# بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره‌های استونی، اتانولی و متانولی برگ چهار رقم زیتون ایرانی بر *اشریشیا کلای*

**مریم عباس‌والی[1*]، محمود اسماعیلی کوتمهر[2]، حمدالله مشتاقی[1]، محمد هادی اسکندری[3]**

۱. گروه بهداشت وکنترل کیفیت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

۲. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

۳. دانشیار بخش صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.

***نویسنده مسئول:** *abbasvali@sci.sku.ac.ir*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۴/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۵/۲۲

## چکیده

هدف از این پژوهش بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره برگ چهار رقم زیتون مهم بومی ایران شامل ارقام دزفول، روغنی، زرد و شیراز بر *اشریشیا کلای* بود. در این مطالعه عصاره استونی، متانولی و اتانولی برگ‌های زیتون به روش مایکروویو استخراج، تغلیظ و خشک شدند. اثر مهاری غلظت‌های مختلف عصاره‌ها به روش میکروپلیت بر رشد باکتری *اشریشیا کلای* در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت با دستگاه پلیت ریدر اندازه‌گیری و منحنی رشد باکتری رسم و مساحت زیر منحنی محاسبه گردید. هم‌چنین درصد مهار رشد باکتری توسط هر یک از عصاره‌ها محاسبه شد. هیچ‌کدام از عصاره‌ها در غلظت ۵ و۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اثر مهاری قابل توجهی نداشتند. عصاره استونی رقم‌های دزفول و زرد در غلظت ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به‌ترتیب ۹۳/۰ و ۹۴/۹ درصد رشد باکتری را مهار کردند که به‌طور معنی‌داری قوی‌تر از عصاره استونی دو رقم دیگر بود. در رقم روغنی عصاره متانولی با ۹۳/۴ درصد مهار به‌طور معنی‌داری اثر قوی‌تری نسبت به عصاره‌های استونی و اتانولی داشت. عصاره اتانولی هر چهار رقم مورد بررسی فاقد اثر ضد میکروبی بود. نتایج به‌دست آمده از این پژوهش نشان داد که از چهار رقم زیتون بومی ایران بیشترین اثر ضد میکروبی متعلق به ارقام دزفول و زرد بوده و مناسب‌ترین حلال نیز استون می‌باشد. لذا برگ زیتون رقم‌های بومی ایران را می‌توان برای تهیه عصاره غنی از ترکیبات ضد میکروبی جهت استفاده به‌عنوان نگهدارنده طبیعی در صنایع غذایی و یا ترکیب ضد میکروبی در پمادها و دیگر داروها به‌کار برد.

**واژگان کلیدی:** اثر ضد میکروبی، *اشریشیا کلای*، مهار رشد، برگ زیتون.

## مقدمه

*اشریشیا کلای* باکتری گرم منفی و عضو خانواده انتروباکتریاسه و یکی از کلیفرم‌های روده‌ای می‌باشد. این باکتری دارای سویه‌های متعددی است که بسیاری از آن‌ها بیماری‌زا نیستند ولی بعضی سویه‌های آن بیماری‌زا بوده و می‌توانند موجب کم خونی، نارسایی کلیه، اسهال خونی و حتی مرگ شوند (Varnam and Evans, 1996). در بسیاری از استانداردهای جهانی به‌عنوان شاخص آلودگی مدفوعی مواد غذایی معرفی شده‌اند (Jay et al., 2006).

شمار انسان‌هایی که ترجیح می‌دهند غذای طبیعی و با کم-ترین مقدار ممکن نگهدارنده مصرف نمایند رو به افزایش است. به‌این جهت استفاده از ترکیبات طبیعی از جمله اسانس و عصاره گیاهان به‌منظور حفظ سلامت و افزایش ماندگاری مواد غذایی فزونی یافته است. از سوی دیگر استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها، اصلی‌ترین روش درمان در عفونت‌های باکتریایی می‌باشد، ولی به‌دلیل افزایش روزافزون مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها و وجود عوارض جانبی آن‌ها، کاربرد یک روش کمکی برای درمان این عفونت‌ها اهمیت ویژه‌ای یافته است. امروزه، استفاده از عصاره‌های گیاهی برای درمان کمکی عفونت‌های میکروبی، توجه بسیاری از پژوهشگران را به خود معطوف کرده است. یکی از این عصاره‌ها، عصاره برگ زیتون (*Olea europaea*) است. برگ زیتون یکی از فراوان‌ترین محصولات جانبی باغات زیتون می‌باشد و منبع مهم، در دسترس و ارزانی از ترکیبات فعال زیستی طبیعی محسوب می‌گردد (Rahmanian et al., 2015). زیتون درختچه‌ای است از تیره Oleaceae با برگ‌های سبز دائمی که به حالت وحشی، ارتفاعی در حدود ۵ متر یا اندکی بیشتر دارد. قسمت مورد استفاده درخت زیتون میوه و برگ آن است. برگ‌های آن دارای وضعیت متقابل بر روی ساقه و ظاهر بیضوی دراز، نوک تیز، چرمی به رنگ سبز روشن و زیبا، در سطح فوقانی پهنک است ولی سطح تحتانی پهنک، رنگ روشن‌تری دارد.

برگ زیتون به‌دلیل داشتن محتوای غنی فنولی یکی از منابع قوی پلی‌فنول‌های گیاهی می‌باشد که دارای خاصیت آنتی-اکسیدانی، ضدمیکروبی، ضدویروسی و ضدتوموری است (Pereira et al., 2007; Sudjana et al., 2009; Aytul 2010; Kiritsakis et al., 2010; Zafar and Filiz, 2010; Brahmi et al., 2012; Bulotta et al., 2013; Casaburi et al., 2013; Garcia-Villalba et al., 2013; Bulotta et al., 2014; Gökmen et al., 2014).

ترکیبات شیمیایی برگ زیتون تحت تاثیر عوامل متعددی از جمله رقم زیتون، شرایط اقلیمی محل کشت، سن درخت (Niaounakis and Halvadakis, 2006)، عملیات باغداری، ژنتیک، چرخه زیستی درخت و نحوه عصاره‌گیری می‌باشد (Fares et al., 2011).

ایران یکی از بزرگترین مناطق تولید زیتون در دنیا می‌باشد و باغات زیتون کشور بالغ بر یک صد هزار هکتار می‌باشد (Noormohammadi et al., 2014 ). در مناطق مختلف کشور با توجه به شرایط اقلیمی رقم‌های مختلفی کشت می-شود. رقم‌های زرد و روغنی متداول‌ترین انواع کشت شده در ایران می‌باشند. این دو رقم بومی ایران بوده و بیشترین سطح زیر کشت را به خود اختصاص داده‌اند. دزفول یک رقم دو منظوره بوده که هم برای روغن‌کشی و هم برای تهیه کنسرو پرورش داده می‌شود. این رقم بومی مناطق گرمی مثل خوزستان و فارس می‌باشد. رقم شیراز بومی فارس بوده و چهارمین رقم زیر کشت از نظر سطح زیر کشت می‌باشد. این رقم برای کشت در مناطق گرم و خشک بسیار مناسب می‌باشد (Dastkar et al., 2013).

با توجه به تولید مقدار زیادی برگ زیتون که منبعی ارزان و در دسترس از ترکیبات فنولی می‌باشد این مطالعه طراحی گردید. هدف از این پژوهش بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره برگ چهار رقم مهم بومی ایران شامل ارقام زرد و روغنی با بیشترین سطح زیر کشت در کشور و ارقام شیراز و دزفول، فراوانترین ارقام زیر کشت در منطقه جنوب کشور بر علیه *اشریشیا کلای* بود.

## مواد و روش کار

### استخراج عصاره برگ زیتون

برگ زیتون ارقام دزفول، روغنی، زرد و شیراز در شهریور ماه از باغ تحقیقات زیتون بنیاد جانبازان شیراز برداشت شد. برگ‌ها در سایه خشک و با استفاده از آسیاب پودر گردیدند.

عصاره برگ‌های پودر شده با سه حلال استون، اتانول و متانول ۸۰ درصد با pH برابر ۲، اسیدی شده با اسید کلریدریک به‌روش مایکرویو استخراج شدند (Abbasvali et al., 2015). به‌منظور خروج حلال و خشک کردن عصاره‌ها، از دستگاه دوار تبخیر در خلاء (Rotary evaporator) استفاده شد و عصاره‌ها تغلیظ شده با دستگاه خشک‌کن انجمادی (Freeze dryer) خشک شدند و تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

در هنگام پژوهش غلظت ۴۰ میلی‌گرم در میلی لیتر از عصاره‌های خنثی شده با سود ۰/۱ نرمال (pH برابر ۷) تهیه گردید و با فیلتر ۰/۲ میکرون یک بار مصرف سترون گردید.

آماده سازی سوش باکتریایی و ارزیابی اثر مهاری عصاره‌ها به روش میکروپلیت

در این پژوهش از باکتری *اشریشیا کلای* (ATCC 35218) استفاده شد. این باکتری از گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی شیراز تامین شد. سوش باکتری پس از کشت در محیط TSB (مرک، آلمان) و گرمخانه‌گذاری به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در محیط مک کانکی آگار (مرک آلمان) کشت و ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. روز قبل از آزمایش یک کلونی خالص از باکتری برداشته شد و به محیط TSB اضافه گردید، پس از یک شب گرمخانه‌گذاری، کدورت سوسپانسیون باکتری معادل استاندارد ۴ مک فارلند و تعداد باکتری آن حدود ۹ لوگاریتم واحد تشکیل دهنده کلونی در هر میلی لیتر بود. در روز آزمایش با استفاده از سرم فیزیولوژی سترون رقت مورد نیاز از سوسپانسیون باکتری تهیه می‌شد.

از عصاره‌های سترون شده در پلیت‌های مخصوص ۹۶ خانه‌ای، رقت متوالی دو دویی (Two-fold serial dilution) در محیط کشت TSB تهیه شد. سپس به هر چاهک مقدار ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری افزوده و غلظت نهایی باکتری در هر چاهک ۶ لوگ واحد تشکیل دهنده کلونی در هر میلی لیتر گردید (Abbasvali et al., 2015). هم‌زمان برای هر آزمایش کنترل‌های لازم در نظر گرفته شد. غلظت‌های ۲۰، ۱۰ و ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر هر عصاره مورد آزمایش قرار گرفت و هر تیمار سه بار تکرار گردید.

پلیت‌ها بلافاصله پس از آماده شدن در دستگاه پلیت ریدر (Bio Tek, PowerWave XS2, USA) قرار داده شدند و دمای دستگاه روی ۳۷ درجه سانتی‌گراد تنظیم گردید و میزان جذب نور هر چاهک در طول موج ۶۰۰ نانومتر و در فاصله‌های زمانی یک ساعت تا مدت ۲۴ ساعت ثبت گردید. دستگاه طوری تنظیم می‌شد که قبل از هر بار قرائت محتویات چاهک‌ها به مدت ۸ ثانیه به هم زده شوند.

بر اساس داده‌های دستگاه منحنی رشد باکتری در مدت ۲۴ ساعت رسم گردید و مساحت زیر منحنی محاسبه گردید و در مقایسه با سطح زیر منحنی کنترل مثبت، درصد سطح زیر منحنی محاسبه گردید (Tiina and Sandholm, 1989). هم‌چنین با استفاده از فرمول زیر درصد مهار رشد هر یک از عصاره‌ها محاسبه گردید (Casey et al., 2004).

$$\text{درصد مهار رشد} = \frac{(O-E)}{O} \times ۱۰۰$$

O = جذب کنترل مثبت در ساعت ۲۴ منهای جذب در ساعت صفر.

E = جذب نمونه حاوی عصاره و باکتری در ساعت ۲۴ منهای جذب در ساعت صفر.

## تجزیه و تحلیل آماری

در این پژوهش، تیمارها در سه تکرار انجام شدند. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار SPSS 16 انجام گرفت و نتایج به‌دست آمده با استفاده از روش آنالیز واریانس مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ($P <$ ۰/۰۵) انجام شد.

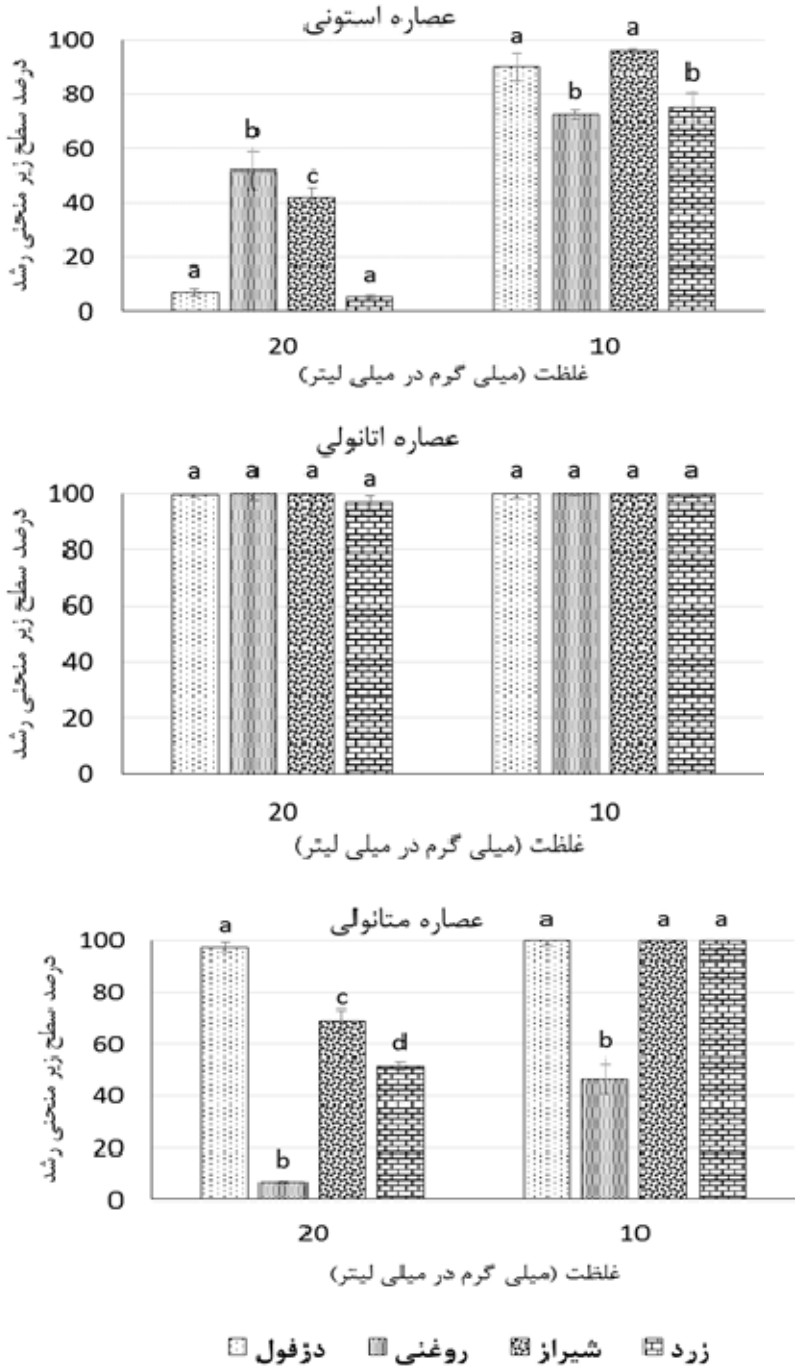
## نتایج

درصد سطح زیر منحنی رشد باکتری *اشریشیا کلای* در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در مدت ۲۴ ساعت تحت تاثیر ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره استونی، اتانولی و متانولی برگ چهار رقم زیتون در نمودار ۱ آورده شده است. همان طور که مشاهده می‌شود در غلظت ۱۰میلی گرم عصاره‌ها تقریباً اثر مهاری قابل توجهی نداشتند و در غلظت ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نیز عصاره‌های اتانولی کاملاً بی‌اثر بودند.

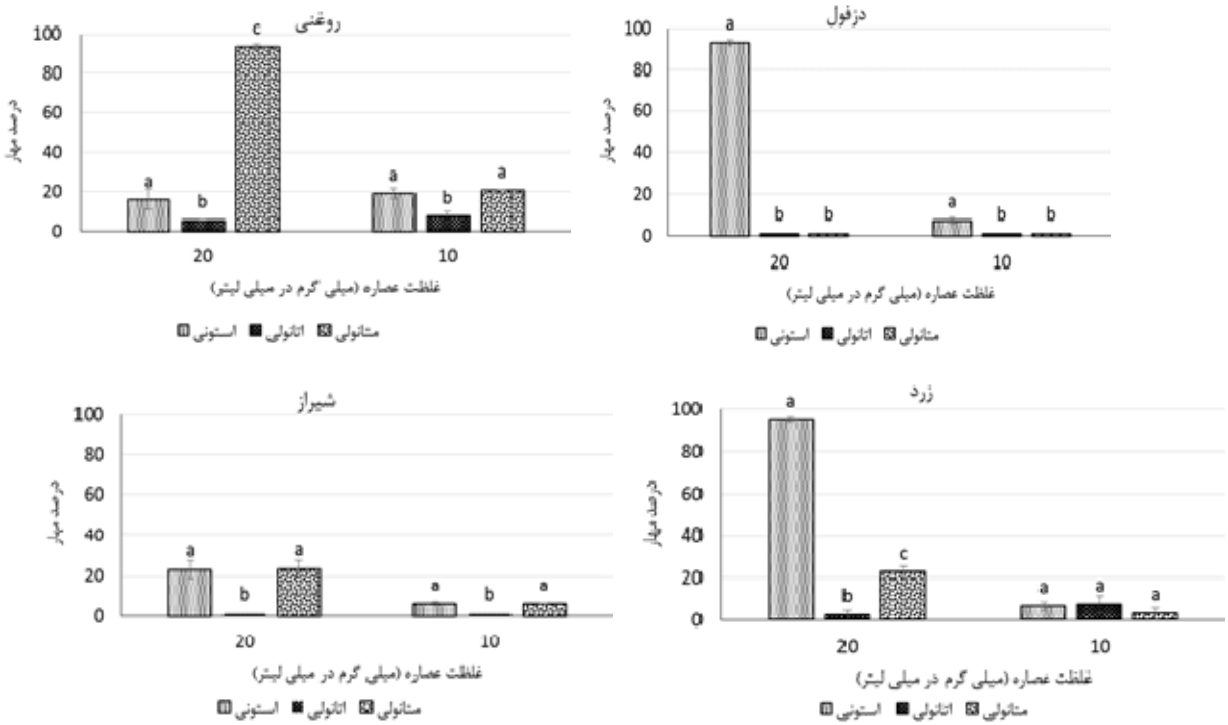
درصد سطح زیر منحنی رشد عصاره‌های استونی رقم‌های دزفول، روغنی، زرد و شیراز به ترتیب ۱/۳± ۷/۱، ۶/۸ ±۵۱/۹، ۰/۶± ۵/۴ و ۳/۹ ± ۴۱/۸ بود. درصد سطح زیر منحنی رقم‌های دزفول و زرد به‌طور معنی‌داری کمتر از دو رقم دیگر بود که نشانگر اثر مهاری بیشتر عصاره استونی این دو رقم بر رشد باکتری *اشریشیا کلای* بود (نمودار ۱).

درصد سطح زیر منحنی عصاره متانولی رقم روغنی در غلظت ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر ۰/۲ ± ۶/۷ بود که به طور معنی‌داری از سه رقم دیگر کمتر بود (نمودار ۱).

در این پژوهش مهار رشد باکتری *اشریشیا کلای* توسط عصاره‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت و منحنی رشد باکتری در مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد رسم گردید و میانگین درصد مهار رشد هر عصاره بعد از ۲۴ ساعت محاسبه گردید. هیچکدام از عصاره-ها در غلظت ۱۰ و ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اثر مهاری قابل توجهی نداشتند. عصاره استونی رقم‌های دزفول و زرد در غلظت ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به ترتیب ۱/۴ ±۹۳/۰ و ۱/۲ ± ۹۴/۹ درصد رشد باکتری را مهار کردند که به طور معنی‌داری قوی‌تر از عصاره استونی دو رقم دیگر بود. در رقم روغنی عصاره متانولی با درصد مهار ۱/۵± ۹۳/۴ به طور معنی‌داری اثر قوی‌تری نسبت به عصاره‌های استونی و اتانولی داشت. عصاره‌های استونی و اتانولی در غلظت ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اثر مهاری قابل توجهی نداشتند (نمودار ۲). درصد مهار رشد باکتری توسط عصاره‌های استونی، اتانولی و متانولی رقم شیراز در غلظت ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به ترتیب ۴/۵ ± ۲۳/۱، ۳/۲ ± ۱/۰ و ۴/۴ ± ۲۳/۴ بود که اثر قابل توجهی قلمداد نمی‌گردد (نمودار ۲). بر اساس یافته‌های این پژوهش عصاره‌های اتانولی برگ چهار رقم زیتون مورد مطالعه در غلظت ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اثر مهاری کمتر از ۴ درصد داشت (نمودار ۲).




نمودار ۱- درصد سطح زیر منحنی رشد باکتری اشریشیا کلای تحت تاثیر غلظت مختلف عصاره‌های استونی، اتانولی و متانولی برگ چهار رقم زیتون زرد، شیراز، روغنی و دزفول در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در مقایسه با منحنی رشد گروه کنترل. حروف غیر مشابه نشانگر تفاوت آماری معنی‌دار می‌باشد ($P<0/05$).




نمودار ۲- درصد مهار رشد غلظت‌های مختلف عصاره‌های استونی، اتانولی و متانولی برگ چهار رقم زیتون بر باکتری اشریشیا کلای در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد. حروف غیر مشابه نشانگر تفاوت آماری معنی‌دار می‌باشد (P< ۰/۰۵ ).

## بحث

نتایج این پژوهش نشان داد که عصاره برگ زیتون ارقام دزفول، روغنی، زرد و شیراز استخراج شده با استون، اتانول و متانول اثر مهاری متفاوتی بر *اشریشیا کلای* داشتند. در این مطالعه عصاره متانولی رقم روغنی و عصاره استونی ارقام دزفول و زرد نسبت به دیگر ارقام مورد بررسی بیشترین اثر ضد میکروبی را بر *اشریشیا کلای* نشان دادند و عصاره اتانولی هر چهار رقم مورد بررسی فاقد اثر ضد میکروبی بود.

رفیعی و همکاران (۱۳۸۹) در مطالعه‌ای تاثیر رقم زیتون را بر ویژگی ضد میکروبی عصاره برگ‌های آن بررسی نمودند. بین ارقام مورد مطالعه آن‌ها (کرونایکی، روغنی و میشن) بیشترین فعالیت ضدمیکروبی مربوط به رقم کرونایکی گزارش گردید (رفیعی و همکاران، ۱۳۸۹). مارکین و همکاران (۲۰۰۳) در مطالعه‌ای اثر ضد میکروبی غلظت ۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره آبی برگ زیتون را بر مهار رشد *اشریشیا کلای* نشان دادند (Markin et al., 2003).

عزیزاللهی علی‌آبادی و همکاران (۲۰۱۲) اثر ضد میکروبی عصاره آبی برگ زیتون را بر مهار رشد پنج باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس*، *باسیلوس سرئوس*، *سالمونلا تیفی موریوم*، *اشریشیا کلای* و *کلبسیلا نومونیا* مورد بررسی قرار دادند. آنها بیان داشتند که عصاره آبی بیشترین اثر را در مهار رشد *سالمونلا تیفی‌موریوم* دارد ( Azizollahi Aliabadi et al., 2012).

در این پژوهش عصاره استونی رقم‌های دزفول، زرد و شیراز بیشتر از عصاره‌های اتانولی و متانولی اثر ضد میکروبی

داشتند. این یافته با نتایج تحقیقات کروکلوگلا و همکاران (۲۰۱۰) مطابقت دارد. آنها دلیل این امر را وجود مقدار قابل توجه اولئوروپین در عصاره استونی و حلالیت بهتر آن در استون بیان نمودند (Korukluoglu et al., 2010). یافته-های محققین دیگر نیز نشان دهنده اثر ضد میکروبی بیشتر عصاره استونی برگ زیتون بر باکتری‌های گرم منفی در مقایسه با عصاره‌های اتانولی و متانولی می‌باشد (Abbasvali et al., 2015b; Faiza et al., 2011). رفیعی و همکاران (۱۳۹۱) نشان دادند که روش استخراج و نوع حلال بر میزان ترکیبات فنولی موجود در عصاره و در نتیجه اثر ضد میکروبی آن تاثیر دارد. در مطالعه آن‌ها عصاره متانولی استخراج شده به کمک مایکروویو بیشترین میزان ترکیبات فنولی و کمترین غلظت کشندگی در برابر *اشریشیا کلای* و *استافیلوکوکوس آرئوس* را به خود اختصاص داد (رفیعی و همکاران، ۱۳۹۱).

برگ زیتون یک منبع طبیعی غنی از ترکیبات فنولی می‌باشد که اثرات ضد میکروبی آن در تحقیقات تایید شده‌اند. برگ زیتون دارای ترکیبات زیست فعال ارزشمندی همچون فلاونوئیدها، کافئیک اسید، تانن‌ها (Samet et al., 2014)، اولئوروپین (Oleuropein)، راتین (Rutin)، تیروزول (Tyrosol) و هیدروکسی تیروزول (Hydroxytyrosol) می‌باشد این ترکیبات اثرات ضدمیکروبی قابل توجهی دارند (Rahmanian et al., 2015).

اثر بازدارندگی ترکیبات فنولی را می‌توان به ویژگی جذب سطحی به غشاهای سلولی و اختلال در عملکرد آن، واکنش با آنزیم‌ها، سوبستراها و جلوگیری از دسترسی سلول به یون های فلزی مرتبط دانست (Duman et al., 2009). میزان ترکیبات فنولی موجود در برگ زیتون تحت تاثیر عوامل مختلفی از قبیل رقم زیتون، شرایط آب و هوایی، سن گیاه (Niaounakis and Halvadakis 2006) و روش‌های استخراج (Fares et al., 2011) قرار می‌گیرد. نوع حلال به کار رفته جهت استخراج نیز بر میزان ترکیبات فنولی و همچنین ویژگیهای ضد میکروبی عصاره‌ها اثر دارد (Korukluoglu et al., 2010).

لی و همکاران (۲۰۰۹) بیان داشتند که عصاره برگ زیتون می‌تواند به عنوان یک افزودنی غذایی فراسودمند و منبع بسیار خوبی از ترکیبات فنولی که دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی قابل توجهی است مورد استفاده قرار گیرد. نتایج پژوهش آنها نشان داد که اُلئوروپین موجود در برگ زیتون اثر مهاری قوی بر رشد باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* داشته و اسید کافئیک موجود در عصاره برگ زیتون به ترتیب اثر مهاری خوبی بر رشد *اشریشیا کولای* و *سالمونلا انتریتیدیس* داشت (Lee et al., 2009).

در این مطالعه با توجه به نتایج به‌دست آمده از ارزیابی اثر ضد باکتریایی عصاره‌های ارقام مختلف برگ زیتون استخراج شده با حلال‌های متفاوت بر مهار رشد *اشریشیا کولای* می‌توان نتیجه گرفت که اثرات ضد میکروبی عصاره برگ زیتون تحت تاثیر ارقام زیتون و حلال مورد استفاده می-باشند و در بین این چهار رقم بومی ایران بیشترین اثر متعلق به دزفول و زرد بوده و مناسب‌ترین حلال نیز استون می‌باشد. بهترین حلال رقم روغنی برای استخراج ترکیبات ضد میکروبی نیز متانول می‌باشد. اتانول حلال مناسبی برای استخراج ترکیبات ضد میکروبی از برگ زیتون نمی‌باشد.

نتایج بدست آمده از این مطالعه نشان داد که برگ زیتون رقم‌های بومی ایران را می‌توان برای تهیه عصاره غنی از ترکیبات ضد میکروبی جهت استفاده به عنوان یک نگهدارنده طبیعی در صنایع غذایی و یک ترکیب ضد میکروبی طبیعی در کرم‌ها، پمادها و دیگر داروها به کار برد.

## تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله تشکر خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه شهرکرد به خاطر حمایت‌های مالی این تحقیق اعلام می‌دارند. همچنین از بنیاد جانبازان فارس به جهت تامین برگ زیتون از باغ تحقیقات زیتون شیراز، جناب آقای مهندس جعفری مسئول طرح زیتون سازمان جهاد کشاورزی استان فارس به جهت شناسایی ارقام زیتون، جناب آقای دکتر محمد تقی گلمکانی استادیار محترم بخش صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز به جهت همکاری در عصاره‌گیری با مایکروویو و جناب آقای دکتر شهرام شکرفروش استاد محترم گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز به جهت همکاری در انجام آزمایش‌های میکرودیلوشن قدردانی می‌گردد.

## منابع

۱. رفیعی، زهرا.، جعفری، سید مهدی.، اعلمی، مهران و خمیری، مرتضی. (۱۳۹۱). ارزیابی فعالیت ضد میکروبی عصاره برگ زیتون (*Olea Europaea* L.) رقم زراعی میشن به روش الیزا. فصلنامه علمی- پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، جلد ۲۸، شماره ۲، صفحات ۲۹۲-۲۸۰.

۲. رفیعی، زهرا.، جعفری، سید مهدی.، خمیری، مرتضی و اعلمی، مهران. (۱۳۸۹). تاثیر واریته و روش استخراج بر ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی عصاره برگ‌های زیتون. نشریه پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران، جلد ۶، شماره ۴، صفحات ۳۰۷-۲۹۷.

3. Abbasvali, M., Esmaeili Koutamehr, M., Moshtaghi, M. and Eskandari, M.H. 2015a. Antibacterial effect of leaf extract of four olive (*Olea europaea*) cultivars on *Staphylococcus aureus.* Onl J Vet Res. 19 (8): 519-529.

4. Abbasvali, M., Esmaeili Koutamehr, M., Moshtaghi, M., and Eskandari, M.H. 2015b. In-vitro antibacterial activity of olive leaf extract of four Iranian caltivars against *Salmonella* Typhimurium. Onl J Vet Res. 19 (9): 632-641.

5. Aytul, K.K. 2010. Antibacterial and antioxidant activities of olive leaf extract and its food applications. Turkey, MSc. Thesis, Graduate School of Engineering and Sciences of Izmir Institute of Technology.

6. Azizollahi Aliabadi, M., Kazemi Darsanaki, R., Laleh Rokhi, M., Nourbakhsh, M., and Raeisi, G. 2012. Antimicrobial activity of olive leaf aqueous extract. Ann Biol Res. 3(8): 4189-4191.

7. Brahmi, F., Mechri, B., Dabbou, S., Dhibi, M., and Hammami, M. 2012. The efficacy of phenolics compounds with different polarities as antioxidants from olive leaves depending on seasonal variations. Ind Crop Prod. 38: 146-152.

8. Bulotta, S., Corradino, R., Celano, M., Maiuolo, J., D'Agostino, M., Oliverio, M., Procopio, A., Filetti, S., and Russo, D. 2013. Antioxidant and antigrowth action of peracetylated oleuropein in thyroid cancer cells. J Mol Endocrinol. 51: 181-189.

9. Bulotta, S., Celano, M., Lepore, S.M., Montalcini, T., Pujia, A., and Russo, D.

15. Fares, R., Bazzi, S., Baydoun, S.E., and Abdel-Massih, R.M. 2011. The antioxidant and anti-proliferative activity of the lebanese *olea europaea* extract. Plant Food Hum Nutr. 66: 58-63.

16. Garcia-Villalba, R., Larrosa, M., Possemiers, S., Tomas-Barberan, F.A., and Espin, J.C. 2013. Bioavailability of phenolics from an oleuropein-rich olive (*Olea europaea*) leaf extract and its acute effect on plasma antioxidant status: comparison between pre- and post-menopausal women. Eur J Nutr. 53: 1015-1027.

17. Gökmen, M., Kara, R., Akkaya, L., Torlak, E., and Önen, A. 2014. Evaluation of antibacterial activity in olive (*olea europaea*) leaf extract. Am J Microbiol. 5 (2): 37-40.

18. Jay, J.M., Loessner, M.J., and Golden, D.A. 2006. Modern Food Microbiology, 7th edition. Springer, New York.

19. Kiritsakis, K., Kontominas, M.G., Kontogiorgis, C., Hadjipavlou-Litina, D., Moustakas, A., and Kiritsakis, A. 2010. Composition and antioxidant activity of olive leaf extracts from Greek olive cultivars. J Am Oil Chem Soc. 87: 369-376.

20. Korukluoglu, M., Sahan, Y., Yigit, A., Ozer, E.T., and Gucer, S. 2010. Antibacterial activity and chemical constitutions of *olea europaea* L. leaf extracts. J Food Process Pres. 34: 383-396.

2014. Beneficial effects of the olive oil phenolic components oleuropein and hydroxytyrosol: focus on protection against cardiovascular and metabolic diseases. J Transl Med. 12 (1): 219.

10. Casaburi, I., Puoci, F., Chimento, A., Sirianni, R., Ruggiero, C., Avena, P., and Pezzi, V. 2013. Potential of olive oil phenols as chemopreventive and therapeutic agents against cancer: a review of in-vitro studies. Mol Nutr Food Res. 57: 71-83.

11. Casey, J., O'Cleirigh, C., Walsh, P., and O'Shea, D. 2004. Development of a robust microtiter plate-based assay method for assessment of bioactivity. J Microbiol Meth. 58: 327-334.

12. Dastkar, E., Soleimani, A., Jafary, H., and Naghavi, M.R. 2013. Genetic and morphological variation in Iranian olive (*Olea europaea L.*) germplasm. Crop Breed J. 3(2): 99-106.

13. Duman, A.D., Ozgen, M., Dayisoylu, K.S., Erbil, N., and Durgac, C. 2009. Antimicrobial activity of six pomegranate (*Punica granatum* L.) varieties and their relation to some of their pomological and phytonutrient characteristics. Molecules. 14(5): 1808-1817.

14. Faiza, I., Wahiba, K., Nassira, G.r., Chahrazed, B., and Atik, B.F. 2011. Antibacterial and antifungal activities of olive (*Olea europaea* L.) from Algeria. J Microbiol Biotechn Res. 1(2): 69-73.

21. Lee, O.H., Lee, B.Y., Lee, J., Lee, H.B., Son, J.Y., Park, C.S., Shetty, K., and Kim, Y.C. 2009. Assessment of phenolics-enriched extract and fractions of olive leaves and their antioxidant activities. J Bioresour Technol. 100 (23): 6107–6113.
22. Markin, D., Duek, L., and Berdicevsky, I. 2003. In vitro antimicrobial activity of olive leaves. Mycoses. 46: 132–136.
23. Niaounakis, M., and Halvadakis, C.P. 2006. Olive processing, waste management series voliume 5, 2nd Edition. Elsevier Ltd.
24. Noormohammadi, Z., Trujillob, I., Belaj, A., Ataeid, S., and Hosseini-Mazinand, M. 2014. Genetic structure of Iranian olive cultivars and their relationship with Mediterranean's cultivars revealed by SSR markers. Sci Hortic-Amsterdam. 178: 175–183.
25. Pereira, A.P., Ferreiara, I.C.F.R., Marcelino, F., Valentao, P., Andrade, P.B., Seabra. R., Estevinho, L., Bento, A., and Pereira, J.A. 2007. Phenolic compounds and antibacterial activity of olive (*Olea europaea*) leaves. Molecules. 12: 1153-1162.
26. Rahmanian, N., Jafari, S.M., and Wani, T.A. 2015. Bioactive profile, dehydration, extraction and application of the bioactive components of olive leaves. Trends Food Sci Tech. 42(2): 150–172.
27. Samet, I., Han, J., Jlaiel, L., Sayadi, S., and Isoda, H. 2014. Olive (*Olea europaea*) leaf extract induces apoptosis and monocyte/macrophage differentiation in human chronic myelogenous leukemia K562 cells: insight into the underlying mechanism. Oxid Med Cell Longev. 16 pages.
28. Sudjana, A.N., D'Orazio, C., Ryan, V., Rasool, N., Ng, J., Islam, N., Riley, T.V., and Hammer, K.A. 2009. Antibacterial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. Int J Antimicrob Ag. 33: 461-463.
29. Tiina, M., and Sandholm, M. 1989. Antibacterial effect of the glucose oxidase-glucose system on food-poisoning organisms. Int J Food Microbiol. 8: 165-174.
30. Varnam, A.H., and Evans, M.G. 1996. Foodborne pathogens: an illustrated text. Cornell University: Manson.
31. Zafar, E., and Filiz, I. 2010. The importance and potential uses of olive leaves. Food Rev Int. 26: 319-334.

# Antibacterial activity of acetonic, ethanolic and methanolic olive leaf extracts of four Iranian cultivars against Escherichia coli

**Maryam Abbasvali1[*], Mahmoud Esmaeili Koutamehr[2], Hamdollah Moshtaghi[1]**
**Mohammad Hadi Eskandari[3]**

1. Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.
2. Graduated of M.Sc of Food Science and Technology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.
3. Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.

[*]**Corresponding author email**: *abbasvali@sci.sku.ac.ir*

Accepted: 13 August 2015 Received: 19 July 2015

## Abstract

The aim of this study was to evaluate the antibacterial activity of olive leaf extracts from four important Iranian native cultivars (Dezfol, Roghani, Zard and Shiraz) against E. coli. Acetonic, methanolic and ethanolic olive leaf extracts were prepared using a microwave. The extracts were concentrated and lyophilized. The growth inhibition effect of different concentrations of extracts was determined using the broth micro-dilution assay. The growth curves of E. coli during 24 h incubation at 37°C were drawn. The area under the bacterial growth curve and the percentage inhibition of the growth were calculated. Extracts with the concentrations of 5 and 10 mg/ml had no considerable inhibition effect on the bacterium. Acetonic extract of Dezfol and Zard cultivars with the concentration of 20 mg/ml inhibited the bacterial growth 93% and 94.9%, respectively and showed significantly stronger inhibition effect in comparison with acetonic extract of Shiraz and Roghani cultivars. Methanolic extract of Roghani cultivar with the bacterial growth inhibition of 93.4% showed significantly stronger effect in comparison with its acethonic and ethanolic extracts. Ethanolic extracts of four studied cultivars showed no antibacterial effect. Among the four important Iranian native olive leaf cultivars, Dezfol and Zard were found to possess the highest antimicrobial activity and aceton was the best solvent. On the basis of these results, it can be concluded that extracts of the Iranian native olive leaf cultivars could be used as a natural antimicrobial agent in food preservative, ointment and drugs.

**Keywords:** Antimicrobial effect, Escherichia coli, Growth inhibition, Olive leaf.