مقایسه اثر ضدباکتریایی عصاره برگ چهار رقم زیتون (*Olea europaea*) بر *باسیلوس سرئوس*

مریم عباس والی[1*]، محمود اسماعیلی کوتمهر[2]، حمدالله مشتاقی[3]، محمد هادی اسکندری[4]

۱- استادیار گروه بهداشت و کنترل کیفیت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، ایران
۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، ایران
۳- دانشیار گروه بهداشت و کنترل کیفیت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، ایران
٤- دانشیار بخش صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، ایران
*نویسنده مسئول مکاتبات: abbasvali@sci.sku.ac.ir
(دریافت مقاله: ۹٤/۵/۱۹؛ پذیرش نهایی:۹٤/۷/۷)

چکیده

در سال‌های اخیر عصاره‌های گیاهی به‌عنوان مواد ضدمیکروبی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. یکی از این عصاره‌ها، عصاره برگ زیتون می‌باشد که ویژگی‌های ضدمیکروبی این عصاره به‌دلیل وجود ترکیب‌های فنولی است. در این پژوهش، عصاره برگ چهار رقم زیتون شیراز، زرد، روغنی و دزفول توسط حلال‌های مختلف (استون، متانول و اتانول) و با کمک مایکروویو استخراج شد و اثر ضد باکتریایی آن‌ها بر *باسیلوس سرئوس* (*Bacillus cereus*) به دو روش استاندارد و میکروپلیت مورد بررسی قرار گرفت. کمترین غلظتی از عصاره که موجب مهار رشد باکتری گردیده بود (MIC) برای یازده نمونه از عصاره‌ها برابر با ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد و تنها MIC عصاره متانولی رقم روغنی ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. در این پژوهش منحنی رشد باکتری *باسیلوس سرئوس* تحت تأثیر عصاره‌های برگ زیتون در مدت ۲٤ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس رسم گردید و میانگین درصد مهار رشد هر عصاره بعد از ۲٤ ساعت محاسبه شد. نتایج نشان داد، عصاره متانولی برگ زیتون رقم روغنی با ۹۱/۳ و ۸۷/۸ درصد مهار در غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بیشترین اثر ضدمیکروبی را بر *باسیلوس سرئوس* نسبت به دیگر ارقام مورد بررسی داشت. این مطالعه نشان داد که عصاره برگ زیتون به‌دست آمده از ضایعات ارزان قیمت کشاورزی، می‌تواند به‌عنوان یک منبع ارزشمند از ترکیبات فعال زیستی با خاصیت ضدباکتریایی باشد که قابل استفاده به‌عنوان افزودنی سالم در مواد غذایی است.

واژه‌های کلیدی: اثر ضدمیکروبی، *باسیلوس سرئوس*، مهار رشد، برگ زیتون

مقدمه

باسیلوس سرئوس (*Bacillus cereus*) یک باکتری گرم مثبت، متحرک، هوازی اختیاری و هاگ‌زا است و به‌طور معمول در خاک، گرد و غبار و آب یافت می‌شود. در دمای ۴۸-۱۰ درجه سلسیوس رشد می‌کند و دمای مناسب برای رشد آن بین ۳۵-۲۸ درجه سلسیوس می‌باشد. این باکتری انتشار وسیعی در طبیعت دارد و اغلب از خاک و گیاهان در حال رشد جدا می‌شود. اختلالات گوارشی، استفراغ و اسهال در انسان از عوارض وجود این باکتری در مواد غذایی است (Stenfors Arnesen *et al*., 2008). با توجه به اهمیت *باسیلوس سرئوس* در مواد غذایی یافتن راه‌های کنترل رشد آن حائز اهمیت است. از جمله راه‌های کنترل این میکروارگانیسم‌ها استفاده از مواد نگه‌دارنده می باشد. اما استفاده از مواد نگه‌دارنده در مواد غذایی عوارض جانبی متعددی از جمله تولید متابولیت‌های ثانویه مضر و ایجاد مقاومت میکروارگانیسم‌ها را به‌همراه دارد (مهدی‌زاده و رضوی روحانی، ۱۳۷۸)، لذا در سال‌های اخیر نگه‌دارنده‌های طبیعی از قبیل ادویه‌ها، عصاره گیاهان و اسانس‌ها به‌عنوان افزودنی‌های ایمن غذایی جایگزین استفاده از نگه‌دارنده‌های شیمیایی با عوارض جانبی خطرناک برای مصرف‌کننده، شده‌اند. هدف از استفاده از نگه‌دارنده‌های طبیعی تولید غذایی ایمن است. این افزودنی‌های طبیعی توانایی از بین بردن میکروب‌های بیماری‌زا و مولد فساد را نیز دارند و عمر نگه‌داری محصول را افزایش می‌دهند (Oonmetta-aree *et al*., 2006). یکی از این عصاره‌ها، عصاره برگ زیتون (*Olea europaea*) است. زیتون درختچه‌ای است از تیره Oleaceae با برگ‌های سبز دائمی که به‌حالت وحشی ارتفاعی در حدود ۵ متر دارد. ایران یکی از مهم‌ترین تولیدکننده‌های زیتون در جهان است و در سال‌های اخیر کشت زیتون در ایران در حال گسترش بوده است. رقم‌های متعددی از زیتون در ایران وجود دارد. بیشتر باغ‌های اقتصادی زیتون ایران از ارقام زرد و روغنی محلی تشکیل شده‌اند و ارقام فیشمی، شنگه، دزفول، شیراز، زرد، گلوله و ماری نیز در سطوح کمتری مشاهده می‌گردد (Noormohammadi *et al*., 2014).

برگ زیتون یکی از فراوان‌ترین محصولات جانبی حاصل از کشت زیتون می‌باشد که می‌تواند به‌عنوان منبعی از ترکیبات فعال زیستی طبیعی محسوب گردد (Rahmanian *et al*., 2015). برگ زیتون به‌دلیل داشتن محتوای غنی فنولی یکی از منابع قوی پلی‌فنول‌های گیاهی می‌باشد که دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی و خواص ضدویروسی است (Markin *et al*., 2003; Owen *et al*., 2003; Pereira *et al*., 2007; Sudjana *et al*., 2009; Aytul, 2010). ترکیبات فعال زیستی موجود در برگ زیتون تحت تأثیر فاکتورهای مختلفی از قبیل رقم زیتون، شرایط آب و هوایی، سن گیاه (Niaounakis and Halvadakis, 2006) و روش‌های استخراج آن‌ها (Fares *et al*., 2011) قرار می‌گیرد. الئوروپین (Oleuropein) مهم‌ترین ترکیب فنولی برگ زیتون است. این ترکیب و سایر ترکیب‌های فنولی در عصاره برگ زیتون نظیر اسید پاراهیدروکسی بنزوئیک (P-hydroxybenzoic acid)، اسید فرولیک (Ferulic acid)، اسید کافئیک (Caffeic acid)، اسید وانیلیک (Vanillic acid)، اسید پروتوکاتکوئیک (Protocatechuic acid)، اسید سیرینژیک (Syringic acid)، اسید پاراکوماریک (P-coumaric acid)، کوئرستین (Quercetin)، تیروزول (Tyrosol)،

هیدروکسی تیروزول (Hydroxytyrosol) و اسید النولیک (Elenolic acid) فعالیت ضدمیکروبی دارند (Korukluoglu *et al*., 2010; Brahmi *et al*., 2012; Kiritsakis *et al*., 2010; Zafer and Filiz, 2010).

با توجه به میزان بالای کشت زیتون در ایران و تولید حجم زیادی برگ زیتون که منبعی ارزان و در دسترس از ترکیبات فنولی می‌باشد و تقاضای رو به رشد مصرف‌کنندگان مبنی بر مصرف غذاهای حاوی نگه‌دارنده‌ها و مواد ضدمیکروبی طبیعی، این مطالعه طراحی گردید. هدف از این پژوهش بررسی اثر ضدباکتریایی عصاره‌های مختلف برگ چهار رقم زیتون بر *باسیلوس سرئوس* بود.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی و عصاره‌گیری از برگ‌های زیتون

برگ‌های زیتون ارقام زرد، روغنی، دزفول و شیراز در شهریور ماه از باغ زیتون بنیاد جانبازان در حومه شیراز برداشت شد. برگ‌ها در سایه خشک و با استفاده از آسیاب پودر گردیدند. ترکیبات فنولی موجود در برگ چهار رقم زیتون مذکور به‌وسیله سه حلال متانول، اتانول و استون ۸۰ درصد اسیدی شده با اسید کلریدریک (pH=۲) به نسبت یک به ده (وزنی/ حجمی) استخراج شدند. برای این منظور از یک مایکروویو خانگی (سامسونگ ME3410W، مالزی) که کندانسور به آن اضافه گردیده بود، استفاده شد. بعد از پرتودهی (۱۵ دقیقه، ۲۰۰ وات) و سرد شدن بالن، عصاره حاصل با کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صاف شد. به‌منظور خروج حلال، از دستگاه دوار تبخیر در خلاء (Rotary evaporator) با دمای ٤٠ درجه سلسیوس استفاده شد و عصاره‌ها پس از تغلیظ با دستگاه خشک‌کن انجمادی خشک گردیدند. دوازده نمونه عصاره تهیه شده تا زمان استفاده در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس نگه‌داری شدند (Pan *et al*., 2003).

آماده‌سازی باکتری

در این تحقیق از باکتری *باسیلوس سرئوس* (ATCC 14579) استفاده شد. سوش باکتری در محیط کشت Tryptic Soy Broth (مرک، آلمان) حاوی ۳۰ درصد گلیسیرین در دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگه‌داری می‌شد. در موقع آزمایش سوش در دمای محیط انجمادزدایی شد و پس از کشت در TSB و گرمخانه‌گذاری به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در محیط اختصاصی باسیلوس (*Bacillus cereus* Selective Agar) (مرک، آلمان) کشت و ٢٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شد. روز قبل از آزمایش یک پرگنه خالص از باکتری به محیط Mueller Hinton Broth (مرک، آلمان) انتقال یافت. پس از یک شب گرمخانه‌گذاری، کدورت سوسپانسیون باکتری معادل استاندارد ٤ مک‌فارلند و تعداد باکتری آن حدود ۹ واحد لگاریتمی در هر میلی‌لیتر بود. در روز آزمایش با استفاده از سرم فیزیولوژی استریل رقت مورد نیاز از سوسپانسیون باکتری تهیه شد.

آماده‌سازی عصاره‌ها

جهت تهیه محلول عصاره‌های مورد آزمایش، مقدار ٢/٤ گرم پودر خشک شده از هر یک از عصاره‌های برگ زیتون به دقت وزن گردید و به یک استوانه مدرج به حجم ۵۰ میلی‌لیتر انتقال یافت. سپس مقداری آب مقطر به آن افزوده و به‌خوبی مخلوط گردید. بعد از

قرارگیری الکترود pH متر در داخل استوانه مدرج، با افزودن سود ۰/۱ نرمال pH روی ۷ تنظیم گردید. حجم مخلوط با آب مقطر به ۳۰ میلی‌لیتر رسانده شد. در این حالت عصاره‌ای با غلظت ۸ درصد (یا ۸۰ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر) تهیه گردید. عصاره به‌دست آمده ابتدا با فیلتر ۰/۸ میکرون و مجدداً جهت استریل‌سازی با فیلتر ۰/۲ میکرون صاف گردید. در نهایت عصاره تا زمان انجام آزمایش‌های بعدی در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس و دور از نور) نگه‌داری شد.

ارزیابی اثر مهاری عصاره‌ها به روش استاندارد (Broth dilution-method)

برای هر عصاره ۳ سری ۷ تایی لوله آزمایش استریل انتخاب گردید. لوله‌های ۱ تا ۷ جهت رقیق‌سازی سری و ۳ لوله نیز برای کنترل‌ها که شامل یک لوله حاوی ۱ میلی‌لیتر محیط کشت Mueller Hinton Broth (کنترل محیط کشت)، لوله دوم حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره و ۰/۵ میلی‌لیتر محیط کشت با غلظت دو برابر (٤٢ گرم در لیتر) (کنترل منفی) و لوله سوم حاوی ۱ میلی‌لیتر محیط کشت و ۱۰ میکرولیتر باکتری (کنترل مثبت) بود. در لوله اول مقدار ۱ میلی‌لیتر محیط کشت با غلظت دو برابر ریخته شد و به ٦ لوله بعدی ۱ میلی‌لیتر محیط کشت با غلظت متعارف (۲۱ گرم در لیتر) انتقال یافت. سپس ۱ میلی‌لیتر از عصاره ۸ درصد استریل شده به لوله اول اضافه گردید و به‌خوبی مخلوط شد، سپس ۱ میلی‌لیتر برداشته و به لوله دوم اضافه گردید. این کار تا لوله هفتم ادامه یافت، در پایان ۱ میلی‌لیتر از لوله آخر دور ریخته شد و حجم تمامی لوله‌ها برابر گردید. در این حالت غلظت عصاره از لوله اول تا هفتم به‌ترتیب ٤٠، ۲۰، ۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵ و ۰/٦۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. سپس به همه لوله‌ها ده میکرولیتر از سوسپانسیون *باسیلوس سرئوس* با غلظت ۸ واحد لگاریتمی در هر میلی‌لیتر افزوده شد (غلظت نهایی باکتری ٦ واحد لگاریتمی در هر میلی‌لیتر) و پس از ٢٤ ساعت گرمخانه‌گذاری در ۳۷ درجه سلسیوس، نتایج مورد ارزیابی قرار گرفتند. رقیق‌ترین لوله‌ای که کدورت نداشت و رشد باکتری مشاهده نمی‌شد، به عنوان MIC (کمترین غلظتی از عصاره که موجب مهار رشد باکتری گردیده بود) مد نظر قرار گرفت.

ارزیابی اثر مهاری عصاره‌ها به روش میکروپلیت

از عصاره‌های استریل شده در پلیت‌های مخصوص ۹٦ خانه‌ای، رقت متوالی دو دویی (Two-fold serial dilution) در محیط کشت Mueller Hinton Broth در حجم ۱۰۰ میکرولیتر تهیه شد. به این صورت که در چاهک اول ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت با غلظت دو برابر و در چاهک‌های بعدی ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت با غلظت متعارف ریخته شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره استریل شده با غلظت ۸۰ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر به چاهک اول اضافه و همگن گردید و رقت‌سازی تا رسیدن به رقت‌های مورد نظر از عصاره‌ها ادامه یافت. در پایان ۱۰۰ میکرولیتر از محتویات آخرین چاهک دور ریخته شد. سپس به هر چاهک مقدار ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون *باسیلوس سرئوس* با غلظت ۷ واحد لگاریتمی در هر میلی لیتر انتقال یافت. در این صورت غلظت نهایی باکتری در هر چاهک، ٦ واحد لگاریتمی در هر میلی‌لیتر گردید (CLSI, 2006). هم‌زمان برای هر آزمایش سه کنترل به‌شرح زیر در نظر گرفته شد: کنترل منفی حاوی ۵۰ میکرولیتر عصاره و ۵۰ میکرولیتر محیط کشت با غلظت دو برابر؛ کنترل

محیط کشت حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت و کنترل مثبت، حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت و ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری. غلظت‌های ٤٠، ۲۰، ۱۰، ۵ و ۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر هر عصاره مورد آزمایش قرار گرفت.

میکروپلیت ها بلافاصله پس از آماده شدن در دستگاه پلیت ریدر (Bio Tek, PowerWave XS2, USA) قرار داده شدند و دمای دستگاه روی ۳۷ درجه سلسیوس تنظیم گردید و میزان جذب نور هر چاهک در طول موج ٦۰۰ نانومتر و در فاصله‌های زمانی یک ساعت تا مدت ٢٤ ساعت ثبت گردید. دستگاه طوری تنظیم می‌شد که قبل از هر بار قرائت محتویات چاهک‌ها به مدت ۸ ثانیه به هم زده شوند. سپس علاوه بر رسم منحنی رشد باکتری در مدت ٢٤ ساعت تحت تأثیر غلظت‌های ۲۰، ۱۰ و ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره-های استونی، متانولی و اتانولی برگ چهار رقم زیتون، 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 نوری کنترل مثبت در ساعت ٢٤ منهای جذب در ساعت صفر

E = جذب نمونه حاوی عصاره و باکتری در ساعت ٢٤ منهای جذب در ساعت صفر

آنالیز آماری

مطالعه در سه تکرار انجام شد و نتایج به‌دست آمده با استفاده از روش آنالیز واریانس (ANOVA) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ($p <$ ۰/۰۵) انجام شد. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار (SPSS 16 for windows, SPSS Inc., SPSS Chicago, IL, USA) انجام گرفت.

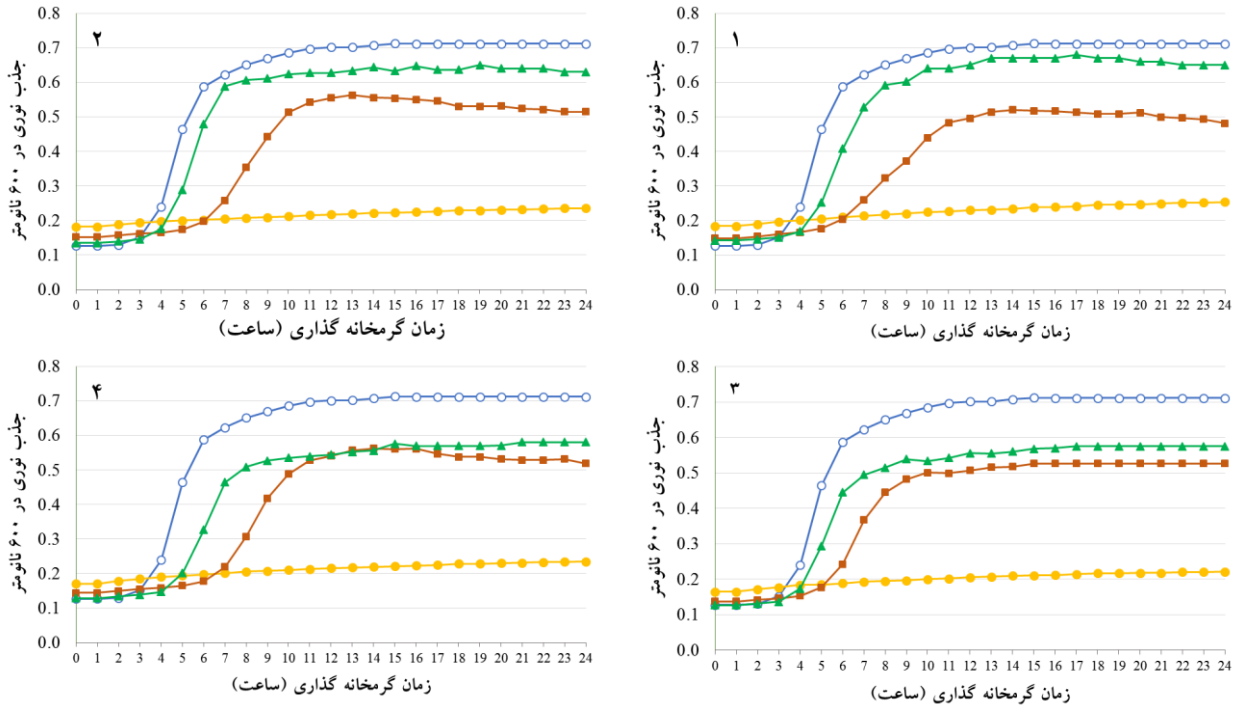
یافته‌ها

نتایج ارزیابی مهار رشد باکتری *باسیلوس سرئوس* توسط عصاره‌ها به روش استاندارد

مطابق نتایج به‌دست آمده، MIC یازده نمونه از عصاره‌ها برابر با ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تعیین گردید و تنها عصاره متانولی رقم روغنی MIC برابر با ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود.

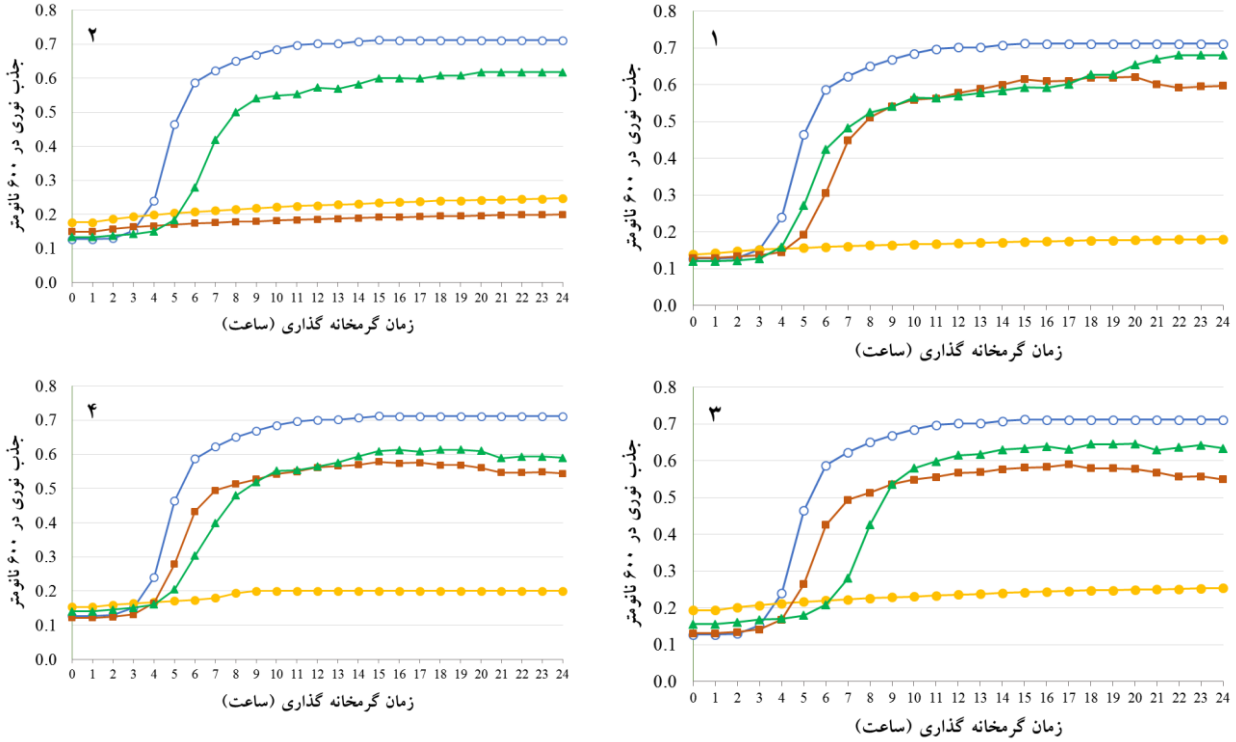
نتایج ارزیابی مهار رشد باکتری *باسیلوس سرئوس* توسط عصاره‌ها به روش میکروپلیت

نمودار (۱) اثر غلظت‌های مختلف عصاره استونی برگ چهار رقم زیتون بر مهار رشد باکتری *باسیلوس سرئوس* را نشان می‌دهد.



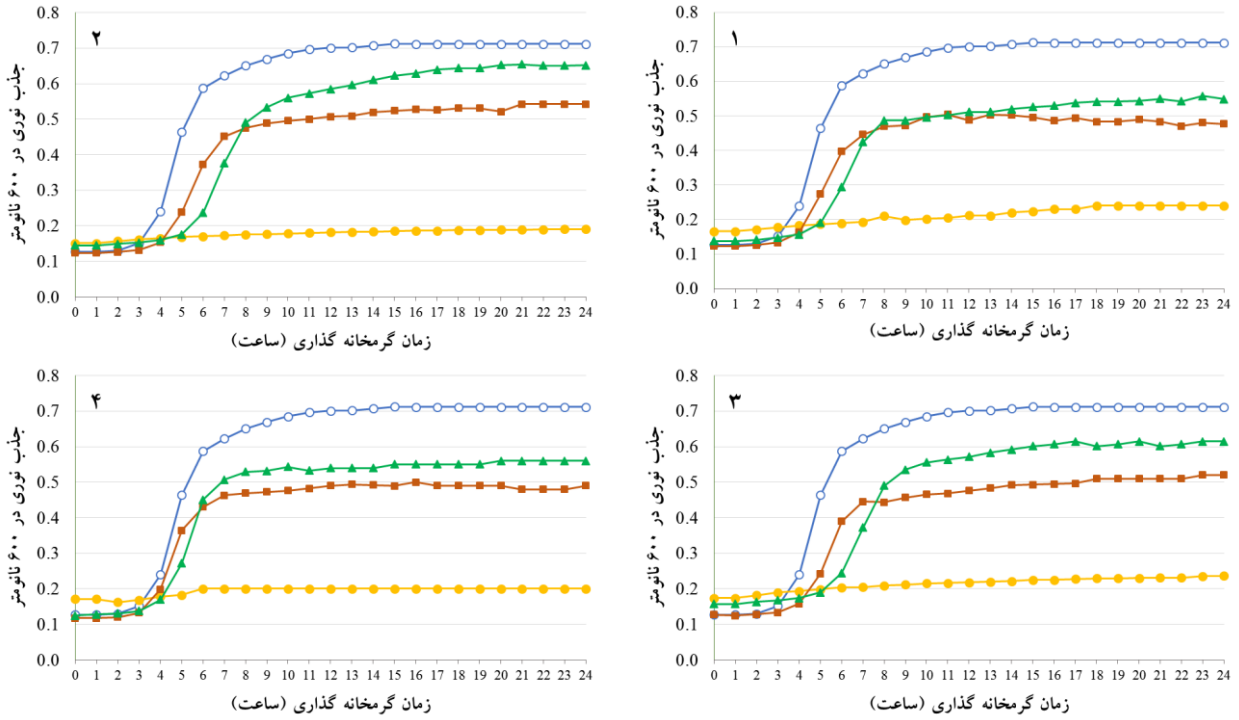
نمودار (۱)- اثر غلظت‌های مختلف عصاره استونی برگ چهار رقم زیتون بر مهار رشد باکتری *باسیلوس سرئوس* در دمای ۳۷ درجه سلسیوس. ۱- رقم دزفول، ۲- رقم روغنی، ۳- رقم زرد، ٤- رقم شیراز. کنترل (○)، غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر(▲)، غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر(■) و غلظت ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر(●).

عصاره‌های متانولی برگ هر چهار رقم زیتون در غلظت ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر رشد باکتری را به‌طور کامل مهار نموده است ولی در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر فقط رقم روغنی قادر به مهار رشد باکتری بود (نمودار ۲).



نمودار (۲)- اثر غلظت‌های مختلف عصاره متانولی برگ چهار رقم زیتون بر مهار رشد باکتری *باسیلوس سرئوس* در دمای ۳۷ درجه سلسیوس. ۱- رقم دزفول، ۲- رقم روغنی، ۳- رقم زرد، ٤- رقم شیراز. کنترل (○)، غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر(▲)، غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر(■) و غلظت ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر(●).

بر اساس نتایج نمودار (۳)، عصاره اتانولی فقط در غلظت ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر قادر به مهار رشد *باسیلوس سرئوس* بود و در غلظت‌های کمتر هیچ‌کدام از چهار رقم مورد بررسی اثر مهاری قابل‌توجهی نداشتند.



نمودار (۳)- اثر غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی برگ چهار رقم زیتون بر مهار رشد باکتری *باسیلوس سرئوس* در دمای ۳۷ درجه سلسیوس. ۱- رقم دزفول، ۲- رقم روغنی، ۳- رقم زرد، ٤- رقم شیراز. کنترل (○)، غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر(▲)، غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر(■) و غلظت ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر(●).

مطابق نتایج ارایه شده در جدول (۱)، در تمامی نمونه‌های مورد بررسی با افزایش غلظت عصاره‌ها فعالیت ضدمیکروبی افزایش یافت. تفاوت آماری معنی‌داری بین درصد مهار رشد عصاره‌های استونی ارقام مورد بررسی در غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده نشد (p> ۰/۰۵). اما غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره استونی رقم دزفول به‌طور معنی‌داری (p < ۰/۰۵) درصد مهار رشد کمتری (۷/۱ ± ٦/۳) نسبت به عصاره استونی ارقام دیگر داشت. تفاوت آماری معنی‌داری بین درصد مهار رشد عصاره‌های متانولی ارقام مورد بررسی در غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دیده نشد (p>۰/۰۵). اما در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر رقم روغنی به طور معنی‌داری درصد مهار رشد بیشتری (۱/۰ ± ۹۱/۳) در مقایسه با ارقام دیگر عصاره متانولی از خود نشان داد (p< ۰/۰۵). در غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره متانولی رقم دزفول به طور معنی‌داری (p< ۰/۰۵) از بقیه ارقام درصد مهار رشد کمتری (۲/۵ ± ۳/۱) را نشان داد. درصد مهار رشد عصاره اتانولی رقم روغنی در غلظت ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به طور معنی‌داری (p<۰/۰۵) کمتر از عصاره اتانولی ارقام دیگر بود (٤/۰ ±۹/۳) ولی در غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، رقم

دزفول به طور معنی‌داری (p< ۰/۰۵) درصد مهـار رشـد کمتری (۱۱/۰ ±۷۹/۰) را نشان داد.

از نتایج به‌دست آمده می‌توان چنین نتیجه گرفـت کـه نسبت به دیگر ارقام مورد بررسی، عصاره متـانولی رقـم روغنی با درصد مهار ۹۱/۳ و ۸۷/۸ در غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بهترین اثـر ضـدمیکروبی را بـر *باسیلوس سرئوس* داشت.

جدول (۱)- درصد مهار رشد غلظت‌های مختلف عصاره‌های استونی، متانولی و اتانولی برگ چهار رقم زیتون بر باکتری *باسیلوس سرئوس* در دمای ۳۷ درجه سلسیوس

نوع عصاره	رقم زیتون	غلظت عصاره (mg/ml) *		
		۵	۱۰	۲۰
استونی	دزفول	٦/۳ ± ۷/۱^{a}	٤۲/۷ ± ۷/۵^{a}	۸۸/۰ ± ۲/۸^{a}
	روغنی	۱۹/۵ ± ۷/۱^{b}	۳۷/۵ ± ۲/۲^{a}	۹۰/۷ ± ۱/٤^{a}
	زرد	۳۲/۱ ± ۲/۱^{c}	۳۷/۷ ± ٤/٤^{a}	۹۰/۲ ± ۰/۳^{a}
	شیراز	۲۹/۰ ± ۱/۷^{c}	۳۵/۳ ± ۰/۳^{a}	۸۸/۹ ± ۰/٦^{a}
متانولی	دزفول	۳/۱ ± ۲/۵^{a}	۱۹/۲ ± ۰/۳^{a}	۹۲/۹ ± ۰/۲^{a}
	روغنی	۱۹/٦ ± ۲/٦^{b}	۹۱/۳ ± ۰/۱^{b}	۸۷/۸ ± ۰/۵^{a}
	زرد	۱۷/۸ ± ۲/۷^{b}	۲۷/٦ ± ۱/۰^{c}	۸۹/۷ ± ۰/۹^{a}
	شیراز	۱۷/۲ ± ۱/۹^{b}	۲٤/۷ ± ۰/۵^{c}	۹۱/۳ ± ۰/٤^{a}
اتانولی	دزفول	۲۹/۱ ± ۸/۵^{a}	۳۹/۲ ± ۵/۸^{a}	۷۹/۰ ± ۱۱/۰^{a}
	روغنی	۹/۳ ± ٤/۰^{b}	۲۲/٦ ± ۳/۱^{b}	۹۳/۱ ± ۰/۹^{b}
	زرد	۲۵/۲ ± ۰/۳^{a}	۳۷/۲ ± ۰/۲^{a}	۸۹/۲ ± ۰/۳^{b}
	شیراز	۲۸/٤ ± ۳/۱^{a}	۳۵/۲ ± ۲/۹^{a}	۹٤/۸ ± ۰/۷^{b}

* حروف غیرمشابه در هر ستون و هر نوع عصاره نشانگر تفاوت آماری معنی‌دار (P < ۰/۰۵) می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج بـه‌دسـت آمـده از ایـن پـژوهش نشـان داد کـه عصاره برگ ارقـام مختلـف زیتـون اسـتخراج شـده بـا حلال‌های متفاوت دارای فعالیت ضدباکتریایی متفـاوتی هستند. برگ‌های زیتون یک منبع طبیعی غنی از ترکیبات فنولی می‌باشند که اثرات ضدمیکروبی آن‌ها در تحقیقات تأیید شده‌اند. لی و همکاران در مطالعـه‌ای بیـان داشـتند که عصاره برگ زیتون می‌تواند بـه‌عنـوان یـک افزودنـی

غذایی فراسودمند و منبع بسیار خوبی از ترکیبات فنولی مطرح باشد که دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی قابل‌توجهی است. نتایج حاصل از تحقیق آن‌ها نشان داد که اُلئوروپین (Oleuropein) موجود در برگ زیتون اثر مهاری قوی بر رشد باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* دارد. آن‌ها گزارش کردند که اسید کافئیک موجود در عصاره برگ زیتون به‌ترتیب اثر مهاری خوبی بر رشد *باسیلوس سرئوس*، *اشریشیا کولای* و *سالمونلا انتریتیدیس* دارد (Lee *et al*., 2009). مارکین و همکاران در مطالعه‌ای اثر ضدمیکروبی عصاره آبی برگ زیتون را در شرایط آزمایشگاهی بر مهار رشد چهار باکتری *باسیلوس سوبتیلیس*، *استافیلوکوکوس آرئوس*، *کلبسیلا نومونیا* و *سودوموناس آئروژینوزا* بررسی نمودند. در مطالعه آن‌ها همه باکتری‌های مورد مطالعه به‌غیر از *باسیلوس سوبتیلیس* در غلظت ٦ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره، در مدت زمان سه ساعت از بین رفتند (Markin *et al*., 2003). در مطالعه حاضر میزان رشد *باسیلوس سرئوس* با افزایش غلظت عصاره برگ زیتون کاهش یافت. پری‌یرا و همکاران در مطالعه‌ای که روی اثر ضدمیکروبی عصاره آبی برگ زیتون بر تعدادی باکتری گرم مثبت و گرم منفی انجام دادند، بیان داشتند که در نمونه‌های مورد بررسی با افزایش غلظت عصاره مهار رشد *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس آرئوس* افزایش یافت (Preira *et al*., 2007).

میزان ترکیبات فنولی موجود در برگ زیتون تحت تأثیر 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 به‌کار رفته جهت استخراج نیز بر میزان ترکیبات فنولی و هم‌چنین ویژگی‌های ضدمیکروبی عصاره‌ها اثر دارد (Korukluoglu *et al*., 2010). عزیزاللهی علی‌آبادی و همکاران اثر ضدمیکروبی عصاره آبی برگ زیتون را بر مهار رشد *استافیلوکوکوس آرئوس*، *باسیلوس سرئوس*، *سالمونلا تیفی‌موریوم*، *اشریشیا کولای* 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 مطالعه دیگری رفیعی و همکاران ضمن تأیید خاصیت ضدمیکروبی عصاره برگ زیتون رقم زراعی میشن نشان دادند که روش استخراج و نوع حلال بر میزان ترکیبات فنولی موجود در عصاره و در نتیجه اثر ضد میکروبی آن تأثیر دارد. در مطالعه آن‌ها عصاره متانولی استخراج شده به کمک مایکروویو بیشترین میزان ترکیبات فنولی و کمترین غلظت کشندگی در برابر *اشریشیا کولای* و *استافیلوکوکوس آرئوس* را به خود اختصاص داد (رفیعی و همکاران، ۱۳۹۱). رفیعی و همکاران در مطالعه دیگری بیشترین فعالیت ضدمیکروبی بین ارقام کرونایکی، روغنی و میشن را مربوط به رقم کرونایکی گزارش کردند (رفیعی و همکاران، ۱۳۸۹). در مطالعه اخیر عصاره متانولی رقم روغنی نسبت به دیگر ارقام مورد بررسی بیشترین اثر ضدمیکروبی را بر *باسیلوس سرئوس* نشان داد. به‌علاوه، تفاوت‌هایی که در نتایج این پژوهش در مهار رشد باکتری به‌وسیله عصاره‌های مورد بررسی در مقایسه با مطالعات دیگر موجود است می‌تواند به‌علت تفاوت در غلظت عصاره‌های مورد مطالعه، ارقام زیتون، روش استخراج عصاره‌ها، نوع

حلال مصرفی جهت استخراج عصاره‌ها و روش‌های بررسی مهار رشد باکتری‌ها باشد.

در این مطالعه، با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان نتیجه گرفت، عصاره برگ زیتون ارقام مورد بررسی اثر ضدباکتریایی بر مهار رشد باکتری *باسیلوس سرئوس* داشتند. بنابراین با توجه به این‌که برگ زیتون در تمامی فصول سال به آسانی در دسترس است و در ایران به شکل صنعتی استفاده دارویی و خوراکی ندارد، می‌توان از ارقام مختلف آن برای تهیه عصاره غنی از ترکیبات فنولی جهت استفاده به‌عنوان یک نگه‌دارنده طبیعی در صنایع غذایی و یک ترکیب ضدمیکروبی طبیعی در کرم‌ها، پمادها و دیگر داروها بهره جست.

سپاسگزاری

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

منابع

- رفیعی، زهرا؛ جعفری، سیدمهدی؛ 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، دوره ٦، شماره ٤، صفحات: ۳۰۷-۲۹۷.
- رفیعی، زهرا؛ جعفری، سیدمهدی؛ 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، دوره ۲۸، شماره ۲، صفحات: ۲۹۲-۲۸۰.
- مهدی‌زاده، تورج و رضوی‌روحانی، سیدمهدی (۱۳۸۷). بررسی اثرات ضد باکتریایی عصاره روغن های اسانسی سه نوع پیاز مختلف بر روی باکتریهای استافیلوکوکوس اورئوس و اشیرشیا کلی. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی. دوره ۱۵، شماره ۲، صفحات: ١٥٤-١٤٧.
- 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.
- Azizollahi Aliabadi, M., Kazemi Darsanaki, R., Laleh Rokhi, M., Nourbakhsh, M. and Raeisi, G. (2012). Antimicrobial activity of olive leaf aqueous extract Annals of Biological Research, 3(8): 4189-4191.

- 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. Industrial Crops and Products, 38: 146-152.
- 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. Journal of microbiological methods, 58: 327-334.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2006). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard. 7thed. Clinical and Laboratory Standards Institute.
- 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 Foods for Human Nutrition, 66: 58-63.
- 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. Journal of the American Oil Chemists' Society, 87: 369-376.
- Korukluoglu, M., Sahan, Y., Yigit. A., Ozer, E.T. and Gucer, S. (2010). Antibacterial activity and chemical constitutions of olea europaea L. leaf extracts. Journal of Food Processing and Preservation, 34 (3): 383–396.
- Lee, O.H., Lee, B.Y., Lee, J., Lee, H.B., Son, J.Y., Park, C.S., et al. (2009). Assessment of phenolics-enriched extract and fractions of olive leaves and their antioxidant activities. Journal of Bioresource Technology, 100(23): 6107–6113.
- Markin, D., Duek, L. and Berdicevsky, I. (2003). In vitro antimicrobial activity of olive leaves: Blackwell Publishing Ltd. Mycoses, 46: 132–136.
- Mehdizadeh, T. and Razavi-Rohani, S.M. (۲۰۰۸). Antibacterial activity of essential oil extracts of various onions *(Allium* cepa L.) on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, Journal of Agricultural Sciences Natural Resource, Vol. 15(2): 154-147. [in Persian]
- Niaounakis, M. and Halvadakis, C.P. (2006). Olive processing waste management: literature review and patent survey. 2nd Edition, Elsevier, London, pp.54-61.
- 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. Scientia Horticulturae, 178: 175–183.
- Oonmetta-aree, J., Suzuki, T., Gasalucka, P. and Eumkebc, G. (2006). Antimicrobial properties and action of galangal (*Alpinia galanga* Linn.) on *Staphylococcus aureus*. LWT- Food Science and Technology, 39: 1214–1220.
- Owen, R.W., Haubner, R., Mier, W., Giacosa, A., Hull, W.E., Spiegelhalder, B., *et al*. (2003). Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes. Food and Chemical Taxicology, 41: 703-717.
- Pan, X., Niu, G. and Liu, H. (2003). Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves. Chemical Engineering and Processing, 42: 129-133.
- Pereira, A.P., Ferreira, I.C.F.R., Marcelino, F., Valentão, P., Andrade, P.B., Seabra, R., *et al*. (2007). Phenolic compounds and antimicrobial activity of Olive (*Olea europaea* L. *Cv*. Cobrançosa) leaves. Journal of Molecules, 12: 1153-1162.
- Rafiei, Z., Jafari, S.M., Alami, M. and Khomeiri, M. (2012). Evaluation of antimicrobial activity of olive leaf extracts by ELISA method, Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 28(2): 292-280. [in Persian]
- Rafiei, Z., Jafari, S.M., Khomeiri, M. and Alami, M. (2010). Effect of Variety and Method of Extraction on Antioxidant and Antimicrobial Activity of Olive Leaf Extracts, Iranian Food Science and Technology Research Journal, 6(4); winter 2011: 297-307. [in Persian]

- Rahmanian, N., Jafari, S.M. and Wani. T.A. (2015). Bioactive profile, dehydration, extraction and application of the bioactive components of olive leaves. Trends in Food Science & Technology, 42(2): 150–172.
- Stenfors Arnesen, L.P., Fagerlund, A. and Granum, P.E. (2008). From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. Journal of Federation of European Microbiological Societies, 32: 579-606.
- Sudjana, A.N., D'Orazio, C., Ryan, V., Rasool, N., Ng, J., Islam, N., *et al*. (2009). Antibacterial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. International Journal of Antimicrobial Agents, 33: 461-463.
- Zafar, E. and Filiz, I. (2010). The importance and potential uses of olive leaves. Food Reviews International, 26: 319-334.

Comparison of antibacterial activity of four cultivars of olive (*Olea europaea*) leaf extract on *Bacillus cereus*

Abbasvali, M.[1*], Esmaeili Koutamehr, M.[2], Moshtaghi, H.[3], Eskandari, M.H.[4]

1- Assistant Professor, Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
2- MSc Graduated of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
3- Associate Professor, Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
2- Associate Professor, Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran
[*]Corresponding author email: abbasvali@sci.sku.ac.ir
(Received: 2015/8/10 Accepted: 2015/9/29)

Abstract

In recent years, plant extracts have been used as antimicrobial agents. One of these extracts is olive leaf extract, which has antimicrobial properties due to its phenolic compounds. In current study the leaf extract of four olive (*Olea europaea*) cultivars (Shiraz, Zard, Roghani and Dezfool) was extracted by different solvents (acetone, methanol and ethanol) using microwave-assisted extraction method. Then the antibacterial activity of the extracts was assessed on *Bacillus cereus.* The antibacterial activity of the extracts was determined using the standard and micro broth-dilution methods. All experiments were carried out in triplicate. Minimum inhibitory concentration (MIC) of eleven extracts was estimated as 20 mg/ml, and only MIC of the methanolic extract of Roghani cultivar was 10 mg/ml. Bacterial growth curve of *B. cereus* in the presence of olive leaf extracts was drawn after 24 h incubation at 37 °C and the mean percentage of growth inhibition of each extract was measured after 24 hours. The results showed that in comparison with the other cultivars, the methanolic extract of Roghani cultivar with the percentage of growth inhibition of 91.3% and 87.8% (in the concentrations of 10 and 20 mg/ml, respectively), demonstrated stronger antibacterial effect on *B. cereus*. This study indicated that olive leaf extract from inexpensive agricultural waste might be a valuable bioactive source with antibacterial activity, and seem to be applicable as a safe food additive.

Key words: Antimicrobial effect, *Bacillus cereus*, Minimum inhibitory concentration, Olive leaf