# فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌های آبی و اتانولی برگ درخت گردو بر تعدادی از باکتری‌های بیماری‌زا: یک مطالعه آزمایشگاهی

**بهروز علیزاده بهبهانی*[۱]، محمد حجتی[۲]، محمد نوشاد[۱]**

۱- استادیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران
۲- دانشیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

***نشانی برای مکاتبه:** B.alizadeh@asnrukh.ac.ir

دریافت مقاله: اسفند نود و نه پذیرش برای چاپ: اردیبهشت هزار و چهارصد

## چکیده

**سابقه و هدف:** درخت گردو منبعی غنی از ترکیبات سلامتی بخش فلاوونوئیدی و فنولی با خواص ضدمیکروبی می‌باشد. هدف از این پژوهش آزمایشگاهی، تعیین اثر ضدمیکروبی عصاره‌های آبی و اتانولی برگ درخت گردو بر *Escherichia coli*، *Salmonella typhi*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Staphylococcus aureus* و *Listeria innocua* در شرایط آزمایشگاهی بود.

**روش کار:** عصاره‌های آبی و اتانولی برگ درخت گردو با روش خیساندن استخراج شد. فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌های آبی و اتانولی برگ درخت گردو به روش‌های پورپلیت، دیسک دیفیوژن، چاهک آگار، حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) بررسی گردید. تجزیه و تحلیل نتایج با کمک نرم‌افزار SPSS و آزمون تعقیبی دانکن ($p < ۰/۰۵$) انجام شد.

**یافته‌ها:** تمامی باکتری‌های بیماری‌زا نسبت به عصاره برگ درخت گردو حساس بودند. در روش دیسک دیفیوژن و چاهک آگار، *Staphylococcus aureus* حساس‌ترین باکتری نسبت به عصاره آبی و اتانولی بود. MIC عصاره آبی برگ درخت گردو برای باکتری‌های *Escherichia coli*، *Salmonella typhi*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Staphylococcus aureus* و *Listeria innocua* به ترتیب ۵۰ mg/ml، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵ و ۲۵ بود. MIC عصاره اتانولی برای باکتری‌های مذکور نیز به ترتیب ۵۰ mg/ml، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵ و ۱۲/۵ بود. MBC عصاره‌های آبی و اتانولی برگ درخت گردو برای تمامی باکتری‌های مورد مطالعه بزرگتر از MIC بود.

**نتیجه‌گیری:** اثر ضدمیکروبی عصاره اتانولی بالاتر از عصاره آبی بود و باکتری‌های گرم مثبت نسبت به انواع باکتری‌های گرم منفی به عصاره برگ گردو حساس‌تر بودند. عصاره‌های آبی و اتانولی برگ گردو قابلیت استفاده به عنوان عامل ضدمیکروب طبیعی را دارا می‌باشند.

**واژگان کلیدی: برگ گردو، عصاره آبی، عصاره اتانولی، فعالیت ضدمیکروبی**

### مقدمه

باکتری‌ها از مهمترین و رایج‌ترین عوامل بروز عفونت‌ها و بیماری‌ها هستند. از جمله باکتری‌های بیماری‌زا می‌توان به اشرشیا کلی، سودوموناس ائروژینوزا، استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا تیفی و لیستریا مونوسیتوژنز اشاره کرد. باکتری گرم منفی اشرشیا کلی موجود در روده جانوران خونگرم در ایجاد اسهال و عفونت نقش دارد. سودوموناس ائروژینوزا از دیگر باکتری‌های گرم منفی است که عامل بیماری‌های عفونی در سیستم تنفسی، مجاری ادراری، عفونت‌های معده و روده و بافت‌های نرم شناخته شده است. استافیلوکوکوس اورئوس کوکسی گرم مثبتی می‌باشد که با تکثیر در بافت‌ها و تولید مواد خارج سلولی در ایجاد بیماری نقش دارد(۱). باکتری گرم منفی سالمونلا تیفی به عنوان عامل تب حصبه در انسان شناخته شده است(۲) و لیستریوز ایجاد شده توسط لیستریا مونوسیتوژنز (باکتری گرم مثبت) با میزان بالای مرگ و میر یکی از قابل توجه‌ترین بیماری‌ها در جهان به شمار می‌آید(۳).

در سال‌های اخیر، تمایل به استفاده از ترکیبات طبیعی به جای انواع شیمیایی افزایش یافته است. به دلیل پیچیدگی مواد شیمیایی و محصولات حاصل از آن‌ها در مقایسه با ترکیبات طبیعی زمان زیادی جهت تکمیل سیکل طبیعی این ترکیبات و بازگشت آن‌ها به محیط نیاز است. از این رو، استفاده از مواد شیمیایی نگرانی‌هایی زیادی در ارتباط با آلودگی‌های زیست‌محیطی ایجاد می‌کنند. علاوه بر این، با افزایش هزینه مواد اولیه، مشکل سوء محصولات شیمیایی بیشتر مورد توجه قرار گرفته است(۴). از سوی دیگر، استفاده بیش از حد از داروهای ضدمیکروبی سبب افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بسیاری از باکتری‌ها شده است که این امر منجر به استفاده بیشتر از ترکیبات ضدمیکروبی گیاهی در درمان بیماری‌های عفونی در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های سنتزی شده است(۵). ترکیبات ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی طبیعی از جمله ترکیبات فنولی به دلیل اثرات مفید بر سلامت انسان، کاهش بیماری‌های با کاهش استرس اکسیداسیون و جلوگیری از اکسیداسیون ماکرومولکول‌ها، آن‌ها را به نگهدارنده‌های طبیعی و آنتی‌بیوتیک‌های بسیار خوبی تبدیل کرده است(۴).

گردو با نام علمی Juglans regia گیاهی از خانواده Juglandaceae بوده که دارای ۲۱ گونه خزان‌دار همراه با میوه خوراکی است(۶). درخت گردو به دلیل داشتن میوه و چوب با ارزش، کاربرد در داروسازی به عنوان گیاه دارویی و همچنین به عنوان یک گیاه زینتی مورد استفاده قرار می‌گیرد و در ایران در مناطقی مانند البرز، خراسان، آذربایجان و دامنه‌های البرز به فراوانی یافت می‌شود(۷). برگ درخت گردو منبعی از ترکیبات سلامتی بخش است که از زمان گذشته تا کنون در درمان انواع بیماری‌هایی مانند نارسایی‌های قلبی، بیماری‌های هموروئیدی، اسهال و بیماری-های التهابی مورد استفاده قرار می‌گیرد. همچنین، خواص کراتولیتیک و ضدقارچی، جلوگیری از افت قند خون و فشار خون، ضد اسکوربوت و خاصیت آرامبخشی آن نیز گزارش شده است(۸). علاوه بر این، برگ درخت گردو حاوی ترکیبات فلاوونوئیدی و فنولی مانند کوئرستین رامنوزید، کوئرستین گالاکتوزید و مشتق‌های کوئرستین پنتوزید، کوئرستین رامنوزید و کوئرستین گزایلوزید است(۹)، بنابراین می‌تواند به عنوان یک ترکیب ضدمیکروب در جلوگیری از رشد برخی عوامل بیماری‌زا مورد استفاده قرار گیرد.

در این پژوهش اثر ضدمیکروبی عصاره‌های آبی و اتانولی برگ درخت گردو بر تعدادی از باکتری‌های بیماری‌زا از جمله اشرشیا کلی، سودوموناس ائروژینوزا، استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا تیفی و لیستریا اینوکوا بررسی گردید.

## روش کار

سویه‌های میکروبی مورد استفاده در این پژوهش شامل اشرشیا کلی، سالمونلا تیفی، سودوموناس ائروژینوزا، استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا اینوکوا هستند که از مجموعه میکروبی گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان تهیه شد. در این پژوهش به دلیل بیماری‌زایی بالای لیستریا مونوسیتوژنز از لیستریا اینوکوا استفاده شد.

پس از جمع‌آوری برگ درخت گیاه گردو از استان کهگیلویه و بویر احمد، عصاره‌های آبی و اتانولی به روش خیساندن تهیه گردید. به این ترتیب که، برگ‌های خشک شده با استفاده از آسیاب برقی پودر گردید. جهت تهیه عصاره‌های آبی و اتانولی ۵۰ گرم از پودر تهیه شده به ترتیب به ۲۵۰ میلی‌لیتر آب و اتانول اضافه و به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور مجهز به سیستم لرزان هم زده شد. پس از آن عصاره‌های به دست آمده ابتدا از کاغذ صافی واتمن عبور داده شد و به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. در ادامه از اواپراتور تحت خلأ جهت حذف هر گونه حلال و از نور UV برای استریل کردن عصاره‌ها استفاده گردید. عصاره‌های به دست آمده تا انجام آزمون‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری شدند(۱۰ و ۱۱).

جهت بررسی فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌های آبی و اتانولی برگ درخت گردو از روش‌های پورپلیت، دیسک دیفیوژن، چاهک آگار، حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی استفاده شد.

به منظور تعیین حساسیت عصاره‌های آبی و اتانولی برگ گیاه درخت گردو از روش پورپلیت استفاده گردید. در این روش پس از افزودن ۰/۲ گرم از هر یک از عصاره‌های آبی و اتانولی به ۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل، مخلوط حاصل به کمک دستگاه ورتکس هم زده شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از محلول در پلیت‌های استریل قرار داده شد. پس از آن محیط کشت مولر هینتون آگار استریل (با دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد) به پلیت‌ها اضافه و هر یک از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا روی محیط کشت داده شدند. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و در پایان رشد یا عدم رشد میکروبی در سطح محیط کشت میکروبی به صورت چشمی بررسی گردید(۱۲ و ۱۳).

در روش دیسک دیفیوژن، ۲۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف عصاره‌های تهیه شده (۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به دیسک‌های استریل اضافه شد. سپس دیسک‌های آغشته شده به عصاره‌های آبی و اتانولی بر محیط مولر هینتون آگار حاوی هر یک از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا تثبیت گردید. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری و قطر هاله-های عدم رشد بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری گردید(۱۴ و ۱۵).

در روش ضدمیکروبی چاهک آگار، ابتدا چاهک‌هایی با قطر ۶ میلی-متر بر روی محیط مولر هینتون آگار ایجاد شد. پس از کشت میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا روی محیط، ۲۰ میکرولیتر از غلظت-های مختلف عصاره‌های آبی و اتانولی (۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به چاهک‌ها اضافه گردید. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت

در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری و قطر هاله عدم رشد (بر حسب میلی‌متر) اندازه‌گیری شد(۱۶ و ۱۷).

از روش رقت سازی در چاهک جهت تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی هر یک از عصاره‌های آبی و اتانولی برگ درخت گردو استفاده گردید. بدین منظور، ابتدا محلولی با غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه و سپس رقت‌های متوالی (۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲، ۱/۵۶ و ۰/۷۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) از محلول اولیه تهیه شد. ۱۰۰ میکرولیتر از هر یک از رقت‌های تهیه شده به هر یک از چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای اضافه و ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی حاوی هر یک از میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه (معادل نیم مک فارلند) به چاهک‌ها اضافه گردید. از محیط کشت و سوسپانسیون میکروبی به عنوان کنترل مثبت و از هر یک از عصاره‌ها به عنوان کنترل منفی استفاده شد. پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد ۱۰ میکرولیتر معرف تری فنیل تترازولیوم کلراید ۵ درصد به چاهک‌ها اضافه و مجدداً به مدت نیم ساعت گرمخانه گذاری شد. پس از پایان زمان گرمخانه-گذاری حضور رنگ قرمز یا ارغوانی در هر یک از چاهک‌ها به معنی رشد میکروارگانیسم بوده و اولین خانه‌ای که در تغییر رنگی مشاهده نگردید (به معنی عدم رشد باکتری) به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی رشد گزارش شد(۱۸ و ۱۹).

جهت تعیین حداقل غلظت کشندگی، ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک‌های فاقد رشد در روش تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی بر محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. پلیت‌های فاقد کلنی به عنوان حداقل غلظت کشندگی در نظر گرفته شدند(۱۹ و ۲۰).

آزمون‌های این پژوهش در ۳ تکرار انجام و نتایج بصورت "انحراف معیار ± میانگین" گزارش شدند. از آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی دانکن ($p < ۰/۰۵$) برای تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد.

**یافته‌ها**

باکتری‌های اشرشیا کلی، سودوموناس ائروژینوزا، سالمونلا تیفی و لیستریا اینوکوا در برابر عصاره‌های آبی و اتانولی مقاوم بودند. در این بین باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در برابر عصاره آبی مقاوم و در برابر عصاره اتانولی نیمه حساس بود(جدول ۱).

**جدول ۱**- حساسیت باکتری‌های مورد مطالعه نسبت به عصاره‌های آبی و اتانولی برگ درخت گردو

| باکتری | عصاره آبی | عصاره اتانولی |
|---|---|---|
| *اشرشیا کلی* | مقاوم | مقاوم |
| *سالمونلا تیفی* | مقاوم | مقاوم |
| *سودوموناس ائروژینوزا* | مقاوم | مقاوم |
| *استافیلوکوکوس اورئوس* | مقاوم | نیمه حساس |
| *لیستریا اینوکوا* | مقاوم | مقاوم |

با افزایش غلظت عصاره‌های آبی و اتانولی قطر هاله‌های عدم رشد افزایش یافت. در باکتری اشرشیا کلی بین غلظت ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و ۶۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره آبی، اختلاف معنی‌داری در سطح آماری ۵ درصد مشاهده نشد در حالی که بین این غلظت‌ها اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. همچنین در این باکتری تمام غلظت‌های عصاره اتانولی با یکدیگر اختلاف معنی‌داری داشتند. در باکتری سالمونلا تیفی غلظت‌های ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میلی-گرم بر میلی‌لیتر عصاره آبی با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشتند ولی با غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دارای اختلاف معنی‌داری بودند. در این باکتری غلظت‌های ۶۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره اتانولی فاقد اختلاف معنی‌داری بودند ولی بین این غلظت‌ها و غلظت‌های ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. در باکتری سودوموناس ائروژینوزا غلظت‌های ۶۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره آبی با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشتند اما بین غلظت‌های ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و این دو غلظت اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. همچنین در این باکتری غلظت‌های ۴۰ و ۶۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره اتانولی با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نشان ندادند، در حالی که بین این غلظت‌ها و غلظت‌های ۲۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر این عصاره اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. غلظت‌های مختلف عصاره آبی بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس دارای اثری معنی‌داری بودند، درحالی که غلظت‌های ۴۰ و ۶۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره اتانولی فاقد اختلاف معنی‌دار بوده ولی این غلظت‌ها و غلظت‌های ۲۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با یکدیگر اختلاف معنی‌داری داشتند. در رابطه با باکتری لیستریا اینوکوا مشاهده گردید که غلظت‌های ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره آبی فاقد اختلاف معنی‌داری بودند، در حالی که این غلظت‌ها با غلظت‌های ۶۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر میلی-لیتر اختلاف معنی‌داری نشان دادند. در این باکتری تمامی غلظت-های مختلف عصاره اتانولی با یکدیگر اثر معنی‌داری داشتند(جدول ۲).

**جدول ۲- میانگین قطر هاله عدم رشد میکروبی (دیسک دیفیوژن) عصاره‌های آبی و اتانولی برگ درخت گردو بر باکتری‌های بیماری‌زا برحسب میلی‌متر**

| نوع عصاره | باکتری | غلظت‌های عصاره برگ درخت گردو (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) ۲۰ | ۴۰ | ۶۰ | ۸۰ |
|---|---|---|---|---|---|
| آبی | *اشرشیا کلی* | ۷/۲۰±۰/۴۵$^{a}$ | ۸/۱۰±۰/۶۹$^{a}$ | ۱۰/۲۰±۰/۲۸$^{b}$ | ۱۱/۱۰±۰/۷۵$^{b}$ |
| آبی | *سالمونلا تیفی* | ۷/۳۰±۰/۳۵$^{a}$ | ۹/۵۰±۰/۶۱$^{b}$ | ۱۰/۳۰±۰/۳۳$^{b}$ | ۱۰/۶۰±۰/۵۶$^{b}$ |
| آبی | *سودوموناس ائروژینوزا* | ۸/۰۰±۰/۳۲$^{a}$ | ۹/۹۰±۰/۲۴$^{b}$ | ۱۱/۸۰±۰/۱۹$^{c}$ | ۱۲/۴۰±۰/۴۷$^{c}$ |
| آبی | *استافیلوکوکوس اورئوس* | ۹/۵۰±۰/۲۹$^{a}$ | ۱۱/۷۰±۰/۲۰$^{b}$ | ۱۴/۰۰±۰/۴۰$^{c}$ | ۱۵/۸۰±۰/۲۴$^{d}$ |
| آبی | *لیستریا اینوکوا* | ۸/۰۰±۰/۵۶$^{a}$ | ۹/۰۰±۰/۴۹$^{a}$ | ۱۱/۹۰±۰/۳۰$^{b}$ | ۱۴/۰۰±۰/۴۶$^{c}$ |
| اتانولی | *اشرشیا کلی* | ۷/۹۰±۰/۱۸$^{a}$ | ۹/۶۰±۰/۲۵$^{b}$ | ۱۱/۷۰±۰/۳۶$^{c}$ | ۱۳/۵۰±۰/۲۸$^{d}$ |
| اتانولی | *سالمونلا تیفی* | ۷/۵۰±۰/۱۸$^{a}$ | ۹/۰۰±۰/۲۱$^{b}$ | ۱۱/۲۰±۰/۳۷$^{c}$ | ۱۲/۰۰±۰/۵۶$^{c}$ |
| اتانولی | *سودوموناس ائروژینوزا* | ۷/۷۰±۰/۱۷$^{a}$ | ۱۱/۴۰±۰/۳۹$^{b}$ | ۱۲/۱۰±۰/۴۷$^{b}$ | ۱۳/۹۰±۰/۲۲$^{c}$ |
| اتانولی | *استافیلوکوکوس اورئوس* | ۹/۶۰±۰/۴۸$^{a}$ | ۱۲/۱۰±۰/۳۵$^{b}$ | ۱۳/۰۰±۰/۶۶$^{b}$ | ۱۶/۳۰±۰/۲۸$^{c}$ |
| اتانولی | *لیستریا اینوکوا* | ۸/۲۰±۰/۲۶$^{a}$ | ۹/۹۰±۰/۳۳$^{b}$ | ۱۲/۲۰±۰/۱۵$^{c}$ | ۱۴/۲۰±۰/۵۵$^{d}$ |

- حروف غیر مشابه در یک ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد میان غلظت‌های مختلف عصاره های آبی و اتانولی برگ درخت گردو است.

با افزایش غلظت هر یک از عصاره‌های آبی و اتانولی قطر هاله-های عدم رشد افزایش یافت. در باکتری اشرشیا کلی غلظت-های ۶۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره آبی با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نشان ندادند در حالی که بین این غلظت‌ها و غلظت‌های ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اختلاف معنی-داری مشاهده شد. در باکتری سالمونلا تیفی غلظت‌های ۶۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره آبی فاقد اختلاف معنی‌داری بودند ولی این غلظت‌ها با غلظت‌های ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اختلاف معنی‌داری نشان دادند. در این باکتری بین غلظت‌های ۴۰ و ۶۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره اتانولی اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ولی این غلظت‌ها با غلظت-های ۲۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اختلاف معنی‌داری داشتند. غلظت‌های مختلف عصاره آبی و اتانولی در باکتری سودوموناس ائروژینوزا دارای اختلاف معنی‌داری بودند. غلظت-های ۴۰ و ۶۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره آبی فاقد اختلاف معنی‌داری در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بودند در حالی که این غلظت‌ها با غلظت‌های ۲۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثر معنی‌داری نشان دادند. در این باکتری غلظت‌های ۶۰ و ۸۰ عصاره اتانولی اثر معنی‌داری نشان دادند اما این غلظت‌ها با غلظت‌های ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اختلاف معنی‌داری داشتند. غلظت‌های مختلف عصاره آبی دارای اختلاف معنی-داری در باکتری لیستریا اینوکوا بودند. در این باکتری در غلظت‌های ۶۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره اتانولی اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد اما بین این غلظت‌ها و غلظت‌های ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اختلاف معنی‌داری وجود داشت(جدول ۳).

**جدول ۳- میانگین قطر هاله عدم رشد میکروبی (چاهک آگار) عصاره‌های آبی و اتانولی برگ درخت گردو بر باکتری‌های بیماری‌زا برحسب میلی‌متر**

| نوع عصاره | باکتری | غلظت‌های عصاره برگ درخت گردو (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | ۲۰ | ۴۰ | ۶۰ | ۸۰ |
| آبی | *اشرشیا کلی* | ۸/۰۰±۰/۲۳$^{a}$ | ۹/۹۰±۰/۱۹$^{b}$ | ۱۱/۸۰±۰/۱۷$^{c}$ | ۱۲/۴۰±۰/۶۲$^{c}$ |
| آبی | *سالمونلا تیفی* | ۷/۵۰±۰/۲۷$^{a}$ | ۹/۶۰±۰/۳۴$^{b}$ | ۱۱/۷۰±۰/۳۸$^{c}$ | ۱۲/۷۰±۰/۷۰$^{c}$ |
| آبی | *سودوموناس ائروژینوزا* | ۸/۹۰±۰/۵۸$^{a}$ | ۱۰/۸۰±۰/۳۹$^{b}$ | ۱۲/۷۰±۰/۲۹$^{c}$ | ۱۴/۸۰±۰/۲۰$^{d}$ |
| آبی | *استافیلوکوکوس اورئوس* | ۱۰/۵۰±۰/۱۰$^{a}$ | ۱۲/۶۰±۰/۲۰$^{b}$ | ۱۲/۷۰±۰/۳۰$^{b}$ | ۱۶/۰۰±۰/۴۹$^{c}$ |
| آبی | *لیستریا اینوکوا* | ۹/۱۰±۰/۴۴$^{a}$ | ۱۰/۹۰±۰/۲۱$^{b}$ | ۱۲/۵۰±۰/۱۵$^{c}$ | ۱۴/۶۰±۰/۳۲$^{d}$ |
| اتانولی | *اشرشیا کلی* | ۸/۳۰±۰/۴۷$^{a}$ | ۱۰/۶۰±۰/۶۶$^{b}$ | ۱۱/۵۰±۰/۷۰$^{b}$ | ۱۲/۰۰±۰/۷۵$^{b}$ |
| اتانولی | *سالمونلا تیفی* | ۸/۵۰±۰/۵۰$^{a}$ | ۱۰/۴۰±۰/۳۳$^{b}$ | ۱۱/۰۰±۰/۴۴$^{b}$ | ۱۳/۱۰±۰/۳۸$^{c}$ |
| اتانولی | *سودوموناس ائروژینوزا* | ۸/۵۰±۰/۴۸$^{a}$ | ۱۱/۵۰±۰/۶۳$^{b}$ | ۱۳/۶۰±۰/۳۸$^{c}$ | ۱۵/۱۰±۰/۳۱$^{d}$ |
| اتانولی | *استافیلوکوکوس اورئوس* | ۱۰/۶۰±۰/۱۸$^{a}$ | ۱۳/۰۰±۰/۴۷$^{b}$ | ۱۵/۱۰±۰/۵۰$^{c}$ | ۱۶/۱۰±۰/۷۰$^{c}$ |
| اتانولی | *لیستریا اینوکوا* | ۹/۰۰±۰/۴۵$^{a}$ | ۱۱/۳۰±۰/۳۶$^{b}$ | ۱۴/۴۰±۰/۵۵$^{c}$ | ۱۴/۹۰±۰/۵۰$^{c}$ |

- حروف غیر مشابه در یک ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد میان غلظت‌های مختلف عصاره های آبی و اتانولی برگ درخت گردو است.

در غلظت‌های مختلف عصاره آبی، حداقل غلظت مهارکنندگی برای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (حساس‌ترین باکتری) و برای باکتری‌های اشرشیا کلی و سالمونلا تیفی ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (مقاوم‌ترین باکتری) مشاهده شد. حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره‌های آبی و اتانولی برای باکتری گرم منفی سودوموناس ائروژینوزا ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره اتانولی برای باکتری‌های لیستریا اینوکوا و استافیلوکوکوس اورئوس ۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و برای باکتری‌های اشرشیا کلی و سالمونلا تیفی ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. حداقل غلظت کشندگی عصاره آبی برای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود در حالی که برای باکتری سالمونلا تیفی بیشتر از ۴۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مورد نیاز بود. حداقل غلظت کشندگی عصاره اتانولی در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و در باکتری سالمونلا تیفی ۴۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد (جدول ۴). به طور کلی، نتایج حاصل از تمامی روش‌های ضدمیکروبی مورد استفاده در این پژوهش نشان‌دهنده خاصیت ضدمیکروبی بیشتر عصاره اتانولی در مقایسه با عصاره آبی برگ درخت گردو می-باشد(جدول ۴).

**جدول ۴**- حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره‌های آبی و اتانولی برگ درخت گردو

| عصاره | باکتری | حداقل غلظت مهارکنندگی (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) | حداقل غلظت کشندگی (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) |
|---|---|---|---|
| آبی | *اشرشیا کلی* | ۵۰ | ۲۰۰ |
| آبی | *سالمونلا تیفی* | ۵۰ | بزرگتر از ۴۰۰ |
| آبی | *سودوموناس ائروژینوزا* | ۲۵ | ۲۰۰ |
| آبی | *استافیلوکوکوس اورئوس* | ۱۲/۵ | ۵۰ |
| آبی | *لیستریا اینوکوا* | ۲۵ | ۱۰۰ |
| اتانولی | *اشرشیا کلی* | ۵۰ | ۲۰۰ |
| اتانولی | *سالمونلا تیفی* | ۵۰ | ۴۰۰ |
| اتانولی | *سودوموناس ائروژینوزا* | ۲۵ | ۱۰۰ |
| اتانولی | *استافیلوکوکوس اورئوس* | ۱۲/۵ | ۵۰ |
| اتانولی | *لیستریا اینوکوا* | ۱۲/۵ | ۱۰۰ |

**بحث**

محصولات گیاهی می‌توانند به عنوان عوامل ضدمیکروبی استفاده شوند و در مطالعات مختلف اثرات ضدمیکروبی آن‌ها بررسی شده است(۲۱-۲۴). کاهش تمایل به استفاده از محصولات تهیه شده با ترکیبات شیمیایی و افزایش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده از ترکیبات ضدمیکروبی طبیعی به خصوص اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی را افزایش داده است(۲۵). ترکیبات زیست‌فعال موجود در اسانس‌ها و عصاره-های گیاهی پس از اتصال به سطح سلولی به داخل غشای فسفولیپیدی نفوذ می‌یابند. درنتیجه تجمع این ترکیبات متابولیسم سلولی تغییر کرده و به دنبال آن ساختمان یکپارچه غشا نابود شده و در نهایت منجر به مرگ سلولی می-شوند(۲۶).

عصاره‌های آبی و اتانولی برگ درخت گردو روی تمام باکتری-های بیماری‌زای مورد مطالعه در این پژوهش اثر ضدمیکروبی نشان دادند، اگرچه غلظت‌های کمتری از عصاره‌های آبی و اتانولی جهت جلوگیری یا توقف رشد باکتری‌های گرم مثبتی مانند *استافیلوکوکوس اورئوس* در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی نیاز بود. این امر به دلیل وجود تنها یک غشای موکوپپتیدی در غشای سلولی باکتری‌های گرم منفی است که آن‌ها را نسب به عوامل ضدمیکروبی حساس می‌کند، در حالی که غشای سلولی باکتری‌های گرم منفی از لایه‌های فسفولیپیدی و لیپوپلی‌ساکاریدی پیچیده‌تری تشکیل شده است که باعث کاهش سرعت نفوذ ترکیبات ضدمیکروبی می-شود(۲۷).

در مطالعه‌ای خاصیت ضدمیکروبی عصاره آبی میوه گردو به روش چاهک آگار بر ۱۲ باکتری بیماری‌زا بررسی و گزارش گردید که نوع استخراج، میزان غلظت و نوع پاتوژن در شدت اثر ضدمیکروبی مؤثر می‌باشد(۲۸). در پژوهشی اثر ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های تهیه شده با حلال-های مختلف پوست سبز گردو بررسی و بیشترین اثر ضدمیکروبی بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مشاهده شد(۲۹). در مطالعه دیگری، عصاره‌های آبی برگ گونه‌های مختلف گردو در کشور پرتغال تهیه و اثر ضدمیکروبی آن بر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا بررسی گردید. در این پژوهش مشخص گردید که برگ‌های گیاه گردو دارای اثر ضدمیکروبی

مقاومت بیشتر آن‌ها ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره می-باشد(۸). در مطالعه‌ای اثر ضدمیکروبی عصاره برگ‌های درخت گردو و گواوا بر تعدادی از باکتری‌های عامل آکنه مانند *پروپیونی‌باکتریوم آکنس*، *استفیلوکوکوس اورئوس* و *استفیلوکوکوس اپیدرمیس* بررسی و هاله‌های عدم رشد ایجاد شده توسط این عصاره‌ها با روغن درخت چای، داکسی سایکلین و کلیندامایسین مقایسه گردید. در رابطه با استافیلوکوکوس‌ها این مناطق مهار به طور قابل توجهی بالاتر از مناطق مهار روغن درخت چای و برابر با مناطق به دست آمده از داکسی سایکلین یا کلیندامایسین بود که نشان‌دهنده کاربرد بالای عصاره‌های برگ این درختان در درمان آکنه به ویژه در مواقعی که فعالیت ضدمیکروبی آن‌ها مشخص نیست، می‌باشد(۳۰). در بررسی ترکیبات شیمیایی و اثرات ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های هیدرواتانولیک برگ-های سبز و زرد درخت گردو در پرتغال، مشخص گردید که عصاره‌های حاصل از برگ‌های سبز دارای کمترین غلظت مهارکنندگی در برابر باکتری‌های گرم مثبت بوده به گونه‌ای که حداقل غلظت مهارکنندگی برای باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود و استفاده از برگ-های گردو به عنوان منبع مواد مغذی زیست فعال و بدون اثرات سمیت کبدی برای کاربردهای مختلف در صنایع غذایی یا دارویی پیشنهاد شده است(۳۱).

بیشتری بر باکتری‌های گرم مثبت بوده و حداقل غلظت مهارکنندگی برای باکتری‌های گرم منفی و قارچ‌ها به دلیل

## نتیجه‌گیری

افزایش مقاومت دارویی نسبت به مواد ضدمیکروب شیمیایی سبب افزایش تقاضا برای استفاده از گیاهان دارویی بعنوان عوامل طبیعی ضدمیکروب شده است. با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه می‌توان ذکر نمود که عصاره (آبی/اتانولی) برگ گردو دارای فعالیت ضدمیکروبی قابل توجهی بر باکتری‌های بیماری‌زا در شرایط آزمایشگاهی دارد. با اینحال، مطالعات بالینی گسترده‌ای بایستی در این زمینه صورت گیرد تا از کارایی این عصاره در شرایط درون تنی و در نتیجه معرفی آن بعنوان یک ماده ضدمیکروب طبیعی اطمینان حاصل نمود.

## تشکر و قدردانی

مقاله حاضر مستخرج از طرح پژوهشی با کد ۹۹۱/۱۷ می‌باشد، لذا نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان به دلیل حمایت‌های مادی و معنوی صمیمانه تشکر و قد
ردانی نمایند.

## REFERENCE

1. Heydari S, Jooyandeh H, Noshad M. Invitro determination of chemical Compounds and antibacterial activity of Lavandula essential oil against some Pathogenic microorganisms. Scientific journal of Ilam university of medical sciences. 2019; 27(4):77-89. [Full Text in Persian]
2. Kidgell C, Reichard U, Wain J, Linz B, Torpdahl M, Dougan G., et al. Salmonella typhi, the causative agent of typhoid fever, is approximately 50,000 years old. Infection, Genetics and Evolution. 2002; 2 (1):39-45.
3. Zakrzewski AJ, Chajęcka-Wierzchowska W, Zadernowska A, Podlasz P. Virulence Characterization of Listeria monocytogenes, Listeria innocua, and Listeria welshimeri Isolated from Fish and Shrimp Using In Vivo Early Zebrafish Larvae Models and Molecular Study. Pathogens. 2020; 9 (12):1028.

4. Oliveira I, Sousa A, Ferreira IC, Bento A, Estevinho L, Pereira JA. Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (Juglans regia L.) green husks. Food and chemical toxicology. 2008; 46 (7): 2326-31.
5. Omeidi Myrzai M, Hojjati M, Alizadeh Behbahani B, Noshad M. Determination of chemical composition, antioxidant properties and antimicrobial activity of coriander seed essential oil on a number of pathogenic microorganisms. Iranian Food Science and Technology Research Journal. 2020;16(2):221-33. [Full Text in Persian]
6. Sharafatichaleshtori R, Sharafatichaleshtori F, Sharafatichaleshtori A, Rafieian M. Antibacterial effects of ethanolic extract of walnut leaves (Juglans regia) on propionibacterium acnes. J Adv Med Biomed Res. 2010; 18(71): 42-9. [Full Text in Persian]
7. Ebrahimi A, Sharifi M, Rafiei, S, Fattahi Moghadam M. Determination of Physical and Morphological Properties in Four Genotypes of Walnut. Iranian Journal of Biosystems Engineering, 2009; 40 (1): 63-70. [Full Text in Persian]
8. Pereira JA, Oliveira I, Sousa A, Valentão P, Andrade PB, Ferreira IC., et al. Walnut (Juglans regia L.) leaves: Phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. Food and chemical toxicology. 2007; 45 (11): 2287-95.
9. Mohammadi J, Delaviz H, Malekzadeh JM, Roozbehi A. The effect of hydro alcoholic extract of Juglans regia leaves in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. Pak J Pharm Sci. 2012; 25(2): 407-11.
10. Tabatabai Yazdi F, Alizadeh Behbahani B, Alghoneh A, Zanganeh H. Optimization of extraction of Mespilus germanica by mixture design and investigation of its effect on Infectious Microorganisms “in vitro”. Food Science and Technology. 2016; 13 (52): 131-45. [Full Text in Persian]
11. Alizadeh Behbahani B, Tabatabaei Yazdi F, Noorbakhsh H, Riazi F, Jajarmi A, Tabatabaei Yazdi F. Study of the antibacterial activity of methanolic and aqueous extracts of Myrtus communis on pathogenic strains causing infection. Zahedan Journal of Research in Medical Sciences. 2016;18(2): 1-7.
12. Tabatabaei Yazdi F, Alizadeh Behbahani B, Mortazavi A. Investigating the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of the Lavandula stoechas L. and Rosmarinus officinalis L. extracts on pathogen bacterias “in vitro”. Archives of Advances in Biosciences. 2014;5(2): 91-101
13. Alizadeh Behbahani B, Tabatabaei Yazdi F, Shahidi F, Mortazavi SA, Mohebbi M. Principle component analysis (PCA) for investigation of relationship between population dynamics of microbial pathogenesis, chemical and sensory characteristics in beef slices containing Tarragon essential oil. Microbial pathogenesis. 2017; 105: 37-50.
14. Kiarsi Z, Hojjati M, Alizadeh Behbahani B, Noshad M. In vitro antimicrobial effects of Myristica fragrans essential oil on foodborne pathogens and its influence on beef quality during refrigerated storage. Journal of Food Safety. 2020; 40 (3): e12782.
15. Alizadeh Behbahani B, Yazdi FT, Mortazavi A, Gholian MM, Zendeboodi F, Vasiee A. Antimicrobial effect of Carboxy Methyl Cellulose (CMC) containing aqueous and ethanolic Eucalyptus camaldulensis L. leaves extract against Streptococcus pyogenes, Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus epidermidis. Archives of Advances in Biosciences. 2014;5(2): 59-69.

16. Alizadeh Behbahani B, Noshad M, Falah F. Study of chemical structure, antimicrobial, cytotoxic and mechanism of action of Syzygium aromaticum essential oil on foodborne pathogens. Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences. 2019; 13 (1): 875-83.
17. Alizadeh Behbahani B, Noshad M, Falah F. Cumin essential oil: Phytochemical analysis, antimicrobial activity and investigation of its mechanism of action through scanning electron microscopy. Microbial Pathogenesis. 2019;136:103716.
18. Ebrahimi Hemmati Kaykha M, Jooyandeh H, Alizadeh Behbahani B, Noshad M. Antimicrobial activity of Rosemary essential oil and its interaction with common therapeutic antibiotics on some Gram positive and Gram negative bacteria. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2019; 24 (87): 25-34. [Full Text in Persian]
19. Yeganegi M, Yazdi FT, Mortazavi SA, Asili J, Alizadeh Behbahani B, Beigbabaei A. Equisetum telmateia extracts: Chemical compositions, antioxidant activity and antimicrobial effect on the growth of some pathogenic strain causing poisoning and infection. Microbial Pathogenesis. 2018; 116:62-7.
20. De Santi II, Gatto DA, Machado MR, Dos Santos PS, Freitag RA. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of the oil and plant extract Myrocarpus frondosus Allemao. American Journal of Plant Sciences. 2017; 8 (7): 1560-71.
21. Hsieh PC, Mau JL, Huang SH. Antimicrobial effect of various combinations of plant extracts. Food Microbiology. 2001; 18 (1): 35-43.
22. Sabo VA, Knezevic P. Antimicrobial activity of Eucalyptus camaldulensis Dehn. Plant extracts and essential oils: A review. Industrial Crops and Products. 2019; 132: 413-29.
23. Jafari-Sales A, Hossein-Nezhad P, Bolouri P. Identification of chemical composition of essential oil and evaluation of antimicrobial effects of ethanolic extract of Mentha pulegium on Staphylococcus aureus and Escherichia coli. Health Biotechnology and Biopharma. 2019; 3(1): 29-38.
24. Trong Le N, Viet Ho D, Quoc Doan T, Tuan Le A, Raal A, Usai D., et al. In vitro antimicrobial activity of essential oil extracted from leaves of Leoheo domatiophorus Chaowasku, DT Ngo and HT Le in Vietnam. Plants. 2020; 9 (4): 453.
25. Fernández-Agulló A, Pereira E, Freire MS, Valentao P, Andrade PB, González-Álvarez J., et al. Influence of solvent on the antioxidant and antimicrobial properties of walnut (Juglans regia L.) green husk extracts. Industrial Crops and Products. 2013; 42: 126-32.
26. Shahidi F, Yazdi FT, Roshanak S, Alizadeh Behbahani B, Norouzi N, Vasiee A. Antimicrobial Activity of Lepidium draba Extract on some Pathogenic Microorganisms “in vitro”. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine Vol. 2019; 24 (85): 1-9. [Full Text in Persian]
27. Alizadeh Behbahani B, Falah F, Lavi Arab F, Vasiee M, Tabatabaee Yazdi F. Chemical composition and antioxidant, antimicrobial, and antiproliferative activities of Cinnamomum zeylanicum bark essential oil. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2020 Apr 30.
28. Kavuncuoglu H, Kavuncuoglu E, Karatas SM, Benli B, Sagdic O, Yalcin H. Prediction of the antimicrobial activity of walnut (Juglans regia L.) kernel aqueous extracts using artificial neural network and multiple linear regression. Journal of microbiological methods. 2018; 148: 78-86.
29. Han KI, Jo BK, Kim MJ, Kang MJ, Park KH, Kim B., et al. Antimicrobial and antioxidative activities of the extracts from walnut (Juglans regia L.) green husk. Journal of Life Science. 2015; 25 (4): 433-40.

30. Qa'dan F, Thewaini AJ, Ali DA, Afifi R, Elkhawad A, Matalka KZ. The antimicrobial activities of Psidium guajava and Juglans regia leaf extracts to acne-developing organisms. The American Journal of Chinese Medicine. 2005; 33(02): 197-204.
31. Vieira V, Pereira C, Pires TC, Calhelha RC, Alves MJ, Ferreira O, et al. Phenolic profile, antioxidant and antibacterial properties of Juglans regia L. (walnut) leaves from the Northeast of Portugal. Industrial Crops and Products. 2019; 134: 347-55.