Iranian Journal of Medical Microbiology | ISSN:2345-4342

Antibacterial Activities of Ethanolic Extract of *Malva sylvestris L.* Against *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* Isolated from Diarrheic Lambs

Yaser Nozohour*, Ghader Jalilzadeh

Department of Internal Medicine and Clinical Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

10.30699/ijmm.15.1.121

ABSTRACT

Background and Aim: Bacterial enteritis occurred in neonatal lambs, is an economically important disease that can cause high morbidity and mortality in lambs, therefore, emergency antibacterial treatment is necessary. *Malva sylvestris* L. plays an important role in traditional remedies for medicinal properties. The present study aimed to evaluate the antibacterial activity of *M. sylvestris* on bacterial pathogens isolated from the stool of diarrhetic lamb.

Materials and Methods: The antibacterial activities of *M. sylvestris* hydroalcoholic extract (MSHE) were evaluated by agar diffusion and microbroth dilution methods against isolates of *Salmonella enterica* (n=10), *Escherichia coli* (n=10) and standard strains *S. enterica* PTCC 1709-CIP104115, *E. coli* PTCC1270.

Results & Conclusion: The results of plant extract efficiency against clinically isolated reported as Minimum Inhibitory Concentration (MIC) test and Minimum Bactericidal Concentration (MIC) test toward *E. coli* (MIC: 11.56±0.0 mg×mL^{-1} and MBC: 21.25±0.0 mg×mL^{-1}) *S. enterica* (MIC: 42.50±0.0 mg×mL^{-1} and MBC: 80.00±0.0 mg×mL^{-1}). The conclusions of this study indicated that *M. sylvestris* revealed antibacterial properties and this plant could be a good candidate for the generation of new wide spectrum antibacterial agents.

Keywords: Sheep, *Salmonella enterica, Escherichia coli*, Anti-Bacterial agents, Plant extracts

Received: 2020/06/18; **Accepted**: 2020/11/19; **Published Online:** 2021/01/10

Corresponding Information: **Yaser Nozohour, Department of Internal Medicine and Clinical Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.** Email: yasar_nozohour@yahoo.com

Copyright © 2021, This is an original open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribution of the material just in noncommercial usages with proper citation.

Use your device to scan and read the article online

Nozohour Y, Jalilzadeh G. Antibacterial Activities of Ethanolic Extract of Malva sylvestris L. Against Salmonella enterica and Escherichia coli Isolated from Diarrheic Lambs. Iran J Med Microbiol. 2021; 15 (1) :121-129

Download citation: BibTeX | RIS | EndNote | Medlars | ProCite | Reference Manager | RefWorks

Send citation to: Mendeley Zotero RefWorks

Introduction

Diarrhea is a clinical syndrome that causes serious economic losses as it leads to high mortality, weight loss, or even late growth in various animals and even in the human people. It has appeared from enteritis, which is the inflammation of the intestinal mucosa, distinguished by abdominal pain, loose feces, an increase in stool mass, stool frequency, tendency, or stool fluidity that contain 70-95% water which leads to dehydration **(1,2)**. Lamb diarrhea is associated with both infectious and non-infectious factors **(1, 2)**. *Salmonella spp.* and *Escherichia coli* is the most common bacterial etiologic agents of lamb diarrhea during the first weeks of life **(1, 3)**. Diarrhea induced by infectious organisms is the most significant cause of morbidity and mortality in ruminant neonatal in the world and it can be caused by numerous pathogens including viruses, protozoa, and bacteria **(1, 3)**. Currently, there is some medication approved for the treatment of bacterial pathogens of diarrhea in the animal. Chloramphenicol, gentamicin and Enrofloxacin are used to treat bacterial-induced diarrhea in ruminants' neonates. These agents have

several side effects, including liver and kidney failure including toxic nephrosis and hemorrhage, as well as removing the natural microflora of the digestive tract when used orally **(4)**. Nowadays, due to the creation of microbial resistance to antibiotics, the use of other safe sources such as derived agents from plants and their compounds have been proposed as an alternative to synthetic antibiotics. Recently the results of many studies have shown that some plants interestingly can inhibit the growth of the microorganisms **(5)**. *Malva sylvestris L*. an annual plant known as mallow is a genus belonging to the family Malvaceae with lobed leaves and purple flowers that bloom in late spring **(6)**. *M. sylvestris L*. can be used as food antimicrobial agents due to their potent activity against both gram-positive and gram-negative bacteria **(7, 8)**. Therefore, the present study was conducted to evaluate the antibacterial properties of *M. sylvestris L.* against *Salmonella enterica* and *E. coli* isolated from diarrheic lambs.

Materials and Methods

Plant Extraction

During summer 2018 *M. sylvestris* was obtained from the local market in Urmia, Iran, then the sample was authenticated by the Pharmacognosy department. Leaves were air-dried at room temperature and grounded into powder by a hammer mill. To prepare the extract, 200 g of powder was macerated in 70% ethanol (1:10 ratio) in a sealed container and was shaken for 24 hr in a darkroom. The extract was filtered through Whatman No 41 filter paper and concentrated under vacuum at 40°C using a rotary machine, and collected powder was stored at −80°C **(9)**.

Isolation and Identification of Bacteria

In this study, 100 stool specimens collected from diarrheic Lambs were refereed to veterinary teaching hospital and clinic of Urmia University during the six months in winter and spring 2018. The strains of bacteria were identified by the use of biochemical profiles according to the directions of the manual of clinical microbiology. The assayed microorganisms used in this study were as followed: 1) Regional clinical isolates: *S. enterica* (n=10), *E. coli* (n=10). 2) And Reference strains: *S. enterica* PTCC 1709-CIP104115, *E. coli* PTCC1270. The standard strains were taken from Microbiology Tabriz and the Hospital of Department of Urmia University **(10)**.

Antibacterial Activity Assay

The antibacterial activity of the extract was assessed using agar disk-diffusion, micro broth dilution **(11)**. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentrations (MBC) were evaluated. Bacterial suspensions equivalent to a 0.5 McFarland turbidity were made in sterile normal saline solution from clinical and reference isolates a sterile swab dipped into the inoculum tube containing bacterial suspensions and then was cultured on the Muller-Hinton agar (Merck®, Germany). Sterile filter paper discs (6 mm in diameter) were impregnated *M. sylvestris* extract 10 µl (75 mg mL^{-1}) for 10–15 min and left to dry completely for 20–25 min, then precisely placed on the surface of previously inoculated cultures. Chloramphenicol (30µg) antibiotic discs (Merck®, Germany) were used as positive control and sterile diluent (0.1% peptone water) was negative control for comparison of inhibition zone with the sample. Plates were incubated at 37°C for 24h until the obvious growth of bacteria was evident in control plates. Apparent inhibition zones around discs were measured in three directions and averaged. The antibacterial activity was displayed as the diameter of the inhibition zone produced by extract against test bacteria **(12)**.

Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

The broth microdilution method was conducted to determine the MIC and MBC of the extract revealed by the agar diffusion assay **(13)**. Briefly, MIC and MBC were tested in the microplate reader, using sterile 96 wells plates. Each well was loaded with a total volume of 100 µl containing Mueller-Hinton broth (MHB). Different concentrations of each extract 100, 50, 25, 12.5, 6.25 and 3.12 mg mL^{-1} was provided by serial dilution (dilution by one-half) in MHB. 100 µl of inoculums contains approximately 5×10^5 CFU/mL of test bacteria were added to each well. Negative controls contained a non-inoculated medium with extract samples and positive controls wells were prepared with inoculated culture medium with no extracts **[13]**. Resazurin powder **(11)** (Sigma-Aldrich) was diluted in distilled water to a final concentration of 1 mg/ml and 10 µL was added to all wells **(13)**. Microplates were incubated at 37°C for 24 hr. The MIC was determined by observing the lowest concentration of extract which would inhibit the apparent growth of bacteria. For determination of minimum bactericidal concentrations (MBC), 20 µL of the suspension of well before MIC of the extract were cultured on BHI agar using the spread plate technique. After 24 hours of incubation at 37°C, the MBC was evaluated by calculating the number of bacterial colonies **(13)**.

Results and Discussion

The antimicrobial characteristics of the *M. sylvestris* against clinically isolates of *S. enterica* and E. coli were determined and presented as MICs and MBCs values. *M. sylvestris* extract showed the highest effect against clinical isolate of *E. coli* (MIC: 11.56±0.0 mg mL-1 and MBC: 21.25±0.0 mg mL-1). Details presented in Tables 1 and 2. Bacterial enteritis in lambs is the most common and important disease that can cause severe economic loss in the sheep production industry. Lambs are at greatest risk of diarrhea during the first month of the neonatal period, although the incidence of diarrhea declines with age **(14)**. Enteropathogens have a high level of resistance to commonly used antibiotics therefore resistance to new drugs develops quite fast. Diarrheal diseases are greatly more common among lambs group and the search for new agents with antibacterial activity against enteropathogens has a public health priority **(1, 2)**. New antimicrobials derived from medicinal plants resulting in recovery without side effects. This is very important since a major problem with antibiotics is a common failure to achieve successful treatment, which in turn favors the selection of resistant bacterial strains. With the focus of research on the undesired effects of chemical drugs, the use of herbal medicines has been re-considered **(16)**. Most of the plant extracts have antimicrobial activity, which is mainly associated with their phenolic compounds. The higher amount of phenolic material in the plant extracts appears more antimicrobial activity **(16)**. In a study by 17. Mohajerfar that was done on 10 different species of bacteria, it is shown that the methanol extract of *M. sylvestris* had an antibacterial effect on *B. pumilus* **(17)**. The results of another study showed that the extract of *M. rotundifolio* had a strong inhibiting effect on *S. aureus, P. aeruginosa, B. subtilis, K. pneumoniae,* and *E. coli* **(18)**. It was revealed that methanolic extracts of the flower and leaves of *M. sylvestris* show high antimicrobial activity against *S. aureus, S. agalactiae,* and *E. faecalis* **(22)**. Dost-Mohamadi *et al*. (2012) mentioned that the ethanolic extracts of *Malva neglecta* with nanosilver particles had an inhibitory effect on *S. aureus* and *S. typhimurium* which were consistent with our findings **(19)**. Elvin-lewis *et al.* (2009) demonstrated the antibacterial effect of *M. neglecta* on the Nocardia strain **(15)**. The result of this study confirmed that the *M. sylvestris* has an antibacterial effect against *Salmonella enterica* and *E.coli.* According to the results presented here and from previous research, *M. sylvestris* potentially has a wide-spectrum antimicrobial effect. Studies are needed to characterize the accurate and precise mechanisms of *M.* sylvestris ingredients and to study its toxicity to further define the potential therapeutic benefit of it or the risk that accompanies oral administration of this plant extract respectively.

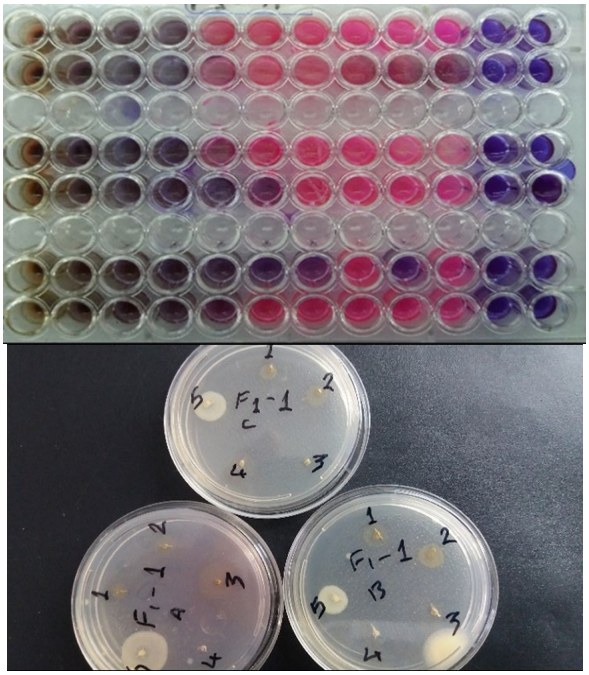


Figure 1. Microplates and plate showing the MICs and MBC: Columns 1–10 (contain serial dilutions of extracts), columns 11(growth control wells), columns 12 (sterility control wells): Purple color (lack of bacterial growth) and Pink color (bacterial growth).

Table 1. MICs and MBCs of *M. sylvestris* extract against standard and clinically isolated bacteria

Bacteria	MIC (mg mL^{-1})	MBC (mg mL^{-1})
***S. enteric* (1709-CIP104115)**	50±0.0	100±0.0
***S. enteric* (clinical isolate)**	42.5±0.0	80±0.0
***E. coli* (PTCC -1270)**	50±0.0	100±0.0
***E. coli* (clinical isolate)**	11.56±0.0	21.25±0.0

Table 2. Diameter of inhibition zone (mm) of *M. sylvestris* extract and antibiotic disk extracts tested against standard and clinically isolated bacteria

Bacteria	*M. sylvestris* (75 mg mL^{-1})	Chloramphenicol (0.03 mg/disc)
S. enteric **(1709-CIP104115)**	10.2	13.9
S. enteric **(clinical isolate)**	15	17
E. coli **(PTCC -1270)**	13.3	16
E. coli **(clinical isolate)**	16	20

Conclusion

The results of this study indicate that *M. sylvestris* has antibacterial properties. In particular, *M. sylvestis* can be considered as a suitable substitute for synthetic antibiotics to treat the bacterial diarrheic lambs as a cheap and available source. Certainly, more studies are needed to consider the mechanisms of antibacterial effects of *M. sylvestris* and its compounds more accurately. Therefore, taking into account the detrimental effects of antibiotics, the use of medicinal plants-based drugs can be a new horizon for controlling and controlling diarrhea pathogens especially bacteria.

Acknowledgment

We thank Hospital of Urmia and Microbiology Department of Urmia University

Conflict of Interest

All authors disclose any financial and the authors declare that there are not any potential conflicts of interest.

مقاله کوتاه

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۵ ـ شماره ۱ ـ بهمن و اسفند ۱۳۹۹

Journal homepage: www.ijmm.ir

فعالیت ضد باکتریایی عصاره اتانولی گیاه پنیرک بر علیه *سالمونلا انتریکا* و *اشریشیاکلی* جدا شده از بره‌های اسهالی

یاسر نوظهور*، قادر جلیل زاده امین

گروه بیماری های درونی و کلنیکال پاتولوژی،دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچهٔ مقاله

دریافت: ۱۳۹۹/۰۳/۲۹

پذیرش:۱۳۹۹۰۸/۰۵/۲۹

انتشار آنلاین: ۱۳۹۹/۱۰/۲۱

موضوع: مواد ضد میکروبی

نویسندهٔ مسئول:

یاسر نوظهور، گروه بیماری های درونی و کلنیکال پاتولوژی،دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

ایمیل:
yasar_nozohour@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: آنتریت باکتریایی در بره‌های نوزاد رخ می‌دهد که از دید اقتصادی یک بیماری مهم بوده و می‌تواند باعث واگیری و مرگ و میر بالا در بره‌ها گردد، بنابراین، درمان ضد باکتری به‌صورت اورژانسی ضروری است. گیاه پنیرک به دلیل دارا بودن خواص دارویی، جایگاه مهمی در درمان‌های طب سنتی دارد. مطالعهٔ حاضر به‌منظور ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی عصارهٔ گیاه پنیرک علیه باکتری‌های پاتوژن جداشده از مدفوع اسهالی بره‌ها هدف‌گذاری شده است.

مواد و روش کار: فعالیت ضدباکتریایی عصارهٔ هیدروالکلی پنیرک با استفاده از آزمون‌های انتشار در آگار و روش رقیق کردن در محیط مایع، حداقل غلظت باکتری‌کشی و حداقل غلظت مهارکنندگی روی جدایه‌های *سالمونلا انتریکا*، *اشریشیاکلی* و سویه‌های استاندارد *سالمونلا انتریکا* 1709-CIP104115/*اشریشیاکلی* PTCC1270 بررسی و داده‌ها تجزیه و تحلیل آماری شدند.

یافته‌ها و بحث: نتایج حاصل نشان داد که حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت باکتری‌کشی عصاره در مورد *اشریشیاکلی* به‌ترتیب ۲۱/۲۵ و ۱۱/۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود و حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت باکتری‌کشی عصاره بر *سالمونلا انتریکا* ۸۰/۰۰ و ۴۲/۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. نتیجه‌گیری نهایی این پژوهش نشان داد که پنیرک دارای خواص ضد باکتریایی است و می‌تواند به‌عنوان جایگزین مناسبی برای تولید داروی‌های جدید ضد باکتریایی با طیف اثر گسترده مورد استفاده قرارگیرد.

کلید واژه‌ها: گوسفند، *سالمونلا انتریکا*، *اشریشیاکلی*، ضد باکتریایی، عصاره‌های گیاهی

کپی‌رایت © مجله میکروب شناسی پزشکی ایران: دسترسی آزاد؛ کپی برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیرتجاری با ذکر منبع آزاد است.

مقدمه

اسهال یک سندرم بالینی است که باعث خسارات اقتصادی جدی می‌شود زیرا منجر به مرگ و میر ، کاهش وزن یا عقب افتادگی رشد در حیوانات و حتی در انسان می گردد. آنتریت که در واقع التهاب مخاط روده است و با شکم درد، مدفوع شل، افزایش مقدار و دفعات مدفوع، آبکی بودن ۷۰-۹۰ درصدی مدفوع منجر به کم آبی بدن می‌شود. اسهال بره با عوامل عفونی و غیر عفونی در ارتباط است (۱ ، ۲). گونه‌های *سالمونلا و اشریشیا کلی* شایع‌ترین عوامل باکتریایی اسهال بره در هفته های اول زندگی هستند (۱، ۳). اسهال ناشی از ارگانیسم‌های عفونی مهمترین علت بیماری و مرگ و میر در نوزادان نشخوارکننده در همه جای جهان است و می‌تواند توسط عوامل بیماری‌زای بی شماری از جمله ویروس ها، تک یاخته‌ها و باکتری‌ها ایجاد شود (۱، ۳). در حال حاضر، داروهایی برای درمان عوامل باکتریایی ایجاد کننده اسهال در حیوانات وجود دارند. کلرامفنیکل، جنتامایسین و انروفلوکساسین برای درمان اسهال ناشی از باکتری‌ها در نوزادان نشخوارکننده استفاده می‌شود. این داروها دارای عوارض جانبی مانند نارسایی‌های کبدی و کلیوی نفروز و خونریزی، می باشند، و همچنین میکرو فلور طبیعی دستگاه گوارش را هنگام استفاده خوراکی از بین می‌برند. امروزه، به دلیل ایجاد مقاومت میکروبی در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها ،استفاده از مواد کم خطر دیگر مانند عوامل مشتق شده از گیاهان و ترکیبات آنها به عنوان جایگزینی برای تولید آنتی‌بیوتیک‌های مصنوعی پیشنهاد شده است. اخیراً نتایج بسیاری از مطالعات نشان می‌دهد که برخی از گیاهان به طرز جالب توجهی می‌توانند از رشد میکروارگانیسم‌ها جلوگیری کنند

(۵). پنیرک گیاه یک ساله است از خانواده مالواسه که در اواخر بهار گل دهی می‌کند. پنیرک داری اثر ضد باکتریایی بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی بوده است **(۷و۸)**. مطالعهٔ حاضر به منظور ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی عصاره گیاه پنیرک علیه باکتری های پاتوژن *سالمونلا انتریکا و اشریشیا کلی* جدا شده از مدفوع اسهالی برهها هدف‌گذاری شده است.

مواد و روش کار

تهیهٔ عصاره برگ پنیرک

در تابستان ۲۰۱۸ گیاه پنیرک از بازار محلی ارومیه خریداری شده و سپس نمونه توسط بخش فارماکوگنوزی تایید گردید. برگ‌ها در دمای اتاق خشک شده و توسط آسیاب به پودر تبدیل گردید. ۲۰۰ گرم نمونهٔ پودرشده برگ پنیرک با حلال اتانول ۷۰ درصد (۱: ۱۰) کاملاً مخلوط و به مدت ۲۴ ساعت در محیط تاریک در ظرف در بسته خیسانده شدند. برای تسریع عمل عصاره‌گیری، ظرف حاوی پودر گیاهی و حلال روی دستگاه لرزاننده قرارداده شد. بعد از اتمام عملیات عصاره‌گیری، عصارهٔ به‌دست‌آمده با استفاده از فیلتر کاغذی نمره ۴صاف و با استفاده از دستگاه روتاری تحت شرایط خلاء و دمای ۴۰ درجه سلسیوس تغلیظ گردیده و در یخچال با دمای ۴ درجهٔ سلسیوس تا زمان شروع آزمایش نگهداری شد **(۹)**.

جداسازی و شناسایی باکتری ها

در این مطالعه ، ۱۰۰ نمونه مدفوع از برههای اسهالی طی شش ماه در زمستان و بهار ۱۳۹۷ به بیمارستان و کلینیک آموزش دامپزشکی ارجاع شده بود، جمع‌آوری گردید. سویه های باکتری با استفاده از معیارهای بیوشیمیایی و میکروب‌شناسی شناسایی شدند. میکروارگانیسم‌های مورد استفاده در این مطالعه به شرح زیر بودند: جدایه‌های بالینی: *سالمونلا انتریکا* (n:10) و *اشریشیا کلی* (n:10) و سویه‌های استاندارد: *سالمونلا انتریکا* PTCC 1709-CIP104115 ، *اشریشیاکلی*PTCC1270 سویه‌های استاندارد از بخش میکروبیولوژی تبریز و در بیمارستان دامپزشکی دانشگاه ارومیه گرفته شده است **(۱۰)**.

فعالیت ضد باکتریایی عصاره با استفاده از آزمون‌های انتشار در آگار و روش رقیق کردن در محیط مایع (میکرو براث دیلوشن) ارزیابی شد **(۱۱)**. حداقل غلظت مهاری و حداقل غلظت ضد باکتری بررسی شدند. سوسپانسیون‌های باکتریایی معادل کدورت ۰/۵ مک‌فارلند در محلول نرمال نمکی استریل از جداشده‌های بالینی و مرجع تهیه گردید؛ سپس یک سواب استریل آغشته به سوسپانسیون‌های باکتریایی آماده شده در آگار مولر-هینتون (مرک ، آلمان) کشت داده شد. روی هر کدام از دیسک‌های کاغذی استریل به قطر 6 میلی‌متر مقدار 10 میکرولیتر از عصارهٔ برگ پنیرک با غلظت ۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ریخته و در آزمایش مذکور بعد از کشت باکتری در محیط کشت و خشک‌شدن از آنتی‌بیوتیک استاندارد کلرامفیکل 30 میکروگرم (مرک آلمان) استفاده شد. پلت‌ها به‌مدت 24 ساعت در دمای مناسب گرمخانه گذاشته شد. فعالیت ضدباکتریایی بر مبنای اندازه‌گیری قطر هالهٔ عدم‌رشد اطراف دیسک‌ها بر حسب میلی‌متر انجام گرفت **(۱۲)**.

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت باکتری‌کشی

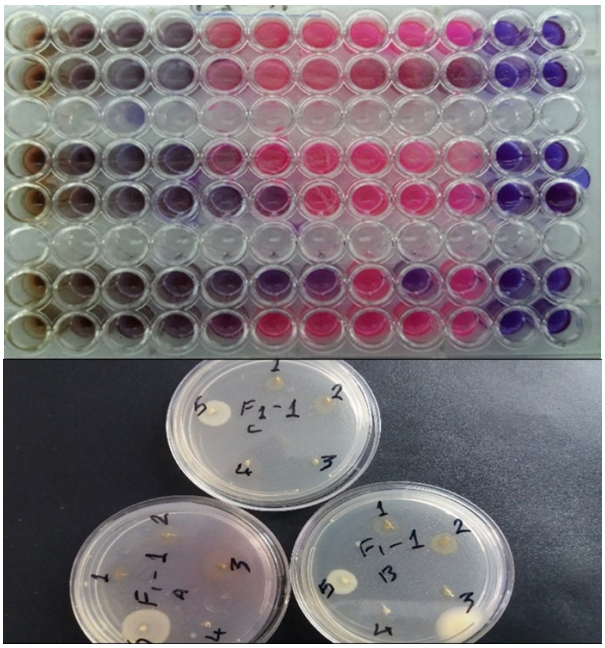
برای بررسی اثر مهارکنندگی و باکتری‌کشی عصاره از روش آزمایشگاهی حداقل غلظت مهارکنندگی و باکتری‌کشی به روش رقیق‌سازی در محیط مایع استفاده شد. به‌طور خلاصه در این روش از میکروپلیت استریل ۹۶ گودی استفاده گردیده به‌شکلی که به تمامی گودهها به جز گودهٔ اول هر ردیف ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت مولر هینتون براث اضافه شد. سه گودی آخر هر ردیف از چپ به راست، نمونهٔ کنترل سوسپانسیون باکتریای، محیط کشت و عصارهٔ گیاهی بودند. پس از افزودن محیط کشت، غلظت‌های مختلف عصاره ۱۰۰-۵۰-۲۵-۱۲/۵- ۶/۲۵ و۳/۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در هر گوده ریخته شد و سپس از هر کدام نمونه‌های باکتریایی به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر را با غلظت 5×10^5 CFU/mL به هر گوده اضافه گردید. در پایان معرف رنگی رزازورین **(۱۱)** ۱میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به میزان ۱۰ میکرولیتر به تمامی گودهها اضافه شد. سپس میکروپلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ سلسیوس گرماخانه‌گذاری شدند. بعد از اتمام ۲۴ ساعت تغییرات از نظر رنگ به صورت چشمی بررسی شد. برای تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد کمترین غلظتی که تغییر رنگ ایجاد نکرده بود، به عبارت اگر کمترین غلظتی که جلوگیری از رشد کرده بود به‌عنوان MIC گزارش شد **(۱۳)**.

برای تعیین کمترین غلظت باکتری‌کشی، بعد از قرائت نتیجه MIC از گوده ۱ تا یک گود بعدی MIC بوسیله آنس‌استریل نمونه برداشته و در یک محیط کشی BHI آگار کشت داده شد. پلت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس گرماخانه‌گذاری شد و در تفسیر اولین غلظتی که در آن هیچ رشدی دیده نشده به ستون MBC ثبت شد

نتایج و بحث

اثر ضد میکروبی پنیرک در برابر جدایه‌های بالینی *سالمونلا انتریکا* و *اشریشیاکلی* به روش MIC و MBC تعیین شد. عصاره پنیرک بیشترین اثر را در برابر جداسازی بالینی *اشریشیا کلی* نشان داد

(حداقل غلظت مهارکنندگی: ۰/۰ ±۱۱/۵۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و حداقل غلظت باکتری کشی: ۰/۰ ±۲۱/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر). مشروح نتایج در جداول ۱ و ۲ آورده شده است. آنتریت باکتریایی در بره‌ها شایع‌ترین و مهمترین بیماری است که می‌تواند باعث خسارت اقتصادی شدیدی در صنعت تولید گوسفند شود. بره‌ها در ماه اول دوره نوزادی بیشترین خطر مبتلا شدن به اسهال را دارند ، اگرچه با افزایش سن میزان اسهال کاهش می‌یابد (۱۴). پاتوژن‌های آنتروپاتوژن از مقاومت بالایی در برابر آنتی‌بیوتیک‌های معمول برخوردارند بنابراین مقاومت در برابر داروهای جدید خیلی سریع ایجاد می‌شود. بیماری‌های اسهالی در بین بره‌ها بسیار شایع‌تر است و جستجوی عوامل جدید با فعالیت ضد باکتری در برابر بیماری‌های انتروپاتوژن دارای اولویت بهداشت عمومی است (۱ ، ۲). مواد ضد میکروبی جدید که از گیاهان دارویی حاصل می‌شود دارای اثرات بهبودی و بدون عوارض جانبی هستند. این بسیار مهم است زیرا یک مشکل عمده در مورد آنتی‌بیوتیک‌ها عدم موفقیت در دستیابی به درمان موفقیت‌آمیز است، که به نوبه خود به انتخاب سویه‌های باکتریایی مقاوم کمک می‌کند. با توجه به اثرات نامطلوب داروهای شیمیایی، استفاده از داروهای گیاهی دوباره مورد توجه قرار گرفته است (۱۵). اکثر عصاره‌های گیاهی دارای فعالیت ضد میکروبی هستند که عمدتا با ترکیبات فنلی آنها در ارتباط است. هر چقدر مقدار ماده فنلی موجود در عصاره‌های گیاه بیشتر باشد فعالیت ضد میکروبی بیشتری نشان می‌دهد (۱۶). در تحقیقاتی که توسط شهیدی روی ۱۰ گونه مختلف باکتری انجام شد، نشان داده شده است که عصاره متانولی پنیرک اثر ضد باکتریایی بر روی باسیلوس پومیلوس داشته است (۱۷). نتایج یک مطالعه دیگر نشان داد که عصاره پنیرک اثر مهاری شدیدی بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* *سودوموناس ائروژینوزا* و *اشریشیا کلی* دارد (۱۸). عصاره‌های متانولی گل و برگ پنیرک فعالیت ضد میکروبی بالایی در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* نشان داده است (۲۲). Dost-Mohamadi و همکاران (۲۰۱۲) ذکر کردند که عصاره‌های اتانولی گونه‌ای از پنیرک همراه با نانو ذرات نقره اثر مهاری بر *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا تیفی موریوم* داشتند که موارد ذکر شده با یافته‌های ما سازگار هستند (۱۹). اشراقی و همکاران (۲۰۰۹) اثر ضد باکتریایی پنیرک معمولی روی سویه نوکاردیا را نشان دادند (۱۵). این مطالعه تایید کرد که پنیرک اثر ضد باکتریایی بر علیه *سالمونلا انتریکا* و *اشریشیا کلی* دارد. با توجه به نتایج ارائه‌شده در این پژوهش و یافته‌های تحقیقات قبلی، استناط می‌گردد که پنیرک به‌طور بالقوه دارای اثر ضد میکروبی با طیف گسترده است. گرچه برای توصیف مکانیسم‌های دقیق ترکیبات پنیرک و بررسی سمیت آن برای تعیین فواید درمانی بالقوهٔ آن یا خطرات احتمالی که با مصرف خوراکی این عصاره گیاهی می‌تواند بروز دهد، مطالعاتی بیشتری لازم است.



شکل ۱. میکروپلیت‌ها و پلت که MIC و MBC را نشان می دهد: ستون های ۱-۱۰ (حاوی رقت های عصاره ای سریال) ، ستون های ۱۱ (چاه های کنترل رشد) ، ستون های ۱۲ (چاه های کنترل عدم رشد): رنگ بنفش (عدم رشد باکتری ها) و صورتی رنگ (رشد باکتری).

جدول ۱. حداقل غلظت باکتری کشی و حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره پنیرک بر باکتری های بالینی و استاندارد

سویه باکتری	حداقل غلظت باکتری کشی میلیگرم بر میلی‌لیتر	حداقل غلظت مهارکنندگی میلیگرم بر میلی‌لیتر
***سالمونلا انتریکا* استاندارد**	۰/۰±۱۰۰	۰/۰±۵۰
***سالمونلا انتریکا* بالینی**	۰/۰±۸۰	۰/۰±۴۲/۵
***اشریشیاکلی* استاندارد**	۰/۰±۱۰۰	۰/۰±۵۰
***اشریشیاکلی* بالینی**	۰/۰±۲۱/۲۵	۰/۰±۱۱/۵۶

جدول ۲. قطر هاله عدم رشد ایجاد شده توسط عصاره پنیرک و آنتی‌بیوتیک

سویه باکتری	عصاره پنیرک (میلی متر)	کلرامفنیکول (میلی متر)
سالمونلا انتریکا استاندارد	۱۰/۲	۱۳/۹
سالمونلا انتریکا بالینی	۱۵	۱۷
اشریشیاکلی استاندارد	۱۳/۳	۱۶
اشریشیاکلی بالینی	۱۶	۲۰

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که پنیرک دارای خواص ضد باکتری است. به‌طور ویژه می‌توان پنیرک را به‌عنوان جایگزینی مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌های مصنوعی برای درمان بره‌های اسهالی باکتریایی و به عنوان یک منبع ارزان و در دسترس مورد توجه قرار داد. مطمئناً به مطالعات بیشتری برای در نظر گرفتن مکانیسم اثرات ضد باکتریایی پنیرک و ترکیبات آن با دقت بیشتری نیاز است. بنابراین، با در نظر گرفتن اثرات مخرب آنتی‌بیوتیک‌ها، استفاده از داروهای مبتنی بر گیاهان دارویی می‌تواند افق جدیدی برای کنترل و درمان عوامل بیماری‌زای اسهال به‌ویژه باکتری‌ها باشد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از بیمارستان دامپزشکی دانشگاه ارومیه تشکر و قدردانی می‌شود.

تعارض در منافع

در انجام مطالعه حاضر، نویسندگان هیچ‌گونه تضاد منافعی نداشته‌اند.

Referance

1. SmithPalmer A, Stewart W, Mather H, Greig A, Cowden A, Cowden J, Reilly W. Epidemiology of S. enterica and Typhimurium in animals and people in Scotland between 1990 and 2001. Vet Rec. 2003; 153(17): 517-20. [DOI:10.1136/vr.153.17.517] [PMID]
2. Buxton A, Fraser G. Animal Microbiology. Oxford, London, UK: Blackwell Scientific Publications. 1977 Jan 1; 1: 94-102.
3. AwadMasalmeh M. Virulence genes of verotoxin producing non-157 E. coli strains isolated from healthy small ruminants and cattle. Wiener Tierarztliche Monatsschrift. 2004 Jan 1; 91 (2): 47-55.
4. Ghamarian A. compendium of data sheets for veterinary products. 2005-2006.
5. KollanoorJohny A, Darre M, Hoagland T, Schreiber D, Donoghue A, Donoghue D, Venkitanarayanan K. Antibacterial effect of trans- cinnamaldehyde on Salmonella Enteritidis and Campylobacter jejuni in chicken drinking water. J Appl Poult Res. 2008 Des 1; 17 (4): 490-497. [DOI:10.3382/japr.2008-00051]
6. Zhenyu W, Qian Y. Study on physico-chemical properties of the pigment in flowers of mallow. J Chem Indus Forest Produc. 2003 Sep 9; 23(3): 102-4.
7. Valnet J. Phytotherapy, treatment of disease by plants. Translated to Persian by: Emami A, Shams-Ardekani MR, Nekoei-naeini N. Tehran. Rahe-kamal Pub. 2002; 61-358.
8. Shale T, Stirk W, van Staden J. Variation in antibacterial and anti-inflammatory activity of different growth forms of Malva parviflora and evidence for synergism of the anti-inflammatory compounds. J Ethnopharmacol. 2005 Jan 4; 96(1-2):325-30. [DOI:10.1016/j.jep.2004.09.032] [PMID]
9. Gavanji S, Larki B, Bakhtari A. The effect of extract of Punica granatum var. pleniflora for treatment of minor recurrent aphthous stomatitis. Integr Med Res. 2014 Jun 1; 3(2): 83-90. [DOI:10.1016/j.imr.2014.03.001] [PMID] [PMCID]
10. Jorgensen J, Turnidge J. Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods. In: Jorgensen J, Pfaller M, Carroll K, editors. Manual of Clinical Microbiology. 11th ed. Washington, DC: American Society of Microbiology. 2015. 1253-1273. [DOI:10.1128/9781555817381.ch71]
11. Nozohour Y, Golmohammadi R, Mirnejad R, Fartashvand M. Antibacterial activity of pomegranate (punicagranatum l.) seed and peel alcoholic extracts on staphylococcus aureus and pseudomonas aeruginosa isolated from health centers. J Appl Biotechnol Rep. 2018 Mar 30; 5(1):32-36. [DOI:10.29252/JABR.01.01.06]

12. Andrews J. Determination of minimum inhibitory concentrations. J Antimicrob Chemother. 2001 Jul 48 (1):5-16. [DOI:10.1093/jac/48.suppl_1.5] [PMID]

13. Hajifattahi F, Moravej-Salehi E, Taheri M, Mahboubi A, Kamalinejad M. Antibacterial effect of hydroalcoholic extract of Punica granatum Linn. Petal on common oral microorganisms. Int J Biomater. 2016 Jan 14:1-6 [DOI:10.1155/2016/8098943] [PMID] [PMCID]

14. Garcia A, Ruiz-Santa-Quiteria J, Orden J, Cid D, Sanz R, Gómez-Bautista M, et al. Rotavirus and concurrent infections with other enteropathogens in neonatal diarrheic dairy calves in Spain. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2000 Jul 23 (3):175-83. [DOI:10.1016/S0147-9571(99)00071-5]

15. Elvin-lewis M. should we be concerned about herbal remedies. J Ethnopharmacol. 2001 May 75 (2): 141-64. [DOI:10.1016/S0378-8741(00)00394-9]

16. Mashak Z, Moradi B, Moradi B. The Combined Effect of ZatariamultifloraBoiss. andCinnamomumzeylanicumNees. Essential Oil on the Growth of Bacillus cereus in a Food Model System. J Med Plants 2012; 11(42): 62-73.

17. Mohajerfar T, Hosseinzadeh A, AkhondzadehBasti A, Khanjari A, Misaghi A, GandomiNasrabadi H. Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of Zatariamultiflora Boiss. Essential oil and Lysozim on L. monocytogenes. J Med Plants. 2012; 11(44):70-77.

18. Dulger B, Gonuz A. Antimicrobial activity of certain plants used in Turkish traditional medicine. Asian J Plant Sci. 2004; 3(1): 104-7. [DOI:10.3923/ajps.2004.104.107]

19. Dost-Mohamadi M. Nasiri-Semnani SH, Shapouri R, Alizadeh H, Abdo-lahzade P. Evaluation of antibacterial effects of aquatic and etha-nolic extracts of Malva neglecta & Silver nanoparticle on Staphylococus aureus and Salmonella typhimurium in In vivo and In vitro. J Zabol U Med Sci Health Serv. 2012; 4(1): 99-111.

20. Zareii B, Seyfi, Movahedi R, Cheraghi J, Ebrahimi S. Antibacte-rial effects of plant extracts of Alcea digitata L., Satureja bachtiari-ca L. And Ferula go angulate L. J Babul University Med Sci. 2014; 16(1):31-7.

21. Razavi S, Zarrini G, Molavi G, Ghasemi G. Bioactivity of Malva sylvestris L. a medicinal plant from Iran. Iran J Basic Med Sci. 2011 nove; 14 (6):574-9.