مجله تحقیقات دامپزشکی
دوره ۷۷، شماره ۴، ۱۴۰۱، ۲۲۷-۲۲۱
Homepage: jvr.ut.ac.ir
شاپا الکترونیکی: 2251-6190
انتشارات دانشگاه تهران
مقاله پژوهشی

# اثر ضدباکتریایی عصاره الکلی برگ زیتون (*Olea europaea .L*) بر *استافیلوکوکوس اورئوس*های جدا شده از شیر گاوهای مبتلا به التهاب پستان تحت بالینی

حسین شکیبا[۱]، حمیدرضا محمدی[۲]، اشکان جبلی‌جوان[۳]، رضا نارنجی‌ثانی[۲]

[۱] *دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران*
[۲] *گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران*
[۳] *گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، ایران*

**تاریخ دریافت:** ۱۸ مهر ماه ۱۴۰۱، **تاریخ پذیرش:** ۲۰ آذر ماه ۱۴۰۱
10.22059/jvr.2022.335938.3218 20.1001.1.20082525.1401.77.4.3.4

## چکیده

**زمینهٔ مطالعه**: التهاب پستان تحت بالینی نقش مهمی در زیان‌های اقتصادی مزارع گاو شیری ایفا می‌کند. باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* از مهم‌ترین عوامل این بیماری بوده که درمان آن با آنتی‌بیوتیک‌های سنتتیک دارای عوارضی مانند مقاومت آنتی‌بیوتیکی است و استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های گیاهی می‌تواند راهکار مناسبی برای کاهش این عوارض جانبی باشد.

**هدف**: تعیین حداقل غلظت مهاری عصاره الکلی برگ زیتون بر *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی شده از شیر گاوهای مبتلا به التهاب پستان تحت بالینی به منظور دستیابی به یک درمان دارویی گیاهی.

**روش‌کار**: مطالعه حاضر روی ۱۷۵ راس گاو ماده نژاد هلشتاین انجام گرفت. نمونه شیر به روش استریل از گاوها اخذ گردید و با استفاده از آزمون کالیفرنیایی ۶۰ راس گاو مبتلا به التهاب پستان تحت بالینی تعیین شدند. نمونه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به روش کشت از نمونه‌های مثبت جداسازی گردید. سپس به روش میکرودایلوشن حداقل غلظت مهاری عصاره الکلی برگ زیتون بر باکتری جدا سازی شده تعیین شد.

**نتایج**: از ۱۷۵ راس گاو مورد مطالعه، ۶۰ راس گاو در آزمون کالیفرنیایی التهاب پستان مثبت بودند که از ۱۴ مورد نمونه شیر موارد مثبت، باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی گردید. حداقل غلظت مهاری عصاره الکلی برگ زیتون *استافیلوکوکوس اورئوس* ۱۲۰۰۰ پی پی ام بود.

**نتیجه‌گیری نهایی**: عصاره الکلی برگ زیتون دارای اثر ضد باکتریایی بر *استافیلوکوکوس اورئوس* مولد التهاب پستان است و حداقل غلظت مورد نیاز برای بروز این اثر ۱۲۰۰۰ پی پی ام می‌باشد. اما در آینده به مطالعات بیشتری در زمینه اثرات این گیاه بر سایر عوامل باکتریایی التهاب پستان تحت بالینی گاو و بررسی مواد مؤثره موجود در عصاره نیاز است.

**کلمات کلیدی**: *استافیلوکوکوس اورئوس*، التهاب پستان، زیتون، شیر، گاو

کپی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است.
ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

*نویسنده مسئول: حمیدرضا محمدی، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران*

## مقدمه

التهاب پستان یکی از زیان آورترین بیماری‌های مزارع گاو شیری است و فرم تحت بالینی این بیماری به علت پنهان ماندن از چشم دامدار سبب ضررهای اقتصادی سنگینی ناشی از کاهش تولید شیر، دور ریختن شیر، مستعد شدن دام به سایر بیماری‌ها، مشکلات تولید مثلی و حذف دام می‌شود (۱). باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* از مهم‌ترین عوامل باکتریایی التهاب پستان تحت بالینی بوده که با داشتن آنزیم پنی‌سیلیناز به درمان با برخی از آنتی بیوتیک‌های خانواده بتالاکتام مقاوم است. دامپزشکان تا به امروز کوشیده‌اند تا با استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های سنتتیک بر ورم پستان تحت بالینی ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* فائق آیند (۲). با

توجه به عوارض جانبی بالا، مقاومت آنتی‌بیوتیکی و باقی مانده دارویی آنتی‌بیوتیک‌های سنتتیک استفاده از ترکیبات گیاهی می‌تواند به عنوان راه حل مناسبی در جهت درمان التهاب پستان تحت بالینی ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* مطرح گردد (۳). داروهای گیاهی دارای طیف متنوعی از اثرات درمانی و حداقل اثرات جانبی بوده و علاوه بر این امر می‌توان از آنان به عنوان راهکاری مناسب در مقابله با مقاومت دارویی استفاده نمود. در ضمن با توجه به تنوع پوشش گیاهی در ایران می‌توان با استفاده از این ترکیبات در جهت حمایت از تولید ملی و کاهش واردات دارویی نیز بهره جست (۴). زیتون با نام علمی *Olea europaea* گیاهی از راسته نعناسانان است. این گیاه بومی سوریه و جنوب ترکیه بوده و امروزه در تمام نقاط دنیا که دارای آب و هوای مدیترانه‌ای هستند، مورد کشت قرار می‌گیرد (۵). در متون سنتی به خواصی همچون درمان تب ناشی از مالاریا به دنبال مصرف گیاه زیتون اشاره گردیده است (۶). طی مطالعات علمی اثرات ضدمیکروبی (۷)، ضدالتهابی (۸) و کاهندگی فشار خون (۹) برگ این گیاه به اثبات رسیده و طی مطالعاتی اثر ضدباکتریایی عصاره برگ زیتون بر *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داده شده است (۱۰،۱۱). هدف از مطالعه حاضر تعیین حداقل غلظت مهاری یا همان MIC عصاره الکلی برگ زیتون بر *استافیلوکوکوس اورئوس*های جداسازی شده از گاوان مبتلا به التهاب پستان تحت بالینی جهت دستیابی به داروی گیاهی مؤثر علیه التهاب پستان می‌باشد.

## مواد و روش کار

**تهیه عصاره:** پس از تهیه ۲ کیلوگرم برگ زیتون در فروردین ماه سال ۱۳۹۶ از شهر سمنان، این گیاه به تأیید واحد پژوهش‌های گیاهی مؤسسه تحقیقات جهاد کشاورزی شهرستان سمنان رسید و پس از خشک شدن در سایه، گیاه مذکور به وسیله هاون به صورت پودر درآورده شد. پودر حاصل شده به مدت ۱۵ دقیقه با رعایت نسبت ۱ به ۵ در متانول ۸۰ درصد قرار گرفت و به مدت ۵ روز بر روی شیکر قرار داده شد. سپس محلول به دست آمده با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صاف گردید و محلول عبور کرده از صافی با دستگاه تبخیر تحت خلاء (روتاری) خشک گشت. عصاره به دست آمده تا زمان استفاده در شیشه‌های تیره و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه داری شد (۱۲). در زمان آزمایش با مخلوط کردن ۰/۲ گرم از عصاره در ۴ میلی لیتر محیط آبگوشت BHI حاوی ۵ درصد DMSO استوک اولیه با غلظت ۵۰۰۰۰ پی پی ام به دست آمد (۱۳) و با توجه به مطالعات صورت گرفته بر اثرات ضدمیکروبی عصاره الکلی برگ زیتون (۱۱)، از غلظت‌های ۲۵، ۳۱، ۶۲، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۴۰۰۰، ۸۰۰۰، ۱۲۰۰۰، ۱۶۰۰۰، ۲۰۰۰۰ پی پی ام در مطالعه حاضر استفاده گردید.

**نمونه‌گیری:** حجم نمونه در مطالعه حاضر بر اساس فرمول کوکران [$n= Z^2.P(1-P)/d^2$] و با توجه به مطالعه Islam و همکاران در سال ۲۰۱۱ تعیین گردید (۱۴) که مقادیر Z، P و d به ترتیب ۱/۹۶، ۰/۳ و ۵ درصد در نظر گرفته شد و با توجه به جمعیت هدف، حجم نمونه محدود محاسبه گردید که عدد به دست آمده برابر با ۳۰۱ بود. نمونه‌های شیر به صورت خوشه‌ای از گاوهای هلشتاین به ظاهر سالم از گاوداری صنعتی شهرستان سمنان تهیه شد. در هنگام نمونه هر گاو از لحاظ عدم وجود التهاب در پستان و کارتیه‌ها، عدم مشاهده لخته در شیر هر چهار کارتیه، فقدان علائم بالینی بیماری و تست کالیفرنیایی ورم پستان (CMT) مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین صورت که کارتیه به صورت کامل شسته شد و با الکل ۷۰ درصد ریخته شده روی پنبه استریل ضدعفونی گردید. پس از خشک کردن کارتیه با حوله استریل یک بار مصرف، سه دوشش ابتدایی سرپستانک دور ریخته شد و ۲۰ میلی‌لیتر شیر در لوله‌های استریل جمع آوری گردید (۱۵). هر نمونه شیر اخذ شده بلافاصله با رعایت شرایط دمایی ۴- درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان انتقال داده شد.

**جداسازی باکتری:** در آزمایشگاه هر نمونه شیر مربوط به کارتیه مثبت در CMT به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس گردید و ۱۰ میلی‌لیتر از آن با رعایت شرایط استریل به ۹۰ میلی‌لیتر آبگوشت پپتون واتر افزوده گشت و مخلوط حاصله به مدت یک دقیقه بر روی شیکر گذاشته شد و سپس به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از این مدت نمونه‌ها از انکوباسیون خارج شده و از آنان در محیط‌های برد پارکر آگار کشت خطی و انکوباسیون ۴۸ ساعته به عمل آمد. نمونه‌های مثبت شده در محیط مذکور که به صورت کلونی‌های سیاه کهربایی احاطه شده با حاله‌ای سفید بودند به عنوان *استافیلوکوکوس اورئوس* احتمالی در نظر گرفته شدند و برای خالص سازی تحت کشت در محیط نوترینت آگار قرار گرفتند. کشت مذکور به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه گذاری شد. کلنی‌های رشد کرده در این محیط با هدف تفریق باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* از سایر گونه‌های جنس استافیلوکوکوس تحت بررسی مرفولوژیک

و آزمون‌های بیوشیمیایی کاتالاز، کوآگولاز. اُکسیداز، DNase، تولید استون و تخمیر D-مانیتول قرار گرفتند. در بررسی مرفولوژیک پس از تهیه گسترش بر روی اسلاید شیشه‌ای، رنگ آمیزی گرم از وجود سلول‌های باکتریایی با ظاهر گرد، بنفش و خوشه‌ای حکایت داشت که نمایی شبیه به خوشه انگور را در ذهن بیننده تداعی می‌کرد (۱۶). جهت ذخیره سازی باکتری هر نمونه، پرگنه تأیید شده *استافیلوکوکوس اورئوس* در محیط BHI براث به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد، سپس ۱/۵ میلی‌لیتر از آن با ۰/۵ میلی‌لیتر گلیسیرین مخلوط گردید و تا زمان آزمایش در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۷).

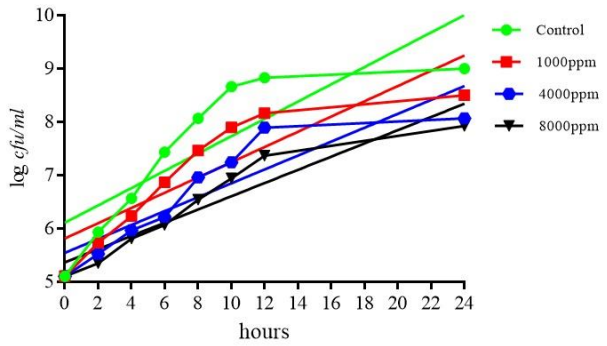
**طراحی آزمایش:** غلظت‌های مختلف عصاره الکلی برگ زیتون (۲۵، ۳۱، ۶۲، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۴۰۰۰، ۸۰۰۰، ۱۲۰۰۰، ۱۶۰۰۰، ۲۰۰۰۰ پی پی ام) در محیط آزمایشگاهی برای تعیین حداقل غلظت بازدارنده (MIC) به روش میکرودایلوشن بر روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد ارزیابی قرار گرفت. هم‌چنین غلظت‌های تحت بازدارنده عصاره الکلی برگ زیتون بر منحنی رشد باکتری مذکور نیز بررسی شد.

**تهیه میزان تلقیح باکتری:** جهت تهیه میزان تلقیح باکتری از کشت استوک به داخل محیط آبگوشت BHI برده و در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت گرم‌خانه گذاری شد. سپس از کشت اول کشت مجددی داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت گرم‌خانه گذاری شد. از کشت دوم مقادیر مختلفی به داخل لوله کووتی که حاوی ۴ میلی‌لیتر آبگوشت BHI استریل بود، منتقل شد تا جذب نوری ۰/۱ در طول موج ۶۰۰ نانومتر به دست آید. سپس با انتقال ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتریایی داخل کووت، به لوله حاوی ۹ میلی‌لیتر آب پپتونه ۰/۱ درصد رقت‌های متوالی تا $10^{-6}$ تهیه شد و پس از کشت سطحی در محیط BHI آگار میزان غلظت باکتری در هر میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری با جذب نوری معادل ۰/۱ محاسبه شد. با مشخص شدن این عدد هر گاه که سوسپانسیون باکتریایی با جذب نوری ۰/۱ تهیه شود، تعداد باکتری در آن معادل عدد محاسبه شده بوده و می‌توان از این سوسپانسیون غلظت‌های دلخواه را تهیه نمود. البته در هر مورد تعداد دقیق باکتری تلقیح شده از طریق کشت هم‌زمان باکتری و شمارش تعداد کلونی محاسبه شد (۱۸).

**تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد به روش میکرودایلوشن:** در مطالعه حاضر، جهت تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد به روش میکرودایلوشن از پلیت ۹۶ خانه با چاهک ته گرد و با حجم ۳۰۰ میکرولیتر استفاده گردید. غلظت‌های متوالی از عصاره الکلی برگ زیتون (۲۵، ۳۱، ۶۲، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۴۰۰۰، ۸۰۰۰، ۱۲۰۰۰، ۱۶۰۰۰، ۲۰۰۰۰ پی پی ام) در آبگوشت BHI حاوی ۵ درصد DMSO تهیه شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره به هر چاهک از پلیت‌های ۹۶ خانه انتقال داده شد و تا ۱۱ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی (با غلظت تقریبی $5 \times 10^5$ CFU باکتری در هر میلی لیتر) در هر چاهک اضافه گردید (۱۹). محتویات هر چاهک به مدت ۲ دقیقه توسط Plate Reader مجهز به شیکر مخلوط شد. سپس جذب نوری با استفاده از Plate Reader در زمان صفر و با طول موج ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شدند و بعد از اتمام گرم‌خانه‌گذاری کدورت یا عدم کدورت در چاهک‌ها به صورت چشمی مشاهده گردید و با جذب نوری خوانده شده بعد از گرم‌خانه گذاری توسط Plate Reader تأیید شد. روش کار بدین صورت بود که افزایش جذب نوری به میزان بزرگ‌تر یا مساوی ۰/۱ نسبت به زمان صفر به معنی رشد باکتری و ایجاد کدورت و اولین غلظت عصاره که فاقد کدورت بود، به منزله حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) در نظر گرفته شد (۲۰).

**بررسی اثر عصاره الکلی برگ زیتون بر نمودار رشد باکتری:** در این مرحله اثر غلظت‌های تحت بازدارنده عصاره الکلی برگ زیتون بر رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در طی ۲۴ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. غلظت‌های مورد استفاده شامل ۱۰۰۰، ۴۰۰۰ و ۸۰۰۰ پی پی ام بودند. بدین صورت که ۱۰ میلی‌لیتر از محلول‌های تهیه شده با غلظت‌های مذکور در لوله استریل ریخته شد و ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاوی $5 \times 10^5$ cfu در هر میلی لیتر به هر لوله اضافه گردید. لوله‌ها در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و در ساعات صفر، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲ و ۲۴ تحت کشت سه‌تایی در محیط BHI آگار قرار گرفتند و پس از یک گرم‌خانه‌گذاری ۲۴ ساعته در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد، تعداد کلونی‌ها شمارش و تعداد باکتری‌ها بر حسب cfu/ml ثبت گردید (۱۹).

**تحلیل آماری:** داده‌های حاصل از بررسی اثر عصاره بر نمودار رشد باکتری به روش رگرسیون خطی مدل سازی گردیدند و شیب نمودارها به روش آنالیز واریانس یک‌طرفه و تست تکمیلی توکی در سطح اطمینان ۹۵ درصد مقایسه شدند.




**نمودار ۱.** روند رشد باکتری در طول ۲۴ ساعت پس از افزودن غلظت‌های مختلف بازدارنده رشد باکتری.

## نتایج

**نتایج مربوط به جداسازی باکتری:** در مطالعه حاضر ۱۷۵ راس گاو مورد مطالعه قرار گرفت که از این تعداد ۶۰ راس با سلامت بالینی دام، در آزمون کالیفرنیایی شیر مثبت و مشکوک به ورم پستان تحت بالینی اعلام شدند. طی بررسی آزمایشگاهی بر نمونه‌های مشکوک، از ۱۴ نمونه عامل *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی گردید.

**نتایج مربوط به تعیین MIC عصاره:** در تمام نمونه‌های مثبت از لحاظ *استافیلوکوکوس اورئوس* گوده حاوی ۱۲۰۰۰ پی پی ام از عصاره برگ زیتون، اولین گوده فاقد کدورت بود. همچنین نتایج حاصل از جذب نوری توسط دستگاه پلیت خوان در طول موج ۶۰۰ نانومتر قبل و پس از انکوباسیون با نتایج مشاهده چشمی پلیت‌ها هم‌خوانی داشت.

**نتایج مربوط به اثر عصاره بر روند رشد باکتری:** غلظت‌های ۴۰۰۰ و ۸۰۰۰ پی پی ام نسبت به گروه کنترل سبب مهار معنی‌دار رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در طول ۲۴ ساعت گردیدند ($P<۰/۰۵$). غلظت ۱۰۰۰ پی پی ام نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌داری نداشت ($P>۰/۰۵$) و فاقد اثر مهاری بر رشد باکتری در طول ۲۴ ساعت بود (نمودار ۱).

## بحث

در مطالعه حاضر مشخص گردید که عصاره الکلی برگ زیتون نسبت به باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا سازی از شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی، دارای اثر ضدباکتریایی وابسته به دز است و حداقل غلظت مورد نیاز از عصاره الکلی این برگ برای مهار رشد باکتری مذکور ۱۲۰۰۰ پی پی ام می‌باشد.

برگ زیتون سرشار از ترکیبات فنلی شامل هیدروکسی تیروزول، تیروزول،کافئیک اسید، پی-کوماریک اسید، وانیلیک اسید، وانیلین، اولئوروپین، لوتئولین، دیئوسمتین، روتین، ورباسکوزید، لوتئولین۷-گلوکوزید، آپیژنین۷-گلوکوزید و دیئوسمتین۷-گلوکوزید بوده و بیشترین سهم ترکیبات فنلی در برگ زیتون به اولئوروپین و هیدروکسی‌تیروزول تعلق دارد که هیدروکسی‌تیروزول پیش ساز اولئوروپین است (۲۱).

طی دو مطالعه Fattouch و همکاران در سال ۲۰۰۷ و Estevinho و همکاران در سال ۲۰۰۸ مشخص گردید که ترکیبات فنولی دارای خاصیت ضد میکروبی می‌باشند (۲۲،۲۳). همچنین Doman و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که ترکیبات فنولی به‌وسیله اثر بر سطح غشای میکروارگانیسم‌ها اثر ضد میکروبی خود را اعمال می‌نمایند (۲۴). پس با توجه به مطالعات مذکور می‌توان خاصیت آنتی بیوتیکی عصاره الکلی برگ زیتون را به ترکیبات فنلی موجود در آن نسبت داد.

بر اساس مطالعه Acar و همکاران در سال ۲۰۱۰ مشخص گردید که عصاره‌های گیاهی بر باکتری‌های گرم مثبت اثر بهتری نسبت به باکتری‌های گرم منفی دارند (۲۵). همچنین طی مطالعه Kalemba و Kunicka در سال ۲۰۰۳ مشخص گردید که سطح هیدروفیل دیواره سلولی لیپوپلی ساکاریدی باکتری‌های گرم منفی به عنوان سدی در برابر آنتی بیوتیک‌ها عمل می‌کند اما در باکتری‌های گرم مثبت، مواد ضد میکروبی به راحتی دیواره سلولی را تخریب می‌نمایند (۲۶). بنابراین می‌توان گفت که ممکن است عصاره برگ زیتون بر باکتری‌های گرم مثبت از جمله *استافیلوکوکوس اورئوس* در مقایسه با عوامل باکتریایی گرم منفی ورم پستان مانند *اشریشیاکلی* اثربخشی بیشتری داشته باشد.

براساس مطالعه Sudjana و همکاران در سال ۲۰۰۹ مشخص گردید که عصاره برگ زیتون دارای خاصیت ضد میکروبی است. بدین صورت که اثر ضدمیکروبی عصاره این برگ بر ۲۸ گونه میکروبی از جمله گونه‌های استافیلوکوکوس، لیستریا، لاکتوباسیلوس، سالمونلا و قارچهایی مثل کاندیدیا به روش براث میکرودایلوشن بررسی و MIC مربوط به هر کدام ارایه گردید. علاوه بر این Sudjana و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که عصاره برگ زیتون اثر ضدمیکروبی قوی‌تری بر باکتری‌ها نسبت به قارچها دارد و در میان باکتری‌ها هم بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، کمپیلوباکتر و هلیکوباکتر نسبت به سایر گونه‌های باکتریایی مؤثرتر است (۲۷). طی مطالعه دیگری

Pereira و همکاران در سال ۲۰۰۷ اثر ضد میکروبی عصاره آبی برگ زیتون بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس*، *باسیلوس سوبتیلیس*، *اشریشیاکلی*، *سودوموناس آئروژناس*، *کلبسیلا پنومونیه* و قارچ‌های *کاندیدا آلبیکنز* و *کاندیدا نئوفورمنس* بررسی گردید و مشخص شد که برگ زیتون بر این میکروارگانیسم‌ها اثر بازدارندگی رشد دارد که این اثر در باکتری‌ها نسبت به قارچ‌ها بیشتر بود. همچنین در بین باکتری‌های تحت بررسی، باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سوبتلیس*، *کلبسیلا پنومونیه* و سودوموناس حساس‌تر بودند (۲۸). در مطالعه Rafiei و همکاران در سال ۲۰۱۲ اثر ضدمیکروبی عصاره‌های متانولی، استونی و آبی برگ گیاه زیتون به روش براث میکرودایلوشن بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیاکلی*، *سالمونلا تیفی* مورد مطالعه قرار گرفت و نشان داده شد که این گیاه ضمن داشتن اثر آنتی بیوتیکی بر این باکتری‌ها، بیشترین اثر مهاری را بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* داشته است و عصاره الکلی نسبت به عصاره آبی از اثربخشی بالاتری برخوردار است به طوری که حداقل غلظت بازدارندگی رشد این گیاه با عصاره الکلی نصف عصاره آبی بود (۲۹). به همین دلیل در این مطالعه از عصاره الکلی استفاده شد. در ضمن Chirinos و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان دادند که آب به‌دلیل قطبیت بالا و استون به‌دلیل غیر قطبی بودن حلال خوبی برای انحلال ترکیبات فنولی نمی‌باشند (۳۰). در مطالعه Sudjana و همکاران در سال ۲۰۰۹، MIC عصاره الکلی برگ زیتون برای باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بین ۰/۸ تا ۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و حداقل غلظت بازدارندگی رشد که بر ۹۰ درصد نمونه‌ها اثر داشته است ($MIC_{90}$) ۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برآورد شد (۲۷). در مطالعه حاضر MIC عصاره الکلی برگ زیتون بر *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از ورم پستان تحت بالینی گاو ۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (۱۲۰۰۰ پی پی ام) بود که با نتایج دو مطالعه همخوانی دارند و اختلافات اندکی که در میزان عصاره لازم برای تأثیر بر باکتری در مطالعات مختلف دیده می‌شود می‌تواند ناشی از تفاوت در ترکیب عصاره باشد زیرا ترکیبات یک گیاه ممکن است بسته به ناحیه جغرافیایی، سن گیاه، فصل و روش استحصال عصاره دستخوش تغییر گردد (۲،۱۶). همچنین Gerrits و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که نتایج حاصل از حساسیت باکتری‌ها در شرایط آزمایشگاهی را نباید به شرایط طبیعی و درون‌تنی (in vivo) تعمیم داد زیرا ممکن است میزان حساسیت باکتری نسبت به یک آنتی‌بیوتیک در شرایط درون‌تنی متفاوت باشد (۳۱).

**نتیجه‌گیری نهایی:** به طور کلی نتایج مطالعه حاضر نشان داد که غلظت ۱۲۰۰۰ پی پی ام عصاره الکلی برگ زیتون بر *استافیلوکوکوس اورئوس* ایجادکننده التهاب پستان تحت بالینی اثر مهاری دارد که می‌تواند به عنوان یک ترکیب دارویی ارزان و در دسترس در درمان التهاب پستان‌های ناشی از عامل *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد استفاده قرار گیرد. حال پیشنهاد می‌گردد که اثر ضدمیکروبی عصاره الکلی برگ زیتون طی یک کارآزمایی بالینی در گاوهای مبتلا به التهاب پستان تحت بالینی ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد ارزیابی قرار گیرد و علاوه بر این اثر ضد میکروبی عصاره الکلی برگ زیتون بر سایر پاتوژن‌های مولد التهاب پستان گاو شیری، اجزاء مختلف مؤثره این گیاه نیز مورد مطالعه واقع شود.

## سپاسگزاری

بدینوسیله از زحمات کارشناسان آزمایشگاه مرکزی و شیمی مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان تشکر و قدردانی می شود.

## تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

## References

1. Hogeveen H, Steeneveld W, Wolf CA. Production diseases reduce the efficiency of dairy production: A review of the results, methods, and approaches regarding the economics of mastitis. Annu Rev Resour Economics. 2019; 11: 289-312. doi: 10.1146/annurev-resource-100518-093954
2. Rosario I, Zunino PM, Gil AD, Laport A, Hirigoyen DJ. Antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* associated with subclinical and clinical mastitis in Uruguay during an eight-year period. Austral J Vet Sci. 2017; 49(3): 191-194. doi: 10.4067/S0719-81322017000300191
3. Francoz D, Wellemans V, Dupré J, Roy J, Labelle F, Lacasse P. Invited review: A systematic review and qualitative analysis of treatments other than conventional antimicrobials for clinical mastitis in dairy cows. J. Dairy Sci. 2017; 100(10): 7751-7770. doi: 10.3168/jds.2016-12512
4. Tariq S, Wani S, Rasool W, Shafi K, Bhat MA, Prabhakar A, Shalla AH, Rather MA. A comprehensive review of the

antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. Microb Pathog. 2019; 134: 103580. doi: 10.1016/j.micpath.2019.103580 PMID: 31195112
5. Zeriouh W, Nani A, Belarbi M, Dumont A, De-Rosny C, Aboura I. Correction: Phenolic extract from oleaster (*Olea europaea* var. Sylvestris) leaves reduces colon cancer growth and induces caspase-dependent apoptosis in colon cancer cells via the mitochondrial apoptotic pathway. PloS one. 2017; 12(4): 137-142. PMID: 28212423
6. Özcan MM, Matthäus B. A review: benefit and bioactive properties of olive (*Olea europaea L.*) leaves. Eur Food Res Technol. 2017; 243(1): 89-99.
7. Thielmann J, Kohnen S, Hauser C. Antimicrobial activity of *Olea europaea* Linné extracts and their applicability as natural food preservative agents. Int J Food Microbiol. 2017; 251: 48-66. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.03.019 PMID: 28395179
8. Vezza T, Algieri F, Rodríguez- Nogales A, Garrido- Mesa J, Pilar-Utrilla M, Talhaoui N. Immunomodulatory properties of *Olea europaea* leaf extract in intestinal inflammation. Mol Nutr Food Res. 2017; 61(10): 61-67. PMID: 28731213
9. DalBó S, De-Aguiar-Amaral P. Medicinal Plants that can Cause Changes in Blood Pressure and Interactions with Antihypertensive Agents. A J Ethno. 2017; 4(1): 1-8.
10. Korukluoglu M, Sahan Y, Yigit A, Ozer, ET, Gucer S. Antibacterial activity and chemical constitutions of *Olea europaea L.* leaf extracts. J Food Process. 2010; 34(3): 383-396.
11. Al-Quraishy S, Othman M S, Dkhil M A, Moneim A E A. Olive (Olea europaea) leaf methanolic extract prevents HCl/ethanol-induced gastritis in rats by attenuating inflammation and augmenting antioxidant enzyme activities. Biomed Pharmacother. 2017; 91: 338-349. doi: 10.1016/j.biopha.2017.04.069 PMID: 28463797
12. Gholami-Ahangaran M, Bahmani M, Zia-Jahromi N. Comparative and evaluation of anti-leech (*Limnatis nilotica*) effect of olive (*Olea europaea L.*) with levamisole and thiabendazole. Asian Pac J Trop Dis. 2012; 2: 101-103.
13. Lambert R, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas GJ. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. J. Appl. Microbiol. 2001; 91(3): 453-462. doi: 10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x PMID: 11556910
14. Islam MA, Islam MZ, Islam MA, Rahman MS, Islam MT. Prevalence of subclinical mastitis in dairy cows in selected areas of Bangladesh. Bangladesh J Vet Med. 2011; 9(1): 73-78.
15. Godden SM, Jansen JT, Leslie KE, Smart NL, Kelton DF. The effect of sampling time and sample handling on the detection of *Staphylococcus aureus* in milk from quarters with subclinical mastitis. Can Vet J. 2002; 43(1): 38. PMID: 11802668
16. Thaker HC, Brahmbhatt MN, Nayak JB. Isolation and identification of *Staphylococcus aureus* from milk and milk products and their drug resistance patterns in Anand. Vet World. 2013; 6(1):10-13.
17. Sakai H, Procop G, Kobayashi N, Togawa D, Wilson D, Borden L. Simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci in positive blood cultures by real-time PCR with two fluorescence resonance energy transfer probe sets. J Clin Microbiol. 2004; 42(12): 5739-5744. doi: 10.1128/JCM.42.12.5739-5744.2004 PMID: 15583307
18. Strommenger B, Kettlitz C, Werner G, Witte W. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 2004; 41(9): 4089-4094. doi: 10.1128/JCM.41.9.4089-4094.2003 PMID: 12958230
19. Imelouane B, Amhamdi H, Wathelet JP, Ankit M, Khedid K, El-Bachiri A. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of thyme (*Thymus vulgaris*) from Eastern Morocco. Int J Agric Biol. 2009; 11(2): 205-208.
20. Oussalah M, Caillet S, Saucier L, Lacroix M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157: H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. Food Control. 2007; 18(5): 414-420.
21. Benavente-Garcıa O, Castillo J, Lorente J, Ortuno A, Del Rio J. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea L.* leaves. Food Chemistry. 2000; 68(4): 457-462.
22. Estevinho L, Pereira AP, Moreira L, Dias LG, Pereira E. Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. Food Chem Toxicol. 2008; 46(12): 3774-3779. doi: 10.1016/j.fct.2008.09.062 PMID: 18940227
23. Fattouch S, Caboni P, Coroneo V, Tuberoso CI, Angioni A, Dessi S. Antimicrobial activity of *Tunisian quince* (*Cydonia oblonga* Miller) pulp and peel polyphenolic extracts. J Agric Food Chem. 2007; 55(3): 963-969. doi: 10.1021/jf062614e PMID: 17263500
24. Duman AD, Ozgen M, Dayisoylu KS, Erbil N, Durgac C. Antimicrobial activity of six pomegranate (*Punica granatum L.*) varieties and their relation to some of their pomological and phytonutrient characteristics. Molecules. 2009; 14(5): 1808-1817. doi: 10.3390/molecules14051808 PMID: 19471201
25. Acar G, Dogan NM, Duru ME, Kıvrak I. Phenolic profiles, antimicrobial and antioxidant activity of the various extracts of Crocus species in Anatolia. Afr J Microbiol Res. 2010; 4(11): 1154-1161.
26. Kalemba D, Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Curr Med Chem. 2003; 10(10): 813-829. doi: 10.2174/0929867033457719 PMID: 12678685
27. Sudjana AN, D'Orazio C, Ryan V, Rasool N, Ng J, Islam N. Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. Int J Antimicrob Agents. 2009; 33(5): 461-463. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2008.10.026 PMID: 19135874
28. Pereira AP, Ferreira IC, Marcelino F, Valentão P, Andrade PB, Seabra R. Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves. Molecules 2007; 12(5): 1153-1162. doi: 10.3390/12051153 PMID: 17873849
29. Rafiei Z, Jafari S, Alami M, Khomeiri M. Evaluation of antimicrobial activity of olive leaf extracts by ELISA method. IJMAPR. 2012; 28(2): 280-292. (Persian).
30. Chirinos R, Rogez H, Campos D, Pedreschi R, Larondelle Y. Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (Tropaeolum tuberosum Ruíz & Pavón) tubers. Sep Purif Technol. 2007; 55(2): 217-225.
31. Gerrits MM, Van-Vliet AH, Kuipers EJ, Kusters JG. *Helicobacter pylori* and antimicrobial resistance: molecular mechanisms and clinical implications. Lancet Infect Dis. 2006; 6(11): 699-709. doi: 10.1016/S1473-3099(06)70627-2 PMID: 17067919

Journal of Veterinary Research
J Vet Res, Volume 77, Number 4, 2023
Homepage: jvr.ut.ac.ir
Online ISSN: 2251-6190
University of Tehran Press
Original Article

# Antibacterial Effect of Olive Leaf (*Olea europaea. L*) Alcoholic Extract on *Staphylococcus aureus* Isolated from Milk Sample of Cows with Subclinical Mastitis

**Hossein Shakiba[1]✉, Hamid Reza Mohammadi[2]✉, Ashkan Jebelli Javan[3]✉, Reza Narenji Sani[2]✉**

[1] *Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran*
[2] *Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran*
[3] *Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran*

10.22059/jvr.2022.335938.3218
***Received:*** *10 October 2022,* ***Accepted:*** *11 December 2022*

## Abstract

**BACKGROUND:** Subclinical mastitis plays an important role in the economic losses of dairy cattle farms. Staphylococcus aureus is one of the most important causes of this disease. Treatment of this disease with synthetic antibiotics has complications like antibiotic resistance. Using herbal antibiotics can be an excellent way to reduce these side effects.

**OBJECTIVES:** This study aimed to determine the minimum inhibitory concentration of alcoholic extract of olive leaf on *Staphylococcus aureus* isolated from milk of cows with subclinical mastitis to achieve herbal treatment.

**METHODS:** This study was conducted on 175 Holstein female cattle. The milk samples of 60 cows were obtained with the sterilized method, and Subclinical mastitis-positive cases were determined using the California mastitis test. *Staphylococcus aureus* bacteria were isolated from positive samples by culture method, and the minimum inhibitory concentration of olive (*Olea europaea L.*) leaves alcoholic extract on isolated bacteria was determined by microdilution method.

**RESULTS**: From 175 cows under study, 60 cows had a positive California mastitis test, and *Staphylococcus aureus* separated from milk samples of 14 cows. The minimum inhibitory concentration of olive (*Olea europaea L.*) leaves extract on this bacterium was 12000 ppm.

**CONCLUSIONS**: Alcoholic extract of olive (*Olea europaea L.*) leaves has an antimicrobial effect on *Staphylococcus aureus* as a cause of mastitis. The minimum concentration required for this effect was 12000 ppm. Further studies on the impact of this plant on other bacterial causes of subclinical mammary inflammation in cows and investigation of the effective substances in the extract are needed.

**Keywords**: Cattle, Mastitis, Milk, Olive, *Staphylococcus aureus*

Copyright © 2023. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution- 4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

**Corresponding author:** Hamid Reza Mohammadi, Tel/Fax: 023-331532612 / 023-31532626

**How to cite this article:**

Shakiba H, Mohammadi H R, Jebelli Javan A, Narenji Sani R. Antibacterial Effect of Olive Leaf (*Olea europaea. L*) Alcoholic Extract on *Staphylococcus aureus* Isolated from Milk Sample of Cows with Subclinical Mastitis. J Vet Res, 2023; 77(4): 221-227. doi: 10.22059/jvr.2022.335938.3218

## Figure Legends and Table Captions

**Diagram 1.** The process of bacterial growth during 24 hours after adding different concentrations of bacterial growth inhibitor.