مطالعه اثرات ضد میکروبی عصاره متانولی گل راعی (*Hypericum perforatum*) بر باکتری های غذازاد

لیلا قدرتی[1]، مهرداد عطایی کچویی[2،3*]، صادق موسوی فرد[4،5]، فریبرز معطر[6،7]

۱. دانشجوی دکتری تخصصی گیاهان دارویی، گروه گیاهان دارویی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۲. دانشیار گروه گیاهان دارویی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۳. دانشیار مرکز تحقیقات فرآوری گیاهان دارویی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۴. استادیار گروه گیاهان دارویی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
۵. گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران.
۶. استاد گروه گیاهان دارویی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
۷. گروه فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

***نویسنده مسئول:** *Drataie@iaushk.ac.ir*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۲/۲۵

چکیده

گل راعی گیاهی طبی از جنس هیپرکاسیه است که دارای ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی با خصوصیات ضدمیکروبی بالا است. مطالعه حاضر به منظور ارزیابی اثرات ضدمیکروبی عصاره متانولی گل راعی روی باکتری های غذازاد انجام پذیرفت. اندام هوایی گل راعی از مزرعه تحقیقاتی تهیه و پس از تایید توسط کارشناسان، خشک و پودر شد و برای تهیه عصاره متانولی استفاده شد. قطر هاله عدم رشد باکتری های *سودوموناس آئروژینوزا*، *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* با استفاده از روش دیسک گذاری ارزیابی و با آنتی بیوتیک ها مقایسه شد. حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره متانولی گل راعی روی باکتری های مورد نظر با استفاده از پلیت الایزا ارزیابی شد. قطر هاله عدم رشد باکتری ها در برابر عصاره متانولی گل راعی رنجی معادل ۰/۴۵ ± ۹/۳۳ تا ۰/۶۰ ± ۱۵/۲۸ میلی متر داشت. استفاده از غلظت ۱۰۰ میلی گرم/میلی لیتر از عصاره متانولی گل راعی سبب ایجاد بیشترین قطر هاله عدم رشد *سودوموناس آئروژینوزا* (۰/۵۳ ± ۱۲/۲۷ میلی متر)، *اشریشیا کلی* (۰/۵۹ ± ۱۳/۲۰ میلی متر) و *استافیلوکوکوس اورئوس* (۰/۶۰ ± ۱۵/۲۸ میلی متر) شد. اثرات ضد میکروبی عصاره متانولی گل راعی وابسته به دوز بود ($P<0/05$). کمترین و بیشترین میزان MIC و MBC عصاره متانولی گل راعی برای *استافیلوکوکوس اورئوس* (به ترتیب ۰/۰۰۱۰ و ۰/۰۰۱۹) و *اشریشیا کلی* (به ترتیب ۰/۵۰ و ۱/۰۰) بدست آمد. قطر هاله عدم رشد باکتری های تیمار شده با عصاره متانولی گل راعی در مقایسه با بسیاری از دیسک های آنتی بیوتیکی، بیشتر بود.

کلید واژه ها: *Hypericum perforatum*، عصاره متانولی، ضد میکروبی، باکتری غذازاد.

مقدمه

بیماری های غذازاد در دهه های اخیر منجر به بروز طیف گسترده ای از مسمومیت های غذایی و مشکلات گوارشی در انسان و به بار آمدن خسارات اقتصادی جبران ناپذیر ناشی از هزینه های درمان بیماران، شده اند. در بین باکتری های غذازاد، اهمیت *اشریشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناس آئروژینوزا* به عنوان برخی از مهم ترین و فراوان ترین عوامل ایجاد کننده بیماری های غذازاد، بیشتر است (Abebe et al., 2020). *اشریشیا کلی* یک باکتری گرم منفی، میله ای شکل، بدون اسپور و بی هوازی اختیاری است که جزء باکتری های

روده ای بوده و موجب عفونت های غذایی مهلک در انسان می گردد(Hemmatinezhad et al., 2015). چندین سویه از باکتری *اشریشیا کلی* به عنوان بیماری زاهای بالقوه در اثر مصرف مواد غذایی آلوده، معرفی شده اند. یکی از سویه های مهم این باکتری، *اشریشیا کلی* O157:H7 می باشد که جز تیپ های تولید کننده شیگاتوکسین (STEC) است و معمولا به عنوان عامل ایجاد کننده بیماری های مهم و خطرناک کولیت خونریزی دهنده، اسهال خونی و غیرخونی، ترومبوسیتوپنی، آنمی همولیتیک، اختلالات کلیوی و سندرم همولیتیک اورمیک در انسان است (Ranjbar et al., 2017). *استافیلوکوکوس اورئوس*، یکی از شایع ترین عوامل عفونت های بیمارستانی و همچنین دلیل بروز اکثر مسمومیت های غذایی در جوامع محسوب می شود (Dehkordi et al., 2017). *استافیلوکوکوس اورئوس* یک باکتری کوکسی شکل، گرم مثبت، هوازی بی هوازی اختیاری، کاتالاز مثبت و مهمترین گونه از جنس استافیلوکوک است. علاوه بر عفونت های پوستی، عفونت زخم و سوختگی، مننژیت، اندوکاردیت، پنومونی و سندرم شوک سمی، *استافیلوکوکوس اورئوس* عامل بروز مسمومیت غذایی با دوره کمون کوتاه ۲ تا ۴ ساعته و علائم تهوع، استفراغ، دل پیچه و ضعف، می‌باشد، هر چند که اسهال نیز در پاره ای از موارد گزارش شده است (Momtaz et al., 2013). *سودوموناس آئروژینوزا* یک پاتوژن فرصت طلب شایع بیمارستانی است که مسئول طیف وسیعی از عفونت‌های انسانی شامل عفونت‌های دستگاه ادراری و تنفسی، پوستی، عفونت‌های بافت نرم، باکتریمی، عفونت‌های استخوان و مفاصل، عفونت‌های دستگاه گوارش، انواع عفونت‌های سیستمیک، عفونت در بیماران با سوختگی شدید، زخم بستر، در بیماران ایدزی و سرطانی که دچار دپرسیون سیستم ایمنی هستند می‌باشد (Raposo et al., 2017). این باکتری جز فلور میکروبی گوشت های تازه، سرد و منجمد محسوب می شود و اغلب دلیل بروز عفونت های غذایی و گوارشی در ثصر مصرف آب آلوده محسوب می شود. همچنین باکتری جزء فلور انواع زخم‌های عفونی و سوختگی‌های سطحی بدن انسان می‌باشد و به راحتی در اثر دستکاری‌هایی که روی مواد غذایی خام، اعمال می‌شود، می‌تواند به آن ها منتقل گردد. بعلاوه سودوموناس‌ها عواملی برای فساد در برخی از انواع مواد غذایی مانند گوشت هستند (Freedman et al., 1989).

گل راعی (*Hypericum perforatum*) گیاهی است علفی و دائمی از جنس هیپرکاسیه به ارتفاع یک متر با بوی معطر، دارای برگ های متقابل، بیضوی، با ساقه بلند، به تعداد زیاد و منشعب. گل های آن بصورت گل آذین و زرد رنگ است که در کناره‌های گلبرگ زرد رنگ نقاط تیره به رنگ قرمز مایل به قهوه‌ای دیده می‌شود. زمان گلدهی گیاه برحسب ناحیه رویش از اردیبهشت تا مهرماه می‌باشد. محل رویش گیاه در کوهستان‌ها و ارتفاعات نواحی شمالی کشور و همچنین در ارتفاعات متوسط و کم بسیاری از نقاط از جمله کرج، راه چالوس، لاهیجان، ارومیه، بروجرد، گنبدکاووس، کلاردشت و اطراف تهران می باشد (Azizi et al., 2010). قسمت‌های مورد استفاده دارویی گیاه سرشاخه‌های گلدار آن است (Greeson et al., 2001). سر شاخه‌های گلدار و برگ های گل راعی در استعمال داخلی، محرک، اشتهاآور، بهبود دهنده هضم، قابض، ضداسید معده، مدر، ضدالتهاب، دافع کرم، تب‌بر و ضد افسردگی و در استعمال خارجی التیام بخش و ضدعفونت موضعی می‌باشد (Shrivastava et al., 2015). طیف گسترده‌ای از ترکیبات فعال بیولوژیکی از جمله نفتودیانترون‌ها (هایپرسین و هایپرفورین)، آسیل‌فلوروگلوگسینول‌ها (هایپرفورین و ادهایپرفورین)، زانتون‌ها وفلاونوئیدها تاکنون در این گیاه شناسایی و گزارش شده است (Esmaeilzadeh Kenari et al., 2014).

با توجه به نقش باکتری های غذازاد در بروز مسمومیت های غذایی و نبود مطالعات مدون روی اثرات ضدمیکروبی گل راعی، مطالعه حاضر به منظور ارزیابی اثرات ضد

میکروبی عصاره متانولی گل راعی روی باکتری های *اشریشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناس آئروژینوزا* انجام پذیرفت.

روش کار

جمع آوری گیاهان دارویی

اندام هوایی گیاه گل راعی که در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، پرورش داده شده بود، در بهار سال ۱۳۹۹، جمع آوری و به آزمایشگاه منتقل شد. ابتدا گونه گیاه توسط یکی از مختصصین گروه گیاهان دارویی و معطر دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد تایید و نمونه هرباریوم آن در مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان چهارمحال و بختیاری ثبت شد (شماره هرباریوم ۱۹۶۶).

تهیه عصاره از گیاه گل راعی

ابتدا اندام هوایی گیاه گل راعی در سایه و در دمای اتاق خشک شد. سپس قسمت های خشک شده با استفاده از آسیاب برقی (Best 350, Germany) پودر شدند. به منظور عصاره گیری، به ۱۰ گرم از پودر آسیاب شده گل راعی، ۱۰۰ سی سی متانول خالص به عنوان حلال با نسبت ۱:۱۰ اضافه شد و به مدت ۷۲ ساعت روی شیکر (فن آزما گستر، ایران) با سرعت ۱۴۰ rpm قرار گرفت. در ادامه حلال و حل شونده توسط قیف و کاغذ صافی واتمن شماره ۱، از هم جدا شدند و عصاره داخل آون در دمای ۴۰ درجه سلسیوس به منظور حلال زدایی قرار گرفت. پس از تبخیر حلال، عصاره تا رسیدن به وزن ثابت در دسیکاتور قرار گرفت. عصاره خشک در فریزر و دمای ۲۰ – درجه سلسیوس نگهداری شد (Esmaeilzadeh Kenari et al., 2014).

باکتری ها و شرایط رشد

سه گونه باکتریایی دخیل در همه گیری ها و مسمومیت های غذایی شامل *اشریشیا کلی* (ATCC 25922)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 9144) و *سودوموناس آئروژینوزا* (ATCC 25922) از مرکز تحقیقات میکروب شناسی مواد غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، تهیه شدند. کشت خالص باکتری ها به منظور احیا مجدد به صورت جداگانه در محیط کشت تریپتیک سوی براث (مرک، آلمان) کشتد داه شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم خانه گذاری شدند.

ارزیابی قطر هاله عدم رشد باکتری ها

فعالیت ضدمیکروبی عصاره متانولی گل راعی با استفاده از روش انتشار دیسک بررسی شد. به طور خلاصه بعد از کشت یک شبه باکتری ها تا رسیدن به کدورت $۱۰^{۸}$ × ۱/۵ کلنی در هر میلی لیتر، رقیق شد. سپس باکتری ها به صورت سطحی روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شدند. سپس دیسک‌های بلانک ۶ میلی‌متری روی محیط کشت مولر هینتون آگار قرار گرفتند و میزان ۱۰۰۰ میکرولیتر از عصاره متانولی گل راعی با غلظت های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم/میلی لیتر به آرامی روی دیسک های بلانک ریخته شد. به منظور مقایسه اثرات شد میکروبی عصاره، دسک های آنتی بیوتیکی سفتازدیم (۳۰ میکروگرم/دیسک)، ایمی پنم (۱۰ میکروگرم/دیسک)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم/دیسک)، ونکومایسین (۳۰ میکروگرم/دیسک)، پنی سیلین (۱۰ میکروگرم/دیسک)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم/دیسک)، تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم/دیسک)، اریترومایسین (۱۵ میکروگرم/دیسک)، آمپی سیلین (۱۰ میکروگرم/دیسک) و آزیترومایسین (۱۵ میکروگرم/دیسک) (Himedia, India) نیز با فاصله های معین روی پلیت های حاوی باکتری قرار گرفتند. سپس پلیت های حاوی باکتری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم خانه گذاری شدند. دیسک حاوی متانول به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. سپس قطر هاله عدم رشد دیسک‌ها به کمک خط‌کش میلی‌متری اندازه‌گیری شد (CLSI, 2012).

ارزیابی حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره

ابتدا از کشت تازه باکتری ها در محیط تریپتیک سوی براث، کدورتی معادل ۰/۵ مک فارلند تهیه شد. سپس کدورت تهیه شده از هر باکتری به نسبت ۱ به ۱۰۰ رقیق شد تا غلظتی معادل 1×10^6 کلنی در هر میلی لیتر از محیط ایجاد شود. بدین منطور از محیط کشت باکتری مقداری با لوپ استریل برداشته شده و درون لوله ازمایشی حاوی ۴-۵ میلی لیتر آب مقطر استریل ریخته و آنقدر باکتری اضافه شده تا کدورت محلول باکتری و مک فارلند یکسان شوند. سپس از عصاره متانولی گل راعی با استفاده از سرنگ استریل رقت های متوالی در محیط براث تهیه شد. سپس در پلیت ۹۶ خانه پلی استایرن ۱۰۰ میکرولیتر از رقت های مختلف عصاره که حاوی ۱۰۰ میکرو لیتر سوسپانسیون باکتری بود، ریخته شد. رقت سازی عصاره ها با استفاده از آب مقطر استریل انجام شد. همچنین چاهک هایی حاوی ۲۰۰ میکرولیتر محیط براث به عنوان کنترل منفی و چاهک هایی حاوی محیط کشت و باکتری به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد .چاهک هایی نیز به عنوان شاهد کدورت حاوی ۱۰۰ میکرو لیتر محیط و ۱۰۰ میکرو لیتر از هر رقت در نظر گرفته شد. برای هر باکتری سه بار تکرار در نظر گرفته شد. سپس سطح پلیت ها پوشیده شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم خانه گذاری شدند. پس از اتمام گرم خانه گذاری، کدورت در طول موج ۶۳۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الایزا ریدر (Statfax 2100, USA) قرائت شد. کمترین غلظتی از مواد که باعث کاهش ۹۰ درصدی کدورت در مقایسه با گروه کنترل شده بود به عنوان MIC و کمترین غلظتی از مواد که باعث رفع کامل کدورت شده بود به عنوان MBC در نظر گرفته شد (Etame et al., 2018). عصاره با استفاده از متانول رقیق شد. اندازه گیری قطر هاله عدم رشد هر یک از باکتری ها در برابر عصاره های مورد نظر سه بار تکرار شد.

تجزیه و تحلیل آماری

نتایج بدست آمده با استفاده از نرم افزار MiniTab19 در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد بررسی قرار گرفت و مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون Fisher برای داده های کیفی و تست ANOVA برای داده های کمی در سطح احتمال ۵ درصد صورت پذیرفت.

نتایج

جدول ۱ قطر هاله عدم رشد باکتری های غذازاد در برابر غلظت های مختلف عصاره متانولی گل راعی و دیسک های آنتی بیوتیکی را نشان می دهد. قطر هاله عدم رشد باکتری های مورد ارزیابی در برابر عصاره متانولی گل راعی رنجی معادل ۰/۴۵ ± ۹/۳۳ تا ۰/۶۰ ± ۱۵/۲۸ میلی متر داشت. بیشترین قطر هاله عدم رشد باکتری های *سودوموناس آئروژینوزا* (۰/۵۳ ± ۱۲/۲۷ میلی متر)، *اشریشیا کلی* (۰/۵۹ ± ۱۳/۲۰ میلی متر) و *استافیلوکوکوس اورئوس* (۰/۶۰ ± ۱۵/۲۸ میلی متر) در برابر غلظت ۱۰۰ میلی گرم/میلی لیتر از عصاره متانولی گل راعی بدست آمد. اثرات ضد میکروبی عصاره متانولی گل راعی وابسته به دوز بود و با کاهش دوز از ۱۰۰ به ۲۵ میلی گرم/میلی لیتر اثرات ضد میکروبی آن برای تمام باکتری ها به شکل معنی دار کاهش یافت ($P<$ ۰/۰۵). بیشترین قطر هاله عدم رشد *سودوموناس آئروژینوزا* در مقابل آنتی بیوتیک سیپروفلوکسازین (۰/۹۷ ± ۱۷/۲۳ میلی متر) دیده شد. بیشترین قطر هاله عدم رشد *اشریشیا کلی* در مقابل آنتی بیوتیک ایمی پنم (۱/۵۷ ± ۱۹/۴۹ میلی متر) دیده شد. بیشترین قطر هاله عدم رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* در مقابل آنتی بیوتیک تتراسایکلین (۰/۸۵ ± ۲۵/۳۳میلی متر) دیده شد.

جدول ۱. قطر هاله عدم رشد باکتری های غذازاد در برابر غلظت های مختلف عصاره متانولی گل راعی و دیسک های آنتی بیوتیکی.

تیمارها		قطر هاله عدم رشد (میلی متر)		
		سودوموناس آئروژینوزا	*اشریشیا کلی*	*استافیلوکوکوس اورئوس*
عصاره متانولی (میلی گرم/میلی لیتر)	۱۰۰	۱۲/۲۷ ± ۰/۵۳^{c}	۱۳/۲۰ ± ۰/۵۹^{d}	۱۵/۲۸ ± ۰/۶۰^{bc}
	۵۰	۱۱/۳۱ ± ۰/۴۷^{cd}	۱۱/۳۵ ± ۰/۴۴^{e}	۱۳/۳۴ ± ۰/۴۵^{cd}
	۲۵	۱۰/۲۳ ± ۰/۴۶^{de}	۹/۳۳ ± ۰/۴۵^{fg}	۱۲/۲۶ ± ۰/۳۸^{de}
دیسک آنتی بیوتیک (میکروگرم/دیسک)	سفتازدیم (۳۰)	۷/۲۰ ± ۰/۹۲^{f}	۱۲/۲۳ ± ۰/۸۷^{de}	۷/۳۰ ± ۰/۷۹^{h}
	ایمی پنم (۱۰)	۱۴/۳۰ ± ۰/۷۰^{b}	۱۹/۴۹ ± ۱/۵۷^{a}	۱۶/۳۷ ± ۰/۸۱^{c}
	جنتامایسین (۱۰)	۱۱/۲۰ ± ۰/۹۲^{cd}	۱۳/۳۳ ± ۰/۶۷^{cd}	۱۶/۴۰ ± ۱/۲۵^{c}
	ونکومایسین (۳۰)	۲/۶۱ ± ۱/۱۰^{h}	۴/۴ ± ۰/۷۶^{hij}	۱۱/۳۷ ± ۰/۸۰^{e}
	پنی سیلین (۱۰)	۱/۷۰ ± ۰/۸۴^{h}	۲/۶۷ ± ۰/۵۹^{j}	۱۳/۳۷ ± ۰/۸۱^{d}
	سیپروفلوکساسین (۵)	۱۷/۲۳ ± ۰/۹۷^{a}	۱۶/۲۷ ± ۱/۱۲^{b}	۱۸/۴۰ ± ۰/۶۹^{b}
	تتراسایکلین (۳۰)	۵/۳۳ ± ۰/۸۵^{g}	۱۰/۴۳ ± ۰/۸۴^{ef}	۲۵/۳۳ ± ۰/۸۵^{a}
	اریترومایسین (۱۵)	۴/۴ ± ۰/۷۶^{g}	۵/۶۷ ± ۰/۹۶^{hi}	۱۷/۳۳ ± ۰/۴۹^{bc}
	آمپی سیلین (۱۰)	۲/۴۶ ± ۰/۹^{h}	۶/۲۷ ± ۰/۷۴^{gh}	۱۴/۳۳ ± ۰/۸۵^{d}
	آزیترومایسین (۱۵)	۱۰/۳۰ ± ۰/۷۹^{de}	۱۲/۳۳ ± ۰/۷۶^{de}	۱۶/۳۷ ± ۰/۹۱^{c}

*حروف انگلیسی کوچک غیریکسان در هر ستون نشان دهنده اختلاف آماری معنی دار در حد ۰/۰۵ > P می باشد.

نتایج نشان داد که عصاره متانولی گل راعی بیشترین اثرات ضد میکروبی را در غلظت ۱۰۰ میلی گرم/میلی لیتر و روی *اشریشیا کلی* داشت. در مقایسه با دیسک های آنتی بیوتیکی، فعالیت ضد میکروبی عصاره متانولی گل راعی روی *اشریشیا کلی* از آنتی بیوتیک های سفتازیدیم، جنتامایسین، ونکومایسین، پنی سیلین، تتراسایکلین، اریترومایسین، آمپی سیلین و آزیترومایسین بیشتر (۰/۰۵ > P) و از آنتی بیوتیک های ایمی پنم و سیپروفلوکسازین کمتر بود (۰/۰۵ > P). فعالیت ضد میکروبی عصاره متانولی گل راعی روی *استافیلوکوکوس اورئوس* از آنتی بیوتیک های سفتازیدیم و ونکومایسین بیشتر (۰/۰۵ > P) و از سایر آنتی بیوتیک ها کمتر بود (۰/۰۵ > P).

همچنین فعالیت ضد میکروبی عصاره متانولی گل راعی روی *سودوموناس آئروژینوزا* از آنتی بیوتیک های سفتازیدیم، جنتامایسین، ونکومایسین، پنی سیلین، تتراسایکلین، اریترومایسین، آمپی سیلین و آزیترومایسین بیشتر (۰/۰۵ > P) و از آنتی بیوتیک های ایمی پنم و سیپروفلوکسازین کمتر بود (۰/۰۵ > P).

جدول ۲ میزان MIC و MBC باکتری های غذازاد در برابر عصاره متانولی گل راعی را نشان می دهد. بر طبق نتایج، کمترین میزان MIC و MBC عصاره متانولی گل راعی برای باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (به ترتیب ۰/۰۰۱۰ و ۰/۰۰۱۹) بدست آمد. بیشترین میزان MIC و MBC

عصاره متانولی گل راعی برای باکتری *اشریشیا کلی* (به ترتیب ۰/۵۰ و ۱/۰۰) بدست آمد.

جدول ۲. میزان MIC و MBC باکتری های غذازاد در برابر عصاره متانولی گل راعی.

تیمار ها	*سودوموناس آئروژینوزا*		*اشریشیا کلی*		*استافیلوکوکوس اورئوس*	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
عصاره متانولی	۰/۰۰۷۸	۰/۰۱۵۶	۰/۵	۱	۰/۰۰۱۰	۰/۰۰۱۹

بحث

عوامل ضد میکروبی گیاهی از طریق هدف‌گیری مناطق خاصی از میکروب‌ها عمل می‌کنند. از جمله مهم ترین مکانیسم‌های عمل ترکیبات ضدمیکروبی می توان به تداخل با سنتز دیواره سلولی، مهار سنتز پروتئین، تداخل با سنتز اسیدنوکلئیک، مهار مسیرهای متابولیکی واسطه و اختلال در غشای سیتوپلاسمی سلول، اشاره نمود (Saddiqe et al., 2010).

با توجه به نتایج این تحقیق، به نظر می رسد عصاره متانولی گل راعی از فعالیت ضدمیکروبی قابل قبولی برعلیه آنتی بیوتیک های غذازاد برخوردار است. با این وجود مطالعات بسیار اندکی در زمینه خصوصیات ضد میکروبی گل راعی انجام شده است. مطالعات نشان داده اند که عصاره گل راعی عموما از شش گروه ترکیبات با خصوصیات موثر شامل naphthodianthrones، فلوروگنوسینول ها، فلاونوئید ها، بی فلاوون ها، فنیل پروپان ها و پروآنتوسیانیدین ها تشکیل شده است. همچنین مقادیر اندکی تانن، گزانتان و اسید های آمینه نیز در عصاره گل راعی یافت می شود (Saddiqe et al., 2010). مطالعات دیگر نشان دادند هایپرفورین (Maisenbacher et al., 1992)، هایپریسین (Lavie et al., 1995)، ۳ و ۸ بی آپی ژنین پروآنتوسیانین (Nahrstedt et al., 1997) و سودوهایپرسین (Meruelo et al., 1988)، ترکیبات موثره اصلی موجود در عصاره گیاه گل راعی هستند. Dall'Agnol و همکاران (۲۰۰۳) اقدام به مطالعه اثرات ضدمیکروبی گونه های گل راعی نمودند (Dall'Agnol et al., 2003). نتایج این محققان نشان داد که با افزایش غلظت عصاره متانولی گونه های مختلف گل راعی، اثرات ضد میکروبی آن نیز افزایش یافت. در این مطالعه بیشترین قطر هاله عدم رشد (۸۵/۳۸-۷/۱۹ میلی متر) گونه های مختلف گل راعی با غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر برای *استافیلوکوکوس اورئوس* گزارش شد. Çelen و همکاران (۲۰۰۸) محتوی بالای ترکیبات فنولی موجود در گل راعی را دلیل اصلی خصوصیات ضد میکروبی این گیاه معرفی نمودند و قطر هاله عدم رشد عصاره استونی گل راعی برای باکتری های *سودوموناس آئروژینوزا*، *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* را به ترتیب ۱۴، ۱۶ و ۲۷ میلی متر گزارش نمودند (Çelen et al., 2008). Mazandarani و همکاران (۲۰۰۷) (۲۲) قطر هاله عدم رشد باکتری های *اشریشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناس آئروژینوزا* تیمار شده با عصاره اتانولی گل راعی را به ترتیب ۹، ۱۲ و ۰ میلی متر گزارش نمودند (Mazandarani et al., 2007). Feyzioğlu و همکاران (۲۰۱۳) میزان MIC باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* تیمار شده با عصاره گل راعی را ۶۴ میکروگرم/میلی لیتر گزارش نمودند اما موفق به دستیابی به میزان MIC *اشریشیا کلی*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *کلبسیلا پنومونیه* و MBC *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلی*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *کلبسیلا پنومونیه* تیمار شده با عصاره گل راعی، نشدند (Feyzioğlu et al., 2013). همچنین اثرات ضد میکروبی انواع عصاره های گل راعی برعلیه باکتری های گرم مثبت و گرم منفی در مطالعات انجام پذیرفته در کشور های روسیه (Vatnikov et al.,

2020)، یونان (Grafakou et al., 2020)، صربستان (Milosevic et al., 2007)، ترکیه (Özkan et al., 2019)، آلمان (Reichling et al., 2001) و سوئیس (Vollmer et al., 2019) به اثبات رسیده است. اثرات ضدمیکروبی عصاره گل راعی بر علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* (Bahmani et al., 2019) (قطر هاله عدم رشد ۱۲/۶۶ میلی متر و MIC معادل ۶۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر)، *اشریشیا کلی* (Couladis et al., 2003) (MIC با رنج ۲ نت ۶/۸۸ میلی گرم بر میلی لیتر) و *سودوموناس آئروژینوزا* (Tusevski et al., 2018) (MIC معادل ۱۵۶ تا ۳۱۲۲ میلی گرم بر میلی لیتر) نیز در مطالعات مختلفی گزارش شده است.

از نتایج تحقیق حاضر حساسیت بیشتر باکتری های گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس* با قطر هاله عدم رشد ۰/۶۰ ± ۱۵/۲۸ میلی متر و MIC معادل ۰/۰۰۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر) در مقایسه با باکتری های گرم منفی (*اشریشیا کلی* با قطر هاله عدم رشد ۰/۵۹ ± ۱۳/۲۰ میلی متر و MIC معادل ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر و *سودوموناس* آئروژینوز با قطر هاله عدم رشد ۰/۵۳ ± ۱۲/۲۷ میلی متر و MIC معادل ۰/۰۰۷۸ میلی گرم بر میلی لیتر) در برابر عصاره متانولی گل راعی می باشد. Koohsari و همکاران (۲۰۱۷) میزان حداکثری قطر هاله عدم رشد عصاره گل راعی برعلیه باکتری های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* را به ترتیب ۳۰ و ۱۶ میلی متر گزارش نمودند که از نتایج ما به مراتب بیشتر بود.

مطالعات نشان داده است که دیواره سلولی باکتری های گرم مثبت نسبت به باکتری های گرم منفی در مقابل بسیاری از آنتی بیوتیک ها، ترکیبات شیمیایی، عوامل ضدمیکروبی و حتی داروهای گیاهی حساسیت بیشتری دارد. این امر ممکن است به لیپوپلی ساکاریدها در غشای بیرونی و نیز فضای پری پلاسمیک باکتری های گرم منفی نسبت داده شود که آنها را ذاتاً به عوامل خارجی مقاوم می سازد (Masoumian et al., 2017). دلیل احتمالی وجود تفاوت در اثرات ضدمیکروبی گل راعی در مطالعات مختلف می تواند اختلاف در منطقه جغرافیایی، آب و هوا، پارامترهای دما، ارتفاع از سطح دریا، طول مدت زمان سایه، جنس خاک، استفاده از انواع کودها و در نهایت نوع عصاره یا اسانس استفاده شده، باشد. هرچند تمام مطالعات تایید کننده اثرات ضدمیکروبی گل راعی روی باکتری ها می باشند.

از جمله محدودیت های این تحقیق می توان به عدم استفاده از آنتی بیوتیک ها به صورت پودری به منظور اعمال غلظت بندی دقیق و همچنین عدم بررسی تاثیرات ضد میکروبی سایر انواع عصاره ها (عصاره اتانولی، عصاره آبی، عصاره استونی و عصاره هیدروالکلی) روی باکتری های مورد نظر، اشاره نمود.

نتیجه گیری کلی

نتایج این مطالعه نشان داد عصاره متانولی گل راعی خصوصا در غلظت ۱۰۰ میلی گرم/میلی لیتر، اثرات ضدمیکروبی مناسبی برعلیه باکتری های *سودوموناس آئروژینوزا*، *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* دارد. هرچند اثرات ضد میکروبی عصاره متانولی گل راعی اثرات ضد میکروبی کمتری نسبت به برخی از انواع دیسک های آنتی بیوتیکی داشت اما قطر هاله عدم رشد باکتری های تیمار شده با این گیاه از بسیاری از دیسک های آنتی بیوتیکی، بیشتر بود. میزان MIC و MBC پایین عصاره متانولی گل راعی می تواند نشان دهنده اثرات ضد میکروبی مشخص گیاه در غلظت های پایین باشد که استفاده از آن را به صرفه و اقتصادی می کند. با توجه به نتایج بدست آمده، پیشنهاد می شود از عصاره متانولی گل راعی به عنوان یک ترکیب ضدمیکروبی خوراکی در مواد غذایی (به صورت فیلم خوراکی یا به عنوان چاشنی)، استفاده شود. هرچند، مطالعات تکمیلی دیگری نیز بایستی در این زمینه صورت پذیرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این تحقیق کمال تشکر و قدردانی را از پرسنل مرکز تحقیقات گیاهان دارویی و معطر دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد و همچنین مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان چهارمحال و بختیاری، دارند.

منابع

1. Abebe, E., Gugsa, G., and Ahmed, M. 2020. Review on major food-borne zoonotic bacterial pathogens. J. Trop. Med. 2020: 1-19.

2. Azizi, M., Ghani, A., Ebadi, T., and Crockett, S. (2010). *The ex situ comparison of two improved st. John's wort (Hypericum perforatum) cultivars with an Iranian wild population.* Paper presented at the XXVIII International Horticultural Congress on Science and Horticulture for People (IHC2010): A New Look at Medicinal and 925.

3. Bahmani, M., Taherikalani, M., Khaksarian, M ,.Rafieian-Kopaei, M., Ashrafi, B., Nazer, M., Soroush, S., Abbasi, N., and Rashidipour, M. 2019. The synergistic effect of hydroalcoholic extracts of Origanum vulgare, Hypericum perforatum and their active components carvacrol and hypericin against Staphylococcus aureus. Future. Sci. OA. 5: FSO371.

4. Çelen, G., Ozkan, S., and Ayhan, F. 2008. The phenolic compounds from Hypericum perforatum and their antimicrobial activities. Hacettepe. J. Biol. Chem. 36: 339-345.

5. CLSI. (2012). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 22nd informational supplement. M100–S22. Wayne (PA). In: Clinical and Laboratory Standards Institute.

6. Couladis, M., Chinou, I., Tzakou, O., and Petrakis, P. 2003. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of Hypericum rumeliacum subsp. apollinis (Boiss. & Heldr.). Phytotherap. Res. 17: 152-154.

7. Dall'Agnol, R., Ferraz, A., Bernardi, A., Albring, D., Nör, C., Sarmento, L., Lamb, L., Hass, M., Von Poser, G., and Schapoval, E. 2003. Antimicrobial activity of some Hypericum species. Phytomed. 10: 511-516.

8. Dehkordi, F.S., Gandomi, H., Basti, A.A., Misaghi, A., and Rahimi, E. 2017. Phenotypic and genotypic characterization of antibiotic resistance of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated from hospital food. Antimicrob. Res. Infect. Control. 6: 104.

9. Esmaeilzadeh Kenari, R., Mohsenzadeh, F., and Amiri, Z.R. 2014. Antioxidant activity and total phenolic compounds of Dezful sesame cake extracts obtained by classical and ultrasound-assisted extraction methods. Food. Sci. Nutr. 2: 426-435.

10. Etame, R.E., Mouokeu, R.S., Pouaha, C.L.C., Kenfack, I.V., Tchientcheu, R., Assam, J.P.A., Poundeu, F.S.M., Tiabou, A.T., Etoa, F.X., and Kuiate, J.R. 2018. Effect of Fractioning on Antibacterial Activity of Enantia chlorantha Oliver (Annonaceae) Methanol Extract and Mode of Action. Evid-Based Complementary Altern. Med. 2018: 1-13.

11. Feyzioğlu, B., Demircili, M.E., Doğan, M., and Baykan, M. 2013. Antibacterial effect of hypericin. Afr. J. Microbiol. Res. 7: 979-982.

12. Freedman, D.J., Kondo, J.K., and Willrett, D.L. 1989. Antagonism of foodborne bacteria by Pseudomonas spp.: a possible role for iron. J. Food. Prot. 52: 484-489.

13. Grafakou ,M.-E., Diamanti, A., Antaloudaki, E., Kypriotakis, Z., Ćirić, A., Soković, M., and Skaltsa, H. 2020. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of three closely related hypericum species growing wild on the island of Crete, Greece. Appl. Sci. 10: 2823.

14. Greeson, J.M., Sanford, B., and Monti, D.A. 2001. St. John's wort (Hypericum perforatum): a review of the current pharmacological, toxicological, and clinical literature. Psychopharmacol. 153: 402-414.

15. Hemmatinezhad, B., Khamesipour, F., Mohammadi, M., Safarpoor Dehkordi, F., and

Mashak, Z. 2015. Microbiological Investigation of O-Serogroups, Virulence Factors and Antimicrobial Resistance Properties of Shiga Toxin-Producing E scherichia Coli Isolated from Ostrich, Turkey and Quail Meats. J. Food. Safety. 35: 491-500.

16. Koohsari, H., Khormali, H,, and Khormali, A. 2017. Evaluation of phenolic, flavonoid, antioxidant and antibacterial activity of *Hypericum perforatum* medicinal plant collected from two habitats in the north of the country. J. Ecophytochem. Med. Plant. 5: 78-90.

17. Lavie, G., Mazur, Y., Lavie, D., and Meruelo ,D. 1995. The chemical and biological properties of hypericin—a compound with a broad spectrum of biological activities. Med. Res. Rev. 15: 111-119.

18. Maisenbacher, P., and Kovar, K.-A. 1992. Adhyperforin: a homologue of hyperforin from Hypericum perforatum. Planta. Med. 58: 291-293.

19. Masoumian, M., and Zandi, M. 2017. Antimicrobial activity of some medicinal plant extracts against multidrug resistant bacteria. Zahedan. J. Res. Med. Sci. 19: 1-8.

20. Mazandarani, M., Yassaghi, S., Rezaei, M., Mansourian, A., and Ghaemi, E. 2007. Ethnobotany and antibacterial activities of two endemic species of Hypericum in North-East of Iran. Asian. J. Plant. Sci 6: 354-358.

21. Meruelo, D., Lavie, G., and Lavie, D. 1988. Therapeutic agents with dramatic antiretroviral activity and little toxicity at effective doses: aromatic polycyclic diones hypericin and pseudohypericin. Proc. National. Acad. Sci. 85: 5230-5234.

22. Milosevic, T., Solujic-Sukdolak, S., and Sukdolak ,S. 2007. In vitro study of ethanolic extract of Hypericum perforatum L. on growth and sporulation of some bacteria and fungi. Turk. J. Biol. 31: 237-241.

23. Momtaz, H., Dehkordi, F.S., Rahimi, E., Asgarifar, A., and Momeni, M. 2013. Virulence genes and antimicrobial resistance profiles of Staphylococcus aureus isolated from chicken meat in Isfahan province, Iran. J. Appl. Poult. Res. 22: 913-921.

24. Nahrstedt, A., and Butterweck, V. 1997. Biologically active and other chemical constituents of the herb of Hypericum perforatum L. Pharmacopsychiatry. 30: 129-134.

25. Özkan, E.E., Çelİk, B.Ö., and Afife, M. 2019. Antimicrobial activities of five endemic Hypericum species from Anatolia compared with Hypericum perforatum. Marmara. Pharm. J. 23: 114-119.

26. Ranjbar, R., Masoudimanesh, M., Dehkordi, F.S., Jonaidi-Jafari, N., and Rahimi, E. 2017. Shiga (Vero)-toxin producing Escherichia coli isolated from the hospital foods; virulence factors, o-serogroups and antimicrobial resistance properties. Antimicrob. Res. Infect. Control. 6: 4.

27. Raposo, A., Pérez, E., de Faria, C.T., Ferrús, M.A., and Carrascosa, C. 2017. Food spoilage by Pseudomonas spp.—An overview. Foodborne. Pathog. Antibiotic. Res. 3: 41-58.

28. Reichling, J., Weseler, A., and Saller, R. 2001. A current review of the antimicrobial activity of Hypericum perforatum L. Pharmacopsychiatry. 34: 116-118.

29. Saddiqe, Z., Naeem, I., and Maimoona, A. 2010. A review of the antibacterial activity of Hypericum perforatum L. J. Ethnopharmacol. 131: 511-521.

30. Shrivastava, M., and Dwivedi, L. 2015. Therapeutic potential of Hypericum Perforatum: a review. Int. J. Pharm. Sci. Res. 6: 4982.

31. Tusevski, O., Krstikj, M., Stanoeva, J., Stefova, M., and Simic, S.G ۲۰۱۸ .Phenolic profile and biological activity of Hypericum perforatum L.: Can roots be considered as a new source of natural compounds? South. Afr. J. Botany. 117: 301-310.

32. Vatnikov, Y., Sergey, S., Arfenia, K., Evgeny, K., Nadezhda, S., Viktor, S., Elena, V., Natalia, B., Vladimir, L., Vladimir, A., Anna, Z., Pavel, R., and Andrei, R. 2020. Antimicrobial activity of Hypericum Perforatum L. Int. J. Pharm. Res. 54: 723-730.

33. Vollmer, A., Al-Ahmad, A., Argyropoulou, A., Thurnheer, T., Hellwig, E., Attin, T., Vach, K., Wittmer, A., Ferguson, K., and Skaltsounis, A.L. 2019. Antimicrobial Photoinactivation Using Visible Light Plus Water-Filtered Infrared-A (VIS+ wIRA) and Hypericum Perforatum Modifies In Situ Oral Biofilms. Sci. Report. 9: 1-15.

Study the antimicrobial effects of methanolic extract of *Hypericum perforatum* on foodborne bacteria

Ghodrati L[1], Ataie Kachoie M[1,2], Mousavi-Fard S[3], Moattar F[4,5]

1. Department of Medicinal Plants, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
2. Medicinal Plants Processing Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
3. Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, P.O. Box 465, Iran.
4. Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
5. *R & D Goldaru-co, Phramaceutical Labratory, Iran.*

***Corresponding author:** *Drataie@iaushk.ac.ir*

Received: February 13, 2021 Accepted: May 15, 2021

Abstract

Hypericum perforatum is a medicinal plant of the genus Hypercasia with phenolic and flavonoid compounds with high antimicrobial and antioxidant properties. The present study was performed to evaluate the antimicrobial effects of the methanolic extract of *Hypericum perforatum* on food-borne bacteria. The aerial part of *Hypericum perforatum* was prepared from the research farm, and after approval by experts, it was dried and powdered and used to prepare the methanolic extract. The diameter of the growth inhibition zone of *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus* was assessed using disk diffusion and compared with antibiotics. Minimum inhibitory concentration (MIC) and Minimum Bacterial Concentration (MBC) of methanolic extract of *Hypericum perforatum* were evaluated on the target bacteria using an ELISA plate. The diameter of the growth inhibition zone of bacteria against the methanolic extract of *Hypericum perforatum* ranged from 9.33±0.45 to 15.28±0.60 mm. Application of 100 mg/ml concentration of methanolic extract of *Hypericum perforatum* caused the highest diameter of the growth inhibition zone of *Pseudomonas aeruginosa* (12.27±0.53 mm), *Escherichia coli* (13.20±0.59 mm), and *Staphylococcus aureus* (15.28±0.60 mm). The antimicrobial effects of methanolic extract of fenugreek were dose-dependent (P <0.05). The lowest and highest levels of MIC and MBC of methanolic extract of *Hypericum perforatum* were obtained for *Staphylococcus aureus* (0.0010 and 0.0019, respectively) and *Escherichia coli* (0.50 and 1.00, respectively). The diameter of the growth inhibition zone of bacteria treated with methanolic extract of *Hypericum perforatum* was higher than some antibiotic discs.

Keywords: *Hypericum perforatum*, Methanolic extract, Antimicrobial, Foodborne bacterium.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited

Copyright © 2021 Shahrekord Branch, Islamic Azad University.