Comparison of antibacterial properties of *Elettaria cardamomum, Urtica dioica L, Valeriana officinalis* and *Crocus sativus* on *E. coli* and *Staphylococcus aureus*

Mosafaiyan S.*[1], Emamjomeh Z.[2], Safaeian Sh.[3]

1. *Department of Food Engineering, Science and technology, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Sepehr.mosafa@gmail.com*
2. *Department of Food Engineering, Science and technology, Faculty of biosystem Engineering, The University of Tehran*
3. *Department of Marine Biology, Islamic Azad University, North Tehran Branch*

Abstract

Aim and Background*:* The aim of this study was to evaluate and compare the antibacterial activity of *Elettaria cardamomum, Urtica dioica L, Valeriana officinalis* and *Crocus sativus* extracts on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

Material and Methods: After preparing the spices first aqueous extracts are prepared based on the dry weight of the extract in different concentrations were prepared by means of diffusion in agar and development of wells in a minimum inhibitory concentration of the dilution Micro MBC plates was studied.

Results: Also, the inhibitory effect of MBC and MIC of Aqueous mixture were also determined. Accordingly *Crocus sativus* extract has the highest antibacterial effect and *Elettaria cardamomum* extract has the least effect on both Gram-positive and Gram-negative antibacterial, though antibacterial effect on gram-positive bacteria were all extracts.

Discussion: Medicinal plants can have antimicrobial effects as a medicinal supplement and have less side effects than using them. Discussion: Medicinal plants can have antimicrobial effects as a medicinal supplement and have less side effects than using chemical drugs.

Keywords: Antimicrobial properties, *Elettaria cardamomum, Urtica dioica L, Valeriana officinalis, Crocus sativus*

مقایسه عملکرد آنتی باکتریال عصاره‌های آبی گیاهان هل، گزنه، سنبل الطیب و زعفران بر روی دو باکتری گرم منفی و گرم مثبت

سپهر مصفائیان[1]*، زهرا امام جمعه[2]، شیلا صفائیان[3]

۱. *گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم و فنون، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال*
۲. *گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی دانشگاه تهران*
۳. *گروه زیست شناسی دریا، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال*

چکیده

سابقه و هدف :هدف از انجام این تحقیق بررسی و مقایسه فعالیت آنتی باکتریال عصاره‌های هل، گزنه، سنبل الطیب و زعفران بر روی باکتری‌های گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس و گرم منفی اشریشیاکلی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: پس از تهیه ادویه جات ابتدا عصاره آبی آنها آماده شده و بر اساس وزن خشک هر عصاره غلظت‌های مختلف تهیه گردید و با استفاده از روش‌های انتشار در سطح آگار و ایجاد چاهک در محیط حداقل غلظت بازدارندگی آنها و با روش رقیق‌سازی در میکرو پلیت حداقل غلظت کشندگی آنها مورد بررسی قرار گرفت. همچنین اثر بازدارندگی و کشندگی مخلوط عصاره‌های آبی نیز تعیین گردید.

یافته‌ها: بر این اساس عصاره زعفران دارای بیشترین اثر آنتی باکتریال و عصاره هل دارای کمترین اثر آنتی باکتریال برروی هر دو باکتری گرم مثبت و گرم منفی بودند، گرچه اثر آنتی باکتریال همه عصاره‌ها بر روی باکتری گرم مثبت بیشتر بود.

بحث: گیاهان دارویی می توانند بعنوان مکمل دارویی اثرات ضد میکروبی داشته باشند وعوارض کمتری را نسبت به مصرف داروهای شیمیایی داشته باشند.

کلمات کلیدی: عملکرد آنتی باکتریال، هل، گزنه، سنبل الطیب، زعفران

مقدمه

یکی از مهمترین چالش‌های درمانی، مقابله با عوامل بیماری های عفونی و مسمومیت زا شیوع و گسترش بالای آنها می باشد. استفاده بی‌رویه از آنتی بیوتیک‌ها و نگهدارنده‌های شمیایی منجر به افزایش مقاومت در بیشتر باکتری‌ها گردیده است بنابراین یافتن ترکیبات ضدمیکروبی جدید با کمترین اثرات جانبی امری مهم و ضروری به نظر می‌رسد (۱). بنابر گزارش سازمان بهداشت جهانی بیش از ۸۰ درصد مردم جهان (نزدیک به ۵ میلیارد نفر) برای درمان بیماری ها هنوز از داروهای گیاهی استفاده می‌کنند. تقریباً یک چهارم داروهای تهیه شده در دنیا دارای منشأ گیاهی هستند که یا مستقیماً از گیاهان عصاره گیری شده‌اند و یا بر اساس ترکیبات گیاهی، سنتز گردیده‌اند. مطالعات نشان می‌دهد که تمایل زیاد به استفاده از داروهای گیاهی جهت درمان عفونت‌ها به دلیل عوارض پایین‌تر این داروهای طبیعی، نسبت به داروهای شیمیایی است (۲). در کنار این روند رو به افزایش، کمبود اطلاعات دارویی و درمانی در گروه بزرگی از فراورده‌های طب گیاهی، مشکلی بزرگ می‌باشد (۳). آنتی بیوتیک‌ها و مواد نگهدارنده مواد شمیایی قوی هستند که یا مانع تکثیر میکروارگانیسم‌ها شده و یا در نهایت آنها را از بین می‌برند. (۴). با توجه به این که بیماری‌های عفونی و مسمومیت زا طیف وسیعی از بیماری‌ها را تشکیل می‌دهند و از سویی شمار سوش‌های میکروبی مقام به آنتی بیوتیک ها در بدن انسان و نگدارنده‌ها در خوراک انسان هر روز بیشتر می‌شوند، لذا نیاز به مواد ضد میکروبی طبیعی جدید و کم خطر به شدت زیاد می‌باشد. از این رو، بررسی اثر ضد میکروبی گیاهان می‌تواند دریچه ای برای به دست آوردن مواد نگهدارنده جدید را هموار سازد (۵ و ۶).

آدرس نویسنده مسئول: گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم و فنون، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

پست الکترونیک: Sepehr.mosafa@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۰۲/۰۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۳/۱۳

انسان‌ها در طول تاریخ از گیاهان جهت درمان استفاده می‌کردند و همواره سلامت بشر به نحوی درگرو استفاده از گیاهان بوده است. اگر چه در نیم قرن گذشته استفاده از نگهدارنده‌های شیمیایی و سنتزی در فرآورده‌های غذایی به شدت رواج یافت، ولی به سرعت آثار زیانبار آنها بر زندگی انسان‌ها سبب گرایش مجدد به گیاهان گردید و این نکته که توسل به فرآورده‌های گیاهی همواره در طول تاریخ یکی از روش‌های مؤثر درمان بوده است، به خوبی روشن است (۷). خصوصیت آنتی میکروبی عصاره‌های گیاهی همانند آنتی بیوتیک‌های مرسوم، توجه زیادی را به خود معطوف کرده است (۸ و ۹). میکروبیولوژیست‌های بالینی و غذایی به دو دلیل به خاصیت ضد میکروبی عصاره های گیاهی توجه دارند. اولاً این احتمال وجود دارد که چنین ترکیبات فیتوشیمیایی، راهی برای ورود به منابع دارویی آنتی میکروبی تهیه شده توسط پزشکان باشد. به این دلیل تعداد زیادی از آنها بر روی انسان آزمایش شده است. ثانیاً، افراد به طور آشکار نسبت به مشکلات و عوارض ناشی از مصرف بیش از حد نگهدارنده‌های مورد استفاده در مواد غذایی، آگاه شده‌اند. علاوه بر این، بیشتر مردم تمایل به استفاده ترکیبات طبیعی داشته تا اینکه در معرض مواد شیمیایی مضر قرار گیرند (۷). از این رو استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی برای مهار رشد باکتری‌های بیماری‌زا یک ایده ارزشمند درصنعت فرآورده‌های غذایی به منظورحفظ سلامت مصرف کنندگان به شمارمی‌آید. عصاره های گیاهی ترکیبات فرار و معطری هستند که در اندام های مختلف گیاه وجود دارند و یکی از نقش‌هایی که در گیاهان بر عهده دارند محافظت از گیاه در برابر عفونت های گیاهی می‌باشد. بسیاری از گیاهان و ادویه جات مانند زعفران، گزنه، هل، سنبل الطیب، پونه کوهی، مرزنجوش، رزماری، مریم گلی و غیره به علت داشتن ظرفیت بالای آنتی اکسیدانی باعث کاهش رشد میکروبی و اکسیداسیون چربی درطول ذخیره‌سازی و نیز باعث بهبود کیفیت و ارزش تغذیه‌ای و افزایش مدت زمان ماندگاری مواد غذایی و جایگزین آنتی اکسیدان‌های مصنوعی می‌شوند (۱۰ و ۱۱) .

زعفران با نام علمی *Crocus sativus* گیاهی است از تیره‌ی زنبقیان، سرده زعفران که ویژگی سرخوشی داشته و امروزه برخی شرکت‌های دارویی اروپایی از آن به عنوان اینتگراتور ضد افسردگی استفاده می‌کنند. زعفران گیاهی کوچک و چند ساله به ارتفاع ۱۰ تا ۳۰ سانتی‌متر است. مهم‌ترین ترکیبات موجود در زعفران شامل ترکیبات زرد رنگ که به خوبی در آب محلول‌اند (مشتقات کروستین)، ترکیبات تلخ از جمله پیکروکروسین که به ویژه مقوی معده می‌باشند، مواد معطر (اسانس) که مهم‌ترین ترکیب آن سافرانال می‌باشد که گاهی تا ۱ درصد زعفران را تشکیل می‌دهد، روغن ثابت به میزان حداکثر ۱۰ درصد، رطوبت حدود ۱۰ تا ۱۳ درصد و ترکیبات معدنی حدود ۵ درصد می‌باشد (۱۲و ۱۳).

گَزَنه با نام علمی *Urtica dioica L* نام سرده‌ای از تیره گزنه‌ایان است. گیاهی است علفی و پایا با ساقه‌ای منشعب است. ساقه آن راست و چهارگوش بوده و برگ‌های آن پوشیده از کرک‌های گزنده‌ای است (۱۴).

گزنه دارای تانن، لسیتین، اسید فورمیک، نیترات پتاسیم و کلسیم، ترکیبات آهن، ویتامین C و نوعی گلوکوزید است که پوست را قرمز می‌کند از سرشاخه‌های این گیاه ماده قرمز رنگی بنام اورتی‌سین استخراج می‌شود (۱۴).

سنبل الطیب یا علف گربه با نام علمی *Valeriana officinalis* گیاهی است که بوته‌ای استوار و چندساله دارد و در اروپا و بخش‌هایی از آسیا می‌روید. دارای ریشه‌ای کوتاه و بوته‌ای با ارتفاع بین ۵۰ تا ۱۵۰ سانتی‌متر می‌باشد. ریشهی این گیاه در طب سنتی ایران دارای ارزش دارویی است و از آن به عنوان آرام‌بخش اعصاب، خواب آور، ضد تشنج، درمان افسردگی، هضم کننده غذا و ضد دل‌پیچه استفاده می‌شود (۱۵).

ریشه سنبل الطیب حاوی ۱ درصد اسانس است. این اسانس در ریشه تازه بیشتر است و به تدریج که ریشه خشک می‌شود مقدار اسانس آن کاهش یافته ولی بوی آن قوی‌تر می‌شود. اسانس تازه برنگ سبز مایل به زرد است ولی در اثر ماندن غلیظ می‌شود (۱۶). آثار دارویی ریشه تازه آن سه برابر خشک شده آن است. سنبل الطیب باید در حرارت کم خشک شود و در حرارت بالا تمام اثر دارویی آن از بین می‌رود (۱۷).

هل با نام علمی *Elettaria cardamomum* گیاهی است که بومی جنوب شرق آسیا است. هل درختی است از خانواده زنجبیل به صورت وحشی و پرورشی در مناطق کوهستانی و در سایه درختان می‌روید. ارتفاع درخت ۳۰ تا ۵۰ سانتی‌متر و بعضی‌ها دارای اعضاء چوبی تا ۳ متر ارتفاع و شاخه‌های هوایی و برگ‌های متناوب نوک تیز با گل‌های ریز سفید مانند گل باقلا و میوه آن کوچک ناشکوفا (پوشینه دار) بقدر بند انگشت با پوست تیره رنگ و دارای دانه‌های متعدد می‌باشد. (۱۸).

از این رو با وجود آنکه مطالعاتی بر روی اثرات ضدمیکروبی عصاره‌های بدست آمده از گیاهان هل، گزنه، سنبل الطیب و زعفران در محیط آزمایشگاهی بر روی باکتریهای پاتوژن درموادغذایی انجام شده است، هدف تحقیق حاضر مطالعه ای درزمینه عملکرد مقایسه ای این عصاره ها بر روی دو باکتری گرم مثبت و گرم منفی از شایع‌ترین باکتری‌های بیماری‌زا در موادغذایی می باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه و آماده سازی عصاره‌ها

گیاهان مورد آزمون از گروه باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران تهیه گردید. هر چهار گیاه بوسیله آسیاب خرد شده و سپس به کمک الک، پودری یکنواخت تهیه گردید. پودرهای تهیه شده تا زمان تهیه عصاره در تاریکی و دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

تهیه عصاره آبی

بر پایه روش نصار عباس و هالکمن[۱] (۲۰۰۴) و همچنین مورنو و همکاران[۲](۲۰۰۶)، استخراج آبی عصاره‌ها انجام پذیرفت (۱۹ و ۲۰). بر این اساس مقدار ۵ گرم از پودر گیاه را در یک ارلن وزن کرده به آن ۹۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه گردید و به مدت یک ساعت توسط همزن

۱. Nasar-Abbas and Halkman

۲. Moreno et al

مغناطیسی هم زده شد. سپس ارلن در بن ماری ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۶ ساعت قرار داده شد. بعد از طی این مدت مخلوط حاصل با استفاده از پمپ خلاء و قیف بوخنر استریل و به همراه کاغذ صافی شماره ۱ استریل صاف گردید. عمل صاف کردن ۲ بار تکرار شد تا محلولی کاملاً صاف و عاری از ذرات ریز حاصل شود. در انتها عصاره آبی بدست آمده با گذراندن از فیلتر سر سرنگی ۰/۴۵ میکرونی، استریل و در شیشه‌های تیره در یخچال نگهداری شد.

آماده سازی نمونه‌های میکروبی

دو سویه باکتریایی اشریشیاکلی[۳] و استافیلوکوکوس اورئوس[۴] جهت بررسی خصوصیات ضد میکروبی عصاره‌های تولید شده انتخاب گردیدند.

استافیلوکوکوس اورئوس در محیط برد پارکر آگار کشت داده شده به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد. اشریشیا کلی در محیط EC براث کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴۴ درجه سانتیگراد انکوبه گردید، ایجاد کدورت و تولید گاز در لوله نشان دهنده اشریشیا کلی بود.

رقیق‌سازی عصاره‌ها

عصاره‌ها براساس وزن خشک، رقیق‌سازی شدند. بر این اساس به ترتیب رقت‌های متوالی از عصاره‌ها با غلظت‌های (۱، ۵، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تهیه شد.

اندازه‌گیری مقدار کل پلی فنول‌ها با روش سیو کالتیو

پلی فنول‌های موجود در عصاره‌ها به وسیله رنگ سنجی و با استفاده از معرف فولین سیوکالتیو طبق روش استاندارد ملی ایران (بی نام، ۱۳۸۵) اندازه گیری شد (۲۱).

تعیین حداقل غلظت بازدارنده (MIC)

تعیین حداقل غلظت بازدارنده (MIC) طبق روش استاندارد ملی ایران (بی نام، ۱۳۸۲) اندازه گیری شد (۲۲).

انجام آزمون به روش دیسک‌های انتشاری[۵]

ابتدا اتاق کشت به وسیله الکل اتانول ۷۰ درصد و لامپ UV به خوبی استریل گردید. سپس سوآپ استریل به یکی از سوسپانسیون‌های میکروبی با غلظت ۰/۵ مک فارلند آغشته و بر سطح محیط کشت مولرهینتون آگار به صورت یکنواخت کشت داده شد. مکان قرارگیری دیسک و نوع عصاره در پشت پلیت‌ها مشخص شد.رقت‌های آماده شده از هر عصاره توسط شیکر لوله‌ای خوب تکان داده شد و به میزان ۲۰ میکرولیتر با سمپلر کالیبر شده برروی دیسک‌های بلانک استریل (هایمدیا)که در پلیتی استریل قرار داده شده بودند، تزریق شد سپس دیسک‌ها با پنس استریل برداشته شده در جای مشخص آن روی محیط کشت قرار داده شد (با توجه به قطر۸ سانتیمتری پلیت، در هر پلیت ۲ دیسک قرار داده شد). همه عصاره‌ها به همین طریق به دیسک تزریق شده بر روی سطح محیط کشت قرار داده شدند. سپس همه پلیت‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد و بعد از ۲۴ ساعت با خط‌کش کولیس قطر هاله عدم رشد باکتری اندازه‌گیری شد. تمامی مراحل آزمون برای هر باکتری و هر عصاره ۳ بار تکرار گردید (۹).

انجام آزمون به روش چاهک[۶]

محیط کشت مولرهینتون آگار پس از استریلیزاسیون در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد، در بن ماری ۴۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد تا دمای محیط کشت نیز به ۴۵ درجه سانتیگراد کاهش یابد. از سوسپانسیون ۰/۵ مک فارلند باکتری، ۱ میلی‌لیتر برداشته شده به ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت ۴۵ درجه سانتیگراد اضافه گردید (دمای محیط کشت به دقت کنترل شد تا باکتری تزریق شده به محیط کشته نشود). سپس محیط‌های کشت- پس از ترکیب کامل سوسپانسیون باکتری با محیط کشت -به پلیت‌هایی با قطر ۸ سانتیمتر انتقال داده شدند. بعد از

۳. *Escherichia coli*

۴. *Staphylococcus aureus*

۵. Disk diffiusion method

۶. Well method

خشک شدن سطح محیط کشت حاوی باکتری، پلیت‌ها از لحاظ داشتن نوع میکروب و نوع عصاره نشانه گذاری شده سپس درهر پلیت ۲ چاهک توسط انتهای سر سمپلر (۱۰۰۰ میکرو) استریل ایجاد شد و عصاره‌ها با غلظت‌های تعیین شده به میزان ۶۰ میکرولیتر به داخل چاهک‌ها تزریق شدند. سپس پلیت‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شدند، بعد از مدت ۲۴ ساعت، قطر هاله عدم رشد توسط خط‌کش کولیس اندازه گیری شد. تمامی مراحل فوق برای هر باکتری و هر عصاره ۳ بار تکرار گردید (پارخ و همکاران[۷]، ۲۰۰۵) (۲۳).

آنالیزهای آماری

اختلاف بین تیمارهای مختلف، براساس طرح آماری فاکتوریل کاملا تصادفی با استفاده از تحلیل واریانس (ANOVA) در سطح احتمال ۵ درصد تعیین شد. مقایسه میانگین داده‌ها براساس آزمون دانکن[۸] با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۹ و EXCEL نسخه ۲۰۱۳ ,Chicago (USA) انجام گرفت.

نتایج

مقدار ترکیبات فنولی کل

نتایج مربوط به اندازه گیری مقدار ترکیبات فنولی کل عصاره ها در شکل شماره ۱ نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می شود دو عصاره هل و سنبل الطیب از این نظر اختلاف معنی داری با یکدیگر ندارند. بیشترین مقدار ترکیبات فنولی در عصاره زعفران و کمترین مقدار آن در عصاره هل می‌باشد.

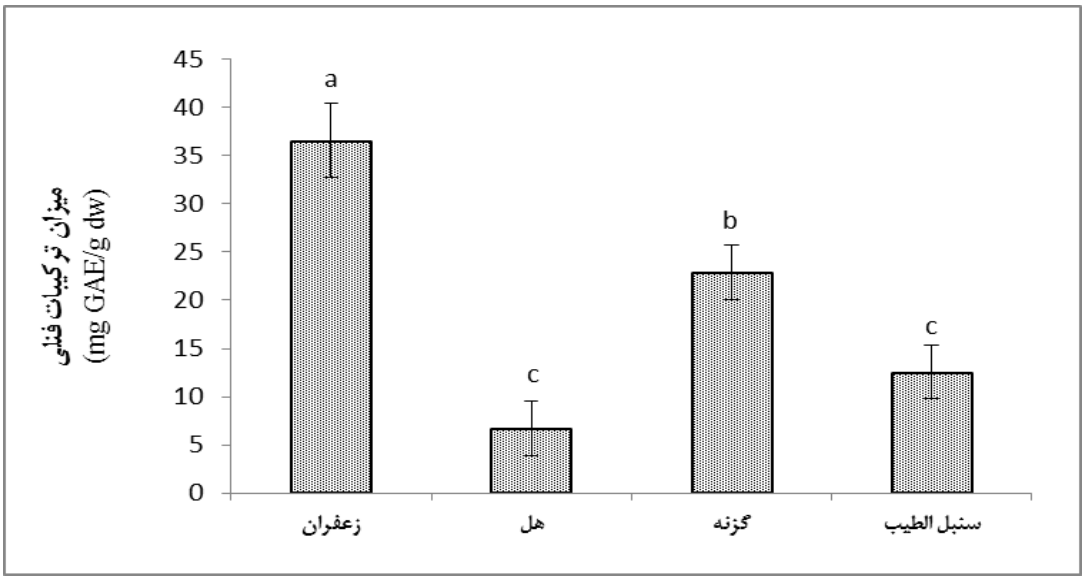
حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی عصاره‌ها بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس

حداقل غلظت بازدارنده و مهار کننده عصاره‌های مورد آزمون به شرح جدول شماره ۱ می‌باشد.

---

۷. Parekh et al

۸. Duncan



شکل شماره ۱- مقدار ترکیبات فنولی کل عصاره های مورد بررسی

جدول شماره ۱- حداقل غلظت بازدارنده و کشنده عصاره ها بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس

نوع عصاره	رقت‌های عصاره بر حسب µg/ml									
	۱	۵	۱۰	۵۰	۱۰۰	۲۵۰	۵۰۰	۷۵۰	۱۰۰۰	۱۵۰۰
هل	++	++	++	++	++	+	-	-	-	-
گزنه	++	++	++	++	+	+	-	-	-	-
سنبل الطیب	++	++	++	++	++	+	+	-	-	-
زعفران	++	++	++	+	+	-	-	-	-	-

++ نشان دهنده رشد زیاد باکتری، + نشان دهنده رشد کم باکتری، - نشاندهنده عدم رشد می‌باشد

بر طبق نتایج، حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس برای عصاره های هل، گزنه، سنبل الطیب و زعفران به ترتیب ۲۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر می باشد. حداقل غلظت کشندگی (MBC) بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس برای عصاره های هل، گزنه، سنبل الطیب و زعفران به ترتیب ۵۰۰، ۵۰۰، ۷۵۰ و ۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر بود. بررسی قطر هاله عدم رشد ایجاد شده توسط عصاره‌ها بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس قطر هاله های عدم رشدحاصل از عصاره های هل، گزنه، سنبل الطیب وزعفران در سه تکرار بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس انجام شد که نتایج آن به شرح جداول شماره ۲ و ۳ می‌باشد.

جدول شماره ۲- قطر هاله عدم رشد ایجاد شده توسط عصاره‌ها بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس با روش چاهک

نوع عصاره	رقت‌های عصاره بر حسب µg/ml				
	۲۵۰	۵۰۰	۷۵۰	۱۰۰۰	۱۵۰۰
هل	۰۰/۰۰±۰/۰۰	۶/۲۵±۰/۴۲	۱۰/۷۰±۰/۲۶	۱۵/۳۱±۰/۳۷	۲۰/۸۴±۰/۵۲
گزنه	۷/۲۱±۰/۲۲	۱۰/۸۳±۰/۷۱	۱۵/۴۹±۰/۶۷	۱۹/۵۵±۰/۳۴	۲۶/۶۸±۰/۴۵
سنبل الطیب	۰۰/۰۰±۰/۰۰	۵/۹۰±۰/۱۸	۹/۶۴±۰/۶۳	۱۶/۶۸±۰/۱۵	۲۰/۶۱±۰/۲۰
زعفران	۸/۱۴±۰/۳۳	۱۲/۲۳±۰/۵۴	۱۸/۹۰±۰/۴۲	۲۵/۱۶±۰/۳۰	۳۳/۲۴±۰/۱۹

جدول شماره ۳- قطر هاله عدم رشد ایجاد شده توسط عصاره‌ها بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس با روش دیسک‌های انتشاری

نوع عصاره	رقت‌های عصاره بر حسب µg/ml				
	۲۵۰	۵۰۰	۷۵۰	۱۰۰۰	۱۵۰۰
هل	۰۰/۰۰±۰/۰۰	۶/۷۵±۰/۱۸	۹/۶۱±۰/۱۷	۱۲/۶۰±۰/۲۹	۱۷/۰۹±۰/۲۲
گزنه	۷/۵۴±۰/۴۸	۱۱/۶۲±۰/۱۹	۱۴/۸۳±۰/۳۷	۱۸/۱۷±۰/۶۲	۲۴/۲۳±۰/۵۶
سنبل الطیب	۰۰/۰۰±۰/۰۰	۰۰/۰۰±۰/۰۰	۷/۰۵±۰/۱۵	۱۰/۳۹±۰/۴۸	۱۴/۴۸±۰/۳۴
زعفران	۷/۲۳±۰/۱۹	۱۰/۵۹±۰/۳۸	۱۶/۴۳±۰/۷۷	۲۱/۸۰±۰/۷۸	۲۸/۳۶±۰/۱۴

حداقل غلظت بازدارنده و مهار کننده عصاره‌های مورد آزمون
که عبارتند از هل ، گزنه، سنبل الطیب و زعفران به شرح
جدول شماره ۴ می باشد.

جدول شماره ۴- حداقل غلظت بازدارنده و کشنده عصاره‌ها بر روی باکتری اشریشیا کلی

نوع عصاره	رقت‌های عصاره بر حسب µg/ml									
	۱	۵	۱۰	۵۰	۱۰۰	۲۵۰	۵۰۰	۷۵۰	۱۰۰۰	۱۵۰۰
هل	++	++	++	++	++	++	++	+	-	-
گزنه	++	++	++	++	++	++	+	-	-	-
سنبل الطیب	++	++	++	++	++	++	++	+	-	-
زعفران	++	++	++	++	+	-	-	-	-	-

++ نشان دهنده رشد زیاد باکتری، + نشان دهنده رشد کم باکتری، - نشان دهنده عدم رشد می باشد.

بر طبق نتایج، حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) بر روی باکتری اشرشیاکلی برای عصاره های هل، گزنه، سنبل الطیب و زعفران به ترتیب ۷۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر می باشد. حداقل غلظت کشندگی (MBC) بر روی باکتری اشرشیاکلی برای عصاره‌های هل، گزنه، سنبل الطیب و زعفران به ترتیب ۱۰۰۰، ۷۵۰، ۱۰۰۰ و ۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر بود. بررسی قطر هاله عدم رشد ایجاد شده توسط عصاره‌ها بر روی باکتری اشرشیاکلی قطر هاله‌های عدم رشد حاصل از عصاره‌های هل، گزنه، سنبل الیب و زعفران در سه تکرار بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس انجام شد.

جدول شماره ۵- قطر هاله عدم رشد ایجاد شده توسط عصاره‌ها بر روی باکتری اشریشیا کلی با روش چاهک

نوع عصاره	رقت‌های عصاره بر حسب µg/ml				
	۲۵۰	۵۰۰	۷۵۰	۱۰۰۰	۱۵۰۰
هل	۰۰/۰۰±۰/۰۰	۰۰/۰۰±۰/۰۰	۶/۸۳±۰/۱۸	۱۰/۷۵±۰/۲۳	۱۵/۱۸±۰/۱۹
گزنه	۰۰/۰۰±۰/۰۰	۸/۴۲±۰/۲۳	۱۱/۷۵±۰/۳۸	۱۵/۰۸±۰/۱۴	۲۲/۸۲±۰/۲۹
سنبل الطیب	۰۰/۰۰±۰/۰۰	۰۰/۰۰±۰/۰۰	۷/۹۰±۰/۲۱	۹/۸۳±۰/۴۴	۱۴/۰۷±۰/۳۲
زعفران	۰۰/۰۰±۰/۰۰	۸/۰۴±۰/۱۷	۱۲/۵۹±۰/۱۶	۱۷/۳۸±۰/۲۷	۲۴/۱۱±۰/۲۶

جدول شماره ۶- قطر هاله عدم رشد ایجاد شده توسط عصاره ها بر روی باکتری اشریشیا کلی با روش دیسک های انتشاری

نوع عصاره	رقت‌های عصاره بر حسب µg/ml				
	۲۵۰	۵۰۰	۷۵۰	۱۰۰۰	۱۵۰۰
هل	۰۰/۰۰±۰/۰۰	۰۰/۰۰±۰/۰۰	۶/۲۵±۰/۰۸	۹/۴۰±۰/۱۹	۱۳/۰۱±۰/۲۶
گزنه	۰۰/۰۰±۰/۰۰	۶/۳۷±۰/۱۷	۱۰/۱۱±۰/۲۹	۱۴/۰۰±۰/۱۶	۱۹/۳۶±۰/۱۲
سنبل الطیب	۰۰/۰۰±۰/۰۰	۰۰/۰۰±۰/۰۰	۶/۵۴±۰/۱۱	۸/۹۰±۰/۱۷	۱۱/۷۱±۰/۰۹
زعفران	۰۰/۰۰±۰/۰۰	۷/۱۲±۰/۲۶	۱۰/۸۷±۰/۱۶	۱۴/۶۶±۰/۲۶	۲۰/۵۴±۰/۴۰

بحث

از آنجائیکه این کار در مورد گیاهانی که منحصرا بومی ایران بوده، کمتر انجام شده است، هدف تحقیق حاضر بررسی خصوصیات ضد باکتریایی این گیاهان می‌باشد. زیرا قبل از اینکه یک عصاره یا اسانس بتواند به عنوان یک افزودنی غذایی به مواد غذایی افزوده شود باید خصوصیات متفاوت آن از جمله اثرات ضد میکروبی آن مورد ارزیابی قرار گیرد. در همین راستا در مطالعه حاضر ابتدا فعالیت ضد باکتریایی عصاره هل، گزنه، سنبل الطیب و زعفران برعلیه باکتری‌های بیماری زا با منشا غذایی مورد ارزیابی قرار گرفت. بر این اساس عصاره زعفران دارای بیشترین اثر آنتی باکتریال و عصاره سنبل الطیب و هل دارای کمترین اثر آنتی باکتریال برروی هر دو باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس و گرم منفی اشرشیاکلی بودنند، گرچه اثر آنتی باکتریال همه عصاره ها بر روی باکتری گرم مثبت بیشتر بود.

قابل ذکر است که تفاوت بین اثر آنتی باکتریال عصاره سنبل الطیب و هل زیاد نبود، هل بر روی باکتری گرم مثبت اثر بیشتری از سنبل الطیب نشان داد و اثر آنتی باکتریال سنبل الطیب بر باکتری گرم منفی اندکی بیشتر از عصاره هل بود.

عصاره‌ها ترکیبی از استرها، آلدئیدها، الکل‌ها، کتونها و ترپن هابوده که در دو گروه ترکیبات اصلی و فرعی طبقه بندی می‌شوند (۲۴). ترکیبات اصلی حدود ۸۵ درصد اسانس را تشکیل‌می‌دهند که کمیت و کیفیت آن‌ها در اسانس با توجه به آب وهوا، ترکیب خاک وسن گیاه می‌تواند متغیر باشد (۲۵و ۲۶).

اسانس‌ها، اثرات ضد باکتریایی خود را از طریق تغییرساختار و عمل غشاء سلولی اعمال می‌کنند. بررسی‌های صورت گرفته در خصوص مکانیسم عمل اسانس‌ها اثبات نموده که این ترکیبات نفوذ پذیری غشاء را افزایش می‌دهند. اجزای اسانس با نفوذ در غشاء منجر به متورم شدن غشاء گردیده و فعالیت آن را تحت تاثیر قرار داده (کاهش می‌دهند) و در نهایت منجر به مرگ سلول خواهند شد. اجزای اسانس نیز اثرات ضد باکتریایی متفاوتی دارند، به طوری که گروه هیدروکسیل موجود در مولکول اجزای اسانس مانند کارواکرول، تیمول، سایمن و منتول برای بروز خاصیت ضد باکتریایی آنها بسیار مهم است (۲۷).

تانن قابل هیدرولیز و مقادیر قابل توجهی فلاونوئیدها ترکیبات اصلی گیاهان دارویی هستند که در پزشکی سنتی برای درمان

اضطراب، اسپاسم معده ای و کاهش اسهال مورد استفاده قرار می‌گیرند (۲۸). ترکیبات فنولی متابولیت های ثانویه هستند که مسئول اثر آنتی اکسیدانی این گیاه می‌باشند. این مواد در صنایع غذایی با جلوگیری از تشکیل رادیکال‌های آزاد باعث کاهش اکسیداسیون چربی‌ها شده‌اند (۲۹ و ۳۰).

با توجه به بررسی‌های انجام شده و نتایج درج شده در فصل چهارم هاله‌های ناشی از روش چاهک به مراتب بزرگ‌تر از هاله‌های تشکیل شده با استفاده از روش انتشار دیسک در آگار است که علت آن به دلیل نفوذپذیری بهتر و تاثیر گذاری بیشترعصاره بر روی باکتری مورد نظر می‌باشد (۳۱ -۳۳).

به طور کلی باکتری‌های گرم منفی نسبت به باکتری‌های گرم مثبت مقاومت بیشتری در مقابل مواد ضد میکروبی از خود نشان می‌دهند (۲۷ و۳۴- ۳۷). در این مطالعه مشاهده شد که باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به باکتری گرم منفی اشریشیا کلی حساسیت بیشتری در برابر عصاره ها داشتند که این احتمالا به واسطه وجوددیواره

عامل دیگری که می‌تواند اثرات ضد باکتریایی عصاره یا اسانس یک گیاه را تحت تاثیر قرار دهد، محیط کشت مورد استفاده جهت انجام آزمایشات ضد باکتریایی می‌باشد . تفاوت در اثرات ضد باکتریایی یک ماده در محیط کشت‌های‌گوناگون به اثبات رسیده است (۴۰).

البته به نظر می‌رسد که علت مقاومت بیشتر باکتری‌های گرم منفی به اسانس گیاهی احتمالاً پیچیدگی بیشتر غشای مضاعف سلولی این ارگانیسم‌ها در مقایسه با غشای یگانه گلیکوپروتئینی/ تایکوئیک اسید باکتری‌های گرم مثبت باشد (۴۱). همچنین به نظر می‌رسد مقاومت سلول‌های میکروبی وابسته به سرعت و میزان انحلال (حل شدن) مواد ضد میکروبی در بخش لیپیدی غشای سلولی باشد. اگرچه این مسئله نمی‌تواند توضیح کاملی برای شرح اختلاف در حساسیت باکتری‌های گرم مثبت و منفی باشد به همین علت اختلاف در هیدروفوبیسیتی سطح غشای سلول نیز به عنوان یک عامل موثر پیشنهاد شده است (۴۲). باکتری‌های گرم منفی به دلیل داشتن غشا خارجی در اطراف دیواره سلولی متفاوت در دو نوع باکتری گرم مثبت و گرم منفی و عدم وجود غشاء خارجی در باکتری‌های گرم مثبت می‌باشد.

این نتایج با نتایج کوساه و همکاران (۲۰۱۱) که نشان دادند عصاره سماق روی باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی دارای اثر ممانعت کنندگی بیشتری است، مطابقت دارد (۳۸).

آکرایی و همکاران (۲۰۱۳) نیز اثر بازدارندگی عصاره های گیاهی را در غلظت پایین برروی باکتری‌هایی همچون استافیلوکوکوس اورئوس را به دلیل وجود ترکیباتی مانند تانن، فنل ؛آنتراکینون و ساپونین عنوان نمودند (۳۹). البته باید توجه نمود که ترکیب تشکیل دهنده اسانس و شدت اثرات ضد میکروبی یک گونه در شرایط منطقه ای مختلف ممکن است اختلاف داشته باشد این اختلافات می تواند ناشی از تفاوت در فصل برداشت، زمان استخراج اسانس، مناطق مختلف جغراقیایی حتی بخش های مختلف گیاه باشد (۲۶).

سلولی حساسیت کمتری را به ترکیبات ضد میکروبی نشان می‌دهند. غشا خارجی نفوذ ترکیبات هیدروفوب را از پوشش لیپوپلی ساکاریدی محدود می‌کند. ترکیب اصلی دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت پپتیدوگلیکان به همراه مقدار کمی پروتئین است، اما دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی با وجود ضخامت کمتر، پیچیدگی بیشتری داشته و علاوه بپپتیدوگلیکان حاوی ترکیبات دیگری مانند پلی ساکارید های مختلف، پروتئین‌ها و لیپیدها می‌باشد (۴۳).

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر ابتدا فعالیت ضد باکتریایی عصاره هل، گزنه، سنبل الطیب و زعفران برعلیه باکتری‌های بیماری زا با منشا غذایی مورد ارزیابی قرار گرفت. بر این اساس عصاره زعفران دارای بیشترین اثر آنتی باکتریال و عصاره سنبل الطیب و هل دارای کمترین اثر آنتی باکتریال برروی هر دو باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس و گرم منفی

اشرشیاکلی بودنند، گرچه اثر آنتی باکتریال همه عصاره ها بر روی باکتری گرم مثبت بیشتر بود.

منابع

1. Trick WE, Weinstein RA, DeMarais PL, Kuehnert, MJ, Tomaska W, Nathan C, Rice TW, McAllister SK, Carson LA, Jarvis WR. Colonization of skilled -care facility residents with antimicrobial -resistant pathogens. J. Am. Geriatr. Soc. 2001. 49**:**270-276.

2. Voravuthikunchai S, Kitpipit L. Activity of quality control: determination of chemical composition and geograph ical origin. Journal of agricultural and food chemis try. 2005. 53:9337-9341.

13. Melnyk JP, Wang S, Marcone MF. Chemical and biological properties of the world's most expensive spice: Saffron. Food Research International. 2010. 43**:**1981-1989.

14. Bombardelli, E., Morazzoni, P. Urtica dioica L. Fitoterapia. 1997. 68:387-402.

15. Hendriks H, Bos R, Allersma D, Malingré TM, Koster AS. Pharmacological screening of valerenal and some other components of essential oil of Valeriana officinalis. Planta Medica. 1981.42:62-68.

16. Wang J, Zhao J, Liu H, Zhou L, Liu Z, Wang J, Han J, Yu Z, Yang F. Chemical analysis and biological activity of the essential oils of two valerianaceous species from China: Nardostachys chinensis and Valeriana officinalis. Molecules. 2010. 15:6411-6422.

17. Letchamo W, Ward W, Heard B, Heard D. Essential oil of Valeriana officinalis L. cultivars and their antimicrobial activity as influenced by harvesting time under commercial organic cultivation. Journal of agricultural and food chemistry. 2004.52:3915-3919.

18. Korikanthimath VS, Hiremath GM, Hosmanp MM. Cultivation of cardamom (Elettaria cardam omumMaton) in homesteads. Journal of Spices and Aromatic Crops. 1998. 7(1):1-6.

19. Nasar-Abbas SM, Halkman AK, Al-Haq MI. Inhibition of Some Foodborne Bacteria by Alcohol Extract of Sumac (Rhus coriaria L.). Journal of Food Safety. 2004. 24: 257-267.

20. Moreno DA, Ilic N, Poulev A, Raskin I. medicinal plant extracts against hospital isolates of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Clin. Microbiol. Infect. 2005. 11:510-512.

3. Fong WG, Liston P, Rajcan-Separovic E, Jean, MS, Craig C, Korneluk RG. Expression and genetic analysis of XIAP-associated factor 1 (XAF1) in cancer cell lines. Genomics. 2000. 70:113-122.

4. Neuhauser MM, Weinstein RA, Rydman R, Danziger LH, Karam G, Quinn JP. Antibiotic resistance among gram-negative bacilli in US intensive care units: implications for fluoroquinolone use. JAMA. 2003. 289:885-888.

5. Masomi, J., Yadegari, D., Mozoni, S. 2005. More Appropriate Antimicrobial Agents for Antibiogram. Iranian Journal of Infectious. Disease and Tropical Medicine.2005;10(29):53-58.

6. Zhao H1, Dong J, Lu J, Chen J, Li Y, Shan L, Lin Y, Fan W, Gu G. Effects of extraction solvent mixtures on antioxidant activity evaluation and their extraction capacity and selectivity for free phenolic compounds in barley (Hordeum vulgare L.).J Agric Food Chem. 2006. 54(19):7277-7286.

7. Cowan MM. Plant products as antim icrobial agents. Clin. Microbiol. Rev. 1999.12:564-582.

8. Alviano D., Alviano, C. Plant extracts: search for new alternatives to treat microbial diseases. Curr. Pharm. Biotechnol. 2009. 10:106-121.

9. Zaidan M, Noor Rain A, Badrul A, Adlin A, Norazah A, Zakiah I. *In vitro* screening of five local medicinal plants for antibacterial activity using disc diffusion method. Trop Biomed. 2005. 22:165-170.

10. Kaur C, Kapoor HC. Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. International Journal of Food Science & Technology. 2002. 37:153-161.

11. Sánchez-Ortega I, García-Almendárez BE, Santos-López EM, Amaro-Reyes A, Barboza-Corona JE, Regalado C. Antimicrobial edible films and coatings for meat and meat products preservation. The Scientific World Journal. 2014:248935.

12. Zalacain A, Ordoudi SA, Díaz-Plaza EM, Carmona M, Blázquez I, Tsimidou MZ, Alonso GL. Near-infrared spectroscopy in saffron

Effects of *Arachis hypogaea* nutshell extract on lipid metabolic enzymes and obesity parameters. Life Sciences. 2006. 78(24): 2797-2803.

۲۱. بی نام. ۱۳۸۵. چای سبز و سیاه-اندازه گیری مواد اختصاصی آن-قسمت اول -تعیین مقدار کل پلی فنل ها-روش رنگ سنجی با استفاده از معرف، استاندارد به شماره ۸۹۸۶-۱. مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتي ایران، چاپ اول.

۲۲. بی نام. ۱۳۸۲. نگهدارنده ها - تعیین حداقل غلظت بازدارنده (MIC) - روش آزمون میکروبیولوژي، استاندارد به شماره ۵۸۷۵. مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتي ایران، چاپ اول.

23. Parekh J, Jadeja D, Chanda S. Efficacy of Aqueous and Methanol Extracts of Some Medicinal Plants for Potential Antibacterial Activity Turk J Biol. 2005. 29:203-210.

24. Uma B, Parvathavarthini R. Antibacterial effect of hexane extract of sea urchin, Temnopleurus alexandri (Bell, 1884). International Journal of PharmTech Research. 2010. 2:1677-1680.

25. Dumas ER, Michaud AE, Bergeron C, Lafrance JL, Mortillo S, Gafner S. Deodorant effects of a supercritical hops extract: antibacterial activity against Corynebacterium xerosis and Staphylococcus epidermidis and efficacy testing of a hops/zinc ricinoleate stick in humans through the sensory evaluation of axillary deodorancy. Journal of cosmetic dermatology. 2009. 8:197-204.

26. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. International journal of food microbiology. 2004. 94:223-253.

27. Chaieb K, Hajlaoui H, Zmantar T, Kahla-Nakbi AB, Rouabhia M. Mahdouani K, Bakhrouf A. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, Eugenia caryophyllata (Syzigium aromaticum L. Myrtaceae): a short review. Phyto therapy research. 2007. 21:501-506.

28. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils–a review. Food and chemical toxicology. 2008.46:446-475.

29. Kim J, Marshall MR, Wei C. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. Journal of agricultural and food chemistry. 1995. 43: 2839-2845.

30. Edris AE. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. Phytotherapy research. 2007. 21:308-323.

31. Farag R, Daw Z, Hewedi F, El-Baroty G. Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. Journal of Food Protection. 1989. 52: 665-667.

32. Janssen A, Scheffer J, Svendsen AB. Anti microbial activity of essential oils: a 1976-1986 literature review. Aspects of the test methods. Planta medica. 1987. 53:395-398.

33. Prabuseenivasan S, Jayakumar M, Ignacim uthu S. *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. BMC complementary and alternative medicine. 2006. 6:39.

34. Burt SA, Reinders RD. Antibacterial activity of selected plant essential oils. Lett Appl Micro biol. 2003.36(3):162-7.

35. Benkeblia N. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (Allium cepa) and garlic (Allium sativum). LWT-Food Science and Technology. 2004.37: 263-268.

36. Mahboubi M, Haghi G. Antimicrobial activity and chemical composition of Mentha pulegium L. essential oil. Journal of ethnopharmacology. 2008. 119:325-327.

37. Viljoen A, Van Vuuren S, Ernst E, Klepser M, Demirci B, Başer H, Van Wyk B. Osmitopsis asteriscoides (Asteraceae)-the antimicrobial activity and essential oil composition of a Cape-Dutch remedy. Journal of Ethnopharmacology. 2003. 88: 137-143.

38. Kossah R, Zhang H, Chen W. Antimicrobial and antioxidant activities of Chinese sumac (Rhus typhina L.) fruit extract. Food Control. 2011. 22**,** 128-132.

39. Akrayi HFS, Abdullrahman ZFA. Screening in vitro and in vivo the antibacterial activity of Rhus coriaria extract against S. Aureus. IJRRAS. 2013. 15: 390-397.

40. Norajit K, Laohakunjit N, Kerdchoechuen O. Antibacterial effect of five Zingiberaceae essential oils. Molecules. 2007. 12:2047-2060.

41. Rasooli I, Mirmostafa SA. Bacterial susceptibility to and chemical composition of essential oils from Thymus kotschyanus and Thymus persicus. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2003. 51: 2200-2205.

42. Griffin SG, Markham JL, Leach DN. An agar dilution method for the determination of the minimum inhibitory concentration of essential

antimicrobial activity and its determination1. Journal of Food Safety. 1988. 9:97-118.

oils. Journal of Essential Oil Research. 2000. 12: 249-255.

43. Zaika LL. Spices and herbs: their