اثر مهارکنندگی و کشندگی عصاره‌های آبی و اتانولی کرفس کوهی (Kelussia odoratissima) بر Bacillus cereus, Escherichia coli و Listeria innocua در شرایط آزمایشگاهی

مریم حیدری سورشجانی*[۱]، فریده طباطبایی یزدی[۲]، علی مرتضوی[۳]، فخری شهیدی[۳]

۱ . دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۲ . دانشیار و عضو هئیت علمی گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۳. استاد و عضو هئیت علمی گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

* **نشانی برای مکاتبه:** Maryam.heidari67@yahoo.com
دریافت مقاله: خرداد نود و دو پذیرش برای چاپ: مرداد نود و دو

چکیده

سابقه و هدف: *کرفس کوهی با نام علمی Kelussia odoratissima و نام محلی کلوس از خانواده چتریان (Apiaceae)، گیاهی ۲ ساله یا چند ساله است. هدف از این مطالعه تعیین اثر ضد میکروبی عصاره‌های آبی و اتانولی کرفس کوهی علیه Escherichia coli, Bacillus cereus و Listeria inocua می‌باشد.*

روش کار: *در این پژوهش، غلظت‌های مختلف (۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میلی گرم بر میلی لیتر) عصاره‌های آبی و اتانولی برگ کرفس کوهی گیاهی تهیه گردید. اثر ضد باکتریایی عصاره‌ها با استفاده از روش پخش عصاره (تمام ظرف) در سطح محیط کشت و روش انتشار در آگار (به کمک دیسک) بررسی شد. حداقل غلظت مهارگنندگی و حداقل غلظت کشندگی نیزبه روش رقت لوله‌ای تعیین شد. تجزیه و تحلیل نتایج با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) انجام شد.*

یافته‌ها: *در روش انتشار در آگار همه غلظت‌های عصاره اتانولی بر Bacillus cereus و Listeria innocua اثر بازدارندگی داشت. MIC عصاره‌های آبی و اتانولی برای Bacillus cereus و Listeria innocua به ترتیب ۱۶ mg/ml و ۸ و برای Escherichia coli به ترتیب ۳۲ mg/ml و ۱۶ بود . MBC عصاره‌های آبی و اتانولی نیز در خصوص Bacillus cereus و Listeria innocua به ترتیب ۳۲ mg/ml و ۱۶ و برای Escherichia coli به ترتیب برابر ۶۴ mg/ml و۳۲ بود. Escherichia coli بیش‌ترین مقاومت را در برابر عصاره‌های آبی و اتانولی کرفس کوهی نشان داد.*

نتیجه‌گیری:*عصاره اتانولی برگ کرفس کوهی در مقایسه با عصاره آبی در شرایط آزمایشگاهی اثر بازدارندگی بیش‌تری بر روی سویه-های مورد مطالعه داشت.*

واژگان کلیدی: *کرفس کوهی، عصاره‌های آبی و اتانولی، اثر ضد میکروبی*

مقدمه

استفاده از گیاهان دارویی برای درمان بیماری‌ها قرن‌ها سابقه دارد. با وجود آن‌که بسیاری از داروها شیمیایی هستند اما دست کم یک سوم داروها منشا گیاهی دارند یا پس از استخراج از گیاه تغییر شکل یافته اند(۱) . در حال حاضر روند استفاده از گیاهان دارویی جهت درمان بیماری‌های مختلف به صورت علمی و سنتی روند رو به رشدی داشته است بر اساس مطالعات انجام شده در ایالت متحده فروش ترکیبات گیاهی به عنوان دارو رشد ۳۷ درصدی داشته است(۲). ایران از لحاظ آب و هوا و موقعیت جغرافیایی یکی از بهترین مناطق جهان محسوب می‌شود و در گذشته هم منبع تولید و مصرف گیاهان دارویی بوده است(۳).

کرفس کوهی (Kelussia odoratissima) با نام محلی کلوس به عنوان گونه‌ای جدید از جنس جدید Kelussia از تیره چتریان، یکی از گیاهان دارویی با ارزشی است که در ایران مورد استفاده قرار می‌گیرد. این گیاه بومی کوه‌های زاگرس مرکزی به ویژه استان چهارمحال و بختیاری بوده و تنها در ایران مشاهده شده است. کرفس کوهی در منابع مختلف گذشته با نام‌های علمی Amircabiria, Apium graveolens odoratiaaima و Opopanax sp. نام‌گذاری شده است(۴). رویش گاه‌های طبیعی کرفس کوهی بر روی خاک‌های کم‌عمق تا بسیار عمیق با بافت متوسط تا سنگین که ظرفیت نگه داری آب بالایی داشته و فاقد شوری و قلیائیت می‌باشند، دیده می‌شود. در حال حاضر رویش گاه‌های طبیعی کلوس به قطعات کوچکی در استان‌های اصفهان، چهارمحال و بختیاری، کهگیلویه و بویراحمد، فارس و لرستان محدود می‌شود.

در طب سنتی برای اندام‌های هوایی گیاه کرفس کوهی خواصی چون ضد التهاب، ضد درد، درمان رماتیسم، تصفیه خون و برای بذرها و ریشه آن به صورت جوشانده خواصی برای درمان سرماخوردگی و سرفه‌های شدید قائل هستند. هم چنین در تحقیقات دیگر، اثرهای ضدآلرژی ، محافظت کننده عروق، آنتی ترومبوز و محافظ دستگاه گوارش، ضد دیابت، آنتی پراکسیداسیون لیپیدها و ضدسرطان مشخص شده است(۵،۶).

Escherichia coli نوعی باسیل گرم منفی از خانواده انتروباکتریاسه است که برخی از سروتیپ‌های آن موجب مسمویت غذایی و اسهال می‌شوند. Escherichia coli بزرگ‌ترین عامل عفونت های ادراری است و به عنوان شاخص آلودگی آب شهری به فاضلاب در نظر گرفته می شود(۷). Bacillus cereus باسیل گرم مثبت از خانواده باسیلاسه است که مولد انتروتوکسین‌های مولد اسهال و تهوع بوده و قادر به ایجاد سندرم اسهال و سندرم تهوع است(۸). Listeria باکتری غیر اسپورزا، غیر شاخه دار، منظم، کوتاه، گرم مثبت و بی‌هوازی اختیاری است که آن را از خاک، غذای حیوانات، آب، مدفوع، گوشت و فرآورده‌های آن، شیر و لبنیات و سبزیجات جدا نموده اند(۹). با توجه به روند رو به رشد گیاهان دارویی، وجود ترکیبات فعال بیولوژیکی موجود در گیاه کرفس کوهی و وجود این گیاه در استان چهار محال و بختیاری بر آن شدیم تا در این پژوهش اثر ضد میکروبی عصاره‌های آبی و اتانولی برگ کرفس کوهی علیه , Escherichia coli Bacillus cereus وListeria innocua را تعیین کنیم.

روش کار

این پژوهش آزمایش گاهی در آزمایش گاه میکروب صنعتی و آزمایش گاه فناوری‌های نوین گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانش گاه فردوسی مشهد انجام شد. گیاه کرفس کوهی در ابتدای دوره رویشی گیاه (اردیبهشت ماه) از ارتفاعات شهرستان کوهرنگ واقع در استان چهارمحال و بختیاری جمع آوری گردید و با هم کاری هرباریوم و آزمایش گاه سیستماتیک گیاهی دانش کده علوم پایه و پژوهش کده علوم دانش گاه فردوسی مشهد شناسایی شد. برگ‌های کرفس کوهی پس از تمیز شدن در شرایط مناسب (سایه) خشک و توسط آسیاب آزمایش گاهی مدل Waring پودر گردید. باکتری‌های مورد استفاده از Escherichia coli ، Listeria innocua و Bacillus cereus بودند.

مقدار ۷۵ گرم از برگ‌های پودر شده گیاه جهت تهیه عصاره‌های آبی و اتانولی به ارلن حاوی ۳۷۵ میلی‌لیتر آب مقطر و اتانول ۹۶ درجه اضافه شد و ارلن به مدت ۷۲ ساعت در دمای اتاق بر روی دستگاه هم زن مغناطیسی قرار گرفت تا استخراج عصاره به طور کامل انجام گیرد. سپس مخلوط حلال و گیاه توسط صافی از هم جدا شد تا عصاره‌های اولیه به دست آید. عصاره‌های اولیه حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. سپس عصاره حاصل وارد دستگاه تقطیر در خلاء (روتاری) شده و در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد حلال آن‌ها به مدت یک ساعت تبخیر و عصاره‌های تغلیظ شده به دست آمد. عصاره‌های تغلیظ شده در ظرف تیره استریل ریخته شد وتا زمان مصرف در ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند(۱۰).

برای تعیین وزن خشک عصاره کرفس کوهی ابتدا وزن یک لوله آزمایش تعیین و ۱ ml از عصاره‌های آبی و اتانولی در آن ریخته شد. سپس محتوی لوله در دمای اتاق خشک گردید. بعد از خشک شدن عصاره، وزن لوله آزمایش مجددا تعیین گشت. اختلاف وزن لوله معادل ۱ ml از عصاره‌ها است. میانگین سه بار تکرار، به عنوان وزن خشک عصاره ها محاسبه شد(۱۱). میزان استحصال عصاره اتانولی ۱۲ ٪ و عصاره آبی ۸ ٪ بود.

بیست و چهار ساعت قبل از انجام آزمایش، از کشت ذخیره به محیط کشت شیب‌دار Muller Hinton Agar تلقیح انجام شد. سوسپانسیون غلیظ میکروبی با استفاده از محلول رینگر پس از رشد باکتری بر سطح شیب‌دار آگار آن تهیه گردید. سپس کدورت سوسپانسیون حاصل توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۰ نانومتر اندازه گیری شد و تا برابر شدن کدورت محلول با کدورت ۰/۵ محلول استاندارد مک فارلند(CFU) (/ml ۱۰۸ ×۱/۵)، توسط محلول رینگر رقیق شد(۱۳،۱۲) .

برای تعیین حساسیت سویه‌های باکتری نسبت به عصاره‌های آبی و اتانولی گیاه از روش انتشار در آگار به کمک دیسک و روش پخش عصاره در سطح محیط کشت (تمام ظرف) استفاده شد. در روش تمام ظرف پس از افزودن ۰/۲ گرم از عصاره‌های آبی و اتانولی به ۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل، مخلوط حاصل به کمک دستگاه ورتکس هم زده شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از این محلول به ظرف های پتری استریل اضافه گشت. پس از آنکه محیط کشت استریل مولر هینتون آگار (مرک آلمان) به ظرف‌های پتری اضافه شد یک لوپ از کشت استاندارد هر سوش بر روی این محیط‌ها کشت داده شد و به مدت ۲۴ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت(۱۴). در روش انتشار در آگار به کمک دیسک، ابتدا CFU /ml۱/۵×۱۰۸ (معادل استاندارد نیم مک فارلند) از کشت استاندارد هر سوش بر روی سطح محیط آگار کشت داده شد و توسط اسپریدر شیشه‌ای استریل بر سطح آگار پخش شد. دیسک‌هایی که قبلا در غلظت‌های مشخص عصاره(۲۰mg/ml per disc) خیسانده شده بودند توسط پنس استریل با کمی فشار بر سطح محیط کشت ثابت گردید. پتری‌ها پس از گرم خانه‌گذاری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، با استفاده از خط‌کش به طور دقیق قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد. تمامی آزمایشات با ۳ تکرار انجام گرفت(۱۵).

برای تعیین MIC از روش رقت لوله‌ای استفاده گردید به طوری‌که برای هر عصاره از یک سری ۹ تایی لوله آزمایش استریل استفاده شد، ۸ لوله برای آزمایش رقت‌های مختلف هر عصاره (۲۵۶ mg/ml و ۴،۸،۱۶،۳۲،۶۴،۱۲۸،۲) و یک لوله به عنوان کنترل منفی تهیه شد. پس از کشت تمام لوله‌های آزمایش به مدت ۲۴ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم خانه‌گذاری شد. پس از آن لوله‌ها از نظر کدورت ناشی از رشد باکتری‌های تلقیح شده بررسی شدند و پایین‌ترین غلظتی که در آن کدورتی مشاهده نگردید و کاملا شفاف بود، به عنوان MIC در نظر گرفته شد(۱۷،۱۶).

حداقل غلظت مهارکننده رشد عصاره‌های آبی و اتانولی کرفس کوهی نیز توسط روش رقت لوله‌ای تعیین گردید. برای تعیین MBC برای هر عصاره از یک سری ۹ تایی لوله آزمایش استریل استفاده شد، ۸ لوله برای آزمایش رقت-های مختلف هر عصاره (۲۵۶ mg/ml و ۴،۸،۱۶،۳۲،۶۴،۱۲۸،۲) یک لوله هم به عنوان کنترل به کار گرفته شد. پس از کشت تمام لوله‌های آزمایش به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم خانه‌گذاری شدند از تمام لوله-های که هیچ رشدی در آن‌ها مشاهده نشده بود نمونه‌برداری و جهت تعیین MBC به روش Pour Plate Method کشت داده شد. لوله‌ای که حاوی کم‌ترین غلظت عصاره بود و در پلیت مربوط به آن هیچ رشدی مشاهده نشده بود به عنوان MBC در نظر گرفته شد(۱۸).

جهت تجزیه و تحلیل اطلاعات از آزمون واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی دانکن با سطح احتمال 5 درصد با استفاده از نرم افزار آماری SPSS تحت نسخه ۱۶ استفاده شد.

یافته‌ها

عصاره آبی و الکلی درغلظت ۲ mg/ml برروی Bacillus cereus و Listeria innocua کاملا موثر بوده و از رشد آن‌ها روی محیط کشت جلوگیری کرد. هر دو عصاره آبی و اتانولی در غلظت ۲ mg/ml فاقد اثر ضد باکتریایی مشخصی روی Escherichia coli بوده و قادر به جلوگیری از رشد این باکتری بر روی محیط کشت نبود.

عصاره اتانولی برگ گیاه کرفس کوهی در تمامی غلظت‌ها روی Bacillus cereus و Listeria innocua و در غلظت‌های ۴۰ ،۶۰و ۸۰ mg/ml بر روی Escherichia coli دارای اثر بازدارندگی بود. اختلاف میانگین قطر عدم رشد عصاره اتانولی بر Bacillus cereus و Listeria innocua به جز در غلظت ۴۰ با ۶۰ در بقیه موارد با هم معنی‌دار بود. در مقایسه میان غلظت‌های ۴۰ با ۶۰ و۶۰ با ۸۰ عصاره اتانولی بر Escherichia coli نیز مشاهده شد که اختلاف میانگین قطر بازدارندگی معنی‌دار می‌باشد. عصاره آبی روی Bacillus cereus و Listeria innocua در غلظت‌های۴۰ mg/ml، ۶۰ و ۸۰ از رشد این باکتری ها جلوگیری کرد، اما در غلظت ۲۰ mg/ml اثر بازدارندگی مشاهده نشد. هم چنین غلظت‌های۲۰mg/ml و۴۰ عصاره آبی روی Escherichia coliموثر نبوده، و فقط غلظت‌های ۶۰ mg/ml و ۸۰ عصاره آبی اثر بازدارندگی را نشان داد. مقایسه دو به دو میانگین‌های قطر هاله عدم رشد در مورد عصاره آبی بر باکتری‌های مورد بررسی نشان داد که بجز در غلظت ۸۰ با ۶۰ عصاره آبی برBacillus cereus در بقیه موارد میانگین قطر عدم رشد اختلاف معنی‌دار است. مورد عصاره اتانولی غلظت موثر برای تمامی باکتری‌های مورد بررسی ۸۰mg/ml بود. غلظت موثر عصاره آبی برای باکتری Bacillus cereus ۶۰mg/ml و برای باکتری‌های Listeria innocua و Escherichia coli ۸۰mg/ml بود(جدول۱).

حداقل غلظت بازدارندگی(MIC) عصاره اتانولی برگ گیاه کرفس کوهی برای Bacillus cereus ، Listeria innocua و Escherichia coli به ترتیب ۸ ، ۸ و ۱۶ mg/ml بود، در حالی‌که MIC عصاره آبی برایBacillus cereus، Listeria innocua و Escherichia coli به ترتیب ۱۶،۱۶ و ۳۲ mg/ml بود(جدول۲).

حداقل غلظت کشندگی(MBC) عصاره اتانولی و عصاره آبی برگ گیاه کرفس کوهی برای Bacillus cereus و Listeria innocua به ترتیب ۱۶mg/mlو ۳۲ بود و MBC عصاره اتانولی و عصاره آبی برگ گیاه کرفس کوهی برایEscherichia coli به ترتیب برابر با ۳۲ mg/mlو ۶۴ بود(جدول۳).

جدول۱. میانگین قطر هاله عدم رشد Bacillus cereus، Listeria innocua وEscherichia coli بر حسب میلی‌متر در حضور عصاره‌های اتانولی و آبی برگ گیاه کرفس کوهی(انتشار در آگار)

نوع عصاره	میکروارگانیسم	غلظت عصاره برگ گیاه کرفس کوهی(mg/ml)			
		۲۰	۴۰	۶۰	۸۰
اتانولی	Bacillus cereus	^{a}۰/۵۷±۱۲/۶۰	^{b}۰/۵۵±۱۴/۵۰	^{b}۰/۲۸±۱۵/۶۰	^{d}۰/۵۳±۱۷/۷۰
اتانولی	Listeria innocua	^{a}۰/۵۰±۱۱/۴۰	^{b}۰/۵۷±۱۳/۷۰	^{b}۰/۵۳±۱۴/۹۰	^{d}۰/۲۸±۱۶/۶۰
اتانولی	Escherichia coli	-	^{b}۰/۵۵±۱۱/۲۰	^{c}۰/۲۸±۱۲/۳۰	^{d}۰/۵۷±۱۳/۹۰
آبی	Bacillus cereus	-	^{b}۰/۵۳±۱۰/۵۰	^{c}۰/۵۷±۱۲/۷۰	^{c}۰/۵۲±۱۳/۹۰
آبی	Listeria innocua	-	^{b}۰/۵۷±۸/۹۰	^{c}۰/۲۸±۱۰/۶۰	^{d}۰/۵۷±۱۲/۷۰
آبی	Escherichia coli	-	-	^{c}۰/۵۲±۹/۴۰	^{d}۰/۵۵±۱۱/۵۰

- علامت (-) نشان دهنده عدم وجود فعالیت ضد باکتری عصاره آبی و اتانولی برگ گیاه کرفس کوهی می باشد.
- حروف غیر مشابه در یک ردیف نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار میان اثر ضد میکروبی غلظت‌های مختلف می‌باشد.
- حروف مشابه در یک ردیف نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار میان اثر ضد میکروبی غلظت‌های مختلف می‌باشد.

جدول۲. نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) عصاره‌های اتانولی و آبی عصاره برگ گیاه کرفس کوهی برBacillus cereus ، Listeria innocua وEscherichia coli

نوع عصاره	میکروارگانیسم	غلظت عصاره برگ گیاه کرفس کوهی(mg/ml)								
		۲	۴	۸	۱۶	۳۲	۶۴	۱۲۸	۲۵۶	کنترل
اتانولی	Bacillus cereus	-	-	+	+	+	+	+	+	-
اتانولی	Listeria innocua	-	-	+	+	+	+	+	+	-
اتانولی	Escherichia coli	-	-	-	+	+	+	+	+	-
آبی	Bacillus cereus	-	-	-	+	+	+	+	+	-
آبی	Listeria innocua	-	-	-	+	+	+	+	+	-
آبی	Escherichia coli	-	-	-	-	+	+	+	+	-

+: عدم رشد ، -: رشد

جدول۳. نتایج حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره‌های متانولی و آبی عصاره برگ گیاه کرفس کوهی بر Bacillus cereus، Listeria innocua وEscherichia coli

نوع عصاره	میکروارگانیسم	غلظت عصاره برگ گیاه کرفس کوهی(mg/ml)								
		۲	۴	۸	۱۶	۳۲	۶۴	۱۲۸	۲۵۶	کنترل
اتانولی	Bacillus cereus	-	-	-	+	+	+	+	+	-
اتانولی	Listeria innocua	-	-	-	+	+	+	+	+	-
اتانولی	Escherichia coli	-	-	-	-	+	+	+	+	-
آبی	Bacillus cereus	-	-	-	-	+	+	+	+	-
آبی	Listeria innocua	-	-	-	-	+	+	+	+	-
آبی	Escherichia coli	-	-	-	-	-	+	+	+	-

+: عدم رشد، -: رشد

بحث

مقاومت میکروبی روز افزون باکتری‌ها نسبت به آنتی بیوتیک‌ها و شیوع بیماری‌های عفونی که جهت درمان نیاز به آنتی‌بیوتیک مناسب دارند ، هم چنین توانایی برخی از گیاهان جهت تولید مواد ضد میکروبی محققین را بر آن داشت تا به عنوان یک جای گزین مناسب آنتی‌بیوتیک‌ها عصاره های گیاهی را مدنظر قرار دهند(۱۹).

بر اساس نتایج حاصل از مقایسه دو به دو میانگین‌ها با کمک آزمون چند دامنه‌ای دانکن، وجود یا عدم وجود تفاوت معنی‌دار میانگین قطر عدم رشد غلظت‌های مختلف را می‌توان به مقدار ماده مؤثر موجود در عصاره‌ها نسبت داد. ولی به طوری کلی می‌توان نتیجه گرفت که با افزایش غلظت عصاره‌های آبی و اتانولی برگ گیاه کرفس کوهی میزان قطر هاله عدم رشد افزایش پیدا می‌کند(جدول ۱). شرافتی چالشتری و هم کاران (۱۳۸۷) در بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره‌های آبی و اتانولی گیاه گل میمونی (Scrophularia striata) بر Escherichia coli نشان دادند که با افزایش غلظت عصاره‌های آبی و اتانولی گیاه گل میمونی قطر هاله عدم رشد به طور معنی داری افزایش پیدا می‌کند که نتایج آن‌ها با نتایج بررسی حاضر هم‌سویی دارد(۲۰). نتایج نشان داد در سطح معنی دار ۵٪ کم‌ترین بازداری مربوط به عصاره آبی روی Escherichia coli و بیش‌ترین بازداری مربوط به عصاره اتانولی علیه Bacillus cereus بود.

قاسمی پیربلوطی و هم کاران اثرات ضدباکتریایی اسانس و عصاره ۱۰گونه گیاهی منحصر بفرد ایرانی از جمله کرفس کوهی بر روی باکتری‌های Staphylococcus aureus , Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa ,Klebsiella pneumonia را مورد بررسی قرار دادند. نتایج آن‌ها حاکی از آن بود که اکثر اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهان مورد مطالعه اثرات آنتی باکتریایی بالایی با قطر بازداری ۸ تا ۲۳ میلی‌متر در مقابل باکتری‌های مورد آزمایش دارد(۲۱).

نتایج نشان می‌دهد که عصاره اتانولی برگ گیاه کرفس کوهی در مقایسه با عصاره آبی برگ گیاه اثر بازدارندگی بیش‌تری روی سوش‌های مورد مطالعه دارد. علت آن درصد استحصال بیشتر عصاره اتانولی نسبت به عصاره آبی و در نتیجه استخراج بیشتر مواد موثر در برگ گیاه کرفس کوهی توسط حلال اتانول می‌باشد. علیزاده بهبهانی و هم کاران (۱۳۹۱) در بررسی اثر ضد میکروبی گیاه حرا (Avicennia marina) بر Penicillium digitatum نشان دادند که عصاره اتانولی این گیاه در مقایسه با عصاره آبی اثر ضد میکروبی قوی‌تری از خود نشان می‌دهد(۲۲). نتایج این پژوهش گران با نتایج ما هم‌خوانی دارد.

در مطالعه انجام شده توسط سلیمی و هم کاران مشخص شد که عمده-ترین ترکیب‌های موجود در اسانس اکوتیپ‌های کرفس کوهی موجود در استان چهارمحال و بختیاری شامل سیس -لیگوستیلید(Z-ligustilid)، ۳ ترانس-بوتیلیدن فتالید، ترانس -لیگوستیلید (E-ligustilide) کسان، اسپاتولنول، گلوبولول، بوتیل فتالید ، بتا-سلینن ،لیگوستیلید، بوتیلیدن فتالید و پنتیل بنزن بوده که حدود ۸۸/۶ درصد از ترکیب‌های اسانس این اکوتیپ ها را تشکیل می‌دهند(۲۳). به نظر می‌رسد بیش‌ترین اثر ضد باکتریایی گیاه کرفس کوهی مربو به این ترکیبات می‌باشد.

حساسیت بیش‌تر باکتری‌های گرم مثبت در مقابل عوامل ضد میکروبی در مطالعات مختلف مطرح و مورد تایید قرار گرفته است و این مسأله ممکن است به علت وجود دیواره سلولی غنی از پپتیدوگلیکان و فقدان لایه غشا خارجی در این باکتری‌ها باشد(۲۶-۲۴). نتایج ما نیز نشان داد که باکتری-های گرم مثبت Bacillus cereus و Listeria innocua در مقایسه با باکتری گرم منفی Escherichia coli حساسیت بیش‌تری داشتند. هم چنین نتایج این بررسی نشان داد در سطح معنی‌دار $p < 0/05$ بیش‌ترین مقاومت نسبت به عصاره‌های اتانولی و آبی برگ گیاه کرفس کوهی مربوط به Escherichia coli و بیش‌ترین حساسیت به عصاره‌های اتانولی و آبی مربوط به Bacillus cereus بود(جدول ۱).

خواص ضد میکروبی عصاره بخش‌های گیاه گزنه دوپایه بر روی ۵ باکتری از جمله Bacillus subtilis و Escherichia coli توسط مجد و هم کاران در سال ۱۳۸۲بررسی گردید(۲۷). آن‌ها اثبات نمودند که عصاره مورد آزمایش اثر ضد میکروبی بیش‌تری بر باکتری‌های گرم مثبت هم چون Bacillus subtilis دارد. مشاهدات این پژوهش گران مبنی بر اثر بیش‌تر عصاره‌ها بر باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی با مشاهدات ما هم‌خوانی دارد.

نتایج حاصل از حداقل غلظت مهارکنندگی MIC و حداقل غلظت کشندگی MBC عصاره اتانولی گیاه کرفس کوهی نشان داد، بیش‌ترین مقاومت مربوط به باکتری گرم منفی Escherichia coli بود(جدول ۲و ۳).

در مطالعه حاضر اثر ضد میکروبی برگ کرفس کوهی به عنوان یکی دیگر از اعضای خانواده چتریان بررسی گردید تا در تکمیل یافته‌های فارماکولوژیکی بتوان اطلاعات کامل‌تری از خواص گیاه را فراهم آورد. لذا در گام‌های بعدی باید به مطالعه اثرات ضدمیکروبی اندام‌های دیگر گیاه پرداخت. با توجه به غلظت بیش‌تر ماده مؤثره در اسانس گیاه به احتمال بسیار قوی مطالعه اثرات ضد میکروبی اسانس گیاه اثرات ضد میکروبی بهتری را نشان خواهد داد.

نتیجه گیری

عصاره برگ کرفس کوهی در شرایط "in vitro"دراری قابلیت ضد باکتریایی قابل ملاحظه ای بر روی سویه های مورد مطالعه می باشد و در ادامه لازم است مطالعات بیش‌تری در شرایط " in vivo " انجام شود تا عواملی هم‌چون دوزاژ موثر این عصاره بر باکتری‌های مورد نظر ارزیابی شود و نهایتا بتوان این عصاره را به عنوان یک ماده ضد میکروبی طبیعی و جدید معرفی کرد.

تشکر و قدردانی

از آقای مهندس بهروز علیزاده بهبهانی، خانم مهندس شهناز افشاریان وخانم دکتر عادله حیدری که در فراهم مواد لازم و انجام آزمایشات ما را یاری کردند، قدردانی می‌شود.

REFERENCES

1. Eisenberg DM, Davis RB, Ernst SL, Apple S, Wilkey S, Van Rompay M, et al, editors. Trends in alternative medicine use in the united states, 1990 - 1997, Results of a follow – up national survey.JAMA. 1998; 280: 75–1569.

2. Klink B. Alternative medicine: is natural really better? Drug Top. 1997;141:99-100.

3. Jalali M, Abedi D, ghasemi Dehkordi N, Chaharmahali A. [The antimicrobial effect of ethanol extracts of some medicinal plants against Listeria monocytogenes]. J Sahrekord Univ Med Sci. 1385;8(3);25-33. (Persian)

4. Rafieiyan M, Shahrani M, pilevarian A, Kheiri S, Rabiei R, et al, editors. [Effect of Kelussia odoratissima on blood lipid patients taking Lovastatin: a clinical study]. J Sahrekord Univ Med Sci. 1387.p.70-76. (Persian)

5. Behagh A. [Fibrinolytic effect of selected medicinal plants]. J Isfahan Univ Med Sci. 1382.p.31. (Persian)

6. Sadeghi M. [Anti-anxiety and will effect of total extract and essence of Kelussia odoratissima Mozaf. In mice]. PhD Thesis, Isfahan Univ of Med Sci. 1386. (Persian)

7. Shimi A. Veterinary bacteriology and bacterial diseases. Jahad Institute Press. 1997.p.185-297. (Persian)

8. Kotiranta A, Lounatmaa K, Haapasalo M. Epidemiology and pathogenesis of Bacillus cereus infections. Microb Infect. 2000; 2 (2): 189–98.

9. Farber J.M, Peterkin P.I. 1991. Listeria monocytogenes, a food-borne pathogen. Microbiol Rev. 1991; 55: 476–511

10. Samsam Shariat H, Extraction of effective components from medicinal plants and their diagnostic and evaluation methods. 1st ed. Mani Press. Esfehan. 1992.p.8 - 20.

11. Soltaninejad Sh, Sataei Mokhtari T, Soltaninejad M.[Evaluation of antibacterial activity of methanol extract of eucalyptus leaves against Staphylococcus aureus, Escherichia coli and Streptococcus pyogenes in vitro]. J Microbial Biotech Research Islamic Azad Univ .1389; 2(4): 21-28. (Persian)

12. Naderi Nasab M, Nazem M. Bacteriology laboratory. Mashhad: Astan Gods Razavi Public. 1996.p.382-462.

13. Valero M, Salmeron M. Antibacterial activity of 11 essential oils against Bacillus cereus in tyndallized carrot broth. Int J food microbiol. 2003; 85(1): 73-81.

14. Babayi H, Kolo I, Okogun J.I, Ijah U. J. J. The antimicrobial activities of methanolic extracts of Eucalyptus camaldulensis and Terminalia catappa against some pathogenic microorganisms. Nigerian Society for Experimental Biology. 2004; 16(2):106-111.

15. Awoyinka O.A, Balogun I.O, Ogunnowo A. A. Phytochemical screening and in vitro bioactivity of Cnidoscolus aconitifolius (Euphorbiaceae). J Med Plants Research. 2007; 1(3):063-065.

16. Vanden DA, Vlietinck AJ. In: Dey, PM., Harborne, JB. (Eds.). Methods in plant biochemistry: screening medthods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. London: Academic Press. 1991.p.47-69.

17. Tape B, Donmez E, Vnlu M, Candan F, Daferera D, Sokmen A. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of Salvia cryptantha and Salvia multicaulis. Food Chem. 2004; 84: 519-525.

18. Espinel-Ingroff A, Fothergill A, Peter J, Rinaldi M, Walsh T. Testing conditions for determination of minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for Aspergillus spp: NCCLS collaborative study. J clini microbiol. 2002;40(9): 3204-8.

19. Motamedi H, Darabpour E,Gholipour M, Seyyednejd SM.. antibacterial effect of ethanolic and methanolic extracts of plantago ovaa and oliveria decumbens endemic in iran against some pathogenic bacteria. Inter J Pharmacology. 2010;6(2):117-22.

20. Sharfati Chaleshtori F, Sharafati Chaleshtori R, Momeni M. [Antimicrobial effect of aqueous and ethanol extracts of Scrophularia striata on Escherichia coli in vitro]. J Sahrekord Univ Med Sci. 1388.p.32-37. (Persian)

21. Ghasemi Pirbalouti A, Malekpoor F, Enteshari S, Yousefi M, Momtaz H, Hamedi B. Antibacterial activity of some folklore medicinal plants used by Bakhtiari tribal in Southwest Iran. Inter J Biology. 2010;2:55

22. Alizadeh Behbahani B, Tabatabaei Yazdi F, Shahidi F, Mohebbi M. Antimicrobial activity of Avicennia marina extracts ethanol, methanol & glycerin against Penicillium digitatum (citrus green mold). Scientific J Microbiology. 2012;1(7):147-151.

23. Salimi M, Ebrahimi A, Shojaei Asadiye Z, Saaei Dehkordi S. [Extraction and identification of chemical compounds of Kelussia odoratissima]. J Medicinal and Aromatic Plants. 1389; 26(2):147-156. (Persian)

24. Zakarya D, Fkih – Tetouani S, Hajji F. Chemical composition – antimicrobial activity relationship of Eucalyptus essential oils. Plants medicinal et Phytothrapie. 1993;26: 319- 33.

25. Tassou CC, Nychas GJ. .Antimicrobial activity of the essential oil of Mastic fum on gram – positive and gram – negative bacteria in broth and model food systems. Int. Biodeterio. biodegrad. 1995;36: 411- 20.

26. Majnuni MB, Abiri R, Malek Khatabi P, Adibi H. [Antimicrobial effects of hydro alcoholic leaf and Trigonella foenum seeds on different bacterial strains]. J Laboratory Medicine. 1388;3(2):31-35. (Persian)

27. Majd A, Mehrabian S, Jafari Z. [Study of antimicrobial properties of plant extracts of urtica diois L. J Medicinal and Aromatic Plants]. 1382;19(3):287-312. (Persian)