تعیین قدرت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت ضدمیکروبی عصاره هیدروالکلی سرخارگل بر اشرشیا کلی، سالمونلا تیفی، استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس

محمد نوشاد*[1]، بهروز علیزاده بهبهانی[1]، حسن برزگر[2]

۱. استادیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران
۲. دانشیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

***نشانی برای مکاتبه:** noshad@asnrukh.ac.ir

دریافت مقاله: اردیبهشت هزار و چهارصد پذیرش برای چاپ: تیر هزار و چهارصد

چکیده

سابقه و هدف: افزایش مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها گرایش مصرف کنندگان به استفاده از ترکیبات ضدمیکروبی طبیعی را افزایش داده است. گیاه سرخارگل به دلیل دارا بودن ترکیبات مؤثر از دیرباز در درمان بسیاری از بیماری‌ها مورد استفاده قرار می-گرفته است. هدف از این پژوهش، بررسی میزان فنول، فلاونوئید، فعالیت آنتی اکسیدانی و خاصیت ضدمیکروبی عصاره هیدروالکلی سرخارگل بر تعدادی از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا می‌باشد.

روش کار: در این پژوهش عصاره هیدروالکلی (۵۰ درصد آب مقطر و ۵۰ درصد اتانول) به روش (خیساندن) تهیه گردید. میزان فنول، فلاونوئید و خاصیت آنتی اکسیدانی به دو روش مهار رادیکال DPPH و ABTS اندازه‌گیری شد. همچنین، فعالیت ضدمیکروبی عصاره با روش‌های دیسک دیفیوژن، چاهک آگار، حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی بر باکتری‌های *اشرشیا کلی*، *سالمونلا تیفی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس* مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: حداقل غلظت کشندگی برای *استافیلوکوکوس اورئوس* برابر با ۱۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، *باسیلوس سرئوس* برابر با ۳۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و باکتری‌های *اشرشیا کلی* و *سالمونلا تیفی* برابر با ۶۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. در روش‌های دیسک دیفیوژن و چاهک آگار کمترین قطر هاله در *سالمونلا تیفی* و بیشتر مقدار آن در *استافیلوکوکوس اورئوس* مشاهده شد. عصاره هیدروالکلی دارای مقادیر قابل توجهی از ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و فعالیت آنتی اکسیدانی بود.

نتیجه‌گیری: با وجود حساسیت بیشتر باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با گرم منفی‌ها، عصاره گیاه سرخارگل دارای خاصیت ضدمیکروبی قابل توجهی در برابر باکتری‌های مورد مطالعه بود. از این رو، از گیاه سرخارگل می‌توان به عنوان یک ترکیب ضدمیکروبی مؤثر در برابر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا استفاده کرد.

واژگان کلیدی: سرخارگل، عصاره هیدروالکی، باکتری‌های بیماری‌زا، ترکیب ضدمیکروبی

مقدمه

در سال‌های اخیر، مقاومت باکتری‌ها به آنتی بیوتیک‌ها به دلیل تغییرات کروموزومی و یا تغییر در ماده ژنتیکی آن‌ها افزایش یافته است. از جمله این باکتری‌ها می‌توان به اشرشیا کلی از رایجترین باکتری‌های موجود در روده و مولد عفونت‌های بیمارستانی، سالمونلا تیفی یک باکتری بیماری‌زای انسانی بوده که با مهار اکسیداتیو لکوسیت‌ها می‌تواند سیستم ایمنی ذاتی را از کار اندازد، باکتری اسپورزای باسیلوس سرئوس به عنوان یک باکتری بیماری‌زا یا فرصت طلب شناخته شده و از بعضی از عفونت‌های انسانی جدا شده است و استافیلوکوکوس اورئوس که در ایجاد بیماری‌های پوستی و تنفسی نقش دارند اشاره کرد، بیماری‌های اکتسابی بیماران در مراکز درمانی می‌باشد(۱).

از زمان‌های گذشته استفاده از گیاهان دارویی جهت درمان بیماری‌ها رایج می‌باشد. منشأ طبیعی گیاهان دارویی، سازگاری و نزدیکی بیشتر با فیزیولوژی بدن در مقایسه با داروهای شیمیایی و خطرات و عوارض جانبی کمتر منجر به افزایش تمایل مردم به استفاده از گیاهان دارویی شده است(۲). عصاره‌های گیاهی برای درمان طیف گسترده‌ای از بیماری‌ها مانند التهاب، اسهال، بی-خوابی و سرفه مورد استفاده قرار می‌گیرند. گیاهان حاوی متابولیت‌های ثانویه‌ای از جمله ترکیبات فنولی و اسانس‌ها می-باشند که این ترکیبات دارای اثرات ضدمیکروبی، ضدقارچی، حشره کشی، کنه کشی می‌باشند، بنابراین در زمینه‌های مختلف مانند داروسازی، میکروبیولوژی و آسیب شناسی گیاهی مورد مطالعه قرار گرفته اند(۳).

سرخارگل (Purple Coneflower) با نام علمی Echinacea purpurea متعلق به تیره گل ستاره یا میناسانان (Asteracae) می‌باشد. سرخارگل گیاهی چند ساله و علفی بوده که منشأ آن شمال آمریکا می‌باشد. ترکیبات مؤثره موجود در این گیاه دارای خاصیت ضد باکتریایی، ضد قارچی و ضد ویروسی می‌باشد و در تولید داروهای پیشگیری کننده و درمان کننده سرماخوردگی مورد استفاده قرار می‌گیرد. این ترکیبات همچنین در افزایش تولید ایمونوگلوبولین G و تقویت سیستم دفاعی بدن مؤثر می-باشد(۴). علاوه بر این، فرمولاسیون‌های تولیدی از این گیاه سبب افزایش تعداد گلبول‌های سفید خون، افزایش سلول‌های طحال و افزایش توانایی فاگوسیتوز توسط گرانولوسیت‌ها شده و استفاده موضعی آن‌ها در درمان زخم‌های دیر خوب شونده و مزمن مؤثر می‌باشد(۵). عصاره‌های گیاه سرخارگل منجر به تحریک باکتری-های مفید روده و در نتیجه کاهش باکتری‌هایی مانند اشرشیا کلی می‌شود. همچنین پلی‌ساکاریدهای موجود در عصاره در افزایش تولید اسید لاکتیک و در نتیجه افزایش تکثیر باکتری‌های مفید روده و به دنبال آن کاهش باکتری‌های گرم منفی مانند اشرشیا کلی مؤثر می‌باشد(۶).

با توجه به افزایش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در میکروارگانیسم‌ها، استفاده از ترکیبات ضدمیکروبی موجود در گیاهان به عنوان مواد طبیعی با اثر کشندگی و مهارکنندگی مورد توجه قرار گرفته است (۲). از آنجایی که تمام پیکره گیاه سرخارگل (از ریشه تا بخش-های رویشی) ترکیبات ضدمیکروبی ارزشمندی را دارا می‌باشد(۶)، از این رو در این پژوهش عصاره هیدروالکلی گیاه سرخارگل تهیه و میزان فنول، فلاونوئید، خاصیت آنتی اکسیدانی و اثرات ضد میکروبی آن روی تعدادی از باکتری‌های بیماری‌زا مانند اشرشیا کلی، سالمونلا تیفی، استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار

در این پژوهش از باکتری‌های اشرشیا کلی، سالمونلا تیفی، استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس که از کلکسیون میکروبی گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان تهیه شد، استفاده گردید.

پس از جمع آوری، تمیز کردن و خشک کردن گیاه خارسرگل، عصاره هیدروالکلی به روش خیساندن تهیه گردید. گیاه خشک شده با استفاده از آسیاب برقی پودر گردید. مقدار ۲۰۰ گرم از پودر تهیه شده با ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر و الکل اتیلیک ۹۶ درجه به نسبت ۵۰ به ۵۰ مخلوط و به مدت ۲ روز در تاریکی نگهداری شد. ارلن حاوی پودر، آب و الکل در هر روز به مدت ۲۰ دقیقه هم زده شد. سپس محتویات ارلن از کاغذ صافی واتمن عبور داده شد و عصاره‌گیری با استفاده با اواپراتور تحت خلأ انجام شد. به منظور تبخیر هر چه بیشتر الکل و آب پلیت‌های استریل حاوی عصاره در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد(۷).

آزمون‌های دیسک دیفیوژن، چاهک آگار، حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی به منظور تعیین خاصیت ضدمیکروبی عصاره مورد استفاده قرار گرفت. در روش دیسک دیفیوژن، پس از کشت سویه‌های میکروبی بر روی محیط مولر

هینتون آگار، دیسک‌های کاغذی آغشته شده به غلظت‌های عصاره در سطح محیط کشت تثبیت شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، قطر هاله عدم رشد با استفاده از خط کش بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری گردید(۸). در روش چاهک آگار، ۲۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف عصاره به هر یک از چاهک‌ها اضافه شد. سویه‌های میکروبی روی سطح پلیت‌ها کشت داده شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از اتمام زمان گرمخانه‌گذاری همانند روش دیسک دیفیوژن قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد(۹). در تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی، از پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای استفاده شد. ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های تهیه شده از عصاره هیدروالکلی به هر یک از چاهک‌ها اضافه گردید. سپس ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی به چاهک‌ها افزوده شد. همچنین، از محیط کشت حاوی سوسپانسیون میکروبی و فاقد عصاره به عنوان کنترل مثبت و از محیط کشت بدون باکتری حاوی عصاره به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. سپس پلیت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. پس از گذشت این مدت زمان، ۱۰ میکرولیتر از معرف تری فنیل تترازولیوم کلراید ۵ درصد به عنوان شاخص رنگی باکتری به خانه‌های پلیت اضافه و مجدداً به مدت ۱۵ دقیقه گرمخانه گذاری شد. چاهک‌های فاقد رنگ قرمز یا ارغوانی (عدم رشد باکتری) به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی رشد گزارش گردید(۱۰). به منظور تعیین حداقل غلظت کشندگی، ۱۰ میکرولیتر از چاهک‌های فاقد هر گونه تغییر رنگ (روش تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی) در پلیت‌های حاوی محیط مولر هینتون آگار به صورت پورپلیت کشت داده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردید. پلیت‌های فاقد کلنی به عنوان حداقل غلظت کشندگی گزارش شدند(۱۱).

در اندازه‌گیری میزان فنول کل عصاره هیدروالکلی، ۵۰ میکرولیتر از عصاره هیدروالکلی به ۲/۵ میلی‌لیتر معرف فنول فولین-سیوکالتو با رقت ۱/۱۰ و ۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۷/۵ درصد (حجمی/ وزنی) به اضافه شد. مخلوط به مدت ۱۵ دقیقه در مکان تاریکی در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. جذب محلول در طول موج ۷۶۰ نانومتر ثبت گردید و نتایج بر اساس میلی‌گرم گالیک اسید در هر گرم عصاره گزارش شد(۱۲).

به منظور اندازه‌گیری میزان فلاونوئید کل عصاره، ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره با ۳۰۰ میلی‌لیتر نیتریت سدیم (۱:۲۰ حجمی/وزنی) مخلوط و به مدت ۱۰ ثانیه هم زده شد و در دمای اتاق (به مدت ۵ دقیقه) نگهداری شد. در مرحله بعد، آلومینیوم تری کلرید (۳۰۰ میکرولیتر، ۱:۱۰ وزنی/حجمی)، سدیم هیدروکسید (۱ مولار) و آب مقطر (۱/۹ میلی‌لیتر) به مخلوط اضافه شد و به مدت ۱۰ ثانیه هم زده شد. جذب مخلوط در طول موج ۵۱۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید و میزان فلاونوئید کل عصاره بر حسب میلی-گرم کوئرستین در گرم عصاره گزارش شد(۱۳).

از ۲ آزمون مهار رادیکال DPPH و ABTS جهت بررسی میزان فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره هیدروالکلی گیاه سرخارگل استفاده شد. در روش اندازه‌گیری مهار رادیکال DPPH، ۳۷/۵ میکرولیتر از عصاره یا متانول (بعنوان نمونه کنترل) با ۲ میلی‌لیتر محلول متانولی رادیکال DPPH (10^{-4} مولار) مخلوط و به مدت ۲۰ دقیقه در محلی تاریک در دمای اتاق نگهداری شد. سپس جذب نمونه‌ها در۵۱۷ نانومتر ثبت گردید. فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH عصاره هیدروالکی با استفاده از فرمول زیر به دست آمد(۱۴):

$$\text{فعالیت مهارکنندگی DPPH (درصد)} = (1-\frac{\text{جذب نمونه}}{\text{جذب کنترل}}) \times 100$$

در آزمون مهار رادیکال آزاد ABTS، مقادیر یکسانی از پتاسیم پرسولفات (۲/۴۵ میلی‌مولار) و محلول ABTS (۷ میلی‌مولار) با یکدیگر مخلوط گردید. محلول جهت تولید رادیکال کاتیونی ABTS به مدت ۱۶ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. سپس به رادیکال کاتیونی ABTS تا رسیدن به جذب ۰/۷±۰/۲ در طول موج ۷۳۴ نانومتر متانول اضافه گردید. در مرحله بعد، مقدار ۳/۹ میلی‌لیتر رادیکال ABTS با ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره (جذب نمونه) یا متانول (جذب کنترل) مخلوط و به مدت ۶ دقیقه در دمای اتاق نگهداری و جذب آن در ۷۳۴ نانومتر ثبت گردید. میزان فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS بر اساس فرمول زیر محاسبه شد(۱۵):

$$\text{فعالیت مهارکنندگی رادیکال ABTS (درصد)} = (1-\frac{\text{جذب نمونه}}{\text{جذب کنترل}}) \times 100$$

غلظت‌های مختلف عصاره یا استاندارد جهت ترسیم منحنی‌های کالیبراسیون و تعیین EC_{50} (غلظت در محور x و درصد مهار در آزمون‌های DPPH* و ABTS* در محور y) استفاده شد

غلظت مؤثر (EC_{50}) به عنوان غلظتی تعریف می شود که حداکثر ۵۰ درصد پاسخ را می دهد(۱۶).

از آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون دانکن به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد. تمامی آزمون‌ها در ۳ تکرار انجام شدند و نتایج به صورت "انحراف معیار ± میانگین" گزارش گردید.

یافته‌ها

غلظت‌های ۳۰ و ۶۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره روی دو باکتری اشرشیا کلی و سالمونلا تیفی هیچگونه اثر ضد میکروبی نداشت. غلظت‌های ۹۰ و ۱۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دارای اختلاف معنی-داری در این باکتری‌ها بود. در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس قطر هاله عدم رشد در غلظت‌های ۳۰ و ۶۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح آماری ۵ درصد بود ولی با غلظت-های ۹۰ و ۱۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با یکدیگر اختلاف معنی-داری داشتند. در باکتری باسیلوس سرئوس در غلظت ۳۰ میلی-گرم در میلی‌لیتر هیچگونه هاله عدم رشد مشاهده نشد، اما غلظت‌های ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر دارای اختلاف معنی‌داری در سطح آماری ۵ درصد با یکدیگر بودند. به طور کلی با افزایش غلظت عصاره، قطر هاله‌های عدم رشد به طور معنی-داری افزایش یافت(جدول ۱).

جدول ۱- میانگین قطر هاله عدم رشد میکروبی (دیسک دیفیوژن) عصاره هیدروالکلی سرخارگل بر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا برحسب میلی‌متر

باکتری	غلظت عصاره هیدروالکلی سرخارگل (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)			
	۳۰	۶۰	۹۰	۱۲۰
اشرشیا کلی	-	-	۸/۲۰±۰/۴۶^{a}	۱۱/۶۰±۰/۳۸^{b}
سالمونلا تیفی	-	-	۸/۰۰±۰/۳۶^{a}	۱۰/۱۰±۰/۵۰^{b}
استافیلوکوکوس اورئوس	۷/۵۰±۰/۴۱^{a}	۸/۴۰±۰/۶۶^{a}	۱۱/۲۰±۰/۳۰^{b}	۱۳/۹۰±۰/۴۹^{c}
باسیلوس سرئوس	-	۷/۲۰±۰/۵۰^{a}	۹/۸۰±۰/۲۷^{b}	۱۲/۵۰±۰/۳۵^{c}

- **نتایج به‌صورت "انحراف معیار ± میانگین" سه تکرار (n=3) گزارش شده اند و از آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون Duncan برای تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شده است.**
- **حروف غیر مشابه در یک ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح معنی‌داری ۵ درصد میان غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی سرخارگل است.**
- **(-) نشان دهنده عدم وجود فعالیت ضدمیکروبی عصاره هیدروالکلی سرخارگل است.**

در غلظت ۳۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در دو باکتری اشرشیا کلی و سالمونلا تیفی هیچگونه هاله عدم رشد مشاهده نشد. در باکتری اشرشیا کلی قطر هاله عدم رشد در غلظت‌های ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اختلاف معنی‌داری در سطح آماری ۵ درصد با یکدیگر داشتند. در باکتری سالمونلا تیفی قطر هاله عدم رشد در غلظت‌های ۶۰ و ۹۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح آماری ۵ درصد بودند، ولی با غلظت ۱۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اختلاف معنی‌داری داشتند. قطر هاله عدم رشد در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در تمامی غلظت‌ها دارای اختلاف معنی‌داری در سطح آماری ۵ درصد بود. در باکتری باسیلوس سرئوس غلظت‌های ۶۰ و ۹۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر فاقد اختلاف معنی‌داری بودند، در حالی که، با غلظت‌های ۳۰و ۱۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و این غلظت‌ها با یکدیگر دارای اختلاف معنی‌داری در سطح آماری ۵ درصد با یکدیگر بودند. در این آزمون نیز، با افزایش غلظت قطر هاله‌های عدم رشد افزایش یافت(جدول ۲).

جدول ۲- میانگین قطر هاله عدم رشد میکروبی (چاهک آگار) عصاره هیدروالکلی سرخارگل بر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا برحسب میلی‌متر

باکتری	غلظت عصاره هیدروالکلی سرخارگل (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)			
	۳۰	۶۰	۹۰	۱۲۰
اشرشیا کلی	-	۷/۱۰±۰/۲۰^{a}	۸/۹۰±۰/۲۵^{b}	۱۲/۱۰±۰/۴۰^{c}
سالمونلا تیفی	-	۷/۰۰±۰/۵۵^{a}	۸/۲۰±۰/۶۸^{a}	۱۰/۶۰±۰/۳۷^{b}
استافیلوکوکوس اورئوس	۸/۲۰±۰/۳۰^{a}	۹/۹۰±۰/۲۱^{b}	۱۲/۱۰±۰/۴۴^{c}	۱۵/۰۰±۰/۶۳^{d}
باسیلوس سرئوس	۷/۵۰±۰/۳۸^{a}	۹/۶۰±۰/۲۹^{b}	۱۰/۱۰±۰/۶۴^{b}	۱۳/۰۰±۰/۵۳^{c}

- **نتایج به‌صورت "انحراف معیار ± میانگین" سه تکرار (n=3) گزارش شده اند و از آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون Duncan برای تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شده است.**
- **حروف غیر مشابه در یک ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح معنی‌داری ۵ درصد میان غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی سرخارگل است.**
- **(-) نشان دهنده عدم وجود فعالیت ضدمیکروبی عصاره هیدروالکلی سرخارگل است.**

کمترین غلظت لازم جهت مهار (جدول ۳) باکتری استافیلوکوکوس اورئوس برابر با ۱۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، برای باکتری باسیلوس سرئوس برابر با ۳۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و برای باکتری‌های اشرشیا کلی و سالمونلا تیفی برابر با ۶۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. کمترین غلظت کشندگی (جدول ۳) در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس (۱۲۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و بیشترین غلظت کشندگی در باکتری سالمونلا تیفی (بزرگتر از ۵۱۲ میلی-گرم بر میلی‌لیتر) مشاهده شد.

جدول ۳- حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره هیدروالکلی سرخارگل

باکتری	حداقل غلظت مهارکنندگی (mg/ml)	حداقل غلظت کشندگی (mg/ml)
اشرشیا کلی	۶۴	۵۱۲
سالمونلا تیفی	۶۴	بزرگتر از ۵۱۲
استافیلوکوکوس اورئوس	۱۶	۱۲۸
باسیلوس سرئوس	۳۲	۲۵۶

میزان فنول کل برابر۰/۷۳ ± ۶۵/۶۴ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره و میزان فلاونوئید کل برابر با ۰/۵۳ ± ۲۷/۱۹ میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره بود. مقدار خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره بر حسب EC_{50} به روش مهار رادیکال DPPHبرابر با ۰/۲۹±

۵۴/۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و بر اساس روش ABTS برابر با ۰/۶۸ ± ۴۶/۶۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بود.

بحث

نشان داده شده است که بسیاری از ترکیبات طبیعی موجود در گیاهان، ادویه‌جات و گیاهان معطر دارای عملکرد ضد میکروبی بوده و می‌توانند به عنوان منبع یک عامل ضد میکروبی در برابر باکتری‌های گرم مثبت و منفی عمل کنند(۱۷). همچنین به دلیل طبیعی بودن این ترکیبات، اثرات زیان‌آور و منفی آن‌ها بر محیط زیست و سلامتی انسان بسیار کمتر از آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد. عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی در گیاهان، ادویه‌ها و گیاهان معطر مسئول فعالیت ضدمیکروبی می‌باشند و مانند یک سیستم دفاعی در برابر حمله میکروبی عمل می‌کنند(۱۸). در این پژوهش عصاره هیدروالکلی گیاه سرخارگل اثر ضدمیکروبی بیشتری بر روی باکتری‌های گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس نسبت به باکتری های گرم منفی اشرشیا کلی و سالمونلا نشان داد. این امر می‌تواند به دلیل تفاوت در ساختار دیواره سلولی‌ها آن‌ها باشد. دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت دارای ترکیب موکوپپتیدی می‌باشد، اما در دیواره باکتری‌های گرم منفی علاوه بر لایه نازکی از موکوپپتید، بخش اعظمی از لیپوپروتئین‌ها و لیپوپلی‌ساکاریدها وجود دارد که باعث مقاومت آن‌ها می‌شود(۱۹). همچنین باکتری‌های گرم منفی دارای غشای دو لایه می‌باشند به گونه‌ای که لایه پپتیدوگلیکان این باکتری‌ها در فضای پری پلاسمی که فضای بین غشای داخلی و خارجی می‌باشد، قرار دارد. آنزیم‌هایی مانند پروتئازها، پنی‌سیلینازها، فسفاتازها و فسفریله کننده آمینوگلیکوزید ترکیبات و مولکول‌های ورودی به فضای پری پلاست را تجزیه می‌کنند. این در حالی است که، در باکتری‌های گرم مثبت به دلیل عدم وجود چنین فضایی، ترکیبات ضد میکروبی می‌توانند به آسانی به دیواره سلولی و غشای سیتوپلاسمی نفوذ کرده و باعث مرگ سلولی شوند(۲۰). از سوی دیگر، تأثیر بیشتر عصاره بر روی باکتری‌ها در روش چاهک آگار در مقایسه با دیسک دیفیوژن به دلیل تماس مستقیم عصاره با میکروارگانیسم‌ها در روش چاهک آگار می‌باشد، در حالی که در روش دیسک دیفیوژن به دلیل عبور از دیسک به صورت غیر مستقیم اثر بخشی آن کمتر می‌شود(۲۱). در مطالعات مختلف فعالیت ضدمیکروبی عصاره و اسانس گیاه سرخارگل گزارش شده است(۲۶-۲۲). ایزدی و همکاران (۱۳۹۳)، ترکیبات شیمیایی و اثرات ضدمیکروبی اسانس این گیاه را بر تعدادی از میکروارگانیسم بیماری‌زا بررسی و بیان کردند که با وجود مقاومت متفاوت میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه باکتری‌های گرم منفی مقاومت بیشتری داشته و سالمونلا تیفی موریوم مقاومترین باکتری شناخته شد(۲). بررسی اثر ضدمیکروبی اسانس و عصاره-های تهیه شده از بخش‌های مختلف گیاه سرخارگل بر روی باکتری پکتوباکتریوم کاروتووروم زیرگونه کاروتووروم با استفاده از روش‌های دیسک دیفیوژن و حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی نشان داد که مواد گیاهی به دست آمده از سرخارگل در آینده کارایی قابل توجهی در مهار زیستی این باکتری خواهد داشت(۶).

از محتوای فنولی می‌توان به عنوان یک شاخص مهم برای ارزیابی ظرفیت آنتی اکسیدانی استفاده کرد، زیرا ترکیبات فنولی به عنوان متابولیت‌های ثانویه به طور گسترده‌ای در گیاهان تولید می‌شوند و بیشتر آنتی اکسیدان‌های گیاهی حاوی مقادیر زیادی پلی فنول هستند(۲۵). از این رو خاصیت آنتی اکسیدانی بالای

عصاره را می‌توان با مقادیر بالای ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی آن نسبت داد. در تعیین بهترین روش استخراج ترکیبات فنولی گیاه سرخارگل ضمن تأکید بر مؤثر بودن نوع حلال و روش استخراج در مقدار این ترکیبات، این گیاه را سرشار از ترکیبات فنولی معرفی کردند و گزارش کردند که استفاده از حلال‌های ترکیبی کارایی بیشتری در استخراج مواد فنولی دارند و استفاده از آب منجر به افزایش میزان استخراج می‌شود(۵). میزان فنول، فلاونوئید و فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH (بر حسب EC_{50}) برای عصاره اتانولی گیاه سرخارگل را ۶۰/۲ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره، ۳۲/۳ میلی‌گرم روتئین در گرم عصاره و ۶۵/۴۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره گزارش شده است(۲۴).

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که عصاره هیدروالکی گیاه سرخارگل دارای خاصیت ضدمیکروبی بالایی در برابر باکتری‌های اشرشیا کلی، سالمونلا تیفی، استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس بوده و در این میان باکتری‌های گرم مثبت حساسیت بیشتری نشان دادند. همچنین مشخص گردید عصاره این گیاه درای مقادیر قابل توجهی ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و فعالیت آنتی اکسیدانی می‌باشد. وجود ترکیبات زیست فعال در این گیاه، می-تواند آن را به یک مهارکننده طبیعی تبدیل کند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان جهت حمایت مالی طرح پژوهشی شماره ۹۹۱/۲۷ که این مقاله مستخرج از آن می‌باشد تشکر و قدردانی می‌نمایند.

REFERENCE

1. Saeedi M, Yeganegi M, Alizadeh Behbahani B, Vasiee, A R, Tabatabaei Yazdi F. Antimicrobial effects of Leek (Allium ampeloprasum L. subsp. iranicum) extract on some food-borne pathogens in vitro. Food Science and Technology. 2017; 14(7):73-82. [Full Text in Persian]
2. Izadi Z, Sorooshzadeh A, Modarres Sanavi S A M, Esna-Ashari M, Davoodi P. Investigation on antimicrobial effects of essential oil of purple coneflower (Echinacea purpurea L.) and identification of its chemical compounds. Iranian South Medical Journal. 2014; 17 (1):58-69. [Full Text in Persian]
3. Çoban EP, Biyik H, Törün B, Yaman F. Evaluation the antimicrobial effects of Pistacia terebinthus L. and Papaver rhoeas L. extracts against some pathogen microorganisms. Indian J Pharm Education Research. 2017; 51(3):377-80.
4. Omidbaigi R. Study of Cultivation and Adaptability of Purple Coneflower (*Echinaceae purpurea*) in the North of Tehran. Journal of Water and Soil Science. 2002; 6 (2):231-241. [Full Text in Persian]
5. Hajimehdipoor H, Khanavi M, Shekarchi M, Abedi Z, Pirali Hamedani M. Investigation of the Best Method for Extraction of Phenolic Compounds from Echinaceae purpurea L. (Moench). Journal of Medicinal Plants. 2009; 8 (32); 145-152. [Full Text in Persian]
6. Andargani S, Jamshidi S, Oraei M. Antibacterial effect of flower essential oils and plant organs' extracts of purple coneflower on the bacterium Pectobacterium carotovora pv. Carotovora in laboratory condition. Research in Plant Pathology. 2014; 2(4):25-35. [Full Text in Persian]
7. Sharifi A, Naghmachi M, Bahrami S. Antimicrobial Activities of Dorema Auchri. Armaghane danesh. 2011; 15(4):378-387. [Full Text in Persian]
8. Alizadeh Behbahani B, Tabatabaei Yazdi F, Heidari Sureshjani M, Mortazavi A, Tabatabaei Yazdi F. Antimicrobial Effect of the Aqueous and Ethanolic Satureja bachtiarica Extracts " in vitro". Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2014: 19(64):13-20. [Full Text in Persian]
9. Barzegar H, Mehrnia M A, Alizadeh Behbahani B. Determination of the chemical composition, antioxidant activity and the antimicrobial effect of *Heracleum Lasiopetalum* on infection and food poisoning microorganisms. Journal of Applied Microbiology in food industry. 2019; 4(4):15-28. [Full Text in Persian]
10. Sosani Gharibvand Z, Alizadeh Behbahani B, Noshad M, Jooyandeh H. Investigation of the Functional Groups of Bioactive Compounds, Radical Scavenging Potential, Antimicrobial Activity and Cytotoxic Effect of Callistemon Citrinus Aqueous Extract on Cell Line HT29: A Laboratory Study. Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences. 2020; 19(5):463-484. [Full Text in Persian]
11. Shahidi F, Tabatabaei Yazdi F, Alizadeh Behbahani B, Roshanak S, Norouzi N, Vasiee A. Aantibacterial Effect of Tragopogon graminifolius Extract on Staphylococcus epidermidis, Bacillus subtilis, Escherichia coli and Salmonella typhi "in vitro". Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2019; 24(84):1-10.

12. Noshad M., Alizadeh Behbahani B., Dehghani S. Evaluation of the effect of aqueous and ethanolic extraction methods on extraction yield, phenolic compounds, and antioxidant and antimicrobial activity of Stachys schtschegleevii extract. Food Science and Technology. 2020; 17(3):117-125.

13. Noshad M, Alizadeh Behbahani B, Jooyandeh H, Rahmati-Joneidabad M, Hemmati Kaykha ME, Ghodsi Sheikhjan M. Utilization of Plantago major seed mucilage containing Citrus limon essential oil as an edible coating to improve shelf-life of buffalo meat under refrigeration conditions. Food Science & Nutrition. 2021; 9(3):1625-39.
14. Alizadeh Behbahani B., Falah F., Lavi Arab F., Vasiee M., Tabatabaee Yazdi F. Chemical composition and antioxidant, antimicrobial, and antiproliferative activities of Cinnamomum zeylanicum bark essential oil. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2020; 2020.
15. Barzegar H, Behbahani BA, Mehrnia MA. Quality retention and shelf life extension of fresh beef using Lepidium sativum seed mucilage-based edible coating containing Heracleum lasiopetalum essential oil: an experimental and modeling study. Food Science and Biotechnology. 2020; 29(5):717-28.
16. Sridhar K, Charles AL. In vitro antioxidant activity of Kyoho grape extracts in DPPH and ABTS assays: Estimation methods for EC_{50} using advanced statistical programs. Food Chemistry. 2019; 275:41-9.
17. Kotzekidou P, Giannakidis P, Boulamatsis A. Antimicrobial activity of some plant extracts and essential oils against foodborne pathogens in vitro and on the fate of inoculated pathogens in chocolate. LWT-Food Science and Technology. 2008; 41(1):119-27.
18. Noshad M, Alizadeh behbahani B, Jooyandeh H, Rahmati-Joneidabad M, Ebrahimi Hemmati Kaykha M, Ghodsi Sheikhjan M. In vitro investigation of the antimicrobial activity of Dezfuli orange peel essential oil with and without common antibiotics on some pathogenic bacteria. Iranian Journal of Food Science and Technology. 2021; 18(111):159-167. [Full Text in Persian]
19. Heydari S, Jooyandeh H, Alizadeh behbahani B, Noshad M. In vitro Determination of Chemical Compounds and Antibacterial Activity of Lavandula Essential oil against some Pathogenic Microorganisms. Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2019; 27(4):77-89. [Full Text in Persian]
20. Tabatabaei yazdi F, Falah F, Alizadeh behbahani B, Vasiee A, Mortazavi A. Antimicrobial effect of Citrus aurantium essential oil on some food-borne pathogens and its determination of chemical compounds, total phenol content, total flavonoids content and antioxidant potential. Food Science and Technology. 2019; 16(2):275-288. [Full Text in Persian]
21. Behbahani BA, Yazdi FT, Shahidi F, Mortazavi SA, Mohebbi M. Principle component analysis (PCA) for investigation of relationship between population dynamics of microbial pathogenesis, chemical and sensory characteristics in beef slices containing Tarragon essential oil. Microbial pathogenesis. 2017; 105:37-50.
22. Jamshidi M, Barzegar M, Sahari MA. Effect of gamma and microwave irradiation on antioxidant and antimicrobial activities of Cinnamomum zeylanicum and Echinacea purpurea. International Food Research Journal. 2014; 21(4).
23. Noorolahi Z, Sahari MA, Barzegar M, Doraki N, Naghdi Badi H. Evaluation antioxidant and antimicrobial effects of cinnamon essential oil and echinacea extract in Kolompe. Journal of Medicinal Plants. 2013 Mar 10;1(45):14-28.

24. Stanisavljević I, Stojičević S, Veličković D, Veljković V, Lazić M. Antioxidant and antimicrobial activities of Echinacea (Echinacea purpurea L.) extracts obtained by classical and ultrasound extraction. Chinese Journal of Chemical Engineering. 2009;17(3):478-83.
25. Sabouri Z, Barzegar M, Sahari MA, Naghdi Badi H. Antioxidant and antimicrobial potential of Echinacea purpurea extract and its effect on extension of cake shelf life. Journal of Medicinal Plants. 2012; 11(43):28-40.
26. Sharifi-Rad M, Mnayer D, Morais-Braga MF, Carneiro JN, Bezerra CF, Coutinho HD, Salehi B, Martorell M, del Mar Contreras M, Soltani-Nejad A, Uribe YA. Echinacea plants as antioxidant and antibacterial agents: From traditional medicine to biotechnological applications. Phytotherapy Research. 2018; 32(9):1653-63.