ویژگی‌های شیمیایی و فعالیت ضدمیکروبی عصاره اتانولی کاه‌مکی بر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا: یک مطالعه آزمایشگاهی

محمد نوشاد*[1]، بهروز علیزاده بهبهانی[1]

۱. استادیار، 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: **تیر چهارصد** پذیرش برای چاپ: **مهر چهارصد**

چکیده

سابقه و هدف: *ترکیبات موجود در گیاهان دارای خواص ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی می‌باشند. بنابراین می‌توانند جایگزین مناسبی برای داروهای شیمیایی باشند. گیاه کاه‌مکی به عنوان یک ماده ضدعفونی کننده و درمان کننده معده درد استفاده می‌شود. در این پژوهش، میزان فنول کل، فلاونوئید کل، خاصیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت ضدمیکروبی عصاره اتانولی گیاه کاه‌مکی بر تعدادی از میکروارگانیسم‌ها بررسی گردید.*

روش کار: *پس از تهیه عصاره اتانولی گیاه، میزان فنول و فلاونوئید کل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی به دو روش مهار رادیکال DPPH و ABTS اندازه‌گیری شد. همچنین، از روش‌های دیسک دیفیوژن، چاهک آگار، حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی جهت بررسی فعالیت ضدمیکروبی عصاره اتانولی بر باکتری‌های انتروباکتر ائروژنز، استافیلوکوکوس اورئوس و قارچ‌های کاندیدا آلبیکنس و پنی‌سیلیوم ایتالیکوم استفاده شد.*

یافته‌ها: *در روش دیسک دیفیوژن کمترین قطر هاله عدم رشد در انتروباکتر ائروژنز و بیشتر مقدار آن در استافیلوکوکوس اورئوس و کاندیدا آلبیکنس مشاهده شد. کمترین قطر هاله عدم در روش چاهک آگار مربوط به انتروباکتر ائروژنز و بیشترین مقدار مربوط به کاندیدا آلبیکنس بود. کمترین غلظت کشندگی و مهارکنندگی در کاندیدا آلبیکنس و بیشترین غلظت در انتروباکتر ائروژنز مشاهده گردید.*

نتیجه‌گیری: *مشخص گردید که عصاره اتانولی گیاه کاه‌مکی علاوه بر دارا بودن مقادیر قابل‌توجهی از ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی، دارای اثرات ضدمیکروبی مناسبی در برابر انواع میکروارگانیسم‌ها (باکتری گرم مثبت، گرم منفی، کپک و مخمر) می‌باشد. بنابراین، می‌توان از این گیاه به عنوان یک ترکیب ضد میکروبی قوی در مهار انواع میکروارگانیسم‌ها و جایگزینی جهت داروهای شیمیایی استفاده کرد.*

واژگان کلیدی: **گیاه کاه‌مکی، عصاره اتانولی، خاصیت ضد میکروبی، ترکیبات فنولی**

مقدمه

انتروباکتر ائروژنز بعنوان باکتری گرم منفی و بیماریزای فرصت‌طلب شناخته می‌شود که سبب ایجاد عفونت‌های مجاری ادراری در بیماران ناتوان و پنومونی و عفونت زخم در بیماران بستری می‌گردد. علاوه بر این، این باکتری نسبت به تعداد زیادی از داروها مقاومت نشان می‌دهد(۱). استافیلوکوکوس اورئوس بیماری‌های مختلفی در انسان و حیوانات ایجاد می‌کند. این باکتری در فلور طبیعی پوست یافت شده و بیماری‌های از قبیل پنومونی و سپتی سمی ایجاد می‌کند. انتروتوکسینهای تولیدی توسط این باکتری قادر به ایجاد مسمومیت و مرگ و میر در انسان می‌باشند(۲). کاندیدیازیس دهانی بعنوان شایع‌ترین عفونت فرصت‌طلب مخاط دهان شناخته می‌شود که رشد بیش از حد قارچ کاندیدا، بویژه گونه کاندیدا آلبیکنس در حفره دهانی سبب این بیماری می‌گردد(۳). پنی‌سیلیوم ایتالیکوم قادر به تولید مایکوتوکسین دئوکسی بروینامید E در میوه‌جات و سبزیجات می‌باشد. مایکوتوکسین‌ها بعنوان ترکیباتی سمی شناخته می‌شوند که در غلظت پایین قادر به ایجاد سمیت می‌باشند(۴).

اگرچه صنایع دارویی در سه دهه گذشته تعدادی آنتی‌بیوتیک جدید تولید کرده است، اما استفاده بیش از حد از آن‌ها منجر به ایجاد

مشکلاتی مانند افزایش خطر عوارض جانبی، افزایش هزینه‌ها و افزایش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها شده است. این عوامل چشم‌انداز استفاده از داروهای ضدمیکروبی را در آینده نامشخص کرده است. از این رو اقداماتی جهت کاهش این مشکلات صورت گرفته است. گسترش مطالعات گوناگون در زمینه درک بهتر مکانیسم ژنتیکی مقاومت و تلاش جهت تولید داروهای جدید از جمله این اقدامات می‌باشد (۵ و ۶). از زمان‌های گذشته گیاهان در درمان بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گرفتند و در سال‌های اخیر تولید داروهای گیاهی مختلف افزایش یافته است. تحقیقات نشان داده است که ترکیبات گرفته شده از گیاهان، دارای فعالیت‌های بیولوژیکی از جمله فعالیت ضد میکروبی می‌باشند(۷). امروزه اسانس‌ها و عصاره-های گیاهان به عنوان منبعی از محصولات طبیعی مورد توجه قرار گرفته‌اند و به عنوان داروهای جایگزین برای درمان بسیاری از بیماری‌های عفونی استفاده می‌شوند (۸). ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی موجود در اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی از جمله ترکیبات فیتوشیمیایی هستند که در بخش‌های مختلف گیاهان یافت می‌شوند و فعالیت بیولوژیکی متنوعی مانند فعالیت‌های ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و گشادکنندگی عروق آن‌ها گزارش شده است(۹).

گیاه علفی کاه‌مکی (نام علمی آن Cymbopogon olivieri (Boiss.) Bor) متعلق به خانواده Gramineae از غلات اسانس-دار می‌باشد. در حدود ۶۰ گونه از این گیاه در مناطق حاره و تحت حاره آفریقا و آسیا شناسایی شده است. همچنین این گیاه در آمریکای مرکزی و جنوبی، جزایر هند شرقی و غربی جهت تقطیر برگ‌ها و تهیه اسانس کشت داده می‌شود. ۲ گونه این جنس در ایران در مناطق جنوبی استان فارس، استان‌های بوشهر، هرمزگان، کرمان، بلوچستان و خوزستان می‌رویند(۱۰). گیاه کاه‌مکی به عنوان یک گیاه معطر در طب سنتی به عنوان یک ماده ضدعفونی کننده و همچنین به عنوان درمانی برای معده درد، بیماری‌های عصبی، برافروختگی، استفراغ و روماتیسم استفاده می‌شود(۱۱). همچنین اسانس این گیاه بر روی قارچ‌های پنی‌سیلیوم و میکروسپوریوم و ناقل بیماری مالاریا اثرات بازدارندگی قابل ملاحظه‌ای دارد(۱۲).

با توجه به خواص گیاه کاه‌مکی، هدف از این پژوهش تهیه عصاره اتانولی این گیاه و تعیین فنول، فلاونوئید، خاصیت آنتی‌اکسیدانی و اثرات ضد میکروبی آن روی تعدادی از میکروارگانیسم‌ها از جمله انتروباکتر ائروژنز، استافیلوکوکوس اورئوس، کاندیدا آلبیکنس و پنی‌سیلیوم ایتالیکوم می‌باشد.

روش کار

سویه‌های مورد استفاده در این پژوهش شامل باکتری‌های انتروباکتر ائروژنز (گرم منفی) و استافیلوکوکوس اورئوس (گرم مثبت) و قارچ-های کاندیدا آلبیکنس (مخمر) و پنی‌سیلیوم ایتالیکوم (کپک) بود که از کلکسیون میکروبی گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان تهیه شد.

دیسک‌های بلانک، محیط کشت مولر هینتون آگار، پوتیتو دکستروز آگار و اتانول ۹۶ درجه از شرکت مرک (آلمان)، رادیکال DPPH، پتاسیم پرسولفات، محلول ABTS، نیتریت سدیم، آلومینیوم تری کلرید، سدیم هیدروکسید و تری فنیل تترازولیوم کلراید از شرکت سیگما (آمریکا) خریداری شد.

پس از جمع‌آوری و پودر کردن برگ‌های گیاه کاه‌مکی، ۱۰۰ گرم از پودر تهیه شده به ارلن حاوی ۵۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درجه اضافه گردید. مخلوط به آرومی به مدت ۷۲ ساعت در دمای اتاق توسط دستگاه هم زن مغناطیسی تا استخراج عصاره به طور کامل همزده شد. سپس جهت به دست آمدن عصاره اولیه، محتویات ارلن از کاغذ صافی عبور داده شد. پس از جمع‌آوری مایع رویی، به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. پس از عبور مجدد از کاغذ صافی ۰/۴۵ میکرومتر، وارد دستگاه تقطیر تحت خلأ شد و حلال آن به مدت یک ساعت در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد تبخیر گردید. عصاره تغلیظ شده در ظروف تیره استریل در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا زمان مصرف نگهداری شد(۱۳).

خاصیت ضدمیکروبی عصاره با استفاده از آزمون‌های دیسک دیفیوژن، چاهک آگار، حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی بررسی گردید. عصاره اتانولی کاه‌مکی با استفاده از محیط‌های کشت مولر هینتون براث برای باکتری‌ها و پوتیتو دکستروز براث برای قارچ‌ها رقیق گردید. رقت‌های ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر برای آزمون‌های دیسک دیفیوژن و چاهک آگار مورد استفاده قرار گرفت. همچنین از رقت‌های ۵۱۲، ۲۵۶، ۱۲۸، ۶۴، ۳۲، ۱۶، ۸، ۴، ۲ و ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در آزمون‌های حداقل غلظت کشندگی و حداقل غلظت مهارکنندگی استفاده شد. در روش دیسک دیفیوژن، پس از بسته شدن محیط کشت مولر هینتون آگار برای باکتری‌ها و پوتیتو دکستروز آگار در پلیت‌های استریل، ۱۰۰ میکرولیتر از هر یک میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه (معادل نیم مک فارلند)، دیسک‌های کاغذی بلانک آغشته شده به غلظت‌های عصاره روی سطح محیط کشت قرار داده شد و با اندکی فشار تثبیت شدند. سپس پلیت‌ها جهت عمل پیش انتشار به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری شدند. در مرحله بعد، پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی-گراد برای باکتری‌ها و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد برای قارچ‌ها در گرمخانه قرار داده شدند. سپس قطر هاله عدم رشد با استفاده از خط کش بر حسب میلی‌متر به طور دقیق اندازه‌گیری و گزارش گردید(۱۴).

در آزمون ضدمیکروبی چاهک آگار، سویه‌های میکروبی روی سطح پلیت‌های حاوی محیط‌های کشت مولر هینتون آگار (برای باکتری-ها) و پوتیتو دکستروز آگار (برای قارچ‌ها) کشت داده شد. سپس درون چاهک‌های ایجاد شده با قطر ۶ میلی‌لیتر در هر یک از محیط‌های کشت، ۶۰ میکرولیتر از رقت‌های تهیه شده ریخته شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد (برای باکتری‌ها) و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد (برای قارچ‌ها) در گرمخانه نگهداری شدند. در پایان، قطر هاله‌های عدم رشد بر حسب میلی‌متر توسط خط کش اندازه‌گیری گردید(۱۵).

جهت انجام آزمون حداقل غلظت مهارکنندگی، در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای استریل، ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های تهیه شده از عصاره و ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی (معادل نیم مک فارلند) به هر خانه اضافه شد. علاوه بر این، از محیط کشت حاوی سوسپانسیون میکروبی و فاقد عصاره به عنوان کنترل مثبت و از محیط کشت تلقیح نشده حاوی عصاره و فاقد سوسپانسیون میکروبی به عنوان کنترل منفی استفاده شد. سپس میکروپلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد (برای باکتری‌ها) و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد (برای قارچ‌ها) گرمخانه گذاری شدند.. پس از این مرحله، تغییر رنگ هر یک از چاهک‌ها (به رنگ ارغوانی یا قرمز) پس از افزودن معرف تری فنیل تترازولیوم کلراید (غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و گرمخانه‌گذاری مجدداً به مدت ۳۰ دقیقه گرمخانه گذاری بررسی و اولین چاهک فاقد رنگ قرمز یا ارغوانی (عدم رشد باکتری) به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی رشد گزارش گردید(۱۶).

در روش تعیین حداقل غلظت کشندگی، از خانه‌های فاقد هر گونه تغییر رنگ ارغوانی یا قرمز (نتایج حاصل از آزمون حداقل غلظت مهارکنندگی)، ۱۰۰ میکرولیتر روی پلیت‌های حاوی محیط مولر هینتون آگار (برای باکتری‌ها) و پوتیتو دکستروز آگار (برای قارچ‌ها) کشت داده شد. پلیت‌ها همانند آزمون‌های قبلی گرمخانه‌گذاری شدند. اولین پلیتی که در آن هیچگونه کلنی مشاهده نگردید به عنوان حداقل غلظت کشندگی عصاره اتانولی کاه‌مکی گزارش شد(۱۷).

جهت اندازه‌گیری میزان فنول کل از روش فولین سیوکالچو استفاده شد. بدین ترتیب که، ۱ میلی‌لیتر عصاره (۰/۱ درصد) با ۲/۵ میلی‌لیتر معرف فنول مخلوط و پس از ۵ دقیقه ۲/۵ میلی‌لیتر کربنات سدیم (۷ درصد) به آن اضافه گردید. پس مخلوط مدت ۱ ساعت در دمای اتاق قرار داده شد. در پایان، جذب نمونه در طول‌موج ۷۲۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر ثبت شد. میزان فنول کل عصاره اتانولی نتایج بر حسب میلی‌گرم گالیک اسید در هر گرم عصاره گزارش گردید(۱۸).

جهت اندازه‌گیری فلاونوئید کل عصاره، ۵۰۰ میکرولیتر عصاره یا کوئرستین به همراه ۳۰۰ میکرولیتر نیتریت سدیم (۵ درصد) مخلوط گردید. محلول به مدت ۶ دقیقه هم زده شد. در ادامه، ۳۰۰ میکرولیتر آلومینیوم نیترات (۱۰ درصد) به آن اضافه گردید. مجدداً محلول به مدت ۶ دقیقه هم زده شد. سپس ۲ میلی‌لیتر سود (۲ مولار) به محلول اضافه گردید و جذب آن در طول‌موج ۵۱۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. میزان فلاونوئید کل عصاره بر حسب میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره با استفاده از منحنی استاندارد کوئرستین گزارش گردید(۱۹).

آزمون‌های مهار رادیکال DPPH و مهار رادیکال ABTS به منظور اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره استفاده گردید. در آزمون مهار رادیکال DPPH، ۱ میلی‌لیتر عصاره با ۲ میلی‌لیتر محلول رادیکال DPPH (۰/۰۰۴ درصد) به طور کامل مخلوط و برای مدت زمان ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. جذب نمونه در طول‌موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری گردید. درصد فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH عصاره مطابق با فرمول زیر محاسبه گردید:

فعالیت مهارکنندگی DPPH (درصد) = ۱۰۰ - {(جذب کنترل – جذب نمونه) / (جذب کنترل) ×۱۰۰}

از ۲ میلی‌لیتر متانول و ۱ میلی‌لیتر عصاره به عنوان نمونه شاهد و ۲ میلی‌لیتر محلول و ۱ میلی‌لیتر متانول به عنوان نمونه کنترل استفاده گردید(۲۰).

در اندازه‌گیری فعالیت مهارکنندگی رادیکال ABTS، در ابتدا محلول رادیکال کاتیون ABTS از طریق مخلوط کردن مقادیر یکسانی از پتاسیم پرسولفات (۲/۴۵ میلی‌مولار) و محلول ABTS (۰/۷ میلی‌مولار) با یکدیگر و قرار دادن آن به مدت ۱۶ ساعت در دمای اتاق تهیه شد. پس از آن محلول رادیکال کاتیونی ABTS تا رسیدن به جذب ۰/۷ در ۷۳۴ نانومتر توسط متانول رقیق گردید. بعد از این مرحله، محلول رقیق شده رادیکال کاتیونی ABTS (۳/۹ میلی‌لیتر) با ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره اتانولی یا متانول (نمونه کنترل) مخلوط شد. نمونه‌ها مجدداً به مدت ۶ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شدند. سپس جذب آن‌ها در ۷۳۴ نانومتر اندازه‌گیری شد. میزان فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد(۲۱):

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

(درصد)

میزان فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌ها بر اساس میزان آنتی‌اکسیدان‌های مورد نیاز جهت کاهش جذب اولیه به میزان ۵۰ درصد (IC_{50}) گزارش گردید(۲۰).

نتایج به‌صورت "انحراف معیار ± میانگین" سه تکرار گزارش شده‌اند و از آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی دانکن و نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۶) برای تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد.

یافته‌ها

در روش دیسک دیفیوژن (جدول ۱)، در باکتری انتروباکتر ائروژنز قطر هاله‌های ایجاد شده در غلظت‌های ۴۵ و ۶۰ میلی‌گرم در میلی-لیتر فاقد اختلاف معنی‌داری با یکدیگر بودند ولی با غلظت‌های ۱۵ و ۳۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اختلاف معنی‌داری داشتند. قطر هاله-های ایجاد شده در تمامی غلظت‌های عصاره اتانولی دارای اثر معنی-داری بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بودند. در مخمر کاندیدا آلبیکنس قطر هاله‌های عدم رشد در غلظت‌های ۱۵ و ۳۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند، در حالی که بین این دو غلظت با سایر غلظت‌ها اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. در کپک پنی‌سیلیوم ایتالیکوم قطر هاله‌ها در غلظت‌های ۳۰ و ۴۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر فاقد اختلاف معنی‌داری بودند اما با سایر غلظت‌ها اختلاف معنی‌داری داشتند. به طور کلی می‌توان گفت در این روش با افزایش غلظت قطر هاله‌های عدم رشد افزایش یافته و انتروباکتر ائروژنز با کمترین میزان مقاوم‌ترین و استافیلوکوکوس اورئوس و کاندیدا آلبیکنس از جمله حساس‌ترین میکروارگانیسم-های مورد بررسی بودند.

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

میکروارگانیسم	غلظت عصاره اتانولی کاه‌مکی (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)			
	۱۵	۳۰	۴۵	۶۰
انتروباکتر ائروژنز	۹/۳۰±۰/۲۹^{a}	۱۱/۸۰±۰/۳۴^{b}	۱۳/۶۰±۰/۲۷^{c}	۱۴/۱۰±۰/۵۰^{c}
استافیلوکوکوس اورئوس	۱۰/۸۰±۰/۳۹^{a}	۱۲/۹۰±۰/۳۵^{b}	۱۴/۵۰±۰/۲۲^{c}	۱۶/۶۰±۰/۳۷^{d}
کاندیدا آلبیکنس	۱۰/۹۰±۰/۴۰^{a}	۱۱/۵۰±۰/۵۸^{a}	۱۴/۰۰±۰/۲۵^{b}	۱۶/۶۰±۰/۴۶^{c}
پنی‌سیلیوم ایتالیکوم	۱۰/۰۰±۰/۴۵^{a}	۱۲/۲۰±۰/۴۲^{b}	۱۳/۲۰±۰/۶۵^{b}	۱۵/۱۰±۰/۳۳^{c}

حروف غیر مشابه در یک ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح معنی‌داری ۵ درصد میان غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی کاه‌مکی است.

در باکتری انتروباکتر ائروژنز قطر هاله‌های ایجاد شده در تمامی غلظت‌ها با یکدیگر دارای اختلاف معنی‌داری بودند. در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس قطر هاله عدم رشد در غلظت‌های ۳۰ و ۴۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر فاقد اختلاف معنی‌دار بودند ولی با غلظت‌های ۱۵ و ۶۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اختلاف معنی‌داری داشتند. در مخمر کاندیدا آلبیکنس در اندازه قطر هاله‌های عدم رشد در غلظت-های ۱۵ و ۳۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد، در حالی که این غلظت‌ها و سایر غلظت‌ها با یکدیگر اختلاف معنی‌داری داشتند. در کپک پنی‌سیلیوم ایتالیکوم بین اندازه قطر هاله‌ها در غلظت‌های ۳۰ و ۴۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد در حالی که بین این غلظت‌ها با سایر غلظت‌ها اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. در این روش نیز با افزایش غلظت قطر هاله‌های عدم رشد افزایش یافت. انتروباکتر ائروژنز مقاوم‌ترین و کاندیدا آلبیکنس حساس‌ترین میکروارگانیسم‌ها به عصاره اتانولی گیاه کاه‌مکی بودند(جدول ۲).

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

میکروارگانیسم	غلظت عصاره اتانولی کاه‌مکی (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)			
	۱۵	۳۰	۴۵	۶۰
انتروباکتر ائروژنز	۱۰/۰۰±۰/۳۷^{a}	۱۲/۱۰±۰/۴۱^{b}	۱۴/۰۰±۰/۲۹^{c}	۱۶/۲۰±۰/۳۰^{d}
استافیلوکوکوس اورئوس	۱۲/۱۰±۰/۴۵^{a}	۱۴/۸۰±۰/۴۷^{b}	۱۵/۲۰±۰/۳۶^{b}	۱۷/۹۰±۰/۵۰^{c}
کاندیدا آلبیکنس	۱۲/۵۰±۰/۵۲^{a}	۱۳/۵۰±۰/۶۱^{a}	۱۵/۷۰±۰/۴۸^{b}	۱۸/۱۰±۰/۴۳^{c}
پنی‌سیلیوم ایتالیکوم	۱۱/۸۰±۰/۴۰^{a}	۱۲/۵۰±۰/۶۴^{a}	۱۵/۰۰±۰/۳۱^{c}	۱۶/۹۰±۰/۵۱^{d}

حروف غیر مشابه در یک ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح معنی‌داری ۵ درصد میان غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی کاه‌مکی است.

کمترین غلظت مورد نیاز برای مخمر کاندیدا آلبیکنس برابر با ۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر (حساس‌ترین) و برای انتروباکتر ائروژنز برابر با ۳۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر (مقاوم‌ترین) بود. کمترین و بیشترین غلظت کشندگی نیز به ترتیب برای کاندیدا آلبیکنس (۱۲۸ میلی-گرم در میلی‌لیتر) و انتروباکتر ائروژنز (بزرگتر از ۵۱۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) مشاهده شد (جدول ۳).

جدول ۳- حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره اتانولی کاه‌مکی

میکروارگانیسم	حداقل غلظت مهارکنندگی (mg/ml)	حداقل غلظت کشندگی (mg/ml)
انتروباکتر ائروژنز	۳۲	بزرگتر از ۵۱۲
استافیلوکوکوس اورئوس	۱۶	۲۵۶
کاندیدا آلبیکنس	۸	۱۲۸
پنی‌سیلیوم ایتالیکوم	۱۶	۲۵۶

میزان فنول و فلاونوئید کل به ترتیب برابر با ۴۰/۱۵ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره و ۲۵/۳۰ میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره می‌باشد. همچنین خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره بر حسب IC_{50} در روش مهار رادیکال DPPH برابر با ۸۳/۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و در روش ABTS برابر با ۷۵/۷۰ میکروگرم در میلی‌لیتر می‌باشد(جدول ۴).

جدول ۴- میزان فنول کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره اتانولی کاه‌مکی

فنول کل (میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره)	فلاونوئید کل (میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره)	فعالیت آنتی اکسیدانی (بر حسب IC_{50}؛ میکروگرم در میلی‌لیتر)	
		مهار رادیکال DPPH	مهار رادیکال ABTS
۴۰/۱۵±۰/۳۶	۲۵/۳۰±۰/۴۱	۸۳/۸۰±۰/۲۶	۷۵/۷۰±۰/۳۸

بحث

مطالعه ویژگی‌های ضد باکتریایی گیاهان، می‌تواند به جایگزینی این ترکیبات طبیعی به جای داروهای شیمیایی در درمان و کنترل عفونت‌های میکروبی کمک کند(۲۲). در این پژوهش مشخص گردید که عصاره تولیدی دارای اثرات ضدمیکروبی قابل‌توجهی بر روی میکروارگانیسم‌های مورد بررسی می‌باشد. اثر ضد باکتریایی بیشتر عصاره روی باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس در مقایسه با باکتری گرم منفی انتروباکتر ائروژنز به دلیل اختلاف در دیواره سلولی آن‌ها می‌باشد. به گونه‌ای که انواع گرم مثبت دارای ترکیبات موکوپپتیدی در دیواره سلولی خود می‌باشند، در حالی که گرم منفی‌ها علاوه بر لایه نازکی از موکوپپتید قسمت زیادی از دیواره دارای لیپو پلی‌ساکارید و لیپوپروتئین بوده و در نتیجه در برابر ترکیبات ضد باکتریایی مقام‌تر می‌باشند(۲۳). روش‌های چاهک آگار و دیسک دیفیوژن از روش‌های ابتدایی در تعیین هاله عدم رشد می‌باشند و بزرگتر بودن قطر هاله‌های عدم رشد در چاهک آگار در مقایسه با دیسک دیفیوژن به دلیل مکانیسم اثر عصاره در این روش‌ها می‌باشد. به گونه‌ای که در دیسک دیفیوژن عصاره باید از سطح دیسک‌های کاغذی عبور کند تا به محیط کشت برسد، در حالی که در روش چاهک آگار عصاره به صورت مستقیم با محیط کشت در ارتباط می‌باشد و در نتیجه قطر هاله‌های عدم رشد در این روش بزرگتر می‌باشد(۲۴). اجزا موجود در عصاره‌ها از جمله ترکیبات فنولی، ترپنوئیدها و آلکالوئیدها با پروتئین‌ها و آنزیم‌های غشای سلولی واکنش می‌دهند و به دنبال آن با خروج پروتون‌ها به بیرون سلول در مرگ سلولی یا مهار آنزیم‌های سنتزکننده آمینواسیدها دخیل می‌باشند. همچنین، ویژگی آبگریزی عصاره‌های گیاهی منجر به واکنش آن‌ها با پروتئین‌های غشای سلولی و میتوکندری و در نهایت تخریب و تغییر نفوذپذیری آن‌ها می‌شود(۲۱). در مطالعه‌ای که بر روی اسانس و عصاره‌های مختلف گیاه کاه‌مکی رشد یافته در استان سیستان و بلوچستان صورت گرفت، گزارش گردید که اسانس و عصاره‌های تولیدی اثر مهارکنندگی قابل‌توجهی بر باکتری‌های اشرشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس و قارچ‌های کاندیدا آلبیکنس و آسپرژیلوس نایجر دارد(۹). همچنین در مقایسه عصاره‌های تهیه شده از گیاه کاه‌مکی حاصل از فصول مختلف سال گزارش شده است که عصاره اتانولی گیاه روئیده شده در فصل بهار به دلیل مقادیر بیشتر فنول و فلاونوئید دارای اثر ضدمیکروبی بیشتری بر روی میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه می‌باشد(۲۵). علاوه بر این، گزارش شده است که اثر ضدقارچی عصاره‌های گیاهی ناشی از ترکیبات شیمیایی آنها مانند آلکالوئیدها، پلی فنولها، ساپونین، استرول می‌باشد(۲۶).

میان میزان ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس و عصاره‌های گیاهی ارتباط مستقیمی وجود دارد که در مطالعات مختلف به آن اشاره شده است(۲۷ و ۲۸). از این رو فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالای عصاره اتانولی گیاه کاه‌مکی را می‌توان به مقادیر بالای فنول آن نسبت داد. در یک مطالعه، میزان فنول و فلاونوئید کل برای عصاره متانولی گیاه کاه‌مکی به ترتیب ۴۵/۵۶ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره و ۳۷/۶۳ میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره و میزان مهار رادیکال DPPH (بر حسب IC50) ۵۳/۴۷ میکروگرم در میلی‌لیتر گزارش شده است(۹). این اختلاف در مقادیر میزان فنول و فلاونوئید به دلیل متفاوت بودن شرایط آب و هوایی، جنس و گونه‌های مختلف، نوع خاک، نحوه خشک کردن گیاه و زمان برداشت می‌باشد(۱۷).

نتیجه‌گیری

عصاره اتانولی گیاه کاه‌مکی به دلیل وجود ترکیبات فنولی دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی مناسبی می‌باشد. بررسی فعالیت ضدمیکروبی عصاره گیاه بر روی میکروارگانیسم‌هایی مانند انتروباکتر ائروژنز، استافیلوکوکوس اورئوس، کاندیدا آلبیکنس و پنی‌سیلیوم ایتالیکوم نشان از قدرت بالای آن در مهار این میکروارگانیسم‌ها می‌باشد. بنابراین این گیاه می‌تواند به عنوان یک ترکیب ضدمیکروبی طبیعی مورد استفاده قرار گیرد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان به دلیل حمایت‌های مادی و معنوی صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

REFERENCE

1. Kalvandi R, Darvishi S, Davari K. Evaluation of antibacterial properties of ethanol and oil extracts of propolis in Kurdistan Province, on *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mutans* and *Entrobacter aerogenes*. Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences. 2016; 21(2): 85-93. [Full Text in Persian]
2. Nonahal F, Rahimi E, AtaieSalehi E. Prevalence of *Staphylococcus aureus in* meat and meat products. Journal of Food Microbiology. 2015; 1(3): 41-46. [Full Text in Persian]
3. Titidej A, Alizadeh Koshkohi S, Ashori A, Azmoudeh F. Study of Antifungal effect of *Punica Granatum* alcoholic extract on *Candida Albicans* (in vitro study). Journal of Research in Dental Sciences. 2020; 17(3): 201-207. [Full Text in Persian]
4. Rundberget T, Skaar I, Flåøyen A. The presence of Penicillium and Penicillium mycotoxins in food wastes. International Journal of Food Microbiology. 2004; 90(2): 181-188.
5. Nascimento GG, Locatelli J, Freitas PC, Silva GL. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. Brazilian journal of microbiology. 2000; 31(4): 247-56.
6. Čižman M. The use and resistance to antibiotics in the community. International journal of antimicrobial agents. 2003; 21(4):297-307.
7. Compean KL, Ynalvez RA. Antimicrobial activity of plant secondary metabolites: A review. Research Journal of Medicinal Plants. 2014; 8(5): 204-13.
8. Prabuseenivasan S, Jayakumar M, Ignacimuthu S. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. BMC complementary and alternative medicine. 2006; 6(1): 1-8.
9. Azizian Shermeh O, Taherizadeh M, Valizadeh M, Zaboli A. Investigation of antioxidant and antimicrobial activities and phytochemical Compounds of essential oil and different extracts of *Cymbopogon olivieri* (Boiss.) Bor. from Sistan and Baluchestan province. Journal of Sabzevar University of Medical Sciences. 2018; 25(2): 279-292. [Full Text in Persian]
10. Rezaee MB, Jaimand K. Chemical constituents of the essential oils of *Cymbopogon olivieri* (Boiss.) Bor. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research, 2001; 10(1): 75-83.

11. Mahboubi M, Kazempour N. Biochemical activities of Iranian *Cymbopogon olivieri* (Boiss) Bor. essential oil. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2012; 74(4): 356-360.
12. Mirjalili M, Sonboli A, Salehi P, Sarkhosh A. Essential oil analysis wild and cultivated of *Cymbopogon olivieri* (Boiss.) Bor. in Iran. Journal of Medicinal Plants. 2005; 4(16): 22-28. [Full Text in Persian]
13. 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]
14. Ebrahimi Hemmati Kaykha M, Jooyandeh H, Alizadeh Behbahani B, Noshad M. Antimicrobial potential of Sepestan fruit on pathogenic bacteria: A study “in vitro”. Food Science and Technology. 2020; 101(17): 71-80. [Full Text in Persian]
15. Shahidi F, Tabatabaei Yazdi F, Roshanak S, Alizadeh Behbahani B, Vasiee A ,Norouzi N. Antimicrobial Activity of *Taraxacum pseudocalocephalum* Leaves Extract on Pathogenic Microorganisms and Comparison with Common Therapeutic Antibiotics in vitro. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2019; 23(83): 37-46. [Full Text in Persian]
16. Shahidi F, Yazdi FT, Roshanak S, Behbahani BA, Norouzi N, Vasiee A. Antimicrobial Activity of *Lepidium draba* Extract on some Pathogenic Microorganisms “in vitro”. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2019; 24(85): 1-9. [Full Text in Persian]
17. 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]
18. 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]
19. Alizadeh Behbahani B, Noshad M, Falah F. Study the chemical composition of essential oil of *Foeniculum vulgare* and antioxidant activity and its cell toxicity. Food Science and Technology. 2020; 17(7): 124-133. [Full Text in Persian]
20. 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. [Full Text in Persian]
21. Hojjati M, Alizadeh Behbahani B. Evaluation of the effect of aqueous and methanolic extraction methods on the antioxidant and antimicrobial characteristics of *Allium jesdianum* extract: in vitro study. Iranian Food Science and Technology Research Journal. 2020; 17(1): 83-91. [Full Text in Persian]
22. Noshad M, Hojjati M, Behbahani BA. Black Zira essential oil: Chemical compositions and antimicrobial activity against the growth of some pathogenic strain causing infection. Microbial pathogenesis. 2018; 116:153-7.
23. 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]

24. Alizadeh behbahani B, Noshad M, Sahraiyan B. Investigation of the minimum inhibitory concentration and the minimum bactericidal concentration of *Eucalyptus globulus* essential oil on a number of pathogenic bacteria and the cause of food spoilage. Iranian Journal of Food Science and Technology. 2021; 18 (110): 49-57. [Full Text in Persian]
25. Barfroshan Y, Mottaghipisheh J, Maghsoodlou MT, Dosti N, Beyzaei H, Moghaddam Manesh MR, Vitalini S, Iriti M. Comparative Study of Bioactivities and Chemical Constituents of *Cymbopogon jwarancusa* subsp. *olivieri* (Boiss.) *Soenarko* Harvested in Spring and Winter. Journal of Essential Oil Bearing Plants. 2018; 21(4): 1107-18.
26. Roşca-Casian O, Mircea C, Vlase L, Gheldiu AM, Teuca DT, Pârvu M. Chemical composition and antifungal activity of *Hedera helix* leaf ethanolic extract. Acta Biologica Hungarica. 2017; 68(2): 196-207.
27. Behbahani BA, Shahidi F, Yazdi FT, Mortazavi SA, Mohebbi M. Use of Plantago major seed mucilage as a novel edible coating incorporated with *Anethum graveolens* essential oil on shelf life extension of beef in refrigerated storage. International journal of biological macromolecules. 2017; 94: 515-526.
28. 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.