پتانسیل آنتی‌اکسیدانی و فعالیت ضدمیکروبی عصاره اتانولی برگ بو (Laurus nobilis L) بر باکتری‌های شیگلا دیسانتری، اشرشیا کلی، لیستریا مونوسیتوژنز و استافیلوکوکوس اورئوس در شرایط برون‌تنی

بهروز علیزاده بهبهانی[۱]*، محمد نوشاد[۲]، مصطفی رحمتی جنیدآباد[۳]

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
۳-استادیار، گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

*نشانی برای مکاتبه: B.alizadeh@asnrukh.ac.ir

دریافت مقاله: بهمن چهارصد پذیرش برای چاپ: فروردین چهارصد و یک

چکیده

سابقه و هدف: به دلیل سمیت بالقوه و سایر نگرانی‌ها، نسل کنونی به محصولات طبیعی به جای محصولات سنتزی اعتقاد دارد. بنابراین یکی از فناوری‌های نوظهور استخراج عصاره از اندام‌های مختلف گیاهی و کاربرد آن‌ها در صنایع داروسازی و غذایی می‌باشد. در این مطالعه، عصاره اتانولی برگ بو (*Laurus nobilis* L) استخراج و فعالیت ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی آن بررسی گردید.

روش کار: در این پژوهش آزمایشگاهی، از روش‌های دیسک دیفیوژن آگار، چاهک آگار، حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی جهت تعیین فعالیت ضدباکتریایی عصاره اتانولی برگ بو در برابر باکتری‌های *شیگلا دیسانتری*، *اشرشیا کلی*، *لیستریا مونوسیتوژنز* و *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده گردید. علاوه بر این، محتوای فنول کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی (بر پایه مهار رادیکال آزاد DPPH و ABTS و زوال رنگ بتا-کاروتن/لینولئیک اسید) عصاره بررسی گردید.

یافته‌ها: غلظت ۶۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره سبب بالاترین اثر ضدمیکروبی گردید. میانگین قطر هاله عدم رشد برای باکتری‌های گرم مثبت بزرگ‌تر از باکتری‌های گرم منفی بود و غلظت کمتری از عصاره جهت جلوگیری از رشد یا از بین بردن باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* نیاز بود. میزان فنول و فلاونوئید کل عصاره برگ بو معادل ۲۹/۳۲ میلی‌گرم گالیک اسید و ۱۹/۱۶ میلی‌گرم کوئرستین در یک گرم عصاره بود. عصاره سبب مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS به میزان ۷۰/۶۰ و ۶۶/۵۰ درصد و مهار زوال رنگ محلول بتا-کاروتن/لینولئیک اسید به میزان ۵۹/۳۴ درصد گردید.

نتیجه‌گیری: نتایج آزمون‌های برون‌تنی عصاره اتانولی برگ بو نشان داد که عصاره غنی از ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی بالا می‌باشد.

واژگان کلیدی: عصاره اتانولی؛ برگ بو؛ فعالیت آنتی‌اکسیدانی؛ اثر ضدمیکروبی

مقدمه

بیماری‌های ناشی از مواد غذایی یک موضوع بهداشت عمومی جهانی است که تأثیرات عمده‌ای بر سلامت انسان، معیشت و سیستم‌های مراقبت بهداشتی دارد؛ علاوه بر این، تجارت بین‌الملل را از طریق استراتژی‌های کنترل ملی با اجرای قوانین و مقررات مواد غذایی تحت تأثیر قرار می‌دهد. با تغییرات مداوم در پویایی تجارت جهانی غذا، رفتارهای مصرف مواد غذایی، محیط و فرآیندهای تولید مواد غذایی و ظهور پاتوژن های غذایی و آلاینده‌های شیمیایی که وارد زنجیره غذایی می‌شوند، بیماری‌های ناشی از مواد غذایی همچنان یک

مشکل رو به رشد است. تخمین زده می‌شود که ۶۰۰ میلیون نفر، تقریباً از هر ۱۰ نفر یک نفر در جهان، سالانه به دلیل مصرف مواد غذایی آلوده بیمار می‌شوند که بیماری‌های اسهالی شایع‌ترین شکل این بیماری‌ها است (۱). بیماری‌های ناشی از مواد غذایی توسط بسیاری از پاتوژن های باکتریایی از جمله سالمونلا، کمپیلوباکتر، اشریشیا کلی، شیگلا، استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا مونوسیتوژنز ایجاد می‌شوند (۲). برخی از بیماری‌های ناشی از مواد غذایی با مقاومت آنتی‌بیوتیکی مرتبط هستند که یک مشکل مهم در سراسر جهان است.

مقاومت باکتری‌ها در برابر عوامل ضد میکروبی مختلف به عنوان پاسخ مستقیم به قرار گرفتن در معرض آن‌ها می‌باشد. مکانیسم‌های دخیل در چنین مقاومتی عبارتند از تغییر پروتئین هدف با جهش یا فعال‌سازی آنزیمی، کسب ژن‌هایی از سایر گونه‌های باکتریایی که پروتئین‌های هدف کمتر حساس را کد می‌کنند، پوشش پروتئین هدف، یا بیرون راندن ماده ضد میکروبی از سلول. این سازگاری‌ها می‌توانند در باکتری‌های حساس در نتیجه جهش‌ها یا از طریق انتقال افقی ژن، در داخل یا بین جنس‌ها، عمدتاً با استفاده از عناصر ژنتیکی متحرک مانند پلاسمیدها، ترانسپوزون‌ها یا اینتگرون‌ها ایجاد شوند. این واقعیت که مقاومت آنتی‌بیوتیکی همچنان در طیف وسیعی از میکروب‌ها توسعه می‌یابد به خوبی شناخته شده است. عوامل مؤثر در این توسعه عبارتند از استفاده نامناسب از آنتی‌بیوتیک‌ها، مانند استفاده بیش از حد از آنتی‌بیوتیک‌های قدرتمند با طیف وسیع و وجود آنتی‌بیوتیک‌ها در صنعت غذا/دام. در نتیجه این استراتژی‌ها، بسیاری از سویه‌های باکتری‌های بیماری‌زا در حال حاضر به چند دارو مقاوم هستند (که به عنوان مقاومت به سه یا چند نوع دارویی ضد باکتری تعریف می‌شوند) و در نتیجه درمان آن مشکل‌ساز است. این حالت یک تهدید واقعی برای سلامت انسان است و منجر به تلاش‌هایی برای توسعه عوامل ضد میکروبی جدید شده است (۳, ۴).

تعداد زیادی از گیاهان دارویی به عنوان منابع ارزشمند ترکیبات ضد میکروبی طبیعی شناخته شده‌اند که به طور بالقوه می‌توانند در درمان این عفونت‌های باکتریایی مشکل‌ساز مؤثر باشند. مطابق گزارش سازمان بهداشت جهانی، گیاهان دارویی بهترین منبع برای به دست آوردن انواع داروها هستند (۵). بسیاری از گیاهان به دلیل ویژگی‌های ضد میکروبی خود مورد استفاده قرار گرفته‌اند که این حالت به دلیل مواد شیمیایی گیاهی سنتز شده در متابولیسم ثانویه گیاه است (۶). گیاهان سرشار از طیف گسترده‌ای از متابولیت های ثانویه مانند تانن‌ها، آلکالوئیدها، ترکیبات فنولی و فلاونوئیدها هستند که در شرایط آزمایشگاهی مشخص شده است که دارای خواص ضد میکروبی هستند و از گیاهان دارویی مختلفی برای درمان بیماری‌های عفونی مانند عفونت‌های دستگاه ادراری، اختلالات گوارشی، بیماری‌های تنفسی و عفونت‌های پوستی استفاده شده است (۹-۷).

برگ بو (Laurus nobilis L) از خانواده Lauraceae و گیاهی بومی نواحی جنوبی مدیترانه است که به عنوان ادویه ارزشمند در آن منطقه و به عنوان یک گیاه زینتی در سراسر اروپا و آمریکا کشت می‌شود. عصاره آبی میوه‌ها و برگ‌های بو در طب سنتی به عنوان یک عامل قابض و برای درمان بسیاری از اختلالات عصبی، پوستی و اورولوژیکی استفاده می‌شود. علاوه بر این، اسانس برگ بو در حال حاضر در بسیاری از داروهای موجود برای درمان مشکلات مختلف سلامتی، مانند روماتیسم و درماتیت استفاده می‌شود (۱۰, ۱۱). فیدان و همکاران (۲۰۱۹) گزارش نمودند که اسانس برگ بو حاوی ۱،۸-سینئول (۴۱ درصد)، α-ترپینیل استات (۱۴/۴ درصد)، سابینن (۸/۸ درصد)، متیل اوژنول (۶ درصد)، β-لینالول (۴/۹ درصد) و α-ترپینئول (۳/۱ درصد) بودند. اسانس برگ بو فعالیت ضد باکتریایی و ضد قارچی را در برابر تقریباً همه سویه‌های میکروارگانیسم‌های آزمایش شده (استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس آئروژینوزا، اشرشیا کلی، باسیلوس سوبتیلیس، سالمونلا آبونی، ساکارومایسس سرویزیه، کاندیدا آلبیکنز و آسپرژیلوس برازیلینسیس) نشان داد (۱۰). کارینونیچ و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که عصاره متانولی برگ بو دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی در شرایط برون‌تنی و درون تنی است (۱۲).

این مطالعه با هدف تعیین فنول کل، فلاونوئید کل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و اثر ضد باکتریایی عصاره اتانولی برگ بو به عنوان منبع احتمالی ترکیبات زیست فعال برای استفاده در صنایع غذایی و دارویی انجام شد.

روش کار

برگ‌های بو در دمای اتاق خشک و در مخلوط کن آسیاب شدند. جهت بدست آوردن عصاره گیاه، میزان ۱۰۰ گرم از پودر گیاه در یک فلاسک حاوی ۵۰۰ میلی‌لیتر اتانول قرار داده شد و سپس مخلوط به مدت ۵ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد همزده شد. در ادامه، فرایند استخراج عصاره به مدت ۲۴ ساعت انجام و مخلوط فیلتر گردید. استخراج بر مقدار باقیمانده رسوب با استفاده از ۱۵۰ میلی‌لیتر اتانول تکرار شد و تمامی عصاره‌ها با استفاده از کاغذ صافی ۰/۴۵ میکرونی فیلتر شدند. پس از آن، دو بخش از عصاره با هم مخلوط شده و سپس با استفاده از یک تبخیر کننده چرخشی در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و تحت خلأ تغلیظ شدند. پس از آن عصاره در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شد (۱۳).

سویه‌های میکروبی در این مطالعه شامل شیگلا دیسانتری، اشرشیا کلی، لیستریا مونوسیتوژنز و استافیلوکوکوس اورئوس بود که از بانک میکروبی آزمایشگاه میکروبیولوژی گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان تهیه شدند. برای این منظور، ابتدا از سویه‌های میکروبی کشت ۲۴ ساعته تهیه و فعال گردیدند و از استاندارد نیم مک فارلند (Colony forming unit/ml ۱/۵ × ۱۰^۸) جهت استاندارد نمودن میزان تلقیح سویه‌های میکروبی استفاده گردید (۴).

از آزمون‌های ضدمیکروبی دیسک دیفیوژن آگار، چاهک آگار، حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی جهت بررسی فعالیت ضدمیکروبی عصاره اتانولی برگ بو استفاده گردید.

در آزمون دیسک دیفیوژن آگار، ابتدا غلظت‌های ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره تهیه گردید و سپس از روش برزگر و همکاران (۲۰۲۰) برای تعیین فعالیت ضدمیکروبی استفاده شد. عصاره استریل (۲۰ میکرولیتر) به آرامی به دیسک‌های بلانک اضافه شد و سپس آن‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شدند. سپس دیسک‌های بلانک روی محیط حاوی سویه‌های باکتریایی فوق‌الذکر قرار داده شدند. پس از گرمخانه گذاری بلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، ناحیه مهار (میلی‌متر) اطراف دیسک‌ها اندازه‌گیری شد و به عنوان پتانسیل ضد باکتریایی عصاره گزارش گردید (۱۴).

از روش علیزاده بهبهانی و شهیدی (۲۰۱۹) جهت بررسی فعالیت ضدمیکروبی عصاره اتانولی برگ بو بر پایه روش چاهک آگار استفاده گردید. در این روش، ۵ چاهک با استفاده از پیپت پاستور بر روی سطح محیط کشت مولر هینتون آگار ایجاد شد. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتریایی انکوبه شده روی محیط کشت پخش شد. در ادامه ۲۰ میکرولیتر از هر غلظت عصاره (۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) داخل چاهک ریخته شد. پس از گرمخانه گذاری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ناحیه مهار اطراف چاهک‌ها اندازه‌گیری و بصورت میلی‌متر گزارش گردید (۱۵).

حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره با استفاده از روش میکرودایلوشن در پلیت ۹۶ خانه‌ای، مطابق روش علیزاده بهبهانی و همکاران (۲۰۱۹)، ارزیابی شد. غلظت‌های متوالی عصاره (۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۸، ۲۵۶، ۵۱۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) در محیط کشت مولر هینتون براث تهیه شد و سپس از طریق فیلترهای سرنگی ۰/۴۵ میکرونی استریل شد. در مرحله بعد، ۱۰۰ میکرولیتر از هر غلظت به چاهک‌های حاوی ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی با معادل ۰/۵ مک فارلند اضافه شد. پلیت ها در دمای ثابت ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند و سپس ۱۰ میکرولیتر محلول ۵ درصد تری‌فنیل‌تترازولیوم کلرید به چاهک اضافه گردید. پلیت ها مجدداً انکوبه شدند و کمترین غلظت عصاره که رشد سویه‌های باکتریایی را مهار کرد (که با عدم وجود رنگ قرمز تیره در چاهک‌ها تائید می‌شود)، به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره در نظر گرفته شد (۱۶).

در آزمایش ضد باکتریایی حداقل غلظت کشندگی، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول در چاهک‌های بدون رشد میکروبی (بر اساس نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی) روی سطح محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد و سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. کمترین غلظت عصاره که سویه‌های باکتریایی را از بین برد (بدون تشکیل کلنی قابل مشاهده) به عنوان حداقل غلظت کشندگی عصاره گزارش شد (۱۷).

میزان فنول کل عصاره با استفاده از روش حجتی و همکاران (۱۴۰۰) اندازه‌گیری گردید. برای این منظور، ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره با ۵ میلی‌لیتر معرف فولین-سیوکالتو مخلوط گردید و ترکیب حاصل به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط نگهداری شد. در ادامه، ۴ میلی‌لیتر محلول ۱ مولار سدیم کربنات به مخلوط اضافه گردید و جذب نمونه بعد از ۱۵ دقیقه نگهداری، در طول‌موج ۷۶۵ نانومتر ثبت گردید. نتایج میزان فنول کل بر اساس میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره ارائه گردید (۱۸).

جهت تعیین محتوای فلاونوئید کل عصاره، ۱ میلی‌لیتر از آن با ۱/۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۷۵ میکرولیتر نیتریت سدیم ۵ درصد مخلوط گردید. در ادامه، ۱۵۰ میکرولیتر آلومینیوم تری کلرید ۱۰ درصد و ۱ میلی‌لیتر سود به آن اضافه گردید. محلول حاصل به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط نگهداری شد و سپس جذب آن در طول‌موج ۵۱۰ نانومتر تعیین گردید. از کوئرستین جهت رسم منحنی استاندارد استفاده شد و نتایج برحسب میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره بیان گردید (۱۹).

از روش علیزاده بهبهانی و همکاران (۲۰۲۱) جهت اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی برگ بو بر پایه آزمون‌های مهار رادیکال آزاد DPPH، رادیکال آزاد ABTS و جلوگیری از زوال رنگ محلول بتا-کاروتن/لینولئیک اسید استفاده گردید (۲۰).

برای تعیین فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH، عصاره (۵۰ میکرولیتر) یا کنترل (۵۰ میکرولیتر) با ۵ میلی‌لیتر محلول DPPH اتانولی ۰/۱۲ میلی‌مولار مخلوط شد. محلول بدست آمده در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شد و جذب آن (A) در طول‌موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. سپس فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH به صورت زیر اندازه‌گیری گردید:

$$DPPH\ (\%)=\frac{A_{control}-A_{sample}}{A_{control}}\times 100$$

برای ارزیابی فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS، محلول ABTS و $K_2S_2O_8$ در ابتدا با هم مخلوط شدند تا محلول کاتیونی رادیکال ABTS تولید شود. پس از آن، عصاره (۰/۱ میلی‌لیتر) یا کنترل (۰/۱ میلی‌لیتر) با محلول رادیکال ABTS (۳/۹ میلی‌لیتر) مخلوط شد و جذب آن در ۷۳۴ نانومتر ثبت شد. سپس فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS به صورت زیر تعیین گردید:

$$ABTS\ (\%)=\frac{A_{control}-A_{sample}}{A_{control}}\times 100$$

از معادله زیر برای اندازه‌گیری اثر بازدارندگی عصاره در برابر زوال رنگ محلول بتاکاروتن-لینولئات استفاده شد:

$$Inhibition\ effect\ (\%)=\frac{A_{sample\ (after\ 120\ min\ incubation)}-A_{control\ (after\ 120\ min\ incubation)}}{A_{control\ (without\ incubation)}-A_{control\ (after\ 120\ min\ incubation)}}\times 100$$

جهت آنالیز نتایج از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۸ مطابق آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی دانکن ($p < ۰/۰۵$) استفاده شد. آزمون‌ها در سه تکرار انجام شدند و نتایج به صورت "انحراف معیار ± میانگین" گزارش شدند.

یافته ها

افزایش غلظت عصاره سبب افزایش معنی‌دار قطر هاله عدم رشد گردید. در ارتباط با باکتری شیگلا دیسانتری، اختلاف معنی‌داری بین قطر هاله عدم رشد در غلظت‌های ۱۵ و ۳۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره مشاهده نشد، اما اختلاف بین غلظت‌های ۴۵ و ۶۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در سطح آماری ۵ درصد معنی‌دار بود. نتایج میانگین قطر هاله عدم رشد برای باکتری اشرشیا کلی نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین اثر ضدمیکروبی غلظت‌های مختلف عصاره مشاهده می‌شود و بالاترین و کمترین قطر هاله عدم رشد به ترتیب در غلظت‌های ۶۰ و ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر مشاهده گردید. نتایج ضدمیکروبی مشابهی در مورد باکتری‌های لیستریا مونوسیتوژنز و استافیلوکوکوس اورئوس مشاهده شد و اختلاف معنی‌داری در سطح آماری ۵ درصد بین قطر هاله‌های عدم رشد حاصل از غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی برگ بو مشاهده گردید. بطور کلی، غلظت ۶۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره سبب بالاترین اثر ضدمیکروبی و غلظت ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر منجر به کمترین فعالیت ضدمیکروبی گردید. علاوه بر این، بالاترین قطر هاله عدم در تمامی غلظت‌های عصاره مربوط به باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بود و کمترین مقدار به باکتری شیگلا دیسانتری اختصاص یافت. بعلاوه، میانگین قطر هاله عدم رشد برای باکتری‌های گرم مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا مونوسیتوژنز) بزرگ‌تر از باکتری‌های گرم منفی (شیگلا دیسانتری و اشرشیا کلی) بود(جدول ۱)

جدول ۱- میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره اتانولی برگ بو در برابر باکتری‌های پاتوژن بر اساس روش دیسک دیفیوژن آگار بر حسب میلی‌متر

باکتری	غلظت عصاره (میلی گرم در میلی لیتر)			
	۱۵	۳۰	۴۵	۶۰
شیگلا دیسانتری	۶/۱۵±۰/۶۱ ^{c}	۷/۱۰±۰/۴۶ ^{c}	۹/۷۰±۰/۳۶ ^{b}	۱۱/۸۰±۰/۴۱ ^{a}
اشرشیا کلی	۷/۰۰±۰/۲۴ ^{d}	۸/۹۰±۰/۲۵ ^{c}	۱۰/۸۰±۰/۳۰ ^{b}	۱۳/۱۰±۰/۲۷ ^{a}
لیستریا مونوسیتوژنز	۷/۲۰±۰/۲۸ ^{d}	۹/۸۰±۰/۳۱ ^{c}	۱۱/۵۰±۰/۲۹ ^{b}	۱۵/۰۰±۰/۳۷ ^{a}
استافیلوکوکوس اورئوس	۸/۱۰±۰/۲۰ ^{d}	۱۰/۴۰±۰/۳۸ ^{c}	۱۳/۹۰±۰/۳۳ ^{b}	۱۶/۸۰±۰/۳۵ ^{a}

حروف متفاوت در هر سطر بیان اختلاف معنی‌دار بین غلظت‌های مختلف عصاره در $p < ۰/۰۵$ می باشد.

کوچک‌ترین قطر هاله عدم رشد برای باکتری شیگلا دیسانتری در حضور ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره مشاهده شد. مقایسه آماری نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین قطر هاله عدم رشد در غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی برگ بو وجود دارد و افزایش غلظت عصاره سبب افزایش معنی‌دار قطر هاله عدم رشد (اثر ضدمیکروبی) اطراف کلنی‌های باکتری‌های مورد مطالعه می‌گردد، به استثنای غلظت‌های ۳۰ و ۴۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره که اثر ضدمیکروبی معنی‌داری در برابر شیگلا دیسانتری نداشتند. هماهنگ با نتایج آزمون دیسک دیفیوژن آگار، استافیلوکوکوس اورئوس با بالاترین قطر هاله عدم رشد، حساس‌ترین سویه باکتریایی نسبت به عصاره بود و باکتری‌های گرم مثبت نسبت به انواع گرم منفی در برابر عصاره حساس‌تر بودند(جدول ۲).

جدول ۲- میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره اتانولی برگ بو در برابر باکتری‌های پاتوژن بر اساس روش چاهک آگار بر حسب میلی‌متر

باکتری	غلظت عصاره (میلی گرم در میلی لیتر)			
	۱۵	۳۰	۴۵	۶۰
شیگلا دیسانتری	۷/۱۰±۰/۳۱ ^{c}	۹/۵۰±۰/۳۳ ^{b}	۱۰/۱۰±۰/۵۴ ^{b}	۱۲/۳۰±۰/۳۲ ^{a}
اشرشیا کلی	۷/۵۰±۰/۲۸ ^{d}	۹/۴۰±۰/۳۷ ^{c}	۱۱/۶۰±۰/۲۷ ^{b}	۱۳/۶۰±۰/۳۰ ^{a}
لیستریا مونوسیتوژنز	۷/۵۰±۰/۳۴ ^{d}	۱۰/۳۰±۰/۲۲ ^{c}	۱۲/۴۰±۰/۲۸ ^{b}	۱۵/۷۰±۰/۴۱ ^{a}
استافیلوکوکوس اورئوس	۸/۹۰±۰/۱۹ ^{d}	۱۰/۸۰±۰/۳۹ ^{c}	۱۴/۶۰±۰/۴۰ ^{b}	۱۷/۲۰±۰/۴۳ ^{a}

حروف متفاوت در هر سطر بیان اختلاف معنی‌دار بین غلظت‌های مختلف عصاره در $p < ۰/۰۵$ می باشد.

حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره برای باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا مونوسیتوژنز، اشرشیا کلی و شیگلا دیسانتری به ترتیب ۸، ۱۶، ۱۶ و ۳۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. علاوه بر این، باکتری استافیلوکوکوس اورئوس با حداقل غلظت کشندگی ۲۵۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، حساس‌ترین باکتری نسبت به عصاره اتانولی برگ بو بود که در راستای نتایج آزمون‌های دیسک دیفیوژن آگار و چاهک آگار می‌باشد(جدول ۳).

جدول ۳- حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی عصاره اتانولی برگ بو در برابر باکتری‌های پاتوژن

باکتری	حداقل غلظت مهارکنندگی (میلی گرم در میلی لیتر)	حداقل غلظت کشندگی (میلی گرم در میلی لیتر)
شیگلا دیسانتری	۳۲	بزرگتر از ۵۱۲
اشرشیا کلی	۱۶	بزرگتر از ۵۱۲
لیستریا مونوسیتوژنز	۱۶	۵۱۲
استافیلوکوکوس اورئوس	۸	۲۵۶

میزان فنول کل عصاره برگ بو معادل ۰/۴۱ ± ۲۹/۳۲ میلی‌گرم گالیک اسید در یک گرم عصاره و فلاونوئید کل برابر با ۰/۳ ± ۱۹/۱۶ میلی‌گرم کوئرستین در یک گرم عصاره بود. نتایج فعالیت آنتی‌اکسیدانی نشان داد که عصاره اتانولی برگ بو قادر به مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS به میزان ۷۰/۶۰ و ۶۶/۵۰ درصد می‌باشد. علاوه بر این، عصاره سبب مهار زوال رنگ محلول بتا-کاروتن/لینولئیک اسید به میزان ۵۹/۳۴ درصد گردید(جدول ۴).

جدول ۴- محتوای فنول کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی برگ بو

فنول کل (میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره)	فلاونوئید کل (میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره)	فعالیت آنتی‌اکسیدانی (%)		
		مهار رادیکال DPPH	مهار رادیکال ABTS	بتا-کاروتن/لینولئیک اسید
۲۹/۳۲±۰/۴۱	۱۹/۱۶±۰/۳۰	۷۰/۶۰±۰/۵۸	۶۶/۵۰±۰/۶۴	۵۹/۳۴±۰/۳۹

بحث

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که عصاره اتانولی برگ بو دارای فعالیت ضدمیکروبی بالایی نسبت به باکتری‌های پاتوژن و عامل مسمومیت می‌باشد. در راستای نتایج این مطالعه، گزارش شده است که اسانس برگ بو دارای فعالیت ضد باکتریایی و ضد قارچی در برابر سویه‌های میکروبی از قبیل استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس آئروژینوزا، اشرشیا کلی، باسیلوس سوبتیلیس، سالمونلا آبونی، ساکارومایسس سرویزیه، کاندیدا آلبیکنز و آسپرژیلوس برازیلینسیس می‌باشد (۱۰). عظیم زاده و همکاران (۱۳۹۶) نشان دادند که عصاره آبی برگ بو دارای فعالیت ضدمیکروبی بالایی در برابر باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلی دارد و این اثر وابسته به غلظت می‌باشد؛ بطوریکه افزایش غلظت عصاره سبب افزایش معنی‌دار قطر هاله عدم رشد گردید. علاوه بر این، باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس حساسیت بالاتری نسبت به باکتری گرم منفی اشرشیا کلی در برابر عصاره نشان داد که در راستای نتایج این تحقیق می‌باشد (۲۱). پدرام نیا و همکاران (۱۳۹۷) گزارش نمودند که عصاره متانولی برگ بو از رشد باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا مونوسیتوژنز و اشرشیا کلی جلوگیری کرد و اثر ضد باکتریایی با افزایش غلظت عصاره افزایش نشان داد؛ با اینحال، عصاره اثری بر باکتری باسیلوس سرئوس و کپک آسپرژیلوس نایجر در غلظت‌های مورد استفاده نداشت (۲۲). گزارش شده است که خاصیت ضدمیکروبی عصاره‌های گیاهی به آبگریزی آن‌ها برمی‌گردد که آن‌ها را قادر می‌سازد با لایه لیپیدی غشاء سلولی باکتری‌ها و میتوکندری پیوند برقرار کرده و به این ترتیب سبب پاره شدن غشاء سلولی و خروج مولکول‌ها و یون‌های مهم باکتری به خارج از سلول و در نهایت مرگ باکتری می‌شود (۱۴, ۲۰). در این راستا، ارتباط بین میزان ترکیبات فنولی و فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی در مطالعات مختلف گزارش شده است (۷, ۱۵, ۱۷, ۱۸). لازم به ذکر است که فعالیت ضد باکتریایی بالاتر عصاره در برابر گونه‌های گرم مثبت نسبت به انواع گرم منفی می‌تواند عمدتاً به دلیل تفاوت در ترکیب دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی باشد. باکتری‌های گرم مثبت دارای یک لایه موکوپپتید ضخیم‌تری در دیواره سلولی خود هستند، در حالی که باکتری‌های گرم منفی تنها دارای یک لایه نازک موکوپپتید هستند و ساختار دیواره آن‌ها عمدتاً از لیپوپروتئین و لیپوپلی ساکارید تشکیل شده است که در نتیجه منجر به مقاومت بالاتر در برابر عوامل ضد باکتریایی می‌شود (۴, ۱۶, ۲۳).

محتوای فنول کل عصاره برگ بو در مطالعات مختلف گزارش شده است. عظیم زاده و همکاران (۱۳۹۶) میزان فنول کل عصاره آبی برگ بو را ۹۹/۰۹ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره گزارش نمودند. در مطالعه‌ای دیگر، هیننبرگ و همکاران (۲۰۰۶) بیان نمودند که عصاره آبی برگ بو غنی از ترکیبات فنولی می‌باشد (۹۲ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره) (۲۴). همچنین، پدرام نیا و همکاران (۱۳۹۷) گزارش نمودند که افزایش غلظت عصاره سبب افزایش میزان ترکیبات فنولی از ۳۴/۷۱ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر تا ۷۶/۱۲ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره در غلظت ۱۶۰۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره برگ گیاه برگ بو می‌گردد (۲۲). ترکیبات فنولی گیاهان یکی از بهترین منابع آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی می‌باشند. ترکیبات فنولی نقش مهمی در حفاظت بافت‌ها در مقابل اثرات اکسایشی رادیکال‌های آزاد ایفا کرده و از بروز بسیاری از بیماری‌های التهابی، آلزایمر، دیابت، سرطان، سکته قلبی و پارکینسون جلوگیری می‌کنند؛ فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان دارویی به غلظت ترکیبات فنولی آن‌ها وابسته می‌باشد (۲۵, ۲۶).

بدلیل تنوع در ترکیبات تشکیل دهنده گیاهان، معمولاً از چند روش آنتی‌اکسیدانی به منظور بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی استفاده می‌شود تا معایب روش‌های مختلف پوشش داده شود (۱۴). در این مطالعه، روش‌های آنتی‌اکسیدانی بر پایه مهار رادیکال آزاد DPPH و ABTS و جلوگیری از زوال رنگ محلول بتا-کاروتن/لینولئیک اسید جهت ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی برگ بو استفاده گردید. مطابق نتایج، عصاره برگ بو از اثر آنتی‌اکسیدانی بالایی برخوردار بود که عمدتاً ناشی از میزان بالای ترکیبات فنولی آن می‌باشد. نعمت شاهی و همکاران (۱۳۹۵) گزارش نمودند که با افزایش غلظت عصاره، فعالیت دام اندازی رادیکال‌های آزاد DPPH بطور چشمگیری افزایش یافت؛ بطوریکه غلظت‌های ۲۰۰ و ۱۶۰۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره به ترتیب فعالیت دام اندازی ۶/۵۲ و ۷۰/۸ درصدی نشان دادند. علاوه بر این، افزودن عصاره برگ بو به روغن کانولا سبب

افزایش شاخص پایداری اکسایشی و کاهش شاخص پراکسید طی زمان نگهداری گردید (۲۷). در مطالعه‌ای دیگر مشخص گردید که عصاره متانولی برگ گیاه برگ بو حاوی آلفا، بتا، گاما و دلتا توکوفرول می‌باشد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها در منابع مختلف گزارش شده است (۲۲). کارینونیچ و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که عصاره متانولی برگ بو دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی در شرایط برون‌تنی و درون تنی است (۱۲). همچنین، قدرت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS و احیاء کنندگی آهن فریک عصاره آبی برگ بو در مطالعه‌ی عظیم زاده و همکاران (۱۳۹۶) گزارش شده است (۲۱). بطور کلی تفاوت‌های مشاهده شده بین نتایج این پژوهش با یافته‌های سایر محققین را می‌توان به تغییرات آب و هوا و محل گیاهان و استفاده از حلال‌های مختلف برای استخراج ترکیبات زیست فعال نسبت داد (۳۱-۲۸).

نتیجه‌گیری

افزودنی‌های سنتزی بطور گسترده ای در مواد غذایی استفاده می‌شوند. با این‌حال، افزودنی‌های سنتزی در سال‌های اخیر به دلیل اثرات نامطلوب مفروض آن‌ها بر سلامتی، کمتر مورد پذیرش مصرف‌کنندگان قرار گرفته‌اند. بنابراین گرایش مصرف‌کنندگان به مواد افزودنی طبیعی روز به روز در حال افزایش است. بطور کلی، نتایج آزمون‌های برون تنی عصاره اتانولی برگ بو نشان داد که عصاره غنی از ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی بالا می‌باشد. بنابراین می‌توان از پتانسیل بالقوه برگ بو در صنایع داروسازی و غذایی بهره برد.

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. Faour-Klingbeil D, C. D. Todd E. Prevention and Control of Foodborne Diseases in Middle-East North African Countries: Review of National Control Systems. International Journal of Environmental Research and Public Health. 2020;17(1):70.
2. Havelaar AH ,Kirk MD, Torgerson PR, Gibb HJ, Hald T, Lake RJ, et al. World Health Organization global estimates and regional comparisons of the burden of foodborne disease in 2010. PLoS medicine. 2015;12(12):e1001923.
3. Baltzer SA, Brown MH. Antimicrobial peptides–promising alternatives to conventional antibiotics. Journal of molecular microbiology and biotechnology. 2011;20(4):228-35.
4. 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.
5. Manandhar S, Luitel S, Dahal RK. In Vitro Antimicrobial Activity of Some Medicinal Plants against Human Pathogenic Bacteria. Journal of Tropical Medicine. 2019;2019:1895340.
6. Alizadeh Behbahani B, Tabatabaei Yazdi F, Mortazavi SA, Zendeboodi F, Gholian MM, Vasiee A. Effect Of Aqueous And Ethanolic Extract Of Eucalyptus Camaldulensis L. On Food Infection And Intoxication Microorganisms "In Vitro". Journal of paramedical sciences. 2013;4(3):89-99.
7. Alizadeh Behbahani B, Tabatabaei Yazdi F, Noorbakhsh H, Riazi F, Jajarmi A , Tabatabaei Yazdi F. Study Of The Antibacterial Activity Of Methanolic And Aqueous Extracts Of Myrtus Communis On Pathogenic Strains Causing Infection. Zahedan Journal of Research in Medical Sciences. 2016;18(2):1-6.
8. Alizadeh Behbahani B, Noshad M ,Jooyandeh H. Improving oxidative and microbial stability of beef using Shahri Balangu seed mucilage loaded with Cumin essential oil as a bioactive edible coating. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 2020;24:101563.
9. Anand U, Jacobo-Herrera N ,Altemimi A, Lakhssassi N. A comprehensive review on medicinal plants as antimicrobial therapeutics: potential avenues of biocompatible drug discovery. Metabolites. 2019;9(11):258.
10. Fidan H, Stefanova G, Kostova I, Stankov S, Damyanova S, Stoyanova A, et al. Chemical composition and antimicrobial activity of Laurus nobilis L. essential oils from Bulgaria. Molecules. 2019;24(4):804.

11. Patrakar R, Mansuriya M, Patil P. Phytochemical and pharmacological review on Laurus nobilis. International journal of pharmaceutical and chemical sciences. 2012;1(2):595-602.

12. Kaurinovic B, Popovic M, Vlaisavljevic S. In vitro and in vivo effects of Laurus nobilis L. leaf extracts. Molecules. 2010;15(5):3378-90.

13. Alizadeh Behbahani B, Tabatabaei Yazdi F, Fakhri S ,Riazi F. Antifungal Effect Of The Aqueous And Ethanolic Avicennia Marina Extracts On Alternaria Citri And Penicillium Digitatum. Zahedan Journal of Research in Medical Sciences. 2016;18(2):e5992.

14. Barzegar H, Alizadeh Behbahani B, 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.

15. Alizadeh Behbahani B, Shahidi F. Melissa officinalis essential oil: Chemical compositions, antioxidant potential, total phenolic content and antimicrobial activity. Nutr Food Sci Res. 2019;6:17-25.

16. Alizadeh Behbahani B, Noshad M, Falah F. Study of chemical structure, antimicrobial, cytotoxic and mechanism of action of *syzygium aromaticum* essential oil on foodborne pathogens. Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences.2019; 13(1): 875-83.

17. Alghooneh A, Alizadeh Behbahani B, Noorbakhsh H, Yazdi FT. Application of intelligent modeling to predict the population dynamics of Pseudomonas aeruginosa in Frankfurter sausage containing Satureja bachtiarica extracts. Microbial pathogenesis. 2015;85:58-65.

18. 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. 2021;17(1):83-91.

19. 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): 463-84.

20. Alizadeh Behbahani B, Falah F, Vasiee A, Tabatabaee Yazdi F. Control of microbial growth and lipid oxidation in beef using a Lepidium perfoliatum seed mucilage edible coating incorporated with chicory essential oil. Food Science & Nutrition. 2021; 9(5): 2458-67.

21. Azimzadeh B, Jahadi M, Fazel M. Antioxidant and antibacterial effects of laurus nobilis aqueous extract again Staphylococcus aureus and Escherichia coli. Food Hygiene. 2017;7(1 (25)):65-73.

22. Pedram Nia A, Mortazavi SA, Nemat Shahi MM. Study of Chemical Compounds and The Antimicrobial Effects of Leaf Extract of Laurus nobilis L on Various Microbial Strains. Journal of food science and technology(Iran). 2018;15(81):217-27.

23. Zanganeh H, Mortazavi SA, Shahidi F, Alizadeh Behbahani B. Evaluation of the chemical and antibacterial properties of Citrus paradise essential oil and its application in Lallemantia iberica seed mucilage edible coating to improve the physicochemical, microbiological and sensory properties of lamb during refrigerated storage. Journal of Food Measurement and Characterization. 2021;15(6):5556-71.

24. Hinneburg I, Dorman HD, Hiltunen R. Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. Food chemistry. 2006;97(1):122-9.

25. Kim H-S, Quon MJ, Kim J-a. New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate. Redox biology. 2014;2:187-95.

26. Ivanova D, Gerova D, Chervenkov T, Yankova T. Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. Journal of ethnopharmacology. 2005;96(1-2):145-50.

27. Nemat Shahi MM, Hadad Khodaparast M, Elhamirad A, Hooshmand Dalir M, Nemat Shahi N. Investigation of chemical composition and antioxidant properties of Laurus nobilis L. leaf extract and its effect on canola oil stability during storage. journal of innovation in food science and technology. 2016;8(1):63-73.

28. Alizadeh Behbahani B, Noshad M, Falah F. Cumin essential oil: Phytochemical analysis, antimicrobial activity and investigation of its mechanism of action through scanning electron microscopy. Microbial pathogenesis. 2019;136:103716.

29. Nooshkam M, Varidi M, Alkobeisi F. Bioactive food foams stabilized by licorice extract/whey protein isolate/sodium alginate ternary complexes. Food Hydrocolloids. 2022:107488.

30. Kiarsi Z, Hojjati M, Alizadeh Behbahani B, Noshad M. In vitro antimicrobial effects of Myristica fragrans essential oil on foodborne pathogens and its influence on beef quality during refrigerated storage. Journal of Food Safety. 2020;40(3):e12782.

31. Heydari S, Jooyandeh H, Alizadeh Behbahani B, Noshad M. The impact of Qodume Shirazi seed mucilage-based edible coating containing lavender essential oil on the quality enhancement and shelf life improvement of fresh ostrich meat: An experimental and modeling study. Food Science & Nutrition. 2020;8(12):6497-512.