فعالیت ضدمیکروبی عصاره اتانولی گیاه روناس صخره‌زی بر باکتری‌های بیماری‌زا در شرایط برون‌تنی

محمد نوشاد[1*]، بهروز علیزاده بهبهانی[2]، مصطفی رحمتی جنیدآباد[3]

۱- دانشیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران
۲- استادیار، 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: **Noshad@asnrukh.ac.ir**

دریافت مقاله : بهمن چهارصد پذیرش برای چاپ: فروردین چهارصد

چکیده

سابقه و هدف: گیاه روناس صخره‌زی (*Rubia florida*) دارای اثرات دارویی مختلفی از جمله ضد سرطان، ضد میکروب و آنتی‌اکسیدان و ضدعفونی کننده می‌باشد. لذا این مطالعه با هدف بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره اتانولی گیاه روناس صخره‌زی در برابر باکتری‌های بیماری‌زا *انتروباکتر آئروژنز*، *اشرشیا کلی*، *استرپتوکوکوس پیوژنز* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* صورت گرفت.

روش کار: روش‌های ضدمیکروبی دیسک دیفیوژن آگار، چاهک آگار، حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی به منظور بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره اتانولی گیاه روناس صخره‌زی در برابر باکتری‌های *انتروباکتر آئروژنز*، *اشرشیا کلی*، *استرپتوکوکوس پیوژنز* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* مورد استفاده قرار گرفتند.

یافته‌ها: اثر ضد باکتریایی عصاره وابسته به غلظت بود و افزایش غلظت آن سبب افزایش قطر هاله عدم رشد گردید. مطابق نتایج آزمون دیسک دیفیوژن آگار و چاهک آگار، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* حساس‌ترین سویه باکتریایی نسبت به عصاره بود. بطوریکه قطر هاله عدم رشد در حضور ۴۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره برای این باکتری، در آزمون دیسک دیفیوژن آگار و چاهک آگار به ترتیب برابر با ۱۴/۶۰ و ۱۵/۸۰ میلی‌متر به دست آمد. علاوه بر این، حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی برای باکتری‌های گرم مثبت کمتر از باکتری‌های گرم منفی بود.

نتیجه‌گیری: عصاره اتانولی گیاه روناس صخره‌زی قابلیت استفاده بعنوان عامل ضد میکروب طبیعی جهت جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا را دارا می‌باشد.

واژگان کلیدی: **روناس صخره‌زی؛ عصاره اتانولی؛ نگهدارنده طبیعی؛ اثر ضدمیکروبی**

مقدمه

در سال ۲۰۰۷، سازمان بهداشت جهانی گروه مرجع اپیدمیولوژی بیماری‌های ناشی از مواد غذایی را به منظور تخمین بار جهانی بیماری‌های ناشی از مواد غذایی تأسیس کرد و این گزارش تخمین زده است که ۳۱ خطر مرتبط با بیماری‌های ناشی از مواد غذایی منجر به بیش از ۶۰۰ میلیون بیماری و ۴۲۰ هزار مرگ در سراسر جهان شده است و ۴۰ درصد از بار بیماری‌های ناشی از مواد غذایی در بین کودکان زیر ۵ سال بود (۱). تخمین زده می‌شود که هر ساله حدود ۷۶ میلیون مورد بیماری‌های ناشی از مواد غذایی، که منجر به ۳۲۵ هزار بستری شدن در بیمارستان و مرگ ۵ هزار نفر می‌شود، تنها در ایالات متحده آمریکا اتفاق می‌افتد (۲). در طول ۲۰ سال گذشته، حداقل در جهان صنعتی، بیماری‌های ناشی از مواد غذایی توسط باکتری‌ها، انگل‌ها، ویروس‌ها و پریون‌ها به طور قابل‌توجهی در دستور کار سیاسی قرار گرفته‌اند و در مواردی توجه رسانه‌ها را به خود جلب کرده‌اند. در سال‌های اخیر، بیماری‌ها و کاهش بهره‌وری ناشی از باکتری‌های بیماری‌زای غذایی توجه

قابل‌توجهی را به خود جلب کرده است. هزاران باکتری بیماری‌زای موجود در غذا بر سلامت و ایمنی جمعیت انسان‌ها، حیوانات و گیاهان در جهان تأثیر می‌گذارند. در میان این باکتری‌ها، کمپیلوباکتر، سالمونلا، لیستریا، اشرشیا کلی، استافیلوکوکوس، انتروباکتر، استرپتوکوکوس و باسیلوس، باکتری‌های پاتوژن اصلی هستند که مسئول اکثر شیوع بیماری‌های ناشی از مواد غذایی می‌باشند (۳).

اشرشیا کلی یکی از شایع‌ترین علل چندین عفونت باکتریایی رایج در انسان و حیوانات است. اشرشیا کلی علت برجسته آنتریت، عفونت مجاری ادراری، سپتی‌سمی و سایر عفونت‌های بالینی مانند مننژیت نوزادان است. درمان عفونت‌های اشرشیا کلی با ظهور مقاومت ضد میکروبی تهدید می‌شود. شیوع سویه‌های اشرشیا کلی مقاوم به چند دارو در سراسر جهان عمدتاً به دلیل گسترش عناصر ژنتیکی متحرک مانند پلاسمیدها در حال افزایش است (۴).

انتروباکتر آئروژنز و انتروباکتر کلواسه دو پاتوژن اغلب جدا شده از عفونت‌های بیمارستانی در میان جنس انتروباکتر هستند. این ارگانیسم‌ها متعلق به فلور گوارشی طبیعی انسان‌ها هستند و بعنوان پاتوژن‌های فرصت‌طلب شناخته می‌شوند که بیماران عمدتاً ضعیف را آلوده می‌کنند. تا همین اواخر، انتروباکتر کلواسه شایع‌ترین گونه گزارش شده در عفونت‌های بیمارستانی مرتبط با این جنس بود، اما انتروباکتر آئروژنز اخیراً به عنوان یک پاتوژن مهم بیمارستانی ظاهر شده است (۵). از سال ۲۰۱۰، انتروباکتر آئروژنز در فرانسه پنجمین باکتری انتروباکتریاسه و هفتمین باسیل گرم منفی است که مسئول عفونت‌های بدخیم بیمارستانی است (۶).

استرپتوکوکوس پیوژنز گروه A یک پاتوژن باکتریایی گرم مثبت مهم است که باعث طیف وسیعی از شرایط بالینی از فارنژیت تا عفونت‌های تهاجمی شدید می‌شود. میزان مرگ و میر گزارش شده عفونت‌های شدید استرپتوکوکوس پیوژنز بالا است و بین ۱۰ تا ۳۰ درصد متغیر است. تعداد مرگ و میر ناشی از این عفونت‌های شدید هر سال حداقل ۶۵۰ هزار نفر تخمین زده می‌شود (۷).

استافیلوکوک‌ها گروه متنوعی از باکتری‌ها هستند که باعث ایجاد بیماری‌هایی از عفونت‌های پوستی خفیف تا کشنده می‌شوند. علیرغم تلاش‌های گسترده برای کنترل شیوع آنها، این گروه از باکتری‌ها به عنوان عامل اصلی عفونت‌های بیمارستانی و اجتماعی در سراسر جهان باقی می‌مانند. تنها در محیط بیمارستان، این گروه مسئول بیش از یک میلیون عفونت جدی در سال هستند. دو پاتوژن فرصت‌طلب اصلی این جنس، استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، بخش قابل‌توجهی از جمعیت انسانی را تهدید می‌کنند. گونه غالب، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، نسبتاً گسترده در سراسر اکوسیستم پوستی است، در حالی که استافیلوکوکوس اورئوس عمدتاً بر روی سطوح مخاطی قرار داشته و منتقل می‌شود. در این زمینه، استافیلوکوک‌ها به طور کلی یک رابطه همزیستی خوش‌خیم با میزبان خود دارند. با اینحال، جراحات پوستی، استافیلوکوک‌ها را قادر می‌سازد تا وارد میزبان شوند و نقش یک پاتوژن را ایفا کنند. مقاومت در برابر اکثر گروه‌های عوامل ضد میکروبی مانند پنی‌سیلین‌ها، ماکرولیدها، آمینوگلیکوزیدها، کلرامفنیکل و تتراسایکلین، درمان و کنترل عفونت‌های استافیلوکوکی را دشوارتر کرده است (۸).

سازگاری باکتری‌ها با آنتی‌بیوتیک‌ها بسیار موفقیت‌آمیز بوده است و در دهه گذشته افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی مشکلات پزشکی قابل‌توجهی ایجاد کرده است (۹). قرن‌هاست که سیستم‌های درمانی سنتی برای درمان عفونت‌های باکتریایی به گیاهان دارویی متکی بوده‌اند. تقریباً ۸۰ درصد از کشورهای در حال توسعه به داروهای سنتی مشتق شده از گیاهان دارویی به عنوان روش مراقبت بهداشتی اولیه خود متکی هستند. بطوریکه گزارش شده است که بیش از ۳۳ درصد از کل داروهای مشتق شده از گیاهان صنعتی شده است و سازمان بهداشت جهانی نام بیش از ۲۰ هزار گونه از گیاهان دارویی را با کاربردهای بالقوه متنوع ثبت کرده است. گیاهان دارویی اغلب ارزان‌تر هستند، استفاده از آنها از نظر عوارض جانبی ایمن‌تر و در مقایسه با همتایان مصنوعی‌شان آسان‌تر است. علاوه بر این، آنها در ترکیبات فعالی که فعالیت ضد میکروبی دارند فراوان هستند. این مواد زیست فعال شامل تانن‌ها، آلکالوئیدها، کربوهیدرات‌ها و گلیکوزیدها، ترپنوئیدها، استروئیدها، فلاونوئیدها و کومارین‌ها هستند. این ترکیبات ارزش بالینی ویژه‌ای دارند زیرا زیست فعالی آنها معمولاً مقاومت ایجاد نمی‌کند (۱۰).

گیاه روناس صخره‌زی (Rubia florida) عمدتاً صنعتی بوده و در زمان گذشته در صنعت رنگرزی استفاده می‌شده است. این گیاه دارای اثرات دارویی مختلفی از جمله ضد سرطان و نقرس می‌باشد. گیاه روناس در برابر شوری و گرما بسیار مقاوم است و در این مناطق رشد بسیار خوبی دارد. این گیاه در ناراحتی‌های کلیوی و مثانه مورد استفاده قرار گرفته و آرامش‌بخش و ضدعفونی کننده است. علاوه بر این، گیاه روناس دارای اثر ضدمیکروبی بوده و باکتری‌های گرم مثبت نسبت به این گیاه حساس‌تر می‌باشند (۱۱). در ریشه این گیاه ترکیبی گلیکوزیدی به نام روبه ریتریک وجود دارد که یکی از مهم‌ترین عوامل درمانی این گیاه است و این ماده در بنزن نامحلول و در آب و آب آهک محلول می‌باشد. از مواد دیگر موجود در گیاه روناس می‌توان به آلیزارین، پورپورین، روبیادین، گلوکز، مشتقات آنتراکینونی، رزینی، مواد چرب و مواد پکتیکی اشاره نمود (۱۲).

در این مطالعه، عصاره اتانولی گیاه روناس صخره‌زی استخراج گردید و ویژگی‌های ضدمیکروبی آن در برابر باکتری‌های پاتوژن و عامل مسمومیت انتروباکتر آئروژنز، اشرشیا کلی، استرپتوکوکوس پیوژنز و

استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس با کمک روش‌های دیسک دیفیوژن آگار، چاهک آگار، حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار

گیاه روناس صخره‌زی در دمای محیط خشک گردید و سپس توسط دستگاه خرد کننده برقی پودر شد و در نهایت در ظروف در بسته نگهداری گردید. عصاره گیری از گیاه روناس صخره‌زی مطابق روش گرمهء و مهدیان (۱۳۹۷) با تغییرات مورد نیاز انجام گردید. برای این منظور، حلال اتانول به ۴۰ گرم از گیاه پودر شده در داخل بشر اضافه شد تا حجم حلال حدود ۲ سانتی‌متر در بالای پودر قرار گرفت. در بشر توسط فویل آلومینیوم بسته شد و سپس بشر به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و بر روی دستگاه شیکر قرار داده شد. عصاره استخراج شده توسط کاغذ صافی از پودر گیاه جداسازی گردید. در ادامه، حلال تازه روی پودرهای گیاه ریخته شد و عصاره گیری به مدت ۲۴ ساعت دیگر تکرار گردید. عصاره استخراج شده مجدداً صاف گردید و تمام عصاره‌ها ترکیب شدند. سپس، عصاره توسط دستگاه روتاری و تحت خلأ در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد تا حلال آن تبخیر گردید. عصاره تغلیظ شده در نهایت در آون با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ روز خشک گردید (۱۳).

فعالیت ضدمیکروبی عصاره اتانولی گیاه روناس صخره‌زی توسط آزمون‌های ضدمیکروبی دیسک دیفیوژن آگار، چاهک آگار، حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی انجام گردید.

سویه‌های باکتریایی لیوفیلیزه شده در این مطالعه (انتروباکتر آئروژنز، اشرشیا کلی، استرپتوکوکوس پیوژنز و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس) از گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان تهیه شدند. کشت‌های باکتریایی لیوفیلیزه شده در شرایط استریل باز شده و در محیط مولر هینتون براث به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. برای تهیه سوسپانسیون میکروبی تازه، کشت استوک در نوترینت آگار کشت داده شد، سپس با محلول رینگر استریل شستشو انجام گرفت و سوسپانسیون میکروبی غلیظ تهیه گردید. از این سوسپانسیون برای تنظیم کدورت سوسپانسیون مورد نظر استفاده شد. کدورت (در ۶۳۰ نانومتر) هر نمونه با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر تنظیم شد و کدورت سوسپانسیون میکروبی بر اساس ۰/۵ مک فارلند یا $1/5 \times 10^8$ Colony Forming Unit/ml تهیه گردید (۱۴).برای انجام آزمون دیسک دیفیوژن آگار، غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره در حلال مناسب تهیه شد. سپس دیسک‌های بلانک به مدت ۱۵ دقیقه در محلول‌های عصاره غوطه‌ور شدند تا کاملاً آغشته شوند. در نهایت، دیسک‌هایی که قبلاً در غلظت‌های معینی از عصاره غوطه‌ور شده بودند، روی سطح محیط کشت قرار داده شدند. پس از آن، پتری‌دیش‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند و اثر ضد میکروبی عصاره بر حسب قطر هاله عدم رشد (میلی‌لیتر) تعیین گردید (۱۵, ۱۶).

آزمون چاهک آگار با استفاده از سوسپانسیون میکروبی با کدورت استاندارد ۰/۵ مک فارلند انجام گردید. برای این منظور، چاهک‌هایی به قطر ۶ میلی‌متر روی محیط کشت مولر هینتون آگار ایجاد شد و سپس با سوسپانسیون میکروبی و ۵۰ میکرولیتر عصاره (غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) پر شدند. پلیت‌های متشکل از باکتری‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند و سپس فعالیت ضد میکروبی عصاره با اندازه‌گیری ناحیه مهار (میلی‌متر) در اطراف هر چاهک ارزیابی شد (۱۷).

برای اندازه‌گیری حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره، از روش میکرودایلوشن براث در پلیت ۹۶ خانه‌ای استریل استفاده شد. غلظت‌های متوالی عصاره (۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۸، ۲۵۶، ۵۱۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) ابتدا در محیط کشت مولر هینتون براث تهیه شد. مخلوط‌های به‌دست‌آمده از طریق فیلتر سر سرنگی (۰/۴۵ میکرون) فیلتر شدند و سپس عصاره استریل (۱۰۰ میکرولیتر) به هر چاهک حاوی ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی با معادل ۰/۵ مک فارلند منتقل شد. در ادامه، پلیت‌ها با توجه به شرایط فوق برای روش‌های دیسک دیفیوژن آگار و چاهک آگار انکوبه شدند. پس از افزودن ۲۰ میکرولیتر تری‌فنیل‌تترازولیوم کلرید ۵ درصد به چاهک‌ها، پلیت‌ها مجدداً به مدت ۳۰ دقیقه برای باکتری‌ها انکوبه شدند. رشد میکروبی باعث ایجاد رنگ قرمز تیره در چاهک‌ها می‌شود. اولین غلظت عصاره که قادر به سرکوب رشد میکروبی و جلوگیری از تشکیل رنگ قرمز بود، بعنوان حداقل غلظت مهارکنندگی در نظر گرفته شد (۱۸, ۱۹).

در آزمون حداقل غلظت کشندگی، ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک‌های بدون رشد میکروبی (بر اساس نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی) برداشته شد و روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد و سپس گرمخانه گذاری تحت شرایط ذکر شده برای آزمون‌های فوق انجام گردید. کمترین غلظت عصاره که سبب از بین بردن سویه‌های میکروبی گردید (عدم تشکیل کلنی)، بعنوان حداقل غلظت کشندگی در نظر گرفته شد (۱۴, ۱۵, ۲۰).

تمام آزمون‌ها در سه تکرار انجام شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۱۸) و از طریق آنالیز واریانس یک‌طرفه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و اختلاف بین میانگین داده‌ها با کمک آزمون دانکن در $p< ۰/۰۵$ تعیین شد.

یـافـتـه هـا

با افزایش غلظت اثر ضد میکروبی عصاره افزایش می‌یابد (p< ۰/۰۵) اما میزان اثر آن در تمامی باکتری‌ها یکسان نمی‌باشد. به گونه‌ای که غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره فاقد اثر ضد میکروبی روی باکتری‌های انتروباکتر آئروژنز و اشرشیا کلی بود، در حالی که این غلظت بر روی باکتری‌های استرپتوکوکوس پیوژنز و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس اثر ضد میکروبی معنی‌داری نشان داد. غلظت ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره خاصیت ضد میکروبی روی باکتری انتروباکتر آئروژنز نداشت. همچنین در غلظت ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بین قطر هاله‌های عدم رشد حاصل از باکتری‌های اشرشیا کلی، استرپتوکوکوس پیوژنز و باکتری استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس اختلاف قابل توجهی مشاهده شد. غلظت ۳۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره روی باکتری‌های اشرشیا کلی، انتروباکتر آئروژنز، استرپتوکوکوس پیوژنز و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس اثر ضد میکروبی بالایی نشان داد. در غلظت ۴۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر قطر هاله‌های عدم رشد در باکتری‌های مختلف اختلاف قابل توجهی با یکدیگر داشتند. به طور کلی مشاهده می‌شود که کمترین قطر هاله عدم رشد مربوط به باکتری استرپتوکوکوس پیوژنز با قطر ۷/۰۰ میلی‌متر و بیشترین میزان آن مربوط به باکتری استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس با قطر ۱۴/۶۰ میلی‌متر می‌باشد. براساس آنالیز آماری مشخص گردید در سطح آماری ۵ درصد میان تمامی غلظت‌های مورد بررسی به جز غلظت ۲۰ با ۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای باکتری‌های اشرشیا کلی و استرپتوکوکوس پیوژنز و همچنین غلظت ۳۰ با ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای باکتری انتروباکتر آئروژینوزا اختلاف معنی‌داری مشاهده شد(جدول ۱).

جدول ۱- میانگین قطر هاله عدم رشد (برحسب میلی‌متر) عصاره اتانولی گیاه روناس صخره‌زی در برابر باکتری‌های پاتوژن، بر اساس روش دیسک دیفیوژن آگار

باکتری	غلظت عصاره (میلی‌گرم در میلی‌لیتر)			
	۱۰	۲۰	۳۰	۴۰
انتروباکتر آئروژنز	-	-	۸/۲۰±۰/۴۴ [a]	۹/۰۰±۰/۵۸ [a]
اشرشیا کلی	-	۷/۷۰±۰/۳۸ [b]	۸/۴۰±۰/۵۲ [b]	۱۰/۵۰±۰/۲۷ [a]
استرپتوکوکوس پیوژنز	۷/۰۰±۰/۱۳ [c]	۹/۱۰±۰/۵۵ [b]	۱۰/۱۰±۰/۴۷ [b]	۱۳/۰۰±۰/۲۳ [a]
استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس	۷/۲۰±۰/۱۶ [d]	۹/۸۰±۰/۲۷ [c]	۱۱/۷۰±۰/۱۵ [b]	۱۴/۶۰±۰/۳۰ [a]

حروف متفاوت (a، b، c و d) در هر سطر بیان اختلاف معنی‌دار بین غلظت‌های مختلف عصاره در p < ۰/۰۵ می‌باشد.

قطر هاله‌های عدم رشد در روش چاهک آگار بیشتر از روش دیسک دیفیوژن آگار می‌باشد اما همانند روش قبل در این روش نیز افزایش غلظت سبب افزایش اثر ضد میکروبی می‌شود (p< ۰/۰۵). در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر هیچگونه اثر ضد میکروبی بر روی باکتری‌های مشاهده نشد و این غلظت دارای اثر قابل توجی بر روی باکتری‌های استرپتوکوکوس پیوژنز و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس بود. در غلظت ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، قطر هاله‌های عدم رشد در باکتری‌های انتروباکتر آئروژنز و اشرشیا کلی کمتر از باکتری‌های استرپتوکوکوس پیوژنز و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس بود. همچنین غلظت‌های ۳۰ و ۴۰ میلی‌لیتر اثر ضد میکروبی قابل توجهی روی باکتری‌های مورد مطالعه نشان دادند. به طور کلی کمترین قطر هاله عدم رشد در باکتری‌های استرپتوکوکوس پیوژنز و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس (قطر ۷/۵۰ میلی‌متر) و بیشترین میزان قطر هاله عدم رشد در باکتری استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس (قطر ۱۵/۸۰ میلی‌متر) می‌باشد. علاوه بر این، باکتری‌های گرم مثبت نسبت به انواع گرم منفی در برابر عصاره حساس‌تر بودند(جدول ۲). براساس آنالیز آماری در سطح آماری ۵ درصد میان تمامی غلظت‌های مورد بررسی به جز غلظت ۲۰ با ۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای باکتری‌های انتروباکتر آئروژنز و اشرشیا کلی اختلاف معنی‌داری مشاهده شد.

جدول ۲- میانگین قطر هاله عدم رشد (برحسب میلی‌متر) عصاره اتانولی گیاه روناس صخره‌زی در برابر باکتری‌های پاتوژن، بر اساس روش چاهک آگار

باکتری	غلظت عصاره (میلی‌گرم در میلی‌لیتر)			
	۱۰	۲۰	۳۰	۴۰
انتروباکتر آئروژنز	-	۸/۰۰±۰/۳۱ b	۸/۵۰±۰/۲۶ b	۱۰/۶۰±۰/۳۲ a
اشرشیا کلی	-	۸/۴۰±۰/۲۹ b	۹/۰۰±۰/۴۱ b	۱۱/۲۰±۰/۳۷ a
استرپتوکوکوس پیوژنز	۷/۵۰±۰/۲۷ d	۹/۸۰±۰/۵۰ c	۱۲/۷۰±۰/۱۹ b	۱۵/۰۰±۰/۱۵ a
استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس	۷/۵۰±۰/۲۰ d	۱۰/۵۰±۰/۳۶ c	۱۲/۶۰±۰/۲۸ b	۱۵/۸۰±۰/۳۳ a

حروف متفاوت (a، b، c و d) در هر سطر بیان اختلاف معنی‌دار بین غلظت‌های مختلف عصاره در $p < ۰/۰۵$ می‌باشد.

کمترین غلظت مهارکنندگی مربوط به باکتری‌های استرپتوکوکوس پیوژنز و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و بیشترین غلظت مربوط به باکتری‌های انتروباکتر آئروژنز و اشرشیا کلی می‌باشد. همچنین کمترین غلظت کشندگی مربوط به باکتری استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس بوده و پس از آن باکتری استرپتوکوکوس پیوژنز و باکتری‌های انتروباکتر آئروژنز و اشرشیا کلی قرار دارد. نتایج نشان داد که حداقل غلظت مهارکنندگی برای باکتری‌های انتروباکتر آئروژنز، اشرشیا کلی، استرپتوکوکوس پیوژنز و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس به ترتیب ۳۲، ۳۲، ۸ و ۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. حداقل غلظت کشندگی برای باکتری‌های انتروباکتر آئروژنز، اشرشیا کلی، استرپتوکوکوس پیوژنز و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس به ترتیب بزرگتر از ۵۱۲، بزرگتر از ۵۱۲، ۵۱۲ و ۲۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود.

بحث

سازگاری باکتری‌ها با آنتی‌بیوتیک‌ها بسیار موفقیت‌آمیز بوده است و در دهه گذشته افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی مشکلات پزشکی قابل‌توجهی ایجاد کرده است. بنابراین، بیشتر کشورهای جهان از داروهای سنتی مشتق شده از گیاهان دارویی به عنوان جایگزین داروهای سنتزی استفاده می‌نمایند. در این پژوهش، تأثیر ضدمیکروبی عصاره اتانولی گیاه روناس صخره‌زی بر باکتری‌های انتروباکتر آئروژنز، اشرشیا کلی، استرپتوکوکوس پیوژنز و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس بررسی گردید. نتایج نشان داد که اثر ضدمیکروبی عصاره وابسته به غلظت آن می‌باشد و افزایش غلظت عصاره منجر به افزایش معنی‌دار قطر هاله عدم رشد در آزمون‌های دیسک دیفیوژن آگار و چاهک آگار گردید. در راستای نتایج این مطالعه، گزارش شده است که اسانس و عصاره‌های گیاهی دارای اثر ضدمیکروبی وابسته به غلظت می‌باشند (۱۵, ۲۲-۲۰).

علاوه بر این، مقایسه نتایج آزمون‌های دیسک دیفیوژن آگار و چاهک آگار نشان داد که قطر هاله عدم رشد در آزمون چاهک آگار بالاتر از آزمون دیسک دیفیوژن آگار می‌باشد که هماهنگ با نتایج علیزاده بهبهانی و همکاران (۲۰۱۷) (۲۳)، نوشاد و همکاران (۲۰۱۸) (۲۴)، علیزاده بهبهانی و همکاران (۲۰۲۰) (۲۵) و حیدری و همکاران (۲۰۲۰) (۲۶) می‌باشد. این محققین بیان نمودند که گونه‌های باکتریایی در روش انتشار چاهک آگار در تماس مستقیم با عصاره/اسانس هستند، اما سرعت انتشار عامل ضد میکروبی از سطوح دیسک به محیط، اثر بازدارندگی آن را در آزمایش دیسک دیفیوژن آگار تعیین می‌کند.

همچنین لازم به ذکر است که مطابق نتایج آزمون‌های ضدمیکروبی دیسک دیفیوژن آگار، چاهک آگار، حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس بیشترین حساسیت را نسبت به عصاره اتانولی گیاه روناس صخره‌زی نشان داد. بطورکلی، باکتری‌های گرم مثبت استرپتوکوکوس پیوژنز و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس حساسیت بالاتری نسبت به باکتری‌های گرم منفی انتروباکتر آئروژنز و اشرشیا کلی در برابر عصاره اتانولی گیاه روناس صخره‌زی نشان دادند. این حالت 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 عمدتاً از لیپوپروتئین و لیپوپلی ساکارید تشکیل شده است که در نتیجه منجر به مقاومت بالاتر در برابر عوامل ضد باکتریایی می‌شود (۱۴, ۳۱-۲۷).

گرمهء و مهدیان (۱۳۹۷) با بررسی خاصیت ضدمیکروبی عصاره الکلی (اتیل استات) گیاه روناس صخره‌زی بر باکتری‌های بیماری‌زای مواد غذایی (لیستریا مونوسیتوژنز، اشرشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس) نشان دادند که در روش چاهک آگار، هیچ هاله عدم رشدی بر روی باکتری‌های گرم مثبت و منفی مشاهده نشد. در روش دیسک دیفیوژن آگار، قطر هاله عدم رشد دو باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا مونوسیتوژنز اختلاف معنی‌داری

با یکدیگر نداشته و هاله عدم رشدی برای باکتری اشرشیا کلی مشاهده نشد. کمترین و بیشترین میزان حداقل غلظت مهارکنندگی به ترتیب برای لیستریا مونوسیتوژنز و اشرشیا کلی حاصل گردید، اما اختلاف معنی‌داری بین مقادیر حداقل غلظت کشندگی در مورد سه باکتری مشاهده نگردید. نتایج این محققین نشان داد که بطور کلی حساسیت باکتری‌های گرم مثبت نسبت به عصاره روناس صخره‌زی در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی بالاتر است (۱۳) که در هم‌راستا با نتایج این مطالعه می‌باشد.

آل شیخ و همکاران (۱۳۹۸) گزارش نمودند که عصاره متانولی گیاه روناس صخره‌زی دارای اثر ضدمیکروبی قابل‌توجهی بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد و قطر هاله عدم رشد در آزمون‌های دیسک دیفیوژن آگار و چاهک آگار در مورد این باکتری به ترتیب ۱۰ و ۶ میلی‌متر به دست آمد (۱۱). مطالعات بسیاری بر روی اثر ضدمیکروبی عصاره‌های هیدرو الکلی گونه‌های مختلف جنس Rubia انجام شده است (۳۵-۳۲).

اثر ضدمیکروبی عصاره هیدرو الکلی گیاه صخره‌زی ممکن است ناشی از حضور ترکیبات فنولی در آن باشد. مکانیسم‌های مختلفی برای فعالیت ضد میکروبی پلی فنول‌ها تصور می‌شود. یکی از مکانیسم‌های اثبات شده، مهار آنزیم توسط ترکیبات اکسید شده است که احتمالاً از طریق واکنش با پروتئین‌ها از طریق گروه‌های SH- یا از طریق فعل و انفعالات غیر اختصاصی صورت می‌گیرد. یافته‌های متناقضی در مورد میزان سمیت روی میکروارگانیسم‌ها و درجه هیدروکسیله شدن در منابع علمی وجود دارد. برخی از مطالعات نشان می‌دهند که فنول‌های بسیار اکسید شده یا آن‌هایی که OHهای بیشتری دارند نسبت به آن‌هایی که کمتر اکسید شده‌اند، مهارکننده‌تر هستند. علاوه بر این، فلاونوئیدها با گروه‌های (OH) بیشتر، فعالیت ضد میکروبی بیشتری داشتند. با اینحال، مطالعات دیگر نشان می‌دهد که فلاونوئیدهای فاقد گروه‌های هیدروکسیل در حلقه‌های بتا در اختلالات غشایی در اهداف میکروبی فعال‌تر هستند. علاوه بر این، برخی از فنول ها مانند کینون‌ها به عنوان منبع رادیکال‌های آزاد پایدار عمل می‌کنند و به طور برگشت ناپذیری با پروتئین‌ها متصل می‌شوند که منجر به از دست دادن عملکرد آن می‌شود. از سایر مکانیسم‌های ضدمیکروبی ترکیبات فنولی می‌توان به غیرفعال کردن آنزیم‌ها، اتصال روی سطح سلول میکروبی، اتصال به پروتئین‌های دیواره سلولی، برهمکنش با سوبستراها، از دسترس خارج کردن سوبستراها برای میکروارگانیسم و کمپلکس شدن با یون‌های فلزی اشاره نمود (۳۶).

نتیجه‌گیری

مطابق نتایج این پژوهش، عصاره اتانولی گیاه روناس صخره‌زی دارای فعالیت ضد باکتریایی قابل‌توجهی بر سویه‌های باکتریایی گرم مثبت (استرپتوکوکوس پیوژنز و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس) و گرم منفی (انتروباکتر آئروژنز و اشرشیا کلی) می‌باشد. بنابراین پیشنهاد می‌گردد که مطالعات گسترده‌تری در مورد ترکیبات زیست فعال تشکیل دهنده عصاره و بررسی ویژگی‌های بیولوژیکی در شرایط درون تنی و برون‌تنی صورت گیرد تا این گیاه بعنوان داروی طبیعی جهت درمان بیماری‌های عفونی و کنترل رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا معرفی گردد.

تقدیر و تشکر

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

REFERENCE

1. Cissé G. Food-borne and water-borne diseases under climate change in low- and middle-income countries: Further efforts needed for reducing environmental health exposure risks. Acta Tropica. 2019;194:181-8.
2. Newell DG, Koopmans M, Verhoef L, Duizer E ,Aidara-Kane A, Sprong H, et al. Food-borne diseases — The challenges of 20years ago still persist while new ones continue to emerge. International Journal of Food Microbiology. 2010;139:S3-S15.
3. Wang Y, Ye Z, Ying Y. New Trends in Impedimetric Biosensors for the Detection of Foodborne Pathogenic Bacteria. Sensors. 2012;12(3):3449-71.
4. Allocati N, Masulli M, Alexeyev MF, Di Ilio C. Escherichia coli in Europe: An Overview. International Journal of Environmental Research and Public Health. 2013;10(12):6235-54.
5. Ronveaux O, De Gheldre Y, Glupczynski Y, Struelens M, De Mol P. Emergence of Enterobacter aerogenes as a major antibiotic-resistant nosocomial pathogen in Belgian hospitals. Clinical Microbiology and Infection. 1999;5(10):622-7.
6. Davin-Regli A, Pagès J-M. Enterobacter aerogenes and Enterobacter cloacae; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. Frontiers in Microbiology. 2015;6.
7. Terao Y. The virulence factors and pathogenic mechanisms of Streptococcus pyogenes. Journal of Oral Biosciences. 2012;54(2):96-100.
8. Gill SR, Fouts DE, Archer GL, Mongodin EF, Deboy RT, Ravel J, et al. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant Staphylococcus aureus strain and a biofilm-producing methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis strain. J Bacteriol. 2005;187(7):2426-38.
9. Andersson DI. Persistence of antibiotic resistant bacteria. Current Opinion in Microbiology. 2003;6(5):452-6.
10. Cheesman MJ, Ilanko A, Blonk B, Cock IE. Developing New Antimicrobial Therapies: Are Synergistic Combinations of Plant Extracts/Compounds with Conventional Antibiotics the Solution? Pharmacogn Rev. 2017;11(22):57-72.

11. Alesheikh P, Feyzi P, Moghaddam PZ, Mohammadi A, Kasaian J, Nezhad AA, et al. Antibacterial Activity of Methanolic Extract of Some Native Medicinal Herbs of North Khorasan Province on Staphylococcus aureus. Journal of North Khorasan University of Medical Sciences. 2019;11(2):59-65.

12. Arianfar A, Mehraban Sang Atash M SAS. Identification of chemical constituents of essential oil from aerial parts of florida Rubia. Journal of North Khoras an University of Medical sciences. 2017;9(1):15-26.

13. Garmehei B, Mahdian E. Evaluation the antimicrobial activity of Rubia Florida alcoholic extract on some pathogenic bacteria in foods. Journal of food science and technology(Iran). 2018;15(75):266-59.

14. 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 (TABIB-E-SHARGH). 2016;18(2).

15. 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 (TABIB-E-SHARGH) 2016;18(2):e5992.

16. Behbahani BA, 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.

17. 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.

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):463-84.

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

20. 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”. ARCHIVES OF ADVANCES IN BIOSCIENCES (JOURNAL OF PARAMEDICAL SCIENCES) 2013;4(3):89-99.

21. Alizadeh Behbahani B, Shahidi F. Melissa officinalis essential oil: Chemical compositions, antioxidant potential, total phenolic content and antimicrobial activity. Nutrition and Food Sciences Research. 2019;6(1):17-25.

22. Rahmati-Joneidabad M, Alizadeh Behbahani B. Identification of chemical compounds, antioxidant potential, and antifungal activity of Thymus daenensis essential oil against spoilage fungi causing apple rot. Iranian Food Science and Technology Research. 2021;17(5):691-700.

23. 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.

24. 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.

25. 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.

26. 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.

27. 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.

28. Nooshkam M, Varidi M, Verma DK. Functional and biological properties of Maillard conjugates and their potential application in medical and food: A review. Food research international. 2020;131:109003.

29. Nooshkam M, Falah F, Zareie Z, Tabatabaei Yazdi F, Shahidi F, Mortazavi SA. Antioxidant potential and antimicrobial activity of chitosan–inulin conjugates obtained through the Maillard reaction. Food Science and Biotechnology. 2019;28(6):1861-9.

30. Shahidi F, Tabatabaei Yazdi F, Nooshkam M, Zareie Z, Fallah F. Chemical modification of chitosan through non-enzymatic glycosylation reaction to improve its antimicrobial and anti-oxidative properties. Iranian Food Science and Technology Research Journal. 2020; 16(1):117-129.

31. Kiarsi Z, Hojjati M, Behbahani BA, 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.

32. Naidu K, Lalam R, Bobbarala V. Antimicrobial agents from Rubia cordifolia and Glycyrrhiza glabra against phytopathogens of Gossypium. Int J Pharm Tech Res. 2009;1:1512-8.

33. Basu S, Ghosh A, Hazra B. Evaluation of the antibacterial activity of Ventilago madraspatana Gaertn., Rubia cordifolia Linn. and Lantana camara Linn.: isolation of emodin and physcion as active antibacterial agents. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives. 2005;19(10):888-94.

34. Meena A, Pal B, Panda P, Sannd R, Rao M. A review on Rubia cordifolia: its phyto constituents and therapeutic uses. Drug Invention Today. 2010;2(5):244-6.

35. Barlow R, Barnes D, Campbell AM, Nigam PS, Owusu-Apenten RK. Antioxidant, anticancer and antimicrobial, effects of Rubia cordifolia aqueous root extract. 2015.

36. Othman L, Sleiman A, Abdel-Massih RM. Antimicrobial activity of polyphenols and alkaloids in middle eastern plants. Frontiers in microbiology. 2019;10:911.