



ارزیابی فعالیت ضد میکروبی عصاره آبی گیاه گزنه (*Urtica dioica*) بر تعدادی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی در شرایط آزمایشگاهی

پریسا قاسمی^۱، بهروز عزیزاده بهبهانی^{۲*}، محمد نوشاد^۲

۱. دانشجوی دکتری، 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

اطلاعات مقاله	چکیده
<p>تاریخ های مقاله :</p> <p>تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۲/۳</p> <p>تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۴/۹</p>	<p>گیاهان دارویی از دیرباز به عنوان منبعی برای درمان بیماری‌ها مورد استفاده قرار گرفته‌اند. گیاه گزنه (<i>Urtica dioica</i>) دارای خواص ضدالتهابی، دیورتیک، آنتی‌هیستامین، ضد میکروبی و تقویت کننده سیستم ایمنی است. هدف از این مطالعه، بررسی اثر ضد میکروبی عصاره آبی برگ گزنه با روش‌های دیسک دیفیوژن آگار، چاهک آگار، حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی بر تعدادی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی در شرایط آزمایشگاهی بود. نتایج آزمون‌های دیسک دیفیوژن آگار و چاهک آگار نشان داد که حساس‌ترین و مقاوم‌ترین سویه بیماری‌زا نسبت به عصاره آبی برگ گزنه <i>استافیلوکوکوس اورئوس</i> و <i>سالمونلا تیفی</i> می‌باشند. با افزایش غلظت عصاره برگ گزنه قطر هاله عدم رشد برای تمامی سویه‌های بیماری‌زا مورد بررسی به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. نتایج نشان داد که حداقل غلظت مهارکنندگی برای باکتری‌های گرم منفی از جمله <i>اشرشیا کلی</i>، <i>سالمونلا تیفی</i> و <i>سودوموناس ائروژینوزا</i> به ترتیب ۱۲۸، ۲۵۶ و ۲۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و برای باکتری‌های گرم مثبت از جمله <i>لیستریا اینوکوا</i>، <i>استافیلوکوکوس اورئوس</i> و <i>باسیلوس سرئوس</i> به ترتیب ۱۲۸، ۶۴ و ۱۲۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. نتایج حداقل غلظت کشندگی برای همه سویه‌های مورد بررسی بزرگتر از ۵۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. مطالعه حاضر نشان داد که می‌توان از عصاره آبی برگ گزنه به عنوان یک ترکیب ضد میکروبی طبیعی در صنعت غذا بهره برد.</p>
<p>کلمات کلیدی:</p> <p>گیاه گزنه، باکتری‌های بیماری‌زا، ضد میکروبی، عصاره آبی.</p>	
<p>DOI:10.22034/FSCT.21.154.173.</p> <p>* مسئول مکاتبات: B.alizadeh@asnrukh.ac.ir</p>	

۱- مقدمه

مصرف گیاهان دارویی دارای قدمت زیادی در جهان است به طوری که ۸۰ درصد از کشورهای در حال توسعه همچنان از داروهای سنتی به دست آمده از گیاهان دارویی بهره‌مند می‌شوند. سازمان بهداشت جهانی همچنین نام بیش از ۲۰۰۰۰ گونه گیاه دارویی را ثبت کرده است و گیاهان دارویی را به عنوان یکی از منابع بالقوه داروهای جدید توصیف کرده است. بیش از ۱۳۴۰ گیاه با فعالیت ضد میکروبی تعریف شده وجود دارد و بیش از ۳۰۰۰۰ ترکیب ضد میکروبی از گیاهان جدا شده است. علاوه بر این، برآورد شده است که ۱۴ تا ۲۸ درصد از گونه‌های گیاهی عالی دارویی هستند و ۷۴ درصد از ترکیب‌های گیاهی با خاصیت زیستی بر اساس مصارف دارویی کشف شده‌اند [۱-۲].

آنتی‌بیوتیک‌ها مطمئناً یکی از حیاتی‌ترین اکتشافات درمانی قرن بیستم هستند. از سوی دیگر، تنها یک سوم بیماری‌های عفونی با استفاده از این داروهای مصنوعی درمان می‌شوند. به خاطر استفاده بی‌رویه و نادرست گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها، مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سال‌های اخیر افزایش یافته است بنابراین، تقاضای فزاینده‌ای برای توسعه عوامل ضد میکروبی جدید وجود دارد که بتواند استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها را کاهش دهد و با توسعه مقاومت مقابله کند. این امر محققان را به سمت جداسازی و شناسایی مواد شیمیایی زیستی جدید از گیاهان برای مقابله با مقاومت میکروبی سوق داده است [۳]. همچنین با در نظر گرفتن اینکه تقریباً ۵۰ درصد از داروها و مواد غذایی-دارویی فعلی محصولات طبیعی و مشتقات آن‌ها هستند [۴]. گیاهان دارویی یکی از منابعی است که دارای طیف گسترده‌ای از ترکیب‌های فعال بیولوژیکی هستند، اما هنوز بخش زیادی از آن‌ها کشف نشده‌اند. در حال حاضر، حدود یک سوم از داروهای تجاری دارای حداقل یک ترکیب گیاهی هستند. در سراسر جهان، گیاهان دارویی و ترکیب‌های آن‌ها به عنوان جایگزین بالقوه آنتی-بیوتیک‌ها در برابر بیماری‌های عفونی پیشنهاد شده است [۵-۶].

در این راستا، عصاره‌های گیاهی منابع از مولکول‌های ضد-میکروبی هستند. به دلیل دارا بودن منشأ طبیعی و به طور کلی، خواص ضد میکروبی و بیولوژیکی مناسب، از مقبولیت بالایی در بین مصرف‌کنندگان برخوردارند. افزایش کاربرد این عصاره‌ها، ناشی از مزایایی متعددی از جمله کاهش بروز بیماری‌ها، مشکلات زیست‌محیطی و مقاومت میکروبی به مواد نگهدارنده شیمیایی است. بنابراین، عصاره‌های گیاهی به عنوان جایگزینی مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها، می‌توانند نقشی مؤثر در ارتقای سلامت انسان و حفظ محیط زیست ایفا کنند [۷].

گیاه گزنه با نام علمی *Urtica dioica* L. و متعلق به خانواده Urticaceae می‌باشد. گیاهی علفی و چند ساله که حداکثر ارتفاع آن دو متر با برگ‌های خاردار است. که در زمین‌های مرطوب و چمن‌زارها در نقاط سایه‌دار می‌روید. گیاه گزنه در مناطق معتدل اروپا، آسیا، شمال آفریقا و آمریکای شمالی یافت می‌شود [۸-۹]. این گیاه در زمان‌های قدیم به عنوان یک گیاه دارویی استفاده می‌شده است و هنوز هم در طب سنتی برای طیف گسترده‌ای از بیماری استفاده می‌شود. همچنین دارای اثرات ضد التهابی، ضد میکروبی و ضد درد است. علاوه بر این، برای درمان فشار خون بالا، روماتیسم، آرتریت و بیماری‌های قلبی پیشنهاد می‌شود. گیاه گزنه حاوی عناصر معدنی (Ca, Mg, Zn, Mn, Cu) و ویتامین (A, B2, B5, B9, C, D, E, K، کاروتنوئیدها، است [۱۰-۱۱].

مرادی و همکاران (۱۳۹۶)، نشان دادند که عصاره آبی گیاه گزنه دو پایه داری خواص ضد باکتریایی و ضد قارچی می‌باشد و بر این اساس می‌تواند بر طیف گسترده‌ی از میکروارگانیسم‌ها اثر داشته باشد [۱۲]. در مطالعه دیگر، عصاره آبی گزنه مورد بررسی قرار گرفت و نتایج آن‌ها نشان داد که این عصاره داری فعالیت ضد میکروبی بر برخی از باکتری‌های گرم مثبت و منفی بوده است [۱۳]. علاوه بر این، فعالیت ضد میکروبی عصاره گیاه گزنه در پژوهش‌های مختلف گزارش شده است. در پژوهش حاضر اثر

دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد در آن خشک شد. درصد رطوبت از اختلاف جرم بعد و قبل از خشک شدن محاسبه شد. فعالیت آبی (aw) پودر برگ گزنه خشک شده با دستگاه اندازه‌گیری فعالیت آبی (مدل lab touch-aw، ساخت شرکت novasina) تعیین شد [۱۵].

۲-۴- بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره

۲-۴-۱- روش دیسک دیفیوژن آگار

در این روش ابتدا غلظت‌های مختلفی از عصاره (۶۴، ۱۲۸، ۲۵۶ و ۵۱۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) تهیه شد. سپس دیسک‌های بلانک (قطر ۶ میلی‌لیتر) حاوی ۳۰ میکرولیتر از هر غلظت عصاره آبی برگ گزنه را بر سطح محیط کشت مولر هیتون آگار حاوی سویه‌های استاندارد بیماری‌زا (۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی) تثبیت و به مدت ۱۵ دقیقه در یخچال نگهداری شدند. پس آن به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد درون انکوباتور قرار گرفتند. پس از سپری شدن زمان انکوباسیون، قطر هاله‌های عدم رشد اطراف دیسک‌ها بر اساس میلی‌متر اندازه‌گیری و گزارش شد [۱۶].

۲-۴-۲- چاهک آگار

به منظور بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره آبی برگ گزنه با روش چاهک آگار، از روش عزیزاده بهبهانی و همکاران (۱۴۰۰) استفاده گردید. در این روش، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی بر روی محیط کشت مولر هیتون آگار پخش شد. سپس چاهک‌های به قطر ۶ میلی‌متر روی سطح محیط ایجاد و ۶۰ میکرولیتر از غلظت‌های عصاره را در هر چاهک‌ها ریخته شد و به مدت ۱۵ دقیقه در یخچال نگهداری شدند. پس آن به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد درون انکوباتور قرار گرفتند. پس از سپری شدن زمان انکوباسیون، قطر هاله‌های عدم رشد اطراف دیسک‌ها بر اساس میلی‌متر اندازه‌گیری و گزارش شد [۱۷].

۲-۴-۳- حداقل غلظت مهارکنندگی

جهت تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره آبی برگ گزنه، رقت‌های مختلفی از عصاره (۵۱۲، ۲۵۶، ۱۲۸، ۶۴، ۳۲، ۱۶، ۸، ۴، ۲، ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) با استفاده از محیط

ضدمیکروبی بالقوه عصاره آبی گیاه گزنه بر تعدادی از میکروارگانیزم‌های بیماری‌زا مورد بررسی قرار گرفت.

۲- مواد و روش

۲-۱- مواد شیمیایی و سویه‌های میکروبی

مواد مورد استفاده در این پژوهش شامل دیسک‌های بلانک، تری‌فنیل تترازیلیوم کلراید، محیط‌های کشت مولر هیتون برات و آگار (شرکت مرک، آلمان) تهیه شدند. از سویه‌های *اشرشیا کلی* (ATCC 25922)، *لیستریا اینوکوا* (ATCC 33090)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 25923)، *باسیلوس سرئوس* (ATCC 14579)، *سالمونلا تیفی* (ATCC 14028) و *سودوموناس اثرورژینوزا* (ATCC 27853) نگهداری شده در کلکسیون میکروبی گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان استفاده شد.

۲-۲- جمع‌آوری و تهیه عصاره آبی گیاه گزنه

به منظور تهیه عصاره آبی برگ گزنه، از روش خیساندن (ماسراسیون) استفاده شد. بدین منظور، نمونه‌های گیاهی جمع‌آوری شده بعد از شستشوی سطحی در سایه و به دور از نور مستقیم خورشید به مدت ۵ روز خشک شدند و قبل از عصاره‌گیری با آسیاب خرد شد. سپس ۵۰ گرم پودر برگ به ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر افزوده و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور شیکردار همزده شد. سپس عصاره‌ها از صافی عبور داده شد و سپس ۱۰ دقیقه در ۵۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل دور ریخته شد و فاز روی که حاوی عصاره بود، جمع‌آوری شد. جهت حذف حلال از دستگاه تقطیر تحت خلاء (مدل دستگاه) استفاده شد و در نهایت عصاره‌های خشک شده در ظروف شیشه‌ای تاریک جمع‌آوری و تا زمان انجام آزمون‌ها در یخچال نگهداری شدند. لازم به ذکر است که عصاره خشک شده با استفاده از اشعه UV استریل شد [۱۴].

۲-۳- تعیین میزان رطوبت و فعالیت آبی

قبل از عصاره‌گیری از برگ گزنه، میزان رطوبت نمونه‌ها تعیین شد. برای این منظور ۱ گرم نمونه توزین شده و در

جهت انجام آزمایش در نظر گرفته می‌شود [۲۰]. برگ‌های خشک شده گزنه مقدار فعالیت آبی ۰/۴۱۸ را نشان دادند. این مقدار بسیار پایین بود و تضمین کننده پایداری ترکیب‌های آن است. فرآیند خشک کردن، فعالیت آبی نمونه‌ها را کاهش می‌دهد، که رشد میکروبی را مهار می‌کند و واکنش‌های بیوشیمیایی را که منجر به فساد می‌شود را به حداقل می‌رساند. باکتری‌های بیماری‌زا نمی‌توانند زیر فعالیت آبی ۰/۸۵/۸۶- رشد کنند. علاوه بر این، فرآیند خشک کردن گیاه می‌تواند سبب تغییر ریزساختار بافت‌های گیاهی شود که همین امر می‌تواند بازده استخراج بهتری ایجاد کند [۲۱].

۲-۳- فعالیت ضد میکروبی

نتایج میانگین قطر هاله عدم رشد در روش دیسک دیفیون در شکل ۱، نشان داده شده است. نتایج نشان داد، با افزایش میزان غلظت عصاره آبی برگ گزنه، قطر هاله عدم رشد برای همه سویه‌های بیماری‌زا مورد مطالعه به طور معنی‌داری افزایش یافت. دیسک‌های حاوی بالاترین غلظت عصاره (۵۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، بیشترین قطر هاله عدم رشد را برای باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و کمترین قطر هاله عدم رشد را برای باکتری *سالمونلا تیفی* مشاهده گردید. قطر هاله عدم رشد برای آن‌ها به ترتیب ۲۱/۳۷ میلی‌متر و ۱۶/۳۱ میلی‌متر بود. که بیانگر حساسیت و مقاومت بالای باکتری‌های فوق نسبت به عصاره می‌باشد. به طور کلی، باکتری‌های گرم مثبت *باسیلوس سرئوس*، *لیستریا اینوکوا* و *استافیلوکوکوس* (باکترهای گرم مثبت) نسبت به باکتری‌های *سالمونلا تیفی* و *سودوموناس اورئوس* (باکتری‌های گرم منفی) دارای قطر هاله عدم رشد بیشتری در برابر عصاره آبی گزنه بودند. اثر ضد میکروبی بالای عصاره در مقابل باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی حاکی از این است که باکتری‌های گرم منفی دارای غشایی سلولی خارجی مستحکم و پیچیده (لیپوپلی ساکارید) است، در صورتی که باکتری‌های گرم مثبت فاقد غشای پیچیده می‌باشد. همچنین به نظر می‌رسد که سرعت و میزان انحلال‌پذیری ماده ضد میکروبی در قسمت لیپیدی غشای سلولی سبب مقاومت سلول‌های میکروبی می‌گردد [۲۲-۲۳]. نوشاد و همکاران (۱۴۰۰)، در

کشت مولر هیتون براث تهیه شد. ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت را به چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای اضافه و سپس ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی به آن اضافه گردید. میکروپلیت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد درون انکوباتور قرار گرفته شد. پس از سپری شدن زمان فوق، ۱۰ میکرولیتر معرف تری فنیل تترازولیوم کلراید ۵ درصد به چاهک‌ها اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه مجدداً در انکوباتور گذاشته شد و در نهایت اولین چاهکی که در آن هیچگونه تغییر رنگی روی نداشت، به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی بیان شد. لازم به ذکر است که از محیط کشت حاوی سوسپانسیون میکروبی و فاقد عصاره و محیط کشت حاوی عصاره و فاقد سوسپانسیون میکروبی به ترتیب به عنوان کنترل مثبت و منفی استفاده شد [۱۸].

۲-۴-۴- حداقل غلظت کشندگی

در این روش، ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای که در آن‌ها هیچ تغییر رنگی روی نداشت را در محیط کشت مولر هیتون آگار کشت داده و سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه در انکوباتور قرار گرفته شد. رقتی که در آن هیچگونه باکتری رشد نداشت، به عنوان حداقل غلظت کشندگی بیان شد [۱۹].

۲-۵- تجزیه و تحلیل آماری

نتایج حاصل از این پژوهش به روش آنالیز واریانس یک طرفه، با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۸ مورد آنالیز قرار گرفت. مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($p < 0/05$) انجام شد. همچنین برای رسم نمودارها از نرم افزار اکسل استفاده شد. تمامی آزمایش‌ها در سه تکرار صورت گرفت.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- میزان رطوبت و فعالیت آبی

برگ‌های گزنه قبل از استفاده برای استخراج عصاره و بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی خشک شدند. میزان رطوبت برگ‌های خشک گزنه ۸/۷۶ درصد بود. که درصد رطوبت کمتر از ۱۲ درصد بیانگر کیفیت خوب و مناسب

آن‌ها نشان داد عصاره اتانولی و استونی دارای قدر مهارکنندگی بر روی سویه‌های باکتری با قطر هاله عدم رشد متفاوت بین ۱۰ تا ۱۶ میلی‌متر بود، که از میان سویه‌ها میکروکوکوس لوتئوس نسبت به عصاره استونی حساستر بود، در حالی که عصاره آبی هیچ اثر مهارکنندگی بر سویه‌ها باکتریایی نشان نداد [۲۶]. در پژوهشی دیگر، اثر ضد میکروبی عصاره متانولی و اتانولی گیاه گزنه بر تعداد از سویه‌های بیماری‌زا بررسی شد، نتایج حاکی از آن بود که بیشترین قطر هاله عدم رشد برای هر دو عصاره مربوط به باکتری‌های گرم مثبت و کم‌ترین قطر هاله عدم رشد مربوط به باکتری گرم منفی بود [۲۷].

طی پژوهشی اثر ضد میکروبی عصاره اتانولی برگ گزنه در برابر تعدادی باکتری گرم مثبت و منفی را مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج حاصل از پژوهش آن‌ها نشان داد که باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی در برابر عصاره اتانولی گزنه حساس‌تر بودند [۲۰]. حمزه‌زاد نخجوانی و امام جمعه (۱۴۰۲) نشان دادند که اثر ضد میکروبی عصاره الکلی گزنه در فیلم خوراکی بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به صورت معنی‌داری ($p < 0.05$) موثرتر از *اشرشیاکلی* بود [۲۴]. در مطالعه‌ای دیگر گزارش شده است که عصاره گزنه دارای خاصیت ضد میکروبی در برابر *اشرشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیس* می‌باشد [۲۵]. زوهره و همکاران (۲۰۲۱)، خاصیت ضد میکروبی عصاره‌های آبی، اتانولی و استونی گیاه گزنه را روی چهار سویه باکتریایی (*اشرشیاکلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *میکروکوکوس لوتئوس* و *انتروکوکوس فکالیس*) به روش دیسک دیفیوژن مورد بررسی قرار دادند. نتایج مطالعه

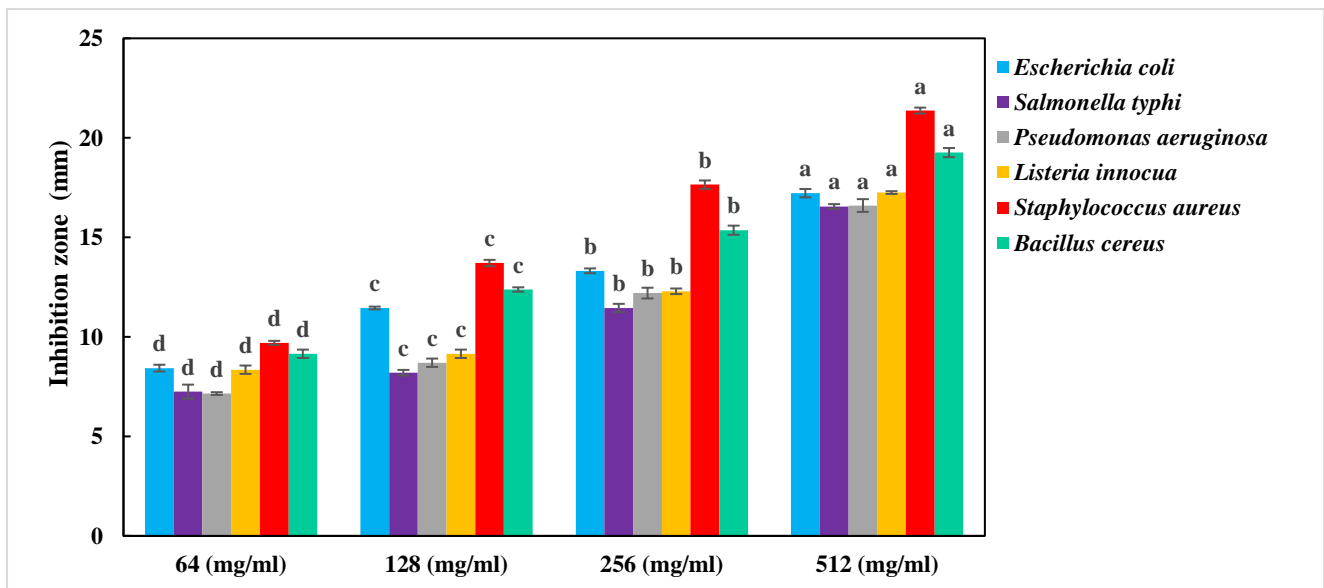


Fig.1. Antibacterial effect of nettle (*Urtica dioica* L.) leaf aqueous extract by disk diffusion method.

میلی‌لیتر و بیشترین مقدار آن در غلظت ۵۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با قطر هاله ۲۱/۶ میلی‌لیتر برای باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مشاهده شد. علاوه بر این، نتایج فعالیت ضد میکروبی عصاره آبی گزنه به روش چاهک آگار در مقایسه با روش دیسک دیفیوژن اندکی بیشتر مشاهده گردید. به این دلیل است که در روش چاهک آگار ماده ضد-

شکل ۲، نتایج میانگین قطر هاله عدم رشد در روش چاهک آگار را ارائه می‌کند. نتایج نشان داد در روش چاهک آگار با افزایش غلظت عصاره آبی (۶۴-۵۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) قطر هاله عدم رشد به طور معنی‌داری (در سطح ۰.۵٪) افزایش یافت. به گونه‌ای که کمترین قطر هاله برای باکتری *سالمونلا تیفی* در غلظت ۶۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با قطر هاله ۷/۳۸

عصاره فعالیت ضد باکتریایی متفاوتی دارند، که به دلیل حلالیت بیشتر مواد مؤثر در عصاره‌ی اتانولی نسبت به عصاره‌ی آبی، عصاره اتانولی برتری داشت. باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سوبتیلیس* و *سالمونلا spp* بیشترین حساسیت را به اثر ضدباکتریایی عصاره گزنه نشان دادند، در حالی که *اشرشیاکلی*، *سودوموناس* و *پروتئوس حساسیت کمتری* داشتند و تنها باکتری *کلبسیلا spp* بود که مقاوم شناسایی نمودند [۳۰]. علاوه بر این، کیایی و همکاران (۲۰۱۰)، اثر ضد میکروبی عصاره آبی و متانولی از ریشه و برگ گزنه بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیاکلی* و *سودوموناس ائروژنوزا* گزارش نمودند [۳۱]. مقایسه نتایج این مطالعه با یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* نیز حساس‌ترین سویه میکروبی بود. بنابراین می‌توان بیان نمود که نتایج این محقق-ها با یافته‌های مطالعه حاضر مطابقت دارد.

میکروبی (اسانس یا عصاره) در تماس مستقیم با سویه بیماری‌زا می‌باشد، در صورتی که در روش دیسک دیفیوژن ماده ضد میکروبی بعد از عبور از صفحات دیسک اثر خود را بر سویه بیماری‌زا می‌گذارد [۱۸]. در مطالعه روشنی و همکاران (۲۰۱۶)، فعالیت ضد میکروبی عصاره اتانولی و استونی برگ گزنه مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها بیان داشتند که هر دو عصاره قدرت بازدارندگی بالای بر سویه‌های بیماری‌زا داشت [۲۸]. در مطالعه‌ای دیگر نشان داده شد که عصاره الکلی داری اثر ضد میکروبی در برابر باکتری‌های *باسیلوس سرئوس* و *ویبریوپاراهمولایتیکوس* می‌باشد [۲۹]. صالح و همکاران (۲۰۱۴)، فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌های آبی و اتانول ۹۵ درصد برگ گزنه با استفاده از روش انتشار در چاهک آگار، بر برخی از باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت مورد تحقیق قرار دادند. در این آزمایش از باکتری‌های: *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیاکلی*، *کلبسیلا spp*، *باسیلوس سوبتیلیس*، *پروتئوس spp*، *سالمونلا spp* و *سودوموناس spp* استفاده شد. آن‌ها گزارش کردند که هر دو

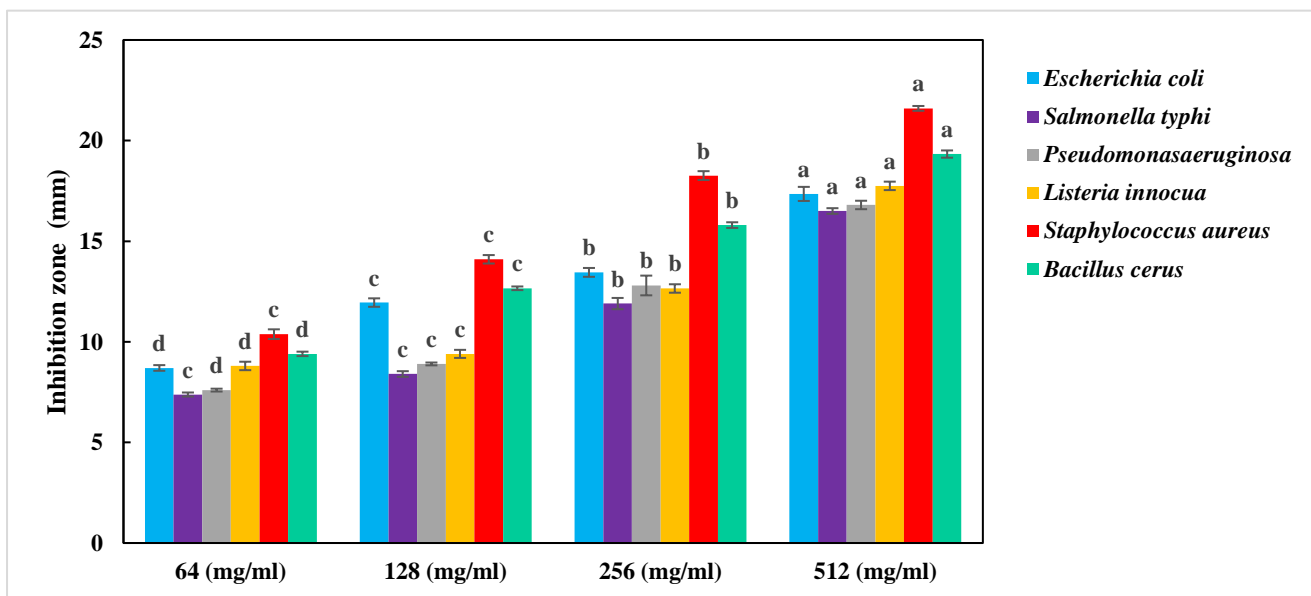


Fig. 2. Antibacterial effect of nettle (*Urtica dioica* L.) leaf aqueous extract by well diffusion agar method.

نتایج ضد میکروبی عصاره آبی گزنه بر پایه حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی در برابر سویه‌های بیماری‌زا در جدول ۱، ارائه شده است. با توجه به نتایج، حداقل غلظت مهارکنندگی برای باکتری‌های گرم منفی از جمله *اشرشیا کلی*، *سالمونلا تیفی* و *سودوموناس ائروژینوزا* به ترتیب ۱۲۸، ۲۵۶ و ۲۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و برای باکتری‌های گرم مثبت از جمله *لیستریا اینوکوا*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس* به ترتیب ۱۲۸، ۶۴ و ۱۲۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. بنابراین، بیشترین میزان مهارکنندگی متعلق به گونه‌های گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* و کمترین میزان متعلق به گونه‌های گرم منفی *سالمونلا تیفی* و *سودوموناس ائروژینوزا* بود. با توجه به نتایج (جدول ۳)، حداقل غلظت کشندگی برای همه سویه‌های مورد بررسی بزرگتر از ۵۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. در پژوهشی اثر ضد میکروبی عصاره‌های آبی تعدادی از گیاهان از جمله گیاه گزنه را بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد بررسی قرار دادند. نتایج آن‌ها نشان داد که مقدار حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی برای این گونه به ترتیب $678/5 \mu\text{m/ml}$ و $1375 \mu\text{m/ml}$ بود [۳۲]. مرادی و همکاران (۱۳۹۶)، فعالیت ضد باکتریایی و ضد قارچی عصاره‌های آبی و الکلی گیاه گزنه روی باکتری‌های *Listeria*، *Proteus vulgaris*، *Staphylococcus aureus*، *Klebsiella pneumoniae*، *Monocytogenes* و مخمر *Candida albicans* مورد بررسی قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد عصاره‌های آبی نسبت به عصاره‌های الکلی دارای بیشترین اثر ضدباکتریایی بوده است. همچنین، باکتری‌های گرم مثبت *S. aureus* و *L. monocytogenes* در عصاره آبی حساس‌ترین باکتری و باکتری‌های گرم منفی *K. pneumoniae* و *P. vulgaris* بهترین اثر ضد میکروبی را داشتند. علاوه بر این، عصاره آبی گیاه گزنه اثر ضدقارچی بر قارچ *C. albicans* از خود نشان داد [۱۲]. در مطالعه انجام شده توسط جعفری و همکاران (۱۳۹۱)، خواص ضد-باکتریایی عصاره‌های مختلف گیاه گزنه مورد بررسی قرار

دادند. نتایج نشان داد که عصاره‌های اتانولی از بخش‌های مختلف این گیاه، توانایی ضد میکروبی بر برخی باکتری‌ها از جمله *سودوموناس ائروژینوزا*، *باسیلوس سوبتلیس*، *اشرشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* را دارا هستند. بین این عصاره‌ها، عصاره بذر گیاه گزنه بیشترین تأثیر بازدارندگی را روی باکتری‌های گرم مثبت و عصاره برگ این گیاه بیشترین تأثیر را روی باکتری‌های گرم منفی داشته است. همچنین، عصاره‌های آبی این گیاه بر رشد تمام میکروارگانیزم‌ها با استثنای *سودوموناس ائروژینوزا*، تأثیر مثبتی داشته‌اند [۳۳]. معتمدی و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند، حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) عصاره اتانولی گیاه گزنه در برابر *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و *اشرشیا کلی* به ترتیب ۱۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره متانولی در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* به ترتیب ۴۰ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. حداقل غلظت کشندگی باکتری (MBC) فقط برای *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* بدست آمد که مقدار آن ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود [۲۷]. نتایج پژوهش حاضر با سایر مطالعه‌های که در مورد اثر ضد میکروبی اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی انجام شده بود مطابقت داشت [۳۴-۳۶].

Table 1. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of nettle (*Urtica dioica* L.) leaf aqueous extract on pathogenic bacteria

Microorganism	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)
<i>Escherichia coli</i>	128	>512
<i>Salmonella typhi</i>	256	>512
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	256	>512
<i>Listeria innocua</i>	128	>512
<i>Staphylococcus aureus</i>	64	>512
<i>Bacillus cereus</i>	128	>512

۴- نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که با افزایش غلظت عصاره آبی برگ گزنه قطر هاله‌های رشد برای باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی مورد بررسی افزایش یافت. بنابراین می‌توان بیان داشت که عصاره آبی گیاه گزنه دارای پتانسیل ضد میکروبی قابل توجهی است که می‌تواند در توسعه داروهای گیاهی و ترکیب‌های طبیعی برای مقابله با عفونت‌های مختلف به کار رود. این خواص می‌تواند در مواجهه با باکتری‌های *اشرشیا کلی*، *لیستریا اینوکوا*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس*، *سالمونلا تیفی* و *سودوموناس اثرورزینوزا* مؤثر باشد. با این حال نیاز به انجام

پژوهش‌های بیشتری بر سایر سویه‌های بیماری‌زا در شرایط برون‌تنی انجام گیرد.

۵- تشکر و قدردانی

مقاله حاضر مستخرج از درس مسئله مخصوص دوره دکتری نویسنده اول می‌باشد، لذا 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.

۶- منابع

- phytochemical and pharmacological overview. *Phytochemistry Reviews*, 19, 1341-1377.
- [10] Wolska, J., Czop, M., Jakubczyk, K., & Janda, K. (2016). Influence of temperature and brewing time of nettle (*Urtica dioica* L.) infusions on vitamin C content. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*, 67(4).
- [11] Repajić, M., Cegledi, E., Zorić, Z., Pedisić, S., Elez Garofulić, I., Radman, S., ... & Dragović-Uzelac, V. (2021). Bioactive compounds in wild nettle (*Urtica dioica* L.) leaves and stalks: Polyphenols and pigments upon seasonal and habitat variations. *Foods*, 10(1), 190.
- [12] Moradi, P., & Amini, k. (2018). Extraction and identification of the extract of different organs of the nettle plant *Urtica dioica* L and its antibacterial and antifungal effects. *Magazine of Mazandaran University of Medical Sciences*, 27(151), 74-85.
- [13] Harrison, F., Furner-Pardoe, J., & Connelly, E. (2022). An assessment of the evidence for antibacterial activity of stinging nettle (*Urtica dioica*) extracts. *Access Microbiology*, 4(3), 000336.
- [14] Yousafipour, H., Mehrnia, M. A., Alizadeh Behbahani, B., Jooyandeh, H., & Hojjati, M. (2022). Investigation of the functional groups of bioactive compounds, radical scavenging potential, antimicrobial activity of *Trigonella foenum* aqueous extract "in vitro". *Iranian Food Science and Technology Research Journal*.
- [15] Flórez, M., Cazón, P., & Vázquez, M. (2022). Antioxidant extracts of nettle (*Urtica dioica*) leaves: evaluation of extraction techniques and solvents. *Molecules*, 27(18), 6015.
- [16] Hojjati, M., & Alizadeh Behbahani, B. (2021). 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*, 17(1), 83-91.
- [17] Alizadeh Behbahani, B., & Noshad, M. (2021). Evaluation of the minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of *Hyssopus*
- [1] Vaou, N., Stavropoulou, E., Voidarou, C., Tsigalou, C., & Bezirtzoglou, E. (2021). Towards advances in medicinal plant antimicrobial activity: A review study on challenges and future perspectives. *Microorganisms*, 9(10), 2041.
- [2] Li, J., Hu, S., Jian, W., Xie, C., & Yang, X. (2021). Plant antimicrobial peptides: structures, functions, and applications. *Botanical Studies*, 62(1), 5.
- [3] Külçü, D. B., Gökışık, C. D., & Aydın, S. (2019). An investigation of antibacterial and antioxidant activity of nettle (*Urtica dioica* L.), mint (*Mentha piperita*), thyme (*Thyme serpyllum*) and *Chenopodium album* L. plants from Yaylacık Plateau, Giresun, Turkey. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 7(1), 73-80.
- [4] Chavan, S. S., Damale, M. G., Devanand, B., & Sangshetti, J. N. (2018). Antibacterial and antifungal drugs from natural source: A review of clinical development. *Natural products in clinical trials*, 1, 114-164.
- [5] Abdelmouhaimine, L., Salem, A., & Bouziane, A. (2021). Characterisation of the antibacterial profile of organic and aqueous extract of algerian nettle (*Urtica dioica* L.). *JOURNAL Horticulture For Biotechnol*, 25(3), 45-50.
- [6] Carvalho, A. R., Costa, G., Figueirinha, A., Liberal, J., Prior, J. A., Lopes, M. C., ... & Batista, M. T. (2017). *Urtica* spp.: Phenolic composition, safety, antioxidant and anti-inflammatory activities. *Food Research International*, 99, 485-494
- [7] Foroughi, A. (2022). A review on medicinal plants; An emphasis on antimicrobial effects. *Veterinary Research & Biological Products*, 35(1), 2-17.
- [8] Bhusal, K. K., Magar, S. K., Thapa, R., Lamsal, A., Bhandari, S., Maharjan, R., ... & Shrestha, J. (2022). Nutritional and pharmacological importance of stinging nettle (*Urtica dioica* L.): A review. *Heliyon*.
- [9] Grauso, L., de Falco, B., Lanzotti, V., & Motti, R. (2020). Stinging nettle, *Urtica dioica* L.: Botanical,

- Investigating the Antibacterial Effect of Methanol and Acetone Extracts of *Urtica Dioica* and *Zataria Multiflora* against Metallo Beta-lactamase Producing *Pseudomonas aeruginosa*. December 5, 2015. *Journal of Ilam University of Medical Sciences*, 24(3), 70-78.
- [29] Modarresi Chahardehi, A., Ibrahim, D., Fariza Sulaiman, S., & Aboulhassani, F. (2012). Determination of antimicrobial activity of various extracts of stinging nettle (*Urtica dioica*). *Journal of Medicinal Plants*, 11(42), 98-104.
- [30] Salih, N. A., Arif, E. D., & Ali, D. J. (2014). Antibacterial effect of nettle (*Urtica dioica*). *Al-Qadisiyah Journal of Veterinary Medicine Sciences*, 13(1), 1-6.
- [31] Kiaei, E., Mazandarani, M. A. S. O. U. M. E. H., & Ghaemi, E. (2010). Antibacterial activity of 7 species of medicinal plants on bacteria isolated from UTI patients in Golestan province. *Journal of Medicinal plants*, 9(34).
- [32] Hashemi, A. H., Shapouri, R., & Esrafil, M. R. (2019). Antimicrobial and healing effect of burdock and Nasturtium of nettle, extracts with silver sulfadiazine on burn infections of *Staphylococcus aureus*. *Animal Physiology and Development Quarterly*, 45(12), 63-72.
- [33] Jaffari, Z., Majd, A., & Mehrabian, S. (2012). Antibacterial effect of plant extract of nettle two basic *Urtica dioica* L. *Medicinal and Aromatic Plants Research of Iran*, 19(3), 287-312.
- [34] Tanavar, H., Barzegar, H., Alizadeh Behbahani, B., & Mehrnia, M. A. (2021). Investigation of the chemical properties of *Mentha pulegium* essential oil and its application in *Ocimum basilicum* seed mucilage edible coating for extending the quality and shelf life of veal stored in refrigerator (4 C). *Food Science & Nutrition*, 9(10), 5600-5615.
- [35] Noshad, M., Behbahani, B. A., & Nikfarjam, Z. (2022). Chemical composition, antibacterial activity and antioxidant activity of *Citrus bergamia* essential oil: Molecular docking simulations. *Food bioscience*, 50, 102123.
- [36] Behbahani, B. A., Yazdi, F. T., Noorbakhsh, H., Riazi, F., Jajarmi, A., & Yazdi, F. T. (2016). 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*, 18(2).
- [37] Jalil Sarghaleh, S., Alizadeh Behbahani, B., Hojjati, M., Vasiee, A., & Noshad, M. (2023). Evaluation of the constituent compounds, antioxidant, anticancer, and antimicrobial potential of *Prangos ferulacea* plant extract and its effect on *Listeria monocytogenes* virulence gene expression. *Frontiers in microbiology*, 14, 1202228.
- [38] Yazdi, F. T., Behbahani, B. A., Vasiee, A., Mortazavi, S. A., & Yazdi, F. T. (2015). An investigation on the effect of alcoholic and aqueous extracts of *Dorema aucheri* (Bilhar) on some pathogenic bacteria in vitro. *Archives of Advances in Biosciences*, 6(1).
- officinalis extract on a number of Gram-positive and Gram-negative bacteria: A study "in vitro". *Journal of food science and technology (Iran)*, 18(110), 1-9.
- [18] Barzegar, H., & Noshad, M. (2021). Evaluation of total phenol and flavonoid contents, antioxidant and antimicrobial activity of *Lawsonia inermis* aqueous extract against some gram-positive and gram-negative bacteria. *Journal of food science and technology (Iran)*, 18(116), 327-335.
- [19] Sosani Gharibvand, Z., Alizadeh Behbahani, B., Noshad, M., & Jooyandeh, H. (2022). Green synthesis of silver nanoparticles using *Callistemon citrinus* leaf extract and evaluation of its antibacterial activity. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 18(1), 151-163.
- [20] Đurović, S., Pavlić, B., Šorgić, S., Popov, S., Savić, S., Petronijević, M., ... & Zeković, Z. (2017). Chemical composition of stinging nettle leaves obtained by different analytical approaches. *Journal of Functional Foods*, 32, 18-26.
- [21] Saifullah, M., McCullum, R., McCluskey, A., & Vuong, Q. (2019). Effects of different drying methods on extractable phenolic compounds and antioxidant properties from lemon myrtle dried leaves. *Heliyon*, 5(12).
- [22] Alizadeh Behbahani, B., Noshad, M., & Rahmati-Joneidabad, M. (2022). *Mentha aquatica* extract: total phenols and flavonoids content, radical scavenging potential and its antibacterial activity on a number of Gram-positive and Gram-negative bacteria "in vitro". *Journal of food science and technology (Iran)*, 19(123), 289-297.
- [23] Alizadeh Behbahani, B., Tabatabaei Yazdi, F., Shahidi, F., Mohebbi, M., & Vasiee, A. (2014). Antimicrobial effect of aqueous and ethanolic extract of *Avicennia marina* on microorganisms: the infection and intoxication in vitro. *Journal of North Khorasan University of Medical Sciences*, 6(1), 99-109.
- [24] Hamzezade Nakhjavani, P., & Emam-Djomeh, Z. (2023). Evaluation of antimicrobial and physicochemical properties of the edible film based on sodium caseinate containing nettle extract. *Innovative Food Technologies*, 10(3), 215-228.
- [25] Gülçin, I., Küfrevioğlu, Ö. İ., Oktay, M., & Büyükkuroğlu, M. E. (2004). Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.). *Journal of ethno pharmacology*, 90(2-3), 205-215.
- [26] Zohra, E. K. F., Khedoudja, K., Nesrine, B., Amina, K., Abdelmouhaimine, L., Salem, A., & Bouziane, A. (2021). Characterisation of the antibacterial profile of organic and aqueous extract of Algerian nettle (*Urtica dioica* L.).
- [27] Motamedi, H., Seyyednejad, S. M., Bakhtiari, A., & Vafaei, M. (2014). Introducing *Urtica dioica*, a native plant of Khuzestan, as an antibacterial medicinal plant. *Jundishapur journal of natural pharmaceutical products*, 9(4).
- [28] Roshani, M., Heidary, M., Goudarzi, H., Hashemi, A., Eslami, G., & Yousefi, N. (2016).

- [43] Noshad, M., & Rahmati-Joneidabad, Behbahani, B. A. (2023). Determination of total phenolic and flavonoid contents, radical scavenging potential and antimicrobial activity of ethanolic extract of *Quercus persica* on *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Research in Plants Metabolites*, 1(1), 5.
- [44] Behbahani, B. A., Yazdi, F. T., Mortazavi, A., Gholian, M. M., Zendeboodi, F., & Vasiee, A. (2014). Antimicrobial effect of Carboxy Methyl Cellulose (CMC) containing aqueous and ethanolic *Eucalyptus camaldulensis* L. leaves extract against *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*. *Archives of Advances in Biosciences*, 5(2).
- [45] Ahmad Nejad, A., Alizadeh Behbahani, B., Hojjati, M., Vasiee, A., & Mehrnia, M. A. (2023). Identification of phytochemical, antioxidant, anticancer and antimicrobial potential of *Calotropis procera* leaf aqueous extract. *Scientific Reports*, 13(1), 14716.
- [46] Shirani, K., Falah, F., Vasiee, A., Yazdi, F. T., Behbahani, B. A., & Zanganeh, H. (2022). Effects of incorporation of *Echinops setifer* extract on quality, functionality, and viability of strains in probiotic yogurt. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 16(4), 2899-2907.
- [39] Yazdi, F. T., Behbahani, B. A., & Mortazavi, A. (2014). Investigating the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of the *Lavandula stoechas* L. and *Rosmarinus officinalis* L. extracts on pathogen bacterias "in vitro". *Archives of Advances in Biosciences*, 5(2).
- [40] Rahmati-Joneidabad, M., & Behbahani, B. A. (2021). Identification of chemical compounds, antioxidant potential, and antifungal activity of *Thymus daenensis* essential oil against spoilage fungi causing apple rot.
- [41] Rahmati-Joneidabad, M., Alizadeh Behbahani, B., & Noshad, M. (2023). Determination of antioxidant activity, and antifungal effect of *Ferula persica* L hydroalcoholic extract on some fungal strains causing strawberry and grape fruits rot "in vitro". *Journal of Research in Plants Metabolites*, 5-15.
- [42] Rahmati-Joneidabad, M. (2023). Identification of chemical compounds of *Ocimum basilicum* essential oil and its effect on inhibiting the growth of fungi causing postharvest rots in apple. *Journal of Research in Plants Metabolites*, 1(3), 5.
- [43] Rahmati-Joneidabad, M. (2022). Evaluation of chemical and antimicrobial properties of hydroalcoholic extract of artichoke (*Cynara scolymus*) on fungi causing rot in strawberry fruit. *Journal of food science and technology (Iran)*, 19(125), 369-379.



Scientific Research

Assessment of the Antioxidant Effects of *Urtica dioica* Aqueous Extract on Free Radical Scavenging, Determination of Total Phenol and Flavonoid Content, and the Bioactive Compound Groups

Parisa Ghasemi¹, Behrooz Alizadeh Behbahani^{*2}, Mohammad Noshad²

1- Ph.D. Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.

2- Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Article History:

Received: 2024/4/22

Accepted: 2024/6/29

Keywords:

Nettle plant,
Pathogenic bacteria,
Antimicrobial,
Aqueous extract.

DOI: 10.22034/FSCT.21.154.173.

*Corresponding Author E-
B.alizadeh@asnrkh.ac.ir

Medicinal plants have been used since ancient times as a source for treating diseases. Nettle (*Urtica dioica*) possesses anti-inflammatory, diuretic, antihistamine, antimicrobial, and immune-boosting properties. The aim of this study was to investigate the antimicrobial effect of nettle leaf aqueous extract using agar disc diffusion, agar well diffusion, minimum inhibitory concentration (MIC), and minimum bactericidal concentration (MBC) methods against a number of Gram-positive and Gram-negative bacteria. Results from agar disc diffusion and agar well diffusion tests showed that the most sensitive and resistant fungal strains to nettle leaf aqueous extract were *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhi*, respectively. As the concentration of nettle leaf extract increased, the zone of inhibition for all tested fungal strains significantly increased. The results indicated that the minimum inhibitory concentration for gram-negative bacteria such as *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, and *Pseudomonas aeruginosa* was 128, 256, and 256 mg/ml, respectively, and for gram-positive bacteria including *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus*, and *Bacillus cereus* was 128, 64, and 128 mg/ml, respectively. The minimum bactericidal concentration for all tested strains was greater than 512 mg/ml. This study suggests that nettle leaf aqueous extract can be used as a natural antimicrobial compound in the food industry or in the treatment of certain infectious diseases.