ارزیابی خاصیت ضدمیکروبی عصاره الکلی گیاه روناس صخره زی (*Rubia Florida*) بر باکتری های بیماریزای مواد غذایی

بهمن گرمهء [۱]، الهام مهدیان [۲*]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد قوچان، دانشگاه آزاد اسلامی، قوچان، ایران.
۲- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد قوچان، دانشگاه آزاد اسلامی، قوچان، ایران.

چکیده

بهره گیری از خواص نگهدارندگی و ضد میکروبی گیاهان با توجه به اثرات مضر داروهای شیمیایی و همچنین مقاوم شدن باکتری های بیماری زای متعدد به آنتی بیوتیک ها در حال گسترش است. در این تحقیق اثر ضدمیکروبی عصاره اتیل استاتی گیاه روناس صخره زی بر سه باکتری بیماریزای مواد غذایی شامل *لیستریا مونوسیتوژنز*، *اشرشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* به دو روش دیسک و چاهک مورد بررسی قرار گرفت. همچنین مقادیر حداقل غلظت مهارکنندگی(MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره به روش براث میکرودایلوشن برای سه باکتری تعیین گردید. بر اساس نتایج به دست آمده، در روش چاهک از نظر محاسبه قطر هاله بر حسب میلی متر، هیچ هاله عدم رشدی بر روی باکتری های گرم مثبت و منفی مشاهده نشد. در روش دیسک، قطر هاله عدم رشد دو باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* و *استافیلوکوکوس اورئوس* با یکدیگر اختلاف معناداری نداشته و در مورد باکتری *اشرشیا کلی* هاله عدم رشدی مشاهده نگردید. کمترین و بیشترین مقدار MIC به ترتیب برای *لیستریا مونوسیتوژنز* و *اشرشیا کلی* به دست آمد در حالی که اختلاف معناداری بین مقادیر MBC در مورد سه باکتری مشاهده نگردید. به طور کلی نتایج به دست آمده نشان دهنده حساسیت بیشتر باکتریهای گرم مثبت نسبت به عصاره اتیل استاتی روناس صخره زی در مقایسه با باکتریهای گرم منفی بوده که در نتیجه می توان از این عصاره جهت کنترل رشد باکتریهای گرم مثبت تا حدودی در مواد غذایی استفاده نمود.

کلید واژگان: روناس صخره زی، ضد میکروبی، *لیستریا مونوسیتوژنز*، *اشرشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*

* مسئول مکاتبات: emahdian2000@yahoo.com

۱- مقدمه

استفاده از گیاهان دارویی به منظور درمان با تاریخ زندگانی انسان همزمان بوده است. انسان در تمام دوران تاریخی چاره ای جز توسل به گیاهان نداشته و طی سالیان متمادی داروهای طبیعی خصوصاً داروهای گیاهی اساس و حتی در برخی موارد تنها طریق درمان محسوب می شدند و مواد اولیه موجود در آنها در صنعت داروسازی مورد استفاده قرار می گرفتند [۱].

استفاده از این روش درمانی در تمامی تمدن ها سابقه دارد و یک جزء مهم در پیشرفت علم پزشکی رایج به شمار می رود. اگر چه در نیم قرن گذشته استفاده از داروهای شیمیایی سنتزی به شدت رواج یافت ولی اثرات جانبی آنها سبب گرایش مجدد به گیاهان دارویی گردیده است و این نکته که توسل به گیاهان دارویی همواره در طول تاریخ یکی از روش های موثر در درمان بوده است، به خوبی روشن است [۲].

با توجه به مطالب فوق، مطالعات زیادی بر روی عصاره های گیاهان مختلف که منابع غنی از ترکیبات طبیعی دارای اثرات ضد میکروبی و آنتی اکسیدان هستند صورت گرفته است تا بتوان جایگزین مناسبی جهت آنتی بیوتیک های قدیمی و مواد آنتی اکسیدان سنتزی که دارای سمیت و اثرات مضر در سلامت انسان هستند پیدا کرد.

در یک بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره های استونی (۷۰ درصد)، اتانولی (۷۰ درصد) و متانولی (۷۰ درصد) گل گیاه گل مغربی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد، عصاره استونی بیش ترین مقدار ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و بازدهی استخراج را دارا می باشد. عصاره های فنولی فعالیت ضد میکروبی قابل ملاحظه ای در مقابل تمامی باکتری های مورد بررسی نشان دادند و تاثیر عصاره ها بر باکتری های گرم مثبت بیش تر از باکتری های گرم منفی بود. [۳].

پراوینا بات و همکاران (۲۰۱۲) فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد باکتریایی عصاره ی برگ گل گاو زبان هندی را بررسی کردند. برای این کار از روش دایلوشن و عصاره های متانولی، هیدروالکلی، اتیل استات و استون استفاده کردند و اثر آن ها را برروی چهار پاتوژن *یرسینیا انترکولیتیکا، اشرشیاکلی، باسیلوس سرئوس و استافیلوکوکوس اورئوس* بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که فعالیت ضد باکتریایی عصاره اتیل استات از متانول بیش تر است. همچنین در میان پاتوژن های مورد ازمایش *باسیلوس سرئوس* حساس ترین گونه بود و حداقل مقدار MIC را نشان داد [٤].

در یک مطالعه تحقیقاتی نشان داده شد اسانس اکالیپتوس بر روی باکتری گرم منفی *اشریشیا کلی* و باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* دارای اثر مهاری بسیار بالایی می باشد، البته اثر ضد باکتریایی بر روی باکتری گرم منفی بیشتر از گرم مثبت می باشد [٥].

یکی ازگیاهان دارویی با ارزش،گیاه روناس با نام علمی ***Rubia Florida*** می باشد . مطالعات بسیاری بر روی گونه های مختلف جنس ***Rubia***صورت گرفته است [٦.] طبق مطالعات انجام شده، عصاره اتانولی ***Rubia cordifolia*** دارای خاصیت ضد التهابی خوبی میباشد[۷]. در بررسی فیتوشمیایی گیاه ***Rubia cordifolia*** حضور فلاونوئیدها، آنتوسیانینها، فنلها، استروئیدها و آنتراکینونها به اثبات رسیده است[۸]. در بررسی ضد باکتریایی بر روی ***Rubia cordifolia*** مشخص شده که عصاره اتانولی این گیاه خاصیت بالایی یر روی باکتری گرم منفی اشرشیاکلی دارد[۹]. در بررسی دیگری مشخص شد که عصاره متانولی ریشه این گیاه از خاصیت ضد باکتریایی بالایی برخوردار است[۱۰]. به منظور استفاده بهینه از قابلیت های ضد میکروبی گیاه روناس صخره زی ***Rubia Florida*** وعنایت به اینکه گیاه مذکور جزء فلورگیاهان ایران است که تاکنون اثرات ضد باکتریایی آن مورد ارزیابی قرارنگرفته است، این مطالعه به بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره اتیل استاتی گیاه روناس صخره زی بر رشد سه باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز، اشرشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* می پردازد.

۲- مواد و روشها

باکتری های *لیستریا منوسیتوژنز* (PTCC 1298)، *اشرشیا کلی* (PTCC1399) و *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC1431) از معاونت پژوهشی سازمان غذا- دارو دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی تهیه شد. محیط کشت مولر هینتون آگار با pH =۷/٤±۰/۲ در 25°c از شرکت مرک آلمان تهیه شد.

۲-۱- جمع آوری گیاه مورد مطالعه

گیاه روناس صخره زی از کهنه کهن واقع درخراسان شمالی، ارتفاع ۱۰۹۰ متری به شماره هرباریومی ٤- ١٥٦ MP جمع آوری گردید. گیاه برداشت شده بر روی پارچه تمیز وخشک ریخته ودر سایه (فاقد باد شدید و رطوبت) پهن گردید. به مدت یک هفته هر روز گیاه به آرامی هم زده شد تا کاملا خشک گردید.گیاه خشک شده توسط دستگاه خرد کننده برقی پودر شده ودر ظرف در بسته برای عصاره گیری نگه داری شد.

۲-۲- عصاره گیری به روش خیساندن

به ٤٠ گرم از گیاه پودر شده داخل بشر، حلال اتیل استات اضافه شد. حجم حلال به اندازه ای بود که حدود ۲ سانتی متر در بالای پودر قرار گرفت. سپس با یک فویل آلومینیوم در بشر را بسته و به مدت ٤٨ ساعت در دمای اتاق و بر روی دستگاه شیکر قرار داده شد تا حلال به درون آن نفوذ کند و عصاره گیاه خارج شود. پس از گذشت این زمان عصاره استخراج شده توسط کاغذ صافی صاف گردید. مجددا روی پودر گیاه حلال تازه ریخته و مدت ٢٤ ساعت دیگر در دمای اتاق روی دستگاه شیکر قرار داده شد. عصاره استخراج شده مجددا صاف گردید. پایان عمل عصاره گیری با بی رنگ شدن عصاره استخراج شده مشخص گردید. سپس عصاره استخراج شده توسط دستگاه روتاری و در فشار کاهش یافته، در دمای $^{\circ}C$ ٤٠ تقطیر شد تا حلال آن کاملا تبخیر گردید. عصاره غلیظ شده سپس در آون با دمای $^{\circ}C$ ٥٠ به مدت ۳ روز خشک گردید[۳].

۲-۳- تعیین خاصیت ضد میکروبی عصاره های گیاه

۲-۳-۱- تهیه سوسپانسیون باکتری ها

برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره ، به کشت ٢٤ ساعته از هر میکروارگانیسم نیاز است، ابتدا کشت های نگه داری شده در$^{\circ}C$ ٨٠- به محیط آبگوشت BHI منتقل و به مدت٢٤ ساعت در دمای $^{\circ}C$٣٧ گرمخانه گذاری گردید .سپس در محیط کشت شیب دارمجددا تلقیح و جهت استفاده در طول آزمایش دریخچال$^{\circ}C$ ٤ نگه داری شد. از کشت آماده شده، با سواپ استریل چند کلنی به سدیم کلراید استریل منتقل و کاملا ورتکس شد، کدورت سوسپانسیون تهیه شده باید برابر کدورت سوسپانسیون استاندارد نیم مک فارلند باشد (برای آزمایش دیسک)، از این سوسپانسیون، رقت یک دهم تهیه شد تا سوسپانسیون نهایی با تعداد $1/5\times10^{7}$میکروارگانیسم در هر میلی لیتر به دست آید (برای آزمایش تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی) [٥].

۲-۳-۲- دیسک دیفیوژن به روشKirby-Bauer

ابتدا سوسپانسیون باکتریایی از باکتری های مورد مطالعه با سوسپانسیونی معادل نیم مک فارلند تهیه شده و سپس با استفاده از سواپ سطح پلیت های حاوی محیط مولر هینتون آگار با باکتری های مورد نظر تلقیح شد .بعداز خشک شدن سطح پلیت ،دیسک های کاغذی ٦,٤ میلی متری حاوی ٥٠ میکرولیتر از عصاره ها (۱۰۰میلی گرم بر میلی لیتر) و جنتامایسین و دی متیل سولفواکسید بر روی پلیت منتقل شده و به مدت ٢٤ ساعت گرمخانه گذاری شد و بعداز گرمخانه گذاری قطر هاله مهار رشد باکتری ها اندازه گیری شد.

۲-۳-۳- آماده سازی نمونه ها و دیسک های کاغذی

یک دهم گرم از عصاره های مختلف در یک سی سی دی متیل سولفواکسید حل شد.٥٠ میکرولیتر از آن به یک دیسک کاغذی استریل اضافه شد. ٥٠ میکرولیتر از آنتی بیوتیک جنتامایسین و ٥٠ میکرولیتر از حلال دی متیل سولفواکسید نیز به دیسک استریل دیگر اضافه شد.

۲-۳-٤- روش چاهک

بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره به روش چاهک پلیت انجام شد. در این روش هم از پلیت های حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار که آغشته به میکروارگانیسم بودند استفاده شد. توسط یک پیپت پاستور استریل که مخصوص ایجاد چاهک است، یک حفره در محیط کشت ایجاد کرده و داخل هر چاهک با سمپلر ٥٠ میکرولیتر از عصاره ها به طور جداگانه قرار داده شد سپس پلیت ها به مدت ٢٤ساعت در انکوباتور ۳۷درجه سانتی گراد قرار داده شدند. عملیات مذکور در مورد هر نمونه دو بار تکرار گردید، پس از آن میزان قطر هاله عدم نفوذ مورد ارزیابی قرار گرفت و بر اساس میلی متر محاسبه گردید.

۲-۳-۵- تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی(MIC[1]) به روش براث میکرودایلوشن[۲]

ابتدا مقدار ۰/۲ گرم از عصاره مورد آزمایش را در دو سی سی از مخلوط دی متیل سولفوکساید و محیط مولر هینتون براث (۰/۵ سی سی دی متیل سولفوکساید DMSO و ۱/۵ سی سی محیط مولر هینتون براث) حل نموده که رقت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر از عصاره بدست می آید. سپس در لوله هرکدام حاوی یک سی سی محیط مولر هینتون براث رقت سازی لوله ای را انجام نموده که به ترتیب غلظت هر شیشه نصف غلظت شیشه قبلی می گردد. در این روش مقدار۲۰۰ ماکرولیتر از غلظت های ۰/۱۹۵، ۰/۳۹۰، ۰/۷۸۱، ۱/۵٦۲، ۳/۱۲۵، ٦/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم در میلی لیتر عصاره (تهیه شده در محیط کشت مولر هینتون براث) به خانه های یک پلیت ۹٦ خانه منتقل خواهد شد.سپس سوسپانسیون میکروبی نیم مک فارلند تهیه شده را ده مرتبه رقیق ساخته تا از کدورت معادل $۱۰^{۷}$ باکتری بدست آمده در هر میلی لیتر به میزان ۲۰ میکرولیتر به هر یک از خانه ها اضافه گردد .(یک سی سی از سوسپانسیون ۲ معادل نیم مک فارلند با ۹ سی سی سرم فیزیولوژی مخلوط میگردد تا کدورت معادل $۱۰^{۷}$ باکتری بدست آید.) به عنوان کنترل مثبت، در تعدادی از خانه های پلیت ۱۵۰ میکرولیتر از محیط کشت مولر هینتون آگار،۲۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری و۵۰ مایکرولیتر آنتی بیوتیک جنتامایسین اضافه شد. از خانه های حاوی ۲۰۰ میکرولیتر از محیط کشت و باکتری به عنوان کنترل منفی استفاده خواهد شد. پلیت۹٦ خانه به مدت ۲٤ ساعت در گرمخانه ^{o}C ۳۷ قرار داده خواهد شد. پس از این مدت به تمام خانه های هر پلیت۵۰ میکرولیتر از معرف تری فنیل تترازولیوم کلراید TTC اضافه شد و مجدداً به مدت۳ ساعت در گرمخانه قرار داده شد. پس از خروج از گرمخانه، در هر ردیف مربوط به غلظت های مختلف عصاره، اولین غلظتی که در آن رنگ قرمز تشکیل نشده باشد، به عنوان MIC در نظر گرفته خواهد شد [۱۱]. برای به دست آوردن مقادیر حداقل غلظت کشندگی (MBC)[3] از کلیه خانه هایی که رنگ قرمز در آن ها تشکیل نشده باشد، ۱۰ میکرولیتر یا یک لوپ به پلیت های حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار منتقل شد. اولین غلظتی از هر عصاره که در پلیت مربوط به آن رشد مشاهده نشد به عنوان MBC در نظر گرفته شد [۱۱].

۲-۳-٦- تجزیه و تحلیل آماری

در این تحقیق اثر کاربرد عصاره در غلظت۱۰۰میلی گرم بر میلی لیتر بر قطر هاله عدم رشد و همچنین مقادیر MIC و MBC عصاره برای سه باکتری در ۳ تکرار محاسبه و با نمونه های کنترل مثبت جنتامایسین و کنترل منفی دی متیل سولفوکساید مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج و داده های به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱٦ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته و مقایسات میانگین با آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد انجام گرفت.

۳- نتایج و بحث

جدول ۱ قطر هاله عدم رشد سه باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز، اشرشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* را در حضور عصاره اتیل استاتی روناس به دو روش دیسک و چاهک نشان می دهد. از نتایج بدست آمده از محاسبه قطر هاله بر حسب میلی متر در روش چاهک می توان دریافت که هیچ کدام از عصاره ها در غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر اثر ضدباکتریایی بر روی هیچ یک از باکتری های گرم مثبت و گرم منفی نداشته و هیچ هاله عدم رشدی بر روی پلیت ها مشاهده نگردید.

نتایج به دست آمده از روش دیسک نیز نشان می دهد که دو باکتری گرم مثبت *لیستریا منوسیتوژنز* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در برابر عصاره حساس تر بوده و قطر هاله عدم رشد این دو باکتری اختلاف معناداری با یکدیگر نداشتند ($p>0.05$). باکتری گرم منفی *اشرشیا کلی* نسبت به عصاره کاملا مقاوم می باشد. این نتیجه را می توان به مقاومت زیاد دیواره باکتری های گرم منفی در برابر نفوذ مواد خارجی نسبت به دیواره باکتری های گرم مثبت و تاثیر کمتر عصاره ها بر روی آنها دانست.

1. Minimum Inhibitory Concentration
2 .Microbroth Dilution
3. Minimum Bactericidal Concentration

Table 1 Inhibition zones diameter (mm) for tested bacteria with *Rubia Florida* extract

method	bacteria		
	Staphylococcus aureus (PTCC 1431)	*Escherchia coli* (PTCC 1399)	*Listeria monocytogenes* (PTCC 1298)
Disc Diffusion	10 [b]	0 [c]	10 [b]
Micro Well Dilution	0 [c]	0 [c]	0 [c]
Gentamicin (Disc Diffusion)	34 [a]	29 [ab]	36 [a]
Gentamicin(Micro Well Dilution)	38 [a]	31 [ab]	36 [a]
Dimethylesulfoxide (control negative)	0 [c]	0 [c]	0 [c]

قطر هاله عدم رشد سه باکتری در حضور عصاره و هچنین آنتی بیوتیک های جنتامایسین و دی متیل سولفوکساید در روش دیسک در شکل ۱ مورد مقایسه قرار گرفته است. با توجه به شکل مشخص می شود که با وجود حساسیت بالاتر دو باکتری گرم مثبت نسبت به باکتری گرم منفی اشرشیاکلی، قطر هاله های بدست آمده در حضور عصاره روناس در مقایسه با قطر هاله نمونه کنترل مثبت جنتامایسین زیاد چشمگیر نبوده است.

شکل ۲ حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره روناس را در مورد سه باکتری نشان می دهد. همانطور که مشخص است اختلاف معناداری در مقادیر MIC سه باکتری وجود دارد ($p<0.05$). کمترین MIC (۳/۱۲۵mg/ml) مربوط به باکتری *لیستریا منوسیتوژنز* و بیشترین میزان (۱۰۰mg/ml) مربوط به باکتری *اشرشیا کلی* می باشد که دلیل دیگری بر اثبات حساسیت کمتر باکتری گرم منفی *اشرشیا کلی* نسبت به عصاره اتیل استاتی گیاه روناس می باشد.

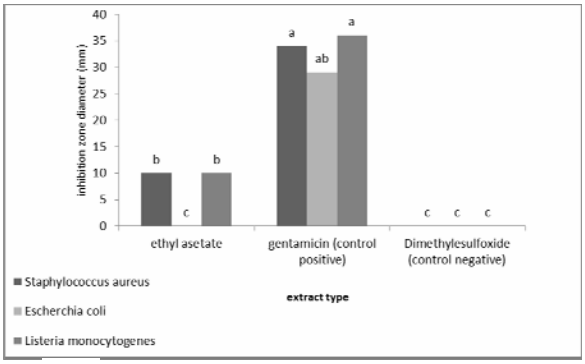

Fig 1 Inhibition zones diameter (mm) for tested bacteria with *Rubia Florida* extract, gentamicin and dimethylsofoxide in Disc Diffusion method

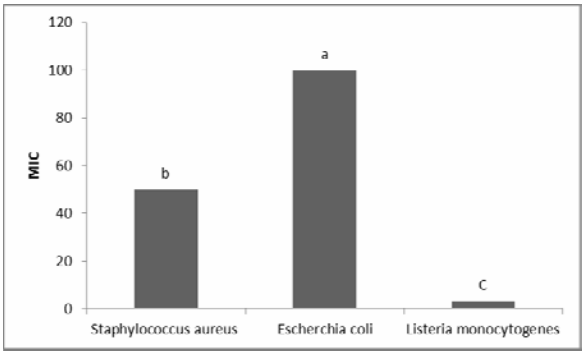

Fig 2 Minimum Inhibitory Concentration of *Rubia Florida* extract on tested bacteria

مقادیر حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره روناس نسبت به سه باکتری مورد مطالعه در شکل ۳ نشان داده شده است. . همان گونه که مشاهده می شود، بین مقادیر MBC سه باکتری اختلاف معناداری وجود ندارد ($p>0.05$). همچنین عصاره اتیل استاتی در غلظت های بالای ۱۰۰ قادر به حذف باکتری می باشند.

مطالعات مختلف نشان داده است که دیواره سلولی باکتری های گرم مثبت نسبت به باکتریهای گرم منفی در مقابل بسیاری از آنتی بیوتیک ها، ترکیبات شیمیایی ضد میکروبی و بسیاری از داروهای گیاهی حساسیت زیادی دارند. باکتری های گرم منفی نسبت به عوامل شیمیایی مقاوم تر از انواع گرم مثبت هستند. مقاومت کمتر باکتریهای گرم مثبت نسبت به انواع گرم منفی در مقابل اسانس ها و عصاره های گیاهی توسط برخی از محققین گزارش شده است[۱۱، ۱۲، ۱۳ ,۱٤ و ۱۵].

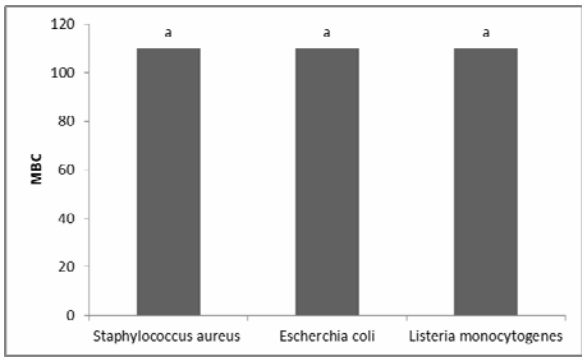

Fig 3 Minimum Bactericidal Concentration of *Rubia Florida* extract on tested bacteria

ضرغامی مقدم و همکاران (۲۰۱۲)، فعالیت ضد باکتریایی و آنتی اکسیدانی عصاره ی ریشه *Onosma dichroanthum Boiss* که از خانواده ی گل گاو زبان است را در شمال ایران بررسی کردند. برای این کار اثر ضد میکروبی عصاره کلروفرم، استون، متانول، اتانول از ریشه ی گیاه بر روی باکتری های گرم منفی و گرم مثبت به روش دیسک و چاهک را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج نشان داد که ناحیه ی مهارکنندگی باکتری های گرم مثبت در روش چاهک بین mm ۱۷-۱۱اندازه گیری شد. عصاره ی استون مؤثرترین عصاره ی گیاهان و *باسیلوس سرئوس* با۱۷ میلی متر منطقه ی مهارکنندگی در عصاره ی استون حساس ترین سویه ی باکتریایی بود. هیچ یک از باکتری های گرم منفی نسبت به عصاره های مختلف ریشه ی گیاهان حساسیت نشان ندادند. کم ترین میزان MIC مربوط به *باسیلوس سرئوس* بود که بین۰/۱۵۶-۰/۰۷۸ میلی متر بود و عصاره ی استون بهترین اثر مهارکنندگی و پایین ترین MIC را دارا بود [۱۱].

کرمانشاهی و همکاران (۱۳۸۷) نشان دادند که عصاره الکلی رازک به طور معنی داری روی *باسیلوس سوبتیلیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* تاثیر بیشتری نسبت به *اشرشیاکلی* و *سودوموناس* داشتند و البته حداقل غلظت کشندگی نیز به دست آمد [۱۲].

پاس و همکاران (۱۳۹۱)، ترکیبات شیمیایی، خاصیت ضدباکتریایی و فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس گیاه خوشاریزه را تعیین و بررسی کردند. اثر ضد باکتریایی قوی اسانس خوشاریزه بر باکتری های *استافیلوکوکوس ارئوس* استاندارد مشاهده گردید؛ به طوری که در MIC=0.16 mg/ml اثر مهار کنندگی و در رقت MBC=0.63 mg/ml اثر کشندگی بر این باکتری داشت. این اثر بر *استافیلوکوکوس* مقاوم MRSA و *اشریشیا کلی* ضعیف تر بود. *سودوموناس آئروژینوزا* نسبت به این اسانس مقاوم بود [۱۳].

عصاره های هگزانی، دی کلرومتانی و متانولی اندام هوایی گیاه *Cyperus longus* به روش خیساندن تهیه و فعالیت آنتی باکتریایی عصاره ها به روش انتشار در آگار توسط دیسک بررسی شد. نتایج آزمایشات ضد باکتریایی نشان داد عصاره های این گیاه بر باکتری های گرم منفی تاثیر نداشته اما بر باکتری های گرم مثبت موثر بوده است [۱٤]. در تحقیق مشابهی، نصیرپور و همکاران (۱۳۹٤) گزارش کردند که *لیستریامونوسیتوژنز* حساس ترین و *اشرشیا کلی* به عنوان مقاوم ترین باکتری در برابر عصاره آبی دو گیاه درمنه و زوفا بودند [۱۵].در عین حال گزارش شده که عصاره الکلی گیاه *Rubia cordifolia* می تواند به میزان متفاوتی از رشد نژادهای مختلف *اشرشیاکلی* ایزوله شده از ادرار که قادر به تولید آنزیم بتالاکتاماز باشند جلوگیری کند [۹].

علت حساس تر بودن باکتری گرم مثبت نسبت به مواد شیمیایی و عصاره های گیاهی، اختلاف ساختمان دیواره می باشد. باکتری های گرم مثبت در دیواره سلولی خود دارای موکوپپتید بوده، در حالی که باکتری گرم منفی فقط لایه ی نازکی از موکوپپتید دارند و قسمت اعظم ساختمان دیواره در آنها لیپوپروتئین و لیپوپلی ساکارید است. در *حقیقت* باکتری های گرم منفی یک غشاء خارجی در اطراف دیواره سلولی خود دارند که به همین دلیل آنها را در برابر مواد ضد باکتریایی مقاوم تر می سازد.

٤- نتیجه گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که حساسیت باکتری های گرم مثبت به عصاره گیاه روناس صخره زی بیش از باکتری های گرم منفی بود و بر باکتری گرم منفی مورد آزمون اثر مهارکنندگی و کشندگی کمی داشت. در مجموع با توجه به نتایج به دست آمده استفاده از عصاره گیاه روناس صخره زی به عنوان یک ترکیب ضد میکروب طبیعی در محصولات غذایی پیشنهاد می شود که علاوه بر ایجاد اثرات مفید سلامت بخشی و دارا بودن ترکیبات آنتی اکسیدانی می تواند فساد مواد غذایی را نیز به تعویق اندازد.

۵- منابع

[1] Zaman, S. 2003. Medicinal plants, Methods of cultivation and harvest and color illustrated description of 256 Vlagzhanvu Estudolazhyry plants. 5th Edition, Ghoghnus Pbblication,Tehran. pp. 9-18.

[2] Emad, m. 2003. Identification of Medicinal industrial forestry Plants and indications for their use. 1st edition, volume 2. Rural Development Publications, Tehran. pp. 9.

[3] Maedani Ghahfarokhi, V., Alami, M., Arabshahi Doluie, S., Khodabakhshi, R., and Ghaderi Ghahfarokhi, M. 2013. Evaluating the antioxidant and anti-microbial activity of phenolic extract from evening primrose plant flower (Oenothera biennis L.). Iranian Food Science and Technology Research Journal, 9(2): 182-189.

[4] Praveena B., and Pradeep S. N. 2012. Antioxidant and Antibacterial Activities in the Leaf Extracts of Indian Borage (Plectranthus amboinicus), Food and Nutrition Sciences, 3(2): 146-152.

[5] Bachir, R. G., Benali, M. 2012. Antibacterial activity of the essential oils from the leaves of Eucalyptus globulus against Escherichia coli and Staphylococcus aureus. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 2(9):739-742.

[6] Abdelhafeez, M.A, Mohammed Philip. H, Coombes Neil, R., Crouch Dulcie, A. 2013. Chemical Constituents from Fadogiahomblei De Wild (Rubiaceae), International Letters of Chemistry, Physics and Astronomy, 9(2): 116-124.

[7] Shekhar, B., Bahuguna, Y. M., Vijender, S. 2010. Anti-inflamatory activity of ethanolic stem extracts of Rubia Cordifolia linn in Rats. International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy1 (1) 126-130.

[8] Sreenu, P., Samatha, T., Gandhi N., and Seetara N. A. 2014. phytochemical analysis of root, stem and leaf extracts in rubia cordifolia l. an important medicinal plant. world journal of pharmacy and pharmaceutical sciences, 3(10), 826-838.

[9] Sawhney, R., Berry, V., Kumar, A.. 2012. Inhibitory Activity of Rubia cordifolia Plant Extract Against ESBL Producing Urinary E.coli Isolates . Journal of Pharmacy Research, 5(3),1328-1335.

[10] Naidu, K. C., Ramya L., , Varaprasad, B. 2009. Antimicrobial agents from rubia cordifolia and glycyrrhiza glabra against phytopathogens of gossypium. International journal of pharmtech research coden (usa), 1(4): 1512-1518.

[11] Zarghami moghadaam, P., Mazandarani, M, Zolfaghari M.R , Badele, M.T, Ghaemi, E.A 2012. Antibacterial and antioxidant activities of root extract of Onosma dichroanthum Boiss in north of Iran, African Journal of microbiology researcher, 6(21): 1776-1781.

[12] Kermanshahi, K., Nasr Isfehani, B., Poor Babaei, A., Asghari, Gh., Esmi Sarkani, Zh., 2009. Effect of alcoholic extrat of Humulu slupulus on some gram negative and positive bacteria. Journal of Pharm Herbs. 9(30), 92-97.

[13] Pas, M., Rashidipoor. M., Talei, Gh. R., Dusti, F.B. 2012. Chemical compounds, anti-bacterial and antioxidant activity of Echinophora cinerea Boiss essential oils. Medicinal Plants, 3(2):67-74.

[14] Mohamadi. M., Kazemi, T., Asili, J., and Kamali, H. 2014. Evaluation of Antioxidant and anti-bacterial activity of methanol, dichloromethane and hexane extracts of Cyperus longus shoots. Journal of North Khorasan University of Medical Sciences, 1(6): 161-167.

[15] Nasirpour, M., Yavarmanesh, M., Mohamadi Sani, A., Mohamdzade Moghadam. M. 2014. Antibacterial effect of aqueous extract of *Artemisia aucheri*, *Artemisia sieberi* and *Hyssopus officinalis* L. on the food borne pathogenic bacteria. Journal of Food Science and Technology, 12(46): 73-84.

Evaluation the antimicrobial activity of *Rubia Florida* alcoholic extract on some pathogenic bacteria in foods

Garmehei, B. [1], Mahdian, E. [2 *]

1. Ms.C graduated, Department of Food Science and Technology, Quchan branch, Islamic Azad University, Quchan, Iran.
2. Ph.D, Assistant professor, Department of Food Science and Technology, Quchan branch, Islamic Azad University, Quchan, Iran.

Utilizing protective and antimicrobial properties of some plants is developing due to the harmful effects of chemical drugs as well as pathogenic bacteria resistant to antibiotics. In this study, Antimicrobial effect of alcholic extract (ethyl asetate) of *Rubia Florida* on three bacteria *(Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes,* and *Escherchia coli)* were evaluated using Micro Well Dilution and Disc Diffusion methods. Also Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of all extracts were determined using Micro-Broth dillusion method. Based on obtained results, for all studied bacteria, no inhibition zones were observed in Micro Well Dilution method. When Disc Diffusion method applied, no significant difference was observed between *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* inhibition zone diameters where there is no inhibition zone for *Escherchia coli.* Minimum and maximum of MIC was obtained for *Listeria monocytogenes* and *Escherchia coli* respectively and no significant differences were observed between MBC of three bacteria. In general, gram positive bacteria were more sensitive to ethyl asetate extract of *Rubia Florida* than gram negative ones so it could be used against gram positive bacteria in food products.

Key Words: *Rubia Florida*, Antimicrobial, *Listeria monocytogenes, Escherichia coli, Staphylococcus aureus*

[*] Corresponding Author E-Mail Address: emahdian2000@yahoo.com