



بررسی ویژگی‌های شیمیایی و فعالیت ضد میکروبی اسانس درمنه کپه داغی بر باکتری‌های عامل

بیماری‌های عفونی در شرایط برون‌تنی

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

۱- دانشیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاتانی، ایران

۲- دانشجوی دکتری، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاتانی، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

در سال‌های اخیر، به منظور ارتقاء کیفیت بهداشتی و کاهش خطرات ناشی از نگهدارنده‌های شیمیایی در صنعت غذا، توجه پژوهشگران به استفاده از ترکیبات طبیعی به ویژه اسانس‌های گیاهی معطوف شده است. این تغییر رویکرد به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی آن‌ها بوده است. در همین راستا، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، میزان محتوای فنول و فلاونوئید کل و همچنین خواص ضد میکروبی اسانس درمنه کپه داغی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد، اسانس درمنه کپه داغی حاوی فنول کل ($60/1 \pm 43/41$ میلی گرم گالیک اسید در گرم) و فلاونوئید کل ($24/38 \pm 1/32$ میلی گرم کوئرستین در گرم) بالای بود. ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی نشان داد که اسانس توانای بالای در مهار رایکال آزاد DPPH ($63/49 \pm 1/25$ درصد) و ABTS ($70/61 \pm 1/20$ درصد) دارد. نتایج اثر ضد میکروبی بر سویه‌های باکتریایی بیماری‌زا (گرم مثبت؛ استرپتوکوکوس پیوژنز، استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سوبتیلیس و گرم منفی؛ شیگلا دیسانتری، کلبسیلا ائروژنز و اشرشیا کلی) نشان داد که باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی در برابر اسانس درمنه کپه داغی حساسیت بالاتری داشتند. این پژوهش نشان داد که اسانس درمنه کپه داغی، حاوی ترکیبات زیست‌فعال با فعالیت ضد میکروبی است. این یافته، پتانسیل این اسانس گیاهی را به عنوان جایگزینی طبیعی برای نگهدارنده‌های شیمیایی مضر در صنایع غذایی تایید می‌کند.

تاریخ‌های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۲/۲۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۲/۱

کلمات کلیدی:

درمنه کپه داغی،

اسانس،

ضد میکروبی،

ترکیب‌های فنولی،

فعالیت آنتی‌اکسیدانی.

DOI: 10.22034/FSCT.22.166.243.

* مسئول مکاتبات:

B.alizadeh@asnrukh.ac.ir

۱- مقدمه

توجه روزافزون به اثرات مفید گیاهان، به ویژه گیاهان معطر و دارویی که به عنوان داروهای گیاهی برای درمان یا پیشگیری از بیماری‌ها یا تقویت سلامت به کار می‌روند، منجر به تحقیقاتی برای تعیین خواص آن‌ها و میزان مواد شیمیایی گیاهی موجود در آن‌ها شده است. ترکیب‌های گیاهی به عنوان منبع بالقوه آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی شناخته شده‌اند [۱]. مطابق با شواهد موجود، ترکیبات فنلی استخراج شده از گیاهان به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی شناخته می‌شوند. هدف از جایگزینی این ترکیب‌ها با آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی در صنایع غذایی و دارویی، بهره‌مندی از مزایای ذاتی آن‌ها همچون سازگاری بیشتر با بدن، کاهش عوارض جانبی و پاسخ به تقاضای روزافزون مصرف‌کنندگان برای محصولات طبیعی است [۲ و ۳]. علاوه بر این، آن‌ها در پیشگیری از بیماری‌های مختلف مرتبط با استرس اکسیداتیو مانند سرطان‌ها و بیماری‌های قلبی عروقی نقش دارند. از سوی دیگر، گیاهان معطر سرشار از اسانس‌هایی هستند که به طور گسترده در صنایع عطر، طعم و رایحه درمانی کاربرد دارند [۴].

اسانس‌ها ترکیب‌های فراری هستند که اغلب در بافت‌های اپیدرمی ذخیره می‌شوند. اسانس‌ها از نظر شیمیایی مخلوطی از ترکیب‌های آلی با وزن مولکولی پایین مانند مونوترپن‌ئیدها و سس کوئی ترپن‌ئیدها، فیل پروپن‌ها، ایزوتیوسیانات‌ها و غیره هستند و دارای طیف وسیعی از اثرات بیولوژیکی قوی از جمله ضدقارچی، ضدباکتریایی، ضددیابتی، ضدسرطان، ضدویروسی هستند [۵ و ۶]. تقریباً ۳۰۰۰ اسانس مختلف از بیش از ۲۰۰۰ گونه گیاهی به دست آمده است که تولید سالانه آن بین ۴۰۰۰ تا ۶۰۰۰ تن با درآمدزایی حدود ۷/۵ میلیارد دلار در سال ۲۰۱۸ بوده و تا سال ۲۰۲۶ با رشد ۹ درصدی همراه خواهد بود [۷].

جنس درمنه (*Artemisia*) یکی از بزرگ‌ترین جنس‌های تیره گل *Asteraceae* است که پراکندگی وسیعی داشته و شامل بیش از پانصد گونه مختلف می‌باشد. گونه‌های درمنه به دلیل

تولید اسانس‌های ویژه و داشتن دامنه وسیعی از فعالیت‌های زیستی شناخته شده‌اند [۸]. این فعالیت‌ها شامل خاصیت ضدباکتری، ضدویروس، ضدانگل، ضدقارچ، نماتدکش و حشره‌کش می‌شود که در مجموع به طور قابل توجهی به دفاع‌های طبیعی گیاه در برابر عوامل بیماری‌زا کمک می‌کند. با وجود این خواص ارزشمند، برخی از گونه‌های درمنه به دلیل کمبود و یا پراکندگی نامناسب، کمتر مورد مطالعه قرار گرفته‌اند [۹]. یکی از این زیر گونه‌ها، درمنه کپه داغی (*Artemisia kopetdaghensis*) است. این زیرگونه در شمال شرق ایران، ترکمنستان و افغانستان دیده شده است. جایی که دره‌ها و قله‌های مرتفع، زیستگاه‌های منحصر به فردی را برای این گیاه با توانایی پراکندگی پایین و تحمل محدود به شرایط خاص محیطی فراهم کرده‌اند [۱۰ و ۱۱].

در این پژوهش میزان ترکیب‌های فنولی و فلاونویدی اسانس درمنه کپه داغی و خواص آنتی‌اکسیدانی آن به روش‌های DPPH و ABTS ارزیابی شد. همچنین، اثر ضد-میکروبی اسانس روی سویه‌های مختلف باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی با استفاده از روش انتشار دیسک، چاهک آگار و حداقل غلظت بازدارنده و کشندگی بررسی شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

تمامی مواد شیمیایی مورد استفاده با خلوص بالا تهیه شد. گالیک اسید، کربنات سدیم، معرف فولین-سیوکالتو، آلومنیوم تری کلراید، معرف کوئروستین، رادیکال آزاد DPPH، رادیکال آزاد ABTS، متانول، محیط کشت مولر هیتون آگار و مولر هیتون براث از شرکت سیگما-آلدריך و مرک تهیه گردید.

۲-۲- تهیه اسانس درمنه کپه داغی

گیاه خشک شده (سایه) با استفاده از دستگاه آسیاب آزمایشگاهی، آسیاب و پودر شد. پودر حاصله جهت حفظ کیفیت و جلوگیری از تخریب، در ظروف دربسته و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. جهت استخراج اسانس، از

دستگاه کلونجر به روش تقطیر با آب استفاده گردید. اسانس استخراج شده به منظور جلوگیری از نفوذ نور و تغییر خواص آن، در ویال‌های شیشه‌ای تیره رنگ در یخچال نگهداری شد [۱۲].

۲-۳- اندازه‌گیری میزان فنول کل

محتوای فنول کل اسانس درمنه ایرانی با استفاده از روش Folin-Ciocalteu در طول موج ۷۶۰ نانومتر تعیین شد. به طور خلاصه، یک میلی‌لیتر از اسانس یا محلول استاندارد اسید گالیک (با غلظت‌های ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) به ۳ میلی‌لیتر آب دیونیزه اضافه گردید. سپس، یک میلی‌لیتر از معرف فنول Folin-Ciocalteu به مخلوط اضافه شد و به خوبی تکان داده شد. بعد از گذشت ۵ دقیقه، ۱۰ میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم (۷٪) به مخلوط اضافه شد. محلول به مدت ۹۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. نتایج نهایی به بر حسب میلی‌گرم گالیک اسید در هر گرم اسانس (mg GA/g) بیان گردید [۱۳].

۲-۴- اندازه‌گیری میزان فلاونوئید کل

این روش بر اساس تشکیل کمپلکس فلاونوئید-آلومینوم با حداکثر جذب در طول موج ۵۱۰ نانومتر عمل می‌کند. یک میلی‌لیتر از عصاره یا محلول استاندارد کوئرستین با غلظت‌های مختلف (۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) به ۴ میلی‌لیتر آب دیونیزه اضافه گردید. سپس، به ترتیب با فواصل زمانی مشخص، ۰/۳ محلول نیترات سدیم (۵٪)، ۰/۱ آلومینوم تری کلرید (۱۰٪) و در نهایت ۲ میلی‌لیتر محلول ۱ مولار سود به مخلوط اضافه شد. محلول نهایی به خوبی مخلوط شده و جذب آن اندازه‌گیری شد. نتایج نهایی به صورت میلی‌گرم معادل کوئرستین بر گرم اسانس بیان شد [۱۴].

۲-۵- فعالیت آنتی اکسیدانی

۲-۵-۱- اندازه‌گیری مهار رادیکال آزاد DPPH

فعالیت کاهندگی رادیکال آزاد اسانس با استفاده از روش حیدری و همکاران (۲۰۲۰) با اندکی تغییرات انجام شد. به طور خلاصه، ۲ میلی‌لیتر از محلول استاندارد DPPH با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار در متانول خالص به یک لوله آزمایش

حاوی ۲ میلی‌لیتر از محلول نمونه در متانول (۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) اضافه شد مخلوط واکنش به مدت ۱۰ ثانیه همزده شد و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفت. جذب نمونه در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر اندازه‌گیری شد. برای کالیبراسیون دستگاه از متانول خالص استفاده شد. کاهش جذب محلول DPPH نشان دهنده افزایش کاهندگی رادیکال آزاد DPPH است. فعالیت آنتی اکسیدانی به صورت درصد مهار رادیکال آزاد با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید [۱۵]:

$$TAA (\%) = (A_0 - A_s / A_0) \times 100$$

که در آن، TAA فعالیت آنتی اکسیدانی کل، A_0 جذب

محلول DPPH در متانول و A_s جذب محلول DPPH با

اسانس یا محلول اسیدگالیک است.

۲-۵-۲- اندازه‌گیری مهار رادیکال آزاد ABTS

برای سنجش فعالیت کاهندگی مهار رادیکال آزاد ABTS، بر اساس روش کار جلیل سرقلعه و همکاران (۲۰۲۳) با تغییرات جزئی به کار گرفته شد. رادیکال کاتیونی ABTS پیش ساخته شده، از طریق اکسیداسیون محلول ABTS (۷ میلی‌مولار) با محلول پتاسیم پرسولفات ۴۵.۲ میلی‌مولار (با حجم مساوی) تولید گردید. مخلوط به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و تاریکی واکنش داد. ۱ میلی‌لیتر از محلول حاصل در ۶۰ میلی‌لیتر متانول رقیق شد تا جذب آن در طول موج ۷۳۴ نانومتر به 0.7 ± 0.06 برسد. ۱ میلی‌لیتر از محلول رقیق شده رادیکال کاتیونی ABTS به ۳ میلی‌لیتر اسانس اضافه شد و جذب در طول موج ۷۳۴ نانومتر اندازه‌گیری گردید. درصد مهار رادیکال آزاد ABTS با استفاده از معادله‌ای مشابه با روش DPPH محاسبه شد [۱۶].

۲-۶- فعالیت ضد باکتریایی

فعالیت ضدباکتریایی اسانس درمنه کپه داغی بر روی طیف وسیعی از باکتری‌های گرم مثبت (باسیلوس سرئوس، استرپتوکوکوس پیورنز و استافیلوکوکوس اورئوس) و گرم منفی (شیگلا دیسانتری، کلبسیلا ترورنز و اشریشیا کلی) مورد ارزیابی قرار گرفت. این بررسی با استفاده از چهار روش استاندارد شامل دیسک دیفیوژن، چاهک آگار، حداقل

برابری با رنج ۵۱۲ تا ۰/۵ میلی گرم در میلی لیتر تهیه شد. سپس ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون نهایی باکتری به هر چاه حاوی ۱۸۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف اسانس اضافه گردید. بدین ترتیب حجم نهایی در هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر و تعداد باکتری-ها حدود $1/5 \times 10^8$ CFU/mL بود. در نهایت، پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه‌گذاری شدند. MIC به عنوان پایین‌ترین غلظت اسانس که مانع رشد قابل مشاهده باکتری می‌شود، تعیین گردید. [۱۹].

۲-۶-۴- حد اقل غلظت کشندگی

برای تعیین حد اقل غلظت کشندگی (MBC) از چاهک‌های میکروپلیت که در آن‌ها هیچ رشد باکتریایی قابل مشاهده نبود، ۱۰۰ میکرولیتر نمونه برداشته شد و روی محیط کشت آگار MHA کشت داده شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه‌گذاری شد. MBC به عنوان پایین‌ترین غلظت اسانس که منجر به مرگ کامل باکتری‌ها می‌شود، بر اساس عدم مشاهده کلنی باکتری روی پلیت‌های آگار تعیین گردید [۲۰].

۲-۷- آنالیز آماری

مقایسه میانگین داده در سطح احتمال ۰/۵٪ براساس آزمون One Way ANOVA با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۷ و ترسیم نمودارهای با نرم افزار اکسل نسخه ۲۰۱۶ انجام گرفت. آزمایش‌ها در ۳ مرتبه تکرار شد.

۳- نتایج و بحث

ترکیبات فنلی، به عنوان گروهی از متابولیت‌های ثانویه گیاهان، به دلیل دارا بودن ساختار مولکولی غنی از گروه‌های هیدروکسیل فنولی، به طور گسترده‌ای به عنوان آنتی-اکسیدان‌های طبیعی شناخته شده‌اند. این ترکیبات نه تنها نقش حیاتی در دفاع گیاهان در برابر استرس‌های محیطی و پاتوژن‌ها ایفا می‌کنند، بلکه به دلیل طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های بیولوژیکی، از جمله خواص آنتی‌اکسیدانی قوی، ضدالتهابی، ضدسرطانی و قلبی عروقی، مورد توجه ویژه

غلظت مهار کنندگی (MIC) و حد اقل غلظت کشندگی (MBC) انجام شد.

۲-۶-۱- دیسک دیفیوژن

بدین منظور، ابتدا سوسپانسیون باکتری‌های مورد آزمایش (۰/۱ میلی لیتر از سوسپانسیون با غلظت colony forming $1/5 \times 10^8$ unit (CFU)/mL روی سطح محیط کشت آگار کشت داده شد. سپس، دیسک‌های کاغذ صافی (قطر ۶ میلی- متر) با ۲۰ میکرولیتر از اسانس آغشته و روی پلیت‌های کشت حاوی باکتری قرار گرفتند. پلیت‌ها پس از ۱۵ دقیق پیش انکوباسیون در دمای ۴ درجه سانتی گراد، به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه‌گذاری شدند. قطر هاله‌های عدم رشد در اطراف دیسک‌های حاوی اسانس به عنوان شاخصی از فعالیت ضد میکروبی اندازه‌گیری شد. برای کنترل منفی، از حلال مورد استفاده در تهیه اسانس و برای کنترل مثبت، از دیسک‌های حاوی تتراسایکلین (۲۰ میکروگرم بر دیسک) استفاده شد [۱۷].

۲-۶-۲- چاهک آگار

به منظور بررسی اثر ضدباکتریایی از روش انتشار چاه بر اساس روش طباطبایی یزدی و همکاران (۲۰۱۳) استفاده شد. حفره‌هایی به قطر ۶ میلی متر در محیط کشت آگار MHA ایجاد گردید و ۴۰ میکرولیتر از اسانس درون هر چاه ریخته شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد گرمخانه‌گذاری شدند. مهار رشد باکتریایی با اندازه‌گیری قطر هاله‌های ایجاد شده برحسب میلی متر تعیین گردید. محلولی از آب مقطر استریل و ۰/۵ درصد توئین ۸۰ به عنوان کنترل منفی استفاده شد [۱۸].

۲-۶-۳- حد اقل غلظت مهار کنندگی

حد اقل غلظت مهار کنندگی اسانس با استفاده از تست میکرو رقت در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای و براساس روش عزیزاده بهبهانی و همکاران (۲۰۱۴) با تغییراتی انجام شد. محلول اولیه اسانس با غلظت ۲۵۶ میلی گرم در میلی لیتر در محیط کشت مولر-هیتون براث و با استفاده از توئین ۸۰ به عنوان امولسیفایر تهیه شدند. از هر محلول اولیه، رقت‌های سری دو

میزان فلاونوئید کل $24/38 \pm 1/32$ میلی گرم کوئرستین در گرم بدست آمد (شکل ۱).

محققان قرار گرفته اند [۲۱]. میزان فنول کل اسانس درمنه کپه داغی برابر با $60/43 \pm 1/41$ میلی گرم گالیک اسید در گرم و

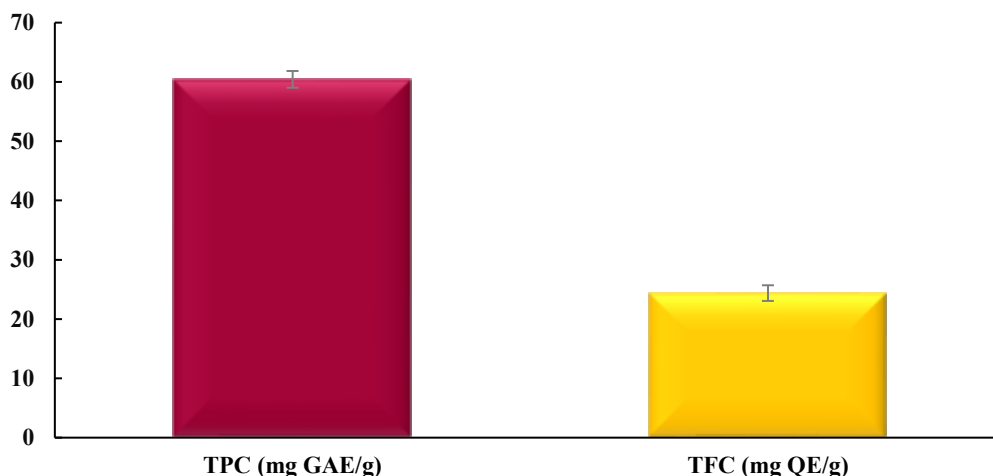


Fig 1. Total phenol content (TPC) and total flavonoid content (TFC) of *Artemisia kopetdaghensis* essential oil.

این اسانس بیشتر باشد، توانایی آن‌ها در مهار رادیکال‌های آزاد نیز افزایش می‌یابد. دلیل اصلی این پدیده، وجود گروه‌های هیدروکسیل متعدد در ساختار ترکیبات فنلی است. این گروه‌ها قادرند با اهدای اتم هیدروژن به رادیکال‌های آزاد، آن‌ها را پایدار کرده و از آسیب به سلول‌ها جلوگیری کنند. بنابراین، افزایش تعداد گروه‌های هیدروکسیل در عصاره‌ها، به طور مستقیم با افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها مرتبط است [۲۴]. مطالعات انجام شده بر روی دو گونه گیاه درمنه، سیبری و کپه داغی، نشان داده است که هر دو گونه این گیاه از قدرت احیاکنندگی بالایی برخوردار هستند. با این حال، گونه درمنه کپه داغی فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی‌تری نسبت به گونه دیگر از خود نشان داده بود. این پژوهشگران علت این امر را مقادیر بالای ترکیبات فنولی در این گونه بیان کردند [۲۵]. صلاحی و همکاران (۱۴۰۲) نیز فعالیت آنتی‌اکسیدانی درمنه کپه داغی را گزارش کردند.

گیاهان در مواجهه با تنش‌های محیطی، گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) (مانند H_2O_2 و $O_2\bullet$ ، $OH\bullet$) تولید می‌کنند که به سلول‌های آن‌ها آسیب می‌رسانند. مولکول‌های آنتی‌اکسیدانی موجود در گیاهان با خنثی‌سازی این گونه‌ها، از سلول‌ها محافظت می‌کنند. بنابراین، تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان برای درک بهتر مکانیسم‌های دفاعی آن‌ها و همچنین کشف ترکیبات جدید با خاصیت آنتی‌اکسیدانی، بسیار حائز اهمیت است [۲۲ و ۲۳]. در پژوهش حاضر، برای تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی اسانس گیاه درمنه کپه داغی، از دو روش رایج سنجش فعالیت رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS بهره گرفته شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی براساس روش DPPH برابر با $63/49 \pm 1/25$ درصد و بر اساس روش ABTS برابر با $70/61 \pm 1/20$ درصد بدست آمد.

مطالعات نشان داده‌اند که ارتباط مستقیمی بین محتوای فنلی عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها وجود دارد. به عبارت دیگر، هرچه غلظت ترکیبات فنولی در

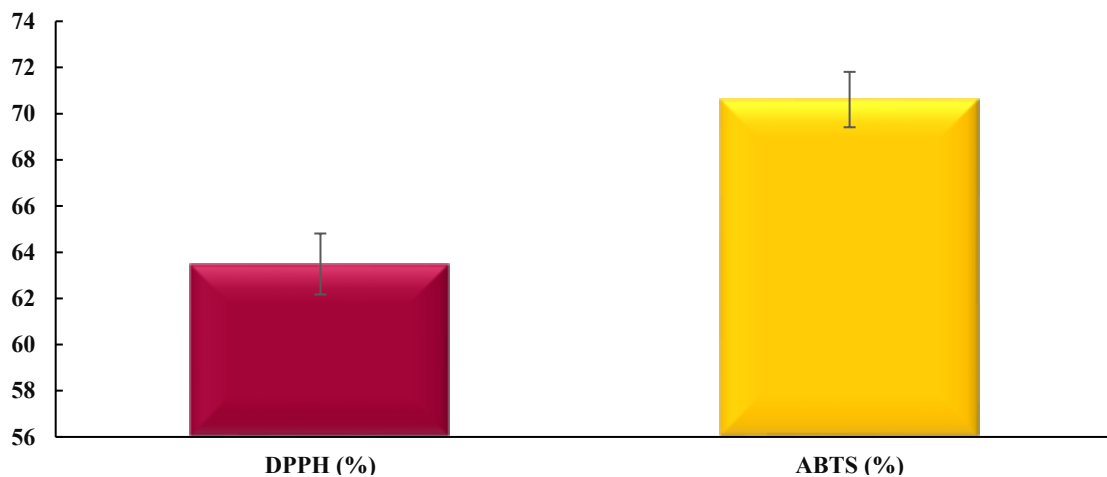


Fig 2. Antioxidant activity of *Artemisia kopetdaghensis* essential oil based on DPPH- and ABTS-radical scavenging methods.

نسبت به باکتری‌های گرم منفی داشته‌اند. این امر با تشکیل هاله‌های عدم رشد بزرگ‌تر در اطراف دیسک‌های حاوی این ترکیبات در محیط کشت آگار حاوی باکتری‌های گرم مثبت، مشهود بود. بزرگ‌ترین قطر هاله عدم رشد در میان باکتری‌های گرم مثبت در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (16.0 ± 0.50 میلی‌متر) و کوچک‌ترین آن‌ها *باسیلوس سوبتلیس* (13.10 ± 0.40 میلی‌متر) بود. همچنین در میان باکتری‌های گرم منفی بزرگ‌ترین و کوچک‌ترین قطر هاله عدم رشد به ترتیب در باکتری‌های *اشرشیا کلی* (13.40 ± 0.60 میلی‌متر) و *شیگلا دیسانتری* (11.0 ± 0.30 میلی‌متر) مشاهده شد ($p < 0.05$).

عفونت و مسمومیت غذایی ناشی از باکتری‌های گرم مثبت و منفی، یکی از مهم‌ترین عوامل مرگ و میر در کشورهای در حال توسعه است. با وجود کارایی ترکیبات شیمیایی در کنترل این مشکل، استفاده مکرر از آن‌ها منجر به مقاومت میکروبی و آلودگی زنجیره غذایی می‌شود. به همین دلیل، توجه به ترکیبات طبیعی مانند عصاره‌های گیاهی به عنوان جایگزین‌های ایمن‌تر و موثرتر برای حفظ سلامت مواد غذایی، رو به افزایش است [۲۶ و ۲۷]. نتایج اثر ضد میکروبی اسانس درمنه کپه داغی براساس روش دیسک دیفیوژن آگار در شکل ۳ ارائه شده است. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که اسانس، اثر مهار قوی‌تری بر باکتری‌های گرم مثبت

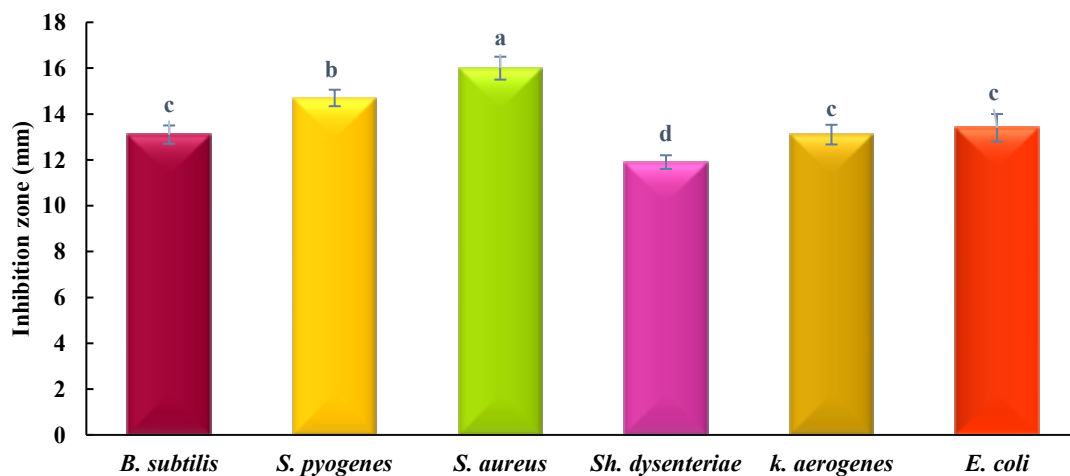


Fig 3. Antimicrobial activity of *Artemisia kopetdaghensis* essential oil based on disc diffusion method.

پس از عبور از دیسک کاغذی به تدریج در محیط کشت پخش می‌شود [۲۸]. در مطالعه، اثر ضد میکروبی اسانس و نانوامولسیون گیاه درمنه کپه داغی روی دو سویه باکتریایی *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیا کلی* را مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌های این مطالعه نشان داد، اسانس درمنه کپه داغی اثر مهاری قوی‌تر روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* داشت، به طوری که قطر هاله عدم رشد برای اسانس ۱۱/۱ میلی‌متر بود، در حالی که این مقدار برای نانوامولسیون ۸/۰ میلی‌متر بود. برای باکتری *اشرشیا کلی*، قطر هاله عدم رشد برای اسانس ۹/۰ میلی‌متر و برای نانوامولسیون هاله‌ای از عدم رشد مشاهده نکردند [۲۱].

شکل ۴، نتایج فعالیت ضد میکروبی براساس روش چاهک آگار را ارائه می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود قطر هاله‌های عدم رشد در اطراف چاهک‌ها در این روش مشابه دیسک دیفیوژن آگار بود. در حالی که قطر هاله‌ها در این روش بزرگ‌تر بود، به طوری که بزرگترین قطر هاله برای باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* برابر با $17/70 \pm 0/49$ میلی‌متر و کوچکترین قطر هاله برای باکتری *شیگلا دیسانتری* برابر با $13/60 \pm 0/27$ میلی‌متر بود ($p < 0.05$). همانطور که مطالعات پیشین نشان داده‌اند، علت این امر را تفاوت در نحوه تماس عصاره یا اسانس با میکروارگانیسم‌ها بیان داشتند. در روش چاهک آگار، عصاره به طور مستقیم در تماس با میکروب‌ها قرار می‌گیرد، در حالی که در روش دیسک دیفیوژن، عصاره

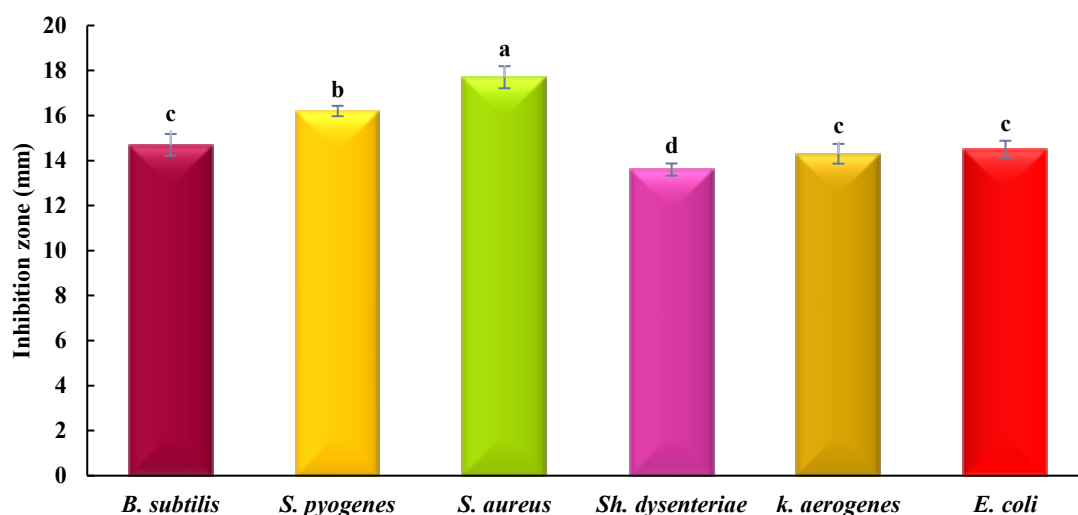


Fig 4. Antimicrobial activity of *Artemisia kopetdaghensis* essential oil based on well diffusion method.

مهار گردید. باکتری‌های گرم منفی نیز در غلظت ۳۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و بالاتر، رشد آن‌ها متوقف گردید. اما غلظت بالاتر از اسانس منجر به جلوگیری از رشد این سویه‌ها گردید. به طور کلی، حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس درمنه کپه داغی برای باکتری‌های *باسیلوس سوبتیلیس*، *استرپتوکوکوس پیوژنز*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *شیگلا دیسانتری*، *کلبسیلا ائروژنز* و *اشرشیا کلی* به ترتیب برابر با ۸، ۴، ۶۴، ۶۴، ۳۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به دست آمد.

شکل ۵، نتایج حاصل از حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس درمنه را ارائه می‌دهد. آنالیز آماری داده‌ها نشان داد که تفاوت معنی‌داری در MIC بین سویه‌های باکتریایی مختلف وجود دارد ($p < 0.05$). افزایش تدریجی غلظت اسانس از ۲ به ۲۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، رابطه مستقیم و معنی‌داری با افزایش اثر ضد میکروبی آن نشان داد. در غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، کلیه سویه‌های باکتریایی مورد بررسی قادر به رشد بودند. با این حال، با افزایش غلظت به ۱۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و بالاتر، رشد کلیه سویه‌های گرم مثبت به طور کامل

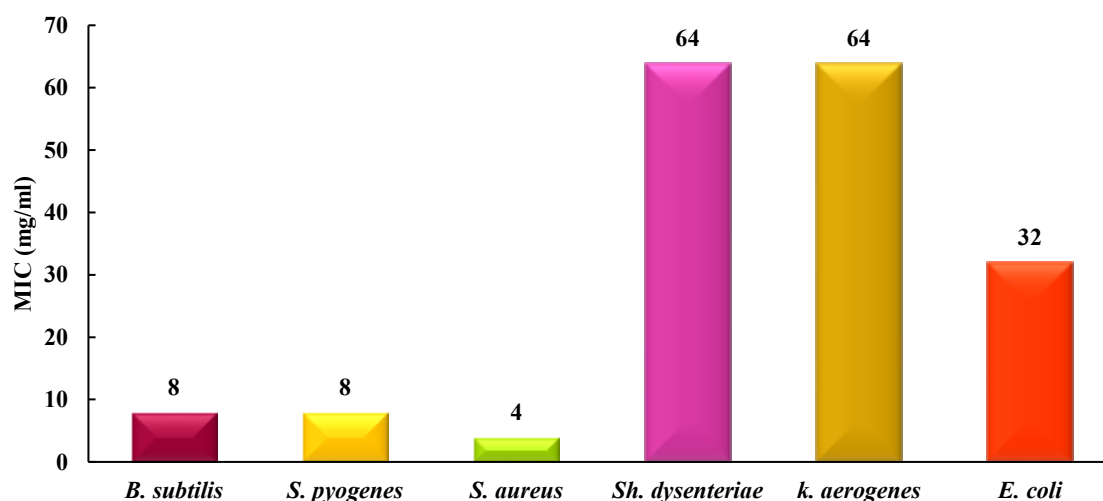


Fig 5. Antimicrobial activity of *Artemisia kopetdaghensis* essential oil based on minimum inhibitory concentration (MIC).

دیسانتیری و کلبسیلا / ائروژنز با MBC برابر با ۲۵۶ میلی گرم بر میلی لیتر، مقاوم ترین سویه ها بودند. / شرشیا کلی نیز با MBC برابر با ۱۲۸ میلی گرم بر میلی لیتر، حساسیت متوسطی را نشان داد. اثر ضد میکروبی اسانس یا عصاره های گیاهی عمدتاً به واسطه حضور ترکیبات زیست فعالی است که قادر به برهم کنش با ساختارهای سلولی میکروارگانیسم ها هستند. این ترکیب های با نفوذ به غشای سلولی و ایجاد اختلال در یکپارچگی آن، عملکردهای حیاتی سلول مانند انتقال مواد، تولید انرژی و سنتز پروتئین را مختل کرده و در نهایت منجر به مرگ سلول می شوند [۲۹ و ۳۰].

نتایج حاصل از تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC) نشان داد (شکل ۶) که سویه های باکتریایی مورد مطالعه، حساسیت متفاوتی به عامل ضد میکروبی مورد بررسی از خود نشان دادند. به طور کلی، باکتری های گرم مثبت مانند / استرپتوکوکوس پیوژنز و / استافیلوکوکوس اورئوس با MBC برابر با ۶۴ میلی گرم بر میلی لیتر، حساسیت بیشتری نسبت به باکتری های گرم منفی نشان دادند. در میان باکتری های گرم مثبت، باسیلوس سوبتلیس با MBC برابر با ۱۲۸ میلی گرم بر میلی لیتر، مقاومت بیشتری از خود نشان داد. همچنین، شیگلا

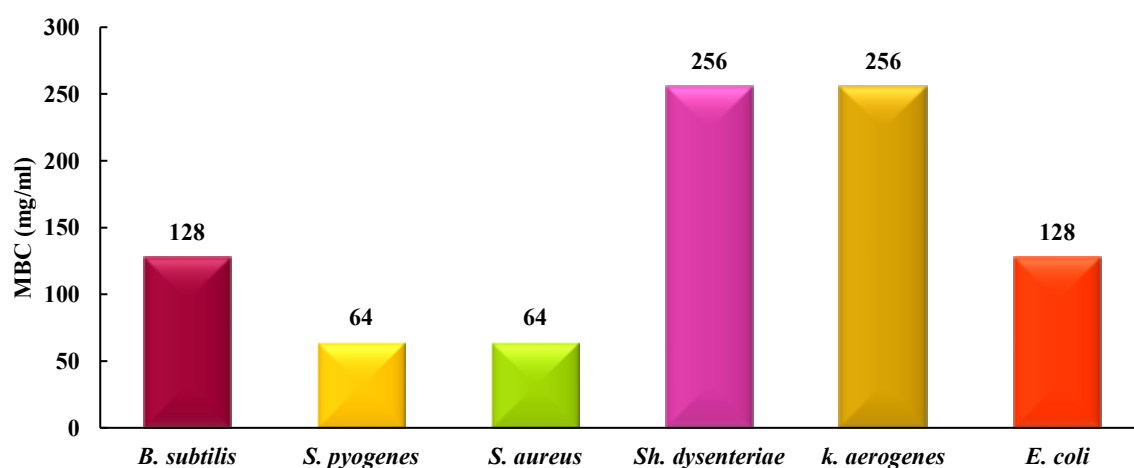


Fig 6. Antimicrobial activity of *Artemisia kopetdaghensis* essential oil based on minimum bactericidal concentration (MBC).

دو فلاونوئید) استخراج شده از گیاه درمنه کپه داغی بر روی تعدادی باکتری بررسی گردید. نتایج این پژوهش نشان داد،

در پژوهشی [۷]، فعالیت ضد میکروبی پنج ترکیب (لاکتون سزکوئی ترین، سزکوئی ترین پراکسید، فنوکسی کرومون و

آنتی‌اکسیدانی قوی برخوردار است. علاوه بر این، اسانس درمنه مورد آزمایش، فعالیت ضد میکروبی قابل توجهی از خود نشان داد. که بیانگر اثربخشی آن‌ها در برابر بیماری‌های ناشی از رشد بیش از حد میکروارگانیسم‌ها است. بنابراین، این گونه می‌تواند برای توسعه عوامل ضد میکروبی جدید مورد بررسی‌های بیشتر قرار گیرد. همچنین، می‌توان از آن به عنوان افزودنی‌های ایمن و طبیعی در فرآورده‌های غذایی برای افزایش ماندگاری مواد غذایی و کاهش فساد ناشی از رشد میکروارگانیسم‌ها مورد استفاده قرار گیرد. با این حال، تحقیقات بیشتری برای اطمینان از ایمنی و سمیت ترکیبات اصلی موجود در این اسانس مورد نیاز است.

۵- تقدیر و تشکر

مقاله حاضر مستخرج از طرح پژوهشی با کد ۱۴۰۳/۲۴ می‌باشد، لذا از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان به دلیل حمایت‌های مادی و معنوی صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

ترکیب سزکوئی ترپن پراکسید به عنوان قوی‌ترین ترکیب ضدباکتری، فعالیت چشمگیری علیه باکتری سودوموناس آئروژینوزا (MIC: ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و همچنین باکتری‌های سالمونلا تیفی، کلبسیلا پنومونیه، اشریشیا کلی و لیستریا مونوسیژنوز (MIC: ۳۲ و ۶۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بود. حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی اسانس و نانوامولسیون گیاه درمنه علیه دو سویه باکتریایی استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کلی توسط صالحي و همکاران (۱۴۰۲) گزارش گردید. نتایج حاصل از فعالیت ضد میکروبی اسانس درمنه در گزارش ما با سایر گزارش‌های مشابه مطابقت دارد [۲۱]. مکائیلی و همکاران (۱۴۰۲) فعالیت ضدقارچی عصاره درمنه کپه داغی را گزارش کردند [۳۱].

۴- نتیجه‌گیری

پژوهش حاضر نشان داد که اسانس درمنه کپه داغی حاوی مقدار قابل توجهی از ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی است. به دلیل محتوای بالای این ترکیب‌ها، این اسانس از فعالیت

۶- منابع

- [1] Bourgo, S., Tammar, S., Salem, N., Mkadmini, K., & Msaada, K. (2016). Phenolic composition, essential oil, and antioxidant activity in the aerial part of *Artemisia herba-alba* from several provenances: A comparative study. *International Journal of Food Properties*, 19(3), 549-563.
- [2] Alizadeh Behbahani, B., Tabatabaei Yazdi, F., Shahidi, F., & Mohebbi, M. (2012). Antimicrobial activity of *Avicennia marina* extracts ethanol, methanol & glycerin against *Penicillium digitatum* (citrus green mold). *Scientific Journal of Microbiology*, 1(7), 147-151.
- [3] 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.
- [4] Burdock, G. A., & Carabin, I. G. (2009). Safety assessment of coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil as a food ingredient. *Food and chemical Toxicology*, 47(1), 22-34.
- [5] Khan, F. A., Khan, N. M., Ahmad, S., Nasruddin, Aziz, R., Ullah, I., ... & Aljuaid, A. (2022). Phytochemical profiling, antioxidant, antimicrobial and cholinesterase inhibitory effects of essential oils

- isolated from the leaves of *Artemisia scoparia* and *Artemisia absinthium*. *Pharmaceuticals*, 15(10), 1221.
- [6] Sharmeen, J.B.; Mahomoodally, F.M.; Zengin, G.; Maggi, F. Essential Oils as Natural Sources of Fragrance Compounds for Cosmetics and Cosmeceuticals. *Molecules* 2021, 26, 666.
- [7] Ebrahimi, M., Ramezani, M., Tehrani, S. O., Malekshah, O. M., & Behravan, J. (2010). Cytotoxic effects of methanolic extract and essential oil of *Artemisia Kopetdagensis*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 13(6), 732-737.
- [8] Ezzatzadeh, E. (2017). Phytoconstituents and biological activities of *Artemisia kopetdagensis*. *Health Biotechnol Biopharma*, 1(3), 65-76.
- [9] Sainz, P., Andrés, M. F., Martínez-Díaz, R. A., Bailén, M., Navarro-Rocha, J., Díaz, C. E., & González-Coloma, A. (2019). Chemical composition and biological activities of *Artemisia pedemontana* subsp. *assoana* essential oils and hydrolate. *Biomolecules*, 9(10), 558.
- [10] Fattahian, M., Ghanadian, M., Zolfaghari, B., Aghaei, M., Zulfiqar, F., Khan, I. A., & Ali, Z. (2022). Phytochemical analysis of *Artemisia kopetdagensis*: Sesquiterpene lactones with proapoptotic activity

- against prostate cancer cells. *Phytochemistry*, 203, 113411.
- [11] Firouzni, A., Vahedi, H., Sabbaghi, F., & Bigdeli, M. (2008). Composition of the essential oil of *Artemisia ciniformis*, *A. kopetdaghensis*, and *A. khorasanica* in Iran. *Chemistry of natural compounds*, 44(6), 804-806.
- [12] Rahmati-Joneidabad, M., Alizadeh Behbahani, B., & Noshad, M. (2022). Evaluation of total phenols and flavonoids, antioxidant power, and antimicrobial activity of *Levisticum officinale* Koch essential oil against some spoilage fungi causing apple and orange rot. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 18(5), 699-709.
- [13] Tabatabai Yazdi, F., Falah, F., Alizadeh Behbahani, B., & Vasiee, A. (2019). Identification of chemical compounds, antioxidant potential, phenolic content and evaluation of inhibitory and bactericidal/fungicidal effects of ginger essential oil on some pathogenic microorganisms in vitro. *Qom University of Medical Sciences Journal*, 13(3), 50-62.
- [14] Falah, F., Shirani, K., Vasiee, A., Yazdi, F. T., & Behbahani, B. A. (2021). In vitro screening of phytochemicals, antioxidant, antimicrobial, and cytotoxic activity of *Echinops setifer* extract. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 35, 102102.
- [15] Heydari, S., Jooyandeh, H., Alizadeh Behbahani, B., & Noshad, M. (2020). 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*, 8(12), 6497-6512.
- [16] 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.
- [17] Alizadeh, B. B., Falah, F., Vasiee, A., & Tabatabae Yazdi, F. (2021). 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*, 9(5), 2458-2467.
- [18] Tabatabai Yazdi, F., & Behbahani, B. A. (2013). Antimicrobial effect of the aqueous and ethanolic *Teucrium polium* L. extracts on gram positive and gram negative bacteria "in vitro". *Archives of Advances in Biosciences*, 4(4).
- [19] Alizadeh, B. B., Farideh Tabatabaei, Y., Ali, M., Mohammad Mahdi, G., Fatemeh, Z., & Alireza, V. (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*.
- [20] Tabatabai Yazdi, F., 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).
- [21] Salahi, E., Asgharzadeh, A., Amani, A., Besharati, M., & Tatari, M. (2023). Design of Nanoemulsions Containing Essential Oil of *Artemisia Kopetdaghensis*: Investigation of Antioxidant Properties and Antimicrobial Activity on Two Isolates from Clinical Specimens.
- [22] Tabatabai Yazdi, F., Tanhaeian, A., Azghandi, M., Vasiee, A., Behbahani, B. A., Mortazavi, S. A., & Roshanak, S. (2019). Heterologous expression of thrombocidin-1 in *Pichia pastoris*: evaluation of its antibacterial and antioxidant activity. *Microbial pathogenesis*, 127, 91-96.
- [23] 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.
- [24] Alizadeh, B. 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.
- [25] Arvin, P., & Firouzeh, R. (2022). Study of quality, quantity and antioxidant activity of essential oils of two medicinal species of *Artemisia kopetdaghensis* Krasch. and *A. sieberi* Besser. *Journal of Plant Process and Function*, 11(50), 199-212.
- [26] 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. doi:10.22067/ifstrj.v17i1.85992
- [27] Sureshjani, M. H., Yazdi, F. T., Mortazavi, S. A., Behbahani, B. A., & Shahidi, F. (2014). Antimicrobial effects of *Kelussia odoratissima* extracts against food borne and food spoilage bacteria" in vitro. *Journal of Paramedical Sciences*, 5(2), 115-120.
- [28] Behbahani, B. A., Yazdi, F. T., Shahidi, F., & Riazi, F. (2016). Antifungal effect of the aqueous and ethanolic *Avicennia marina* extracts on *Alternaria citri* and *Penicillium digitatum*. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*, 18(2).
- [29] Alizadeh, B. B., Falah, F., Vasiee, A., Tabatabaei, Y. F., & Mortazavi, S. A. (2019). Antimicrobial effect of *Citrus aurantium* essential oil on some foodborne pathogens and determination of its

chemical compounds, total phenolcontent, total flavonoids content and antioxidant potential. FSCT, 16 (87) :291-304

[30] Alizadeh, B. B., Noshad, M., & Falah, F. (2020). The combined effect of the combined Fennel and Clove essential oils on *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhi* and *Enterobacter aerogenes* using Checkerboard assay (fractional

inhibitory concentration index). *Journal of food science and technology (Iran)*, 17(106), 75-83.

[31] Mikaeili, A., Ghasemi, S., Salmani, S., Modarresi, M., & Mojarab, M. (2023). Antifungal effects of various extracts from three *Artemisia* species against dermatophytosis fungal agents. *Journal of Birjand University of Medical Sciences*, 30(1), 33-43.



Journal of Food Science and Technology (Iran)

Homepage: www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Investigating the chemical properties and antimicrobial activity of *Artemisia kopetdaghensis* essential oil against bacteria that cause infectious diseases *in vitro*

Behrooz Alizadeh Behbahani^{*1}, Mohammad Noshad¹, Parisa Ghasemi²

1- 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.

2- PhD student, 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: 2025/3/11 Accepted: 2025/4/21 Keywords: <i>Artemisia kopetdaghensis</i>, Essential oil, Antimicrobial, Phenolic compounds, Antioxidant activity. DOI: 10.22034/FSCT.22.166.243. *Corresponding Author E- B.alizadeh@asnrukh.ac.ir	In recent years, in order to improve the hygienic quality and reduce the risks associated with chemical preservatives in the food industry, researchers have focused on the use of natural compounds, especially essential oils. This shift in approach is due to their antioxidant and antimicrobial properties. In this context, the antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content, and antimicrobial properties of the essential oil of <i>Artemisia kopetdaghensis</i> were investigated. Results showed that <i>Artemisia kopetdaghensis</i> essential oil contained high levels of total phenols (60.43 ± 1.41 mg gallic acid equivalent/g) and total flavonoids (24.38 ± 1.32 mg quercetin equivalent/g). Evaluation of antioxidant activity revealed that the essential oil exhibited a strong ability to scavenge DPPH radicals ($63.49 \pm 1.25\%$) and ABTS radicals ($70.61 \pm 1.20\%$). The antimicrobial activity against pathogenic bacterial strains (Gram-positive: <i>Streptococcus pyogenes</i>, <i>Staphylococcus aureus</i>, and <i>Bacillus subtilis</i>; Gram-negative: <i>Shigella dysenteriae</i>, <i>Klebsiella aerogenes</i>, and <i>Escherichia coli</i>) revealed that Gram-positive bacteria were more susceptible to <i>Artemisia kopetdaghensis</i> essential oil compared to Gram-negative bacteria. This research demonstrated that the essential oil of <i>Artemisia kopetdaghensis</i> contains bioactive compounds with antimicrobial activity. This finding confirms the potential of this plant-based essential oil as a natural alternative to harmful chemical preservatives in the food industry.