تعیین فنل و فلاونوئید کل، توانایی رادیکال گیرندگی و فعالیت ضدمیکروبی عصاره برگ بلوط بر باکتری‌های *سالمونلا تیفی، اشرشیا کلی، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و لیستریا مونوسیتوژنز*

شماره صفحات
۵۰-۶۲

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

۱) دانشیار گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران.
۲) استادیار گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران.
۳) استادیار گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران.

* نویسنده مسئول: **Noshad@asnrukh.ac.ir**

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۱/۳۱

چکیده

هدف از این مطالعه، استخراج عصاره اتانولی برگ بلوط به روش خیساندن و تعیین محتوای فنول کل (به روش معرف فولین-سیوکالتو)، فلاونوئید کل (به‌روش رنگ‌سنجی کلراید آلومینیوم)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی (بر اساس روش‌های مهار رادیکال آزاد DPPH و ABTS) و اثر ضدمیکروبی (مطابق روش‌های دیسک دیفیوژن آگار، چاهک آگار، حداقل غلظت مهارکنندگی رشد و حداقل غلظت کشندگی) آن بود. میزان فنول و فلاونوئید کل عصاره به‌ترتیب برابر با ۷۹/۲۱ mg GAE/g و ۳۵/۱۰ mg QE/g بود. عصاره اتانولی برگ بلوط دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل‌توجهی بود؛ به‌طوری‌که قادر به مهار ۵۲/۶۰ درصد از رادیکال‌های آزاد DPPH و۶۰/۵۰ درصد از رادیکال آزاد ABTS بود. نتایج بررسی فعالیت ضدمیکروبی عصاره به روش دیسک دیفیوژن آگار نشان داد که اثر ضدمیکروبی عصاره وابسته به غلظت است. بیش‌ترین و کم‌ترین قطر هاله عدم رشد در غلظت ۱۰۰ $mg.ml^{-1}$ به‌ترتیب برای باکتری‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* (۱۸/۶۰ mm) و *سالمونلا تیفی* (۱۴/۸۰ mm) مشاهده گردید. میزان قطر هاله عدم رشد در روش چاهک آگار برای دو باکتری فوق به‌ترتیب برابر با ۱۹/۴۰ mm و ۱۵/۱۰ mm بود. علاوه‌بر این، حداقل غلظت مهارکنندگی رشد برای حساس‌ترین باکتری (*استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*) و مقاوم‌ترین باکتری (*سالمونلا تیفی*) به‌ترتیب برابر با ۳۲ $mg.ml^{-1}$ و ۲۵۶ $mg.ml^{-1}$ به‌دست آمد. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که عصاره اتانولی برگ بلوط را می‌توان به‌عنوان ترکیب زیست‌فعال طبیعی جهت جایگزینی مواد نگهدارنده سنتزی استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: فعالیت آنتی‌اکسیدانی، اثر ضدمیکروبی، عصاره اتانولی و برگ بلوط.

مقدمه

اکسیداسیون مواد غذایی و پاتوژن‌های موجود در آن، دو فاکتور مهم و اثرگذار بر کیفیت محصولات غذایی در طول دوره نگهداری می‌باشند (Barzegar *et al*., 2020). در سال‌های اخیر، تمایل به مصرف مواد غذایی طبیعی، استفاده از نگهدارنده‌های سنتزی جهت کنترل رشد میکروبی و اکسیداسیون لیپیدها به‌شدت کاهش یافته است. علاوه‌بر این، افزایش مقاومت میکروارگانیسم‌های مختلف به آنتی‌بیوتیک‌های رایج، توجه بخش‌های صنعتی و تحقیقاتی به استفاده از ترکیبات ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی طبیعی را جلب کرده است. این نگهدارنده‌ها عموماً از گیاهان دارویی به‌دست می‌آیند. گیاهان دارویی علاوه‌بر خواص درمانی به‌عنوان مخازنی از ترکیبات زیست‌فعال طبیعی شناخته می‌شوند (Alizadeh Behbahani and Noshad, 2021; Kiarsi *et al*., 2020). عصاره‌ها و اسانس‌های حاصل از بخش‌های مختلف گیاهان علاوه‌بر ایجاد عطر و طعم، به‌دلیل دارا بودن فعالیت ضد میکروبی در بهبود ایمنی مواد غذایی مؤثر می‌باشند. همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولی موجود در عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی در تثبیت اسیدهای چرب آزاد محصولات غذایی و افزایش ماندگاری آن‌ها نقش دارند (Noshad *et al*., 2020).

درخت بلوط با نام علمی *Quercus persica* L. در برخی مناطق ایران یافت می‌شود (Karimi *et al*., 2011). بلوط ایرانی با درختانی تا ارتفاع ۲۰m دارای تاج کروی بزرگ بوده و جز خانواده فاگاسه[1]می‌باشد. برگ‌های درخت بلوط یکنواخت و تخم‌مرغی شکل و میوه آن کشیده و شبیه بیضی می‌باشد. قسمت‌های مختلف این گیاه در درمان بیماری‌های مختلف مانند بواسیر، التهاب، زخم معده، بیماری‌های پوستی، واریس، اگزما و پادزهری برای مسمومیت‌های آلکالوئیدها استفاده می‌شود. تانن که یکی از ترکیبات عمده بلوط ایرانی است دارای اثرات ضدعفونی کنندگی می‌باشد (Karimi *et al*., 2011).

در مطالعات مختلف اثر ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی بخش‌های مختلف درخت بلوط بررسی شده است. به‌عنوان مثال در پژوهشی اثر ضد میکروبی عصاره‌های آبی و اتانولی جفت میوه بلوط بر رشد *لاکتوکوکوس گارویه*[2]با استفاده از روش چاهک آگار و دیسک دیفیوژن بررسی گردید (Hosseini *et al*., 2016). بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره هیدروالکی میوه بلوط و مقایسه آن با تعدادی از آنتی‌بیوتیک‌های رایج نشان داد که غلظت $mg.ml^{-1}$ ۷۵ عصاره دارای اثرات ضد میکروبی بالایی بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*[3]بوده و قادر به رقابت با برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها مانند توبرامایسین می‌باشد (Ebrahimi *et al*., 2012). همچنین گزارش شده است که برخی از غلظت‌های عصاره متانولی جفت دانه بلوط دارای اثر مشابه یا بیش‌تری در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های کوتریموکسازول و نالیدیکسیک اسید می‌باشد (Khosravi and Behzadi, 2002). گزارش شده است که عصاره‌های آبی و اتانولی (۷۰٪) میوه بلوط دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بوده و استفاده از عصاره اتانولی سبب تأخیر در

[1] *Fagaceae*
[2] *Lactococcus garvieae*
[3] *Staphylococcus aureus*

اکسیداسیون روغن آفتاب‌گردان می‌شود (Ghaderi Ghahfarokhi *et al*., 2012a,b). در این مطالعه پس از تهیه عصاره اتانولی برگ درخت بلوط، میزان فنول کل، فلاونوئید کل اندازه‌گیری شد. همچنین خاصیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از دو روش مهار رادیکال آزاد DPPH و مهار رادیکال آزاد ABTS[2] بررسی گردید. علاوه‌بر این فعالیت ضد میکروبی عصاره این گیاه بر روی باکتری‌های *سالمونلا تیفی*[3]، *اشرشیا کلی*[4]، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*[5] و *لیستریا مونوسیتوژنز*[6] مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد

رادیکال آزاد ABTS، رادیکال آزاد DPPH، معرف فولین-سیوکالتو (شرکت سیگما، آمریکا) و محیط‌های کشت مولر هینتون براث، مولر هینتون آگار و ۲ و ۳ و ۵ تری فنیل تترازولیوم کلراید (شرکت مرک، آلمان) از جمله مورد استفاده در این پژوهش بودند.

جمع‌آوری گیاه و تهیه عصاره

پس از جمع‌آوری گیاه بلوط، برگ‌های آن در شرایط مناسب خشک و سپس پودر شدند. جهت تهیه عصاره اتانولی با استفاده از روش خیساندن ابتدا، ۵۰ g از پودر برگ بلوط با ۲۵۰ ml اتانول ۹۶٪ مخلوط و به مدت ۷۲ hr در انکوباتور شیکردار هم‌زده شد. پس از عبور مخلوط از کاغذ صافی واتمن، سوپرناتانت با سرعت ۳۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ min جدا گردید. از اواپراتور تحت خلأ جهت حذف حلال استفاده شد. عصاره تهیه شده در ظروف در بسته، دور از نور و در یخچال نگهداری شد (Tabatabai Yazdi *et al*., 2015).

اندازه‌گیری فنول کل

به‌طور خلاصه ۰/۱ ml نمونه به ۰/۱ ml معرف فولین- سیوکالتو ۱۰٪ v/v اضافه و به‌مدت ۵ min هم‌زده شد. سپس ۰/۳ ml سدیم کربنات ۱۰٪ به آن اضافه شد. پس از گذشت ۲۴ hr در دمای اتاق، جذب نمونه در طول‌موج ۷۶۰ nm اندازه‌گیری شد. از غلظت‌های مختلف گالیک‌اسید ($0-0.5\ mg.ml^{-1}$) به‌عنوان استاندارد استفاده و میزان فنول کل عصاره بر حسب میلی‌گرم گالیک‌اسید موجود در هر گرم وزن خشک عصاره (mg GAE/g) گزارش گردید (Alizadeh Behbahani *et al*., 2019b).

میزان فلاونوئید کل

۰/۱ ml عصاره ($0.1\ mg.ml^{-1}$) یا کوئرستین ($0-0.5\ mg.ml^{-1}$) به ۳ ml محلول نیتریت سدیم (۵٪) اضافه شد. سپس

---

[1] 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
[2] 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
[3] *Salmonella typhi*
[4] *Escherichia coli*
[5] *Staphylococcus epidermidis*
[6] *Listeria monocytogenes*

به مدت ۵ min همزده شد و ۰/۱ ml محلول آلومینیوم تری کلراید (۱۰٪) به آن اضافه و به مدت ۶ min دقیقه همزده شد. پس از افزودن ۱ ml سود ۱ M، جذب نمونه در ۵۱۰ nm اندازه‌گیری شد. مقدار فلاونوئید کل برحسب میلی‌گرم کوئرستین در هر گرم عصاره (mg QE/g) گزارش گردید (Barzegar *et al*., 2020).

تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره

اندازه‌گیری مهار رادیکال آزاد DPPH

برای این منظور، ۱ ml از عصاره اتانولی با ۳ ml محلول متانولی DPPH مخلوط گردید و به مدت ۳۰ min در محل تاریکی در دمای اتاق نگهداری شدد. جذب نمونه در طول‌موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری گردید. از متانول به عنوان کنترل استفاده شد. درصد مهارکنندگی رادیکال DPPH طبق معادله زیر محاسبه گردید (Namazi *et al*., 2021):

$$\text{فعالیت مهارکنندگی (٪)} = (A_{\text{کنترل}} - A_{\text{نمونه}} / A_{\text{کنترل}}) \times ۱۰۰$$

مهار رادیکال آزاد ABTS

ابتدا محلول آبی ABTS با غلظت ۷ mM تهیه و سپس توسط پتاسیم پرسولفات تا رسیدن به غلظت ۲/۴۵ mM رقیق گردید. محلول کاتیونی رادیکالی ABTS به مدت ۱۶ hr در دمای اتاق در محل تاریکی نگهداری شد. محلول کاتیونی رادیکالی ABTS در طول‌موج ۷۳۴ nm تا رسیدن به جذب ۰/۷ رقیق گردید. در پایان، ۳۰ µl عصاره یا متانول (به عنوان کنترل) به ۳ ml محلول کاتیونی رادیکال ABTS اضافه و پس از ۶ min جذب نمونه اندازه‌گیری شد (Majdi *et al*., 2021).

تعیین خاصیت ضدمیکروبی عصاره

دیسک دیفیوژن آگار

دیسک‌های بلانک به‌مدت ۱۵ min در غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی ($mg.ml^{-1}$ ۱۰۰، ۷۵، ۵۰، ۲۵) غوطه‌ور و سپس بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار حاوی سویه‌های میکروبی تثبیت گردید. پلیت‌ها در دمای ۳۷ °C، به مدت ۲۴ hr ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. در پایان، قطر هاله‌های عدم رشد اطراف دیسک‌ها اندازه‌گیری و بر حسب mm اندازه‌گیری شد (Zanganeh *et al*., 2021).

چاهک آگار

در این روش سویه‌های میکروبی بر اساس استاندارد ۰/۵ مک فارلند در سطح محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد. سپس، ۲۰ µl از هر یک از غلظت‌های تهیه شده ($mg.ml^{-1}$ ۴۰۰، ۳۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰) به چاهک‌های ایجاد شده اضافه گردید. پس از گذشت ۲۴ hr در دمای ۳۷ °C درجه سانتی‌گراد، قطر هاله‌های عدم رشد اطراف چاهک‌ها بر حسب mm اندازه‌گیری و گزارش گردید (Barzegar *et al*., 2019).

اندازه‌گیری حداقل غلظت مهارکنندگی[1]

ابتدا غلظت‌های مختلف عصـــاره اتانولی ($mg.ml^{-1}$ ۵۱۲، ۲۵۶، ۱۲۸، ۶۴، ۳۲) در محیط مولر هینتون براث تهیه گردید. سپس با استفاده از فیلتر µm ۴۵ استریل شد. در مرحله بعد، µl ۲۰۰ یک از غلظت‌های استریل شده به چاهک‌های حاوی µl ۲۰ ســوســپانســیون میکروبی اضــافه گردید. پس از گذشــت hr ۲۴ در دمای °C ۳۷، µl ۲۰ معرف تری‌فنل‌تترازولیوم ۵٪ به چاهک‌ها اضــافه شــد. پس از min ۳۰ گرمخانه‌گذاری، اولین خانه فاقد رشــد و تغییر رنگ به‌عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی گزارش شد (Alizadeh Behbahani *et al*., 2019a).

اندازه‌گیری حداقل غلظت کشندگی[2]

جهت اندازه‌گیری حداقل غلظت کشندگی، µl ۱۰۰ از چاهک‌های بدون تغییر رنگ در آزمون حداقل غلظت مهارکنندگی بر روی پلیت‌های حاوی محیط کشــت مولر هینتون آگار کشــت داده شــد. پس از گرمخانه‌گذاری اولین غلظتی که در آن تعداد باکتری‌های بیماری‌زا ۹۹/۹ درصـــد کاهش پیدا کرده بودند، به عنوان حداقل غلظت کشـــندگی گزارش شـــد (Alizadeh Behbahani and Shahidi, 2019).

آنالیز آماری

در این پژوهش همه آزمون‌ها در سه تکرار انجام شدند. از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۸ جهت تجزیه و تحلیل نتایج استفاده شد. به‌منظور تعیین معنی‌دار بودن اختلاف بین میانگین‌ها، از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵٪ ($p<0.05$) استفاده شد.

نتایج و بحث

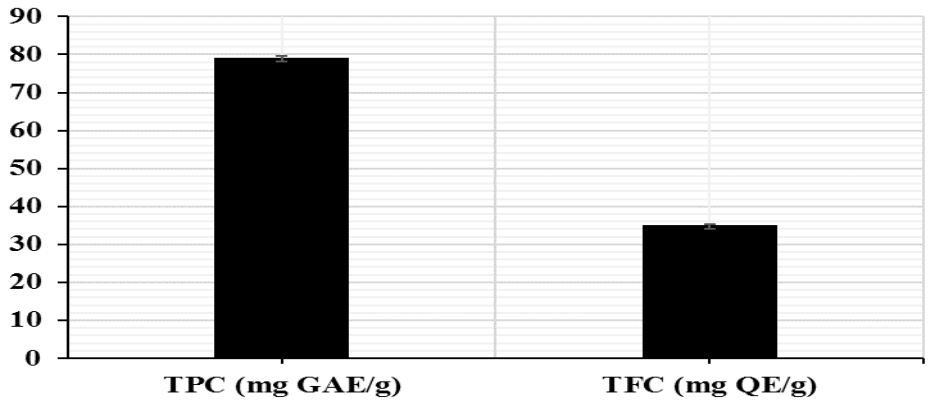
میزان فنول و فلاونوئید کل

محتوای فنول و فلاونوئید عصاره اتانولی برگ بلوط در شکل ۱ نشان داده شده است. عصاره اتانولی برگ بلوط دارای میزان فنول کل برابر با mg GAE/g ۰/۳۷ ± ۷۹/۲۱ بود. محتوای فلاونوئید عصاره اتانولی بلوط نیز mg QE/g ۰/۲۲ ± ۳۵/۱۰ به دست آمد.

محتوای فنول کل عصاره متانولی دو گونه بلوط *Q. robur* و *Q. cerris* به ترتیب mg QE/mg ۰/۲۲۳ و ۰/۲۲۹ گزارش گردید (Rakić *et al*., 2007). میزان فنول کل عصـــاره اتانولی و آبی بلوط را به ترتیب mg Tannic acid/g ۲۳۸/۸۵ و ۱۴۲/۱۸ گزارش نمودند (Ghaderi Ghahfarokhi *et al*., 2012a). در مطالعه‌ای دیگر، مشخص گردید که عصاره آبی برگ دو گونه بلوط *Q. robur* و *Q. petraea* به ترتیب دارای محتوای فنول کل mg catechin/g ۳۲/۳۷ و ۳۵/۵۲ و فلاونوئید کل

[1] Minimum inhibitory concentration (MIC)
[2] Minimum bactericidal concentration (MBC)

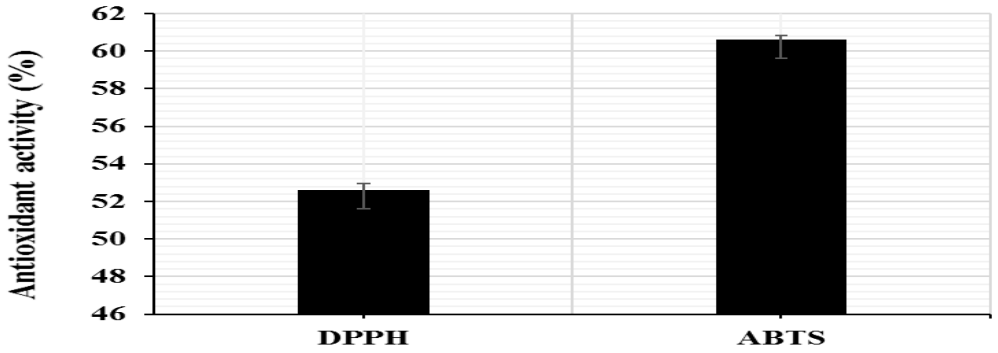
mg rutin/g ۲۹۰/۲ و ۳۰۶/۱ می‌باشد (Popović *et al*., 2013). علاوه بر این، در گزارشی دیگر بیان شد که عصاره متانولی دو گونه میوه بلوط *Q. castaneifolia* و *Q. branti* دارای محتوای فنول کل به ترتیب mg Tannic acid/g ۱۸۳/۹۶ و ۲۱۷/۶۵ می باشند (Ghaderi Ghahfarokhi *et al*., 2012b). مقدار ترکیبات فنولی موجود در بافت های گیاهی و عصاره/اسانس‌های گیاهی تحت تأثیر عوامل مختلفی از قبیل گونه و واریته، ژنتیک، شرایط خاک، میزان تابش نور خورشید، شرایط محیطی و آب و هوایی، درجه ر سیدگی در زمان بردا شت، عملیات پس از بردا شت، شرایط نگهداری، روش ا ستخراج، حلال مورد استفاده و زمان استخراج قرار می‌گیرند (Ghaderi Ghahfarokhi *et al*., 2012a).



شکل ۱: میزان فنول و فلاونوئید کل عصاره اتانولی برگ بلوط.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی

در این مطالعه از دو روش آنتی‌اکسیدانی بر پایه مهار رادیکال های آزاد DPPH و ABTS جهت بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی برگ بلوط استفاده شد (شکل ۲). فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره بر اساس مهار رادیکال آزاد DPPH برابر با ۰/۳۸ ± ۵۲/۶۰ درصد و بر اساس مهار رادیکال آزاد ABTS معادل ۰/۳۷ ± ۶۰/۵۰ درصد بود.



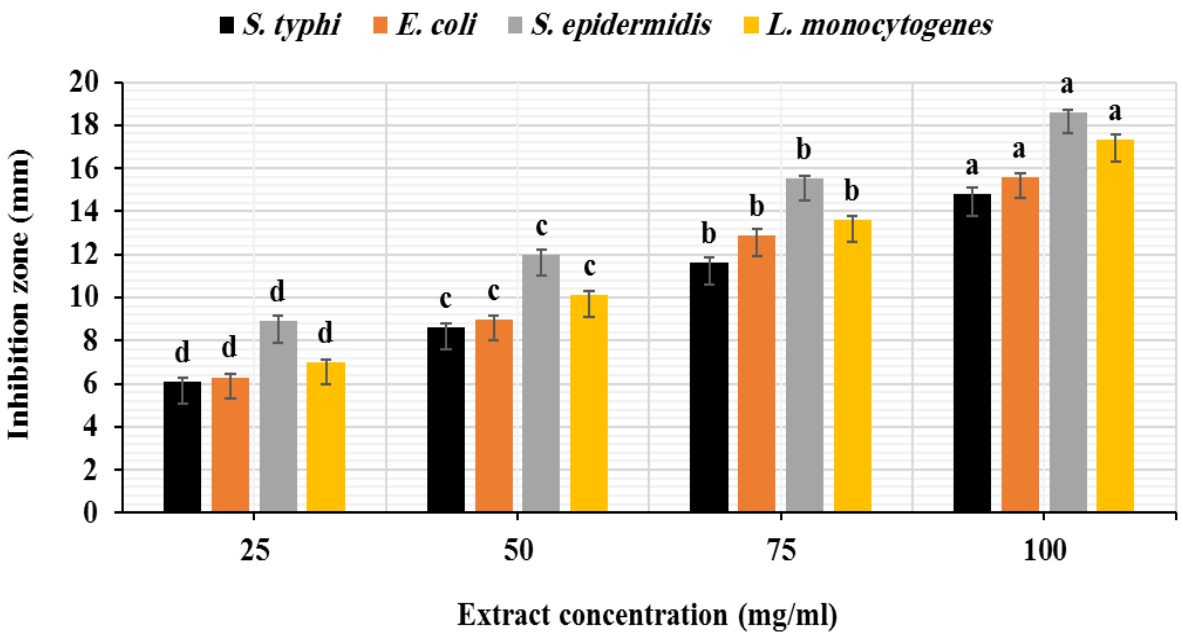
شکل ۲: میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی برگ بلوط بر اساس روش‌های مهار رادیکال آزاد DPPH و ABTS.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره برگ و میوه بلوط در مطالعات مختلف گزارش شده است. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره آبی برگ، میوه و چوب بلوط بر اساس روش‌های آنتی‌اکسیدانی DPPH و مهار رادیکال‌های اکسید نیتروژن و اکسیژن اندازه‌گیری شده است و نتایج مؤید اثر آنتی‌اکسیدانی بالقوه عصاره بخش‌های مختلف درخت بلوط می‌باشد (Popović *et al*., 2013). عصاره متانولی میوه بلوط قابلیت به تأخیر انداختن اکسیداسیون روغن آفتابگردان را دارا است (Ghaderi Ghahfarokhi *et al*., 2012b). این محققان در پژوهشی دیگر، فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های آبی و اتانولی میوه بلوط را با روش‌های مختلف اندازه‌گیری و مقایسه نمودند (Ghaderi Ghahfarokhi *et al*., 2012a). نتایج این محققان نشان داد که بیشترین میزان به دام اندازی رادیکال‌های آزاد DPPH توسط عصاره اتانولی حاصل شد و در آزمون‌های ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل و قدرت احیاء کنندگی، بالاترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی به ترتیب توسط BHT، عصاره اتانولی، BHA و عصاره آبی بود. علاوه بر این، عصاره اتانولی میوه بلوط (۲۵۰ ppm، ۵۰۰ و ۱۰۰۰) به روغن آفتابگردان اضافه گردید و کارایی آنتی‌اکسیدانی آن با آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی BHA و BHT (۱۰۰ ppm و ۲۰۰) مقایسه گردید. نتایج نشان داد که اکسیداسیون روغن در حضور عصاره اتانولی به تأخیر افتاد و غلظت‌های ۵۰۰ ppm و ۱۰۰۰ عصاره کارایی بهتری نسبت به غلظت ۲۰۰ ppm از BHT و غلظت ۲۵۰ ppm عصاره نسبت به غلظت ۱۰۰ ppm از آنتی‌اکسیدان BHA بهتر عمل نمود (Ghaderi Ghahfarokhi *et al*., 2012a).

در مطالعه‌ای دیگر برهمکنش ضداکسایشی ترکیب عصاره‌های چای سبز و بلوط را در شرایط آزمایشگاهی و روغن بررسی شد. نتایج نشان داد که در آزمون‌های مهار رادیکال آزاد DPPH و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل، عصاره چای سبز در تمامی غلظت‌ها و در آزمون قدرت احیاء کنندگی در دو غلظت عملکردی بهتری نسبت به BHT داشت و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن بهتر از عصاره بلوط بود. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره بلوط بر اساس مهار رادیکال آزاد DPPH بهتر از BHT بود. اگرچه عصاره ترکیبی چای و بلوط اثر هم‌ستیزی در روغن نشان داد، اما عملکرد آن بهتر از آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT بود (Nedamani *et al*., 2015). فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره آبی و آلی بخش‌های مختلف درخت بلوط عمدتاً ناشی از حضور ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در آن‌ها می‌باشد که قابلیت اهداء هیدروژن به رادیکال‌های آزاد و در نتیجه مهارکنندگی آنها را دارند (Raissy *et al*., 2022; Lavado *et al*., 2021). رادیکال‌های آزاد به‌عنوان گونه‌های بسیار شدت واکنش‌گر شناخته می شوند که قادر به واکنش با مولکول‌های موجود در سامانه‌های بیولوژیک می باشند؛ به‌طوری‌که سبب شکسته شدن رشته‌های DNA، تخریب پروتئین و تسریع پراکسیداسیون ترکیبات مختلف می‌شوند (Noshad *et al*., 2020). با توجه به فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل‌توجه عصاره اتانولی برگ بلوط می‌توان از این ترکیب زیست فعال جهت جلوگیری یا کنترل اکسیداسیون مواد غذایی غنی از اسیدهای چرب غیراشباع استفاده نمود.

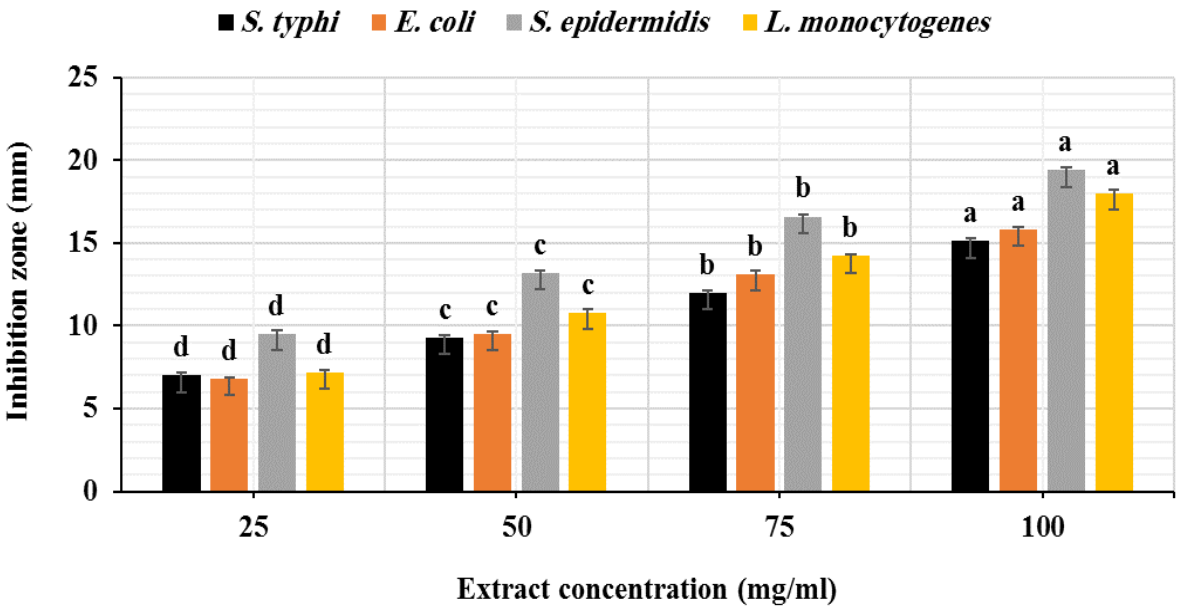
فعالیت ضدمیکروبی

نتایج فعالیت ضدمیکروبی غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی برگ بلوط بر اساس روش دیسک دیفیوژن آگار در شکل ۳ ارائه داده شده است. مطابق نتایج، افزایش غلظت عصاره سبب افزایش معنی‌دار قطر هاله عدم رشد برای تمام باکتری‌های مورد مطالعه گردید. قطر هاله عدم رشد غلظت ۲۵ $mg.ml^{-1}$ عصاره برای باکتری‌های *سالمونلا تیفی*، *اشرشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و *لیستریا مونوسیتوژنز* به ترتیب برابر با ۶/۱۰ mm، ۶/۳۰، ۸/۹۰ و ۷ بود؛ در حالی‌که این اعداد در حضور غلظت ۱۰۰ $mg.ml^{-1}$ عصاره اتانولی برگ بلوط به ترتیب ۱۴/۸۰ mm، ۱۵/۶۰، ۱۸/۶۰ و ۱۷/۳۰ بود. در غلظت ۱۰۰ $mg.ml^{-1}$ عصاره، بیش‌ترین و کم‌ترین قطر هاله عدم رشد به‌ترتیب برای باکتری‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و *سالمونلا تیفی* مشاهده گردید. علاوه‌بر این، قطر هاله عدم رشد برای باکتری‌های گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و *لیستریا مونوسیتوژنز*) بزرگ‌تر از باکتری‌های گرم منفی (*سالمونلا تیفی* و *اشرشیا کلی*) بود که بیانگر حساسیت بیشتر این باکتری‌ها نسبت به عصاره اتانولی برگ بلوط می‌باشد.



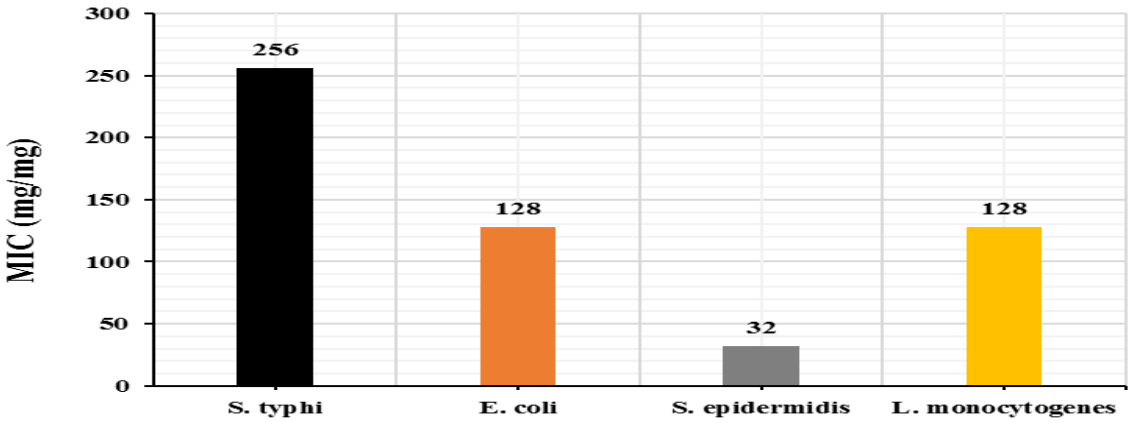
شکل ۳: میزان فعالیت ضدمیکروبی عصاره اتانولی برگ بلوط بر اساس روش دیسک دیفیوژن آگار.

نتایج مشابهی در روش ضدمیکروبی چاهک آگار مشاهده گردید (شکل ۴). قطر هاله عدم رشد با افزایش غلظت عصاره به‌طور معنی‌داری افزایش یافت و این مقدار برای باکتری‌های *سالمونلا تیفی*، *اشرشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و *لیستریا مونوسیتوژنز* در غلظت ۴۰۰ $mg.ml^{-1}$ عصاره به‌ترتیب ۱۵/۱۰ mm، ۱۵/۸۰، ۱۹/۴۰ و ۱۸ بود. باکتری *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* با قطر هاله عدم رشد ۱۹/۴۰ mm و باکتری *سالمونلا تیفی* با قطر هاله عدم رشد ۱۵/۱۰ mm به ترتیب حساس‌ترین و مقاوم‌ترین میکروارگانیسم‌ها نسبت به غلظت ۴۰۰ $mg.ml^{-1}$ عصاره اتانولی برگ بلوط بودند.



شکل ۴: میزان فعالیت ضدمیکروبی عصاره اتانولی برگ بلوط بر اساس روش چاهک آگار.

نتایج فعالیت ضدمیکروبی عصاره اتانولی برگ بلوط بر اساس روش حداقل غلظت مهارکنندگی رشد در شکل ۵ آورده شده است. حداقل غلظت مهارکنندگی رشد برای باکتری‌های *سالمونلا تیفی*، *اشرشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و *لیستریا مونوسیتوژنز* به‌ترتیب برابر با $mg.ml^{-1}$ ۲۵۶، ۱۲۸، ۳۲ و ۱۲۸ بود. نتایج نشان می‌دهد که باکتری‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و *سالمونلا تیفی* به‌ترتیب حساس‌ترین و مقاوم‌ترین سویه‌ها نسبت به عصاره می‌باشند که در راستای نتایج آزمون‌های دیسک دیفیوژن آگار و چاهک آگار می‌باشد. با اینحال، لازم به ذکر است که حداقل غلظت کشندگی برای باکتری‌های *سالمونلا تیفی*، *اشرشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و *لیستریا مونوسیتوژنز* به ترتیب برابر با $mg.ml^{-1}$ ۵۱۲، ۲۵۶، ۶۴ و ۱۲۸ بود (جدول ۱).



شکل ۵: حداقل غلظت مهارکنندگی رشد عصاره اتانولی برگ بلوط در برابر باکتری‌های پاتوژن.

جدول ۱. حداقل غلظت کشندگی عصاره اتانولی برگ بلوط در برابر باکتری‌های پاتوژن

میکروارگانیسم	حداقل غلظت کشندگی ($mg.ml^{-1}$)
سالمونلا تیفی	۵۱۲
اشرشیا کلی	۲۵۶
استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس	۶۴
لیستریا مونوسیتوژنز	۱۲۸

مقاومت بالاتر باکتری‌های گرم منفی در برابر عصاره اتانولی برگ بلوط نسبت به انواع گرم مثبت ممکن است به حضور غشاءهای خارجی اطراف غشاء سلولی باکتری‌های گرم منفی نسبت داده شود که سبب افزایش مقاومت آن‌ها نسبت به مواد ضدمیکروبی می‌شود. به‌طوری‌که این غشا لیپوپلی‌ساکاریدی قادر به کاهش سرعت نفوذ ترکیبات آب‌گریز موجود در عصاره و اسانس‌های گیاهی به داخل سلول می‌باشد. در حالی‌که باکتری‌های گرم مثبت دارای لایه موکوپپتیدی ساده با نفوذپذیری بالایی در ساختار سلولی خود بوده و بنابراین حساسیت بیشتری نسبت به ترکیبات آبگریز دارند (Alizadeh Behbahani *et al*., 2020; Falah *et al*., 2021). بررسی فعالیت ضدمیکروبی عصاره هیدروالکلی (اتانول/آب) میوه بلوط ایرانی با استفاده از روش دیسک دیفیوژن آگار بر روی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و *اشرشیا کلی*، نشان دادند که اثر ضدمیکروبی عصاره وابسته به غلظت بود. در غلظت عصاره $mg.ml^{-1}$ ۷۵، اثر ضدمیکروبی بر روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بیش‌تر از آنتی‌بیوتیک توبرامایسین، کم‌تر از کانامایسین و مشابه جنتامایسین بود. علاوه‌بر این، اثر ضدمیکروبی غلظت $mg.ml^{-1}$ ۷۵ عصاره هیدروالکی بلوط در برابر *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* مشابه کانامایسین، کم‌تر از توبرامایسین و بیش‌تر از جنتامایسین بود. در ارتباط با باکتری *اشرشیا کلی*، اثر ضدباکتریایی بیش‌تر از توبرامایسین و کم‌تر از جنتامایسین و کانامایسین گزارش گردید (Ebrahimi *et al*., 2010). این محققان در مطالعه‌ای دیگر نشان دادند که اثر ضدباکتریایی عصاره متانولی پوست تنه، پوست میوه، میوه و برگ بلوط ایرانی در برابر باکتری *اشرشیا کلی* وابسته به غلظت بود و اثر ضدمیکروبی عصاره حاصل از میوه بلوط بهتر از عصاره‌های برگ، پوست تنه، پوست میوه و آنتی‌بیوتیک‌های مورد آزمایش بود (Ebrahimi *et al*., 2012). فعالیت ضدباکتریایی عصاره اتانولی جفت میوه بلوط (لایه داخلی میوه بلوط) در برابر باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* را بررسی شد. نتایج این محققان نشان داد که قطر هاله عدم رشد در حضور عصاره اتانولی برابر با ۷/۷۲ mm در روش دیسک دیفیوژن آگار و در حضور عصاره آبی برابر با ۷/۱۲ mm در روش چاهک آگار بود (Hosseini *et al*., 2016). فعالیت ضدباکتریایی عصاره آبی جفت میوه بلوط در برابر باکتری *هلیکوباکتر پیلوری* نیز گزارش شده است (Sharifi *et al*., 2019). مطابق نتایج، عصاره‌های آبی و آلی بخش‌های مختلف درخت بلوط دارای ترکیبات زیست‌فعال با اثر ضدمیکروبی قابل‌توجهی می باشند و بنابراین قابلیت استفاده به‌عنوان نگهدارنده طبیعی جهت جلوگیری از رشد انواع میکروارگانیسم‌های پاتوژن و مولد فساد در مواد غذایی را دارا است.

نتیجه‌گیری نهایی

نتایج این پژوهش نشان داد که عصاره اتانولی برگ بلوط به‌واسطه دارا بودن مقادیر زیادی از ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی، از فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی بالایی برخوردار است. عصاره اتانولی برگ بلوط بطور مؤثری سبب مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS گردید. علاوه‌بر این، نتایج اثرات ضدمیکروبی نشان داد که حساسیت باکتری‌های گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و *لیستریا مونوسیتوژنز*) در برابر عصاره اتانولی برگ بلوط بیش‌تر از باکتری‌های گرم منفی (*سالمونلا تیفی* و *اشرشیا کلی*) می‌باشد. بنابراین، عصاره اتانولی برگ بلوط را می‌توان به‌عنوان ترکیب زیست فعال طبیعی جهت کنترل یا جلوگیری از واکنش‌های رادیکالی و رشد میکروارگانیسم‌های مولد فساد در مواد غذایی مختلف استفاده نمود. با این‌حال، مطالعات گسترده‌ای جهت بررسی مکانیسم عمل فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی و تشخیص ترکیبات مسئول فعالیت بیولوژیکی عصاره اتانولی برگ بلوط نیاز می‌باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان به‌دلیل حمایت‌های مادی و معنوی صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

Alizadeh Behbahani B., & Noshad, M. (2021). Evaluation of the minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of Hyssopus officinalis extract on a number of Gram-positive and Gram-negative bacteria: A study "in vitro". *Food Science and Technology*, *18*(110), 1-9. (In Persian)

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

Alizadeh Behbahani, B., Falah, F., Lavi Arab, F., Vasiee, M., & Tabatabaee Yazdi, F. (2020). Chemical composition and antioxidant, antimicrobial, and antiproliferative activities of Cinnamomum zeylanicum bark essential oil. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, *2020*.

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

Alizadeh Behbahani, B., Noshad, M., & Falah, F. (2019b). Study of chemical structure, antimicrobial, cytotoxic and mechanism of action of Syzygium aromaticum essential oil on foodborne pathogens. *Potravinarstvo*, *13*(1), 875-883.

Barzegar, H., Alizadeh Behbahani, B., & Mehrnia, M. A. (2020). 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*, *29*(5), 717-728.

Majdi, B., Mehrnia, M. A., Barzegar, H., & Alizadeh Behbahani, B. (2021). Determination of the structure, chemical composition, antioxidant activity and the cytotoxic effect of Turmeric essential oil. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, *17*(2), 261-271. (In Persian)

Ebrahimi, A., Khayami, M., & Nejati, V. (2010). Evaluation of the Antibacterial Activity of *Quercus persica* Jaub & Spach Fruit's Hidroalcoholic Extract in Disc Diffusion Method. *Journal of Medicinal Plants*, *9*(33), 26-34 (In Persian).

Ebrahimi, A., Khayami, M., & Nejati, V. (2012). Comparison of Antimicrobial effect of different parts of *Quercus persica* against *Escherichia coli* O157:H7. Horizon Med Sci, *17*(4), 11-17 (In Persian).

Falah, F., Shirani, K., Vasiee, A., Yazdi, F. T., & Alizadeh Behbahani, B. (2021). In vitro screening of phytochemicals, antioxidant, antimicrobial, and cytotoxic activity of Echinops setifer extract. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *35*, 102102.

Tabatabaei Yazdi, F. T., Alizadeh Behbahani, B., Alghooneh, A., & Zanganeh, H. (2016). Optimization of extraction of *Mespilus germanica* by mixture design and investigation of its effect on Infectious Microorganisms" in vitro". *Iranian Journal of Food Science & Technology*, *13*(52), 133-147. (In Persian)

Ghaderi Ghahfarokhi, M., Alami, M., Sadeghi Mahoonak, A., Azizi, M. H., & Ghorbani, M. (2012). Study on antioxidant activities of methanolic extracts from fruit of two variety of acorn Q. *castaneifolia* var *castaneifolia* and Q. *branti* var *persica* in sunflower oil. *Food Science and Technology*, *34*(19), 117-127. (In Persian)

Ghaderi Ghahfarokhi, M., Sadeghi Mahoonak, A., Alami, M., Azizi, M. H., Ghorbani, M. (2012). Study on Antioxidant Activities of Phenolic Extracts from Fruit of a Variety of Iranian Acorn (Q. *castaneifolia* var *castaneifolia*). *Food Science and Technology*, 9(35), 45-56. (In Persian)

Barzegar, H., Mehrnia, M.A., Alizadeh Behbahani, B. (2018). Determination of the chemical composition, antioxidant activity and the antimicrobial effect of *Heracleum Lasiopetalum* on infection and food poisoning microorganisms. *Applied Microbiology in Food Industries*, *4*(4), 15-28. (In Persian)

Hosseini, S., Soltani, M., Heydari, M., Masodi, M., & Pourmaaf Esfahani, E. (2016). The antibacterial effects of *Quercus brantii* var. *persica* extracts against *Lactococcus garvieae* under in vitro condition. *Journal of Animal Environment*, *7*(4), 165-172 (In Persian)

Karimi A, Moradi M, Saedi M, Salimzadeh L, Rafieian M. The Inhibitory Effect of Quercqus Persica L Extract on Herpes Simplex Virus-1 Replication on Baby Hamster Kidney Cells. Armaghane danesh. 2011; 16 (2) :141-149 (In Persian)

Khosravi, A., & Behzadi, A. (2002). Comparison of the Antibacterial Activity of the Seed Hull of *Quercus Bantii* on Some Gram Negative Entric Bacilli With Some in-Use Antibiotics. *Journal of Arak University of Medical Sciences*, *5*(1), 1-6. (In Persian)

Kiarsi, Z., Hojjati, M., Alizadeh Behbahani, B., & Noshad, M. (2020). 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*, *40*(3), e12782.

Lavado, G., Ladero, L., & Cava, R. (2021). Cork oak (Quercus suber L.) leaf extracts potential use as natural antioxidants in cooked meat. *Industrial Crops and Products*, *160*, 113086.

Namazi, P., Barzegar, H., Alizadeh Behbahani, B., & Mehrnia, M. A. (2021). Evaluation of functional groups of bioactive compounds, antioxidant potential, total phenolic and total flavonoid content of red bell pepper extracts. *Food Science and Technology*, *18*(113), 301-311. (In Persian)

Nedamani, E. R., Sadeghi Mahoonak, A. R., Ghorbani, M., & Kashaninejad, M. (2015). Antioxidant interactions in green tea and oak extracts combination. *Journal of Food Science & Technology*, *12*(49), 123-132.

Noshad, M., Alizadeh Behbahani, B., Dehghani, S. (2020). Evaluation of the effect of aqueous and ethanolic extraction methods on extraction yield, phenolic compounds, and antioxidant and antimicrobial activity of *Stachys schtschegleevii* extract. *Food Science and Technology*, *17*(100), 117-125. (In Persian)

Popović, B. M., Štajner, D., Ždero, R., Orlović, S., & Galić, Z. (2013). Antioxidant characterization of oak extracts combining spectrophotometric assays and chemometrics. *The Scientific World Journal*, *2013*,

Raissy, M., Ghafarifarsani, H., Hoseinifar, S. H., El-Haroun, E. R., Naserabad, S. S., & Van Doan, H. (2022). The effect of dietary combined herbs extracts (oak acorn, coriander, and common mallow) on growth, digestive enzymes, antioxidant and immune response, and resistance against *Aeromonas hydrophila* infection in common carp, Cyprinus carpio. *Aquaculture*, *546*, 737287.

Rakić, S., Petrović, S., Kukić, J., Jadranin, M., Tešević, V., Povrenović, D., & Šiler-Marinković, S. (2007). Influence of thermal treatment on phenolic compounds and antioxidant properties of oak acorns from Serbia. *Food Chemistry*, *104*(2), 830-834.

Sharifi, A., Azizi, M., Moradi-Choghakabodi, P., Aghaei, S., & Azizi, A. (2019). In vitro anti-Helicobacter pylori activity of aqueous extract from Persian Oak testa. *Chinese Herbal Medicines*, *11*(4), 394-399.

Zanganeh, H., Mortazavi, S. A., Shahidi, F., & Alizadeh Behbahani, B. (2021). 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*, *15*(6), 5556-5571.