Downloaded from journal.rums.ac.ir at 5:22 IRDT on Tuesday June 19th 2018

مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره ۱۳، آذر ۱۳۹۳، ۸۸٤-۷۷۵

مقایسه اثر مهارکنندگی و ضدباکتریایی عصاره‌ی آبی و اتانولی کرفس کوهی (*Kelussia odoratissima*) بر تعدادی از باکتری‌های بیماری‌زا در شرایط آزمایشگاهی

مریم حیدری سورشجانی[۱]، فریده طباطبایی‌یزدی[۲]، سیدعلی مرتضوی[۳]، فخری شهیدی[۳]

دریافت مقاله: ۹۳/۲/۳۰ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۳/۴/۱۸ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۳/۶/۵ پذیرش مقاله: ۹۳/۶/۱۸

چکیده

زمینه و هدف: امروزه افزایش استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و یا عدم رعایت دوز توصیه شده توسط بیماران، منجر به گسترش مقاومت باکتریایی به آنتی‌بیوتیک‌ها گردیده است. این امر منجر به افزایش تمایل به استفاده از ترکیبات جدید آنتی‌میکروبی مؤثرتر و بدون سمیت، همچون گیاهان دارویی شده است. هدف از این مطالعه بررسی و مقایسه اثرات ضدباکتریایی عصاره‌های آبی و اتانولی برگ کرفس کوهی در برخی از باکتری‌های بیماری‌زا می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه آزمایشگاهی، فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌های آبی و اتانولی برگ گیاه کرفس کوهی با استفاده از روش تمام ظرف و روش انتشار در آگار به کمک دیسک بررسی شد. حداقل غلظت مهارکنندگی (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) و حداقل غلظت کشندگی(Minimum Bactericidal Concentration; MBC) نیز به روش رقت لوله‌ای تعیین گردید. تجزیه و تحلیل نتایج با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) انجام شد.

یافته‌ها: MIC عصاره‌های آبی و اتانولی برای استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استرپتوکوکوس پیوژنز به ترتیب ۳۲ و ۱۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و برای سودوموناس آئروژینوزا به ترتیب ۶۴ و ۳۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. همچنین، MBC عصاره‌های آبی و اتانولی نیز در خصوص استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استرپتوکوکوس پیوژنز به ترتیب ۶۴ و ۳۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و برای سودوموناس آئروژینوزا به ترتیب برابر ۱۲۸و ۶۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. نتایج آنالیز واریانس یک طرفه نیز نشان داد با افزایش غلظت عصاره‌های آبی و اتانولی، قطر هاله بازدارندگی به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد عصاره اتانولی برگ کرفس کوهی در مقایسه با عصاره آبی در شرایط آزمایشگاهی اثر بازدارندگی بیشتری بر سویه‌های مورد مطالعه دارد.

واژه‌های کلیدی: اثر ضدباکتریایی، عصاره‌های آبی و اتانولی، کرفس کوهی

۱- (نویسنده مسئول) دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
تلفن: ۰۳۸۲-۳۲۲۲۶۱۲، دورنگار: ۰۳۸۲-۳۲۲۴۲۵۵، پست الکترونیکی: Maryam.Heidari67@yahoo.com
۲- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
۳- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 5:22 IRDT on Tuesday June 19th 2018

مقدمه

در سال‌های اخیر تحقیقات زیادی برای ارزیابی آثار ضدمیکروبی انواع اسانس‌ها، عصاره‌ها و ادویه‌ها صورت گرفته است که حاکی از قدرت و توانایی این ترکیبات در ممانعت از رشد دامنه وسیعی از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و عامل فساد می‌باشد. امروزه با وجود پیشرفت علوم و توسعه داروهای سنتزی، هنوز گیاهان دارویی در مقیاس گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرند. مواد مؤثره موجود در این گیاهان به دلیل همراه بودن آنها با مواد دیگر پیوسته از حالت تعادل زیستی برخوردار هستند، لذا در بدن انباشته نمی‌شوند و اثرات جانبی به بار نمی‌آورند، از این‌رو زیان آنها برای انسان بسیار کمتر از مواد نگهدارنده شیمیایی می‌باشد [۲-۱]. طبق آمار سازمان بهداشت جهانی در هر سال حدود ۳۰٪ مردم در کشورهای صنعتی از مسمومیت غذایی رنج می‌برند و در سال ۲۰۰۰ حداقل دو میلیون نفر در اثر بیماری اسهال در دنیا از بین رفته‌اند [۴-۳].

اثر گیاهان معطر و ادویه ها در نگهداری و پیشگیری از فساد مواد غذایی از دوران باستان برای انسان به خوبی شناخته شده بود، به طوری که برای بهبود عطر و طعم غذاها و حفظ و نگهداری آنها به مدت طولانی از مقادیر زیاد ادویه همراه با نمک استفاده می‌شده است [۵].

کرفس کوهی (Kelussia odoratissima) با نام محلی کلوس به عنوان گونه‌ای جدید از جنس جدید Kelussia از تیره چتریان (Apiaceae)، یکی از گیاهان تغذیه‌ای، مرتعی و بومی ایران بوده و تاکنون وجود آن در سایر مناطق جهان گزارش نشده است. کرفس کوهی در منابع مختلف گذشته با نام‌های علمی Amircabiria odoratiaaima، Apium graveolens و Opopanax sp نامگذاری شده است [۶]. در طب سنتی برای اندام‌های هوایی گیاه کرفس کوهی خواصی همچون ضد التهاب، ضد درد، درمان روماتیسم، تصفیه خون و برای بذرها و ریشه آن به صورت جوشانده خواصی برای درمان سرماخوردگی و سرفه‌های شدید قائل هستند. همچنین، در تحقیقات دیگر، اثرات ضدحساسیت، محافظت کننده عروق، ضد انعقادی و محافظ دستگاه گوارش، ضد دیابت، آنتی پراکسیداسیون لیپیدها و ضدسرطان آن مشخص شده است [۸-۷].

در مطالعه Shahrani و همکاران اثر فلاوونوئید موجود در کرفس کوهی بر چربی خون موش سوری مورد بررسی قرار گرفت. این محققان اثر این ترکیب در کاهش چربی خون در موش سوری را تأیید کردند [۹]. Hojjati و همکاران اثر عصاره الکلی برگ کرفس کوهی را بر انقباض ایلئوم موش صحرایی بررسی کردند. نتایج مطالعه آنها نشان داد عصاره الکلی برگ کرفس کوهی انقباض‌های ایلئوم موش صحرایی را مهار می‌کند و می‌توان از آن برای رفع گرفتگی روده‌ای استفاده کرد [۱۰].

با توجه به اهمیت روزافزون گیاهان دارویی به عنوان جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها، وجود ترکیبات فعال زیستی موجود در گیاه کرفس کوهی همچون فتالیدها و فلاوونوئیدها و وجود این گیاه در استان چهارمحال و بختیاری، بر آن شدیم تا در این پژوهش اثر ضد میکروبی عصاره‌های آبی و اتانولی برگ کرفس کوهی علیه باکتری‌های گرم مثبت استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استرپتوکوکوس پیوژنز و باکتری گرم منفی سودوموناس آئروژینوزا را مورد بررسی قرار دهیم. استافیلوکوکوس اپیدرمیس یکی از علل عفونت‌های فرصت طلب بعد از استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد و در حال حاضر نیز از اهمیت زیادی برخوردار است. استرپتوکوکوس پیوژنز جزء گروه A استرپتوکوک‌های بتا همولیتیک است. این استرپتوکوک‌ها در گلو و پوست مستقر می‌شوند و مسئول

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 5:22 IRDT on Tuesday June 19th 2018

ایجاد انواع عفونت‌های چرکی و پی آمدهای غیر چرکی هستند. سودوموناس آئروژینوزا نیز یک بیماری‌زای فرصت طلب است و از سیستم ایمنی افراد بیمار و ناتوان سوء استفاده کرده و در این افراد موجب ایجاد عفونت و تولید سموم مضر می‌گردد.

مواد و روش‌ها

برای انجام این مطالعه آزمایشگاهی ابتدا گیاه کرفس کوهی در ابتدای دوره رویشی گیاه (اردیبهشت ماه ۱۳۹۲) از ارتفاعات شهرستان کوهرنگ واقع در استان چهارمحال و بختیاری جمع‌آوری گردید و با همکاری هرباریوم و آزمایشگاه سیستماتیک گیاهی دانشکده علوم پایه و پژوهشکده علوم دانشگاه فردوسی مشهد شناسایی شد. برگ‌های کرفس کوهی پس از تمیز شدن در شرایط مناسب و سایه خشک و توسط آسیاب آزمایشگاهی (مدل Waring ساخت کشور آلمان) پودر گردید.

برای تهیه عصاره‌های آبی و اتانولی به روش جوشاندن (Decoction) ۱۰۰ گرم از برگ‌های پودر شده گیاه به ارلن حاوی ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر و یا ۵۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درجه اضافه شد و ارلن به مدت ۳۰-۱۵ دقیقه (پس از به جوش آمدن) برروی حرارت قرار گرفت. جهت تهیه عصاره‌های آبی و اتانولی به روش خیساندن (Maceration) ۱۰۰ گرم از برگ‌های پودر شده گیاه به ارلن حاوی ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر و یا اتانول ۹۶ درجه (به طور جداگانه) اضافه شد و ارلن به مدت ۷۲ ساعت در دمای اتاق بر روی دستگاه همزن مغناطیسی قرار گرفت تا استخراج عصاره به طور کامل انجام گیرد. سپس مخلوط حلال و گیاه توسط صافی از هم جدا شد تا عصاره‌های اولیه به دست آید. عصاره‌های اولیه حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس عصاره حاصل وارد دستگاه تقطیر در خلاء (روتاری) شده و در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد حلال آنها به مدت یک ساعت تبخیر و عصاره‌های تغلیظ شده به دست آمد. عصاره‌های تغلیظ شده در ظرف تیره استریل غیر قابل نفوذ نسبت به هوا و نور ریخته شد و تا زمان مصرف در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند [۲]. این نکته قابل ذکر است که هدف از عصاره‌گیری با استفاده از دو روش خیساندن و جوشاندن، تنها مقایسه درصد استحصال عصاره با استفاده از این دو روش بود و کلیه آزمایشات مربوط به بررسی اثر ضدباکتریایی گیاه کرفس کوهی با استفاده از عصاره به دست آمده از روش خیساندن انجام گرفت.

جهت تهیه سوسپانسیون میکروبی، باکتری‌ها از کشت لیوفیلیزه (از دانشگاه شهید بهشتی) روی محیط مولر هینتون آگار منتقل شدند، سپس محیط‌های کشت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور گرمخانه گذاری شدند. در مرحله بعد با استفاده از کشت مادر رشد یافته کشت ذخیره تهیه و در مراحل بعدی از این کشت استفاده شد. از آنجائی که برای هر آزمون جهت بررسی اثرات ضد میکروبی کشت تازه ۲۴ ساعته لازم است، ۲۴ ساعت قبل از انجام آزمایش از کشت ذخیره به محیط کشت شیب‌دار مولر هینتون آگار تلقیح باکتری انجام شد. پس از رشد باکتری بر سطح محیط کشت شیب‌دار سوسپانسیون غلیظ میکروبی با استفاده از محلول رینگر تهیه گردید. سپس کدورت سوسپانسیون حاصل توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۰ نانومتر اندازه‌گیری و تا برابر شدن کدورت محلول با کدورت ۰/۵ محلول استاندارد مک فارلند ($1/5\times10^{8}$ واحد شکل‌گیری کلنی بر میلی‌لیتر) توسط محلول رینگر رقیق شد [۱۲-۱۱]. باکتری‌های مورد استفاده در این پژوهش استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس (PTCC 1435) و

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 5:22 IRDT on Tuesday June 19th 2018

استرپتوکوکوس پیوژنز (PTCC 1447) و سودوموناس آئروژینوزا (PTCC 1310) بودند که از دانشگاه شهید بهشتی تهیه شدند.

فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌های آبی و اتانولی کرفس کوهی با استفاده از روش انتشار در آگار به کمک دیسک (Disk Diffusion) و روش تمام ظرف (Pour Plate) تعیین گردید. در روش تمام ظرف ۰/۲ گرم از عصاره‌های حاصل از روش خیساندن به ۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل افزوده و مخلوط حاصل به کمک دستگاه ورتکس هم زده شد، سپس ۱ میلی‌لیتر از این محلول به ظرف‌های پتری استریل اضافه گردید به طوری که غلظت نهایی عصاره ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر شود. محیط کشت استریل مولر هینتون آگار (۱۹ میلی‌لیتر) به ظرف‌های پتری اضافه و پس از بسته شدن محیط یک لوپ از کشت استاندارد هر سوش بر روی این محیط‌ها به صورت خطی کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت[۱۳]. در روش انتشار در آگار نیز از عصاره‌های حاصل از روش خیساندن استفاده گردید. در این روش ابتدا معادل استاندارد نیم مک فارلند از کشت استاندارد هر سوش بر روی سطح محیط آگار کشت داده شد و توسط اسپریدر شیشه‌ای استریل بر سطح آگار پخش شد. دیسک‌هایی که قبلاً در غلظت‌های مشخص عصاره (۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) خیسانده شده بودند توسط پنس استریل با کمی فشار بر سطح محیط کشت ثابت گردید. پتری‌ها پس از گرمخانه‌گذاری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، با استفاده از خط کش به طور دقیق قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد. تمامی آزمایشات با ۳ تکرار انجام گرفت [۱۴].

در این مطالعه برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) از روش رقت لوله‌ای استفاده گردید، به طوری که برای هر عصاره از یک سری ۹ تایی لوله آزمایش استریل استفاده شد، ۸ لوله برای آزمایش رقت‌های مختلف هر عصاره (۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۸ و ۲۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و یک لوله به عنوان کنترل منفی (لوله حاوی محیط کشت و سوسپانسیون میکروبی) تهیه شد. پس از کشت تمام لوله‌های آزمایش به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شده و سپس از نظر کدورت ناشی از رشد باکتری‌های تلقیح شده مورد بررسی قرار گرفتند. میزان کدورت با نمونه کنترل مقایسه و سپس پایین‌ترین غلظتی که در آن کدورتی مشاهده نگردید، به عنوان MIC در نظر گرفته شد [۱۶-۱۵].

حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره‌های آبی و اتانولی کرفس کوهی نیز توسط روش رقت لوله‌ای تعیین گردید. نمونه‌ای از تمام لوله‌هایی که در قسمت قبل هیچ رشدی در آنها مشاهده نشده بود برای تعیین MBC در نظر گرفته شدند. این لوله‌ها به روش Pour Plate کشت داده شدند و در نهایت لوله‌ای که حاوی کمترین غلظت عصاره بود و در پلیت مربوط به آن هیچ رشدی مشاهده نشده بود به عنوان MBC در نظر گرفته شد [۱۷].

به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۱۶ استفاده گردید. داده‌های حاصل از تأثیر ۴ سطح متفاوت غلظت عصاره‌های آبی و اتانولی بر میکروارگانیسم‌های مورد بررسی با سه تکرار، با استفاده از تجزیه واریانس یک طرفه (one-way ANOVA) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. همچنین، برای انجام مقایسه زوج میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن (Duncan) در سطح معنی‌داری $p<۰/۰۵$ استفاده شد.

نتایج

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 5:22 IRDT on Tuesday June 19th 2018

نتایج حاصل از روش‌های مختلف عصاره‌گیری (خیساندن و جوشاندن) حاکی از آن است که در روش خیساندن مقدار عصاره بیشتری به دست می‌آید، به طوری که درصد استحصال عصاره در روش خیساندن، برای عصاره‌های آبی و اتانولی کرفس کوهی به ترتیب ۸٪ و ۱۲٪ و در مورد روش جوشاندن به ترتیب ۴٪ و ۸٪ بود.

نتایج نشان داد در روش تمام ظرف، باکتری‌های گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس و استرپتوکوکوس پیوژنز بر خلاف باکتری گرم منفی سودوموناس آئروژینوزا تحت تأثیر عصاره‌های آبی و اتانولی کرفس کوهی (در غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) قرار گرفته و از رشدشان ممانعت شده است.

همانگونه که در جدول ۲ مشاهده می‌شود غلظت‌های ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره آبی از رشد استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استرپتوکوکوس پیوژنز جلوگیری کرد، اما در غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثر بازدارندگی مشاهده نشد و فقط غلظت ۸۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره آبی برگ گیاه کرفس کوهی اثر بازدارندگی بر سودوموناس آئروژینوزا داشت. همچنین، عصاره اتانولی برگ گیاه کرفس کوهی در تمامی غلظت‌ها روی استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استرپتوکوکوس پیوژنز و در غلظت‌های ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر روی سودوموناس آئروژینوزا دارای اثر بازدارندگی بود. در روش انتشار در آگار به کمک دیسک افزایش غلظت عصاره‌ها موجب افزایش قطر هاله عدم رشد شد (جدول۱).

جدول۱- میانگین قطر هاله عدم رشد استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، استرپتوکوکوس پیوژنز و سودوموناس آئروژینوزا بر حسب میلی‌متر در حضور عصاره‌های اتانولی و آبی برگ گیاه کرفس کوهی به انتشار در آگار (p<۰/۰۵)

نوع عصاره	میکروارگانیسم	غلظت عصاره برگ گیاه کرفس کوهی (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)			
		۲۰	۴۰	۶۰	۸۰
اتانولی	*Staphylococcus epidermidis*	[a]۵۰±۱۱/۵۰	[b]۰/۵۵±۱۲/۸۰	[c]۰/۲۸±۱۴/۶۰	[d]۰/۵۳±۱۶/۴۰
اتانولی	*Streptococcus pyogenes*	[a]۵۳±۱۲/۹۰	[b]۰/۵۰±۱۴/۵۰	[c]۰/۵۲±۱۶/۳۰	[d]۰/۵۲±۱۷/۸۰
اتانولی	*Pseudomonas aeruginosa*	-	[b]۰/۵۳±۹/۵۰	[c]۰/۵۷±۱۰/۷۰	[d]۰/۲۸±۱۲/۵۰
آبی	*Staphylococcus epidermidis*	-	[b]۰/۲۸±۱۰/۵۰	[c]۰/۲۸±۱۱/۳۰	[d]۰/۲۸±۱۲/۵۰
آبی	*Streptococcus pyogenes*	-	[b]۰/۵۷±۱۱/۸۰	[c]/۵۳±۱۲/۹۰	[d]۰/۲۸±۱۴/۷۰
آبی	*Pseudomonas aeruginosa*	-	-	-	[d]۰/۵۵±۱۰/۸۰

- ***علامت (-) نشان دهنده عدم وجود فعالیت ضد باکتری عصاره‌های آبی و اتانولی برگ گیاه کرفس کوهی می باشد.***
- ***حروف غیر مشابه در یک ردیف نشان دهنده وجود تفاوت معنی دار میان اثر ضد میکروبی غلظت‌های مختلف می‌باشد.***

•نتایج با استفاده از روش آنالیز واریانس یک طرفه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت همچنین، برای انجام مقایسات زوج میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن (Duncan) در سطح معنی‌داری ۵ درصد استفاده شد

حروف غیر مشابه در یک ردیف نشان دهنده وجود تفاوت معنی دار میان اثر ضد میکروبی غلظت‌های مختلف می‌باشد. نتایج با استفاده از روش آنالیز واریانس یک طرفه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت همچنین، برای انجام مقایسات زوج میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن (Duncan) در سطح معنی‌داری$p< ۰/۰۵$ استفاده شد.

MIC عصاره اتانولی برگ گیاه کرفس کوهی برای استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استرپتوکوکوس پیوژنز ۱۶

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 5:22 IRDT on Tuesday June 19th 2018

میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و برای سودوموناس آئروژینوزا ۳۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود، در حالی که MIC عصاره آبی برای استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استرپتوکوکوس پیوژنز ۳۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و برای سودوموناس آئروژینوزا ۶۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود (جدول ۳). نتایج نشان می‌دهد MBC عصاره آبی و اتانولی عصاره برگ گیاه کرفس کوهی برای استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استرپتوکوکوس پیوژنز به ترتیب ۶۴ و ۳۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود و MBC عصاره آبی و اتانولی عصاره برگ گیاه کرفس کوهی برای سودوموناس آئروژینوزا به ترتیب برابر با ۱۲۸ و ۶۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود (جدول ۴). همانگونه که مشاهده می‌شود عصاره اتانولی در غلظت کمتری قادر به مهار کردن و نابود کردن باکتری‌های مورد آزمون بود (جداول ۲ و ۳).

جدول۲- نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) عصاره‌های اتانولی و آبی عصاره برگ کرفس کوهی بر استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، استرپتوکوکوس پیوژنز و سودوموناس آئروژینوزا

نوع عصاره	میکروارگانیسم	غلظت عصاره برگ گیاه کرفس کوهی (mg/ml)								
		۲	۴	۸	۱۶	۳۲	۶۴	۱۲۸	۲۵۶	کنترل
اتانولی	*Staphylococcus epidermidis*	–	–	–	+	+	+	+	+	–
اتانولی	*Streptococcus pyogenes*	–	–	–	+	+	+	+	+	–
اتانولی	*Pseudomonas aeruginosa*	–	–	–	–	+	+	+	+	–
آبی	*Staphylococcus epidermidis*	–	–	–	–	+	+	+	+	–
آبی	*Streptococcus pyogenes*	–	–	–	–	+	+	+	+	–
آبی	*Pseudomonas aeruginosa*	–	–	–	–	–	+	+	+	–

+: عدم رشد -: رشد

جدول ۳- نتایج حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره‌های متانولی و آبی عصاره برگ کرفس کوهی بر استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، استرپتوکوکوس پیوژنز و سودوموناس آئروژینوزا

نوع عصاره	میکروارگانیسم	غلظت عصاره برگ گیاه کرفس کوهی (mg/ml)								
		۲	۴	۸	۱۶	۳۲	۶۴	۱۲۸	۲۵۶	کنترل
اتانولی	*Staphylococcus epidermidis*	–	–	–	–	+	+	+	+	–
اتانولی	*Streptococcus pyogenes*	–	–	–	–	+	+	+	+	–
اتانولی	*Pseudomonas aeruginosa*	–	–	–	–	–	+	+	+	–
آبی	*Staphylococcus epidermidis*	–	–	–	–	–	+	+	+	–
آبی	*Streptococcus pyogenes*	–	–	–	–	–	+	+	+	–
آبی	*Pseudomonas aeruginosa*	–	–	–	–	–	–	+	+	–

+: عدم رشد -: رشد

بحث

اگرچه هزاران سال است که اثرات مختلف ادویه‌جات، عصاره‌های گیاهی و اسانس‌ها شناخته شده است، در سال‌های اخیر اثر مهارکنندگی عصاره‌ها، اسانس‌ها و اجزای این اسانس‌ها بر روی باکتری های بیماری‌زا و میکروارگانیسم‌های عامل فساد مواد غذایی به شدت مورد توجه قرار گرفته است [۱۹-۱۸].

نتایج حاصل از بررسی روش‌های مختلف عصاره‌گیری از برگ گیاه کرفس کوهی نشان داد در سطح معنی‌داری $p<۰/۰۵$ بین روش خیساندن و روش جوشاندن تفاوت

معناداری وجود دارد. به این معنی که بازدهی عصاره‌های اتانولی حاصل از روش خیساندن و جوشاندن با هم و بازدهی عصاره‌های آبی حاصل از دو این رو دو روش نیز با هم، تفاوت معناداری دارند. این نکته حائز اهمیت است که برای به دست آوردن بهترین و مؤثرترین عصاره توجه به مواردی از جمله خصوصیات ماده گیاهی، انتخاب حلال مناسب و دقت در مراحل عصاره‌گیری ضروری بوده و باید در نظر داشت که بازده بالا در عصاره حاصله به معنای بازده بالای ترکیب مورد نظر در عصاره نمی‌باشد [۲۰].

باکتری‌های گرم مثبت در دیواره سلولی خود دارای ترکیب موکوپپتید هستند، در حالی که باکتری‌های گرم منفی فقط لایه نازکی از موکوپپتید دارند و قسمت اعظم ساختمان دیواره در آنها لیپوپروتئین و لیپوپلی‌ساکارید است به همین علت در مقابل اغلب مواد ضد باکتریایی مقاوم‌ترند. حساسیت بیشتر باکتری‌های گرم مثبت در مقابل عوامل ضد میکروبی در مطالعات مختلف مطرح و مورد تأیید قرار گرفته است [۲۲-۲۱]. در پژوهش حاضر نیز با توجه به نتایج حاصل از اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد و نتایج به دست آمده از حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت‌کشندگی (MBC) می‌توان گفت باکتری‌های گرم مثبت استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استرپتوکوکوس پیوژنز در مقایسه با باکتری گرم منفی سودوموناس آئروژینوزا حساسیت بیشتری در برابر عصاره‌های آبی و اتانولی برگ کرفس کوهی داشتند.

نتایج آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد با افزایش غلظت عصاره‌های آبی و اتانولی برگ گیاه کرفس کوهی، هاله بازدارندگی به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد. در مطالعات دیگری نیز محققین افزایش اثر ضد میکروبی عصاره‌های گیاهان مختلف با افزایش غلظت عصاره را تأیید کردند. به عنوان مثال Suresh و همکاران در بررسی آزمایشگاهی اثر ضد میکروبی عصاره اتانولی گیاه Rauvolfia tetraphylla نیز نشان دادند با افزایش غلظت عصاره، قطر هاله بازداری نیز افزایش می‌یابد [۲۳].

نتایج نشان می‌دهد که عصاره اتانولی برگ گیاه کرفس کوهی در مقایسه با عصاره آبی برگ گیاه کرفس کوهی اثر بازدارندگی بیشتری روی باکتری‌های مورد مطالعه دارد (جدول۲). در بررسی انجام شده توسط Rakshit و همکاران نشان داده شد عصاره اتانولی گیاه Scindapsus officinalis اثر ضد میکروبی بیشتری روی اشرشیاکلی، سالمونلاتیفی، استافیلوکوکوس‌اورئوس و کلبسیلا پنومونیه در مقایسه با عصاره آبی این گیاه دارد [۲۴] که نتایج این پژوهشگران با نتایج ما همخوانی دارد. نتایج مطالعات اخیر Asadiyeh و همکاران و Rabbani و همکاران نشان داد ترکیبات عمده اسانس حاصل از بخش‌های هوایی کرفس کوهی سیس-لیگوستیلید (Z-ligustilid) و ۳ ترانس- بوتیلیدن فتالید (3-e-butyl phthalide) می‌باشند [۲۶-۲۵] که به نظر می‌رسد بیشترین اثر ضد باکتریایی گیاه کرفس کوهی مربوط به این ترکیبات می‌باشد.

تنها محدودیت مهم در این پژوهش، کار کردن با باکتری‌های بیماری‌زا بود که این امر با در نظر گرفتن شرایط ایمنی و عمل درست به آنها مرتفع گشت. در این پژوهش آزمایشگاهی اثر ضد میکروبی برگ کرفس کوهی به عنوان یکی از اعضای خانواده چتریان بررسی گردید تا بتوان اطلاعات کامل‌تری از خواص گیاه را فراهم آورد. لذا در گام‌های بعدی باید به مطالعه اثر ضدمیکروبی عصاره برگ گیاه بر گونه‌های میکروبی بیشتر، اثر ضد میکروبی اندام‌های دیگر گیاه، مقایسه اثر ضدمیکروبی عصاره‌های حاصل از روش‌های مختلف عصاره‌گیری و مطالعه اثرات ضد میکروبی اسانس گیاه پرداخت.

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 5:22 IRDT on Tuesday June 19th 2018

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 5:22 IRDT on Tuesday June 19th 2018

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به دست آمده از آنالیز واریانس یک طرفه می‌توان گفت با افزایش غلظت عصاره‌های آبی و اتانولی برگ گیاه کرفس کوهی، هاله بازدارندگی به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد. همچنین، مشاهده شد عصاره اتانولی برگ گیاه کرفس کوهی در مقایسه با عصاره آبی برگ گیاه کرفس کوهی اثر بازدارندگی بیشتری روی باکتری‌های مورد مطالعه دارد. در ادامه لازم است مطالعات بیشتری در شرایط *"in vivo"* انجام شود تا بتوان این عصاره را به عنوان یک ماده ضد میکروبی طبیعی و جدید معرفی کرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از خانم عادله حیدری سورشجانی و آقای بهروز علیزاده بهبهانی که در فراهم نمودن مواد لازم و انجام آزمایش‌ها ما را یاری کردند، قدردانی می‌شود.

References

[1] Samsam Shariat H. Extraction of effective components from medicinal plants and their diagnostic and evaluation methods. Esfehan: Mani Press. 1992; 1: 8-20. [Farsi]

[2] Taheri A, Seifan A, Jalalinejad S, Naseri F. Study of antibacterial effect of Prosopis sp. hydro-alcoholic extract. *J Res Shahid Beheshti Univ Med Sci* 2012; 17(4): 196-202. [Farsi]

[3] Burt SA. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods, a Review. *Int J Food Microbiol* 2004; 94: 223-53.

[4] Hwang CA, Mark T, Tamplin L. The influence of mayonnaise pH and storage temperature on growth of Listeria monocytogenes in seafood. *Int J Food Microbiol* 2005; 102: 277-85.

[5] Bullerman LB, Leiu Y, Seier SA. Inhibition of growth and aflatoxin production by Cinnamon and Cloves oil, Cinnamic Aldehyd ans Eugemol. *J Food Sci* 1977; 42(4): 1107-16.

[6] Rafieiyan M, Shahrani M, pilevarian A, Kheiri S, Rabiei R, Momeni KH, et al. Effect of *Kelussia odoratissima* on blood lipid patients taking Lovastatin: a clinical study. *J Shahrekord Univ Med Sci* 2008; 10(4): 70-6. [Farsi]

[7] Behagh A. Fibrinolytic effect of selected medicinal plants. *J Isfahan Univ Med Sci* 2003; 31-5. [Farsi]

[8] Salimi M, Ebrahimi A, Shojaei Asadiye Z, Saaei Dehkordi S. Extraction and identification of chemical compounds of Kelussia odoratissima. *J Med Aro Plants* 2009; 26(2):147-56. [Farsi]

[9] Shahrani M, Pile Varian A, Kheiri S, Asgari A, Farokhi E, Pravin N, et al. Investigate the effects of *Kelussia odoratissima* on blood lipids in Syrian mice. *J Shahrekord Univ Med Sci* 2008; 10(4): 50-6. [Farsi]

[10] Hojjati M, Sedighi Hafshejani M, Shahrani M. Investigate the effect of alcoholic extract of *Kelussia odoratissima* on rat ileum contractions. *J Sabzevar Univ Med Sci* 2012; 19(2): 156-63. [Farsi]

[11] Naderi Nasab M, Nazem M. Bacteriology laboratory. Mashhad: Astan Ghods Razavi Press. 1996; 1: 382-462. [Farsi]

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 5:22 IRDT on Tuesday June 19th 2018

[12] Valero M, Salmeron M. Antibacterial activity of 11 essential oils against Bacillus cereus in tyndallized carrot broth. *Int J Food Microbiol* 2003; 85(1): 73-81.

[13] Babayi H, Kolo I, Okogun JI, Ijah UJ. The antimicrobial activities of methanolic extracts of Eucalyptus camaldulensis and Terminalia catappa against some pathogenic microorganisms. *Nigerian Soc Exper Biol* 2004; 16(2): 106-11.

[14] Awoyinka OA, Balogun IO, Ogunnowo AA. Phytochemical screening and in vitro bioactivity of Cnidoscolus aconitifolius (Euphorbiaceae). *J Med Pl Res* 2007; 1(3): 63-5.

[15] Vanden DA, Vlietinck AJ, Dey PM, Harborne JB. (Eds.). Methods in plant biochemistry: screening medthods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. London: Academic Press. 1991; 6: 47-69.

[16] Tape B, Donmez E, Vnlu M, Candan F, Daferera D, Sokmen A. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of Salvia cryptantha and Salvia multicaulis. *J Food Chem* 2004; 84: 519-25.

[17] Espinel-Ingroff A, Fothergill A, Peter J, Rinaldi M, Walsh T. Testing conditions for determination of minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for Aspergillus spp: NCCLS collaborative study. *J Clin Microbiol* 2002; 40(9): 32-48.

[18] Ali MS, Saleem M, Akhtar F, Jahangir M, Parvez M, Ahmad VU. Three p-cymene erivatives from Zararia multiflora Phytochemistry. *J Res Inst Chem* 1999; 52(4): 685-8.

[19] Valero M, Giner MJ. Effects of antimicrobial components of essential oils on growth of Bacillus cereus INRA L2104 in and the sensory qualities of carrot broth. *Int J Food Microbiol* 2006; 106(1): 90-4.

[20] Zolfaghari B, Yekdane A, Recent developments in the combination of herbal extraction methods. *J Med Pl* 2011; 1: 51-5. [Farsi]

[21] Schaechter M, Medoff G, Fchlessinger D. Mechanisms of Microbial Disease. International Edition. Williams and Wilkins Press. 1989; 5: 17-50.

[22] Irabor EI, Falodun A, Obasuyi O, Ofoegbu CO, Abiodun SO, Umujeyan K. Antimicrobial evaluation of methanolic extract of *Colliandria surinamensis* on some pathogenic organizams. *Acta Pol Pharm-Drug Res* 2007; 63(5): 449-51.

[23] Suresh K, Babu SS, Harisaranraj R. Studies on In Vitro Antimicrobial Activity of Ethanol Extract of Rauvolfia tetraphylla. *J Ethnobot Leaf* 2008; 12: 77.

[24] Rakshit ST, Pachute AP, Singh A, Baghel A, Patel BD. Antibacterial activity of aqueous and ethanolic extracts of Scindapsus officinalis (Roxb.) Schott. *Advan Biol Res* 2011; 5(2): 77-80.

[25] Asadiyeh SZ, Ebrahimi A, Salimi M. Chemical composition of three ecotypes of wild celery (*Kelussia odoratissima*). *J Herb Spice Med Pl* 2011; 17(1): 62-8.

[26] Rabbani M, Sajjadi SE, Sadeghi M. Chemical composition of the essential oil from *kelussia odoratissima* mozaff. and the evaluation of its sedative and anxiolytic effects in mice. *Clinics* 2011; 66(5): 843-8.

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 5:22 IRDT on Tuesday June 19th 2018

Comparison of the Inhibitory and Antibacterial Effect of Aqueous and Ethanolic Extract of *Kelussia odoratissima* on Some Pathogenic Bacteria "*in vitro*"

M. Heidari Sureshjani[1], F. Tabatabaei Yazdi[2], A. Mortazavi[3], F. Shahidi[3]

Received: 20/05/2014 Sent for Revision: 09/07/2013 Received Revised Manuscript: 27/08/2014 Accepted: 09/09/2014

Background and Objective: Nowadays, the increasing use of antibiotics, or failure to comply the recommended dose by the patients, has led to the development of bacterial resistance to antibiotics. It has resulted in increasing the interest to use more efficient new anti-microbial compounds without toxicity, such as medicinal plants. The aim of this study was to compare the antibacterial activity of aqueous and ethanolic extracts of *Kelussia odoratissima* on some pathogenic bacteria.

Materials and Methods: In this laboratory study, the antibacterial effect of aqueous and ethanolic extracts of *Kelussia odoratissima* leaves were investigated using pour plate and disk agar diffusion tests. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) were also studied using the Dilution method. Analysis of results was performed using One-way analysis of variance (ANOVA).

Results: MIC of aqueous and ethanolic extracts for *Staphylococcus epidermidis* and *Streptococcus pyogenes* was 32 and 16 mg/ml and for *Pseudomonas aeruginosa* was 64 and 32 mg/ml, respectively. MBC of aqueous and ethanolic extracts for *Staphylococcus epidermidis* and *Streptococcus pyogenes* was 64 and 32 mg/ml and for *Pseudomonas aeruginosa* was 128 and 64 mg/ml, respectively. The results of One-way analysis of variance showed, with increasing concentrations of ethanolic and aqueous extracts, inhibition zone was significantly increased.

Conclusion: The results showed that the ethanolic extract of *Kelussia odoratissima* leaves had greater inhibitory effects on the strains studied in comparison with to aqueous extracts *in vitro*.

Key words: Antimicrobial effect, Aqueous and ethanolic extracts, *Kelussia odoratissima*

Funding: This research was funded by Department of Food Sciences and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Ethics Committee of Ferdowsi University of Mashhad approved the study.

How to cite this article: Heidari Sureshjani M, Tabatabaei Yazdi F, Mortazavi A, Shahidi F. Comparison of the Inhibitory and Antibacterial Effect of Aqueous and Ethanolic Extract of *Kelussia odoratissima* on Some Pathogenic Bacteria "*in vitro*". *J RafsanjanUniv Med Sci* 2014; 13(9): 775-784. [Farsi]

1- MSc Student of Food Sciences and Technology, Dept. of Food Sciences and Technology, Agriculture School, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
(Corresponding Author): Tel: (0382) 3222612, Fax: (0382) 3224255, E-Mail: Maryam.Heidari67@yahoo.com
2- Associate Prof., Dept. of Food Sciences and Technology, Agriculture School, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
3- Prof., Dept. of Food Sciences and Technology, Agriculture School, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran