

مقاله پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

دوره هشتم، شماره سوم، پاییز ۱۳۸۸، ۲۲۷-۲۳۸

بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره متانولی ۱۲ گونه گیاه بر روی ۶ گونه میکروبی به روش سیلندر- پلیت

زهرا مهدوی میمند^۱، محمدحسن مصحفی^۲، حمید فروتن فر^۳

دریافت مقاله: ۸۶/۱۱/۶ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۸۷/۱۰/۲۵ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۸۸/۷/۲۶ پذیرش مقاله: ۸۸/۷/۲۷

چکیده

زمینه و هدف: افزایش روزافزون مقاومت دارویی به آنتی بیوتیک ها و حساسیت به ترکیبات شیمیایی ضد میکروبی از جمله دلایل رویکرد محققان برای یافتن ترکیبات واجد خاصیت ضد میکروبی با منشأ گیاهی است. در این تحقیق اثرات ضد میکروبی عصاره متانولی ۱۲ گیاه بنه، بادام کوهی، سس، ریش بز، شوره، ساماری، طوسک صحرایی، شنگ اسبی بیابانی، جوغندمک، صابونک، شیر تیغ و سیلن هرز بر روی ۶ گونه میکروب *استافیلوکوک آرئوس*، *استافیلوکوک اپیدرمیدیس*، *اشرشیاکولی*، *کلبسیلا پنومونیه*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *باسیلوس سابتیلیس* به روش سیلندر پلیت مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها: در این مطالعه آزمایشگاهی که در سال ۱۳۸۵ صورت گرفت، ابتدا عصاره متانولی گیاهان فوق به روش خیساندن تهیه شد. بعد از خشک کردن عصاره ها، با حل کردن آن ها در مخلوط ۱:۱ متانول: دی متیل سولفوکسید، غلظت های ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵ و ۳/۱۲۵ میلی گرم در میلی لیتر تهیه گردید. محلول میکروب های استاندارد مورد آزمایش بعد از تهیه از محلول ذخیره اصلی به محیط کشت مولر- هینتون آگار تلقیح شد. بعد از انکوباسیون غلظت های مختلف از عصاره ها و نفوذ عصاره ها به داخل محیط کشت، قطر هاله عدم رشد (بر حسب میلی متر) اندازه گیری شد. جنتامایسین به عنوان شاهد مثبت در نظر گرفته شد. برای تجزیه و تحلیل داده ها از آزمون t یک طرفه و ANOVA استفاده گردید.

یافته ها: از بین ۱۲ گیاه مورد مطالعه ۱۰ گیاه هاله عدم رشد از خود نشان دادند که بیشترین هاله ممانعت از رشد در غلظت ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر مربوط به عصاره بادام کوهی بر روی سوش *استافیلوکوک اپیدرمیدیس* بود که معادل 19 ± 0.3 میلی متر محاسبه گردید.

نتیجه گیری: عصاره متانولی گیاهان بنه، بادام کوهی و ریش بز از سایر گیاهان مورد آزمایش در پژوهش اثر ضد باکتریایی بیشتری نشان دادند که این فعالیت در مقایسه با داروی جنتامایسین قابل توجه بود. می توان گفت در صورت مطالعه روی سایر فراکسیون های موجود در عصاره های مختلف این سه گیاه (عصاره گیری با سایر حلال های آلی) امکان خالص سازی و استخراج ترکیبات واجد آثار آنتی بیوتیکی از این گیاهان وجود دارد.

واژه های کلیدی: عصاره، ضد میکروب، سیلندر- پلیت

۱- کارشناس گروه آموزشی فارماکوتکونوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان

۲- (نویسنده مسؤول) دانشیار گروه آموزشی فارماسوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان

تلفن: ۰۳۴۱-۳۲۰۵۰۱۸، دورنگار: ۰۳۴۱-۳۲۰۵۰۰۳، پست الکترونیکی: Moshafi14@yahoo.com

۳- داروساز، دستیار بیوتکنولوژی دارویی گروه آموزشی بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

مقدمه

امروزه بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره‌های گیاهی به خصوص گیاهانی که به صورت سنتی مصرف طبی دارند، یکی از مباحث مورد علاقه محققین به شمار می‌رود. دو دلیل اصلی برای این علاقه‌مندی ذکر شده است. نخست این که ترکیبات موجود در گیاهان که کم و بیش طی سال‌ها تجویز مکرر روی انسان آزمایش شده‌اند، ذخیره‌های عظیم بالقوه‌ای از داروهای مختلف از جمله ترکیبات مهارکننده میکروارگانیسم‌های مختلف هستند و اکنون می‌توان از آن‌ها به عنوان منابعی جهت کشف داروهای جدید از جمله ترکیبات ضد میکروبی بهره برد. دلیل دوم، بروز مقاومت میکروبی در اثر مصرف غیر اصولی داروهای ضد میکروبی فعلی توسط عامه مردم و همچنین نرخ بالای حساسیت‌های دارویی نسبت به این ترکیبات شیمیایی نیاز شدید دستیابی به داروهای جدید را خاطر نشان می‌سازد [۱-۲].

اطلاعات جامعی در مورد انواع گیاهان مذکور در منابع گزارش نشده است، اما تحقیقاتی در خصوص بررسی اثر ضد میکروبی بعضی از گونه‌های گیاهی و یا گونه‌هایی از همان جنس انجام شده است.

از بین گیاهان فوق، گونه بنه بیشتر مورد توجه محققین بوده است. برگ این درخت به علت دارا بودن تانن زیاد اثر قابض دارد و در اسهال‌های ساده مورد استفاده قرار می‌گیرد [۳]. سقز که در اثر خراش دادن از تنه درخت بنه به صورت صمغ خارج می‌شود جهت برطرف کردن ناراحتی‌های معده استفاده سنتی دارد. در سال ۲۰۰۶ وجود اثرات ضد میکروبی عصاره حاصل از میوه نارس گیاه بنه به اثبات رسید [۴]. Ghalem و همکاران در سال ۲۰۰۸ اثر ضد میکروبی اسانس این گیاه را ثابت

کردند [۵]. در همین سال اثر ضدباکتریایی عصاره اتانولی برگ‌های این گیاه توسط Benhammou و همکاران گزارش شد [۶]. در سال ۲۰۰۵ توسط Koutsoudaki و همکاران مشخص گردید اسانس و صمغ گونه دیگری از همین جنس با نام مصطکی (*Pistacia lentiscus*) نیز روی تعدادی از باکتری‌ها اثر مهاری دارد [۷]. در مورد سایر گیاهان نیز تحقیقاتی صورت گرفته است. Shahidi و همکاران خاصیت ضد میکروبی گونه‌ای از افدرا با نام *Ephedra intermedia* را گزارش نمود [۸]. گیاه شنگ اسبی دارای خاصیت ضدباکتریایی و ضد قارچی می‌باشد [۹]. اما گونه دیگری از همین جنس با نام علمی *Scorzonera humilis* خاصیت ضد میکروبی ندارد [۱۰]. در پژوهش دیگری که Zidorn و همکاران گونه گیاهی شورخاردار (*Salsola kali*) را مورد بررسی قرار دادند نتایج آنها حاکی از فقدان اثر ضد میکروبی این گیاه بود [۱۱]. در صورتی که اثر ضد میکروبی *Sonchus Oleraceas* و *Sonchus Transcaspieus* به اثبات رسیده است [۱۳-۱۲]. همچنین اثر مهاری عصاره کلروفرمی گونه‌ای از جنس *Silene* به نام *Silene Multifida* در سال ۲۰۰۶ بر روی ۶ گونه میکروب و قارچ کاندیدا آلبیکنز گزارش شده است [۱۴]. هدف پژوهش حاضر بررسی اثر ضد میکروبی عصاره‌های متانولی برگ گیاه بنه (*Pistacia Atlantica*) از خانواده پسته (*Anacardiaceae*)، ریشه بادام کوهی (*Scoparia Amygdalus*) از خانواده گل سرخ (*Rosaceae*)، گیاه سس (*Cuscuta Eptimum*) از خانواده سس (*Cuscutaceae*) و اندام‌های هوایی گیاهان ریش بز (*Ephedra Procera*) از خانواده ارمک (*Ephedraceae*)، علف شوره (*Salsola Boryosma*)، ساماری (*Sameraria*) *Armen*، طوسک صحرایی (*Scabiosa Olivier*) از خانواده

گیاه‌شناس مورد تأیید قرار گرفت [۱۵]. بخش‌های مورد استفاده این گیاهان در سایه نگهداری شدند و بعد از خشک شدن، به کمک آسیاب خرد شده، به صورت پودر درآمدند و سپس عصاره‌گیری انجام شد. برگ گیاه بنه، ریشه بادام کوهی، اندام‌های هوایی گیاهان ریش بز، علف شوره ساماری، طوسک صحرایی، شنگ اسبی بیابانی، سیلن هرز، شیر تیغک، صابونک و تمام گیاه سس، بخش‌های مورد استفاده گیاهان مورد مطالعه بودند.

عصاره‌گیری: جهت تهیه عصاره متانولی این گیاهان از روش خیساندن پودر گیاهی در متانول ۸۰٪ استفاده شد. در طول این فرآیند سعی شد تا با هم‌زدن، عصاره یکنواختی تهیه گردد. عصاره‌های به دست آمده به روش تقطیر در خلاء تا حد خشک شدن تغلیظ گردید [۱۶]. دلیل استفاده از روش خیساندن، عدم آسیب به مواد موجود در عصاره تهیه شده از گیاهان بوده است [۱].

طرز تهیه سوسپانسیون میکروبی: آمپول لیوفیلیزه حاوی این میکروارگانیسم‌ها در شرایط استریل شکسته و با حدود ۱-۲ میلی‌لیتر محیط کشت نوترینت برات به صورت سوسپانسیون درآمد. چند قطره از این سوسپانسیون توسط سرنگ استریل به محیط کشت جامد نوترینت آگار منتقل گردید تا بعد از رشد ۱۸-۲۴ ساعته در گرمخانه به عنوان کشت ذخیره از آن استفاده گردد. ۲۴ ساعت قبل از شروع آزمایشات ضد میکروبی، کشت تازه‌ای از این محیط کشت ذخیره تهیه و برای ساخت استاندارد ۰/۵ مک فارلند مورد استفاده قرار گرفت. بدین صورت که ۴-۶ ساعت قبل از شروع، از کشت تازه تهیه شده در محیط جامد یک کشت تازه در محیط مایع (نوترینت برات) تهیه شد و تا رسیدن کدورت آن به استاندارد ۰/۵ مک فارلند (سوسپانسیون شامل ۰/۰۵ میلی‌لیتر کلرور باریم ۱/۱۷۵٪ و ۹/۹۵

طوسک (Dipceae)، شنگ اسبی بیابانی (*Scorzonera Tortuosissima*)، شیر تیغک (*Sonchus Oleraceas*) از تیره کاسنی (Compositae)، سیلن‌هرز (*Silene Conoidea*)، صابونک (*Vaccaria Pyramidata*) و جوگندمک (*Lepyrodialis Holosteoides*)، هر سه از خانواده خرفه (*Caryophyllaceae*) [۱۵]، بر روی ۶ گونه میکروب استاندارد / استافیلوکوک آرئوس، استافیلوکوک اپیدرمیدیس، اشرشیاکولی، کلبسیلا پنومونیه، سودوموناس آئروژینوزا و باسیلوس سابتیلیس بوده است [۱-۲]. سه گونه از این گیاهان (بنه، بادام کوهی و ریش بز) در مناطق کوهپایه‌ای و مراتع رویش دارند و بقیه آن‌ها در مزارع به صورت علف هرز می‌رویند.

مواد و روش‌ها

محیط‌های کشت و میکروارگانیسم‌های مورد استفاده:

کلیه محیط کشت‌های مورد استفاده در این تحقیق شامل نوترینت برات، نوترینت آگار، مولر-هینتون آگار، متانول و دی‌متیل سولفوکسید (از شرکت MERCK آلمان) خریداری شدند. میکروارگانیسم‌های مورد استفاده در این تحقیق از کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران (Persian Type Culture Collection (PTCC) (مرکز پژوهش‌های علمی-صنعتی ایران) خریداری شدند که بر اساس شماره عبارتند از: استافیلوکوک آرئوس (۱۱۱۲) PTCC=، استافیلوکوک اپیدرمیدیس (۱۱۱۴) PTCC=، اشرشیاکولی (۱۳۳۰) PTCC=، کلبسیلا پنومونیه (۱۰۵۳) PTCC=، سودوموناس آئروژینوزا (۱۰۴۷) PTCC= و باسیلوس سابتیلیس (۱۰۲۳) PTCC=.

جمع‌آوری و خشک کردن گیاهان: در این مطالعه

آزمایشگاهی پس از جمع‌آوری گیاهان از رویشگاه طبیعی، نمونه هر باریومی از آن‌ها تهیه شد و نام علمی آن‌ها توسط

میلی لیتر اسید سولفوریک ۱٪، در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شد. این سوسپانسیون حاوی $10^8 \times 1/5$ میکروارگانیسم در هر میلی لیتر است. این سوسپانسیون میکروبی به نسبت ۱/۲۰۰ به وسیله محیط کشت مولر هینتون آگار مذاب رقیق و در پتری دیش های استریل (هر پتری دیش ۲۰ میلی لیتر) ریخته شد تا منجمد گردد [۱-۲].

روش سیلندر- پلیت: بعد از سرد و جامد شدن محیط کشت، پتری دیش ها برای سیلندرگذاری آماده شدند. سیلندرها از جنس استیل زنگ نزن با قطر داخلی ۶ میلی متر، قطر خارجی ۸ میلی متر و ارتفاع ۱۰ میلی متر می باشند که باید قبل از استفاده با حرارت خشک (۱۷۰ درجه به مدت ۱ ساعت) استریل شوند. با قرار دادن ۵ سیلندر در اطراف و یک سیلندر در مرکز به عنوان شاهد منفی (جهت اطمینان از این که حلال نهایی خاصیت ضد میکروبی ندارد)، همه پتری دیش ها سیلندرگذاری می شوند. در سیلندرها محیطی، به ترتیب پنج غلظت از عصاره های مورد نظر (۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲۵، ۱/۲۵ و ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر) برای مشخص شدن کمترین غلظت مؤثر از عصاره گیاهی و در سیلندر مرکزی حلال نهایی عصاره (مخلوط ۱:۱ متانول: دی متیل سولفوکسید) افزوده شد [۱-۲]. غلظت ۱/۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر جنتامایسین به عنوان شاهد مثبت و به منظور مقایسه استفاده گردید. پس از پر شدن سیلندرها از عصاره ها، پلیت ها به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد جهت رشد میکروب ها و مشخص شدن قطر هاله عدم رشد، در گرمخانه قرار داده شدند. بعد از طی مدت گرمخانه گذاری، نتایج اثرات ضدباکتریایی به صورت قطر هاله عدم رشد و بر حسب میلی متر برای هر باکتری

به طور جداگانه بیان شد [۱-۲]. قابل ذکر است که اثر ضد میکروبی هر عصاره بر روی هر گونه میکروب به روش فوق سه بار مورد آزمایش قرار گرفت و نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار هاله عدم رشد بیان گردید. تجزیه و تحلیل داده ها به کمک نرم افزار آماری SPSS صورت گرفت. به منظور مقایسه میانگین های هاله عدم رشد عصاره ها و بررسی معنی دار بودن تفاوت میانگین هاله عدم رشد با آنتی بیوتیک جنتامایسین به عنوان یک آنتی بیوتیک وسیع الطیف، از آزمون t یک طرفه استفاده شد. برای بررسی معنی دار بودن تفاوت میانگین های هاله عدم رشد با این آنتی بیوتیک از آزمون ANOVA استفاده شد. $p < 0.05$ به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد.

نتایج

بازده عصاره گیری: میزان عصاره استخراج شده از برگ بنه ۲۵٪، ریشه بادام کوهی ۹٪، گیاه سس ۴٪ و اندام های هوایی گیاهان ریش بز ۱۲٪، شوره ۲۳/۵٪، ساماری ۱۱/۵٪، طوسک صحرایی ۱۲٪، شنگ اسبی بیابانی ۶٪، جوگندمک ۱۴٪، صابونک ۱۱/۵٪، شیرتیغک ۷٪ و سیلن هرز ۱۳٪ بود.

نتایج حاصل از آزمایشات ضد میکروبی: پس از بررسی نتایج مشخص شد که ده گونه از این گیاهان دارای اثر ضد میکروبی و دو گونه گیاه شوره و ساماری بر روی میکروب های فوق بی اثر بوده اند. نتایج حاصل از اندازه گیری قطر هاله عدم رشد پس از محاسبه میانگین همراه با انحراف معیار و هم چنین قطر هاله عدم رشد ناشی از غلظت ۱/۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر جنتامایسین به عنوان آنتی بیوتیک وسیع الطیف در جداول ۱-۳ آورده شده است. در این جداول دیده می شود که با افزایش

غلظت عصاره، قطر هاله عدم رشد نیز افزایش می‌یابد. جدول ۱ اثر مهارکنندگی از رشد عصاره متانولی سه گیاه بنه، بادام کوهی و ریش بز را نشان می‌دهد. در این جدول بیشترین اثر مهارکنندگی رشد مربوط به اثر گیاه بادام کوهی بر روی *استافیلوکوک اپیدرمیدیس* بود که قطر هاله عدم رشد آن در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برابر با ۱۹ میلی‌متر در مقایسه با جنتامایسین (۲۲ میلی‌متر) بود.

آزمون ANOVA معنی‌دار بودن تفاوت بین میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره این گیاه در غلظت‌های ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر را در مقایسه با جنتامایسین نشان می‌دهد. عصاره این گیاه همچنین بر روی *استافیلوکوک ارئوس* و *سودوموناس آئروژینوزا* موثر بود (جدول ۱).

جدول ۱- مقایسه میانگین \pm انحراف معیار قطر هاله عدم رشد حاصل از عصاره متانولی سه گونه گیاه بنه، بادام کوهی و ریش بز بر روی میکروارگانیسم‌های مورد آزمایش به روش سیلندر - پلیت با جنتامایسین

نام گونه میکروبی	باسیلوس سابتیلیس	سودوموناس آئروژینوزا	کلبسیلا پنومونیه	اشرشیا کولی	استافیلوکوک اپیدرمیدیس	استافیلوکوک ارئوس	نام گیاه
غلظت عصاره (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	۳/۱۲۵	۱۳±۰/۳	۱۴±۰/۶	۱۲±۰/۳	۱۱±۰/۷	-	بنه
۶/۲۵	۱۴±۰/۳	۱۵±۰/۶	-	۱۳±۰/۳	۱۳±۰/۹	۱۱±۰/۳	
۱۲/۵	۱۴±۰/۳	۱۶±۰/۶	۱۱±۰/۳	۱۴±۰/۳	۱۳±۰/۶	۱۳±۰/۶	
۲۵	۱۵±۰/۷	۱۶±۰/۶	۱۲±۰/۳	۱۵±۰/۶	۱۳±۰/۳	۱۵±۰/۳	
۵۰	۱۵±۰/۶	۱۶±۰/۳	۱۳±۰/۳	۱۶±۰/۶	۱۴±۰/۶	۱۵±۰/۳	
۳/۱۲۵	۱۳±۰/۳	۱۴±۰/۷	-	۱۳±۰/۳	۱۴±۰/۷	۱۴±۰/۹	بادام کوهی
۶/۲۵	۱۳±۰/۳	۱۴±۰/۳	-	۱۳±۰/۳	۱۵±۰	۱۴±۰/۳	
۱۲/۵	۱۴±۰/۷	۱۵±۰	-	۱۳±۰/۳	۱۵±۰/۳	۱۵±۰/۶	
۲۵	۱۵±۰/۳	۱۶±۰/۳	-	۱۴±۰/۶	۱۷±۰/۳	*۱۷±۰/۳	
۵۰	۱۵±۰/۹	۱۷±۰/۶	-	۱۴±۰/۶	*۱۹±۰/۳	*۱۸±۰/۳	
۳/۱۲۵	-	۱۲±۰/۹	-	۱۱±۰/۹	-	۱۱±۰/۹	ریش بز
۶/۲۵	-	۱۲±۰/۶	-	۱۲±۰/۶	-	۱۲±۰/۶	
۱۲/۵	-	۱۲±۰/۷	-	۱۳±۰/۷	-	۱۲±۰/۳	
۲۵	-	۱۳±۰/۳	-	۱۳±۰/۶	۱۱±۰/۳	۱۳±۰/۲	
۵۰	-	۱۳±۰/۳	-	۱۳±۰/۳	۱۲±۰/۳	۱۴±۰/۳	
۱/۲۵	۳۵±۰/۶	۱۸±۰/۶	۲۸±۰/۶	۲۸±۰/۶	۲۲±۰/۶	۱۷±۰/۶	جنتامایسین (میکروگرم بر میلی‌لیتر)

*) $(p < 0.05)$

آزمون ANOVA

جدول ۲ اثر مهار کنندگی از رشد عصاره متانولی سه گیاه سیلن هرز، صابونک و جوگندمک را نشان می دهد که هر سه از تیره خرفه هستند و در مزارع به صورت علف هرز می رویند. در این جدول بیشترین اثر مهار کنندگی رشد مربوط به اثر گیاه سیلن هرز و صابونک بر روی *استافیلوکوک آرنوس* می باشد که قطر هاله عدم رشد در غلظت ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر برابر با ۱۶ میلی متر در

مقایسه با جنتامایسین (۱۷ میلی متر) است. گیاه صابونک هم چنین در غلظت ۱۲/۵ تا ۵۰ میلی گرم در میلی لیتر روی *سودوموناس آئروژینوزا* اثر مهاری نشان داده است (جدول ۲). این سه گونه گیاه بر روی میکروب های *اشرشیا کولی*، *کلبسیلا پنومونیه* و *باسیلوس سابتیلیس* اثر مهاری از خود نشان ندادند.

جدول ۲- مقایسه میانگین \pm انحراف قطر هاله عدم رشد حاصل از عصاره متانولی سه گونه گیاه سیلن هرز، صابونک و جوگندمک بر روی میکروارگانیسم های مورد آزمایش به روش سیلندر- پلیت با جنتامایسین

نام گونه میکروبی	سودوموناس آئروژینوزا	استافیلوکوک اپیدرمیدیس	استافیلوکوک آرنوس	نام گیاه
غلظت عصاره (میلی گرم بر میلی لیتر)	قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی متر (میانگین \pm انحراف معیار)			
سیلن هرز	۱۴ \pm ۰/۳	-	۱۲ \pm ۰/۹	
	۱۴ \pm ۰/۳	-	۱۴ \pm ۰/۶	
	۱۵ \pm ۰/۳	-	۱۴ \pm ۰/۳	
	۱۵ \pm ۰/۶	-	۱۴ \pm ۰/۷	
	۱۵ \pm ۰/۶	-	۱۶ \pm ۰/۲*	
صابونک	۱۴ \pm ۰/۳	۱۲/۰ \pm ۰/۶	۱۳ \pm ۰/۶	
	۱۵ \pm ۰/۷	۱۲/۳ \pm ۰/۳	۱۳ \pm ۰/۹	
	۱۶ \pm ۰/۹*	۱۳/۳ \pm ۰/۳	۱۴ \pm ۰/۸	
	۱۶ \pm ۰/۶*	۱۴/۰ \pm ۰/۶	۱۴ \pm ۰/۷	
	۱۶ \pm ۰/۶*	۱۵/۰ \pm ۰/۶	۱۶ \pm ۰/۹*	
جوگندمک	۱۲ \pm ۰/۷	۱۱ \pm ۰/۳	۱۰ \pm ۰/۷	
	۱۲ \pm ۰/۳	۱۱ \pm ۰/۷	۱۱ \pm ۰/۲	
	۱۳ \pm ۰/۷	۱۱ \pm ۰/۷	۱۲ \pm ۰/۷	
	۱۳ \pm ۰/۷	۱۲ \pm ۰/۹	۱۲ \pm ۰/۶	
	۱۳ \pm ۰/۳	۱۳ \pm ۰/۳	۱۳ \pm ۰/۷	
جنتامایسین (میکروگرم بر میلی لیتر)	۱۸ \pm ۰/۶	۲۲ \pm ۰/۶	۱۷ \pm ۰/۶	

*($p < 0.05$)

ANOVA آزمون

جدول ۳ اثر مهار کنندگی از رشد عصاره متانولی ۴ گیاه سس، طوسک صحرایی، شنگ اسبی بیابانی و شیرتیغ را نشان می‌دهد. در این جدول بیشترین اثر مهار کنندگی رشد مربوط به اثر گیاه سس بر روی استافیلوکوک/پیدرمیدیس می‌باشد که قطر هاله عدم رشد آن در غلظت ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر برابر با ۱۹ میلی متر در مقایسه با جنتامایسین (۲۲ میلی متر) است. قطر هاله عدم رشد شیرتیغ روی سودوموناس *آئروژینوزا* نیز در مقایسه با جنتامایسین و بر اساس آزمون ANOVA معنی دار بود. این چهار گونه گیاه بر روی میکروب‌های *اشرشیاکولی* و *کلبسیلا پنومونیه* اثرمهراری نداشتند.

جدول ۳- مقایسه میانگین \pm انحراف قطر هاله عدم رشد حاصل از عصاره متانولی چهار گونه گیاه سس، طوسک صحرایی، شنگ اسبی بیابانی و شیرتیغ بر روی میکروارگانیسم‌های مورد آزمایش به روش سیلندر- پلیت با جنتامایسین

نام گونه میکروبی	باسیلوس سابتیلیس	سودوموناس آئروژینوزا	استافیلوکوک پیدرمیدیس	استافیلوکوک آرئوس	نام گیاه
غلظت عصاره (میلی گرم بر میلی لیتر)	میانگین قطر هاله عدم رشد (میلی متر) (میانگین \pm انحراف معیار)				
۳/۱۲۵	-	-	-	-	سس
۶/۲۵	-	-	۱۱ \pm ۰/۶	-	
۱۲/۵	-	-	۱۳ \pm ۰/۳	-	
۲۵	-	-	۱۸ \pm ۰/۹	-	
۵۰	-	-	*۱۹ \pm ۰/۶	-	
۳/۱۲۵	-	۱۱ \pm ۰/۹	-	-	طوسک صحرایی
۶/۲۵	-	۱۱ \pm ۰/۳	-	-	
۱۲/۵	-	۱۲ \pm ۰/۳	-	۱۱ \pm ۰/۲	
۲۵	-	۱۲ \pm ۰/۶	-	۱۲ \pm ۰/۳	
۵۰	۱۲ \pm ۰/۳	۱۳ \pm ۰/۳	-	۱۲ \pm ۰/۷	
۳/۱۲۵	-	۱۱ \pm ۰/۳	-	-	شنگ اسبی بیابانی
۶/۲۵	-	۱۱ \pm ۰/۷	-	-	
۱۲/۵	-	۱۲ \pm ۰/۷	-	-	
۲۵	-	۱۲ \pm ۰/۹	-	-	
۵۰	-	۱۳ \pm ۰/۹	-	-	
۳/۱۲۵	-	۱۳ \pm ۰/۳	-	-	شیر تیغ
۶/۲۵	-	۱۴ \pm ۰/۳	-	-	
۱۲/۵	-	۱۵ \pm ۰/۳	-	-	
۲۵	-	*۱۶ \pm ۰/۹	-	-	
۵۰	-	*۱۶ \pm ۰/۶	-	-	
۱/۲۵	۳۵ \pm ۰/۶	۱۸ \pm ۰/۶	۲۲ \pm ۰/۶	۱۷ \pm ۰/۶	جنتامایسین (میکروگرم بر میلی لیتر)

* ($p < 0.05$)

آزمون ANOVA

بحث

این تحقیق نشان داد که عصاره متانولی ۱۰ گونه گیاهی از ۱۲ گونه مورد بررسی، فعالیت ضدباکتریایی دارند که از این میان گیاه سس فقط بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گیاه شیرتیغ فقط بر روی باکتری‌های گرم منفی و ۸ گونه دیگر هم بر روی باکتری‌های گرم مثبت و هم بر روی باکتری‌های گرم منفی مؤثر بودند. عصاره متانولی دو گیاه شوره و ساماری بر روی هیچ‌کدام از باکتری‌ها اثر مهاری نداشت. اثر ضد میکروبی ریشه گیاه بادام کوهی با نام محلی رنگ، برای اولین بار مورد بررسی قرار گرفت و بیشترین اثر مهارکنندگی رشد مربوط به ریشه این گیاه بر روی *استافیلوکوک اپیدرمیدیس* می‌باشد. این گیاه بر روی میکروب‌های *استافیلوکوک آرئوس*، *اشرشیاکولی*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *باسیلوس سابتیلیس* نیز مؤثر است. در منابع، از این گیاه به عنوان گیاه دارویی نامی آورده نشده است اما افراد محلی از ریشه این گیاه (رنگ) جهت درمان دردهای معده و هم‌چنین دردهای قاعدگی استفاده می‌کنند و در صنعت مشک‌سازی نیز کاربرد دارد.

عصاره متانولی برگ‌های گیاه بنه بر روی شش میکروب *استافیلوکوک آرئوس*، *استافیلوکوک اپیدرمیدیس*، *اشرشیاکولی*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *کلبسیلا پنومونیه* و *باسیلوس سابتیلیس* اثر مهارکنندگی نشان داد و بیشترین اثر مهارکنندگی رشد مربوط به اثر این گیاه بر روی *سودوموناس آئروژینوزا* بود. در تحقیقی که توسط Benhammou و همکاران انجام شد اثر ضدباکتریایی عصاره اتانولی برگ‌های دو گونه بنه و مصطکی بر روی ۹ میکروارگانیسم از جمله *استافیلوکوک آرئوس* و

سودوموناس آئروژینوزا به روش انتشار دیسک بررسی شد و اثر ضدباکتریایی آن‌ها مشخص شد. قطر هاله عدم رشد عصاره اتانولی بنه بر روی *استافیلوکوک آرئوس* ۱۶/۵ میلی‌متر و بر روی *سودوموناس آئروژینوزا* ۱۰/۵ میلی‌متر گزارش شد [۶] نتایج مطالعه حاضر با نتایج مطالعه فوق [۶] مغایرت دارد. این قبیل اختلافات با توجه به شرایط محیطی گیاه، نحوه عصاره‌گیری و نوع آزمایش میکروبی قابل انتظار است. Ghalem و همکاران اثر مهاری اسانس گیاه بنه بر روی *استافیلوکوک آرئوس*، *استرپتوکوکوس پیوجنز* و *اشرشیاکولی* را با روش انتشار دیسک بررسی کردند و نشان دادند که این اسانس بر روی هر سه گونه میکروب اثر مهاری دارد [۵]. اثرات ضد میکروبی عصاره میوه نارس گیاه بنه توسط Rasooli مورد بررسی قرار گرفت که بر روی *استافیلوکوک آرئوس* و *استافیلوکوک اپیدرمیدیس* مؤثر واقع شد [۴]. بنابراین بیشتر قسمت‌های گیاه بنه دارای خواص دارویی، به ویژه اثر ضد میکروبی هستند.

در تحقیق حاضر اثر ضدباکتریایی عصاره گیاه ریش بز یا ارمک بر روی پنج سوش *استافیلوکوک آرئوس*، *استافیلوکوک اپیدرمیدیس*، *اشرشیاکولی*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *باسیلوس سابتیلیس* نشان داده شد. اثر ضد میکروبی این گیاه تاکنون مورد بررسی قرار نگرفته است.

سه نمونه گیاهی، یعنی ریشه گیاه بادام کوهی، برگ گیاه بنه و اندام هوایی گیاه ریش بز در این تحقیق بر روی حداقل ۵ گونه از میکروب‌های مورد آزمایش مؤثر واقع شدند و بیشترین اثر ضد میکروبی را در بین گیاهان مورد

آزمایش داشته‌اند. نتایج این آزمایش‌ها را با استفاده‌ای که افراد محلی از این گیاهان می‌کنند (افراد محلی در صنعت

مشک‌سازی از این گیاهان استفاده می‌کنند) نمی‌توان بدون ارتباط دانست و لازم است تحقیقات جامع‌تری در این زمینه صورت گیرد.

در این تحقیق گیاه سیلن هرز بر روی هر دو نوع باکتری گرم مثبت /استافیلوکوک آرئوس و گرم منفی سودوموناس آئروژینوزا مؤثر بود. گیاه شنگ اسبی بیابانی نیز بر روی باکتری گرم منفی سودوموناس آئروژینوزا مؤثر واقع شد.

گیاه سس در این مطالعه بر روی /استافیلوکوک /پیدرمیدیس اثر مهاری داشت. محققین مختلف اثر ضد میکروبی این گیاه را در تحقیقات مختلف بررسی کرده‌اند [۸-۱۱]. نتایج این تحقیقات از لحاظ قطر هاله عدم رشد و نوع میکروبی که مهار شده است با مطالعه اخیر یکسان نیست. با توجه به این که گیاه سس گیاهی است بدون برگ و کلروفیل و به صورت انگل و به وسیله اندام مکنده خود به سطح اندام‌های گیاه میزبان می‌چسبد و از آن تغذیه می‌کند، بنابراین عواملی از جمله نوع گیاهی که سس بر روی آن بصورت انگل زندگی و از آن تغذیه می‌کند، می‌تواند در خواص ضدباکتری آن مؤثر باشد [۹، ۱۱]. در این پژوهش گیاه شیرتیغ فقط بر روی سودوموناس آئروژینوزا اثر مهاری نشان داد. در تحقیق دیگری اثر ضد میکروبی ۹ علف هرز بر روی ۶ گونه میکروب به روش *in vitro* بررسی شد که در نتیجه آن شیرتیغ بر روی سودوموناس آئروژینوزا و باسیلوس سابتیلیس اثر مهاری داشته است [۱۰].

طوسک صحرایی نیز بر روی /استافیلوکوک آرئوس و سودوموناس آئروژینوزا مؤثر واقع شد. صابونک بر روی سه

باکتری /استافیلوکوک آرئوس، /استافیلوکوک /پیدرمیدیس و سودوموناس آئروژینوزا اثر مهاری نشان داد. جوگندمک بر روی سه گونه /استافیلوکوک آرئوس، /استافیلوکوک /پیدرمیدیس و سودوموناس آئروژینوزا اثر داشته است. طوسک صحرایی، شنگ اسبی بیابانی، سیلن هرز، شیر تیغ، صابونک و سس همگی جزء علف‌های هرز به حساب می‌آیند. بنابراین علف‌های هرز دارای خواص ضد میکروبی می‌باشند و می‌توانند داروی گیاهی به شمار آیند.

نتیجه‌گیری

در مجموع تحقیق حاضر نشان داد که ریشه گیاه بادام کوهی، برگ‌های گیاه بنه و اندام هوایی ریش بز اثر ضد میکروبی بیشتری از سایر گونه‌های مورد آزمایش دارند و دیگر این که هر چند این آزمایش‌ها برای شناسایی خواص ضد میکروبی ابزار مناسبی می‌باشند، ولی مشاهده هاله عدم رشد در آن‌ها راه را برای تحقیقات بیشتر باز می‌کند. پیشنهاد می‌گردد برای ادامه تحقیق از حلال‌های مختلف و روش‌های مناسب جهت عصاره‌گیری و جدا کردن فراکسیون‌های موجود در عصاره‌های این گیاهان استفاده شود، تا ترکیبات مؤثر این گیاهان شناسایی گردند.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمان که هزینه طرح تحقیقاتی فوق را تأمین نموده است تشکر و سپاسگزاری می‌گردد

References

- [1] Moshafi MH, Forutan H, Mehrabani M. Investigation of antibacterial effects *Hibiscus Sabdariffa* L. Dried caryx by agar diffusion and bioautographic methods. *J Kerman Univ Med Sci* 2006; 13(2): 103-10. [Farsi]
- [2] Moshafi MH, Mehrabani M, Zolhasab H. Antibacterial activity studies of *Salvia Mirzayanii* and *Salvia Atropatana* against six standard gram positive and gram negative bacteria. *J Kerman Univ Med Sci* 2004; 11(2): 109-18. [Farsi]
- [3] Zargari A, Medicinal plants. Tehran University press, vol. 1, 4 th ed. 1990; pp: 571-3. [Farsi]
- [4] Rasooli B. Antibacterial activity studies of *Thymus Kotschyanus*, *Stachys inflata* (Labiatae), *Rhus coriaria* and *Pistacia atlantica* (anacardiaceae) by *in vitro* method. Iranian *Pistachio Research Institute* 2006; 13: 1-2.
- [5] Ghalem BR, Mohamed B. Bactericidal activity of *Pistacia atlantica*. Desf mastic gum against certain pathogens. *African J Plabt Sci* 2009; 3(1): 13-5.
- [6] Benhammou N, Bekkara FA, Panovska TK, Antioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts. *African J Pharm Pharmacol* 2008; 2(2): 22-8.
- [7] Koutsoudaki C, Krsek M, Rodger A. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil and the gum of *Pistacia lentiscus* Var. chia. *J Agric Food Chem* 2005 53(20): 7681-5.
- [8] Shahidi Bonjar GH. Evaluation of antibacterial properties of Iranian Medicinal-Plants against *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae* and *Bordetella bronchiseptica*. *Asian J Plant Sci* 2004; 3(1): 82-6.
- [9] Erturk O, Demirbag Z, Trabzon O. Antimicrobial activity of *Scorzonera mollis* Bief (Compositae) Plant. *Nisan-Mayis-Haziran* 2003; 47: 27-31.
- [10] Shahidi Bonjar GH, Aghighi S, Karimi Nik A. Antibacterial and antifungal survey in plants used in indigenous herbal-medicine of south

- east regions of Iran. *J Biological Sci* 2004; 4(3): 405-12.
- [11] Zidorn Ch, Spitaler R, Ellmeret-Muller EP, Perry NB, Gerhäuser C, Stuppner H. Structure of tyrollobibenzyl D and biological activity of tyrollobibenzyls from *Scorzonera humilis*. *Z Naturforsch* 2002; 57(7-8): 614-9.
- [12] Gorette M, Lisieux R, Rpberta. phytochemical screening and *in vitro* antibacterial activity of weed plants. *Revista Lecta Braganca Pualista* 2002; 20: 177-82.
- [13] Feng Han Y, Zhang Q, Gao K, Jian jia Z. New Sesquiterpenes from *Sonchus transapicus*. *Planta Med* 2005; 71: 543-7.
- [14] Erturk O, Kati H, Yayli N, Demirbag Z. Antimicrobial properties of *Silene multifida* (Adams) Rohrb. *Plant Extracts. Turk J Biol* 2006; 30: 17-21.
- [15] Mozaffarian V. A Dictionary of Iranian plant names, 2th ed. Tehran: Farhang-Moaser Publication. 1998; pp: 40-571. [Farsi]
- [16] Samsam Shariat H. Qualitative and Quantitative evaluation of the active consituents and control methods for medicinal plants. 2th Ed, Esfahan University of Medical Sciences, Mani Publications. 1992; pp: 10-3. [Farsi].

Antibacterial Activity of Metanolic Extract of 12 Herbal Species on 6 Bacterial Strains Using Cylinder-plate Method

Z. Mahdavi Meymand¹, M.H. Moshafi², H. Forotanfar³

Received: 26/01/08

Sent for Revision: 14/01/09

Received Revised Manuscript: 18/10/09

Accepted: 25/10/09

Background and Objectives: Resistance to antibacterial agents and sensitivity reaction to such chemical compounds are the main reasons for investigators to develop new antibiotics from herbal sources. Antimicrobial effects of Metanolic extract of 12 herbal species *Pistacia atlantica*, *Amygdalus scoparia*, *Cuscuta ephthymum*, *Ephedra procera*, *Salsola boryosm*, *Sameraria armena*, *Scabiosa olivier*, *Scorzonera tortuosissima*, *Lepyradielis holosteoidea*, *Vaccaria pyramidata*, *Sonchus oleraceam* and *Silene conoidema* on 6 bacterial strains *Staphylococcus aureas*, *Staphylococcus epidermidis*, *Echerichia coli*, *Kelebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeroginos* and *Bacillus subtilis* were, separately, studied using Cylinder-plate method.

Materials and Methods: In this laboratory study, methanolic extracts of herbal strains were prepared by maceration and after concentrating the extracts were dried. Then the concentrations of 50, 25, 12.5, 6.25 and 3.125 mg/ml of the extracts were prepared using 1:1 solution of DMSO/methanol. The standard bacteria with certain concentration (0.5 MacFarland) were inoculated on to the Muller-Hinton agar medium. Prepared extracts were dropped into cylinders and 18-24 hours after incubation and penetration of extract into the culture medium, the antibacterial effects and growth inhibitory zone (mm) were measure and values were expressed as (Mean \pm SEM).

Results: The least and the most amount of effective concentration were 3.125 mg/ml and 50 mg/ml, respectively. The most inhibitory diameter belonged to methanolic extract of *Amygdalus scoparia* on *Staphylococcus epidermidis* which was equal to 19 ± 0.3 mm.

Conclusions: Metanolic extracts of herbal species of *Pistacia atlantica*, *Amygdalus scoparia* and *Ephedra procera* had the most antibacterial effects compared to gentamicin as positive control. Regarding the side effects of the synthetic drugs and also benefits of such herbal extracts, extracts of these herbs as antibacterial agents after further investigations seems to be useful.

Key words: Extract, Antimicrobial, Cylinder-plate

Funding: This Research was funded by Kerman University of Medical Sciences.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Ethical Committee of Kerman University of Medical Science approved the study.

1- BSc of Pharmacogenosy, Faculty of Pharmacy, University of Medical Sciences, Kerman, Iran

2- Associate Prof., Dept. of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, University of Medical Sciences, Kerman, Iran

(Corresponding Author) Tel: (0341) 3205018, Fax: (0341) 3205003, E-mail: Moshafi14@yahoo.com

3- Student of Pharmaceutical Biotechnology, Dept. of Pharmaceutical Biotechnology, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran