مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره هشتم، شماره سوم، پاییز ۱۳۸۸، ۲۳۸-۲۲۷

بررسی اثرات ضدمیکروبی عصاره متانولی ۱۲ گونه گیاه بر روی ٦ گونه میکروبی به روش سیلندر- پلیت

زهرا مهدوی میمند[۱]، محمدحسن مصحفی[۲]، حمید فروتن‌فر[۳]

دریافت مقاله:۸٦/۱۱/٦ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح:۸۷/۱۰/۲۵ دریافت اصلاحیه از نویسنده:۸۸/۷/۲٦ پذیرش مقاله: ۸۸/۷/۲۷

چکیده

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

مواد وروش‌ها: در این مطالعه آزمایشگاهی که در سال ۱۳۸۵ صورت گرفت، ابتدا عصاره متانولی گیاهان فوق به روش خیساندن تهیه شد. بعد از خشک کردن عصاره‌ها، با حل کردن آن‌ها در مخلوط ۱:۱ متانول: دی‌متیل‌سولفوکسید، غلظت‌های ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵ و ۳/۱۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تهیه گردید. محلول میکروب‌های استاندارد مورد آزمایش بعد از تهیه از محلول ذخیره اصلی به محیط کشت مولر- هینتون آگار تلقیح شد. بعد از انکوباسیون غلظت‌های مختلف از عصاره‌ها و نفوذ عصاره‌ها به داخل محیط کشت، قطر هاله عدم رشد (بر حسب میلی‌متر) اندازه‌گیری شد. جنتامایسین به عنوان شاهد مثبت در نظر گرفته شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون t یکطرفه و ANOVA استفاده گردید.

یافته‌ها: از بین ۱۲ گیاه مورد مطالعه ۱۰ گیاه هاله عدم رشد از خود نشان دادند که بیشترین هاله ممانعت از رشد در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مربوط به عصاره بادام کوهی بر روی سوش *استافیلوکوک اپیدرمیدیس* بود که معادل ۰/۳±۱۹ میلی‌متر محاسبه گردید.

نتیجه‌گیری: عصاره متانولی گیاهان بنه، بادام کوهی و ریش بز از سایر گیاهان مورد آزمایش در پژوهش اثر ضدباکتریایی بیشتری نشان دادند که این فعالیت در مقایسه با داروی جنتامایسین قابل توجه بود. می‌توان گفت در صورت مطالعه روی سایر فراکسیون‌های موجود در عصاره‌های مختلف این سه گیاه (عصاره‌گیری با سایر حلال‌های آلی) امکان خالص‌سازی و استخراج ترکیبات واجد آثار آنتی‌بیوتیکی از این گیاهان وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: عصاره، ضدمیکروب، سیلندر- پلیت

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

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

تلفن: ۰۳٤۱-۳۲۰۵۰۱۸، دورنگار: ۰۳٤۱-۳۲۰۵۰۰۳، پست الکترونیکی: Moshafi14@yahoo.com

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

مقدمه

امروزه بررسی اثرات ضدمیکروبی 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 ضدمیکروبی بهره برد. دلیل دوم، بروز مقاومت میکروبی در اثر مصرف غیر اصولی داروهای ضدمیکروبی فعلی توسط عامه مردم و هم‌چنین نرخ بالای حساسیت‌های دارویی نسبت به این ترکیبات شیمیایی نیاز شدید دستیابی به داروهای جدید را خاطرنشان می‌سازد [۲-۱].

اطلاعات جامعی در مورد انواع گیاهان مذکور در منابع گزارش نشده است، اما تحقیقاتی در خصوص بررسی اثر ضدمیکروبی 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 ضدمیکروبی عصاره حاصل از میوه نارس گیاه بنه به اثبات رسید [۴]. Ghalem و همکاران در سال ۲۰۰۸ اثر ضدمیکروبی 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 ضدمیکروبی 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 ضدمیکروبی 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 ضدمیکروبی این گیاه بود [۱۱]، در صورتی که اثر ضدمیکروبی *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 ضدمیکروبی عصاره‌های متانولی برگ گیاه بنه (*Pistacia Atlantica*) از خانواده پسته (Anacardiacae)، 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

طوسک (Dipcaceae)، شنگ اسبی بیابانی (*Scorzonera Tortuosissima*)، شیرتیغک (*Sonchus Oleraceas*) از تیره کاسنی (Compositeae)، سیلن‌هرز (*Silene Conoidea*)، صابونک (*Vaccaria Pyramidata*) و جوگندمک (*Lepyrodielis Holosteoides*)، هر سه از خانواده خرفه (*Caryophylaceae*) [۱۵]، بر روی ۶ گونه میکروب استاندارد *استافیلوکوک آرئوس*، *استافیلوکوک اپیدرمیدیس*، *اشرشیاکولی*، *کلبسیلا پنومونیه*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *باسیلوس سابتیلیس* بوده است [۲-۱]. 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 براث، نوترینت‌آگار، مولر- هینتون آگار، متانول و دی‌متیل‌سولفوکسید (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* (PTCC=۱۱۱۴)، *اشرشیا کولی* (PTCC=۱۳۳۰)، *کلبسیلا پنومونیه* (PTCC=۱۰۵۳)، *سودوموناس آئروژینوزا* (PTCC=۱۰۴۷) و *باسیلوس سابتیلیس* (PTCC=۱۰۲۳).

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 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 ۲-۱ میلی‌لیتر محیط کشت نوترینت براث به صورت سوسپانسیون درآمد. چند قطره از این سوسپانسیون توسط سرنگ استریل به محیط کشت جامد نوترینت آگار منتقل گردید تا بعد از رشد ۲۴-۱۸ ساعته در گرمخانه به عنوان کشت ذخیره از آن استفاده گردد. ۲۴ ساعت قبل از شروع آزمایشات ضدمیکروبی، کشت تازه‌ای از این محیط کشت ذخیره تهیه و برای ساخت استاندارد ۰/۵ مک فارلند مورد استفاده قرار گرفت. بدین صورت که ۶-۴ ساعت قبل از شروع، از کشت تازه تهیه شده در محیط جامد یک کشت تازه در محیط مایع (نوترینت براث) 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

میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۱٪)، در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. این سوسپانسیون حاوی $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ میکروارگانیسم در هر میلی‌لیتر است. این سوسپانسیون میکروبی به نسبت۱/۲۰۰ به وسیله محیط کشت مولر هینتون آگار مذاب رقیق و در پتری دیش‌های استریل (هر پتری دیش ۲۰ میلی‌لیتر) ریخته شد تا منجمد گردد [۲-۱] .

روش سیلندر- پلیت: بعد از سرد و جامد شدن محیط کشت، پتری دیش‌ها برای سیلندرگذاری آماده شدند. سیلندرها از جنس استیل زنگ نزن با قطر داخلی ۶ میلی‌متر، قطر خارجی ۸ میلی‌متر و ارتفاع ۱۰ میلی‌متر می‌باشند 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 ضدمیکروبی ندارد)، همه پتری دیش‌ها سیلندرگذاری می‌شوند. در سیلندرهای محیطی، به ترتیب پنج غلظت از عصاره‌های مورد نظر (۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) 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 [۲-۱]. غلظت ۱/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر جنتامایسین به عنوان شاهد مثبت و به منظور مقایسه استفاده گردید. پس از پر شدن سیلندرها از عصاره‌ها، پلیت‌ها به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد جهت رشد میکروب‌ها و مشخص شدن قطر هاله عدم رشد، در گرمخانه قرار داده شدند. بعد از طی مدت گرمخانه‌گذاری، نتایج اثرات ضدباکتریایی به صورت قطر هاله عدم رشد و بر حسب میلی‌متر برای هر باکتری به طور جداگانه بیان شد [۲-۱]. قابل ذکر است که اثر ضدمیکروبی هر عصاره بر روی هر گونه میکروب به روش فوق سه بار مورد آزمایش قرار گرفت و نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار هاله عدم رشد بیان گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها به کمک نرم‌افزار آماری SPSS صورت گرفت. به منظور مقایسه میانگین‌های هاله عدم رشد عصاره‌ها و بررسی معنی‌دار بودن تفاوت میانگین هاله عدم رشد با آنتی‌بیوتیک جنتامایسین به عنوان یک آنتی‌بیوتیک وسیع‌الطیف، از آزمون t یک‌طرفه استفاده شد. برای بررسی معنی‌دار بودن تفاوت میانگین‌های هاله عدم رشد با این آنتی‌بیوتیک از آزمون ANOVA استفاده شد. $p<۰/۰۵$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

نتایج

بازده عصاره‌گیری: میزان عصاره استخراج شده از برگ بنه ۲۵٪، ریشه بادام کوهی ۹٪ ،گیاه سس ۴٪ و اندام‌های 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 ضدمیکروبی: پس از بررسی نتایج مشخص شد که ده گونه از این گیاهان دارای اثر ضدمیکروبی و دو گونه گیاه شوره و ساماری بر روی میکروب‌های فوق بی‌اثر بوده‌اند. نتایج حاصل از اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد پس از محاسبه میانگین همراه با انحراف معیار و هم‌چنین قطر هاله عدم رشد ناشی از غلظت ۱/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر جنتامایسین به عنوان آنتی‌بیوتیک وسیع‌الطیف در جداول ۳-۱ آورده شده است. در این جداول دیده می‌شود 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* بودکه 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 برروی *استافیلوکوک ارئوس* و *سودوموناس آئروژینوزا* موثر بود (جدول ۱).

جدول ۱- مقایسه میانگین ± 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 آرئوس*
نام گیاه / غلظت عصاره (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	میانگین قطر هاله عدم رشد (بر حسب میلی‌متر) (میانگین ± انحراف معیار)					
بنه 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
بنه ۱۲/۵	۱۴±۰/۳	۱۶±۰/۶	۱۱±۰/۳	۱۴ ± ۰/۳	۱۳±۰/۶	۱۳±۰/۶
بنه ۲۵	۱۵±۰/۷	۱۶±۰/۶	۱۲±۰/۳	۱۵±۰/۶	۱۳±۰/۳	۱۵±۰/۳
بنه ۵۰	۱۵±۰/۶	۱۶±۰/۳	۱۳±۰/۳	۱۶±۰/۶	۱۴±۰/۶	۱۵±۰/۳
بادام کوهی 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
بادام کوهی ۱۲/۵	۱۴±۰/۷	۱۵±۰	-	۱۳±۰/۳	۱۵±۰/۳	۱۵±۰/۶
بادام کوهی ۲۵	۱۵±۰/۳	۱۶±۰/۳	-	۱۴±۰/۶	۱۷±۰/۳	*۱۷±۰/۳
بادام کوهی ۵۰	۱۵±۰/۹	۱۷±۰/۶	-	۱۴±۰/۶	*۱۹±۰/۳	*۱۸±۰/۳
ریش بز ۳/۱۲۵	-	۱۲±۰/۹	-	۱۱±۰/۹	-	۱۱±۰/۹
ریش بز ۶/۲۵	-	۱۲±۰/۶	-	۱۲±۰/۶	-	۱۲±۰/۶
ریش بز ۱۲/۵	-	۱۲±۰/۷	-	۱۳±۰/۷	-	۱۲±۰/۳
ریش بز ۲۵	-	۱۳±۰/۳	-	۱۳±۰/۶	۱۱±۰/۳	۱۳±۰/۲
ریش بز ۵۰	-	۱۳±۰/۳	-	۱۳±۰/۳	۱۲±۰/۳	۱۴±۰/۳
جنتامایسین ۱/۲۵ (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	۳۵±۰/۶	۱۸±۰/۶	۲۸±۰/۶	۲۸±۰/۶	۲۲±۰/۶	۱۷±۰/۶

(p<۰/۰۵)

آزمون ANOVA

جدول ۲ اثر مهار کنندگی از رشد عصاره متانولی سه گیاه سیلن هرز، صابونک و جوگندمک را نشان می‌دهد که هر سه از تیره خرفه هستند و در مزارع به صورت علف هرز می‌رویند. در این جدول بیشترین اثر مهارکنندگی رشد مربوط به اثر گیاه سیلن هرز و صابونک بر روی *استافیلوکوک آرئوس* می‌باشد که قطر هاله عدم رشد در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برابر با ۱۶ میلی‌متر در مقایسه با جنتامایسین (۱۷ میلی‌متر) است. گیاه صابونک هم‌چنین در غلظت ۱۲/۵ تا ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر روی *سودوموناس آئروژینوزا* اثر مهاری نشان داده است (جدول ۲). این سه گونه گیاه بر روی میکروب‌های *اشرشیا کولی*، *کلبسیلا پنومونیه* و *باسیلوس سابتیلیس* اثر مهاری از خود نشان ندادند.

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

نام گونه میکروبی		*سودوموناس آئروژینوزا*	*استافیلوکوک اپیدرمیدیس*	*استافیلوکوک آرئوس*
نام گیاه	غلظت عصاره (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر (میانگین ± انحراف معیار)		
سیلن هرز	۳/۱۲۵	۱۴ ± ۰/۳	-	۱۲ ± ۰/۹
	۶/۲۵	۱۴ ± ۰/۳	-	۱۴ ± ۰/۶
	۱۲/۵	۱۵ ± ۰/۳	-	۱۴ ± ۰/۳
	۲۵	۱۵ ± ۰/۶	-	۱۴ ± ۰/۷
	۵۰	۱۵ ± ۰/۶	-	*۱۶ ± ۰/۲
صابونک	۳/۱۲۵	۱۴ ± ۰/۳	۱۲/۰ ±۰/۶	۱۳ ± ۰/۶
	۶/۲۵	۱۵ ± ۰/۷	۱۲/۳± ۰/۳	۱۳ ± ۰/۹
	۱۲/۵	*۱۶ ± ۰/۹	۱۳/۳± ۰/۳	۱۴ ± ۰/۸
	۲۵	*۱۶ ± ۰/۶	۱۴/۰ ±۰/۶	۱۴ ± ۰/۷
	۵۰	*۱۶ ± ۰/۶	۱۵/۰± ۰/۶	*۱۶ ± ۰/۹
جوگندمک	۳/۱۲۵	۱۲ ± ۰/۷	۱۱ ± ۰/۳	۱۰ ± ۰/۷
	۶/۲۵	۱۲ ± ۰/۳	۱۱ ± ۰/۷	۱۱ ± ۰/۲
	۱۲/۵	۱۳ ± ۰/۷	۱۱ ± ۰/۷	۱۲ ± ۰ /۷
	۲۵	۱۳ ± ۰/۷	۱۲ ± ۰/۹	۱۲ ± ۰/۶
	۵۰	۱۳ ± ۰/۳	۱۳ ± ۰/۳	۱۳ ± ۰/۷
جنتامایسین (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	۱/۲۵	۱۸ ± ۰/۶	۲۲ ± ۰/۶	۱۷ ± ۰/۶

(p<۰/۰۵)

آزمون ANOVA

جدول ۳ اثر مهار کنندگی از رشد عصاره متانولی ۴ گیاه سس، طوسک صحرایی، شنگ اسبی بیابانی و شیرتیغک را نشان می‌دهد. در این جدول بیشترین اثر مهارکنندگی رشد مربوط به اثر گیاه سس بر روی *استافیلوکوک اپیدرمیدیس* می‌باشد که قطر هاله عدم رشد آن در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برابر با ۱۹ میلی‌متر در مقایسه با جنتامایسین (۲۲ میلی‌متر) است. قطر هاله عدم رشد شیرتیغک روی *سودوموناس آئروژینوزا* نیز در مقایسه با جنتامایسین و بر اساس آزمون ANOVA معنی‌دار بود. این چهار گونه گیاه بر روی میکروب‌های *اشرشیاکولی* و *کلبسیلا پنومونیه* اثرمهاری نداشتند.

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

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

** (p<۰/۰۵)*

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 شیرتیغک 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 ضدمیکروبی 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 برروی شش میکروب *استافیلوکوک آرئوس*، *استافیلوکوک اپیدرمیدیس*، *اشرشیاکولی*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *کلبسیلا پنومونیه* و *باسیلوس سابتیلیس* اثر مهارکنندگی نشان داد و بیشترین اثر مهارکنندکی 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 *اشرشیا کولی* را با روش انتشار دیسک بررسی کردند و نشان دادند که این اسانس بر روی هر سه گونه میکروب اثر مهاری دارد [۵]. اثرات ضدمیکروبی 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 ضدمیکروبی 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 ضدمیکروبی 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 ضدمیکروبی را در بین گیاهان مورد

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

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 اپیدرمیدیس* اثر مهاری داشت. محققین مختلف اثر ضدمیکروبی این گیاه را در تحقیقات مختلف بررسی کرده‌اند [۱۱-۸]. 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 وکلروفیل 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 شیرتیغک فقط بر روی *سودوموناس آئروژینوزا* اثر مهاری نشان داد. در تحقیق دیگری اثر ضدمیکروبی ۹ علف هرز بر روی ۶ گونه میکروب به روش *in vitro* بررسی شد که در نتیجه آن شیرتیغک 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 اپیدرمیدیس* و *سودوموناس آئروژینوزا* اثر مهاری نشان داد. جوگندمک بر روی سه گونه *استافیلوکوک آرئوس*، *استافیلوکوک اپیدرمیدیس* و *سودوموناس آئروژینوزا* اثر داشته است. طوسک صحرایی، شنگ اسبی بیابانی، سیلن هرز، شیر تیغک، صابونک و سس همگی جزء علف‌های هرز به حساب می‌آیند. بنابراین علف‌های هرز دارای خواص ضدمیکروبی 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 ضدمیکروبی بیشتری از سایر گونه‌های مورد آزمایش دارند و دیگر این که هر چند این آزمایش‌ها برای شناسایی خواص ضدمیکروبی 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 inflate* (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 antibactetial 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 macescens*, *Klebsiella pneumoniae* and *Bordetella bronchoseptica*. *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 sourth

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 tyrolobibenzyl D and biological activity of tyrolobibenzyls 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: Farhangh-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 Meymand[1], M.H. Moshafi[2], H. Forotanfar[3]

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 sensivity 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 epthymum, Ephedra procera, Salsola boryosm, Sameraria armena, Scabiosa olivier, Scorzonera tortuosissima, Lepyrodielis 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 ± 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 to19± 0.3mm.

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