

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 آنتی‌بیوتیک‌ها 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 صحرائی، شنگ اسبی بیابانی، جوگندمک، 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 روش‌ها: 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: دی‌متیل سولفوکسید، 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 19 ± 0.3 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، ضد میکروب، سیلندر- پلیت

۱- کارشناس گروه آموزشی فارماکوتکوزی، 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 سنگ 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 Transcaspicus* به اثبات رسیده است [۱۳-۱۲]. هم‌چنین اثر مهاری عصاره کلروفومی 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 صحرائی (*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 صحرائی، 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 ۲۴-۱۸ 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 آرتوس، استافیلوکوک اپیدرمیدیس، اشرشیاکولی، کلبسیلا پنومونیه، سودوموناس آرتوژینوزا 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 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 آرتوس (۱۱۱۲ PTCC=)، استافیلوکوک اپیدرمیدیس (۱۱۱۴ PTCC=)، اشرشیاکولی (۱۳۳۰ PTCC=)، کلبسیلا پنومونیه (۱۰۵۳ PTCC=)، سودوموناس آرتوژینوزا (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

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 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. $p < 0.05$ 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 صحرائی 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 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 ۱-۳ آورده شده است. در این جداول دیده می‌شود که با افزایش

میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۰/۱٪، در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. این سوسپانسیون حاوی $10^8 \times 1/5$ میکروارگانیسم در هر میلی‌لیتر است. این سوسپانسیون میکروبی به نسبت ۱/۲۰۰ به وسیله محیط کشت مولر هینتون آگار مذاب رقیق و در پتری دیش‌های استریل (هر پتری دیش ۲۰ میلی‌لیتر) ریخته شد تا منجمد گردد [۱-۲].

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 ضد میکروبی ندارد)، همه پتری دیش‌ها سیلندرگذاری می‌شوند. در سیلندرها 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: دی‌متیل سولفوکسید) افزوده شد [۱-۲]. 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

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 ائروس و سودوموناس آئروژینوزا موثر بود (جدول ۱).

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.

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 سیندر - پلیت با جنتامایسین

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

* (p<۰/۰۵)

آزمون ANOVA

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 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 مهار کنندگی رشد مربوط به اثر گیاه سیلن هرز و صابونک بر روی استافیلوکوک آرنوس می‌باشد که قطر هاله عدم رشد در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برابر با ۱۶ میلی‌متر در

جدول ۲- مقایسه میانگین \pm 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 آرنوس
نام گیاه	قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر (میانگین \pm انحراف معیار)		
غلظت عصاره (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)			
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
	۱۸ \pm ۰/۶	۲۲ \pm ۰/۶	۱۷ \pm ۰/۶

*($p < 0.05$)

ANOVA آزمون

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* اثرمهراری نداشتند.

جدول ۳ اثر مهار کنندگی از رشد عصاره متانولی ۴ گیاه سس، طوسک صحرائی، شنگ اسبی بیابانی و شیرتیغک را نشان می‌دهد. در این جدول بیشترین اثر مهار کنندگی 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

جدول ۳- مقایسه میانگین \pm انحراف قطر هاله عدم رشد حاصل از عصاره متانولی چهار گونه گیاه سس، طوسک صحرائی، 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
میانگین قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر) (میانگین \pm انحراف معیار)					غلظت عصاره (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)
	-	-	-	-	۳/۱۲۵
	-	-	۱۱ \pm ۰/۶	-	۶/۲۵
سس	-	-	۱۳ \pm ۰/۳	-	۱۲/۵
	-	-	۱۸ \pm ۰/۹	-	۲۵
	-	-	*۱۹ \pm ۰/۶	-	۵۰
	-	۱۱ \pm ۰/۹	-	-	۳/۱۲۵
طوسک	-	۱۱ \pm ۰/۳	-	-	۶/۲۵
صحرائی	-	۱۲ \pm ۰/۳	-	۱۱ \pm ۰/۲	۱۲/۵
	-	۱۲ \pm ۰/۶	-	۱۲ \pm ۰/۳	۲۵
	۱۲ \pm ۰/۳	۱۳ \pm ۰/۳	-	۱۲ \pm ۰/۷	۵۰
	-	۱۱ \pm ۰/۳	-	-	۳/۱۲۵
شنگ اسبی	-	۱۱ \pm ۰/۷	-	-	۶/۲۵
بیابانی	-	۱۲ \pm ۰/۷	-	-	۱۲/۵
	-	۱۲ \pm ۰/۹	-	-	۲۵
	-	۱۳ \pm ۰/۹	-	-	۵۰
	-	۱۳ \pm ۰/۳	-	-	۳/۱۲۵
شیر تیغک	-	۱۴ \pm ۰/۳	-	-	۶/۲۵
	-	۱۵ \pm ۰/۳	-	-	۱۲/۵
	-	*۱۶ \pm ۰/۹	-	-	۲۵
	-	*۱۶ \pm ۰/۶	-	-	۵۰
جنتامایسین (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	۳۵ \pm ۰/۶	۱۸ \pm ۰/۶	۲۲ \pm ۰/۶	۱۷ \pm ۰/۶	۱/۲۵

*($p < 0.05$)

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 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 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 میکروارگانیزم 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

باکتری استافیلوکوک آرتوس، استافیلوکوک اپیدرمیدیس و سودوموناس آئروژینوزا اثر مهاری نشان داد. جوگندمک بر روی سه گونه استافیلوکوک آرتوس، استافیلوکوک اپیدرمیدیس و سودوموناس آئروژینوزا اثر داشته است. طوسک صحرائی، سنگ اسبی بیابانی، سیلن هرز، شیر تیغک، صابونک و سس همگی جزء علفهای هرز به حساب می آیند. بنابراین علفهای هرز دارای خواص ضد میکروبی می باشند و می توانند داروی گیاهی به شمار آیند.

نتیجه گیری

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 گونه های مورد آزمایش دارند و دیگر این که هر چند این آزمایش ها برای شناسایی خواص ضد میکروبی ابزار مناسبی می باشند، ولی مشاهده هاله عدم رشد در آنها راه را برای تحقیقات بیشتر باز می کند. پیشنهاد می گردد برای ادامه تحقیق از حلال های مختلف و روش های مناسب جهت عصاره گیری و جدا کردن فراکسیون های موجود در عصاره های 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 می گردد

مشک سازی از این گیاهان استفاده می کنند) نمی توان بدون ارتباط دانست و لازم است تحقیقات جامع تری در این زمینه صورت گیرد.

در این تحقیق گیاه سیلن هرز بر روی هر دو نوع باکتری گرم مثبت استافیلوکوک آرتوس و گرم منفی سودوموناس آئروژینوزا مؤثر بود. گیاه سنگ 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 ضد میکروبی این گیاه را در تحقیقات مختلف بررسی کرده اند [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 اندام های گیاه می چسبد و از آن تغذیه می کند، بنابراین عواملی از جمله نوع گیاهی که سس بر روی آن بصورت انگل زندگی و از آن تغذیه می کند، می تواند در خواص ضد باکتری آن مؤثر باشد [۹، ۱۱]. در این پژوهش گیاه شیر تیغک 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 شیر تیغک بر روی سودوموناس آئروژینوزا و باسیلوس سابتیلیس اثر مهاری داشته است [۱۰].

طوسک صحرائی نیز بر روی استافیلوکوک آرتوس و سودوموناس آئروژینوزا مؤثر واقع شد. صابونک بر روی سه

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 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 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 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 constituents 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*, *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 \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