

بررسی اثر ضد میکروبی چند نوع عصاره مختلف میوه گیاه *Pycnocycla spinosa*

داریوش عابدی (Ph.D.)**

محمد جلالی (Ph.D.)⁺*

زینب رضایی (Ph.D.)****

غلامرضا اصغری (Ph.D.)***

چکیده

سابقه و هدف: تنوع گونه‌های گیاهی و گرایش جامعه جهت استفاده از مواد طبیعی در درمان بیماری‌ها باعث گردیده است تا غربالگری اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی مورد توجه محققین قرار گیرد. اثرات ضد میکروبی برای برخی از گیاهان خانواده چتریان ذکر شده است بر همین اساس در این مطالعه اثرات ضد میکروبی یکی از اعضای این خانواده، گیاه سنگ دندان خاردار (*Pycnocycla spinosa* Decne) بررسی گردید.

مواد و روش‌ها: پس از جمع‌آوری و تهیه میوه گیاه و انجام مطالعات فارماکognوزی (Pharmacognosy) عصاره‌های هیدروالکلی، هگزانی، کلروفرمی و متانولی گیاه تهیه گردید و اثرات ضد میکروبی عصاره‌ها با استفاده از روش انتشار دیسک و همچنین تعیین حداقل غلظت مهارکننده رشد میکروب‌ها (MIC)^۱ با استفاده از روش رقیق‌سازی لوله‌ای انجام شد. میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه عبارت بودند از: استافیلوکوکوس ارئوس، لیستریا مونوسیتوزنز، باسیلوس سوبتیلیس، سودوموناس آئروژنوزا، سالمونلا انتریتیدیس، اشرشیا کلی، کاندیدا آلبیکنس و آسپرژیلوس نایجر.

یافته‌ها: عصاره‌های مورد استفاده بر روی باسیلوس سوبتیلیس، آسپرژیلوس نایجر و کاندیدا آلبیکنس اثر ضد میکروبی داشتند. عصاره هیدروالکلی دارای بیشترین اثر ضد میکروبی بود ($p < 0/001$). هر چند اثر ضد میکروبی با افزایش غلظت عصاره تشدید گردید اما در مجموع این اثر در حد متوسط ارزیابی گردید.

استنتاج: اثر ضد میکروبی متوسط می‌تواند ناشی از ناکافی بودن مواد مؤثره میوه گیاه باشد. در نتیجه احتمالاً بررسی اثر ضد میکروبی عصاره گیاه و مطالعه اثر ضد میکروبی سایر اندام‌های گیاه ممکن است نتایج ضد میکروبی بهتری را نشان دهد.

واژه‌های کلیدی: ضد میکروبی، عصاره، *Pycnocycla spinosa*

1. Minimal inhibitory concentration

⁺✉ **مؤلف مسئول:** اصفهان- دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده بهداشت
E-mail: Jalali@mui.ac.ir

***متخصص فارماکognوزی، استاد دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

*متخصص میکروبیولوژی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

**متخصص بیوتکنولوژی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

****دکترای داروسازی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

تاریخ تصویب: ۸۶/۴/۲۷

تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۸۵/۱۲/۱۳

تاریخ دریافت: ۸۵/۸/۱

مقدمه

اندام هوایی گیاه سگ دندان خاردار حاوی اسانس، ترکیبات فلاونوئیدی و ساپونین است (۱۲). بررسی فیتوشیمیایی (Phytochemistry) اسانس این گیاه نشان داده است که گیاه حاوی ترکیبات مونوترپن و سزکوئیترین می باشد (۱۳). بررسی های فارماکولوژیکی اثرات ضد اسهال (۱۴)، ضد اسپاسم (۱۲) و قلبی-عروقی (۱۵) را نشان داده است. نظر به این که اغلب میوه گیاهان این خانواده همانند زیره، رازیانه و انیسون در صنایع غذایی و دارویی مورد مصرف دارند و اثرات ضد میکروبی اسانس و عصاره میوه آنها گزارش شده است در این تحقیق اثرات ضد میکروبی عصاره میوه گیاه *Pycnocycla spinosa* بررسی می شود.

مواد و روش ها

عصاره گیری

میوه گیاه سگ دندان خاردار (*Pycnocycla spinosa*) از محوطه دانشگاه اصفهان جمع آوری و توسط بخش زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه اصفهان شناسایی گردید. نمونه هر بار بومی گیاه در دانشکده داروسازی اصفهان موجود است. میوه ها قبل از آسیاب کردن در هوای آزاد و در سایه کاملاً خشک شد تا عمل خرد کردن آنها در آسیاب برقی به راحتی صورت گیرد. مقدار ۲۰۰ گرم از پودر میوه گیاه سگ دندان خاردار به دقت توزین و با اتانول ۹۶ درجه به نسبت ۱ به ۱۰ عصاره گیری انجام شد. جهت آماده سازی پودرها قبل از ریختن درون پرکولاتور (Percolator) ابتدا مطابق روش Samuelsson (۱۳) با حدود ۶۰۰ میلی لیتر خیسانده شدند، سپس توده حاصله برای کامل شدن عمل خیساندن به مدت ۲ ساعت به حال خود گذاشته شد. این

بیماری های عفونی از مهمترین بیماری های شایع در جهان هستند که بار مالی فراوانی را به جوامع بشری تحمیل می نمایند. آنتی بیوتیک های ساختگی (Synthetic) در دهه های گذشته هر چند توانسته اند نقش مهمی را در درمان بیماری های عفونی ایفا نمایند، اما مشکلاتی که در رابطه با بروز مقاومت های میکروبی آنتی بیوتیک ها به وجود آمده باعث گردیده است تا به مصرف هر چه بیشتر داروهای گیاهی گرایش پیدا شود (۳ تا ۱). در صنایع غذایی نیز به علت گرایش منفی مردم در مصرف غذاهایی که در آنها از نگهدارنده های شیمیایی استفاده شده است باعث گردیده که از منابع گیاهی علاوه بر استفاده به عنوان طعم دهنده به عنوان ضد میکروب نیز استفاده نمایند (۴، ۲). استفاده از اسانس ها و عصاره های گیاهی به عنوان جایگزین مواد محافظ ساختگی جای خود را در صنایع غذایی بخوبی پیدا کرده است. لذا به منظور دستیابی به مواد طبیعی ضد میکروبی، غربالگری اسانس ها و عصاره های گیاهی مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است (۵ تا ۸). در همین راستا مطالعات انجام شده نشان داده است که بسیاری از گیاهان خانواده چتریان (Umbelliferae) دارای اثرات ضد میکروبی می باشند (۹، ۱۰). اثر ضد میکروبی عصاره الکلی، اتیل استات و کلروفرم گیاه *Coriandrum osativum* و گیاه *Pimpinella anisum* از خانواده چتریان بر روی میکروارگانیسم های مختلف بررسی شده است (۹) اثر ضد میکروبی گیاه کرفس (*Apium graveolens*) از خانواده چتریان نیز بررسی شده است و گزارش شده است که عصاره الکلی آن دارای MIC برابر ۲ درصد (v/v) برای اشرشیاکلی می باشد (۱۰). گیاه *Pycnocycla spinosa* نیز یکی از گیاهان خانواده چتریان است در مناطق مرکزی ایران رویش دارد (۱۱).

عمل از خشک شدن و ترک برداشتن گیاه در پرکولاتور جلوگیری می‌کند. قبل از ریختن پودرها درون پرکولاتور ابتدا دهانه خروجی آنرا با مقداری پنبه پوشانده، سپس توده گیاهی را به آرامی و به وسیله چند تکان ملایم و با استفاده از میله شیشه‌ای به طور یکنواخت درون پرکولاتور ریخته و به هنگام وارد کردن پودرها، فشار ملایمی به سطح پودرها وارد شد تا فضای خالی ایجاد نشود، روی سطح گیاهان با کاغذ صافی پوشانده شد تا از جابجا شدن پودر گیاهی درون پرکولاتور جلوگیری شود. سپس شیرخروجی پرکولاتور را باز کرده و به آرامی مقداری از حلال باقیمانده درون پرکولاتور ریخته شد. به محض این که اولین قطرات حلال از شیر پرکولاتور شروع به خارج شدن نمود، شیر را بسته و برای ۴۸ ساعت عمل پرکولاسیون (Percolation) در حالی که روی توده گیاهی به طور کامل توسط حلال پوشانده شده بود، ادامه یافت. در طول این مدت عمل تورم تکمیل شده و خیساندن بینابینی صورت می‌گیرد. بعد از پایان این مدت، ضمن ورود منظم بقیه حلال از بالا، عصاره قطره قطره از پرکولاتور خارج شد (۱۳). به منظور تهیه عصاره‌های هگزانی، کلروفرمی و متانولی از روش سوکسله (Soxhlet) استفاده شد. در این روش مقدار ۵۰۰ گرم از پودر گیاه را داخل کاغذ صافی ریخته و در دستگاه سوکسله قرار داده شد. سپس عمل سوکسله به ترتیب با ۵۰۰ میلی لیتر از هر یک از حلال‌های هگزان، کلروفرم و متانول عصاره‌گیری به مدت یک ساعت انجام گرفت. در ادامه عصاره‌های هیدروالکلی، متانولی، کلروفرمی و هگزانی تهیه شده با دستگاه روتاری و در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد تغلیظ و سپس در آون و در همان دما خشک گردید. برای تهیه محلول‌های رقیق مورد نیاز در آزمایشات بررسی اثر ضد میکروبی از عصاره‌های

خشک شده، استفاده شد. به منظور بررسی اثرات ضد میکروبی حلال‌ها در روش دیسک، دیسک‌های حاوی ۲۰ µl از هر یک از حلال‌ها تهیه و بررسی گردید. همچنین در روش تعیین MIC در هر سری آزمایش یک لوله واجد محیط کشت و میکروارگانیزم به همراه حلال مورد آزمایش و فاقد هر گونه عصاره مورد آزمایش قرار گرفت.

روش آزمونهای ضد میکروبی

میکروارگانیزم‌های مورد استفاده در این تحقیق عبارت بودند از: استافیلوکوکوس ارئوس (*Staphylococcus aureus* PTCC 1337)، اشرشیا کلی (*Escherichia coli* PTCC 1338)، لیستریا مونوسیژنوز (*Listeria monocytogenes* RITCC 1397)، تهیه شده از مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی) سودوموناس ائروژینوزا (*Pseudomonas aeruginosa* PTCC 1074)، سالمونلا انتریتیدیس (*Salmonella enteritidis* PTCC 16,24)، باسیلوس سوبتیلیس (*Bacillus subtilis* PTCC 1023)، کاندیدا آلیکنس (*Candida albicans* PTCC 5027) و آسپرژیلوس نایجر (*Aspergillus niger* PTCC 5021). میکروارگانیزم‌های فوق الذکر در دسترس بودند و در عین حال به نمایندگی از باکتری‌های گرم منفی و مثبت انتخاب شدند. در ضمن برخی از آنها بیماری‌زا و برخی دیگر غیر بیماری‌زا بودند. آمپول لیوفلیزه میکرو-ارگانیزم‌های مورد استفاده زیر هود لامینارفلو و در شرایط استریل باز شده و به محیط کشت مایع مولر هیتتون (Merk, Germany) انتقال یافت و سپس به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس از محیط کشت ۲۴ ساعته یک چرخش کامل بر روی محیط‌های مولر و همچنین کشت خطی بر روی پلیت‌های مولر هیتتون آگار (Merk Germany)

انجام داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۵ درجه سانتی‌گراد در گرمخانه قرار داده تا به عنوان منبع باکتری استفاده شود. در مورد آسپرژیلوس نایجر و کاندیدا آلبیکنس از محیط سابراد دکستروز استفاده شده و به مدت ۴۸ ساعت در گرمخانه ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. محیط‌های منبع در یخچال نگهداری و در موارد لزوم مورد استفاده قرار گرفت.

فعالیت ضد میکروبی براساس متد انتشار دیسک (۱۴) و MIC و حداقل غلظت کشندگی ماده ضد میکروبی (MBC)^۱ با استفاده از روش رقت لوله‌ای (۱۵) تعیین گردید. بدین منظور ابتدا از کشت ۲۴ ساعته باکتری سوسپانسیونی در نرمال سالین استریل که در هر میلی لیتر حاوی $10^8 \times 1/5$ (CFU/ml) باکتری بود با استفاده از محلول استاندارد ۰/۵ مک فارلند تهیه شد. از عصاره گیاه مورد نظر حداقل ۹ رقت (۴۸۰ و ۲۴۰ و ۱۲۰ و ۶۰ و ۳۰ و ۱۵ و ۷/۵ و ۳/۷۵ و ۱/۷۸) تهیه و به هر دیسک ۲۰ μ l از رقت مورد نظر اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۵ درجه سانتی‌گراد خشک گردید. سپس به مقدار کافی از محیط مولر هینتون آگار به عنوان لایه اولیه درون پلیت‌های استریل ریخته و اجازه داده شد تا سفت شود. یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون میکروبی کشت یک شبه به ۱۰ میلی‌لیتر کشت آگار مذاب ۴۵-۵۰ درجه سانتی‌گراد اضافه و از آن به عنوان لایه زاینده استفاده گردید (برای باکتری‌ها از محیط کشت مولر هینتون و در مورد قارچ‌ها برای هر دو لایه از محیط کشت سابراد دکستروز استفاده شد). پس از بستن سطح پلیت‌های حاوی میکروارگانیزم مورد نظر، دیسک‌های تهیه شده در فواصل مناسب بر روی لایه زاینده ثابت گردیده و پلیت‌ها برای مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (۱۴). از

دیسک آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد سیپروفلوکساسین، کتوکونازول و آمفوترپسین B به عنوان کنترل استفاده گردید. پس از طی دوره گرما گذاری هاله‌های عدم رشد بررسی و قطر هاله‌های عدم رشد توسط کولیس اندازه‌گیری شد. آزمون‌ها برای هر عصاره و هر میکرو-ارگانیزم حداقل ۳ بار تکرار و میانگین نتایج گزارش و همچنین میزان انحراف معیار محاسبه گردید. تفاوت اثر ضد باکتری عصاره‌های مختلف توسط آزمون آنالیز واریانس آنوا (ANOVA) انجام گردید. برای بررسی آماری تفاوت اثر ضدقارچی عصاره‌ها از آزمون t مستقل استفاده گردید.

به منظور تعیین MIC (۱۵) ابتدا از هر عصاره غلظت ۴۰ mg/ml و برای هر عصاره به ازای هر میکروارگانیزم از یک سری ده تایی لوله‌های آزمایش استفاده شد. هشت لوله برای غلظت‌های مختلف هر عصاره و یک لوله به عنوان کنترل مثبت و یک لوله به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. به هر کدام از لوله‌ها به میزان ۹ میلی لیتر از محیط کشت مولر هینتون مایع همراه با غلظت معینی از عصاره و یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون کشت یک شبه میکروارگانیزم اضافه گردید. بدین ترتیب در لوله شماره یک و هشت غلظت عصاره به ترتیب برابر ۱۰۰۰ μ g/ml و ۷/۸۱ μ g/ml بود. سپس لوله‌ها برای مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از طی زمان انکوباسیون (Incubation) لوله‌ها از نظر کدورت ناشی از رشد میکروارگانیزم بررسی گردیدند (۱۵). از میان لوله‌هایی که در آنها باکتری رشد نکرده بود لوله‌ای که حاوی کمترین غلظت عصاره گیاهی بود به عنوان MIC گزارش گردید. به منظور تعیین حداقل غلظت کشندگی باکتری (MBC) و قارچ (MFC)^۲ یک میلی‌لیتر از

1. Minimum Bactriocidal Concentration

2. Minimum Fungicidal concentration

لوله‌هایی که باکتری در آن رشد نکرده بود با ۱۵ میلی‌لیتر از محیط کشت مولر هینتون، آگار مذاب با درجه حرارت ۴۸ درجه سانتی‌گراد در یک پلیت مخلوط و پس از بسته شدن آگار، در ۳۵ درجه سانتی‌گراد برای ۲۴ ساعت گرماگذاری شد. سپس پلیتی را که حاوی کمترین غلظت عصاره بود و در آن رشد مشاهده نشد به عنوان MBC یا MFC آن عصاره در نظر گرفته شد (۱۵).

یافته ها

نتایج به دست آمده از آزمون‌های انتشار دیسک (جدول شماره ۱ و ۲) نشان داد که هیچ یک از عصاره‌ها حتی با غلظت بالا ($1000 \mu\text{g/ml}$) روی باکتری‌های استافیلوکوکوس آروئوس، لیستریا مونوسیژنوز، سودوموناس آروژنوزا، سالمونلا انتریتیدیس و اشرشیا کلی اثر ضد میکروبی نداشته و هاله عدم رشد تشکیل نشد. تنها باکتری که برضد آن اثر ضد میکروبی مشاهده گردید با سیلوس سوبتیلیس بود. عصاره هیدروالکلی گیاه سگ دندان خاردار با کمترین غلظت ($3/75 \text{ mg/ml}$) قطر هاله‌ای برابر با $1/07 \pm 7/8$ میلی‌متر ایجاد نمود. بالاترین غلظت عصاره (480 mg/ml) قطر هاله‌ای برابر با $15/33 \pm 0/47$ میلی‌متر پدید آورد ($p < 0/001$). عصاره هگزانی گیاه سگ دندان خاردار کمترین اثر ضد میکروبی را داشت و کمترین غلظتی که هاله مهار رشد نشان داد غلظت 240 mg/ml بود که هاله‌ای برابر با $7/63 \pm 0/89$ میلی‌متر پدید آورد. در مجموع اثر ضد میکروبی عصاره هیدروالکلی به طور معنی‌داری ($p < 0/001$) از دیگر عصاره اثر ضد میکروبی قوی‌تری داشت. نتایج میانگین قطر هاله مهار رشد عصاره‌های مختلف گیاه سگ دندان خاردار با غلظت‌های مختلف علیه باسیلوس سوبتیلیس

در جدول شماره ۲ آمده است. عصاره‌های هیدروالکلی و هگزانی گیاه سگ دندان خاردار بر روی هر دو گونه قارچی مورد مطالعه (آسپرژیلوس نایجر و کاندیدا آلیکنس) اثر ضد قارچی نشان داد اما اطراف دیسک‌های حاوی عصاره‌های کلرفرمی و متانولی هاله مهار رشد مشاهده نشد. آسپرژیلوس نایجر حساسیت بیشتری به هر دو نوع عصاره هیدروالکلی و هگزانی نشان داد ($P < 0.5$). کمترین غلظت عصاره هیدروالکلی که این میکرو-ارگانسم به آن حساسیت نشان داد برابر 15 mg/ml بود و قطر هاله مهار رشد برابر $0/66 \pm 7/1$ میلی‌متر ایجاد نمود. این در حالی است که کاندیدا آلیکنس در کمترین غلظتی که حساسیت نشان داد برابر 60 mg/ml بود که قطر هاله‌ای برابر با $6/9 \pm 0/14$ میلی‌متر ایجاد نمود. در خصوص عصاره هگزانی نیز در غلظت‌های برابر با 60 mg/ml ، قطر هاله مهار عدم رشد برای آسپرژیلوس نایجر و کاندیدا آلیکنس به ترتیب برابر با $12/66 \pm 0/94$ و $6/71 \pm 0/24$ میلی‌متر بود. در مجموع تفاوت معنی‌داری بین تاثیر دو نوع عصاره بر قارچ‌ها مشاهده نشد ($p < 0.3$, $p < 0.0016$). نتایج میانگین قطر هاله مهار رشد عصاره‌های هیدروالکلی و هگزانی بر علیه آسپرژیلوس و کاندیدا آلیکنس در جدول شماره ۲ آمده است.

نتایج به دست آمده از آزمون‌های رقت لوله‌ای (جدول شماره ۳) نشان داد که عصاره‌های گیاه مورد مطالعه در محیط مایع نیز روی باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا مونوسیژنوز، سودوموناس آروژنوزا، سالمونلا انتریتیدیس و اشرشیا کلی اثر ضد باکتری نداشتند. همانند نتایج آزمون‌های انتشار دیسک تنها باکتری که به عصاره مورد مطالعه حساسیت نشان داد باسیلوس سوبتیلیس بود. عصاره هگزانی و کلرفرمی بیشترین MIC هر یک برابر

هگزانی برای آسپرژیلوس نایجر به ترتیب برابر ۲۵۰ و ۱۲۵ $\mu\text{g/ml}$ بود. میزان MFC عصاره هیدروالکلی و هگزانی برای کاندیدا آلیکنس به ترتیب برابر ۲۵۰ و ۵۰۰ $\mu\text{g/ml}$ بود. همچنین در این مطالعه مشخص گردید هیچ کدام از حلال‌های به کار رفته جهت تهیه رقت از عصاره خشک برای انجام آزمایشات فعالیت ضد میکروبی واجد خاصیت ضد میکروبی نمی‌باشند.

۲۵۰ $\mu\text{g/ml}$ را داشتند و عصاره‌های متانولی و هیدروالکلی به ترتیب MIC برابر ۲۵۰ و ۶۲/۵ $\mu\text{g/ml}$ داشتند.

و عصاره های متانولی و هیدروالکلی به ترتیب MIC برابر ۲۵۰ و ۶۲/۵ $\mu\text{g/ml}$ داشتند. میزان MBC عصاره‌های هگزانی، هیدروالکلی و متانولی برای باسیلوس سوبتیلیس به ترتیب برابر ۵۰۰، ۵۰۰، و ۲۵۰ $\mu\text{g/ml}$ بود. میزان MFC عصاره هیدروالکلی و

جدول شماره ۱: میانگین $\pm$ انحراف معیار (SD) قطر هاله مهار رشد (mm) عصاره های گیاه *Pycnocycla spinosa* بر علیه باسیلوس سوبتیلیس (سه بار تکرار).

غلظت	۴۸۰	۲۴۰	۱۲۰	۶۰	۳۰	۱۵	۷/۵	۳/۷۵	۱/۷۸
عصاره mg/ml									
هیدروالکلی	۱۵/۳۳ $\pm$ ۰/۴۷	۱۴/۳۳ $\pm$ ۱/۲۴	۱۲ $\pm$ ۰/۸۱	۱۰/۶۶ $\pm$ ۰/۴۷	۱۰/۳۳ $\pm$ ۰/۴۷	۹ $\pm$ ۰/۸۱	۸/۳۳ $\pm$ ۰/۹۴	۷/۸ $\pm$ ۱/۰۷	-
هگزانی	۸/۸ $\pm$ ۰/۶۲	۷/۶۳ $\pm$ ۰/۸۹	-	-	-	-	-	-	-
کلرفرمی	۹/۶ $\pm$ ۰/۴۸	۸/۹ $\pm$ ۰/۲۹	۷ $\pm$ ۰/۴۵	-	-	-	-	-	-
متانولی	۱۳ $\pm$ ۰/۸۲	۱۱ $\pm$ ۰/۸۲	۷/۳۳ $\pm$ ۰/۵	-	-	-	-	-	-
آزمون واریانس	F=۷۳/۴۸	F=۳۳/۳۵	F=۶۳/۴	-	-	-	-	-	-
P Value	P<0.001	P<0.001	P<0.05	-	-	-	-	-	-

(-) عدم مشاهده هاله مهار رشد.

جدول شماره ۲: میانگین $\pm$ انحراف معیار (SD) قطر هاله مهار رشد عصاره های هیدروالکلی و هگزانی گیاه *Pycnocycla spinosa* بر علیه دو گونه قارچ آسپرژیلوس نایجر و کاندیدا آلیکنس

عصاره	غلظت mg/ml	۴۸۰	۲۴۰	۱۲۰	۶۰	۳۰	۱۵	*۷/۵
هیدروالکلی	آسپرژیلوس نایجر	۲۲/۶ $\pm$ ۱/۷۱	۱۹ $\pm$ ۰/۹۴	۱۵ $\pm$ ۲/۴۴	۱۴ $\pm$ ۰/۸۱	۹ $\pm$ ۰/۸۱	۷/۱ $\pm$ ۰/۶۶	-
	کاندیدا آلیکنس	۱۲ $\pm$ ۰/۸۱	۱۰/۶۶ $\pm$ ۰/۹۴	۷/۸ $\pm$ ۰/۲۳	۶/۹ $\pm$ ۰/۱۴	-	-	-
هگزانی	آسپرژیلوس نایجر	۲۴ $\pm$ ۱/۴	۱۹/۹ $\pm$ ۱/۲۴	۱۶/۶ $\pm$ ۱/۲۴	۱۶/۷ $\pm$ ۰/۹۴	۸/۳ $\pm$ ۱/۲۴	-	-
	کاندیدا آلیکنس	۱۰ $\pm$ ۰/۸۱	۹ $\pm$ ۰/۸۱	۷/۸ $\pm$ ۰/۲۳	۶/۷ $\pm$ ۰/۱۴	-	-	-
آزمون t مستقل	کاندیدا آلیکنس	T=۹/۱۵	T=۵/۳۷	T=۱/۱۶	T=۱/۱۵			
		P<0.01	P<0.49	P<0.26	P<0.25			
	آسپرژیلوس نایجر	T=۱/۲	T=۱	T=۱/۰۳	T=۱۰۳/۸			
		P<0.3	P<0.35	P<0.34	P<0.001			

* نتایج غلظت های ۳/۷۵ و ۱/۸۷ mg/ml نیامده است

(-) عدم مشاهده هاله مهار رشد.

جدول شماره ۳: حداقل غلظت مهار کنندگی MIC (Minimum Inhibitory Concentration) عصاره های مختلف میوه گیاه سگ دندان خاردار بر علیه میکروارگانیسم های مختلف

عصاره	غلظت mg/ml	۱۰۰۰	۵۰۰	۲۵۰	۱۲۵	۶۲/۵	۳۱/۲۵	۱۵/۶۲	۷/۸۱	کنترل منفی *	کنترل مثبت **
میکروارگانیسم											
هیدروالکلی	آسپرژیلوس نایجر	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+
	کاندیدا آلیکس	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+
	باسیلوس سوبتیلیس	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+
هگزانی	آسپرژیلوس نایجر	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+
	کاندیدا آلیکس	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+
	باسیلوس سوبتیلیس	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+
کلرفرمی	آسپرژیلوس نایجر	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	کاندیدا آلیکس	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	باسیلوس سوبتیلیس	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+
متانولی	آسپرژیلوس نایجر	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	کاندیدا آلیکس	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	باسیلوس سوبتیلیس	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+

(-) مشاهده عدم رشد میکروارگانیسم
(+) مشاهده رشد میکروارگانیسم
* محیط کشت + عصاره
** محیط کشت + سوسپانسیون میکروبی

بحث

میکروارگانیسم ها نقش مهمی را در ایجاد بیماری های انسان ایفا می کنند. مرگ و میر فراوان ناشی از این عوامل، همواره بشر را بر آن داشته است تا به فکر راه های مقابله با میکروارگانیسم ها برآید. مواد شیمیایی استخراجی از گیاهان به عنوان ترکیبات ضد میکروبی جایگزین داروهای سنتتیک مطرح شده اند زیرا دارای عوارض جانبی کمتری هستند. در کشور ما نیز اهمیت تحقیق و مطالعه روی گیاهان دارویی مشخص گردیده است (۱۶). در مطالعات فضلی بزاز و حریرزاده (۹)، اثرات ضد میکروبی از اندام هوایی گیاه سگ دندان خالداری (*Pycnocycla spinosa*) مشاهده نگردید. لذا در مطالعه حاضر اثرات ضد میکروبی عصاره میوه این گیاه بر روی هشت میکروارگانیسم بیماری زای انسانی بررسی گردید. اثرات ضد میکروبی عصاره میوه گیاه سگ دندان خاردار با استفاده از دو روش انتشار دیسک و رقت

لوله ای بررسی شد (۱۵، ۱۴). از هشت میکروارگانیسم مطالعه شده عصاره ها بر روی یک گونه باکتری (باسیلوس سوبتیلیس) و دو گونه قارچی (آسپرژیلوس و کاندیدا) اثر داشت. میانگین قطر هاله عدم رشد مربوط به عصاره ها (جدول شماره ۱ و ۲) نشان می دهد که اغلب هر چه از غلظت عصاره کاسته می شود از قطر هاله عدم رشد نیز کاسته می شود. براساس مطالعه سیمانگا (Cimanga) و همکارانش (۱۷) در صورتی که قطر هاله عدم رشد برابر یا بیشتر از ۱۵ میلی متر باشد فعالیت بسیار، قطر هاله عدم رشد بین ۱۰-۱۵ میلی متر نشان دهنده فعالیت متوسط و قطر هاله عدم رشد کمتر از ۱۰ میلی متر نشان دهنده غیر فعال بودن عصاره است. از مجموع عصاره های مورد مطالعه بر علیه باسیلوس سوبتیلیس، اثر ضد میکروبی عصاره هیدروالکلی از بسیار فعال تا متوسط ارزیابی شد. عصاره متانولی فعالیت متوسط بر روی باکتری مورد

اشاره داشت و عصاره‌های دیگر غیرفعال بودند. در مورد قارچ‌های مورد مطالعه عصاره هیدروالکلی و هگزانی بر علیه کاندیدا آلیکنس فعالیت متوسط از خود نشان دادند. عصاره‌های دیگر اثری بر روی کاندیدا نداشتند. آسپرژیلوس نایجر حساسیت بیشتری از خود نشان داد، به طوری که عصاره‌های هیدروالکلی و هگزانی بر علیه آسپرژیلوس به ترتیب اثر ضد میکروبی بسیار فعال و متوسط داشتند. عصاره‌های دیگر اثری بر روی آسپرژیلوس نشان ندادند. در بررسی فضلی بزاز و حریرزاده (۹)، عصاره اندام هوایی گیاه اثر ضد میکروبی از خود نشان نداد. مطالعه حاضر نشان می‌دهد که احتمالاً نوع و میزان عوامل ضد میکروبی در میوه گیاه در مقایسه با اندام هوایی متفاوت است.

عوامل متعددی در اثرات ضد میکروبی یک گیاه موثر هستند. عواملی چون میزان اسانس گیاه، روش عصاره‌گیری و نوع حلال مورد استفاده، نوع محیط کشت و مواد موجود در آن و غلظت عصاره می‌تواند بر اثرات ضد میکروبی گیاه اثر بگذارد (۲۰ تا ۲۸). سینگ (Singh) و همکاران (۱۸) اثرات آنتی باکتریال آویشن و میخک را بر علیه باکتری لیستریا نشان دادند در حالی که در مطالعه چهارمحالی و همکاران (۲۱) عصاره هیدروالکلی گیاه آویشن هیچ اثری بر ضد لیستریا نشان نداد. در مطالعه مشابهی فارسی و همکاران (۲۲) نشان دادند که اسانس گیاه خوشاریزه اثرات ضد میکروبی خوبی دارد در حالی که عصاره هیدروالکلی خوشاریزه هیچ اثر ضد میکروبی نداشت. براساس نتایج مطالعات انجام شده در ایران، ترکیه و تونس (۸ تا ۵) بر روی اثرات ضد میکروبی اسانس‌های برخی از اعضای خانواده چتریان این اثر تایید گردیده است. عدم مشاهده اثرات ضد میکروبی بسیار خوب و متفاوت از عصاره‌های گوناگون گیاه سگ‌دندان خاردار احتمالاً به دلیل تفاوت در میزان اسانس موجود در عصاره است.

عامل دیگری که ممکن است اثرات ضد میکروبی عصاره یک گیاه را تحت تأثیر قرار دهد، روش عصاره‌گیری و نوع حلال مورد استفاده می‌باشد (۲۳). عصاره‌هایی که باروش‌ها و حلال‌های متفاوت از یک گیاه استخراج می‌شوند، می‌توانند اثرات ضد میکروبی متفاوتی بر روی گونه‌های خاص میکروارگانیسم‌ها از خود نشان دهند (۲۳). ابراهیم و عثمان (۲۴) نشان دادند که عصاره اتانولی برگ‌های گیاه *Cassia alata* اثر ضد قارچی بر علیه چهارگونه قارچی دارد، اما بر روی مخمرها و گونه‌های باکتریایی بی‌تأثیر است. اما اثرات ضد باکتریایی عصاره متانولی این گیاه توسط خان (Khan) و همکارانش (۲۵) ثابت گردید. در مطالعات دیگری نیز محققین به تفاوت اثر عصاره‌های مختلف مهر تایید زده‌اند. به عنوان مثال پنا (Penna) و همکاران (۲۶) گزارش کرده‌اند که تنها عصاره کلروفرمی گیاه *Myrcianthes cislantensis* بر روی باسیلوس سوبتیلیس اثر مهارکننده دارد و عصاره‌های هیدروالکلی، متانولی و آبی بی‌اثر است.

در مطالعه حاضر نیز اثرات متفاوتی از عصاره‌های مختلف مشاهده گردید. عصاره‌های کلروفرمی و متانولی میوه گیاه سگ‌دندان خاردار برخلاف عصاره‌های هیدروالکلی و هگزانی تأثیری بر روی آسپرژیلوس و کاندیدا نداشت. نظر به این که اثرات ضد میکروبی در عصاره هگزانی که غیر قطبی می‌باشد مشاهده شده است و عصاره نیمه قطبی کلروفرمی و قطبی متانول فاقد اثرات ضد میکروبی بوده‌اند می‌توان نتیجه گرفت که ترکیبات واجد اثر ضد میکروبی میوه گیاه ترکیبات غیر قطبی می‌باشند. همانند مطالعه حاضر دیگر محققین نیز به حساسیت‌های متفاوت گونه‌های باکتریایی و قارچی بر علیه ماده ضد میکروبی مشابه اشاره کرده‌اند (۲۶). احتمالاً تفاوت حساسیت میکروارگانیسم‌های گوناگون به مواد

گیاه را فراهم آورد. هر چند اثرات ضد میکروبی عصاره‌های میوه گیاه سگ دندان خاردار در مجموع متوسط ارزیابی گردید اما مشخص نمود که در گام‌های بعدی باید به مطالعه اثرات ضد میکروبی اندام‌های دیگر گیاه پرداخت. با توجه به غلظت بیشتر ماده مؤثره در اسانس گیاه به احتمال بسیار قوی مطالعه اثرات ضد میکروبی اسانس گیاه اثرات ضد میکروبی بهتری را نشان خواهد داد.

سپاسگزاری

از جناب آقای دکتر سیدمحسن حسینی استادیار محترم گروه آمار و اپیدمیولوژی جهت انجام محاسبات آماری و خانم شهین شفیع زادگان کارشناس آزمایشگاه کنترل میکروبی دانشکده داروسازی تقدیر و تشکر می‌گردد.

ضدمیکروبی به علت ساختار متفاوت میکروارگانیسم‌ها می‌باشد.

غلظت‌های متفاوت عصاره نیز در تأثیر اثر ضد میکروبی مؤثر است و در مطالعات متعددی (۲۸،۲۷) با تغییر میزان غلظت عصاره، اثرات ضدمیکروبی گیاه تغییر کرده است. محیط کشت‌های مورد استفاده در آزمون‌های ضدمیکروبی نیز تأثیر به سزایی در خواص ضد میکروبی عصاره‌ها دارد. استفاده از اندام‌های مختلف گیاه نیز در اثر ضد میکروبی عصاره تأثیر دارد. کودی (Kudi) و همکاران (۲۹) بخوبی اثرات متفاوت ضد میکروبی پوست و برگ برخی از گیاهان را نشان داده‌اند.

در مطالعه حاضر اثر ضد میکروبی میوه گیاه سگ دندان خاردار به عنوان یکی دیگر از اعضای خانواده چتریان بررسی گردید تا در تکمیل یافته‌های فارماکولوژیکی بتوان اطلاعات کامل‌تری از خواص

فهرست منابع

1. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 1999; 12(4): 564-582.
2. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *Int. J. Food. Microbiol.* 2004; 94: 223-253.
3. Ayfer D, Turgay O. Antimicrobial activities of various medicinal and commercial plant extracts. *Turk. J. Biol. Vol.* 2003; 27: 157-162.
4. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl. Microbiol.* 1996; 86: 985-990.
5. Sonboli A, Azzizin D, Yousefzadi M, Kanani, Mehrabian AR. Volatile constituents and antimicrobial activity of *Tetrataenium lasiopetalum* (Apiaceae) from Iran. *Flavour. Frag. J.* 2007; 22: 119-122.
6. Abdelwahed A, Hayder N, Kilani S, Mahmoud A, Chibani J, Hammami M, et al. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from Tunisian *Pituranthos toruosus* (Coss). Maire. *Flavour. Frag. J.* 2006; 21: 120-133.
7. Erdurak CS, Coskun M, Demirci B, Baser KHC. Composition of the essential

- oil of fruits and roots of *Ferulago isaurica* Pesmen and *F. syriaca* Boiss. (Umbelliferae) from Turkey. *Flavour. Frag. J.* 2006; 21: 118-121.
8. Kurkcuoglu M, Husnu KCB, Iscan G, Malyer H, Kaynak G. Composition and anticandidal activity of essential oil of *Chaerophyllum byzantinum* Boiss. *Flavour. Frag. J.* 2006; 21: 115-117.
 9. Fazly Bazzaz BS, Harirzadeh G. Screening of Iranian plants for antimicrobial activity. *Pharmaceutical Biology.* 2003; 41: 573-583.
 10. Sadraei H, Asghar G, Hekmatti AA. Antispasmodic effect of three fractions of hydroalcoholic extract of *Pycnocyclus spinosa*. *J. Ethnopharmacology.* 2003; 86: 187-190.
 11. Asghari G, Houshfar G, Mahmudi Z. Composition of the essential oil of *Pycnocyclus spinosa* Decne. *ExBoiss from Isfahan, Daru.* 2001; 9: 28-29.
 12. Ahmadi L, Mirza M. Volatile constituents of the essential oil of *Pyconcyclus spinosa* from Iran. *J. Essent. Oil. Res.* 1998; 10: 197-198.
 13. Samuelsson G. Drugs of Natural Origin, A Textbook of pharmacognosy. 4th ed. Sweedish Pharmaceutical press, Stockholm: 1999; 48-49.
 14. Mangena TO, Muyima N Y O, Comparative evaluation of the antimicrobial activities of essential oils of *Artemisia afra*, *Pteronia incana* and *Rosmarinus* on selected bacteria and yeast strains. *Lett Appl Microbiol.* 1999; 28(4): 291-296.
 15. Vanden DA, Vlietinck A J, In: Dey P M, Harborne J B. (Eds.), *Methods in plant biochemistry: Screening medthods for antibacterial and antiviral agents from higher plants.* Academic press, London. 1991; 47-69.
 16. موسوی، ک. م. ر. داروشناسی و درمان. چاپ سوم. انتشارات سپهر تهران، ۸، ۱۳۶۰.
 17. Cimanga K, Kambu K, Tona I, Apers S, De Bruyne T, Hermans N, et al. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *J. Ethnopharmacol.* 2002; 79: 213-220.
 18. Singh A, Singh RK, Bhunia AK, Singh N. Efficacy of plant essential oils as antimicrobial agents against, *Listeria monocytogenes* in hotdogs. *Lebensmittel wissenschaft uan Technologic.* 2003; 36(8): 787-799.
 19. Cosentino S, Tuberoso CLG, Pisano B, Satta M, Mascia V, Araedi E, Planas F. Invitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian thymus essential oils. *Lett Appl Microbiol.* 1999; 29: 130-135.
 20. Rasodi I, Mirmostafa SA. Bacterial susceptibility to and chemical composition

- of Thymus persicu. *J. Agric.Food. Chem.* 2003; 51(8): 2200-5.
- چهار محالی ا. بررسی اثرات ضد میکروبی
عصاره هیدروالکلی تعدادی از گیاهان علیه
Listeria monocytogenes پایان نامه دکترای
عمومی داروسازی. دانشکده داروسازی. دانشگاه
علوم پزشکی اصفهان، ۱۳۸۳.
- فارسی س. بررسی اثر ضد میکروبی گیاه خوشاریزه
پایان نامه دکترای عمومی داروسازی، دانشکده
داروسازی، و علوم دارویی دانشگاه علوم پزشکی
اصفهان، ۱۳۸۴.
23. Nostro A, Gernano MP, Angelo VA, Marino A, Cannatelli MA. Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Lett Appl Microbiol.* 2000; 30: 379-384.
24. Ibrahim D, Osman H. Antimicrobial activity of Cassia alata from Malaysia. *J Ethnopharmacol.* 1995; 45(3): 151-156.
25. Khan MR, Kihara M, Omoloso AD. Antimicrobial activity of Cassia alata. *Fitoterapia.* 2001; 75(2): 561-564.
26. Penna C, Marino S, Viro E, Cruanes MC, Munoz J, Cruanes J, et al. Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases. Isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*. *J Ethnopharmacol.* 2001; 77: 37-40.
27. Kartal M, Yildiz S, Kaya S, Kurucu S, Topcu G. Antimicrobial activity of propolis samples from two different regions of Anatolia. *J Ethnopharmacol.* 2003; 86: 69-73.
28. Baydar H, Sagdic O, Ozkan G, Karadogan T. Antibacterial activity and composition of essential oils from *origanum*, *thymbra* and *satureja* species with commercial importarr4e in Turkey. *Food Control.* 2003.
29. Kudi AC, Umoh JU, Eduvio LO, Gefu J. Screening of some Nigerian medicinal plants for antibacterial activity. *J Ethnopharmacol.* 1999; 67: 225-228.