ORIGINAL ARTICLE

Extraction and Identification of Urtica dioica L Extract and Its Antibacterial and Antifungal Properties

Pezhman Moradi[1,]
Kumarss Amini[2]

[1] Assistant Professor, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University, Saveh Branch, Saveh, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Saveh Branch, Saveh, Iran

(Received december 25, 2016 Accepted may 22, 2017)

Abstract

Background and purpose: Medicinal plants have gained much interest in today's world because they have fewer adverse effects compared to chemical drugs. *Urtica dioica L* could be used in treatment of some chronic diseases. This study aimed at investigating its treatment properties in vitro.

Materials and methods: Different parts of the plant were collected and the extract was prepared using maceration and percolation. The antibacterial effects of the plant were identified using disk diffusion method. The MIC and MBC values were determined using dilution method against *Listeria Monocytogenes* (PTCC 1294), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Proteus vulgaris* (ATCC 13315), *Kellebsiella pneumoniae* (PTCC 1053), and *Candida albicans* (ATCC 10231). The major components in the extract were identified by Gas Chromatography (GC). The extract consisted of 20 different combinations, including Neophytadiene (21.25%), Phthaleic acid (15.8%), phthalate Dibutyl (37.7%), maleate Bis (2-ethyl hexyl 32.6%), and 1,2 - Benzenedicarboxylic acid (62.7%). The amount of these compounds were higher in leaves.

Results: The aqueous extract obtained from different organs of *Urtica dioica L* was found to have more antibacterial effect (the leaf and root at dilution of 5 mg /ml) compared to those of the alcoholic extract. In different dilutions, it also exhibited more antifungal effect on *Candida albicans*.

Conclusion: According to this study, *Urtica dioica* has antibacterial and antifungal properties, therefore, it could be used against a broad spectrum of microorganisms.

Keywords: disk diffusion, gas chromatography, *Urtica dioica* L, medicinal plants, maceration

J Mazandaran Univ Med Sci 2017; 27 (151): 74- 85 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و هفتم شماره 151 مرداد سال 1396 (85 -74)

استخراج و شناسایی عصاره اندام های مختلف گیاه گزنه دو پایه *Urtica dioica* L و بررسی اثرات ضد باکتریایی و ضدقارچی آن

پژمان مرادی[1]
کیومرث امینی[2]

چکیده

سابقه و هدف: گیاهان دارویی به‌دلیل نداشتن عوارض داروهای شیمیایی، امروزه در جهان مورد توجه است. گیاه گزنه دو پایه *Urtica dioica* L دارای خاصیت درمانی در معالجه بیماری‌های مزمن می‌باشد. این مطالعه به منظور تعیین خاصیت درمانی در شرایط برون‌تنی انجام شد.

مواد و روش‌ها: پس از جمع‌آوری قسمت‌های مختلف گیاه گزنه به روش ماسیراسیون و پرکولاسیون، عصاره‌ها تهیه شد. اثرات ضد باکتریایی این گیاه با استفاده از روش دیسک دیفیوژن (کربی-بائر) انجام و مقایسه گردید. تعیین MIC و MBC با استفاده از روش رقت لوله‌ای (ماکرودایلوشن) با باکتری‌های *Listeria Monocytogenes* (PTCC 1294) و *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) و *Proteus vulgaris* (Atcc 13315) و *Kellebsiella pneumoniae* (PTCC 1053) و مخمر *Candida albicans* (ATCC 10231) مورد بررسی قرار گرفت. شناسایی اجزای اصلی موجود در عصاره اندام‌های مختلف گیاه به وسیله دستگاه گاز کروماتوگراف (GC) انجام شد. ترکیب‌های شناسایی شده در اسانس شامل 20 نوع بوده که مهم‌ترین آن‌ها شامل 5 ترکیب (25/21 درصد) Neophytadiene و (8/15 درصد) Phtaleic acid و (7/37 درصد) Dibutyl phtaleate و (6/32 درصد) Bis(2-ethyl hexyl) maleate و (7/62 درصد) 1,2 - benzenedi carboxylic acid می‌باشد که مقدار این ترکیبات در برگ نسبت به سایر اندام‌ها دارای بیش‌ترین مقدار بوده است.

یافته‌ها: عصاره‌های آبی بخش‌های مختلف گیاه نسبت به عصاره‌های الکلی دارای بیش‌ترین اثر ضد باکتریایی بوده است. با توجه به این که عصاره آبی اندام‌های برگ و ریشه در رقت 0/5 mg/ml بهترین اثر آنتی‌باکتریایی را داشته‌اند. عصاره آبی برگ گزنه در رقت‌های مختلف اثر ضد قارچی مناسب‌تری بر روی قارچ *Candida albicans* از خود نشان داد.

استنتاج: با توجه به آزمایشات انجام شده، گیاه گزنه دو پایه *Urtica dioica* دارای خواص ضد باکتریایی و ضد قارچی می‌باشد و از این حیث می‌تواند علیه طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها اثر داشته باشد.

واژه های کلیدی: دیسک دیفیوژن، کروماتوگرافی گازی، گزنه دو پایه (*Urtica dioica* L)، گیاهان دارویی، ماسیراسیون

مقدمه

استفاده از گیاهان در درمان بیماری‌ها، به ویژه بیماری‌های عفونی در سال‌های اخیر روند رو به رشدی پیدا کرده است. استفاده بی‌رویه از داروهای شیمیایی جهت درمان بیماری‌های عفونی، منجر به ظهور ایزوله‌های

مولف مسئول: کیومرث امینی - ساوه: دانشگاه آزاد اسلامی ساوه، گروه میکروبیولوژی Email: dr_kumarss_amini@yahoo.com
1. استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران.
2. استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران.
تاریخ دریافت: 1395/10/5 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1395/10/7 تاریخ تصویب: 1396/3/1

مقاوم میکروبی گردیده که هر روزه بر تعداد آن‌ها افزوده می‌گردد(1، 2). گیاهان و ترکیب‌های آن‌ها شامل عصاره‌های گیاهی دارای توان بالقوه جهت جایگزینی با داروهای شیمیایی هستند(3). این در حالی است که عوارض جانبی این ترکیب‌ها در مقایسه با داروهای شیمیایی کم‌تر است(4). از جمله گیاهان بومی ایران می‌توان گزنه دو پایه را نام برد. Urtica یکی از جنس‌های مهم است که دارای 30 گونه بوده و گزنه *Urtica dioica* در این جزء قرار دارد. گزنه دو پایه بومی مناطق معتدل اروپا و آسیا می‌باشد. گیاهی است عموماً علفی و در نقاط مرطوب و نواحی سایه‌دار به حالت خودرو می‌روید. گزنه دو پایه از جمله گیاهان با خواص دارویی بوده و صدها سال است که در طب سنتی جهان جهت معالجه بیماری‌هایی نظیر اگزما، ناراحتی‌های دستگاه گوارش و تناسلی، دردهای مفاصل و نیز درمان کم‌خونی از عصاره آن استفاده می‌شود(4). نتایج پژوهش‌ها نشان داده است که عصاره گیاه گزنه دارای خاصیت ضد باکتریایی است و به میزان چند برابر بیش‌تر از باکتری‌کش‌های شیمیایی از توان کنترل باکتری‌های گرم مثبت و منفی برخوردار می‌باشد(5). امروزه یکی از روش‌های کنترل میکروارگانیسم‌های بیماریزا، استفاده از نگهدارنده‌های شیمیایی ساخت بشر در غذا است. اما همواره استفاده از این گونه مواد شیمیایی در غذا سبب نگرانی مردم شده است. زیرا اعتقاد عمومی مردم آن است که مواد شیمیایی ضد میکروبی ممکن است سلامتی آن‌ها را تهدید نماید. به همین دلیل استفاده از مواد طبیعی به جای مواد شیمیایی از اهمیت خاصی برخوردار است. بدون شک استفاده از عصاره گیاهان می‌تواند جایگزین مناسبی باشد. اثرات ضد باکتریایی عصاره‌های گزنه توسط برخی محققین بررسی شده است(6). در بین عوامل میکروبی، باکتری‌های عامل مسمومیت مواد غذایی (Food Bone Bacterial Intoxications) مطرح هستند که با تولید سم در ماده غذایی باعث بروز مسمومیت می‌گردند و گروه دوم تحت عنوان باکتری‌های عامل عفونت مواد غذایی (Food Borne Bacterial Infections) مطرح بوده که با تکثیر خود و یا تولید متابولیت‌های خاص باعث بروز عفونت می‌گردند. با توجه به این‌که اکثر موارد عفونت‌ها و مسمومیت‌های میکروبی توسط باکتری‌ها انجام می‌گیرد، تشخیص و جداسازی آن‌ها حائز اهمیت فراوانی است(7). *استافیلوکوکوس اورئوس* یکی از اصلی‌ترین باکتری‌های بیماریزای انسانی است که مسئول بسیاری از مسمومیت‌های غذایی در جهان می‌باشد. این باکتری دارای ژن‌های کدکننده فاکتورهای بیماریزایی است که برخی از این ژن‌ها روی کروموزوم و برخی به صورت عناصر ژنتیکی متحرک هستند. برخی از این فاکتورها عبارتند از: پپتیدوگلیکان، لیپوتیکوئیک اسید، همولیزین‌ها و انتروتوکسین. انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی فاکتور اصلی ایجاد مسمومیت غذایی می‌باشد(7). اغلب سویه‌های باکتری کلبسیلا می‌تواند کپسول تولید کنند و معمولاً فلور میکروبی دستگاه تنفس و گوارشی انسان را تشکیل می‌دهند و عامل ذات الریه باکتریایی در انسان می‌باشد(8). باکتری لیستریا، باکتری گرم مثبت و غیر اسپورزایی است که نوعی حرکت لغزشی دارند. *L.monocytogenes* در شیوع بیماری ناشی از مصرف مواد غذایی شرکت می‌کند(9). پروتئوس‌ها عامل فساد انواع گوشت، فراورده‌های دریایی و تخم ماکیان است و در مواد غذایی خارج از یخچال به مقدار زیادی یافت می‌شوند. در نتیجه این احتمال وجود دارد که عامل مسمومیت غذایی باشند(10).

بیش‌ترین خطر کاندیدا آلبیکنس از نظر پاتوژن بودن، در نفوذ آن به درون جریان خون است. در صورت داخل شدن کاندیدا به درون جریان خون بیماران، به ویژه بیماران بستری در بیمارستان، انتظار بیماری‌های سیستمیک هم‌چون اندوکاردیت، دمل، ترومبوفلبیت و انواع عفونت‌های چشمی وجود خواهد داشت(11).

در این پژوهش، اثرات ضد باکتریایی عصاره‌های آبی و الکلی اندام‌های مختلف ریشه، ساقه و برگ گیاه گزنه دو پایه بر روی باکتری‌های گرم مثبت *S.aureus* و *L.monocytogenes* و باکتری‌های گرم منفی *K.Pneumoniae* و *P.Vulgaris* و اثرات ضدقارچی *Candida albicans* مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

شناسایی و جمع‌آوری گیاه

در این مطالعه توصیفی، بعد از شناسایی گیاه گزنه دو پایه، جمع‌آوری آن از منطقه دو هزار شهرستان تنکابن واقع در استان مازندران (ایران) در ارتفاع 1800 متر از سطح دریا در تابستان سال 2011 انجام شد. سپس در هرباریوم دانشگاه آزاد واحد ساوه مورد تایید قرار گرفت. اندام‌های مورد مطالعه (ریشه، ساقه و برگ) در شرایط مناسب (تاریک و خشک) نگهداری و به طور کامل خشک و جهت عصاره گیری آسیاب شدند(12).

آماده سازی عصاره آبی

در تهیه عصاره آبی از آب مقطر استریل استفاده گردید. جهت تهیه عصاره آبی 50 گرم از پودر گیاه خشک اندام‌های ریشه، ساقه و برگ را به طور جداگانه وزن کرده و مقدار 500 میلی لیتر آب مقطر که به دمای 70 تا 80 درجه سانتی‌گراد رسید، به ارلن محتوی پودر اضافه گردید. سپس دهانه ارلن بسته شده و داخل بن ماری 60 درجه سانتی گراد قرار داده شد و پس از مدت 24 ساعت، مخلوط داخل ارلن را فشرده و عصاره به‌دست آمده توسط کاغذ صافی و قیف بوخنر صاف شدند(13).

آماده سازی عصاره اتانولی

در این پژوهش از اتانول 70 درجه به روش پرکولاسیون استفاده شد، بدین ترتیب که 50 گرم از پودر قسمت‌های مختلف گیاه را جداگانه وزن کرده و داخل دکانتور ریخته سپس مرحله به مرحله به آن اتانول 70 درجه اضافه گردید. افزودن اتانول تا جایی ادامه یافت که تمام حجم گیاه داخل دکانتور خیس شده و مقداری اتانول هم بر روی سطح نمونه قرار گرفت. پس از گذشت 72 ساعت عصاره‌گیری، عمل جداسازی حلال از عصاره توسط دستگاه روتاری با کمک پمپ خلاء انجام شد(13).

رقیق‌سازی عصاره گیاه و تهیه دیسک‌های حاوی عصاره

هر یک از عصاره‌های آبی و اتانولی به ترتیب با آب مقطر استریل و DMSO (دی متیل سولفوکساید) رقیق شده و غلظت‌های 0/625، 0/125، 0/25، 0/5 mg/ml از عصاره‌ها تهیه شد. جهت تهیه دیسک‌های حاوی عصاره از دیسک‌های بلانک استفاده شد. بدین‌ترتیب که دیسک‌های بلانک با مقدار 30 میکرولیتر از غلظت‌های مختلف عصاره به کمک سمپلر تلقیح شدند. بعد از مدت 3 تا 5 دقیقه پس از جذب کامل، دیسک‌ها را در دمای 37 درجه سانتی‌گراد قرار داده تا کاملا خشک شده و جهت دیسک‌گذاری آماده شوند(14).

بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره‌ها

تهیه سوش‌های باکتریایی و قارچی

سویه‌های مورد نظر باکتری‌ها و قارچ مورد نظر *Listeria Monocytogenes* (PTCC 1294) و *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) و *Proteus vulgaris* (Atcc 13315) و *Kellebsiella pneumoniae* (PTCC 1053) و مخمر *Candida albicans* (ATCC 10231) از مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه و بعد از کشت در محیط‌های اختصاصی سوسپانسیون از سویه‌های مورد نظر تهیه شد.

روش تهیه سوسپانسیون و بررسی اثر ضدباکتریایی عصاره‌ها

ابتدا از سویه‌های باکتریایی سوسپانسیون میکروبی معادل 0/5 مک فارلند ($1.5x10^8$ cfu/ml) تهیه شد و سپس با 100 میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه شده بر سطح محیط مولر هینتون آگار کشت یکنواخت انجام شد. سپس دیسک‌های بلانک استریل، حاوی رقت‌های مختلف عصاره، با فاصله معین از یکدیگر بر روی سطح محیط کشت آگار کاشته شدند. پلیت‌ها به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه شده و نتایج اثر ضدباکتریایی با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک‌ها ثبت شد. جهت حصول اطمینان این آزمایش برای هر سویه باکتری 3 بار تکرار شد. میانگین قطر هاله عدم رشد در سه بار تکرار به عنوان قطر نهایی ثبت شد(15). قطر هاله عدم رشد کم‌تر از 8 میلی‌متر به عنوان مقاوم و 8 تا 9 میلی متر نسبتا مقاوم، بیش‌تر از 10 تا 12 میلی‌متر نسبتا حساس و بیش‌تر از 12 میلی‌متر به عنوان حساس در نظر گرفته شد(14).

روش تعیین حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد باکتری و کاندیدا آلبیکنس (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)

با استفاده از روش رقت لوله‌ای (ماکرودایلوشن) حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی ماده ضد میکروبی (MBC) تعیین گردد(16). جهت تعیین MIC، برای هر عصاره از یک سری 10 تایی از لوله‌های آزمایش استفاده شد. 8 لوله برای آزمایش رقت‌های مختلف هر عصاره و یک لوله به عنوان کنترل مثبت و یک لوله به عنوان کنترل منفی به کار رفت. هر عصاره با رقت‌های مختلف از لوله شماره یک با غلظت gr/ml 1 تا لوله شماره 8 باغلظت gr/ml $\frac{1}{128}$ در 1 میلی‌لیتر محیط کشت نوترینت براث به همراه 1 میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتریایی که دارای cfu/ml $1.5x10^8$ باکتری بود، تهیه شد. یک لوله حاوی 1 میلی‌لیتر محیط کشت به علاوه 1 میلی‌لیتر از عصاره رقیق شده به عنوان کنترل مثبت و یک لوله حاوی 1 میلی‌لیتر محیط کشت به علاوه 1 میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری به عنوان کنترل منفی تهیه شد. همه لوله‌های آزمایش برای مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از طی زمان انکوباسیون، لوله‌ها از نظر کدورت ناشی از رشد باکتری تلقیح شده مورد بررسی قرار گرفتند. جهت تعیین حداقل غلظت کشندگی عصاره‌ها (MBC) از لوله‌هایی که کدورت باکتریایی مشاهده نشد، با استفاده از سوآپ استریل بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شدند، نمونه‌ها داخل انکوباتور به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی گراد قرار گرفتند و سپس با مشاهده عدم رشد باکتری (MBC) گزارش گردید(17).

تست آنتی‌بیوگرام با آنتی بیوتیک‌های تجاری

آنتی‌بیوگرام به روش کربی بائر به وسیله دیسک آنتی‌بیوگرام Ampicillin (10mg)،Ceftizoxim(30mg)، Clindomycin(2mg)، Amikacin(30 mg)، Gentamycin(10mg) محصول شرکت پادتن طب بر روی باکتری‌های مذکور صورت گرفت.

اسانس‌گیری جهت تزریق به دستگاه GC

پس از خشک کردن گیاه و خرد کردن آن به قطعات کوچک، هر اندام به طور جداگانه به روش تقطیر با آب به مدت 6 ساعت با دستگاه کلونجر (Celvengerapparatus) اسانس‌گیری به‌عمل آمده و پس از جداسازی اسانس از سطح آب، توسط سولفات سدیم آب‌گیری و در شیشه‌های تیره و در بسته نگهداری شد. مقدار 3/4 میلی‌لیتر اسانس به ازای هر 100 گرم وزن خشک گیاه حاصل شد.

شناسایی اجزاء اسانس‌ها

نظر به‌این که در مراجع، اجزاء اسانس گیاه به وسیله GC/MS شناسایی شده بود(3)، در این تحقیق، اجزای عمده اسانس با استفاده از دستگاه GC جداسازی و با

روش نرمالیزاسیون، درصد آن‌ها مشخص گردید. آنالیز اسانس با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگراف، الگوی Varian cp-3800 طبق شرایط زیر انجام شد. ستون مورد استفاده CP sil 8CB به طول 60 متر و قطر 0/32 میلی‌متر، ضخامت لایه فاز ساکن 0/25 میکرومتر، گاز حامل نیتروژن و فشار سر ستون Psi 7 بود. برنامه‌ریزی حرارتی عبارت بود از 50-230°C با افزایش 3°C در دقیقه، درجه حرارت محفظه تزریق °C 117 در دمای ترانسفرلاین °C 250 تعیین شد. سپس 1 میلی‌لیتر از اسانس گیاه گزنه (ریشه، ساقه و برگ) به طور جداگانه در 3 تزریق انجام شد و درصد نسبی اجزای اصلی اسانس با استفاده از مواد استاندارد و در مقایسه زمان بازداری شناسایی گردید.

آنالیزهای آماری

اطلاعات جمع‌آوری شده به صورت طرح کامل تصادفی در 3 تکرار با استفاده از نرم افزار کامپیتری SPSS تجزیه و تحلیل شدند و مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن در سطح احتمال 5 درصد و 1 درصد انجام و نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel رسم گردید.

یافته ها

در این مطالعه عصاره‌های آبی و الکلی استخراج شده از اندام‌های مختلف ریشه ساقه و برگ گیاه *Urtica dioica* L با رقت‌های 0/625 mg/ml، 0/125، 0/25و 0/5 بر روی باکتری‌های *S.aureus* , *L.monocytogenes* , *P.vulgaris* , *K.pneumoniae* و مخمر *Candida albicans* مورد آزمایش قرار گرفت. در بین عصاره‌ها، عصاره آبی بیش‌ترین فعالیت ضد میکروبی را نسبت به عصاره الکلی نشان داد. بین اندام‌های مختلف در عصاره آبی، ابتدا اندام ریشه سپس برگ و در نهایت ساقه به ترتیب دارای بیش‌ترین و کم‌ترین اثر ضد باکتریایی بوده‌اند. بیش‌ترین قطر هاله، عدم رشد باکتری مربوط به عصاره آبی ریشه بر روی باکتری‌های *L.monocytogenes* , *P.vulgaris* , *K.pneumoniae* بوده است. در عصاره الکلی ابتدا اندام ریشه سپس ساقه و برگ به ترتیب دارای بیش‌ترین و کم‌ترین اثر ضد باکتریایی بوده‌اند. بیش‌ترین قطر هاله عدم رشد باکتری مربوط به عصاره الکلی ریشه بر روی باکتری‌های *S.aureus* , *P.vulgaris* , *K.pneumoniae* بوده است.

تاثیر عصاره آبی

عصاره‌های آبی قدرت خوبی با اثر ضد باکتریایی، علیه باکتری‌های گرم مثبت و منفی از خود نشان دادند. باکتری‌های گرم مثبت *S.aureus* , *L. monocytogenes* در عصاره آبی برگ در تمامی رقت‌ها حساسیت بالایی را از خود نشان دادند، اما باکتری‌های گرم منفی *P.vulgaris* , *K.pnuomonae* در عصاره آبی ریشه در تمامی رقت‌ها بهترین اثر ضد باکتریایی را داشتند. هم چنین عصاره آبی برگ گزنه در رقت‌های مختلف اثر ضد قارچی مناسب تری بر روی قارچ *Candida albicans* از خود نشان داد(جدول شماره 1).

تاثیر عصاره اتانولی

عصاره اتانولی نسبت به عصاره آبی دارای اثر ضد باکتریایی کم‌تری در اندام‌های مختلف گیاه گزنه بوده است. عصاره اتانولی ریشه بر روی باکتری‌های گرم مثبت *S.aureus* , *L,monocytogenes* در غلظت 0/5 mg/ml دارای بهترین اثر ضد باکتریایی بوده و هم‌چنین اثر عصاره ریشه بر روی باکتری‌های گرم منفی *P.vulgaris* , *K.pnuomonae* در غلظت 0/5 mg/ml نیز نسبت به عصاره سایر اندام‌ها مناسب‌تر بود، ولی اثر عصاره ساقه بر روی مخمر *Candida albicans* در غلظت 0/5 mg/ml نسبت به عصاره اندام برگ و ریشه بیش‌تر بوده است (جدول شماره 2).

جدول شماره 1: میزان قطر هاله عدم رشد میکروارگانیسم‌های مورد آزمایش با عصاره آبی برگ، ریشه و ساقه *Urtica dioica* L برحسب میلی‌لیتر

عصاره آبی	غلظت (mg/ml)	*L.monocytogenes* قطر هاله (mm)	*S.aureus* قطر هاله (mm)	*K.pneumoniae* قطر هاله (mm)	*P.vulgaris* قطر هاله (mm)	*Candida albicans* قطر هاله (mm)
برگ	0/5	17	17	13/5	13/5	17/5
	0/25	15/5	16	11/5	11/5	16
	0/125	14/5	15	10	10/5	13/5
	0/625	12	12	8/5	8/5	11
ساقه	0/5	11	17/5	17	11	13/5
	0/25	10	16/5	14/5	9/5	11/5
	0/125	9	15	11/5	8	9/5
	0/625	7	14	10	7	8/5
ریشه	0/5	17/5	14/5	27/5	21/5	13
	0/25	12/5	13	24	19/5	11
	0/125	10	11/5	20	15	9/5
	0/625	8/5	9/5	17/5	12	8

جدول شماره 2: میزان قطر هاله عدم رشد میکروارگانیسم‌های مورد آزمایش با عصاره الکلی برگ، ریشه و ساقه *Urtica dioica* L برحسب میلی‌لیتر

عصاره آبی	غلظت (mg/ml)	L.monocytogenes قطر هاله (mm)	*S.aureus* قطر هاله (mm)	*K.pneumoniae* قطر هاله (mm)	*P.vulgaris* قطر هاله (mm)	*Candida albicans* قطر هاله (mm)
برگ	0/5	11/5	10/5	10	11/5	10
	0/25	10/5	8/5	9/5	9/5	9
	0/125	8	7/5	8	8	7/5
	0/625	7	7	7	7	7
ساقه	0/5	10	13	12/5	11	14
	0/25	9/5	12	10	9	12/5
	0/125	7/5	10	9	7/5	10/5
	0/625	7	9/5	7/5	7	8/5
ریشه	0/5	13/5	15	15	15	12/5
	0/25	11/5	14	12/5	12/5	10/5
	0/125	9/5	12/5	10	10/5	10
	0/625	8	11	8	8/5	8

نتایج MIC و MBC

آزمایشات MIC و MBC نشان می‌دهد که قوی‌ترین اثر ضد باکتریایی مربوط به عصاره آبی بر روی باکتری‌های *K.pneumoniae* , *P.vulgaris* در اندام ریشه و مخمر *Candida albicans* در اندام برگ بوده است (جدول شماره 3). در مورد عصاره گیری اتانولی آزمایش MIC و MBC نشان می‌دهد که قوی‌ترین اثر ضد باکتریایی مربوط به عصاره اندام ریشه بر روی باکتری *S.aureus* و *K.pneumoniae* بوده است (جدول شماره 4).

نتایج تست آنتی بیوگرام

به دلیل این که میزان ترکیبات ماده موثره موجود در اندام‌های مختلف گیاه متفاوت است، اثر ضد باکتریایی عصاره گیاه می‌تواند بر این اساس متفاوت باشد. در مقایسه اثر عصاره آبی با آنتی‌بیوتیک‌های Clindomycin 2 mg , Amikacin30 mg , Ceftizoxim30 mg , Ampicillin10 mg , Gentamycin10 نشان داده شد که عصاره‌های آبی اندام ریشه نسبت به این آنتی بیوتیک‌ها بر روی باکتری‌های مذکور دارای اثر ضد باکتریایی بوده است. در حالی که عصاره اتانولی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مذکور حساسیت کم‌تری را نشان داده است.

شناسایی مهم‌ترین ترکیبات مواد موثره با دستگاه GC

مهم‌ترین ترکیبات مواد موثر که توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی GC انجام شد، 28 ترکیب شناسایی گردید که مهم‌ترین آن‌ها عبارتند از 5 ترکیب: Neophytadiene (25/21 درصد) و Phtaleic acid (8/15 درصد) و phtaleate (7/37 درصد) Dibutyl و Bis(2-ethyl hexyl) maleate (6/32 درصد) و 1,2 - benzenedi carboxylic acid (7/62 درصد) بوده که مقدار این ترکیبات در برگ نسبت به سایر اندام‌ها دارای بیش‌ترین مقدار بوده است (تصویر شماره 1، 2، 3).

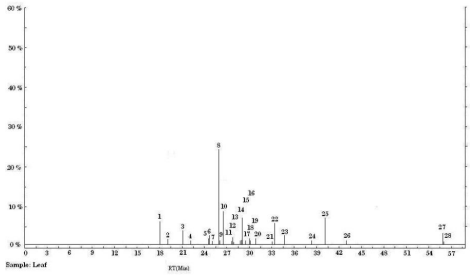
جدول شماره 3: تعیین میزان MIC و MBC عصاره آبی میکروارگانیسم های مورد آزمایش

میکروارگانیسم های مورد آزمایش	*Candida albicans*		*S.aureus*		*K.pnuomonae*		*P.vulgaris*		*L.monocytogenes*	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
برگ	1/128	1/8	1/16	1/8	1/8	1/2	1/16	1/4	1/16	1/2
ساقه	1/32	1/4	1/16	1/4	1/32	1/8	1/4	1/2	1/4	1/2
ریشه	1/64	1/8	1/16	1/8	1/128	1/16	1/64	1/8	1/8	1/2

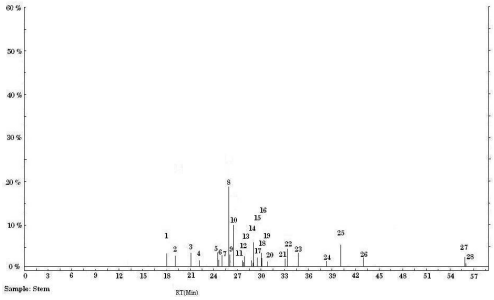
جدول شماره 4: تعیین میزان MIC و MBC عصاره الکلی میکروارگانیسم های مورد آزمایش

میکروارگانیسم های مورد آزمایش	*Candida albicans*		*S.aureus*		*K.pnuomonae*		*P.vulgaris*		*L.monocytogenes*	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
برگ	1/4	1/2	1/4	1/2	1/4	1/2	1/8	1/2	1/4	1/2
ساقه	1/32	1/4	1/8	1/2	1/8	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2
ریشه	1/8	1/2	1/64	1/8	1/32	1/4	1/64	1/4	1/8	1/2

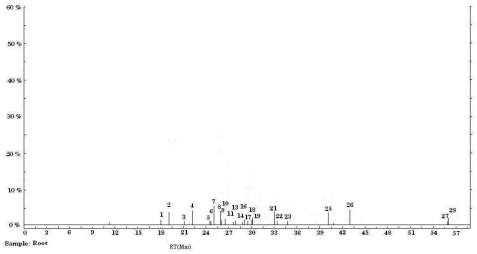
می‌توان بیان کرد با توجه به این که اندام برگ دارای بیش‌ترین درصد ترکیبات ماده موثره بود، به همین دلیل اثرات ضد باکتریایی بهتری را نسبت به سایر اندام‌ها از خود نشان داده است (جدول شماره 5).



تصویر شماره 1: ترکیبات استخراج شده توسط دستگاه GC در اندام برگ *Urtica dioica* L



تصویر شماره 2: ترکیبات استخراج شده توسط دستگاه GC در اندام ساقه *Urtica dioica* L



تصویر شماره 3: ترکیبات استخراج شده توسط دستگاه GC در اندام ریشه *Urtica dioica* L

بحث

یافته‌های مطالعه ما نشان داد که عصاره آبی اندام‌های مختلف گیاه گزنه دارای اثر ضد باکتریایی بیش‌تری نسبت به عصاره الکلی گیاه می‌باشد. عصاره‌های آبی برگ در تمامی رقت‌ها حساسیت بالایی با اثر ضد باکتریایی علیه باکتری‌های *L,monocytogenes* , *S.aureus* و مخمر *Candida albicans* از خود نشان دادند. عصاره آبی ساقه در تمامی رقت‌ها بهترین اثر ضد باکتریایی را بر روی باکتری‌های *S.aureus* و *K.pneumoniae* داشته است و عصاره آبی ریشه در تمامی رقت‌ها بهترین اثر ضد باکتریایی را بر روی باکتری‌های گرم منفی *K.pneumoniae* و *P.vulgaris* داشته است.

جدول شماره 5: آنالیز ترکیبات گیاه گزنه *urtica dioica* با روش GC

ردیف	نام ترکیبات	فرمول ملکولی	RT	Peak Leaf%	Peak Steam%	Peak Root%
1	2,4-di-t-butylphenol	$C_{14}H_{22}O$	18/15	5/28	3/12	0/93
2	Unknown	ـــ	19/33	2/16	2/64	3/81
3	Phosphoric acid tributylester	$C_{12}H_{27}O_4P$	21/31	4/12	2/81	0/68
4	8-methylheptadecane	$C_{18}H_{38}$	22/43	1/20	1/85	4/21
5	1-Heptadecene	$C_{17}H_{34}$	24/68	2/15	4/10	0/85
6	Eicosane	$C_{20}H_{42}$	24/84	2/83	2/03	0/72
7	Unknown	ـ	25/11	1/04	2/81	5/38
8	Neophytadiene	$C_{20}H_{38}$	25/94	25/21	18/56	4/70
9	3,7,11,15-tetramethyl-2-hexadecyl ester	$C_{20}H_{40}$	26/12	1/63	3/45	1/66
10	Phtaleic acid	$C_{26}H_{42}O_4$	26/66	8/15	9/11	2/36
11	2,6,10,15-tetramethylheptadecane	$C_{21}H_{44}$	29/79	1/17	1/59	0/48
12	Olean-18-ene	$C_{30}H_{50}$	27/91	2/25	1/61	-
13	Unknown	ـ	28/16	0/86	2/70	1/20
14	3,5-di-tert-butyl-ortho-benzoquinone	$C_{14}H_{20}O_2$	28/85	1/28	1/79	0/52
15	2,6,10,14-tetramethylpentadecane	$C_{19}H_{40}$	29/1	1/45	1/13	-
16	Dibutylphtaleate	$C_{16}H_{22}O_4$	29/26	7/37	5/22	2/15
17	Unknown	ـ	29/70	1/86	2/59	0/72
18	Heneicosane	$C_{21}H_{44}$	30/37	2/26	4/06	1/30
19	Unknown	ـ	30/49	1/36	2/59	2/16
20	Hexacosane	$C_{28}H_{54}$	32/66	2/04	1/33	-
21	Unknown	ـ	33/03	0/92	2/06	4/15
22	Bis(2-ethyl hexyl)maleate	$C_{20}H_{36}O_4$	33/54	6/32	4/19	1/59
23	Nonacosane	$C_{29}H_{60}$	34/77	2/72	3/81	0/82
24	Pentacosane	$C_{25}H_{52}$	38/46	1/51	1/77	-
25	1,2,-benzenedicarboxylic acid	$C_{24}H_{38}O_4$	40/61	7/69	5/09	3/11
26	Unknown	ـ	43/55	1/40	2/68	4/42
27	2-tert-Butyl-4,6-bis(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzyl)phenol	$C_{40}H_{58}O_3$	55/96	3/42	2/12	1/15
28	Unknown	ـ	56/27	0/51	0/48	1/88

در پژوهشی، عصاره آبی گزنه مورد بررسی قرار گرفت و مشخص گردید این عصاره دارای فعالیت ضد میکروبی علیه میکروارگانیسم‌های گرم منفی از جمله *Citrobacter koseri* ,*P.mirabilis* ,*E.coli*, *P.aeruginosa* و *Enterobacter aexogenes* و باکتری گرم مثبت *S.aureus* بوده است(18).

استاف اورئوس یکی از رایج‌ترین باکتری‌های گرم مثبت است که موجب آلودگی مواد غذایی شده و عصاره آبی گزنه دارای فعالیت ضد میکروبی بر روی این میکروارگانیسم و افزایش زمان ماندگاری مواد غذایی می‌گردد(6). در مطالعه دیگری، عصاره‌های آبی و متانولی اندام‌های ریشه و برگ گزنه علیه باکتری‌های *P.aeruginosa* , *E.coli* , *S.aureus* نشان داد که این میکروارگانیسم‌ها کاملا نسبت به عصاره گزنه مقاوم بودند(19). عصاره اتانولی ریشه گزنه بر روی باکتری گرم مثبت *S.aureus* دارای بهترین اثر ضد باکتریایی بوده و هم‌چنین عصاره ریشه بر روی باکتری گرم منفی *P.vulgaris* , *K.pneumoniae* نسبت به عصاره سایر اندام‌ها مناسب‌تر بوده است. در تحقیق حاضر از عصاره اتانولی برگ گزنه هیچ‌گونه اثرات ضد باکتریایی مشاهده نگردید که با نتایج به‌دست آمده توسط کیایی و همکاران مطابقت دارد(20). در مطالعه‌ای، اثر آنتی‌بیوتیکی گیاه گزنه گزارش گردید که عصاره متانولی گیاه گزنه علیه *S.aureus* *P.aeruginosa* , *E.coli* اثر ضد باکتریایی داشته است(18). ترکیبات شیمیایی موجود در گیاه بستگی به گونه، قسمت‌های مختلف اندام گیاه، زمان برداشت، منطقه جغرافیایی و روش‌های مختلف استخراج دارد. طبق گزارشات ترکیب Neophytadiene به دلیل دارا بودن فعالیت ضدباکتریایی مناسب برای درمان برخی بیماری‌های پوستی به‌کار می‌رود(21). ترکیبات آروماتیکی نظیر کربوکسیلسک اسیدها و استرها نیز در گیاه گزارش گردیده‌اند(12). اسیدهای چرب شامل Bis(2_ ethyl hexyl) maleat, Dibutyl ester, 1,2-benzendi

carboxylic acid نیز در گیاه گزنه گزارش شده که این ترکیبات دارای اثر ضد فساد و ضد میکروب می‌باشند(22).

جعفری و همکاران در سال 1391 با بررسی خواص ضد باکتریائی عصاره بخش‌های مختلف گیاه گزنه دوپایه به این نتیجه رسیدند که عصاره‌های اتانلی 80 درصد بخش‌های مختلف این گیاه بر باکتری‌های Pseudomonas aeruginosa Bacillus subtilis، Staphylococcus aureus، E. coli دارای اثر میکروب‌کشی بودند. در میان عصاره‌ها، عصاره بذر گزنه دارای بیش‌ترین اثر ضد باکتریایی بر روی باکتری‌های گرم مثبت بود، عصاره برگ گیاه مذکور بر باکتری‌های گرم منفی دارای بیش‌ترین تاثیر بازدارندگی بود. عصاره‌های آبی بخش‌های مختلف گیاه گزنه بر روی بازدارندگی رشد همه میکروارگانیسم‌های فوق به جز پسودوموناس آئروژینوزا تاثیر مثبت داشت(23).

در پایان می‌توان نتیجه‌گیری کرد که با توجه به آزمایشات انجام شده، گیاه گزنه دو پایه *Urtica dioica* دارای خواص ضد باکتریایی و ضد قارچی می‌باشد و از این حیث می‌تواند علیه طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها اثر داشته باشد. هم‌چنین نحوه استخراج ماده موثره، گونه گیاه، موقعیت جغرافیایی، استرس‌های وارد شده به گیاه، تفاوت‌های درون‌گونه‌ای بر میزان و نوع ترکیبات شیمیایی گیاه موثر می‌باشند. با توجه به این که گیاه گزنه دو پایه دارای توانایی رشد در شرایط متفاوت و نامساعد محیطی می‌باشد، کشت آن به صورت انبوه امکان پذیر و اقتصادی می‌باشد. هم‌چنین می‌توان با انتخاب گونه‌هایی که دارای مواد موثره بیش‌تری هستند، امکان بهره‌دهی مناسب‌تری از این گیاه فراهم نمود.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از جناب آقای دکتر غلامعلی مرادلی، عضو محترم هیات علمی گروه میکروبیولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد ساوه و سرکار خانم دکتر مژگان فرزامی سپهر، عضو محترم هیات علمی گروه زیست شناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد ساوه و از آقایان مهندس حسنی و مهندس سلیمی، کارشناسان محترم آزمایشگاه کنترل میکروبی دانشکده کشاورزی ساوه قدردانی می‌گردد.

References

1. Ayliffe G, Green W, Livingston R, Lowbury E. Antibiotic-resistant Staphylococcus aureus in dermatology and burn wards. J Clin Pathol. 1977;30(1):40-44.
2. Perea S, López-Ribot JL, Kirkpatrick WR, McAtee RK, Santillán RA, Martí nez M, et al. Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in Candida albicans strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients. Antimicrob Agents Chemother.. 2001;45(10):2676-2684.
3. Srinivasan D, Nathan S, Suresh T, Perumalsamy PL. Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. J Ethnopharmacol. 2001;74(3):217-220.
4. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev.. 1999;12(4):564-582.

5. Lichius JJ, Muth C. The inhibition effects of Urtica dioica root extracts on experimentally induced prostatic hyperplasia in the mouse. Planta Med. 1997;63(04):307-310.
6. Gülçin I, Kufrevioglu OI, Oktay M, Buyukokuroglu ME. Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (Urtica dioica L.). J Ethnopharmacol. 2004;90(2):205-215.
7. Argudín MÁ, Mendoza MC, Rodicio MR. Food poisoning and Staphylococcus aureus enterotoxins. Toxins. 2010;2(7):1751-1773.
8. Kanki M, Yoda T, Tsukamoto T, Shibata T. Klebsiella pneumoniae produces no histamine: Raoultella planticola and Raoultella ornithinolytica strains are histamine producers. Appl Environ Microbiol. 2002 ;68(7):3462-3466.
9. Fisher K, Phillips CA. The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of Campylobacter jejuni, Escherichia coli O157, Listeria monocytogenes, Bacillus cereus and Staphylococcus aureus in vitro and in food systems. J Appl Microbiol. 2006 ;101(6):1232-1240.
10. Wang Y, Zhang S, Yu J, Zhang H, Yuan Z, Sun Y, et al. An outbreak of Proteus mirabilis food poisoning associated with eating stewed pork balls in brown sauce, Beijing. Food Control. 2010 ;21(3):302-305.
11. Manohar V, Ingram C, Gray J, Talpur NA, Echard BW, Bagchi D, et al. Antifungal activities of origanum oil against Candida albicans. Mol Cell Biochem. 2001 ;228(1):111-117.
12. Roy S, Rao K, Bhuvaneswari C, Giri A, Mangamoori LN. Phytochemical analysis of Andrographis paniculata extract and its antimicrobial activity. World J Microbiol Biotechnol. 2010;26(1):85-91.
13. Iqbal MS, Ghafoor A, Abbasi FM, Qureshi AS, Ahmad H. Study of nutritional characteristics, mineral nutrients and agro-biodiversity in black cumin (Nigella sativa L.) genotypes from Pakistan. African J Biotechnol. 2011:26;10(66):14757-14766.
14. Pawle G, Singh S. Antimicrobial, antioxidant activity and phytochemical analysis of an endophytic species of Nigrospora isolated from living fossil Ginkgo biloba. Curr Res Environ Appl Mycol. 2014;4(1):1-9.
15. Andrews J. BSAC standardized disc susceptibility testing method (version 8). J Antimicrob Chemother.. 2009;64(3):454-489.
16. Sindambiwe J, Calomme M, Cos P, Totte J, Pieters L, Vlietinck A, et al. Screening of seven selected Rwandan medicinal plants for antimicrobial and antiviral activities. J Ethnopharmacol. 1999;65(1):71-77.
17. Dey P, Harborne J. Methods in plant biochemistry: screening medthods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. London, UK: Academic Press; 1991.
18. Shale T, Stirk W, van Staden J. Screening of medicinal plants used in Lesotho for anti-bacterial and anti-

inflammatory activity. J Ethnopharmacol. 1999;67(3):347-354.

19. Kiaei E, Mazandarani M, Ghaemi E. Antibacterial activity of 7 species of medicinal plants on bacteria isolated from UTI patients in golestan province. Journal of Medicinal plants. 2010;2(34):74-83. [Persian]
20. Majd,A. Mehrabian,S and Jajary,Z. The study of antimicrobial effects of urtica dioica extract. Medicinal and Aromatic plants Res. 2003; 19 (3): 287-293. [Persian]
21. Lalitharani S, Mohan VR, Regini GS. GC-MS analysis of ethanolic extract of Zanthoxylum rhetsa (roxb.) dc spines. J Herb Med Toxicol .2010;4(1):191-192.
22. Li RW, Leach DN, Myers SP, Leach GJ, Lin GD, Brushett DJ, et al. Anti-inflammatory activity, cytotoxicity and active compounds of Tinospora smilacina Benth. Phytother Res. 2004;18(1):78-83.
23. Jaffari Z, Majd A, Mehrabian S. Antibacterial effect of plant extract of nettle two basic Urtica dioica L. Medicinal and Aromatic Plants Research of Iran .2012;19(3):287-312