

## مقاله تحقیقی

### مطالعه اثر ضد باکتری عصاره اتانولی گیاه والک (*Allium akaka*)

میترا صالحی<sup>۱\*</sup>، فهیمه سلیم پور<sup>۲</sup>، مریم نویدی قهرودی<sup>۱</sup>

۱. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، گروه میکروبیولوژی، تهران، ایران
۲. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، گروه زیست شناسی، تهران، ایران

\*مسؤول مکاتبات: میترا صالحی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تلفن: ۰۲۱-۲۲۶۶۰۱۶

پست الکترونیکی: Mitra\_Salehi\_Microbiology@yahoo.com

محل انجام تحقیق: تهران، خیابان ولیعصر، کوچه سالار، مجتمع آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال

تاریخ پذیرش: ۹۰/۴/۱۹

تاریخ دریافت: ۹۰/۱/۲۰

## چکیده

در سال‌های اخیر به علت مشکلات ناشی از مصرف داروهای شیمیایی و مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها، مطالعات زیادی برای شناسایی ترکیبات گیاهان دارویی انجام شده است. والک با نام علمی *Allium akaka* از خانواده *Liliaceae* از جمله گیاهانی است که تاکنون خواص ضدمیکروبی عصاره آن، بررسی نشده است. در این پژوهش اثرات آنتی‌باکتریال عصاره اتانلی والک روی باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سوبتیلیس، سودوموناس آئروژینورا و سالمونلا تیفی موریوم به روش‌های انتشار دیسک و تمیه رقت در لوله (غلظت‌های ۵/۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاکی از وجود خاصیت مهارکنندگی عصاره اتانلی روی تمام باکتری‌های مورد مطالعه است. بهترین تاثیر عصاره در مورد باسیلوس سوبتیلیس و به میزان ۵/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برآورد شد. بنابراین، ترکیبات موجود در عصاره گیاه والک دارای اثرات ضد باکتریایی می‌باشد.

## واژه‌های کلیدی:

*Allium akaka*، اثر ضدباکتریایی

## مقدمه

گیاه والک با نام علمی *Allium akaka* از تیره لاله سوسنیان (*Liliaceae*) و جزء یکی از سبزیجات صحرایی است (۱). والک گیاهی خودرو در دامنه‌های کوهستان البرز و بیلاحات اطراف تهران مانند فشم و لشگرک است. این گیاه، نوعی سیر کوهی با خواص سیر و پیاز است. در طب سنتی، والک برای تصفیه خون، ناراحتی‌های هاضمه و کاهش فشار خون و همچنین برای معالجه سردرد، بیماری‌های کبدی، اسهال و آرتربیت مورد استفاده قرار گرفته است (۲،۱۰). بسیاری از گزارش‌ها اثرات ضدمیکروبی جنس *Allium* را به داشتن ترکیبات

در قرن حاضر، تحقیقات گستره‌ای روی گیاهان دارویی انجام شده و معرفی داروهایی با مواد موثره طبیعی، افق‌های جدیدی را برای جامعه پزشکان و داروسازان پژوهشگر گشوده است (۷،۶). به طوری که در حال حاضر حدود یک سوم داروهای مورد استفاده در جوامع انسانی را داروها با منشأ طبیعی و گیاهی تشکیل می‌دهند (۸). گیاهان دارویی و فرآورده‌های طبیعی، سر منشأ ۸۰ الی ۶۰ درصد آنتی‌بیوتیک‌های کنونی هستند (۹). امروزه استفاده از عصاره و اسانس‌های گیاهی به علت حضور ترکیبات آنتی‌میکروبیال، بسیار مورد توجه واقع شده است (۶،۷).

تاثیر عصاره بر جلوگیری از رشد باکتری‌ها، به روش انتشار در آگار (دیسک‌گذاری) و رقت در لوله، مطالعه شد. در روش انتشار، ابتدا از هر سویه ۱۶ ساعته در فاز رشد (در محیط *BHI* آگار و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد)، سوسپانسیون میکروبی برابر با کدورت استاندارد ۵٪ مکفارلنند (غلظت تقریبی  $CFU/ml \times 10^8$ ) تهیه شد و در شرایط کاملاً سترون، با سوآب به صورت سطحی روی محیط مولر هیلتون آگار کشت داده شد. سپس از هر غلظت عصاره (۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به میزان ۳۰ میکرولیتر روی دیسک‌های خام کاغذی (پادتن طب) قرار داده شد. دیسک‌ها بعد از خشک شدن و تبخیر کامل حلal، با رعایت فاصله مناسب، روی محیط کشت حاوی باکتری قرار گرفتند. در هر آزمون، دیسک شاهد، حاوی حلal و فاقد عصاره، در نظر گرفته شد.

در این روش، پلیت‌های حاوی کشت باکتری و عصاره در شرایط یکسان به مدت ۲۴ ساعت داخل انکوباتور  $37^\circ C$  گرمخانه گذاری شدند. بعد از این مدت، میزان بازدارندگی بر اساس قطر هاله‌های عدم رشد تشکیل شده اندازه‌گیری و ثبت شدند. آزمایش‌ها ۳ بار تکرار و میانگین قطر هاله‌های عدم رشد، محاسبه شد.

بعد از بررسی نتایج دیسک‌گذاری، جهت تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) Minimum Inhibitory Concentration و کمترین غلظت (MBC) باکتری‌کشی عصاره (Bactericide Concentration) بر طبق استانداردهای میکروب‌شناسی، از روش انجام شد (۱۱).

پس از آماده‌سازی عصاره اتانلی و گذراندن آن از فیلتر  $0.2 \mu m$ ، رقت‌ها در محیط کشت مولر هیلتون براث (*Muller Hinton Broth*) تهیه شد. سپس از سوسپانسیون باکتری با غلظت ۵٪ مکفارلنند، میزان ۱۰۰ میکرولیتر به هر یک از لوله‌های حاوی محیط کشت و عصاره، افزوده شد. به منظور کنترل مثبت، لوله حاوی محیط کشت، باکتری و کنترل

گوگرد دار آن که بسیار واکنش‌پذیرند، نسبت می‌دهند. از این رو، گیاهانی نظریه تره کوهی (*Allium ampeloprasum*) و سیر (*Allium sativum*) دارای اثرات ضدمیکروبی قوی هستند (۳).

تاکنون گزارشی از اثرات آنتی‌باکتریایی گیاه والک ارائه نشده است. بنابراین، در پژوهش حاضر سعی بر این بود که اثر بازدارندگی عصاره اتانلی برگ‌های گیاه والک بر برخی باکتری‌های گرم مثبت و منفی، مورد ارزیابی قرار گیرد.

## مواد و روش‌ها

گیاه والک در اردیبهشت‌ماه از ارتفاعات فشم و لشگرک در اطراف تهران، جمع‌آوری و در هر باریوم دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، شناسایی شد. سپس، برگ‌ها در شرایط تهویه مناسب و دور از نور خورشید، خشک و آسیاب شدند. عصاره‌گیری توسط حلal اتانل انجام شد. برای این منظور، پودر گیاه پس از توزیز (۱۰۰ g) با ۵۰۰ میلی‌لیتر از حلal مورد نظر، مخلوط و در دستگاه سوکسله قرار گرفت. عمل عصاره‌گیری در مدت ۱۲ ساعت انجام شد. در نهایت جهت تغییض، محلول حاصل از عصاره‌گیری که حاوی ترکیبات حل شده ماده گیاهی بود در داخل دستگاه *Rotary Evaporator* در دمای  $40^\circ C$  قرار گرفت. سپس عصاره تا زمان انجام آزمایش، در تاریکی و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای تهیه رقت‌های مختلف از عصاره استخراج شده، ۲ گرم از عصاره با یک‌میلی‌لیتر حلal اتانل، مخلوط و رقت‌های متوالی (۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) تهیه شد.

باکتری‌های مورد بررسی، شامل استافیلوکوکوس *Staphylococcus aureus* (ATCC1113) اورئوس *Sodomonas aeruginosa* آنروژنیوز (ATCC1599) *Pseudomonas* *aeruginosa* (Salmonella typhimurium PTCC 1709) و باسیلوس سوبتیلیس (*Bacillus subtilis* RTCC 1058)، از آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشگاه آزاد واحد تهران شمال تهیه شدند.



تصویر ۲ - هاله عدم رشد ایجاد شده با عصاره اتانلی والک (غلظت‌های ۲۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و  $250\text{ mg/ml}$ ) شاهد) در مورد باسیلوس سوبتیلیس.



تصویر ۳ - هاله عدم رشد ایجاد شده با عصاره اتانلی والک (غلظت‌های ۲۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و  $250\text{ mg/ml}$ ) شاهد) در مورد سالمونولا تیفی موریوم.



تصویر ۴ - هاله عدم رشد ایجاد شده با عصاره اتانلی والک (غلظت‌های ۲۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و  $250\text{ mg/ml}$ ) شاهد) در مورد سودوموناس آتروجینوزا.

### بحث

استفاده از گیاهان دارویی، از گذشته‌های دور در بین ملل مختلف، از جمله ایران، جهت درمان

منفی، لوله دارای محیط کشت و عصاره در نظر گرفته شد. لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور  $37^{\circ}\text{C}$  گرمگذاری شدند. بعد از این زمان، کدورت لوله‌ها با توجه به مقایسه آن‌ها با شاهد، بر اساس رشد یا عدم رشد باکتری‌ها ارزیابی شد. غلظت اولین لوله‌ای که قادر رشد بود، حداقل غلظت بازدارنده‌ی یا باکتریوستاتیک عصاره (MIC) منظور شد. سپس یک میلی‌لیتر از لوله‌های قادر کدورت در محیط‌های کشت جامد، تلقیح شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور  $37$  درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. بعد از گرمگذاری مجدد، پلیت‌های قادر رشد باکتری به عنوان حداقل غلظت کشنده‌ی یا باکتریوسید (MBC) عصاره بر باکتری در نظر گرفته شد.

### نتایج

بررسی هاله‌های عدم رشد در روش دیسک‌گذاری، حاکی از تأثیر عصاره گیاهی بر جلوگیری از رشد باکتری‌های مورد مطالعه است (تصاویر ۱-۴). بهترین تأثیر، در مورد باکتری‌های باسیلوس سوبتیلیس و سالمونولا تیفی موریوم مشاهده شد، به طوری که در بیشترین غلظت ( $200\text{ mg/ml}$ ) میانگین میزان هاله عدم رشد، برابر  $25$  میلی‌متر و در کمترین رقت ( $125\text{ mg/ml}$ ) به ترتیب  $4$  و  $8$  میلی‌متر برآورد شد (جدول ۱). نتایج میزان MIC (باکتریوستاتیک) و MBC (باکتریوسید) عصاره بر هر یک از باکتری‌ها در جدول ۲ آورده شده است.



تصویر ۱ - هاله عدم رشد ایجاد شده با عصاره اتانلی والک (غلظت‌های ۲۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و  $250\text{ mg/ml}$ ) شاهد) در مورد استافتیلوفکوک اورئوس.

گونه‌های *Allium* که در اطراف تهران رویش دارد، پرداخته شد.

بیماری‌ها رواج داشته است. اغلب اسانس‌ها و عصاره‌ها از گیاهان خاص و بومی منطقه تامین می‌شده است. به همین دلیل، در این تحقیق به بررسی اثرات ضد باکتریایی گیاه والک (*A. akaka*) یکی از

جدول ۱ - میانگین قطر هاله‌های عدم‌رشد (بر حسب میلی‌متر) ایجاد شده توسط عصاره *Allium akaka* به روش دیسک‌گذاری.

غلظت عصاره بر حسب mg/ml					عصاره	باکتری
۱۲۵	۲۵۰	۵۰۰	۱۰۰۰	۲۰۰۰		
۲	۵	۱۲	۲۰	۲۳	استافیلوکوک ارئوس	
۴	۱۰	۱۶	۲۰	۲۵	باسیلوس سوبتیلیس	
-	۳	۷	۱۷	۲۰	سودوموناس آئروژینوزا	
۸	۱۳	۱۵	۲۳	۲۵	سالمونلا تیفی‌موریوم	

جدول ۲ - میزان MIC و MBC عصاره اتانلی *Allium akaka* بر حسب mg/ml

MBC	MIC	باکتری
۵۰۰	۲۵۰	استافیلوکوک ارئوس
۱۲۵	۶۲/۵	باسیلوس سوبتیلیس
۵۰۰	۲۵۰	سودوموناس آئروژینوزا
۲۵۰	۱۲۵	سالمونلا تیفی‌موریوم

بررسی و مقایسه نتایج، بیانگر این مطلب است که حضور عصاره گیاه والک می‌تواند در جلوگیری از رشد باکتری‌ها موثر باشد. نتایج تاثیر عصاره اتانلی در روش انتشار نشان داد که کاهش غلظت‌های عصاره، نسبت مستقیم با کاهش قطر هاله‌های عدم رشد در باکتری‌های مورد مطالعه دارد. با توجه به نتایج جدول ۲، کمترین غلظت ممانعت‌کننده از رشد، در مورد باسیلوس سوبتیلیس، به مقدار ۶۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش گردید. در مجموع، حساسیت باکتری‌های مورد مطالعه نسبت به عصاره، به ترتیب در باسیلوس سوبتیلیس، سالمونلا تیفی‌موریوم، استافیلوکوک ارئوس و سودوموناس آئروژینوزا مشاهده شد.

در گزارش‌های متعدد، به خواص گونه‌های متنوع جنس *Allium* به عنوان ارزش درمانی در بهبودی بیماری‌ها و عفونت‌های میکروبی اشاره شده است (۱۲).

Nelsons و همکاران در سال ۲۰۰۷ تاثیر مطالعات Deresse در سال ۲۰۱۰ مبنی بر تاثیر عصاره آبی *A. sativum* به عنوان گونه شناخته‌شده جنس *Allium* بر ایزوله‌های *Staphylococcus aureus* با منابع مختلف کلینیکی، حاکی از حساسیت نسبتاً بالای باکتری در حضور عصاره بود، به طوری که *A. ursinum* ۱۵ MIC عصاره را

میکروبیال عصاره آبی *Allium roseum* را بر باکتری *Salmonella typhymurium* و *Staphylococcus aureus*، ثابت و علت آن را ترکیبات گوگردی موجود در گیاه اعلام کردند (۱۸). از سوی دیگر تحقیقات *Balestra* و همکاران او در سال ۲۰۰۹ بیانگر اثر ممانعت عصاره آبی *Allium sativum* بر باکتری‌های پاتوژن گیاه *Pseudomonas aeruginosa* گوچه‌فرنگی از جمله *Pseudomonas syringae* بود (۱۹). در گزارش سال ۲۰۱۰ بیان *Deresse* مربوط به اثرات ترکیبات گوگرددار گیاه (آلیسین) بر سنتز RNA و پروتئین پروکاریوت است (۱۵). در مطالعه حاضر، در اولین گام، تأثیر عصاره اتانلی والک بر عدم‌رشد باکتری در شرایط آزمایشگاهی (*in vitro*) مورد تائید قرار گرفت تا در مراحل بعد تأثیر آن در شرایط *in vivo* نیز مطالعه شود.

پژوهش روغنی و همکاران در سال ۱۳۸۷ مبنی (*in vivo*) بر مصرف گیاه والک در مدل تجربی (۵) حاکی از اثر هیپوگلیسمیک و تغییرات مطلوب و سودمند در سطح کلسترول بود (۵). بنابراین، با در نظر گرفتن این که گیاه والک یک گیاه بومی است و از دیر باز در غذاهای ایرانی مصرف می‌شده است، مصرف مقادیر بیش از MIC و MBC آن، هیچ گونه عوارض جانبی ایجاد نمی‌کند و در نهایت می‌تواند نقش مهمی در بهبود سلامت افراد جامعه داشته باشد.

### تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از خانم دکتر فریبا شریف‌نیا و پرسنل آزمایشگاه واحد تهران شمال که ما را در انجام این پژوهه یاری کردند، تشکر می‌شود.

میلی‌گرم در میلی‌لیتر گزارش کرد (۱۵). در مطالعه حاضر، تأثیر عصاره اتانلی گیاه والک (*A. akaka*) به عنوان یکی از گونه‌های متعلق به جنس *Allium* در عدم‌رشد باکتری‌های مورد مطالعه، کاملاً قابل مشاهده بود که از این لحاظ با دیگر مطالعات هم‌سویی دارد. البته مقایسه نتایج گزارش شده در مورد اثرات آنتی‌باکتریال عصاره‌ها بسیار مشکل است که از آن جمله، می‌توان به تفاوت در روش‌های بررسی، منابع تهییه عصاره و حتی سویه‌های باکتریایی مورد مطالعه اشاره کرد (۱۶). همان‌طور که *Marilena* و همکاران در گزارش خود بیان می‌کنند ترکیبات موجود در عصاره‌های گیاهی بر حسب منطقه جغرافیایی رویش این گیاهان، سن گیاه و حتی روش خشک کردن و عصاره‌گیری جهت استخراج ترکیبات گیاهی متفاوت است (۱۶).

تحقیقات علیپور یگانه و همکاران در سال ۱۳۸۸ نشان داد که عصاره آبی *A. sativum* دارای اثر ممانعت‌کننده‌گی بر رشد باکتری *Salmonella typhymurium* پیشنهاد کرد که استفاده از ترکیبات عصاره این گیاه در سیستم‌های نگهدارنده مواد غذایی، جهت جلوگیری از آلودگی‌های میکروبی و بیماری‌های ناشی از آنها مفید خواهد بود (۴). با توجه به این که بهترین اثر عصاره اتانلی گیاه والک در جلوگیری از رشد باکتری‌های *Bacillus subtilis* و *Salmonella typhymurium* *MIC* نسبت به دیگر باکتری‌ها ارزیابی شد، می‌توان در آینده با مطالعات بیشتر، از این گیاه در صنعت غذایی نیز بهره گرفت. *Arzanlou* و همکاران در سال ۲۰۰۷، تأثیر عصاره آبی *A. sativum* *in vivo* بررسی و اعلام نمودند که عصاره آبی ۱۰ درصد این گیاه، زخم‌های ناشی از سوختگی و عفونت سودوموناس را بهبود می‌بخشد (۱۷). *Najjaa* و همکاران در سال ۲۰۰۷، خواص آنتی-

## منابع مورد استفاده

۱. زرگری، ع. ۱۳۷۲. گیاهان دارویی. انتشارات دانشگاه تهران. جلد چهارم، ص ۶۲۷.
۲. شاپوری، ر. ستاری، م. زهیر، م. ۱۳۸۳. بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره کلروفرمی سیر (آلیسین) روی بروس ملی تنفسی (Rev1) و بروسلا آبتورس (S19). دانشور، شماره ۲۱-۲۴، ص ۵۳.
۳. امیری، ح. ۱۳۸۵. بررسی مواد متشکله موجود در اسانس و اثرات ضدمیکروبی اسانس و عصاره‌های مختلف *Allium jesdianum* Boiss & Buhse گیاهان دارویی، سال ششم، ویژه نامه شماره ۱، ص ۴۴-۳۹.
۴. علیپور یگانه، م. تاجیک، ح. الهام زاده، م. فرخنده، ط. صدیق آرا، پ. صباح، س. ۱۳۸۸. اثر ممانعت‌کنندگی عصاره سیر بر رشد باکتری‌های سالمونلا تیفی‌موریوم و شیگلا دیسانتری. فصلنامه دانش و تدرستی، دوره ۴، شماره ۲، ص ۶-۹.
۵. روغنی، م. بلوج نژاد مجرد، ت. عگی، ک. ۱۳۸۷. اثر مصرف خوارکی بخش هوایی گیاه والک بر میزان گلوکز و لیپیدهای خون در مosh صحراوی دیابتی. مجله زیست‌شناسی ایران. جلد ۲۱، شماره ۳، ص ۵۴۲-۵۳۷.
6. WHO. 2002. Traditional Medicine Strategy 2002-2005. 1-3. 43-47.
7. Andrews, R. E. J., Parks, L. W., Spence, K. D., 1980. Some effects if Diuglas fir terpenes on certain microorganisms. Applied and Environmental Microbiology 40: 301-40.
8. Omidbaighi, R., 1997. Approaches to production and processing of medicinal plants. Tarrahan Press Iran 2: 235-240.
9. Taghizadeh, M., Pesian, M., 2001. Methods in quality control of medicinal plants. Nashre Jahad Press 1: 192-200.
10. Ivanova, A., Mikhova, B., Najdenski, H., Tsvetkov, I., Kostova, I., 2009. Chemical composition and antimicrobial activity of wild garlic *Allium ursinum* of bulgarian origin. Natural Product Communications 4: 1059-1062.
11. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), 2004. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 3rd ed. Approved Standard M7-A6. NCCLS, Villanova, PA, USA.
12. Nickavar, B., Yousefian, N., 2009. Inhibitory effects of six *Allium* species on  $\alpha$ -amylase enzyme activity. Iranian Journal of Pharmaceutical Research 8: 53-57.
13. Nelson, C., Reginald, A., Okoro, N., Janet, K., 2007. Antibacterial activity of *Allium cepa* (onions) and *Zingiber officinale* (ginger) on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from high vaginal swab. The Internet Journal of Tropical Medicine 3: 1-6.
14. Chehregani, A., Azimishad, F., Haj Alizade, H., 2007. Study on antibacterial effect of some *Allium* species from Hamedan-Iran. International Journal of Agriculture & Biology 9: 873-876.
15. Deresse, D., 2010. Antibacterial effect of garlic (*Allium sativum*) on *Staphylococcus aureus*: An *in vitro* study. Asian Journal of Medical Sciences 2: 62-65.
16. Marilena, M., Bersani, C., Comi, G., 2001. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Composita. International Journal of Food Microbiology 67: 187-195.
17. Arzanlou, M., Arab, R., Alaei, R., 2007. Therapeutic efficacy of garlic (*Allium sativa*) against burn wound infection by *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Biological Sciences 2: 634-638.
18. Najjaa, H., Neffati, M., Zouari, S., Ammar, E., 2007. Essential oil composition and antibacterial activity of different extracts of *Allium roseum* L., a North African endemic species. Chimie 10: 820-826.
19. Balestra, G. M., Heydari, A., Ceccarelli, D., Ovidi, E., Quattrucci, A., 2009. Antibacterial effect of *Allium sativum* and *Ficus carica* extracts on tomato bacterial pathogens. Crop Protection 28: 807-811.