بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره‌های محتلف اندام‌های گیاه دارویی اسفند (*Peganum harmala* L.) در شمال شرق استان گلستان (اینچه برون)

*معصومه مازندرانی[۱]، عزت اله قائمی[۲]، فاطمه غفاری[۳]

۱. استادیار علوم گیاهی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان

۲. دانشیار میکروب شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان (مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی)

۳. دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان

چکیده

گیاه دارویی اسفند .*Peganum harmala* L متعلق به تیره Zigophyllaceae از گونه‌های ارزشمند دارویی رویشگاه‌های متفاوت استان گلستان است. این مطالعه به منظور اتنوفارماکولوژی و مقایسه اثر ضدباکتریال عصاره‌های اندام‌های مختلف گیاه دارویی اسفند در شمال شرق استان گلستان انجام گرفت. در این تحقیق ضمن بررسی فنولوژیکی، اطلاعات اتنوفارماکولوژی در مورد گیاه از مردم بومی و ترکمن منطقه بدست آمد. ریشه، ساقه، برگ، گل و دانه‌های گیاه در فاصله ماه‌های اردیبهشت تا مهر ماه ۱۳۸۷ جمع‌آوری و ضمن تهیه عصاره‌های آبی و جوشانده، عصاره اتانولی به روش پرکولاسیون تهیه گردید. به منظور بررسی و مقایسه اثر ضد باکتریال عصاره‌ها از دو روش دیسک دیفیوژن و چاهک استفاده شد و قطر هاله‌های عدم رشد بعد از ۲٤ ساعت گرمخانه گذاری ،اندازه گیری و مقایسه کارایی ضد میکروبی با آزمون Pearson chi square انجام و $P<0.05$ معنی دار ارزیابی گردید. نتایج نشان داد بیشترین اثر ضد باکتریال مربوط به عصاره اتانولی اندام‌ها بود (۷۸/۸درصد و$P<0.001$). اثربخشی عصاره اتانلی دانه (٤۷/٤ درصد) و ریشه (۲۵/۷ درصد) ، مخصوصا در روش چاهک بیشتر از سایر اندام‌های گیاه بود و تفاوت اثر مهاری عصاره دانه به نسبت سایر گروه‌ها معنی دار بود ($P=0.01$). نتایج حاکی از آن است که باکتری *Bacillus licheniformis* (٥۸/٤ درصد) از بالاترین میزان حساسیت و باکتری‌های *Staphylococcus aureus*، *Staphylococcus epidermisis*، *Micrococcus loteus*، *Salmonella typhi morium* و *Shigella dysentria* هر یک با ۵۰ درصد حساسیت یا حساسیت نسبی، از حساس‌ترین باکتری‌های مورد مطالعه و همچنین باکتری‌های *Pseudomonas aeroginosa* و *Proteus mirabilis* هر یک با ۹۱/۷ درصد مقاومت، از مقاوم ترین باکتری‌های مورد مطالعه بودند. با وجود بالاتر بودن حساسیت باکتری‌های گرم مثبت از انواع گرم منفی، تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نمی‌باشد ($P>0.05$). نتایج تحقیق، احتمالا بیانگر رغبت بیشتر مردم بومی استان، به مصرف دانه‌های گیاه به عنوان یک ضدعفونی کننده قوی می‌باشد، لذا می‌تواند به عنوان یک سرنخ یا کاندید مناسب برای ادامه تحقیقات در زمینه تعیین کمیت و کیفیت مواد موثره ثانوی اندام‌های موثر و بررسی اثر ضدباکتریال آنها در مدل‌های حیوانی و بالینی، با هدف استخراج ، فرمولاسیون و تولید داروی گیاهی با اثر ضد عفونی کنندگی قوی باشد.

کلمات کلیدی: اسفند .*Peganum harmala* L عصاره اتانولی، آبی و جوشانده، ریشه ،دانه، اثر ضدباکتریال، شمال شرق استان گلستان

*email:dr_mazandarani7@yahoo.com

مقدمه

در قرن اخیر بحث عفونت‌های باکتریایی و مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها، تهدیدی جدی برای سلامت انسان‌ها محسوب می‌شوند. لذا دست‌یابی به ترکیبات جدید ضدمیکروبی و طبیعی، با کمترین عارضه جانبی موضوعی است که همواره ذهن محققان را به خود معطوف ساخته است. از آنجائیکه گیاهان برای حفاظت خود در برابر عوامل بیماریزا ناگزیر به ایجاد مکانیسم‌های دفاعی خاص و سنتز ترکیبات ضدمیکروبی می‌باشند، می‌توانند همواره به عنوان یک منبع بالقوه و ارزشمند جهت تولید ترکیبات ضدمیکروبی و ضدباکتریال مطرح باشند (Cha *et al.*, 2005).

گیاه دارویی *Peganum harmala* L. با نام محلی اسفند، از مهمترین گونه‌های علفی دارویی است که به دلیل تنوع نیازهای اکولوژیکی و مقاومت به تنش‌های مختلف محیطی، عرصه‌های وسیعی از مناطق استپی، دشت و نواحی کوهستانی خشک و سرد استان گلستان را به خود اختصاص داده است. مردم ترکمن در طب سنتی، از آن به طرق مختلف به تنهایی یا ترکیبی با سایر گیاهان دارویی از آن به عنوان یک داروی ضد میکروب در درمان بیماری‌های عفونی استفاده می‌کنند.

گیاه اسفند، بومی مناطق نیمه خشک و خشک شمال غرب هند، آفریقای جنوبی، آسیای مرکزی، عرصه‌های ایرانی - تورانی، سحارا - سندی، مدیترانه ای واروپا - سیبری است (Mirzaie *et al.*, 2007). به عبارتی از گیاهان دارویی و ارزشمند نواحی استپی نیمه خشک و بیابانی رویشگاههای مختلف ایران و مخصوصا استان گلستان نیز محسوب می‌شود (Zargari, 1989).

اسفند دربردارنده مواد ضد میکروبی فلاونوئیدی و آلکالوئیدهای بتا -کربولینی (هارمین، هارمالین، هارمالول، پگانین و کینازولین) می‌باشد که بیشتر در ریشه، دانه و کالوس گیاه یافت می‌شوند. در طب سنتی کشورهای آسیای مرکزی (ایران، ترکیه، پاکستان، افغانستان، یمن، تاجیکستان، هند و کشورهای حاشیه هیمالایا) اغلب از عصاره اندام‌های مختلف اسفند، به صور مختلف علاوه بر سمبل دفع بلا و چشم نظر، به عنوان داروی ضدعفونی کننده هوا، افزایش ترشح شیر، دفع انگل، دفع کرم‌های روده‌ای، ضد التهاب در درمان روماتیسم، افزایش قدرت جنسی و نیز به عنوان یک مسکن قوی جهت تسکین معده درد و قاعدگی بکار می‌رود (Astulla *et al.*, 2008). تحقیقات آزمایشگاهی حاکی از اثرضدمیکروبی عصاره دانه گیاه جهت از بین بردن میکروب‌ها است، از جمله اینکه عصاره‌های اتانولی حاصل از دانه ها و کالوس گیاه، خواص ضدمیکروبی علیه میکروب‌های استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیا کلی و کاندیدا آلبکنس نشان داده‌است (Shahverdi *et al.*, 2008). در تحقیقات مشابه، به اثر سمیت سلولی عصاره اتانولی و دوده حاصل از دانه‌های اسفند علیه سلول‌های سرطانی در انسان اشاره شده است (Lamchouri *et al*. 1999; Shahverdi *et al.*, 2008).

Berrougui و همکاران از آلکالوییدهای بتا - کربولیک دانه‌ها به عنوان داروی ضداسپاسم، ضدسرطان، ضدالتهاب، ضدمیکروب، بازکننده رگ‌های قلبی و همچنین عدم تشکیل لخته در رگهای خونی نام بردند (Berrougui *et al.*, 2006). در تحقیقی دیگر از ترکیبات harmine, harmaline, vasicinone به عنوان مهمترین آلکالوییدهای گیاه با اثر ضدمالاریایی، کرم‌کشی، ضدباکتریایی، ضدقارچ، ضد تومور و باز کننده رگهای قلبی نام بردند (Astulla *et al.*, 2008).

Arshad و همکاران به اثر ضد باکتریال عصاره دانه‌های اسفند در التیام زخمهای پوستی و لزوم ادامه تحقیقات کاربردی با هدف شناسایی و فرمولاسیون داروهای موثر طبیعی و با عارضه جانبی کمتر در رفع چالش مقاومت روزافزون باکتریها به آنتی بیوتیکها اشاره کردند (Astulla *et al.*, 2008; Arshad *et al.*, 2008; Mirzaiei *et al*. 2007).

موافقی و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که شهد گل‌های اسفند به دلیل وجود آلکالوییدهای بتاکربولینی، دارای اثرات مسکن و ضد سرطانی است (Movafeghi *et al.*, 2009). تحقیقات نشان داده که مردم مراکش در طب سنتی خود، از دانه‌های اسفند به روشهای مختلف به عنوان ضدعفونی کننده قوی، در درمان التهاب، دیابت، تسکین درد و التیام زخم‌های ناشی از سرطان پوست استفاده می‌کنند که در این رابطه نتایج مشابه In vitro مورد فوق را تایید نموده است (Eddouks *et al.*, 2002; Hemmati nejad *et al.*, 2006).

مردم مکزیک در طب سنتی خود، از عصاره دانه‌ها به عنوان ضدعفونی سیستم هاضمه، درمان بیماری‌های عفونی معده و روده‌ها استفاده می‌کنند که در این رابطه Shouda و همکاران از اثر عصاره دانه ها علیه باکتری‌های مولد عفونت‌های گوارشی. *S. aureus, P. aeroginosa, Candida albicans, Bacillus subtilis* نام برد (Shouda *et al.*,2008). مردم پاکستان نیز از دوده دانه و برگ گیاه اسفند به عنوان ضدعفونی کننده، دافع بلا و چشم نظراستفاده می‌کنند (Shinwari and Gilani, 2003). در کشور یمن نیز از دوده و عصاره‌های مختلف اسفند به عنوان ضدعفونی کننده و میکروب کش نام می‌برند (Ali *et al.*, 2001). لذا با توجه به مصارف فراوان دانه‌های اسفند به طرق مختلف در طب سنتی مردم استان گلستان، در این تحقیق به بررسی و مقایسه اثر ضدباکتریایی عصاره‌های آبی، اتانلی و جوشانده اندام‌های مختلف گیاه اسفند علیه ۱۳ سویه از باکتری‌های گرم مثبت و منفی، به دو روش دیسک دیفیوژن و چاهک پرداخته شد.

مواد و روشها

شناسایی و جمع آوری

عملیات صحرایی به منظور شناسایی رویشگاه‌های طبیعی و بررسی فنولوژی گونه مورد مطالعه در فاصله ماههای اردیبهشت تا آبانماه ۱۳۸۷ انجام گرفت. پس از جمع آوری اندام‌های مختلف (ریشه، دانه، ساقه، گل و برگ) از منطقه اینچه برون واقع در شمال شرق استان، نمونه هرباریومی گیاه مورد مطالعه در هرباریوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان، شناسایی، در شرایط آزمایشگاه خشک و سپس پودر آن برای انجام عملیات عصاره گیری آماده شد.

عصاره آبی

۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر ۷۰ تا ۸۰ درجه سانتیگراد را به ۳۰ گرم پودر گیاه اضافه کرده و به مدت ۲٤ ساعت در بن ماری ٤٥ تا ٥٠ درجه قرار می‌دهیم. سپس محلول حاصل را صاف و با استفاده از آب مقطر ، رقت‌های موردنظر آن تهیه گردید (Mashhadian, 2005).

عصاره جوشانده

۳۰ گرم پودر خشک گیاه را با ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به مدت ۳۰ دقیقه می‌جوشانیم. پس از سرد شدن آن را صاف نموده و از محلول حاصله به عنوان عصاره جوشانده در آزمایشات in vitro استفاده گردید (Mashhadian, 2005).

آماده سازی عصاره اتانولی گیاهان

به منظور تهیه عصاره اتانولی، از اتانول ۷۰ درجه و روش پرکولاسیون استفاده شد. ٥٠ گرم از پودر هر یک از اندام‌های گیاه را در داخل دکانتور ریخته، سپس مرحله به مرحله به آن اتانول ۷۰ درجه می‌افزاییم. برای افزودن اتانول ابتدا آن را گرم کرده و سپس به داخل دکانتور انتقال می‌دهیم. افزودن اتانول را تا جایی ادامه می‌دهیم که حلال تمامی حجم نمونه ها را پوشش دهد و علاوه بر آن مقداری از اتانول نیز روی سطح نمونه داخل دکانتور را کاملا بپوشاند. مدت عصاره‌گیری در این تحقیق ۷۲ ساعت به طول انجامید. جداسازی عصاره‌ها از حلال توسط دستگاه روتاری با کمک پمپ خلاء انجام گرفت (Kordali *et al.*, 2005; Mazandarani *et al.*, 2007).

رقیق سازی عصاره گیاهان و تهیه دیسک‌های حاوی عصاره

در این مرحله عصاره اتانولی را با پروپیلن گلیکول ۱۰درصد،رقیق کرده و علاوه بر عصاره خالص، غلظت‌های mg/ml ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ از عصاره تهیه شد (Shahverdi et al., 2008). سپس جهت تهیه دیسک‌های حاوی عصاره از دیسک‌های بلانک ساخت پادتن طب استفاده شد.بدین ترتیب که دیسک‌های بلانک را در لوله‌های حاوی رقت‌های تعیین شده از عصاره‌ها قرار داده و بعد از ۵ تا ۱۰دقیقه که دیسکها را در دمای ۳۷°C انکوبه تا کاملاً خشک شده و جهت دیسک گذاری آماده شود (Mashhadian, 2005). برای سایر عصاره ها رقیق سازی توسط آب مقطر استریل انجام گردید و رقتهای ۱/۲، ۱/٤، ۱/۸ و۱/۱٦ تهیه گردید.

سویه‌های باکتری‌های مورد مطالعه

با کتری‌های مورد استفاده، سویه‌های

Shigella dysenteria (*PTCC 1188*)
Pseudomonas aeroginosa (*PTCC 1214*)
Escherchia coli (*PTCC 1399*)
Staphylococcus aureous (*PTCC 1431*)
Bacillus licheniformis (*PTCC 1015*)
Salmonella typhimurium (*PTCC 1596*)
Staphylocuccus epidermidis (*PTCC 1114*)
Enterococcus faecalis (*PTCC 1393*)
Proteus mirabilis (*PTCC 1076*)
Listeria monocytoginesis (*PTCC 1163*)
Micrococcus loteus (*PTCC 1318*)
Kelebsiella (*PTCC 1291*)
and *Mycobacterium bovis* (*PTCC 1430*)

که همگی از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شدند.

بررسی اثر ضدباکتریایی عصاره‌ها

از دو روش دیسک دیفیوژن و چاهک استفاده شد و قطر هاله‌های عدم رشد بعد از ٢٤ ساعت انکوباسیون (۳۷ درجه) اندازه‌گیری، ثبت و به جهت مقایسه کارایی ضدمیکروبی از آزمون Pearson chi square استفاده شد.

الف) روش دیسک دیفیوژن

ابتدا از تمام سویه‌های باکتریایی سوسپانسیون میکروبی معادل ۰/۵ مک فارلند (۱/۵×۱۰۸ cfu/ml) تهیه شد و سپس با ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه شده بر سطح محیط مولرهینتون آگار کشت یکنواخت انجام شد(برای باکتری میکوباکتریوم بویس از محیط کشت لوون اشتاین استفاده شد).آنگاه دیسک‌های حاوی رقتهای مختلف عصاره، با فاصله معین از یکدیگر از لبه پلیت بر روی سطح محیط کشت آگار قرار داده شدند.پلیت ها به مدت ٢٤ ساعت در ۳۷°C گرمخانه گذاری شده(برای میکوباکتریوم بویس نتایج بعد از ۱۰-١٤روز بررسی شد) و نتایج اثر ضد باکتریایی با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک ها ثبت شد.برای حصول اطمینان، این آزمایش برای هر سویه باکتری سه بار تکرارگردید و میانگین قطر هاله عدم رشد در سه بار تکرار به عنوان قطر نهایی ثبت شد قطر هاله عدم رشد کمتر از ۸ mm به عنوان مقاوم، ۱۲ mm-۸ نسبتاً حساس و بیشتر از ۱۲ mm، حساس در نظر گرفته شد (Mazandarani *et al.*, 2007). همچنین از دیسک حاوی پروپیلن گلیکول ۱۰درصد به عنوان کنترل منفی و از دیسک حاوی آنتی بیوتیک جنتامایسین به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

ب) روش چاهک

بعد از تهیه غلظت نیم مک فارلند از کشت ٢٤ ساعته باکتریها، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه شده بر سطح محیط کشت مولرهینتون آگار(برای میکوباکتریوم بویس از محیط کشت لوون اشتاین استفاده شد) کشت یکنواخت باکتریها انجام شد سپس با کمک پیپت پاستور استریل ، حفره ای به قطر ٦ تا۷ میلی متر در محیط ایجاد نموده و ۱۰۰ میکرولیتر از رقتهای تهیه شده از عصاره، داخل آن ریخته شد و قطر هاله عدم رشد را پس از ٢٤ ساعت گرمخانه گذاری در ۳۷°C (برای میکوباکتریوم بویس نتایج بعد از ۱۰-١٤روز بررسی شد) بررسی و ثبت نمودیم.

نتایج

عملیات صحرایی در رویشگاه‌های استپی و نیمه استپی منطقه اینچه برون نشان داد که گیاه اسفند، به دلیل تنوع نیازهای اکولوژیکی و همچنین مقاومت به تنش‌های مختلف محیطی، عرصه‌های مختلف نیمه استپی با خاکهای سبک شن لومی شمال شرق استان گلستان را به خود اختصاص داده است. نتیجه بررسی‌های فنولوژی در این تحقیق نشان داد که گیاه از اوایل فروردین تا اواسط اردیبهشت به گل می‌نشیند، میوه‌های کپسول آن نیز بین ماه‌های شهریور تا مهر می‌رسند، بنا به اظهار چوپانان محلی این گیاه سمی بوده و کمتر مورد چرای دام قرار می‌گیرد و اغلب در صورت چرا، باعث سقط جنین و مرگ گوسفندان می‌شود.

مردم ترکمن نشین شمال استان گلستان از دانه‌های اسفند به طرق مختلف به عنوان داروی ضد میکروب در درمان بیماری‌های عفونی، معده، روده، اسهال، شکم درد، درد قاعدگی، دفع کرم و انگل، درمان عفونت‌های پوستی، التیام محل گزش حشرات، عفونت‌های قارچی انگشتان و همچنین به عنوان ضد التهاب ، مسکن و نیز به همراه سایر گیاهان دارویی و بومی استان در کاهش دردهای روماتیسمی بهره می‌برند.

نتایج مطالعه در جداول (۱ و ۲) و همچنین اشکال ۱، ۲ و ۳ حاکی از آن است که بیشترین حساسیت نسبی و کامل باکتریها ، مربوط به عصاره اتانولی است (۷۸/۸ درصد)، فقط ۲۱/۱ درصد باکتریها نسبت به عصاره جوشانده حساسیت داشتند و عصاره آبی اندام‌ها با ۹/٦ درصد حساسیت، عملا بی‌تاثیر بودند (در $P<0.001$ کاملاً معنی‌دار است).

جدول ۱: حساسیت باکتریهای مورد مطالعه نسبت به عصاره های مختلف ریشه گیاه *Peganum harmala* L.

(قطر هاله عدم رشد باکتری بر حسب میلی متر)

عصاره / باکتری	آبی		جوشانده		اتانولی	
	دیسک	چاهک	دیسک	چاهک	دیسک	چاهک
Staphylococcus aureus	-	-	-	۹	۱۱	۱٤
Staphylococcus epidermis	-	-	-	۹	۱۲	۱۳
Micrococcus loteus	-	-	-	-	۱۳	۱۵
Listeria monocytoginesis	-	-	-	-	۱۲	۱۸
Entrococcus faecalis	-	-	-	-	-	۱۲
Basillus licheniformis	-	-	-	۱۰	۱۳	۱۹
Mycobacterium bovis	-	-	-	-	-	۱۱
Pseudomonas aeroginosa	-	-	-	-	-	-
Salmonella typhimurium	-	-	-	-	-	-
Shigella dysentria	-	-	-	-	۹	۱۳
Kelebsiella pnumonie	-	-	-	-	۱۱	۱٤
Proteus mirabilis	-	-	-	-	-	-
Escherchia coli	-		-	-	-	۱۲

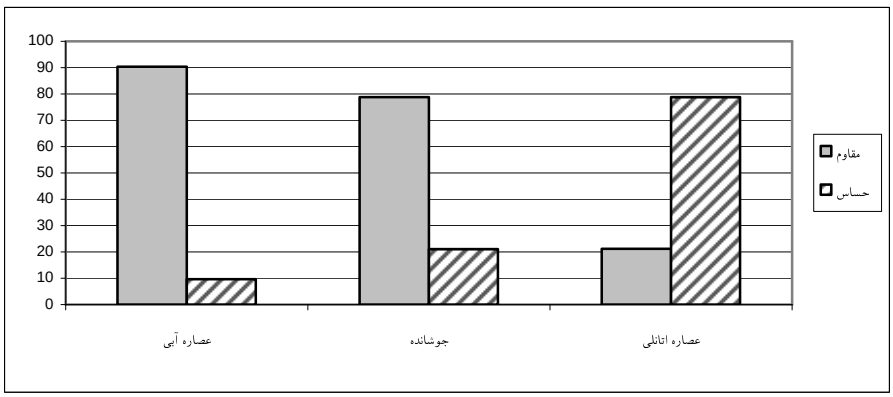
جدول ۲: حساسیت باکتریهای مورد مطالعه نسبت به عصاره های مختلف دانه گیاه *Peganum harmala* L.

(قطر هاله عدم رشد باکتری بر حسب میلی متر)

عصاره / باکتری	آبی		جوشانده		اتانولی	
	دیسک	چاهک	دیسک	چاهک	دیسک	چاهک
Staphylococcus aureus	-	-	-	۱۲	۱۶	۲۱
Staphylococcus epidermis	-	-	-	۱۳	۱۶	۲۵
Micrococcus loteus	-	۹	-	۱۰	۱۹	۲۶
Listeria monocytoginesis	-	-	-	-	۱۶	۲۸
Entrococcus faecalis	-	-	-	-	۱۲	۱۹
Basillus licheniformis	-	۱۰	-	۱۲	۲۱	۲۹
Mycobacterium bovis	-	-	-	-	۱۲	۱۳
Pseudomonas aeroginosa	-	-	-	-	۸	۱۰
Salmonella typhimurium	-	-	-	۱۰	۱۲	۱۸
Shigella dysentria	-	۱۰	-	۱۲	۱۳	۲۳
Kelebsiella pnumonie	-	۱۱	-	۱۳	۱۶	۲۲
Proteus mirabilis	-	-	-	-	-	۱۵
Escherchia coli	-	۹	-	۱۰	۱۲	۲۰

جدول ۳: متوسط میانگین حساسیت باکتری‌های مورد مطالعه نسبت به نوع عصاره‌های مختلف گیاه *Peganum harmala* L.

نوع عصاره / میزان حساسیت	عصاره آبی	جوشانده	عصاره اتانولی
مقاوم	٪۹۰/٤	٪۷۸/۸	٪۲۱/۲
نسبتا حساس	٪۹/٦	٪۱۱/۵	٪۹/٦
حساس	٪۰	٪۹/٦	٪٦۹/۲

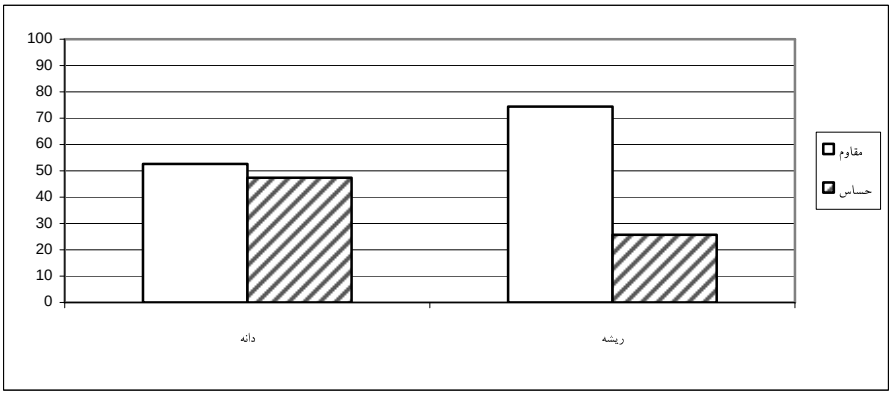


شکل ۱: میزان حساسیت باکتری‌ها ی مورد مطالعه نسبت به عصاره‌های مختلف گیاه

نتایج جداول ۱، ۲ و ٤ و نمودار ۲ نشان می‌دهد که میزان اثر بخشی (حساس یا نسبتاً حساس) عصاره دانه‌ها (٤٧/٤درصد) و ریشه (۲۵/۷ درصد) بیشتر از سایر اندام‌های گیاه بوده است، به عبارتی عصاره سایر اندام‌ها عملا بی اثر بودند. تفاوت اثر مهاری در عصاره دانه به نسبت سایر گروه‌ها معنی‌دار بوده است (P=0.01).

جدول ٤: میزان حساسیت باکتری‌های مورد مطالعه نسبت به عصاره‌های اندام‌های مختلف گیاه *Peganum harmala* L.

اندام‌های گیاه / میزان حساسیت	دانه	ریشه	ساقه	برگ	گل
مقاوم	٪۵۲/٦	٪۷٤/٤	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۱۰۰
نسبتا حساس	٪۱۱/۵	٪۹/۰	-	-	-
حساس	٪۳۵/۹	٪۱٦/۷	-	-	-

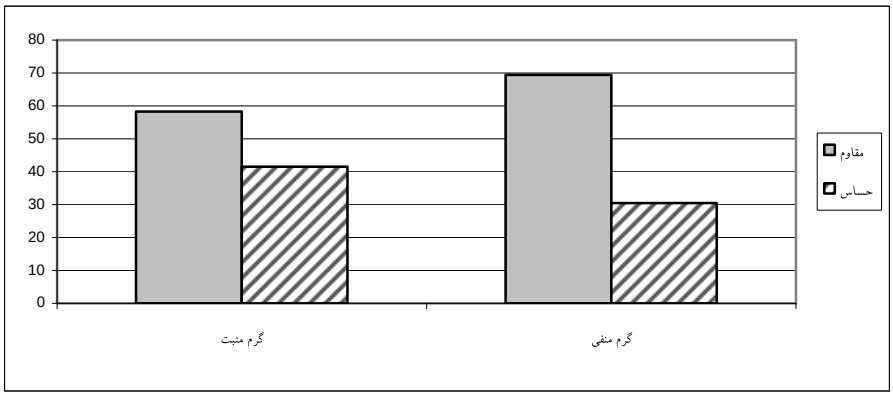


شکل ۲: میزان حساسیت باکتری‌ها نسبت به عصاره اندام‌های ریشه و دانه گیاه

نتایج حاکی از آن است که باکتری *Bacillus licheniformis* با ۵۸/٤ درصد، از بالاترین میزان حساسیت و باکتری‌های *Staphylococcus aureus*، *Staphylococcus epidermisis*، *Micrococcus loteus*، *Salmonella typhi* و *Shigella dysentria* هر کدام با ۵۰درصد حساسیت (یا حساسیت نسبی)، از حساسترین باکتری‌های مورد مطالعه، و باکتری‌های *Pseudomonas aeroginosa*, *Proteus loteus* هریک با ۹۱/۷ درصد مقاومت از مقاوم ترین باکتری‌های مورد مطالعه بودند. در طبقه بندی باکتریها به دو گروه گرم مثبت و گرم منفی مشخص گردید که حساسیت گرم مثبت ها بیش از انواع گرم منفی میباشد(جدول۵) ولی این تفاوت از نظر آماری معنی دار نمی باشد(P>0.05)

جدول ۵: متوسط میانگین حساسیت باکتری‌های گرم مثبت و منفی، نسبت به عصاره‌های اندام‌های مختلف گیاه *Peganum harmala* L.

باکتری / میزان حساسیت	گرم مثبت	گرم منفی
مقاوم	٪۵۸/۳	٪٦۹/٤۵
نسبتا حساس	٪۹/۵	٪۱۱/۱
حساس	٪۳۲/۰	٪۱۹/٤

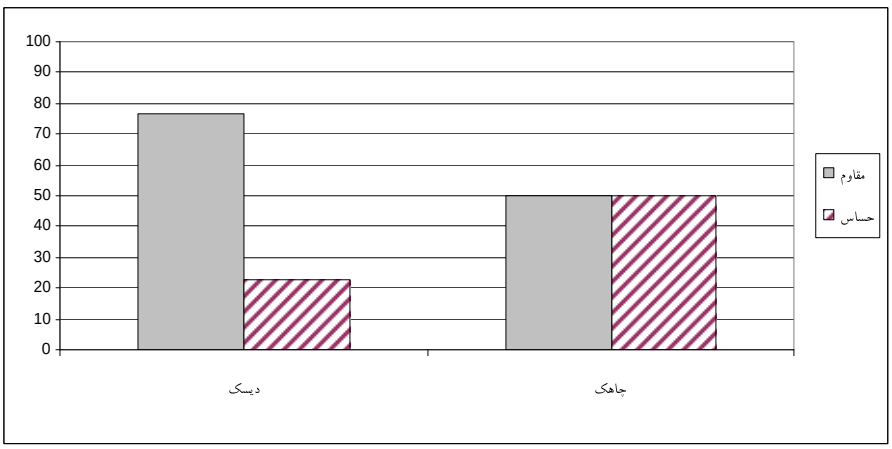


شکل ۳: میزان حساسیت باکتری‌های گرم مثبت و منفی نسبت به عصاره اندام‌های گیاه

همانطور که از نتایج جداول ۱و۲و٤- مشخص شده است، ۵۰ درصد سویه ها مخصوصا در روش چاهک نسبت به عصاره ها، حساس یا نسبتا حساس بودند، عصاره‌های ریشه و دانه‌های گیاه در روش چاهک اثر مهاری بیشتری را علیه باکتری‌های مورد مطالعه از خود نشان دادند (P=0.001 معنی دار است).

جدول ٦: میزان حساسیت باکتری‌های مورد مطالعه نسبت به عصاره‌های گیاه *Peganum harmala* L. در دو روش دیسک و چاهک

روش / میزان حساسیت	روش دیسک	روش چاهک
مقاوم	٪۷٦/۹	٪۵۰
نسبتا حساس	٪۳/۸	٪۱٦/۷
حساس	٪۱۹/۲	٪۳۳/۳



نمودار ٤: میزان حساسیت باکتری‌های مورد مطالعه در دو روش دیسک و چاهک

بحث

نتایج بررسی‌های in vitro در این تحقیق نشان داد که اثر ضد باکتریال عصاره اتانولی دانه‌ها، مخصوصاً در روش چاهک، بیشتر از سایر اندام‌ها بود. حدود ۷۸/۸ درصد از سویه‌های باکتریایی نسبت به عصاره اتانولی گیاه حساسیت نشان دادند (هیچ کدام از عصاره‌های برگ، ساقه و گل گیاه اثر مهاری نداشتند که در قسمت نتایج به آن اشاره شده است).

نتایج تحقیقات مشابه، حاکی از اثر بخشی ضد باکتریال بیشترعصاره‌های الکلی نسبت به سایر عصاره ها می‌باشد (جداول ۱ تا ۳، شکل ۱)، احتمالاً حلال‌های الکلی مثل اتانول، نقش مهمی را در جداسازی ترکیبات فعال ثانوی و دارویی گیاه ایفا نموده و کثرت آن مواد در عصاره اتانولی بر میزان اثربخشی ضد باکتریال آن موثر است (Derakhshanfar *et al*., 2009). در تحقیقی دیگر نشان دادند که عصاره اتانولی گیاه قدرت کشندگی باکتری‌ها و قارچ‌ها را دارد که علت آن را به آلکالوییدهای هارمین و هارمالین نسبت دادند و ضمنا قارچها از حساسیت بیشتری نسبت به باکتریها برخوردارند (Shahverdi *et al*., 2008; Abdel- Fattah *et al*., 1997).

درخشانفر و همکاران به اثر عصاره اتانولی اسفند به عنوان ضد باکتری و ضد قارچ نام بردند که به صورت موضعی در التیام زخم‌های پوستی و درماتیت مطرح است و البته اثر آن از عصاره کلروفرمی آن بیشتر است (Derakhshanfar *et al*., 2009).

نتیجه این تحقیق (جدول ۳ و شکل ۱) بر مبنای مطالعات مختلف مشخص می‌سازد که عصاره اتانولی بیش از عصاره آبی یا جوشانده، توانایی استخراج ترکیبات دارای فعالیت ضد میکروبی را دارا می‌باشد و احتمالاً بسیاری از ترکیبات موجود در اسفند مثل هارمین و هارمالین در حلال‌های آبی حتی بعد از جوشاندن هم حل نمی‌گردد.

نتایج ما نشان می‌دهد که میزان اثر بخشی عصاره دانه و ریشه بیشتر از سایر اندام‌های گیاه بوده است (جدول ٤ و شکل ۲). در تحقیقات مشابه نیز از دانه‌های اسفند به عنوان ضدباکتریال نام برده شد (Berrougui *et al*., 2002; Asghari *et al*., 2006; Shi *et al*., 2001).

Arshad و همکاران به اثر ضد باکتریال عصاره دانه‌های اسفند در التیام زخمهای پوستی و لزوم ادامه تحقیقات کاربردی با هدف شناسایی و فرمولاسیون داروهای موثر طبیعی و با عارضه جانبی کمتر در رفع چالش مقاومت روزافزون باکتری‌ها به آنتی بیوتیکها اشاره کردند (Astulla *et al*., 2008; Arshad *et al*., 2008; Mirzaiei et al., 2007).

شاهوردی و همکاران در این رابطه با اشاره به فراوانی وجود مواد موثره ثانوی هارمین و هارمالین دانه و ریشه گیاه، احتمالا باعث افزایش اثر ضد باکتریال گیاه شده است (Shahverdi *et al*., 2008).

اثرات ضددردی، آرام بخشی، ضد التهابی و ضدباکتریال عصاره دانه‌های اسفند به وجود آلکالوییدهای هارمین و هارمالین نسبت داده می شود (Berrougui and Herrera, 2008; Monsef *et al*., 2004).

در این تحقیق باکتری‌های گرم مثبت از حساسیت بیشتری نسبت به عصاره‌ها برخوردار بودند (جدول ۵ و شکل ۳). تحقیقات مشابه در این رابطه به حساسیت بیشتر باکتری‌های گرم مثبت نسبت به عصاره‌های گیاهان اشاره نموده‌اند (Arshad,2008; Behmanesh *et al*., 2007; Mazandarani *et al*., 2007).

مقاومت بیشتر باکتری‌های گرم منفی احتمالا به علت پیچیدگی بیشتر دیواره، وجود ترکیبات هیدروفوب غنی از چربی در دیواره این باکتریها و عدم امکان ورود عصاره گیاه به داخل سلول باکتری است، حال آنکه باکتری‌های گرم مثبت دارای دیواره‌های یک دست وآسیب پذیر در مقابل آنتی بیوتیک‌ها و مواد ضدمیکروبی می‌باشند در نتیجه حساسیت بیشتری به عصاره ها از خود

نشان می‌دهند. Mazandarani و همکاران (۲۰۰۷) و Behmanesh و همکاران (۲۰۰۷) اذعان داشتند که باکتری‌های گرم مثبت، به دلیل یک لایه‌ای بودن دیواره، نسبت به باکتری‌های گرم منفی از حساسیت بیشتری نسبت به عصاره اتانولی دانه‌های اسفند برخوردارند.

نتایج مطالعه ما (جداول ۱و۲) مشابه یافته‌های شاهوردی نشان داد که عصاره دانه‌های اسفند اثر مهاری بر باکتری‌های گرم مثبت (*S. aureus & S. epidermidis*) داشته، ولی بر *E.coli, Pseudomonas aeroginosa* اثر مهاری ندارد (Shahverdi *et al*., 2008). این در حالی است که ارشد و همکاران نشان دادند، عصاره دانه‌های اسفند در شرایط in vitro، علیه باکتری گرم منفی *E.coli* اثر داشته و نتایج حاکی از اثر آلکالوییدهای عصاره دانه به عنوان ضدباکتری و آنتی بیوتیک بود (Arshad *et al.*, 2008).

باکتری *Mycobacterium* در این تحقیق با قطر هاله عدم رشد ۱۳ میلیمتر، از حساسیت محدودی نسبت به عصاره اتانولی دانه‌ها برخوردار بود (جدول ۲)، در این رابطه Gantam و همکاران از عصاره اتانولی دانه‌های اسفند به عنوان داروی کشنده باکتری *Mycobacterium tubercolosis* عامل بیماری سل نام بردند (Gantam *et al*., 2007). و این موضوع در تایید مصرف دوده دانه‌های گیاه در درمان و پیشگیری از سل نزد مردم ترکمن مطرح است.

نتایج این مطالعه نشانگر کارائی بالاتر روش چاهک در ارزیابی اثر ضد میکروبی عصاره‌ها، به نسبت روش دیسک میباشد.یکی از دلایل احتمالی این پدیده حجم بالاتر عصاره ها در روش چاهک می‌باشد، ولی باید بخاطر داشت که محلول موجود در چاهک در کل محیط اطراف خود (سطح بالائی و داخل آگار پخش می‌گردد و نمیتوان فرض کرد که تمام عصاره با باکتری مجاور بوده است و شاید به همین دلیل است که در روشهای استاندارد برای آنتی بیوگرام ،استفاده از روش دیسک پیشنهاد می‌گردد. یکی دیگر از دلایل احتمالی، این است که در عصاره های تام ممکن است پخش از طریق دیسک بخوبی انجام نگردد و به همین دلیل روش چاهک پاسخهای مناسبتری ارائه می دهد .

نتیجه گیری نهایی

نتایج ما نشان داد که عصاره اتانولی دانه اسفند، اثر ضدمیکروبی مناسبی علیه باکتری‌های گرم مثبت و بعضی از باکتری‌های گرم منفی بیماریزا دارد. که این امر می‌تواند در تایید کاربرد سنتی آن باشد. شناسایی مهمترین مواد موثره ثانوی دانه‌ها و همچنین مقایسه عملکرد آن مواد در اندامها و رویشگاه‌های مختلف و در مدل‌های حیوانی و بالینی پیشنهاد می‌گردد.

References

Abdel-Fattah, A.F.M., Matsumoto, K. and Murakami Y. (1997). Central serotonin level dependent changes in body temperature following adminstratin of tryptophan to pargiline- and harmalin pretreated rats. Gen Pharmacology 28, pp.405-409.

Ali, N.A.A., Julich, W.D., Kusnik, C., Lindequist, U., (2001). Screening of Yemeni medicinal plants for antibacterial and cytotoxic activity. Phytotherapy Research Journal. 42, 173- 179.

Arshad, N., Zitterl-Eglseer, K., Hasnain ,S., Hess, M., (2008). "Effect of *Peganum harmala* or its beta-carboline alkaloids on certain antibiotic resistant strains of bacteria and protozoa from poultry". Phytotherapy Research Journal. **22** (11): 1533–8.

Astulla, A., Zaima, K., Matsuno, Y., Hirasawa, Y., Ekasari, W., Widyawaruyanti, A., (2008). Alkaloids from the seeds of *Peganum harmala* showing antiplasmodial and vasorelaxant activities. Natural Medical Journal, 62:470–472.

Asghari, G., Lock wood, G., (2002). Sterospecific biotransformation by cell culture of *P. harmala*, Iranian Journal Biomedical, 6(1), 43-46.

Behmanesh, B., Heshmati, G.H., Mazandarani, M., Ghaemi, E.A., (2007). Chemical composition and anti bacterial activity from essential oil of *Artemisia sieberi* Besser *sieberi* in North of Iran. Asian Journal of Plant Sciences. 6(3):562-564.

sativa exteracts against *S. aureus, P. aeroginosa*.Pakestan Medical Sciences Journal. 21(1): 47-52.

Mazandarani, M., Yassaghi, S., Rezaei, M.B., Ghaemi, E.A., (2007). Ethnobotany and anti bacterial activity from essential oil of two endemic *Hypericum* species in North of Iran. Asian Journal of Plant Sciences. 6(2):354-358.

Mirzaie1, M., Nosratabadi, S. J.,, erakhshanfar, A., Sharifi, I.,, (2007). Antileishmanial activity of *Peganum harmala* extract on the *in vitro* growth of *Leishmania major* promastigotes in comparison to a trivalent antimony drug. Vet. Arhiv Journal. 77, 365-375,

Movafeghi, A.A; Abedini, M.; Fathiazad, F.B; Aliasgharpour, M.A; Omidi, Y., (2009). Floral nectar composition of *Peganum harmala* L.,. Natural product research Journal. 23, 301-308

Shahverdi, A.R., Ostad, S.N., Khodaee, S., Bitarafan, L., Monsef-Esfahani, H.R., Jamalifar, H., Nikavar, B., Mohseni, M., (2008). Antimicrobial and cytotoxicity potential of *Peganum harmala* smoke.Pathlogy Magazine. 4(15): 236-40.

Shi, C.C, Liao, J.F, Chen, C.F, (2001). Spasmolytic effect of three harmala alkaloids on guinea – pig isolated trachea. Pharmacol toxicology Journal. 89: 259- 264.

Shinwari, Z.K., Gilani, S.Sh., (2003). Sustainable harvest of medicinal plants at Bulashbar Nullah, Astor (Northern Pakistan), Ethnopharmacology Journal. 84. 289- 298.

Shouda, M., Osman, S., Salama, D., Ayub, A., (2008). Toxical effect of *P. harmala* leaves on the Cotton leaf worm, Spodoptera littoralis and its parasitoids microplitis. Pakistan Journal of Biological Science . 1, 546-552.

Zargari, A., (1989). Medicinal Plants ,Tehran University Press, Tehran, Iran. Vol: **1** pp. 637-639.).

Berrougui, H., Martin-Cordero, C., Khalil, A., Hmamouchi, M., Ettaib, A., , Marhuenda ,E., Herrera, M. D, (2006). Vasorelaxant effects of harmine and harmaline extracted from *Peganum harmala* L. seed's in isolated rat aorta. pharmacological research Journal. Vol 54, 150-157.

Cha, J,D., Jeong,M.R., Choi, H.J, (2005). Chemical composition and anti microbial activity of the essential oil of *Artemisia lavandulaefolia* Biochemical Journal, 71(6): 575-7.

Derakhshanfar, A., Oloumi ,M. M. , Mirzaie, M., (2009). Study on the effect of *Peganum harmala* extract on experimental skin wound healing in rat: pathological and biomechanical findings. Clinical Pathology Journal, 580-589.

Eddouks, M., Maghvani, M., Lemhardi, A., Joudad, H, (2002). Ethnopharmocoloical survey of medicinal plant for the treatment of diabete in South east region of Morocco. Journal of Ethnopharm. Vol. 82. 97-103.

Gantam, R., Saklani, A., Sanjay, M., (2007). Indian medicinal plants as a source of anti *Mycobacterial* agents. J of Ethnopharmacology. 110, 200- 234.

Hemmateenejad, B., Abbaspour, A., Maghami, H., Miri, R., Panjehshahin, M.R., (2006). Partial least squares-based multivariate spectral calibration method for simultaneous determination of beta-carboline derivatives in *Peganum harmala* seed extracts. Annual Chimical Acta Journal. 575 (2): 290–9

Kordali, S., Kotan, R., Mavi, A., (2005). Determination of the chemical composition and anti oxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculus* and *A. annuae* J.Agri food chemistry J., 30, 53 (24):9452-8.

Lamchouri, F., Settaf, A., Cherrah, Y., Hassar, M., Zemzami, M., Atif, N., Nadori, E. B. (2000). In vitro celltoxicity of *Peganum harmala* alkaloids on cancerous cell-lines. Fitoterapia Journal. **71:**50-54.

Mashhadian, N.V., Rakhshandeh, H., (2005). Antibacterial and antifungal effects of *Nigella*

.

Antibacterial survey of different extracts of *Peganum harmala* L. different parts in North east of Golestan province (Inche Borun)

Mazandarani, M[1]., Ghaemi, E.A[2]., Ghaffari, F.[3]

1. Assistant professor of Botany, Islamic Azad University of Gorgan- branch
2. Associated professor of microbiology, Golestan University of medical sciences infectious disises research center
3. Islamic Azad University of Gorgan- branch

Abstract

Peganum harmala L. belongs to Zigophyllaceae family is one of the most important medicine plants with wild distribution in stepic and semi stepic of Golestan province. In this research, after phenology ethnopharmacological data obtained from turkman rural people. Different parts of plant were collected in May to late of September 2008 in dry stepic region of North east of Golestan province (Inche Borun). Aqueous, infusion and ethanolic extract were obtained by percolation method and their antibacterial effect was evaluated by disc diffusion and well methods. Inhibition zone after 24h incubation of 37 and their antibacterial activity were assessed by Pearson chi-square ($P<0.05$). Ethnopharmacological data in this research showed, it has been used by the Turkmen rural healers in North east of Golestan province as strong anti air infection, sedative, anti bacterial and skin inflammation to treatment fungal, gastro intestinal infection and dysmenorrhea. Ethanol extracts of root and seeds had the most efficacy against tested bacteria, especially in well method ($P<0.001$), another extracts had no any antibacterial effect. 78.8% of gram positive and negative bacteria (*Bacillus licheniformis*, *Staphylococcus epidermisis*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus loteus*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysentria*) were the most sensitive bacteria against ethanol extract, but gram negative bacteria such as *Pseudomonas aeroginosa* and *Proteus loteus* were the most resistant bacteria ($P<0.001$). Rural people were interested to take seed and smok for air disinfection, sedative and calming, can be a good candid for chemical analysis of antibacterial activity in animal and clinical models for formulation and production of natural antibacterial drug.

Key Word: *Peganum harmala* L., Different extracts, Root, Seed, Anti bacterial, Golestan Province, Inch Borun