بررسی اثرات ضدمیکروبی عصاره‌های اتانولی *Robinia pseudoacacia* L. و *Phytolacca americana* L. علیه برخی از پاتوژن‌های باکتریایی انسانی

نازیلا رضا نژاد[۱]، رقیه اسکوئیان[۲*]، رابعه ایزدی آملی[۲]

[۱]کارشناسی‌ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد آیت‌اله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران

[۲]استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد آیت‌اله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران

تاریخ دریافت: ۹۹/۹/۱۲ ؛ تاریخ پذیرش: ۰۰/۵/۲۳

چکیده

گیاهان دارویی به واسطه تولید ترکیبات ضدمیکروبی می‌توانند جایگزین مناسبی برای تامین آنتی بیوتیک‌ها باشند. در این تحقیق برگ گیاهان اقاقیا (*Robinia pseudoacacia* L.) و سرخاب کولی (*Phytolacca americana* L.) در بهار ۱۳۹۵ از جنگل‌های شهرستان آمل جمع‌آوری گردید، عصاره اتانولی با استفاده از روش سوکسوله استخراج شده و سپس اثر ضدباکتریایی آن‌ها در غلظت‌های ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر بر روی سویه‌های بیماریزای *پروتئوس میرابیلیس*، *پروتئوس ولگاریس*، *استرپتوکوکوس سانگوئیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* به روش دیسک دیفیوژن و چاهک بررسی شد. حداقل میزان بازدارندگی (MIC) و حداقل میزان کشندگی (MBC) عصاره‌ها نیز تعیین شد. بیشترین میزان قطرهاله عدم رشد در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره در هر دو روش دیسک دیفیوژن و چاهک مشاهده شد. در روش دیسک دیفیوژن، عصاره اقاقیا بر باکتری‌های *پروتئوس میرابیلیس* و *پروتئوس ولگاریس* با قطرهاله عدم رشد برابر ۲۴/۶۷ میلی‌متر و عصاره سرخاب کولی بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* با ۲۷/۶۷ میلی‌متر بیشترین تاثیر را داشت. در روش چاهک نیز عصاره اقاقیا بیشترین‌هاله عدم رشد را در اطراف *پروتئوس میرابیلیس* (۲۴/۶۷ میلی متر) و عصاره سرخاب کولی در اطراف *استافیلوکوکوس اورئوس* (۲۴/۳ میلی‌متر) ایجاد کردند. مقدار MIC و MBC عصاره اقاقیا برای سویه‌های *پروتئوس ولگاریس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استرپتوکوکوس سانگوئیس* به‌طور مشابهی به‌ترتیب برابر با ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر و برای *پروتئوس میرابیلیس* ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر تعیین شدند. مقدار MIC و MBC عصاره سرخاب کولی برای *پروتئوس میرابیلیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استرپتوکوکوس سنگوئیس* به‌ترتیب در غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر و برای *پروتئوس ولگاریس* ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بودند. بنابراین، بر اساس نتایج عصاره‌های اتانولی *R. pseudoacacia* و *P. Americana* اثر ضدمیکروبی قابل قبولی به‌ویژه در غلظت ۲۰۰ mg/ml بر روی برخی از عوامل بیماری‌زای مهم باکتریایی داشتند.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌باکتریال، اقاقیا، سرخاب کولی، شمال ایران، عوامل بیماریزا

*نویسنده مسئول: ro.osko@gmail.com

مقدمه

در سالهای اخیر تحقیقات زیادی به منظور ارزیابی اثرات ضد میکروبی انواع اسانس‌ها و عصاره‌ها صورت گرفته است که حاکی از قدرت و توانائی این ترکیبات در ممانعت از رشد طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌های بیماریزا و مولد فساد در مواد غذایی می‌باشد (Adamczak et al., 2020). از طرف دیگر مصرف بی رویه آنتی بیوتیک‌ها در اغلب موارد با عوارض جانبی در بدن انسان همراه است. از آنجایی که برخی از گیاهان با اثر ضد میکروبی در فارماکوپه دارویی کشور ثبت شده‌اند، لذا می‌توان در جهت مقابله با برخی میکروب‌های بیماریزای خاص از آنها استفاده نمود تا جایگزینی بی ضرر برای بعضی از آنتی بیوتیک‌ها گردند (Chandra et al., 2017). مقاومت اکتسابی در نتیجه مواجهه با عوامل ضدمیکروبی به دست می‌آید. استفاده از خاصیت آنتی باکتریال گیاهان رویکرد جدیدی را در مقابله با مقاومتهای آنتی بیوتیکی و جایگرین شدن با آنها پیشِ رو نهاده است. گیاهان توانایی نامحدودی در سنتز ترکیبات فنلی و مشتقات آنها و انواعی از ترکیبات آروماتیک دارند. این ترکیبات، متابولیتهای ثانویه گیاهان هستند و اثرات درمانی قابل توجهی علیه ویروسها، باکتریها و قارچها دارند. بررسی ترکیبات فعال گیاهان دارویی هر منطقه جغرافیایی به منظور کشف مواد مؤثر با خاصیت ضدمیکروبی ضروری است (Zarei-Yazdeli et al., 2020; Mazandarani et al., 2012).

ایران منبع سرشاری از گونه‌های مختلف گیاهان دارویی است که در نقاط مختلف ایران به‌صورت خودرو رشد می‌کنند از بین حدود ۳۰۰۰ گونه از گیاهان دارویی که در دنیا شناخته شده حدود ۱۴۰ گونه خاص ایران است و در حال حاضر طب سنتی در ایران طرفداران بسیاری پیداکرده است (Koohsari et al., 2015). گیاه اقاقیا (*Robinia pseudoacacia* L.) از خانواده Fabaceae است و از برگ‌های آن خاصیت ملین و مخدر دارد و برای درمان عفونت‌های قارچی و باکتریایی استفاده می شود (Mozaffarian, 2013).

پژوهشگران زیادی در سال‌های اخیر به مطالعه اثرات ضدباکتریایی، ضدقارچی و ضد حشره‌کشی اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی که جزء متابولیت‌های ثانویه هستند پرداخته‌اند. این ترکیبات باعث می‌شوند که گیاهان در برابر آفات و بیماریهای گیاهی دارای نوعی دفاع شیمیایی می‌باشند. به دنبال شناخت این ویژگیها در گیاهان محققان به دنبال استخراج ترکیبات ثانویه دفاعی گیاهان رفتند (Alam et al., 2012; Mazandarani et al., 2013). غربالگری فیتوشیمیایی عصاره‌های گیاهی مختلف که دارای فعالیت ضد باکتری هستند، وجود ترکیبات مختلفی از جمله کوئرستین، کامپرول، استیگماسترول، کامپسترول، توکوفرول، کاروتنوئیدها، فیستین، میریستین، روتین، آپیژنین و بسیاری از ترکیبات فنلی دیگر را به‌عنوان ترکیبات فعال موجود در آنها نشان می‌دهد. به‌علاوه، وجود انواع مختلفی از این ترکیبات زیست فعال در گیاه *R. pseudoacacia* نیز گزارش شده است (Calina et al., 2013). پاترا و همکاران (۲۰۱۵) براساس وجود ترکیبات مختلف فعال زیستی درگیاه اقاقیا، در مجموع اثر هفت ترکیب طبیعی دارای پتانسیل ضدباکتری (اکاستین، آمیگدالین، فیستین، تاکسی‌فولین، میریستین، آپیژنین و روتین) را به‌طور جداگانه در برابر عوامل بیماری زای دهانی مورد ارزیابی قرار دادند. در بین این ترکیبات فیستین و میرستین بیشترین اثرات را بر باکتری‌های بیماریزای دهانی نشان دادند. نتایج این تحقیق اثر ضدباکتریایی عصاره گیاه اقاقیا را به دلیل وجود دو ترکیب فیستین و میرستین یا مشتقات آنها دانست و بیان داشتند که

این ترکیبات بصورت جداگانه یا هم افزایی به راحتی در سلولهای باکتریایی نفوذ می کنند و در نتیجه باعث تخریب دیواره سلول و غشای سیتوپلاسمی می شوند (Patra et al., 2015). هالمن (۲۰۲۰) به تجزیه و تحلیل و مقایسه غلظت ترکیبات فعال زیستی در دو گیاه *Robinia pseudoacacia* L. و *Robinia hispida* L. طی دو سال پرداخت و ماده خشک و محتوای پلی فنل گلها را تعیین کرد. نتایج نشان داد که نمونه‌های گل گیاه *Robinia pseudoacacia* که به نام ملخ سیاه (black locust) شناخته می شود حاوی میزان قابل توجهی میرستین و لوتئولین و گلهای این گیاه حاوی پنج نوع آنتوسیانین و ترکیبات زیستی فراوان هستند که در طب سنتی برای درمان بعضی بیماریها مورد استفاده قرار می‌گیرند (Hallmann, 2020).

عصاره برگ گیاه اقاقیا حاوی آلکالوئیدها، ساپونین‌ها، فلاونوئیدها، ترپنوئیدها و ترکیبات فنلی می باشد که هر یک به تنهایی یا در ترکیب با یکدیگر در پژوهش‌های مختلف اثر ضد میکروبی نشان داده اند. در تحقیقی میزان فنول و فلاونوئید کل گیاهان اُکالیپتوس، اقاقیا و زوفا اندازه گیری گردیدند. بر اساس نتایج به دست آمده، بیشترین فعالیت ضد باکتریایی در بین عصاره‌های کلروفرمی سه گونه گیاهی روی گونه‌های مختلف باکتری، مربوط به عصاره برگ گیاه اقاقیا و فیتول عمده ترین ترکیب تشکیل دهنده عصاره برگ این گیاه بود. با توجه به نتایج به دست آمده از این تحقیق می‌توان از عصاره‌های این سه گیاه به عنوان کاندیدای مناسبی جهت استفاده از قدرت باکتری کشی آنها در قالب برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات بهره برد (Hadadi et al., 2019).

گیاه سرخاب کولی (*Phytolacca americana* L.) به خانواده فیتولاکاسه تعلق دارد. این گیاه اثرات متعدد درمانی در اختلالات گوارشی (ایجاد تهوع، استفراغ و اثر مسهلی)، روماتیسم مزمن و ضد میکروارگانیزمی (ضد میکروبی و ضد ویروسی) و کاهش آلودگی‌های قارچی و تحریک سیستم ایمنی دارد (Kumar et al., 2014). عزیزیان شرمه و همکاران (۲۰۱۶) فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی عصاره‌های اتانولی و آبی گیاه سرخاب کولی را مورد بررسی قرار دادند و میزان فنل کل، فلاونوئیدها، آنتوسیانین، پروتئین در این گیاه را محاسبه. نتایج نشان داد که عصاره اتانولی دارای فعالیت آنتی اکسیدانی و فعالیت ضد میکروبی بیشتری نسبت به عصاره آبی است. بنابراین، عصاره اتانولی این گیاه می تواند برای درمان بیماری‌هایی که در اثر استرس‌های اکسیداتیو، باکتری‌ها و قارچ‌های بیماری زا ایجاد شده اند، استفاده شود (Azizian shermeh et al., 2016). پاترا و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که عصاره خام گیاه سرخاب کولی دارای ترکیبات طبیعی استاندارد، کامپرول، کوئرستین، کوئرستین ۳-گلوکوزید، ایزوکوئیترین و اسید فرولیک بوده و اثرات ضدباکتریایی این عصاره در برابر عوامل بیماریزا را تایید کردند. از بین آنها کامپرول و کوئرستین فعالیت ضد باکتریایی قابل توجهی در برابر پاتوژن‌های دهانی به روش وابسته به غلظت نشان دادند. این ممکن است به دلیل نفوذ آسان این ترکیبات به سلول‌های باکتری و در نتیجه اختلال در دیواره سلول و غشای سیتوپلاسمی باشد. همچنین این ترکیبات می توانند بر آنزیم‌های باکتریایی مانند ژنژیپین که مسئول بقای باکتری است تأثیر گذارند و با صدمه زدن به آنها موجب لیز سلولی شوند (Patra et al., 2014).

باکتری‌های *پروتئوس ولگاریس*، *پروتئوس میرابیلیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* از جمله عوامل مهم ایجاد عفونت در انسان به ویژه عفونت‌های بیمارستانی می باشند (Álvarez et al., 2019; Lin et al., 2019; Nakano et al., 2019). همچنین باکتری

استرپتوکوکوس سانگوئیس پاتوژن فرصت طلب و عامل ایجاد کننده پوسیدگی دهان می‌باشد. با توجه به وجود مواد فتوشیمیایی گوناگون با پتانسیل ضدباکتریایی قابل ملاحظه در گیاهان اقاقیا و سرخاب کولی از یکسو و معضل جهانی مقاومت دارویی در باکتریها از سوی دیگر، الزم است تا مطالعات آزمایشگاهی در جهت تعیین کیفیت و گستره تأثیر مواد مذکور بر میکروارگانیسمهای پاتوژن انجام پذیرد. بنابراین در این مطالعه بر آن شدیم تا اثرات ضد میکروبی عصاره این دو گیاه را بر روی سویه‌های *پروتئوس ولگاریس*، *پروتئوس میرابیلیس*، *استرپتوکوکوس سانگوئیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد بررسی قرار دهیم.

مواد و روش‌ها

جمع آوری و عصاره گیری گیاهان: برگ گیاه اقاقیا (شماره هرباریومی ۳-۲۰۱۸) و سرخاب کولی (شماره هرباریومی ۴-۲۰۱۸) در فصل بهار سال ۱۳۹۵ از جنگل‌های آمل جمع آوری و سپس توسط مرکز تحقیقات کشاورزی شهرستان ساری مورد تائید قرار گرفت. مقدار ۵۰۰ گرم از برگ گیاهان جمع آوری شده، در دمای اتاق و سایه به مدت یک هفته خشک شدند و سپس با کمک آسیاب پودر شدند. عصاره گیری به روش سوکسله انجام گردید. برای عصاره گیری پودر به دست آمده در بالن یک لیتری ریخته شده و سپس ۱ لیتر متانول به آن اضافه شد و به کمک دستگاه سوکسیله به م«دت ۷ ساعت در حرارت ۶۴ درجه سانتیگراد عصاره گیری به عمل آمد. عصاره حاصله با استفاده از کاغذ واتمن شماره ۱ فیلتر شده و با استفاده از دستگاه تبخیر کننده در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد در شرایط خلاء تغلیظ شد. سپس به وسیله دستگاه فریز درایر به عصاره پودری تبدیل گردید. حدود ۱۰۰ گرم پودر اقاقیا و سرخاب کولی به طور جداگانه همراه با ۵۰۰ سی سی اتانول مخلوط و به دور از نور نگهداری گردید. بعد از ۴۸ ساعت محلول‌ها کاغذ صافی بدون خاکستر (Ashless) عبور داده و محلول آن در ارلن جمع آوری شدند. رلن با فویل پوشیده شده و در نهایت محلول‌ها به یخچال انتقال یافته و روز بعد با دستگاه روتاری (پمپ خلا) عصاره گیری شدند (Baydar et al., 2004).

تهیه و کشت نمونه‌های میکروبی: سویه‌های باکتریایی شامل *پروتئوس میرابیلیس*، *پروتئوس ولگاریس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استرپتوکوکوس سانگوئیس* به صورت لیوفیلیزه از انستیتوپاستور ایران خریداری شدند. سویه‌های باکتریایی به محیط کشت مولر هینتون براث انتقال داده شد و سپس به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. سپس این باکتریها در محیط کشت بلاد آگار کشت خطی داده شدند و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای۳۷ درجه سلسیوس در انکوباتور قرار داده شدند تا به عنوان منبع باکتری استفاده شوند (Basti et al., 2007).

بررسی خاصیت ضدمیکروبی عصاره‌ها به روش دیسک دیفیوژن و چاهک: خاصیت ضدباکتریایی عصاره‌های اقاقیا و سرخاب کولی به دو روش انتشار دیسک (دیسک دیفیوژن) و چاهک تعیین گردید. در روش دیسک دیفیوژن، سوسپانسیون باکتریایی در محلول سرم فیزیولوژی سترون تهیه و ۰/۱ میلی‌لیتر از آن روی محیط‌های کشت نوترینت آگار و مولر هینتون آگار کشت داده و به وسیله میله شیشه‌ای استریل به طور کامل روی محیط پخش شد. بعد از خشک شدن سطح محیط، روی هر کدام از دیسک های کاغذی سترون به قطر ۶ میلیمتر، ۱۵ میکرولیتر از هر کدام از غلظتهای تهیه شده از عصاره ها (۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میلی گرم

بر میلی‌لیتر) ریخته شد. از دیسک آنتی‌بیوتیک جنتامایسین و کلرامفنیکل (۱۰میکروگرم) به عنوان شاهد مثبت و دیسک حاوی ۱۵ میکرولیتر آب مقطر سترون به عنوان شاهد منفی استفاده گردید. دیسک‌های حاوی عصاره‌ها، شاهدان مثبت و منفی در سه تکرار روی محیط کشت قرار داده شدند. تمامی ظروف پتری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۶ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شدند. با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک‌ها، حساسیت یا مقاومت باکتری های مورد نظر به عصاره‌ها تعیین شد (Saharkhiz et al., 2008). در روش چاهک، با استفاده از سواپ استریل کشت یکنواخت از سوسپانسیون میکروب در محیط کشت‌های مولر هینتون آگار باکتری‌ها در سطح پلیت انجام شد. سپس چاهک‌هایی با قطر ۶ میلی‌متر و با فاصله ی ۲/۵ سانتی متر از یکدیگر ایجاد و در هر یک از چاهک‌ها مقادیری از عصاره‌ها اضافه گردید. پس از مدت زمان ۴-۳ ساعت عصاره‌ها کاملا در داخل محیط چاهک نفوذ کرده و سپس محیط های کشت داده شده در دمای ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. در نهایت پلیت‌ها از لحاظ هاله عدم رشد مورد بررسی قرار گرفته و قطرهاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر اندازه گیری گردید (Saharkhiz et al., 2008).

تعیین MIC و MBC روی باکتری‌ها: برای آزمون تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی یا MIC از روش رقت مایع (میکرو براث دایلوشن) استفاده گردید. از سوسپانسیون نیم مک فارلند تهیه شده از کشت ۲۴ ساعته میکروارگانیسم رقت‌های ۰/۱ و سپس ۰/۰۱ تهیه شد تا تعداد تقریبی 10^6 میکروارگانیسم در هر میلی‌لیتر از سوسپانسیون حاصل شود. برای انجام این آزمایش از محیط کشت مولر هینتون براث و میکروپلیت‌های ۹۶ خانه ای ته گرد استفاده شد. به‌طوری که، در خانه‌های ردیف اول پلیت فقط محیط کشت و سوسپانسیون باکتری، در ردیف بعدی مقدار ۱۰۰ میکرولیتر محیط مایع مغذی مولر هینتون براث، و به خانه اول ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره گیاه و به ترتیب به خانه‌های بعدی غلظت‌های ۶/۲۵، ۱۲/۵،۲۰۰،۱۰۰،۵۰،۲۵ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر اضافه گردید. سپس به هر چاهک ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری اضافه شد و محتویات هر چاهک ۲ دقیقه بوسیله شیکر تکان داده شد تا مخلوط شود. تمامی آزمایشات در ۳ تکرار انجام شدند. برای هر تکرار یک لوله شاهد منفی فاقد باکتری و یک لوله شاهد مثبت و فاقد اسانس تهیه شد. سپس محیط در دمای ۳۰-۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شده و بعد از گرمخانه گذاری با توجه به رشد و کدورت ایجاد شده در لوله‌ها کمترین رقت از عصاره که کدورتی در آن مشاهده نشد به صورت چشمی مورد ارزیابی قرار گرفته به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی یا MIC گزارش شد. این آزمایش در سه تکرار جداگانه انجام گرفته و میانگین ۳ تکرار برای هر چاهک برای تعیین کمترین غلظت بازدارنده مورد ارزیابی قرار گرفت. تمام لوله‌هایی که رشد باکتری در آنها کاملا متوقف شده بود در پلیت‌های حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شدند و سپس ۲۴ ساعت در دمای۳۷ درجه انکوبه شدند و غلظت‌هایی که فاقد رشد باکتری بودند به عنوان MBC گزارش شدند (Mahon et al., 2000).

تجزیه و تحلیل آماری

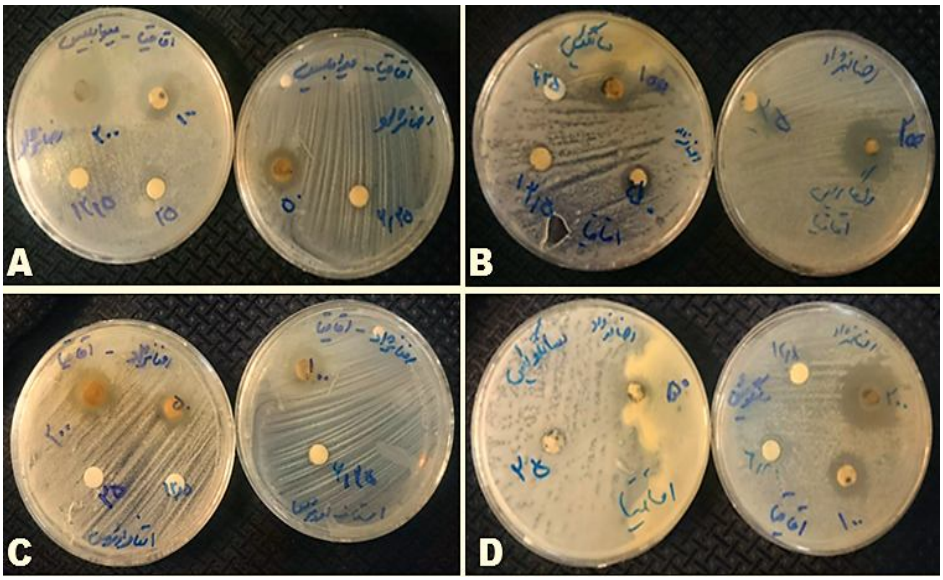
در این تحقیق، تست واریانس یکطرفه (One-Way-ANOVA) و واریانس تک متغیره در سطح احتمال ($p<۰/۰۵$) برای مقایسه بین گروه‌های مختلف استفاده گردید. همچنین مقایسه میانگین‌ها با استفاده از روش آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال ($p<۰/۰۵$)

مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار SPSS انجام شد.

نتایج

فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌های گیاهی به روش دیسک دیفیوژن:

نتایج اثر غلظت های مختلف عصاره گیاه اقاقیا بر روی قطرهاله عدم رشد باکتری‌های مورد مطالعه در جدول ۱ نشان داده شده است. به طور کل با افزایش غلظت عصاره گیاه، قطرهاله عدم رشد نیز در تمام سویه‌ها افزایش یافته بود. به طوریکه بیشتری تاثیر بازدارندگی رشد سویه‌ها در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرمی عصاره و کمتر تاثیر در غلظتهای ۱۲/۵ و ۶/۲۵ میلی‌گرمی عصاره مشاهده گردید. بیشترین قطرهاله عدم رشد بر روی باکتری *پروتئوس میرابیلیس* توسط آنتی بیوتیک کلرامفنیکل و غلظت ۲۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر از عصاره حاصل گردید (شکل 1A). بیشترین قطرهاله عدم رشد باکتری *پروتئوس ولگاریس* به ترتیب مربوط به آنتی بیوتیک کلرامفنیکل (۳۱/۳۳ میلی‌متر) و غلظت‌های ۲۰۰ (۲۴/۶۷ میلی‌متر) و ۱۰۰ میلی گرم (۱۸/۶۷ میلی‌متر) بوده است (شکل 1B). آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل و جنتامایسین به ترتیب باهاله‌های عدم رشد ۳۵/۳۳ میلی‌متر و ۲۷/۶۷ میلیمتر قویترین تاثیر را بر روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* داشتند. غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره گیاه اقاقیا تاثیر ضعیفتری در مقایسه با هر دو آنتی بیوتیک بر روی این سویه (با قطرهاله عدم رشد ۱۵/۶۷ میلی‌متر) نشان داد (شکل 1C). آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل و غلظت ۲۰۰ میلی‌گرمی عصاره به ترتیب با قطرهاله عدم رشد ۲۸/۳۳ میلی‌متر و ۲۲/۶۷ میلی‌متر بیشتری تاثیر را بر روی باکتری *استرپتوکوکوس سانگوئیس* داشتند (شکل 1D). میانگین‌های مربوط به اثر غلظت‌های مختلف عصاره گیاه سرخاب‌کولی بر روی سویه‌های مختلف در جدول ۲ نشان داده شده است. بیشترین قطرهاله عدم رشد *پروتئوس میرابیلیس* به ترتیب توسط آنتی بیوتیک کلرامفنیکل (۲۴/۳۳ میلی متر)، جنتامایسین (۱۳ میلی‌متر) و غلظت ۲۰۰ میلی‌گرمی عصاره گیاه سرخاب کولی (۱۱/۶۷ میلی متر) حاصل گردید (شکل 2A). بیشترین قطرهاله عدم رشد باکتری *پروتئوس ولگاریس* به ترتیب مربوط به آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل (۳۰ میلی‌متر)، غلظت ۲۰۰ عصاره گیاه سرخاب کولی (۱۷/۶۷ میلی متر) و سپس جنتامایسین (۱۶/۳۳ میلی‌متر) بود (شکل 2B). نتایج مقایسه میانگین مربوط به اثر غلظت‌های عصاره و آنتی بیوتیک روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داد که بیشترین قطرهاله عدم رشد مربوط به آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل باهاله ۳۴ میلی‌متر، سپس جنتامایسین (۲۸ میلی‌متر) و غلظت ۲۰۰ میلی‌گرمی عصاره گیاه سرخاب کولی (۱۷/۶۷ میلی متر) بوده است (شکل 1C). بیشترین قطرهاله عدم رشد *استرپتوکوکوس سانگوئیس* مربوط به غلظت ۲۰۰ می گرم بر میلی‌لیتر از عصاره و آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل به ترتیب باهاله‌های ۲۷/۶۷ و ۲۷ میلی‌متر بوده است (شکل 2D).



شکل ۱: تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره گیاه اقاقیا و آنتی بیوتیک بر روی تشکیل‌هاله عدم رشد باکتری‌های *پروتئوس میرابیلیس* (A)، *پروتئوس ولگاریس* (B)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (C) و *استرپتوکوکوس سانگوئیس* (D) در محیط مولر هینتون آگار

جدول ۱: میانگین تیمارهای مورد بررسی (غلظت‌های مختلف عصاره اقاقیا و آنتی‌بیوتیک‌ها) بر روی باکتری‌های پاتوژن مورد مطالعه به روش دیسک دیفیوژن

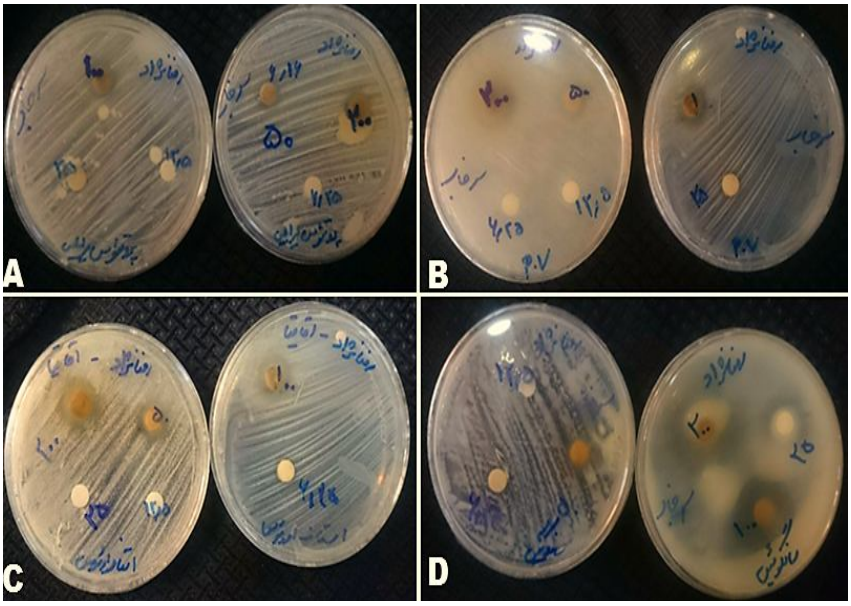
باکتری	میانگین							
	۶/۲۵	۱۲/۵	۲۵	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	جنتامایسین	کلرامفنیکل
پروتئوس میرابیلیس	۱/۶۷^{E}	۳/۶۷^{E}	۶/۶۷^{D}	۱۴/۶۷^{B}	۱۴/۳۳^{B}	۲۴/۶۷^{A}	۱۰/۳۳^{C}	۲۵^{A}
پروتئوس ولگاریس	۱/۳۳^{G}	۲/۳۳^{F}	۴/۶۷^{E}	۱۰/۶۷^{D}	۱۸/۶۷^{C}	۲۴/۶۷^{B}	۱۹/۳۳^{C}	۳۱/۳۳^{A}
استافیلوکوکوس اورئوس	۱/۳۳^{H}	۳/۳۳^{G}	۵/۶۷^{F}	۱۲/۳۳^{E}	۱۴/۶۷^{D}	۱۵/۶۷^{C}	۲۸/۶۷^{B}	۳۵/۳۳^{A}
استرپتوکوکوس سانگوئیس	۱/۳۳^{G}	۲/۳۳^{G}	۳/۶۷^{F}	۶/۳۳^{E}	۱۵^{D}	۲۲/۶۷^{B}	۲۱/۳۳^{C}	۲۸/۳۳^{A}

جدول ۲: نتایج مقایسات میانگین تیمارهای مورد بررسی (غلظت‌های مختلف عصاره سرخاب‌کولی و آنتی‌بیوتیک‌ها) بر روی باکتری‌های پاتوژن مورد مطالعه به روش دیسک دیفیوژن

باکتری	میانگین							
	۶/۲۵	۱۲/۵	۲۵	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	جنتامایسین	کلرامفنیکل
پروتئوس میرابیلیس	۱/۶۷^{G}	۲/۳۳^{G}	۴/۶۷^{F}	۸/۶۷^{E}	۱۰/۳۳^{D}	۱۱/۶۷^{C}	۱۳^{B}	۲۴/۳۳^{A}
پروتئوس ولگاریس	۲^{G}	۴/۳۳^{F}	۷/۶۷^{E}	۱۲/۳۳^{D}	۱۵/۳۳^{C}	۱۷/۶۷^{B}	۱۷/۳۳^{B}	۳۰^{A}
استافیلوکوکوس اورئوس	۱/۳۳^{G}	۲^{G}	۶/۶۷^{F}	۱۲/۳۳^{E}	۱۵/۳۳^{D}	۱۷/۶۷^{C}	۲۸^{B}	۳۴^{A}
استرپتوکوکوس سانگوئیس	۱/۶۷^{G}	۴/۶۷^{F}	۱۲/۶۷^{E}	۱۴/۶۷^{D}	۲۳/۳۳^{B}	۲۷/۶۷^{A}	۱۹/۶۷^{C}	۲۷^{A}

فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌های گیاهی به روش چاهک: نتایج اثر غلظت‌های مختلف عصاره گیاه اقاقیا بر روی قطرهاله عدم رشد باکتری‌های مورد مطالعه در جدول ۳ نشان داده شده است. بیشترین قطرهاله عدم رشد *پروتئوس میرابیلیس* مربوط به غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم از عصاره (۲۴/۶۷ میلی‌متر) و سپس و آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل (۲۴ میلی‌متر) بوده است (شکل 3A). در مورد باکتری *پروتئوس ولگاریس* و *استرپتوکوکوس سانگوئیس* قویترین اثر بازدارندگی رشد به ترتیب مربوط به آنتی‌بیوتیک

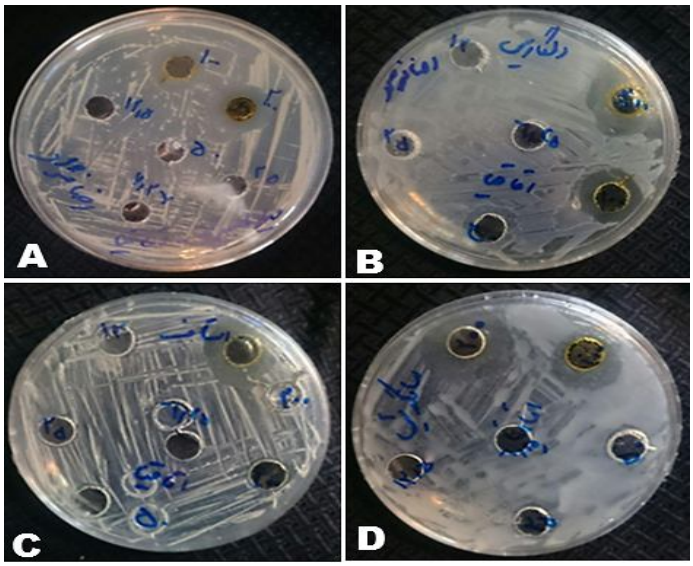
کلرامفنیکل، غلظت ۲۰۰ میلی‌گرمی عصاره و سپس جنتامایسین بوده است (شکل 3B و 3D). در مورد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشترین اثر بازدارندگی به ترتیب مربوط به آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل (۳۴/۳۳ میلی‌متر)، جنتامایسین (۲۸/۳۳ میلی‌متر) و سپس غلظت ۲۰۰ میلی گرمی عصاره (۱۷/۶۷ میلی متر) بوده است (شکل 3C). نتایج اثر غلظت‌های مختلف عصاره گیاه سرخاب‌کولی بر روی قطرهاله عدم رشد باکتری‌های مورد مطالعه به روش چاهک در جدول ۴ نشان داده شده است. در مورد سویه‌های *پروتئوس میرابیلیس*، *پروتئوس ولگاریس* و *استرپتوکوکوس سانگوئیس* قویترین اثر بازدارندگی رشد به ترتیب مربوط به آنتی بیوتیک کلرامفنیکل، غلظت ۲۰۰ میلی‌گرمی عصاره و سپس جنتامایسین بوده است (شکل 4A، 4B و 4D). در مورد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشترین اثر بازدارندگی به‌ترتیب مربوط به آنتی بیوتیک کلرامفنیکل (۳۴/۶۷ میلی‌متر)، جنتامایسین (۲۸/۶۷ میلی‌متر) و سپس غلظت ۲۰۰ میلی گرمی عصاره (۲۴/۳۳ میلی متر) بوده است (شکل 4C).



شکل ۲: تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره گیاه سرخاب‌کولی و آنتی بیوتیک بر روی تشکیل‌هاله عدم رشد باکتری‌های *پروتئوس میرابیلیس* (A)، *پروتئوس ولگاریس* (B)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (C) و *استرپتوکوکوس سانگوئیس* (D) در محیط مولر هینتون آگار

جدول ۳: نتایج مقایسات میانگین تیمارهای مورد بررسی (غلظت‌های مختلف عصاره اقاقیا و آنتی‌بیوتیک‌ها) بر روی باکتری‌های پاتوژن مورد مطالعه به روش چاهک

باکتری	میانگین							
	۶/۲۵	۱۲/۵	۲۵	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	جنتامایسین	کلرامفنیکل
پروتئوس میرابیلیس	$۱/۳۳^{F}$	$۲/۳۳^{F}$	$۴/۳۳^{E}$	$۶/۶۷^{D}$	$۱۲/۳۳^{B}$	$۲۴/۶۷^{A}$	$۱۰/۶۷^{C}$	۲۴^{A}
پروتئوس ولگاریس	$۱/۳۳^{H}$	$۲/۳۳^{G}$	$۴/۶۷^{F}$	$۸/۶۷^{E}$	$۱۴/۶۷^{D}$	$۱۹/۶۷^{B}$	$۱۸/۶۷^{C}$	$۳۰/۶۷^{A}$
استافیلوکوکوس اورئوس	$۱/۳۳^{H}$	$۲/۳۳^{G}$	$۳/۶۷^{F}$	$۷/۶۷^{E}$	$۱۲/۳۳^{D}$	$۱۷/۶۷^{C}$	$۲۸/۳۳^{B}$	$۳۴/۳۳^{A}$
استرپتوکوکوس سانگوئیس	$۱/۳۳^{G}$	$۲/۳۳^{G}$	$۵/۶۷^{F}$	$۹/۶۷^{E}$	$۱۵/۶۷^{D}$	$۲۲/۶۷^{B}$	$۲۰/۳۳^{C}$	۲۷^{A}

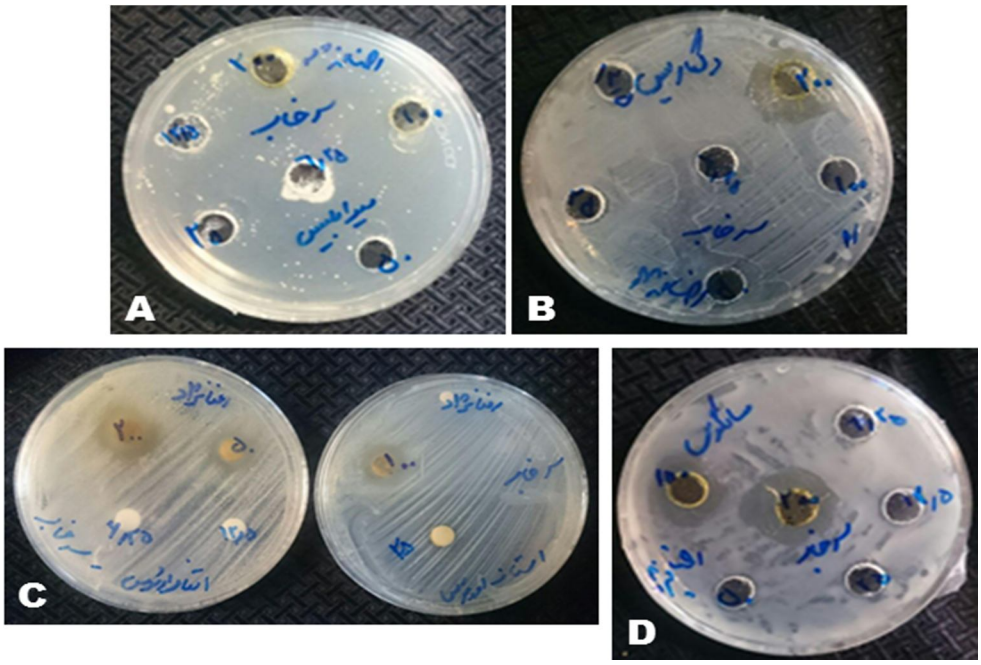


شکل ۳: تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره گیاه اقاقیا و آنتی بیوتیک بر روی تشکیل‌هاله عدم رشد باکتری‌های *پروتئوس میرابیلیس* (A)، *پروتئوس ولگاریس* (B)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (C) و *استرپتوکوکوس سانگوئیس* (D) به روش چاهک

جدول ٤: نتایج مقایسات میانگین تیمارهای مورد بررسی (غلظت‌های مختلف عصاره سرخاب‌کولی و آنتی‌بیوتیک‌ها) بر روی باکتری‌های پاتوژن مورد مطالعه به روش چاهک

باکتری	میانگین							
	۶/۲۵	۱۲/۵	۲۵	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	جنتامایسین	کلرامفنیکل
پروتئوس میرابیلیس	۱/۳۳^{G}	۲/۳۳^{FG}	۲/۶۷^{F}	۴/۶۷^{E}	۸^{D}	۱۲/۳۳^{B}	۱۱^{C}	۲۳/۶۷^{A}
پروتئوس ولگاریس	۲/۳۳^{G}	۳/۳۳F	۵/۳۳^{E}	۸/۳۳^{D}	۱۲/۳۳^{C}	۱۷/۳۳^{B}	۱۷/۶۷^{C}	۳۱^{A}
استافیلوکوکوس اورئوس	۳/۳۳^{H}	۵/۳۳^{G}	۹/۳۳^{F}	۱۴/۳۳^{E}	۱۷/۶۷^{D}	۲۴/۳۳^{C}	۲۸/۶۷^{B}	۳۴/۶۷^{A}
استرپتوکوکوس سانگوئیس	۱/۶۷^{H}	۳/۳۳^{G}	۷^{F}	۱۲^{E}	۱۶/۶۷^{D}	۲۱/۳۳^{B}	۱۹/۶۷^{C}	۲۶/۶۷^{A}

مقایسه MIC و MBC عصاره گیاه اقاقیا و سرخاب‌کولی علیه سویه‌های مورد مطالعه: میانگین نتایج MIC و MBC عصاره‌های گیاه اقاقیا و سرخاب کولی به ترتیب در جداول ۵ و ۶ نشان داده شده است. در حالیکه مقادیر MIC و MBC عصاره گیاه اقاقیا برای باکتری *پروتئوس میرابیلیس* به ترتیب ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است، این مقادیر برای عصاره سرخاب کولی به ترتیب برابر با ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر بوده است. لذا عصاره سرخاب کولی اثر قویتری بر روی این سویه باکتریایی در مقایسه با عصاره اقاقیا نشان داد. اما بر عکس، مقادیر MIC و MBC عصاره گیاه اقاقیا برای باکتری *پروتئوس ولگاریس* به ترتیب ۲۵ و ۵۰ میلی گرم بر میلی‌لیتر و برای عصاره سرخاب کولی به ترتیب برابر با ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر بوده است. لذا عصاره اقاقیا اثر قویتری بر روی این سویه باکتریایی در مقایسه با عصاره اقاقیا نشان داد. تفاوت معنی داری در مقدار MIC و MBC هر دو عصاره گیاهی بر روی سویه‌های استاف اورئوس و *استرپتوکوکوس سانگوئیس* مشاهده نگردید.



شکل ٤: تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره گیاه سرخاب‌کولی و آنتی بیوتیک بر روی تشکیل‌هاله عدم رشد باکتری‌های *پروتئوس میرابیلیس* (A)، *پروتئوس ولگاریس* (B)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (C) و *استرپتوکوکوس سانگوئیس* (D) به روش چاهک

جدول ۵: نتایج تاثیر غلظت‌های عصاره اقاقیا روی پاتوژن‌های مورد مطالعه در روش MIC و MBC

باکتری	غلظت‌های عصاره						MIC	MBC
	۶/۲۵	۱۲/۵	۲۵	۵۰	۱۰۰	۲۰۰		
پروتئوس میرابیلیس	+	+	+	–	–	–	۵۰	۱۰۰
پروتئوس ولگاریس	+	+	–	–	–	–	۲۵	۵۰
استافیلوکوکوس اورئوس	+	+	–	–	–	–	۲۵	۵۰
استرپتوکوکوس سانگوئیس	+	+	–	–	–	–	۲۵	۵۰

+رشد میکرواورگانیسم؛ -عدم رشد میکرواورگانیسم

جدول ٦: نتایج تاثیر غلظت‌های عصاره سرخاب‌کولی روی پاتوژن‌های مورد مطالعه در روش MIC و MBC

باکتری	غلظت‌های عصاره						MIC	MBC
	۶/۲۵	۱۲/۵	۲۵	۵۰	۱۰۰	۲۰۰		
پروتئوس میرابیلیس	+	+	–	–	–	–	۲۵	۵۰
پروتئوس ولگاریس	+	+	+	–	–	–	۵۰	۱۰۰
استافیلوکوکوس اورئوس	+	+	–	–	–	–	۲۵	۵۰
استرپتوکوکوس سانگوئیس	+	+	–	–	–	–	۲۵	۵۰

+رشد میکرواورگانیسم؛ -عدم رشد میکرواورگانیسم

بحث

در این مطالعه اثرات ضد میکروبی عصاره گیاهان اقاقیا و سرخاب کولی بر روی چندین سویه بیماریزا مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج تحقیق ما نشان داد که عصاره دو گیاه اقاقیا و سرخاب کولی، به ویژه در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرمی تاثیر قابل قبولی بر روی مهار

رشد سویه‌های میکروبی مورد نظر داشته است (جدول ۱و ۲و ۳و ۴). نتایج بررسی اثرات ضد باکتریایی عصاره گیاهی اقاقیا به روش دیسک دیفیوژن و چاهک نشان داد که بیشترین اثر ضد باکتریایی عصاره‌های گیاهی در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرمی و کمترین اثر آنها در غلظت‌های ۱۲/۵ و ۶/۲۵ میلی‌گرمی مشاهده گردید. در برخی موارد عصاره اقاقیا و سرخاب کولی تا حدودی تاثیر مهارکنندگی قویتری در مقایسه با آنتی بیوتیک کلرامفنیل و جنتامایسین نشان دادند (جدول ۱و ۲و ۳و ۴). مقایسه مقدار MIC و MBC بدست آمده از تاثیر هر دو عصاره گیاهی نشان داد که عصاره گیاه اقاقیا بیشترین تاثیر را بر روی سویه‌های *پروتئوس ولگاریس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استرپتوکوکوس سانگوئیس*، در حالیکه عصاره گیاهی سرخاب کولی بیشترین اثر مهارکننده گی را بر روی سویه‌های *پروتئوس میرابیلیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استرپتوکوکوس سانگوئیس* داشت (جدول ۵ و ۶). این نتایج دال بر این می باشد که عصاره‌های هر دو گیاه در غلظتهای بالاتر تاثیر ضدمیکروبی قابل قبولی در مقایسه با آنتی بیوتیکهای مورد مطالعه بر روی سویه‌های مورد نظر داشته و می توانند به عنوان یک جایگزین بیشتر مورد بررسی قرار گیرند.

مکانیسم اثر ضدمیکروبی عصاره‌ها در از بین بردن باکتری‌ها احتمالا به خاطر خاصیت آب گریزی مواد موجود در عصاره‌ها می باشد که منجر می‌شود آنها در بخش‌های لیپید دیواره و میتوکندری باکتری توزیع شده و موجب تغییر و تخریب ساختمان و نفوذ پذیری بیشتر آن‌ها گردد. سپس بخش زیادی از محتویات حیاتی و یون‌ها به بیرون تراوش و در نهایت به مرگ باکتری‌ها منجر می‌شود (Lin et al., 2019; Saharkhiz et al., 2008). چندین مطالعه ترکیبات موجود در عصاره و اثر ضدمیکروبی عصاره گیاهان اقاقیا و سرخاب کولی، را علیه چند سویه بیماریزا مورد مطالعه قرار دادند. برای مثال ویچ و همکاران با بررسی روی گیاه اقاقیا نشان دادند که برگ این گیاه حاوی فلاونوئیدها از جمله روبینین (کامپرول-۳-رامنوزیل-گالاکتوزیل-۷-رامنوزید)، آکاستین-۷-او-روتوزید، آپیژنین، دیوسمتین، لوتئولین، سکوندیفلرول، مکرونولاتول، ایزوومکرونولاتول و ایزومکرونولاتول که از اهمیت دارویی برخوردار هستند (Veitch et al., 2010). در تحقیقی حسینی‌هاشمی و همکاران در بررسی فعالیت‌های ضدقارچی و آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های چوب میانی، پوست و برگ اقاقیا، گزارش کردند که عصاره‌های فوق دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیش از ۹۰ درصد می‌باشند. همچنین عصاره حاصل از چوب میانی اقاقیا فعالیت ضد قارچی قابل قبولی علیه سویه *Trametes versicolor* داشت (Hosseini Hashemi et al., 2006). در مطالعه‌ای، روسیو و همکاران فعالیت ضد قارچی و ضد باکتریایی عصاره الکلی گیاه اقاقیا را علیه باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم و حساس به متی‌سیلین، *استرپتوکوکوس پیوژنز*، *اشریشیا کلی*، *پروتئوس ولگاریس* و *کاندیدا آلبیکانس* به روش دیسک دیفیوژن بررسی کردند (Rosu et al., 2012). نتایج آنها نشان داد که عصاره‌های حاصل از بخش‌های مختلف گیاه اقاقیا فعالیت ضدباکتریایی متفاوتی داشتند. عصاره‌های گل‌ها و دانه‌ها، اثرات ضدباکتریایی موثرتری بر باکتری‌های کوکسی گرم مثبت داشتند. عصاره‌های حاصل از پوست و برگ گیاه اثر قابل قبولی علیه *اشریشیا کلی*، *پروتئوس ولگاریس* و *کاندیدا آلبیکانس* داشتند. در مطالعه روسو و همکاران، عصاره برگ اقاقیا اثرات ضدباکتریایی موثرتری بر باکتری گرم منفی *اشریشیا کلی*، *پروتئوس ولگاریس* و قارچ کاندیدا نشان داد درحالیکه عصاره برگ اقاقیا در پژوهش حاضر بر هر

دو نوع باکتری گرم مثبت و منفی اثر ضدباکتریایی قابل قبولی را نشان داد. وجود برخی تفاوت‌ها در میزان اثرات ضد میکروبی مشاهده شده در این مطالعه و مطالعات مشابه می تواند به دلیل تفاوت مکان‌های رشدی گیاهان تولیدکننده عصاره‌ها، استفاده از روش‌های مختلف برای استخراج و... باشد. در پژوهش دیگری، تالاس-اورگاش و همکاران فعالیت ضدباکتریایی پروتئین‌های موجود در دانه اقاقیا را علیه *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سوبتیلیس*، *سودوموناس* و *زانتوموناس* و *اشریشیاکلی* مورد بررسی قرار دادند (Talas-Oğraş et al., 2005). غلظت‌های موثر برای مهار ۵۰ درصد رشد باکتری در محدوده ۲۰ تا ۱۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش گردید و *استافیلوکوکوس اورئوس* حساس‌ترین سویه بود. در مطالعه دیگری پاترا و همکاران، اثرات ضدباکتریایی عصاره‌ها و متابولیت‌های اقاقیا را بر روی *استرپتوکوکوس موتانس* و *پورفیرومونا*سی *گینگیوالیس* از عوامل موجب شونده پلاک دندان مورد بررسی قرار دادند (Patra et al., 2014). نتایج آنها نشان داد که عصاره خام بر علیه *پورفیرومونا*س *گینگیوالیس* (مهار رشد ۱۰۰ درصدی) نسبت به *استرپتوکوکوس موتانس* (مهار رشد ۷۳ درصد) در غلظت ۱۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر موثرتر بود. ماریناس و همکاران در مطالعه‌ای، فعالیت ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های حاصل اندامهای رویشی و زایشی گیاه اقاقیا را مورد بررسی قرار دادند (Marinas et al., 2014). نتایج آنها نشان داد که عصاره‌های مورد مطالعه یک اثر ضدمیکروبی انتخابی علیه *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سوبتیلیس* و *اشریشیا کلی* نشان دادند. همین عصاره با پنی‌سیلین G، کانامایسین و ریفامپین بالاترین اثر سینرژیستی را علیه سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین داشتند. نتایج این محققین در رابطه با اثر ضدمیکروبی عصاره اقاقیا با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد. هوشمند و همکاران به بررسی اثر ضدباکتریایی غلظت‌های مختلف عصاره گیاه اقاقیا بر برخی از باکتری‌های حفره دهان در شرایط آزمایشگاهی پرداختند. نتایج آنها نشان داد که قطرهاله عدم رشد برای‌ها باکتری *استرپتوکوکوس سالیواریس* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیس* در غلظت‌های مختلف عصاره گیاه مورد از نظر آماری تفاوت معنی‌داری نداشت. بزرگترین قطرهاله عدم رشد برای *استرپتوکوکوس سانگوئیس*، *استرپتوکوکوس موتانس* و *دیفتروئید*، در غلظت ۲/۵٪ و برای *لاکتوباسیل* در غلظت ۱٪ و برای *استافیلوکوکوس آرئوس* در غلظت‌های ۱٪ و ۲/۵٪ و برای *سودوموناس آئروژینوزا* در غلظت ۲/۵٪ مشاهده گردید و کمترین قطرهاله عدم رشد مربوط به *لاکتوباسیل* در غلظت ۵٪ بود. بیشترین حساسیت به عصاره گیاه اقاقیا در غلظت ۲/۵٪ و کمترین حساسیت در غلظت ٪ ۰/۵ و ۵٪ مشاهده شد. عصاره گیاه با غلظت‌های مختلف دارای اثرات متفاوت بر روی باکتری‌های مورد مطالعه بود (Houshmand et al., 2010). فیتول عمده ترین ترکیبات تشکیل دهنده عصاره برگ گیاه اقاقیا است (Hadadi etal., 2019). در باکتریهای تیمار شده با فیتول میزان اکسیژن فعال بین سلولی و از بین رفتن NADH افزایش می یابد. این موضوع نشان می دهد که فیتول منجر به القای تولید گونه‌های اکسیژن فعال و تجمع آن‌ها در سلول شده و باعث اختلال در عملکرد عادی زنجیره‌های انتقال الکترون از طریق افزایش سطح اکسیژن فعال می گردد. به علاوه فیتول منجر به آسیب شدید DNA باکتریایی می‌شود (Lee et al., 2016).

نتایج مطالعات حبیب زاده و همکاران نشان داد با وجود اینکه در روش آزمایشگاهی، تعدادی از عصارههای گیاهی ناحیه بازدارندگی از رشد را در

اطراف دیسک کاغذی، ایجادکردند، اما در شرایط انباری، از بین ۱۰ گیاه مورد مطالعه تنها گیاه سرخاب کولی بود که به‌طور معنی‌داری مانع از تولید اسپور توسط قارچ *Penicillium digitatum* شد (Habibzadeh et al., 2017). پاترا و همکاران (۲۰۱۴) در تحقیقی ترکیبات طبیعی استاندارد موجود در عصاره خام گیاه سرخاب کولی (کامپرول، کوئرستین، کوئرستین ۳-گلوکوزید، ایزوکوئیترین و اسید فرولیک) را برای فعالیت ضد باکتریایی آنها در برابر عوامل بیماریزا مورد آزمایش قرار دادند. نتایج نشان داد که عصاره گیاه سرخاب کولی دارای ترکیبات طبیعی فعال است که می تواند از رشد باکتری‌ها در بیماریهای دهان و دندان جلوگیری کند. کامپرول فعالیت ضد باکتریایی علیه هر دو پاتوژن استرپتوکوکوس موتانس و *Porphyromonas gingivalis* انجام داد، در حالی که کوئرستین فعالیت مهار رشد قوی را فقط در برابر استرپتوکوکوس موتانس به روشی وابسته به غلظت نشان داد (Patra et al., 2014). در پژوهش اخیر نیز عصاره برگ گیاه اثر ضدباکتریایی قابل ملاحضه ای را نشان داد و با افزایش غلظت عصاره این گیاه اثر ضدباکتریایی آن افزایش یافت. پاترا و همکاران (۲۰۱۴) بیان داشتند که فعالیت ضد باکتریایی عصاره گیاه سرخاب کولی ممکن است به دلیل ترکیبات فعال طبیعی باشد که توسط حلال‌ها استخراج می شوند و این ترکیبات فعال ممکن است از طریق کانال‌های تشکیل شده توسط پورین‌های موجود در دیواره‌های سلولی ضخیم باکتری، به داخل سلول باکتری نفوذ کرده و بر آنزیم‌های باکتریایی مانند ژنژیپین که مسئول بقای باکتری است تأثیر گذارند و در نتیجه لیز سلولی را باعث شوند (Patra et al., 2014). این نحوه عملکرد عصاره گیاه در برابر باکتری‌ها ممکن است به دلیل عملکرد ثانویه آن در برابر آنزیم‌های باکتری باشد (Deris et al., 2014). امروزه اجزای سازنده بسیاری اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی شناسایی شده اند و محققان اثر ضدمیکروبی هر یک از اجزای موجود در ترکیبات سازنده آنها را مورد پژوهش قرار دادند. این پژوهش‌ها نشان می دهد که اجزای اسانس‌ها و عصاره‌ها اثرات ضدمیکروبی متفاوتی دارند. شواهدی وجود دارد که نشان می دهد مکانیزم اصلی فعالیت ضد میکروبی اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی از طریق تغییر ساختار و عمل غشای سلولی اعمال می شود. بررسی‌های صورت گرفته نشان داده است که ترکیبات مشتق شده از گیاهان نفوذپذیری غشای سلولی میکروارگانیسم‌های تحت بررسی را افزایش می دهند و از این طریق تعادل یونهای مختلف در دو سوی غشا را برهم می زنند. گروه هیدروکسیلی موجود در مولکول اجزای ترکیبات گیاهی مانند: کارواکرول، تیمول، سایمن و منتول خاصیت ضدباکتریایی بالایی دارند (Sandri et al., 2007).

نتیجه‌گیری نهایی

با توجه به نتایج حاصل از آزمایشهای انتشار چاهک و دیسک دیفیوژن و مقایسه این نتایج می توان ادعا کرد، عصاره‌های اتانولی گیاهان اقاقیا و سرخاب کولی اثر مهاری بسیار مطلوبی در رشد سویه‌های استاندارد باکتریهای *پروتئوس میرابیلیس*، *پروتئوس ولگاریس*، *استرپتوکوکوس سانگوئیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* دارا هستند؛ همچنین مشاهده شد که تاثیر نهایی عصاره‌ها بر روی سویه‌های باکتری‌های مورد بررسی به میزان غلظت عصاره‌ها بستگی دارد و با افزایش غلظت عصاره اثر ضد باکتریایی عصاره افزایش می یابد. این عصارها در مقایسه با آنتی بیوتیک‌های به کار رفته اثر مهاری قابل توجهی داشتند. با توجه به اثرات ضدباکتریایی قابل ملاحظه عصاره‌های این گیاهان بر باکتریهای بیماریزا پیشنهاد می‌گردد بررسیهای

وسیعتری در شرایط in vitro انجام گیرد تا غلظت مؤثر این عصاره بر باکتریهای موردنظر و سویه‌های بالینی، اثرات جانبی و نیز فرموالسیون دقیق آن ارزیابی شود و سپس به خالص‌سازی ترکیبات عصاره و تولید قطره‌های گیاهی با خاصیت آنتی باکتریال پرداخته شود تا بتوان از آن به جای داروهای شیمیایی در درمان برخی بیماریها استفاده نمود.

سپاسگزاری

کلیه مراحل این تحقیق که متعلق به پایان نامه کارشناسی ارشد رشته زیست شناسی به شماره ۳۲۵۱ می باشد در دانشگاه آزاد اسلامی، واحد آیت الله آملی انجام گردید. از تمام اعضاء و همکاران در دپارتمان گروه زیست شناسی که ما را در پیشبرد روند مطالعه حمایت کردند قدردانی می‌گردد.

References

1. Adamczak, A., Ożarowski, M. and Karpiński, T.M. 2020. Antibacterial activity of some favonoids and organic aids widely distributed in plants. Journal of Clinical Medicine, 9(1): 109-118.
2. Alam, A., Sharma, V. and Sharma, S.C. 2012. In vitro antifungal efficacies of aqueous extract of *Targionia hypophylla* L. against growth of some pathogenic fungi. International Journal of Ayurvedic and Herbal Medicine, 2(02): 229-233.
3. Álvarez, A., Fernández, L., Gutiérrez, D., Iglesias, B., Rodríguez, A. and García, P. 2019. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitals: Latest trends and treatments based on bacteriophages. Journal of Clinical Microbiology, 57: e01006-01019 .
4. Azizian Shermeh, O., Valizadeh, M. and Taherizadeh, M. 2016. Phytochemical investigation, antioxidant and antimicrobial activities of *Phytolacca americaca* L. from Mazandaran province. 5th National Congress on Medicinal Plants, Isfahan, Iran. 117.
5. Basti, A.A., Misaghi, A. and Khaschabi, D. 2007. Growth response and modelling of the effects of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil, pH and temperature on *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. LWT- Food Science and Tecnology, 40(6): 973-981.
6. Baydar, N.G., Ozkan, G. and Sagdic, O. 2004. Total phenolic contents and antibacterial activities of grape seed extracts. Food Control, 15: 335-339.
7. Calina, D.; Olah, N.K., Patru, E.; Docea, A., Popescu, H. and Bubulica, M.V. 2013. Chromatographic analysis of the flavonoids from *Robinia pseudoacacia* species. Current Health Sciences Journal, 39: 232–236.
8. Chandra, H., Bishnoi P., Yadav, A., Patni, B., Mishra, A.P. and Nautiyal, A.R. 2017. Antimicrobial resistance and the alternative resources with special emphasis on plant-based antimicrobials–A review. Plants, 6(2): 16-25.
9. Deris, Z.Z., Akter, J., Sivanesan, S., Roberts, K.D., Thompson, P.E., Nation, R.L., Li, J. and Velkov, T. 2013. A secondary mode of action of polymyxins against gram-negative bacteria involves the inhibition of NADH-quinone oxidoreductase activity. The Journal of Antibiotics, 67: 147-151.
10. Ding, L.J., Ding, W, Zhang, Y.Q. and Luo, J.X. 2013. Bioguided fractionation and isolation of esculentoside P from *Phytolacca americana* L.. Industrial Crops and Products, 44: 534-541.
11. Habibzadeh, S. and Beiki, F. 2017. Assessment of antifungal activity of some native plant extracts of north of Iran on *Penicillium digitatum*. Journal of Applied Research in Plant Protection, 7(1): 123-134
12. Hadadi, Z., Nematzadeh, G.N. and Ghahari Kouchaksaraei, S. 2019. Investigating of chemical compounds of essential oils and antibacterial, antifungal and antioxidant effects of methanolic and chloroform extracts of *Eucalyptus, Hyssop* and False Acacia. Journal of Medicinal Plants Biotechnology, 4(2): 70-93.
13. Hallmann, E. 2020. Quantitative and qualitative identification of bioactive compounds in edible flowers of black

and bristly locust and their antioxidant activity. Biomolecules, 10(12): 1603-1614.

14. Hosseini Hashemi, S.K.H., Parsapajouh, D., Khademi Eslam, H., Mirshokraie, S.A. and Hemmasi, A.H. 2006. Identification of chemical compounds within north of Iran's Walnut heart wood extractives by GC/MS method. Journal of Agricultural Sciences, 12(4): 939-947.
15. Houshmand, B., Mortazavi, H., Alikhani, Y., Abdolsamadi, H.R., Motemayel, F.A. and Mahmoudabadi, R.Z. 2010. In vitro evaluation of antibacterial effect of *Myrtus* extract with different concentrations on some oral bacteria. Journal of Mashhad Dental School, 35: 123-130.
16. Koohsari, H., Ghaemi, E.A., Sheshpoli, M.S., Jahedi, M. and Zahiri, M. 2015. The investigation of antibacterial activity of selected native plants from north of Iran. Journal of Medicine and life, 8: 38–42.
17. Lee, W., Woo, E.R. and Lee, D.G. 2016. Phytol has antibacterial property by inducing oxidative stress response in *Pseudomonas aeruginosa*. Free radical research, 50(12): 1309- 1318.
18. Lin, M.F., Liou, M.L., Kuo, C.H, Lin, Y.Y., Chen, J.Y. and Kuo, H.Y. 2019. Antimicrobial susceptibility and molecular epidemiology of *Proteus mirabilis* isolates from three hospitals in northern Taiwan. Microbial Drug Resistance, 25: 1338-134.
19. Mahon, C.R. and Manoselis, G. 2000. Textbook of diagnostic microbiology, Chapter 3, 2nd edition WB. Saunders Company, 62- 95.
20. Marinas, I.C., Oprea, E., Geana, E.I., Chifiriuc, C. and Lazar, V. 2014. Antimicrobial and antioxidant activity of the vegetative and reproductive organs of *Robinia pseudoacacia*. Journal of the Serbian Chemical Society, 79: 1363–1378.
21. Mazandarani, Masoumeh, Koushan Sineh Sepehr, Behzad Baradaran, Parastoo Zarghami Moghaddam 3 and Vahid Khuri 2013. Autecology, phytochemical and antioxidant activity of *Peganum harmala* L. seed extract in North ofIran (Tash Mountains) . Journal of Medicinal Plants and By-products, 2: 85-90.
22. Mazandarani, Masoumeh, Zahra Majidi, Parastoo Zarghami-Moghaddam, Mehdi Abrodi, Helen Hemati 4and Fatemeh Fathiazad. 2012. Essential oil composition, total phenol, flavonoid, anthocyanin and antioxidant activities in different parts of *Artemisia annua* L. in two localities (North of Iran). Journal of Medicinal Plants and By-products, 1: 13-21.
23. Mozaffarian, V. 2013. Indepentification of medicinal and aromatic plants of Iran. Contemporary Culture Publications, 856.
24. Nakano, R., Nakano, A., Abe, M., Nagano, N., Asahara, M. and Furukawa, T. 2019. Prevalence and mechanism of fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Proteus mirabilis* in Japan. Heliyon, 5: e01291.
25. Patra, J.K., Kim, E.S., Oh, K., Kim, H.J., Kim, Y. and Baek, K.H. 2014. Antibacterial effect of crude extract and metabolites of *Phytolacca americana* on pathogens responsible for periodontal inflammatory diseases and dental caries. BMC Complement Altern Medicine and therapies, 14: 343- 354
26. Patra J.K., Kim, E.S., Oh, K., Kim, H.J., Dhakal, R., Kim, Y. and Baek, K.H. 2015. Bactericidal effect of extracts and metabolites of *Robinia pseudoacacia* L. on *Streptococcus mutans* and *Porphyromonas gingivalis* causing dental plaque and periodontal inflammatory diseases. Molecules, 20: 6128-6139.
27. Rosu, A.F., Bita, A., Calina, D., Rosu, L., Zlatian, O. and Calina, V. 2012. Synergic antifungal and antibacterial activity of alcoholic extract of the species *Robinia pseudoacacia* L. (Fabaceae). European Journal of Hospital Pharmacy, 19(2): 216-226.
28. Saharkhiz, M.J., Satari, M., Goudarzi, G. and Or, B. 2008. Assessment of antibacterial properties of *Tanacetum parthenium* L. essential oil. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 24: 47-55 .

29. Sandri, I., Zacaria, J., Fracaro, F., Delamare, A. and Echeverrigaray, S. 2007. Antimicrobial activity of the essential oils of Brazilian species of the genus *Cunila* against foodborne pathogens and spoiling bacteria. Food Chemistry, 103(3): 823-828
30. Talas-Oğraş, T., Bajroviç, Z.K. and Gözükirmizi, N. 2005. Antibacterial activity of seed proteins of *Robinia pseudoacacia*. Fitoterapia, 76: 67-72.
31. Veitch, N.C., Elliott, P.C., Kite, G.C. and Lewis, G.P. 2010. Flavonoid glycosides of the black locust tree, *Robinia pseudoacacia* (Leguminosae) .Phytochemistry, 71: 479–486.
32. Zarei-Yazdeli, M., Seyed Ebrahimi, S.A., Alipanah, H. and Noori, M. 2020. Evaluation of antibacterial activity of ethanoloic and methanoloic extracts of *Dracocephalum kotschyi* and Mazouj galls. Journal of Kashan University of Medical Sciences, 24(3): 293-301.
33. Antimicrobial diversity of extracts of medicinal plants of northern Iran (*Robinia pseudoacacia* L.) and (*Phytolacca americana* L.) against some human pathogenic bacteria.

Antimicrobial effects of *Robinia pseudoacacia* L. and *Phytolacca americana* L. ethanolic extracts against human bacterial pathogens in the habitat of northern Iran

Rezanezhad, N.[1], Oskoueiyan, R.[2,*], Izadi Amoli, R.[2]

[1]MSc, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran

[2]Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran

Received: 2-12-2020; Accepted: 14-8-2021

Abstract

Medicinal plants can be a good alternative to antibiotics by producing antimicrobial compounds. The aim of this study was to investigate the antimicrobial effects of *Robinia pseudoacacia* L. and *Phytolacca americana* L. ethanolic leaf extract on several nosocomial pathogenic strains. Plant leaves were collected from the forests of Amol city in the spring of 2016. The extract was extracted by Soxhlet extractor method and then their antibacterial activity at concentrations of 6.25, 12.5, 25, 50, 100 and 200 mg/ml on *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Streptococcus sanguinis*, and *Staphylococcus aureus* were studied by disk diffusion and well dilution methods. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were also determined. The highest inhibition zone diameter in the both disk diffusion and well dilution methods was found at concentrations of 200 mg/ml of each plant extract. In the disk diffusion method, *R. pseudoacacia* extract had highest inhibitory effect on *P. mirabilis* and *P. vulgaris* with a growth inhibition zone diameter of 24.67 mm, while *P. Americana* extract had the highest effect on *S. aureus* with 27.67 mm. In the well dilution method, *R. pseudoacacia* extract had the highest inhibition zone diameter on *P. mirabilis* (24.67 mm), whereas *P. Americana* showed highest inhibition zone diameter on *S. aureus* (24.3 mm). The MIC and MBC values of *R. pseudoacacia* extract was determined at 25 and 50 mg/ml concentrations for *P. vulgaris*, *S. aureus* and *S. sanguis*, and 50 and 100 mg/ml for *P. mirabilis*. The MIC and MBC values of *P. Americana* extract was 25 and 50 mg/ml for *P. mirabilis*, *S. aureus* and *S. sanguis*, and 50 and 100 mg/ml for *P. vulgaris*, respectively. Therefore, based on the results *R. pseudoacacia* and *P. Americana* ethanolic extracts had acceptable antimicrobial effect, especially at 200 mg/ml, against some important bacterial pathogens.

***Keywords*:** Antibacterial effects, *Robinia pseudoacacia, Phytolacca americana,* Pathogens.

[*]Corresponding author; ro.osko@gmail.com