بررسی اثر ضد باکتریال عصاره الکلی و آبی گیاه *Echinochloa crus-galli* L. در شرایط *In vitro*

سیدمسعود هاشمی کروئی[۱]، *آیت الله نصرالهی عمران[۲]، حمیدرضا پردلی[۳]، عیسی غلامپور عزیزی[٤]

۱. گروه میکروب‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن
۲. دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن
۳. دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان
٤. گروه میکروب‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل

چکیده

از اثر آنتاگونیسمی گیاهان، می‌توان جهت حذف میکروارگانیسم‌ها از محیط استفاده نمود. گیاه *Echinochloa crus-galli* در مزارع برنج شمال ایران به عنوان علف هرز سوروف به وفور یافت می‌شود. در این تحقیق به بررسی اثر عصاره‌های مختلف آبی، اتانولی و متانولی گیاه علیه باکتری‌های گرم مثبت و منفی با استفاده از روشهای دیسک، چاهک، پورپلیت، کمترین غلظت مهارکنندگی(MIC)، کمترین غلظت باکتری کشی (MBC) پرداختیم و مشخص گردید که عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی علیه باکتری‌های گرم مثبت *Staphylococcus aureus* و *Bacillus cereus* اثر مهار کنندگی شدید داشته، در صورتی که علیه باکتری‌های گرم منفی *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeroginosa* اثر مهار کنندگی مشاهده نشد.

کلمات کلیدی: اثر ضد باکتریال، عصاره آبی، عصاره الکلی، *Echinochloa crus-galli*

مقدمه

با استفاده از اثرات متقابل گیاهان با انواع میکروارگانیزم‌ها، می‌توان مکانیزم آنتاگونیسمی را بررسی نمود و عوامل مؤثر مهار یا تحریک رشد میکروارگانیزم‌ها را شناسائی کرد، همچنین از عصاره آن گیاهان در درمان عفونت ها به عنوان گیاه داروئی و یا در شناسائی عوامل عفونی در آزمایشگاه استفاده نمود (ولاگ ژان، ۱۳۷٤). سوروف با نام علمی *Echinochloa crus-galli* L. از گیاهان هرز زیان‌آور درجه اول و مشخص مزارع برنج سراسر جهان است. یکی از مشخصات مهم سوروف، چند ریختی آن است. سوروف گیاهی رطوبت دوست، آبزی است که عموماً خاک‌های مرطوب، حتی غرقابی، گرم، حاصلخیز و شنی ـ لوم را ترجیح می‌دهد. این گونه جزو بیوتوپ باتلاق‌های کم عمق و ماندابی است و در زمین‌های متروک کنار جوی‌های آبیاری و نهرها، تأسیسات صنعتی - کشاورزی، جاده‌ها، باغ‌ها، زمین‌های زراعی و به خصوص برنج و نیشکر می‌روید (کوچکی و همکاران، ۱۳۷۳).

*e.mail:ayat51@yahoo.com

بسیاری از گیاهانی که اثر ضد قارچی دارند دارای ترکیباتی مانند آلکالوئید، فلاونوئید، تانن، گلیکوزید و ساپونین می‌باشند که اثر ضدقارچی بسیاری از آنها اثبات شده است (Abdumoniem, 2006; Aderotimi and Samuel, 2006). در تحقیقات مشابه در گیاه سداب وجود ساپونین، تانن، آلکالوئید و گلیکوزید به اثبات رسیده است. ساپونین نوع خاصی از گلیکوزید است که دارای خاصیت صابونی بوده و اثر ضد قارچی آن ثابت شده است. تانن موجود با رسوب پروتئین‌های میکروبی و غیر قابل دسترس ساختن آنها اثر ضدمیکروبی دارد (Aderotimi and Samuel, 2006).

در این تحقیق با روشهای مختلف حساسیت و مقاومت باکتریها به عصاره گیاه از طریق دیسک، چاهک، پورپلیت MIC (Minimum Inhibitory Concentration) و MBC (Minimum Bactericidal Concentration) تعیین و بررسی شدند.

مواد وروشها

گیاه دارای بذر و ریشه‌دار در اواخر بهار و اوایل تابستان از مزارع برنج جمع‌آوری گردید. تمام اندام‌های آن چند بار با آب تمیز شستشو داده شده و جهت حذف وجود احتمالی سموم کشاورزی، آنها را به مدت ۷۲ ساعت در مخزن آب قرار داده، بعد از این مدت، در جای گرم و خشک و به دور از نور خورشید به طور کامل خشک نموده و از اندام‌های مختلف ریشه، ساقه، برگ و بذر آن پودر تهیه شد و به آزمایشگاه شیمی جهت تهیه عصاره منتقل گردید. عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی اندام‌های مختلف گیاه به روش سوکسوله تهیه و بعد از حذف حلال از آنها، جهت انجام تست‌های حساسیت به آزمایشگاه میکروبیولوژی منتقل گردید. در مرحله بعد نمونه خالص میکروبی از باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا (ATCC=1430)، استافیلوکوک اورئوس (ATCC=1431)، باسیلوس سرئوس (ATCC=1247)، اشرشیا کلی (ATCC=1399) از آمپول‌های لیوفیلیزه تهیه شده از انیستیتو پاستور ایران آماده گردید. برای انجام تست‌های تعیین حساسیت از انواع عصاره‌های تهیه شده که خشک می‌باشند، با آب مقطر استریل سوسپانسیون به نسبت ۱ به ۱۰ تهیه و از این سوسپانسیون در مراحل مختلف استفاده شد (Berrin et al., 2005; Scazzocchia et al., 2006).

الف) روش پورپلیت

این عمل با استفاده از سوسپانسیون واجد تعداد مشخص باکتری معین یک‌بار با استفاده از نوترینت آگار بدون عصاره به عنوان شاهد و بار دیگر نوترینت آگارهای واجد یک درصد عصاره آبی، اتانولی و متانولی انجام گرفت. بعد از انکوباسیون ابتداً نمونه شاهد را مشاهده نمود، رشد باکتری ها را بررسی نموده و به این ترتیب تعداد باکتری در سوسپانسیون اولیه میکروبی مشخص می‌شد. سپس پورپلیت عصاره آبی، اتانولی و متانولی را جداگانه بررسی و با نمونه شاهد مقایسه کرده چنانچه تعداد کلنی ها یا باکتری ها زیاد شود، نشانه اثر تقویت کننده عصاره روی رشد و چنانچه تعداد کلنی ها با باکتری ها کم شود، نشانه اثر مهارکنندگی عصاره می‌باشد. (Berrin et al., 2005; Scazzocchia et al., 2006).

ب) روش استفاده از دیسک: Kirby-Bauer disc diffusion test

در این روش به دیسک‌های استاندارد مقدار ۳۰ لاندا از عصاره تهیه شده آبی، اتانولی و متانولی بطور جداگانه اضافه و به کشت یکنواخت تهیه شده وارد کرده و در حرارت ۳۵- ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲٤-٤۸ ساعت انکوبه نموده بعد از انکوباسیون، تشکیل هاله عدم رشد در اطراف دیسک را بررسی و چنانچه هاله ای تشکیل شود، قطر هاله را با خط کش اندازه گیری نموده و در ارتباط با حساسیت قضاوت می‌نمائیم. نمونه شاهد برای این کار، استفاده از دیسک‌های بدون عصاره می‌باشد (Berrin et al., 2005; Scazzocchia et al., 2006).

ج) روش ایجاد چاهک

برای این کار ابتدا در قسمت‌های از این محیط کشت به فاصله حداقل ۲ سانتی متر چاهک هائی ایجاد نموده و بطور جداگانه به این چاهک ٦۰ لاندا از عصاره آبی، اتانولی و

متانولی بطور جداگانه اضافه و بعد از انکو باسیون تشکیل هاله عدم رشد بررسی میشود.

نتایج

در روش پورپلیت با استفاده از عصاره آبی، اتانولی و متانولی مهار کامل رشد باکتری‌های *Staphylococcus aureus* و *Bacillus cereus* صورت گرفته و کلنی ایجاد نشد در صورتی که در این روش همانند نمونه شاهد باکتریهای *E. coli* و *Pseudomonas aeroginosa* رشد وتشکیل کلنی صورت گرفته و تعداد کلنی‌ها در نمونه شاهد و نمونه‌های دارای عصاره کاملا برابر بوده است. شاهد *Bacillus cereus* دارای ۷۰×۱۰^{۳}، *Staphylococcus aureus* دارای ۲۰×۱۰^{۶}، *E.coli* دارای تعداد ۲۰×۱۰^{۴} و *Pseudomonas aeroginosa* واجد ۷۰×۱۰^{۲} سلول باکتری بوده است.

در روش دیسک، هاله‌ای برای هیچکدام از باکتری‌ها در برابر عصاره آبی ایجاد نشد، اما در برابر عصاره اتانولی باکتری‌های *Staphylococcus aureus* قطر هاله عدم رشد ۲۷ میلی متر و برای *Bacillus cereus* حدود ۲۶ میلی‌متر ایجاد کرده در حالی که باکتری‌های *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeroginosa* هاله‌ای ایجاد نکردند. در اطراف دیسک واجد عصاره متانولی *Staphylococcus aureus* هاله به قطر ۲۶ میلی‌متر و *Bacillus cereus* به قطر ۲۱ میلی‌متر ایجاد کرده در حالی که باکتری‌های *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeroginosa* هاله‌ای ایجاد نکردند.

در روش چاهک برای هیچ‌کدام از عصاره‌ها *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeroginosa* هاله ایجاد نکرده، در حالی که در اطراف چاهک واجد عصاره اتانولی *Bacillus cereus* و *Staphylococcus aureus* هاله‌ای به قطر ۲۶ میلی‌متر ایجاد نموده‌اند. باکتری *Staphylococcus* در اطراف چاهک واجد عصاره متانولی هاله ای به قطر ۲۵ میلی‌متر و *Bacillus cereus* هاله به قطر ۲۱ میلی‌متر ایجاد کرده است (جدول ۱).

عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی روی *Bacillus cereus* مقدار MIC برابر با ۳/۱۲۵ میلی گرم در سی‌سی و MBC برابر با ٦/۲۵ میلی‌گرم در سی‌سی داشته و عصاره آبی روی *Staphylococcus aureus* مقدار MIC برابر با ٦/۲۵ و MBC برابر با ۱۲/۵ میلی گرم در سی‌سی، اما عصاره‌های اتانولی و متانولی MIC برابر ۳/۱۲۵ و MBC برابر با ٦/۲٤ میلی‌گرم در سی‌سی داشته است. روی *Escherichia coli* عصاره‌های متانولی و اتانولی MIC برابر با ۵۰ میلی گرم وMBC برابر با ۱۰۰ میلی‌گرم در سی‌سی را نشان دادند، در حالی که با روش‌های انجام گرفته در تمام لوله‌های MIC وMBC باکتری *Pseudomonas aeroginosa* رشد کرده و ایجاد کدورت ننموده است (جدول ۱).

جدول ۱: اثر عصاره گیاه *Echinochloa crus-galli* روی باکتری‌های مختلف بر حسب اندازه قطر هاله به روش دیسک و چاهک (mm) و تعیین MIC و MBC

باکتری	قطر هاله به روش دیسک (30λ)			قطر هاله به روش چاهک (60λ)			MIC(mg/ml)			MBC(mg/ml)		
	عصاره اتانولی	عصاره متانولی	عصاره آبی	عصاره اتانولی	عصاره متانولی	عصاره آبی	عصاره اتانولی	عصاره متانولی	عصاره آبی	عصاره اتانولی	عصاره متانولی	عصاره آبی
B.cereus	۰	۲۳	۲٦	۱۰	۲۱	۲٦	۳/۱۲۵	۳/۱۲۵	۳/۱۲۵	٦/۲۵	٦/۲۵	٦/۲۵
S. aureus	۰	۲٦	۲۷	۰	۲۵	۲٦	٦/۲۵	۳/۱۲۵	۳/۱۲۵	۱۲/۵	٦/۲۵	٦/۲۵
E. coli	۰	۰	۰	۰	۰	۰	-	۵۰	۵۰	-	۵۰	۵۰
P.aeroginosa	۰	۰	۰	۰	۰	۰	-	-	-	-	-	-

بحث

گیاهان مختلف با مکانیسم‌های متفاوت دفاعی در برابر پاتوژن‌ها و ارگانیزم‌های مختلف مقاومت نشان می‌دهند و در محیط، بقای خود را حفظ نمایند. یکی از مکانیزم‌های موثر دفاعی تولید ترکیبات شیمیائی مختلف و موثر می‌باشد که تحت عنوان کمپلکس‌های شیمیائی ممکن است انواعی از اسید، باز و ترکیبات آلی دیگر باشد. در روشهای مختلف عصاره گیری این ترکیبات جدا شده و می‌توان از آنها به منظورهای مختلفی استفاده نمود. کمیت و کیفیت این مواد در ارتباط با گیاهان مختلف و روشهای مختلف عصاره گیری متفاوت می‌باشد (Albert et al., 2000).

برخی از ترکیبات ثانویه موجود در عصاره گیاهان همانند فلاونوئیدها، کافئیک اسید, بنزوئیک اسید، سینامیک اسید احتمالا روی دیواره سلولی و یا غشاء سلولی موثر واقع شده و سبب خرابی و اختلال در کار آنها گشته و با این عمل موجبات مرگ سلول میکروب را سبب می‌شود (Scazzocchia et al., 2006; Marcucci et al., 1995).

در تحقیق Chung و همکاران در سال ۲۰۰۲ مشخص شده است که در عصاره تهیه شده از *Echinochloa crus-galli* ترکیبات مهمی همانند سیناپیک اسید، وانیلیک اسید، هیدروکسی فنی لاکتیک اسید، بنزواسید، سالیسیلیک اسید، کافئیک اسید، آلفا هیدروکسی بنزوئیک اسید، ۲ کلرو بنزوئیک اسید وجود دارد که هم در اثر آللوپاتی با گیاهان نقش داشته و هم بر اساس بحث بالا ممکن است با اختلال در دیواره سلولی و غشاء سیتوپلاسمی سبب مرگ باکتریها و قارچهای مورد بحث شده باشند (Chung et al., 2002).

یکی دیگر از مواردی که می‌توان به آن اشاره نمود مکانیزم خاصی از روش آللوپاتی می‌باشد که در آن برخی از گیاهان با تولید برخی از ترکیبات ضد میکروبی روی میکروارگانیزم‌های موثر در رشد گیاهان خاصی سبب مهار رشد گیاه خاص می‌شود. در این ارتباط ترکیبات مربوطه میکروارگانیزم‌های مفید را حذف می‌نمایند. براساس تحقیقی که توسط Tran Dang Xuan و همکاران در ژاپن ۲۰۰۳ انجام گرفت مشخص شد که عصاره ریشه گیاه Kava (نوعی درخچه فلفل) روی قارچهای تریکوفیتون دفورمنس و فوزاریوم سولانی نیز موثر می‌باشد. در این تحقیق مشخص شد که اثر آللوپاتی گیاه Kava مربوط به اثر مهار کنندگی ترکیبات آن روی رشد میکروارگانیزم‌های همزیست می‌باشد (Tran Dang Xuan et al., 2003).

در مطالعه ما مشخص شد که باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی حساسیت بیشتری داشته یا به عبارتی با مقادیر به کار گرفته شده باکتری‌های گرم منفی مقاومت نشان داده که علت این امر هم به دلیل وجود دیواره مستحکم‌تری است که در گرم منفی‌ها مثل سودوموناس و اشرشیاکلی وجود دارد. در نتیجه به مقادیر بیشتری از مواد نیاز می‌باشد. این امر با در تحقیق سایرین نیز مطابقت دارد (Berrin et al., 2005; Ellen et al., 1994).

در برخی موارد ترکیبات موجود در عصاره ممکن است مانع از سنتز و فعالیت آنزیم‌های موثر در رشد و پاتوژنیسیته میکروارگانیزم‌ها شود. در برخی موارد هم برخی از ترکیبات اثر سینرژیسمی با انواع آنتی بیوتیک‌ها را دارند (Krol et al., 1993).

نتیجه‌گیری نهایی

با توجه به نتایج حاصله از آنجایی که برخی از ترکیبات عصاره تهیه شده دارای اثر ضدمیکروبی می‌باشند که مقدار آنها در عصاره کم بوده با تخلیص و تغلیظ آنها می‌توان به اشکال مختلف داروئی برای درمان عفونت‌های باکتریائی بخصوص باکتریهای گرم مثبت استفاده نمونه.

منابع

کوچکی، ع.، رحیمیان، ح.، نصیری محلاتی، م. (۱۳۷۳). اکولوژی علف‌های هرز. انتشارات دانشگاه مشهد. ۳۲۰ص.

ولاگ، ژ.، استودولا، و. ترجمه زمان ساعد. (۱۳۷٤). گیاهان داروئی. انتشارات ققنوس تهران. ۷۵۰ ص.

Abdumoniem. M.A.S (2006): Antifungal activity of some Saudi plant used in traditional medicine. Asian Journal of Plant Science. 5(5). pp 907-909.

Aderotimi. B and Samuel. A. (2006): phytochemical screening and antimicrobial assessment of Abutilon mauritianum, Bacopa monifera and Datura stramonium. Biokemistri. vol.18. No.1: 39-44.

Albert J. fisher.; Bayer D.E.; Carriere M.D.; Ateh C.M.; Yim K-O.(2000). Mechanisms of Resistance to Bispyribac- sodium in an *Echinichloa phyllopogon* Accession. Pesticide Biochemistry and Physiology. 68(3): 156-165.

Berrin O., Mustafa A., Hkay O. and Taner K. (2005). Antibacterial, antifungal and antiviral activities of the lipophylic extracts of *Pistacia vera*. Microbiological Research. 160(2):159-164.

Cheah L.H., Tate K. G., Hunt A. W., desilva N.(1993). Decreased sensitivity of peach leaf curl (*Taphrina deformans*) to copper fungicides in Hawkes Bay. Proceeding of the 46th NZ plant protection conference, Waitangi city, New Zealand: 15-17.

Chung I.M., T. Kim and S.H. Kim,. (2002). Screening of allelochemicals on baryarolgrass (Echinochloa crus-galli) and identification of potentially allelopathic compounds from rice (oryza sative) variety hull extracts. Crop protection. 21(10): 913-920.

Ellen JO. Baron, Lancer R. Peterson and Sydney M. Finegold. (1994). Diagnostic Microbiology. Ninth Edition. Mosby – Year book. Inc.

Krol W., Scheller S., Shani J., Piets G. and Ozaba Z.(1993). Synergistic effect of ethanolic extract of propolis and antibiotic on the growth of staphylococcus aureus. Arzeimitte for schuug 43: 607-609.

Marcucci M. C. (1995). Propolis; chemical composition, biological properties and therapeutic activity, Apidologie. 26: 83-99.

Scazzocchia F., F.D. D'Auriaa, D. Alessandrinia. (2006). Multifacterial aspect of antimicrobial activity of propolis; Micribiological Research. 161(4): 327-333.

Tran Dang, X.O.Y, Chikara, J., Eiji, T. (2003). Kava root (piper methysticum L.) as a potential nature herbicid and fungicide. Crop Protection. 22 (6): 873-881.

Antibacterial activity of alcoholic and aqueous extracts of *Echinochloa crus-galli* L. against bacteria in vitro

HashemiKarooyi, M[1]., Nasrollahi omran, A[2]., Pordeli, H.R[3]., Gholampoor Azizi, I[4].

1. Department of Microbiology, Islamic Azad University, Tonkabon Branch
2. Faculty of Medical Science, Islamic Azad University, Tonkabon Branch
3. Islamic Azad University, Gorgan Branch
4. Department of Microbiology, Islamic Azad University, Babol Branch

Abstract

The antagonistic effects that plants have on different micro organisms can be used to protect microorganism from the environment. The *Echinochloa crus-galli* with a universal growth is found in paddy fields in the North of Iran, named Soroof, in the weed form. In this research,different methanolic, ethanolic and aqueous extract have been provided from *Echinochloa crus-galli* and their effects on gram positive & gram negative bacteria growth using disk diffusion, well diffusion, plate count, Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) method. It concluded that different types of methanolic, ethanolic& aqueous extract inhibited *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* growth while did not have any effect on *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeroginosa* growth.

Key Word: *Echinochloa crus-galli* L., Antibacterial effect, Aqueous and alchoholic extract