بررسی خاصیت ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی عصاره‌های آبی و الکلی ترکیب چند گیاه دارویی(حنا، پوست انار، پوست گردو، مورد) بر روی برخی باکتری‌های گرم مثبت و منفی

سیمین خسروی[۱]، زهرا رضایتمند*[۲]، مژگان قیاسیان[۳]

چکیده

امروزه به دلیل مقاومت باکتری‌های بیماری‌زا، یافتن مواد ضد میکروبی جدید مورد توجه زیادی قرار گرفته است. از این رو، در پژوهش حاضر، خاصیت‌های ضدمیکروبی ترکیب چهار عصارهٔ گیاه برگ مورد، برگ حنا، پوست گردو و پوست انار روی سه باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس آرئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و باسیلوس سابتیلیس و دو باکتری‌های گرم منفی اشرشیا کلی و باکتری سودوموناس آئروژینوزا مورد بررسی قرار گرفته است. اثر ضد باکتریایی عصارهٔ الکلی و آبی این گیاهان به روش دیسک دیفیوژن و چاهک گذاری با اندازه‌گیری قطر هالهٔ عدم رشد بررسی و حداقل غلظت مهارکنندگی به روش الایزا مطالعه شد. براساس نتایج، در دو روش دیسک دیفیوژن و چاهک‌گذاری در عصارهٔ الکلی و آبی بیش‌ترین تأثیر بر روی باکتری استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و کم‌ترین تأثیر بر روی باکتری اشرشیاکلای مشاهده می‌گردد. کم‌ترین مقدار MIC در مورد عصاره الکلی، ۳۱/۲۵ و کم‌ترین مقدار MBC ۶۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر مربوط به باکتری اشرشیا کلای است. نتایج اندازه‌گیری مقدار ترکیبات فنلی تام و فلاوونوئید و تانن نیز نشان می‌دهند که بیش‌ترین میزان این ترکیبات در غلظت ۵۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره گیاهان می‌باشد. همچنین میزان فعالیت آنتی اکسیدانی در عصاره الکلی نسبت به عصاره آبی حدود دو برابر است. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که ترکیب عصارهٔ گیاهان، به ویژه عصارهٔ الکلی اثر ضدباکتریایی بیش‌تری نسبت به عصاره آبی داشته است که علت آن را می‌توان حضور ترکیبات بیش‌تری با خاصیت ضد باکتریایی در این عصاره دانست.

واژگان کلیدی: باکتری‌های بیماری‌زا، خاصیت‌های ضدمیکروبی، عصاره آبی، عصاره الکلی.

۱. گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران
۲. گروه زیست‌شناسی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران rezayatmand@iaufala.ac.ir
۳. گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

مقدمه

میکروارگانیسم‌ها دارای نقش مهمی در ایجاد بیماری‌های انسان هستند. مرگ و میر فراوان ناشی از این عوامل، همواره بشر را بر آن داشته تا به دنبال راه‌هایی برای مقابله با میکروارگانیسم‌ها باشد. امروزه استفاده از گیاهان دارویی، رو به فزونی دارد؛ زیرا گیاهان دارویی آثار سوء کم‌تری نسبت به داروهای شیمیایی دارند. بنابراین، برای درمان عفونت‌ها، گیاهان مختلف دارویی مورد ارزیابی قرار می‌گیرند(۱). استفاده بی‌رویه از داروهای ضدمیکروبی به افزایش مقاومت‌های دارویی علیه آنتی‌بیوتیک‌های متفاوت در اکثر باکتری‌ها منجر شده است. همین موضوع در محققان انگیزه استفاده از گیاهان دارویی را به عنوان مواد طبیعی کم‌خطر، در دسترس و ارزان قیمت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ساختگی در درمان عفونت‌های باکتریال ایجاد کرده است(۲).

در گذشته بسیاری از گیاهان دارویی برای رنگ‌آمیزی مو مورد استفاده قرار می‌گرفت. بر همین اساس، در این تحقیق خاصیت ضد باکتریایی تعدادی از این گیاهان را مورد آزمایش قرار دادیم. در تحقیق حاضر ۴ نوع گیاه، شامل برگ مورد، برگ حنا، پوست گردو و انار که برای رنگ‌کردن مو به صورت سنتی استفاده می‌شوند، انتخاب شدند. گیاهان انتخاب شده برای درمان بیماری‌های مختلف استفاده می‌شوند و آثار ضدباکتریایی آن‌ها در مطالعات متعددی نشان داده شده؛ ولی تاکنون اثر ترکیب این گیاهان گزارش نشده است. لذا در این تحقیق، اثر ضد باکتریایی آن‌ها بر روی برخی از باکتری‌های گرم مثبت و منفی، مانند استافیلوکوکوس آرئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، باسیلوس سابتیلیس، اشرشیاکلای و سودوموناس آئروژینوزا موردارزیابی قرار گرفتند.گیاه مورد، اثر ضدعفونی کننده دارد و از آن، در مصارف داخلی و خارجی می‌توان استفاده کرد. گل‌های نسبتاً درشت و زیبای مورد، رنگ سفید و بوی مخصوصی دارند و از اردیبهشت ماه تا تیر ظاهر می‌شوند. این گیاه جزو خانواده پلانِتا [1]، رسته میرتال‌ها[2]، خانواده میرتاسه[3] است(۳).

در مورد گیاه حنا نیز می‌توان به خاصیت ضد قارچی آن، ضد باکتریایی، تب بری، ضد التهاب و محافظت از پوست در برابر آفتاب اشاره کرد. حنا به صورت درختچه‌هایی به طول ٦-۷ متر است که در نواحی گرمسیری می‌روید. این گیاه در استان‌های کرمان و سیستان بلوچستان بومی شده و کاشته می‌شود. برگ‌های این گیاه مورد استفاده بوده که معمولاً سالی ۲-۸ بار برداشت و پس از خشک و آسیاب کردن وارد بازار می‌شود. علاوه بر رنگ کردن پوست و موی انسان، چوب، پشم و چرم، دارای خواص درمانی و پزشکی فراوانی است(۴).

3 Plantae

4Myrtales

5 Myrtaceae

پوست انار دارای خواص ضدمیکروبی فراوانی در انسان بوده و از گذشته‌های دور مصارف گوناگونی در این زمینه داشته است. از طرف دیگر، قسمت‌های مختلف درخت انار، شامل برگ‌ها، پوست تنه، ریشه، پوست میوه، آب انار و بذر آن؛ همگی حاوی ترکیبات مؤثر هستند که علاوه بر خاصیت ضدمیکروبی، فعالیت آنتی اکسیدانی گسترده‌ای را شامل می‌شوند. انار درخت کوچکی است که ارتفاع آن حداکثر تا ٦ متر می‌رسد و در مناطق نیمه گرمسیری می‌روید. گل‌های انار درشت به رنگ قرمز اناری، ولی بی‌بو و میوه آن کروی با اندازه‌های مختلف دارای پوستی قرمز و یا زرد رنگ می‌باشد. انار درختچه‌ای است خزاندار و بومی ایران که از قدمت کشت و کار زیادی در کشور برخوردار است(۵).

پوست سبز گردو، به علت دارابودن خاصیت‌های سودمندی مثل ضد رادیکالی، قابلیت پیشگیری از اکسایش LDL و سختی سرخرگ‌ها و ضدسرطان؛ برای سلامت انسان بسیار مفید است. درخت گردو از خانواده راش‌سانان است. در ایران این گیاه از ارتفاع ٢٦ متر پایین‌تر از سطح دریا در مازندران و تا ارتفاع بیش از ۲۵۰۰ متر از سطح دریا در چهار محال و بختیاری رویش داشته و به جز استان‌های ساحلی خلیج فارس و دریای عمان، در سایر استان‌های کشور کشت می‌گردد(۶).

باکتری‌های مورد آزمایش در این تحقیق، سودوموناس آئروجینوزاریا، اشرشیا کلی، باسیلوس سابتیلیس، اسافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، استافیلوکوکوس آرئوس می‌باشند. سودوموناس‌ها باسیل‌های گرم منفی، هوازی و متحرک هستند و برخی از آن‌ها رنگدانه‌های محلول در آب تولید می‌کنند. سودوموناس‌ها به طور وسیعی در خاک، آب، گیاهان و حیوانات وجود دارند. سودوموناس آئروجینوزا تنها زمانی بیماری‌زا است که به محیط‌های عاری از دفاع طبیعی وارد شود. عفونت‌های مهم بالینی سودوموناس آئروجینوزا را نباید به صورت تک دارویی درمان کرد. وقتی از درمان تک دارویی استفاده می‌شود، احتمال موفقیت پایین است و باکتری سریعاً مقاوم می‌شود. از یک پنی‌سیلین مؤثر علیه سودوموناس آئروجینوزا، مانند پیپراسیلین به همراه یک آمینوگلیکوزید، معمولا توبرامایسین استفاده می‌گردد(۷). اشرشیا کُلای یک باکتری گرم منفی از خانواده انتروباکتریاسه است که در سال ۱۸۵۵ کشف شد. این باکتری بی‌هوازی اختیاری و بدون اسپور می‌باشد. باکتری‌های اشرشیا کلای، اغلب متحرک هستند. باکتری اشرشیا کلای به صورت عادی در دستگاه گوارش انسان زندگی می‌کند و معمولاً بیماری‌زا نیست؛ ولی سویه‌های خاصی از این باکتری تحت شرایط خاص می‌توانند بیماری‌های مختلفی ایجاد کنند. بیماری‌هایی که عامل آن به حساب می‌آید در دو دسته عفونت‌های روده‌ای و غیر روده‌ای قرار دارند. گونه‌های اشرشیاکلای در خارج از روده، مثلاً در مجاری ادراری و ملتحمه و ... نیز می‌توانند بیماری‌زا باشند(۸).

باسیلوس سابتیلیس باکتری باسیلی شکل است که می‌تواند اسپور تولید کند و به مدت چندین دهه زنده بماند و

در برابر شرایط نامساعد محیطی، مانند خشکسالی، نمک بالا، pH بالا، تشعشع و حلال‌ها مقاومت کند. باسیلوس‌ها گرم مثبت، میله‌ای شکل و اغلب هوازی اجباری و بی‌هوازی اختیاری هستند. باسیلوس سوبتلیس فقط در بیمارانی که به ضعف پاسخ ایمنی شدید دچار هستند، می‌تواند عامل بیماری‌زایی باشد و می‌توان از آن در اشخاص سالم به عنوان یک پروبیوتیک استفاده کرد و به‌ندرت باعث مسمومیت غذایی می‌گردد (۹). باسیلوس سابتیلیس به دلیل تولید تاژک بسیار، دارای توانایی حرکت سریع در مایعات است و به عنوان یک مدل آزمایشگاهی، معمولاً باکتری گرم مثبت در مقابل اشرشیاکلای گرم منفی قرار می‌گیرد(۱۰). استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، کوکسی گرم مثبت و کواگولاز منفی در جنس استافیلوکوکوس است. این باکتری، بخشی از فلور همزیست پوست انسان است و در غشای مخاطی بسیاری از جانوران نیز دیده شده است. این باکتری از طریق پروتئین‌های سطحی خود، به پروتئین‌های خونی و ماتریکس خارج سلولی متصل می‌شود و با ایجاد بیوفیلم بر روی کاتترهای درون عروقی و پروتزهای پزشکی، مانند مبتلایان به دیالیز موجب عفونت می‌شود. ارگانیسم‌های مقاوم بیش‌تر در روده دیده شده‌اند؛ اما باکتری‌هایی که ساکن پوست هستند نیز می‌توانند به دلیل دفع آنتی‌بیوتیک‌ها در ترشحات غدد عرقی مقاوم شوند (۱۱). استافیلوکوکوس آرئوس، کوکسی گرم مثبت و بی‌هوازی اختیاری است که به شکل خوشه در زیر میکروسکوپ دیده می‌شود. کلنی باکتری، به شکل زرد طلایی است و هنگامی که بر روی محیط آگار خوندار رشد می‌کند، همولیز ایجاد می‌کند(۱۲). استافیلوکوکوس آرئوس با تولید انتروتوکسین، مسمومیت غذایی ایجاد می‌کند. باکتری ممکن است به شکل همزیست بر روی پوست وجود داشته باشد و از بینی یک سوم از مردم جدا شود.

گیاهان دارای متابولیت‌های ثانویه می‌باشند. از بین این متابولیت‌ها اثر ضد باکتریایی ترکیبات فنلی و فلاوونوئیدی در گزارش‌های متعددی آمده و بین میزان ترکیبات فنلی و خاصیت آنتی اکسیدانی این مواد ارتباط مستقیمی وجود دارد(۱۳). ترکیبات فنلی با مکانسیم‌هایی همانند افزایش جذب سطحی، شکستن غشای سلول، تداخل در عمل پروتئین‌های غشایی، واکنش با آنزیم‌ها و کاهش یون‌های فلزی مورد نیاز میکروارگانیسم‌ها برای باکتری‌ها سم تولید می‌کنند (۱۴).

هدف در این تحقیق، بررسی اثر متابولیت‌های ثانویه بر عصاره گیاهان مورد نظر و تأثیر ضد باکترایی آن‌ها بر باکتری‌های مورد بررسی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

گیاه حنا، مورد، انار و گردو از اطراف باغ بهادران در مرداد ماه سال ۱۳۹۶ جمع آوری شد و بعد از جمع آوری، برگ گیاه حنا و مورد و پوست انار و گردو در یک مکان خشک و فاقد نور قرار گرفتند و پس از خشک شدن در

آسیاب پودر شدند و برای تهیه عصاره‌ها مورد استفاده قرار گرفتند. نمونه‌های باکتریایی نیز به صورت لیوفیلیزه از سازمان ملی و پژوهش های علمی و صنعتی ایران تهیه شدند.

سویه‌های باکتریایی مورد استفاده در این پژوهش عبارت است از: اشرشیا کلای ATCC: 25922، استافیلوکوکوس آرئوس ATCC:25923- استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس ATCC:12228، باسیلوس سابتیلیس ATCC: 6633 و سودوموناس آئروژینوزا ATCC:9027 .

تهیه عصارهٔ متانولی و عصارهٔ آبی

۲۵ گرم از پودر هر گیاه با هم مخلوط و در یک ارلن استریل ریخته شد و ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر به آن اضافه گردید و به مدت ۷۲ ساعت درون شیکر قرار گرفت. سپس این محلول، توسط کاغذ صافی جدا و بخش آبدار را درون پلیت ریخت شد و درون دستگاه فور با دمای ۴۵ درجه سانتی گراد خشک گردید. در تهیه عصاره متانولی در ارلن استریل ۵۰۰ میلی لیتر متانول ۹۶% هم به آن اضافه شد.

تهیه سوسپانسیون باکتری

ابتدا از هر باکتری، بعد از احیا، به صورت خطی بر روی محیط کشت (BHI) آگار کشت خالص تهیه و در یخچال به مدت طولانی نگهداری شد. برای تهیهٔ سوسپانسیون میکروبی استاندارد از باکتری تازه کشت داده شده (۱۸ تا ۲۴ ساعته) چند کلنی برداشت و به محیط کشت مولر هینتون براث منتقل گردید و سپس برای استاندارد کردن سوسپانسیون میکروبی تهیه شده؛ از دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۶۲۵ نانومتر استفاده شد. جذب نوری (OD) حدود ۰/۰۸درصد تا ۰/۱ درصد کدورتی معادل$\frac{cfu}{ml}$ ۱۰^۸ × ۱/۵ باکتری را نشان خواهد داد.

بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره الکلی و آبی

الف) روش چاهک

برای تعیین حساسیت سویه‌های باکتریایی نسبت به عصارهٔ الکلی و آبی تهیه شده، از روش انتشار در چاهک استفاده شد. ابتدا به کمک سواپ استریل سوسپانسیون باکتری (که کدورتی معادل کدورت لولهٔ نیم مک فارلند استاندارد داشت)، به صورت یکنواخت در سطح محیط کشت داده شد. سپس در محیط کشت مولر هینتون آگار در فواصل معین و مساوی، ۶ چاهک به قطر ۶ میلی متر ایجاد گردید. ۵۰ میکرولیتر از غلظت های مختلف عصاره (۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵ گرم بر میلی لیتر) آماده و به هر چاهک اضافه شد. در یک چاهک به عنوان کنترل منفی از (DMSO) ۱۰% استفاده و به عنوان کنترل مثبت از آنتی‌بیوتیک جنتامایسین (برای باکتری‌های

گرم منفی) و آنتی‌بیوتیک تترا سایکلین (برای باکتری‌های گرم مثبت) استفاده شد. به منظور تأیید نتایج، هر آزمون برای هر عصاره و هر میکروارگانیسم سه بار تکرار شد.

ب) روش دیسک دیفیوژن (روش انتشار در آگار با استفاده از دیسک)

برای تعیین حساسیت سویه‌های باکتریایی نسبت به عصارهٔ الکلی و آبی تهیه شده، از روش دیسک دیفیوژن استفاده شد. ابتدا به کمک سواپ استریل سوسپانسیون باکتری (که کدورتی معادل کدورت لوله ی نیم مک فارلند استاندارد داشت)، به صورت یکنواخت در سطح محیط کشت داده شد. برای تهیه دیسک‌های مورد آزمایش، هر دیسک با عصاره‌های تهیه شده به مقدار ۳۰ میکرولیتر اشباع گردید. سپس دیسک‌ها به مدت ۳۰ دقیقه درون پلیت استریل قرار داده شد تا عصاره به طور کامل جذب دیسک شود. در هر سری آزمایش یک دیسک حاوی DMSO، به عنوان کنترل منفی و دیسک جنتامایسین و تتراسایکلین، به عنوان کنترل مثبت به کار برده شد و سپس در محیط کشت مولر هینتون آگار در فواصل معین و مساوی از دیسک‌های آغشته به غلظت‌های مختلف عصاره (۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵، ۱۵/۶۲، ۷/۸۱ گرم بر میلی لیتر) کاشته و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. سپس قطر هاله‌های عدم رشد با کولیس اندازه‌گیری و میانگین مربوط گزارش گردید، (هر تست سه بار تکرار گردید).

ج) سنجش حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) با استفاده از روش میکرودایلویشن

در این تحقیق، MIC عصارهٔ الکلی به روش میکرو دایلویشن انجام شد. ابتدا از هفت لولهٔ استریل رقت‌های ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵، ۱۵/۶۲، ۷/۸۱ میلی گرم بر میلی لیتر از عصاره الکلی تهیه و سپس از پلیت‌های ۹۶ چاهکی استفاده شد و از هر کدام از رقت‌های تهیه شده از عصاره الکلی به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر درون چاهک‌ها ریخته و مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر سوسپانسیون باکتریایی (معادل لولهٔ نیم مک فارلند) به آن اضافه گردید و سپس مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت مولر هینتون براث افزوده و به عنوان کنترل مثبت ۱۵۰ میکرولیتر از محیط کشت مولر هینتون براث و ۱۵۰ میکرو لیتر سوسپانسیون باکتریایی حاوی $۱/۵\times۱۰^{۸}$ $\frac{cfu}{ml}$ به آن اضافه گردید. به عنوان کنترل منفی، ۱۵۰ میکرولیتر از رقت‌های تهیه شده از عصاره الکلی و ۱۵۰ میکرولیتر از محیط کشت مولر هینتون براث اضافه گردید و در ادامه جذب نوری چاهک‌ها توسط دستگاه الایزا خوانده و در دمای ۳۷ سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد و سپس مجددا توسط دستگاه الایزا خوانده شد و بر اساس اعداد MIC مشخص گردید. برای تعیین MBC، از هر چاهک مقدار ۲۰ میکرولیتر با سمپلر استریل برداشته و روی محیط کشت مولر هینتون اگار به صورت جداگانه کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت، انکوباسیون پلیت‌ها مورد بررسی قرار

گرفتند. غلظتی که در آن هیچ گونه رشدی از باکتری دیده نشد، به عنوان MBC در نظر گرفته شد. بـه منظـور تأییـد نتایج آزمون هر نمونه ۳ بار تکرار شد.

اندازه‌گیری ترکیبات فنلی

مقدار ترکیبات فنلی با استفاده از روش فولین ـ سیوکالتیو (Folin- ciocalteu) تعیین شد(۱۵). به منظور اندازه‌گیری فنل‌ها، ابتدا ۵۰ میکرولیتر از عصاره تهیه شده درون لوله‌های آزمایش ریخته شد و سپس به هـر یـک از لولـه‌هـای تست مربوط آب مقطر اضافه گردید تا به حجم ۵۰۰ میکرو لیتر برسد. به هـر کـدام از نمونـه‌هـا ۲۵۰ میکرولیتـر معرف فولین سیوکالتو (1N) افزوده شد و سپس ۱/۲۵ میلی لیتر محلول ۲۰ درصد سدیم کربنـات اضـافه گردیـد و برای مخلوط شدن کامل ترکیبات آن‌ها را ورتکس کرده و در نهایت محتوای به دست آمده، به مـدت ۴۰ دقیقـه در تاریکی قرار گرفت و سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۲۵ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر قرائت شد.

اندازه‌گیری فلاونوئیدها

این اندازه‌گیری با استفاده از آلومینیوم کلراید که به وسیلهٔ روش Abdel-Hamed با اندکی تغییرات توضیح داده شده است؛ صورت گرفت(۱۶). به این منظور ابتدا مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره تهیه شده را درون لوله‌های آزمـایش ریخته و سپس ۱۰۰ میکرو لیتر الکل ۲۰% و ۲ قطره گلاسیال استیک اسید اضافه گردید و با استفاده از متانول بـه حجم ۳ سی‌سی رسانده و بعد از ۴۰ دقیقه، جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۱۵ نانومتر قرائت شد. محلـول بلانـک باید بدون الکل تهیه گردد.

اندازه‌گیری تانن

این اندازه‌گیری بر اساس روش بیان، توسط porter انجام گرفت (۱۷). به این منظور ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره تهیه شده درون لوله‌های آزمایش ریخته و با استفاده از استون ۷۰% به حجم ۰/۵ رسانده شد. ۳ میلی لیتر بوتانول ـ HCl با نسبت ۹۵:۵، یعنی ۹۵ میلی لیتر بوتانول و ۵ میلی لیتر HCl به هـر یـک افـزوده و سـپس ۰/۱ میلـی لیتـر محلول فریک به محلول اضافه گردید و در نهایت، مخلوط به دسـت آمـده در ورتکـس قـرار گرفـت و هـر یـک از لوله‌های آزمایش بسته شد و آن‌ها به مدت ۶۰ دقیقه در بن ماری بـا دمـای ۱۰۰ درجـه سـانتی‌گـراد قـرار گرفتنـد. محلول بلانک به حرارت و قرار گرفتن در بن ماری نیازی ندارد. بعـد از خنـک شـدن لولـه‌هـای آزمـایش، جـذب نمونه‌ها در طول موج ۵۵۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر خوانده شد.

اندازه‌گیری ظرفیت آنتی اکسیدانی

اثر آنتی اکسیدانی عصاره‌ها با روش اندازه‌گیری کاهش ظرفیت رادیکالی (RSC) به کمک ۲، ۲-دی فنیل ۱-بیکریل هیدرازیل مورد ارزیابی قرار گرفت. DPPH ترکیبی است بنفش رنگ که به دلیل وجود گروه‌های فنیل در ساختارش به راحتی به صورت رادیکال درمی‌آید و در واقع منبع رادیکال آزاد می‌باشد.

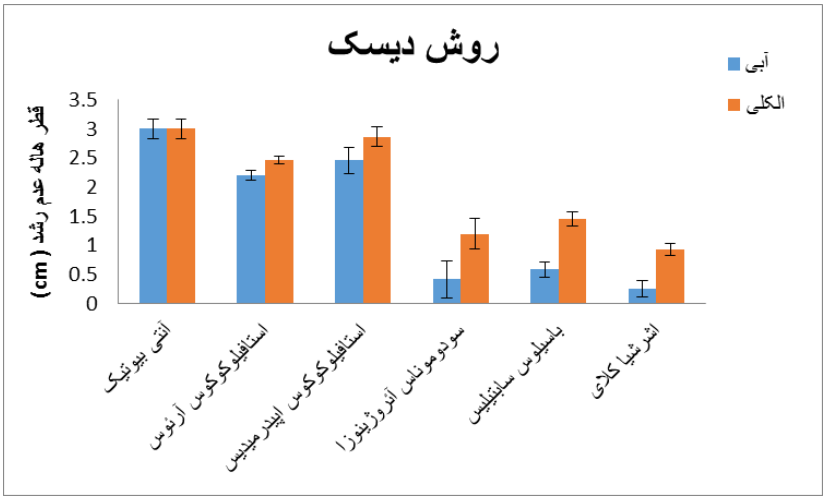
در مرحلهٔ بعد، ۰/۰۱ عصاره از هر نمونه را برداشته و در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد و به این ترتیب، استوک اولیه تهیه گردید. سپس مقادیر ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ میکرولیتر از استوک اولیه برداشته شد و با آب مقطر به حجم ۱ میلی لیتر رسید. سپس ۳ میلی لیتر محلول بلانک (DPPH متانولی) به آن اضافه و به مدت ۶۰ دقیقه در تاریکی تکان داده شد و جذب محلول‌های حاصل در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. نمونه بلانک در این آزمایش آب مقطر بود(۱۸).

روش‌های آماری

داده‌های این آزمایش‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵% مورد مقایسه قرار گرفت.

نتایج

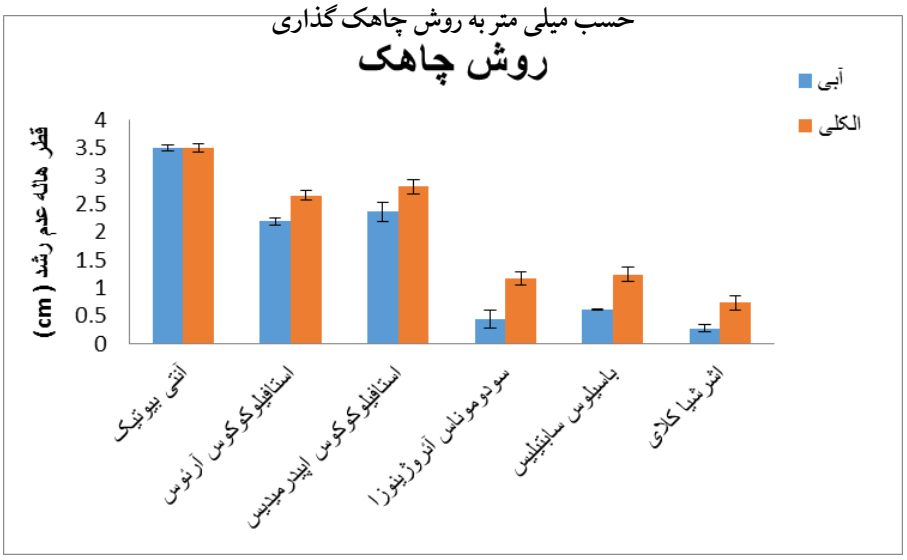
در پژوهش حاضر، عصاره‌ای از ترکیب برگ مورد، برگ حنا، پوست گردو و انار را با دو حلال آبی و اتانولی به‌دست آورده و اثر آن‌ها با روش چاهک گذاری و دیسک دیفیوژن بر روی باکتری‌های اشرشیا کلای، استافیلوکوکوس آرئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، باسیلوس سابتیلیس و سودوموناس آئروژینوزا مورد آزمایش قرار گرفت که نتایج آن در نمودارهای (۱) و (۲) قابل بررسی می‌باشد.



نمودار ۱. میانگین قطر هاله‌های عدم رشد در غلظت‌های مختلف عصاره‌های آبی و الکلی بر باکتری‌های مورد آزمایش بر حسب میلی متر به روش دیسک دیفیوژن

نتایج نمودار ۱ و ۲ نشان می‌دهد که در عصاره‌های الکلی، بیش‌ترین میزان قطر هالهٔ عدم رشد به باکتری استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و کم‌ترین میزان قطر هالهٔ عدم رشد به باکتری اشرشیاکلای مربوط است. همچنین در عصاره‌های آبی، بیش‌ترین میزان قطر هالهٔ عدم رشد به باکتری استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و کم‌ترین میزان قطر هالهٔ عدم رشد به باکتری اشرشیاکلای مربوط است. در هر دو روش، دیسک دیفیوژن و چاهک‌گذاری تأثیر عصارهٔ الکلی نسبت به آبی بیش‌تر است.

نمودار ۲. میانگین قطر هاله‌های عدم رشد در غلظت های مختلف عصاره‌های آبی و الکلی بر باکتری‌های مورد آزمایش بر حسب میلی متر به روش چاهک گذاری



جدول ۱. مقادیر MIC و MBC عصارهٔ الکلی بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر باکتری‌های مورد آزمایش

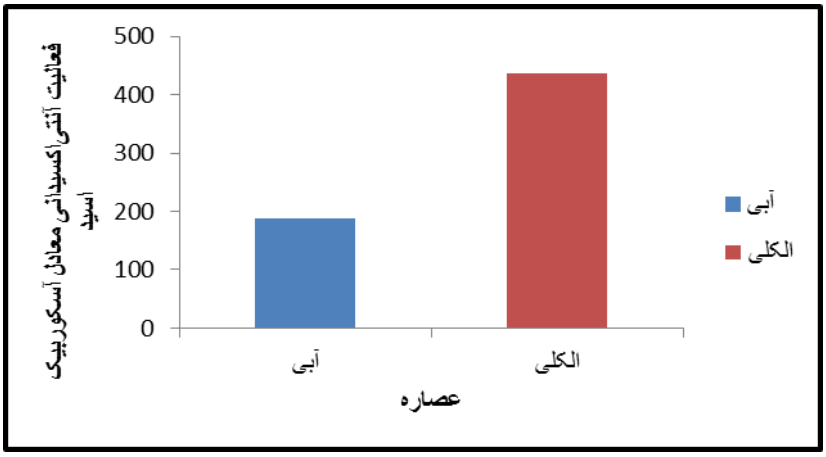
باکتری‌ها	MIC mg/ml بر حسب	MBC mg/ml بر حسب
سودوموناس آئروژینوزا	۲۵۰	۵۰۰
استافیلوکوکوس آرئوس	۲۵۰	۵۰۰
استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس	۶۲/۵	۱۲۵
باسیلوس سابتیلیس	۱۵۰	۵۰۰
اشرشیاکلای	۳۱/۲۵	۶۲/۵

نتایج جدول ۱. حاکی از آن است که کم‌ترین مقدار MIC در عصارهٔ الکلی با غلظت ۳۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و کم‌ترین مقدار MBC در عصارهٔ الکلی با غلظت ۶۲/۵ بر میلی‌لیتر برای باکتری اشرشیا کلای می‌باشد.

جدول ۲. میزان ترکیبات فنل کل، تانن و فلاونوئید موجود در عصاره الکلی و آبی

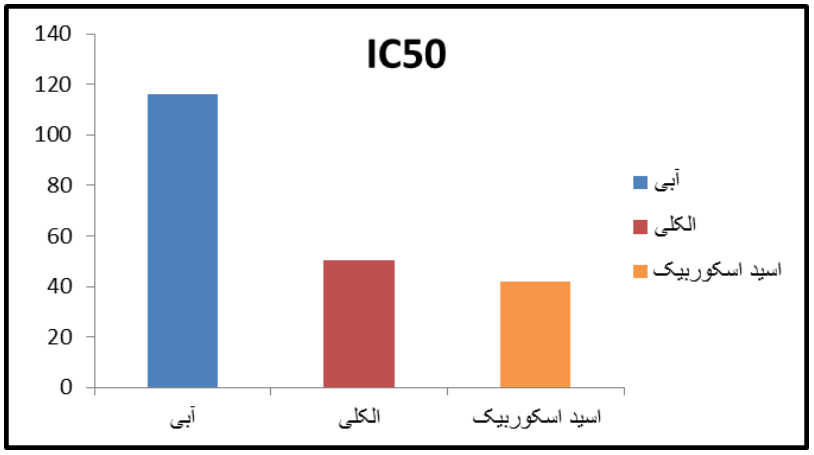
غلظت عصاره گیاهان(mg/ml)		۳۱/۲۵	۶۲/۵	۱۲۵	۲۵۰	۵۰۰
ترکیبات فنلی (mg/ml)	الکلی	۰/۰۷۴±/۹۴ ۱۲	۲/۴۵±/۶۱ ۴۱	۶/۷۳±۶۷/۵	۷/۲۵±۹۷/۴۸	۳/۴۷±۱۵۳/۵۷
	آبی	۱/۷۶±۵/۱۳	۲/۶۴±/۸۸ ۲۵	۳/۴۷±/۱۷ ۵۷	۱/۲۱±۶۱/۸۸	۰/۵۱ ±۹۸/۷۸
تانن (mg/ml)	الکلی	۰/۰۶±/۳۵	۰/۴۳۵±۲/۴	۰/۰۶۳±/۰۱ ۳	۰/۴۴±۳/۱۵	۰/۱۰۶±۳/۹۳
	آبی	۰/۰۱۳±/۲۸ ۰	۰/۱۲۱±۰۲۷ ۱/	۰/۱۳۷±/۴۳ ۱	۰/۴۹±۲/۱۱	۰/۱۴۱±۲/۲۷
فلاونوئید Quersitin (mg/ml)	الکلی	۰/۳۳۴±۱۶۳ ۳/	۰/۲۳۷±۲۸۳ ۵/	۰/۱۲۷±۱۸۶ ۸/	۰/۵۴۳±۹/۱۵	۰/۰۴۷±۱۰/۹۵
	آبی	۰/۱۶۴±/۱۵ ۱	۰/۲۰۷±/۵۳ ۱	۰/۱۰۹±/۴۴ ۲	۰/۱۸۴±۳/۸۳	۰/۲۱۳±۴/۸۹

با توجه به نتایج، جداول مقایسه بین میزان تانن، فلاونوئید و فنل در عصارهٔ آبی و الکلی نشان می‌دهند که بیش‌ترین میزان تانن در عصارهٔ الکلی با مقدار ۳/۹۳، فلاونوئید با مقدار ۱۰/۹۵ و فنل با مقدار ۱۵۳/۵۷ در غلظت ۵۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر می‌باشد که این مقادیر نسبت به مقدار این سه ماده در عصارهٔ آبی، به ترتیب حدودا دو، پنج و یک و نیم برابر است.



نمودار ۳. نمودار میزان فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های آبی و الکلی

میزان فعالیت آنتی اکسیدانی در عصاره الکلی به مقدار ۴۳۶/۸۳ نسبت به عصاره آبی، حدود دو برابر است.



نمودار ۴. IC50 عصاره‌های الکلی و آبی در غلظت‌های مختلف بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر

بر اساس نمودار ٤، غلظت‌هایی از عصاره‌های آبی و الکلی که دارای درصد مهار رادیکالی ۵۰ % IC50 بود؛ محاسبه گردید. بدیهی است که هر چه این عدد کوچک‌تر باشد، قدرت آنتی اکسیدانی بیش‌تر است. در این نمودار مقادیر درصد مهار رادیکالی عصاره الکلی با داشتن مقدار ۵۰/۲۷ ، عصاره آبی با مقدار ۱۱۶/۲۱ و اسید آسکوربیک با مقدار ٤١/٨٦، نشان‌دهندهٔ خاصیت آنتی اکسیدانی بیش‌تر عصاره الکلی نسبت به عصاره آبی است.

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج مطالعه حاضر، عصاره‌های آبی و الکلی ترکیب چهار گیاه برگ مورد، برگ حنا، پوست گردو و پوست حنا بر روی برخی از باکتری‌های گرم مثبت، مانند استافیلوکوکوس آرئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و باسیلوس سابتیلیس و برخی از باکتری‌های گرم منفی، مانند اشرشیاکلای و سودوموناس آئروژینوزا دارای اثر ضدباکتریایی است که این تأثیر در مقایسه با آنتی‌بیوتیک بررسی شد. نتایج هر دو روش دیسک دیفیوژن و چاهک گذاری برای عصاره الکلی و آبی نشان می‌دهد که با افزایش میزان غلظت عصاره، میزان قطر هاله عدم رشد افزایش می‌یابد. در تحقیق حاضر، بیش‌ترین میزان قطر هاله عدم رشد در زمینه با استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استافیلوکوکوس آرئوس به عصاره الکلی و کم‌ترین میزان قطر هاله عدم رشد در رابطه با اشرشیاکلای مربوط است. عصاره آبی در مورد باکتری‌های باسیلوس سابتیلیس، اشرشیاکلای، سودوموناس آئروژینوزا، فاقد خاصیت کشندگی است.

بوکائییان و همکارانش، در سال ۲۰۱۴، اثر عصاره‌های دانه زیره سبز، برگ مورد، شوید، گشنیز و مرزنگوش، حنا و پوست انار را بر روی استافیلوکوکوس آرئوس و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت‌های بیمارستانی بررسی کردند که نتایج آن نشان می‌دهد که از بین تمامی گیاهان نام برده، حنا بر روی استافیلوکوکوس آرئوس با حداقل غلظت مهار کنندگی ۲۵۰ میلی‌گرم بر میلی لیتر، دارای بهترین و بیش‌ترین اثر است. (۱۹).

شهبا و همکارانش نیز در سال ۲۰۱۳ تحقیقاتی در همین زمینه بر روی گیاه حنا داشتند و تأثیر عصاره‌های متانولی، آبی و اتیل استات حنا را بر روی باکتری‌های عامل عفونت ادراری بررسی کردند. نتایج نشان می‌دهند که عصاره متانولی و آبی حنا بر روی تنها ۲ باکتری سودوموناس و انتروباکتر اثر گذار بوده و بر روی هیچ کدام از باکتری‌های دیگر مانند (اشرشیاکلای و کلبسیلا پنومونیه) اثری نداشته است و همگی به آن عصاره‌ها مقاومت نشان دادند. علاوه بر این طباطبایی یزدی و بهبهانی، آثار آنتی میکروبی عصاره‌های متانولی و آبی حنا را بر روی باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت انتخاب شده بررسی کردند که نتایج نشان می‌دهد عصاره متانولی و آبی حنا در غلظت ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر، بر سودوموناس ائروجینوزا و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استرپتوکوکوس پایوجنز دارای بهترین اثر می‌باشند (۲۰).

با توجه به مقادیر MIC و MBC عصارهٔ الکلی چهار گیاه پژوهش حاضر، کم‌ترین مقدار MIC و بیش‌ترین مقدار آن در مورد عصاره الکلی، به ترتیب ۳۱/۲۵ و ۲۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر است که این مقادیر به باکتری اشرشیا کلای، سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس آرئوس مربوط می‌باشد و بالاترین MBC به دست آمده در

عصاره الکلی به ترتیب به میزان ۵۰۰و ۶۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر است.

بر اساس مقایسه مقادیر MIC و MBC ، عصاره‌های الکلی دارای اثر ضد میکروبی قوی‌تری نسبت به عصاره‌های آبی هستند که علت آن را می‌توان نسبت بیش‌تر وجود ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی و تانن موجود در داخل عصارهٔ الکلی نسبت به عصارهٔ آبی دانست.

محبوبی و کاظم پور در سال ۲۰۱۱، در تحقیقی به بررسی اسانس گیاه مورد پرداختند. در این بررسی این گونه علیه باکتری‌های استافیلوکوکوس ارئوس، سودوموناس آئروژینوزا و اشرشیاکلای ارزیابی شد. در این مطالعه سودوموناس آئروژینوزا به اسانس مورد مقاومت بیش‌تری نشان داد؛ در حالی که استافیلوکوکوس و اشرشیاکلای حساس‌تر بودند؛ به طوری که میزان MIC برای استافیلوکوکوس ۲ میلی گرم بر میلی لیتر، برای اشرشیاکلای ۱ میلی گرم برمیلی لیتر و برای سودوموناس آئروژینوزا۸ میلی گرم بر میلی لیتر بود. در مطالعه تیموری در سال ۱۳۸۸، بر عصارهٔ اتانولی پوست گردو، میزان MIC بر حسب میلی گرم در لیتر برای باکتری‌های استافیلوکوکوس، سودوموناس آئروژینوزا و باسیلوس سرئوس به ترتیب ۲۵۰،۱۲۵ و ۲۵۰ گزارش شد. همچنین میزان MBC برای هر سه باکتری >۱۰۰۰ بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر محاسبه گردید.

در همین سال، دوزیم و همکاران، آثار و مکانیسم فعالیت آنتی باکتریال فلاونوئیدهای جدا شده از برخی گونه‌های گیاهی را بر استافیلوکوکوس آرئوس مقاوم به متی سیلین بررسی کردند و نتایج آن آثار ضد باکتریایی و ضد قارچی را نشان دادند(۲۱). کیم و همکاران (۲۰۰۲) پوست انار را منبعی غنی از آنتی اکسیدان‌ها و مواد فنولیکی دانستند. در واقع فعالیت آنتی اکسیدانی انار را به وجود مواد فنولیک، به خصوص الاژیک اسید و پونیکالاژین نسبت می‌دهند (۲۲). ترکیبات فنلی روی غشای سلولی اثر گذاشته و نفوذپذیری آن را تغییر می‌دهد و باعث آزادسازی محتویات درون سلولی می‌گردد که می‌تواند با مختل کردن عملکرد غشا، مثل انتقال الکترونی، فعالیت آنزیمی یا جذب مواد مغذی همراه باشد. از طرفی مشخص شد که روش عصاره گیری و نوع حلال مورد استفاده، بر فعالیت ضدمیکروبی عصاره گیاهی مؤثر است(۲۳).

این مطالعه به منظور اندازه‌گیری قدرت آنتی اکسیدانی و آنتی باکتریایی چهار گیاه (حنا، مورد، پوست گردو و پوست انار) انجام شد. نتایج گویای آن است که ترکیباتی با خاصیت ضدمیکروبی، مانند فنل‌ها، فلاونوئیدها، تانن در عصارهٔ گیاه می‌توانند دلیل خاصیت‌های ضدمیکروبی عصاره باشند. طبق مطالعات مقدماتی فیتوشیمیایی، سطح ترکیبات پلی فنلی در عصاره الکلی و میزان فلاوونوئیدها در عصاره الکلی و آبی قابل توجه است. بنابراین، این نتایج ارزشمند می‌توانند حاکی از نقش بیولوژیکی پر اهمیت مواد پلی فنلی موجود در نمونه‌های این گیاه باشند. نتایج مقایسهٔ تأثیر عصاره آبی و الکلی به روش دیسک دیفیوژن و چاهک‌گذاری بر روی باکتری‌های

پژوهش حاضر، نشان می‌دهد که در هر دو روش، تأثیر عصاره الکلی نسبت به آبی بیش‌تر است. این طور استنباط می‌شود که حلال اتانول، با استخراج بهتر مواد مؤثر گیاهان مورد استفاده می‌تواند اثر ضدباکتریایی خود را بهتر از عصاره آبی، به خصوص بر باکتری‌های گرم منفی پژوهش حاضر نشان دهد. دانشمندان بر این باورند که فعالیت آنتی اکسیدانی فلاوونوئیدها به علت قابلیت در اختیار گذاشتن هیدروژن آن‌ها می‌باشد (Hydrogen donation). فلاوونوئیدها گروه وسیعی از ترکیبات هستند که در پاسخ به عفونت‌های میکروبی در گیاه ساخته می‌شوند و علیه گستره وسیعی از میکروارگانیسم‌های فعال می‌باشند. اثر ضد میکروبی فلاوونوئیدها، از طریق تشکیل کمپلکس با غشای خارجی و پروتئین‌های محلول که بینشان متصل هستند، می‌باشد. ترکیبات فنلی هم با تداخل در عمل غشای سیتوپلاسمی و تداخل در ورود و خروج مواد به درون سلول، اثر ضد میکروبی خود را اعمال می‌کنند. علت حساسیت بیش‌تر باکتری‌های گرم مثبت نسبت به عصاره‌ها، ممکن است ناشی از این باشد که این باکتری‌ها در دیواره سلولی یک لایه دارند؛ در حالی که در باکتری‌های گرم منفی این دیواره از چند لایه تشکیل شده است. بنابراین، می‌توان میزان قابل توجه فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره آبی و الکلی را به مقدار بالای ترکیبات فلاوونوئیدی نسبت داد. در کل می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که دلیل خاصیت ترکیب عصاره گیاهان مورد مطالعه می‌تواند به علت وجود ترکیباتی، همانند فنلی، فلاوونوئیدها و تانن‌ها در این ترکیب عصاره گیاهی باشد.

منابع و مآخذ

1- Firn R. 2010. Nature's Chemicals. Oxford University Press, Oxford. 74-75.

2- Zargari, AS, 2004. Medicinal Plants. Volume 2, University of Tehran Publications, page 465. [In Persian]

3- Naserian R. 1999. Study of phyto chemical and antibacterial effect of Myrtus communis Shiraz Medical University. [In Persian]

4- Fattahi Bafafi, AS, Falihzadeh, h. And Mossadegh, M., 2010. Efficacy of henna extract on cutaneous ulcer in mice Scientific Journal of c / BALB Sur Kerman University of Medical Sciences, Volume 4, pp. 821 - 881. [In Persian]

5- Sarkhosh, AS, Zamani, Zaza, Fatahi Moghaddam, MR, Ghorbani Ghojdzi,. And Hadan, H., 2007 A Review on the Pharmacological and Pharmacological Properties of Pomegranates. Medicinal Plants, 6 (22): 13-24. [In Persian]

6- Rajat Rakesh M, Ninama Govind L, Mistry Kalpesh, Parmar Rosy, Patel Kanu, Vegad MM. 2012 .National Journal of Medical Research Natl J Med Res; 2(2): 156-159.

7- Chanawong A, M'zali FH, Heritage J, Lulitanond A, Hawkey PM .2001. SHV-12, SHV-5, SHV-2a and VEB-1 extended-spectrum β- lactamases in Gram-negative bacteria isolated in a university hospital in Thailand. J Antimicrob Chemother; 48:839-852.

8- Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, et al.2010. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. The Lancet infectious diseases.;10(9):597-602.

9- Madziga HA. Sanni S .Sandabe UK. 2010. Phytochemical and Elemental analysis of Acalypha wilkesiana Leaf. Journal of American Science. 6(11): 510-514.

10- Fernandes, P. A. V., Arruda, Santos, I. R., A. F. A. B., Araujo, A. A., Maior, A. M. S., and Ximenes, E. A. 2007. Antimicrobial activity of surfactants produced by Bacillus Subtilis.

11- Burt S A and Reinders R.2003. DAntibacterial activity of selected plant essential oil against Escherichia coli 0175:H7. Letter in applied microbiology, 36:162-167.

12- Ahari, H., Shahbazzadeh, D. and Misaghi, A. 2009. Selective amplification of SEA, SEB and SEC genes by multiplex PCR for rapid detection of Staphylococcus aureus.

Pakistan J Nutr. 8: 1224-1228.

13- Mujeeb, F., Bajpai, P. and Pathak, N., 2014. Phytochemical evaluation, antimicrobial.activity, and determination of bioactive components from leaves of Aegle marmelos. BioMed research international, 1-12.

14- Negi PS. Review Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. Int J Food Microb. 2012; 156(1):7-17.

15- Amensour M, Bouhdid S, Fernandez-Lopez J, et al.2010. Antibacterial activity of extracts of *Myrtus communis* against food-borne pathogenic and spoilage bacteria. Int J Food Proper; 13: 1215-1224.

16- Cai Y.Z. Sun M. 2003. Antioxidant activity of betalins from plants of the Amaranthacea. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 51: 2288-2294.

17- Liu, Y., Guo, C., Yang, J., Wei, J., Xu, J. and Cheng, S., 2004. Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. Food Chem. 2006;96:254–60.

18- Ghasemi-Pirbalouchi A, Jahanbazi P, Enteshari S. 2010. Antimicrobial activity of some iranian medicinal plants. Arch Biol Sci Belgrade, 62(3): 633-642.

19- Brahmeshwari, G., Surekha, M. and Saini, K., 2012. Antifungal activity of naphthothiazoles derived from Lawsone (Lawsonia inermis). African Journal of Biotechnology, 11(78), 14405-14409.

20- Casanova, E., García-Mina, J.M. and Calvo, M.I. 2008. Antioxidant and antifungal activity of Verbena officinalis L. leaves. Plant Foods for Human Nutrition, 63(3): 93-97.

21- Arun P, Purushotham KG, Johnsy jayarani J, kumaraV. 2010. In vitro antibacterial activity and flavonoid contents of *Lawsonia inermis* (Henna). Int J PharmTech Res, 2(2): 1178-1181.

22- Anderson K.J. Teuber S.S. 2001. Walnut polyphenolics inhibit in vitro human plasma and LDL oxidation, biochemical and molecular action of nutrients. J Nutr. 131(11):2837-42.

23- Walter C, Zabta K, Wari S, Afzal I, Malik RN. 2011. Antibacterial activityin herbal products used in Pakistan. Pak J Bot, 43:155-162.

Study of antioxidan and antimicrobial effects of aqueous and alcoholic extract of plant (*Lawsonia inermis, punica granatum*, walnut, Myrtus) on gram positive and gram negative bacteria

Siminkhosravi[1] ,zahra rezayatmand[2], mozhgan ghiasian[1]

1- Department of Microbiology,Falavarjan beranch, Islamic Azad University,Isfahan, Iran

2-Department of Biology,Falavarjan branch,Islamic Azad University,Isfahan, Iran

rezayatmand@iaufala.ac.ir

Abstract

Recently, due to the resistance of bacterial pathogens to the detection of new antimicrobials, much attention has been paid. In the present study, the antimicrobial properties of four extracts of leafy leafy leaves, henna leaves, walnut shells and pomegranate peel on three gram-positive bacteria, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis and Bacillus subtilis, and two gram-negative bacteria of Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa were studied. it placed. Antimicrobial effect of the alcoholic and aqueous extract of these plants was studied by diffusion and well discarding method by measuring the non-growth aura's diameter and the minimum inhibitory concentration was investigated by ELISA method. The results show that in two methods, diffusion discs and wells in alcoholic and aqueous extracts have the highest effect on Staphylococcus epidermidis bacterium and have the least effect on E. coli bacteria. The minimum amount of MIC for alcoholic extract is 31.25 and MBC 54.25 mg / ml, which is related to Escherichia coli bacteria. The results measurements of total phenolic compounds, flavonoids and tannins also indicate that the highest amount of this product is in the concentration of 500 mg / ml of the extract of plants. Also, the amount of antioxidant activity in the alcoholic extract is about twice as much as the aqueous extract. The results of this study indicate that the combination of extracts of plants, especially alcoholic extract, has a more antibacterial effect than the aqueous extract, which can be due to the presence of more antibacterial compounds in the extract.

Key words :pathogenic bacteria , antimicrobial agents , water extract, alcoholic extract.