مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۱۸، شماره۸، آذر۱۳۹۲(شماره پی در پی ۸۰)

خواص ضد میکروبی ریشه و اندام هوایی گیاه گل میمونی سازویی علیه باکتری‌های اشریشیاکلی، باسیلوس‌سرئوس و استافیلوکوکوس‌اورئوس در شرایط آزمایشگاهی

فرشته صفوی، پونه ابراهیمی*، حسین میقانی
گروه شیمی، دانشگاه گلستان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۱/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱/۱۷

چکیده

زمینه و هدف: با توجه به عوارض جانبی ناشی از مصرف داروهای شیمیایی، جایگزین کردن این داروها با ترکیبات طبیعی با خواص ضد باکتریایی مورد توجه قرار گرفته است. هدف این مطالعه، بررسی اجزای فیتوشیمیایی و خواص ضد میکروبی ریشه و اندام هوایی گیاه گل میمونی سازویی علیه باکتری‌های اشریشیاکلی، باسیلوس‌سرئوس و استافیلوکوکوس اورئوس در شرایط آزمایشگاهی بود.

روش بررسی: در این مطالعه، اثرات ضدمیکروبی عصاره‌های مختلف ریشه و عصاره متانولی اندام هوایی، حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت میکروب‌کشی عصاره‌ها، با روش دیسک دیفیوژن و نیز رقت لوله‌ای بر باکتری‌های اشرشیاکلی، باسیلوس‌سرئوس و استافیلوکوکوس‌اورئوس مورد سنجش قرار گرفت. از دی‌متیل‌سولفوکسید به‌عنوان شاهد منفی و از آمپی‌سیلین و نالیدیکسیک‌اسید به‌عنوان شاهدهای مثبت استفاده شد. داده‌ها با آزمون آماری آنالیز واریانس تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: ریشه و اندام هوایی گیاه گل میمونی سازویی حاوی فلاونوئیدها، گلیکوزیدها، ساپونین ها، تانن ها و ترپنوئیدها بود. هاله عدم رشد به وسیله عصاره‌های کلروفرمی و اتیل‌استاتی ریشه مشاهده نشد. در صورتی‌که، عصاره متانولی ریشه، مؤثرترین عصاره بر باسیلوس سرئوس با هاله عدم رشد ۲۱ میلی متر، حداقل غلظت مهارکنندگی ۶۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و حداقل غلظت میکروب کشی ۷۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. عصاره متانولی اندام هوایی دارای کمترین اثر بر روی اشریشاکلی بود.

نتیجه‌گیری: عصاره متانولی ریشه و اندام هوایی گیاه گل میمونی دارای اثر ضدمیکروبی به‌ویژه بر روی باکتری باسیلوس سرئوس بود. بنابرین، تحقیقات بیشتری برای شناسایی ترکیبات مختلف این گیاه و دستیابی به فرمولاسیون جدیدی از این ترکیبات در این گیاه لازم است.

واژه‌های کلیدی: استافیلوکوکوس‌اورئوس، اشرشیاکلی، باسیلوس‌سرئوس، ضدمیکروبی، گل میمونی سازویی

***نویسنده مسئول**: **پونه ابراهیمی**، گرگان، دانشگاه گلستان، دانشکده شیمی، گروه شیمی

Email: p.ebrahimi@gu.ac.ir

مقدمه

گیاه درمانی در بیماری‌ها و به ویژه بیماری‌های عفونی در سال‌های اخیر روند رو به فزونی پیدا کرده است. متخصصین عفونی تمایل زیادی به استفاده از این داروها جهت درمان عفونت‌ها دارند، زیرا عوارض این داروها در مقایسه با داروهای شیمیایی به‌طور قابل ملاحظه‌ای پایین‌تر است(۱). بررسی تاریخچهٔ استفاده از گیاه درمانی از زمان‌های گذشته تا اواسط قرن بیستم، نشان دهندهٔ افت مصرف گیاهان دارویی تا دهه ۱۹٤۰ و افزایش مجدد استفاده از آن‌ها تا دهه ۱۹۸۰ می‌باشد. امروزه با پیشرفت‌های حاصل شده در شیمی آلی و تحولات چشمگیر در روش‌های استخراج، تخلیص و تعیین ساختمان ترکیبات طبیعی گیاهان، ارزش داروهای حاصل از منابع گیاهی روز به روز آشکارتر شده، به طوری که در حال حاضر حدود یک سوم تا نیمی از فرآورده‌های دارویی موجود در آمریکا دارای منشاء گیاهی هستند(۲). هم‌چنین در انگلستان تولیدات گیاهی و مکمل‌های فراوانی به شکل سالم و بی‌خطر تولید شده است(۳). مطالعات نشان می‌دهد که تمایل زیاد به استفاده از این داروها جهت درمان عفونت‌ها به‌علت عوارض پایین‌تر این داروها نسبت به داروهای شیمیایی است. بسیاری از خواص ضدمیکروبی عصاره‌های گیاهی به علت وجود موادی همچون ترکیبات فنولی و پلی‌فنولیک‌اسیدها، ترپنوئیدها و اسانس‌ها، آلکالوئیدها، ترکیبات سولفوردار و نظایر آن می‌باشد که در قسمت‌های مختلف گیاه نظیر ریشه، برگ، جوانه‌ها، نهال و پوست وجود دارد. با توجه به افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی، در اثر مصرف داروهای ضدمیکروبی جهت پیشگیری و درمان عفونت‌ها و هم‌چنین عوارض جانبی و اثرات سوء متفاوت آن‌ها، بررسی و تحقیق بر روی گیاهان دارویی به منظور کشف منابع جدید دارویی علیه عفونت‌های باکتریایی مور نیاز می‌باشد. لذا استفاده از گیاهان دارویی و ترکیبات شیمیایی آن‌ها می‌توانند فواید بالقوه‌ای در حل این مشکلات داشته باشند(٤).

استافیلوکوکوس اورئوس یک کوکسی گرم مثبت و بی‌هوازی اختیاری است که مهم‌ترین گونه در سرده استافیلوکوک از نظر پزشکی محسوب می‌شود. گاهی اوقات به این باکتری، استافیلوکوک طلایی نیز می‌گویند. اورئوس در زبان لاتین به معنای طلایی است(۵). این باکتری ممکن است به شکل فلور عادی پوست یا بینی وجود داشته باشد. این‌طور تخمین زده می‌شود که ۲۰ درصد از مردم به مدت طولانی، ناقل این باکتری می‌باشند. این باکتری، یکی از موفق‌ترین باکتری‌های بیماری‌زاست که به‌دلیل تولید رنگدانه طلایی کارتنوئیدی به‌نام استافیلوزانتین کلنی‌های زرد رنگی را ایجاد می‌نماید. این پیگمان در بیماری‌زایی نقش دارد، زیرا به‌عنوان ماده آنتی‌اکسیدان عمل کرده و موجب در امان ماندن باکتری در برابر رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شود. رادیکال‌های آزاد اکسیژن به وسیله سیستم ایمنی (گلبول‌های سفید) میزبان برای کشتن باکتری‌ها تولید می‌شوند(٦). اشریشیاکلی که به‌طور اختصار E. coli نیز نامیده می‌شود، یک باسیل

گرم منفی از خانواده آنتروباکتریاسه است که به‌طور شایع در روده جانوران خونگرم وجود دارد. بیشتر سویه‌های اشریشیا کلی بی‌آزار هستند که این سویه‌ها، بخشی از فلور عادی روده هستند که در تولید ویتامین K_2 نقش دارند و از استقرار باکتری‌های بیماری‌زا در روده جلوگیری می‌کنند، اما برخی از سروتیپ‌ها موجب مسمویت غذایی و اسهال می‌شوند و از طریق مسیر مدفوعی- دهانی از یک فرد به فرد دیگر منتقل می‌شود (۷). باسیلوس سرئوس باسیل گرم مثبت و اسپوردار از خانواده‌ی باسیلاسه است. این باکتری در انسان باعث مسمومیت غذایی و التهاب چشم ضربه‌ای می‌شود و به‌صورت گسترده‌ای در طبیعت و آب و خاک پراکنده شده، به طوری که می‌توان آن را از مواد غذایی جدا نمود. این باکتری قادر به ایجاد آنتروتوکسین‌های اسهال و تهوع می‌باشد(۸). گل میمونی سازویی[1] از تیره Scrophulariaceae می‌باشد که اکثراً علفی یا بوته‌ای و به ندرت درختی با برگ‌های‌متناوب، متقابل یا فراهم، ساده و بدون گوشوارک و گل‌های پنج‌پر یا زیگومورف با جام گل دارای لوب و میوه(به صورت کپسول) با دانه‌های متعدد می‌باشد(۹). از آنجایی که در غرب کشور ایران به صورت سنتی و بومی از جوشانده و دم کرده گیاه گل میمونی برای درمان عفونت‌های سطحی، عمقی و داخلی استفاده می‌شود، با تعیین حضور مواد فیتوشیمی در این گیاه، دلیل استفاده از آن در درمان سنتی بیماری‌ها آشکار می‌گردد. از آنجا که تاکنون هیچ بررسی فیتوشیمیایی و هم‌چنین بررسی خاصیت ضدباکتری روی ریشه این گیاه صورت نگرفته است، هدف این مطالعه بررسی خواص ضد میکروبی ریشه و اندام هوایی گیاه گل میمونی سازویی علیه باکتری‌های اشریشیاکلی، باسیلوس‌سرئوس و استافیلوکوکوس اورئوس در شرایط ازمایشگاهی بود.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی، اندام هوایی گیاه گل میمونی سازویی در فصل بهار و ریشه آن در فصل تابستان از منطقه تختان(شهرستان دهلران، استان ایلام) جمع‌آوری شد و در سایه خشک گردید. عصاره نمونه‌ها به‌وسیله خیساندن ۱۰ گرم پودر گیاه در ۲۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد به مدت ۲۴ ساعت تهیه شده و با کاغذ واتمن صاف گردید. آزمایش‌های شیمیایی زیر روی عصاره به منظور تعیین کیفی ترکیبات ثانویه انجام شدند؛ ۱- با افزودن چند قطره از واکنشگر مایر به محلول حاوی آلکالوئید، رسوب زرد رنگی تشکیل می‌شود(۱۰). در واقع بسیاری از آلکالوئیدها در محلول‌های خنثی یا کمی اسیدی به وسیله واکنش‌گر مایر رسوب می‌کنند. در این مطالعه، پس از تبخیر حلال، عصاره موردنظر خشک گردیده و باقی‌مانده در اسید کلریدریک ۲ درصد و در حمام آب جوش حل گردید. بعد از سرد شدن، مخلوط حاصل فیلتر شده و به آن چند قطره واکنش‌گر مایر اضافه

1-Scrophularia Striata

گردید. کدری شدن نمونه یا تشکیل رسوب زردرنگ نشان‌دهنده وجود آلکالوئیدهاست. ۲ـ عصاره در اسید استیک گلاسیال حل نموده و سپس چند قطره کلرید آهن ۵ درصد و اسید سولفوریک غلیظ به آن می‌افزائیم. ایجاد رنگ قهوه‌ای ـ قرمز در تقاطع لایه‌ها و رنگ سبزـ آبی در لایه بالا نشان‌دهنده وجود گلیکوزیدهاست(۱۰).۳ـ به ۴ میلی‌گرم از عصاره، ۰/۵ میلی‌لیتر انیدرید استیک و ۰/۵ میلی‌لیتر کلروفرم اضافه شد. سپس اسید سولفوریک غلیظ به آرامی به مخلوط اضافه گردید. ایجاد رنگ بنفش ـ قرمز نشان‌دهنده ترپنوئید و رنگ سبزـ آبی نشان‌دهنده استروئیدهاست(۱۰). ۴ـ به ۴ میلی‌لیتر از عصاره، ۱/۵ میلی‌لیتر متانول ۵۰ درصد اضافه گردید. سپس به محلول گرم آن، فلز منیزیم و ۶ـ۵ قطره اسیدکلریدریک غلیظ اضافه شد. رنگ قرمز مربوط به وجود فلاونوئیدها و رنگ نارنجی مربوط به فلاون‌ها می‌باشد(۱۰). ۵ـ به ۰/۵ میلی‌لیتر محلول عصاره، یک میلی‌لیتر آب و ۲ـ۱ قطره کلرید آهن ۵ درصد اضافه شد. رنگ آبی نشان‌دهنده گالیک تانن‌ها و رنگ سبز تیره نشان‌دهنده کاتچول تانن‌هاست(۱۱). ۶ ـ ۰/۵ گرم عصاره با اسیدکلریدریک ۱۰ درصد برای چند دقیقه در حمام آب گرم جوشانده و سپس صاف شد. پس از سرد شدن، به میزان هم حجم با محلول، کلروفرم و سپس چند قطره آمونیاک ۱۰ درصد اضافه و گرما داده شد. رنگ صورتی نشان‌دهنده وجود آنتراکینون‌هاست (۱۰). ۷ـ حدود ۰/۲ گرم از عصاره با ۵ میلی‌لیتر آب مقطر تکان داده شده و سپس محلول تا دمای جوش حرارت داده شد. تولید کف نشان دهنده وجود ساپونین‌هاست(۱۱). ۸ـ ۰/۵ گرم عصاره در آب مقطر حل شده و سپس فیلتر می‌شود. محلول فیلتر شده با محلول اسیدکلریدریک ۲ درصد جوشانده می‌شود. رسوب قرمز نشان‌دهنده فلوباتانن‌هاست(۱۱). ۹ـ به ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول عصاره گرم، یک میلی‌لیتر آب و ۸ـ۵ قطره محلول فهلینگ اضافه می‌شود. رسوب قرمز آجری نشان‌دهنده وجود قندهای احیایی می‌باشد(۱۱).

به‌منظور تعیین خاصیت ضدمیکروبی ریشه و اندام هوایی گیاه گل میمونی سازویی، میکروارگانیسم های اشرشیاکلی(PTCC1330-Escherichia coli)، استافیلوکوکوس اورئوس (PTCC1112-Staphylococcus aureus) و باسیلوس سرئوس(PTCC1247-Bacillus cereus) از دانشکده صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان تهیه شدند.

برای گرفتن عصاره‌ی گیاه از روش خیساندن استفاده شد. ۲۰ گرم پودر خشک شده اندام هوایی به وسیله ۱۰۰ میلی‌لیتر متانول عصاره‌گیری شد. ارلن حاوی ۲۰ گرم پودر خشک شده ریشه گیاهی نیز با ۱۰۰ میلی‌لیتر از حلال کلروفرم پر شد و روی تکان‌دهنده قرار گرفت تا عمل استخراج مواد مؤثره به‌خوبی صورت پذیرد. پس از چندبار تعویض حلال، کنترل پایان عصاره‌گیری با کلروفرم با استفاده از صفحات TLC انجام شد. سپس گیاه را خشک کرده و عمل عصاره‌گیری با حلال اتیل‌استات دنبال شد. پس

از اتمام عصاره‌گیری و خشک شدن گیاه، عصاره‌گیری با حلال متانول انجام شد. سه عصاره را با صافی کتانی و بعد با صافی کاغذی صاف کرده و با استفاده از دستگاه تقطیر در خلأ تغلیظ نموده و عصاره‌ی خشک آن به ازای مقدار معینی از گیاه تعیین گردید. سپس مقدار ۰/۴ گرم از هر نوع عصاره (کلروفرمی، اتیل استاتی و متانول) در ۵ میلی‌لیتر دی‌متیل‌سولفوکسید حل شده و با استفاده از فیلترهای سرسرنگی میلی پور به قطر ۰/۲۲ میکرومتر صاف و استریل شدند. سپس تحت تأثیر رقت‌های متوالی غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره‌ها تهیه شد.

در این تحقیق، از روش انتشار دیسکی[۱] برای اندازه‌گیری هاله عدم رشد استفاده شد. در روش انتشار از طریق دیسک کاغذی، جهت تعیین حساسیت میکروارگانیسم‌ها نسبت به مواد ضدمیکروبی بر طبق روش متداول کربی- بوئر[۲] عمل گردید(۱۲).

ابتدا سوسپانسیون میکروبی معادل ۰/۵ مک فارلند[۳] بر اساس روش استاندارد تهیه شد(۰/۵ میلی‌لیتر کلرید باریم ۰/۰۴۸ مولار و ۹۹/۵ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک ۱ درصد). سپس با استفاده از یک سوآب استریل اشباع شده از سوسپانسیون میکروبی، کشت سفره‌ای فشرده‌ای در تمام سطح محیط کشت مولر هینتون آگار (شرکت Merk آلمان) ایجاد گردید. سپس دیسک‌های(شرکت پادتن طب) اشباع شده از ماده‌ی ضدمیکروبی و نیز بعضی از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی نظیر آمپی‌سیلین و نالیدیکسیک اسید به منظور مقایسه با عصاره‌ی ضدمیکروبی مورد آزمایش، بر سطح محیط کشت باکتری قرار داده شده و پلیت‌ها به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در گرمخانه قرار داده شدند. در پایان دوره‌ی گرمخانه‌گذاری هاله‌ی عدم رشد، در اطراف هر دیسک با یک خط کش میلی‌متری به‌دقت اندازه‌گیری شد. این کار برای هر رقت و هر باکتری به‌طور جداگانه، حداقل ۳ بار انجام پذیرفت. در این بررسی، از دیسک‌های استریل فاقد هر گونه ماده‌ی ضدمیکروبی و آغشته به دی‌متیل‌سولفوکسید نیز به‌عنوان کنترل منفی استفاده گردید. از آمپی‌سیلین و نالیدیکسیک‌اسید نیز به‌عنوان شاهدهای مثبت استفاده شد.

به منظور تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد باکتری[٤] و حداقل غلظت کشندگی[۵] آزمایش‌ها در دو مرحله طراحی و از روش اصلاح شده ماکرودایلوشن (توصیه شده به وسیله NCCLS[۶]) استفاده گردید(۱۳). بدین ترتیب که سوسپانسیونی با غلظت معادل ۰/۵ مک فارلند از باکتری تهیه شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تحت تأثیر رقت‌های متوالی در محدوده غلظت ۲۰۰-۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰، ۱۲۰، ۱۶۰ و ۲۰۰) قرار گرفتند و بعد از ۲۴ ساعت با مشاهده کدورت لوله‌ها، آخرین لوله‌ای

1-Disk diffusion method
2-Kirby-Bauer
3-McFarland
4-Minimum Inhibitory Concentration (MIC)
5-Minimum bactericidal Concentration (MBC)
6-National Committee for Clinical Laboratory Standards(NCCLS)

که فاقد کدورت بود به‌عنوان MIC در نظر گرفته شد، ولی برای سنجش MBC، کشت مجددی از لوله‌های MIC که در آن‌ها کدورتی دیده نشد و یک رقت پایین‌تر و بالاتر از آن بر روی محیط مولر هینتون آگار صورت گرفت. بعد از ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری پلیت‌ها در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، آخرین لوله‌ای که هیچ‌گونه رشدی از باکتری روی پلیت مربوطه نداشت، به‌عنوان MBC در نظر گرفته شد. تأثیر هرکدام از عصاره‌ها با هم و نیز با دو آنتی‌بیوتیک، با روش آنالیز واریانس مقایسه شدند.

یافته‌ها

نتایج حاصل از آزمایش‌های فیتوشیمیایی مقدماتی بر روی گیاه گل میمونی سازویی به منظور تعیین وجود یا عدم وجود متابولیت‌های ثانویه در جدول ۱ آمده است. بر اساس این مطالعه ریشه و اندام هوایی گیاه گل میمونی سازویی، حاوی فلاونوئید، گلیکوزید، ساپونین، تانن و ترپنوئید می‌باشند.

نتایج به‌دست آمده از آزمون مقایسه میانگین‌های قطر هاله عدم رشد غلظت‌های مختلف عصاره ریشه گیاه گل میمونی بر سه باکتری مورد مطالعه نشان‌دهنده‌ی آن است که تفاوت معنی‌داری بین پنج غلظت عصاره ریشه وجود دارد($p<۰/۰۵$)، ولی چنانچه میانگین‌ها به صورت دوتایی با هم مقایسه شوند میان دو غلظت ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و سه غلظت ۵ ، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تفاوت معنی‌داری از نظر آماری وجود ندارد ($p>۰/۰۵$). به بیان دیگر دو غلظت گروه اول (۴۰ و ۸۰) و سه غلظت گروه دوم (۵ و ۱۰ و ۲۰) از نظر قطر هاله عدم رشد مانند هم عمل می‌کنند، اما میان هر کدام از غلظت‌های گروه اول و غلظت‌های گروه دوم تفاوت معنی‌داری وجود دارد. این نتایج در مورد باسیلوس سرئوس نشان داد که میانگین غلظت‌های مختلف ریشه گیاه با آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین تفاوت معنی‌داری داشته و بهتر از آن عمل می‌کند(جدول ۲). نتایج به‌دست آمده از آزمون مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد غلظت‌های مختلف عصاره اندام هوایی گیاه گل میمونی بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی نشان دهنده آن است که بین سه غلظت ۸۰ و ۴۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، و در مورد باکتری باسیلوس سرئوس میان دو غلظت ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از لحاظ آماری تفارت معنی‌داری وجود نداشت(جدول ۳). نتایج این بررسی هم‌چنین نشان داد که اثر غلظت‌های مختلف ریشه و اندام هوایی گیاه گل میمونی سازویی بر میانگین قطر هاله عدم رشد سه میکروارگانیسم مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری داشته و در واقع ریشه نسبت به اندام هوایی هاله عدم رشد بزرگ‌تری ایجاد می‌کند.

نتایج حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی از رشد میکروارگانیسم و حداقل غلظت کشندگی میکروارگانیسم برای ریشه و اندام هوایی گیاه گل میمونی سازویی در جدول ۴ نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود بیشترین اثر مربوط به

عصاره متانولی ریشه بر باکتری باسیلوس سرئوس می‌باشد که میزانMIC وMBC برای آن به‌ترتیب برابر با ۶۰ و ۷۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. در این حالت قطر هاله عدم رشد بر روی محیط مولر هینتون آگار در مقابل دیسک‌های اشباع شده از عصاره‌ی متانولی ریشه برابر با ۲۱ میلی‌متر برای باکتری باسیلوس سرئوس می‌باشد.

بحث

وجود خواص ضدعفونی‌کنندگی علاوه بر اثرات درمانی از عوامل توجه طب سنتی به گیاهان دارویی در سال‌های اخیر بوده است. بسیاری از گونه‌های شناخته شده جنس اسکروفولاریا شامل گروه‌های متفاوتی از ترکیبات ثانویه می‌باشند. به‌عنوان مثال، می‌توان به ایریدوئیدها، اسیدهای فنولیک، فنیل‌پروپانوئیدها، فلاونوئیدها و ساپونین‌ها اشاره کرد. بسیاری از این ترکیبات دارای فعالیت ضد التهابی، ضدمیکروبی، ادرارآوری، قارچ‌کشی، تعدیل‌کننده‌ی سیستم ایمنی، تعدیل‌کننده‌ی سیستم قلبی ـ عروقی و فعالیت ضد توموری می‌باشند(۱۷ـ۱۴). هدف این مطالعه بررسی فیتوشیمیایی مقدماتی و بررسی خاصیت ضدباکتریایی ریشه و اندام هوایی گیاه گل میمونی سازویی بود.

جدول ۱: نتایج حاصل از بررسی آزمایش‌های فیتوشیمیایی مقدماتی بر روی گیاه گل میمونی

نوع متابولیت ثانویه	روش بررسی	مشاهدات	اندام هوایی	ریشه
آلکالوئیدها	تست مایر	ایجاد رسوب زرد کمرنگ	−	−
	تست دراگندورف	ایجاد رسوب نارنجی کدر	−	−
آنتراکینون‌ها	واکنش بورن تراگر	عدم ایجاد رنگ زرد	−	−
فلاونوئیدها	تست شینودا	ایجاد محلول قرمز رنگ	+	+
	واکنش آلکالین	ایجاد محلول زرد طلایی	+	+
گلیکوزیدها	تست کیلر کیلیانی	ایجاد محلول قرمز- قهوه‌ای	+	+
قند احیایی	تست فهلینگ	ایجاد محلول سبز رنگ با فهلینگ A ایجاد محلول قهوه‌ای رنگ با فهلینگ B	−	−
ساپونین‌ها	تست فورث	ایجاد کف ماندگار	+	+
تانن‌ها	واکنش با فریک کلرید	ایجاد محلول آبی‌رنگ برای گالیک تانن‌ها ایجاد محلول سبز تیره برای کاتچولیک تانن‌ها	+	+
ترپنوئیدها	تست لیبرمن- بوشارد	ایجاد محلول قرمز- بنفش	+	+
استروئیدها	تست لیبرمن- بوشارد	ایجاد محلول سبز- آبی	−	+

جدول ۲: مقایسه میانگین قطر هاله‌های ایجاد شده علیه سه باکتری باسیلوس سرئوس، اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس (میانگین ۳ بار تکرار) به وسیله غلظت‌های مختلف عصاره متانولی ریشه گیاه گل میمونی در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه

متغیر باکتری	غلظت عصاره بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر					دی متیل سولفوکسید	آمپی سیلین	نالیدیکسیک اسید
	۸۰	٤۰	۲۰	۱۰	۵			
استافیلوکوکوس اورئوس	۱۲±۰/۱	۱۲±./۱	۹/۵±./۲	۹±./۳	۸±./۱	−	۱۹	۸
اشرشیاکلی	۱٤±./۲	۱۱±./۱	۹/۵±./۳	۹±./۲	۸±./۴	−	−	۲۱
باسیلوس سرئوس	۲۱±./۳	۲۱±./۳	۱۹±./۲	۱۸/۵±./۱	۱۸±./۲	−	۱۵	۲۳

جدول ۳: مقایسه میانگین قطر هاله‌های ایجاد شده علیه سه باکتری باسیلوس سرئوس، اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس (میانگین ۳ بار تکرار) به وسیله غلظت‌های مختلف عصاره متانولی اندام هوایی گیاه گل میمونی در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه

متغیر / باکتری	غلظت عصاره بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر					دی متیل سولفوکسید	آمپی سیلین	نالیدیکسیک اسید
	۸۰	٤۰	۲۰	۱۰	٥			
استافیلوکوکوس اورئوس	۹/٥±۰/۳	۹/٥±٫/۲	۹±٫/۲	–	–	–	۲۱±۰/۴	۱۱±۰/۴
اشرشیاکلی	۸/٥±٫/۱	۸/٥±٫/۲	۸±٫/۳	۷/٥±٫/۲	۷/٥±٫/۳	–	–	۲۹±۰/۳
باسیلوس سرئوس	۱۱±٫/۱	۹/٥±٫/۲	۹/٥±٫/۳	۸/٥±٫/۳	–	–	۱۹±۰/۴	۲٦±۰/۲

جدول ۴: حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی و حداقل غلظت کشندگی (برحسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) عصاره متانولی ریشه و اندام هوایی گیاه گل میمونی سازویی در برابر باکتری‌های مورد مطالعه

باکتری	اندام هوایی		ریشه	
	MIC	MBC	MIC	MBC
اشریشیاکلی	–*	–	۹۰	۱۰۰
استافیلوکوکوس اورئوس	۱۰۰	۱۰۰	۹۰	۱۰۰
باسیلوس سرئوس	۹۰	۱۰۰	٦۰	۷۰

*عصاره روی باکتری اثر نداشت.

در گیاه مورد مطالعه هاله عدم رشد به وسیله هیچ‌کدام از عصاره‌های کلروفرمی و اتیل‌استاتی ریشه مشاهده نگردید. در صورتی‌که میانگین قطر هاله‌های به‌دست آمده از عصاره متانولی، نشان‌دهنده اثر مهار این عصاره بر هر سه باکتری می‌باشد که بیشترین اثر روی باکتری باسیلوس سرئوس مشاهده شد. با توجه به قطر هاله عدم رشد در دیسک‌های کنترل مثبت و منفی، عصاره متانولی ریشه در غلظت ۸۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر دارای کمترین اختلاف نسبت به هاله عدم رشد در آنتی‌بیوتیک نالیدیکسیک اسید بود. عصاره متانولی ریشه در غلظت ۶۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر می‌تواند از رشد این باکتری جلوگیری نموده و در غلظت ۷۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر این باکتری را از بین می‌برد. تقریباً همه ترکیبات ضدمیکروبي شناخته شده گیاهی، آروماتیک یا ترکیبات آلي هستند و بیشتر از طریق حلال‌های اتانولي و متانولی استخراج می‌شوند. در طب سنتي از عصاره‌های آبی استفاده می‌شود، اما تحقیقات نشان داده‌اند عصاره‌های تهیه شده با حلال‌های آلي، اثر ضد میکروبي پایدارتر و بیش‌تری دارند، زیرا بیشتر ترکیبات فعال ضد میکروبی شناخته شده، در آب نامحلول هستند و بنابراین عصاره‌های حاصل از حلال‌های آلی برای استخراج ترکیبات ضد میکروبی توانمندی بیشتری دارند(۱۸).

میانگین قطر هاله‌های به‌دست آمده از روش دیسک دیفیوژن نشان داد که بیشترین اثر مربوط به عصاره متانولی ریشه گیاه مذکور بر باسیلوس سرئوس و پس از آن بر اشریشاکلی بوده است. معمولاً باکتری‌های گرم منفی به ترکیبات ضدمیکروبی گیاهی مقاومند، مگر آن‌که از غلظت‌های بالای آن

استفاده شود(۱۹). در این بررسی، کمترین اثر حاصل، مربوط به اثر عصاره اندام هوایی بر اشریشاکلی بود. در واقع در هر دو عصاره ریشه و اندام هوایی، بیشترین اثر بر باکتری باسیلوس سرئوس مشاهده شد. فعالیت ضدمیکروبی اجزای متفاوت گونه‌های مختلف جنس اسکروفولاریا به‌وسیله محققان مورد بررسی قرار گرفته و همه‌ی این مطالعه‌ها خواص ضدمیکروبی آن‌ها را به اثبات رسانده‌اند(۲۲ـ۲۰). تاکنون فقط یک گزارش از بررسی فیتوشیمیایی اندام هوایی گیاه گل میمونی سازویی منتشر شده است که در آن ترکیباتی از قبیل اسیدهای فنولیک، فلاونوئیدها و فنیل پروپانوئیدها جداسازی شده‌اند که خاصیت ضدمیکروبی اندام هوایی این گیاه را می‌توان به این ترکیبات نسبت داد(۲۳). ساز و کار سمیت فنول‌ها و فنولیک‌اسیدها در برابر میکروارگانیسم‌ها از طریق مهار آنزیمي ترکیبات اکسید شده و یا از طریق واکنش با گروه‌هاي سولفیدریل یا یک واکنش غیر اختصاصي با پروتئین‌ها می‌باشد(۲۴). در مطالعه‌ای که استاوری و همکاران(۲۰۰۶) روی گونه Scrophularia.deserti انجام دادند، ترکیبات ترپنوئیدی استخراج شده از این گونه خاصیت مهارکنندگی قوی در برابر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس از خود نشان دادند(۲۵). در مطالعات انجام گرفته به وسیله احمد و همکاران(۲۰۱۲)، هیچ یک از عصاره‌های هگزانی، کلروفرمی، اتیل‌استاتی، بوتانولی و آبی گیاه Scrophularia nodosa روی باکتری اشرشیاکلی اثری نداشته در صورتی‌که تمامی این عصاره‌ها به‌جز عصاره هگزانی اثر مهارکنندگی روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس نشان دادند که از این میان بیشترین هاله عدم رشد(۱۳میلی‌متر) را عصاره آبی نشان داد(۲۰). در مطالعه‌ای که فرنانـدز و همکاران(۱۹۹۶) روی دو گونه S. frutescens و S. sambucifolia انجام دادند نیز مانند اکثر گونه‌های جنس اسکروفولاریا (از جمله گیاه مورد مطالعه)، بیشترین اثر مهار، روی باکتری گرم مثبت باسیلوس سرئوس مشاهده شد. مقدار MIC در این حالت برابر با ۰/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود، هم‌چنین نتایج این محققین نشان داد که گونه S.frutescens به‌دلیل دارا بودن ترکیبات فنولیک غنی‌تر، فعالیت بالاتری را نسبت به گونه S.sambucifolia در برابر هر سه باکتری اشریشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس دارد(۱۶). معمولاً خواص ضدمیکروبی گیاهان به یک نوع خاص متابولیت ثانویه نسبت داده نمی‌شود، بلکه به همکاری ترکیبات موجود در گیاه نسبت داده می‌شود. ترکیبات فیتوشیمیایی با خاصیت ضدمیکروبی به چند گروه تقسیم می‌شوند که شامل ترکیبات فنلی و پلی‌فنول‌ها که شامل؛ فنل‌های ساده و فنولیک اسیدها، کینون‌ها، فلاونوئیدها، تانن‌ها و کومارین‌ها می‌باشند، ترپنوئیدها و اسانس‌ها، آلکالوئیدها، لکتین‌ها و پروتئین‌ها می‌باشند(۲۲و۱۹).

نتیجه‌گیری

در بررسی حاضر خواص ضدمیکروبی گیاه گل میمونی سازویی به‌خصوص اثر مهارکنندگی قوی

ریشه آن در برابر باکتری باسیلوس سرئوس مشاهده شد که با توجه به وجود ترکیبات مؤثر بیولوژیکی در این گیاه اثرات ضدباکتریایی آن امری معقول می‌باشد و می‌تواند مسیر را جهت بررسی اثرات ضدمیکروبی این گیاه در مدل‌های حیوانی به منظور استفاده احتمالی در درمان آنتریت‌های ناشی از این باکتری هموارتر سازد.

تقدیر و تشکر

این مطالعه با همکاری گروه علوم صنایع غذایی دانشگاه منابع طبیعی استان گلستان انجام شد. از دکتر منیژه میان‌آبادی و مهندس حاجی‌تبار که در انجام این تحقیق همکاری نمودند، قدردانی به عمل می‌آید.

REFERENCES:

1.Avijgan M, Saadat M, Nilforoosh-Zadeh MA, Hafizi M. Anti-fungal effect of Echinophora platyloba extract on some common dermatophytes. J Med Plants 2006; 5(18): 10-6.
2.Clark AM. Nutural products as a resource from new drugs. Pharm Res 1996; 13: 1133-44.
3.Corns CM. Herbal remedies and clinical biochemistry. Hum Psychpharmacol 2004; 19: 235-41.
4.Meda A, Lamien CE, Romito M, Millogo J, Nacoulma OG. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. Food Chem 2005; 91: 571-7.
5.Azadbakht M. Classification of medical plants. Tehran: Teimorzadeh Pub; 2000; 7-276.
6.Nariman F, Eftekhar F, Habibi Z, Falsafi T. Anti-helcobacter pylori activities of six Iranian plants. Helicobacter 2004; 9(2): 146-51.
7.Lee SY (1996). High cell-density culture of Escherichia coli. Trends Biotechnol 1996; 14 (3): 98–105.
8.Wong HC, Chang MH, Fan JY. Incidence and characterization of Bacillus cereus isolates contaminating dairy products. Appl Environ Microbiol 1988; 54: 699-702.
9.Baron EJ, Finegold SM. Methods for testing antimicrobial effectiveness, Baily & Scott`s diagnostic microbiology. 8th ed. NewYork: Mosby Company; 1994; 171-9.
10.Krishnaiah D, Sarbatly R, Bono A. Phytochemical antioxidants for health and medicine–A move towards nature. Biotechnol Mol Biol Rev 2007; 1(4): 97-104.
11.Ahmad M, Muhammad N, Jahan N, Alam SM, Ahmad M. Biological screening of Scrophularia nodosa extract and its fractions. Pak J Pharm Sci 2012; 25(2): 307-13.
12.Bermejo Benito P, Díaz Lanza AM, Silván Sen AM, De Santos Galíndez J, Fernández Matellano L, Sanz Gómez A, Abad Martínez M. Effects of some iridoids from plant origin on arachidonic acid metabolism in cellular systems. Planta Med 2000; 66: 324–8.
13. Espinel-Ingroff A, Chaturvedi V, Fothergill A, Rinaldi MG. Optimal Testing Conditions for Determining MICs and Minimum Fungicidal Concentrations of New and Established Antifungal Agents for Uncommon Molds: NCCLS Collaborative Study. J Clin Microbiol. 2002; 40(10): 3776–3781.
14.Dholwani KK, Saluja AK, Gupta AR, Shah DR. A review on plant-derived natural products and their analogs with antitumor activity. Indian J Pharmacol 2008; 40: 49-58.
15.Fernández MA, Saenz MT, García MD. Antiinflammatory activity in rats and mice of phenolic acids isolate from Scrophularia frutescens. J Pharm Pharmacol 1998; 50: 1183–6.
16.Fernandaz MA, Garcia MD, Saenz MT. Antibacterial activity of phenolic acids of Scrophularia frutescens and Scrophularia sambucifolia. Journal of Ethnopharmacology 1996; 53: 11-4.
17.Olthof MR, Hollman PCH, Katan MB. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. J Nutr 2001; 131: 66-71.
18.Giner RM, Villalba ML, Recio MC, Mañez S, Cerdá-Nicolás M, Ríos JL. Anti-inflammatory glycoterpenoids from Scrophularia auriculata. Eur J pharmacol 2000; 389: 243-52.
19.Kluytmans J, Van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of Staphylococcus aureus: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. Journal of Clinical Microbiology 1997; 3: 505–20.
20.Murray PR, Rosental KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. Medical Microbiology. 4th ed. Mosby: St. Louis ; 2002; 55-70.
21.Hounsome N, Hounsome B, Tomos D and Jones GE. Plant metabolites and nutritional quality of vegetables. Journal Of Food Science 2008; 73: 4.
22.Clauditz A, Resch A, Wieland KP, Peschel A, Götz F. Staphyloxanthin plays a role in the fitness of Staphylococcus aureus and its ability to cope with oxidative stress. Infection and Immunity 2006; 74(8): 4950–3.
23.Monsef-Esfahani HR, Hajiaghaee R, Shahverdi AR, Khorramizadeh MR, Amini M. Flavonoids, cinnamic acid and phenyl propanoid from aerial parts of Scrophularia striata. Pharmaceutical Biology 2010; 48(3): 333–6.
24.Dholwani KK, Saluja AK, Gupta AR, Shah DR. A review on plant-derived natural products and their analogs with antitumor activity. Indian J Pharmacol 2008; 40: 49-58.
25.Stavri M, Mathew KT, Gibbons S. Antimicrobial constituents of Scrophularia deserti. Phytochemistry 2006; 67: 1530–3.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

In Vitro Anti-Bacterial Activity of Root And Aerial Parts of Scrophularia Striata Bioss on Escherichia Coli, Staphylococcus Aureus and Bacillus Cereus

Safavi F, Ebrahimi P*, Mighani H
Department of Chemistry, University of Golestan, Gorgan, Iran

Received: 18 Feb 2013 Accepted: 06 Apr 2013

Abstract

Background & aim: Due to the side effects of chemical drugs, the replacement of these drugs by natural compounds with antibacterial properties, such as plant extracts, has received much attention. The aim of this study was to evaluate the phytochemical constituents and antimicrobial properties of root and aerial parts of Scrophularia against *E. coli, S. aureus* and *B. cereus in* vitro.

Methods: In the present study, the antimicrobial activity of different extracts of roots and methanol extract of aerial part the sequential, minimal inhibitory concentrations of bacteria, and minimal bactericidal concentrations of bacteria were determined against the bacteria of *E.coli, S. aureus and B. cereus* by using both the disk diffusion and the tube dilution method. DMSO was used as the negative control, whereas nalidixic acid and ampicillin were used as the positive control. The collected data was analyzed using the one-way ANOVA test.

Results: The results revealed that the root and aerial parts of *Scrophularia* striata contain flavonoids, glycosides, saponins, tannins and terpenoids. The ethyl acetate and chloroform extracts of root showed no inhibition zone on the bacterial growth. Whereas, the methanolic extract of the root was the most effective against *B. cereus* with the inhibition zone of the bacterial growth (21 mm), followed by MIC and MBC 60 mg/ml 70 mg/ml respectively. The methanol extract of aerial parts had the lowest effect on *E.coli*

Conclusion: The results of the present study revealed that the methanolic extract of root and aerial parts of Scrophularia striata has antibacterial effects, especially against *B. cereus*. Therefore, further research is needed to identify the different compounds, and also, attainment of new formulation of these components in this plant.

Key words: Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Bacillus cereus, Antimicrobial, Scrophularia striata.

***Corresponding Author**: **Ebrahimi P**, Department of Chemistry, Faculty of Basic Sciences, University of Golestan, Gorgan, Iran
E-mail: p.ebrahimi@gu.ac.ir