



مقایسه اثرات ضدبacterیایی اندام هوایی و ریشه گیاه پنیرک با روش MIC

علی محمدعینی^{*}^۱، جلال شایق^۲، مجید محرومی فرد^۳

- ۱- دانشجوی علوم آزمایشگاهی، پاشرگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شبستر، شبستر، ایران
- ۲- استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شبستر، شبستر، ایران
- ۳- دانشجوی علوم آزمایشگاهی، پاشرگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شبستر، شبستر، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۸/۳۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۸/۹

چکیده

مقدمه: گیاه پنیرک (Malva sylvestris L.) که مقدار زیادی (مالون آ:۲-۳- متیل ۳- متوكسی ۶-دھیدروکسی ۱ و ۴ ناپاتوکوئی نون) و آنتوسیانین و رنگدانه‌های طبیعی خیلی مهم از آن استخراج شده است. آنتوسیانین و دیگر مواد گیاه پنیرک دارای خواص ضدبacterیایی هستند.

روش بررسی: در این مطالعه خواص ضدبacterیایی عصاره گیاه پنیرک با استفاده از استخراج عصاره آبی - الکلی (اندام هوایی و ریشه) گیاه با الکل ۷۰ درجه به صورت مجزا، بر روی ۶ گونه bacterیایی (پاستورولا مولتوسیدا، لیستریا مونوسایتوژن، اشريشیا کلی، سالمونلا انتریکا، استافیلوکوکوس آرئوس، استرپتوکوکوس آگالاکتیف) مورد بررسی قرار گرفت. باکتری‌ها به روش سنجش رازازوین با استفاده از میکروتیترپلیت کشت داده شدند.

نتایج: اثرات ضدبacterیایی عصاره الکلی گیاه پنیرک به صورت مجزا بررسی شد که بیشترین اثر ضدبacterیایی مربوط به عصاره اندام هوایی بر باکتری پاستورولا مولتیسیدا (0/19mg/ml/3/12) بود و بر باکتری سالمونلا انتریکا بدون اثر تعیین گردید.

نتیجه‌گیری: از آنجایی که آنتی‌بیوتیک‌ها در سلامتی بشر انقلاب بزرگی را ایجاد کرده‌اند که منجر به معالجه عفونت‌های تهدیدکننده زندگی انسان می‌شوند. با این وجود به دلیل وقوع در حال افزایشی مقاومت bacterیایی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های موجود، به نظر می‌رسد جستجوی آنتی‌بیوتیک‌های جدیدتر با روش‌های بروز ضروری باشد.

واژه‌های کلیدی: عصاره پنیرک، ضدبacterیایی، سنجش رازازوین، میکروتیترپلیت، MIC

* (نویسنده مسئول؛ تلفن: ۰۲۵۱-۲۷۰۰ ۱۵۶، پست الکترونیکی: ali.meini@gmail.com)

مقدمه

مطالعات گیاه شناسی در جمعیت‌های روستایی از نواحی مختلف نشان داد که از این گیاه به عنوان دارویی برای درمان بیماری‌ها و اختلالات گوارشی و تنفسی به کرات استفاده نموده اند(۱۰،۱۱).

در کشورهای توسعه یافته اغلب میکروارگانیسم‌ها علت شایع بیماری‌ها است و موضوع جدی بهداشت همگانی در پوشش دادن جمعیت‌های در معرض خطر پراهمیت‌ترین عملکرد بخش سیستم‌های مراقبت بهداشت عمومی می‌باشد(۱۲).

اگر چه اخیراً اشکال داروهای گیاهی در حال گسترش می‌باشد اما در رابطه با داروهای ضدمیکروبی جدید این امر کمنگتر می‌باشد با این وجود، مطالعات بی‌شماری صورت گرفته است که مشخصات ضدمیکروبی گیاهان دارویی را نشان می‌دهد(۱۳،۱۴). این مطالعه با هدف مقایسه اثرات ضدبакتریایی اندام هوایی و ریشه گیاه پنیرک انجام پذیرفته است.

روش بررسی

این مطالعه از نوع کراس سکشینال می‌باشد که برای انجام آن، گیاه پنیرک در اوخر اردیبهشت ماه از باغ‌های استان قم جمع‌آوری گردید، پس از تأیید هویت در مرکز تحقیقات گیاهان دارویی شرکت باریج انسانس، ۱ کیلوگرم از پودر خشک شده گیاه در ۳ لیتراتانول-آب مقطر(۷/۷٪ برای ۵ روز در دمای اتاق قرار داده شد. بعد از آن با کاغذ (شماره ۴۲) فیلتر شد و در بطری‌های تیره ریخته شد. عصاره‌گیری توسط شرکت باریج انسانس کاشان انجام شد.

در این مطالعه اثرات ضدبакتریایی اندام هوایی و ریشه گیاه پنیرک بر روی ۶ باکتری پاستورلا مولتوفسیدا (جدایه از ترشحات PCR بینی گوسفند که قبلًاً توسط Shayegh و همکاران توسط آنیتی شده بود)(۱۵)، لیستریا مونوسایتوژن (جدایه از ورم پستان گاو)، استرپتوكوکوس آگالاكتیه(PTCC 1321)، استافیلکوکوس اورئوس(PTCC 1112)، اشريشیاکلی(PTCC 1270) و سالمونلا انتریکا (PTCC 1639) با روش MIC بررسی گردید. در طول این سنجش محیط مولر هینتون براث (Hi Media-) (India) که از لحاظ PH بافر بود مورد استفاده قرار گرفت.

پنیرک (Malva sylvestris) از تیره (Malvaceae) می‌باشد که مقدار زیادی ترکیبات مهم ضدبакتریایی نظیر آنتوسیانین، (مالون آ-۲-متیل ۳-متوکسی ۵، ۶-دھیدروکسی ۱ و ۴ ناپاتوکوئی نون) و رنگدانه‌های طبیعی از آن استخراج شده است. آزمایشاتی بر روی مواد استخراج شده گیاه پنیرک از جمله سیانین بر روی باکتری‌های استافیلکوکوس آرئوس، اشرشیا کلی انجام شده است(۱-۵).

در کتب دستور داروسازی کشورهای فرانسه و سوئیس مکتوب است که گل و میوه‌های نارس این گیاه در درمان سیاه سرفه مفید است. همچنین پنیرک سرشار از فلاونوئید می‌باشد که فلاونوئیدها ترکیباتی طبیعی هستند که در حد زیادی در متابولیت‌های ثانویه گیاهان قرار می‌گیرند(۶). خواص آنتی‌اسیدانی فلاونوئیدها از القای پراکسیداسیون لیپید با پروکسیدانت‌های گوناگون موجود در میکروزوم، میتوکندری و لیپوزوم کبد جلوگیری می‌کند. این خواص مربوط به توانایی یون‌های فلاونوئید و پاکسازی اکسیژن رادیکالی، آنیون‌های سوپراکسید، رادیکال‌های پروکسیل، رادیکال‌های هیدروکسیلی و بروکسی نیتریت می‌باشد(۷،۸). طی تحقیقات به عمل آمده گیاه پنیرک باعث افزایش اینترلوکین ۱۲ و اینترفرون گاما در ژن رونویسی می‌شود، همچنین باعث فعال شدن ماکروفاز و سلول‌های هلپرو نیز موجب غیرفعال شدن اینترلوکین ۴ رونویسی می‌شود(۶).

جهت آزمایش محصولات طبیعی نظیر عصاره‌های خام، کروماتوگرافی یا محصولات خالص شده از جهت فعالیت‌های باکتریایی محصولات بکارگیری یک بخش آنتی‌باکتریایی در شرایط آزمایشگاهی که ساده، کارآمد، قابل اتکا، حساس، مطمئن و مقرن به صرفه باشد، ضروری است. علاوه بر این در اکثر مواقع مقادیر کم محصولات طبیعی، به خصوص ترکیبات خالص‌سازی شده که برای آزمایش آنتی‌باکتریایی در دسترس هستند، می‌تواند یک فاکتور محدودکننده در هر برنامه آزمایشی باشد. به نظر می‌رسد که سنجش رژازوزین با استفاده از میکروتیترپلیت می‌تواند سودمند باشد(۹).

صفت کمی (غلظت عصاره) می‌باشد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون آماری اسپیرمن و نرم‌افزار SPSS صورت گرفت.

نتائج

نتایج حاصل از آزمایش تعیین حساسیت ضد میکروبی به روش MIC مربوط به اثر سطوح مختلف اندام هوایی و ریشه گیاه پنیرک بر روی باکتری های پاستور لا مولتوفسیدا، لیستریامونوسایتوژن، اشتبه کلی، سالمونلا انتریکا، استافیلوکوکوس آرئوس، است پتکوکوس آگالاکتیف در جدول ۱ آورده شده است.

به طوری که ارتباط بین غلظت عصاره‌ها و رشد باکتری‌ها (به استثناء سالمونلا انتریکا و استاف آرئوس) غیرمستقیم، منفی و مناسب است به گونه‌ای که با کاهش غلظت عصاره پنیرک اثر آن نیز کمتر می‌شود.

در میان اندام‌های مورد مطالعه در این تحقیق بهترین اثر مربوط به اندام هوایی و ریشه بر پاستورلا مولتوسیدا (0.19mg/ml) و (0.12mg/ml) و (0.25mg/ml) و بر روی سالمونلا انتریکا بی اثر تعیین گردید.

عصاره‌ها بیشترین اثر میکروبی را روی پاستورلا نشان دادند.
اثر عصاره‌های مذکور بر روی باکتری‌های استرپتوكوکوس آگالاکتیه، لیستریامونوسایتوژن و استافیلوکوکوس اورئوس، و اشریشیاکلی نیز مشاهده گردید و همچنین عصاره ریشه بر استافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا اینتریکا بی‌اثر تعیین گردید.

همچنین روش تعداد استاندارد کلنجی با استانداردهای مک فارلند (لوله ۰/۵) مورد قیاس قرار گرفت.

لوله مورد نظر را ۱۵ دقیقه تا ۴ ساعت و برای باکتری‌های کند رشد ۲۴ ساعت انکوبه کرده و سپس لوله حاصله را با ۰/۵ مک فارلند مقایسه گردید. اگر لوله کشت کدرتر از ۰/۵ مک فارلند بود، آن را با محیط کشت به قدری رقیق می‌شد که به کدورت مطلوب برسد و اگر کدورت کم بود اندکی زمان انکوباسیون را افزایش داده می‌شد. در این حال تعداد باکتری‌های موجود $1/5 \times 10^8$ بود.

محلول رازازورین با استفاده از حل کردن 270 mg پودر در 40 ml آب مقطر استریل تهیه شد. یک ورتکس میکسر برای اطمینان از حل شدن کامل پودر و ایجاد محلول هموژن مورد استفاده قرار گرفت.

برای انجام روش MIC ابتدا پلیت‌های استریل ۹۶ خانه‌ای تهیه شد. برای تمام چاهک‌ها ۵۰ میکرولیتر از محیط کشت مولر هینتون برات اضافه گردید. چاهک شماره ۱۲ از آنتی‌بیوتیک وسیع‌الطیف (سیپروفلوکساسین) به عنوان کنترل مثبت و چاهک شماره ۱۱ به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. ۵۰ میکرولیتر از عصاره به چاهک اول اضافه و تا چاهک دهم به صورت سریالی رقیق‌سازی انجام شد. سر پیپت‌ها پس از هر بار استفاده عصاره دور انداخته شد. سپس به هر چاهک ۱۰ میکرولیتر محلول شاخص رزوزارین (Sigma) اضافه شد. در نهایت ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی $5/0$ مک فارلند با غلظت 10^8 cfu/ml به هر چاهک اضافه شد تا در نهایت به غلظت $1/5 \times 10^8$ cfu/ml رسید.

پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس تغییر رنگ به طور چشمی مورد ارزیابی قرار گرفت. آخرین چاهک ارغوانی به عنوان غلظت MIC در نظر گرفته شد و نیز کمترین غلظت در هر تغییر رنگ به عنوان مقدار MIC در نظر گرفته شد(۱۶). بدین منظور که تغییر رنگ از صورتی به ارغوانی به عنوان عدم رشد باکتری و اثر بخش بعدن آن غلظت‌ها عصا، ایشان، م دهد.

یا توجه به اینکه یک صفت کیفی (رشد، عدم رشد) و یک

عصاره پنیرک اثر آن نیز کمتر شده است (جدول ۱).

غیرمستقیم، منفی و مناسب است به گونه‌ای که با کاهش غلظت

جدول ۱: اثر سطوح مختلف اندام هوای و ریشه گیاه پنیرک بر روی باکتری به روش MIC

نام باکتری	غلظت (درصد)	اندام هوایی	ریشه
	(بر حسب میلی گرم/میلی لیتر)	غلظت (درصد)	اندام هوایی
برسینیا	۴۹/۵	۲/۶	
اشریشیا کلی	۲۴/۷۵	(۵۰) ۱/۳	(۵۰)
استافیلوکوکوس آرئوس	۲۴/۷۵	(۵۰)	بی اثر
سالمونلا انتریکا	۲۴/۷۵	بی اثر	بی اثر
پاستورولا مولتوسیدا	۱/۵۴	(۳/۱۲۵)	(۲۵) ۰/۶۵
استافیلوکوکوس آگالاکتیه	۲۴/۷۵	(۵۰)	۱/۳
لیستر یا مونوسایتوئنز	۲۴/۷۵	(۵۰)	۱/۳

در این مطالعه به روش MIC در تصویر یک آورده شده است

بیشترین اثر ضدباکتریایی عصاره ریشه در حضور برسینیا و اندام هوایی گیاه پنیرک در حضور پاستورولا بوده است که نمونه‌ای آزمایش تعیین حساسیت ضدمیکروبی اجرا شده

عصاره اندام هوایی در حضور پاستورولا مولتوسیدا

عصاره اندام هوایی در حضور اشریشیا کلی



تصویر ۱: نمونه‌ای از آزمایش تعیین حساسیت ضدمیکروبی به روش MIC

بحث و نتیجه‌گیری

اشریشیا کلی و سودوموناس آیروژنوزا محسوس بوده است (۲۰). اثرات ضدباکتری پنیرک بر روی سویه‌های استاف اورئوس (E38) مقاوم به متی‌سیلین نیز گزارش گردیده است (۲۱). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۳ میلادی بر روی فعالیت ضدباکتریایی گیاه پنیرک انجام گرفت مشخص گردید که عصاره اتانولی ۹۵ درصد بر استاف آرئوس، سودوموناس آئروژنوزا، اشریشیا کلی اثر ضدباکتریایی ندارد (۲۲). در مطالعه‌ای

خواص مختلف دارویی برای گیاه پنیرک به خوبی شناخته شده است که می‌تواند به عنوان یک ماده ضدالتهابی دستگاه تنفسی، دستگاه گوارش و پوست مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۷-۱۹).

در این مطالعه سنجد ضدباکتریایی عصاره گیاه پنیرک بر روی باکتری‌های سالمونلا انتریکا تأثیری نداشت، میزان فعالیت آنتی‌باکتریایی پنیرک به روش انتشار دیسک فوزیون بر روی

بیشترین صحت و سرعت و کارآمدی موجب افروden ترکیبات و عصاره‌های آنتی‌میکروبی جدید به تسهیلات کنونی می‌گردد. این سنجش روزوارین تعديل شده، اشتباهات رقیق‌سازی را تصحیح می‌کند. به خصوص در رابطه با تعیین MIC، که منجر به قابل مقایسه بودن نتایج برای مواد آزمایشگاهی سویه‌های باکتریایی مختلف می‌گردد. روشی که در این مطالعه به آن پرداخته شد، روشی آسان و با دقت بالا است. روزگارین یک شاخص اکسیداسیون/احیاء است که برای ارزیابی و رشد سلول‌ها به خصوص در سنجش‌های سیتوتوکسیتی گوناگون مورد استفاده قرار می‌گیرد(۱۵،۱۶).

با توجه به موارد مذکور و اهمیت گیاهان دارویی در این نوشتار سعی بر آن است تا با معرفی گیاه دارویی مهم و روشی جهت بررسی میزان قدرت آنتی‌بакتریالی آن مورد بررسی قرار گیرد.

که در سال ۲۰۰۴ میلادی انجام گرفت از ۱۶ گیاه مورد بررسی از جمله پنیرک، اثر ضدبacterیایی عصاره اتانولی پنیرک بر باکتری‌های استاف آرئوس، سودوموناس آتروژناز، باسیلوس سرئوس و اشریشیاکلی مشخص نمود که عصاره مذکور دارای قدرت بازدارندگی از رشد باکتری است(۲۳). فعالیت‌های دارویی و بیولوژیکی گیاه پنیرک باید مربوط به حضور مقادیر بالای آنتوسبیانیدین‌ها، نفتاکوئین‌ها و فلاونوئیدها یا پلی‌ساکاریدهای لعاب‌دار که در میوه بوته، گل، برگ و ریشه وجود دارد، باشد(۱۴). در سال‌های اخیر، توسعه مقاومت باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها یک مشکل جدی بهداشتی جهانی و برنامه‌های بهداشتی شده است. جستجوی یک عامل ضدمیکروبی جدید با منشاء طبیعی ضروری است. همچنین انتخاب سنجش مناسب برای ارزیابی پتانسیل آنتی‌میکروبی عصاره‌ها و ترکیبات به منظور ایجاد داده‌های با کیفیت با

References:

- 1- Zhenyu W, Qian Y. *Study on physico-chemical properties of the pigment in flowers of mallow*. J Chem Indus Forest Produc 2003; 23(3). 102-4. [Chinese]
- 2- Takeda K, Enoki S, Harborne Jb, Eagles J. *Malonated anthocyanins in malvaceae: malonylmalvin from malva sylvestris*. Phytochemistry 1989; 28: 499-500.
- 3- Cutillo F, D'Abrosca B, Dellagreca M, Fiorentino A, Zarrelli A. *Terpenoids and phenol derivatives from malva silvestris*. Phytochemistry 2006; 67(5): 481-5.
- 4- Vinothapooshan G, Sundar K. *Wound healing effect of various extracts of adhatoda vasica*. Int J Pharma Bio Sci 2010; 1(4): 530-36.
- 5- D'Amelio FS. *Botanicals, a phyto-cosmetic desk reference*. Boca Raton: Crc Press Llc; 1999.
- 6- Barros L, Carvalho AM, Ferreira IC. *Leaves, flowers, immature fruits and leafy flowered stems of Malva sylvestris: a comparative study of the nutraceutical potential and composition*. Food Chem Toxicol 2010; 48(6): 1466-72.
- 7- Bors W, Heller W, Michel C, Saran M. *Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies*. Method Enzymol 1990; 186: 343-55.
- 8- Bors W, Michel C, Stettmaier K. *Antioxidant effects of flavonoides*. Biofactors 1997; 6(4): 399-402.
- 9- El Ghaoui WB, Ghanem EB, Chedid LA, Abdelnoor AM. *The effects of Alcea rosea L. Malva sylvestris L.*

and *Salvia libanotica* L. water extracts on the production of anti-egg albumin antibodies, interleukin-4, gamma interferon and interleukin-12 in BALB/c mice. Phytother Res 2008; 22(12): 1599-604.

10- Garlet, T.M.B. *Levantamento das plantas medicinais utilizadas no município de Cruz Alta*. M.Sc. [thesis], Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; 2000.p.211

11- Marodin SM. *Plantas utilizadas como medicinais no município de Dom Pedro de Alcântara*. M.Sc. [thesis], Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; 2000.p. 413.

12- Drummond AJ, Waigh RD. *Recent research developments in phytochemistry*. Vol 4. Research Signpost; 2000.p. 143-52.

13- Young JC. *A model of illness treatment decisions in a tarascan town*. Am Ethnologist 1980; 7(1): 106-31.

14- Ellof JN. *Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants*. J Ethnopharmacol 1998; 60(1): 1-8.

15- Shayegh J, Hejazi MS, Tabatabayi AM, Dolgari-sharaf J. *Phenotyping of Pasteurella multocida isolates from cattle*. sheep and buffaloes in Iran 2007, 1st Iranian Congress of Clinical Microbiology; Shiraz; Iran. [Persian]

16- Sarker SD, Nahar L, Kumarasamy Y. *Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals*. Methods 2007; 42(4): 321-4.

17- Ellof JN. *It is possible to use herbarium specimens to screen for antibacterial components in some plants*. J Ethnopharmacol 1999; 67(3): 355-60

18- Mc Nicholl BP, McGrath JW, Quinn JP. *Development and application of a resazurin-based biomass activity test for activated sludge plant management*. Water Res 2006; 41: 127-33.

19- Guarnera PM. *Traditional phytotherapy in central Italy (Marche, Abruzzo and Latium)*. Fitoterapia 2005; 76(1): 1-25.

20- Walter C, Shinwari ZK, Afzal I, Malik RN. *Antibacterial activity in herbal products used in pakistan*. Pak J Bot 2011; 43: 155-62.

21- Razavi M, Zarrini Gh, Molavi G, Ghasemi G. *Bioactivity of malva sylvestris L., a medicinal plant from iran*. Iran J Basic Med Sci 2011; 14(6): 574-79

22- Rojas R, Bustamante B, Beatur J, Fernandez I, Alban J, Lock O. *Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants*. J Ethnopharmacol 2003; 88(2-3); 199-204.

23- Basaran D, Ahmet G. *Antimicrobial activity of certain plants used in Turkish traditional medicine*, Asian J Plant sci 2004; 3(1): 104-7.

Comparison of Antibacterial Effect of *Malva Sylvestris L.*(Aerial and Root Organs) by MIC

Mohammad Eini A(PhD Student)^{*1}, Shayegh J(PhD)², Moharrami fard M(PhD Student)³

^{1,3}Department of Veterinary Medicine, Young Researchers Club, Islamic Azad University, Shabestar Branch, Shabestar, Iran

²Department of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Shabestar Branch, Shabestar, Iran

Received: 31 Oct 2013

Accepted: 21 Nov 2013

Abstract

Introduction: Malva sylvestris belongs to Malvaceae family from which A great deal of (malvone A:2-methony-5,6di hydroxyl-1,4naphthoquinone) anthocyanins and important natural pigments have been extracted. Anthocyanins and other substances of Malva sylvestris own antibacterial properties.

Methods: In this study, antibacterial properties of Malva sylvestris were investigated on the 6 bacterial species (Pasteurella multosida, Listeria monocytogenes, Salmonella enterica, Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae) via Hydro-alcoholic extract (arial and root organs)

Results: In this study, the anti-bacterial effects of alcoholic extract of Malva sylvestris was separately investigated according to which the most ani-bacterial effect belonged to the extract of the aerial parts on Pasteurella multosida(3/12(0/19mg/ml)%) and no effect was observed on Salmonella enteritidis .

Conclusion: however antibiotics play an important role in human health,with the increasing occurrence of bacterial resistance against available antibiotics ,it has now become essential to look for newer antibiotics.

Keywords: Antibacterial; Malva Sylvestris L; MIC; Microtitre Plate; Resazurin Assay

This paper should be cited as:

Mohammad Eini A, shayegh J, Moharrami fard M. *Comparison of antibacterial effect of malva sylvestris L.(aerial and root organs) by MIC.* J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2014; 21(6): 816-22.

***Corresponding author:** Tel: +98 251 2700156, Email: ali.meini@gmail.com