

## بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره‌های مختلف اندام‌های گیاه دارویی اسفند (*Peganum harmala* L.) در شمال شرق استان گلستان (اینچه برون)

\* معصومه مازندرانی<sup>۱</sup>، عزت اله قائمی<sup>۲</sup>، فاطمه غفاری<sup>۳</sup>

۱. استادیار علوم گیاهی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان

۲. دانشیار میکروب شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان (مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی)

۳. دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان

### چکیده

گیاه دارویی اسفند *Peganum harmala* L. متعلق به تیره *Zigophyllaceae* از گونه‌های ارزشمند دارویی رویشگاه‌های متفاوت استان گلستان است. این مطالعه به منظور اتنوفارماکولوژی و مقایسه اثر ضدباکتریال عصاره‌های اندام‌های مختلف گیاه دارویی اسفند در شمال شرق استان گلستان انجام گرفت. در این تحقیق ضمن بررسی فنولوژیکی، اطلاعات اتنوفارماکولوژی در مورد گیاه از مردم بومی و ترکمن منطقه بدست آمد. ریشه، ساقه، برگ، گل و دانه‌های گیاه در فاصله ماه‌های اردیبهشت تا مهر ماه ۱۳۸۷ جمع‌آوری و ضمن تهیه عصاره‌های آبی و جوشانده، عصاره اتانولی به روش پرکولاسیون تهیه گردید. به منظور بررسی و مقایسه اثر ضد باکتریال عصاره‌ها از دو روش دیسک دیفیوژن و چاهک استفاده شد و قطر هاله‌های عدم رشد بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری، اندازه گیری و مقایسه کارایی ضد میکروبی با آزمون Pearson chi square انجام و  $P < 0.05$  معنی دار ارزیابی گردید. نتایج نشان داد بیشترین اثر ضد باکتریال مربوط به عصاره اتانولی اندام‌ها بود (۷۸/۸ درصد و  $P < 0.001$ ). اثربخشی عصاره اتانولی دانه (۴۷/۴ درصد) و ریشه (۲۵/۷ درصد)، مخصوصاً در روش چاهک بیشتر از سایر اندام‌های گیاه بود و تفاوت اثر مهاری عصاره دانه به نسبت سایر گروه‌ها معنی دار بود ( $P = 0.01$ ). نتایج حاکی از آن است که باکتری *Bacillus licheniformis* (۵۸/۴ درصد) از بالاترین میزان حساسیت و باکتری‌های *Staphylococcus aureus* و *Staphylococcus epidermidis* یا *Micrococcus lotaeus* حساسیت نسبی، از حساس‌ترین باکتری‌های مورد مطالعه و همچنین باکتری‌های *Pseudomonas aeruginosa* و *Proteus mirabilis* هر یک با ۹۱/۷ درصد مقاومت، از مقاوم‌ترین باکتری‌های مورد مطالعه بودند. با وجود بالاتر بودن حساسیت باکتری‌های گرم مثبت از انواع گرم منفی، تفاوت از نظر آماری معنی دار نمی‌باشد ( $P > 0.05$ ). نتایج تحقیق، احتمالاً بیانگر رغبت بیشتر مردم بومی استان، به مصرف دانه‌های گیاه به عنوان یک ضد عفونی کننده قوی می‌باشد، لذا می‌تواند به عنوان یک سرخ یا کاندید مناسب برای ادامه تحقیقات در زمینه تعیین کمیت و کیفیت مواد موثره ثانوی اندام‌های موثر و بررسی اثر ضدباکتریال آنها در مدل‌های حیوانی و بالینی، با هدف استخراج، فرمولاسیون و تولید داروی گیاهی با اثر ضد عفونی کنندگی قوی باشد.

**کلمات کلیدی:** اسفند *Peganum harmala* L. عصاره اتانولی، آبی و جوشانده، ریشه، دانه، اثر ضدباکتریال، شمال شرق

استان گلستان

## مقدمه

در قرن اخیر بحث عفونت‌های باکتریایی و مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها، تهدیدی جدی برای سلامت انسان‌ها محسوب می‌شوند. لذا دستیابی به ترکیبات جدید ضد میکروبی و طبیعی، با کمترین عارضه جانبی موضوعی است که همواره ذهن محققان را به خود معطوف ساخته است. از آنجائیکه گیاهان برای حفاظت خود در برابر عوامل بیماریزا ناگزیر به ایجاد مکانیسم‌های دفاعی خاص و سنتز ترکیبات ضد میکروبی می‌باشند، می‌تواند همواره به عنوان یک منبع بالقوه و ارزشمند جهت تولید ترکیبات ضد میکروبی و ضدباکتریال مطرح باشند (Cha et al., 2005).

گیاه دارویی *Peganum harmala* L. با نام محلی اسفند، از مهمترین گونه‌های علفی دارویی است که به دلیل تنوع نیازهای اکولوژیکی و مقاومت به تنش‌های مختلف محیطی، عرصه‌های وسیعی از مناطق استپی، دشت و نواحی کوهستانی خشک و سرد استان گلستان را به خود اختصاص داده است. مردم ترکمن در طب سنتی، از آن به طرق مختلف به تنهایی یا ترکیبی با سایر گیاهان دارویی از آن به عنوان یک داروی ضد میکروب در درمان بیماری‌های عفونی استفاده می‌کنند.

گیاه اسفند، بومی مناطق نیمه خشک و خشک شمال غرب هند، آفریقای جنوبی، آسیای مرکزی، عرصه‌های ایرانی - تورانی، صحارا - سندی، مدیترانه ای و اروپا - سیبری است (Mirzaie et al., 2007). به عبارتی از گیاهان دارویی و ارزشمند نواحی استپی نیمه خشک و بیابانی رویشگاههای مختلف ایران و مخصوصا استان گلستان نیز محسوب می‌شود (Zargari, 1989).

اسفند دربردارنده مواد ضد میکروبی فلاونوئیدی و آلکالوئیدهای بتا-کربولینی (هارمین، هارمالین، هارمالول، پگانین و کینازولین) می‌باشد که بیشتر در ریشه، دانه و کالوس گیاه یافت می‌شوند. در طب سنتی کشورهای آسیای مرکزی (ایران، ترکیه، پاکستان، افغانستان، یمن،

تاجیکستان، هند و کشورهای حاشیه هیمالایا) اغلب از عصاره اندام‌های مختلف اسفند، به صورت مختلف علاوه بر سمبل دفع بلا و چشم نظر، به عنوان داروی ضد عفونی کننده هوا، افزایش ترشح شیر، دفع انگل، دفع کرم‌های روده‌ای، ضد التهاب در درمان روماتیسم، افزایش قدرت جنسی و نیز به عنوان یک مسکن قوی جهت تسکین معده درد و قاعدگی بکار می‌رود (Astulla et al., 2008).

تحقیقات آزمایشگاهی حاکی از اثر ضد میکروبی عصاره دانه گیاه جهت از بین بردن میکروب‌ها است، از جمله اینکه عصاره‌های اتانولی حاصل از دانه‌ها و کالوس گیاه، خواص ضد میکروبی علیه میکروب‌های استافیلوکوکوس اورئوس، اش‌ریشیا کلی و کاندیدا آلبکنس نشان داده‌است (Shahverdi et al., 2008). در تحقیقات مشابه، به اثر سمیت سلولی عصاره اتانولی و دوده حاصل از دانه‌های اسفند علیه سلول‌های سرطانی در انسان اشاره شده است (Lamchouri et al. 1999; Shahverdi et al., 2008).

Berrougui و همکاران از آلکالوئیدهای بتا-کربولیک دانه‌ها به عنوان داروی ضد اسپاسم، ضد سرطان، ضد التهاب، ضد میکروب، بازکننده رگ‌های قلبی و همچنین عدم تشکیل لخته در رگ‌های خونی نام بردند (Berrougui et al., 2006). در تحقیقی دیگر از ترکیبات harmine, harmaline, vasicinone به عنوان مهمترین آلکالوئیدهای گیاه با اثر ضد مالاریایی، کرم‌کشی، ضد باکتریایی، ضد قارچ، ضد تومور و بازکننده رگ‌های قلبی نام بردند (Astulla et al., 2008).

Arshad و همکاران به اثر ضد باکتریال عصاره دانه‌های اسفند در التیام زخم‌های پوستی و لزوم ادامه تحقیقات کاربردی با هدف شناسایی و فرمولاسیون داروهای موثر طبیعی و با عارضه جانبی کمتر در رفع چالش مقاومت روزافزون باکتریها به آنتی بیوتیکها اشاره کردند (Astulla et al., 2008; Arshad et al., 2008; Mirzaie et al. 2007).

برگ) از منطقه اینچه برون واقع در شمال شرق استان، نمونه هرباریومی گیاه مورد مطالعه در هرباریوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان، شناسایی، در شرایط آزمایشگاه خشک و سپس پودر آن برای انجام عملیات عصاره گیری آماده شد.

#### عصاره آبی

۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر ۷۰ تا ۸۰ درجه سانتیگراد را به ۳۰ گرم پودر گیاه اضافه کرده و به مدت ۲۴ ساعت در بن ماری ۴۵ تا ۵۰ درجه قرار می دهیم. سپس محلول حاصل را صاف و با استفاده از آب مقطر، رقت های مورد نظر آن تهیه گردید (Mashhadian, 2005).

#### عصاره جوشانده

۳۰ گرم پودر خشک گیاه را با ۲۰۰ میلی لیتر آب مقطر به مدت ۳۰ دقیقه می جوشانیم. پس از سرد شدن آن را صاف نموده و از محلول حاصله به عنوان عصاره جوشانده در آزمایشات *in vitro* استفاده گردید (Mashhadian, 2005).

#### آماده سازی عصاره اتانولی گیاهان

به منظور تهیه عصاره اتانولی، از اتانول ۷۰ درجه و روش پرکولاسیون استفاده شد. ۵۰ گرم از پودر هر یک از اندام های گیاه را در داخل دکانتور ریخته، سپس مرحله به مرحله به آن اتانول ۷۰ درجه می افزاییم. برای افزودن اتانول ابتدا آن را گرم کرده و سپس به داخل دکانتور انتقال می دهیم. افزودن اتانول را تا جایی ادامه می دهیم که حلال تمامی حجم نمونه ها را پوشش دهد و علاوه بر آن مقداری از اتانول نیز روی سطح نمونه داخل دکانتور را کاملاً بپوشاند. مدت عصاره گیری در این تحقیق ۷۲ ساعت به طول انجامید. جداسازی عصاره ها از حلال توسط دستگاه روتاری با کمک پمپ خلاء انجام گرفت (Kordali et al., 2005; Mazandarani et al., 2007).

موافقی و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که شهد گل های اسفند به دلیل وجود آلكالوئیدهای بتاکربولینی، دارای اثرات مسکن و ضد سرطانی است (Movafeghi et al., 2009). تحقیقات نشان داده که مردم مراکش در طب سنتی خود، از دانه های اسفند به روش های مختلف به عنوان ضد عفونی کننده قوی، در درمان التهاب، دیابت، تسکین درد و التیام زخم های ناشی از سرطان پوست استفاده می کنند که در این رابطه نتایج مشابه *In vitro* مورد فوق را تایید نموده است (Eddouks et al., 2002; Hemmati nejad et al., 2006).

مردم مکزیک در طب سنتی خود، از عصاره دانه ها به عنوان ضد عفونی سیستم هاضمه، درمان بیماری های عفونی معده و روده ها استفاده می کنند که در این رابطه Shouda و همکاران از اثر عصاره دانه ها علیه باکتری های مولد عفونت های گوارشی، *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Candida albicans*, *Bacillus subtilis* نام برد (Shouda et al., 2008). مردم پاکستان نیز از دوده دانه و برگ گیاه اسفند به عنوان ضد عفونی کننده، دافع بلا و چشم نظر استفاده می کنند (Shinwari and Gilani, 2003). در کشور یمن نیز از دوده و عصاره های مختلف اسفند به عنوان ضد عفونی کننده و میکروب کش نام می برند (Ali et al., 2001). لذا با توجه به مصارف فراوان دانه های اسفند به طرق مختلف در طب سنتی مردم استان گلستان، در این تحقیق به بررسی و مقایسه اثر ضد باکتریایی عصاره های آبی، اتانولی و جوشانده اندام های مختلف گیاه اسفند علیه ۱۳ سویه از باکتری های گرم مثبت و منفی، به دو روش دیسک دیفیوژن و چاهک پرداخته شد.

#### مواد و روشها

##### شناسایی و جمع آوری

عملیات صحرائی به منظور شناسایی رویشگاه های طبیعی و بررسی فنولوژی گونه مورد مطالعه در فاصله ماه های اردیبهشت تا آبانماه ۱۳۸۷ انجام گرفت. پس از جمع آوری اندام های مختلف (ریشه، دانه، ساقه، گل و

رقیق سازی عصاره گیاهان و تهیه دیسک‌های حاوی

عصاره

در این مرحله عصاره اتانولی را با پروپیلن گلیکول ۱۰درصد، رقیق کرده و علاوه بر عصاره خالص، غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ mg/ml از عصاره تهیه شد (Shahverdi et al., 2008). سپس جهت تهیه دیسک‌های حاوی عصاره از دیسک‌های بلانک ساخت پادتن طب استفاده شد. بدین ترتیب که دیسک‌های بلانک را در لوله‌های حاوی رقت‌های تعیین شده از عصاره‌ها قرار داده و بعد از ۵ تا ۱۰ دقیقه که دیسک‌ها را در دمای ۳۷°C انکوبه تا کاملاً خشک شده و جهت دیسک گذاری آماده شود (Mashhadian, 2005). برای سایر عصاره‌ها رقیق سازی توسط آب مقطر استریل انجام گردید و رقت‌های ۱/۲، ۱/۴، ۱/۸، ۱/۱۶ تهیه گردید.

سویه‌های باکتری‌های مورد مطالعه

با کتری‌های مورد استفاده، سویه‌های

- Shigella dysenteria* (PTCC 1188)
- Pseudomonas aeruginosa* (PTCC 1214)
- Escherchia coli* (PTCC 1399)
- Staphylococcus aureus* (PTCC 1431)
- Bacillus licheniformis* (PTCC 1015)
- Salmonella typhimurium* (PTCC 1596)
- Staphylococcus epidermidis* (PTCC 1114)
- Enterococcus faecalis* (PTCC 1393)
- Proteus mirabilis* (PTCC 1076)
- Listeria monocytogenes* (PTCC 1163)
- Micrococcus loteus* (PTCC 1318)
- Kelebsiella* (PTCC 1291)
- and *Mycobacterium bovis* (PTCC 1430)

که همگی از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شدند.

بررسی اثر ضدباکتریایی عصاره‌ها

از دو روش دیسک دیفیوژن و چاهک استفاده شد و قطر هاله‌های عدم رشد بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون (۳۷ درجه) اندازه‌گیری، ثبت و به جهت مقایسه کارایی ضد میکروبی از آزمون Pearson chi square استفاده شد.

الف) روش دیسک دیفیوژن

ابتدا از تمام سویه‌های باکتریایی سوسپانسیون میکروبی معادل ۰/۵ مک فارلند (۱/۵×۱۰<sup>۸</sup> cfu/ml) تهیه شد و سپس با ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه شده بر سطح محیط مولر هیتون آگار کشت یکنواخت انجام شد (برای باکتری میکوباکتریوم بویس از محیط کشت لوون اشتاین استفاده شد). آنگاه دیسک‌های حاوی رقت‌های مختلف عصاره، با فاصله معین از یکدیگر از لبه پلیت بر روی سطح محیط کشت آگار قرار داده شدند. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷°C گرمخانه گذاری شده (برای میکوباکتریوم بویس نتایج بعد از ۱۰-۱۴ روز بررسی شد) و نتایج اثر ضد باکتریایی با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک‌ها ثبت شد. برای حصول اطمینان، این آزمایش برای هر سویه باکتری سه بار تکرار گردید و میانگین قطر هاله عدم رشد در سه بار تکرار به عنوان قطر نهایی ثبت شد. قطر هاله عدم رشد کمتر از ۸ mm به عنوان مقاوم، ۸-۱۲ mm نسبتاً حساس و بیشتر از ۱۲ mm حساس در نظر گرفته شد (Mazandarani et al., 2007). همچنین از دیسک حاوی پروپیلن گلیکول ۱۰درصد به عنوان کنترل منفی و از دیسک حاوی آنتی بیوتیک جنتامایسین به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

ب) روش چاهک

بعد از تهیه غلظت نیم مک فارلند از کشت ۲۴ ساعته باکتریها، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه شده بر سطح محیط کشت مولر هیتون آگار (برای میکوباکتریوم بویس از محیط کشت لوون اشتاین استفاده شد) کشت یکنواخت باکتریها انجام شد سپس با کمک پیت پاستور استریل، حفره ای به قطر ۶ تا ۷ میلی متر در محیط ایجاد نموده و ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های تهیه شده از عصاره، داخل آن ریخته شد و قطر هاله عدم رشد را پس از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری در ۳۷°C (برای میکوباکتریوم بویس نتایج بعد از ۱۰-۱۴ روز بررسی شد) بررسی و ثبت نمودیم.

## نتایج

مردم ترکمن نشین شمال استان گلستان از دانه‌های اسفند به طرق مختلف به عنوان داروی ضد میکروب در درمان بیماری‌های عفونی، معده، روده، اسهال، شکم درد، درد قاعدگی، دفع کرم و انگل، درمان عفونت‌های پوستی، التیام محل گزش حشرات، عفونت‌های قارچی انگشتان و همچنین به عنوان ضد التهاب، مسکن و نیز به همراه سایر گیاهان دارویی و بومی استان در کاهش دردهای روماتیسمی بهره می‌برند.

نتایج مطالعه در جداول (۱ و ۲) و همچنین اشکال ۱، ۲ و ۳ حاکی از آن است که بیشترین حساسیت نسبی و کامل باکتریها، مربوط به عصاره اتانولی است (۷۸/۸ درصد)، فقط ۲۱/۱ درصد باکتریها نسبت به عصاره جوشانده حساسیت داشتند و عصاره آبی اندام‌ها با ۹/۶ درصد حساسیت، عملاً بی‌تاثیر بودند (در  $P < 0.001$  کاملاً معنی‌دار است).

عملیات صحرائی در رویشگاه‌های استپی و نیمه استپی منطقه اینچه برون نشان داد که گیاه اسفند، به دلیل تنوع نیازهای اکولوژیکی و همچنین مقاومت به تنش‌های مختلف محیطی، عرصه‌های مختلف نیمه استپی با خاکهای سبک شن لومی شمال شرق استان گلستان را به خود اختصاص داده است. نتیجه بررسی‌های فنولوژی در این تحقیق نشان داد که گیاه از اوایل فروردین تا اواسط اردیبهشت به گل می‌نشیند، میوه‌های کپسول آن نیز بین ماه‌های شهریور تا مهر می‌رسند، بنا به اظهار چوپانان محلی این گیاه سمی بوده و کمتر مورد چرای دام قرار می‌گیرد و اغلب در صورت چرا، باعث سقط جنین و مرگ گوسفندان می‌شود.

جدول ۱: حساسیت باکتریهای مورد مطالعه نسبت به عصاره های مختلف ریشه گیاه *Peganum harmala* L.

(قطر هاله عدم رشد باکتری بر حسب میلی متر)

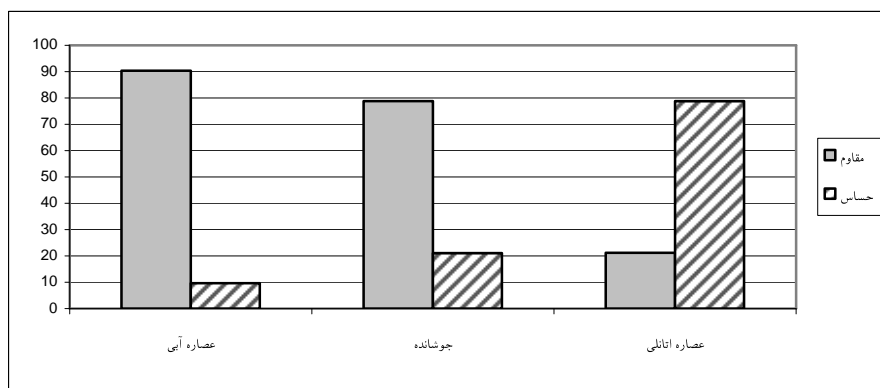
عصاره	آبی		جوشانده		اتانولی	
	دیسک	چاهک	دیسک	چاهک	دیسک	چاهک
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	۹	۱۱	۱۴
<i>Staphylococcus epidermis</i>	-	-	-	۹	۱۲	۱۳
<i>Micrococcus loteus</i>	-	-	-	-	۱۳	۱۵
<i>Listeria monocytoginesis</i>	-	-	-	-	۱۲	۱۸
<i>Entrococcus faecalis</i>	-	-	-	-	-	۱۲
<i>Basillus licheniformis</i>	-	-	-	۱۰	۱۳	۱۹
<i>Mycobacterium bovis</i>	-	-	-	-	-	۱۱
<i>Pseudomonas aeroginosa</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Shigella dysentria</i>	-	-	-	-	۹	۱۳
<i>Kelebsiella pnumonie</i>	-	-	-	-	۱۱	۱۴
<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Escherchia coli</i>	-	-	-	-	-	۱۲

جدول ۲: حساسیت باکتریهای مورد مطالعه نسبت به عصاره های مختلف دانه گیاه *Peganum harmala* L. (قطر هاله عدم رشد باکتری بر حسب میلی متر)

باکتری	عصاره آبی		جوشانده		اتانولی	
	دیسک	چاهک	دیسک	چاهک	دیسک	چاهک
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	۱۲	۱۶	۲۱
<i>Staphylococcus epidermis</i>	-	-	-	۱۳	۱۶	۲۵
<i>Micrococcus luteus</i>	-	۹	-	۱۰	۱۹	۲۶
<i>Listeria monocytoginesis</i>	-	-	-	-	۱۶	۲۸
<i>Entrococcus faecalis</i>	-	-	-	-	۱۲	۱۹
<i>Basillus licheniformis</i>	-	۱۰	-	۱۲	۲۱	۲۹
<i>Mycobacterium bovis</i>	-	-	-	-	۱۲	۱۳
<i>Pseudomonas aeroginosa</i>	-	-	-	-	۸	۱۰
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-	-	۱۰	۱۲	۱۸
<i>Shigella dysentria</i>	-	۱۰	-	۱۲	۱۳	۲۳
<i>Kelebsiella pnunionie</i>	-	۱۱	-	۱۳	۱۶	۲۲
<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	-	-	۱۵
<i>Escherchia coli</i>	-	۹	-	۱۰	۱۲	۲۰

جدول ۳: متوسط میانگین حساسیت باکتریهای مورد مطالعه نسبت به نوع عصاره‌های مختلف گیاه *Peganum harmala* L.

نوع عصاره	عصاره آبی	جوشانده	عصاره اتانولی
میزان حساسیت			
مقاوم	٪۹۰/۴	٪۷۸/۸	٪۲۱/۲
نسبتا حساس	٪۹/۶	٪۱۱/۵	٪۹/۶
حساس	٪۰	٪۹/۶	٪۶۹/۲



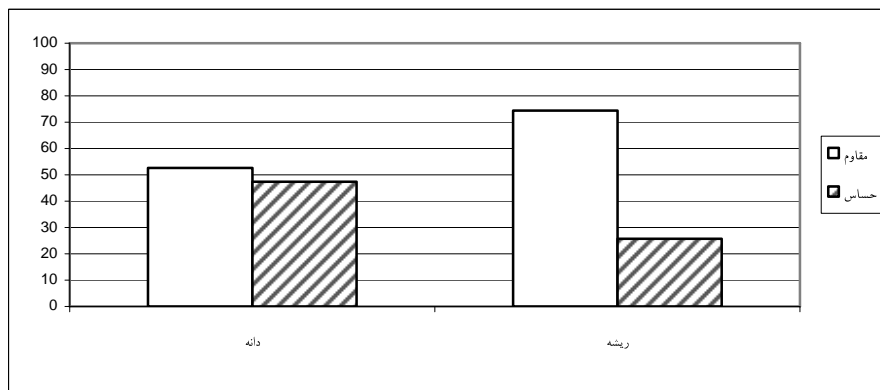
شکل ۱: میزان حساسیت باکتریهای مورد مطالعه نسبت به عصاره‌های مختلف گیاه

اندام‌های گیاه بوده است، به عبارتی عصاره سایر اندام‌ها عملاً بی اثر بودند. تفاوت اثر مهاری در عصاره دانه به نسبت سایر گروه‌ها معنی‌دار بوده است ( $P=0.01$ ).

نتایج جداول ۱، ۲ و ۴ و نمودار ۲ نشان می‌دهد که میزان اثر بخشی (حساس یا نسبتاً حساس) عصاره دانه‌ها (۴۷/۴ درصد) و ریشه (۲۵/۷ درصد) بیشتر از سایر

جدول ۴: میزان حساسیت باکتری‌های مورد مطالعه نسبت به عصاره‌های اندام‌های مختلف گیاه *Peganum harmala* L.

اندام‌های گیاه	دانه	ریشه	ساقه	برگ	گل
میزان حساسیت					
مقاوم	۵۲/۶٪	۷۴/۴٪	۱۰۰٪	۱۰۰٪	۱۰۰٪
نسبتاً حساس	۱۱/۵٪	۹/۰٪	-	-	-
حساس	۳۵/۹٪	۱۶/۷٪	-	-	-



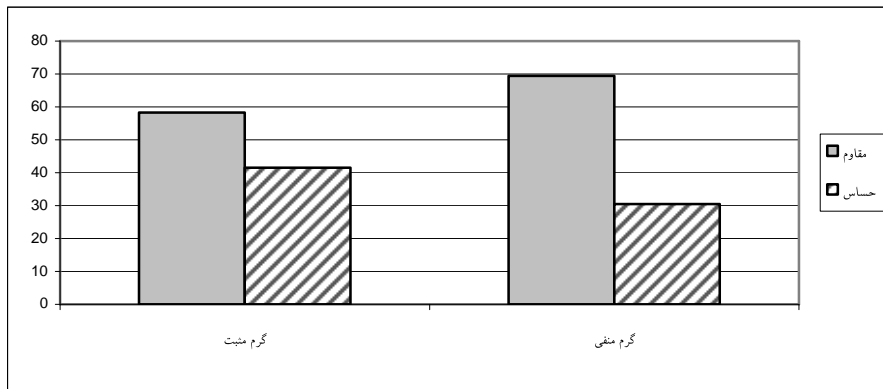
شکل ۲: میزان حساسیت باکتری‌ها نسبت به عصاره اندام‌های ریشه و دانه گیاه

با *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus loteus* هر یک با ۹۱/۷ درصد مقاومت از مقاوم‌ترین باکتری‌های مورد مطالعه بودند. در طبقه بندی باکتریها به دو گروه گرم مثبت و گرم منفی مشخص گردید که حساسیت گرم مثبت‌ها بیش از انواع گرم منفی میباشد (جدول ۵) ولی این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نمی‌باشد ( $P>0.05$ )

نتایج حاکی از آن است که باکتری *Bacillus licheniformis* با ۵۸/۴ درصد، از بالاترین میزان حساسیت و باکتری‌های *Staphylococcus aureus*، *Staphylococcus epidermis*، *Micrococcus typhi*، *Shigella dysentria* و *Salmonella typhi* هر کدام با ۵۰ درصد حساسیت (یا حساسیت نسبی)، از حساسترین باکتری‌های مورد مطالعه، و باکتری‌های

جدول ۵: متوسط میانگین حساسیت باکتری‌های گرم مثبت و منفی، نسبت به عصاره‌های اندام‌های مختلف

میزان حساسیت	گیاه <i>Peganum harmala</i> L.	
	باکتری	گرم مثبت
مقاوم	۵۸/۳٪	۶۹/۴۵٪
نسبتاً حساس	۹/۵٪	۱۱/۱٪
حساس	۳۲/۰٪	۱۹/۴٪



شکل ۳: میزان حساسیت باکتری‌های گرم مثبت و منفی نسبت به عصاره اندام‌های گیاه

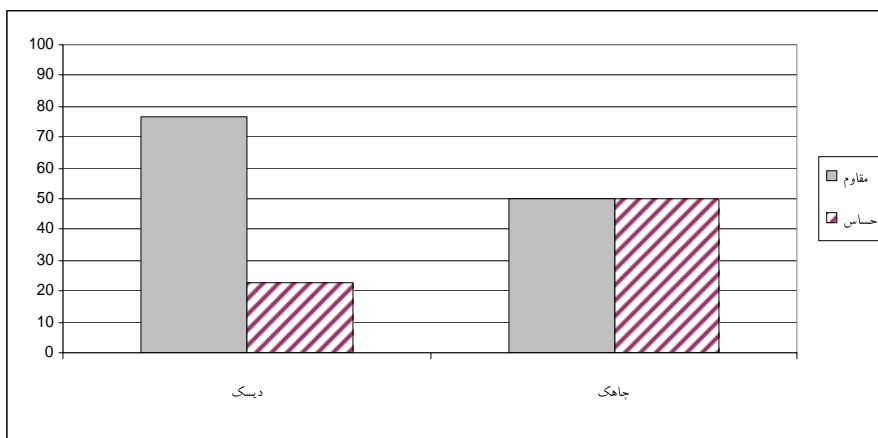
عصاره‌های ریشه و دانه‌های گیاه در روش چاهک اثر  
 مهاری بیشتری را علیه باکتری‌های مورد مطالعه از خود  
 نشان دادند ( $P=0.001$  معنی دار است).

همانطور که از نتایج جداول ۱ و ۲ و ۴- مشخص شده  
 است، ۵۰ درصد سویه‌ها مخصوصاً در روش چاهک  
 نسبت به عصاره‌ها، حساس یا نسبتاً حساس بودند،

جدول ۶: میزان حساسیت باکتری‌های مورد مطالعه نسبت به عصاره‌های گیاه *Peganum harmala* L.

در دو روش دیسک و چاهک

میزان حساسیت	روش	روش دیسک	روش چاهک
مقاوم		٪۷۶/۹	٪۵۰
نسبتاً حساس		٪۳/۸	٪۱۶/۷
حساس		٪۱۹/۲	٪۳۳/۳



نمودار ۴: میزان حساسیت باکتری‌های مورد مطالعه در دو روش دیسک و چاهک



## بحث

نتایج بررسی‌های *in vitro* در این تحقیق نشان داد که اثر ضد باکتریال عصاره اتانولی دانه‌ها، مخصوصاً در روش چاهک، بیشتر از سایر اندام‌ها بود. حدود ۷۸/۸ درصد از سویه‌های باکتریایی نسبت به عصاره اتانولی گیاه حساسیت نشان دادند (هیچ کدام از عصاره‌های برگ، ساقه و گل گیاه اثر مهاری نداشتند که در قسمت نتایج به آن اشاره شده است).

نتایج تحقیقات مشابه، حاکی از اثر بخشی ضد باکتریال بیشتر عصاره‌های الکلی نسبت به سایر عصاره‌ها می‌باشد (جدول ۱ تا ۳، شکل ۱)، احتمالاً حلال‌های الکلی مثل اتانول، نقش مهمی را در جداسازی ترکیبات فعال ثانوی و دارویی گیاه ایفا نموده و کثرت آن مواد در عصاره اتانولی بر میزان اثربخشی ضد باکتریال آن موثر است (Derakhshanfar *et al.*, 2009). در تحقیقی دیگر نشان دادند که عصاره اتانولی گیاه قدرت کشندگی باکتری‌ها و قارچ‌ها را دارد که علت آن را به آکالوئیدهای هارمین و هارمالین نسبت دادند و ضمناً قارچ‌ها از حساسیت بیشتری نسبت به باکتریها برخوردارند (Shahverdi *et al.*, 2008; Abdel-Fattah *et al.*, 1997).

درخشانفر و همکاران به اثر عصاره اتانولی اسفند به عنوان ضد باکتری و ضد قارچ نام بردند که به صورت موضعی در التیام زخم‌های پوستی و درماتیت مطرح است و البته اثر آن از عصاره کلروفرمی آن بیشتر است (Derakhshanfar *et al.*, 2009).

نتیجه این تحقیق (جدول ۳ و شکل ۱) بر مبنای مطالعات مختلف مشخص می‌سازد که عصاره اتانولی بیش از عصاره آبی یا جوشانده، توانایی استخراج ترکیبات دارای فعالیت ضد میکروبی را دارا می‌باشد و احتمالاً بسیاری از ترکیبات موجود در اسفند مثل هارمین و هارمالین در حلال‌های آبی حتی بعد از جوشاندن هم حل نمی‌گردد.

نتایج ما نشان می‌دهد که میزان اثر بخشی عصاره دانه و ریشه بیشتر از سایر اندام‌های گیاه بوده است (جدول ۴ و شکل ۲). در تحقیقات مشابه نیز از دانه‌های اسفند به عنوان ضدباکتریال نام برده شد (Berrougui *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2001; Arshad *et al.*, 2006).

همکاران به اثر ضد باکتریال عصاره دانه‌های اسفند در التیام زخم‌های پوستی و لزوم ادامه تحقیقات کاربردی با هدف شناسایی و فرمولاسیون داروهای موثر طبیعی و با عارضه جانبی کمتر در رفع چالش مقاومت روزافزون باکتری‌ها به آنتی بیوتیکها اشاره کردند (Astulla *et al.*, 2008; Arshad *et al.*, 2008; Mirzaiee *et al.*, 2007).

شاهوردی و همکاران در این رابطه با اشاره به فراوانی وجود مواد موثره ثانوی هارمین و هارمالین دانه و ریشه گیاه، احتمالاً باعث افزایش اثر ضد باکتریال گیاه شده است (Shahverdi *et al.*, 2008).

اثرات ضددردی، آرام بخشی، ضد التهابی و ضدباکتریال عصاره دانه‌های اسفند به وجود آکالوئیدهای هارمین و هارمالین نسبت داده می‌شود (Berrougui and Herrera, 2008; Monsef *et al.*, 2004).

در این تحقیق باکتری‌های گرم مثبت از حساسیت بیشتری نسبت به عصاره‌ها برخوردار بودند (جدول ۵ و شکل ۳). تحقیقات مشابه در این رابطه به حساسیت بیشتر باکتری‌های گرم مثبت نسبت به عصاره‌های گیاهان اشاره نموده‌اند (Arshad, 2008; Behmanesh *et al.*, 2007; Mazandarani *et al.*, 2007).

مقاومت بیشتر باکتری‌های گرم منفی احتمالاً به علت پیچیدگی بیشتر دیواره، وجود ترکیبات هیدروفوب غنی از چربی در دیواره این باکتریها و عدم امکان ورود عصاره گیاه به داخل سلول باکتری است، حال آنکه باکتری‌های گرم مثبت دارای دیواره‌های یک دست و آسیب پذیر در مقابل آنتی بیوتیکها و مواد ضد میکروبی می‌باشند در نتیجه حساسیت بیشتری به عصاره‌ها از خود

پیشنهاد می‌گردد. یکی دیگر از دلایل احتمالی، این است که در عصاره های تام ممکن است پخش از طریق دیسک بخوبی انجام نگردد و به همین دلیل روش چاهک پاسخهای مناسبتری ارائه می دهد .

#### نتیجه گیری نهایی

نتایج ما نشان داد که عصاره اتانولی دانه اسفند، اثر ضد میکروبی مناسبی علیه باکتری‌های گرم مثبت و بعضی از باکتری‌های گرم منفی بیماریزا دارد. که این امر می‌تواند در تایید کاربرد سنتی آن باشد. شناسایی مهمترین مواد موثره ثانوی دانه‌ها و همچنین مقایسه عملکرد آن مواد در اندامها و رویشگاه‌های مختلف و در مدل‌های حیوانی و بالینی پیشنهاد می‌گردد.

#### References

- Abdel-Fattah, A.F.M., Matsumoto, K. and Murakami Y. (1997).** Central serotonin level dependent changes in body temperature following administration of tryptophan to pargiline- and harmalin pretreated rats. *Gen Pharmacology* 28, pp.405-409.
- Ali, N.A.A., Julich, W.D., Kusnik, C., Lindequist, U., (2001).** Screening of Yemeni medicinal plants for antibacterial and cytotoxic activity. *Phytotherapy Research Journal*. 42, 173- 179.
- Arshad, N., Zitterl-Eglseer, K., Hasnain ,S., Hess, M., (2008).** "Effect of *Peganum harmala* or its beta-carboline alkaloids on certain antibiotic resistant strains of bacteria and protozoa from poultry". *Phytotherapy Research Journal*. 22 (11): 1533-8.
- Astulla, A., Zaima, K., Matsuno, Y., Hirasawa, Y., Ekasari, W., Widyawaruyanti, A., (2008).** Alkaloids from the seeds of *Peganum harmala* showing antiplasmodial and vasorelaxant activities. *Natural Medical Journal*, 62:470-472.
- Asghari, G., Lock wood, G., (2002).** Sterospecific biotransformation by cell culture of *P. harmala*, *Iranian Journal Biomedical*, 6(1), 43-46.
- Behmanesh, B., Heshmati, G.H., Mazandarani, M., Ghaemi, E.A., (2007).** Chemical composition and anti bacterial activity from essential oil of *Artemisia sieberi* Besser *sieberi* in North of Iran. *Asian Journal of Plant Sciences*. 6(3):562-564.

نشان می‌دهند. Mazandarani و همکاران (۲۰۰۷) و Behmanesh و همکاران (۲۰۰۷) اذعان داشتند که باکتری‌های گرم مثبت، به دلیل یک لایه‌ای بودن دیواره، نسبت به باکتری‌های گرم منفی از حساسیت بیشتری نسبت به عصاره اتانولی دانه‌های اسفند برخوردارند.

نتایج مطالعه ما (جدول ۱ و ۲) مشابه یافته‌های شاهوردی نشان داد که عصاره دانه‌های اسفند اثر مهاری بر باکتری‌های گرم مثبت (*S. aureus & S. epidermidis*) داشته، ولی بر *E.coli, Pseudomonas aeruginosa* اثر مهاری ندارد (Shahverdi et al., 2008). این در حالی است که ارشد و همکاران نشان دادند، عصاره دانه‌های اسفند در شرایط *in vitro* علیه باکتری گرم منفی *E.coli* اثر داشته و نتایج حاکی از اثر آکالوئیدهای عصاره دانه به عنوان ضدباکتری و آنتی بیوتیک بود ( Arshad et al., 2008).

باکتری *Mycobacterium* در این تحقیق با قطر هاله عدم رشد ۱۳ میلیمتر، از حساسیت محدودی نسبت به عصاره اتانولی دانه‌ها برخوردار بود (جدول ۲)، در این رابطه Gantam و همکاران از عصاره اتانولی دانه‌های اسفند به عنوان داروی کشنده باکتری *Mycobacterium tuberculosis* عامل بیماری سل نام بردند ( Gantam et al., 2007). و این موضوع در تایید مصرف دوده دانه‌های گیاه در درمان و پیشگیری از سل نزد مردم ترکمن مطرح است.

نتایج این مطالعه نشانگر کارایی بالاتر روش چاهک در ارزیابی اثر ضد میکروبی عصاره‌ها، به نسبت روش دیسک میباشد. یکی از دلایل احتمالی این پدیده حجم بالاتر عصاره ها در روش چاهک می‌باشد، ولی باید بخاطر داشت که محلول موجود در چاهک در کل محیط اطراف خود (سطح بالائی و داخل آگار پخش می‌گردد و نمیتوان فرض کرد که تمام عصاره با باکتری مجاور بوده است و شاید به همین دلیل است که در روشهای استاندارد برای آنتی بیوگرام، استفاده از روش دیسک

- sativa* extracts against *S. aureus*, *P. aeruginosa*. Pakistan Medical Sciences Journal. 21(1): 47-52.
- Mazandarani, M., Yassaghi, S., Rezaei, M.B., Ghaemi, E.A., (2007).** Ethnobotany and anti bacterial activity from essential oil of two endemic *Hypericum* species in North of Iran. Asian Journal of Plant Sciences. 6(2):354-358.
- Mirzaei, M., Nosratabadi, S. J., Erakhshanfar, A., Sharifi, I., (2007).** Antileishmanial activity of *Peganum harmala* extract on the *in vitro* growth of *Leishmania major* promastigotes in comparison to a trivalent antimony drug. Vet. Arhiv Journal. 77, 365-375,
- Movafeghi, A.A; Abedini, M.; Fathiazad, F.B; Aliasgharpour, M.A; Omid, Y., (2009).** Floral nectar composition of *Peganum harmala* L... Natural product research Journal. 23, 301-308
- Shahverdi, A.R., Ostad, S.N., Khodae, S., Bitarafan, L., Monsef-Esfahani, H.R., Jamalifar, H., Nikavar, B., Mohseni, M., (2008).** Antimicrobial and cytotoxicity potential of *Peganum harmala* smoke. Pathology Magazine. 4(15): 236-40.
- Shi, C.C, Liao, J.F, Chen, C.F, (2001).** Spasmolytic effect of three harmala alkaloids on guinea – pig isolated trachea. Pharmacol toxicology Journal. 89: 259- 264.
- Shinwari, Z.K., Gilani, S.Sh., (2003).** Sustainable harvest of medicinal plants at Bulashbar Nullah, Astor (Northern Pakistan), Ethnopharmacology Journal. 84. 289- 298.
- Shouda, M., Osman, S., Salama, D., Ayub, A., (2008).** Toxic effect of *P. harmala* leaves on the Cotton leaf worm, *Spodoptera littoralis* and its parasitoids microplitis. Pakistan Journal of Biological Science . 1, 546-552.
- Zargari, A., (1989).** Medicinal Plants ,Tehran University Press, Tehran, Iran. Vol: 1 pp. 637-639).
- Berrougui, H., Martin-Cordero, C., Khalil, A., Hmamouchi, M., Ettaib, A., Marhuenda, E., Herrera, M. D, (2006).** Vasorelaxant effects of harmine and harmaline extracted from *Peganum harmala* L. seed's in isolated rat aorta. pharmacological research Journal. Vol 54, 150-157.
- Cha, J.D., Jeong, M.R., Choi, H.J, (2005).** Chemical composition and anti microbial activity of the essential oil of *Artemisia lavandulaefolia* Biochemical Journal, 71(6): 575-7.
- Derakhshanfar, A., Oloumi, M. M. , Mirzaie, M., (2009).** Study on the effect of *Peganum harmala* extract on experimental skin wound healing in rat: pathological and biomechanical findings. Clinical Pathology Journal, 580-589.
- Eddouks, M., Maghvani, M., Lemhardi, A., Joudad, H, (2002).** Ethnopharmacological survey of medicinal plant for the treatment of diabete in South east region of Morocco. Journal of Ethnopharm. Vol. 82. 97-103.
- Gantam, R., Saklani, A., Sanjay, M., (2007).** Indian medicinal plants as a source of anti *Mycobacterial* agents. J of Ethnopharmacology. 110, 200- 234.
- Hemmateenejad, B., Abbaspour, A., Maghami, H., Miri, R., Panjehshahin, M.R., (2006).** Partial least squares-based multivariate spectral calibration method for simultaneous determination of beta-carboline derivatives in *Peganum harmala* seed extracts. Annual Chemical Acta Journal. 575 (2): 290–9
- Kordali, S., Kotan, R., Mavi, A., (2005).** Determination of the chemical composition and anti oxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculoides* and *A. annuae* J. Agri food chemistry J., 30, 53 (24):9452-8.
- Lamchouri, F., Settaf, A., Cherrah, Y., Hassar, M., Zemzami, M., Atif, N., Nadori, E. B. (2000).** In vitro celltoxicity of *Peganum harmala* alkaloids on cancerous cell-lines. Fitoterapia Journal. 71:50-54.
- Mashhadian, N.V., Rakhshandeh, H., (2005).** Antibacterial and antifungal effects of *Nigella*

## Antibacterial survey of different extracts of *Peganum harmala* L. different parts in North east of Golestan province (Inche Borun)

Mazandarani, M<sup>1</sup>., Ghaemi, E.A<sup>2</sup>., Ghaffari, F.<sup>3</sup>

1. Assistant professor of Botany, Islamic Azad University of Gorgan- branch
2. Associated professor of microbiology, Golestan University of medical sciences infectious disises research center
3. Islamic Azad University of Gorgan- branch

### Abstract

*Peganum harmala* L. belongs to Zygophyllaceae family is one of the most important medicine plants with wild distribution in stepic and semi stepic of Golestan province. In this research, after phenology ethnopharmacological data obtained from turkman rural people. Different parts of plant were collected in May to late of September 2008 in dry stepic region of North east of Golestan province (Inche Borun). Aqueous, infusion and ethanolic extract were obtained by percolation method and their antibacterial effect was evaluated by disc diffusion and well methods. Inhibition zone after 24h incubation of 37 and their antibacterial activity were assessed by Pearson chi-square ( $P < 0.05$ ). Ethnopharmacological data in this research showed, it has been used by the Turkmen rural healers in North east of Golestan province as strong anti air infection, sedative, anti bacterial and skin inflammation to treatment fungal, gastro intestinal infection and dysmenorrhea. Ethanol extracts of root and seeds had the most efficacy against tested bacteria, especially in well method ( $P < 0.001$ ), another extracts had no any antibacterial effect. 78.8% of gram positive and negative bacteria (*Bacillus licheniformis*, *Staphylococcus epidermis*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus loteus*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysentria*) were the most sensitive bacteria against ethanol extract, but gram negative bacteria such as *Pseudomonas aeroginosa* and *Proteus loteus* were the most resistant bacteria ( $P < 0.001$ ). Rural people were interested to take seed and smok for air disinfection, sedative and calming, can be a good candid for chemical analysis of antibacterial activity in animal and clinical models for formulation and production of natural antibacterial drug.

**Key Word:** *Peganum harmala* L., Different extracts, Root, Seed, Anti bacterial, Golestan Province, Inch Borun