Archive of SID

فصلنامه اکوفیتوشیمی گیاهان دارویی، شماره پیاپی 8، سال دوم، شماره 4، زمستان 1393

اتنوفارماکولوژی، فیتوشیمیایی (فنل و فلاونویید کل) و ارزیابی اثر ضد باکتریائی عصاره اتانولی گیاهان دارویی-خوراکی (*Allium cepa, Actinidia deliciosa, Berberis vulgaris*) بر جدایه‌های لیستریا مونوسیتوژنز

یونس انزابی[1*] و آرش خاکی[2]

[1]استادیار، گروه پاتوبیولوژی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

[2]دانشیار، گروه پاتوبیولوژی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

تاریخ دریافت: 93/7/24 ؛ تاریخ پذیرش: 93/11/25

چکیده

بررسی‌های اتنوفارماکولوژیکی، فیتوشیمیایی و ضد باکتریایی گیاهان دارویی و خوراکی، به‌منظور دستیابی به ترکیبات طبیعی آنتی‌اکسیدان و ضدعفونی‌کننده در پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری‌های عفونی، از مهمترین چالش‌های سازمان جهانی بهداشت (WHO) گزارش شده است. در این تحقیق گیاهان خوراکی: زرشک، کیوی و پیاز از استان‌های مختلف کشور جمع‌آوری و همزمان مهمترین استفاده‌های دارویی آن‌ها از مردم محلی اخذ و ثبت گردید، عصاره اتانولی گیاهان با استفاده از روش ماسراسیون در قیف پرکولاسیون، میزان فنل و فلاونوئید کل به روش اسپکتروفوتومتری، ارزیابی اثر ضد باکتریایی عصاره‌ها علیه جدایه‌های باکتری لیستریا مونوسیتوژنز از روش‌های دیسک دیفیوژن، تعیین حداقل غلظت ممانعت از رشد (MIC) وحداقل غلظت باکتری کشی (MBC) بر مبنای روش رقت لوله‌ای استفاده گردید و نتایج در سطح $P<0/05$ ارزیابی گردید. ارزیابی اتنوفارماکولوژیکی نشان داد که از فراورده‌های مختلف پیاز، سیر، زرشک، اسفند و سیاه‌دانه در طب سنتی استان‌های مورد بررسی به‌عنوان مقوی سیتم ایمنی، ضدالتهاب و ضدمیکروب قوی در پیشگیری و درمان عفونت‌های گوارشی، روده، عفونت سینوسی و ریه استفاده می‌شود. نتایج نشان داد بالاترین میزان ترکیبات فنلی (402.14±1.51mgGAE/g) و فلاونوییدی ($278.1\pm12.1\ mgQUEg^{-1}$) در دو گیاه زرشک و پیاز مربوط به عصاره گیاه زرشک بود و عصاره‌های کیوی، زرشک و پیاز در مقایسه با آنتی‌بیوتیک استاندارد آمپی‌سیلین، به‌ترتیب با قطر هاله‌های عدم رشد 25/5، 22 و 21 میلی‌متر، مقدار MIC معادل 62/5، 125 و 125 میکروگرم بر میلی‌لیتر و MBC معادل 250، 500 و 500 میکروگرم بر میلی‌لیتر از عملکرد بهینه علیه باکتری لیستریا مونوسیتوژنز برخوردار بودند. نتایج آنالیز آماری نیز مشخص کرد که عصاره گیاه کیوی نسبت به عصاره دو گیاه دیگر از عملکرد ضدلیستریایی بیشتری برخوردار است و پیشنهاد می‌گردد در این رابطه بررسی‌های تکمیلی در مدل‌های حیوانی و بالینی صورت پذیرد.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌باکتریال، اتنوفارماکولوژی، پیاز، زرشک، کیوی، لیستریا مونوسیتوژنز.

*نویسنده مسئول: anzabi@iaut.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

استفاده از فراورده‌های مختلف گیاهان به‌عنوان مهمترین منابع غذایی، دارویی و صنعتی قرن‌ها سابقه دارد. امروزه با توجه به اینکه بخش عظیمی از افزودنی‌های صنایع غذایی، شیمیایی و داروهای مصرفی شیمیایی هستند و متعاقب آن بشریت دائما با انواع بیماری‌های عفونی، نگهدارنده‌های التهابات گوارشی و... دست و پنجه نرم می‌کند، لذا مشخص است که شناسایی ترکیبات غذایی و دارویی طبیعی به‌عنوان آنتی‌اکسیدان و ضدعفونی کننده، مخصوصا در گیاهانی که به‌طور روزمره در قالب سبزی، غذا و میوه مصرف می‌شوند، بسیار قابل توجه سازمان جهانی بهداشت است، تا بتوان با کمترین هزینه در پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری‌های عفونی که هرساله موجب مرگ و میر میلیون‌ها بیمار می‌شود، گردد (مازندرانی و همکاران، ۲۰۱۳).

در تحقیقات مختلف بررسی‌های فیتوشیمیایی، آنتی‌اکسیدانی، ضدباکتریایی،ضدالتهابی، ضد توموری و همچنین ضد قارچی گیاهان مختلف خوراکی از جمله سیر، پیاز، زرشک، نعنا، کاکوتی، بومادران، علف چشمه، مورد و کبر گزارش شده است که در طب سنتی اغلب کشورها و از جمله ایران دارای سابقه دیرینه مصرف، به‌عنوان یک منبع غذایی آنتی‌اکسیدان حاوی متابولیت‌های ثانوی (فنلی و فلاونوییدی) در درمان انواع بیماری‌های قلبی، دیابت، اختلالات کبدی، زخم معده، برونشیت، رماتیسم، میگرن، عفونت‌های ادراری، بواسیر، سرماخوردگی، زخم‌های عفونی و عفونت‌های گوارشی مورد استفاده قرار گرفته و می‌گیرند (Mahboubi, 2012; Guinoiseau *et al.*, 2010; Mazandarani *et al.*, 2013; Mazandarani *et al.*, 2014; Mazandarani *et al.*, 1015).

لیستریا مونوسیتوژنز (*Listeria monocytogenesis*) یک باکتری گرم مثبت، میله‌ای، کاتالاز مثبت و اکسیداز منفی است که به‌طور معمول در طبیعت و دستگاه گوارش بسیاری از حیوانات (Farber and Peterkin, 1991)، در تعداد زیادی از غذاهای فرآوری شده و خام، محصولات لبنی، گوشتی، سبزیجات تازه مثل تربچه، کلم و همچنین در غذاهای دریایی، تخم‌مرغ و میوه‌ها دیده شده است (Gandhi, 2007) این باکتری از طریق مصرف غذای آلوده به انسان منتقل شده و ممکن است عفونت غذایی ناشی از آن منجر به عوارضی مانند منتژیت، سپتی سمی و سقط‌جنین در زنان آبستن شود (Hof *et al.*, 1998). بررسی‌ها نشان داده که در موارد اپیدمیک میزان مرگ و میر بیماری لیستریوزیس ممکن است تا حد20 درصد و در افراد مستعد حتی تا 75 درصد هم برسد (Farber and Peterkin, 1991; Aguado *et al*, 2004).

با توجه به فراوانی این باکتری در طبیعت و اینکه حتی دوز بسیار پایین آن نیز حتی در یخچال، توانایی ایجاد عفونت را دارد، باعث شده تا رویکرد جامعه جهانی بهداشت به سمت شناسایی و استخراج ترکیبات طبیعی آنتی‌اکسیدان و ضدباکتریال از گیاهان دارویی که از سابقه طولانی مصرف و دارو به‌عنوان ضدعفونی‌کننده و ضدباکتری دارند، مثل کیوی، زرشک و پیاز معطوف گردد که دارای سابقه دیرینه در درمان عفونت‌های گوارشی هستند (Cowan, 1999; Thuille *et al.*, 2003; Burt, 2004).

در این رابطه بررسی‌های مختلف اتنوفارماکولوژیکی و فیتوشیمیایی گیاهان مذکور نشان داده که عملکرد ضد باکتریایی و آنتی‌اکسیدانی آن‌ها به مواد موثره ترپنوییدی، فنولی و فلاونوییدی آن‌ها وابسته است (Griffiths *et al.*, 2002; Freile *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2011).

ترپنوییدها و پلی‌فنل‌های: کامفرول، کوئرستین و گالیک اسید موجود در عصاره گیاه پیاز (*cepa*

www.SID.ir

Archive of SID

Allium) از مهمترین ترکیبات شیمیایی آنتی‌اکسیدان، ضدعفونی‌کننده و ضدالتهاب هستند که به‌عنوان آنتی پاتوژنهای فعال و طبیعی، هم در محیط آزمایشگاه و نیز در موارد بالینی، اثر آنتی باکتریال از خود نشان داده‌اند (Griffiths *et al.*, 2002; Nelson and Regiland, 2007; Momeni and Zamanzad, 2010).

همچنین در طب سنتی اغلب کشورها از عصاره گیاهان زرشک (*Berberis vulgaris*) پیاز، سیر، سیاه‌دانه وکیوی (*Actinidia deliciosa*) به‌عنوان مقوی سیستم ایمنی، ضدالتهاب، ضدعفونی‌کننده قوی در پیشگیری و درمان بیماری‌های عفونی، قلبی عروقی و فشار خون استفاده می‌شود که در بررسی‌های اتنوفارماکولوژی و فارماکوگنوزی اثرات دارویی فوق را به وجود مواد موثره فنولی و آلکالوئیدی این گیاهان نسبت داده‌اند که مواد مذکور از طریق اینترکالاته شدن در اسید نوکلئیک و دیواره سلولی باکتری‌ها از عملکرد این دو قسمت مهم سلول باکتری‌ها جلوگیری می‌کنند (Baqaeian and Naqdi Badi, 2000; Motohashi *et al.*, 2001; Freile *et al.*, 2003; Mishra *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2011).

لذا با توجه به ارزش گیاهان دارویی زرشک، پیاز و کیوی در طب سنتی اغلب استان‌های ایران و نیز سایر کشورها به‌عنوان ترکیباتی ضدالتهابی، مقوی و ضدعفونی‌کننده قوی در پیشگیری و درمان بیماری‌های عفونی گوارشی و ریوی، این تحقیق با هدف اتنوفارماکولوژی و بررسی اثر ضد لیستریایی عصاره اتانولی گیاهان فوق علیه جدایه‌های باکتری لیستریا مونوسیتوژنز که در آزمایشگاه میکروب‌شناسی بخش بهداشت مواد غذائی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز از نمونه‌های مواد غذائی آلوده جداشده بود، انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی نمونه اندام‌های گیاهان مورد مطالعه: در این رابطه ابتدا به ترتیب، میوه زرشک (Barberry) از منطقه بیرجند در استان خراسان جنوبی، میوه کیوی (Kiwi) از منطقه آستارا در استان گیلان و ریشه گیاه پیاز (Onions) از منطقه ایلخچی استان آذربایجان شرقی جمع‌آوری و همزمان مهمترین استفاده‌های دارویی آن‌ها در طب سنتی ثبت گردیدند. سپس هر یک از اندام‌های مذکور به‌طور جداگانه و در شرایط مناسب دمای اتاق و در سایه‌خشک گردیده و در ادامه به‌منظور تهیه عصاره مربوطه با آسیاب آزمایشگاهی به‌طور کامل خردشده و به‌صورت پودر درآمدند (Burt, 2004).

آماده‌سازی عصاره الکلی گیاهان: برای تهیه عصاره گیاهان موردنظر از اتانول 70 درجه و روش پرکولاسیون استفاده شد. بدین‌منظور 50 گرم از پودر نمونه‌های گیاهی را در داخل دکانتور ریخته، سپس مرحله به مرحله به آن اتانول گرم 70 درجه افزودیم. افزودن اتانول را تا جایی ادامه دادیم که تمامی حجم گیاه داخل دکانتور خیس شده و مقداری از اتانول هم در روی سطح نمونه داخل دکانتور باشد چرا که در این حالت پودر گیاه بهتر می‌تواند حلال را در خود جذب نماید تا حداکثر مواد موثره در اتانول حل شود. لازم به ذکر است که برای عصاره‌گیری کامل، حدود 24 ساعت زمان بکار رفت و سپس عمل جداسازی حلال از عصاره نیز توسط دستگاه روتاری با کمک پمپ خلاء انجام شد (Mashhadian and Rakhshandeh, 2005).

سنجش میزان فنل کل (Purmorad *et al.*, 2006): برای ارزیابی فنل کل از معرف فولین سیکالتو استفاده می‌کنیم. یک گرم از پودر خشک شده نمونه‌های گیاهی را در 50 میلی‌لیتر متانول (80 درصد) حل می‌کنیم و از عصاره حاصل 0/1 میلی‌لیتر را در یک

www.SID.ir

Archive of SID

لوله آزمایش ریخته و به آن 2/5 میلی‌لیتر معرف فولین سیکالتو و سپس 2 میلی‌لیتر کربنات سدیم (7/5 درصد) اضافه می‌کنیم. همچنین از غلظت‌های مختلف اسید گالیک نیز 0/1 میلی‌متر را در یک لوله آزمایش ریخته و به آن نیز 2/5 میلی‌لیتر فولین سیکالتو و 2 میلی‌لیتر کربنات سدیم اضافه می‌کنیم. پس از نیم ساعت جذب هر یک از محلول‌ها را به‌وسیله دستگاه اسپکترو فتومتری (مدل UV; T90 +; UV/Vis Sepctrophotometer double beam: pG Instruments Ltd) در طول موج 760 نانومتر اندازه‌گیری شد. منحنی استاندارد بر حسب اسید گالیک با غلظت‌های مختلف ترسیم و مقدار فنل کل میلی‌گرم در هر گرم پودر خشک گیاه معادل اسید گالیک بیان شد. بلانک شامل همه موارد بجز عصاره نمونه گیاهی می‌باشد.

سنجش میزان فلاونوئید کل (Purmorad *et al.*, 2006): اندازه‌گیری فلاونوئید کل براساس رنگ سنجی کلراید آلومینیوم انجام شد. به 0/5 میلی‌لیتر از عصاره هیدروالکی (اتانول 70 درصد) را در یک لوله آزمایش ریخته، سپس به آن 1/5 میلی‌لیتر متانول 70 درصد اضافه کرده، پس از آن 0/1 میلی‌لیتر کلراید آلومینیوم یک درصد، 0/1 میلی‌لیتر استات پتاسیم و 2/8 میلی‌لیتر آب مقطر به آن افزوده و آنهارا به خوبی هم می‌زنیم. پس از گذشت نیم ساعت جذب آن‌ها را توسط دستگاه اسپکتروفنومتر با مشخصات که قبلاً ذکر شد در طول موج 415 نانومتر قرائت گردید و سپس منحنی استاندارد نیز بر اساس غلظت‌های (250،200،300،350، 400 و450) محلول کوئرسیتین رسم و میزان فلاونوئید معادل میلی گرم کوئرسیتین در هر گرم پودر خشک گیاه محاسبه و تعیین گردید.

ج) تهیه سوسپانسیون میکروبی: در این پژوهش از یکی از سویه‌های باکتری لیستریا مونوسیتوژنز که قبلاً درآزمایشگاه میکروب‌شناسی بخش بهداشت مواد غذائی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز از مواد غذائی آلوده به باکتری مذکور جداشده و بر مبنای روش‌های بیوشیمیائی و بیولوژیکی استاندارد میکروب‌شناسی تعیین هویت شده بود استفاده گردید. با توجه به اینکه برای تهیه سوسپانسیون میکروبی نیاز به کشت 24 ساعته از هر باکتری می‌باشد، بنابراین 24 ساعت قبل از انجام هر آزمایش، از کشت خالص باکتری مذکور به محیط کشت آگار مغذی تلقیح گردیده و به‌مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری می‌شد. سپس کلونی‌های سطح محیط کشت با محلول نرمال سالین شسته شده و سوسپانسیون میکروبی تهیه شده با محلول نرمال سالین رقیق می‌گردید تا کدورت آن معادل کدورت لوله استاندارد 0/5 مک فارلند تنظیم گردد (Quinn *et al.*, 1994 ; Naderinasab *et al.*, 1997; Babayi *et al.*, 2004).

د) بررسی اثرات ضد باکتریایی عصاره گیاهان:

روش انتشار دیسک در آگار: به‌منظور بررسی اثرات ضد باکتریایی عصاره گیاهان مورد آزمایش از روش مذکور استفاده شد. به این منظور ابتدا از هر عصاره گیاهی به‌طور جداگانه با استفاده از حلال دی متیل سولفوکسید و متانل (با نسبت 60 به 40) در لوله‌های استریل رقت 10 میکرو گرم بر میلی‌لیتر تهیه شده و سپس دیسک‌های بلانک استریل ساخت شرکت پادتن طب (تهران- ایران) را در لوله‌های حاوی رقت تهیه شده از هر عصاره قرار داده و بعد از مدت30 تا 50 دقیقه و پس از جذب کامل محتویات لوله مذکور توسط دیسک و اشباع شدن آن‌ها، دیسکهای تهیه شده را در دمای 37 درجه سانتی گراد قرار دادیم تا کاملاً خشک شده و جهت استفاده در آزمایش انتشار در آگار آماده شوند (Vanden and Vlietinck, 1991; Inouye *et al.*, 2001).

www.SID.ir

Archive of SID

سپس به ازای هر عصاره با استفاده از 100 میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری مذکورکه کدورت آن معادل کدورت لوله استاندارد 0/5 مک فارلند تنظیم گردیده بود، جداگانه بر سطح محیط مولرهینتون آگار کشت یکنواخت به‌صورت پخش کردن در سطح پلیت انجام شد. در مرحله بعد با استفاده از پنس استریل دیسک‌های آغشته شده به عصاره‌های موردنظر در این تحقیق، با فاصله معین از یکدیگر و از لبه پلیت در سطح محیط کشت مذکور قرار گرفته و با کمی فشار بر روی محیط ثابت گردید. آنگاه پلیت‌ها به‌مدت 24 ساعت در 37 درجه سانتی گراد انکوبه شده و نتایج اثر ضدباکتریایی با اندازه گیری قطر منطقه عدم رشد اطراف دیسک‌ها با استفاده از کولیس ثبت شد. برای حصول اطمینان، این آزمایش برای هر عصاره سه بار تکرار شد و در نهایت میانگین قطر منطقه عدم رشد در سه بارتکرار به‌عنوان قطر نهایی موردنظر (میزان قدرت ضد باکتریائی عصاره گیاهی با توجه به جدول استاندارد آزمایش آنتی بیوگرام) ثبت شد (Quinn *et al.*, 1994; Rezai and Rasooli, 2000).

جدول 1 . ارزیابی و مقایسه فیتوشیمیایی عصاره اتانولی دو گیاه زرشک و پیاز

Plants	Total Flavonoid ($mgQUEg^{-1}$)	Total Phenol ($mgGAEg^{-1}$)
Berberis vulgaris	278/1±12/1	402/14±1/51
Allium cepa	119/7±14/7	371/76±2/13

جدول 2. بررسی و مقایسه اثر ضد لیستریایی عصاره گیاه زرشک، پیاز و کیوی و مقایسه آن با آنتی‌بیوتیک

Plant extracts	Microorganism: *Listeria monosytogenesis*			
	inhibition zone (mm) ±SD	MIC (µg/mL)	MBC(µg/mL)	Ampicilin
Allium cepa	21/3±0/2	125/4	500	16/7
Actinidia deliciasa	25/6±0/2	62/6	250	14/7
Berberis vulgaris	22/5±0/1	125/5	500	16/5

جدول 3. نتایج آزمایشات انجام شده را نشان می‌دهد

نام گیاه	میانگین قطرهاله عدم رشد در آزمایش انتشار دیسک در آگار	MIC	MBC
کیوی	*25/5* میلی‌متر	62/25µg/ml	250 µg/ml
زرشک	*22* میلی‌متر	125 µg/ml	500 µg/ml
پیاز	*21* میلی‌متر	125 µg/ml	500 µg/ml

لازم به ذکر است که در آزمایشات مذکور از دیسک آنتی‌بیوتیک استاندارد آمپی‌سیلین (10 میکروگرم بر دیسک) به‌عنوان کنترل مثبت و همچنین از دیسک بلانک آغشته به حلال دی متیل سولفوکسید و متانل با نسبت 60 به 40 (10 میکرولیتر بر دیسک) به‌عنوان کنترل منفی که همگی از شرکت پادتن طب (تهران- ایران) تهیه شده بودند، استفاده گردید.

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی از رشد (Minimal Inhibitory Concentration=MIC) **و حداقل غلظت باکتری کشی** (Minimal Bactericidal Concentration=MBC): با استفاده از روش رقت

www.SID.ir

Archive of SID

لوله‌ای حداقل غلظت مهارکنندگی از رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) هر عصاره به‌طور جدا گانه تعیین گردید که بدین‌منظور، برای هر عصاره از یک سری 10 تایی از لوله‌های آزمایش استفاده شد. 8 لوله برای آزمایش بر روی رقت‌های مختلف هر عصاره و یک لوله به‌عنوان کنترل عصاره و یک لوله هم به‌عنوان کنترل سوسپانسیون باکتری بکار رفت. بدین‌منظور هر عصاره با رقت‌های مختلف از لوله شماره یک حاوی رقت 1 mg/ml تا لوله شماره 8 با رقت 7/8 µg/ml در سری‌های جداگانه در محیط کشت آبگوشت BHI به همراه 1 ml از سوسپانسیون میکروبی که دارای $1/5\times10^8$ CFU/ml بود مورد آزمایش قرار گرفت . همزمان یک لوله هم حاوی 9 ml از محیط کشت مذکور به علاوه 1ml از هر عصاره به‌عنوان کنترل عصاره و نیز یک لوله حاوی 9 ml از محیط کشت به علاوه 1 ml از سوسپانسیون باکتری به‌عنوان کنترل باکتری تهیه و استفاده شد. همه لوله‌های آزمایش برای مدت 24 ساعت در 37 درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از طی زمان انکوباسیون لوله‌ها از نظر کدورت ناشی از رشد باکتری تلقیح شده بررسی گردید. این روش برای هر عصاره 3 بار تکرار شده ودر نهایت میانگین رقتی که حاوی کمترین غلظت عصاره بوده و از افزایش کدورت ناشی از رشد باکتری ممانعت کرده بود به‌عنوان MIC آن عصاره در نظر گرفته شد. همچنین از لوله‌هایی که در آن‌ها عدم رشد باکتری مشاهده گردید، نمونه برداری کرده و جهت تعیین حداقل غلظت کشندگی عصاره‌ها، به روش پورپلیت (Pure Plate Method) کشت داده شد. بدین منظور 1 ml از محتویات هر یک از لوله‌های مذکور را با 20 ml از مخلوط BHI آگار با درجه حرارت حدود 45 درجه سانتی گراد در ظروف پتری دیش مخلوط کرده و پس از بسته شدن آگار و انکوبه کردن به‌مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتیگراد، پلیت‌های کشت داده شده از نظر وجود رشد باکتری کنترل شد. رقتی که حاوی کمترین غلظت عصاره بوده و در پلیت مربوطه آنهم هیچ کلنی از باکتری موردنظر مشاهده نگردید، به‌عنوان MBC آن عصاره در نظر گرفته شد (Sindambiwe *et al.*, 1999).

هـ) آنالیز آماری: برای مقایسه میانگین قطرهاله عدم رشد عصاره‌ها با قطرهاله عدم رشد آنتی‌بیوتیک استاندارد از آزمون واریانس (ANOVA) یک‌طرفه و تست دانکن استفاده نمودیم. همچنین داده‌ها در رنج $P<0/05$ معنی‌دار تلقی گردید.

نتایج

بررسی اتنوفارماکولوژیکی دو گیاه پیاز و زرشک در طب سنتی استان‌های مورد بررسی نشان داد که از عصاره زرشک، آب انار و پودر سیاه‌دانه به‌عنوان مقوی، مسکن، ضدالتهاب، ضد انگل و ضدعفونی‌کننده قوی در درمان فشار خون، عفونت سینوزیت و عفونت ریه استفاده میشود و از پیاز نیز به‌عنوان ضدعفونی‌کننده، مقوی سیستم ایمنی و ضدپاتوژن در پیشگیری و درمان سرماخوردگی، برونشیت و از دوده آن به همراه اسپند به‌عنوان ضدعفونی‌کننده هوا و دفع باکتری استفاده میشود. همچنین این بررسی در مورد گیاه کیوی نشان میدهد که از میوه گیاه مذکور و گیاهانی نظیر توت فرنگی، عنبه و انواع مرکبات که سرشار از ویتامین C و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی هستند در طب سنتی ایران و اغلب کشورها جهت مبارزه با بیماری‌های مزمن تنفسی، قلبی- عروقی، فشار خون بالا و برخی از سرطان‌ها استفاده می‌شود.

ارزیابی اتنوفارماکولوژیکی نشان داد که از فراورده‌های مختلف پیاز، سیر، زرشک، اسفند و سیاه‌دانه در طب سنتی استان‌های مورد بررسی

www.SID.ir

Archive of SID

به‌عنوان مقوی سیتم ایمنی، ضدالتهاب و ضدمیکروب قوی در پیشگیری و درمان عفونت‌های گوارشی، روده، عفونت سینوسی و ریه استفاده می‌شود. نتایج بدست آمده در جداول 1 و 2 نشان داد که بالاترین میزان ترکیبات فنلی (402.14±1.51 mgGAE/ g) و فلاونوییدی (278.1±12.1 $mgQUEg^{-1}$) در دو گیاه مربوط به عصاره گیاه زرشک بود و عصاره‌های کیوی، زرشک و پیاز در مقایسه با آنتی بیوتیک استاندارد آمپی سیلین، به ترتیب با قطرهاله‌های عدم رشد 25/5، 22 و 21 میلی‌متر، مقدار MIC معادل 62/5، 125 و 125 میکروگرم بر میلی‌لیتر و MBC معادل 250، 500 و 500 میکروگرم بر میلی‌لیتر از عملکرد بهینه علیه باکتری لیستریا مونوسیتوژنز رخوردار بودند و نتایج در سطح $P<0/05$ معنی‌دار می‌باشد. همچنین از نظر خاصیت ضد لیستریائی بر مبنای آزمایش انتشار دیسک در آگار تفاوت معنی‌داری بین عصاره پیاز و آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین و نیز بین عصاره پیاز و عصاره زرشک مشاهده نمی‌گردد. از طرف دیگر در این پژوهش بر مبنای آزمایش انتشار در آگار کمترین تاثیر ضد لیستریائی مربوط به آنتی بیوتیک آمپی‌سیلین ثبت گردید (قطر منطقه عدم رشد 9 میلی‌متر) که از این نظر با عصاره‌های دیگر تفاوت معنی‌داری را نشان می‌دهد.

بحث

نتایج نتایج آنالیز آماری این تحقیق مشخص کرد که در این پژوهش تفاوت معنی‌داری بین اثر ضدلیستریائی عصاره پیاز و زرشک و آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین مشاهده نمی گردد. اما لازم به ذکر است که بیشترین میزان تاثیر بر باکتری لیستریا مونوسیتوژنز مربوط به عصاره گیاه کیوی می‌باشد که تفاوت معنی‌داری را با تمامی عصاره‌ها و آنتی بیوتیک استاندارد مورد مطالعه از خود نشان داد. همچنین در این پژوهش کمترین تاثیر ضد لیستریائی مربوط به آنتی بیوتیک آمپی‌سیلین ثبت گردید که از این نظر با همه عصاره‌های مورد آزمایش تفاوت معنی داری را نشان می‌دهد.

در سال‌های اخیر اثرات ضد لیستریایی اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی ازجمله مریم گلی، اکالیپتوس، میخک هندی، نعناع، شیشه شور، پیاز، زرشک و زیره سبز توسط برخی از محققین بررسی شده است (Singh *et al.*, 2003; Jalali *et al.*, 2006; Moshtaghi and Bonyadian, 2008; Bayoub *et al.*, 2009; Razavi Rohani *et al.*, Seyydnejad *et al.*, 2010 ; Fazlara *et al.*, 2012; 2011).

در تحقیقات مختلف نیز عملکرد ضد باکتریایی عصاره گیاهان زرشک،، باریجه، عطر پایزی، کبر، پیاز و کیوی را علیه باکتری‌های اشرشیا کلی، باسیلوس سوبتیلیس، سالمونلا تیفی و نیز استافیلوکوکوس آرئوس، سودوموناس آئروژینوزا و کاندیدا آلبیکنس بررسی کرده و عمدتاً این خواص را به ترپنوییدها، فلاونوییدها، مونوترپن‌ها، آلکالوئیدها وبرخی ترکیبات گوگرددار فرار با بوی تند در گیاهان فوق نسبت داده‌اند (Chitsaz, 2006; Nelson and Regiland, 2007; Chyun *et al.*, 2007; Momeni and Zamanzad, 2010; Mazandarani *et al.*, 2014; Mazandarani *et al.*, 2015; Lu *et al.*, 2011).

در تحقیقی مشابه با پژوهش حاضر مشخص گردیده که عصاره خام گیاه پیاز علیه باکتری سودوموناس آئروژینوزا موثر و بر کاندیدا آلبیکانس با اثر ضدمیکروبی ضعیف ولی در مورد استافیلوکوکوس آرئوس و اشرشیا کلی بی تاثیر بوده است در حالیکه عصاره آبی پیاز اثر ضد میکروبی نداشته است (Dankert *et al.*, 1979; Nelson and Regiland, 2007; Momeni and Zamanzad, 2010).

لذا به نظر می‌رسد که نوع گیاه و اندام آن، تنوع رویشگاه، حلال، روش عصاره گیری و استخراج مواد موثره، علاوه بر اینکه در کمیت و کیفیت مواد موثره

www.SID.ir

Archive of SID

دارویی گیاهان موثر است، می‌تواند در عملکردهای متنوع دارویی آن‌ها ازجمله اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی، ضدقارچی و ضدالتهابی آن‌ها نیز دخیل باشد (Nostro *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2003; Jalali *et al.*, 2006; Moreno *et al.*, 2006; Mashak *et al.*, 2008; Mazandarani *et al.*, 2013-2015).

به‌طوری‌که در این خصوص در برخی مطالعات هم که اثرات ضد میکروبی گیاه زرشک (با داشتن ترکیبات فراوان فنلی و آلکالوئیدی) گزارش شده است، مشاهده می‌شود که نتایج مطالعه حاضر که خاصیت ضد لیستریائی زرشک را به‌طور نسبی نشان داده تا حدودی با نتایج ارائه شده در برخی از مطالعات قبلی در این مورد مشابه و در برخی موارد اختلاف دارد. به‌طوری‌که مثلاً در پژوهش چیتساز در سال 2006 علی‌رغم مشاهده اثرات ضد میکروبی ازعصاره الکلی گیاه زرشک، از عصاره آبی و جوشانده این گیاه هیچ نوع فعالیت ضدمیکروبی گزارش نشده است (Chitsaz, 2006).

همچنین در تحقیقی مشابه همسو با یافته‌های این تحقیق مشخص شده که عصاره میوه کیوی به‌دلیل کثرت ترکیبات مونوترپنی و فلاونوییدی دارای اثر ضدباکتریائی محدود علیه باکتری‌های گرم مثبت استافیلوکوکوس آرئوس و باسیلوس سوبتیلیس می‌باشد (Lu *et al.*, 2011). البته در پژوهش دیگری که توسط میشرا و همکاران در سال 2010 انجام گرفت، مشخص گردید که عصاره متانولی کیوی در روش انتشار در آگار علیه باکتری گرم منفی اشرشیا کلی بیشترین قدرت ضد باکتریائی با قطرهاله عدم رشد 27 میلی‌متر و MIC=0.312mg/ml را نشان داده است (Mishra *et al.*, 2010).

مشابه با اثر ضد لیستریائی عصاره کیوی، زرشک و پیاز در پژوهش حاضر، درتحقیق مشابهی که سینگ و همکاران در سال 2003 در مورد اثرات ضد لیستریائی عصاره‌های آویشن، میخک، فلفل، رزماری و مریم گلی در محیط آزمایشگاه انجام دادند، مشخص شد که آویشن بیشترین تاثیر را بر لیستریا داشته و البته میخک و فلفل هم فعالیت ضد لیستریائی نسبی از خود نشان داده‌اند، اما رزماری و مریم گلی تاثیر چندانی نداشتند (Singh *et al.*, 2003).

نتیجه‌گیری نهایی

ارزیابی نهایی یافته‌های این پژوهش و مقایسه آن با بررسی‌های دیگران نشان داد که اثر ضد لیستریائی هر سه عصاره، مخصوصا کیوی و زرشک در مقایسه با آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین بسیار بیشتر و قابل بحث است و این موضوع همسو با یافته‌های اتنوفارماکولوژی گیاهان فوق در منطقه و نتایج پژوهش موهان نیر و همکاران (2005) در مورد اثر ضدلیستریایی گیاه سیاه‌دانه در محیط کشت می‌باشد، که مشخص گردیده عصاره‌های فوق عملکرد بهینه ای علیه باکتری لیستریا داشتند، به‌طوری‌که اثر ضدلیستریایی سیاه‌دانه بسیار بیشتر از آنتی‌بیوتیک جنتامایسین بوده است (Mohan Nair *et al.*, 2005) و نیز این موضوع در تایید یافته‌های آزمایشگاهی و اتنوفارماکولوژی این تحقیق که از عصاره پیاز، زرشک و سیاه‌دانه به‌عنوان یک ضدعفونی‌کننده قوی در درمان عفونت‌های ناشی از سینوزیت، گوارش و ریه‌ها استفاده می‌شود، قابل بحث است. لذا پیشنهاد می‌گردد بررسی‌های دقیق تکمیلی فیتوشیمیایی به همراه بررسی‌های ضدالتهابی و ضدمیکروبی در مدل‌های حیوانی و بالینی نیز در مورد عصاره گیاهان مورد آزمایش فوق انجام پذیرد.

سپاسگزاری

این مقاله مربوط به قسمتی از نتایج طرح پژوهشی مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز به مورخ 1390/11/29 می‌باشد که بدین‌وسیله مراتب تقدیر و

www.SID.ir

Archive of SID

تشکر خود را از کلیه مسئولین و کارکنان محترم این دانشگاه که در به نتیجه رسیدن پژوهش حاضر مارا یاری فرمودند اعلام می‌داریم.

منابع

1.Aguado, V., Vitas, A.I., and Garcia-Jalon, I. 2004. Characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from a vegetable processing plant by RAPD and REA. Int. J. Food Microbiol. 90(3):341-347.

2.Babayi, L., Kolo, J.I., and Ijah, U.J. 2004. The antimicrobial activities of methanolic extracts of *Eucalyptus camaldulensis* and *Terminalia catappa* against some pathogenic microorganisms. Biochemistry. 16(2):106-110.

3.Baqaeian, K., and Naqdi Badi, H.A. 2000. Essences in Plants. Tehran,Iran; Nashr Andooz. pp: 248 (In Persian)

4.Bayoub, K., Baibai, T., Mountassif, D., Retmane, A., and Soukri, A. 2009. Antibacterial activities of the crude ethanol extracts of medicinal plants against *Listeria monocytogenes* and some other pathogenic strins. Malabaricus Bloch et Schneider. Microb. Pathog.19: 39-48.

5.Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential application in food-a review. Int. J. Food Microbiol., 94(3):223-53.

6.Chitsaz, M. 2006. In vitro Evaluation of Antibacterial Effect of Stachys schtschegleevii. Med.Daneshvar.67:12-19. (In Persian)

7.Chyun, J.C., and Huang, L. 2007. Ginger and its bioactive component inhibit entrotoxigenic *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin-induced diarrhea in mice. J. Agric. Food Chem., 55(21): 8390-7.

8.Cowan, M.M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clin. Microbiol. Rev., 12(4): 564-82.

9.Dankert, J., Tromp, T.F., Devries, H., and Klasen, H.J. 1979. Antimicrobial Activity of Crude Juices of *Allium ascalonicum, Allium cepa* and *Allium sativum*. Journal of Zentralblatt fur Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. 245(1-2):229-239.

10.Farber, J.M., and Peterkin, P.L. 1991. *Listeria monocytogenes* ,a food-borne pathogen. Microbiol Rev., 3(55):476-511.

11.Fazlara, A., Sadeghi, E., and Rostami Soleimani, P. 2012. Study on the antibacterial effects of *Cuminum cyminum* essential oil on *Listeria mono cytogenes* in Iranian white cheese. JFST. 35(9): 36-42.

12.Freile, M.L., Giannini, F., Pucci, G., Sturniolo, A., Rodero, L., Pucci, O., Balzareti, V., and Enriz, R.D. 2003. Antimicrobial activity of aqueous extracts and of berberine isolated from *Berberis heterophylla*. Fitoterapia Journal, 74(7-8):702-5.

13.Gandhi, M., and Chikindas, M.L. 2007. *Listeria*: A food borne pathogen that know how to survive. Int. J. Food Microbiol. 113:1-15.

14.Griffiths, G., Trueman, L., Crowther, T., Thomas, B. and Smith, B. 2002. Onions – A global benefit to health. Phytotherapy Research, 16: 603-615.

15.Guinoiseau *et al*. 2010. Cellular effects induced by *Inula graveolens* and *Santolina corsica* essential oils on Staphylococcus aureus. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect Dis. 29(7):873-9.

16.Hof, H., Nichterlein, T., Lampidis, R., and Wecke, J. 1998. *Listeria* dispose of many facettes. Biotest Bullten., 6: 3-21.

17.Inouye, Sh., Takizawa, T., and Yamaguchi, H. 2001. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. J. Antimicrob. Chemother. 47: 565-573.

18.Jalali, M., Abedi, D., Ghasemi dehkordi, N. and Chaharmahali, A. 2006. Evaluation of antibacterial activity of ethanol extracts of some medicinal plants against *Listeria monocytogenes*. J. Shahrekord. Univ. Med. Sci., 8(3): 25-33.

19. Lu, Y., and Chen, H. 2011. Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of a Wild Kiwi. Advanced Materials Research, 322: 160-163.

20.Mashak, Z., Moradi, B., Akhonzdade, A., Abasifar, A., and Gandomi, H. 2008. Study the behavior of *Listeria monocytogenes* during the production process of Iranian white cheese under the influence of *Zataria multiflora* Boiss essential oil. Journal of Medicinal Plants. 29:114-122.

21.Mashhadian, N.V., and Rakhshandeh, H. 2005. Antibacterial and antifungal effects of *Nigella sativa* extracts against *S. aureus*, *P. aeroginosa* and *C. albicans*. Pakistan J. Medical Sci., 21(1):47–52.

22.Mahboubi, M., Bokaee, S., Dehdashti, H., and Feizabadi, M.M. 2012. Antimicrobial activity of *Mentha piperitae*, *Zhumeria majdae*, *Ziziphora tenuior* oils on ESBLs producing isolates of *Klebsiella pneumoniae*, Biharean Biologist. 6(1):5–9.

23.Mazandarani, M., Momeji, A., and Zarghami Moghaddam, P. 2013. Evaluation of phytochemical and antioxidant activities from different parts of *Nasturtium officinale* R. In Mazandaran province. Iranian Journal of Plant Physiology, 3(2):659-664.

www.SID.ir

Archive of SID

24.Mazandarani, M., Nargess Osia, N., and Ghafourian, M. 2015. Activity and Ethno pharmacological Survey of *Achillea biebersteinii* Afan. In the Treatment of Dysmenorrhoea in Traditional Medicine of Golestan Province, Iran. International Journal of Women's Health and Reproduction Sciences, 3(2):107–110.

25.Mazandarani M., Majidi Z., Zarghami-Moghaddam P., Abrodi M., Hemati, H., and Fathiazad, F. 2012. Essential Oil Composition, Total Phenol, Flavonoid, Anthocyanin and Antioxidant Activities in Different Parts of *Artemisia annua* L. in Two Localities (North of Iran). Journal of Medicinal Plants and By-products, 1: 13-21.

26.Mazandarani M., Mirdeilami S.Z., and Pessarakli M. 2013. Essential oil composition and antibacterial activity of *Achillea millefolium* L. from different regions in North east of Iran. J. Med. Plants Res., 7:1063-9.

27.Mishra, N., Dubey, A., Singh, N., and Gupta, P. 2010. Antimicrobial, Antionxidant and Chemopreventive potential of Vitamin C rich Fruits. International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology, 1:3(915-920).

28.Mohan Nair, M.K., Vasudevan, P., and Venkitanarayanan, K. 2005. Antibacterial effect of black seed oil on *Listeria monocytogenes*. Journal of Food Control. 16(5):395-398.

29.Momeni, L. and Zamanzad, B. 2010. The antibacterial properties of Allium cepa (onion) and Zingiber officinale (ginger) extracts on *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Candida albicans* isolated from vaginal specimens. Journal of Shahrekord University of Medical Sciences. 11(4): 81-87.

30.Moshtaghi, H., and Bonyadian, M. 2008. Anti Listerial effects of mint extract oil in a food model. Iranian Journal of Medical and Aromatic Plants. 24(3):326-332.

31.Moreno, S., Scheyer, T., Romano, C.S., and Vojnov, A.A. 2006. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. Free Radic Res. 40(2): 223-31.

32.Motohashi, N., Shirataki, Y., Kawase, M., Tani, S., Sakagami, H., Satoh, K., Kurihara, T., Nakashima, H., Wolfard, K., Miskolci, C., Molnár, J. 2001. Biological activity of kiwifruit peel extracts. Phytotherapy Research, 15(4):337-343.

33.Naderinasab, M., Rashed, T., Nazem, M. 1997. Laboratory bacteriology. Emam Reza Press. Mashhad. Iran. pp:24-29. (In Persian).

34.Nelson, C. and Regiland, A. 2007. Antimicrobial properties of extracts of *Allium cepa* and *Zingiber officinale* (ginger) on *Escherchia coli, Salmonella typhi* and *Bacillus subtilis*. Int. J. of Trop. Med., 3(2):1540.

35.Nostro, A., Germano, M.P., Angelo, V.A., Marino, A., Connatelli, M.A. 2000. Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. Lett. Appl. Microbiol., 30(5): 389-394.

36.Pourmorad, F., Hosseini Mehr, S.J. and Shahabimajd, N. ,2006. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. African Journal of Biotechnology, 5(11):1142-1145.

37.Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B.K. and Carter, G.R. 1994. Clinical Veterinary Microbiology. Mosby-year Book Europe Limited. pp: 95-102.

38.Razavi Rohani, S.M., Moradi, M., Mehdizadeh, T. 2011. Antibacterial combined effects of nisin and onion essential oil under different concentration of NaCl and pH against *Listeria monocytogenes* in vitro. J. Food hygiene. 1(3):25-34. (In Persian).

39.Rezai, M., Rasooli, I. 2000. Chemical components and biological activity of essential oils of *Thymus xprolock* and *Mentha longifolia*. Daneshvar., 8(31):1-8.

40.Seyydnejad, S.M., Niknejak, M., Darabpoor, I. and Motamedi, H. 2010. Antibacterial Activity of Hydroalcoholic Extract of *Callistemon citrinus* and *Albizia lebbeck*. American Journal of Applied Sciences, 7(1):13-16.

41.Sindambiwe, J.B., Calomme, M., Cos, P., Totte, J., Pieters, L., Vlietinck, A. 1999. Screening of seven selected Rwandan medicinal plants for antimicrobial and antiviral activates. Journal of Ethnopharmacology. 65(1): 71-77.

42.Singh, A., Singh, R.K., Bhunia, A.K. and Singh, N. 2003. Efficacy of plant essential oils as antimicrobial agents against *Listeria monocytogenes* in hotdogs. Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie.; 36(8):787-794.

43.Thuille, N., Fille, M., and Nagl, M. 2003. Bactericidal activity of herbal extracts. Int. J. Hyg. Environ. Health. 206(3): 217-21.

44.Vanden, D.A., and Vlietnick, A.J. 1991. Methods in plant biochemistry: screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. London: Academic Press; pp: 47-69.

www.SID.ir