مجله علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی ، (JSIAU)
شماره ۶۲/۱ زمستان ۱۳۸۵

اثرات بازدارنده‌ی عصاره متانولی گیاه تاتوره وکالوس‌های حاصل از جداکشت‌های برگی علیه باکتری‌ها و قارچ‌ها

علیرضا ایرانبخش*
گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی- واحد گرمسار، گرمسار، ایران
مصطفی عبادی
گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی- واحد دامغان، دامغان، ایران

چکیده

اثر عصاره‌ی متانولی اندام‌های ریشه، ساقه و برگ در مراحل رویشی و زایشی، گل، بذر و همچنین کالوس‌های حاصل از جدا کشت‌های برگی گیاه تاتوره (*Datura stramonium L.*) از خانواده‌ی سیب‌زمینی (*Solanaceae*) بر روی رشد چهار گونه باکتری *Escherichia coli*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Bacillus subtilis*، *Staphylococcus epidermidis* و چهار سویه‌ی قارچ *Rhizoctonia solani*، *Certocystis ulmi*، *Fusarium semitectum* و *Fusarium colmorum* مورد بررسی قرار گرفت. در این پژوهش از روش‌های کشت مایع (جهت تعیین *M.I.C*)، تمام کشت (پورپلیت)، چاهک، دیسک‌گذاری و قطره مستقیم استفاده شد. نتایج نشان داد عصاره‌ی متانولی کالوس‌های سبز و اندام‌زای حاصل از جداکشت‌های برگی علیه باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* (ATCC KX1-A1 15561) و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* (ATCC 0-1-B29997) اثر بازدارنده‌ی معنی‌داری داشته و هاله‌ی عدم رشد به ترتیب با قطر ۲۲mm و ۲۳mm مشاهده شد. عصاره‌ی متانولی کالوس شفاف علیه *اشریشیا کلی* (ATCC W1485 25645) موثر و رشد (هاله‌ی عدم رشد با قطر ۱۷mm) آن را مهار می‌کند. عصاره‌ی متانولی کالوس اندام‌زا بر روی قارچ *سراتوسیستیس اُلمی* (ATCC 32731) کشنده بوده است. عصاره‌ی متانولی کالوس‌های سبز و اندام‌زا بر روی قارچ *فوزاریوم سمی‌تکتوم* (ATCC 11599) اثر بازدارنده (هاله‌ی عدم رشد به ترتیب با قطر ۱۷mm و ۱۷mm) دارد. عصاره‌ی متانولی کالوس سبز بر روی قارچ *فوزاریوم کالموروم* (ATCC 15620) (هاله‌ی عدم رشد با قطر ۸mm) موثر بوده است. عصاره‌ی متانولی ساقه و برگ در مرحله‌ی رویشی بر روی باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* (هاله‌ی عدم رشد برای هر دو، با قطر ۲۱mm) اثر بازدارنده داشته است. هاله‌ی عدم رشد بر روی باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* در نتیجه‌ی استفاده از عصاره‌ی متانولی برگ و ساقه در مرحله‌ی رویشی (به ترتیب هر دو ۲۱mm)، برگ، ساقه و ریشه در مراحل زایشی (هر سه ۲۰mm) و همچنین بذر بالغ (۱۷mm) بوده است. عصاره‌ی متانولی بذر بالغ بر روی باکتری *پسودو موناس آئروژینوزا* (ATCC PA103-

* عهده دار مکاتبات

Archive of SID
www.SID.ir

29260) اثربخش (هاله‌ی عدم رشد با قطر ۲۱mm) بوده است. عصاره‌ی متانولی ریشه در مرحله‌ی رویشی و همچنین گل بر روی قارچ *ریزوکتونیا آلمی* هاله عدم رشد (هاله‌ی عدم رشد به ترتیب با قطر ۱۶mm و ۲۰mm) نشان داد. با توجه به داده‌های به دست آمده مشخص شد ماده‌ی موثره‌ی کشنده و یا بازدارنده‌ی رشد میکروب‌ها، آلکالوئید آتروپین می‌باشد.

***واژه های کلیدی*: عصاره، داتورا استرامونیوم، کالوس، قارچ، باکتری، آتروپین.**

مقدمه:

گیاهان عالی یکی از مهمترین منابع طبیعی محسوب می‌شوند. آنها علاوه بر تامین نیاز غذایی، فیبر، چوب، بسیاری از ترکیبات شیمیایی مثل روغن‌ها، فلاونوئیدها، رنگ‌ها و ترکیبات دارویی از جمله الکالوئیدها را فراهم می‌کنند[۱].

کشت سلول‌ها و اندام‌های گیاهی امکان تغییر در تولید ترکیبات شیمیایی را فراهم می‌آورد زیرا اندام‌ها و سلول‌های گیاهی دارای ظرفیت لازم برای تولید انواع متابولیت‌های ثانویه هستند[۲]. تمایززدایی ریشه‌های تراریخت شده *داتورا استرامونیوم* در کشت بافت موجب کاهش ظرفیت سنتز الکالوئیدهای تروپانی می‌شود. این موضوع نشان‌دهنده‌ی یک تغییر شاخص در شرایط فیزیولوژیک است. متابولیسم نیتروژن در کشت ریشه‌های تراریخت تاتوره (سیستم تولیدکننده‌ی الکالوئید) و کشت سوسپانسیون تمایززدایی شده حاصل از این ریشه‌ها توسط fliniaux (۲۰۰۴) مطالعه شد. در هر دو نوع کشت طیف‌های مشابه اسیدهای آمینه مورد بررسی قرار گرفت. تفاوت شاخص در تراکم ترکیبات نیتروژن‌دار گزارش گردید. در کشت ریشه‌های تمایزیافته پیک‌های (Peaks) مشاهده شده مربوط به متابولیت‌های ثانویه از جمله تروپین است در حالی‌که در کشت‌های تمایززدایی شده این پیک مشاهده نشد[۳].

گیاهان خانواده سیب زمینی (*Solanaceae*) برخی از الکالوئیدهای فعال زیستی را تولید می‌کنند که شامل نیکوتین و الکالوئیدهای تروپانی می‌باشد[۴]. گیاه تاتوره (*Datura stramniuml*) از خانواده سیب‌زمینی (*Solanaceae*) به دلیل داشتن منابع غنی الکالوئیدهای تروپانی مورد توجه بسیاری از محققین بوده است[۵،۶]. الکالوئیدهای گیاهی یکی از بزرگترین فرآورده‌های گیاهی هستند که بخش عمده ترکیبات داروئی را فراهم می‌کند[۷]. الکالوئیدهای تروپانی شامل آتروپین، هیوسیامین و اسکوپولامین به‌طور عمده در بنگ‌دانه، تاتوره[۸،۹] و شابیزک[۵] وجود دارد.

تاتوره, گیاهی علفی، یک‌ساله, با ارتفاع ۳۰ تا ۸۰ سانتی متر و گاه متجاوز از یک متر است[۱۰]. الکالوئیدهای تروپانی نقش اساسی در صنایع دارویی و دفاعی دارند[۹]. اسکوپولامین دارای فرمول شیمیایی $C_{17}H_{21}NO_4$ است و به‌صورت بلور بی‌رنگ مبتلور می‌شود. هیوسیامین الکالوئیدی است به فرمول $C_{17}H_{23}NO_3$ که ایزومر نوری چپ‌گرد می‌باشد و به سهولت به‌صورت راسمیک درآمده و به آتروپین تبدیل میشود. آتروپین استر اسید تروپیک و تروپنول می‌باشد که علاوه بر تاتوره در گیاهان شابیزک و بنگ‌دانه نیز یافت می‌شود. الکالوئیدهای تروپانی بر روی چشم، سیستم عصبی، قلب، جریان خون و ترشحات بدن دارای اثرات عمیقی می‌باشند. این الکالوئیدها آنتی-کولینرژیک و آنتی‌اسپاسمودیک بوده و در علوم پزشکی به‌صورت گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرند[۵]. مصرف

Archive of SID

www.SID.ir

تاتوره در مقادیر کم، ایجاد خشکی گلو، دشواری بلع، گشادی مردمک چشم، تندی گردش خون، افـزایش درجـه حرارت و کاهش حس درد می‌نماید، مصرف بیش از حد آن موجب مرگ در حالت بهت و خیرگـی و بـه صـورت خفقان ظاهر می‌شود[۱۰] .

مواد و روش‌ها

گیاه طبیعی تاتوره از کیلومتر ۱۲ جاده رشت – فومن (شمال ایران) جمع‌آوری و در گیاه‌کـده فـارابی (تهـران- ایران) شناسایی شد. بذر گیاه نیز از بانک بذر موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع ایران تهیه شد. میکروارگانیسم‌هـای مورد پژوهش، باکتری‌های

Escherichia coli (ATCC W1485 25645)،

Pseudomonas aeruginosa (ATCC PA103-29260)،

Bacillus subtilis (ATCC KX1-A1 15561)،

Staphylococus epidermidis (ATCC 0-1-B29997)

و چهار سویه‌ی قارچ شامل

Rhizoctonia solani (ATCC 16118)،

Certocystis ulmi (ATCC 32731)،

Fusarium semitectum (ATCC 11599)

و *Fusarium colmorum* (ATCC 15620) بودند.

۱- روش تهیه‌ی عصاره متانولی

اندام‌های مختلف گیاه و همچنین کالوس‌های بدست آمده از جدا کشت‌های برگی به مدت دو روز در انکوباتور با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد خشک شدند. سپس هر یک از آنها به طور جداگانه و با استفاده از دستگاه آسیاب برقی (بلندر) به صورت پـــودر درآمدند. سه گرم از پودر قسمت‌های مختلف گیاه به صورت جداگانه در ظروف محتوی ۱۰۰ میلی لیتر متانول وارد شد، ظروف محتوی مواد با پارافیلم و فویل پوشانده شدند تا از تبخیر حلال جلوگیری شود و سپس بـــه مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری شدند. محلول‌ها پس از صاف شدن با صافی میلی‌پور ۰/۲۲ میکرومتر، سترون گردیدند و از آنها برای بررسی آثار ضدمیکروبی استفاده شد[۶،۱۲،۱۱].

محیط کشت میکروبی شامل محیط کشت نوترین براث و محیط مولرهینتون آگـار بـرای کـشت بـاکتری هـا و محیط مالت براث و محیط سابورودکستروز آگار برای کشت قارچ‌ها بوده است[۱۲].

۲- روش بررسی اثر ضدباکتریایی

در ابتدا از باکتری‌ها سوسپانسیون تهیه شد. درون لوله‌های آزمایش به تعداد باکتری‌ها، محیط مولرهینتون براث ریخته و سترون شدند. سپس با یک سواپ سترون از پتـری دیـش دارای بـاکتری‌هـای مـورد پـژوهش، مقـداری از

Archive of SID

www.SID.ir

باکتری‌ها به لوله‌ی آزمایش دارای محیط مولر هینتون براث منتقل گردید تا سوسپانسیون تهیه شود. لوله‌های آزمایش درحدود ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند تا باکتری‌ها رشد کنند، سپس کدورت لوله با کدورت شاهد مک فارلند سنجیده شد. در صورتی‌که کدورت سوسپانسیون میکروبی زیاد باشد سوسپانسیون میکروبی رقیق می‌شود.پس از تهیه سوسپانسیون، در شرایط سترون و توسط یک سواپ سوسپانسیون به طور یکنواخت بر تمام سطح محیط کشت مولر هنیتون براث در سه جهت و هر بار با چرخش ۶۰ درجه برروی محیط کشت درون ظرف پتری کشیده شد. بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره‌ی متانولی تهیه شده از بخش‌های مختلف، به روش‌های تعیین غلظت بازدارندگی حداقل، روش چاهک، روش تمام ظرف، روش دیسک‌گذاری و روش قطره مستقیم انجام گرفت[۱۲،۱۴،۱۴].

الف- روش تعیین غلظت بازدارندگی حداقل (M.I.C): به هر کدام از لوله‌های شماره ۱ تا ۹، ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی از کشت ۲۴ ساعته باکتری‌ها اضافه شد، تمام لوله‌ها در انکوباتور با حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و پس از گذشت ۲۴ ساعت نتایج مربوطه ثبت گردید.

ب- روش چاهک (Well): در مناطقی از محیط کشت که باکتری‌ها بر روی آن کشت شده بودند چاله‌هایی با قطر ۳ میلی متر ایجاد شد و با استفاده از سمپلر مقدار ۱۵۰ میکرولیتر عصاره ریخته شد و سپس ظروف پتری به مدت ۲ ساعت درون یخچال قرار گرفتند تا عصاره به خوبی به محیط کشت اطراف چاله نفوذ کند، این عمل سه بار (هر دوساعت یکبار) تکرار گردید. یک چاله نیز برای حلال متانول در نظر گرفته شد. سپس ظروف پتری به آرامی به انکوباتور با حرارت ۳۷ درجه منتقل گردید و تا ۲۴ ساعت در آن نگهداری شدند. پس از گذشت زمان لازم و رشد باکتری، تاثیر عصاره‌ها و حلال برروی رشد باکتری‌ها بررسی و ثبت شد.

ج- روش تمام ظرف (Pour Plate): یک میلی‌لیتر از عصاره متانولی به ۹ میلی متر از محیط کشت، قبل از سرد شدن کامل محیط کشت و بستن آن (۴۰ درجه سانتی‌گراد) اضافه شد. سپس ظروف پتری به آرامی و در جهت‌های متفاوت حرکت داده شد تا عصاره به طور یکنواخت و به خوبی در محیط کشت پخش شود. پس از بسته شدن محیط کشت، باکتری‌ها بر روی آنها کشت شدند و نمونه‌ها در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه و به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. همین مراحل برای ۱ میلی لیتر متانول انجام شد تا به عنوان شاهد از آن استفاده شود.

د- روش دیسک‌گذاری: در زیر دستگاه لامینار ایرفلو بر روی دیسک‌های خالی بلانک (Blank) که توسط اتوکلاو سترون شده بودند، ۱۵۰ میکرولیتر از عصاره‌ها و حلال متانول (در سه نوبت متوالی و هر بار ۵۰ میکرولیتر) ریخته شد. پس از گذشت زمان لازم برای تبخیر حلال، دیسک‌های حاوی عصاره‌ها بر روی مناطق معینی از محیط کشت که بر روی آن قبلاً باکتری کشت شده بود، قرار داده شدند. ظروف پتری به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه نگهداری و پس از آن نتایج ثبت شد.

ه- روش قطره مستقیم: از هر عصاره به میزان ۱۵۰ میکرولیتر به صورت قطره مستقیم به یک نقطه در سطح محیط کشت شده ریخته و اجازه داده شد تا این قطرات جذب محیط شوند. سپس ظروف پتری به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور بادمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و پس از آن نتایج ثبت گردید.

Archive of SID

www.SID.ir

۳- روش‌های بررسی اثرات ضد قارچی

بررسی اثرات ضد قارچی عصاره متانولی نیز به روش‌های مشابه اثر ضد باکتریایی عصاره‌ها به همان پنج روش ذکر شده، انجام شد که به دلیل تکراری بودن از ذکر آن ها خودداری می شود. برای تهیه کالوس‌های حاصل از جداکشت‌های برگی از روش ایرانبخش و همکاران استفاده شد[۹،۶] .

نتایج

الف ـ خواص ضدمیکروبی بخش‌های مختلف گیاه تاتوره

۱ـ تاثیر عصاره بخش‌های مختلف گیاه تاتوره بر چهار سویه باکتری

نتایج بررسی تاثیر عصاره‌های متانولی بخش‌های مختلف گیاه بر روی چهار سویه باکتری در روش چاهک در جدول ۱ خلاصه شده است. همان‌گونه که ملاحظه می‌شود عصاره‌های متانولی ساقه و برگ در مرحله‌ی رویشی بر روی باکتری باسیلوس سوبتیلیس دارای اثر باز دارندگی می‌باشند (تصویر۱).

نتایج بررسی تاثیر عصاره‌های متانولی بخش‌های مختلف گیاه بر چهار سویه باکتری در روش قطره مستقیم در جدول ۲ مشاهده می‌شود عصاره متانولی برگ و ساقه در مرحله رویشی و برگ ،ساقه و ریشه در مرحله زایشی و همچنین بذر بر روی باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* موثر بوده‌اند، موثرترین تاثیر ضدمیکروبی مربوط به برگ و ساقه در مرحله‌ی رویشی زندگی گیاه می‌باشد. همچنین بذر بر روی باکتری *پسودوموناس آئروژینوزا* اثر بخش بوده است.

۲ـ تاثیر عصاره بخش‌های مختلف گیاه تاتوره بر چهار سویه قارچ

نتایج بررسی تاثیر عصاره‌های متانولی بخش‌های مختلف گیاه تاتوره بر چهار سویه قارچ در روش قطره مستقیم در جدول ۳ مشاهده می‌شود. عصاره‌ی متانولی ریشه رویشی و گل گیاه تاتوره بر روی قارچ *ریزوکتونیا سولانی* پاسخ موثری را نشان دادند (تصویر ۲).

ب- خواص ضدمیکروبی عصاره‌ی کالوس‌های مختلف

۱ـ تاثیر عصاره‌ی کالوس‌های مختلف بر چهار سویه باکتری

همانگونه که در تصویر ۳ و جدول ۴ مشاهده می شود، عصاره متانولی کالوس‌های اندامزا و سبز بر روی باکتری‌های باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس که هر دو گرم مثبت هستند، تاثیر معنی‌داری دارند. عصاره‌ی کالوس شفاف و نیمه شفاف بر روی باکتری باسیلوس سوبتیلیس موثر نبوده است. عصاره‌ی کالوس شفاف بر روی پسودوموناس آئروژینوزا دارای اثر کمی بوده است. عصاره‌ی کالوس نیمه شفاف بر روی باکتری استافیلوکوکوس اپیدرمیدس دارای اثر بازدارندگی مثبت بوده است. عصاره‌ی کالوس شفاف بر روی باکتری اشریشیا کلی موثر بوده است.

Archive of SID

www.SID.ir

۲ـ تاثیر عصاره کالوس‌های مختلف بر چهار سویه قارچ

در تصویر ۴ و جدول ۵ مشاهده می‌شود که عصاره‌ی کالوس اندام‌زا بر روی قارچ سراتوسیستیس اولمی موثر بوده است. هیچ‌یک از عصاره‌ها بر روی قارچ ریزوکتونیا سولانی موثر نبوده‌اند. بر روی قارچ فوزاریوم سمیتکتوم، عصاره‌ی مربوط به کالوس اندام‌زا و سبز اثر بخش بوده است. تنها عصاره‌ی کالوس سبز توانسته است بر روی قارچ فوزاریوم کالموروم تا حدودی اثر بازدارندگی نشان دهد. در یک جمع‌بندی کلی به نظر می رسد عصاره‌ی مربوط به کالوس اندام‌زا بیش از سایر عصاره‌ها بر روی رشد قارچ‌ها اثر بازدارندگی از خود نشان داده است.

جدول ۱: تاثیر عصاره‌ی متانولی بخش‌های مختلف گیاه تاتوره بر چهار سویه‌ی باکتریایی (روش چاهک)

سویه‌ی باکتری	قطر هاله (mm)							
	حلال متانولی	برگ		ساقه		ریشه		گل	بذر
		مرحله رویشی	مرحله زایشی	مرحله رویشی	مرحله زایشی	مرحله رویشی	مرحله زایشی		
E. coli (ATCC W1485 25645)	۹	-	-	-	-	-	۹	-	-
S. epi (ATCC 0-1-B29997)	۸	۱۷	۹	۷	۷	-	۷	-	۹
B. sub (ATCC KX1-A1 15561)	۱۰	۱۳	۱۰	۱۰	۹	-	۸	-	-
P. aer (ATCC PA103-29260)	۱۰	-	-	-	-	-	-	-	-

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲: تاثیر عصاره‌ی متانولی بخش‌های مختلف گیاه تاتوره بر چهار سویه‌ی باکتریایی (روش قطره مستقیم)

سویه‌ی باکتری	قطر هاله (mm)							
	حلال متانولی	برگ		ساقه		ریشه		گل	بذر
		مرحله رویشی	مرحله زایشی	مرحله رویشی	مرحله زایشی	مرحله رویشی	مرحله زایشی		
E. coli (ATCC W1485 25645)	۱۸	۱۵	۱۶	۱۶	۱۵	۱۵	۱۶	۱۶	۱۸
S. epi (ATCC 0-1-B29997)	۲۰	۲۵	۱۶	۱۸	۱۵	۲۰	۱۶	۲۰	۲۰
B. sub (ATCC KX1-A1 15561)	۱۵	۲۱	۲۰	۲۱	۲۰	-	۲۰	-	۱۷
P. aer (ATCC PA103-29260)	۱۷	۱۷	۱۷	۱۷	۱۵	۱۷	۱۷	۱۷	۲۱

جدول ۳: تاثیر عصاره‌ی متانولی بخش‌های مختلف گیاه تاتوره بر چهار سویه‌ی قارچ (روش قطره مستقیم)

سویه‌ی قارچی	قطر هاله (mm)							
	حلال متانولی	برگ		ساقه		ریشه		گل	بذر
		مرحله رویشی	مرحله زایشی	مرحله رویشی	مرحله زایشی	مرحله رویشی	مرحله زایشی		
C. ulmi (ATCC 32731)	۱۲	۸	۱۱	۱۰	-	۱۶*	۱۰	۲۰*	۱۱*
R. sol (A.T.C.C 16118)	-	-	-	۲۰	-	-	-	۱۵	-
F. sem (ATCC 11599)	۱۰	۵	۱۰	۶	۸	-	۶	-	۶
F. col (ATCC 15620)	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* اثر فانجی‌استاتیک داشته است و پس از گذشت زمان مجددا قارچ رشد کرده است.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۴: تاثیر عصاره‌ی متانولی کالوس‌های مختلف گیاه تاتوره علیه چهار سویه‌ی باکتریایی

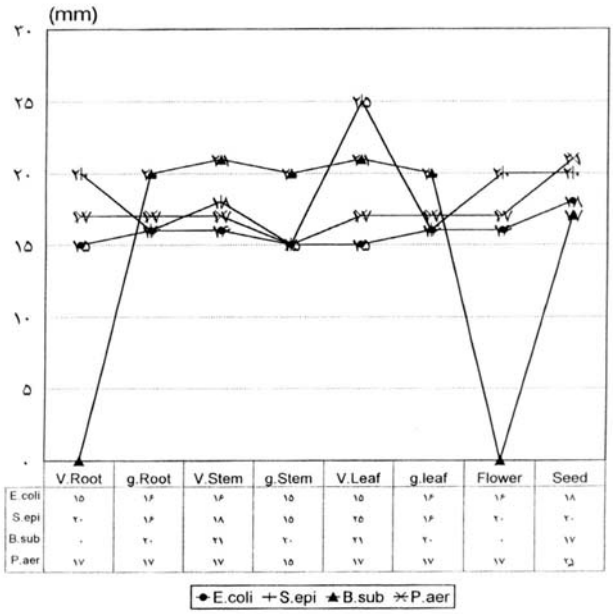
سویه‌ی باکتری	قطر هاله (mm)				
	عصاره‌ی کالوس شفاف	عصاره‌ی کالوس نیمه شفاف	عصاره‌ی کالوس سبز	عصاره‌ی کالوس اندامزا	متانول (شاهد)
E. coli (ATCC W1485 25645)	۱۷	۱۲	۸	۱۲	۱۲
S. epi (ATCC 0-1-B29997)	۱۷	۱۷	۲۲	۲۰	۱۲
B. sub (ATCC KX1-A1 15561)	-	-	۲۳	۲۲	-
P. aer (ATCC PA103-29260)	۱۷	۱۲	۱۵	۱۲	۱۵

جدول ۵: تاثیر عصاره‌ی متانولی کالوس‌های مختلف گیاه تاتوره علیه چهار سویه‌ی قارچی

سویه‌ی قارچی	قطر هاله (mm)				
	عصاره‌ی کالوس شفاف	عصاره‌ی کالوس نیمه شفاف	عصاره‌ی کالوس سبز	عصاره‌ی کالوس اندامزا	متانول (شاهد)
C. ulmi (ATCC 32731)	۲۰	۱۵	۲۰	۲۵	۱۸
R. sol (ATCC 16118)	-	-	-	-	-
F. sem (ATCC 11599)	۱۵	۱۲	۱۷	۱۷	۱۲
F. col (ATCC 15620)	-	-	۸	-	-

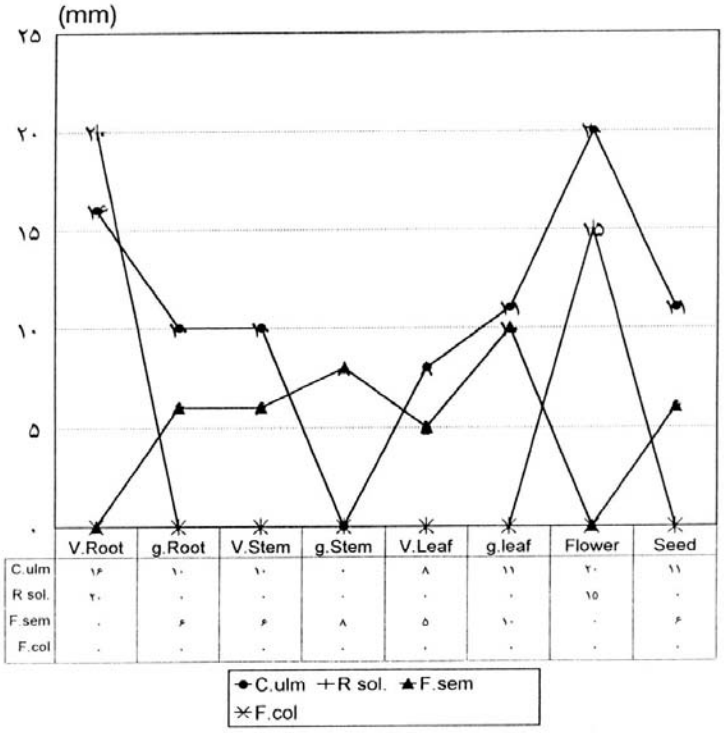
Archive of SID

www.SID.ir



	V.Root	g.Root	V.Stem	g.Stem	V.Leaf	g.leaf	Flower	Seed
E.coli	۱۵	۱۶	۱۶	۱۵	۱۵	۱۶	۱۶	۱۸
S.epi	۲۰	۱۶	۱۸	۱۵	۲۵	۱۶	۲۰	۲۰
B.sub	۰	۲۰	۲۱	۲۰	۲۱	۲۰	۰	۱۷
P.aer	۱۷	۱۷	۱۷	۱۵	۱۷	۱۷	۱۷	۲۵

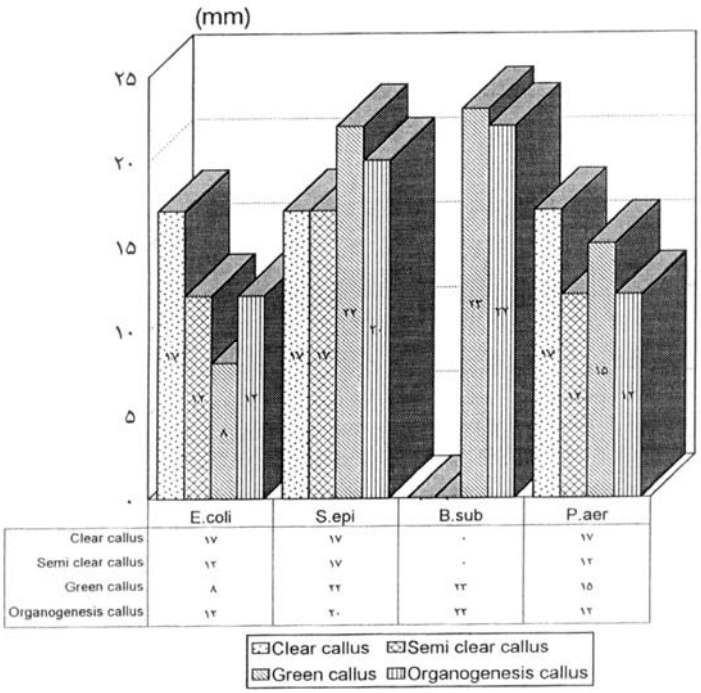
تصویر ۱: منحنی اثرات ضدباکتریایی بخش‌های مختلف گیاه تاتوره علیه چهار سویه‌ی باکتری



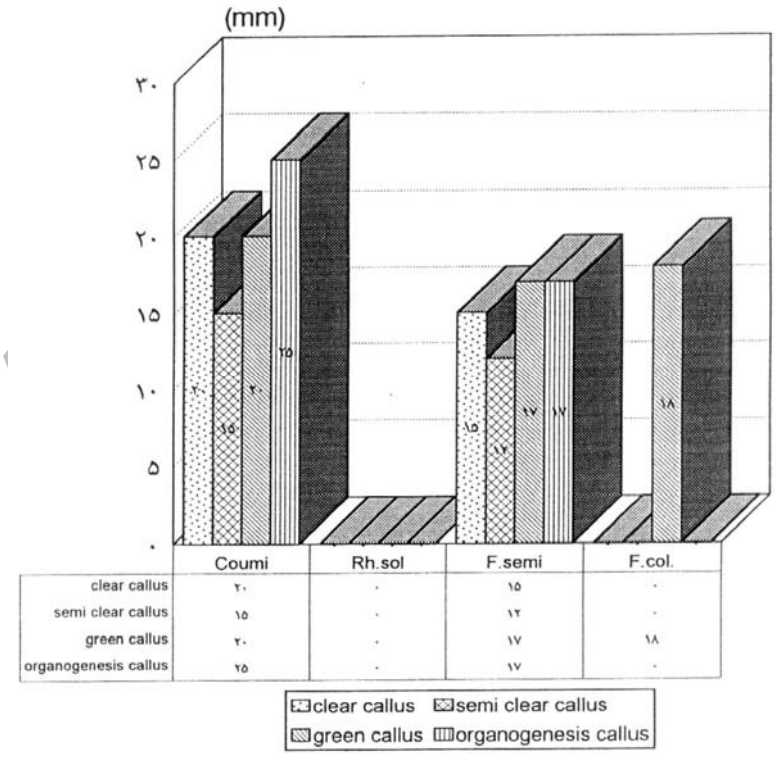
	V.Root	g.Root	V.Stem	g.Stem	V.Leaf	g.leaf	Flower	Seed
C.ulm	۱۶	۱۰	۱۰	۰	۸	۱۱	۲۰	۱۱
R sol.	۲۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱۵	۰
F.sem	۰	۶	۶	۸	۵	۱۰	۰	۶
F.col	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰

تصویر ۲: منحنی اثرات ضدقارچی بخش‌های مختلف گیاه تاتوره علیه چهار سویه‌ی قارچ.

www.SID.ir



تصویر ۳: اثرات ضدباکتریایی عصاره‌ی متانولی کالوس‌های مختلف جداکشت‌های برگی گیاه تاتوره علیه چهار سویه‌ی باکتری.



تصویر ۴: اثرات ضدباکتریایی عصاره‌ی متانولی کالوس‌های مختلف جداکشت‌های برگی گیاه تاتوره علیه چهار سویه‌ی قارچ.

www.SID.ir

بحث و تفسیر

نتایج حاصل از بررسی اثرهای ضدمیکروبی بخش‌های مختلف گیاه *داتورا استرامونیوم* شامل ریشه، ساقه و برگ در مراحل رشد رویشی و زایشی، گل و بذر نشان داده شد. در روش کشت مایع، هیچ‌کدام از عصاره‌های آبی سترون شده در غلظت به کار گرفته شده، اثر بازدارندگی را نشان ندادند. در روش تمام ظرف، هیچ‌یک از عصاره-های آبی و متانولی بخش‌های مختلف گیاه اثر بازدارندگی علیه سویه‌های باکتریایی نشان ندادند. در روش چاهک، برای هیچ‌یک از عصاره‌های آبی هاله عدم رشد مشاهده نشد و تنها عصاره‌های متانولی برگ در مرحله رویشی و ساقه در مرحله‌ی رویشی، اثر ضدباکتریایی علیه *باسیلوس سوبتیلیس* داشتند. در روش قطره مستقیم، هیچ‌کدام از عصاره‌های متانولی علیه باکتری ***E. coli*** تاثیری را نشان ندادند. در باکتری ***S. epidermidis*** برگ رویشی دارای بهترین پاسخ بوده و هاله عدم رشد مشاهده شد. در باکتری ***B. subtilis*** برگ رویشی و ساقه رویشی بهترین هاله عدم رشد را نشان دادند و پس از آن، برگ در مرحله‌ی زایشی و ریشه و ساقه در مرحله‌ی زایشی قرار گرفتند. عصاره‌ی گل هم هیچ‌گونه تاثیری را نشان نداد. در باکتری ***P. aeroginosa*** هیچ‌یک از عصاره‌ها، هاله مهار رشد را نشان ندادند. در روش دیسک‌گذاری، هیچ‌کدام از دیسک‌های دارای عصاره‌ی بخش‌های مختلف گیاه در اطراف خود، هاله عدم رشد ایجاد نکردند در حالی‌که دیسک‌های آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین، آمپی‌سیلین، وانکومایسین و سفالوکسین علیه *باسیلوس سوبتیلیس* بیشترین تاثیر را نشان دادند. آنتی‌بیوتیک وانکومایسین علیه *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* دارای تاثیر بود. این آنتی‌بیوتیک‌ها علیه باکتری‌های *اشریشیا کلی* و *پسودوموناس آئروژینوزا* تاثیری را نشان ندادند.

به نظر می‌رسد ماده‌ی شیمیایی اثربخش که نقش باکتری‌کشی دارد در آب حل نمی‌شود و حلال آن متانول است و همچنین این احتمال وجود دارد که غلظت پایینی از الکالوئیدهای تروپانی موجب شود تا عصاره‌ها علیه باکتری‌ها بی‌تاثیر باشند ولی حساسیت بالای باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* موجب می‌شود تا این غلظت پایین باعث تشکیل هاله عدم رشد در اطراف محل برخورد عصاره و سویه‌های باکتریایی باشد. از طرف دیگر مشخص شد که بهترین روش عملکرد در این خصوص (مقدار کم ماده موثره) می‌تواند روش قطره مستقیم باشد تا از حداقل مقدار ممکن، حداکثر پاسخ گرفته شود و نتیجه‌ی دیگر این‌که اثر بازدارندگی ماده‌ی موثره علیه باکتری‌های گرم مثبت از باکتری‌های گرم منفی بیشتر می باشد. مجد، چلپیان در ۱۳۷۸، در بررسی اثرات ضد میکروبی دو گونه گیاه بنگ‌دانه بیان داشتند خواص ضدمیکروبی هیوسیامین ،قوی تر از اسکوپولامین است[۱۵] .

Alkofahi و همکاران در ۱۹۹۶، اثر ضدباکتریایی و ضدقارچی عصاره‌ی اتانولی گیاه *هیوسیاموس رتیکولاتوس* بر هشت میکروارگانیسم را بررسی نموده و بیان داشتند عصاره‌ی اتانولی گیاه مورد آزمایش دارای اثر ضدمیکروبی موثر می‌باشد[۱۵]. در بررسی ما، مشخص شد که باکتری‌های *باسیلوس سوبتیلیس* و *استافیلوکوکوس اپیدمیدیس* بیشترین تاثیرپذیری را نسبت به عصاره‌های متانولی داشته‌اند که اختلاف معنی‌داری با سایر باکتری‌ها نشان می‌دهند. این نتایج با گزارش مجد، مهرابیان که بیان داشتند باکتری *استافیلوکوکوس* نسبت به الکالوئیدهای گیاهان ***Glaucium Corniculantum*** و ***Glaucium flavum*** حساس می‌باشد، همسو است. نتایج بررسی ما

Archive of SID

www.SID.ir

با گزارش Cabo و همکاران در ۱۹۸۸ علیه *G. flavum* که بیان داشتند عصاره‌ی حاصل از ریشه, اثر ضدمیکروبی بیشتری دارد، متفاوت است[۱۶].

تاثیر علیه چهار سویه قارچ نشان داد هیچ‌کدام از روش‌های تمام ظرف، چاهک و دیسک‌گذاری موثر نبوده‌اند و بهترین پاسخ در روش قطره‌ی مستقیم مشاهده شد. در مورد قارچ سراتوسیستیس اولمی موثرترین عصاره‌ی مربوط به عصاره گل و پس از آن ریشه در مرحله رویشی بوده است. اثر ریشه در مرحله رویشی، قارچ ایستای بوده و پس از گذشت زمان مجدداً قارچ رشد کرده بود. سایر عصاره‌ها تاثیری کمتر از حلال متانول را نشان دادند. در قارچ ریزوکتونیا سولانی، عصاره‌ی متانولی ساقه در مرحله‌ی رویشی و گل موثرترین پاسخ را داشتند و سایر عصاره-ها و حلال فاقد هر گونه تاثیری بودند. علیه گونه قارچ فوزاریوم هیچ‌یک از عصاره‌ها تاثیر معنی‌داری نداشتند.

در این پژوهش تاثیر عصاره‌های متانولی انواع کالوس‌های شفاف، نیمه شفاف، سبز و اندامزا علیه چهار سویه باکتری و چهار سویه قارچ مورد بررسی قرار گرفت. روش به کار گرفته شده روش قطره مستقیم است.

نتایج نشان داد که عصاره‌های متانولی کالوس‌های اندامزا و سبز علیه *باسیلوس سوبتیلیس* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* که هر دو گرم مثبت می باشند، تاثیر معنی‌داری دارند. عصاره‌های کالوس‌های نیمه شفاف و شفاف علیه *باسیلوس سوبتیلیس* موثر نبوده‌اند. همچنین مشخص شد، عصاره‌ی متانولی کالوس شفاف علیه *اشریشیا کلی* موثر است. مشخص گردید ماده‌ی موثره الکالوئیدی آتروپین می‌باشد که طی تکوین بافت و اندام و تمایز بافتی سنتز می‌شود[۶].

پژوهش‌های ایرانبخش و همکاران (۲۰۰۶، ۱۳۸۰) چگونگی تولید کالوس‌های مختلف حاصل از جداکشت-های برگی گیاه *داتورا استرامونیوم* را نشان داد[۹،۶].

نتایج مشخص ساخت عصاره‌ی متانولی کالوس‌های شفاف، سبز و اندامزا که دارای الکالوئیدهای تروپانی بودند علیه قارچ *سراتوسیستیس اولمی* اثر بازدارندگی داشته‌اند. عصاره‌ی متانولی کالوس اندامزا موثرتر از سایر عصاره‌ها بوده است. هیچکدام از عصاره‌ها علیه قارچ *ریزوکتانیا سولانی* تاثیر معنی‌داری را نشان ندادند. عصاره‌های متانولی کالوس‌های سبز و اندامزا علیه قارچ *فوزاریوم سمیتکتوم* اثر بخش بوده‌اند، عصاره‌ی کالوس شفاف نیز تاثیرات بازدارنده را نشان دادند. اثر عصاره‌ی کالوس نیمه شفاف همانند اثر حلال متانولی بود. در قارچ *فوزاریوم کالموروم*، تنها عصاره‌ی کالوس سبز توانسته است تا حدودی از خود اثر نشان دهد و سایر عصاره‌ها بی‌تاثیر بوده‌اند. عصاره متانولی کالوس‌های اندامزا و سبز علیه قارچ *فوزاریوم* نقش ضدمیکروبی از خود نشان دادند. در مورد قارچ *فوزاریوم کالموروم* تنها عصاره کالوس سبز توانسته بود تا حدودی اثر میکروب‌کش نشان دهد.

در یک جمع‌بندی کلی می‌توان گفت عصاره‌ی مربوط به کالوس اندامزا بیش از سایر عصاره‌ها علیه رشد قارچ‌ها اثر بازدارندگی از خود نشان داده و موثرتر از سایر عصاره‌ها بوده است به نظر می رسد ماده موثره ضدمیکروبی در ارتباط مستقیم با تمایز بافت و اندام است. ماهیت این ماده‌ی الکالوئیدی آتروپین (ایزومر راسمیک هیوسیامین، $C_{17}H_{23}NO_3$، نقطه‌ی ذوب ۱۱۴ تا ۱۱۸، وزن مولکولی ۲۸۹/۳۸ و با pKa ۵/۹۳) می‌باشد. بررسی منابع موجود هیچگونه تحقیقات مشابه‌ای در این خصوص را نشان نداد.

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج بدست آمده با گزارش مجد، چلپیان در ۱۳۷۸ [۱۵] و یافته‌های مهرابیان، نورانی در ۱۳۷۴ بر روی دو گونه از شقایق کوهی (*Glaucium*) [۷] و مجد، اربابیان در ۱۳۷۲، بر روی سرده وینکا و Peterson و همکاران در ۱۹۹۲ که اثر ضدقارچی الکالوئیدها بر روی سه گونه از سرده وینکا را گزارش کرده بودند تفاوت ندارد[۱۷] .

با توجه به مجموعه بررسی ها و نتایج به دست آمده به نظر می رسد ماده موثره که نقش میکروب کشی دارد در آب حل نمی شود و حلال آن متانول می باشد[۸،۹و۱۲] . همچنین غلظت پایین الکالوئیدهای تروپانی موجب می شود تا عصاره‌ها علیه باکتری‌ها و قارچ‌ها بی‌تاثیر باشند[۱۲]ولی به دلیل حساسیت زیاد دو باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* حتی با مقادیر کم غلظت ماده موثره، هاله عدم رشد در محل بر خورد عصاره و سویه های باکتری یا قارچ مشاهده شد[۱۰،۱۲]. این نتایج با یافته‌های علیشاهی نورانی و مهرابیان (۱۳۷۴) در دو گونه از شقایق کوهی (*Glaucium flavum*) همسو می‌باشد[۱۳] .

مجد، اربابیان (۱۳۷۲) اثرات ضد قارچی الکالوئیدها را برروی سه گونه از سرده وینکا گزارش کرده‌اند[۱۷]، یافته‌های ما با گزارش این محققین همسو می‌باشد[۱۲].

با توجه به نتایج بدست آمده و با عنایت به غلظت کم ماده موثره به نظر می رسد بهترین روش عملکردی، روش قطره مستقیم باشد. نکته دیگر اینکه اثر بازدارندگی ماده موثره علیه باکتری های گرم مثبت از باکتری های گرم منفی بیشتر می باشد. نتایج ما با تحقیقات مجد، چلپیان (۱۳۸۱) مطابقت دارد[۱۲]. Alkofahi و همکاران در ۱۹۹۶، اثرات ضدباکتریایی و ضدقارچی عصاره‌ی اتانولی گیاه *هیوسیامـوس رتیکولاتوس* بر هشت میکروارگانیسم را بررسی نموده و بیان داشتند عصاره اتانولی گیاه مورد آزمایش، دارای اثر ضد میکروبی موثر می باشد[۱۵] .

مجد، چلپیان در ۱۳۷۸ در بررسی اثر ضد میکروبی دوگونه گیاه بنگ‌دانه بیان داشتند خواص ضدمیکروبی هیوسیامین قوی‌تر از اسکوپولامین است[۱۵] .

Cabo و همکاران در ۱۹۸۸، اثر ضد میکروبی عصاره های حاصل از ریشه، ساقه، برگ و پریکارپ میوه گیاه شقایق کوهی (*Glaucium flavum*) را گزارش نمودند و بیان داشتند عصاره حاصل از ریشه، اثر ضدمیکروبی بیشتری دارد[۱۸،۱۹].

Peterson در ۱۹۹۲ اثر ضد قارچی الکالوئیدهای سه گونه از سرده وینکا را بیان داشته است[۱۷] .

Archive of SID

www.SID.ir

References

1- Sato, F., Takashi Hashimoto, T., Hachiya, A., Tamura, T., Choi, K., Morishige, T., Fujimoto, T and Yamada**,** Y**.** *PNAS January* , **98**, 367 (2000).
2- Verpoorte, R., Van der Heijden, R., Van Gulik, W. M. and Ten Hoopen, H. J. G**.** *The Alkaloids*, **40**,181 (1991).
3- Fliniaux Ophélie, F., François Mesnard, F. ., Sophie Raynaud, S. and Fliniaux, O**.,** *Journal of Experimental Botany*, **55**,1053 (2004).
4- Hashimoto, T and Hayashi,A**.,** *Biological chemistry*, **266** (1991).
5- Shahidi Bonjar, G.H., S. Aghighi and Karimi Nik, A**.,** *Journal of Biological Sciences*, **4**, 405 (2004).
6- Iranbakhsh, A., Oshaghi, M. A., and Majd, A., *Acta biologica cracoviensia*, **48**, 3 (2006).
7- Hashimoto, T. and Yamada, Y., *Annual Rev. Plant Physiolgy Plant Mol. Biol.*, **45**, 257 (1994).
8- Iranbakhsh, A, R and Majd, A., *Pazhoohesh and Sazandegi*, **53,** 16 (2001).
9- Iranbakhsh, A. R. and Riazi, G.h., *Pazhoohesh and Sazandegi*, (No; 53), 82 (2001).
10- Zargari, A ., **Vol. 3**, Terhran University Publisher (1989).
11- Samsam Sariyati, H., Mashal Publisher, Esfahan,(1989).
12- Iranbakhsh, A, R., Riazi, G. h., *Army Medicine Congress, Baghiyatllah Medical Science*, 54,(2002).
13- Alishahi Norani, F., Mehrabian, S**.** MS Thesis, Science Faculty, Thehran Tarbiat Moalem, Iran,(1995).
14- Forbes, B. A., Sahm, D.F.Weissfeld, A. S. and Trevino, E.A**., 36,** 171 (1995).
15- Chalabian, F., Majd, A. and Fallahian, F., Journal of Sciences , Islamic Azad University, (No; 53), 82 (2002).
16- Cabo, J.,and Cabo, P**.,** *Fitoterapia*, **59**, 324 (1988).
17- Majd, A.,and Arbabiyan, S., *Journal of Sciences, Islamic Azad University*, (No: 9 and 10), (1993).
18- Cabo, J.,and Cabo, M. M., *Microbios*, **566**, 177 (1988).
19- Cabo, J., and Cabo, M. P**.,** *Fitoterapia*, **59**, 103 (1988).

Archive of SID

www.SID.ir