Archive of SID

Original Article

Antibacterial effects *Pulicaria gnaphalodes* extract on some gram positive and negative bacteria

Jamshidi-Moghaddam Y[1], Rajabizadeh A[2], Khazaeli P[3]

1- Faculty of Health, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, I.R. Iran.
2- Environmental Health Engineering Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, I.R. Iran.
3- Faculty of Pharmacy, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, I.R. Iran.

Received: 2019/12/10 | Accepted: 2020/10/12

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 12:57 +0330 on Wednesday January 13th 2021

Abstract:

Background: The general tendency of the community to use herbal medicines is due to prove the destructive effects of chemical drugs and environmental pollution. This study aimed to investigate the Anti-bacterial properties of *P. gnaphalodes* extract on some gram-positive and negative bacteria.

Materials and Methods: In this study, all of the organs of the *P. gnaphalodes* plant was dried in the shade in the summer of 2016 after collection. The Anti-bacterial effect of the plant was measured on *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Bacillus cereus* to obtain the best extraction method. Next, 15 ml of Muller-Hinton-Agar medium was mixed with concentrations of 10 - 5.2 - 0.25 - 0.625 and 20 mg/ml of the extracts and 10^4 CFU /ml of the bacterium was inoculated and cultured after growing the colonies. In order to determine the MIC and MBC, the same volumes of 10^5 CFU/ ml were inoculated into Muller Hinton broth medium containing different concentrations of herbicide extracts. The culture medium was incubated for 24 hours at 37 ° C.

Results: Concentration of 20 mg/ml had the most effect on inhibition of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Bacillus cereus* bacteria, which was eliminated for 90, 68, 75 and 90% bacteria, respectively. MIC and MBC of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Bacillus cereus* were obtained at 25, 50, 50, 70, 50, 80 and 30 and 50 mg/ml, respectively.

Conclusion: The results showed that the extract of *P. gnaphalodes* has anti-bacterial effects on some gram positive and negative bacteria.

Keywords: *P. gnaphalodes*, Plant extracts, Anti-bacterial agents, Gram-positive bacteria, Gram-negative bacteria

***Corresponding Author**
Email: yaser.jm1366@yahoo.com
Tel: 0098 916 288 9568
Fax: 0098 343 132 5128

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, December, 2020; Vol. 24, No 5, Pages 516-524

Please cite this article as: Jamshidi-Moghaddam Y, Rajabizadeh A, Khazaeli P. Antibacterial effects *Pulicaria gnaphalodes* extract on some of gram positive and negative bacteria. ***Feyz*** 2020; 24(5): 516-24.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 12:57 +0330 on Wednesday January 13th 2021

اثرات ضدباکتریایی عصاره گیاه علف هیضه *Pulicaria gnaphalodes* روی برخی از باکتری‌های گرم مثبت و منفی

یاسر جمشیدی‌مقدم [۱]، احمد رجبی‌زاده [۲*]، پیام خزائلی [۳]

خلاصه:

سابقه و هدف: گرایش عمومی جامعه به استفاده از داروهای گیاهی به‌دلیل اثبات اثرات مخرب داروهای شیمیایی و ایجاد آلودگی‌های زیست‌محیطی آن‌ها، روبه‌افزایش است. هدف از این تحقیق، بررسی خواص ضدباکتریایی عصاره گیاه علف هیضه بر روی برخی از باکتری‌های گرم مثبت و منفی است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه همه اندام‌های علف هیضه در تابستان ۱۳۹۵ پس از جمع‌آوری در سایه خشک گردید. برای به‌دست آوردن بهترین روش عصاره‌گیری، اثر ضدباکتریایی گیاه بر روی باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس ائروژینوزا، اشرشیا کلی و باسیلوس سرئوس اندازه‌گیری شد. در ادامه ۱۵ میلی‌لیتر محیط مولر هینتون آگار با غلظت‌های ۰/۶۲۵- ۱/۲۵- ۲/۵- ۵ - ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره‌ها مخلوط شد و به آن $CFU/ml10^4$ باکتری موردنظر تلقیح گردید و بعد از کشت، کلنی‌های رشدیافته شمارش شد. جهت تعیین MIC و MBC حجم‌های یکسان شامل $CFU/ml10^5$ به محیط مولر هینتون براث حاوی غلظت‌های مختلف از عصاره‌های علف هیضه تلقیح گردید. محیط‌های کشت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند.

نتایج: غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، بیشترین اثر بازدارنده را بر روی باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس ائروژینوزا، اشرشیا کلی و باسیلوس سرئوس داشت که به‌ترتیب برای باکتری‌های ذکرشده ۹۰، ۶۸، ۷۵ و ۹۰ درصد حذف انجام شد. MIC و MBC باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس ائروژینوزا، اشرشیا کلی و باسیلوس سرئوس ۲۵ و ۵۰، ۵۰ و ۷۰، ۵۰ و ۸۰، ۳۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که عصاره گیاه علف هیضه دارای اثرات ضدباکتریایی بر روی برخی از باکتری‌های گرم مثبت و منفی است.

واژگان کلیدی: علف هیضه، عصاره‌های گیاهی، عوامل ضدباکتریایی، باکتری‌های گرم مثبت، باکتری‌های گرم منفی

دو ماه‌نامه علمی - پژوهشی فیض، دوره بیست و چهارم، شماره ۵، آذر - دی ۱۳۹۹، صفحات ۵۲۴-۵۱۶

مقدمه

بیماری‌های عفونی، یکی از چالش‌های بزرگ علم پزشکی در قرن بیست و یکم است و به تبع آن، تولید آنتی‌بیوتیک‌های جدید روزبه‌روز افزایش می‌یابد. در عین حال، گسترش روزافزون مقاومت باکتریایی به آنتی‌بیوتیک‌ها، درمان بیماری‌های عفونی را مشکل و پرهزینه کرده است؛ از این‌رو، امروزه محققان به سمت جایگزین‌های گیاهی روی آورده‌اند که ضمن دارابودن اثرات ضدباکتریایی، فاقد عوارض جانبی ناشی از مصرف داروهای شیمیایی نیز هستند [۱].

امروزه تعداد داروهای گیاهی رسمی مورد استفاده برای درمان بیماری‌ها، در مقایسه با تعداد کل داروهای رسمی در جهان در حال فزونی است. این نسبت در کشورهایی همچون: چین و هند با حدود بیش از ۷۰ درصد، در بالاترین مقدار و در کشورهایی همچون آمریکا با حدود ۲۰ درصد در حد پایینی قرار دارد [۲]. متأسفانه در ایران، این نسبت در حد پایینی است؛ به‌طوری‌که در حال حاضر در حدود ۵ درصد می‌باشد [۳]. گرایش عمومی جامعه به استفاده از داروها و درمان‌های گیاهی و به‌طور کلی فرآورده‌های طبیعی، به‌ویژه در طی سال‌های اخیر رو به افزایش بوده است و مهم‌ترین علل آن، اثبات اثرات مخرب و جانبی داروهای شیمیایی از یک طرف و از سوی دیگر ایجاد آلودگی‌های زیست‌محیطی که کره زمین را تهدید می‌کند، می‌باشد [۴]. بعضی از اسانس‌های گیاهان، به‌عنوان عوامل مهم ضدمیکروبی طبیعی گزارش شده‌اند. اسانس‌ها، مایعات روغنی معطری هستند که از اندام‌های مختلف گیاه، نظیر: دانه، ریشه، جوانه، پوست، شاخه، برگ، غنچه و گل به دست می‌آیند. به‌طور عمده، ترکیبات فنلی، مسؤول خواص ضدمیکروبی اسانس‌ها هستند. اسانس‌ها می‌توانند تا بیش از ۶۰ نوع ترکیب داشته باشند و ترکیبات اصلی، ممکن است تا ۸۵

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

۲. استاد، مرکز تحقیقات مهندسی بهداشت محیط، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

۳. استاد، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

* **نشانی نویسنده مسؤول:**
کرمان، ابتدای بزرگراه هفت باغ، مرکز تحقیقات مهندسی بهداشت محیط دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دانشکده بهداشت

تلفن: ۰۳۴ ۳۱۳۲۵۱۲۸ **دورنویس:** ۰۳۴ ۳۱۳۲۵۱۲۸

پست الکترونیک: yaser.jm1366@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۹/۱۹ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۱۳۹۹/۷/۲۱

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 12:57 +0330 on Wednesday January 13th 2021

درصد اسانس را تشکیل دهند. نتیجه بعضی از بررسی‌ها بیانگر این موضوع است که اثرات ضدباکتری اسانس‌ها، به‌صورت کامل نسبت به اثرات تک‌تک اجزا بیشتر است [۵]. اسانس‌های گیاهی، ترکیباتی فرّار و معطر هستند که در اندام‌های مختلف گیاه وجود دارند و یکی از نقش‌های اصلی آن‌ها، محافظت از گیاه در برابر عوامل مختلف فساد می‌باشد [۶]. خانواده کاسنیان (Asteraceae) یا مرکبان (Compositae)، تیره‌ای از راسته کاسنی‌سانان (Asterales) و شامل ۲۰۰ جنس و ۲۰۰۰ گونه هستند که از آن، جنس Pulicaria به‌طور گسترده‌ای در آسیا، اروپا و آفریقا توزیع شده است [۷]. پنج گونه از این جنس در ایران رشد می‌کنند که شامل *P. dysenterica*، *P. arabica*، *P. gnaphalodes*، *P. salvifolia* و *P. vulgaris.* هستند [۸]. گیاه علف هیضه (*Pulicaria gnaphalodes*) از خانواده کاسنی (Asteraceae) و از جمله گیاهانی است که در طب سنتی برای سال‌ها در ایران مورد استفاده قرار گرفته است. از این گیاه برای درمان گرمازدگی‌های شدید و پیشگیری از آن، ضداسهال، ضدالتهاب، بثورات پوستی و کک‌کش استفاده شده است [۹]. با توجه به بومی بودن گیاه علف هیضه در ایران و دارا بودن ترکیبات فنولی، دسترسی آسان و ارزان و مصرف غذایی و دارویی این گیاه از زمان‌های دور در کشور [۱]، این مطالعه می‌تواند مقدمه‌ای جهت استفاده عملی از عصاره‌های این گیاه به‌عنوان آنتی‌باکتریال در صنایع غذایی و دارویی باشد تا بدین طریق هم امکان استفاده از یک منبع سهل‌الوصول و مقرون به صرفه فراهم گردد و هم از هدر رفتن محصول و خسارت‌های ناشی از استفاده از مواد شیمیایی بر محیط زیست جلوگیری شود و در نهایت گامی جهت اعتلای بهداشت جامعه برداشته شود. طبق بررسی‌های به عمل‌آمده این مطالعه تاکنون صورت نگرفته است. با توجه به نکات یادشده این تحقیق در نظر دارد اثر ضدمیکروبی عصاره گیاه علف هیضه را روی برخی از باکتری‌های گرم مثبت و منفی مورد بررسی قرار دهد.

مواد و روش‌ها

مکان و زمان انجام مطالعه

این مطالعه تجربی - آزمایشگاهی با کد اخلاق IR.KMU.REC.1395.268 در نیمه اوّل سال ۱۳۹۵ در مرکز تحقیقات مهندسی بهداشت محیط دانشگاه علوم پزشکی کرمان انجام پذیرفت.

جمع‌آوری نمونه

گیاه موردمطالعه در این پژوهش در تابستان ۱۳۹۵ از دشت طبس جمع‌آوری شد که شامل گل، ساقه و برگ این گیاه بود که در سایه خشک گردید. گیاه بعد از جمع‌آوری، در بخش زیست‌شناسی دانشگاه کرمان مورد شناسایی و تأیید علمی قرار گرفت. در ادامه بهترین مسیر انجام آزمایش تعیین شد و اثر گیاه در غلظت‌های مختلف مورد آزمایش قرار گرفت.

تعیین بهترین مسیر انجام آزمایش

برای تهیه عصاره آبی، ۳ میلی‌لیتر آب مقطر به ۳ گرم پودر گیاه اضافه گردید و به مدت ۲۴ ساعت بر روی شیکر قرار گرفت. محلول موردنظر جهت حذف ذرات بزرگ‌تر دکانته شد و ذرات کوچک‌تر با عبور از صافی غشایی ۰/۴۵pm حذف گردید (روش نفوذی اصلاح‌شده). عصاره حاصل در مجاورت هوا به‌سرعت خشک شد و پودر خشک حاصل، پس از توزین، در آب مقطر حل گردید و به‌عنوان عصاره آبی مورد استفاده قرار گرفت. عصاره در ۶ غلظت ۰/۶۲۵- ۱/۲۵- ۲/۵- ۵ - ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه گردید [۱۰]. در ادامه قسمت‌های مختلف گیاه مورد مطالعه (ساقه، برگ و گل) در تابستان ۱۳۹۵ از دشت طبس جمع‌آوری شد. به منظور انتخاب بهترین عضو گیاه، قسمت‌های مختلف آن در سایه خشک و به‌وسیله آسیاب برقی به پودر تبدیل گردید و سپس فعالیت ضدمیکروبی عصاره آبی هر قسمت از گیاه به روش انتشار دیسک اندازه‌گیری شد. برای یافتن بهترین روش خشک نمودن هم با توجه به نتیجه مرحله قبل، برگ گیاه به روش‌های خشک‌کن انجمادی، حرارت مستقیم و حرارت غیرمستقیم آفتاب خشک گردید و فعالیت ضدباکتریایی آن به روش انتشار دیسک اندازه‌گیری شد. عصاره‌گیری به روش‌های سوکسله، کلونجر و ماسراسیون انجام گردید. در روش ماسراسیون ۳ میلی‌لیتر آب مقطر به ۳ گرم پودر گیاه اضافه گردید و به مدت ۲۴ ساعت بر روی شیکر قرار گرفت. محلول موردنظر جهت حذف ذرات بزرگ‌تر دکانته شد و ذرات کوچک‌تر با عبور از صافی غشایی 45/0pm حذف گردید. (روش نفوذی اصلاح‌شده)[1]. عصاره حاصل در مجاورت هوا به سرعت خشک شد و پودر خشک حاصل پس از توزین در آب مقطر حل گردید و به‌عنوان عصاره آبی مورد استفاده قرار گرفت [۱۰]. عصاره در ۶ غلظت ۰/۶۲۵- ۱/۲۵- ۲/۵- ۵ - ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه گردید. عصاره‌گیری به روش سوکسله و کلونجر نیز به‌وسیله دستگاه‌های مربوطه صورت گرفت و فعالیت ضدمیکروبی آن به روش انتشار دیسک اندازه‌گیری شد. برای یافتن بهترین حلّال عصاره‌گیری از حلّال‌های مختلف مانند آب، متانول و اتانول استفاده شد. با توجه به نتایج مراحل قبل، مقدار ۵۰ گرم پودر گیاه خشک‌شده در سایه به‌صورت جداگانه با ۲۵۰ میلی‌لیتر متانول، آب

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 12:57 +0330 on Wednesday January 13th 2021

و اتانول، به روش ماسراسیون عصاره‌گیری و فعالیت ضدمیکروبی آن به روش انتشار دیسک اندازه‌گیری شد.

سویه‌های باکتری و محیط کشت

محیط کشت مولر هینتون در بسته‌بندی ۱۰۰ گرمی ساخت شرکت کیولب کانادا از شرکت شیمی دانش خریداری شد. برای تهیه سویه‌های باکتری ابتدا باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC-29213)، سودموناس ائروژینوزا (ATCC-27883)، اشرشیا کلی (ATCC- 25922) و باسیلوس سرئوس (ATCC-9634) در آزمایشگاه کشت داده شدند. این باکتری‌ها به‌صورت لیوفیلیزه، از انستیتوپاستور و مرکز پژوهش‌های علمی - صنعتی ایران تهیه و در کرایو بانک تلقیح و در دمای 70°C- نگهداری شدند. جهت تهیه کشت تازه باکتری‌های موردنظر از محیط کشت مولر هینتون آگار استفاده شد [۱۱].

تهیه سوسپانسیون میکروبی

یک لوپ از هر سویه به ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت مولر هینتون براث جهت تهیه سوسپانسیون میکروبی اضافه گردید. کدورت ایجادشده این سوسپانسیون، دانسیته سلولی تقریباً $۱/۵\times۱۰^{۸}$ سلول بر میلی‌لیتر را ایجاد می‌نماید. سپس تا هنگام برابر شدن دانسیته نوری آن با محلول ۰/۵ مک‌فارلند، توسط محیط کشت مایع مولر هینتون آگار رقیق‌سازی صورت گرفت و کدورت آن با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۲۵ نانومتر اندازه‌گیری شد [۱۲].

کاربرد روش انتشار از دیسک بر آگار[1] برای یافتن بهترین مسیر آزمایش

در روش انتشار دیسک، برای تهیه دیسک‌های حاوی عصاره، ابتدا میزان ۲۰ میکرولیتر از عصاره‌های رقیق‌شده جذب دیسک‌های بلانک (پادتن طب) شد. سپس دیسک‌های آغشته به عصاره به مدت ۲۴ ساعت داخل فور با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند تا کاملاً خشک شوند. یک دیسک آغشته به حلّال مربوطه نیز به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. در نهایت دیسک‌های آماده، در کنار شعله، توسط پنس با فواصل منظم بر روی محیط کشت مولر هینتون حاوی باکتری قرار گرفتند. پلیت‌های حاوی کشت باکتری و عصاره در شرایط یکسان به مدت ۲۴ ساعت داخل انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند [۱۳].

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)

فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌ها توسط آزمایش رقیق‌سازی آگار و براساس توصیه NCCLS و هرکدام سه بار انجام شد. به‌طور خلاصه، جهت انجام این آزمایش، حجم‌های یکسان از هر سوسپانسیون باکتریایی شامل $۱۰^{۵}$ CFU/ml به محیط مولر - هینتون براث حاوی غلظت‌های مختلف شامل ۲۰ تا ۱۲۵ میلی‌گرم بر لیتر از عصاره‌های علف هیضه تلقیح گردید. سپس محیط‌های کشت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. MIC کمترین غلظت هر عصاره که از رشد باکتری‌ها بر روی محیط کشت جلوگیری می‌کند و MBC کمترین غلظت عصاره که به‌طور کامل باعث مرگ باکتری‌ها می‌شود، تعیین گردید. در ضمن در طول آزمایش یک نمونه شاهد هم در نظر گرفته شد [۱۰].

تعیین و مقایسه تأثیر عصاره بر باکتری‌های مورد مطالعه

به منظور تعیین روند حذف باکتری‌ها در مقادیر مختلف عصاره آبی گیاه علف هیضه، پلیت‌های ۱۵ میلی‌لیتری حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار تحت شرایط استریل تهیه گردید. در حین سرد شدن محیط کشت مذکور در دمای ۷۰-۶۰ درجه سانتی‌گراد، عصاره تهیه‌شده در غلظت‌های مختلف به نسبت ۱/۱۰ با استفاده از پیپت استریل‌شده به آن اضافه گردید (۱ سی‌سی عصاره به ۱۰ سی‌سی محیط کشت)؛ سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رقیق‌شده حاوی باکتری تهیه‌شده در مرحله قبل روی هرکدام از پلیت‌های حاوی محیط کشت و عصاره با استفاده از لوپ استریل‌شده کشت داده شد. پس از انکوبه‌کردن براساس کاهش تعداد کلنی‌های رشدکرده بر روی محیط کشت، میزان CFU در هر میلی‌لیتر گزارش شد و از طریق رسم منحنی درصد حذف محاسبه گردید. درضمن در طول آزمایش‌ها یک نمونه شاهد نیز به کار گرفته شد. آزمایشات این مرحله براساس روش‌های ذکرشده در کتاب استانداردهای آب و فاضلاب انجام گرفت [۱۴].

روش تجزیه و تحلیل آماری

برای تعیین نرمال‌بودن داده‌ها از آزمون کولموگروف اسمیرنوف استفاده گردید. از آن‌جا که سطح معنی‌داری بزرگ‌تر از ۰/۰۵ بود، از آزمون‌های پارامتریک استفاده شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۲۲ و آزمون آماری ANOVA مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند [۱۵].

نتایج

آزمایش انتشار دیسک برای قسمت‌های مختلف گیاه و روش‌های مختلف خشک کردن، روش‌های مختلف عصاره‌گیری و حلّال‌های مختلف انجام شد. جدول‌های شماره‌های ۱ تا ۴ نشان‌دهنده قطر هاله عدم رشد آن‌ها می‌باشد. درادامه حداقل

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 12:57 +0330 on Wednesday January 13th 2021

غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشـندگی (MBC) و روند حذف باکتری‌ها در غلظت‌های مختلف بیان شده است.

جدول شماره ۱- قطر هاله عدم رشد برحسب میلی‌متر ایجادشده به‌وسیله ۰/۵ میلی‌لیتر از غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در مورد قسمت‌های مختلف گیاه (میانگین سه بار تکرار)

باکتری / اندام گیاه	سودموناس ائروژینوزا	باسیلوس سرئوس	استافیلوکوکوس اورئوس	اشرشیا کلی
ساقه	۱۰ ± ۱	±۱۷ ۳/۶۰	±۱۹ ۲/۶۴	±۱۲ ۲
برگ	±۱۲ ۳	±۱۸ ۲/۶۴	±۲۰ ۲	±۱۳ ۱/۷۳
گل	±۹ ۱/۷۳	±۳۳/۱۵ ۱/۱۵	±۱۸ ۱	±۱۲ ۲/۶۴

جدول شماره ۲- قطر هاله عدم رشد برحسب میلی‌متر ایجادشده به‌وسیله ۰/۵ میلی‌لیتر از غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در مورد روش‌های مختلف خشک کردن (میانگین سه بار تکرار)

باکتری / روش خشک کردن	سودموناس ائروژینوزا	باسیلوس سرئوس	استافیلوکوکوس اورئوس	اشرشیا کلی
خشک‌کن انجمادی	±۱۱ ۳/۴۶	±۱۷ ۶	±۱۹ ۲/۶۰	±۱۲ ۶/۰۸
حرارت مستقیم	±۸ ۲/۶۴	±۱۳ ۳/۶۰	±۱۵ ۱	±۳۳/۹ ۲/۰۸
حرارت غیرمستقیم آفتاب	±۱۲ ۱	±۱۸ ۵/۱۹	±۲۰ ۱	±۱۳ ۳

جدول شماره ۳- قطر هاله عدم رشد برحسب میلی‌متر ایجادشده به‌وسیله ۰/۵ میلی‌لیتر از غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در مورد روش‌های مختلف عصاره‌گیری (میانگین سه بار تکرار)

باکتری / روش عصاره‌گیری	سودموناس ائروژینوزا	باسیلوس سرئوس	استافیلوکوکوس اورئوس	اشرشیا کلی
سوکسله	±۱۱ ۳/۶	±۱۷ ۳	±۱۹ ۴/۳۵	±۱۲ ۱
کلونجر	۱۰ ± ۲	±۱۶ ۱/۷۳	±۱۸ ۸/۵۴	±۱۰ ۲/۶۵
ماسراسیون	±۱۲ ۷/۸۱	±۱۸ ۳	±۲۰ ۲	±۱۳ ۶/۰۸

جدول شماره ۴- قطر هاله عدم رشد برحسب میلی‌متر ایجادشده به‌وسیله ۰/۵ میلی‌لیتر از غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در مورد روش‌های حلّال‌های مختلف (میانگین سه بار تکرار)

باکتری / حلّال	سودموناس ائروژینوزا	باسیلوس سرئوس	استافیلوکوکوس اورئوس	اشرشیا کلی
آب	±۱۲ ۷/۸۱	±۱۸ ۳	±۲۰ ۲	±۱۳ ۶/۰۸
متانول	±۹ ۲	۲/۶۴ ±۱۵	±۱۴ ۵/۱۹	±۱۰ ۲
اتانول	±۱۰ ۵/۲۹	۲/۶۴ ±۱۷	±۱۸ ۴	±۱۲ ۱

طبق جدول‌های شماره‌های ۱ تا ۴ بیشترین قطر هاله عدم رشد مربوط به برگ گیاه، با روش خشک کردن با حرارت غیرمستقیم آفتاب، روش عصاره‌گیری ماسراسیون و حلّال آب بود؛ پس به‌عنوان بهترین مسیر آزمایش مشخص شد و در ادامه قطر هاله عدم رشد برای غلظت‌های مختلف عصاره آبی برگ گیاه خشک‌شده در سایه و با روش ماسراسیون بر روی باکتری‌های مورد مطالعه در جدول شماره ۵ نشان داده شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول شماره ۵- قطر هاله عدم رشد برحسب میلی‌متر ایجادشده به‌وسیله ۰/۲ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره آبی برگ گیاه خشک‌شده در سایه و با روش ماسراسیون بر روی باکتری‌های مورد مطالعه (میانگین سه بار تکرار)

باکتری / غلظت (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	استافیلوکوکوس اورئوس	باسیلوس سرئوس	سودموناس ائروژینوزا	اشرشیا کلی
۶/۲۵	۶	۶	۶	۶*
۱۲/۵	±۱۳ ۱	±۱۲ ۲	۶	۶
۲۵	±۱۵ ۵/۵۶	±۱۴ ۱	۶	۶
۵۰	±۱۸ ۴/۳۵	±۱۷ ۱/۷۳	±۱۰ ۲	±۹ ۵/۱۹
۱۰۰	±۲۰ ۲	±۱۸ ۳	±۱۲ ۷/۸۱	±۱۳ ۶/۰۸

*= قطر ۶ میلی‌متر معادل قطر چاهک و نشان‌دهنده عدم تأثیر عصاره می‌باشد.

طبق نتایج جدول شماره ۵ با افزایش غلظت‌های عصاره آبی، اثر ضدمیکروبی بر روی باکتری‌های مورد مطالعه افزایش یافت.

حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC):

تست‌های MIC و MBC جهت تعیین حداقل غلظت مهارکننده رشد و حداقل غلظت کشنده باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، سودموناس ائروژینوزا، اشرشیا کلی و باسیلوس سرئوس انجام شد. جدول شماره ۶ نشان‌دهنده نتایج MIC و MBC عصاره آبی گیاه علف هیضه بر روی باکتری مورد مطالعه می‌باشد.

جدول شماره ۶- نتایج MIC و MBC عصاره آبی گیاه علف هیضه بر روی باکتری‌ها برحسب (Mg/Ml)

باکتری / غلظت (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	استافیلوکوکوس اورئوس		باسیلوس سرئوس		سودموناس ائروژینوزا		اشرشیا کلی	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
۲۰	-	-	-	-	-	-	-	-
۲۵	+	-	-	-	-	-	-	-
۳۰	+	-	+	-	-	-	-	-
۴۰	+	-	+	-	-	-	-	-
۵۰	+	+	+	+	+	-	+	-
۶۰	+	+	+	+	+	-	+	-
۷۰	+	+	+	+	+	+	+	-
۸۰	+	+	+	+	+	+	+	+
۱۰۰	+	+	+	+	+	+	+	+
۱۲۵	+	+	+	+	+	+	+	+

+= دارای اثر -= بدون اثر

طبق نتایج جدول شماره ۶، MIC و MBC باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، سودموناس ائروژینوزا، اشرشیا کلی و باسیلوس سرئوس ۲۵ و ۵۰، ۵۰ و ۷۰، ۵۰ و ۸۰، ۳۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد.

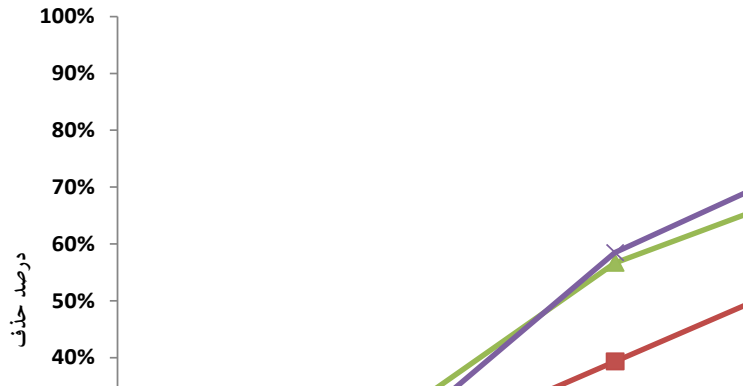
در نمودار شماره ۱ روند حذف باکتری‌ها در مقادیر مختلف با یکدیگر مقایسه شده است.

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 12:57 +0330 on Wednesday January 13th 2021

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 12:57 +0330 on Wednesday January 13th 2021



نمودار شماره ۱- روند حذف باکتری‌ها در مقادیر مختلف عصاره آبی گیاه علف هیضه

طبق نمودار شماره ۱ در تمامی غلظت‌های انتخابی، عصاره گیاه دارای اثر بازدارنده بر روی باکتری‌های مورد مطالعه بود. در غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بیشترین اثر بازدارنده عصاره بر روی باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس ائروژینوزا، اشرشیا کلی و باسیلوس سرئوس مشاهده گردید که به‌ترتیب برای باکتری‌های ذکرشده ۹۰، ۶۸، ۷۵ و ۹۰ درصد حذف انجام شد. نمودار شماره ۱ نشان‌دهنده درصد حذف باکتری‌های مذکور در غلظت‌های مختلف عصاره می‌باشد. آزمون آماری ANOVA رابطه معنی‌داری بین غلظت عصاره و درصد حذف باکتری‌های مختلف نشان داد (P=۰).

بحث

در این مطالعه، اثر ضدباکتریایی عصاره آبی گیاه علف هیضه بر روی باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس ائروژینوزا، اشرشیا کلی و باسیلوس سرئوس مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این تحقیقات نشان داد که عصاره آبی گیاه علف هیضه بر روی باکتری‌های مورد مطالعه مؤثر است. این نتایج، از لحاظ آماری معنی‌دار می‌باشد (P<۰/۰۵). اما این نتیجه کمی متفاوت با نتایج مطالعه‌ای بود که توسط معطر و همکارانش (۱۹۹۰) انجام شد و مشخص گردید که عصاره الکلی تازه استخراج‌شده از گیاه *Pulicaria gnaphalodes* جمع‌آوری‌شده در تابستان بر روی اکثر باکتری‌های مورد مطالعه دارای اثرات ضدمیکروبی می‌باشد و اثر ضدمیکروبی عصاره‌های آبی تابستانه و عصاره‌های آبی و الکلی پاییزه، بسیار ناچیز و قابل‌اغماض بود [۱۶] که این تفاوت می‌تواند به‌دلیل اختلاف اندک در ترکیبات موجود در گیاه و یا در نوع عصاره‌گیری باشد. تفاوت‌هایی که در نوع و میزان ترکیبات مشاهده می‌شود، می‌تواند به‌دلیل وجود تفاوت در محیط‌های رشد، ژنتیک، نوع تغذیه و... باشد [۱۷]. از عوامل مؤثر در مقدار و نوع مواد مؤثره گیاه می‌توان به نوع گیاه، مراحل رشدی گیاه، اندام‌های مختلف گیاه و شرایط آب و هوایی اشاره کرد که در این تحقیق، تفاوت می‌تواند به‌دلیل متفاوت بودن شرایط رشد و منطقه گیاه، موقعیت جغرافیایی، ارتفاع از سطح دریا و خاک منطقه باشد؛ زیرا این دلایل باعث تغییر در خواص ضدمیکروبی گیاه می‌گردد. از دیگر دلایل تفاوت نتیجه می‌توان به متفاوت بودن باکتری‌های مورد مطالعه اشاره کرد. حامدی و همکارانش (۲۰۱۴) تحقیقی بر روی ترکیب شیمیایی و اثر ضدباکتریایی اسانس *Pulicaria gnaphalodes* انجام دادند که نتایج به‌دست‌آمده از این مطالعه، فعالیت ضدمیکروبی اسانس را تأیید می‌کند و کاربرد بالقوه آن را در سیستم برای جلوگیری از رشد باکتری‌های انتقال‌یافته از غذا و گسترش امنیت و ماندگاری خوراکی‌ها نشان می‌دهد [۱۸]. همچنین گندمی و همکارانش (۲۰۱۵) تحقیقی بر روی ترکیب آلی فرّار از *Pulicaria gnaphalodes* و خواص ضدباکتریایی و ضدقارچ اسانس آن و عصاره آبی، اتانولی و متانولی انجام دادند که نتایج به‌دست‌آمده از این مطالعه فعالیت ضدمیکروبی اسانس را تأیید می‌کند و امکان استفاده از آن‌ها را در مواد غذایی، برای جلوگیری از رشد باکتری‌ها و قارچ‌های ناشی از مصرف مواد غذایی و نیز گسترش

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 12:57 +0330 on Wednesday January 13th 2021

ایمنی و طول عمر مواد غذایی نشان می‌دهد [۱۹]. نتایج حاصل از اثر مهار رشد عصاره آبی گیاه علف هیضه بر باکتری‌های مورد مطالعه در جدول شماره ۶ مشاهده می‌گردد. همان‌گونه که در جدول شماره ۶ مشاهده می‌شود، MIC در مورد استافیلوکوکوس با میزان ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و MIC در باکتری اشرشیا کلی با میزان ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد. این نتایج به گونه مشابهی در داده‌های جدول شماره ۵ دیده می‌شود. کمترین اثر بر روی باکتری اشرشیا کلی و بیشترین اثر بر روی باکتری استافیلوکوکوس مشاهده گردید. این نتیجه، کمی با مطالعه عبادی و همکارانش متفاوت بود؛ به‌طوری‌که طی مطالعه آن‌ها باسیلوس سرئوس حساس‌ترین و گرم منفی‌ها مقاوم‌ترین باکتری‌ها در برابر عصاره گیاه بودند [۲۰] که این تفاوت می‌تواند به‌دلیل تفاوت ترکیبات گیاه مورد مطالعه باشد. با توجه به جدول‌های شماره‌های ۵ و ۶ و نمودار شماره ۱ چنین استنباط می‌شود که باکتری‌های گرم مثبت حساسیت بیشتری نسبت به باکتری‌های گرم منفی در مقابل عصاره گیاه علف هیضه دارند و در غلظت‌های کمتری از عصاره نابود می‌شوند. این نتیجه با نتایج مطالعه بهدانی و همکارانش مشابه بود؛ به‌طوری‌که طی مطالعه آن‌ها عصاره آبی حنا، فعالیت ضدمیکروبی کمی علیه باکتری گرم منفی، مانند سودوموناس آئروژینوزا و اشرشیا کلی دارد؛ با این‌حال این عصاره، دارای فعالیت ضدمیکروبی بسیار خوبی علیه گونه‌های استافیلوکوک به‌عنوان باکتری‌های گرم مثبت می‌باشد [۲۱]. در مطالعه‌ای دیگر نیز که توسط طالعی و همکارانش (۲۰۰۴) انجام گرفت، اثر عصاره سماق بر باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از گرم منفی بود [۲۲]. همچنین در مطالعه‌های جداگانه که توسط محققان در مورد اثر ضدمیکروبی عصاره‌های گیاهی بر روی باکتری‌های گرم مثبت و منفی صورت گرفت، به این نتیجه رسیدند که باکتری‌های گرم منفی در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت، مقاومت بیشتری نسبت به ترکیبات گیاه نشان می‌دهند [۲۳،۲۴]. علت احتمالی آن، وجود لیپوپلی‌ساکاریدهای دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی می‌باشد که مانند سدی از عبور مولکول‌های بزرگ و آب‌گریز ممانعت می‌کنند و از آن‌جایی که اکثر ترکیبات مؤثر موجود در عصاره‌ها و اسانس‌ها ماهیت آب‌گریزی دارند، بنابراین می‌توان چنین نتیجه گرفت که این مواد، امکان نفوذ و دسترسی به نقاط فعال داخل باکتری‌های گرم منفی را ندارند و به همین دلیل معمولاً باکتری‌های گرم منفی در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت، مقاومت بیشتری نسبت به ترکیبات گیاه نشان می‌دهند [۲۱]. همچنین توانایی عبور از میان دیواره سلولی باکتری گرم مثبت آسان‌تر از باکتری‌های گرم منفی است، زیرا دیواره سلولی باکتری گرم مثبت شامل پپتیدوگلیکان و فاقد لایه دیواره خارجی می‌باشد [۲۳]. نتایج حاصل از جدول شماره ۱ نشان‌دهنده آن است که عصاره آبی برگ گیاه، دارای بیشترین اثر ضدمیکروبی بر روی باکتری‌های مورد مطالعه نسبت به دیگر قسمت‌های گیاه می‌باشد که این نتیجه با نتایج مطالعه معتمدی و همکارانش همخوانی داشت؛ به‌طوری‌که طی مطالعه آن‌ها عصاره آبی و الکلی برگ گیاه لاواند حقیقی اثر ضدمیکروبی بیشتری نسبت به گل گیاه داشت [۲۵]. از نتایج جدول شماره ۲ چنین استنباط می‌شود که روش خشک کردن در سایه باعث اثر ضدمیکروبی بیشتری نسبت به روش‌های دیگر می‌شود. همچنین نتایج جدول شماره ۳ نشان می‌دهد که عصاره گرفته‌شده توسط روش ماسراسیون دارای اثر ضدمیکروبی بیشتری بر روی باکتری‌های مورد مطالعه می‌باشد. علت احتمالی آن حل شدن مواد مؤثره بیشتر در این روش می‌باشد. نتایج جدول شماره ۴ نشان‌دهنده این است که عصاره آبی گیاه، دارای اثر ضدمیکروبی بیشتری بر روی باکتری‌های مورد مطالعه می‌باشد که این نتیجه با نتایج مطالعه شریعتی‌فر و همکارانش (۲۰۱۲) مشابهت داشت؛ به‌طوری‌که در مطالعه آن‌ها عصاره آبی گیاه علف هیضه بیشترین ترکیبات فنولی را که مسؤول خاصیت ضدمیکروبی عصاره هستند، دارا بود [۱]. در مطالعه‌ای که توسط شریعتی‌فر و همکارانش (۲۰۱۲) انجام گرفت، نتایج نشان داد که عصاره‌های گیاه علف هیضه سرشار از ترکیبات فنلی می‌باشد و نیز خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالایی دارد [۱]. بنابراین با توجه به نتایج این تحقیق می‌توان از این گیاه به‌عنوان یک منبع گیاهی دارای ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی در صنایع غذا و دارو استفاده کرد.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که عصاره آبی گیاه علف هیضه اثر ضدباکتریایی جالب‌توجهی بر سویه‌های مورد مطالعه دارد. درادامه تحقیقات بیشتر در زمینه شناسایی ترکیبات و یافتن مواد مؤثر ضدمیکروبی گیاه علف هیضه و فرمولاسیون آن می‌تواند تهیه اشکال دارویی مختلف از آن را ممکن کند تا اقدام مؤثری جهت بهبود بیماری‌های عفونی و مسمومیت‌زای ناشی از سوش‌های مختلف میکروبی، انجام گیرد. با توجه به خواص دیگر این گیاه، نظیر ضداسهال، ضدالتهاب و بثورات پوستی، کک‌کش بودن، بومی ایران بودن، دسترسی آسان و ارزان و مصرف غذایی و دارویی این گیاه از زمان‌های دور در کشور، گیاه علف هیضه می‌تواند به‌عنوان یک منبع گیاهی دارای ترکیبات ضدمیکروبی در صنایع غذا و دارو، قابل‌اعتماد و کارآمد باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر بخشی از پایان‌نامه دانشجویی آقای یاسر جمشیدی‌مقدم می‌باشد که در مرکز تحقیقات مهندسی بهداشت محیط دانشگاه علوم پزشکی کرمان و با حمایت معاونت تحقیقات و فناوری این دانشگاه به انجام رسیده است؛ بدین‌وسیله از همه دست‌اندرکاران سپاسگزاری می‌شود.

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 12:57 +0330 on Wednesday January 13th 2021

References:

[1] Shariatifar N. Quantitative and qualitative study of phenolic compounds and antioxidant activity of plant *pulicaria gnaphalodes*. ***HMS*** 2012; 17(4): 35-41. [in Persian]

[2] Calixto BJ. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). ***BJMBR*** 2000; 33: 2.

[3] Bagheri A, Naghdi BH, Maki ZM, Hemati A, Movahedian F. Evaluation of using herbal medicine in Isfahan women population. ***JMP*** 2005; 15: 4

[4] Vajargah Sk, motamedi M, vajargah Fk. Study the effect of three medicinal herb kinds as Thyme, Fennel,and Spearmint in health and cure of animal and birds. ***BAU*** 2009. [in Persian]

[5] ATEŞ DA, ERDOĞRUL ÖT. Antimicrobial activities of various medicinal and commercial plant extracts. ***TJB*** 2003; 27(3): 157-62**.**

[6] Hojjati M, and Barzegar H. Chemical composition and biological activities of lemon (*Citrus limon*) leaf essential oil. ***NFSR*** 2017; 4(4): 15-24. [in Persian]

[7] Ali MS, Saleem M. Chemical constituents of *Pulicaria gnaphalodes*. ***NPS*** 1999; 5(3): 134-7.

[8] Mozafarian V. Lexicon of Iranian plant names. ***PCV*** Tehran Press, Tehran; 1996.

[9] Shariatifar N. Qualitative and quantitative study of *Pulicaria gnaphalodes* essential oil and plant extract and evaluation of oxidative stability of soya bean oil in the presence of plant essential oil and extracts: Thesis] ***TU*** 2011. [In Persian]

[10] Behdani M, Ghazvini K, Mohammadzadeh AR, Sadeghian A. Antibacterial activity of Henna extracts against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeroginosa*. ***HMS*** 2009; 15(2): 46-51. [in Persian]

[11] Oussalah M, Caillet S, Saucier L, Lacroix M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria**:** *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. ***FC*** 2007; 18(5): 414-20.

[12] Daneshvar N, Aber S, Dorraji MS, Khataee A, Rasoulifard M. Photocatalytic degradation of the insecticide diazinon in the presence of prepared nanocrystalline ZnO powders under irradiation of UV-C light. ***SAPT*** 2007; 58(1): 91-8 [in Persian]

[13] Salehi M, Raeesniya N, Mehrabiyan S. Evaluation of the bacterial effect of external methanolic extracts *Pistacia vera*. Journal of Microbiological Biotechnology. ***IAU*** 2011; 3(10): 53-9. [in Persian]

[14] Malakootian M, Toolabi A. Determining and comparing the effect of nanoparticle cuo, tio and zno in removing gram positive and negative bacteria from wastewater. ***JRHY*** 2010; 29(2). [in Persian]

[15] Molana Z, Shahande Z, Ahmadi MH. The effect of temperature on bacterial resistance Staphylococcus and *E. coli* to antibiotics. ***JBUMS*** 2006; 8(4): 26-31. [in Persian]

[16] Moattar F, Asgari M. The Antibacterial Activity of *Pulycaria gnaphalodes*. ***JDPS*** 1990; 1(3): 135-43 . [in Persian]

[17] Hui L, He L, Huan L, XiaoLan L, AiGuo Z. Chemical composition of lavender essential oil and its antioxidant activity and inhibition against rhinitis-related bacteria. ***AJMR*** 2010; 4(4): 309-13.

[18] Hamedi H, Rahimikia E, Gandomi H, Abbaszadeh S, Shariatifar N. Chemical composition and antibacterial effect of essential oil from *pulicaria gnaphalodes.* Turkey Association of Food Technology International Congress on ***FTTAU*** 2014. [in Persian]

[19] Gandomi H, Abbaszadeh S, Rahimikia E, Shariatifar N. Volatile Organic Compound from *Pulicaria gnaphalodes* and the Antibacterial and Antifungal Properties of Its Essential Oil and Aqueous, Ethanolic and Methanolic Extracts. ***JFPP*** 2015; 39(6): 2129-34. [in Persian]

[20] Ebadi A, Monadi A, Pashazadeh M, Zakhireh S. Antibacterial effects alcholic extracts of (*Astragalus hamosus*) on gram positive and gram negative bacteria. ***JCPI*** 2014; 1071-6. [in Persian]

[21] Behdani M, Ghazvini K, Mohammadzadeh A, Sadeghian A. Antibacterial activity of Henna extracts against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeroginosa*. ***THMS*** 2009; 15(2): 46-51. [in Persian]

[22] Talei GR, Meshkat AM, Delfan B. Antibacterial activity of fruit, leaves extracts of *Artemisia persica* boiss, *rhus coriaria*, *ephedra intermedia* and *daphne mucronata* royle of lorestan. ***UASSH*** 2004; 19-23. [in Persian]

[23] Kapourchali SS, Aliabadi AA, Ghasemi A, Sadeghi SE. Comparing the antibacterial effects of Iranian oak galls extract on some Gram-positive and Gram-negative plant pathogenic bacteria. ***BPP*** 2013; 271-40. [in Persian]

[24] Azizi Tabrizzad N, Seyedin Ardebili M, Hojjati M. Investigation of chemical compounds and antibacterial activity of pennyroyal, mint and thyme essential oils. ***FST*** 2019; 15(85): 447-57. [in Persian]

[25] Vajargah SK, Motamedi M, Vajargah FK. Study the effect of three medicinal herb kinds as Thyme, Fennel and Spearmint in health and cure of animal and birds. ***BAU*** 2009. [in Persian]

www.SID.ir