

## اولین بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های آبی و متانولی گیاه *Heracleum Persicum*

علی ناظمی\*، مهرداد هاشمی\*\*، محمدرضا خاتمی نژاد\*، کامران پورشمسیان\*

\* دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن  
\*\* دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پزشکی تهران

### چکیده

**سابقه و هدف:** ترکیبات ضد میکروبی با منبع گیاهی دارای قابلیت درمانی بی‌شماری هستند. در این مطالعه خصوصیات ضد میکروبی عصاره‌های آبی و متانولی میوه گیاه گلپر ایرانی *Heracleum Persicum* بصورت *in vitro* مورد مطالعه قرار گرفت. **روش بررسی:** در این مطالعه که به صورت مداخله‌ای انجام شد، گیاه مورد نظر در تیرماه ۱۳۸۱ از ارتفاعات اشکور تنکابن (ناحیه‌ای در شمال ایران) جمع‌آوری گردید. فعالیت ضد میکروبی عصاره‌ها علیه ۱۴ گونه باکتریایی و ۲ گونه قارچی بر اساس قطر هاله ممانعت از رشد در روش سنجش انتشار دیسک (*Disc Diffusion*) و روش سنجش مقادیر حداقل غلظت مهاري (*MIC*) و حداقل غلظت باکتری‌کشی (*MBC*) مورد ارزیابی قرار گرفت. **یافته‌ها:** عصاره آبی *Heracleum Persicum* فاقد اثر ضد میکروبی علیه میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه بود، در حالیکه عصاره متانولی بر روی رشد ۵ گونه باکتریایی از جنسهای باسیلوس، استرپتوکوکوس، انتروکوکوس و نوکاردیا اثر مهاری داشت. **نتیجه‌گیری:** عصاره متانولی گلپر ایرانی شامل مواد ضد میکروبی با اثرات ضد باکتریایی است، پس شاید بتوان تحقیقاتی در مورد استفاده از آن در درمان بیماران عفونی انجام داد. **واژگان کلیدی:** فعالیت ضد میکروبی، گلپر ایرانی، عصاره متانولی، حداقل غلظت مهاري، حداقل غلظت باکتری‌کشی.

### مقدمه

در پزشکی به عصاره‌ها و ترکیبات با خواص بیولوژیکی گونه‌های گیاهی توجه زیادی شده است. ترکیبات ضد میکروبی گیاهی یکی از منابع با ارزش در پزشکی به شمار می‌آیند و در نتیجه گسترش بیماریهای عفونی شناسایی تعداد بیشتری از این عصاره‌ها و ترکیبات در درمان بیماران مفید خواهد بود. ترکیبات ضد میکروبی با منبع گیاهی دارای قابلیت درمانی بی‌شماری هستند. آنها نه تنها در درمان بیماریهای عفونی موثرند، بلکه به طور همزمان تعداد زیادی از اثرات جانبی را که اغلب با ترکیبات ضد میکروبی همراه هستند، کاهش می‌دهند (۳). این مطالعه، خواص ضد میکروبی عصاره‌های آبی و متانولی گیاه گلپر ایرانی بر علیه طیفی از میکروارگانیسم‌ها را بررسی می‌کند.

*Heracleum Persicum* یا گیاه گلپر ایرانی (که از خانواده *Apiaceae* است) یکی از ۱۰ گونه جنس *Heracleum* در ایران است. گیاه گلپر ایرانی یک گیاه یک ساله می‌باشد که در نیمه شمالی کشور در ارتفاعات ۱۵۰۰ متر و بالاتر رشد می‌نماید. میوه آن به طور متداول در کشور به منزله چاشنی در تهیه ترشی‌جات و در طب محلی به مثابه داروی ضد نفخ به کار می‌رود (۱،۲).

اخیراً با توجه به اثرات جانبی و مقاومتی که میکروارگانیسم‌های پاتوژن علیه آنتی‌بیوتیکها کسب نموده‌اند،

## مواد و روشها

در این مطالعه مداخله‌ای، گیاهان در تیرماه ۱۳۸۱ از ارتفاعات اشکور تنکابن، واقع در غرب استان مازندران در شمال کشور، جمع‌آوری گردیدند. تاکسونومیکی (taxonomiky) مواد گیاهی در بخش بیولوژی دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن شناسایی و تایید گردید. مواد گیاهی جمع‌آوری شده در سایه خشک گردید و میوه آن از ساقه گیاه جدا شد، سپس از طریق مکانیکی به پودر تبدیل گردید. از نمونه پودر شده ابتدا به وسیله غوطه‌ورسازی در متانول و سپس به وسیله آب داغ عصاره‌گیری صورت گرفت. تقریباً ۲۰۰ گرم از پودر میوه گیاه در ۶۰۰ میلی‌لیتر متانول به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق ۲۵ درجه سانتیگراد همراه با تکان‌دهی ملایم مخلوط گردید. برای عصاره‌گیری با آب داغ، ۲۰۰ گرم نمونه پودر شده در ۶۰۰ میلی‌لیتر آب به مدت ۲ ساعت جوشانده شد. هر یک از عصاره‌ها بواسطه کاغذ واتمن شماره یک فیلتر گردید. عصاره‌های فیلتر شده در دمای اتاق در جریان ثابت هوا تبخیر گردیدند و کاملاً خشک شدند. عصاره خشک شده به وسیله تشعشع UV به طور شبانه استریل گردید و میزان استریل بودن آن توسط کشت دادن عصاره گیاه بر روی محیط نوترینت آگار بررسی شد. تمامی عصاره‌های خام خشک شده تا زمان آزمایش در دمای اتاق ذخیره گردیدند (۴،۵).

در مرحله بعد عصاره‌های آبی و متانولی گیاه گلپیر ایرانی به طور مجزا علیه ۱۶ میکروارگانیزم آزمایش شدند (جدول ۱). میکروارگانیزم‌ها در بخش میکروبیولوژی دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، تهیه شدند. هویت ارگانیزم‌های مورد آزمایش توسط سیستم شناسایی میکروبی همین بخش تایید گردید.

برای ارزیابی فعالیت ضد میکروبی، سنجش انتشار دیسک (Disc-Diffusion assay) به صورت زیر انجام گرفت. عصاره‌های گیاهی خشک شده در محلول دی‌متیل سولفوکسید (DMSO) ۵۰٪ با غلظت نهایی ۵۰۰ mg/ml حل گردیدند و به وسیله فیلتراسیون با فیلترهای ۰/۴۵ میکرونی استریل شدند. آزمایش‌های ضد میکروبی سپس توسط روش انتشار دیسک (۶) با استفاده از ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون شامل ۱۰۸cfu/ml باکتری، ۱۰۶cfu/ml مخمر و ۱۰۴spore/ml قارچ به ترتیب روی محیط‌های مولر هینتون آگار (MHA)، سابوراد دکستروز آگار (SDA) و پوتاتو دکستروز آگار (PDA) (شرکت Merck) کشت داده شد. دیسک‌ها (به قطر ۶mm) (شرکت پادتن طب) با ۱۰ میکرولیتر از عصاره در غلظت ۵۰۰ mg/ml

آغشته گردید (۵mg/disc) و روی محیط‌های مورد نظر قرار داده شدند. کنترل منفی با استفاده از همان محلولی که برای حل کردن عصاره‌های گیاهی به کار گرفته شد، DMSO (۵۰٪) (۵۰۰ μl/disc) فراهم گردید. آنتی‌بیوتیک‌های Furazolidone (۱۰۰ mg/disc) و استریپتومایسین (۱۰ mg/disc) به منزله استانداردهای مثبت برای تعیین حساسیت هر گونه میکروب مورد آزمایش، استفاده شدند. پلیت‌های محیط کشت که در آنها میکروارگانیزم‌ها تلقیح شده بودند در دمای ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت برای سویه‌های باکتریایی، ۴۸ ساعت برای مخمر و ۷۲ ساعت برای قارچ انکوبه شدند. فعالیت ضد میکروبی از طریق اندازه‌گیری هاله ممانعت از رشد تعیین شد و هر سنجش (در این آزمایش) دوبار تکرار گردید (۴،۷).

در مرحله بعد، سنجش Microdilution به صورت زیر انجام شد. حداقل غلظت مهاری (MIC) برای میکروارگانیزم‌هایی که به عصاره متانولی گیاه گلپیر ایرانی (در روش سنجش انتشار دیسک) حساس بودند، تعیین شد. MIC به کمترین غلظت از ترکیبات که رشد میکروارگانیزم را مهار می‌نماید، اطلاق می‌شود. MBC، غلظتی است که هیچ میکروبی قادر به رشد در آن نیست. تلقیح میکروارگانیزم‌ها از کشت ۱۲ ساعته در محیط مایع فراهم شد و برای رسیدن به کدورت استاندارد مک فارلند ۰/۵ رقیق گردید. عصاره گلپیر ایرانی حل شده در دی‌متیل سولفوکسید ۵۰٪ ابتدا در بالاترین غلظت ۵۰۰ mg/ml برای آزمایش فراهم شد و سپس رقت‌های متوالی در محدوده غلظت از ۵-۵۰۰ mg/ml (۵۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۰ و ۵) تهیه گردید. MIC و حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC) عصاره گلپیر ایرانی علیه سویه‌های باکتریایی بر اساس روش micro-well dilution (۸) با بعضی اصلاحات که در زیر شرح داده می‌شود، تعیین گردید:

پلیت‌های ۹۶ چاهکی به کمک توزیع ۹۵ میکرولیتر از محیط مولر هینتون برات و ۵ میکرولیتر از تلقیح میکروبی به داخل هر یک از چاهک‌ها فراهم گردید. ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره گلپیر ایرانی با غلظت ۵۰۰ mg/ml به چاهک اول هر میکروارگانیزم اضافه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های متوالی دیگر عصاره به داخل ۶ چاهک بعدی انتقال داده شد. چاهک آخر شامل ۹۵ میکرولیتر محیط مولر هینتون برات با ۱۰۰ میکرولیتر DMSO ۵۰٪ و ۵ میکرولیتر از تلقیح میکروبی در هر ردیف به منزله کنترل منفی مورد استفاده قرار گرفت. حجم نهایی در تمامی چاهک‌ها ۲۰۰ میکرولیتر بود. آمپی‌سیلین در محدوده غلظتی ۵-۵۰۰ mg/ml همراه با محیط

در پژوهش حاضر سنجش عصاره علیه هر میکروارگانیسم دوبار بررسی گردید.

### یافته‌ها

نتایج نشان داد که عصاره متانولی بر رشد ۵ گونه باکتری شامل *Bacillus subtilis*، *Bacillus Polymixa*، *Enterococcus faecalis* و *Nocardia*، *Staphylococcus aureus* دارای اثر مهاری است (جدول ۱). عصاره آبی گلپر ایرانی فاقد فعالیت ضد میکروبی علیه هر یک از گونه‌های باکتریایی یا قارچی آزمایش شده در این مطالعه است. حداکثر هاله‌های مهاری و مقادیر MIC و MBC برای میکروارگانیسم‌های حساس به عصاره متانولی گلپر ایرانی به ترتیب در محدوده ۷-۱۴mm، ۲۵-۲۵۰mg/ml و ۵۰-۵۰۰mg/ml بود. (جدول ۲و۱).

جدول ۲- مقادیر MIC و MBC عصاره متانولی هراکلوم پرشیکم علیه میکروارگانیسم‌های آزمایش شده از طریق

#### سنجش Microdilution

داروی استاندارد آمپی سیلین (mg/ml)	عصاره متانولی		میکروارگانیسم
	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)	
۱۰۰	۲۵	۵۰	<i>Bacillus polymixa</i>
۲۰۰	۵۰	۱۰۰	<i>Baxillus subtilis</i>
۵۰۰	۲۵۰	۵۰۰	<i>Enterococcus faecalis</i>
۲۰۰	۱۰۰	۲۰۰	<i>Nocardia</i>
۵۰۰	۲۰۰	۵۰۰	<i>Staphylococcus aureus</i>

### بحث

در پژوهش حاضر، ترکیبات ضد میکروبی میوه گلپر ایرانی جمع‌آوری شده از ارتفاعات اشکور تنکابن که در شمال ایران واقع است، علیه برخی از میکروارگانیسم‌ها بر اساس روش سنجش انتشار دیسک و سنجش Microdilution عصاره‌گیری گردیدند. فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های آبی و متانولی گلپر ایرانی علیه میکروارگانیسم‌ها بررسی شد و این قابلیت به طور کمی به وسیله حضور یا عدم حضور هاله مهاری و قطر هاله (جدول ۱) و مقادیر MIC و MBC (جدول ۲) تعیین گردید. عصاره متانولی بر رشد ۵ گونه باکتری دارای اثر مهاری بود حال آنکه عصاره آبی گلپر ایرانی فاقد فعالیت ضد میکروبی

مولر هینتون براث و تلقیح میکروبی مشابه با چاهک‌های دیگر به مثابه داروی استاندارد برای کنترل مثبت استفاده گردید. به دلیل رنگی بودن عصاره گلپر ایرانی، ۱۰۰ میکرولیتر محیط مولر هینتون براث و ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره گلپر ایرانی در محدوده غلظت ۵-۵۰۰mg/ml به داخل یک ردیف از چاهک‌ها به ترتیب منتقل شد و به منزله کنترل زمینه، مورد استفاده قرار گرفت. پلیت ELISA با درپوش پلیت استریل پوشانده شد. محتویات هر چاهک روی شیکر به مدت ۶۰ ثانیه با دور ۱۰۰rpm مخلوط گردید و سپس در دمای ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. رشد میکروبی با میزان جذب در طول موج ۶۲۰nm با استفاده از reader میکروپلیت 2100 (شرکت Awareness Technology) تعیین شد و به کمک کشت ۵ میکرولیتر از نمونه‌های چاهک‌های شفاف روی محیط مولر هینتون آگار تایید گردید.

جدول ۱- فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌های هراکلوم پرشیکم (5mg/disc) علیه گونه‌های باکتریایی و قارچی آزمایش شده

#### بر اساس روش انتشار دیسک

میکروارگانیسم	ATCC CODE	عصاره		قطر منطقه مهاری اطراف دیسک	
		عصاره متانولی آبی منفی استاندارد (mm)	عصاره کنترل آنتی‌بیوتیک (mm)	عصاره متانولی آبی منفی استاندارد (mm)	عصاره کنترل آنتی‌بیوتیک (mm)
<i>Bacillus polymixa</i>	۱۰۲۰	۱۲	-	-	*۲۲
<i>Bacillus subtilis</i>	۶۰۵۱	۹	-	-	*۲۵
<i>Corynebacterium Diphtheria</i>	۱۰۳۰	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	۲۹۲۱۲	۷	-	-	*۱۸
<i>Escherichia coli</i>	۱۰۴۶	-	-	-	§۱۶
<i>Micrococcus Luteus</i>	۱۱۰۹	-	-	-	§۱
<i>Nocardia</i>	۵۰۲۷	۱۴	-	-	*۵۰
<i>Proteus vulgaris</i>	۱۰۷۹	-	-	-	§۱۵
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	۱۰۷۴	-	-	-	§۱۰
<i>Salmonella gallinarum</i>	۱۰۹۳	-	-	-	§۲۰
<i>Shigella dysenteriae</i>	۱۱۸۸	-	-	-	§۱۵
<i>Staphylococcus aureus</i>	۲۹۲۱۳	-	-	-	*۱۵
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	۱۱۱۴	-	-	-	§۲۱
<i>Streptococcus</i>	۱۴۴۷	-	-	-	§۲۱
<i>Candida albicans</i>	۱۰۲۳۹	-	-	-	تست نشد
<i>Aspergillus flavus</i>	۹۱۱۰	-	-	-	تست نشد

\* استرپتومایسین (10mg/disc) § فورازولیدون (100mg/disc)

ایرانی که دارای ترکیبات با خواص ضدباکتریایی است به منزله عوامل ضد میکروبی در داروهای جدید برای درمان بیماران عفونی مورد استفاده قرار گیرد.

### تشکر و قدردانی

بدین وسیله از اساتید و کارکنان بخش بیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن تشکر و قدردانی می شود.

علیه هر یک از گونه‌های باکتریایی یا قارچی آزمایش شده در این مطالعه بود.

این اولین پژوهشی است که اثبات می‌کند عصاره متانولی گلپر ایرانی شامل مواد ضد میکروبی با اثرات ضدباکتریایی است. به علاوه این نتایج، مطالعات قبلی را مبنی بر اینکه متانول برای استخراج مواد ضد میکروبی از گیاهان دارویی در مقایسه با دیگر حلالها از جمله آب، اتانول و هگزان حلال بهتری است، تایید می‌نماید (۸، ۴). پیشنهاد می‌شود که عصاره متانولی گلپر

## REFERENCES

- زرگری علی، مولف. گیاهان دارویی. انتشارات دانشگاه تهران، صفحه ۶۱۹.
- Mandenova I. *Heracleum*. In: Rechinger KH, editor. *Flora Iranica, Umbelliferae*, No, 162. 1987;p:492-502.
- Kokoska L, Polesny Z, Resa V, et al. Screening of some Siberian medicinal plants for antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology* 2002;82:51-3.
- Karaman I, Sahin F, Gullule M, et al. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus Oxycedrus* L. *Journal of Ethnopharmacology* 2003;85:231-5.
- Okeke MI, Iroegbu GU, Eze EN, et al. Evaluation of extracts of the root of *Landolphia Owerrience* for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology* 2001;78:119-27.
- Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, et al (editors). *Manual of clinical microbiology*. ASM, Washington D.C., 1995.
- Masika PJ, Afolayan AJ. Antimicrobial activity of some plants used for the treatment of livestock disease in the Eastern Cape, South Africa. *Journal of Ethnopharmacology* 2002;83:129-34.
- Zgoda LR, Porter JR. A convenient microdultion method for screening natural products against bacteria and fungi. *Pharmaceut Biol* 2001;39(3):221-5.