

خواص ضد میکروبی ریشه و اندام هوایی گیاه گل میمونی سازویی علیه باکتری‌های اش‌ریشیاکلی، باسیلوس سرئوس و استافیلوکوکوس اورئوس در شرایط آزمایشگاهی

فرشته صفوی، پونه ابراهیمی*، حسین میقانی

گروه شیمی، دانشگاه گلستان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۱/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱/۱۷

چکیده

زمینه و هدف: با توجه به عوارض جانبی ناشی از مصرف داروهای شیمیایی، جایگزین کردن این داروها با ترکیبات طبیعی با خواص ضد باکتریایی مورد توجه قرار گرفته است. هدف این مطالعه، بررسی اجزای فیتوشیمیایی و خواص ضد میکروبی ریشه و اندام هوایی گیاه گل میمونی سازویی علیه باکتری‌های اش‌ریشیاکلی، باسیلوس سرئوس و استافیلوکوکوس اورئوس در شرایط آزمایشگاهی بود.

روش بررسی: در این مطالعه، اثرات ضد میکروبی عصاره‌های مختلف ریشه و عصاره متانولی اندام هوایی، حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت میکروب‌کشی عصاره‌ها، با روش دیسک دیفیوژن و نیز رقت لوله‌ای بر باکتری‌های اش‌ریشیاکلی، باسیلوس سرئوس و استافیلوکوکوس اورئوس مورد سنجش قرار گرفت. از دی‌متیل‌سولفوکسید به‌عنوان شاهد منفی و از آمپی‌سیلین و نالیدیکسیک‌اسید به‌عنوان شاهد‌های مثبت استفاده شد. داده‌ها با آزمون آماری آنالیز واریانس تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: ریشه و اندام هوایی گیاه گل میمونی سازویی حاوی فلاونوئیدها، گلیکوزیدها، ساپونین‌ها، تانن‌ها و ترپنوئیدها بود. هاله عدم رشد به وسیله عصاره‌های کلروفرمی و اتیل‌استاتی ریشه مشاهده نشد. در صورتی‌که، عصاره متانولی ریشه، مؤثرترین عصاره بر باسیلوس سرئوس با هاله عدم رشد ۲۱ میلی‌متر، حداقل غلظت مهارکنندگی ۶۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و حداقل غلظت میکروب‌کشی ۷۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. عصاره متانولی اندام هوایی دارای کمترین اثر بر روی اش‌ریشیاکلی بود.

نتیجه‌گیری: عصاره متانولی ریشه و اندام هوایی گیاه گل میمونی دارای اثر ضد میکروبی به‌ویژه بر روی باکتری باسیلوس سرئوس بود. بنابراین، تحقیقات بیشتری برای شناسایی ترکیبات مختلف این گیاه و دستیابی به فرمولاسیون جدیدی از این ترکیبات در این گیاه لازم است.

واژه‌های کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، اش‌ریشیاکلی، باسیلوس سرئوس، ضد میکروبی، گل میمونی سازویی

*نویسنده مسئول: پونه ابراهیمی، گرگان، دانشگاه گلستان، دانشکده شیمی، گروه شیمی

مقدمه

گیاه درمانی در بیماری‌ها و به ویژه بیماری‌های عفونی در سال‌های اخیر روند رو به فزونی پیدا کرده است. متخصصین عفونی تمایل زیادی به استفاده از این داروها جهت درمان عفونت‌ها دارند، زیرا عوارض این داروها در مقایسه با داروهای شیمیایی به طور قابل ملاحظه‌ای پایین‌تر است (۱). بررسی تاریخی استفاده از گیاه درمانی از زمان‌های گذشته تا اواسط قرن بیستم، نشان دهنده افت مصرف گیاهان دارویی تا دهه ۱۹۴۰ و افزایش مجدد استفاده از آنها تا دهه ۱۹۸۰ می‌باشد. امروزه با پیشرفت‌های حاصل شده در شیمی آلی و تحولات چشمگیر در روش‌های استخراج، تخلیص و تعیین ساختمان ترکیبات طبیعی گیاهان، ارزش داروهای حاصل از منابع گیاهی روز به روز آشکارتر شده، به طوری که در حال حاضر حدود یک سوم تا نیمی از فرآورده‌های دارویی موجود در آمریکا دارای منشأ گیاهی هستند (۲). همچنین در انگلستان تولیدات گیاهی و مکمل‌های فراوانی به شکل سالم و بی‌خطر تولید شده است (۳). مطالعات نشان می‌دهد که تمایل زیاد به استفاده از این داروها جهت درمان عفونت‌ها به علت عوارض پایین‌تر این داروها نسبت به داروهای شیمیایی است. بسیاری از خواص ضد میکروبی عصاره‌های گیاهی به علت وجود موادی همچون ترکیبات فنولی و پلی فنولیک اسیدها، تریپنئیدها و اسانس‌ها، آلکالوئیدها، ترکیبات سولفوردار و نظایر آن می‌باشد که در قسمت‌های مختلف گیاه نظیر ریشه،

برگ، جوانه‌ها، نهال و پوست وجود دارد. با توجه به افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی، در اثر مصرف داروهای ضد میکروبی جهت پیشگیری و درمان عفونت‌ها و همچنین عوارض جانبی و اثرات سوء متفاوت آنها، بررسی و تحقیق بر روی گیاهان دارویی به منظور کشف منابع جدید دارویی علیه عفونت‌های باکتریایی مور نیاز می‌باشد. لذا استفاده از گیاهان دارویی و ترکیبات شیمیایی آنها می‌توانند فواید بالقوه‌ای در حل این مشکلات داشته باشند (۴).

استافیلوکوکوس اورئوس یک کوکسی گرم مثبت و بی‌هوازی اختیاری است که مهم‌ترین گونه در سرده استافیلوکوک از نظر پزشکی محسوب می‌شود. گاهی اوقات به این باکتری، استافیلوکوک طلایی نیز می‌گویند. اورئوس در زبان لاتین به معنای طلایی است (۵). این باکتری ممکن است به شکل فلور عادی پوست یا بینی وجود داشته باشد. این‌طور تخمین زده می‌شود که ۲۰ درصد از مردم به مدت طولانی، ناقل این باکتری می‌باشند. این باکتری، یکی از موفق‌ترین باکتری‌های بیماری‌زاست که به دلیل تولید رنگدانه طلایی کارتنوئیدی به نام استافیلوزانتین کلنی‌های زرد رنگی را ایجاد می‌نماید. این پیگمان در بیماری‌زایی نقش دارد، زیرا به عنوان ماده آنتی‌اکسیدان عمل کرده و موجب در امان ماندن باکتری در برابر رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شود. رادیکال‌های آزاد اکسیژن به وسیله سیستم ایمنی (گلوبول‌های سفید) میزبان برای کشتن باکتری‌ها تولید می‌شوند (۶). اشیریشیاکلی که به طور اختصار E. coli نیز نامیده می‌شود، یک باسیل

و همچنین بررسی خاصیت ضدباکتری روی ریشه این گیاه صورت نگرفته است، هدف این مطالعه بررسی خواص ضد میکروبی ریشه و اندام هوایی گیاه گل میمونی سازویی علیه باکتری‌های اشریشیاکلی، باسیلوس سرئوس و استافیلوکوکوس اورئوس در شرایط آزمایشگاهی بود.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی، اندام هوایی گیاه گل میمونی سازویی در فصل بهار و ریشه آن در فصل تابستان از منطقه تختان(شهرستان دهلران، استان ایلام) جمع‌آوری شد و در سایه خشک گردید. عصاره نمونه‌ها به وسیله خیساندن ۱۰ گرم پودر گیاه در ۲۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد به مدت ۲۴ ساعت تهیه شده و با کاغذ واتمن صاف گردید. آزمایش‌های شیمیایی زیر روی عصاره به منظور تعیین کیفی ترکیبات ثانویه انجام شدند؛ ۱- با افزودن چند قطره از واکنشگر مایر به محلول حاوی آلکالوئید، رسوب زرد رنگی تشکیل می‌شود(۱۰). در واقع بسیاری از آلکالوئیدها در محلول‌های خنثی یا کمی اسیدی به وسیله واکنشگر مایر رسوب می‌کنند. در این مطالعه، پس از تبخیر حلال، عصاره موردنظر خشک گردیده و باقی‌مانده در اسید کلریدریک ۲ درصد و در حمام آب جوش حل گردید. بعد از سرد شدن، مخلوط حاصل فیلتر شده و به آن چند قطره واکنشگر مایر اضافه

گرم منفی از خانواده آنتروباکتریاسه است که به‌طور شایع در روده جانوران خونگرم وجود دارد. بیشتر سویه‌های اشریشیاکلی بی‌آزار هستند که این سویه‌ها، بخشی از فلور عادی روده هستند که در تولید ویتامین K₂ نقش دارند و از استقرار باکتری‌های بیماری‌زا در روده جلوگیری می‌کنند، اما برخی از سروتیپ‌ها موجب مسمومیت غذایی و اسهال می‌شوند و از طریق مسیر مدفوعی-دهانی از یک فرد به فرد دیگر منتقل می‌شود (۷). باسیلوس سرئوس باسیل گرم مثبت و اسپوردار از خانواده‌ی باسیلاسه است. این باکتری در انسان باعث مسمومیت غذایی و التهاب چشم ضربه‌ای می‌شود و به‌صورت گسترده‌ای در طبیعت و آب و خاک پراکنده شده، به طوری که می‌توان آن را از مواد غذایی جدا نمود. این باکتری قادر به ایجاد آنتروتوکسین‌های اسهال و تهوع می‌باشد(۸). گل میمونی سازویی^(۱) از تیره Scrophulariaceae می‌باشد که اکثراً علفی یا بوته‌ای و به ندرت درختی با برگ‌های متناوب، متقابل یا فراهم، ساده و بدون گوشوارک و گل‌های پنج‌پر یا زیگومورف با جام گل دارای لوب و میوه(به صورت کپسول) با دانه‌های متعدد می‌باشد(۹). از آنجایی که در غرب کشور ایران به صورت سنتی و بومی از جوشانده و دم کرده گیاه گل میمونی برای درمان عفونت‌های سطحی، عمقی و داخلی استفاده می‌شود، با تعیین حضور مواد فیتوشیمی در این گیاه، دلیل استفاده از آن در درمان سنتی بیماری‌ها آشکار می‌گردد. از آنجا که تاکنون هیچ بررسی فیتوشیمیایی

1-Scrophularia Striata

گردید. کدری شدن نمونه یا تشکیل رسوب زردرنگ نشان‌دهنده وجود آلکالوئیدهاست. ۲- عصاره در اسید استیک گلاسیال حل نموده و سپس چند قطره کلرید آهن ۵ درصد و اسید سولفوریک غلیظ به آن می‌افزائیم. ایجاد رنگ قهوه‌ای - قرمز در تقاطع لایه‌ها و رنگ سبز- آبی در لایه بالا نشان‌دهنده وجود گلیکوزیدهاست (۱۰). ۳- به ۴ میلی‌گرم از عصاره، ۰/۵ میلی‌لیتر انیدرید استیک و ۰/۵ میلی‌لیتر کلروفرم اضافه شد. سپس اسید سولفوریک غلیظ به آرامی به مخلوط اضافه گردید. ایجاد رنگ بنفش - قرمز نشان‌دهنده تریپنئید و رنگ سبز- آبی نشان‌دهنده استروئیدهاست (۱۰). ۴- به ۴ میلی‌لیتر از عصاره، ۱/۵ میلی‌لیتر متانول ۵۰ درصد اضافه گردید. سپس به محلول گرم آن، فلز منیزیم و ۵-۶ قطره اسیدکلریدریک غلیظ اضافه شد. رنگ قرمز مربوط به وجود فلاونوئیدها و رنگ نارنجی مربوط به فلاون‌ها می‌باشد (۱۰). ۵- به ۰/۵ میلی‌لیتر محلول عصاره، یک میلی‌لیتر آب و ۲-۱ قطره کلرید آهن ۵ درصد اضافه شد. رنگ آبی نشان‌دهنده گالیک تانن‌ها و رنگ سبز تیره نشان‌دهنده کاتچول تانن‌هاست (۱۱). ۶- ۰/۵ گرم عصاره با اسیدکلریدریک ۱۰ درصد برای چند دقیقه در حمام آب گرم جوشانده و سپس صاف شد. پس از سرد شدن، به میزان هم حجم با محلول، کلروفرم و سپس چند قطره آمونیاک ۱۰ درصد اضافه و گرما داده شد. رنگ صورتی نشان‌دهنده وجود آنتراکینون‌هاست (۱۰). ۷- حدود ۰/۲ گرم از عصاره با ۵ میلی‌لیتر آب مقطر تکان داده شده و سپس محلول

تا دمای جوش حرارت داده شد. تولید کف نشان‌دهنده وجود ساپونین‌هاست (۱۱). ۸- ۰/۵ گرم عصاره در آب مقطر حل شده و سپس فیلتر می‌شود. محلول فیلتر شده با محلول اسیدکلریدریک ۲ درصد جوشانده می‌شود. رسوب قرمز نشان‌دهنده فلوپاتانن‌هاست (۱۱). ۹- به ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول عصاره گرم، یک میلی‌لیتر آب و ۸-۵ قطره محلول فهلینگ اضافه می‌شود. رسوب قرمز آجری نشان‌دهنده وجود قندهای احیایی می‌باشد (۱۱).

به‌منظور تعیین خاصیت ضد میکروبی ریشه و اندام هوایی گیاه گل میمونی سازویی، میکروارگانیسم‌های اشرشیاکلی (PTCC1330- *Escherichia coli*)، استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus* PTCC1112) و باسیلوس سرئوس (*Bacillus cereus* PTCC1247) از دانشکده صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان تهیه شدند.

برای گرفتن عصاره‌ی گیاه از روش خیساندن استفاده شد. ۲۰ گرم پودر خشک شده اندام هوایی به وسیله ۱۰۰ میلی‌لیتر متانول عصاره‌گیری شد. ارلن حاوی ۲۰ گرم پودر خشک شده ریشه گیاهی نیز با ۱۰۰ میلی‌لیتر از حلال کلروفرم پر شد و روی تکان‌دهنده قرار گرفت تا عمل استخراج مواد مؤثره به‌خوبی صورت پذیرد. پس از چندبار تعویض حلال، کنترل پایان عصاره‌گیری با کلروفرم با استفاده از صفحات TLC انجام شد. سپس گیاه را خشک کرده و عمل عصاره‌گیری با حلال اتیل استات دنبال شد. پس

منظور مقایسه با عصاره‌ی ضد میکروبی مورد آزمایش، بر سطح محیط کشت باکتری قرار داده شده و پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در گرم‌خانه قرار داده شدند. در پایان دوره‌ی گرم‌خانه‌گذاری هاله‌ی عدم رشد، در اطراف هر دیسک با یک خط کش میلی‌متری به‌دقت اندازه‌گیری شد. این کار برای هر رقت و هر باکتری به‌طور جداگانه، حداقل ۳ بار انجام پذیرفت. در این بررسی، از دیسک‌های استریل فاقد هر گونه ماده‌ی ضد میکروبی و آغشته به دی‌متیل‌سولفوکسید نیز به‌عنوان کنترل منفی استفاده گردید. از آمپی‌سیلین و نالیدیکسیک‌اسید نیز به‌عنوان شاهد‌های مثبت استفاده شد.

به منظور تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد باکتری^(۴) و حداقل غلظت کشندگی^(۵) آزمایش‌ها در دو مرحله طراحی و از روش اصلاح شده ماکرودایلوشن (توصیه شده به وسیله NCCLS^(۶)) استفاده گردید^(۱۳). بدین ترتیب که سوسپانسیون با غلظت معادل ۰/۵ مک فارلند از باکتری تهیه شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تحت تأثیر رقت‌های متوالی در محدوده غلظت ۲۰-۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰، ۱۲۰، ۱۶۰ و ۲۰۰) قرار گرفتند و بعد از ۲۴ ساعت با مشاهده کدورت لوله‌ها، آخرین لوله‌ای

از اتمام عصاره‌گیری و خشک شدن گیاه، عصاره‌گیری با حلال متانول انجام شد. سه عصاره را با صافی کتانی و بعد با صافی کاغذی صاف کرده و با استفاده از دستگاه تقطیر در خلأ تغلیظ نموده و عصاره‌ی خشک آن به ازای مقدار معینی از گیاه تعیین گردید. سپس مقدار ۰/۴ گرم از هر نوع عصاره (کلروفومی، اتیل استاتی و متانول) در ۵ میلی‌لیتر دی‌متیل‌سولفوکسید حل شده و با استفاده از فیلترهای سرسرنگی میلی پور به قطر ۰/۲۲ میکرومتر صاف و استریل شدند. سپس تحت تأثیر رقت‌های متوالی غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره‌ها تهیه شد.

در این تحقیق، از روش انتشار دیسکی^(۱) برای اندازه‌گیری هاله عدم رشد استفاده شد. در روش انتشار از طریق دیسک کاغذی، جهت تعیین حساسیت میکروارگانیسم‌ها نسبت به مواد ضد میکروبی بر طبق روش متداول کربی-بوئر^(۲) عمل گردید^(۱۲).

ابتدا سوسپانسیون میکروبی معادل ۰/۵ مک فارلند^(۳) بر اساس روش استاندارد تهیه شد (۰/۵ میلی‌لیتر کلرید باریم ۰/۰۴۸ مولار و ۹۹/۵ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک ۱ درصد). سپس با استفاده از یک سوآب استریل اشباع شده از سوسپانسیون میکروبی، کشت سفره‌ای فشرده‌ای در تمام سطح محیط کشت مولر هینتون آگار (شرکت Merk آلمان) ایجاد گردید. سپس دیسک‌های (شرکت پادتن طب) اشباع شده از ماده‌ی ضد میکروبی و نیز بعضی از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی نظیر آمپی‌سیلین و نالیدیکسیک‌اسید به

1-Disk diffusion method
2-Kirby-Bauer
3-McFarland
4-Minimum Inhibitory Concentration (MIC)
5-Minimum bactericidal Concentration (MBC)
6-National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)

که فاقد کدورت بود به عنوان MIC در نظر گرفته شد، ولی برای سنجش MBC، کشت مجددی از لوله‌های MIC که در آن‌ها کدورتی دیده نشد و یک رقت پایین‌تر و بالاتر از آن بر روی محیط مولر هینتون آگار صورت گرفت. بعد از ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری پلیت‌ها در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، آخرین لوله‌ای که هیچ‌گونه رشدی از باکتری روی پلیت مربوطه نداشت، به عنوان MBC در نظر گرفته شد. تأثیر هر کدام از عصاره‌ها با هم و نیز با دو آنتی‌بیوتیک، با روش آنالیز واریانس مقایسه شدند.

یافته‌ها

نتایج حاصل از آزمایش‌های فیتوشیمیایی مقدماتی بر روی گیاه گل میمونی سازویی به منظور تعیین وجود یا عدم وجود متابولیت‌های ثانویه در جدول ۱ آمده است. بر اساس این مطالعه ریشه و اندام هوایی گیاه گل میمونی سازویی، حاوی فلاونوئید، گلیکوزید، ساپونین، تانن و تریپنویید می‌باشند.

نتایج به‌دست آمده از آزمون مقایسه میانگین‌های قطر هاله عدم رشد غلظت‌های مختلف عصاره ریشه گیاه گل میمونی بر سه باکتری مورد مطالعه نشان‌دهنده آن است که تفاوت معنی‌داری بین پنج غلظت عصاره ریشه وجود دارد ($P < 0.05$)، ولی چنانچه میانگین‌ها به صورت دوتایی با هم مقایسه شوند میان دو غلظت ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و سه غلظت ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم در

میلی‌لیتر تفاوت معنی‌داری از نظر آماری وجود ندارد ($P > 0.05$). به بیان دیگر دو غلظت گروه اول (۴۰ و ۸۰) و سه غلظت گروه دوم (۵ و ۱۰ و ۲۰) از نظر قطر هاله عدم رشد مانند هم عمل می‌کنند، اما میان هر کدام از غلظت‌های گروه اول و غلظت‌های گروه دوم تفاوت معنی‌داری وجود دارد. این نتایج در مورد باسیلوس سرئوس نشان داد که میانگین غلظت‌های مختلف ریشه گیاه با آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین تفاوت معنی‌داری داشته و بهتر از آن عمل می‌کند (جدول ۲). نتایج به‌دست آمده از آزمون مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد غلظت‌های مختلف عصاره اندام هوایی گیاه گل میمونی بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی نشان دهنده آن است که بین سه غلظت ۸۰ و ۴۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، و در مورد باکتری باسیلوس سرئوس میان دو غلظت ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (جدول ۳). نتایج این بررسی هم‌چنین نشان داد که اثر غلظت‌های مختلف ریشه و اندام هوایی گیاه گل میمونی سازویی بر میانگین قطر هاله عدم رشد سه میکروارگانیسم مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری داشته و در واقع ریشه نسبت به اندام هوایی هاله عدم رشد بزرگ‌تری ایجاد می‌کند.

نتایج حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی از رشد میکروارگانیسم و حداقل غلظت کشندگی میکروارگانیسم برای ریشه و اندام هوایی گیاه گل میمونی سازویی در جدول ۴ نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود بیشترین اثر مربوط به

گروه‌های متفاوتی از ترکیبات ثانویه می‌باشند. به عنوان مثال، می‌توان به ایریدوئیدها، اسیدهای فنولیک، فنیل پروپانوئیدها، فلاونوئیدها و ساپونین‌ها اشاره کرد. بسیاری از این ترکیبات دارای فعالیت ضد التهابی، ضد میکروبی، ادرار آوری، قارچ‌کشی، تعدیل‌کننده‌ی سیستم ایمنی، تعدیل‌کننده‌ی سیستم قلبی - عروقی و فعالیت ضد توموری می‌باشند (۱۷-۱۴). هدف این مطالعه بررسی فیتوشیمیایی مقدماتی و بررسی خاصیت ضدباکتریایی ریشه و اندام هوایی گیاه گل میمونی سازویی بود.

عصاره متانولی ریشه بر باکتری باسیلوس سرئوس می‌باشد که میزان MIC و MBC برای آن به ترتیب برابر با ۶۰ و ۷۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. در این حالت قطر هاله عدم رشد بر روی محیط مولر هینتون آگار در مقابل دیسک‌های اشباع شده از عصاره‌ی متانولی ریشه برابر با ۲۱ میلی‌متر برای باکتری باسیلوس سرئوس می‌باشد.

بحث

وجود خواص ضد عفونی‌کنندگی علاوه بر اثرات درمانی از عوامل توجه طب سنتی به گیاهان دارویی در سال‌های اخیر بوده است. بسیاری از گونه‌های شناخته شده جنس اسکروفولاریا شامل

جدول ۱: نتایج حاصل از بررسی آزمایش‌های فیتوشیمیایی مقدماتی بر روی گیاه گل میمونی

ریشه	اندام هوایی	مشاهدات	روش بررسی	نوع متابولیت ثانویه
-	-	ایجاد رسوب زرد کم‌رنگ	تست مایر	آلکالوئیدها
-	-	ایجاد رسوب نارنجی کدر	تست دراگندورف	آنتراکینون‌ها
-	-	عدم ایجاد رنگ زرد	واکنش بورن تراگر	فلاونوئیدها
+	+	ایجاد محلول قرمز رنگ	تست شینودا	گلیکوزیدها
+	+	ایجاد محلول زرد طلایی	واکنش آلکالین	قند احیایی
+	+	ایجاد محلول قرمز - قهوه‌ای	تست کیلر کیلیانی	ساپونین‌ها
-	-	ایجاد محلول سبز رنگ با فلهینگ A ایجاد محلول قهوه‌ای رنگ با فلهینگ B	تست فلهینگ	تانن‌ها
+	+	ایجاد کف ماندگار	تست فورث	تریپنوئیدها
+	+	ایجاد محلول آبی رنگ برای گالیک تانن‌ها ایجاد محلول سبز تیره برای کاتچولیک تانن‌ها	واکنش با فریک کلرید	استروئیدها
+	+	ایجاد محلول قرمز - بنفش	تست لیبرمن - بوشارد	
+	-	ایجاد محلول سبز - آبی	تست لیبرمن - بوشارد	

جدول ۲: مقایسه میانگین قطر هاله‌های ایجاد شده علیه سه باکتری باسیلوس سرئوس، اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس (میانگین ۳ بار تکرار) به وسیله غلظت‌های مختلف عصاره متانولی ریشه گیاه گل میمونی در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه

متغیر	غلظت عصاره بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر					نالییدیسیک اسید	آمپی سیلین	دی متیل سولفوکسید
	۵	۱۰	۲۰	۴۰	۸۰			
استافیلوکوکوس اورئوس	۸±/۱	۹±/۳	۹/۵±/۲	۱۲±/۱	۱۲±۰/۱	۸	۱۹	-
اشرشیاکلی	۸±/۴	۹±/۲	۹/۵±/۳	۱۱±/۱	۱۴±/۲	۲۱	-	-
باسیلوس سرئوس	۱۸±/۲	۱۸/۵±/۱	۱۹±/۲	۲۱±/۳	۲۱±/۳	۲۳	۱۵	-

جدول ۳: مقایسه میانگین قطر هاله‌های ایجاد شده علیه سه باکتری باسیلوس سرئوس، اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس (میانگین ۳ بار تکرار) به وسیله غلظت‌های مختلف عصاره متانولی اندام هوایی گیاه گل میمونی در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه

متغیر	غلظت عصاره بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر					دی متیل سولفوکسید	آمی سیلین	نالیدیکسیک اسید	باکتری
	۵	۱۰	۲۰	۴۰	۸۰				
استافیلوکوکوس اورئوس	-	-	۹±/۲	۹/۵±/۲	۹/۵±۰/۳	-	۲۱±۰/۴	۱۱±۰/۴	استافیلوکوکوس اورئوس
اشرشیاکلی	۷/۵±/۳	۷/۵±/۲	۸±/۳	۸/۵±/۲	۸/۵±/۱	-	-	۲۹±۰/۳	اشرشیاکلی
باسیلوس سرئوس	-	۸/۵±/۳	۹/۵±/۳	۹/۵±/۲	۱۱±/۱	-	۱۹±۰/۴	۲۶±۰/۲	باسیلوس سرئوس

جدول ۴: حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی و حداقل غلظت کشندگی (بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) عصاره متانولی ریشه و اندام هوایی گیاه گل میمونی سازویی در برابر باکتری‌های مورد مطالعه

ریشه		اندام هوایی		باکتری	
MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC
۱۰۰	۹۰	-	*	-	-
۱۰۰	۹۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
۷۰	۶۰	۱۰۰	۹۰	۷۰	۶۰

* عصاره روی باکتری اثر نداشت.

بیشتر از طریق حلال‌های اتانولی و متانولی استخراج می‌شوند. در طب سنتی از عصاره‌های آبی استفاده می‌شود، اما تحقیقات نشان داده‌اند عصاره‌های تهیه شده با حلال‌های آلی، اثر ضد میکروبی پایدارتر و بیش‌تری دارند، زیرا بیشتر ترکیبات فعال ضد میکروبی شناخته شده، در آب نامحلول هستند و بنابراین عصاره‌های حاصل از حلال‌های آلی برای استخراج ترکیبات ضد میکروبی توانمندی بیشتری دارند (۱۸).

میانگین قطر هاله‌های به دست آمده از روش دیسک دیفیوژن نشان داد که بیشترین اثر مربوط به عصاره متانولی ریشه گیاه مذکور بر باسیلوس سرئوس و پس از آن بر اشرشیاکلی بوده است. معمولاً باکتری‌های گرم منفی به ترکیبات ضد میکروبی گیاهی مقاومند، مگر آن‌که از غلظت‌های بالای آن

در گیاه مورد مطالعه هاله عدم رشد به وسیله هیچ‌کدام از عصاره‌های کلروفرمی و اتیل‌استاتی ریشه مشاهده نگردید. در صورتی‌که میانگین قطر هاله‌های به دست آمده از عصاره متانولی، نشان‌دهنده اثر مهار این عصاره بر هر سه باکتری می‌باشد که بیشترین اثر روی باکتری باسیلوس سرئوس مشاهده شد. با توجه به قطر هاله عدم رشد در دیسک‌های کنترل مثبت و منفی، عصاره متانولی ریشه در غلظت ۸۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر دارای کمترین اختلاف نسبت به هاله عدم رشد در آنتی‌بیوتیک نالیدیکسیک اسید بود. عصاره متانولی ریشه در غلظت ۶۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر می‌تواند از رشد این باکتری جلوگیری نموده و در غلظت ۷۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر این باکتری را از بین می‌برد. تقریباً همه ترکیبات ضد میکروبی شناخته شده گیاهی، آروماتیک یا ترکیبات آلی هستند و

عصاره هگزانی اثر مهارکنندگی روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس نشان دادند که از این میان بیشترین هاله عدم رشد (۱۳ میلی‌متر) را عصاره آبی نشان داد (۲۰). در مطالعه‌ای که فرناندز و همکاران (۱۹۹۶) روی دو گونه *S. frutescens* و *S. sambucifolia* انجام دادند نیز مانند اکثر گونه‌های جنس اسکروفولاریا (از جمله گیاه مورد مطالعه)، بیشترین اثر مهار، روی باکتری گرم مثبت باسیلوس سرئوس مشاهده شد. مقدار MIC در این حالت برابر با ۰/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود، هم‌چنین نتایج این محققین نشان داد که گونه *S. frutescens* به دلیل دارا بودن ترکیبات فنولیک غنی‌تر، فعالیت بالاتری را نسبت به گونه *S. sambucifolia* در برابر هر سه باکتری اشریشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس دارد (۱۶). معمولاً خواص ضد میکروبی گیاهان به یک نوع خاص متابولیت ثانویه نسبت داده نمی‌شود، بلکه به همکاری ترکیبات موجود در گیاه نسبت داده می‌شود. ترکیبات فیتوشیمیایی با خاصیت ضد میکروبی به چند گروه تقسیم می‌شوند که شامل ترکیبات فنلی و پلی‌فنول‌ها که شامل؛ فنل‌های ساده و فنولیک اسیدها، کینون‌ها، فلاونوئیدها، تانن‌ها و کومارین‌ها می‌باشند، ترپنوئیدها و اسانس‌ها، آلکالوئیدها، لکتین‌ها و پروتئین‌ها می‌باشند (۱۹ و ۲۲).

نتیجه‌گیری

در بررسی حاضر خواص ضد میکروبی گیاه گل میمونی سازویی به‌خصوص اثر مهارکنندگی قوی

استفاده شود (۱۹). در این بررسی، کمترین اثر حاصل، مربوط به اثر عصاره اندام هوایی بر اشریشیاکلی بود. در واقع در هر دو عصاره ریشه و اندام هوایی، بیشترین اثر بر باکتری باسیلوس سرئوس مشاهده شد. فعالیت ضد میکروبی اجزای متفاوت گونه‌های مختلف جنس اسکروفولاریا به‌وسیله محققان مورد بررسی قرار گرفته و همه‌ی این مطالعه‌ها خواص ضد میکروبی آن‌ها را به اثبات رسانده‌اند (۲۲-۲۰). تاکنون فقط یک گزارش از بررسی فیتوشیمیایی اندام هوایی گیاه گل میمونی سازویی منتشر شده است که در آن ترکیباتی از قبیل اسیدهای فنولیک، فلاونوئیدها و فنیل پروپانوئیدها جداسازی شده‌اند که خاصیت ضد میکروبی اندام هوایی این گیاه را می‌توان به این ترکیبات نسبت داد (۲۳). ساز و کار سمیت فنول‌ها و فنولیک اسیدها در برابر میکروارگانیسم‌ها از طریق مهار آنزیمی ترکیبات اکسید شده و یا از طریق واکنش با گروه‌های سولفیدریل یا یک واکنش غیر اختصاصی با پروتئین‌ها می‌باشد (۲۴). در مطالعه‌ای که استاوری و همکاران (۲۰۰۶) روی گونه *Scrophularia. deserti* انجام دادند، ترکیبات ترپنوئیدی استخراج شده از این گونه خاصیت مهارکنندگی قوی در برابر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس از خود نشان دادند (۲۵). در مطالعات انجام گرفته به‌وسیله احمد و همکاران (۲۰۱۲)، هیچ یک از عصاره‌های هگزانی، کلروفرمی، اتیل‌استاتی، بوتانولی و آبی گیاه *Scrophularia nodosa* روی باکتری اشریشیاکلی اثری نداشته در صورتی‌که تمامی این عصاره‌ها به‌جز

ریشه آن در برابر باکتری باسیلوس سرئوس مشاهده شد که با توجه به وجود ترکیبات مؤثر بیولوژیکی در این گیاه اثرات ضدباکتریایی آن امری معقول می‌باشد و می‌تواند مسیر را جهت بررسی اثرات ضد میکروبی این گیاه در مدل‌های حیوانی به منظور استفاده احتمالی در درمان آنتریت‌های ناشی از این باکتری هموارتر سازد.

تقدیر و تشکر

این مطالعه با همکاری گروه علوم صنایع غذایی دانشگاه منابع طبیعی استان گلستان انجام شد. از دکتر منیژه میان‌آبادی و مهندس حاجی‌تبار که در انجام این تحقیق همکاری نمودند، قدردانی به عمل می‌آید.

REFERENCES:

1. Avijgan M, Saadat M, Nilforoosh-Zadeh MA, Hafizi M. Anti-fungal effect of *Echinophora platyloba* extract on some common dermatophytes. *J Med Plants* 2006; 5(18): 10-6.
2. Clark AM. Natural products as a resource from new drugs. *Pharm Res* 1996; 13: 1133-44.
3. Corns CM. Herbal remedies and clinical biochemistry. *Hum Psychopharmacol* 2004; 19: 235-41.
4. Meda A, Lamien CE, Romito M, Millogo J, Nacoulma OG. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chem* 2005; 91: 571-7.
5. Azadbakht M. Classification of medical plants. Tehran: Teimorzadeh Pub; 2000; 7-276.
6. Nariman F, Eftekhari F, Habibi Z, Falsafi T. Anti-helicobacter pylori activities of six Iranian plants. *Helicobacter* 2004; 9(2): 146-51.
7. Lee SY (1996). High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol* 1996; 14 (3): 98–105.
8. Wong HC, Chang MH, Fan JY. Incidence and characterization of *Bacillus cereus* isolates contaminating dairy products. *Appl Environ Microbiol* 1988; 54: 699-702.
9. Baron EJ, Tenover FC, Tenover FC. *Methods for testing antimicrobial effectiveness*, Baily & Scott's diagnostic microbiology. 8th ed. New York: Mosby Company; 1994; 171-9.
10. Krishnaiah D, Sarbatly R, Bono A. Phytochemical antioxidants for health and medicine—A move towards nature. *Biotechnol Mol Biol Rev* 2007; 1(4): 97-104.
11. Ahmad M, Muhammad N, Jahan N, Alam SM, Ahmad M. Biological screening of *Scrophularia nodosa* extract and its fractions. *Pak J Pharm Sci* 2012; 25(2): 307-13.
12. Bermejo Benito P, Díaz Lanza AM, Silván Sen AM, De Santos Galíndez J, Fernández Matellano L, Sanz Gómez A, Abad Martínez M. Effects of some iridoids from plant origin on arachidonic acid metabolism in cellular systems. *Planta Med* 2000; 66: 324–8.
13. Espinel-Ingroff A, Chaturvedi V, Fothergill A, Rinaldi MG. Optimal Testing Conditions for Determining MICs and Minimum Fungicidal Concentrations of New and Established Antifungal Agents for Uncommon Molds: NCCLS Collaborative Study. *J Clin Microbiol*. 2002; 40(10): 3776–3781.
14. Dholwani KK, Saluja AK, Gupta AR, Shah DR. A review on plant-derived natural products and their analogs with antitumor activity. *Indian J Pharmacol* 2008; 40: 49-58.
15. Fernández MA, Saenz MT, García MD. Antiinflammatory activity in rats and mice of phenolic acids isolate from *Scrophularia frutescens*. *J Pharm Pharmacol* 1998; 50: 1183–6.
16. Fernandez MA, Garcia MD, Saenz MT. Antibacterial activity of phenolic acids of *Scrophularia frutescens* and *Scrophularia sambucifolia*. *Journal of Ethnopharmacology* 1996; 53: 11-4.
17. Olthof MR, Hollman PCH, Katan MB. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *J Nutr* 2001; 131: 66-71.
18. Giner RM, Villalba ML, Recio MC, Mañez S, Cerdá-Nicolás M, Ríos JL. Anti-inflammatory glycoterpenoids from *Scrophularia auriculata*. *Eur J pharmacol* 2000; 389: 243-52.
19. Kluytmans J, Van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Journal of Clinical Microbiology* 1997; 3: 505–20.
20. Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. *Medical Microbiology*. 4th ed. Mosby: St. Louis ; 2002; 55-70.
21. Hounsome N, Hounsome B, Tomos D and Jones GE. Plant metabolites and nutritional quality of vegetables. *Journal Of Food Science* 2008; 73: 4.
22. Clauditz A, Resch A, Wieland KP, Peschel A, Götz F. Staphyloxanthin plays a role in the fitness of *Staphylococcus aureus* and its ability to cope with oxidative stress. *Infection and Immunity* 2006; 74(8): 4950–3.
23. Monsef-Esfahani HR, Hajiaghaee R, Shahverdi AR, Khorramizadeh MR, Amini M. Flavonoids, cinnamic acid and phenyl propanoid from aerial parts of *Scrophularia striata*. *Pharmaceutical Biology* 2010; 48(3): 333–6.
24. Dholwani KK, Saluja AK, Gupta AR, Shah DR. A review on plant-derived natural products and their analogs with antitumor activity. *Indian J Pharmacol* 2008; 40: 49-58.
25. Stavri M, Mathew KT, Gibbons S. Antimicrobial constituents of *Scrophularia deserti*. *Phytochemistry* 2006; 67: 1530–3.

In Vitro Anti-Bacterial Activity of Root And Aerial Parts of *Scrophularia Striata* Bioss on *Escherichia Coli*, *Staphylococcus Aureus* and *Bacillus Cereus*

Safavi F, Ebrahimi P*, Mighani H

Department of Chemistry, University of Golestan, Gorgan, Iran

Received: 18 Feb 2013

Accepted: 06 Apr 2013

Abstract

Background & aim: Due to the side effects of chemical drugs, the replacement of these drugs by natural compounds with antibacterial properties, such as plant extracts, has received much attention. The aim of this study was to evaluate the phytochemical constituents and antimicrobial properties of root and aerial parts of *Scrophularia* against *E. coli*, *S. aureus* and *B. cereus* *in vitro*.

Methods: In the present study, the antimicrobial activity of different extracts of roots and methanol extract of aerial part the sequential, minimal inhibitory concentrations of bacteria, and minimal bactericidal concentrations of bacteria were determined against the bacteria of *E.coli*, *S. aureus* and *B. cereus* by using both the disk diffusion and the tube dilution method. DMSO was used as the negative control, whereas nalidixic acid and ampicillin were used as the positive control. The collected data was analyzed using the one-way ANOVA test.

Results: The results revealed that the root and aerial parts of *Scrophularia striata* contain flavonoids, glycosides, saponins, tannins and terpenoids. The ethyl acetate and chloroform extracts of root showed no inhibition zone on the bacterial growth. Whereas, the methanolic extract of the root was the most effective against *B. cereus* with the inhibition zone of the bacterial growth (21 mm), followed by MIC and MBC 60 mg/ml 70 mg/ml respectively. The methanol extract of aerial parts had the lowest effect on *E.coli*

Conclusion: The results of the present study revealed that the methanolic extract of root and aerial parts of *Scrophularia striata* has antibacterial effects, especially against *B. cereus*. Therefore, further research is needed to identify the different compounds, and also, attainment of new formulation of these components in this plant.

Key words: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, Antimicrobial, *Scrophularia striata*.

*Corresponding Author: Ebrahimi P, Department of Chemistry, Faculty of Basic Sciences, University of Golestan, Gorgan, Iran
E-mail: p.ebrahimi@gu.ac.ir