فعالیت ضدباکتریایی عصاره هیدروالکلی اندام‌های مختلف گیاه سیاه گینه (*Dendrostellera lesserti*) در شرایط درون شیشه‌ای

مصطفی علم هولو و سنبل ناظری*

همدان، دانشگاه بوعلی‌سینا، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی

تاریخ دریافت: ۹۳/۴/۲ تاریخ پذیرش: ۹۳/۸/۱۰

چکیده

مقاوم شدن بسیاری از باکتری‌های بیماری‌زا در برابر داروهای سنتزی و عوارض جانبی و گرانی داروهای شیمیایی توجه دانشمندان را به سمت مصرف داروهای طبیعی و گیاهی معطوف کرده است. هدف از این تحقیق بررسی خواص آنتی‌باکتریایی عصاره هیدروالکلی ریشه، برگ و ساقه گیاه سیاه گینه علیه برخی باکتری‌های بیماری‌زای انسانی است. گیاه سیاه گینه در تابستان سال ۱۳۹۲ از استان همدان جمع‌آوری شد. پس از شناسایی گیاه، عصاره‌ها به روش خیساندن تهیه شدند. هشت باکتری پاتوژن گرم مثبت و گرم منفی انسانی مورد آزمایش قرار گرفتند. برای بررسی خواص آنتی‌باکتریایی عصاره هیدروالکلی از روش‌های انتشار چاهک در آگار، MIC (به روش رقت لوله‌ای) و MBC استفاده شد. میزان فنول کل به روش فولین سیوکالتو اندازه‌گیری شد. نتایج با نرم‌افزار سس (SAS) در قالب فاکتوریل با طرح پایه کاملا تصادفی در سه تکرار آنالیز آماری شد. هر چند، بیشترین هاله بازدارندگی (۱/۰۰± ۱۸ میلی‌متر) در کشت باکتری *باسیلوس ساتیلیس در* برابر عصاره هیدروالکلی ریشه مشاهده شد، اما عصاره هیدروالکلی ساقه اثر بازدارندگی و کشندگی در کشت غالب باکتری‌های مورد مطالعه داشت. مقدار فنول کل ریشه، ساقه و برگ به‌ترتیب ۲/۶۹±۱۱۱/۸، ۰/۵۵±۴۷/ ۷۹ و ۳/۲۹±۶۹/۱۶ (*mgGAE/g*) اندازه‌گیری شد. آزمایش‌ها انجام شده در این تحقیق نشان داد که عصاره هیدروالکلی ریشه، برگ و ساقه گیاه سیاه گینه حاوی میزان متفاوتی از فنول بوده و این گیاه دارای ترکیباتی با خاصیت ضدباکتریایی است. این تحقیق می‌تواند به‌عنوان یک پایه در بررسی ترکیبات آنتی‌باکتریایی این گیاه مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: سیاه گینه، ضدباکتری، باکتری‌های بیماری‌زای انسانی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۳۴۴۲۴۰۱۲-۰۸۱، پست الکترونیکی:snblnazeri@yahoo.com

مقدمه

گیاهان دارویی دارای مواد مؤثره مشخصی هستند که این مواد مؤثره فعال به میزان بسیار کم در گیاه ساخته می‌شود و در درمان بیماری‌ها بکار می‌رود. امروزه به دلیل گسترش مسئله مقاومت دارویی و هزینه بالای درمان با داروهای شیمیایی و همچنین مشاهده عوارض جانبی برخی آنتی بیوتیک‌ها، تحقیقات برای کشف گیاهانی با خاصیت ضدباکتریایی افزایش یافته است. در بیشتر باکتری‌ها، استفاده بی‌رویه از داروهای ضدمیکروبی سنتزی منجر به افزایش مقاومت‌های دارویی علیه آنتی‌بیوتیک‌های متفاوت شده است (۱۵). خاصیت آنتی‌میکروبی داروهای گیاهی همانند آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم توجه زیادی را به خود معطوف کرده است(۵). امروزه گیاهان دارویی به دلیل مزیت‌های دارویی و طبیعی، برای درمان بیماری‌ها ازجمله عفونت‌ها مورد توجه قرار گرفته‌اند (۱۱). بسیاری از خواص آنتی‌میکروبی عصاره‌های گیاهی به علت وجود

موادی همانند فنول و نظایر آن می‌باشد که در قسمت‌های مختلف گیاه وجود دارند.

گیاه *Dendrostellera lessertii* تنها گونه جنس دندروستلرا در ایران و از خانواده Thymelaeaceae است. این گیاه، بوته‌ای چند ساله با ساقه چوبی به ارتفاع ۲۰-۶۰ سانتی‌متر، برگ‌ها نیزه‌ای باریک، گل‌ها کرم تیره‌ای تا زرد رنگ می‌باشد که در مناطق شمال و شمال‌غرب ایران انتشار دارد. خواص دارویی این گیاه قبلا به اثبات رسیده است. عصاره هیدروالکلی برگ سیاه گینه، مشابه داروی گیاهی آنتی‌نئوپلاستیک تاکسول، سبب تحریک آزاد شدن فاکتور نکروزدهنده بافتی آلفا توسط مونوست‌ها در محیط کشت و نیز سبب تنظیم کاهشی تعداد گیرنده‌های فاکتور نکروزدهنده بافتی آلفا در سطح مونوسیت‌های انسان می گردد (۴). ۳- هیدروجنکوادافنین یک استر دی ترپن نوع دافنان ایزوله شده از برگ‌های گیاه دارویی سیاه گینه با خاصیت ضد سرطانی است. یزدانپرست و مشکینی (۲۰۰۹) اثر بازدارندگی این ترکیب را روی سلول‌سرطانی خون *KG1* نشان دادند(۱۶). البته خواص دارویی جنس-های دیگر این خانواده نیز گزارش شده است. برگ‌های گیاه *Aquilaria senensis* برای درمان بیماری‌های وابسته به زخم مانند شکستگی و کبودشدگی بکار می‌رود (۱۰). بر اساس مطالعات هندرا و همکاران (۲۰۱۱) گیاه *Phaleria macrocarpa* برای درمان بیماری‌هایی مانند سرطان، دیابت، قلب و غیره کاربرد دارد (۷).

تاکنون گزارشی از اثر ضدباکتریایی بافت‌های این گیاه منتشر نشده است. هدف از این تحقیق اندازه‌گیری مقدار فنول کل و همچنین بررسی فعالیت ضدباکتریایی عصاره هیدروالکلی ریشه، ساقه و برگ گیاه دارویی سیاه گینه روی رشد برخی باکتری‌های بیماری‌زای انسانی است.

مواد و روشها

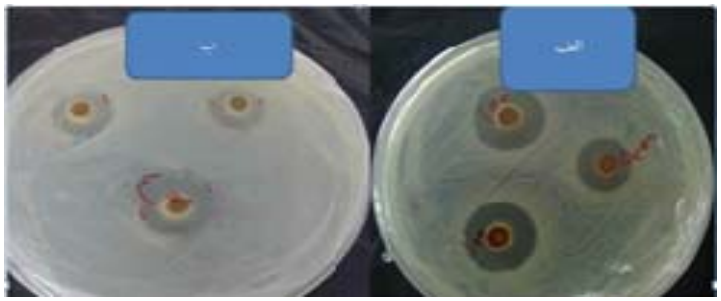
مواد شیمیایی: محیط‌کشت‌های نوتریت براث و مولر هینتون آگار از شرکت مرک آلمان و دیسک‌های آنتی بیوتیک آموکسی‌سیلین و کانامایسین از شرکت پادتن تب خریداری شدند.

جمع‌آوری گیاه و روش عصاره‌گیری: در تابستان ۱۳۹۲، گیاه سیاه گینه از ارتفاعات کوه الوند استان همدان جمع آوری شد. اندام‌های ریشه، ساقه و برگ ابتدا توسط آب جاری شستشو شده و بعد در دمای اتاق و در سایه خشک شدند. دستگاه آسیاب برای پودر کردن قسمت‌های خشک گیاه استفاده گردید. از روش خیساندن برای تهیه عصاره استفاده شد. بدین ترتیب ۲۰ گرم از پودر خشک شده به طور جداگانه به ۲۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد اضافه و به مدت ۴۸ ساعت بر روی شیکر گذاشته شد (۱۲). با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ عصاره‌ها صاف شدند و برای خلوص بیشتر به مدت ۱۰ دقیقه با شدت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. دستگاه روتاری برای تغلیظ عصاره اسفاده شد و پس از خشک شدن کامل در دمای ۴۰ درجه سلسیوس، عصاره‌ها در فریزر ۲۲- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

تهیه سویه‌های میکروبی استاندارد: سویه های باکتریایی از دانشگاه علوم پزشکی استان همدان تهیه شدند. اسامی این سویه‌ها عبارتند از: *میکروکوکوس لوتئوس* (PTCC1110)، *باسیلوس سابتیلیس* (PTCC1156) ، *استرپتوکوکوس پیوژنز* (PTCC1447) ، *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC1189) ، *اشریشیا کولای* (ATCC25922)، *شیگلا بایدی*، *سالمونلا تیفی* (PTCC1609) و *انتروباکتر آئروژنز* (PTCC1221). برای تهیه کشت تازه باکتری، یک کلونی باکتری بر روی محیط جامد مولر هینتون آگار منتقل و ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد. در زمان آزمایش یک لوپ از کشت تازه باکتری به یک میلی‌لیتر محیط نوترینت براث انتقال و در دمای ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. غلظت سوسپانسیون باکتری برابر نیم مک

فارلند ($۱/۵\times۱۰^{۸}$ باکتری در میلی‌لیتر) برای آزمایش‌ها استفاده گردید.

روش انتشار چاهک در آگار (Agar well diffusion method**):** عصاره هیدروالکلی در غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و۴۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر از اندام‌های ریشه، برگ و ساقه تهیه شد. ۰/۲ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری روی پلیت‌های مولر هینتون آگار استریل تلقیح و با سوآب استریل کشت داده شد. چاهک‌هایی به قطر پنج میلی‌متر ایجاد و ۵۰ میکرولیتر از هر یک از غلظت‌ها به داخل این چاهک‌ها ریخته شد. پلیت‌ها ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند (۷). آنتی بیوتیک‌های آموکسی‌سیلین (۲۵ میکروگرم) برای باکتری‌های گرم مثبت و کانامایسین(۳۰میکروگرم) برای باکتری‌های گرم منفی به عنوان کنترل مثبت و حلال اتانول ۷۰ درصد به عنوان کنترل منفی استفاده شدند. آزمایش‌ها برای تمام غلظت‌ها در سه تکرار انجام شد. اندازه قطر هاله‌های بازدارندگی رشد باکتری در اطراف چاهک بر حسب میلی‌متر اندازه-گیری شد (شکل۱).



شکل۱- هاله بازدارندگی در کشت باکتری. الف: اثر عصاره هیدروالکلی ریشه در کشت باکتری ***B.subtilis***، ب: اثر عصاره هیدروالکلی برگ در کشت باکتری ***M. luteus***

حداقل غلظت مهارکنندگی (Minimum inhibitory concentration**) و حداقل غلظت کشندگی (** Minimum bacteriocidal concentration**):** با استفاده از روش رقت لوله‌ای حداقل غلظت مهارکنندگی(MIC) و حداقل غلظت کشندگی(MBC)عصاره هیدروالکلی ریشه، ساقه و برگ تعیین گردید. سری‌های رقت ۲۰۰،۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵و ۶/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در محیط نوترینت براث برای تعیین MIC تهیه شدند. سپس، ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی (برابر نیم مک‌فارلند) به همه لوله‌ها بجز کنترل مثبت (محیط+ عصاره) اضافه گردید. لوله‌های تلقیح شده ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند. کمترین رقتی از عصاره که در آن کدورتی مشاهده نشد، به‌عنوان MIC در نظر گرفته شد. برای تعیین حداقل غلظت کشندگی، ۵ میکرولیتر از تمامی لوله‌های بدون کدورت (فاقد رشد باکتریایی) در سطح محیط کشت مولرهینتون‌آگار کشت و در دمای ۳۷ درجه قرار داده شدند. پس از ۲۴ ساعت، کمترین غلظتی از عصاره که در آن رشد باکتری مشاهده نشد به‌عنوان MBC در نظر گرفته شد.

میزان فنول کل: برای اندازه‌گیری محتوای فنول کل از واکنش‌گر فولین سیوکالتو استفاده شد(۱۳). از حلال متانول برای عصاره‌گیری و از معرف اسیدگالیک بعنوان استاندارد استفاده گردید. نمونه‌ها ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شدند. میزان جذب نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج ۷۶۵ نانومتر اندازه گیری شد. مقدار فنول کل معادل میلی‌گرم اسیدگالیک بر گرم وزن عصاره خشک محاسبه شد.

آنالیز آماری: این پژوهش در قالب فاکتوریل با طرح پایه کاملا تصادفی در سه تکرار انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال۰/۰۵

توسط نرم افزار sas 9.2 و خطای استاندارد (SE) با استفاده از نرم افزار SPSS 20 محاسبه شد.

نتایج

فعالیت ضدباکتریایی به روش انتشار چاهک در آگار: اثر ضدباکتریایی عصاره هیدروالکلی گیاه دارویی سیاه گینه بر روی تعدادی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی استفاده شد. در کشت همه باکتری‌ها، هاله عدم رشد در کنترل منفی مشاهده نشد. آنالیز آماری در سطح احتمال ۰/۰۵ روی تمام باکتری‌ها انجام شد (جدول ۱).

بیشترین حساسیت در برابر عصاره هیدروالکلی ریشه و ساقه، در کشت باکتری *باسیلوس سابتیلیس* به ترتیب با قطر هاله عدم رشد ۱/۰۰± ۱۸ و ۰/۸۸± ۱۳/۶۶ و در مورد برگ در کشت باکتری *میکروکوکوس لوتئوس* با قطر هاله عدم رشد ۱/۲± ۱۷/۶۶ میلی‌متر مشاهده گردید. هاله عدم رشد، در برابر هر سه غلظت عصاره ریشه، در کشت باکتری‌های گرم منفی *انتروباکتر آئروژنز* و *اشریشیا کولای* در مقایسه با آنتی‌بیوتیک کانامایسین بیشتر بود. غلظت‌های بالای عصاره برگ سبب تشکیل هاله آنتی‌باکتریایی بزرگتر از آنتی‌بیوتیک کانامایسین و آموکسی‌سیلین به ترتیب در کشت باکتری انتروباکتر آئروژنز و باکتری میکروکوکوس لوتئوس شد.

جدول ۱- مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر) عصاره هیدروالکلی ریشه، ساقه و برگ سیاه گینه علیه برخی باکتری‌های بیماری‌زای انسانی

باکتری	غلظت (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	میانگین قطر هاله‌های بازدارندگی(میلی‌متر)				
		ریشه	ساقه	برگ	آموکسی‌سیلین	کانامایسین
	۱۰۰	۱۴±۰/۵۵^{kglfihj}	۶±۰/۰۰^{yx}	۱۱±۰/۵۷^{rspoq}	۲۳/۸۳±۰/۱۶^{a}	۱۱±۰/۰۰^{rspoq}
En aerogenes	۲۰۰	۱۴/۳۳±۰/۸۸^{kgfihj}	۶±۰/۵۷^{yx}	۱۲/۶۶±۰/۳۳^{knlmpoj}	۲۳/۸۳±۰/۱۶^{a}	۱۱±۰/۰۰^{rspoq}
	۴۰۰	۱۲/۳۳±۰/۸۸^{knlmpoq}	۱۰/۳۳±۰/۳۳^{rstq}	۱۳/۳۳±۱/۶۶^{knlmihj}	۲۳/۸۳±۰/۱۶^{a}	۱۱±۰/۰۰^{rspoq}
	۱۰۰	۱۱/۳۳±۰/۶۶^{rnspoq}	۰±۰/۰۰^{z}	۱۳±۱/۵۲^{knlmioj}	۱۵/۶۶±۰/۳۳^{gfe}	۱۰±۰/۰۰^{rst}
M.luteus	۲۰۰	۱۴/۶۶±۰/۳۳^{gfihj}	۶±۰/۵۷^{yx}	۱۷/۶۶±۱/۲^{d}	۱۵/۶۶±۰/۳۳^{gfe}	۱۰±۰/۰۰^{rst}
	۴۰۰	۱۴/۶۶±۰/۶۶^{gfihj}	۱۰/۳۳±۰/۳۳^{rstq}	۱۶±۰/۵۷^{fe}	۱۵/۶۶±۰/۳۳^{gfe}	۱۰±۰/۰۰^{rst}
	۱۰۰	۱۳±۱/۰۰^{knlmioj}	۱۰/۳۳±۰/۳۳^{rstq}	۱۰/۶۶±۰/۳۳^{rspq}	۱۵±۰/۵۷^{gfih}	۱۵/۶۶±۰/۶۶^{gfe}
Sal.typhi	۲۰۰	۱۵±۰/۰۰^{gfih}	۱۱±۰/۵۷^{rspoq}	۱۰±۰/۰۰^{rst}	۱۵±۰/۵۷^{gfih}	۱۵/۶۶±۰/۶۶^{gfe}
	۴۰۰	۱۴±۰/۰۰^{kglfihj}	۱۰/۳۳±۰/۳۳^{rstq}	۱۱±۰/۵۷^{rspoq}	۱۵±۰/۵۷^{gfih}	۱۵/۶۶±۰/۶۶^{gfe}
	۱۰۰	۱۳/۶۶±۰/۳۳^{kglmihj}	۱۱/۳۳±۰/۸۸^{rnspoq}	۱۱±۱/۱۵^{rspoq}	۲۱/۳۳±۰/۶۶^{bc}	۱۸/۶۶±۰/۸۸^{d}
B.subtilis	۲۰۰	۱۰/۳۳±۰/۸۸^{rstq}	۱۳/۶۶±۰/۸۸^{kglmihj}	۱۰/۳۳±۰/۶۶^{rstq}	۲۱/۳۳±۰/۶۶^{bc}	۱۸/۶۶±۰/۸۸^{d}
	۴۰۰	۱۸±۱/۰۰^{d}	۱۱/۳۳±۰/۸۸^{rnspoq}	۱۰/۳۳±۱/۲^{rstq}	۲۱/۳۳±۰/۶۶^{bc}	۱۸/۶۶±۰/۸۸^{d}
	۱۰۰	۱۴/۳۳±۰/۸۸ ^{kgfihj}	۱۱/۳۳±۰/۶۶^{rnspoq}	۸±۰/۵۷^{vwu}	۱۵/۳۳±۰/۴۴^{gfh}	۱۲/۶۶±۰/۶۶^{knlmpoj}
E.coli	۲۰۰	۱۷/۳۳±۰/۶۶^{de}	۱۲/۳۳±۰/۳۳^{knlmpoq}	۱۰/۳۳±۰/۳۳^{rstq}	۱۵/۳۳±۰/۴۴^{gfh}	۱۲/۶۶±۰/۶۶^{knlmpoj}
	۴۰۰	۱۳/۳۳±۰/۸۸^{knlmihj}	۱۰/۳۳±۰/۳۳^{rstq}	۸/۶۶±۰/۸۸^{vtu}	۱۵/۳۳±۰/۴۴^{gfh}	۱۲/۶۶±۰/۶۶^{knlmpoj}
	۱۰۰	۱۰/۶۶±۰/۳۳^{rspq}	۱۰/۶۶±۰/۳۳^{rspq}	۷±۰/۰۰^{vwx}	۱۱/۱۶±۰/۷۲^{rspoq}	۱۲±۰/۰۰^{rnlmpoq}
Strep pyogenes	۲۰۰	۱۰/۳۳±۱/۳۳^{rstq}	۱۲/۶۶±۰/۳۳^{knlmpoj}	۷±۰/۰۰^{vwx}	۱۱/۱۶±۰/۷۲^{rspoq}	۱۲±۰/۰۰^{rnlmpoq}
	۴۰۰	۱۲±۰/۵۷^{rnlmpoq}	۱۱±۰/۵۷^{rspoq}	۸±۰/۵۷^{vwx}	۱۱/۱۶±۰/۷۲^{rspoq}	۱۲±۰/۰۰^{rnlmpoq}
	۱۰۰	۱۱/۳۳±۰/۶۶^{rnspoq}	۱۰/۶۶±۰/۶۶^{rspq}	۹/۶۶±۰/۳۳st	۲۰/۶۶±۰/۳۳^{c}	۱۵±۰/۰۰^{gfih}
Staph aureus	۲۰۰	۱۲/۳۳±۰/۳۳^{knlmpoq}	۱۱±۰/۵۷^{rspoq}	۱۰±۰/۵۷st	۲۰/۶۶±۰/۳۳^{c}	۱۵±۰/۰۰^{gfih}
	۴۰۰	۱۲/۶۶±۰/۳۳^{knlmpoj}	۱۲/۳۳±۰/۳۳^{knlmpoq}	۱۱/۳۳±۰/۸۸^{rnspoq}	۲۰/۶۶±۰/۳۳^{c}	۱۵±۰/۰۰^{gfih}
	۱۰۰	۱۱/۶۶±۰/۸۸^{rnsmpoq}	۱۱±۰/۵۷^{rspoq}	۱۳±۰/۵۷^{knlmioj}	۲۲/۶۶±۰/۶۶^{ab}	۱۴±۰/۰۰^{kglfihj}
Sh.boydi	۲۰۰	۱۲/۳۳±۰/۳۳^{knlmpoq}	۱۱/۳۳±۰/۵۷^{rspoq}	۶/۶۶±۰/۳۳^{ywx}	۲۲/۶۶±۰/۶۶^{ab}	۱۴±۰/۰۰^{kglfihj}
	۴۰۰	۱۳/۶۶±۰/۳۳^{kglmihj}	۱۳±۰/۵۷^{knlmioj}	۱۰/۶۶±۰/۳۳^{rspq}	۲۲/۶۶±۰/۶۶^{ab}	۱۴±۰/۰۰^{kglfihj}

بر اساس نتایج جدول ۱، عصاره هیدروالکلی ریشه در مقایسه با ساقه و برگ فعالیت ضدباکتریایی بیشتری را نشان داد. در این تحقیق بیشترین حساسیت در برابر عصاره هیدروالکلی گیاه مربوط به باکتری‌های گرم مثبت در هر سه بافت مشاهده شد. بر اساس داده‌های هاله‌های بازدارندگی رشد، آنتی‌بیوتیک آموکسی‌سیلین در مقایسه با کانامایسین روی باکتری‌های آزمایش شده حساسیت بیشتری نشان داد.

نتایج بررسی قطر هاله نشان داد که در برخی موارد در غلظت‌های پایین اثرات عصاره‌ها روی باکتری‌ها (انتروباکتر آئروژنز) بیشتر بصورت باکتریواستاتیک و با افزایش غلظت عصاره اثرات آن بیشتر بصورت باکتریوساید بود.

بر اساس نتایج جدول ۲ بین باکتری، بافت، غلظت و عصاره هیدروالکلی ریشه، ساقه و برگ تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۰/۰۵ مشاهده شد.

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس اثرات ضدباکتریایی عصاره هیدروالکلی ریشه، ساقه و برگ سیاه گینه روی باکتری‌های بیماری‌زای انسانی

منابع تغییر s.o.v	درجه آزادی Df	میانگین مربعات MS	F
باکتری	۷	۳۵۱/۱۸	۳۷۲/۱*
بافت	۲	۷۰/۸۳	۷۵/۰۶*
عصاره	۲	۲۶۷۶/۷۵	۲۸۳۶/۱۵*
غلظت	۲	۱۷/۳۵	۱۸/۳۹*
باکتری×بافت×عصاره×غلظت	۲۰۲	۲۳/۲۸	۲۴/۶۷*
خطا	۴۳۰	۰/۹۴	
کل	۶۴۵		
ضریب تغییرات			۶/۷۵

***: اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد**

MBC و MIC: نتایج حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره هیدروالکلی ریشه، برگ و ساقه سیاه گینه علیه ۸ سویه باکتری بیماری‌زای انسانی به روش رقت لوله‌ای در (جدول۳) نشان داده شده است. MIC در رقت پایین ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره ساقه در کشت باکتری‌های *سالمونلا تیفی*، *میکروکوکوس لوتئوس*، *شیگلا بایدی* و *اشریشیا کولای* و عصاره برگ در کشت باکتری *میکروکوکوس لوتئوس* مشاهده شد. عصاره هیدروالکلی ساقه در مقایسه با عصاره ریشه و برگ اثر بازدارندگی بهتری نشان داد.

جدول ۳- MIC و MBC عصاره هیدروالکلی ریشه، برگ و ساقه سیاه گینه علیه برخی باکتری‌های بیماری‌زای انسانی (بر حسب mg/ml)

عصاره	باکتری	*B subtillis*	*Sal typhi*	*Sh boydi*	*En aerogenes*	*M luteus*	*Staph aureus*	*E coli*	*Strep pyogenes*
ریشه	MIC	۵۰	۵۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
	MBC	–	۲۰۰	۱۰۰	۲۰۰	۲۰۰	–	۱۰۰	۲۰۰
ساقه	MIC	۵۰	۲۵	۲۵	۵۰	۲۵	۵۰	۲۵	۵۰
	MBC	–	۲۵	۲۰۰	۵۰	۵۰	۱۰۰	۲۵	۵۰
برگ	MIC	۵۰	۵۰	۵۰	۵۰	۲۵	۵۰	–	–
	MBC	–	–	۱۰۰	۵۰	۵۰	۵۰	–	–

-: باکتری رشد کرده

بررسی میزان فنول کل: مقدار فنول کل بر حسب میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک عصاره هیدروالکلی ریشه، برگ و ساقه در جدول(۴) آورده شده است. مقدار فنول کل ریشه، ساقه و برگ به ترتیب ۲/۶۹±۱۱۱/۸، ۰/۵۵±۴۷/

۷۹ و ۶۹/۱۶±۳/۲۹ (*mgGAE/g*) محاسبه شد. ریشه در مقایسه با ساقه و برگ بیشترین میزان فنول را داشت. با توجه به نتایج بدست آمده، بین میانگین مقدار فنول کل هر سه بافت ریشه، برگ و ساقه اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ مشاهده شد.

جدول ۴- مقدار فنول کل ریشه، برگ و ساقه سیاه گینه

اندام گیاه	ریشه	ساقه	برگ
میزان فنول کل (*mgGAE /g*)	۱۱۱/۸±۲/۶۹[a]	۷۹/۴۷±۰/۵۵[b]	۶۹/۱۶±۳/۲۹[c]

حروف غیر مشترک نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشد.

بحث

در عصر حاضر با توجه به اثرات درمانی و تأثیرات قابل توجه گیاهان دارویی نسبت به داروهای شیمیایی بررسی اثر این گیاهان در دستور کار محققان قرار گرفته است(۳). بر اساس گزارشهای متحدین و صعودی (۱۳۸۵)، باکتری سودوموناس آئروؤینوزا دارای مقاومت نسبی علیه آنتی-بیوتیک‌های نورفلوکساسین و کاربنی‌سیلین است(۲). بر اساس نتایج بدست آمده عصاره هیدروالکلی ریشه در مقایسه با ساقه و برگ اثر آنتی‌باکتریایی بهتری روی باکتری‌های کشت شده داشت. بطور مثال عصاره ریشه در غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بیشترین اثر ضدباکتریایی را روی باکتری گرم مثبت *باسیلوس سابتیلیس* با قطر ۱/۰۰± ۱۸ میلی‌متر نشان داد.

بر اساس نتایج رقت ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، حداقل رقت بازدارندگی عصاره هیدروالکلی برگ بر روی رشد باکتری *میکروکوکوس لوتئوس* و عصاره هیدروالکلی ساقه روی رشد باکتری‌های *سالمونلا تیفی*، *میکروکوکوس لوتئوس*، *شیگلا بایدی* و *اشریشیا کولای* بود. طبق نتایج کامون واناسیت و همکاران (۲۰۱۳)، رقت ۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره آبی برگ گیاه *Aquilaria crassna* که از جنس همین خانواده است، حداقل رقت بازدارندگی را در رشد باکتری *استافیلوکوکوس اپیدرمیدس* داشت(۹). هر چند این دو گیاه در یک خانواده قرار دارند، اما اختلاف نتایج می-تواند به دلیل تفاوت در جنس گیاه و سویه‌های باکتری باشد.

مقایسه تحقیق بر روی هاله بازدارندگی گیاهان مختلف این خانواده نشان داد که: در بررسی داش و همکاران(۲۰۰۸)، عصاره آبی برگ گیاه *Aquilaria agallocha Roxb* اثری بر روی باکتری باسیلوس سابتیلیس نداشت و تفاوت نتایج این گروه احتمالا به دلیل تفاوت در جنس گیاه با نتایج این تحقیق بود(۶). بر اساس تحقیقات کامون‌واناسیت و همکاران (۲۰۱۳) عصاره آبی برگ گیاه *Aquilaria crassna* روی باکتری *استافیلوکوکوس اپیدرمیدس* قطر هاله بازدارندگی بزرگتری در مقایسه با عصاره هیدروالکلی برگ گیاه سیاه گینه در کشت *استافیلوکوکوس اورئوس* داشت، این اختلافات می‌تواند به دلیل تفاوت در گونه باکتری، جنس گیاه و همچنین حلال باشد (۷). جاویدنیا و همکاران (۲۰۰۳)، فعالیت ضدباکتریایی عصاره اتانولی ریشه، ساقه و برگ گیاه *Daphne mucronata* را که متعلق به همین خانواده است، علیه باکتری‌های *باسیلوس سابتیلیس*، *اشریشیا کولای* و *استافیلوکوکوس اورئوس* گزارش کردند. طبق نتایج این گروه عصاره‌های مذکور اثر آنتی‌باکتریایی قوی‌تری روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* داشتند(۸) که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. بر اساس نتایج حاصل احتمالا گونه‌های دو جنس دندروستلرا و دافنه دارای ترکیباتی با خواص آنتی‌باکتریایی مشابه - باشند. تایوب و همکاران (۲۰۱۲)، اثر ضدباکتریایی عصاره اتانولی برگ و ساقه گیاه *Daphne oleofolia lam* را علیه باکتری‌های *اشریشیاکولای* بررسی کردند؛ اثر عصاره اتانولی ساقه در تحقیق این گروه در مقایسه با عصاره هیدروالکلی ساقه این تحقیق روی باکتری اشریشیا کولای مشابه بود. این احتمال وجود دارد که حلال‌های مورد

استفاده در این دو تحقیق ترکیبات آنتی‌باکتریایی مشابهی را بر علیه اشریشیاکولای جدا کرده باشند (۱۴).

دلنواز هاشملویان و همکاران(۱۳۹۰) با استفاده از حلال کلروفرم میزان فنول کل برگ و ریشه سیاه گینه را اندازه گیری کردند و دریافتند که میزان فنول برگ و ریشه به یک اندازه و بیشتر از ساقه بود، اما در این تحقیق میزان فنول ریشه بیشتر از برگ و ساقه محاسبه شد. این اختلاف احتمالا ناشی از نوع حلال استفاده شده در این دو تحقیق (حلال‌های کلروفرم و متانول) و منطقه رشد گیاه مورد نظر است (۱). کامون واناسیت و همکاران (۲۰۱۳) میزان فنول عصاره آبی برگ *Aquilaria crassna* را برابر ۲۴/۴۶±۱۷۶/۶۱*mgGAE/g* محاسبه کردند، به‌طوری‌که در مقایسه با میزان فنول در اندام های مورد مطالعه در این گیاه بیشتر بود (۹). ندلجکو و همکاران(۲۰۱۲)، میزان فنل کل عصاره متانولی برگ و ساقه گیاه *Daphne cneorum* را به‌ترتیب ۰/۷۹ ±۷۶/۴۵ و۰/۸۵± ۶۹/۶۷ *mgGAE/g* گزارش کردند(۱۲). اختلاف مشاهده شده در نتایج این گروه‌ها با این تحقیق، احتمالا به دلیل تفاوت در جنس گیاه است.

در نهایت می‌توان نتیجه گرفت که عصاره بافت‌های ریشه، برگ و ساقه گیاه سیاه گینه حاوی میزان متفاوتی از فنول بوده و این گیاه دارای ترکیباتی با خاصیت آنتی‌باکتریایی است.

سپاسگزاری

این پژوهش برگرفته از پایان‌نامه دانشجویی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی بوعلی سینا همدان است. بدین وسیله از جناب آقای دکتر رنجبر، عضو هیئت علمی و متخصص گروه زیست شناسی و آقای دکتر نگارش که صمیمانه با ما همکاری کردند، تشکر می‌کنیم.

منابع

۱- دلنواز هاشملویان، ب.، مینا مژدهی، س. و عطایی عظیمی، ع.،۱۳۹۰. استخراج و جداسازی مواد مؤثره (فنل و تانن) سیاه گینه *Dendrostellera lessertii* .اولین همایش ملی علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، ۱۰-۱۱ اسفند، ۵۴۵-۵۵۳.

۲- متحدین،پ. و صعودی،م.ر.، ۱۳۸۵. بررسی مقاومت به مواد ضدمیکروبی در سویه‌های سودوموناس جدا شده از فراورده‌های بهداشتی. مجله زیست شناسی ایران، ۱۹(۱): ۷۷-۸۶ .

۳- نسیمی، م.، حیدری نصر آبادی، م. و شیروی،ع.، ۱۳۹۱. اثرات عصاره الکلی میوه عروسک پشت پرده (*Physalis alkekengi*) بر تولید مثل و جنین در موش صحرایی نژاد ویستار. مجله زیست شناسی ایران، ۲۵(۲): ۲۷۶-۲۸۵.

۴- هدایتی، م.، یزدانپرست، ر.، جعفری بروجردی، ب. و عزیزی، ف.، ۱۳۸۴. اثر عصاره گیاه *Dendrostellera leserrtii* بر ترشح *TNF-a* و تنظیم کاهشی آن بر سطح مونوسیت‌های انسانی در محیط کشت. پژوهش در پزشکی، ۲۹(۴): ۳۳۷-۳۴۲.

5-Alviano , DS. and Alviano, CS., 2009. Plant extracts: search for new alternatives to treat microbial diseases. Curr Pharm Biotechnol, 10:106-21.

6-Dash, M., Kumar Patra, J. and Panda, P.P., 2008. Phytochemical and antimicrobial screening of extracts of Aquilaria agallocha Roxb. African Journal of Biotechnology, 7(20): 3531-3534.

7-Hendra,R., Ahmad. S., Sukari, A., Yunus Shukor, M. and Oskoueian, E., 2011. Flavonoid analyses and Antimicrobial activity of various parts of *phaleria macrocarpa (Scheff.)* boerl fruit. Molecular Sciences, 12: (3422-3431).

8-Javidnia, K., Miri, R., Najafi, R.B. and Jahromi, N.K., 2003. A preliminary study on the biological activity of *Daphne muronata royle*. Daru, 11 (1).

9-Kamonwannasit, S., Nantapong, N., Kumkrai,P., Luecha, P., Kupittayanant, S. and Hudapongse, N., 2013. Antibacterial activity of *Aquilaria crassna* leaf extract against Staphylococcus epidermidis by disruption of cell wall. Animal of Clinical Microbiology Antimicrobials, 12 (20): 1-7.

10- Zhou, M., Wang, H., Jiba, S., Kou, J. and Yu, B., 2008. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Aquilaria Senensis (Lour)* Gilg

Leaves Extract. Journal of (Ethnopharmacology), 117: 345-350.

11-Mazutti, M., Mossi, A.J., Cansian, R.L., Corazza, M.L., Dariva, C. and Oliveira, J.V., 2008. Chemical profile Boldo *(peumus boldus molina*) extracts obtained by compressed and antimicrobial activity of carbon dioxide extraction. Braz J Chem Eng, 25(34): 427-434.

12-Nedeljko, T., Pavle, Z., Perica, J., Ratomir, M. and Marina, Ž., 2012. HPLC analysis, antimicrobial and antioxidant activities of *Daphne cneorum L.* Hem. Ind, 66 (5): 709–716.

13-Pourmorad, F., Hosseinimehr, S. and Shahabimajd, N., (2006). Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected iranian medicinal plants. African Journal of Biotechnology,5(11):1142-1145.

14-Tayoub, G., Alnaser, A.A. and Shamma, M., 2012. Microbial inhibitor of the *Daphne oleifolia lam* ethanolic extract. Int.J.Med.Arom.Plant, 2 (1): 161-166.

15-Weinstine, RA., 2001. Controlling antimicrobial resistance in hospitals: Infection control and use of antibiotics. Emerg Infect Dis, 7: 188-192.

16-Yazanparast, R and Meshkini, A., 2009. 3-hydrogenkwadaphnine,a novel diterpene ester from *Dendrostellera lessertii*, its role in differentiation and apoptosis of KG1 cells. Phytomedicine, 16: 206-214.

The *in vitro* antibacterial activity of different organs hydroalcoholic extract of *Dendrostellera lesserti*

Alamhulu M. and Nazeri S.

Agricultural Biotechnology Dept., Bu-Ali Sina University, Hamedan, I.R. of Iran

Abstract

Resistance of many diseases pathogenic bacteria against synthetic drugs and their side effects ,besides high expense of chemical drugs directed the attention to scientists toward natural and herbal medicines usage. The purpose of this study is to investigate the antibacterial properties of root, leaf and stem hydroalcoholic extract of *Dendrostellera lesserti* against some human pathogenic bacteria. *Dendrostellera lesserti* was collected from Hamedan province in 2013. After plant identification, the extracts were prepared using maceration method. The eight positive and negative gram human pathogenic bacteria were tested. For antibacterial properties investigation, agar well diffusion, MIC (serial dilution method) and MBC methods were used. The amount of total phenol was measured by Folin-ciocalteu. The results was statistically analysis using sas 9.2 in factorial with completely randomized design in three replications. Though, the highest growth inhibition zone (18±1.00 mm) in *Bacillus subtillis* culture in presence of root hydroalcoholic extract, the stem hydroalcoholic extract showed more inhibitory and bactericidal effect on the most bacterial cultures. The amount of total phenol in the root, stem and leaf was measured as, 111.8± 2.69, 79.47±0.55 and 69.16±3.29 (mgGAE/g), respectively. According to the results, the root, leaf and stem hydroalcoholic extracts of *Dendrostellera lesserti* contain different amount of phenol and plant contains compounds with antibacterial properties. This research can be used as a base in antimicrobial compounds study of this plant.

Key words: *Dendrostellera lesserti*, antibacterial, human pathogenic bacteria