بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره هیدرو الکلی بارهنگ کبیر (*Plantago major* L.) و ناخنک (*Astragalus hamosus*) بر تعدادی باکتری گرم منفی و گرم مثبت

رقیه امینیان[1*]، محسن مردانی[2] و بهنام داودنیا[1]

[1] ایران، قزوین، دانشگاه بین المللی امام خمینی، دانشکده کشاورزی، گروه ژنتیک و به نژادی گیاهی

[2] ایران، اصفهان، دانشگاه پیام‌نور، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی

تاریخ دریافت: ۹۵/۸/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۶/۳/۲۳

چکیده

بیماری‌زایی بسیاری از باکتری‌ها در انسان و همچنین بروز مقاومت در برخی از آن‌ها نسبت به مواد ضد باکتریایی، نیاز به یافتن انواع مواد ضد میکروبی را افزایش داده است. با توجه به اینکه اخیراً تلاش‌هایی جهت جایگزینی داروهای شیمیایی توسط گیاهان دارویی صورت گرفته است، به همین منظور در این آزمایش تأثیر ضد باکتریایی عصاره هیدروالکلی دو گیاه دارویی بارهنگ کبیر و ناخنک بر تعدادی باکتری گرم مثبت و گرم منفی مورد مطالعه قرار گرفت. این آزمایش بصورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی و با سه عامل اصلی شامل گیاه در دو سطح (بارهنگ کبیر و ناخنک)، باکتری در چهار سطح (شیگلا فلکسنری، آنتروکوکوس فکالیس، استرپتوکوکوس پیوژنز و هموفیلوس آنفلوانزا) و عامل ضد باکتریایی در شش سطح (دو نوع آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین و اریترومایسین و غلظت‌های ۰، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره) انجام شد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که نوع گیاه، باکتری و عامل ضد باکتریایی اثر معنی‌داری را در سطح یک درصد بر قطر هاله بازدارندگی داشتند. نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد اگرچه قدرت بازدارندگی غلظت‌های مختلف عصاره نسبت به دو نوع آنتی بیوتیک پنی‌سیلین و اریترومایسین کمتر بود اما نسبت به شاهد (آب مقطر) معنی دار بود. در این آزمایش، تاثیر عصاره ناخنک در مقایسه با بارهنگ کبیر کمتر بود، هرچند که افزایش غلظت عصاره‌ها، سبب افزایش میزان قطر بازدارندگی رشد باکتری‌ها بخصوص استرپتوکوکوس پیوژنز و انتروکوکوس فکالیس می‌گردید. تأثیر عصاره بارهنگ با غلظت ۷۵ میلی گرم در محدودیت رشد باکتری‌های انتروکوکوس فکالیس و استرپتوکوکوس پیوژنز به ترتیب برابر اریترومایسین و ۷۶ درصد پنی‌سیلین بود.

واژه های کلیدی: اریترومایسین، بارهنگ کبیر، باکتری، پنی‌سیلین، ناخنک

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۸۳۳۹۰۱۱۲۸ ، پست الکترونیکی: roghayehaminian@yahoo.com

مقدمه

یکی از کاربردهای گیاهان دارویی استفاده از آن‌ها بعنوان عوامل ضدمیکروبی است. بررسی‌های انجام شده حاکی از این است که عصاره بسیاری از گیاهان قادر به مهار رشد میکروارگانیزم‌ها می‌باشند (۱۰). داروهای گیاهی به علت داشتن منشأ طبیعی نسبت به داروهای شیمیایی با ارگانیسم‌های بدن سازگاری بیشتری داشته و عوارض آن نادر است (۲).

باکتری‌ها علی رغم ساختار ساده‌ایی که دارند، قادر به ایجاد سویه‌های مقاوم و انتقال و گسترش مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های متداول هستند (۱۵). از جمله باکتری‌های بیماری زا می‌توان به باکتری‌های شیگلا فلکسنری (*Shigella flexneri*) عامل اسهال‌های باکتریایی (۳۳)، استرپتوکوکوس پیوژنز (*Streptococcus pyogenes*) عامل گلودرد چرکی (۲۰)، انتروکوکوس فکالیس

(*Enterococcus faecalis*) عامل ایجاد عفونت‌های بیمارستانی (۳۱) و هموفیلوس آنفلوانزا (*Haemophilus influenza*) عامل بیماری‌زای سیستم تنفسی (۱۶ و ۲۲) اشاره کرد.

گیاه دارویی بارهنگ کبیر حاوی ترکیبات گلی‌کوزید اوکوبین و پلانتاژین و خاصیت ضد میکروبی می‌باشد و رشد آن در اکثر نقاط ایران میسر است. این گیاه در درمان مشکلات تنفسی، تصفیه خون، تب‌بری، رفع اسهال، کاهش دردهای رماتیسمی، التیام التهاب کلیه و مثانه نقش دارد (۴). گیاه دارویی ناخنک یا همان شبدر شیرین نیز در درمان ورم‌های مفصلی، برونشیت، آسم، ورم روده، تشنج، اسهال خونی و ضدعفونی کردن مجاری ادراری نقش دارد (۸). با توجه به تحقیقات صورت گرفته این امکان وجود دارد که ترکیبات ضد میکروبی گیاهی فعالیت باکتری‌ها را از طریق یک مکانیسم متفاوت با آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده موجود مهار کنند و دارای ارزش درمانی در معالجه استرین‌های مقاوم باشند (۱۹). تحقیقات نشان داده است که آلوئه ورا دارای خاصیت ضد میکروبی بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی می‌باشد (۲۶ و ۳۰). مطالعات گذشته نشان داده که عصاره استونی و آبی گل محمدی دارای اثر ضدمیکروبی است (۲۵). همچنین اسانس‌زیره سبز دارای خواص ضد لیستریایی می‌باشد (۹). لذا در این تحقیق به مطالعه اثر عصاره دو گونه گیاهی بارهنگ کبیر و ناخنک بر چهار گونه باکتری، بمنظور یافتن منابع جدید با پایداری بیشتر و عوارض کمتر برای تولید داروهای ضد باکتریایی پرداخته شد.

مواد و روشها

این آزمایش بصورت فاکتوریل با سه عامل اصلی گیاه، باکتری و عامل بازدارنده ضد باکتریایی در قالب طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار در دانشگاه پیام نور مرکز اصفهان انجام گردید. گیاه، در دو سطح شامل ناخنک و بارهنگ کبیر، باکتری در چهار سطح شامل باکتری‌های شیگلا فلکسنری، انتروکوکوس فکالیس، استرپتوکوکوس پیوژنز و هموفیلوس آنفلوانزا و عامل ضد باکتریایی در شش سطح شامل غلظت‌های مختلف عصاره (۰، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی-گرم بر میلی‌لیتر عصاره) و دو نوع آنتی‌بیوتیک (پنی‌سیلین و اریترومایسین) بود.

عصاره گیری و تهیه دیسک: بذور گیاهان از مرکز تحقیقات کرج تهیه و پس از تائید در هر باریوم مرکز پیام-نور، عصاره‌گیری به روش ماسراسیون انجام شد. بدین منظور، ابتدا بذور مربوط به هر گیاه آسیاب گردید. سپس مقدار ۵۰ گرم از پودر حاصل درون ارلن ریخته شد و با ۱۵۰ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد مخلوط گردید و به مدت ۷۲ ساعت بر روی شیکر قرار گرفت. عصاره حاصل توسط کاغذ صافی صاف گردید و توسط دستگاه روتاری در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد با ۶۰ دور در دقیقه در داخل بالن تغلیظ گردید و بعد از تبخیر اتانول در زیر هود میکروبیولوژی تا زمان مصرف جهت انجام آزمایش‌های میکروبی در ویال‌های استریل در فریزر و محل تاریک نگه‌داری شد. سپس از عصاره هیدرو الکلی بذر، غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه گردید. بمنظور تهیه دیسک‌های حاوی غلظت‌های مختلف عصاره، دیسک‌های بلانک استریل به تعداد مشخص و به مدت یک شبانه‌روز درون غلظت‌های مختلف عصاره قرار گرفت.

سوش‌های میکروبی مورد آزمایش: جدایه‌های مختلف باکتری مورد استفاده شامل باکتری‌های گرم منفی شیگلا فلکسنری (ATCC 12022) و هموفیلوس آنفلوانزا (ATCC 9009) و باکتری‌های گرم مثبت انتروکوکوس فکالیس (ATCC 29212) و استرپتوکوکوس پیوژنز (ATCC 8668) بود که از شرکت بهار افشان ایران تهیه گردیدند.

بررسی اثرات ضدمیکروبی: روش انتشار دیسک مورد استفاده در این آزمایش، معمول‌ترین روش برای سنجش مواد ضدمیکروبی است و بعنوان روش کربی- بوئر شناخته

می‌شود (۲۴). ابتدا باکتری‌های تهیه شده در محیط نوترنت آگار کشت شدند. برای این کار، به ویال‌های حاوی باکتری لئوفیلیزه، محیط مایع Brain Heart Infusion Broth (BHIB) به مقدار ۲ میلی‌لیتر اضافه شد. ۱ یا ۲ قطره از سوسپانسیون فوق روی محیط بلاد آگار (Blood agar) و در خصوص هموفیلوس آنفلوانزا به دلیل سخت رشد بودن آن در سایر محیط‌های کشت، روی محیط آگار شکلاتی تلقیح گردید. محیط کشت مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در گرمخانه قرار گرفت تا کلنی‌های ایزوله بدست آید. بمنظور اطمینان از خلوص کشت‌های اولیه، کشت اولیه به روش چهار مرحله‌ای انجام شد و تک کلنی‌های حاصل به روش گرم، رنگ‌آمیزی شد و زیر میکروسکوپ بررسی گردید. جهت پیشگیری از ایجاد جهش باکتریایی و نتایج گمراه‌کننده حاصل از آن، برنامه-ریزی به‌گونه‌ای بود که تعداد پاساژ (Passage) از سه مرتبه تجاوز نکند. سپس سوسپانسیون یکنواختی از باکتری‌های مورد نظر در لوله‌آزمایش ایجاد شد. این لوله‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در گرمخانه ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد تا کدورتی مشابه لوله استاندارد ۰/۵ مک فارلند ایجاد نمایند که OD آن در طول موج ۶۲۰ نانومتر برابر ۰/۱-۰/۰۸ می‌باشد. توسط سوآب استریل از لوله حاوی سوسپانسیون باکتری مقداری برداشت نموده و توسط آن به محیط کشت نوترنت آگار به‌صورت کشت چمنی پاساژ داده شد. سپس دیسک‌های حاوی غلظت‌های مختلف عصاره که حلال آن‌ها کاملاً تبخیر شده بود به کمک پنس استریل بر روی محیط کشت قرار گرفت. در هر پتری دیش چهار دیسک با فواصل معین قرار گرفت که سه دیسک مربوط به غلظت‌های مختلف عصاره و یک دیسک مربوط به شاهد منفی (بدون عصاره) بود. بمنظور بررسی فعالیت آنتی‌باکتریالی آنتی‌بیوتیک‌ها، دیسک‌های آنتی‌بیوتیک استاندارد با سه تکرار بصورت جداگانه مورد ارزیابی قرار گرفتند. درنهایت درب پلیت‌های دیسک گذاری شده را بسته و به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا باکتری‌ها رشد کنند (۲۷). در این مطالعه دیسک‌های آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین و اریترومایسین بعنوان شاهد مثبت و آب مقطر استریل بعنوان شاهد منفی مورد استفاده قرار گرفتند.

آنالیز و بررسی داده‌ها: تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام گردید. در صورت معنی‌دار بودن اثر عامل آزمایشی از آزمون دانکن برای مقایسه میانگین داده‌ها استفاده شد. رسم نمودارها نیز توسط نرم‌افزار EXCEL انجام گردید.

نتایج

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که نوع گیاه تأثیر معنی‌داری در سطح یک درصد بر بازدارندگی رشد باکتری داشت (جدول ۱). بطوریکه اثر بازدارندگی بر رشد باکتری بارهنگ کبیر (۸/۱۷ میلی‌متر) نسبت به ناخنک (۷/۲۷ میلی‌متر) حدود ۱۳ درصد بیشتر بود (جدول ۲). همچنین مطابق نتایج حاصل از تجزیه واریانس مشاهده گردید که نوع باکتری اثر معنی‌داری در سطح یک درصد بر قطر هاله عدم رشد باکتری داشت (جدول ۱)؛ بطوریکه بیشترین قطر هاله عدم رشد مربوط به باکتری استرپتوکوکوس پیوژنز (۱۱/۹۸ میلی‌متر) و کمترین میزان آن در باکتری شیگلا فلکسنری (۳/۶۹ میلی‌متر) مشاهده گردید (جدول ۲). همچنین اثر عامل ضد باکتریایی بر قطر هاله عدم رشد در سطح یک درصد معنی دار بود (جدول ۱).

طبق نتایج مقایسه میانگین‌ها تیمار پنی‌سیلین (با ۱۷/۵ میلی‌متر قطر هاله عدم رشد) و شاهد (با صفر میلی‌متر قطر هاله عدم رشد) به ترتیب دارای بیشترین و کمترین تأثیر بر میزان رشد باکتری بودند. اگر چه اثر غلظت‌های مختلف عصاره مورد استفاده در این آزمایش نسبت به دو نوع آنتی‌بیوتیک کمتر بود اما به طور معنی داری نسبت به شاهد معنی دار بود. اثر بازدارندگی غلظت ۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره‌های هر دو گیاه بیشتر از غلظتهای ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آن‌ها بود (جدول ۲).

جدول ۱- تجزیه واریانس قطر هاله عدم رشد باکتری

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات قطر هاله عدم رشد باکتری
گیاه	۱	۳۱**
باکتری	۳	۵۵۱/۸۵**
عامل ضد باکتریایی	۵	۱۰۳۶/۸۱**
گیاه× باکتری	۳	۱۹/۶۶**
گیاه× عامل ضد باکتریایی	۵	۵۸/۷**
عامل ضد باکتریایی × باکتری	۱۵	۷۵۹/۳۲**
گیاه× باکتری× عامل ضد باکتریایی	۱۵	۶۰/۳۱**
خطای آزمایشی	۹۶	۰/۳۹**
ضریب تغییرات		۸/۱۳

ns،**و*: به ترتیب اختلاف غیر معنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵ و ۰/۰۱.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که اثر متقابل گیاه× باکتری بسیار معنی‌دار بود بطوریکه بر اساس نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها، تیمار بارهنگ و استرپتوکوکوس پیوژنز دارای بیشترین اثر بازدارندگی (با ۱۳/۵۴ میلی‌متر قطر هاله عدم رشد) و تیمار بارهنگ و شیگلا فلکسنری با ۳/۶۹ میلی‌متر، و ناخنک و شیگلا فلکسنری با ۳/۶۸ میلی‌مترقطر هاله عدم رشد دارای کمترین اثر بازدارندگی بر رشد باکتری بودند (شکل ۱).

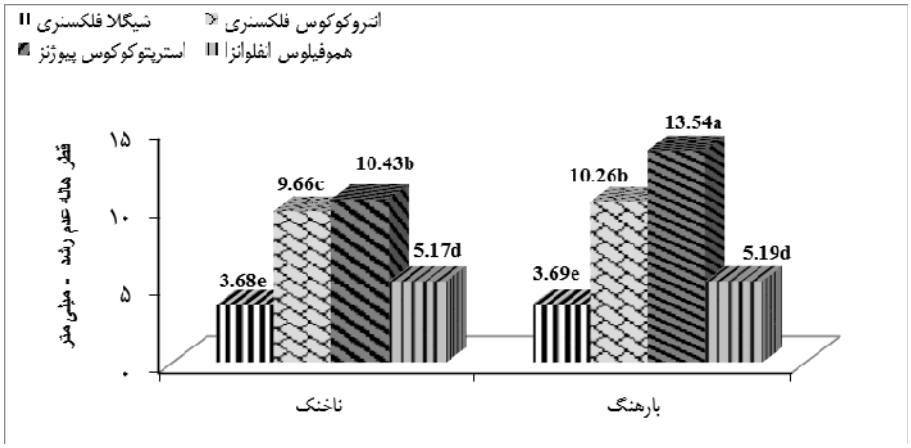
همچنین طبق تجزیه واریانس، اثر متقابل گیاه × عامل ضد باکتریایی در سطح یک درصد معنی‌دار گردید (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیشترین و کمترین قطر هاله عدم رشد باکتری به ترتیب مربوط به اثر متقابل پنی‌سیلین × ناخنک و شاهد × گیاه می‌باشد. همچنین در بین غلظت‌های مختلف عصاره اثر متقابل غلظت mg/ml ۷۵ × بارهنگ دارای بیشترین مقدار (۸/۷۶ میلی‌متر) تأثیر بر بازدارندگی رشد باکتری بود. بر اساس نتایج مقایسه میانگین‌ها غلظت‌های مختلف عصاره گیاه بارهنگ کبیر تأثیر بیشتری نسبت به غلظت‌های مشابه در گیاه ناخنک بر بازدارندگی رشد باکتری‌ها داشت (شکل ۲).

اثر متقابل باکتری × عامل ضد باکتریایی دارای تأثیر معنی‌داری در سطح یک درصد بر میزان بازدارندگی رشد باکتری بود (جدول ۱). مقایسه میانگین تیمارهای اثر متقابل باکتری × عامل ضد باکتریایی اختلاف معنی‌داری را نشان داد بطوریکه اثر متقابل پنی‌سیلین × انتروکوکوس فکالیس دارای بیشترین میزان قطر هاله عدم رشد (۲۴/۷۵ میلی‌متر) و اثر متقابل شاهد × تمام باکتری‌ها بر میزان بازدارندگی رشد باکتری بدون تأثیر بود.

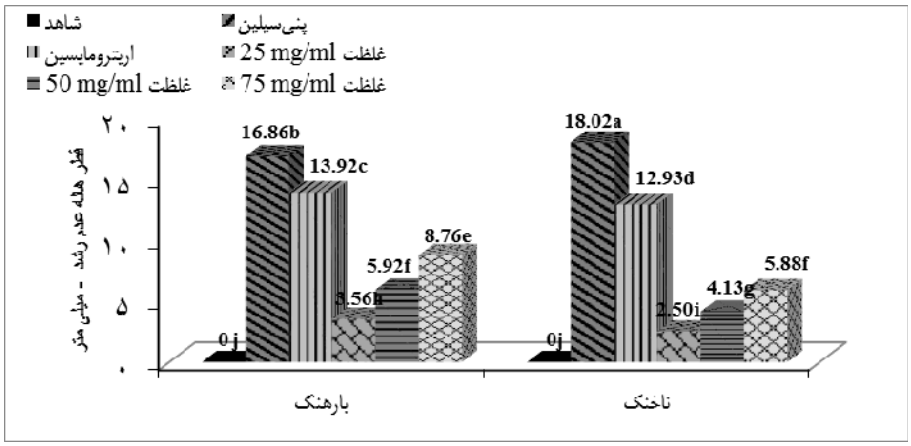
جدول ۲- مقایسه میانگین‌های اثرات اصلی تیمارهای آزمایشی بر قطر هاله عدم رشد باکتری

تیمار	قطر هاله عدم رشد باکتری (میلی‌متر)
گیاه	
بارهنگ	۸/۱۷a
ناخنک	۷/۲۴b
باکتری	
استرپتوکوک پیوژنز	۱۱/۹۸a
انتروکوکوس فکالیس	۹/۹۷b
هموفیلوس آنفلوانزا	۵/۱۸c
شیگلا فلکسنری	۳/۶۹d
عامل ضد باکتریایی	
پنی‌سیلین	۱۷/۵a
اریترومایسین	۱۳/۴۲b
۷۵ mg/ml	۷/۳۲c
۵۰ mg/ml	۵d
۲۵ mg/ml	۳e
شاهد	۰f

میانگین‌های که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند بر اساس آزمون دانکن فاقد اختلاف معنی‌داری هستند (p≤۰/۰۵).



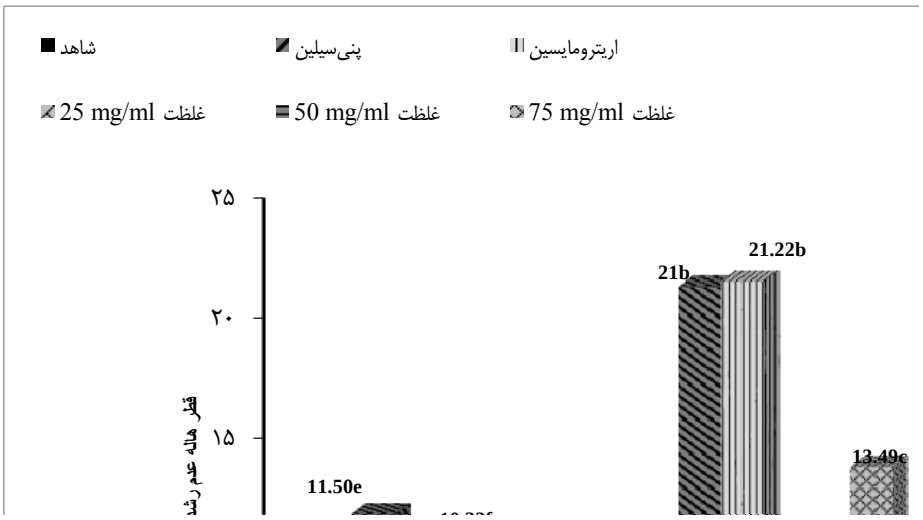
شکل ۱- مقایسه میانگین اثر متقابل گیاه × باکتری بر قطر هاله عدم رشد باکتری



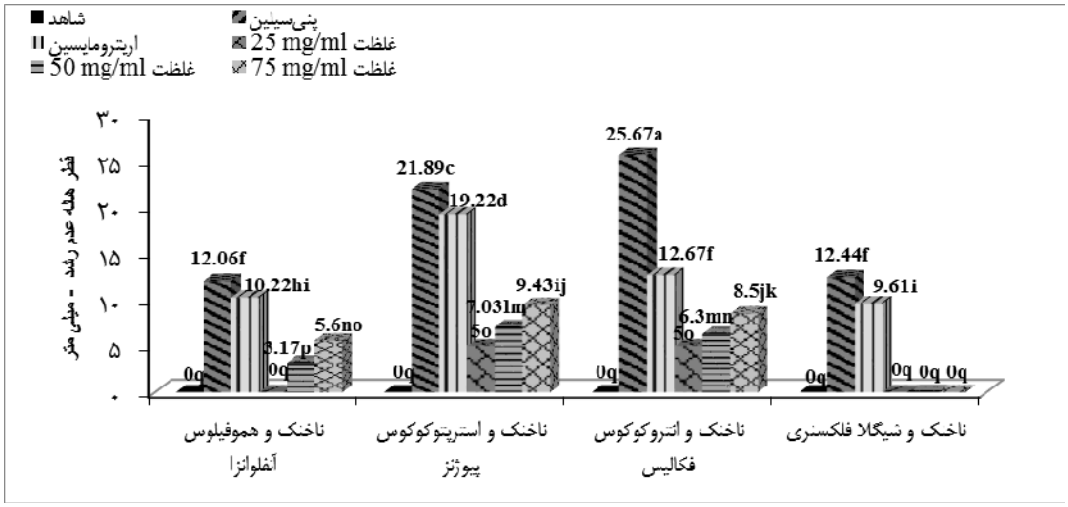
شکل ۲- مقایسه میانگین اثرات متقابل گیاه× عامل ضد باکتریایی بر قطر هاله عدم رشد باکتری

در بین غلظت‌های مختلف عصاره، اثر متقابل غلظت ۷۵ mg/ml × استرپتوکوکوس پیوژنز و سپس اثر متقابل غلظت ۷۵ mg/ml × انتروکوکوس فکالیس دارای بیشترین قطر هاله عدم رشد باکتری بودند درحالی‌که غلظت‌های مختلف عصاره تأثیری بر بازدارندگی رشد باکتری شیگلا فلکسنری نداشت (شکل ۳).

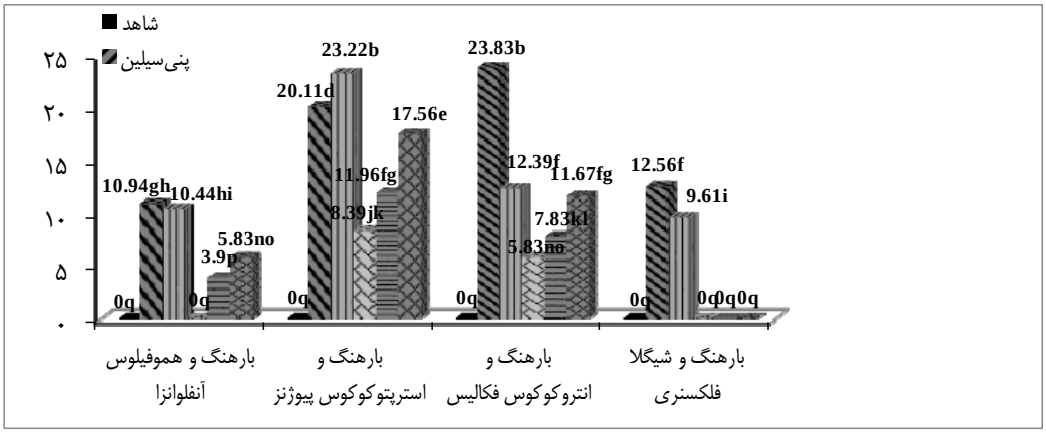
یافته‌های حاصل از تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که اثر متقابل گیاه × باکتری × عامل ضد باکتریایی بر قطر هاله‌ی عدم رشد بسیار معنی‌دار بود. بیشترین مقدار بازدارندگی مربوط به تیمار ناخنک، باکتری انتروکوکوس فکالیس و عامل ضد باکتریایی پنی‌سیلین (۲۵/۶۷) و کمترین مقدار بازدارندگی مربوط به به تیمارهای بدون عمل بازدارندگی گیاهی یا آنتی بیوتیکی بود (شکل ۴). همان‌طور که در شکل ۴ مشخص است اثر غلظت‌های مختلف عصاره هر دو گیاه در محدودیت رشد باکتری‌ها در باکتری‌های گرم مثبت (استرپتوکوکوس پیوژنز و انتروکوکوس فکالیس) نسبت به همین مقدار در باکتری‌های گرم منفی (شیگلا فلکسنری و هموفیلوس آنفلوانزا) متفاوت بود. عصاره بارهنگ با غلظت ۷۵ mg/ml تأثیری معادل ۷۶ درصد تأثیر پنی‌سیلین بر باکتری استرپتوکوکوس پیوژنز و برابر اریترومایسین بر باکتری انتروکوکوس فکالیس داشت. هرچند گیاه ناخنک تأثیر قابل ملاحظه‌ای بر محدودیت رشد باکتری‌ها نشان داد اما این تأثیر در مقایسه با گیاه بارهنگ کمتر بود.



شکل ۳- مقایسه میانگین اثرات متقابل باکتری× عامل ضد باکتریایی بر قطر هاله عدم رشد باکتری



شکل ۴- مقایسه میانگین اثرات متقابل عامل ضد باکتریایی × باکتری× گیاه بر قطر هاله عدم رشد باکتری



ادامه شکل ۴

بحث

میکروارگانیسم‌ها از عوامل مهم ایجاد بیماری در انسان می‌باشند و مرگ و میر ناشی از آن‌ها سبب شده انسان به فکر روش‌های مقابله با میکروارگانیسم‌ها باشد. با توجه به افزایش روز افزون مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها متخصصین این امر در تلاش هستند تا مواد با خاصیت ضدمیکروبی جدید جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها نمایند که در این میان محصولات با خواص ضد میکروبی گیاهی به خاطر سهولت در دسترسی و میزان کم عوارض آن‌ها، بیشتر مورد توجه می‌باشند (۱۷). به همین منظور در این آزمایش اثر ضد باکتریایی عصاره دو گونه بارهنگ کبیر و ناخنک در غلظت‌های مختلف بر روی چهار نوع باکتری مورد مطالعه قرار گرفت که از پنی‌سیلین و اریترومایسین به دلیل خواص آنتی‌بیوتیکی بر بسیاری از باکتری‌ها بعنوان شاهد مثبت و از آب مقطر استریل بعنوان شاهد منفی استفاده گردید. مطابق نتایج آزمایش نوع گیاه و باکتری تاثیر معنی‌داری بر روی قطر هاله عدم رشد داشتند. در مطالعات گذشته اثر ضد باکتریایی بارهنگ کبیر و خرنوب (*Ceratonia Siliqua*) بر باکتری‌های گرم مثبت گونه‌های لاکتوباسیلوس(*Lactobacillus*) و استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*) و باکتری‌های گرم منفی گونه‌های پروتئوس (*Proteus*)، سودوموناس آئروژینوزا (*Pseudomonas aeruginosa*)، اشرشیاکلای (*Escherichia coli*)و گونه‌های انتروکوکوس بر اساس قطر هاله عدم رشد بررسی و مشخص گردید هر دو گیاه بر باکتری‌های مذکور دارای اثر ضد میکروبی بوده و اثر عصاره بارهنگ بیش از خرنوب گزارش گردید (۱۳). همچنین نتایج حاصل از بررسی عصاره الکلی سیر نشان داد که عصاره الکلی این گیاه روی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به آنتی بیوتیک دارای اثر قابل ملاحظه ای می باشد (۵). در همین راستا در تحقیقی که در مورد اثر عصاره الکلی و آبی بذر گندم بر باکتری‌ها انجام شد مشخص گردید که عصاره متانولی بر باکتری استرپتوکوکوس پیوژنز اثر قابل‌توجهی داشته و بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس اثر قابل‌توجهی نداشت (۱۱). این موضوع نشان دهنده این است که نوع باکتری بر قطر هاله عدم رشد موثر می‌باشد و باکتری‌های مختلف حساسیت مختلفی را در مقابل عصاره‌های یکسان نشان می‌دهند. نتایج این آزمایش مشخص نمود که میزان تأثیر عصاره بر باکتری‌های گرم منفی کمتر از باکتری‌های گرم مثبت می‌باشد. در واقع عدم تأثیر یا تأثیر بسیار کم غلظت‌های مختلف عصاره هر دو نوع گیاه بارهنگ کبیر و ناخنک بر روی باکتری‌های گرم منفی (شیگلا فلکسنری و هموفیلوس آنفلوانزا) می‌تواند بیانگر این موضوع باشد که این گیاهان تأثیر بیشتری بر بازدارندگی باکتری‌های گرم مثبت (استرپتوکوکوس پیوژنز و انتروکوکوس فکالیس) نسبت به باکتری‌های گرم منفی دارند. طبق نتایج تحقیقات قبلی عصاره‌های گیاهی بیشتر در باکتری‌های گرم مثبت فعال هستند تا باکتری‌های گرم منفی و به نظر می‌رسد این فعالیت ضد میکروبی به خاطر حضور تانن‌های موجود در عصاره گیاهی باشد (۱۴). یکی دیگر از دلایلی که می‌توان برای عدم تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره دو گیاه ذکرشده در باکتری شیگلا فلکسنری بیان کرد، می‌تواند به دلیل وجود نوعی مکانیسم مقاومت در باکتری مذکور باشد که باعث مقاومت آن در برابر گیاه بارهنگ کبیر و ناخنک گردیده است که با نتایج سایر آزمایش‌ها در این رابطه منطبق می‌باشد. در تحقیقات قبلی گزارش گردیده است که تأثیر غلظت‌های متفاوت عصاره هیدرو الکلی گیاه بیلهر (*Dorema aucheri*) در باکتری‌های گرم منفی به جز اشریشیاکلی مطلوب نبوده است ولی عصاره این گیاه در باکتری‌های گرم مثبت مورد آزمایش دارای تأثیر مناسب بود و هاله عدم رشد قابل قبولی ایجاد شد (۷). در مطالعه-ی دیگری عصاره‌های آبی و الکلی گیاه گلرنگ با غلظت ۱gr/ml دارای اثرات ضد میکروبی قابل‌ملاحظه‌ای بر باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، انتروکوکوس

فکالیس و سالمونا تیفی بوده و بر باکتری‌های اشریشیاکلی، باسیلوس سرئوس و شیگلا فلکسنری فاقد اثر میکروبی بودند. همچنین در آزمایشی که بمنظور ارزیابی خاصیت ضد میکروبی سه گونه از جنس مرکبان (*Centaurea* L.) بر چهار گونه باکتری گرم مثبت و سه گونه باکتری گرم منفی انجام شد مشخص گردید که هیچ یک از گونه‌ها بر روی سه گونه باکتری گرم منفی انترو باکترآئروژنز (*Enterobacter aerogenes*)، سراشیا مارسسنس (*Serratia marcesens*) و اشریشیاکلی موثر نبودند ولی تمام عصاره‌ها در برابر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس خاصیت ضدمیکروبی خوبی نشان دادند (۳). در واقع باکتری‌های گرم منفی به دلیل نوع دیواره‌ایی که دارند حساسیت کمتری در برابر عوامل ضدمیکروبی از خود نشان می‌دهند، که علت آن می‌تواند وجود لیپو پلی ساکاریدهای دیواره سلول‌های باکتری‌های گرم منفی باشد که از ورود مولکول‌های آب گریز و بزرگ به داخل سلول ممانعت می‌کند و از آن جهت که ترکیبات موثر در عصاره گیاهی آب گریز می‌باشند می‌توان نتیجه گرفت که نوع دیواره موجود در باکتری‌های گرم منفی مانع نفوذ این ترکیبات به درون سلول و در نتیجه مقاومت باکتری‌های گرم منفی به عصاره‌های گیاهی می‌شود (۱۰). در مطالعه دیگری مشاهده شد که گیاه ناخنک دارای مقدار فلاونوئید بیشتری نسبت به سایر گونه‌های خود می‌باشد؛ در نتیجه با توجه به خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی فلاونوئید، این گیاه نسبت به سایر هم گونه‌های خود خاصیت ضد باکتریایی بالاتری دارد (۲۹). در گزارشات قبلی اسانس گیاه مریم‌گلی سفید (*Salvia chloroleuca*) بر باکتری‌های گرم منفی تأثیر نداشته اما بر باکتری‌های گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس و کلستریدیوم پرفریژنس (*Clostridium perfringens*) مؤثر بوده است که با نتایج این آزمایش مطابقت دارد (۱۲). همچنین در مطالعات قبلی نشان داده شده که عصاره هیدرو الکلی دانه گیاه اسفرزه در غلظت‌های مختلف بر باکتری‌های گرم منفی تأثیری نداشته ولی در باکتری‌های گرم مثبت به‌جز استرپتوکوکوس پنومونیه (*Streptococcus pneumoniae*) نتیجه نسبتاً قابل قبولی را داشته است (۶). نتایج حاصل از آزمایش حاضر نشان‌دهنده این موضوع است که در هر دو گیاه بارهنگ کبیر و ناخنک با افزایش غلظت عصاره میزان تأثیر آن بر بازدارندگی رشد باکتری افزوده شده است و در مواردی اثری مشابه اثر آنتی‌بیوتیک مورد استفاده در آزمایش داشته است که با یافته‌های محققان دیگر منطبق می‌باشد (۱ و ۸). بر اساس نتایج بدست‌آمده از تحقیقات قبلی مشخص شد که گیاه بارهنگ کبیر حاوی ترکیبات بیولوژیکی فعالی مانند، پلی‌ساکاریدها، لیپیدها، ترکیبات فنولی، فلاونوئیدها، گلیکوزیدها، ترپنوئیدها (۱۸ و ۳۲)، ترکیبات بنزوئیکی مانند وانیلیک اسید (۱۸)، تانن‌ها، ساپونین‌ها و استرول‌ها (۲۳) و همچنین دارای ماده *Plantamajoside* (مشتق اصلی ماده کافئیک اسید) بوده که سبب ایجاد خاصیت ضد التهابی، آنتی‌اکسیدانی و ضد باکتریایی در بارهنگ می‌شود (۳۲). فلاونوئیدهایی مانند اپی‌ژنین، بای‌کالین، لوتئولین، هیسپیدولین، پلنتاگنین، اسکوتلارئین و هموپلنتاگنین از بارهنگ کبیر جدا سازی شدند (۳۲ و ۳۵)، که دارای فعالیت‌های ضد آلرژی، ضدویروسی، ضدالتهابی، گشادکنندگی عروق و همچنین قابلیت القای مرگ سلول‌های سرطانی می‌باشند (۲۸). بنابراین می‌توان خواص آنتی‌بیوتیکی مشاهده شده در تحقیق حاضر را مربوط به ترکیبات ذکرشده دانست. یکی دیگر از عواملی که سبب افزایش خاصیت ضد باکتریالی عصاره گیاهی می‌شود نوع حلال مورد استفاده برای تهیه عصاره می‌باشد؛ بطوریکه، استخراج عصاره در بارهنگ کبیر با حلال هیدرو الکلی نسبت به سایر حلال‌ها (هگزانی، کلروفورمی و متانولی) دارای خاصیت ضد میکروبی بیشتری می‌باشد. در راستای نتایج این تحقیق، در مطالعات انجام‌شده گذشته گزارش‌شده است که عصاره آبی بارهنگ از رشد باکتری باسیلوس سابتیلیس (*Bacillus subtilis*) و مایکوباکتریوم توبرکلوسیس(*Mycobacterium tuberculosis*) ممانعت

می‌کند (۲۱)، درحالی‌که عصاره هگزانی مانع رشد اشریشیاکلای می‌شود (۳۵) و عصاره‌های متانولی و کلروفورمی قسمت‌های هوایی گیاه بطور ضعیفی بترتیب از رشد باسیلوس سوبتیلیس و اشرشیاکلای ممانعت می‌کنند (۳۵). در آزمایشات قبلی عصاره متانولی گیاه یک فعالیت ضد باکتریایی معنی‌داری را در مقابل مایکوباکتریوم فلی (*Mycobacterium phlei*)از خود نشان داد (۲۱). همچنین در آزمایشی دیگر اثرات عصاره بارهنگ کبیر بر روی دو گونه باکتری گرم مثبت (باسیلوس سابتیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس)، دو گونه باکتری گرم منفی (سودوموناس آئروژینوزا و اشرشیاکلای)، دو مخمر ساکرومایسس سروزیه (*Saccharomyces cerevisiae*) و کاندیدا آلبیکنس(*Candida albicans*) و قارچ آسپرژیلوس نیجر(*Aspergillus niger*) مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصل از تحقیقات نشان داد که عصاره متانولی بارهنگ کبیر تأثیری بر میکروارگانیسم‌های فوق نداشت درحالی‌که عصاره هیدروالکلی این گیاه تأثیر بهتری نسبت به میکروارگانیسم‌ها به‌خصوص قارچ‌ها داشت (۳۴).

نتیجه‌گیری نهایی

طبق نتایج تحقیق عصاره هر دو گیاه بارهنگ و ناخنک سبب بازدارندگی رشد باکتری‌های گرم مثبت شدند، ولی بر باکتری‌های گرم منفی بخصوص شیگلا فلکسنری تأثیر نداشتند. که می‌تواند به دلیل وجود مکانیسم‌های مقاومت در باکتری‌های گرم منفی در برابر ترکیبات ضد میکروبی موجود در عصاره گیاهی باشد. همچنین هرچند عصاره گیاه ناخنک بر قطر بازدارندگی مؤثر بود اما این میزان نسبت به بارهنگ کبیر قابل‌مقایسه نبود. به‌طورکلی با توجه به نتایج این آزمایش و یافته‌های دیگر محققین می‌توان گفت، عواملی مانند نوع حلال مورد استفاده برای عصاره‌گیری، نوع گونه، اقلیم و تمام عواملی که بر روی غلظت و ترکیبات عصاره تأثیر گذار هستند، می‌توانند به‌عنوان عاملی مؤثر در افزایش خاصیت ضدمیکروبی عصاره، مورد مطالعه و بهره‌برداری قرار بگیرند. همچنین با توجه به اینکه عصاره گیاه بارهنگ تأثیری نزدیک به پنی‌سیلین و برابر با اریترومایسین به ترتیب در بازدارندگی رشد باکتری‌های استرپتوکوکوس پیوژنز و انتروکوکوس فکالیس از خود نشان داد می‌توان از عصاره این گیاه بعد از شناسایی و تغلیظ عامل ضد میکروبی موجود در عصاره، بررسی بیان ژن دخیل در سنتز آن و همچنین استفاده از الیسیتورهای مؤثر در افزایش بیان ژن مورد نظر در تولید دارو استفاده کرد.

منابع

۱- ابراهیمی، ا.، خیامی، م.، نجاتی، و.، ۱۳۹۰. ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی عصاره ی هیدروالکلی میوه بلوط ایرانی در روش انتشار دیسک. فصلنامه گیاهان دارویی، ۱ (۳۳): ۲۶-۳۴.

۲- اشراقی س. س.، امین غ.، أطاری ا.، ۱۳۸۸. بررسی اثرات ضدباکتریایی و مروری بر ۱۰ گونه گیاهی علیه سوش‌های بیماری زای نوکاردیا. فصلنامه گیاهان دارویی، ۴ (۳۲): ۶۰-۷۸.

۳- الماسی ن.، کرمیان ر.، کریمی ف.، ۱۳۹۴. ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد باکتریایی عصاره متانولی سه گونه از جنس *Centaurea L.* (مرکبان) از ایران. مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست شناسی ایران)، ۲۸ (۲): ۳۴-۴۱.

۴- امین، غ.، ۱۳۸۴. گیاهان داروئی سنتی ایران. انتشارات معاونت پژوهشی وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی. ۲۳۰ صفحه.

۵- بکائیان م.، فرازمند ر.، کی قبادی س.، سعیدی س.، ۱۳۹۴. بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره اتانولی سیر(*Allium Sativum*) بر روی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به آنتی بیوتیک های مختلف. مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست شناسی ایران)، ۲۸ (۱): ۲۲۴-۲۳۴.

۶- شریفی، ا.، نغماچی، م.، جاهد ، س.، خسروانی، س. ع.، ۱۳۸۹. مطالعه خواص ضد میکروبی عصاره هیدروالکلی دانه گیاه اسفرزه . مجله ارمغان دانش، ۲: ۱۹۱-۱۹۹.

۷- شریفی، ا.، نغماچی، م.، بهرامی، س.، ۱۳۸۹. مطالعه خواص ضد میکروبی عصاره هیدروالکلی گیاه بیلهر. مجله ارمغان دانش، ۴: ۳۸۷-۳۷۸.

۸- عبادی، ا. منادی، ع. پاشازاده، م. ذخیره، س.، ۱۳۹۲. بررسی اثرات ضد باکتریایی عصاره الکلی گیاه ناخنک بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی. پاتوبیولوژی مقایسه‌ای، ۱۰: ۱۰۷۱-۱۰۷۶.

۹- فضل آرا ع. صادقی ا، رستمی سلیمانی پ.، ۱۳۹۱. مطالعه تأثیر ضد باکتریایی اسانس گیاه زیره سبز بر باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در پنیر سفید ایرانی. فصلنامه علوم و صنایع غذایی. ۹ (۳۵): ۳۵-۴۴.

۱۰- کرمانشاهی ر.، معطر ف.، سلیمانی منش ع.، ۱۳۸۵. ارزیابی اثرات ضد باکتریایی عصاره های آبی و الکلی گیاه گلرنگ بر روی تعدادی از باکتری ها، مجله علوم دانشگاه شهید چمران اهواز، ۱۵: ۱۸-۲۶.

۱۱- کمیلی زاده، ح.، حاکمی والا، م.، کمالی نژاد، م.، نشاط آشفته، س.، ۱۳۸۷. بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره آلی و آبی دانه-های گیاه *Triticum sativum* L. بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی. فصلنامه گیاهان دارویی، (۴) ۲۸: ۱۰۵-۱۱۱.

۱۲- یدالهی ا.، فیروزنیا، ع.، ۱۳۸۸. بررسی اثر ضد میکروبی اسانس مریم گلی سفید بر چندی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی. مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران. (۴) ۵: ۶۹-۷۶.

13- Abd Razik B. M., Ali Hasan M., Khalil Murtadha, M., 2012. The Study of Antibacterial Activity of *Plantago Major* and *Ceratonia Siliqua*. The Iraqi Postgraduate Medical Journal, 11(1).130-135.

14- Basri D. F., Fan S. H., 2005. The potential of aqueous and acetone extracts of galls of *Quercus infectoria* as antibacterial agents. Indian Journal of Pharmacology, 37 (1): 26-29.

15- Boosinger T. R., Dillon A. R. 1992., Campylobacter jejuni infections in dogs and the effect of erythromycin and tetracycline therapy on fecal shedding. Journal of the American Animal Hospital Association, 28: 33-38.

16- Borderon J. C. 1995., Haemophilus influenzae: colonisation et infection. Archives de pediatrie, 2(3): 249-254..

17- Cawan M. M. 1999., Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews, 12(4): 564 – 582.

18- Chiang L., Chiang W., Chang M., Lin C. 2003., In vitro cytotoxic, antiviral and immunomodulatory effects of *Plantago major* and *Plantago asiatica*. American Journal of Chinese Medicine, 31 (2): 225.

19- Ebrahimzadeh M. A., Pourmorad F., Bekhradnia A. Z. 2008., Iron chelating activity, phenol and flavonoid content of some medicinal plants from Iran. African Journal of Biotechnology, 7(18): 3188-3192.

20- Forbes B. A., Sahm D. F., Weissfeld A. S. 2002., Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 10th ed. Mosby Inc. St. Louis. MO.

21- Gautam R., Saklani A., Jachak S.M. 2007., Indian medicinal plants as a source of antimycobacterial agents. Journal of Ethnopharmacology, 110 (2): 200.

22- Hotomi M., Fujihara K., Sakai A., Billal D. S, Shimada J., Suzumoto M., Yamanaka N. 2006. , Antimicrobial resistance of *Haemophilus influenzae* isolated from the nasopharynx of Japanese children with acute otitis media, Acta oto-laryngologica. 126(3): 240-247.

23- Jurisic Grubesic R., Vukovic J., Kremer D., Vladimir Knezevic S. 2005., Spectrophotometric method for polyphenols analysis: Prevalidation and application on *Plantago* L. species. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences, 39 (3–4): 837.

24- Khosravi A. D., Behzadi A. 2006., Evaluation of the antibacterial activity of the seed hull of *Quercus Brantii* on some gram negative bacteria. Pakistan Journal of Medical Sciences, 22 (4): 429 – 32.

25-Kurhade B., Vite M. H., Nangude S. L., 2011., Antibacterial activity of rosadamascena miller. International Journal of in Pharmaceutical and Biomedical Sciences, 10:1015-20.

26- Lalitha Devi D., Srinivas B., Bandaru Narasinga R., 2012., An evaluation antimicrobial activity of Aloe barbadensis miller (Aloe vera) gel extract. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences , 21: 1-4.

27- Murray P., Baron R., fauer E. J., Tenoyer M., Yolken F. C., Robert H., 1999. Manual of Clinical Microbiology. 7th Ed. American society for microbiology.

28- Pietta P., Flavonoids as antioxidants. 2000. Journal of Natural Products. 63 (7): 1035.

29- Platikanov S., Evstatieva L., Nicolov S., 2002. Dynamic of accumulation of the flavonoids in *Astragalus hamosus* L. Proceeding of the 7th symposium on Flora of Southeastern Serbia and neighbouring Regions, Dimitrovgrad.

30- Renisheya Joy Jeba Malar T., Johnson M., Nancy Beaulah S., Laju R. S., Anupriya G., Renola T., 2012. Anti-Bacterial and Antifungal Activity of *Aloe vera* Gel extract. International Journal of Biomedical and Advance Research, 3:184-187.

31- Ryan K. J, Ray C.G., 2004. Sherris Medical Microbiology (4th ed.). Mc Graw Hill.

32- Samuelsen A. B. 2000. The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major L*. A review Journal of Ethnopharmacology. 71 (1–2): 1.

33- Sivapalasingam S., Nelson J. M., Joyce K., Hoekstra M., Angulo F. J., Mintz E. D., 2006. High prevalence of antimicrobial resistance among Shigella isolates in the United States tested by the National Antimicrobial Resistance Monitoring System from 1999 to 2002. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 50(1): 49-54.

34-Stanisavljevic I. T., Stojicevic S. S., Velickovic D. T., Lazic M. L., Veljkovic V. B., 2008. Screening the antioxidant and antimicrobial properties of the extracts from plantain (*Plantago major* L.) leaves. Separation Science and Technology, 43(14): 3652-3662.

35. Velasco Lezama R., Tapia Aguilar R., Roman Ramos R., Vega Avila E., Perez Gutierrez M. S., 2006. Effect of *Plantago major* on cell proliferation in vitro. Journal of Ethnopharmacology, 103 (1): 36.

The effect of hydro alcoholic extract of *Plantago major* and *Astragalus hamosus* on some gram-positive and gram-negative bacteria

Aminian R.[1], Mardani M.[2] and Davoodnia B.[1]

[1] **Dept. of Genetic and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Imam Khomeini International University (IKIU), Qazvin, I.R. of Iran**

2 Dept.of Biothechnology, Facultyof Agriculture, Payame Noor University, Isfahan, I.R. of Iran

Abstract

Pathogenesis of many bacteria in humans as well as their resistance to anti-bacterial substances has increased the need to find anti-microbial agents. Recently, efforts have been made to replace the synthetic drugs by medicinal plants. Therefore, in this experiment the antibacterial effects of hydro- alcoholic extract of *Plantago major* and *Astragalus hamosus* on some gram-positive and gram-negative bacteria were studied. The factorial experiment was conducted based on completely randomized design with three replications and three main agents including plants in two levels (*Plantago major* and *Astragalus hamosus*), bacteria in four levels (*Shigella flexneri*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes* and *Haemophilus influenza*) and anti-bacterial substance in six levels (the antibiotic Penicillin, the antibiotic Erythromycin, concentrations 0, 25, 50 and 75 mg/ml of extract). Analysis of variance showed that the type of plants, bacterial species and antibacterial agents had a significant effect on the zone of inhibition ($p \leq 0.01$). Comparison of means showed that although inhibitory effects of different concentrations of extracts were less than two antibiotics Penicillin and Erythromycin, their effects were significantly higher than the control (distilled water). The results showed less impact of *Astragalus hamosus* extract compared with *Plantago major*, however, Increasing in extract concentration increased the zone of inhibition, especially in *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus pyogenes*. The effect of *Plantago major* extract (75 mg/ml) on *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus pyogenes* was equal with Erythromycin and 76% Penicillin, respectively.

Key words: *Astragalus hamosus*, Bacterium**,** Erythromycin, Penicillin *and Plantago major*