

فعالیت ضدباکتریایی عصاره هیدروالکلی اندام‌های مختلف گیاه سیاه‌گینه (*Dendrostellera lesserti*) در شرایط درون‌شیشه‌ای

مصطفی علم‌هولو 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 سیاه‌گینه علیه برخی باکتری‌های بیماری‌زای انسانی است. گیاه سیاه‌گینه 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 کاملاً تصادفی در سه تکرار آنالیز آماری شد. هر چند، بیشترین هاله بازدارندگی ($18 \pm 1/00$ میلی‌متر) در کشت باکتری باسیلوس سابتیلیس 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 به ترتیب $111/8 \pm 2/69$ ، $47 \pm 0/55$ و $69/16 \pm 3/29$ ($mgGAE/g$) اندازه‌گیری شد. آزمایش‌ها انجام شده در این تحقیق نشان داد که عصاره هیدروالکلی ریشه، برگ و ساقه گیاه سیاه‌گینه 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: سیاه‌گینه، ضدباکتری، باکتری‌های بیماری‌زای انسانی

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

مقدمه

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 از جمله عفونت‌ها مورد توجه قرار گرفته‌اند (۱۱). بسیاری از خواص آنتی‌میکروبی عصاره‌های گیاهی به علت وجود

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 آنتی‌بیوتیک‌ها، تحقیقات برای کشف گیاهانی با خاصیت ضدباکتریایی افزایش یافته است. در بیشتر باکتری‌ها، استفاده بی‌رویه از داروهای ضد میکروبی سنتزی منجر به

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 قبلاً به اثبات رسیده است. عصاره هیدروالکلی برگ سیاه‌گینه، مشابه داروی گیاهی آنتی‌نئوپلاستیک تاکسول، سبب تحریک آزاد شدن فاکتور نکروزدهنده بافتی آلفا توسط مونوسیت‌ها در محیط کشت و نیز سبب تنظیم کاهشی تعداد گیرنده‌های فاکتور نکروزدهنده بافتی آلفا در سطح مونوسیت‌های انسان می‌گردد (۴). ۳- هیدروجنکوآدافنین یک استر دی‌ترین نوع دافنان ایزوله شده از برگ‌های گیاه دارویی سیاه‌گینه با خاصیت ضد سرطانی است. یزدانپرست و مشکینی (۲۰۰۹) اثر بازدارندگی این ترکیب را روی سلول سرطانی خون *KGI* نشان دادند (۱۶). البته خواص دارویی جنس‌های دیگر این خانواده نیز گزارش شده است. برگ‌های گیاه *Aquilaria senensis* برای درمان بیماری‌های وابسته به زخم مانند شکستگی و کیودشدگی 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 سیاه‌گینه روی رشد برخی باکتری‌های بیماری‌زای انسانی است.

مواد و روشها

مواد شیمیایی: محیط‌کشت‌های نوتریت برات و مولر

هیتون آگار از شرکت مرک آلمان و دیسک‌های آنتی‌بیوتیک آموکسی‌سیلین و کانامایسین از شرکت پادتن تب خریداری شدند.

جمع‌آوری گیاه و روش عصاره‌گیری: در تابستان ۱۳۹۲، گیاه سیاه‌گینه از ارتفاعات کوه الوند استان همدان جمع‌آوری 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 استفاده شد و پس از خشک شدن کامل در دمای ۴۰ درجه سلسیوس، عصاره‌ها در فریزر ۲۲- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

تهیه سویه‌های میکروبی استاندارد: سویه‌های باکتریایی از دانشگاه علوم پزشکی استان همدان تهیه شدند. اسامی این سویه‌ها عبارتند از: میکروکوکوس لوتئوس (PTCC1110)، باسیلوس سابیلیس (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 هیتون آگار منتقل و ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد. در زمان آزمایش یک لوپ از کشت تازه باکتری به یک میلی‌لیتر محیط نوتریت برات انتقال و در دمای ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. غلظت سوسپانسیون باکتری برابر نیم مک

چاهک‌ها ریخته شد. پلیت‌ها ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند (۷). آنتی بیوتیک‌های آموکسی‌سیلین (۲۵ میکروگرم) برای باکتری‌های گرم مثبت و کانامایسین (۳۰ میکروگرم) 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 اندازه‌گیری شد (شکل ۱).



شکل ۱- 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*

شدند. پس از ۲۴ ساعت، کمترین غلظتی از عصاره که در آن رشد باکتری مشاهده نشد به عنوان MBC در نظر گرفته شد.

میزان فنول کل: برای اندازه‌گیری محتوای فنول کل از واکنش گر 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 اندازه‌گیری شد. مقدار فنول کل معادل میلی‌گرم اسیدگالیک بر گرم وزن عصاره خشک محاسبه شد.

آنالیز آماری: این پژوهش در قالب فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵

فارلند ($10^8 \times 1/5$ باکتری در میلی‌لیتر) برای آزمایش‌ها استفاده گردید.

روش انتشار چاهک در آگار (Agar well diffusion method):

عصاره هیدروالکلی در غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از اندام‌های ریشه، برگ و ساقه تهیه شد. ۰/۲ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری روی پلیت‌های مولر هیتتون 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

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، ۱۲/۵ و ۶/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در محیط نوترینت برات 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، به عنوان MIC در نظر گرفته شد. برای تعیین حداقل غلظت کشندگی، ۵ میکرولیتر از تمامی لوله‌های بدون کدورت (فاقد رشد باکتریایی) در سطح محیط کشت مولر هیتتون آگار کشت و در دمای ۳۷ درجه قرار داده

قطر هاله عدم رشد $18 \pm 1/00$ و $13/66 \pm 0/88$ و در مورد برگ در کشت باکتری میکروکوکوس لوتنوس با قطر هاله عدم رشد $17/66 \pm 1/2$ 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 کاناماسین بیشتر بود. غلظت‌های بالای عصاره برگ سبب تشکیل هاله آنتی‌باکتریایی بزرگتر از آنتی‌بیوتیک کاناماسین و آموکسی‌سیلین به ترتیب در کشت باکتری *انتروباکتر آئروژنز* و باکتری میکروکوکوس لوتنوس شد.

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 سیاه‌گینه 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 $0/05$ روی تمام باکتری‌ها انجام شد (جدول ۱).

بیشترین حساسیت در برابر عصاره هیدروالکلی ریشه و ساقه، در کشت باکتری *باسیلوس سابتیلیس* به ترتیب با

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

باکتری	غلظت (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	ریشه	ساقه	برگ	آموکسی‌سیلین	کاناماسین
<i>En aerogenes</i>	۱۰۰	$14 \pm 0/55^{kglfihj}$	$6 \pm 0/00^{yx}$	$11 \pm 0/57^{rspoq}$	$23/83 \pm 0/16^a$	$11 \pm 0/00^{rspoq}$
	۲۰۰	$14/33 \pm 0/88^{kgfihj}$	$6 \pm 0/57^{yx}$	$12/66 \pm 0/33^{knlmpoj}$	$23/83 \pm 0/16^a$	$11 \pm 0/00^{rspoq}$
	۴۰۰	$12/33 \pm 0/88^{knlmpoj}$	$10/33 \pm 0/33^{rstq}$	$13/33 \pm 1/66^{knlmihj}$	$23/83 \pm 0/16^a$	$11 \pm 0/00^{rspoq}$
<i>M.luteus</i>	۱۰۰	$11/33 \pm 0/66^{rnspoj}$	$0 \pm 0/00^z$	$13 \pm 1/52^{knlmioj}$	$15/66 \pm 0/33^{gfe}$	$10 \pm 0/00^{rst}$
	۲۰۰	$14/66 \pm 0/33^{gfhj}$	$6 \pm 0/57^{yx}$	$17/66 \pm 1/2^d$	$15/66 \pm 0/33^{gfe}$	$10 \pm 0/00^{rst}$
	۴۰۰	$14/66 \pm 0/66^{gfhj}$	$10/33 \pm 0/33^{rstq}$	$16 \pm 0/57^{fe}$	$15/66 \pm 0/33^{gfe}$	$10 \pm 0/00^{rst}$
<i>Sal.typhi</i>	۱۰۰	$13 \pm 1/00^{knlmioj}$	$10/33 \pm 0/33^{rstq}$	$10/66 \pm 0/33^{rspq}$	$15 \pm 0/57^{gfh}$	$15/66 \pm 0/66^{gfe}$
	۲۰۰	$15 \pm 0/00^{gfh}$	$11 \pm 0/57^{rspoq}$	$10 \pm 0/00^{rst}$	$15 \pm 0/57^{gfh}$	$15/66 \pm 0/66^{gfe}$
	۴۰۰	$14 \pm 0/00^{kglfihj}$	$10/33 \pm 0/33^{rstq}$	$11 \pm 0/57^{rspoq}$	$15 \pm 0/57^{gfh}$	$15/66 \pm 0/66^{gfe}$
<i>B.subtilis</i>	۱۰۰	$13/66 \pm 0/33^{kglmihj}$	$11/33 \pm 0/88^{rnspoj}$	$11 \pm 1/15^{rspoq}$	$21/33 \pm 0/66^{bc}$	$18/66 \pm 0/88^d$
	۲۰۰	$10/33 \pm 0/88^{rstq}$	$13/66 \pm 0/88^{kglmihj}$	$10/33 \pm 0/66^{rstq}$	$21/33 \pm 0/66^{bc}$	$18/66 \pm 0/88^d$
	۴۰۰	$18 \pm 1/00^d$	$11/33 \pm 0/88^{rnspoj}$	$10/33 \pm 1/66^{rstq}$	$21/33 \pm 0/66^{bc}$	$18/66 \pm 0/88^d$
<i>E.coli</i>	۱۰۰	$14/33 \pm 0/88^{kgfihj}$	$11/33 \pm 0/66^{rnspoj}$	$8 \pm 0/57^{vwu}$	$15/33 \pm 0/44^{gfh}$	$12/66 \pm 0/66^{knlmpoj}$
	۲۰۰	$17/33 \pm 0/66^{de}$	$12/33 \pm 0/33^{knlmpoj}$	$10/33 \pm 0/33^{rstq}$	$15/33 \pm 0/44^{gfh}$	$12/66 \pm 0/66^{knlmpoj}$
	۴۰۰	$13/33 \pm 0/88^{knlmihj}$	$10/33 \pm 0/33^{rstq}$	$8/66 \pm 0/88^{vtu}$	$15/33 \pm 0/44^{gfh}$	$12/66 \pm 0/66^{knlmpoj}$
<i>Strep pyogenes</i>	۱۰۰	$10/66 \pm 0/33^{rspq}$	$10/66 \pm 0/33^{rspq}$	$7 \pm 0/00^{vwx}$	$11/16 \pm 0/77^{rspoq}$	$12 \pm 0/00^{nlmpoj}$
	۲۰۰	$10/33 \pm 1/33^{rstq}$	$12/66 \pm 0/33^{knlmpoj}$	$7 \pm 0/00^{vwx}$	$11/16 \pm 0/77^{rspoq}$	$12 \pm 0/00^{nlmpoj}$
	۴۰۰	$12 \pm 0/57^{nlmpoj}$	$11 \pm 0/57^{rspoq}$	$8 \pm 0/57^{vwx}$	$11/16 \pm 0/77^{rspoq}$	$12 \pm 0/00^{nlmpoj}$
<i>Staph aureus</i>	۱۰۰	$11/33 \pm 0/66^{rnspoj}$	$10/66 \pm 0/66^{rspq}$	$9/66 \pm 0/33^{st}$	$20/66 \pm 0/33^c$	$15 \pm 0/00^{gfh}$
	۲۰۰	$12/33 \pm 0/33^{knlmpoj}$	$11 \pm 0/57^{rspoq}$	$10 \pm 0/57^{st}$	$20/66 \pm 0/33^c$	$15 \pm 0/00^{gfh}$
	۴۰۰	$12/66 \pm 0/33^{knlmpoj}$	$12/33 \pm 0/33^{knlmpoj}$	$11/33 \pm 0/88^{rnspoj}$	$20/66 \pm 0/33^c$	$15 \pm 0/00^{gfh}$
<i>Sh.boydi</i>	۱۰۰	$11/66 \pm 0/88^{rnspoj}$	$11 \pm 0/57^{rspoq}$	$13 \pm 0/57^{knlmioj}$	$22/66 \pm 0/66^{ab}$	$14 \pm 0/00^{kglfihj}$
	۲۰۰	$12/33 \pm 0/33^{knlmpoj}$	$11/33 \pm 0/57^{rspoq}$	$6/66 \pm 0/33^{ywx}$	$22/66 \pm 0/66^{ab}$	$14 \pm 0/00^{kglfihj}$
	۴۰۰	$13/66 \pm 0/33^{kglmihj}$	$13 \pm 0/57^{knlmioj}$	$10/66 \pm 0/33^{rspq}$	$22/66 \pm 0/66^{ab}$	$14 \pm 0/00^{kglfihj}$

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.

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.

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

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

*: اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد

باکتری‌های *سالمونلا تیفی*، میکروکوکوس لوتئوس، شیگلا باییدی 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.

MIC و MBC: نتایج حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره هیدروالکلی ریشه، برگ و ساقه سیاه‌گینه علیه ۸ سویه باکتری بیماری‌زای انسانی به روش رقت لوله‌ای در (جدول ۳) نشان داده شده است. MIC در رقت پایین ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره ساقه در کشت

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

عصاره	باکتری	<i>B subtilis</i>	<i>Sal typhi</i>	<i>Sh boydi</i>	<i>En aerogenes</i>	<i>M luteus</i>	<i>Staph aureus</i>	<i>E coli</i>	<i>Strep pyogenes</i>
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

برگ و ساقه در جدول (۴) آورده شده است. مقدار فنول کل ریشه، ساقه و برگ به ترتیب ۱۱۱/۸±۲/۶۹، ۴۷±۰/۵۵/

بررسی میزان فنول کل: مقدار فنول کل بر حسب میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک عصاره هیدروالکلی ریشه،

سه بافت ریشه، برگ و ساقه اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ مشاهده شد.

۷۹ و $69/16 \pm 3/29$ ($mgGAE/g$) 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

جدول ۴- مقدار فنول کل ریشه، برگ و ساقه سیاه‌گینه

اندام گیاه	ریشه	ساقه	برگ
میزان فنول کل ($mgGAE/g$)	$111/8 \pm 2/69^a$	$79/47 \pm 0/55^b$	$69/16 \pm 3/29^c$

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

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 احتمالاً 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 سیاه‌گینه 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 احتمالاً 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 oleifolia lam* را علیه باکتری‌های *اشریشیا کولای* 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

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 آئرووینوزا 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 $1/00 \pm$ 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 بایبی* و *اشریشیا کولای* بود. طبق نتایج کامون‌واناسیت 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 می‌تواند به دلیل تفاوت در جنس گیاه و سویه‌های باکتری باشد.

گزارش کردند (۱۲). اختلاف مشاهده شده در نتایج این گروه‌ها با این تحقیق، احتمالاً به دلیل تفاوت در جنس گیاه است.

در نهایت می‌توان نتیجه گرفت که عصاره بافت‌های ریشه، برگ و ساقه گیاه سیاه‌گینه 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 زیست‌شناسی و آقای دکتر نگارش که صمیمانه با ما همکاری کردند، تشکر می‌کنیم.

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 سیاه‌گینه را اندازه‌گیری 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 احتمالاً 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 $176/61 \pm 24/46$ mgGAE/g محاسبه کردند، به طوری که در مقایسه با میزان فنول در اندام‌های مورد مطالعه در این گیاه بیشتر بود (۹). ندلجکو و همکاران (۲۰۱۲)، میزان فنل کل عصاره متانولی برگ و ساقه گیاه *Daphne cneorum* را به ترتیب $76/45 \pm 0/79$ و $69/67 \pm 0/85$ mgGAE/g

منابع

- ۱- دلنواز هاشملویان، ب.، مینا مژدهی، س. و عطایی عظیمی، ع. ۱۳۹۰. استخراج و جداسازی مواد مؤثره (فنل و تانن) سیاه‌گینه *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 ضد میکروبی در سویه‌های سودوموناس جدا شده از فرآورده‌های بهداشتی. مجله زیست‌شناسی 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 زیست‌شناسی ایران، ۲۵(۲): ۲۷۶-۲۸۵.
- ۴- هدایتی، م.، یزدانپرست، ر.، جعفری بروجردی، ب. و عزیز، ف.، ۱۳۸۴. اثر عصاره گیاه *Dendrostellera leserrtii* بر ترشح *TNF- α* 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 mucronata 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 Iranian medicinal plants. African Journal of Biotechnology, 5(11):1142-1145.
- 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
- 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 lesserti*, 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 subtilis* 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