DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.4.5.5
مقاله پژوهشی

اثر ضدباکتریایی عصاره متانولی بذر ماریتیغال بر ۸ گونه باکتری گرم مثبت و منفی

زهرا محمودی‌راد، حسن نورافکن*، ناصر محبعلی‌پور، اسد اسدی و سلیمان جمشیدی

ایران، میانه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد میانه، دانشکده کشاورزی، گروه علوم باغبانی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۲۴

چکیده

ماریتیغال با داشتن ماده مؤثره سیلی‌مارین در درمان بیماری‌های مختلف کبدی موثر بوده و خاصیت ضدمیکروبی دارد. آزمایشی به منظور بررسی ترکیبات شیمیایی و فعالیت ضدمیکروبی عصاره الکلی بذر ماریتیغال بر باکتری‌های گرم مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس) و گرم منفی (سالمونلا انتریکا، پروتئوس میرابیلیس، اشریشیاکلی، شیگلا دیسنتریا، کلبسیلا پنومونیا و سودوموناس آئروژینوزا) با روش انتشار در دیسک و رقت‌سازی در لوله بر پایه طرح کاملاً تصادفی در آزمایشگاه دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد میانه در سال ۱۳۹۶ انجام گرفت. ترکیبات عصاره متانولی بذر ماریتیغال با استفاده از HPLC ارزیابی شده و وجود دو ماده سیلیبین A و B از ترکیبات اصلی سیلی‌مارین شناسایی شد. در آزمون ضدباکتریایی، عصاره متانولی بذر ماریتیغال بر باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، سالمونلا انتریکا، پروتئوس میرابیلیس و اشریشیاکلی موثر بود ولی اثر بازدارندگی کمتری در مقایسه با جنتامایسین و آمپی‌سیلین داشت. در انتشار با دیسک، استافیلوکوکوس اورئوس بیشترین عدم رشد و بالاترین MIC و MBC را داشت. در باسیلوس سرئوس و سالمونلا انتریکا قطر هاله عدم رشد تقریباً برابر با استافیلوکوکوس بود و دو باکتری پروتئوس و اشریشیاکلی قطر هاله کمتری نسبت به استافیلوکوکوس نشان داد. به نظر می‌رسد عصاره متانولی ماریتیغال حاوی مواد آنتی سپتیک با اثرات ضد باکتریایی می‌باشد. بنابراین بررسی روی سویه‌های دیگر پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: خارمریم، سیلی‌مارین، ضدمیکروبی، انتشار در دیسک، رقیق‌سازی در لوله

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۴۴۱۴۵۳۳۹ ، پست الکترونیکی: nourafcan@m-iau.ac.ir

مقدمه

بیماری‌های عفونی و میکروبی از جمله بیماری‌های شایع در بین جوامع هستند (۱۱). استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها هسته اصلی درمان در عفونت‌های باکتریایی را تشکیل می‌دهند (۸). آنتی بیوتیک‌های ساختگی (Synthetic) در دهه‌های گذشته هر چند توانسته‌اند نقش مهمی را در درمان بیماری‌های عفونی ایفا نمایند اما مشکلات مربوط به ظهور عوامل میکروبی جدید و سویه‌های مقاوم به آنتی-بیوتیک‌های شایع، موجب نگرانی عمومی و محدود شدن مصرف این داروها برای درمان عفونت‌های باکتریایی شده است (۳۳). در این میان بخش عمده‌ای از مرگ و میر در انسان‌ها به بیماری‌های ناشی از باکتری‌ها نسبت داده می‌شود که می‌توانند از راه‌های مختلف آب، مواد غذایی و تنفس وارد بدن انسان شوند (۷).

رویکرد جدید درمانی، استفاده از منابع موجود در طبیعت مانند گیاهان دارویی است. مواد مؤثره موجود در گیاهان به دلیل همراه بودن با مواد دیگر از یک حالت تعادل بیولوژیک برخوردارند، این مواد در بدن انباشته نمی‌شوند و اثرات جانبی به بار نمی‌آورند که از این نظر امتیاز و برتری قابل ملاحظه‌ای نسبت به داروهای شیمیایی دارند (۲۵). از اواسط قرن بیستم به دلیل عوارض سوء ناشی از مصرف داروهای شیمیایی، گیاهان دارویی و داروهای گیاهی جایگزین داروهای شیمیایی شدند (۱۶). استفاده از این گیاهان و

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.4.5.5
مقاله پژوهشی

داروها به عنوان مواد ضدمیکروبی دوباره رونق گرفته است (۱۵).

یکی از این گیاهان دارویی ماریتیغال است که تاریخ درمانی این گیاه به دو هزار سال پیش برمی‌گردد (۲۹). ماریتیغال (خارمریم یا خارشیر) با نام علمی *Silybum marianum* L. گیاهی یک‌ساله، دو ساله، بدون کرک، با رنگ سبز مات و خاردار می‌باشد. ساقه ایستاده و ضخیم، گل‌ها صورتی – ارغوانی مجتمع در کپه‌های انتهایی و خاردار می‌باشد (۵).

بررسی فیتوشیمیایی عصاره این گیاه نشان داده است که بذر گیاه حاوی ترکیبات فلاونولیگنانی (flavolignan) هستند که اصطلاحاً سیلی‌مارین نامیده می‌شود (۳). همچنین سیلی‌مارین در درمان بیماری‌های مختلف کبدی و سرطانی استفاده می‌شود (۲۶).

از بین تمام مواد شناسایی شده موجود در ترکیبات مؤثره اندام گیاهان، ترکیبات فنولی یا ترکیبات ثانویه بدون نیتروژن، بیشترین و مهمترین موادی هستند که دارای آثار گوناگون بیولوژیک ازجمله فعالیت ضدباکتریایی مؤثر هستند (۴۰).

این متابولیت‌های ثانویه قسمت بزرگی از منابع غذایی انسان را تشکیل می‌دهند (۲۶). این ترکیبات در پاسخ به عفونت‌های میکروبی در گیاه ساخته می‌شوند و علیه طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها فعال می‌باشند (۳۴).

اثر ضدباکتریایی عصاره متانولی ماریتیغال روی باسیلوس سرئوس (*Bacillus cereus*)، باسیلوس آنتراسیس (*Bacillus anthracis*) و استرپتوکوکوس پایوژنز (*Streptococcus pyogenes*) توسط Hasanlo و همکاران(۲۰۱۴) گزارش شده است (۳).

Choobkar و همکاران (۲۰۱۰) با بررسی فعالیت ضد میکروبی اسانس آویشن اثرات ضد میکروبی را مربوط به محتوای ترکیبات فنولی موجود در اسانس دانسته‌اند (۱۷).

عصاره بومادران و بابونه از تیره کاسنی دارای اثرات ضدباکتریایی هستند و از آن‌ها می‌توان به‌عنوان عوامل ضدمیکروبی در درمان عفونت‌ها استفاده نمود. خواص ضدالتهابی، ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی این گیاه عمدتاً به فلاونوئیدها نسبت داده می‌شود (۲۴ و ۳۱).

با توجه به مصرف بی رویه داروهای شیمیایی و به دنبال آن افزایش سویه های میکروبی مقاوم به آنتی بیوتیک، شناسایی و معرفی منابع آنتی بیوتیکی جدید حائز اهمیت فراوانی است. در این پژوهش فعالیت ضدباکتریایی عصاره الکلی دانه ماریتیغال روی دو گونه باکتری گرم مثبت و شش گونه باکتری گرم منفی و مقایسه آن با نمونه‌هایی از آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روشها

بذر ماریتیغال از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اردبیل تهیه شد. جهت ارزیابی ویژگی‌های ضدمیکروبی عصاره متانولی بذر ماریتیغال، آزمایشی بر پایه طرح کاملاً تصادفی در آزمایشگاه دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد میانه در سال ۹۶ انجام شد. باکتری‌های گرم مثبت، استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*) (PTCC= Persian Type Cluture Collection 1431) و باسیلوس سرئوس (PTCC 1015) و باکتری‌های گرم منفی، سالمونلا انتریکا (*Salmonella entrica*) (PTCC 1780)، پروتئوس میرابیلیس (*Proteus mirabilis*) (PTCC 1776)، اشریشیاکلی (*Escherichia coli*) (PTCC 1399)، شیگلا دایسنتریا (*Shigella dysenteriae*) PTCC (1188)، کلبسیلا پنومونیا (*Klebsiella Pneumoniae*) (PTCC 1053)، سودوموناس آئروژینوزا (*Pseudomonas aeruginosa*) (PTCC 1074) انتخاب و از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران به صورت لیوفیلیزه خریداری شد.

تهیه عصاره متانولی از بذر: بذرها با استفاده از آسیاب به صورت پودر در آمده و عصاره‌گیری به روش خیساندن

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.4.5.5
مقاله پژوهشی

(maceration) انجام شد. در هر عصاره‌گیری ۵۰ گرم پودر گیاه وزن شده و درون ارلن ریخته شد و به آن ۲۵۰ میلی‌لیتر الکل متانول افزوده شد به‌طوری که سطح پودر کاملاً پوشانده شود. ارلن به مدت ۲۴ ساعت روی دستگاه تکان دهنده (shaker) قرار گرفت و سپس محتویات به وسیله قیف بوخنر و کاغذ صافی واتمن صاف شد. محلول حاصل در دستگاه تقطیر در خلاء گردان (*rotary* evaporator) با دمای ۵۰–۴۰ درجه سلسیوس تغلیظ شد و عصاره به‌دست آمده در آون در دمای ۴۰ درجه سلسیوس در مدت ۲ روز خشک شد (۱۱). از دی متیل سولفواکساید (Di methyl sulf oxide) (DMSO) برای حل کردن و تهیه غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره استفاده شد (۱۹). سپس محلول عصاره به‌دست آمده با استفاده از فیلتر سرسرنگ ۰/۲۲ میکرون سترون و در دمای ۱۸– درجه سلسیوس در لوله‌های سترون تا زمان آزمایش نگهداری شد (۲۱).

ارزیابی فیتوشیمایی عصاره متانولی به روش HPLC: سیلیبینین (Silibinin) (purity ≥98% by HPLC)، اسیدفسفریک و متانول به عنوان فاز متحرک در HPLC از شرکت سیگما الدریش (Sigma-Aldrich) (آلمان) خریداری شد. نمونه‌ها با کروماتوگرافی مایع Knauer K2600A مورد آنالیز قرار گرفتند.

C18 (150 × 4.6 mm I.D, 5 µm) برابر ۱ میلی‌لیتر در دقیقه، نوع ستون flow rate بود. دتکتور استفاده شده UV و حجم هر بار تزریق برابر ۱۰ میکرولیتر بود. دمای اتاق در زمان انجام آزمایش ۴۰ درجه سلسیوس بود و برای عبور حلال از ستون از سیستم ایزوکراتیک استفاده گردید.

ترکیب فاز متحرک به کار برده شده عبارت از ۸۵٪ از فسفریک‌اسید، متانول – آب به نسبت (v/v ۱:۴۶:۶۴) بود. تجزیه و تحلیل بر اساس استاندارد سیلیبینین شامل سیلیبین A و B و استاندارد خارجی انجام شد.

ضدمیکروبی: آمپول‌های لیوفیلیزه باکتری‌ها ابتدا در شرایط سترون باز شده و پس از تهیه سوسپانسیون اولیه باکتری با استفاده از سرم فیزیولوژی، کشت اولیه باکتری‌ها روی محیط نوترینت بـراث (Broth) انجام شد. سپس باکتری‌های مورد مطالعه روی محیط کشت نوترینت آگار کشت داده شده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند و تا زمان انجام کارهای عملی هر هفته از کشت موجود، کشت تازه تهیه شد. از کلنی میکروبی در سرم فیزیولوژی نرمال سالین سوسپانسیون میکروبی ۰/۵ مک فارلند (Mc Farland) تهیه گردید که معادل با حـدود تقریبـی برابر با $۱/۵\times۱۰^{۸}$ CFU/ml می‌باشد. برای اطمینان از کدورت سوسپانسیون میکروبی تهیه شده، با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۲۵ نانومتر با میزان جذب ۰/۱۳–۰/۰۸ (برابر با $۱/۵\times۱۰^{۸}$ CFU/ml) به صورت چشمی مقایسه گردید. از محیط کشت مولرهینتون براث برای آزمایش رقیق‌سازی در لوله و از محیط کشت مولر هینتون آگار برای روش‌های انتشار در آگار با استفاده از دیسک (Disk diffusion) استفاده شد. کلیه محیط‌های کشت بر اساس دستور کارخانه سازنده تهیه و با استفاده از دستگاه اتوکلاو سترون گردید (۱۰).

روش‌های سنجش اثرات میکروبی: حداقل غلظت بازدارندگی (MIC=Minimal Inhibitory Concentration) و حداقل غلظت کشندگی (MBC=Minimal Bactericidal Concentration) عصاره‌ها، با روش رقیق‌سازی در لوله (Broth Macrodilution Susceptibility Assay) مورد بررسی قرار گرفت (۲۳). هم‌چنین میزان هاله‌ی عدم رشد باکتری‌ها با روش انتشار در آگار با استفاده از دیسک ارزیابی شد (۳۷،۳۰،۱۲).

روش رقت‌سازی در لوله: برای تعیین MIC عصاره ماریتیغال از یک سری ۱۲ تایی از لوله‌های آزمایش استفاده شد. یک لوله به عنوان کنترل منفی (حاوی عصاره رقیق شده به علاوه محیط کشت) و یک لوله به عنوان کنترل مثبت (حاوی سوسپانسیون میکروبی به علاوه محیط

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.4.5.5
مقاله پژوهشی

کشت) و هم‌چنین یک لوله حاوی حلال، سوسپانسیون میکروبی و محیط کشت جهت اطمینان از رشد باکتری‌ها در محیط حاوی حلال به‌کار رفته برای عصاره‌گیری استفاده شد. غلظت اولیه ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود پس از کشت همه لوله‌های آزمایش برای مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد. پس از طی زمان انکوباسیون، لوله‌ها از نظر کدورت ناشی از رشد باکتری تلقیح شده، بررسی گردیدند. از همه لوله‌هایی که در آن‌ها عدم رشد باکتری مشاهده شده بود، نمونـــه‌برداری و جهت تعیین حداقل غلظت کشندگی عصاره‌ها، به روش سطحی کشت داده شدند. بدین منظور ۱۰۰ میکرولیتر از لوله‌هایی که عدم رشد باکتری را نشان داد بودند را روی محیط کشت مولر هینتون آگار انتقال داده و با پخش کننده روی محیط کشت پخش شد. بعد از انکوبه کردن به مدت ۲۴ ساعت، پلیت‌های کشت داده شده از نظر وجود رشد میکروبی کنترل شدند. لوله‌ای که حاوی کم‌ترین غلظت عصاره بوده و در پلیت مربوطه عدم رشد باکتری مشاهده گردید، به‌عنوان MBC آن عصاره در نظر گرفته شد (۳۹).

روش انتشار در آگار با استفاده از دیسک: ۰/۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون بـاکتری روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده و به‌وسیله میلـه شیشـه‌ای ال (L) مانند به‌طور کامل روی محیط پخش شد. بعد از خشک شدن سـطح محـیط، روی هـر کـدام از دیسـک‌هـای کاغذی استریل به قطر ۶ میلی‌متر مقدار ۱۵ میکرولیتر از عصاره ماریتیغال ریخته شد سپس دیسک‌ها به‌مدت یک ساعت روی صفحه مشبک سترون قرار داده شد تا عصاره به‌طور کامل جذب دیسک شود. از دیسک آنتی‌بیوتیک جنتامایسین و آمپی‌سیلین ساخت شرکت پادتن طب بـه‌عنـوان کنترل مثبت و دیسک حاوی متانول و هم‌چنین دیسک حاوی DMSO به‌عنوان کنترل منفی استفاده گردید. تمامی پلیت‌ها به‌مـدت ۲۴ ساعت در آون ۳۷ درجه گذاشته شد. فعالیت ضدباکتریایی بر مبنای انـدازه‌گیـری قطـر هالـه عـدم رشـد اطـراف دیسک‌ها بر حسب میلی‌متر و مقایسه آن‌ها با همدیگر انجام گرفت (۳۲،۱۲،۱۲).

نتایج

در بررسی ترکیبات فیتوشیمیایی ماریتیغال به‌وسیله HPLC سیلیبین A و B به‌عنوان اجزای اصلی عصاره بذر شناسایی شدند (جدول ۱).

جدول ۱- محتوای سیلیبینین، سیلیبین A و B بر اساس آنالیز HPLC

	سیلیبین A در ۱۰۰ گرم وزن خشک	سیلیبین B در ۱۰۰ گرم وزن خشک	سیلیبینین در ۱۰۰ گرم وزن خشک
میزان سیلیبین عصاره	۱/۶۳۳	۱/۶۵۳	۳/۲۸۶

نتایج حاصل از حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره ماریتیغال برای هشت باکتری مذکور به روش دیسک‌گذاری و رقت‌سازی در لوله در جدول ۲ و ۳ آمده است.

مطابق داده‌های جدول، عصاره ماریتیغال هیچ اثری روی شیگلا دایسنتریا، کلبسیلا پنومونیا و سودوموناس آئروژینوزا نداشت اما در مورد سایر باکتری‌ها، هاله عدم رشد مشاهده گردید. باکتری‌ها به جنتامایسین و آمپی‌سیلین کاملاً حساس بودند اما در مقایسه عصاره ماریتیغال اثر ضد باکتری کمتری نسبت به جنتامایسین و آمپی‌سیلین نشان داد. قطر هاله در انتشار با دیسک در استافیلوکوکوس اورئوس برابر ۱۷/۵ میلی‌متر بوده که بیشترین عدم رشد را داشته است. در باسیلوس سرئوس و سالمونلا انتریکا قطر عدم رشد تقریباً برابر استافیلوکوکوس بوده و دو باکتری پروتئوس و اشریشیاکلی قطر هاله کمتری نسبت به

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.4.5.5
مقاله پژوهشی

استافیلوکوکوس به ترتیب برابر ۱۶/۴۰، ۲۳/ ۱۵ میلی‌متر نشان دادند.

اثر ضد میکروبی جنتامایسین و آمپی‌سیلین روی باکتری‌های گرم مثبت با میانگین قطر هاله ۳۰ میلی‌متر در استافیلوکوکوس اروئوس بیشتر از باکتری‌های دیگر بوده است. شاهد منفی(متانول و DMSO) در هر یک از عصاره‌ها در تمام مراحل کار فاقد اثر بود (جدول ۲).

مهارکنندگی در غلظت ۰/۱۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در باکتری استافیلوکوکوس مشاهده شد. در باسیلوس، سالمونلا و پروتئوس مهارکنندگی برابر ۰/۶۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و در اشریشیاکلی برابر ۰/۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. در استافیلوکوکوس کشندگی برابر ۰/۶۲۵، در باسیلوس و سالمونلا ۰/۱۲۵، در پروتئوس ۲/۵ و در اشریشیاکی ۵ بود.

نتایج MBC نشان داد که عصاره ماریتیغال در غلظت ۰/۶۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر قادر به از بین بردن باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، در غلظت ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثر کشندگی روی باسیلوس سرئوس، سالمونلا انتریکا و در ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پروتئوس میرابیلیس و در ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اشریشیاکلی را از بین می‌برد (جدول ۳).

جدول ۲- قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر در حضور عصاره متانولی دانه ماریتیغال به روش دیسک‌گذاری

باکتری‌ها	استافیلوکوکوس اورئوس	باسیلوس سرئوس	سالمونلا انتریکا	پروتئوس میرابیلیس	اشریشیاکلی	شیگلا دایسنتریا	کلبسیلا پنومونیا	سودوموناس آئروژینوزا
عصاره ۵ mg/ml	۱۷/۵۰۰ ±۰/۲۸۸	۱۷/۴۶۶± ۰/۹۵۳	۱۷/۲۶۶± ۰/۴۵۸	۱۶/۴۰۰± ۰/۳۶۰	۱۵/۲۳۳± ۰/۱۰۰	–	–	–
DMSO	–	–	–	–	–	–	–	–
متانول	–	–	–	–	–	–	–	–
آمپی سیلین	۳۰/۳۳۳± ۰/۳۳۳	۲۸/۰۰۰± ۱/۰۰۰	۲۴/۴۶۶± ۰/۴۵۰	۲۵/۴۰۰± ۰/۳۶۰	۲۵/۵۰۰± ۰/۵۰۰	–	–	–
جنتامایسین	۳۲/۳۳۳± ۰/۳۳۳	۲۸/۸۳۳± ۰/۷۶۳	۲۵/۵۳۳± ۰/۵۰۳	۲۵/۶۶± ۰/۵۱۳	۲۶/۷۳۳± ۰/۶۴۲	–	–	–

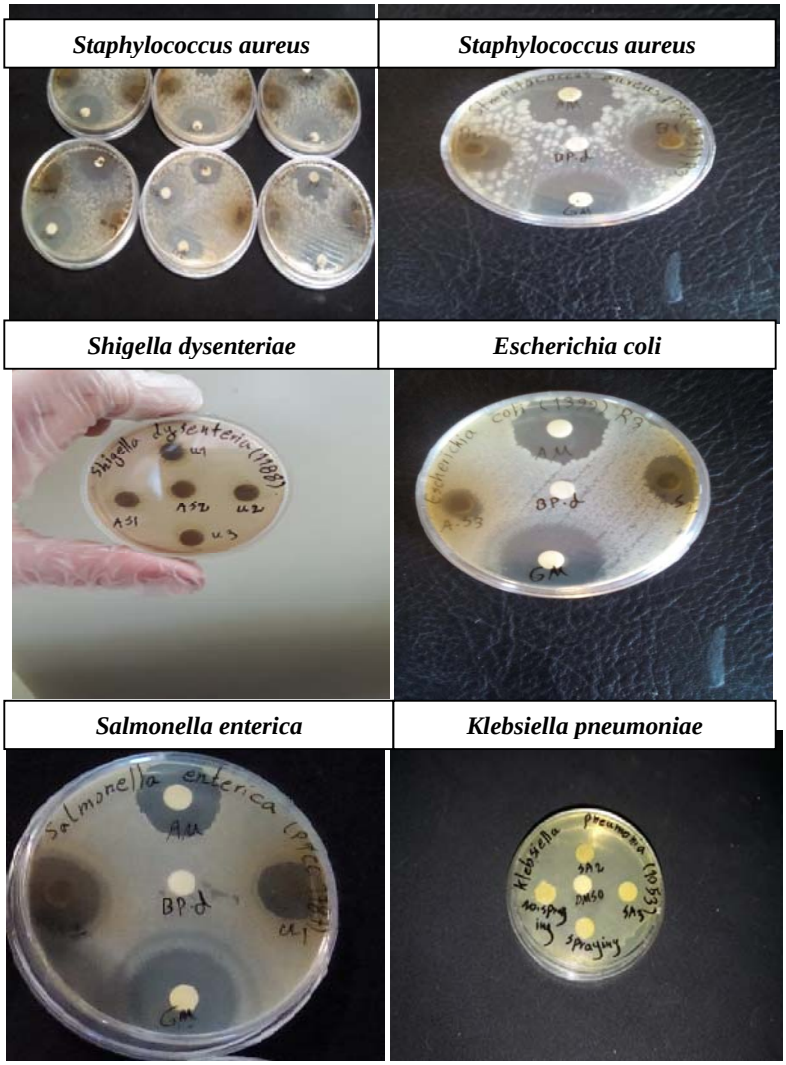
(–) رشد کامل باکتری در محیط

جدول ۳- حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) باکتری‌ها در حضور عصاره متانولی دانه ماریتیغال به روش رقیق‌سازی در لوله

باکتری‌ها	(mg/ml) MIC	(mg/ml) MBC
استافیلوکوکوس اورئوس	۰/۱۵۶	۰/۶۲۵
باسیلوس سرئوس	۰/۶۲۵	۱/۲۵
سالمونلا انتریکا	۰/۶۲۵	۱/۲۵
پروتئوس میرابیلیس	۰/۶۲۵	۲/۵
اشریشیاکلی	۱/۲۵	۵
شیگلا دایسنتریا	–	–
کلبسیلا پنومونیا	–	–
سودوموناس آئروژینوزا	–	–

(–) رشد کامل باکتری در محیط

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.4.5.5
مقاله پژوهشی



شکل ۱- قطر هاله عدم رشد باکتری‌ها در حضور عصاره متانولی دانه ماریتیغال به روش دیسک‌گذاری

بحث و نتیجه گیری

آنتی بیوتیک‌ها داروهای باارزشی برای درمان بسیاری از بیماری‌های عفونی می‌باشند، با این‌حال استفاده زیاد از این داروها منجر به مقاومت‌های میکروبی خواهد شد (۸). بنابراین گیاهان دارای خواص ضدمیکروبی می‌توانند به عنوان جایگزین آنتی‌بیوتیک‌های سنتتیک مطرح باشند. تحقیق در مورد شناسایی مواد جدید با خاصیت ضد میکروبی همراه با افزایش مقاومت در باکتری‌ها رو به گسترش است. از آن‌جا که ماریتیغال به دلیل داشتن ترکیبات فلاونوئیدی از لحاظ اثرات میکروبی قابل بررسی است (۳۷)، و تاکنون گزارش‌های کاملی از اثرات ضدباکتریایی این گیاه ارائه نشده است، بنابراین تحقیق حاضر به‌عنوان یک انتخاب مناسب برای تحقیقات ضدمیکروبی به شمار می‌رود و جز اولین گام‌ها در جهت بررسی اثر ضد میکروبی ماریتیغال است.

ماده مؤثره سیلی‌مارین یا کمپلکس سیلی‌مارین حاوی ترکیبات سیلیبین A و B می‌باشد. بنابراین با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارکرد عالی، مقدار سیلیبین موجود

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.4.5.5
مقاله پژوهشی

در عصاره دانه ماریتیغال تعیین شد. شناسایی ترکیبات مؤثره ماریتیغال توسط Hasanlo و همکاران(۲۰۰۰) گزارش شده است (۲). نتایج حاصل از بررسی میزان سیلی‌مارین در گیاه ماریتیغال نشان می‌دهد که دانه مقادیر بالایی از سیلی‌مارین را در خود دارد (۲۰). Kordi و همکاران (۲۰۱۳) در بررسی فلاونوئیدهای ماریتیغال در اندام‌های مختلف و دانه گیاه نشان دادند که حاوی مقدار قابل توجهی از سیلی‌مارین است (۶). نتایج این بررسی‌ها مطابق با نتایج این پژوهش است. نتایج این تحقیق همچنین نشان داد که اثرات ضدباکتریایی ماریتیغال قابل توجه است. این یافته با گزارش‌های حاصل از بررسی Hasanlo و همکاران (۲۰۱۴) در این زمینه مشابهت دارد؛ که با بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره ماریتیغال اثر ضد میکروبی عصاره این گیاه روی باکتری اشریشیاکلی را به اثبات رساندند ولی هیچ گونه اثری روی باکتری مقاوم گرم منفی سودوموناس آئروژینوزا گزارش نکردند (۳). فنول‌ها از بزرگ‌ترین گروه متابولیت‌های ثانویه گیاهان هستند (۲۶). مشخص شده است که ترکیبات فنولی مسئول خواص ضدباکتریایی عصاره‌ها و اسانس‌ها می‌باشند (۴۱ و ۱۲). ترکیبات فنولی و فلاونوئیدهای موجود در ساختار گیاهان دارویی با تأثیر روی غشای پلاسمایی و سلولی میکرواورگانیسم‌ها و یا با مهار آنزیم‌های ساختاری غشای سلولی آن‌ها خاصیت ضدمیکروبی خود را اعمال می‌نمایند (۲۰). در مورد نحوه عمل ترکیبات فلاونوئیدی و اثر ضدباکتریایی آن می‌توان گفت که متابولیت‌های فنولی موجود درگیاهان توانایی این را دارند که یک هیدروژن از گروه هیدروکسیل موجود در حلقه آروماتیک خود رها کرده و باعث اکسیداسیون رادیکال‌های آزاد چربی‌ها و دیگر بیومولکول‌های غشای سلولی و تخریب آن شوند و به این ترتیب خاصیت ضدمیکروبی خود را اعمال می‌نمایند (۳۷).

مکانیسم‌های مختلفی برای توجیه رفتار ضدمیکروبی ترکیبات فنولی بیان شده است. ترکیبات فنولی ضمن تداخل با غشای فسفولیپیدی دو لایه‌ای، نفوذپذیری غشای سلول‌های میکروبی را تحت تأثیر قرار داده و موجب خروج ترکیبات درون سلولی می‌گردند (۲۷).

مشخص شده که ترکیبات فلاونوئیدی می‌توانند روی سنتز پروتئین‌ها و لیپیدها و به خصوص اسیدهای نوکلئیک تأثیر بگذارند. برقراری پیوند هیدروژنی میان گروه‌های هیدروکسیل در ترکیبات فنولی و اسیدهای نوکلئیک در سلول‌های میکروبی می‌تواند در غیر فعال شدن مولکول‌های DNA مؤثر باشد (۱۸).

Hasanlo و همکاران (۲۰۱۴) نیز اثرات آنتی باکتریایی ترکیبات موجود در عصاره ماریتیغال را مربوط به وجود سیلیبین B دانسته‌اند (۳).

در بررسی دیگری روی پلی‌فنل‌های چای گزارش شد که ترکیبات فنولی از رشد میکروارگانیسم‌ها جلوگیری می‌نمایند (۳۸).

در مطالعه بر روی عصاره چند گیاه دارویی، ارتباط معناداری بین فعالیت آنتی‌باکتریال و ترکیبات پلی‌فنلی گیاهان موردمطالعه وجود داشته است (۴).

در بررسی دیگری روی پلی‌فنول‌های چای، Fan و همکاران (۲۰۰۸) کاهش رشد جمعیت باکتریایی‌ها را به دلیل وجود ترکیبات فنولی در عصاره بیان کرده‌اند (۲۳).

در پژوهش روی گل گندم نیز متابولیت‌های ثانویه به‌ویژه ترکیبات فلاونوئیدی را مسئول خواص دارویی گیاه دانسته‌اند (۱).

در این تحقیق همچنین باکتری‌های گرم مثبت بیش‌تر از گرم منفی‌ها حساسیت نشان دادند و در بین گرم مثبت‌ها استافیلوکوک حساس‌ترین باکتری بود.

این مسأله مربوط به تفاوت ساختمان غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی می‌تواند باشد که به علت خاصیت هیدروفیلی قوی به عنوان یک سد دفاعی عمل می‌کند (۲۲). نتایج Lee و همکاران (۲۰۰۳) نشان داد سیلیبین دارای فعالیت آنتی‌باکتریال در مقابل باکتری‌های گرم مثبت

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.4.5.5
مقاله پژوهشی

می‌باشد و اثری روی گرم منفی‌ها ندارد (۲۸). بر اساس نظر این پژوهشگران اثر بازدارندگی سیلیبین روی سنتز RNA و پروتئین باکتری‌های گرم مثبت می‌باشد (۳۲). در یک نتیجه‌گیری کلی می‌توان بیان نمود که خاصیت ضدمیکروبی ماریتیغال بیشتر به دلیل حضور ترکیبات فلاونوئیدی است که با تأثیر روی غشای پلاسمایی و سلولی میکرواورگانیسم‌ها و یا با مهار آنزیم‌های ساختاری غشای سلولی افزایش نفوذپذیری و از هم گسستگی دیواره سلولی باکتری می‌گردد (۳۶). بنابراین پیشنهاد می‌شود زمینه تحقیقات گسترده‌تری بر طیف وسیعی از باکتری‌ها انجام شود.

سپاسگزاری

در پایان از زحمات کلیه همکاران محترم دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد میانه که در مراحل مختلف اجرای این پژوهش ما را یاری نمودند و حمایت مالی لازم در جهت پیشبرد این تحقیق را فراهم آوردند کمال تشکر و قدردانی را داریم.

منابع

۱- الماسی، ن.، کرمیان، ر. و کریمی، ف. ۱۳۹۴. ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی ضدباکتریایی عصاره متانولی سه گونه از جنس *Centaurea* L. (مرکبان) از ایران. مجله پژوهش‌های گیاهی(زیست شناسی ایران). ۲۸: ۲۳۴-۲۲۴.

۲- حسنلو، ط.، خاوری‌نژاد، ر. و مجیدی، ا. ۱۳۸۲. بررسی صفات مورفولوژیکی و انباشت فلاونولیگنان‌ها در گیاه خارمریم کشت شده و بومی ایران. فصلنامه گیاهان دارویی. ۶: ۹۰-۷۷.

۳- حسنلو، ط.، صالحی، م.، سپهری‌فر، ر. و فرهمند، س. ۱۳۹۳. بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف سیلیمارین استخراج شده از دانه‌های گیاه خارمریم (*Silybum marianum* L. Gaertn) بر رشد ۶ گونه باکتری. فصلنامه علمی پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی. ۳۸: ۱۹۹-۱۹۳.

۴- ذاکرین، ع.، احمدی، ا.، فصیحی رامندی، م.، عبداللهی، سارا، مولازاده، ع.، جعفری، س. و همکاران. ۱۳۹۴. بررسی اثرات زیست بوم برفعالیت ضد میکروبی عصاره گیاهان دارویی بومی استان فارس. مجله دانشگاه علوم پزشکی فسا. ۵: ۱۱۹-۱۱۱.

۵- فلاح حسینی، ح.، همتی مقدم، ا.ر. و علویان، س.م. ۱۳۸۳. مروری بر گیاه دارویی خارمریم. فصلنامه گیاهان دارویی. ۳: ۲۴-۱۴.

۶- کردی، ه.، اقدسی، م. و خلفی، م. ۱۳۹۲. بررسی فلاونولیگنان‌ها در اندام‌های مختلف گیاه خارمریم *Silybum marianum* L. Gaertn در منطقه گرگان. فصلنامهٔ علمی پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران. ۲۹: ۶۶۵-۶۵۱.

۷- ملکوتیان، م. و حاتمی، ب. ۱۳۹۲. بررسی ترکیب شیمیایی و خواص ضدباکتریایی اسانس رزماری بر روی اشریشیاکلی و تعیین سینتیک آن. فصلنامه علمی پژوهشی دانشکده بهداشت یزد. ۱۲: ۱۳-۱.

۸- یکائیان، م.، فرازمند، ر.، کی قبادی، س. و سعیدی، س. ۱۳۹۴. بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره اتانولی سیر (*Allium sativum*) بر روی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف. مجله پژوهشهای گیاهی (زیست‌شناسی ایران). ۲۸: ۴۱-۳۴.

9- Ahmad, N. and Sechi, L.A. 2005. Helicobacter pylori and gastroduodenal pathology: new threads of the old friend. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 5: 4-1.

10- Ahmann, A.J. 2001. Guideline and performance measures for diabetes. Am J Manag Care, 13: 41-46.

11- Akinsulier, R.O., Aibinu, I.E., Adenipekun, T., Adelowotan, T. and Odugbemi, T. 2007. In vitro antimicrobial activity of crude extracts from plants *Bryophyllum pinnatum* and *Kalanchoe crenata*. Afr J Tradit Complement Altern Med; 16; 4: 334-348.

12- Ayoughi, F., Barzegar, M., Sahari, M.A. and Naghdibadi, H. 2011. Chemical compositions of essential oils of Artemisia dracunculus L. and endemic *Matricaria chamomilla* L. and an evaluation of their antioxidative effects. J Agr Sci Tech, 13: 79-88.

13- Barbosa, T.M. and Levy, S.B. 2000. The impact of antibiotic use on resistance development and persistence. Drug Resist Updat, 3:303-311.

14- Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C. and Truck, M. 1991. Antibiotic susceptibility testing by a stand-ardized single disc method. Am J Clin Pathol, 45: 493–496.

15- Borchardt, J.R., Wyse, D.L., Sheaffer, C.C., Kauppi, K.L., Fulcher, R.G., Ehlke, N.J., Biesboer, D.D. and Bey, R.F. 2008. Antimicrobial activity of native and naturalized plants of Minnesota and Wisconsin. J Med Plants Res, 2: 98-110.

16- Chatterjee, S.K. 2002. Cultivation of medicinal and aromatic plants in India, a commercial approach. Proceeding of an International Conference on MAP. Acta Hort (ISHS), 576: 191-202.

17- Choobkar, N., Soltani, M., Ebrahimzadeh Mousavi, H.A., Akhonzadeh Basti, A. and Matinfar, A. 2010. Effect of *Zataria multiflora* Boiss essential oil on the growth of *Staphylococcus aureus* in the light salted fillets of silver carp (Hypophthalmichthys molitrix). Iran J Fish Sci, 9: 352-359.

18- Cushnie, T.P. and Lamb, A.J. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. Int J Antimicrob Agents, 26: 343-356.

19- de Oliveira, D.R., Tintino, S.R., Braga, M.F., Boligon, A.A., Athayde, M.L., Coutinho, H.D., de Menezes, I.R., Fachinetto, R. and et al. 2015. In vitro antimicrobial and modulatory activity of the natural products silymarin and silibinin. Biomed Res Int 2015, 1-7.

20- Deshpande, S.S. 2002. Handbook of food toxicology, Toxicants and Antinutrient in Plant foods, Marcel Dkkel, New York. 920P.

21- Das, K., Tiwari, R.K.S. and Shrivastava, D. 2010. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. J Med Plants, 4: 104-111.

22- Estaji, A., Souri, M.K. and Omidbaigi, R. 2016. Evaluation of nitrogen and flower pruning effects on growth, seed yield and active substances of milk thistle. J Essent Oil Bear Plants, 19: 678-685.

23- Fan, W., Chi, Y. and Zhang. S. 2008. The use of a tea polyphenol dip to extend theshelf life of silver carp (Hypophthalmicthysmolitrix) during storage in ice. Food Chemistry, 108: 148-153.

24- Fathi, H., Lashtoo Aghaee, B. and Ebrahimzadeh, M.A. 2011. Antioxidant activity and phenolic contents of Achillea wilhelmsii. Pharm online, 2: 942-949.

25- Gupta, K., Hooton, T.M. and Stamm, W.E. 2001. Increasing antimicrobial resistance and the management of uncomplicated community-acquired urinary tract infections. Ann Intern Med, 135: 41-50.

26- Harborne, J.B. and Williams, C.A. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. Phytochemistry, 55: 481-504.

27- Kotzekidou, P., Giannakidis, P. and Boulamatsis, A. 2008. Antimicrobial activity of some plant extracts and essential oils against foodborne pathogens in vitro and on the fate of inoculated pathogens in chocolate. LWT Food Sci Technol, 41: 119-127.

28- Lee, D.G., Kim, H.K., Park, Y., Park, S.C., Woo, E.R., Jeong, H.G. and et al. 2003. Gram positive bacteria specific prooerties of silybin derived from *Silybum marianum*. Arch Pharm Res, 26: 597-600.

29- Luper, S.A. 1998. review of plants used in the treatment of liver disease: part 1. Altern Med Rev, 3: 410-421.

30- Mangena, T. and Muyima, N.Y. 1999. Comparative evaluation of the antimicrobial activities of essential oils of *Artemisia afra*, *Pteronia incana* and *Rosmarinus officinalis* on selected bacteria and yeast strains. LettAppl Microbiol, 28: 291-296.

31- Nemeth, E. and Bernath, J. 2008. Biological activities of yarrow species (*Achillea* spp). Curr Pharm Des, 14: 3151- 3167.

32- Özbek, H., Güvenalp1, Z., Kuruüzüm-Uz, A., Kazaz, C. and Demirezer, L.O. 2016. Phenylpropanoids, sesquiterpenoids and flavonoids from *pimpinella tragium*Vill. subsp. *Lithophila* (Schischkin) Tutin. Rec Nat Prod, 10: 207-213.

33- Raei, F., Ghorbani Nohooji, M., Habibi M. and Ashoori, N. 2014. Antibacterial activity of alcoholic extracts of two *Clematis* L. (Ranunculaceae) species from Iran. J MedPlants, 13: 40-46.

34- Shahidi, F. and Wanasundara, P.K. 1992. Phenolic antioxidants. Crit Rev Food Sci Nutr, 32: 67-103.

35- Sokmen, A., Vardar-Unlu, G., Polissiou, M., Daferera, D., Sökmen, M. and Dönmez, E. 2003. Antimicrobial activity of essential oil and methanol extracts of *Achillea sintenisii* Hub. Mor. (Asteraceae). Phyto Res, 17: 1005-1010.

36- Soltani, M., Ghodratnama, M., Taheri Mirghaed, A., Zargar, A. and Rooholahi, Sh.

مقاله پژوهشی
DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.4.5.5

2013. The effect of *Zataria multiflora* Boiss and *Rosmarinus officinalis* essential oil on *Streptococcus iniae* isolated from Rainbow trout farms. J Vet Microbial, 9: 1-11.

37- Strycharz, S. and Shetty, K. 2002. Peroxidase activity and phenolic content in elite clonal lines of Mentha pulegium in response to polymeric dye R-478 and Agrobacterium rhizogenes. Process Biochem, 37: 805- 12.

38- Taguri, T. and Tanakat kouno, I. 2004. Antimicrobial activity of 10 different plant poly phenols against bacteria causing food-borne disease. Biol pharm Bull, 27: 1965-1969.

39- Vanden, D.A. and Vlietinck, A.J. 1991. Methods in plant biochemistry screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. London: Academic Press, 6: 47-69.

40- Yadegarinia, D., Gachkar, L., Rezaei, M.B., Taghizadeh, M., Astaneh, S.A. and Rasooli, I. 2006. Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* L. and Myrtus Communis L. essential oils. Phytochemistry, 67: 1249-1255.

41- Zhang, Z., Liao, L., Moored, J., Wu, T. and Moore, j. 2009. Antioxidant phenolic compounds from walnut kernels (*Juglans regia* L.). Food Chem, 113: 160-165.

Antibacterial effect of methanolic extract of milk thistle seed on 8 species of gram-positive and negative bacteria

Mahmoudi Rad Z., Nourafcan H.*, Mohebalipour N., Assadi A. and Jamshidi S.

Dept. of Horticulture, Miyaneh branch, Islamic Azad University, Miyaneh, I.R. of Iran.

Abstract

Milk thistle with its active ingredient silymarin, is effective in treating various liver diseases and has antimicrobial properties. An experiment aimed at study of the chemical compositions and antimicrobial activity of alcoholic extract of milk thistle seed on 8 species of gram-positive bacteria, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, gram-negative bacteria, *Salmonella enterica*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* (E.coli), *Shigella dysenteria*, *Klebsiella pneumonia* and *Pseudomonas aeruginosa*. by using disk diffusion and macrodilution methods was conducted based on a completely randomized design in the veterinary laboratory of Miyaneh Branch of Islamic Azad University in 2017. The composition of methanolic extract of milk thistle seeds were evaluated using HPLC and the presence of two substances, silybin A and B, were identified as the main constituents of silymarin. In the antibacterial test, methanolic extract of milk thistle seeds was effective against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella enterica*, *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli* but had less inhibitory effect compared to Gentamicin and Ampicillin. In disk diffusion, *Staphylococcus aureus* had the highest inhibitory zone and the highest MIC and MBC. In *Bacillus* cereus and *Salmonella enterica*, the growth inhibition zone diameter was approximately equal to that of *Staphylococcus* and *Proteus* and *Escherichia coli* showed a smaller diameter zone than *Staphylococcus*. It seems that milk thistle methanolic extract contains antiseptic substances with antibacterial effects. Therefore, it is recommended to study other strains.

Key words: Milk thistle, silymarin, antimicrobial, disk diffusion, macrodilution