فصلنامه

زیست شناسی تکوینی

سال هفتم، شماره ۳، تابستان ۱۳۹۴

بررسی اثرات ضد باکتریایی عصاره‌های آبی و آلی گیاه *Alyssum homolocarpum* L. در مراحل مختلف نموی (رویشی، پیش گلدهی و گلدهی) بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی

محبوبه طالبی مهردار[۱]، نیره ساسانی پور[۱]*، رضا حاجی حسینی[۱]، مریم شریف شوشتری[۲]

[۱] گروه بیوشیمی دانشگاه، دانشکده علوم پایه، پیام نور، تهران، ایران

[۲] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

E-mail: nsasanipoor@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۸/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۲/۰۹

چکیده

استفاده ازگیاه قدومه با نام علمی *Alyssum homolocarpum* L. در طب سنتی ایران مرسوم است، در این تحقیق بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره‌های آلی و آبی گیاه قدومه علیه تعدادی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی بررسی شد.

عصاره‌گیری از گیاه در سه مرحله رویشی، پیش گلدهی و گلدهی با حلال‌های آب، اتانول، اتیل استات،استون، متانول وهگزانبه روش ماسراسیون انجام شد. غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی لیتراز عصاره‌ها تهیه شد و بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره‌ها علیه سویه‌های *Staphylococcus aureus*، *Stereptococcus pneumonia* از باکتری‌های گرم مثبت و*Ecoli* از باکتری‌های گرم منفی،صورت گرفت. اثرات ضد میکروبی عصاره‌های تهیه شده در مراحل مختلف نموی، ابتدا به روش انتشار در محیط مولر- هینتون آگار بررسی شد و سپس حداقل غلظت کشنده (MBC) و مهارکنندگی (MIC) تعیین شد.

نتایج بدست آمده نشان داد که عصاره متانولی در مرحله پیش گلدهی، نسبت به سایر عصاره‌های تهیه شده بیشترین اثر ضد باکتریایی را در حد معنی‌دار (P<۰/۰۵) نشان داد تهیه شده از مرحله پیش‌گلدهی، اثر مهاری بیشتری نسبت به سایر عصاره‌های آبی و آلی بر رشد میکرو ارگانیسم‌ها نشان داده‌است. بیشترین و کمترین اثر ضد میکروبی به ترتیب مربوط به مراحل پیش گلدهی و رویشی بوده است. عصاره‌های آبی حاصل از سه مرحله نموی گیاه قدومه بر روی باکتری‌های گرم مثبت اثر ضد میکروبی داشتند، اما بر روی باکتری گرم منفی اشرشیا کلی تاثیر کمتری نشان دادند. همچنین، کمترین MIC و MBC مربوط به عصاره متانولی مرحله پیش گلدهی، علیه باکتری گرم مثبت استرپتوکوکوس پنومونیه (به ترتیب ۰/۷۵ و ۱/۵ میلی‌گرم در میلی لیتر) و بیشترین MICو MBC مربوط به عصاره استونی مرحله رویشی، علیه باکتری گرم منفی اشرشیا کلی (به ترتیب ۵۵ و ۱۱۰ میلی‌گرم در میلی لیتر) بدست آمد.

کلیدواژه‌ها: *Alyssumhomolocarpum* L.، اثر ضد باکتریایی، باکتریگرم مثبت، باکتری گرم منفی، عصاره‌های آبی و آلی

مقدمه

گیاهان یکی از مهم ترین منابع طبیعی محسوب می‌شوند. آنها علاوه بر تامین مواد غذایی، فیبر و چوب، بسیاری از ترکیبات شیمیایی مثل روغن‌ها، ترپنوئیدها، رنگ‌ها و ترکیب‌های دارویی از جمله فلاونوئیدها و آلکالوئیدها را فراهم می‌کنند. در سال‌های اخیر تحقیقات متعددی در زمینه اثر بازدارندگی مواد طبیعی در برابر میکروارگانیسم‌ها صورت گرفته است.با توجه به خواص ضد میکروبی که درعصاره‌ها و اسانس‌های بعضی از گیاهان وجود دارد، می‌توان از این فرآورده‌ها به عنوان جایگزین طبیعی برای آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده کرد [1]. توجه به گیاهان دارویی، اثرو کاربرد آنها و روش استفاده از آنها تقریباً در هیچ مقطع زمانی متوقف نشده است [2].

جنس قدومه (*Alyssum homolocarpum* L.)، متعلق به تیره Brassicaceae و زیر تباره Alyssinae می‌باشد [3]. قدومه گیاهی علفی، یکساله و پایا است و دارای گل‌های کوچک زرد روشن و ساقه منشعب با کرک‌های ستاره‌ای می‌باشد. بذرهایش به رنگ قهوه‌ای و گرد بوده و در حاشیه باریک‌تر می‌شوند [4]. قدومه با داشتن مواد تشکیل دهنده متنوع دارای خواص فارماکولوژیک متعددی می‌باشد. ترکیبات شیمیایی قدومه شامل گلوکز اینولاتی(که پس از اتولیز ایزوسیانات‌ها، نیتریل‌ها و تیوسیانات‌ها را ایجاد می‌کند)، ترکیبات موسیلاژی، روغنی و پروتئینی می‌باشند. موسیلاژ موجود در این گیاه دارای خاصیت نرم‌کنندگی سینه و اندام تنفس فوقانی بوده و موجب آسان شدن خروج خلط می‌شود. بذر گیاه قدومه پس از قرار گرفتن در آب لعابی تولید می‌کند که به عنوان داروی ضد سرفه، خلط آور و لینت دهنده و همچنین سنگ شکن کاربرد سنتی دارد [3] کاربرد این گیاه در طب سنتی در سال ۲۰۰۸، توسط Mehlika و همکارانش گزارش شده است [22]. همچنین مطالعات متعددی در زمینه‌های استخراج مواد آلی و آبی از سایر جنس‌های خانواده قدومه انجام شده که از آن جمله می‌توان به مطالعات ZahidAwan و همکاران در سال ۲۰۱۲ بر روی عصاره تام گیاه کیسه کشیش (*Capsella bursa pastoris* L.) [14]، Bindujain و همکاران در سال ۲۰۱۱ بر روی اثرات ضد میکروبی گیاه خردل سیاه (*Brassica nigra*) [17]، فیاض و همکاران در سال ۲۰۱۲ بر روی خاصیت ضد باکتریایی عصاره ریشه و بذر تربچه [16] (*Raphanussativus* L.)، Amal و همکاران در سال ۲۰۱۰ بر روی فعالیت ضدمیکروبی عصاره متانولی ریشه، ساقه و برگ گیاه Anastaticahierochuntica معروف به چنگ مریم [19]، سفیدکن و همکاران در سال ۹۲ بر روی گیاه *Nasturtiumofficinalis* معروف به علف چشمه با استفاده از حلال متانول [1]، Hero و همکاران در سال ۲۰۱۲ بر روی فعالیت ضد میکروبی عصاره بذرهای گیاه *Lepidiumsativum* (شاهی، ترتیزک) [13] و مطالعات Shinde و همکاران در سال ۲۰۱۲ بر روی فعالیت ضد میکروبی و ضد قارچی گونه *Brassica oleracea* اشاره کرد [21]. از طرفی در زمینه تهیه عصاره‌های گیاهی به منظور بررسی اثرات ضد باکتریایی، مطالعات بسیار زیادی در ایران، در سه دهه گذشته، انجام شده است، اما توجه به مراحل نموی رویشی، پیش‌گلدهی و گلدهی در مطالعات مجد و دوستی در سال ۸۷ تحت عنوان بررسی تغییرات کمی و کیفی ترکیبات سازنده اسانس مرزه خوزستانی در طول تکوین گیاه و خواص ضد میکروبی آن گزارش شده است [2].

در خصوص خاصیت ضد میکروبی در خانواده قدومه در مراحل مختلف نموی به احتمال مطالعات اندکی صورت گرفته است و هدف از این مطالعه، بررسی اثرات ضد میکروبیعصاره‌های آبی و آلی گیاه قدومه در مراحل مختلف نموی (رویشی، پیش گلدهی و گلدهی) بر روی باکتری‌های بیماریزای گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس و استرپتوکوکوس پنومونیه که به ترتیب از عوامل اصلی عفونت‌های چرکی، پنومونی (سینه پهلو) و فارنژیت (التهاب حلق و گلو) و گرم منفی اشرشیا کلی که گاهی می‌تواند سبب ایجاد عفونت شود، می‌باشد [26].

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری گیاه

گیاه قدومه در سه مرحله رویشی، پیش گلدهی و گلدهی از حوالی درب شماره ۱ پارک چیتگر، واقع در غرب تهران در فاصله اوایل اسفند تا اواخر تیرماه سال ۱۳۹۱ جمع‌آوری و نمونه هرباریومی آن تهیه و سپس در هرباریوم موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور شناسایی و نام علمی آن تعیین شد. گیاه جمع‌آوری شده پس از تمیز و خشک کردن، توسط آسیاب پودر شده و در ظروف در بسته شیشه‌ای به دور از نور و حرارت در دمای ٤ درجه سانتیگراد در یخچال نگهداری شد.

عصاره‌گیری

جهت آماده سازی عصاره‌ها ابتدا پودر گیاه قدومه در سه مرحله رویشی، پیش‌گلدهی و گلدهی با استفاده از مخلوط کن تهیه شد. برای اطمینان از هرگونه آلودگی با استفاده از تکنیک تندالیزاسیون استریل شدند. در این تکنیک پودر گیاه در شیشه‌های اتوکلاو شده و کاملاً استریل، ریخته شده و به مدت یک ساعت در بن‌ماری با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد گذاشته و سپس به دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ٢٤ ساعت منتقل و این عمل ۳ بار تکرار شد [2]. جهت تهیه عصاره‌های مختلف، به منظور تهیه و بررسی حداقل غلظت عصاره، ۰/۱ میلی‌گرم پودر گیاه قدومه در مراحل مختلف نموی (رویشی، پیش گلدهی و گلدهی) در ۰/۹ میلی لیتر حلال مورد نظر، شامل آب، اتانول، اتیل استات، استون، متانول و هگزان نرمال، حل کرده و به مدت ۳ ساعت در دمای اتاق روی شیکر قرار داده شد [16]. پس از این مرحله نمونه‌ها تا زمان آزمایش در ظروف استریل در بسته در داخل یخچال با دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

در این مطالعه از دو سویه باکتری گرم مثبت شامل استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*) و استرپتوکوکوس پنومونیه (*Stereptococcus pneumonia*) و باکتری گرم منفی *E.coli* استفاده شد که به صورت لیوفیلیزه از محل سرم‌سازی رازی کرج در آذرماه ۱۳۹۱ تهیه شدند. برای نمونه های کنترل، مثبت تتراسایکلین و کنترل منفی آب، اتانول، اتیل استات، استون، متانول و هگزان در نظر گرفته شد.

روش بررسی فعالیت ضد باکتریایی

به منظور بررسی اثرات ضد باکتریایی غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی لیتر از مراحل رویشی، پیش‌گلدهی و گلدهی گیاه تهیه شد. برای تهیه هر یک از عصاره ها مقدار مناسب از عصاره خشک گیاه را دقیقاً توزین و در حلال مناسب خود حل کرده و از آنها برای بررسی اثرات ضد میکروبی گیاه استفاده شد. به طوری‌که از کلنی ٢٤ ساعته هر کدام از باکتری‌های کشت داده شده در محیط کشت جامد (نوترینت آگار و بلاد

آگار) به کمک لوپ ۵-٤ پرگنه میکروبی برداشته و در یک لوله آزمایش استریل حاوی ۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی یا آب مقطر استریل، کاملاً مخلوط کرده تا سوسپانسیون یکنواختی از باکتری مورد نظر حاصل شود. این لوله به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا کدورتی مشابه لوله استاندارد ۰/۵ مک فارلند ایجاد نماید. در صورتی که کدورت سوسپانسیون میکروبی بیش از مقدار مورد نظر باشد با افزودن آب مقطر یا سرم فیزیولوژی استریل آن را رقیق کرده،سپس توسط سوآپ استریل و در کنار شعله از لوله حاوی سوسپانسیون باکتری مقداری برداشت نموده و سوآپ آغشته به میکروب را روی پلیت حاوی محیط‌کشت نوترینت آگار به صورت خطوط موازی در سه جهت (عمودی، افقی و مورب) بر هم کشت داده، به گونه‌ای که تمام سطح پلیت از یک لایه میکروبی یکنواخت پوشیده شود [17].

روش دیسک گذاری

بعد از تهیه محیط میکروبی،پلیت های حاوی محیط مولر- هیلتون آگار نیز تهیه و هر پلیت به سه بخش مساوی تقسیم گردیدو به هر دیسک استریل ۲۰ میکرولیتر از عصاره‌های گیاه قدومه به غلظت نهایی ۵۰ میلی‌گرم بر میلی لیتر، تزریق و پس از مدت زمانی در حدود ۱۵ دقیقه، دیسک‌ها بر روی نواحی مشخص شده بر روی محیط مولر- هیلتون آگار قرار داده شدند (فاصله هر دیسک از یکدیگر ۲/۵ سانتی‌متر و فاصله از لبه پتری دیش حداقل ۲ سانتی‌متر). همچنین از یک کنترل منفی (آب، اتانول، اتیل استات، استون، متانول و هگزان) به عنوان حلال عصاره‌ها و یک کنترل مثبت (تتراسایکلین ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به عنوان آنتی‌بیوتیک استفاده شد. سپس پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در درون انکوباتور به مدت ١٦ تا ٢٤ ساعت نگهداری شدند و سپس نتایج بررسی شد [17,18]. به منظور تعیین حداقل غلظت بازدارنده (MIC[1]) و حداقل غلظت کشنده (MBC[2]) از یازده لوله به غلظت های نهایی متفاوت گیاه قدومه در سه مرحله نموی به رقت‌های ١٣٣/٣٣، ٦٦/٦٦، ٣٣/٣٣، ١٦/٦٦، ٨/٣٣، ٤/١٧، ٢/٠٨، ١/٠٤، ٠/٥٢، ٠/٢٦ و ٠/١٣ استفاده شد [19].

نتایج

نتایج بدست آمده از تأثیر عصاره‌های گیاه قدومه (*Alyssum homolocarpum* L.) با حلال‌های مختلف (آب، اتانول، اتیلاستات، استون، متانول و هگزان) و با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در سه مرحله رویشی، پیش‌گلدهی و گلدهی، به روش انتشار (Disc diffusion Method) با تعیین قطر هاله مهار رشد و روش MIC بر سوش‌های استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 6538)، استرپتوکوکوس پنومونیه (ATCC 49619) و اشرشیا کلی (PTCC 1335) در مراحل مختلف نموی نتایج متفاوتی را نشان داد که در جدول شماره ۱ آماده است.

بررسی های ضد میکروبی نشان داد که همه عصاره‌های آلی و آبی بر باکتری‌های گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس و استرپتوکوکوس پنومونیه موثر بوده‌اند، در حالیکه تنها عصاره‌های آلی بر اشرشیا کلی اثر ضدمیکروبی داشته است و عصاره‌های آبی بر روی این باکتری گرم منفی بی اثر بوده است.

مقایسه اثر ضدمیکروبی ٦ عصاره آبی و آلی در سه مرحله رویشی، پیش‌گلدهی و گلدهی گیاه قدومه

[1] Minimum Inhibitory Concentration
[2] Minimum bactericidal Concentration

نشان داد که عصاره متانولی مرحله پیش گلدهی اثر مهاری قابل توجهی را بر استرپتوکوکوس پنومونیه داشته (قطر هاله ۳۲mm)، در حالیکه کمترین اثر مهاری مربوط به عصاره استونی مرحله رویشی باکتری اشرشیا کلی بوده است (قطر هاله ۱mm).

همچنین از بین عصاره‌ها، عصاره هگزانی مرحله گلدهی بیشترین تاثیر ضد میکروبی را بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس داشته است (قطر هاله mm ۲۸).

مقایسه عصاره‌های آبی و آلی در ۳ مرحله نموی نشان می‌دهد که عصاره‌های اتیل استاتی مرحله گلدهی تاثیر یکسانی را بر باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و استرپتوکوکوس پنومونیه داشته است (قطر هاله ۱۷mm) که البته این اثر مشابه، در بین عصاره‌های اتانولی مرحله گلدهی نیز دیده شد (قطر هاله ٤mm) (جدول ۱).

نتایج حاصل از بررسی حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره‌های آبی و آلی این گونه از گیاه قدومه بر روی پاتوژن‌های مورد بررسی در جداول ۲ تا ۷ آورده شده است. این نتایج نشان می‌دهند که کمترین MIC علیه پاتوژن‌های مورد بررسی، مربوط به عصاره متانولی مرحله پیش گلدهی و برابر با ۰/۷۵ میلی‌گرم به ازای هر میلی‌لیتر بود و علیه استرپتوکوکوس پنومونیه که یک باکتری گرم مثبت است، مشاهده شد. به بیان دیگر، حساس‌ترین پاتوژن دربین پاتوژن‌های مورد بررسی استرپتوکوکوس پنومونیه بود وMBC عصاره‌های قدومه علیه این پاتوژن دو برابرMIC آن (معادل ۱/۵میلی‌گرم به ازای هر میلی‌لیتر) بدست آمد و این در حالی بود که بیشترین MIC در این تحقیق برابر ۵۵ میلی‌گرم به ازای هر میلی لیتر بوده و این MIC علیه Ecoli که یک باکتری گرم‌منفی است، مشاهده شد.بنابراین مقاوم‌ترین پاتوژن به عصاره‌های آبی و آلی این گونه از قدومه در Ecoli مشاهده شد. MBC عصاره استونی مرحله رویشی گیاه قدومه علیه باکتری اشرشیا کلی ۲ برابر MIC آن یعنی معادل ۱۱۰ میلی‌گرم به ازای هر میلی‌لیتر بدست آمد. MIC عصاره هگزانی مرحله گلدهی این گیاه‌علیه باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس برابر ۱/۷۵ میلی‌گرم به ازای هر میلی لیتر محاسبه شد و مقاومت این باکتری در رتبه بعدی، پس از اشرشیا کلی قرار گرفت. MBC این عصاره علیه باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس که یک باکتری گرم مثبت است، ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد و حساسیت این پاتوژن در حد واسط بین استرپتوکوکوس پنومونیه و اشرشیا کلی قرار گرفت.

جدول ۱ . مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد مراحل رویشی، پیش گلدهی و گلدهی گیاه قدومه بر باکتری های گرم مثبت و منفی

ردیف	مراحل نموی	عصاره با غلظت $5\frac{mg}{ml}$	میکروارگانیسم مورد مطالعه		
			استافیلوکوکوس اورئوس	استرپتوکوکوس پنومونیه	اشرشیا کلی
۱	رویشی	آبی	۵	۱۹	۰
		اتانولی	۱۶	۳	۵/۵
		اتیل استاتی	۱۰	۱/۵	٤
		استونی	۱۸	۵	٤/۵
		متانولی	۲۱	۵	۷/۵
		هگزانی	۱۲	۱۳	٦/۵
۲	پیش گلدهی	آبی	٦	۲٦	۰
		اتانولی	۲۲	۲۰	٤/۵
		اتیل استاتی	۹	۱۲	۵/۵
		استونی	۱۳	۱٦	۷
		متانولی	۲۵	۳۲	۹
		هگزانی	۱۰	۱۸	٦
۳	گلدهی	آبی	۸	۲	۰
		اتانولی	٤	٤	٦
		اتیل استاتی	۱۷	۱۷	۳
		استونی	۲۳	۲۱	۳/۵
		متانولی	۱٦	۱۳/۵	٦
		هگزانی	۲۸	۲٤	۵
٤	شاهد مثبت		۲۰	۲۸	۲۵
۵	شاهد منفی		–	–	–

شاهد منفی:دیسک آغشته به آب مقطر استریل و ۱۵ درصد حلال آلی(اتانول، اتیل استات، استون، متانول، هگزان) شاهد مثبت: تتراسایکلین

– : بی اثر

جدول ۲ . نتایج MIC و MBC($\frac{mg}{ml}$) عصاره های آبی گیاه قدومه بر روی باکتری های مورد مطالعه پس از سه بار تکرار

سویه باکتری	گرم +/–	MIC $\left(\overline{x} \pm SE\right)$			MBC $\left(\overline{x} \pm SE\right)$		
		رویشی	پیش گلدهی	گلدهی	رویشی	پیش گلدهی	گلدهی
استرپتوکوکوس پنومونیه	+	۳±۰/۱۲	۱±۰/۷۵	۵۰±۰/۸	۶±۰/۱۷	۳±۰/۷	۶۶±۰/۵۲
استافیلوکوکوس اورئوس	+	۱۲±۰/۴	۶±۰/۲۵	۱۲±۰/۲۱	۲۵±۰/۳۲	۱۲±۰/۱	۲۵±۰/۲
اشرشیا کولی	–	–	–	–	–	–	–

– : بی اثر

جدول۳ . نتایج MIC و MBC($\frac{mg}{ml}$) عصاره های اتانولی گیاه قدومه بر روی باکتریهای مورد مطالعه پس از سه بار تکرار

سویه باکتری	گرم +/–	MIC $\left(\overline{x} \pm SE\right)$			MBC $\left(\overline{x} \pm SE\right)$		
		رویشی	پیش گلدهی	گلدهی	رویشی	پیش گلدهی	گلدهی
استرپتوکوکوس پنومونیه	+	۱۵±۰/۷	۶±۰/۲۱	۱۵±۰/۲۷	۲۵±۰/۲	۱۱±۰/۵	۲۵±۰/۲۱
استافیلوکوکوس اورئوس	+	۶±۰/۲	۶±۱/۵	۱۵±۰/۳۲	۱۱±۰/۱	۱۲±۳/۸	۲۵±۰/۲
اشرشیا کولی	+	۱۲±۱/۳	۱۵±۲/۱	۱۲±۰/۷	۲۵±۰/۲۹	۲۵±۰/۲	۲۵±۰/۵

جدول ٤. نتایج MIC و MBC($\frac{mg}{ml}$) عصاره های اتیل استاتی گیاه قدومه بر روی باکتریهای مورد مطالعه پس از سه بار تکرار

سویه باکتری	گرم +/-	MIC			MBC		
		رویشی	پیش گلدهی	گلدهی	رویشی	پیش گلدهی	گلدهی
استرپتوکوکوس پنومونیه	+	۵۰±۲/۳	۶±۰/۲۵	۶±۰/۲۹	۱۰۰±۰/۵۲	۱۲±۰/۸	۱۲±۰/۲
استافیلوکوکوس اورئوس	+	۱۲±۰/۱	۱۲±۰/۷	۶±۰/۴	۲۵±۰/۴۲	۲۵±۰/۱	۱۲±۰/۱۸
اشرشیا کولی	-	۱۵±۲/۶	۱۲±۰/۱۸	۱±۰/۷۵	۲۵±۴/۳	۲۵±۰/۳۴	۳±۱/۷

جدول ۵ . نتایج MIC و MBC($\frac{mg}{ml}$) عصاره های استونی گیاه قدومه بر روی باکتریهای مورد مطالعه پس از سه بار تکرار

سویه باکتری	گرم +/-	MIC $\left(\bar{x} \pm SE\right)$			MBC $\left(\bar{x} \pm SE\right)$		
		رویشی	پیش گلدهی	گلدهی	رویشی	پیش گلدهی	گلدهی
استرپتوکوکوس پنومونیه	+	۱۵±۰/۹	۱۲±۰/۷۱	۶±۰/۲۵	۳۰±۷/۵	۲۵±۳/۲	۱۲±۰/۴
استافیلوکوکوس اورئوس	+	۱۲±۰/۱۲	۱۲±۰/۶۲	۶±۰/۲۵	۲۵±۰/۲	۲۵±۰/۴	۱۲±۰/۸۲
اشرشیا کولی	-	۵۵±۱/۲	۲۱±۲/۳	۲۱±۰/۴۴	۱۱۰±۰/۵۱	۴۰±۰/۲۶	۴۰±۳/۱

جدول ٦ . نتایج MIC و MBC($\frac{mg}{ml}$) عصاره های متانولی گیاه قدومه بر روی باکتریهای مورد مطالعه پس از سه بار تکرار

سویه باکتری	گرم +/-	MIC $\left(\bar{x} \pm SE\right)$			MBC $\left(\bar{x} \pm SE\right)$		
		رویشی	پیش گلدهی	گلدهی	رویشی	پیش گلدهی	گلدهی
استرپتوکوکوس پنومونیه	+	۶±۲/۳	۱±۰/۷	۳±۰/۱۸	۱۲±۰/۷	۱±۰/۳	۶±۰/۲۴
استافیلوکوکوس اورئوس	+	۳±۰/۱۲	۱±۰/۱۵	۳±۰/۱۵	۶±۰/۳	۳±۰/۸۶	۶±۰/۱
اشرشیا کولی	-	۳±۰/۲۳	۳±۰/۱۲	۶±۰/۲۵	۶±۲/۷	۶±۳/۱	۱۲±۰/۵۷

جدول۷ . نتایج MIC و MBC($\frac{mg}{ml}$)عصاره های هگزانی گیاه قدومه بر روی باکتریهای مورد مطالعه پس از سه بار تکرار

سویه باکتری	گرم +/-	MIC $\left(\bar{x} \pm SE\right)$			MBC $\left(\bar{x} \pm SE\right)$		
		رویشی	پیش گلدهی	گلدهی	رویشی	پیش گلدهی	گلدهی
استرپتوکوکوس پنومونیه	+	۶±۰/۲۵	۶±۱/۶	۳±۲/۱	۱۲±۰/۴۷	۱۲±۰/۳۶	۶±۰/۸
استافیلوکوکوس اورئوس	+	۶±۰/۴۹	۶±۰/۲۵	۱±۰/۷	۱۲±۰/۲۴	۱۲±۰/۵۲	۳±۴/۲
اشرشیا کولی	-	۱۲±۰/۳	۱۲±۲/۹	۶±۱/۳	۲۵±۰/۳	۲۵±۲/۳	۱۲±۰/۷

بحث

تحقیقات دهه های اخیر در ارتباط با اثرات ضد میکروبی مشخص کرده که بعضی از گیاهان تاثیراتی همانند داروهای شیمیایی یا به مراتب بیشتر از آنها می‌توانند داشته باشند [6] .نتایج گزارش‌های محققان اروپایی بر روی اثر آنتی باکتریال بذر گونه‌ای از گیاه قدومه با نام علمی *Alyssum pateri* [22] و آزمایش‌هایی به منظور بررسی اثر ضدباکتریایی عصاره‌های متانولی بذر قدومه بر روی چند میکروارگانیسم انجام شده و به ماهیت ضد میکروبی بذر گیاه پی بردند. از نتایج این بررسی مشخص شد که عصاره‌های آلی بر باکتری‌های گرم مثبت نسبت به گرم منفی اثر بهتری را نشان می‌دهد. این نتیجه با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت دارد، به طوری که عصاره متانولی مرحله پیش‌گلدهی گیاه قدومه بر باکتری گرم مثبت استرپتوکوکوس پنومونیه بیشترین اثر

ضد میکروبی را نشان داده است که احتمال دارد اثر ضد باکتریایی عصاره متانولی قدومه بر این باکتری، به علت اتصال به N- استیل گلوکز آمینموجود در دیواره سلولی آن باشد [20,21].

نتایج نشان داد که از بین باکتری‌های مورد پژوهش، باکتری‌های گرم مثبت، همچون استرپتوکوکوس پنومونیه و استافیلوکوکوس اورئوس با سهولت بیشتری نسبت به باکتری گرم منفی *E. coli* مهار می شوند، که این امر ممکن است به لیپوپلی ساکاریدهای غشای بیرونی باکتری‌های گرم منفی نسبت داده می‌شود که آنها را ذاتاً به عوامل خارجی مثل رنگ‌های آبدوست، آنتی‌بیوتیک‌ها و شوینده‌ها مقاوم می‌کند [22].

طبق نظر Baseri و Fan [19] عصاره های گیاهی معمولاً بیشتر در برابر باکتری های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی فعال‌تر هستند. از این رو در بررسی‌هایی که توسط AmalA. grawal و همکاران [23] بر روی عصاره گیاه چنگ مریم از خانواده Brassicaceae (با استفاده از حلال قطبی متانول) انجام گرفت، مشخص شد که عصاره های این گیاه بیشترین فعالیت ضدمیکروبی را نسبت به باکتری‌های گرم مثبت نشان دادند که تحقیقات ما هم همین ادعا را در مورد مرحله پیش‌گلدهی در گیاه قدومه به اثبات رساند. مورد دیگر در تحقیقات ضدباکتریایی انتخاب حلال مناسب است تاثیر حلال‌های مختلف بر روی مراحل نموی مختلف گیاه قدومه را می‌توان این گونه تصور کرد که حلال قطبی متانول (۸۰ درصد)که به پودر گیاه قدومه در مراحل مختلف نموی اضافه شد، قادر است ترکیبات قطبی را حل می‌کند. حلال نیمه قطبی اتیل استات، ترپنوئیدها را در خود حل نماید. این مطلب در تاثیر یا عدم تاثیر خواص ضد میکروبی نقش مهمی دارد. مثلاً هنگامی که عصاره متانولی به عنوان بهترین حلال گزارش می‌شود، می‌توان این مطلب را به حل کردن انواع ترکیبات قطبی گیاه از جمله فلاوونوئیدها نسبت داد و یا هنگامی که تاثیر عصاره استونی بر باکتری‌های گرم مثبت ذکر می‌شود می‌توان حل شدن ترکیبات غیر قطبی از جمله کاروتنوئیدها را مطرح کرد [24] استفاده از حلال مناسب در بررسی‌های مختلف و کاربردهای متفاوت روی عصاره‌های گیاهی را می‌توان با گزارش‌های اربابیان و آخوندزاده در سال ۱۳۸۷ و کاویانی و مجد در سال ۱۳۸۸ بر روی حلال‌های انتخابی در دو گونه از گیاه کنگر همسو دانست.

از طرفی انتخاب مرحله نموی در گیاه هم نقش مهمی در محتویات موجود در عصاره دارد. با شروع گل دهی و تبدیل تعداد زیادی از مریستم‌های رویشی به مریستم‌های زایشی، فعالیت گیاه نیز تا حدودی متوقف شده و همه این عوامل منجر به کاهش مواد موثره و کاهش تولید آنها می‌شود. تفاوت در مقدار ونوع ترکیبات سازنده عصاره‌ها در طول تکوین گیاه، به عوامل متعددی وابسته است. اثرات متقابل ژنوم گیاه و عوامل محیطی می‌تواند روی مقدار و نوع ترکیبات سازنده عصاره ها موثر باشد.به این ترتیب که میزان بیان و یا عدم بیان مجموعه های ژنی مرتبط با سنتز عصاره‌ها می‌تواند در برهمکنش با عوامل محیطی در هر مرحله نموی متغیر باشد [14]. بررسی‌های این پژوهش نشان می‌دهد که در مراحل مختلف نموی مقدار و ترکیبات موجود در عصاره‌های آبی و آلی دستخوش تغییر و تحول می‌شوند و تغییرات در مراحل مختلف دیده می‌شود که همسو با گزارش‌های Gonzalez و همکاران در سال ۲۰۰۹ بوده و می‌توان این تغییرات را ناشی از مراحل متابولیسمی در گیاه و

تبدیل آنها به یکدیگر دانست [24]. باتوجه به موارد فوق، لازم است برای استخراج ترکیب‌های با ارزش از عصاره گیاهان، به مراحل نموی آنها توجه کرد. همچنین شرایط محیطی هم می‌تواند نقش مهمی را در ترکیبات موجود در عصاره گیاهان داشته باشد [7]. از آنجایی که در پژوهش ما تمامی نمونه‌های مورد آزمایش در شرایط یکسان آزمایشی بودند، لذا تغییرات مقدار و نوع ترکیب‌های موجود در عصاره‌های آبی و آلی که در پژوهش حاضر به آنها اشاره شد، بیشتر مربوط به روند نمو و مراحل تکوینی گیاه قدومه می‌باشد و می توان استناد کرد که در بیوشیمی گیاهی، توجه به مراحل متابولیسمی در گیاهان برای تهیه مواد دارویی موثر، لازم و ضروری است.

نتایج بدست آمده در زمینه عصاره آلی متانولی مرحله پیش‌گلدهی گیاه قدومه با گزارش‌های فیاض و همکاران در سال ۲۰۱۲ در زمینه بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره بذر تربچه مطابقت دارد [16]، لذا پیشنهاد می‌شود در بررسی ضد باکتریایی گیاهان، به مراحل نموی آنها توجه شود، چراکه مواد موثره و متابولیت‌های ثانویه در مراحل مختلف نمو گیاه مقدار متفاوتی داشته و اثردهی آن فرق می‌کند. گزارش این تفاوت را میتوان با نتایج مجد و دوستی در سال ۸۷ در ارتباط با بررسی تغییرات کمی و کیفی اسانس مرزه خوزستانی مطابقت داد [7].

از طرفی باکتری‌های گرم مثبت به دلیل داشتن دیواره سلولی متفاوت از باکتری‌های گرم منفی، تاثیر متفاوتی را نشان می‌دهند. عصاره‌های حلال‌های قطبی مثل متانول و غیر قطبی مثل استون با داشتن پیوندهای متفاوت از نظر ساختار شیمیایی می‌توانند با دیواره سلولی باکتری گرم مثبت نوعی ارتباط برقرار کنند، اما با دیواره باکتری گرم منفی این رابطه برقرار نمی‌شود. پس توجه به نوع حلال برای استخراج مواد موثره از گیاهان مهم است. نتایج ما در این زمینه با کمیلی و همکاران مطابقت دارد.

تفاوت در اثر عصاره‌ها بر روی رشد باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی می‌تواند بازتابی از تفاوت در ساختار دیواره سلولی آنها باشد، به طوریکه تمام باکتری‌های گرم منفی دارای دیواره خارجی لیپوپلی ساکاریدی با ساختار آبدوستی[1] هستند که به دلیل حضور پروتئین‌های پورین[2] فراوان، مواد محلول آبدوست و کوچک به راحتی از آن عبور می‌کنند ولی این دیواره به عنوان سدی در مقابل ترکیبات آبگریز[3] و درشت مولکول، آنتی‌بیوتیک‌ها و شوینده‌ها عمل می‌کند [7] و از آنجایی که اکثر ترکیبات موجود در عصاره‌ها جزء ترکیبات آبگریز هستند، بنابراین به راحتی قادر به عبور از دیواره مذکور نمی‌باشند و به همین دلیل مقاومت باکتری‌های گرم منفی در تحقیق حاضر، در برابر عصاره‌های گیاه، بیشتر از باکتری‌های گرم مثبت می‌باشد. غشاء باکتری‌های گرم منفی نسبت به باکتری‌های گرم مثبت از میزان کمتری پپتیدوگلیکان تشکیل شده است، اما در عوض دارای غشای خارجی اضافه است که لیپوپلی ساکاریدی می‌باشد و برخی از این لیپوپلی ساکاریدها سمی هستند. غشای لیپوپلی ساکاریدی باکتری‌های گرم منفی آنها را نسبت به داروهای ضدمیکروبی (آنتی‌بیوتیک‌ها) مقاوم‌تر می‌سازد و به همین دلیل عفونت باکتریایی ناشی از باکتری‌های گرم منفی خیلی شدیدتر از عفونت ناشی از باکتری‌های گرم مثبت می‌باشد. عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی می‌توانند عملکردهای مختلفی را در مقابل سویه‌های باکتریایی از خود نشان دهند که از آن جمله می‌توان به

[1] Hydrophilic
[2] Porin
[3] Hydrophobic

تداخل با غشای فسفولیپیدی دو لایه ای سلول اشاره کرد که به دنبال آن نفوذپذیری غشاء افزایش و مواد درون سلولی کاهش می‌یابد. از سایر مکانیسم‌ها می‌توان به آسیب به آنزیم‌های دخیل در تولید انرژی و ترکیبات ساختاری سلول و نیز غیرفعال کردن ترکیبات ژنتیکی اشاره کرد. امید است در آینده تحقیقات بیشتری در زمینه اثر ضدمیکروبی این گیاه بر گونه‌های مختلف میکروبی انجام گیرد تا با یافتن مواد موثره ضدمیکروبی گیاه قدومه و فرمولاسیون آن، تهیه اشکال دارویی مختلف از آن ممکن شده و اقدام ارزنده‌ای جهت بهبود بیماری‌های عفونی ناشی از گونه‌های مختلف میکروبی، خصوصا عفونت‌های چرکی، سینه پهلو و دیگر بیماری‌های ریوی از جمله تنگی نفس و حملات آسم انجام گیرد.

منابع

[۱] اربابیان ص، آخوند زاده م، اخوان سپهی ع، چلبیان ف، ۱۳۸۸، بررسی اثرات ضدمیکروبی عصاره‌های آبی، اتانولی، متانولی و استونی Cynarascolymus (کنگر فرنگی) بر روی برخی از باکتری‌ها و قارچ‌ها، فصلنامه علمی پژوهشی دانش میکروب شناسی، سال اول، شماره ٤، ص ۲۸-۲۱.

[۲] امین غلامرضا، ۱۳۸٤.متداولترین گیاهان دارویی سنتی ایران. مرکز تحقیقات اخلاق و تاریخ پزشکی،

[۳] سفید کن ف، ترابی ب، نادری م، گوشه‌گیر ا، ۱۳۹۲، مقایسه اثر ضدسرطانی نانو کپسول عصاره گیاه علف چشمه (Nasturtium officinallis L.) (R. Br) با عصاره متانولی و فراکسیون‌های آن، فصلنامه علمی- پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، جلد ۲۹، ش ۱، ص ۵۰-۳۵.

[٤] کمیلی زاده ح. حاکمی والا م، کمالی نژاد م، نشاط آشفته س، ۱۳۸۷، بررسی اثرات ضدمیکروبی عصاره‌های آبی و آلی دانه‌های گیاه *Triticumsativum Lam.* بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی، فصلنامه گیاهان دارویی، سال۷، شماره ۲۸، ص ۱۱۱-۱۰۵.

[٥] مجد ا، نژاد ستاری ط، خاوری نژاد ر، دوستی ب، ۱۳۸۷، بررسی تغییرات سازنده اسانس گونه دارویی مرزه خوزستانی (Saturejakhuzistanica J.) در طول تکوین گیاه و خواص ضد میکروبی اسانس آن در شرایط in vitro، مجله علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی، جلد ۱۸، شماره ۷۰/۱، ص ٦۰-٥۱.

[٦] مجد،احمد، اربابیان،صدیقه، کاویانی، مهری. ۱۳۸۸، بررسی اثرات ضدمیکروبی عصاره اندام‌های زیرزمینی، هوایی و دانه‌های گیاه کاسنی (*Cichoiumintybus L.*) بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی، فصلنامه علوم زیستی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، شماره پیاپی ٦، جلد ۲، شماره ۳. ص ۱۳-۲۱.

[۷] مدرسی چهاردهی ا، ابراهیم د، فریضا سلیمان ش، ابوالحسنی ف، ۱۳۹۱، بررسی اثر عصاره‌های الکلی گیاه گزنه (*Urticadioica* L.) بر تعدادی از باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت، فصلنامه گیاهان دارویی، سال یازدهم، دوره دوم، شماره ٤۲، ص ۱۰٤-۹۸.

[۸] مظفریان، ولی الله .۱۳۸٤. رده‌بندی گیاهی کتاب دوم: دولپه‌ای‌ها . تهران: انتشارات امیرکبیر ٤۸۸-٤۹٥

[9] Amal A. Mohamed; Ashraf A. Khalil; Hossam E. S. El-Beltagi; (2010). Antioxidant and antimicrobial properties of kaffmaryam (Anastaticahierochuntica) and doum palm (Hyphaenethebaica).pp:67-75.
[10] Bindu Jain; Anjali Kanzarkar; Vibhor K. Jain; (2011). Comparative Analysis of the Anti-Bacterial; Anti-Fungal Activity of Five SelectedIndian Medicinal Plants on Human Pathogenic Microorganisms, pp: 437-442.
[11]. Ekrem KOKSAL; ilhamiGULCiN; (2008). Antioxidant Activity of Cauliflower (Brassica Oleracea L.) Ataturk University, Faculty of Science and Arts, Department of Chemistry,pp:65-88
[12] Faiyaz Ahmad; IzharulHasan; Danish Kamal Chishti; Haqeeq Ahmad;(2012). Antibacterial Activity of Raphanus Sativus Linn. Seed Extract. Pp: 24-34
[13] Hadi Alizadeh; BehboudJafari; Tohid Babae, (2012).The Study Antibacterial Effect of Capsella Bursa-Pastoris on Some of Gram Positive and Gram Negative Bacteria. pp: 6940-6945.
[14] Hayouni El, Abedrabba M, Bouix M andHamdi M. 2007.The effects of solvents and extractionmethod on the phenolic contents and biologicalactivities in vitro of Tunisian Quercuscoccifera L. and Juniperusphoenicea L. fruit extracts. Food.Chem.; 105 (3): 1126 - 34.
[15] Hero F. S. Akrayi; Jwan D. Tawfee; (2012). Antibacterial Activity of Lepidium sativum and AlliuM Porrum Extractsand Juices Against Some Gram Positiveand Gram Negative Bacteria, Medical Journal of Islamic World Academy of Sciences 20: 1, 10-16.
[16] Kalmba, D; Kunicka, A (2003), Antibacterial and antifungal properties of essential oils. current Medicinal chemistry, pp: 813-829.Liu Benguo; Yongyizhu, (2007). Extraction of flavonoids from flavonoidrichparts in tartary buck wheat and identification of the main flavonoids. Journal of food engineering; pp: 584-587.
[17] Mehlika Benli; UmitBingol; Fatmagul Geven; Kerim Guney; Nazife Yigit; (2008). An Investigation on the antimicrobial activity of some endemic plant species from Turkey. African Journal of Biotechnology Vol. 7 (1), pp: 001-005.
[18] Mehrabian S; Majd A; Jonoubi P ; Kheiri A, (2012). A study of the antimutagenic effects of different extracts of Aloe veraleaf gel and latex using Ames test.pp:100-106.
[19] SedighehMehrabian; AhmadMajd2; ImanMajd; (2000). Antimicrobial effects of three plants (rubiatinctorum, carthamustinctoriusand juglansregia) on some airborne microorganisms. pp: 455-458.
[20] Souri E; Amin G; Farsam H; Barazandeh Tehrani M. (2008). Screening of antioxidant activity and phenolic content of 24 medicinal plant extracts; pp: 83-87.
[21] W. Mamidou Koné; K. Kamanzi Atindehou; A. Kacou-N'Douba; M. Dosso. (2007). Evaluation of 17 Medicinal plants from northern cote d'ivoire for their in vitro activity against streptococcus pneumoniae.pp:17-22.
[22] Zahra Zare; Ahmad Majd; Taher Nejad Sattari; Alireza Iranbakhsh; Sediqeh Mehrabian. (2011).The Comparative Study Of Antimicrobial Activity of Leaves and Flowers Metanolic Extracts of Lippiacitriodora H.B.K (Verbenacea). pp: 901-905.
[23] Zargari A. 1998. Plants medicine. 6nd ed. Tehran university Press. vol 4., pp: 682 - 97.