اثر ضد میکروبی و برهمکنش عصاره های آبی و اتانولی بارهنگ کبیر (Plantago major) براستافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا اینوکوا، اشرشیاکلی و سودوموناس ائروژینوزا در شرایط برون تنی

بهروز علیزاده بهبهانی[۱]، فخری شهیدی[۲]، فریده طباطبایی یزدی* [۲]، سید علی مرتضوی[۲]، محبت محبی[۲]

۱-دانشجوی دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۲-استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

***نشانی برای مکاتبه:** tabatabai@um.ac.ir

دریافت مقاله: مرداد نود و پنج پذیرش برای چاپ: مهر نود و پنج

چکیده

سابقه و هدف: *بارهنگ کبیر (Plantago major) متعلق به تیره بارهنگیان و از گیاهان بومی ایران می باشد. این پژوهش با هدف تعیین اثر ضد میکروبی گیاه بارهنگ کبیر بر چهار گونه باکتری بیماری زا شامل: استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا اینوکوا، اشرشیاکلی و سودوموناس ائروژینوزا انجام شد.*

روش کار: *در این پژوهش آزمایشگاهی استخراج عصاره ها به روش ماسراسیون انجام شد. تعیین مقادیر حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی به عنوان روش کمی و انتشار در آگار به کمک دیسک (کربی-بوئر) و روش پورپلیت به عنوان روش های کیفی استفاده شدند.*

یافته‌ها: *عصاره آبی بارهنگ کبیر در غلظت ۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر هیچ اثر مهاری بر رشد باکتری ها نداشت. بیشترین قطر هاله عدم رشد عصاره‌های آبی و اتانولی بارهنگ کبیر در غلظت ۸۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مربوط به باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و کمترین قطر هاله عدم رشد مربوط به باکتری گرم منفی سودوموناس ائروژینوزا مشاهده شد. حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره آبی بارهنگ کبیر استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا اینوکوا، اشرشیاکلی و سودوموناس ائروژینوزا به‌ترتیب ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و برای عصاره اتانولی به ترتیب برابر با ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. حداقل غلظت کشندگی عصاره آبی بارهنگ کبیر برای استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا اینوکوا، اشرشیاکلی و سودوموناس ائروژینوزا به ترتیب ۵۰، ۵۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و برای عصاره اتانولی به ترتیب برابر با ۲۵، ۲۵، ۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود.*

نتیجه‌گیری: *عصاره اتانولی بارهنگ کبیر در مقایسه با آنتی بیوتیک ونکومایسین اثر بازدارندگی بیشتری داشت. عصاره های بارهنگ کبیر بر باکتری های گرم مثبت در مقایسه با باکتری های گرم منفی اثر بازدارندگی بیشتری نشان داد.*

کلید واژه‌ها: بارهنگ کبیر، عصاره، برهمکنش، آنتی بیوتیک، باکتری های بیماری زا.

مقدمه

سالانه بیش از ۲۵۰ میلیون نفر به بیماری های مختلف مبتلا می گردند. طیف وسیعی از باکتری ها و قارچ های بیماری زا از جمله باکتری های: اشرشیا کلی، انتروباکتر ائروژینوزا و سودوموناس ائروژینوزا و از باکترهای گرم مثبت می توان به استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و لیستریا شایع ترین عامل ایجاد بیماری های عفونی هستند (۱).

اشرشیا کلی باکتری باسیل گرم منفی است که بیش از ۸۰ درصد موارد باعث عفونت می گردد. این باکتری یکی از مهم ترین باکتری های عامل عفونت و مسمومیت و به خصوص عفونت ادرای است (۲). استافیلوکوکوس اورئوس باکتری گرم مثبت کوکسی شکل می باشد که میزان مقاومت در بین سویه های مختلف آن حدود ۷۰ تا ۹۰ درصد است (۱ و ۳). سودوموناس آئروژینوزا باکتری گرم منفی و یکی از سویه های مهم در بروز بیماری های عفونی همانند عفونت‌های مجاری ادراری، سیستم تنفسی، عفونت‌های بافت های نرم، عفونت‌های معده و روده‌ای است (۴). لیستریا باکتری گرم مثبت و بی هوازی اختیاری که باعث بیماری های مختلفی از جمله غیر مننژیت اولیه، انسفالیت، یا سپتی سمی می شود (۵).

شناسایی ترکیبات، فعالیت آنتی اکسیدانی و اثر ضد باکتریایی و قارچی گیاهان دارویی مورد توجه بسیاری است. گیاهان دارویی بعلت عوارض جانبی کمتر، در دسترس و ارزان بودن برای درمان بسیاری از بیماری های با عامل عفونت و مسمومیتاستفاده می شود (۱).

با افزایش مصرف استفاده از آنتی بیوتیک های رایج درمانی، شاهد شیوع و گسترش گونه های میکروبی بیماری زا مقاوم به آنتی بیوتیک ها هستیم. به وجود آمدن این گونه های مقاوم به آنتی بیوتیک ها، روند درمان را طولانی می سازد. با وجود اینکه ساخت و تولید آنتی بیوتیک های جدید و مختلف دارای روند صعودی می باشد اما پیدایش مقاومت در میکروارگانیسم های بیماری زا به ویژه باکتری ها یک مشکل بزرگ و اساسی در سطح جهان می باشد. توجه به گیاهان دارویی و بومی دارای اثر ضد میکروبی می تواند تا حدودی مشکلات ناشی از آنتی بیوتیک ها را کاهش دهد. عصاره ها و اسانس های گیاهی به عنوان یکی از عوامل مهم ضد میکروبی مهم و اساسی در سالیان اخیر مورد توجه بسیاری از محققان و پژوهشگران در زمینه های دارویی، پزشکی و غذا قرار گرفته است (۶).

بارهنگ کبیر با نام علمی (Plantago major) گیاه چندساله‌ای از تیره بارهنگیان است. از نظر گیاه شناسی بارهنگ گیاهی پایا، ظاهراً بی کرک یا کمی کرک پوش است. برگ‌های آن طوقه‌ای، تخم مرغی پهن با ۳ تا ۹رگبرگ برجسته، و دارای دمبرگ نسبتاً بلند است. زمان گل دهی گیاه بارهنگ کبیر اردیبهشت ماه تا شهریورماه می باشد. با بارهنگ به همراه قدومه و به دانه مخلوطی درست می‌کنند که به عنوان نرم کننده سینه و برطرف کننده سرفه وخارش‌های گلو مصرف سنتی دارد. ریشه، برگ و دانه این گیاه اثر نرم کننده داشته و از آن‌ها به عنوان تصفیه کننده خون، آرام کننده ناراحتی‌های آسم مرطوب، اسهال‌های ساده و ورم مخاط دهان استفاده می‌شود. جوشانده دانه بارهنگ در رفع بیماری‌های التهابی کلیه و مثانه موثر است. برگ تازه بارهنگ می تواند در درمان و التیام زخم های موثر می باشد، این گیاه نه تنها زخم را از آلودگی ها محافظت می نماید بلکه سرعت درمان را نیز تسریع می کند. گیاه بارهنگ در منطقه وسیعی از دو قاره

اروپا و آسیا و همچنین شمال آفریقا و آمریکای شمالی می‌روید. در ایران تقریباً در تمام نقاط رشد می کند (۱۰-۷)

هدف از انجام این پژوهش تعیین فعالیت ضد میکروبی عصاره های آبی و اتانولی بارهنگ کبیر به روش های متنوع کیفی و کمی و برهمکنش عصاره های آن به روش شاخص بازدارندگی افتراقی بر باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا اینوکوا، اشرشیاکلی و سودوموناس ائروژینوزا و مقایسه آن با تعدادی از آنتی بیوتیک های رایج درمانی در شرایط برون تنی بود.

روش بررسی

این مطالعه تجربی در سال ۱۳۹۳ در آزمایشگاه میکروبیولوژی صنعتی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد. بعد از تهیه گیاه بارهنگ کبیر، گیاه توسط آسیاب آزمایشگاهی پودر شد، جهت یکنواختی ذرات گیاه پودر شده، پودر گیاه از الک عبور داده شد تا یکنواختی حاصل گردد. میزان ۵۰ گرم از گیاه پودر شده بارهنگ با ۲۵۰ میلی لیتر اتانول (مرک آلمان) و آب مقطر مخلوط شد، ابتدا جهت نفوذ حلال ها از همزن شیشه ای استریل استفاده شد، سپس جهت هر چه استخراج بهتر عصاره از گیاه به مدت ۴۸ ساعت ظرف حاوی گیاه و حلال درون دستگاه شیکر قرار گرفت تا اختلاط به خوبی انجام شود، لازم به ذکر عصاره گیری به روش خیساندن بود. بعد از گذشت ۴۸ ساعت ابتدا درب ظرف حاوی عصاره باز گردید و جداسازی ابتدایی عصاره از ذرات گیاه به وسیله کاغذ صافی انجام شد. عصاره صاف شده جهت هر چه بهتر شدن عصاره گیری به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید، سپس عصاره ها به دست آمده تغلیظ شده و درون ظروف تیره و استریل نگهداری شدند. جهت بهداشتی نمودن و رفع آلودگی میکروبی نیز از فیلتر سر سرنگی با قطر منفذ ۰/۲ میکرون استفاده شد (۱۱). وزن خشک عصاره های آبی و اتانولی بارهنگ کبیر به روش وزن کردن قبل و بعد از خشک شدن گیاه انجام گرفت (۱۲)

سویه های میکروبی مورد استفاده در این مطالعه شامل دو سویه گرم مثبت لیستریا اینوکوا ATTC 33090 و استافیلوکوکوس اورئوس ATTC 25923 و دو سویه گرم منفی اشرشیا کلی ATTC 25922 و سودوموناس ائروژینوزا ATTC 27853 بود. قبل از انجام آزمایش ها از سویه ها کشت ۲۴ ساعت تهیه شد. از استاندارد نیم مک فارلند جهت استاندار کردن سویه های میکروبی استفاده شد. استاندارد نیم مک فارلند معادل با (CFU) /ml $۱/۵\times ۱۰^{۸}$)، باکتری است

برای تعیین حساسیت سویه های باکتری نسبت به عصاره های آبی و اتانولی گیاه بارهنگ کبیر از آزمون انتشار در آگار به کمک دیسک (کربی – بوئر) و روش پخش عصاره در سطح محیط کشت (روش پورپلیت) با دیسک های کاغذی به قطر ۶ میلی متر و آنتی بیوتیک های ونکومایسین و جنتامایسین استفاده گردید. جهت انجام روش انتشار در آگار به کمک دیسک ابتدا محیط کشت مولر هینتون آگار تهیه و استریل شد سپس در پتری دیش های ۸ سانتی متر حدود ۲۵ میلی لیتر محیط کشت ریخته، سوسپانسیون میکروبی که معادل نیم مک فارلند بود در سطح پتری به کمک میله ال شکل پخش شد، دیسک های به قطر ۶ سانتی متر حاوی غلظت های مختلف عصاره (۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میلی گرم بر میلی لیتر) در فواصل معین بر محیط کشت قرار گرفت و به وسیله میله شیشه ای استریل با کمی فشار در سطح پتری ثابت شد. فاصله دیسک ها به

نحوی تعیین شد که تداخلی در هاله های عدم رشد ایجاد نشود. از دیسک فاقد عصاره به عنوان کنترل استفاده گردید. در انتها پتری دیش ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شد. قطر هاله عدم رشد پس از طی ۲۴ ساعت به وسیله خط کش اندازه گیری و بر حسب میلی متر گزارش گردید. اصول کلی برای دیسک های آنتی بیوتیک نیز همانند دیسک های حاوی عصاره بود (۱۴). تمامی آزمایش ها در سه تکرار انجام شد.

برای تعیین حساسیت از روش پورپلیت استفاده شد در این روش پس از افزودن ۰/۲ گرم از عصاره های آبی و اتانولی به ۵ میلی لیتر آب مقطر استریل، مخلوط حاصل به کمک دستگاه ورتکس هم زده شد. یک لوپ از کشت استاندارد هر سوش بر محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت (۱۴).

حداقل غلظت مهار کنندگی به روش میکرودایلوشن براث و در میکروپلیت ۹۶ خانه ای انجام شد. در این روش ابتدا از سوش‌های مورد مطالعه کشت تازه تهیه شد و پس از استاندار کردن سوسپانسیون با نیم مک فارلند مقدار ۷۰ میکرولیتر از هر باکتری در هر یک از خانه ها حاوی محیط کشت مولر هینتون براث که حاوی غلظت های متوالی از عصاره های آبی و اتانولی بارهنگ کبیر بود تلقیح شد. غلظت های متوالی عصاره ها به ترتیب شامل ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر بود. سپس میکروپلیت های ۹۶ خانه ای حاوی باکتری در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. میکروپلیت ها از نظر کدورت بررسی شد و اولین خانه ای که در آن کدورت مشاهده نشد به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی در نظر گرفته شد. جهت اجتناب از خطای احتمالی ناشی از کدورت خانه ها از معرف تری فنیل تترازولیوم کلراید (Triphenyltetrazolium chloride) استفاده شد، اولین غلظتی که در آن رشد باکتری روی نداده و رنگ قرمز تشکیل نشد به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی در نظر گرفته شد. از خانه هایی که در آن کدورت یا تغییر رنگ مشاهده نشد جهت تعیین حداقل غلظت کشندگی استفاده شد به این صورت که از این خانه ها بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد و پس از ۲۴ ساعت گرمخانه کذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد پلیت هایی که در آن کلنی مشاهده نشد به عنوان حداقل غلظت کشندگی تعیین شد (۱۵).

واکنش متقابل عصاره های آبی و اتانولی بارهنگ کبیر با استفاده از رابطه زیر و براساس شاخص FIC یا غلظت بازدارنده افتراقی و با استفاده از روش Checkboard انجام شد. طبق پروتکل EUCAST 2000 تفسیر آن به ۴ حالت امکان پذیر است چناچه ($FIC < 0.5$) حالت هم افزایی، ($0.5 \leq FIC \leq 1$) حالت افزایشی، ($1 < FIC \leq 4$) حالت عدم تاثیر و در نهایت ($FIC > 4$) حالت کاهش اثر می باشد. در معادله زیر A و E به ترتیب عصاره آبی و اتانولی در نظر گرفته شدند (۱۶).

$$FIC\ A\ E = (MIC\ A\ combination / MIC\ A\ alone) + (MIC\ E\ combination / MIC\ E\ alone)$$

تمامی آزمایش ها در ۳ تکرار انجام شد. داده ها حاصل به روش تجزیه واریانس یک طرفه و با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۸ تجزیه و تحلیل شد. برای مقایسه میانگین ها از روش آزمون چند دامنه ای دانکن و در سطح ۵ درصد استفاده شد.

یافته ها

عصاره آبی بارهنگ کبیر در روش پورپلیت که در آن غلظت نهایی عصاره ۲ میلی گرم بر میلی لیتر بود نتوانست از رشد باکتری های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا اینوکوا*، *اشرشیاکلی* و *سودوموناس ائروژینوزا* جلوگیری کند و باکتری ها در سطح محیط کشت رشد کردند. عصاره اتانولی بارهنگ نیز نتوانست به طور کامل از رشد میکروارگانیسم های مورد مطالعه جلوگیری کند و تنها در مورد باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* تا حدی توانست موثر واقع شود و در مورد سایر باکتری ها کلنی و رشد میکروبی مشاهده شد(جدول ۱)

جدول ۱: اثر ضدمیکروبی عصاره‌های آبی و اتانولی بارهنگ کبیر بر باکترهای مورد مطالعه (روش پورپلیت)

میکروارگانیسم	عصاره آبی	عصاره اتانولی
استافیلوکوکوس اورئوس	R	I
لیستریا اینوکوا	R	R
اشرشیا کلی	R	R
سودوموناس ائروژینوزا	R	R

R: Resistant, I: Intermediate

با روش انتشار در آگار به کمک دیسک (کربی-بوئر) در غلظت های مورد بررسی بیشترین قطر هاله عدم رشد عصاره های آبی و اتانولی مربوط به استافیلوکوکوس اورئوس بود. بیشترین مقاومت نسبت به عصاره های آبی و اتانولی مربوط به باکتری سودوموناس ائروژینوزا بود که در غلظت های مورد بررسی به جز در غلظت ۶۰ و ۸۰ میلی گرم برای عصاره اتانولی و در غلظت ۸۰ برای عصاره آبی هاله بازدارندگی مشاهده نشد. عصاره آبی بارهنگ کبیر در غلظت ۲۰ و ۴۰ نتوانست از رشد باکتری اشرشیا کلی جلوگیری کند و هاله بازدارندگی مشاهده نشد. عصاره اتانولی در تمامی غلظت ها بر باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا اینوکوا موثر بود، همچنین عصاره اتانولی در غلظت ۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر بر باکتری اشرشیا کلی موثر نبود و هاله عدم رشد مشاهده نشد ولی در بقیه غلظت ها توانست از رشد جلوگیری نماید و هاله عدم رشد مشاهده شد. عصاره آبی کبیر بارهنگ در غلظت ۲۰ بر باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا اینوکوا موثر نبود و هاله بازدارندگی مشاهده نشد (جدول ۲).

جدول ۲: میانگین قطر هاله عدم رشد بر میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه برحسب میلی‌متر (کربی- بوئر)

	بارهنگ کبیر	غلظت (میلی‌گرم برمیلی‌لیتر)			
عصاره	**میکروارگانیسم**	۲۰	۴۰	۶۰	۸۰
آبی	استافیلوکوکوس اورئوس	-	۹/۴۰±۰/۵۰^{a}	۱۲/۰۰±۰/۵۴^{b}	۱۳/۰۰±۰/۵۰^{b}
آبی	لیستریا اینوکوا	-	۸/۱۰±۰/۲۸^{a}	۱۰/۱۰±۰/۵۲^{b}	۱۲/۷۰±۰/۵۷^{c}
آبی	اشرشیاکلی	-	-	۹/۹۰±۰/۲۸^{a}	۱۱/۰۰±۰/۵۷^{a}
آبی	سودوموناس ائروژینوزا	-	-	-	۹/۲۰±۰/۵۷^{a}
اتانولی	استافیلوکوکوس اورئوس	۸/۱۰±۰/۵۲^{a}	۱۱/۷۰±۰/۵۰^{b}	۱۳/۷۰±۰/۵۲^{c}	۱۶/۵۰±۰/۲۸^{d}
اتانولی	لیستریا اینوکوا	۶/۹۰±۰/۵۷^{a}	۹/۲۰±۰/۵۲^{b}	۱۱/۱۰±۰/۴۵^{c}	۱۴/۰۰±۰/۵۷^{d}
اتانولی	اشرشیاکلی	-	۹/۲۰±۰/۵۷^{a}	۱۱/۰۰±۰/۵۴^{b}	۱۳/۵۰±۰/۵۰^{c}
اتانولی	*سودوموناس ائروژینوزا*	-	-	۸/۵۰±۰/۵۲^{a}	۱۰/۵۰±۰/۲۸^{b}

- **علامت (-)، نشان‌دهنده عدم وجود فعالیت ضدباکتری عصاره‌های آبی و اتانولی بارهنگ کبیر می‌باشد.**
- **حروف غیرمشابه در یک ردیف، نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار میان اثرضدمیکروبی غلظت‌های مختلف می‌باشد.**
- **حروف مشابه در یک ردیف، نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار میان اثر ضدمیکروبی غلظت‌های مختلف می‌باشد.**

نتایج حاصل از حداقل غلظت بازدارندگی عصاره آبی بارهنگ کبیر برای باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا اینوکوا، اشرشیاکلی و سودوموناس ائروژینوزا به ترتیب ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر بود و حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره اتانولی کبیر برای باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا اینوکوا، اشرشیاکلی و سودوموناس ائروژینوزا به ترتیب ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر بود (جدول شماره ۳). نتایج حاصل از حداقل غلظت کشندگی عصاره آبی بارهنگ کبیر استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا اینوکوا، اشرشیاکلی و سودوموناس ائروژینوزا به ترتیب ۵۰، ۵۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود و حداقل غلظت کشندگی عصاره اتانولی استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا اینوکوا، اشرشیاکلی و سودوموناس ائروژینوزا به ترتیب ۲۵، ۲۵، ۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر به دست آمد. (جدول ۳).

جدول ۳: نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) عصاره‌های آبی و اتانولی بارهنگ کبیر به روش میکرودایلوشن براث و تری‌فنیل تترازولیوم کلراید و نتایج حداقل غلظت کشندگی (MBC) بر میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه

عصاره	میکروارگانیسم	میکرودایلوشن براث (MIC)	تری‌فنیل تترازولیوم کلراید (MIC)	MBC (mg/ml)
آبی	استافیلوکوکوس اورئوس	۲۵	≥ ۲۵	۵۰
آبی	لیستریا اینوکوا	۵۰	≥ ۵۰	۵۰
آبی	اشرشیاکلی	۱۰۰	≥ ۱۰۰	۲۰۰
آبی	سودوموناس ائروژینوزا	۲۰۰	≥ ۲۰۰	۴۰۰
اتانولی	استافیلوکوکوس اورئوس	۱۲/۵	≥ ۱۲/۵	۲۵
اتانولی	لیستریا اینوکوا	۲۵	≥ ۲۵	۲۵
اتانولی	اشرشیاکلی	۵۰	≥ ۵۰	۵۰
اتانولی	سودوموناس ائروژینوزا	۱۰۰	≥ ۱۰۰	۲۰۰

پایین ترین کمیت های مربوط به حداقل غلظت ممانعت کننده ی عصاره آبی بارهنگ در مؤثرترین حالت ترکیبی (مشترک) با عصاره اتانولی بارهنگ بر باکتری های اشرشیا کلی و سودوموناس ائروژینوزا بود. با توجه به میزان حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد (مشترک) محاسبه شده برای ترکیب عصاره های آبی و اتانولی بارهنگ کبیر بیشترین اثر هم افزایی علیه باکتری گرم منفی اشرشیا کلی و سودوموناس ائروژینوزا مشاهده شد (جدول ۴).

جدول ۴- برهم کنش عصاره های آبی و اتانولی بارهنگ کبیر بر میکروارگانیسم های مورد مطالعه

باکتری	MIC_A ترکیبی	MIC_E ترکیبی	FIC (AE/A)	FIC (EA/E)	FICI (A + E)	(A + Eبرهمکنش)
(+) گرم						
استافیلوکوکوس اورئوس	۱۲/۵	۱۲/۵	۰/۵۰	۱	۱/۵	Ind.
لیستریا اینوکوا	۲۵	۲۵	۰/۵۰	۱	۱/۵	Ind.
(-) گرم						
اشرشیا کلی	۵۰	۲۵	۰/۵۰	۰/۵۰	۱	Add.
سودوموناس ائروژینوزا	۱۰۰	۵۰	۰/۵۰	۰/۵۰	۱	Add.

Add: addition
Ind: indifference

بحث

در سالیان اخیر توجه به گیاهان دارویی و بومی تا حدودی مشکلات ناشی از آنتی بیوتیک ها را کاهش داده است. عصاره ها و اسانس-های گیاهی به عنوان یکی از عوامل مهم ضد میکروبی مهم و اساسی مورد توجه بسیاری از محققان و پژوهشگران در زمینه های دارویی، پزشکی و غذا قرار گرفته است. در این پژوهش عصاره های آبی و اتانولی گیاه بارهنگ کبیر بررسی شد.

طبق یافته های این مطالعه عصاره های بارهنگ به خوبی توانست از رشد باکتری های بیماری زای عامل عفونت و مسمومیت در شرایط محیط کشت جلوگیری کند. در مطالعه حاضر، نتایج به‌دست‌آمده از آزمون مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد (کربی-بوئر) غلظت‌های مختلف عصاره آبی و اتانولی بر میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه نشان داد تفاوت معنی‌داری بین عصاره های آبی و اتانولی بارهنگ کبیر وجود دارد ($p\leq$ ۰/۰۵)، ولی چنانچه میانگین‌ها به صورت دوتایی با یکدیگر مقایسه شوند، میان دو غلظت ۶۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره آبی بر استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلی، تفاوت معنی‌داری از نظر آماری وجود ندارد ($p\leq$۰/۰۵)، (جدول شماره ۲).

به طور کلی اثر ضد میکروبی عصاره اتانولی بارهنگ کبیر بیشتر از عصاره آبی بود. با توجه به اینکه طبق آزمون اندازه گیری وزن خشک عصاره ها و بالاتر بودن بازده عصاره اتانولی (۳ درصد بیشتر) نسبت به عصاره آبی می توان تا حدودی این مسئله را توجیه نمود که در طی استخراج عصاره بارهنگ کبیر با حلال های آبی و اتانولی، حلال اتانولی به طور موثرتری توانسته با ذرات گیاه بارهنگ کبیر برهمکنش دهد و ترکیبات بیشتری را استخراج نماید و ترکیبات استخراج شده باعث افزایش اثر ضد میکروبی عصاره اتانولی گیاه شده است.

کریما و همکاران (۲۰۱۵) مطالعه ای بر روی فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی عصاره های آبی و اتیل استات بارهنگ را در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار دادند. در این بررسی از روش انتشار در آگار (دیسک) جهت ارزیابی فعالیت ضد میکروبی عصاره ها استفاده شد. نتایج این بررسی نشان داد که عصاره اتیل استات دارای اثر ضد میکروبی بیشتری از عصاره آبی می باشد و قطر هاله عدم رشد بیشتری در مورد عصاره اتیل استات مشاهده گردید. این پژوهشگران نیز ترکیبات بیشتر حاصل از حلال اتیل استات را دلیلی برای بالاتر بودن اثر ضد میکروبی عصاره اتیل استات بارهنگ عنوان کردند (۱۷). نتایج این محققان با یافته های این پژوهش همخوانی داشت.

رازیک و همکاران (۲۰۱۲) عصاره متانولی بارهنگ کبیر را بر تعدادی از باکتری های گرم مثبت و گرم منفی مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان دادکه بیشترین هاله عدم رشد مربوط به باکتری گرم مثبت لاکتوباسیلوس با قطر ۲۵ میلی متر بود و کمترین هاله بازدارندگی مربوط به باکتری گرم منفی انتروکوک بود که قطر هاله عدم رشد ۱۲ میلی متر بود (۱۸).

طبق مطالعه ای که در سال ۲۰۱۵ توسط کریما و همکاران انجام پذیرفت مشخص گردید که بالاترین هاله عدم رشد مربوط به باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس و کمترین قطر هاله مربوط به باکتری گرم منفی پروتئوس بود (۱۷). چاینگ (۲۰۰۲)، تعدادی از گیاهان دارویی را مورد بررسی قرار داد، از جمله گیاهان مورد بررسی توسط این محقق گیاه بارهنگ بود، این پژوهشگر عصاره اتانولی گیاه بارهنگ را بر تعدادی از باکتری های گرم مثبت و گرم منفی مورد بررسی قرار داد. نتایج این پژوهش نشان داد که باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بیشترین حساسیت را دارا می باشد و قطر هاله عدم رشد این باکتری نسبت به سایر باکتری های مورد بررسی بیشتر بود (۱۹). نتایج این مطالعات با یافته های مطالعه اخیر مطابقت داشت.

طبق یافته های مطالعه حاضر کم ترین هاله بازدارندگی مربوط به باکتری سودوموناس ائروژینوزا و بیشترین قطر هاله عدم رشد مربوط به باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس بود. به طور کلی باکتری های گرم مثبت در برابر عصاره ها و اسانس ها گیاهی حساس تر از باکتری های گرم منفی می باشد. با توجه به اینکه باکتری های گرم منفی دارای یک لایه خارجی در اطراف دیواره سلولی خود می باشد و به عنوان یک سد عمل نموده و دسترسی ترکیبات آبگریز را محدود می نماید لذا دارای حساسیت کم تری می باشد (۱۴ و ۱۵).

نتایج حاصل از حداقل غلظت بازدارندگی عصاره آبی بارهنگ کبیر برای باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا اینوکوا، اشرشیا کلی و سودوموناس ائروژینوزا به ترتیب ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر بود و حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره اتانولی کبیر برای باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا اینوکوا، اشرشیا کلی و سودوموناس ائروژینوزا به ترتیب ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر بود.

میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره های آبی و اتانولی برای باکتری های گرم مثبت به ترتیب ۱۲/۸۵ و ۱۴/۲۵بود. میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری های گرم مثبت برای آنتی بیوتیک ونکومایسین حدود ۱۳ میلی متر به دست آمد. مقایسه بین فعالیت آنتی بیوتیک و عصاره های آبی و اتانولی بارهنگ کبیر نشان داد که اثر ضد میکروبی عصاره آبی و آنتی بیوتیک ونکومایسین تقریبا یکسان می باشد ولی در مقایسه با عصاره اتانولی اثر ضد میکروبی کم تری داراست. میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری های گرم منفی برای عصاره های آبی و اتانولی بارهنگ کبیر ۱۰/۱۰ و ۱۲ میلی متر و برای آنتی بیوتیک جنتامایسین ۱۴ میلی متر به دست آمد. مقایسه بین فعالیت آنتی بیوتیک جنتامایسین و عصاره های

آبی و اتانولی بارهنگ کبیر نشان داد که اثر ضد میکروبی عصاره های آبی و اتانولی نسبت به آنتی بیوتیک جنتامایسین کم تر است.
یافته های مربوط به بر هم کنش های مواد ضد میکروبی و اثرات نهایی این بر هم کنش ها بر میکروارگانیسم بیماری زا و عامل عفونت و مسمومیت، در جدول ۴، نشان داده شده است. بررسی برهم کنش های ضد میکروبی به شکل یکی از چهار حالت احتمالی هم افزایی (Synergistic)، افزایشی (Additive)، عدم تأثیر (Indifferent) و یا کاهش اثر (Antagonistic) می باشد.
پایین ترین کمیت های مربوط به حداقل غلظت ممانعت کننده ی عصاره آبی بارهنگ در مؤثرترین حالت ترکیبی (مشترک) با عصاره اتانولی بارهنگ بر باکتری های اشرشیا کلی و سودوموناس ائروژینوزا بود. با توجه به میزان حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد (مشترک) محاسبه شده برای ترکیب عصاره های آبی و اتانولی بارهنگ کبیر بیشترین اثر هم افزایی علیه باکتری گرم منفی اشرشیا کلی و سودوموناس ائروژینوزا مشاهده شد.
مطالعات پیرامون بررسی برهمکنش های ترکیبات مختلف در بازدارندگی از رشد میکروارگانیسم ها محدود می باشد. در مورد ترکیبات طبیعی بیشتر محققان به بررسی وجود اثرات سینرژیستی این ترکیبات با آنتی بیوتیک های متداول پرداخته اند، به عنوان مثال اثر سینرژیستی عصاره بارهنگ کبیر و آنتی بیوتیک جنتامایسین بر تعدادی از باکتری ها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که ترکیب عصاره بارهنگ با آنتی بیوتیک جنتامایسین باعث افزایش فعالیت ضد میکروبی شده است (۱۷).
مطالعات اندکی نیز به بررسی اثرات بر همکنش میان ترکیبات طبیعی مختلف پرداخته اند. با این وجود تحقیقی پیرامون اثر کاربرد هم زمان عصاره های بارهنگ کبیر بر میکروارگانیسم های مختلف یافت نشد تا با نتایج این پژوهش مورد مقایسه قرار گیرد، از این رو مکانیسم تاثیر این ترکیبات ضد میکروبی طبیعی باید مورد بررسی بیشتری قرار گیرد.

نتیجه گیری

عصاره های آبی و اتانولی گیاه بارهنگ کبیر در شرایط برون تنی دارای قابلیت ضد باکتریایی قابل ملاحظه ای روی سویه های مورد مطالعه بود. عصاره های بارهنگ دارای اثر ضد میکروبی کم تری بر باکتری های گرم منفی هستند. در حالت ترکیبی عصاره های آبی و اتانولی بارهنگ با توجه به میزان حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد (مشترک) بیشترین اثر هم افزایی مربوط به باکتری های گرم منفی بود لذا جهت کنترل و مهار رشد باکتری های گرم منفی کاربرد همزمان هر دو عصاره بارهنگ کبیر توصیه می شود.

تقدیر و تشکر

نویسندگان بر خود لازم می دانند که از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد جهت تامین اعتبار هزینه های مالی صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند. مقاله حاضر مستخرج از رساله دکتری نویسنده اول با کد ۳/۳۳۶۰۱ در دانشگاه فردوسی مشهد می باشد.

REFERENCES

1- Kiaei E, Mazandarani M, Ghaemi E. Antibacterial Activity of 7 Species of Medicinal Plants on Bacteria Isolated from UTI Patients in Golestan Province. Journal of medicinal Plants. 2010; 2 (34) :74-83. [Full Text in Persian].
2- Paton JC, Paton AW. "Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing Escherichia coli infections". Clinical Microbiology Reviews. 1998; 11 (3): 450–79.
3- Nwanze PI, Nwaru LM, Oranusi S, Dimkpa U, Okwu MU and Babatunde BB. Urinary tract infection in Okada village: Prevalence and antimicrobial susceptibility pattern. Sci. Res. And Essay. 2007; 2 (4): 112 - 6.
4- Balcht, Aldona; Smith, Raymond. Pseudomonas aeruginosa: Infections and Treatment. Informa Health Care. 1994. pp. 83–84.

5- Aguado v, Vitas AI, Garcia-Jalon I. Characterization of L. monocytogenes and L. Innocua from a vegtable processing plant by RAPD and REA. International Journal of Food Microbiology. 2004; 90(3): 341-7. 2

۸ Golshani Z, Davoodi V. In Vitro Antimicrobial Effect of Rosmarinus Officinalis Leaf Extract Against Some Pathogens. Arak University of Medical Sciences Journal. 2013; 16 (8) :78-84.

6- Nejati V, Khaneshi F. Effect of hydro-alcoholic extract of Plantago major leaf on serum level of insulin, glucose, and histology of pancreas and kidney in streptozotocin-induced diabetic rats. Qom Univ Med Sci J 2013;7(5):14-20. [Full Text in Persian].

7- Gálvez M, Martín-Cordero C, López-Lázaro M, Cortés F, Ayuso MJ. Cytotoxic effect of plantago spp. On cancer cell lines. J Ethno pharmacol. 2003;88(2-3):125-30.

8- Lien C, Lean T, Wen C, Mei-Yin C, Chun-Ching L. Immunomodulatory activities of flavonoids, monoterpenoids, triterpinoids, iridoid glycosides and phenolic compounds of Plantago species. *Planta Medica*. 2003 (7):600-604.

9- Samuelsen AB. The traditional uses, chemical constituents and biological activities of Plantago major L. A review. *Journal of Ethnopharmacology*. 2000;71(1):1-21.

10- Alizadeh Behbahani B, Tabatabaei Yazdi F, Mortazavi A, Zendeboodi F, Gholian MM, Vasiee A. Effect of aqueous and ethanolic extract of Eucalyptus camaldulensis L. on food infection and intoxication microorganisms “in vitro”. Journal of Paramedical Sciences 2013; 4(3): 89-99.

11- Vasiee A, Tabatabaei Yazdi F, Mortazavi S. Evaluation of the antibacterial activity of coriander (Coriandrum sativum) on a number of pathogenic microorganisms “in vitro”. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2014; 20(71): 59-66. [Full Text in Persian].

12- Dehghan Gh, Zarini Gh, Hajizadeh M. Phytochemical investigation and antimicrobial, antifungal and synergistic activities of chloroform fractions of the root of Ferula szovitsiana. J Shahrekord Univ Med Sci. 2014 Feb, March; 15(6): 10-17. [Full Text in Persian].

13- Kolahi Marand S. Comparison of antimicrobial compounds extracted from the leaves of artichoke (*Cynara scolymus*) by supercritical fluid and maceration and its effect on the population of microorganisms of food poisoning and infections. MSc Thesis. 2015. Ferdowsi University of Mashhad. [Full Text in Persian].

14- Yeganegi M, Comparison methods for the extraction of *Equisetum telmateia* Ehrh. extract using supercritical fluid extraction and Maceration, evaluation of its Antimicrobial activity against food infective and intoxication microorganisms. MSc Thesis. 2016. Ferdowsi University of Mashhad. [Full Text in Persian].

15- EUCAST. Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. Clinic Microbiol Infect. 2000; 6:503–8.

16- Karima S, Farida S, Mihoub ZM. Antioxidant and antimicrobial activites of Plantago major. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2015; 7 (5):58-64.

17- Razik B, Ali Hasan H, Murtadha M. The Study of Antibacterial Activity of Plantago Major and Ceratonia Siliqua. The Iraqi Postgraduate Medical Journal. 2012; 11(1): 130-135.

18- Chiang LC, Chiang W, Chang MY, Ng TL and Lin CC. Antiviral activity of P. major extracts and related compounds in vitro. Antiviral Res. 2002; 55: 53 - 62