مقایسه اثر ضد باکتریایی عصاره های گیاه بن سرخ (Allium Jesdianum) با آنتی بیوتیک های رایج درمانی بر تعدادی از میکروارگانیسم های عامل عفونت در شرایط آزمایشگاهی

سارا نیاستی[1]* و فاطمه پورحاجی[1]

۱- دانشجوی دکترای علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران

***نشانی برای مکاتبه:** s.niasti@gmail.com ، تلفن:۰۹۱۱۳۹۳۲۸۴۸

دریافت مقاله: شهریور نود و شش پذیرش برای چاپ: آبان نود و شش

چکیده

سابقه و هدف: گیاه بن سرخ با نام علمی *Allium Jesdianum* و متعلق به خانواده Liliaceae و از گیاهان دارویی بومی ایران است. در طب سنتی از گیاه بن سرخ برای درمان بیماری های رماتیسم، دردهای شکمی، سنگ کلیه، استفراغ و سرماخوردگی استفاده می گردد. هدف از این پژوهش تعیین فعالیت ضد میکروبی گیاه بن سرخ بر تعدادی از باکتری های بیماری زا بود.

روش کار: در این مطالعه تجربی عصاره های آبی و اتانولی گیاه بن سرخ با روش خیساندن تهیه شد. اثر ضد باکتریایی عصاره های گیاه بن سرخ با چهار روش، پورپلیت، انتشار آگار در چاهک، رقت سازی در چاهک (میکرودایلوشن براث) و حداقل غلظت کشندگی بر باکتری های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *استرپتوکوکوس پیوژنز*، *اشرشیا کلی* و *سودوموناس ائروژینوزا* در مقایسه با آنتی بیوتیک‌های رایج درمانی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: *سودوموناس ائروژینوزا* بیشترین مقاومت به عصاره های آبی و اتانولی گیاه بن سرخ نشان داد. بیشترین اثر بازدارندگی در غلظت ۸۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره های آبی و اتانولی گیاه بن سرخ بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بود. عصاره اتانولی گیاه بن سرخ در مقایسه با آنتی بیوتیک ها دارای اثر بیشتری بر برخی از باکتری ها نشان داد. حداقل غلظت بازدارندگی عصاره اتانولی برای باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *استرپتوکوکوس پیوژنز*، *اشرشیا کلی* و *سودوموناس ائروژینوزا* به ترتیب ۱۶، ۳۲، ۳۲ و ۶۴ میلی-گرمبر میلی‌لیتر بود، در حالی که برای عصاره آبی به ترتیب ۳۲، ۳۲، ۶۴ و ۶۴ میلی گرم بر میلی لیتر بود.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش و افزایش مقاومت روز افزون میکروارگانیسم های بیماری زا نسبت به آنتی‌بیوتیک-های رایج درمانی پیشنهاد می گردد با تحقیقات بیشتر روی گیاه بن سرخ بتوان از ترکیبات ضد میکروبی این گیاه در درمان بیماری های عفونی بهره جست.

واژگان کلیدی: بن سرخ، آنتی بیوتیک، عصاره، اثر ضد میکروبی

مقدمه

با مشخص شدن عوارض و اثرات استفاده از داروهای شیمیایی و سنتیتیک، استفاده از گیاهان دارویی با عوارض جانبی کم تر مورد توجه بشر قرار گرفته است. همچنین استفاده از عصاره تام گیاه نسبت به یک ترکیب خالص جدا شده در گیاهان دارویی مورد توجه شایانی قرار گرفته است(۱). به کارگیری گیاهان دارویی و طبیعی یکی از روش های دسترسی به داروهای جدید جهت مقابله با میکروارگانیسم های مقاوم به آنتی بیوتیک های درمانی است. مواد موثر و ترکیبات زیستی گیاهان دارویی با توجه به همراه بودن با سایر مواد پیوسته از حالت تعادل بیولوژیکی برخودار بوده، بنابراین با توجه به باقی نماندن آن در بدن از اهمیت بسیار زیادی برخوردار است(۲ و ۳). ارزیابی فعالیت درمانی گیاهان دارویی برای تمامی بیماری ها امری غیرمعقول، زمان بر و دارای هزینه بالای اقتصادی می باشد. از جمله راهکارهای مورد پذیرش در سرتاسر دنیا، استفاده از دانش و علم آموزه های بومی و سنتی است(۴). طب سنتی در ایران سابقه ای بس طولانی مدت و درخشان دارد و کتاب¬ها، اسناد تاریخی و همچنین دانشمندان بزرگی همچون ابوعلی سینا، جرجانی و ... موید این مطلب می باشد(۵).

تعداد کثیری از آنتی بیوتیک های با ساختار های شیمیایی مختلف برای کنترل و درمان بیماری های عفونی و عفونت¬های بیمارستانی در دنیا مورد استفاده قرار می گیرد. استفاده طولانی مدت و بدون تجویز پزشک از آنتی بیوتیک ها باعث ظهور مقاومت های چند دارویی و سویه های بیماری زا مقاوم به آنتی بیوتیک ها شده و از سوی دیگر باعث بروز مشکلات بالینی زیادی در افراد بیمار شده است(۶ و ۷). گیاهان دارویی به دلیل وجود ترکیبات زیست فعال بسیار، به عنوان یک منبع بالقوه جهت درمان مورد توجه قرار گرفته است. داروها و گیاهان طبیعی به کار گرفته شده جهت درمان بیماری ها به علت منشا طبیعی نسبت به داروهای شیمیایی سازگاری بهتر و مناسب تری در بدن موجودات زنده (بدن انسان) دارا می باشد. نقش اصلی در ایجاد گروه ها و فراورده های طبیعی در گیاهان همانند آلکالوئیدها، ترکیبات فنلی و ... مربوط به

متابولیسم ثانویه گیاهان می باشد. این ترکیبات علاوه بر نقش در گیاه، در درمان بیماری ها و کنترل فعالیت ضد میکروبی نیز وظیفه مهمی ایفا می نمایند(۶، ۸ و ۹).

گیاه بن سرخ با نام علمی Allium Jesdianum می باشد. این گیاه از جمله گیاهان بومی ایران می باشد که در طب سنتی برای درمان بیماری های رماتیسم، دردهای شکمی، سنگ کلیه، استفراغ و سرماخوردگی استفاده می گردد. از نظر گیاه شناسی، این گیاه یک گیاه گلدار می باشد که به طور وحشی در ارتفاعات ۱۸۰۰ تا ۲۶۰۰ متری کوه های زاگرس می روید. گیاه بن سرخ یک گیاه پایا پیازدار می باشد که ارتفاعی حدود نیم متر دارد. در مناطق مختلف گیاه بن سرخ با نام های همچون پیاز یزدی، لپو و سوره بنه نامیده می شود. این گیاه شبیه تره می باشد و در بعضی از مناطق به صورت تازه و خشک در غذا و سوپ استفاده می شود(۱۲-۱۰).

باکتری های بیماری زا با استفاده از سازوکارهای مختلفی نسبت به دارو ها و آنتی بیوتیک ها مقاوم می شوند، مکانیسم های مختلفی همانند تغییر نفوذ پذیری، تغییر گیرنده دارویی، تولید آنزیم تخریب کننده و دست یابی به مسیرهای فرعی نقش بسزایی را در این زمینه ایفا می کنند(۱۳). باکتری ها عمومی ترین عامل در ارتباط با مسمومیت و عفونت ها می باشد. اکثر عفونت ها توسط سویه های استافیلوکوکوس اورئوس، استرپتوکوس پیوژنز، سودوموناس ائروژینوزا و اشرشیا کلی ایجاد می گردد(۱۴). استافیلوکوکوس اورئوس باکتری گرم مثبت و بی هوازی اختیاری بوده که بر غشاهای مخاطی و پوست پستانداران، مواد غذایی و محیط اطراف یافت می گردد. استافیلوکوکوس اورئوس، عامل عفونت های گسترده ای از عفونت‌های ساده پوستی همانند گل مژه و آبسه گرفته تا عفونت¬های کشنده ای همچون پنومونی و مننژیت می باشد(۱۵ و ۱۶). استرپتوکوکوس پیوژنز باکتری گرم مثبت می باشد و نتایج نشان می دهد که میزان مرگ و میر عفونت‌های ایجاد شده توسط استرپتوکوکوس پیوژنز حدود ۲۵ درصد است. سودوموناس ائروژینوزا باکتری گرم منفی و فرصت طلبی می باشد که در خاک، آب و محیط پیرامون یافت می شود. این باکتری با توجه به سیستم های ویژه درونی از جمله سیستم انتقال مقاومت به آنتی بیوتیک به سرعت در برابر آنتی بیوتیک ها مقاوم می گردد و باعث انتشار عفونت در بدن می شود. اشرشیا کلی باکتری گرم منفی می باشد که یکی از عوامل اصلی بیماری های عفونی محسوب می¬گردد(۱۶ و ۱۷).

هدف از این پژوهش بررسی اثر ضد میکروبی گیاه بن سرخ بر تعدادی از سویه های عامل عفونت و مقایسه آن با تعدادی از آنتی بیوتیک های رایج درمانی در شرایط آزمایشگاهی به روش های مختلف کیفی و کمی ضد میکروبی بود.

روش کار

در این پژوهش از ۴ سویه میکروبی که شامل دو سویه گرم مثبت; استافیلوکوکوس اورئوس و استرپتوکوکوس پیوژنز و همچنین از دو سویه گرم منفی; اشرشیا کلی و سودوموناس ائروژینوزا جهت ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی عصاره های بن سرخ استفاده شد. از محیط کشت مولر هینتون آگار و مولر هینتون براث (مرک آلمان) جهت رشد باکتری های مورد آزمون استفاده گردید. از محیط کشت میکروبی نوترینت آگار (مرک آلمان) جهت استریل بودن عصاره های بن سرخ بعد از عمل فیلتراسیون استفاده گردید. دیسک¬های آنتی بیوتیک مورد استفاده نیز شامل استرپتومایسین، جنتامیسین و وانکومایسین بود.

گیاه بن سرخ در اوایل اردیبهشت ماه از کوه های اطراف شهرستان یاسوج (کهگلویه و بویر احمد) جمع آوری و توسط گیاه شناسان جنس و گونه گیاه مورد تایید قرار گرفت. بعد از انتقال گیاه به آزمایشگاه میکروبیولوژی، گیاه با آب سرد به صورت سطحی شسته و در دمای اتاق و سایه خشک گردید. جهت انجام بهتر عمل عصاره گیری، ابتدا گیاه به صورت پودر با اندازه ذرات یکسان تبدیل شد. آماده سازی عصاره بن سرخ و عمل عصاره گیری از گیاه مطابق با مصرف سنتی و به روش خیساندن انجام پذیرفت. در این پژوهش از حلال های آب و اتانول جهت عصاره گیری استفاده شد. ابتدا میزان ۱۰۰ گرم از پودر گیاه بن سرخ به دقت توسط ترازوی دیجیتال وزن گردید و در ارلن به حجم یک لیتر ریخته شد. به طور جداگانه به ارلن ها میزان ۵۰۰ سی سی از حلال های آب و اتانول اضافه شد. بعد از اختلاط اولیه گیاه بن سرخ و حلال های آب و اتانول، دهانه ارلن ها با فویل آلومینیوم بسته و به مدت ۷۲ ساعت روی انکوباتور شیکر دار در دمای اتاق همزده شد. بعد از طی ۷۲ ساعت، مخلوط حلال و گیاه ابتدا صاف گردید و ذرات معلق گیاه جدا شد. عصاره های اولیه به مدت ۱۰ دقیقه در دور 3000 rpm سانتریفوژ شدند. جهت حذف حلال ها از روتاری استفاده شد. عصاره های به دست آمده در ظروف استریل دربداری که با فویل آلومینیوم پوشیده شده بود تا زمان انجام آزمون های ضد میکروبی در یخچال و در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند(۱۸).

یکی از عوامل موثر در افزایش وزن خشک عصاره (بازده عصاره) نوع حلال به کار برده شده جهت عمل عصاره گیری می باشد. برای تعیین وزن خشک (بازده گیاه) عصاره های آبی و اتانولی بن سرخ، ابتدا وزن یک لوله آزمایش به وسیله ترازوی دیجیتال تعیین گردید. بعد از اندازه گیری وزن لوله آزمایشگاه از هر یک از عصاره های آبی و اتانولی بن سرخ به طور جداگانه یک میلی لیتر به لوله آزمایش انتقال داده و سپس در دمای اتاق نگهداری شد، تا عصاره ها کاملا خشک گردند. بعد از خشک شدن عصاره های آبی و اتانولی بن سرخ، مجددا وزن لوله آزمایش تعیین گردید. میانگین سه بار تکرار این آزمون، به عنوان وزن خشک عصاره ها گزارش شد(۱۴).

سوسپانسیون میکروبی به صورت تازه از هر سویه باکتریایی تهیه شد. جهت فعال سازی و ارزیابی فعالیت ضد میکروبی ۲۴ ساعت قبل از انجام آزمایش، به کمک آنس استریل از کشت ذخیره به محیط کشت شیبدار مولر هینتون آگار (مرک آلمان) تلقیح انجام پذیرفت. سوسپانسیون غلیظ میکروبی با استفاده از محلول رینگر پس از رشد باکتری بر سطح شیبدار آگار آن تهیه گردید. سپس کدورت سوسپانسیون حاصل توسط اسپکتروفتومتر تا برابر شدن کدورت محلول با کدورت ۵ /۰ محلول استاندارد مک فارلند رقیق گردید. در این حالت تعداد سویه های میکروبی برابر با CFU/ml 5/1 ×108 بود(۱۹).

با روش پورپلیت یا آمیخته ۱ میلی لیتر از عصاره های آبی و اتانولی که قبلا به وسیله فیلتر ۰/۴۵ میکرونی استریل شده بودند در هر ظرف کشت (پلیت) ریخته شد. بعد از استریل کردن محیط کشت مولر هینتون آگار و قبل از اینکه محیط کشت به صورت جامد در بیاید به درون پلیت ها، محیط کشت به میزان ۱۹ میلی لیتر اضافه گردید. سپس یک لوپ از هر سویه باکتریایی بر روی ظرف ها کشت داده شد. بعد از ۲۴ ساعت از زمان گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد پلیت های به وسیله چشم مورد بررسی قرار گرفته و نتایج حاصل به صورت حساس، نیمه حساس و مقاوم گزارش گردید(۱۸).

در روش چاهک در آگار برای بررسی اثر عصاره های آبی و اتانولی بن سرخ غلظت‌های ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ از هر عصاره تهیه شد. در این روش با استفاده از سمپلر، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون ۰/۵ مک فارلند از هر باکتری مورد آزمون در سه نقطه از سطح محیط کشت مولر هینتون ریخته و توسط اسپریدر L شکل بر سطح محیط کشت پخش گردید. سپس، تعداد ۵ چاهک با قطر ۶ میلی‌متر به وسیله انتهای پیپت پاستور استریل شده در سطح محیط کشت ایجاد شد. ته چاهک‌ها برای جلوگیری از نفوذ عصاره¬های آبی و اتانولی بن سرخ به کف پلیت توسط آگار مذاب بسته شد. داخل ۴ عدد از چاهک‌ها با سمپلر ۲۰ میکرولیتر از غلظت‌های تهیه شده از عصاره های بن سرخ ریخته شد. چاهک پنجم نیز به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. پس از گرم خانه گذاری به مدت ۲۴ ساعت هاله بازدارندگی یا عدم رشد در محیط اطراف چاهک‌ها با در نظر گرفتن قطر چاهک توسط خط کش اندازه گیری و به‌صورت میلی‌متر گزارش شد. عملیات مذکور در مورد هر عصاره سه بار تکرار و سپس میانگین آن‌ها ثبت گردید. لازم به ذکر است که جهت مقایسه اثرات ضد میکروبی عصاره های آبی و اتانولی بن سرخ با آنتی‌بیوتیک‌های تجاری، فعالیت ضد میکروبی دیسک¬های آنتی‌بیوتیک استاندارد استرپتومایسین، جنتامیسین و وانکومایسین نیز در پلیت های جداگانه بررسی شدند(۲۰).

با استفاده از روش رقت‌سازی در چاهک حداقل غلظت مهار کنندگی عصاره های آبی و اتانولی گیاه بن سرخ تعیین گردید. ابتدا از هریک از عصاره ها یک محلول مادر با غلظت ۵۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. برای این منظور ۵/۱۲ گرم از هریک از عصاره ها با ۹/۵ میلی‌لیتر محیط کشت‌های مولر هینتون براث و ۰/۵ میلی‌لیتر دی متیل سولفوکساید مخلوط و با استفاده از فیلتر میکروبی با قطر منافذ ۰/۴۵ میکرون استریل گردید. ۵ میلی لیتر از این محلول صاف شده برداشته و با ۵ میلی لیتر محیط کشت، درون یک شیشه استریل مخلوط گردید و به این ترتیب ادامه داده تا غلظت‌ها نصف گردند و غلظت های متوالی۱، ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۸ و ۲۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. تمام نمونه ها قبل از رقت‌سازی با ورتکس همگن شدند. برای بررسی حداقل غلظت مهارکنندگی با استفاده از روش رقت‌سازی در چاهک (میکروبراث دایلوشن) از پلیت ۹۶ خانه ای استریل استفاده گردید. پس از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت ۲۰ میکرولیتر معرف تری فنیل تترازولیوم کلراید ۵ درصد، به عنوان شاخص رنگی رشد میکروبی، به هر خانه افزوده و به مدت نیم ساعت انکوبه گردید. در خانه‌هایی که رشد میکروبی اتفاق افتاده باشد، پس از گذشت مدت زمان مذکور رنگ قرمز تیره یا ارغوانی ایجاد می‌شود. اولین غلظتی که در آن رشد میکروبی روی نداده و رنگ قرمز تشکیل نشد به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی رشد گزارش گردید(۲۱). تمامی آزمایش‌ها در سه تکرار انجام پذیرفت.

با توجه به نتایج حاصل از حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (رقت‌سازی در چاهک)، از چاهک‌های که فاقد رنگ قرمز بودند، ۱۰۰ میکرولیتر بر پلیت های حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار به روش پورپلیت کشت داده شد و سپس محیط‌های کشت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و به مدت ۲۴ ساعت گرم خانه گذاری شدند. غلظت‌هایی که فاقد رشد میکروارگانیسم بودند، به عنوان حداقل غلظت کشندگی عصاره های آبی و اتانولی برای باکتری های شاخص عفونت زا در نظر گرفته شدند(۲۱).

داده ها، حاصل از تاثیر ۴ سطح متفاوت غلظت عصاره های آبی و اتانولی گیاه بن سرخ بر ۴ سویه باکتریایی عامل عفونت بود. هر یک از آزمون های ضد میکروبی در ۳ تکرار انجام گرفت و میانگین آن ها به روش تحلیل واریانس یک طرفه با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۸ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. هم چنین برای مقایسه میانگین ها از روش آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح معنی داری ۵٪ انجام شد.

یافته ها

نتایج مربوط به اثر ضد میکروبی عصاره های آبی و اتانولی گیاه بن سرخ به روش پور پلیت یا آمیخته در جدول ۱، آورده شده است.

جدول ۱- فعالیت ضد باکتریایی عصاره های آبی و اتانولی گیاه بن سرخ به روش پور پلیت (آمیخته) بر باکتری های مورد مطالعه

میکرو ارگانیسم	عصاره آبی	عصاره اتانولی
استافیلوکوکوس اورئوس	**نیمه حساس**	**حساس**
استرپتوکوکوس پیوژنز	**نیمه حساس**	**نیمه حساس**
اشرشیا کلی	**مقاوم**	**مقاوم**
سودوموناس ائروژینوزا	**مقاوم**	**مقاوم**

در تمامی غلظت های عصاره اتانولی گیاه بن سرخ بر باکتری های مورد مطالعه دارای یک اثر ضد باکتریایی می باشد، به طوری که با افزایش غلظت عصاره اتانولی قطر هاله عدم رشد باکتری (هاله عدم رشد در اطراف چاهک) افزایش می یابد. بیشترین قطر هاله عدم رشد در غلظت ۸۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره بر باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* بود. کم ترین قطر هاله در این غلظت مربوط به باکتری گرم منفی *سودوموناس ائروژینوزا* مشاهده گردید. افزایش قطر هاله عدم رشد در راستای افزایش غلظت عصاره اتانولی گیاه بن سرخ می باشد و با افزایش غلظت عصاره اتانولی قطر هاله نیز افزایش می یابد. در تمامی غلظت های عصاره آبی بر باکتری های گرم مثبت و گرم منفی دارای اثر بازدارندگی می باشد و قطر هاله عدم رشد اطراف چاهک در سطح محیط کشت تشکیل داده شد(جدول ۲). نتایج مربوط به اثر آنتی بیوتیک های رایج درمانی بر ۴ سویه بیماری زا در جدول ۳، آورده شده است

جدول۲- قطر هاله عدم رشد عصاره های آبی و اتانولی گیاه بن سرخ به روش انتشار چاهک در آگار بر سویه های مورد مطالعه بر حسب میلی‌متر

باکتری	نوع عصاره	غلظت ۲۰mg/ml	۴۰ mg/ml	۶۰ mg/ml	۸۰ mg/ml
استافیلوکوکوس اورئوس	آبی	۸/۲۰±۰/۵۰^{a}	۱۰/۴۰±۰/۵۰^{b}	۱۳/۰۰±۰/۵۰^{c}	۱۵/۷۰±۰/۵۰^{d}
استرپتوکوکوس پیوژنز	آبی	۸/۰۰±۰/۵۲^{a}	۹/۵۰±۰/۵۰^{b}	۱۲/۱۰±۰/۳۴^{c}	۱۴/۰۰±۰/۵۲^{d}
اشرشیا کلی	آبی	۷/۵۰±۰/۵۰^{a}	۸/۴۰±۰/۵۰^{a}	۹/۹۰±۰/۵۰^{b}	۱۰/۸۰±۰/۵۰^{b}
سودوموناس ائروژینوزا	آبی	۷/۰۰±۰/۵۴^{a}	۸/۱۰±۰/۳۴^{a}	۹/۶۰±۰/۵۲^{b}	۱۰/۳۰±۰/۵۰^{b}
استافیلوکوکوس اورئوس	اتانولی	۹/۷۰±۰/۵۴^{a}	۱۱/۲۰±۰/۳۵^{b}	۱۴/۴۰±۰/۵۴^{c}	۱۷/۸۰±۰/۵۰^{d}
استرپتوکوکوس پیوژنز	اتانولی	۹/۰۰±۰/۵۰^{a}	۱۰/۲۰±۰/۳۵^{a}	۱۳/۰۰±۰/۵۲^{b}	۱۴/۸۰±۰/۵۰^{c}
اشرشیا کلی	اتانولی	۷/۶۰±۰/۵۲^{a}	۹/۳۰±۰/۵۲^{b}	۱۰/۵۰±۰/۵۰^{b}	۱۱/۷۰±۰/۵۰^{b}
سودوموناس ائروژینوزا	اتانولی	۷/۴۰±۰/۵۰^{a}	۸/۴۰±۰/۵۰^{a}	۱۰/۱۰±۰/۵۰^{b}	۱۱/۶۰±۰/۵۰^{c}

- **حروف غیر مشابه در یک ردیف نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار میان اثر ضد میکروبی غلظت‌های مختلف می‌باشد.**
- **حروف مشابه در یک ردیف نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار میان اثر ضد میکروبی غلظت‌های مختلف می‌باشد.**
- **نتایج حاصل از میانگین سه تکرار (آزمون آماری چند دامنه ای دانکن) در سطح معنی داری ۵ درصد است و داده ها به صورت میانگین ± انحراف معیار آورده شده است.**

جدول۳- میانگین قطر هاله عدم رشد آنتی بیوتیک های رایج درمانی بر باکتری های مورد مطالعه بر حسب میلی متر

باکتری	ونکومایسین	جنتامیسین	استرپتومایسین
استافیلوکوکوس اورئوس	۹/۶۰±۰/۵۰	۱۸/۵۰±۰/۵۲	۱۰/۰۰±۰/۵۰
استرپتوکوکوس پیوژنز	۸/۱۰±۰/۵۰	۱۴/۳۰±۰/۵۲	۱۱/۲۰±۰/۵۰
اشرشیا کلی	۱۰/۵۰±۰/۵۰	۱۰/۹۰±۰/۵۰	۱۴/۴۰±۰/۵۰
سودوموناس ائروژینوزا	۱۱/۲۰±۰/۵۰	۱۶/۴۰±۰/۵۴	۱۳/۵۰±۰/۵۰

حداقل غلظت بازدارندگی عصاره اتانولی برای باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *استرپتوکوکوس پیوژنز*، *اشرشیا کلی* و *سودوموناس ائروژینوزا* به ترتیب ۱۶، ۳۲، ۳۲ و ۶۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود، اما حداقل غلظت بازدارندگی برای عصاره آبی گیاه بن سرخ به ترتیب ۳۲، ۳۲، ۶۴ و ۶۴ میلی گرم بر میلی لیتر بود حداقل غلظت کشندگی عصاره اتانولی برای باکتری-های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *استرپتوکوکوس پیوژنز*، *اشرشیا کلی* و *سودوموناس ائروژینوزا* به ترتیب ۱۶، ۳۲، ۶۴ و ۱۲۸ میلی گرم بر میلی‌لیتر بود. حداقل غلظت کشندگی عصاره آبی گیاه بن سرخ نیز برای باکتری های مورد مطالعه به ترتیب ۳۲، ۶۴، ۱۲۸ و ۱۲۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود(جدول ۴).

جدول۴- نتایج حداقل غلظت بازدارندگی به روش رقت سازی در چاهک (میکرودایلوشن براث) و حداقل غلظت کشندگی عصاره های آبی و اتانولی گیاه بن سرخ

باکتری	نوع عصاره	MIC	MBC
استافیلوکوکوس اورئوس	آبی	۳۲	۳۲
استرپتوکوکوس پیوژنز	آبی	۳۲	۶۴
اشرشیا کلی	آبی	۶۴	۱۲۸
سودوموناس ائروژینوزا	آبی	۶۴	۱۲۸
استافیلوکوکوس اورئوس	اتانولی	۱۶	۱۶
استرپتوکوکوس پیوژنز	اتانولی	۳۲	۳۲
اشرشیا کلی	اتانولی	۳۲	۶۴
سودوموناس ائروژینوزا	اتانولی	۶۴	۱۲۸

بحث

استفاده از گیاهان دارویی در درمان بیماری ها، به خصوص بیماری های عفونی در سالیان اخیر روند رو به افزایشی داشته است. تمایل مصرف کنندگان به استفاده از گیاهان دارویی جهت درمان عفونت ها، ناشی از عوارض کم تر آن ها در مقایسه با داروهای شیمیایی می باشد. سرزمین ایران کشوری ممتاز و غنی از گیاهان و تنوع زیستی و همچنین دارای ۱۱ اقلیم از ۱۳ اقلیم شناخته شده جهانی می باشد. بر اساس نظر گیاه شناسان و محققان در این زمینه تعداد گونه های گیاهی در ایران حدود ۸۰۰۰ گونه می باشد که از این نظر حداقل دو برابر گونه های گیاهی در قاره اروپا می باشد. تحقیقات و مطالعات نشان می دهد که بیش از ۲۳۰۰ گونه از گیاهان ایران دارای اثر دارویی، عطری و ادویه ای می باشد. علاوه بر این ۱۷۲۸ گونه از گیاهان به عنوان گیاهان بومی ایران می باشند و منحصرا در سرزمین ایران رشد می کنند و به عنوان یک ظرفیت انحصاری در کشور محسوب می شود (۱۶). با توجه به پتانسیل بالا و اهمیت موضوع، در مطالعه حاضر اثر ضد میکروبی عصاره های آبی و اتانولی گیاه بن سرخ بر تعدادی از باکتری های عفونت زا مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج آزمون پورپلیت نشان داد که عصاره اتانولی گیاه بن سرخ بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* موثر بوده و از رشد این باکتری در سطح محیط کشت جلوگیری به عمل آورد. عصاره اتانولی گیاه بن سرخ تا حدود زیاد توانست از رشد باکتری *استرپتوکوکوس پیوژنز* در سطح محیط کشت جلوگیری کند (نسبت به نمونه کنترل)، اما همچنان تعدادی کلنی بر سطح محیط کشت مولر هینتون آگار دیده شد، بنابراین می توان بیان کرد که باکتری *استرپتوکوکوس پیوژنز* نسبت به عصاره اتانولی نیمه حساس می باشد. نتایج مربوط به روش پورپلیت عصاره آبی گیاه بن سرخ بر باکتری های گرم منفی نشان داد که در این روش عصاره آبی اثری بر مهار رشد میکروارگانیسم ها نداشت و باکتری *اشرشیا کلی* و *سودوموناس ائروژینوزا* توانست بر سطح محیط کشت رشد کند. نتایج مربوط به عصاره آبی بر باکتری های گرم مثبت نشان داد که عصاره آبی گیاه بن سرخ تا حدودی توانست از رشد آن ها جلوگیری نماید و نیمه حساس بود. دلیل اثر ضد میکروبی بیشتر عصاره اتانولی گیاه بن سرخ نسبت به عصاره آبی گیاه را می توان به نتایج وزن خشک عصاره های گیاه بن سرخ نسبت داد. از آنجایی که بازده عصاره اتانولی ۱۴ درصد و بازده عصاره آبی ۱۰ درصد بود، یک اختلاف ۴ درصدی در بازده عصاره اتانولی در مقایسه با عصاره آبی وجود دارد. به طور کلی میزان وزن خشک عصاره استحصالی از گیاه یکی از مهم ترین فاکتورهای تعیین کننده اثر ضد میکروبی می باشد. مطالعات مختلف نشان می دهد که هر اندازه که میزان استحصال عصاره بیشتر بوده، نشان داده برهمکنش بهتر حلال و گیاه جهت استخراج ترکیبات می باشد. حلال اتانول به نحو موثرتری در این پژوهش توانست با گیاه بن سرخ برهمکنش ایجاد نماید و ترکیبات موثر بیشتری را از ماتریکس گیاهی استخراج نمایید. بنابراین می‌توان این گونه بیان نمود که ترکیبات فنولی

بیشتری توسط حلال اتانول نسبت به حلال آب از گیاه بن سرخ استخراج شده است، در نتیجه اثر ضد میکروبی حلال اتانول نسبت به حلال آب بیشتر بوده است. محققان مختلفی نیز به نتایج مشابه ای دست یافتند (۲۲ و ۲۳).

اثر ضد میکروبی و قطر هاله عدم رشد تشکیل شده در اطراف چاهک برای عصاره آبی در سطح محیط کشت بر باکتری های مورد پژوهش نسبت به عصاره اتانولی گیاه بن سرخ کم تر بود. به طور کلی میزان مقاومت باکتری ها نسبت به عصاره های آبی و اتانولی گیاه بن سرخ از حساس ترین سویه به مقاوم ترین سویه باکتری شامل، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *استرپتوکوکوس پیوژنز*، *اشرشیا کلی* و *سودوموناس ائروژینوزا* بود. کمترین قطر هاله عدم رشد در غلظت ۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر مربوط به باکتری گرم منفی *سودوموناس ائروژینوزا* با قطر ۷ میلی متر بود. نتایج نشان داد که عصاره اتانولی گیاه بن سرخ دارای اثر ضد باکتریایی بیشتری نسبت به عصاره آبی گیاه بن سرخ بود. بیشترین قطر هاله عدم رشد در غلظت ۸۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره اتانولی مربوط به باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس و با قطر ۱۷/۸۰ میلی متر بود. پژوهشگران مختلفی نیز حساسیت بیشتر باکتری های گرم مثبت را نسبت به عصاره های گیاهان دارویی در مقایسه با باکتری های گرم منفی تایید کرده اند و به نتایج مشابه ای دست یافتند (۲۴ و ۲۵). نتایج انتشار چاهک در آگار (جدول ۲)، نشان داد که به طور کلی با افزایش غلظت عصاره گیاه بن سرخ قطر هاله عدم رشد افزایش یافت. مقایسه بین غلظت های مختلف عصاره آبی گیاه بن سرخ نشان داد که مقایسه دوتایی بین غلظت های ۲۰ و ۴۰ میلی گرم بر میلی لیتر و همچنین غلظت های ۶۰ و ۸۰ میلی گرم بر میلی لیتر برای باکتری های *اشرشیا کلی* و *سودوموناس ائروژینوا* هیچ اختلاف معناداری مشاهده نشد، در حالی که برای سایر باکتری ها و در تمامی غلظت ها اختلاف معنی داری مشاهده گردید. مقایسه دوتایی عصاره اتانولی گیاه بن سرخ بر باکتری های مورد مطالعه نشان داد که باکتری گرم مثبت *استرپتوکوکوس پیوژنز* در غلظت ۲۰ و ۴۰ میلی گرم بر میلی لیتر دارای اختلاف معنی داری نمی باشد. مقایسه دو به دو غلظت های مختلف عصاره اتانولی برای باکتری های گرم منفی نشان داد که در غلظت های ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میلی گرم بر میلی لیتر برای باکتری *اشرشیا کلی* و غلظت های ۲۰ و ۴۰ میلی گرم بر میلی لیتر برای باکتری *سودوموناس ائروژینوزا* اختلاف معنی داری مشاهده نشد. در مورد سایر غلظت ها اختلاف معنی داری مشاهده شد (جدول ۲).

تاکنون پژوهش های کمی در زمینه اثر ضد میکروبی گیاه بن سرخ بر میکروارگانیسم های بیماری زا انجام شده است. غلامی و همکاران (۱۳۹۵)، فعالیت ضد میکروبی عصاره متانولی و آبی گیاه بن سرخ را بر تعدادی از باکتری های بیماری زا با مقاومت دارویی گسترده در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه اثر ضد میکروبی گیاه بن سرخ با دو روش میکرودایلوشن براث و انتشار در چاهک انجام پذیرفت. نتایج این پژوهشگران نشان داد که عصاره متانولی و آبی گیاه بن سرخ بر تمامی سویه های مورد مطالعه به جز *انتروکوکوس فکالیس* اثر بازدارندگی داشت (۲۰). امیری و همکاران (۲۰۰۷)، ترکیبات تشکیل دهنده گیاه بن سرخ را مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که ترکیبات سولفیدی و ترپنوئیدی بخش اصلی ترکیبات گیاه را تشکیل می دهد، بنابراین شاید بتوان اثر ضد میکروبی گیاه بن سرخ را به این ترکیبات نسبت داد (۲۶). مقایسه نتایج اثر ضد میکروبی عصاره اتانولی گیاه بن سرخ در برابر آنتی بیوتیک های رایج درمانی نشان داد که اثر ضد میکروبی عصاره های آبی و اتانولی گیاه بن سرخ بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در بالاترین غلظت حداکثر بوده و قطر هاله عدم رشد باکتری از تمامی آنتی بیوتیک ها به جز آنتی بیوتیک جنتامیسین بیشتر بود. مقایسه بین نتایج اثر ضد میکروبی باکتری *سودوموناس ائروژینوزا* به عنوان مقاوم ترین سویه در برابر عصاره های گیاه بن سرخ نشان داد که قطر هاله عدم رشد نسبت به آنتی بیوتیک ونکومایسین بیشتر و در مورد سایر آنتی‌بوتیک ها کم تر بود (جداول ۲ و ۳). نتایج حداقل غلظت مهارککندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره های آبی و اتانولی گیاه بن سرخ نشان داد که کم ترین حساسیت در برابر عصاره ها مربوط به باکتری های گرم مثبت *استافیلوکوکوس ارئوس* و *استرپتوکوکوس پیوژنز* بود. و بیشترین مقاومت را باکتری گرم منفی *سودوموناس ائروژینوزا* از خود نشان داد (جدول ۴). به طور کلی حداقل غلظت مهارکنندگی همیشه مساوی یا بالاتر از حداقل غلظت کشندگی می باشد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که عصاره های آبی و اتانولی گیاه بن سرخ به خوبی از رشد باکتری های گرم مثبت و به میزان کم تری از رشد باکتری های گرم منفی جلوگیری کردند. نتایج این پژوهش حساسیت بیش تر باکتری های گرم مثبت نسبت به گرم منفی در برابر عوامل ضد باکتریایی را نشان داد. با

توجه به ترکیبات شیمیایی در عصاره گیاه بن سرخ، نمی توان مکانیسم واحدی برای فعالیت ضد میکروبی گیاه در نظر گرفت. از ویژگی های مهم عصاره های آبی و اتانولی گیاه بن سرخ و اجزاء تشکیل دهنده آن خاصیت آب گریزی آن ها می باشد که موجب نفوذ این مواد به لیپیدهای غشاء سلول باکتری شده و در نتیجه آن سبب اختلال و ایجاد نفوذپذیری بیشتر می گردد. این مسئله نیز منجر به خروج و نشت یون ها و دیگر محتویات سلولی می شود. بنابراین یکی از دلایل حساسیت بیشتر باکتری های گرم مثبت نسبت به باکتری های گرم منفی را باید به تفاوت در ساختار دیواره سلولی آن ها نسبت داد (۲۴ و ۲۵).

نتیجه گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که گیاه بن سرخ اثر ضد میکروبی بر سویه های مورد مطالعه به ویژه باکتری های گرم مثبت از خود نشان داد. نتایج نشان داد که باکتری های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناس ائروژینوزا* به ترتیب بیشترین و کم ترین حساسیت را در برابر عصاره های آبی و اتانولی گیاه بن سرخ از خود نشان دادند. نتایج نشان داد که اثر ضد میکروبی عصاره های آبی و اتانولی گیاه بن سرخ بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در بالاترین غلظت حداکثر بوده و قطر هاله عدم رشد باکتری از تمامی آنتی بیوتیک ها به جز آنتی بیوتیک جنتامیسین بیشتر بود. پیشنهاد می گردد در ادامه، تحقیقات گسترده تری در این زمینه و بر باکتری های مختلف انجام پذیرد تا در نهایت بتوان از این گیاه در تولید آنتی بیوتیک و داروهای ضد میکروبی بهره برد.

REFERENCES

1- Khaksarian M, Meshkatosadat M H, Farzi R, Safarpour F. A Study of Chemistry and Antinociceptive Properties of Medicinal Plant Allium Jesdianum Leaves and the Probable Role of Opioidergic System. yafte. 2008; 9 (4) :21-26. [Full Text in Persian].
2- Talei G R, Meshkatalsadat M H, Mosavi S Z. Antibacterial activity native medicinal plants extracts in Lorestan, Iran. J Gorgan Uni Med Sci. 2008; 10 (1) :31-35. [Full Text in Persian].
3- Velag J, Studlla G. The Medicinal Plants. Persian Translation by Zaman S. Sixth Ed. Tehran. Naghsh Iran publication. 2005; pp:9-10.
4- Amiri A, Jomehpour N. Evaluation the Effect of Anti-bacterial of Ferula assa-foetida L, Carum copticum, Mentha piperita L Hydroalcoholic Extract on Standard Sensitive and Methicillin- Resistant Staphylococcus aureus, Escherichia coli O157H7 and Salmonella typhimurium. sjimu. 2016; 24 (2) :72-79. [Full Text in Persian].
5- Ayoobi F, Kamali B, Shamsizadeh A, Sajadi MA, Roohbakhsh A, Vazirinejad R, et al. Effect of Aqueous Extract of Descurainia Sophia on Castor Oil-Induced Diarrhea in Male Rat. Journal of Rafsanjan University Medical Science. 2013; 12(2): 149-56. [Full Text in Persian].
6- Dehghan G, Zarrini G, Hajizadeh M. Phytochemical investigation and antimicrobial, antifungal and synergistic activities of chloroform fractions of the root of Ferula szovitsiana. J Shahrekord Univ Med Sci. 2013; 15 (6) :10-17. [Full Text in Persian].

7- Moniri R, Mosayebi Z, Movahedian A. Increasing trend of antimicrobial drug-resistance in Pseudomonas aeruginosa causing septicemia. Iranian Journal of Public Health. 2006;35(1):58-62.
8- Toyang NJ, Verpoorte R. A review of the medicinal potentials of plants of the genus Vernonia (Asteraceae). Journal of ethnopharmacology. 2013;146(3):681-723.
9- Ghaderi S, Falahati hosein abad A, Sarailoo M H, Ghanbari V. Investigation of the components and antibacterial effects of three plant's essential oil Coriandrum sativum, Achilleh millefolium, Anethum graveolens in vitro. J Shahrekord Univ Med Sci. 2012; 14 (5) :74-82. [Full Text in Persian].
10- Zargari A. Medicinal Plants. Sixth Ed. Vol 1. Tehran. Tehran University Press. 1990; pp: 72-166.
11- Shafizadeh F. Popular Medicinal Plants of Lorestan. Tehran. Hayan Publication. 2002; p: 128.
12- Vahdani R, Mehrabi S, Malekzadeh J, Jannesar R, Sadeghi H, Shafaeifar A. Effect of Hydrophilic Extract of Allium Jesdianum on Ethylene Glycol-Induced Renal Stone in Male Wistar Rats. Armaghane danesh. 2012; 16 (6) :566-577. [Full Text in Persian].
13- Tabatabaei Yazdi F, Alizade Behbahani B, Heidari Sureshjani M. The Comparison of Antimicrobial Effects of Chevil (Ferulago Angulata) Extract with a Variety of Common Therapeutic Antibiotics In Vitro. Arak Medical University Journal. 2014; 17 (3) :35-46. [Full Text in Persian].
14- Tabatabaei Yazdi F, Alizadeh Behbahani B, Heidari Sureshjani M, Mortazavi S A. The In vitro Study of Antimicrobial Effect of Teucrium polium Extract on Infectious Microorganisms. Scientific Journal of Hamadan University of Medical Sciences. 2014; 21 (1) :16-24. [Full Text in Persian].
15- Dost Mohamadi M, Nasisri Semnani S, Shapouri R, alizadeh H, Abdolahzade P. Evaluation of antibacterial effects of aquatic and ethanolic extracts of Malva neglecta & Silver nanoparticle on Staphylococus aureus and Salmonella typhimurium in Invivo and Invitro. Journal of zabol university of medical sciences and health services. 2012; 4 (1) :99-111. [Full Text in Persian].
16- B. Alizadeh Behbahani, Production of an antimicrobial edible coating based on *Plantago major* seed mucilage in combination with dill and Tarragon essential oils: its properties and application in beef. [PhD dissertation]. Mashhad: Ferdowsi University of Mashhad, Faculty of Agriculture, Food Science and Technology Department, in Persian. 2016. [Full Text in Persian].
17- Ryan KJ, Ray CG. Medical microbiology: An introduction to infectious diseases: McGraw-Hill; 2004.
18- Alizadeh Behbahani B, Tabatabaei Yazdi F, Shahidi F, Mohebbi M, Vasiee A. Antimicrobial effect aqueous and ethanolic extract of Avicennia marina on microorganisms the infection and intoxication in vitro. Journal of North Khorasan University of Medical Sciences. 2014; 6 (1) :99-109. [Full Text in Persian].
19- McFarland, J.. Nephelometer; an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. Journal of American Medical Association. 1907. 14:1176-1178.

20- Gholami A, Arabestani M R, Ahmadi M. Evaluation of antibacterial activity of aqueous and methanol extracts of Allium Jesdianum plant on a number of pathogenic bacteria resistant to antibiotics. Pajouhan Scientific Journal. 2016; 14 (4) :18-26. [Full Text in Persian].
21- Alizadeh Behbahani B, Shahidi F, Tabatabaei Yazdi F, Mortazavi SA, Mohebbi M. Use of Plantago major seed mucilage as a novel edible coating incorporated with Anethum graveolens essential oil on shelf life extension of beef in refrigerated storage. International Journal of Biological Macromolecules. 2017; 94:515-26.
22- Heidari-Sureshjani M, Tabatabaei-Yazdi F, Alizadeh-Behbahani B, Mortazavi A. Antimicrobial effect of aqueous and ethanolic extracts of Satureja bachtiarica on some pathogenic bacteria in vitro. Zahedan Journal of Research in Medical Sciences. 2015;17(7): 1-5.
23- Alizadeh Behbahani B, Yazdi FT, Noorbakhsh H, Riazi F, Jajarmi A, Yazdi FT. Study of the antibacterial activity of methanolic and aqueous extracts of Myrtus communis on pathogenic strains causing infection. Zahedan Journal of Research in Medical Sciences. 2016;18(2): 1-7.
24- Yolmeh M, Habibi Naja M B, Farhoosh R, Hosseini F. Evaluation of the Antibacterial Activity of Annatto Dye on Some Pathogenic Bacteria. Qom University of Medical Sciences Journal. 2014; 8 (4) :53-57. [Full Text in Persian].
25- Amjad L, Mohammadi Kamalabadi M, Mohammadi Sichani M. Antibacterial Activity of Methanol Extract of Achillea Wilhe lmsii C. Koch Flower and Leaf. Qom University of Medical Sciences Journal. 2011; 5 (3) :50-56. [Full Text in Persian].
26- Amiri H. Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil of Allium jesdianum Boiss. & Buhse From Iran. Journal of Medicinal Plants. 2007;1(21):39-44.