فعالیت ضدمیکروبی و برهمکنش عصاره‌های آبی و اتانولی برگ سپستان (*Cordia myxa*) بر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در شرایط برون‌تنی

حسین جوینده[۱*]، محمد نوشاد[۲]، حسن برزگر[۲]

۱- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان، ملاثانی

۲- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان، ملاثانی

***نشانی برای مکاتبه:** ۰۶۱-۳۶۵۲۴۳۴۱، hosjooy@gmail.com

چکیده

سابقه و هدف: *سپستان متعلق به خانواده گاوزبانیان و از گیاهان دارویی ایران می‌باشد. در طب سنتی هر بخش از گیاه سپستان برای درمان عفونت‌ها و بیماری‌های مختلف استفاده می‌شود. هدف از مطالعه حاضر ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌های برگ سپستان بر تعدادی از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در شرایط آزمایشگاهی بود.*

روش کار: *در این پژوهش آزمایشگاهی، اثر ضدمیکروبی و برهمکنش عصاره‌های آبی و اتانولی برگ سپستان بر استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، لیستریا اینوکوا، اشرشیا کلی، سودوموناس ائروژینوزا و کاندیدا آلبیکنس با روش‌های دیسک دیفیوژن (کربی-بوئر)، حداقل غلظت مهارکنندگی (میکرودایلوشن براث)، حداقل غلظت کشندگی و بازدارنده افتراقی مورد بررسی قرار گرفت.*

یافته‌ها: *دامنه حداقل غلظت بازدارندگی عصاره آبی برگ سپستان بر میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه بین ۱۲۸ تا ۲۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و بسته به نوع میکروارگانیسم متفاوت بود، در حالی که دامنه حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره اتانولی بین ۶۴ تا ۲۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. بیشترین مقاومت در برابر عصاره‌های آبی و اتانولی سپستان مربوط به باکتری گرم منفی سودوموناس ائروژینوزا بود. حداقل غلظت کشندگی عصاره آبی برای استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، لیستریا اینوکوا، اشرشیا کلی، سودوموناس ائروژینوزا و کاندیدا آلبیکنس به‌ترتیب ۱۲۸، ۲۵۶، ۲۵۶، ۵۱۲، ۵۱۲ و ۱۲۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود، در حالی که برای عصاره اتانولی به ترتیب ۶۴، ۱۲۸، ۲۵۶، ۲۵۶، ۵۱۲ و ۱۲۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود.*

نتیجه‌گیری: *عصاره‌های آبی و اتانولی برگ سپستان اثر مهارکنندگی قابل ملاحظه‌ای بر رشد میکروارگانیسم داشتند. درهرحال، به‌منظور کاربرد بالینی عصاره‌های برگ سپستان انجام تحقیقات بالینی ضروری به‌نظر می‌رسد.*

واژگان کلیدی: سپستان، اثر ضدمیکروبی، برهمکنش، میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا.

مقدمه

یکی از مهمترین عوامل مرگ و میر در کشورهای جهان سوم ابتلا به بیماری‌های عفونی می‌باشد. امروزه با افزایش مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها، شاهد افزایش سویه‌های میکروبی مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی بوده، به‌طوری که سازمان جهانی بهداشت در سال ۲۰۱۱، شعار "مقاومت به داروهای ضدمیکروبی یک تهدید جهانی" را مطرح نمود(۱ و ۲).

در دهه‌های گذشته آنتی بیوتیک‌های سنتزی نقش مهمی در درمان بیماری‌های عفونی ناشی از سویه‌های بیماری‌زا داشتند، اما باکتری‌های بیماری‌زای عامل عفونت و مسمومیت به وسیله مکانیسم‌های مختلفی از جمله تغییر نفوذپذیری نسبت به داروها، دست‌یابی به مسیرهای متابولیک فرعی، پمپ افلاکس، تغییر گیرنده و تولید آنزیم‌های تخریب‌کننده نسبت به آنتی بیوتیک‌های رایج درمانی مقاوم شده‌اند. امروزه به دلیل مقاومت میکروبی، هزینه بالای تولید و مشکلات زیست محیطی مربوط به آنتی‌بیوتیک‌ها تمایل مصرف‌کنندگان به جایگزین کردن آن‌ها با گیاهان دارویی و طبیعی با کم‌ترین اثر جانبی شده است(۳ و ۴).

سابقه مصرف گیاهان دارویی توسط بشر به هزاران سال قبل برمی‌گردد. در طول تاریخ، بشر از گیاهان به‌عنوان غذا یا دارو جهت پیشگیری یا درمان بیماری‌ها، استفاده می‌کرده است (۵ و ۶). امروزه حتی با پیشرفت علوم و توسعه کاربرد داروهای شیمیایی، استفاده از گیاهان دارویی جهت درمان بیماری‌ها همچنان از مصرف بالایی میان مصرف کنندگان برخوردار می‌باشد. بی‌شک نخستین راه بشر جهت درمان بیماری‌های مزمن

و عفونی، استفاده از گیاهان دارویی موجود در هر منطقه می-باشد. با توجه به موقعیت جغرافیایی و تنوع آب و هوایی در ایران، انواع مختلفی از گیاهان دارویی که پایه و اساس طب سنتی را تشکیل داده‌اند به وفور یافت می‌شوند. در سالیان اخیر پژوهش‌های زیادی جهت ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی گیاهان بومی ایران انجام شده و همچنان در حال انجام می-باشد (۷).

سپستان با نام علمی *Cordia myxa* گیاهی از خانواده گاوزبانیان یا بوراژیناسه(Boraginaceae) است. سپستان دارای بیش از ۵۰ گونه‌ی بوده و عموماً در مناطق حاره‌ای، نیمه‌حاره‌ای و جنگل‌های خشک تا مرطوب رشد می‌کند. سپستان در نواحی گرم ایران، از جمله سواحل و جزایر خلیج فارس، بندرعباس، لار، خوزستان و نواحی مختلف سیستان و بلوچستان رویش دارد. از نظر گیاه‌شناسی سپستان درختی برگ ریز، دارای ارتفاع حداکثر دوازده متر، با تنه صاف و بدون انشعاب است که در تابستان میوه می‌دهد. تمامی گیاه سپستان خوراکی است و به‌عنوان غذا استفاده می‌شود. میوه نارس آن برای تهیه ترشی و همچنین به‌عنوان سبزی به کار می‌رود. از برگ گیاه سپستان در بعضی نواحی، برای مصارفی شبیه برگ گاوزبان استفاده می‌گردد. آلکالوئیدهای پیرولیزیدینی اشباع موجود در برگ گیاه اثر سایتوتوکسیک روی سلول‌های کارسینوما دارند. عصاره برگ‌ها اثر قوی آنتی-هیستامینی را دارا می‌باشند. در طب سنتی از سپستان به-عنوان ملین، خلط آور و نرم‌کننده استفاده می‌کنند(۸ و ۹).

سالانه بیش از ۲۵۰ میلیون نفر در سرتاسر جهان به بیماری-های مختلف مبتلا می‌شوند. طیف وسیعی از میکروارگانیسم-های بیماری‌زا (باکتری‌ها و قارچ‌ها) همانند: *اشرشیا کلی*، *سودوموناس ائروژینوزا*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس*، *لیستریا* و قارچ *کاندیدا آلبیکنس* شایع‌ترین عامل ایجاد بیماری‌های عفونی و عامل مسمومیت می‌باشند (۱۰ و ۱۱).

هدف از این پژوهش ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی و برهمکنش عصاره‌های آبی و اتانولی برگ سپستان بر تعدادی از سویه‌های بیماری‌زا (*اشرشیا کلی*، *سودوموناس ائروژینوزا*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس* و *لیستریا اینوکوا* و *کاندیدا آلبیکنس*) در شرایط برون‌تنی به‌روش‌های متنوع کیفی و کمی ضدمیکروبی بود.

روش کار

محیط کشت میکروبی مورد استفاده در این پژوهش شامل: مولر هینتون آگار، مولر هینتون براث، سابروز دکستروز آگار و سابروز دکستروز براث (مرک آلمان) بود. مواد مصرفی شامل: اتانول ۹۶ درصد، اسید سولفوریک، کلرور باریم، قرص رینگر، فیلتر سرنگی با قطر ۰/۴۵ میکرونی، کاغذ واتمن و چاهک-های ۹۶ خانه ای ته‌گرد همگی از شرکت نوآوران زیستی پارسه تهیه شد.

از ۶ سویه میکروبی استاندارد شامل: *Escherichia coli* PTCC 1396، *Pseudomonas aeruginosa* PTCC 1570، *Staphylococcus aureus* PTCC 1189، *Bacillus cereus* PTCC 1665، *Listeria innocua* ATCC 33090 و *Candida albicans* PTCC 5027 جهت ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌های آبی و اتانولی برگ سپستان استفاده شد.

برگ سپستان در فصل تابستان از شهرستان بهبهان (۵۰ درجه و ۱۴ دقیقه طول شرقی و۳۰ درجه و ۳۶ دقیقه عرض شمالی، استان خوزستان) جمع‌آوری گردید. پس از تأیید اسم علمی، جهت رفع گرد و خاک برگ‌های جمع آوری شده، شست و شوی سطحی با آب سرد انجام پذیرفت، سپس برگ-ها در سایه خشک شدند. برگ‌های خشک شده توسط آسیاب آزمایشگاهی پودر شد و جهت یکنواختی اندازه ذرات از الک آزمایشگاهی عبور داده شدند. استخراج عصاره‌های آبی و اتانولی برگ سپستان مطابق با روش سورشجانی و همکاران (۲۰۱۵)، انجام پذیرفت (۱۲). در این روش از حلال‌های آب مقطر و اتانول ۹۶ درصد جهت عصاره‌گیری به‌روش ماسراسیون (خیساندن) استفاده شد. میزان ۱۰۰ گرم از پودر برگ سپستان توزین گردید و در ارلن ۱۰۰۰ میلی‌لیتر ریخته شد. به هر یک از ارلن‌ها میزان ۵۰۰ سی سی از حلال‌های آب و اتانول اضافه گردید. بعد از اختلاط اولیه، با فویل آلومینیوم ارلن‌ها بسته و به مدت ۷۲ ساعت روی دستگاه شیکر در دمای آزمایشگاه مخلوط شد. بعد از گذشت ۷۲ ساعت مخلوط‌های مذکور توسط گاز استریل ۳ لایه ای و قیف صاف گردیده و عصاره‌های آبی و اتانولی جهت شفاف سازی سانتریفوژ شدند. جهت حذف اتانول از عصاره‌های به دست آمده از روتاری استفاده گردید. عصاره‌های آبی و اتانولی برگ سپستان توسط

کاردک تراشیده شد. عصاره‌های حاصل با استفاده از فیلترهای میکروبی ۰/۴۵ میکرونی استریل و در میکروتیوب‌های استریل ۱۵ میلی‌متری که دور آن‌ها با فویل آلومینیومی پوشیده شده بود تا موقع انجام آزمایش‌ها در یخچال نگهداری شدند.

وزن خشک برگ سپستان مطابق با روش وسیعی و همکاران (۲۰۱۵)، تعیین شد. در این روش ابتدا یک لوله آزمایش توزین گردید و سپس یک میلی‌لیتر از عصاره‌های آبی و اتانولی برگ سپستان در آن ریخته شد. محتوی لوله در دمای اتاق خشک گردید و بعد از خشک شدن عصاره‌های آبی و اتانولی برگ سپستان، مجدداً لوله توزین شد. اختلاف وزن لوله قبل و بعد از خشک کردن معادل وزن خشک عصاره‌ها بود (۱۳). میانگین سه بار تکرار، به‌عنوان وزن خشک عصاره‌های آبی و اتانولی برگ سپستان گزارش شد.

برای تهیه محلول ۰/۵ مک فارلند، ۹۹/۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۱٪ و ۰/۵ میلی‌لیتر کلرور باریم ۱/۱۷۵٪ به‌کار برده شد. محلول حاصل در طول موج ۶۲۵ نانومتر جذب معادل ۰/۰۸ تا ۰/۱۳ داشت. محلول ۰/۵ مک فارلند، کدورتی معادل با یک سوپانسیون باکتریایی با تعداد 10^8 × CFU/ml ۱/۵ ایجاد می‌نماید. برای هر یک از سویه‌های میکروبی استاندارد، کدورتی معادل با محلول ۰/۵ مک فارلند تهیه گردید(۱۴).

برای انجام تست‌های ضدمیکروبی از استاندارد CLSI سری M100-S 17 و S 24 استفاده شد. حساسیت میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه به عصاره‌های آبی و اتانولی برگ سپستان با روش کربی-بوئر تعیین شد. در این روش ابتدا از هر یک از عصاره‌های آبی و اتانولی به‌طور جداگانه غلظت-های ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. سپس دیسک‌های کاغذی بلانک (پادتن طب) آغشته به عصاره‌ها شدند. جهت انجام روش انتشار در آگار به کمک دیسک ابتدا محیط کشت مولر هینتون آگار برای باکتری‌ها و سابروز دکستروز آگار برای قارچ‌ها تهیه و استریل شد. در پتری‌دیش‌ها (۸ سانتی متر) حدود ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت ریخته، سوسپانسیون میکروبی (۱۰۰ میکرولیتر) که معادل نیم مک‌فارلند بود در سطح پتری‌دیش‌ها به‌کمک میله ال (L) شکل پخش شد، دیسک‌ها در فواصل معین بر محیط کشت قرار گرفته و به‌وسیله میله شیشه‌ای استریل با کمی فشار در سطح پتری ثابت شدند. فاصله دیسک‌ها به نحوی تعیین شد که تداخلی در هاله‌های عدم رشد ایجاد نگردد. از دیسک فاقد عصاره به‌عنوان کنترل استفاده شد. بعد از طی ۲۴ ساعت برای باکتری‌ها و ۷۲ ساعت برای گونه قارچی به‌ترتیب در دمای ۳۷ و ۲۷ درجه سانتی‌گراد هاله عدم رشد با خط کش (بر حسب میلی‌متر) به‌طور دقیق اندازه‌گیری شد. میانگین ۳ بار تکرار برای هر یک از غلظت‌های عصاره‌های آبی و اتانولی برگ سپستان ثبت گردید(۷ و ۱۵).

از عصاره‌های آبی و اتانولی برگ سپستان یک محلول با غلظت ۵۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. رقت‌های متوالی ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۸ و ۲۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از این محلول تهیه گردید. درون هر یک از چاهک‌های ۹۶ خانه‌ای (حاوی ۱۰۰ میکرولیتر عصاره و محیط کشت) به میزان ۱۰ میکرولیتر از هر یک از سویه‌های میکروبی تلقیح شد. پس از انکوباسیون در دمای ۳۷ و ۲۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ و ۷۲ ساعت برای باکتری‌ها و قارچ‌ها میزان ۲۰ میکرولیتر معرف تری فنیل تترازولیوم کلراید ۵ درصد، به هر یک از چاهک‌ها افزوده (برای باکتری‌ها ۳۰ دقیقه و برای قارچ‌ها ۲۴ ساعت) و دوباره چاهک‌ها گرمخانه گذاری شدند. در چاهک‌هایی که رشد میکروبی انجام شده باشد، پس از گذشت مدت زمان مذکور رنگ قرمز تیره یا ارغوانی ایجاد می‌شود. اولین غلظتی که در آن رنگ قرمز یا ارغوانی تیره تشکیل نشد به‌عنوان حداقل غلظت بازدارندگی گزارش گردید(۱۱).

حداقل غلظت کشندگی عصاره‌های آبی و اتانولی برگ سپستان با روش پورپلیت تعیین شد. در این روش از چاهک-های که در آن تغییری رنگی مشاهده نشد (MIC) و غلظت-های بالاتر، ۱۰۰ میکرولیتر بر محیط کشت مولر هینتون آگار (باکتری‌ها) و سابروز دکستروز آگار (قارچ‌ها) برای هر یک از سویه‌های میکروبی کشت پورپلیت انجام شد. محیط‌های کشت در دمای ۳۷ و ۲۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۴ و ۷۲ ساعت گرم خانه گذاری شدند. اولین پلیتی که در آن هیچ کلنی مشاهده نشد، به‌عنوان حداقل غلظت کشندگی عصاره-های آبی و اتانولی برگ سپستان برای سویه‌های میکروبی مورد مطالعه در نظر گرفته شد(۷ و ۱۱).

واکنش متقابل عصاره‌های آبی و اتانولی برگ سپستان مطابق با روش به کار رفته در مطالعه علیزاده بهبهانی و همکاران (۲۰۱۷) و طبق پروتکل EUCAST 2000 با استفاده از رابطه ۱، و براساس شاخص غلظت بازدارنده افتراقی(Fractional Inhibitory Concentration) و

روش Checkboard انجام شد (۱۱ و ۱۶). براساس این روش برهمکنش عصاره‌های آبی(A) و اتانولی(E) برگ سپستان به ۴ حالت امکان پذیر است. چناچه (FIC < 0.5) حالت هم افزایی، (0.5 ≤ FIC ≤ 1) حالت افزایشی، (1 < FIC ≤ 4) حالت عدم تاثیر و در نهایت (FIC > 4) حالت کاهش اثر می‌باشد (۱۶).

FICAE = (MICA combination / MICA alone) + (MICE combination / MICE alone) (۱)

داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۸ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن و سطح معنی‌داری ۵٪ استفاده شد. تمامی آزمون‌های ضدمیکروبی حداقل ۳ بار تکرار گردید و میانگین آن‌ها ثبت شد.

یافته‌ها

نتایج ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌های آبی و اتانولی برگ سپستان به‌روش دیسک دیفیوژن (کربی-بوئر) در جدول ۱، نشان داده شده است. نتایج نشان داد در غلظت‌های ۳۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره آبی برای تمامی میکروارگانیسم‌ها هاله عدم رشد مشاهده شد. در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره آبی برگ سپستان برای باکتری-های گرم منفی *اشرشیا کلی* و *سودوموناس ائروژینوزا* هاله عدم رشد مشاهده نشد. نتایج نشان داد که در غلظت‌های ۳۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره اتانولی برای تمامی میکروارگانیسم‌ها هاله عدم رشد مشاهده شد اما در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای سویه *سودوموناس ائروژینوزا* هاله عدم رشد مشاهده نگردید. نتایج نشان داد که عصاره اتانولی برگ سپستان نسبت به عصاره آبی دارای اثر ضدمیکروبی بیشتری بود. با افزایش غلظت عصاره‌های آبی و اتانولی برگ سپستان قطر هاله عدم رشد افزایش پیدا کرد. کم‌ترین قطر هاله عدم رشد در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم عصاره آبی مربوط به باکتری *اشرشیا کلی* بود، در غلظت ذکر شده برای باکتری *سودوموناس ائروژینوزا* هاله عدم رشد مشاهده نگردید. بیشترین حساسیت مربوط به باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* و سویه قارچی *کاندیدا آلبیکنس* بود.

جدول ۱- قطر هاله عدم رشد عصاره‌های آبی و اتانولی برگ سپستان به‌روش دیسک دیفیوژن (کربی-بوئر) بر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا بر حسب میلی‌متر

میکروارگانیسم‌ها	عصاره	غلظت ۲۰۰mg/ml	۳۰۰ mg/ml	۴۰۰ mg/ml	۵۰۰ mg/ml
استافیلوکوکوس اورئوس	آبی	۸/۰۰±۰/۴۵^{a}	۹/۷۰±۰/۵۰^{b}	۱۲/۹۰±۰/۵۵^{c}	۱۵/۱۰±۰/۴۵^{d}
باسیلوس سرئوس	آبی	۷/۵۰±۰/۵۵^{a}	۹/۷۰±۰/۵۰^{b}	۱۲/۲۰±۰/۴۵^{c}	۱۴/۳۰±۰/۵۰^{d}
لیستریا اینوکوا	آبی	۷/۱۰±۰/۵۰^{a}	۸/۸۰±۰/۴۵^{b}	۱۰/۱۰±۰/۴۵^{b}	۱۳/۲۰±۰/۵۰^{c}
اشرشیا کلی	آبی	-	۷/۷۰±۰/۵۵^{a}	۹/۰۰±۰/۴۵^{a}	۱۰/۲۰±۰/۵۵^{a}
سودوموناس ائروژینوزا	آبی	-	۷/۰۰±۰/۵۰^{a}	۸/۸۰±۰/۵۵^{b}	۱۰/۰۰±۰/۴۵^{b}
کاندیدا آلبیکنس	آبی	۷/۸۰±۰/۵۰^{a}	۹/۸۰±۰/۴۵^{b}	۱۲/۷۰±۰/۵۰^{c}	۱۵/۰۰±۰/۵۰^{d}
استافیلوکوکوس اورئوس	اتانولی	۹/۲۰±۰/۵۵^{a}	۱۱/۵۰±۰/۴۵^{b}	۱۳/۴۰±۰/۵۰^{c}	۱۶/۸۰±۰/۵۰^{d}
باسیلوس سرئوس	اتانولی	۸/۴۰±۰/۵۰^{a}	۱۱/۰۰±۰/۵۰^{b}	۱۲/۳۰±۰/۵۵^{b}	۱۵/۱۰±۰/۵۵^{c}
لیستریا اینوکوا	اتانولی	۸/۰۰±۰/۴۵^{a}	۹/۲۰±۰/۴۵^{a}	۱۱/۵۰±۰/۴۵^{b}	۱۴/۰۰±۰/۴۵^{c}
اشرشیا کلی	اتانولی	۷/۲۰±۰/۵۰^{a}	۹/۰۰±۰/۵۰^{b}	۱۰/۰۰±۰/۵۰^{b}	۱۱/۷۰±۰/۵۰^{c}
سودوموناس ائروژینوزا	اتانولی	-	۶/۹۰±۰/۵۰^{a}	۹/۱۰±۰/۵۰^{b}	۱۱/۲۰±۰/۵۰^{c}
کاندیدا آلبیکنس	اتانولی	۸/۲۰±۰/۵۵^{a}	۱۰/۹۰±۰/۵۰^{b}	۱۳/۳۰±۰/۵۵^{c}	۱۶/۵۰±۰/۵۰^{d}

- **حروف غیر مشابه (a، b، c و d) در ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی دار اثر ضدمیکروبی غلظت‌های مختلف عصاره‌های آبی و اتانولی می‌باشد.**
- **حروف مشابه در یک ردیف نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار میان اثر ضدمیکروبی غلظت‌های مختلف عصاره‌های آبی و اتانولی می‌باشد.**
- **نتایج حاصل از میانگین سه تکرار در سطح معنی‌داری ۵ درصد است و داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار آورده شده است.**

نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره‌های آبی و اتانولی برگ سپستان بر سویه‌های مورد مطالعه در جدول ۲، نشان داده شده است. نتایج نشان داد که حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره آبی برگ سپستان برای سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس*، *لیستریا اینوکوا*، *اشرشیا کلی*، *سودوموناس ائروژینوزا* و *کاندیدا آلبیکنس* به ترتیب ۱۲۸، ۱۲۸، ۲۵۶، ۲۵۶، ۲۵۶ و ۱۲۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره اتانولی نیز برای سویه‌های مذکور به ترتیب ۶۴، ۱۲۸، ۱۲۸، ۲۵۶، ۲۵۶ و ۶۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود.

نتایج حداقل غلظت کشندگی عصاره‌های آبی و اتانولی برگ سپستان در جدول ۲، آورده شده است. نتایج نشان داد که حداقل غلظت کشندگی عصاره آبی برگ سپستان برای سویه-های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس*، *لیستریا اینوکوا*، *اشرشیا کلی*، *سودوموناس ائروژینوزا* و *کاندیدا آلبیکنس* به ترتیب ۱۲۸، ۲۵۶، ۲۵۶، ۵۱۲، ۵۱۲ و ۱۲۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. نتایج حداقل غلظت کشندگی عصاره اتانولی نیز برای سویه‌های مذکور به ترتیب ۶۴، ۱۲۸، ۲۵۶، ۲۵۶، ۵۱۲ و ۱۲۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود.

جدول ۲- نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC یا MFC) عصاره‌های آبی و اتانولی برگ سپستان بر میکروارگانیسم-های بیماری‌زا

میکروارگانیسم‌ها	نوع عصاره	آزمون گرم	MIC	MBC
استافیلوکوکوس اورئوس	آبی	+	۱۲۸	۱۲۸
باسیلوس سرئوس	آبی	+	۱۲۸	۲۵۶
لیستریا اینوکوا	آبی	+	۲۵۶	۲۵۶
اشرشیا کلی	آبی	-	۲۵۶	۵۱۲
سودوموناس ائروژینوزا	آبی	-	۲۵۶	۵۱۲
کاندیدا آلبیکنس	آبی	انجام نشد	۱۲۸	۱۲۸
استافیلوکوکوس اورئوس	اتانولی	+	۶۴	۶۴
باسیلوس سرئوس	اتانولی	+	۱۲۸	۱۲۸
لیستریا اینوکوا	اتانولی	+	۱۲۸	۲۵۶
اشرشیا کلی	اتانولی	-	۲۵۶	۲۵۶
سودوموناس ائروژینوزا	اتانولی	-	۲۵۶	۵۱۲
کاندیدا آلبیکنس	اتانولی	انجام نشد	۶۴	۱۲۸

نتایج بر همکنش عصاره‌های آبی و اتانولی برگ سپستان بر میکروارگانیسم بیماری‌زا در جدول ۳، آورده شده است. پایین-ترین کمیت مربوط به حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره آبی برگ سپستان با عصاره اتانولی آن در مؤثرترین حالت ترکیبی (مشترک) مربوط به باکتری گرم منفی *اشرشیا کلی* بود. با توجه به میزان حداقل غلظت مهار کنندگی (مشترک) محاسبه شده برای عصاره‌های آبی و اتانولی ترکیبی برگ سپستان بیشترین اثر هم‌افزایی برای باکتری‌های *لیستریا اینوکوا*، *اشرشیا کلی* و *سودوموناس ائروژینوزا* مشاهده شد

جدول ۳- برهمکنش عصاره‌های آبی و اتانولی برگ سپستان بر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا

میکروارگانیسم‌ها	MIC_A ترکیبی	MIC_E ترکیبی	FIC (AE/A)	FIC (EA/E)	FICI (A + E)	برهمکنش (A + E)
استافیلوکوکوس اورئوس	۶۴	۶۴	۰/۵۰	۱	۱/۵	Ind.
باسیلوس سرئوس	۱۲۸	۶۴	۱	۰/۵۰	۱/۵	Ind.
لیستریا اینوکوا	۱۲۸	۶۴	۰/۵۰	۰/۵۰	۱	Add.
اشرشیا کلی	۱۲۸	۶۴	۰/۵۰	۰/۲۵	۰/۷۵	Add.
سودوموناس ائروژینوزا	۱۲۸	۱۲۸	۰/۵۰	۰/۵۰	۱	Add.
کاندیدا آلبیکنس	۶۴	۶۴	۰/۵۰	۱	۱/۵	Ind.

Add: addition
Ind: indifference

بحث

با توجه به شرایط جغرافیایی و آب و هوایی متنوع، ایران کشوری ممتاز و غنی از تنوع زیستی و گیاهی می‌باشد. بعضی از این گیاهان دارای اثر دارویی (فعالیت ضد باکتریایی و ضد قارچی) می‌باشند. استفاده از گیاهان دارویی به ویژه گیاهان بومی در درمان بیماری‌ها، به ویژه بیماری‌های ناشی از سویه-های میکروبی عامل عفونت در سالیان اخیر روند رو به افزایشی داشته است (۶ و ۷).

در این پژوهش آزمایشگاهی، فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌های آبی و اتانولی برگ سپستان و برهمکنش آن‌ها بر تعدادی از سویه‌های بیماری‌زا مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این پژوهش نشان داد که عصاره اتانولی برگ سپستان دارای اثر ضدمیکروبی قوی بر میکروارگانیسم‌ها، به‌ویژه سویه‌های گرم مثبت بود. اثر ضدمیکروبی عصاره اتانولی برگ سپستان نسبت به عصاره آبی بیشتر بود. شاید بتوان دلیل این امر را بالاتر بودن وزن خشک عصاره اتانولی برگ سپستان بیان نمود. وزن خشک (بازده استحصال) عصاره اتانولی ۱۱ درصد بود. میزان استحصال عصاره آبی برگ سپستان ۷ درصد بود. به‌نظر می-رسد حلال اتانول به‌طور مؤثرتری توانسته ترکیبات موجود در برگ سپستان را استخراج نماید. پژوهش‌های زیادی در مورد استحصال عصاره‌های مختلف گیاهان دارویی با حلال‌های متفاوت انجام شده است. نتایج پژوهش‌های مختلف نشان می-دهد که نوع حلال به‌کار گرفته شده جهت استخراج عصاره یکی از مهم‌ترین و اساسی‌ترین فاکتورهای تأثیرگذار بر میزان بازده استحصال عصاره می‌باشد. نتایج این پژوهش نشان داد که حلال اتانول نسبت به آب توانایی بیشتری در واکنش با ترکیبات مؤثر و فعال برگ سپستان دارد. وسیعی و همکاران (۲۰۱۴) (۵)، پیرنیا و همکاران (۲۰۱۵) (۱۷) و علیزاده

بهبهانی و همکاران (۲۰۱۷) (۱۱)، به نتایج مشابه دست یافتند.

گیاهان مختلف، ساز و کارهای دفاعی متفاوتی در برابر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا از خود نشان می‌دهند. یکی از ساز و کارهای مؤثر دفاعی گیاهان، تولید ترکیبات شیمیایی می‌باشد که تحت عنوان کمپلکس‌های شیمیایی ممکن است اسید، باز و یا ترکیبات آلی باشد. روش‌های مختلف عصاره-گیری و همچنین نوع حلال‌های به‌کار برده جهت استخراج عصاره‌ها، باعث جدا شدن ترکیبات مختلفی می‌گردد که هر یک از این ترکیبات‌ها می‌تواند کارایی متفاوتی داشته باشد. کمیت و کیفیت این مواد در ارتباط با گیاهان گوناگون و روش‌های مختلف عصاره‌گیری متفاوت است (۱۷). با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان بیان کرد حلال اتانول توانسته ترکیبات فنولی بیشتری را از ماتریکس برگ سپستان استخراج نماید، در نتیجه اثر ضدمیکروبی حلال اتانول نسبت به حلال آب بیشتر بوده است. مطالعات مختلفی نتیجه فوق را تأیید می‌کند (۱۱ و ۱۷). پاندی و همکاران (۲۰۱۴)، گزارش دادند که عصاره برگ سپستان دارای ترکیبات فنلی، ساپونین و تانن می‌باشد (۱۸).

نتایج اثر ضدمیکروبی به‌روش دیسک دیفیوژن نشان داد که قطر هاله عدم رشد مشاهده شده اطراف میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا متفاوت بوده و بسته به نوع میکروارگانیسم دارد. بیشترین قطر هاله عدم رشد مربوط به باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* به قطر ۰/۵۰±۱۶/۸۰ میلی‌متر بود. با افزایش غلظت عصاره‌های آبی و اتانولی برگ سپستان قطر هاله عدم رشد نیز بیشتر شد، به‌طور کلی یک رابطه مستقیم میان افزایش غلظت عصاره و قطر هاله عدم رشد مشاهده گردید. مقایسه دوتایی میان غلظت‌های مختلف عصاره آبی برگ سپستان نشان داد که در غلظت‌های ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی-گرم بر میلی‌لیتر برای باکتری‌های *لیستریا اینوکوا* و *اشرشیا کلی* و غلظت‌های ۴۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای *اشرشیا کلی* و *سودوموناس ائروژینوزا* اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. برای سایر میکروارگانیسم در تمامی غلظت‌ها اختلاف معنی‌دار مشاهده گردید. مقایسه دوتایی میان غلظت-های مختلف عصاره اتانولی برگ سپستان نشان داد که در غلظت‌های ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای باکتری-های *باسیلوس سرئوس* و *اشرشیا کلی* و غلظت‌های ۲۰۰ و ۳۰۰ برای باکتری *لیستریا اینوکوا* اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

پیرنیا و همکاران (۲۰۱۵)، اثر ضدمیکروبی عصاره‌های آبی و اتانولی میوه درخت سپستان بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس*، *اشرشیا کلی* و *سالمونلا تیفی* به-روش دیسک دیفیوژن مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که اثر ضدمیکروبی عصاره اتانولی میوه درخت سپستان بیشتر از عصاره آبی بود. این پژوهشگران گزارش دادند که با افزایش غلظت عصاره میوه سپستان قطر هاله عدم رشد نیز افزایش پیدا می‌کند (۱۷). نتایج این پژوهشگران با یافته‌های مطالعه حاضر همخوانی داشت. پاندی و همکاران (۲۰۱۴)، فعالیت ضدمیکروبی برگ سپستان را بر سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیا کلی*، *سودوموناس ائروژینوزا*، *آسپرژیلوس نایجر* و برخی از گونه‌های پنی‌سیلیوم به‌روش چاهک آگار مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که برگ سپستان بیشتر اثر ضدمیکروبی را بر باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* داشت (۱۸). نتایج مطالعه حاضر با یافته‌های این پژوهشگران مطابقت داشت.

نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره‌های آبی و اتانولی برگ سپستان (جدول ۲)، نشان داد که باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی در برابر عصاره‌های آبی و اتانولی حساسیت بیشتری دارند. حساس‌ترین سویه نسبت به عصاره‌های آبی و اتانولی برگ سپستان، باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* بود. بیشترین مقاومت در برابر عصاره‌های آبی و اتانولی برگ سپستان مربوط به باکتری گرم منفی *سودوموناس ائروژینوزا* بود. اگرچه بروز فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهان دارویی روشن است، ولی مکانیسم عمل آن به‌طور کامل درک نشده است. شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد اسانس‌ها و عصاره‌ها اثر ضدمیکروبی خود را از طریق تغییر ساختار و عمل غشای سلولی اعمال می‌کنند. علت مقاومت بیشتر باکتری‌های گرم منفی به عصاره‌های گیاهان دارویی را می‌توان به‌وجود اختلاف ساختمانی و پیچیدگی بیشتر غشاء سلولی باکتری‌های گرم منفی در مقایسه با غشاء تک لایه‌ای باکتری‌های گرم مثبت نسبت داد. باکتری‌های گرم مثبت در دیواره سلولی خود دارای ترکیب موکوپپتید بوده درحالی‌که قسمت اعظم ساختمان دیواره سلولی در باکتری‌های گرم منفی همانند *سودوموناس ائروژینوز و اشرشیا کلی* لیپوپروتئین و لیپوپلی‌ساکارید است. از سوی دیگر به‌نظر می‌رسد مقاومت

سلول‌های باکتریایی وابسته به سرعت و میزان حل شدن مواد ضدمیکروبی (عصاره‌های آبی و اتانولی برگ سپستان) در بخش لیپیدی غشاء سلولی میکرروارگانیسم می‌باشد. اختلاف در هیدروفوبیسیتی سطح غشای سلول را نیز می‌توان به‌عنوان یک عامل مؤثر ذکر نمود (۱۹ و ۲۰). سویه قارچی *کاندیدا آلبیکنس* نسبت به عصاره‌های آبی و اتانولی برگ سپستان حساس بود و در غلظت‌های پایین عصاره‌ها رشد آن متوقف شد. مکانیسم اثر اسانس و عصاره‌ها بر قارچها دقیقاً معلوم نیست، اما در بیشتر گزارش‌ها این اثر به تغییرات مورفولوژیک نسبت داده می‌شود (۲۰).

نتایج برهمکنش عصاره‌های آبی و اتانولی برگ سپستان نشان داد که در حالت ترکیبی عصاره‌ها، برای باکتری‌های *لیستریا اینوکوا*، *اشرشیا کلی* و *سودوموناس ائروژینوزا* می‌توان در غلظت‌های پایین تری رشد آن‌ها را متوقف کرد. نتایج نشان داد که سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس* و *کاندیدا آلبیکنس* نسبت به حالت ترکیبی عصاره‌های برگ سپستان بی‌تفاوت بودند. پایین‌ترین کمیت مربوط به حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره آبی برگ سپستان با عصاره اتانولی آن در مؤثرترین حالت ترکیبی (مشترک) مربوط به باکتری گرم منفی *اشرشیا کلی* بود. مطالعات پیرامون بررسی برهمکنش‌های ترکیبات مختلف در بازدارندگی از رشد میکروارگانیسم‌ها محدود می‌باشد. در مورد ترکیبات طبیعی بیشتر محققان به بررسی وجود اثرات سینرژیستی این ترکیبات با آنتی بیوتیک‌های متداول پرداخته‌اند. پژوهشی پیرامون اثر کاربرد هم‌زمان عصاره‌های آبی و اتانولی برگ سپستان بر سویه‌های میکروبی‌های یافت نشد تا با نتایج پژوهش حاضر مقایسه گردد، از این رو ساز و کار اثر ضدمیکروبی عصاره‌های آبی و اتانولی برگ سپستان در حالت ترکیب باید مورد بررسی بیشتری قرار گیرد.

نتیجه گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد، عصاره‌های آبی و اتانولی برگ سپستان اثر ضدمیکروبی خوبی بر سویه‌های مورد بررسی داشت. اثر ضدمیکروبی عصاره اتانولی بیشتر از عصاره آبی بود. به‌نظر می‌رسد مقدار برخی از ترکیبات عصاره آبی که دارای اثر ضدمیکروبی می‌باشند کم بوده، لذا با تخلیص و تغلیظ عصاره آبی می‌توان میزان این ترکیبات را در عصاره افزایش داد. به‌طور کلی فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌های آبی و اتانولی برگ سپستان علیه باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از باکتری‌های گرم منفی بود. پیشنهاد می‌گردد از روش‌های مختلف عصاره‌گیری و حلال‌های مختلف جهت ارزیابی اثر ضدمیکروبی برگ سپستان استفاده گردد، همچنین اثر ضدمیکروبی سایر اندام‌های گیاه مانند پوست، میوه و ریشه نیز بررسی گردد.

تقدیر و تشکر

این مقاله مستخرج از طرح پژوهشی شماره ۹۶۱/۱۱ می‌باشد و نویسندگان بر خود لازم می‌دانند که از معاونت پژوهشی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان جهت تأمین اعتبار هزینه‌های مالی صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

REFERENCES

1- Investigation of the extracts antibacterial effect of Hibiscus Sabdariffa against strains of antibiotic resistance on pathogenic bacteria “in vitro”. Iranian Journal of Food Science and Technology. 2016; 13 (55): 23-31. [Full Text in Persian].
2- Tabatabaei Yazdi F, Heidari Sureshjani M, Alizade Behbahani B. Antimicrobial Effects of Aqueous and Ethanolic Extracts of Ferulago angulata on Staphylococcus aureus, Bacillus cereus and Salmonella typhi "in vitro". Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2014; 19(65): 25-31. [Full Text in Persian].
3- Mahesh B, Satish S. Antimicrobial activity of some important medicinal plant against plant and human pathogens. World Journal of Agricultural Sciences. 2008; 4(5): 839-43.

4- Duque AS, Ferreira AF, Cezario RC, Gontijo Filho PP. Nosocomial infections in two hospitals in Uberlandia, Brazil Rev Panam Infectol 2007; 9 (4): 14-18.
5- Vasiee A, Zanganeh H, Alizadeh Behbahani B, Tabatabaei Yazdi F. The in vitro investigating of Antimicrobial Effect of *Portulaca oleracea* Extract on Infectious Microorganisms. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2014; 19(66): 37-43. [Full Text in Persian].
6- Sadighi J, Maftoon F, Ziaei S. Herbal medicine: Knowledge, attitude and practice in Tehran. Journal of Medicinal Plants. 2005; 4(13): 11-8.
7- Tabatabaei Yazdi F, Mortazavi S.A, Alizadeh Behbahani B, Vasiee A, Moradi S, Tabatabaei Yazdi F, Jafarian S. A comparative study of effect of types of Hibiscus Sabdariffa extracts and selective antibiotics on clinical and standard strains of infection agent in vitro. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2015; 20(69): 31-40. [Full Text in Persian].
8- Jamkhande PG, Barde SR, Patwekar SL, Tidke PS. Plant profile, phytochemistry and pharmacology of Cordia dichotoma (Indian cherry): A review. Asian Pacific journal of tropical biomedicine. 2013; 3(12): 1009-12.
9- Pirnia M. Survey of antimicrobial effect of aqueous and ethanolic *Cordia myxa L.* extracts against food infective and intoxication microorganisms and kinetic modelling of *Bacillus cereus* growth affected by temperature and concentration. [M.Sc Thesis]. Mashhad: Ferdowsi University of Mashhad, Faculty of Agriculture, Food Science and Technology Department, in Persian. 2014. [Full Text in Persian].
10- 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].
11- Alizadeh Behbahani B, Shahidi F, Yazdi FT, Mortazavi SA, Mohebbi M. The antimicrobial effect and interaction between the aqueous and ethanolic extracts of *Plantago major* on *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, Escherichia coli and *Pseudomonas aeruginosa* "*in vitro"*. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2017; 21(75): 1-8. [Full Text in Persian].
12- 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.
13- 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. 2015; 20(71): 59-66. [Full Text in Persian].
14- 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.
15- Jones RN, Ballow CH, Biedenbach DJ. Multi-laboratory assessment of the linezolid spectrum of activity using the Kirby-Bauer disk diffusion method: Report of the Zyvox Antimicrobial Potency Study (ZAPS) in the United States. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2001; 40(1): 59-66.

16- EUCAST. Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. Clinic Microbiol Infect. 2000; 6: 503–8.
17- Pirnia M, Edalatian Dovom M R, Tabatabaee Yazdi F, Shahidi F. The Antibacterial Effects of the Aqueous and Ethanolic Extracts of Cordiamyxa L. Fruit on Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Escherichia coli, and Salmonella typhi. Qom University of Medical Sciences Journal. 2015; 9 (4): 39-48.
18- Pandey B, Deshpande B, Singh S, Chandrakar V. Estimation of elemental contents of Cordia myxa and its antimicrobial activity against various pathogenic microorganisms. Indian Journal Sciences Research. 2014; 4(1): 39-44.
19- Holley RA, Patel D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. Food Microbiology. 2005; 22(4): 273-92.
20- Alizadeh Behbahani B, Shahidi F, Yazdi FT, 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.