

بررسی اثربخشی فعالیت ضد باکتریایی عصاره های آبی و اتانولی برگ گیاه خرزهره

(*Nerium oleander*) در مقابل سویه های استاندارد *سالمونلا تیفی* و *لیستریا منوسیتوژنز* در شرایط آزمایشگاهی

فاطمه مکر، مهدی آسمار*، سعید ضرابی، علیرضا مسیحا

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران

چکیده

سابقه و هدف: مقاومت آنتی بیوتیکی، زمینه را برای جایگزین نمودن روش های درمانی گیاهی دارای عوارض جانبی کم تر نسبت به داروهای رایج فراهم نموده است. این مطالعه باهدف تعیین اثر ضد میکروبی گیاه خرزهره (*Nerium oleander*) بر باکتری های *سالمونلا تیفی* و *لیستریا منوسیتوژنز* انجام شده است.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی برگ های گیاه خرزهره از محل مرکز تحقیقات گل و گیاه استان گیلان شهر لاهیجان جمع آوری و پس از عصاره گیری، اثر ضدباکتریایی عصاره های آبی و اتانولی گیاه علیه دوسویه استاندارد *سالمونلا تیفی* PTCC 1609 و *لیستریا منوسیتوژنز* PTCC 1295 مورد ارزیابی قرار گرفت. فعالیت ضد میکروبی، حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره ها با استفاده از تکنیک رقت های سریال در آبگوشت و انتشار در آگار تعیین شد.

یافته ها: در روش انتشار در آگار همه غلظت های عصاره اتانولی گیاه خرزهره بر روی *سالمونلا تیفی* اثر بازدارندگی داشت، با این وجود، اثرهای مهار عصاره اتانولی آن در مقایسه با عصاره آبی به مراتب بالاتر بود. کمترین غلظت بازدارندگی عصاره اتانولی ۱۲۸ mg/ml و حداقل غلظت کشندگی ۲۵۶ mg/ml تعیین شد. عصاره های آبی و اتانولی این گیاه بر روی سویه استاندارد *لیستریا منوسیتوژنز* اثری نداشت.

بحث: به نظر می رسد عصاره های اتانولی و آبی گیاه خرزهره در شرایط آزمایشگاهی دارای اثر ضد میکروبی قابل ملاحظه ای بر روی باکتری گرم منفی *سالمونلا تیفی* است. بنابراین می توانند به عنوان ترکیب های دارویی و یا نگه دارنده مفید باشند.

واژه های کلیدی: اثر ضد میکروبی، *Salmonella Typhi*، *Listeria monocytogenes*

مقدمه

هدفمند و بسته بندی مواد غذایی شده است. گیاهان هم چنین در دارو درمانی بیماری های مختلفی نظیر افزایش فشارخون، کلسترول، آگزما و اسهال برای قرن ها استفاده شده اند و امروزه نقش آن ها به دنبال شناسایی و جداسازی ترکیب های فیتوشیمیایی فعال بیولوژیک نشان داده شده است (۲). این ترکیب های متابولیت های ثانویه ای هستند که به چندین زیرگروه از مواد فعال زیستی گیاهی نظیر آنتی اکسیدان ها، ترکیب های ضد میکروبی، ضد ویروسی، ضد سرطان و غیره تقسیم می شوند (۳). آنتی بیوتیک ها با حذف یا توقف تکثیر میکروب ها با عامل بیماری را مقابله می کنند. ایجاد عوارض جانبی جبران ناپذیر و بروز و انتشار مقاومت دارویی در بین میکروب ها از جمله مشکل های اساسی کاربرد آنتی بیوتیک ها

مطالعه های انجام شده در دنیا حاکی از آن است که عصاره بسیاری از گیاهان توانایی مهار رشد میکروارگانیسم ها را دارند و به این لحاظ گیاهان دارویی به عنوان عوامل ضد میکروبی کاربردهای زیادی پیدا نموده اند (۱). وجود ترکیب های فعال از لحاظ بیولوژیک در میان گیاهان دارویی منجر به استفاده از آن ها به عنوان داروهای گیاهی، مکمل های غذایی، غذاهای

نویسنده مسئول:

گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان.

پست الکترونیکی: mehdiassmar@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۷/۲۲

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۸/۳۰

مانند گیرندگان پیوند اعضا، مبتلایان به لنفوم و ایدز به طور مشخص مستعد بیماری هستند (۱۴). این مطالعه باهدف ارزیابی و مقایسه فعالیت ضدباکتریایی عصاره های آبی و اتانولی برگ گیاه خرزهره بومی استان گیلان علیه برخی از میکروارگانیسم های شاخص عفونت و مسمومیت در شرایط آزمایشگاهی طراحی و اجرا شده است.

روش کار

جمع آوری گیاه

در این مطالعه تجربی برگ های گیاه خرزهره از محل مرکز تحقیقات گل و گیاه شمال ایران واقع در شهر لاهیجان در طی آبان ماه ۱۳۹۵ جمع آوری گردید. شناسایی و تأیید نام علمی گیاه با استفاده از کلیدهای شناسایی توسط متخصص گیاهشناسی و هماهنگی های لازم با هرباریوم و آزمایشگاه سیستماتیک گیاهی دانشکده علوم پایه و دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی لاهیجان صورت پذیرفت. برگ ها در شرایط دمای اتاق و در سایه خشک و با استفاده از آسیاب مدل Waring جهت عصاره گیری به صورت پودر آماده تهیه شدند.

تهیه عصاره

برای تهیه عصاره آبی به ازاء هر گرم پودر ۱۰ میلی لیتر آب مقطر استریل در بشر ریخته و پس از جوش آمدن، پودر گیاه را اضافه نموده و به مدت ۱۵ دقیقه جوشانده شد، عصاره به دست آمده، به منظور حذف حلال توسط کاغذ صافی فیلتر شده وارد دستگاه تقطیر در خلاء^۷ (مدل ۸ RV ساخت کمپانی IKA آلمان) گردید. عصاره آبی با بازده ۱۵ درصد پس از فیلتراسیون (با استفاده از سرنگ میلی پور مدل GSWP آمریکا) با فیلترهای ۰/۴۵ میکرون در غلظت های مختلف به روش چاهک دیفیوژن - پلیت مورد آزمایش ضد میکروبی قرار گرفت. برای تهیه عصاره اتانولی، ۱۰۰ گرم از پودر خشک شده گیاه با ۵۰۰ سی سی اتانول ۸۰ درصد مخلوط و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق (۲۲ درجه سانتی گراد) نگهداری شد و پس از حذف حلال توسط دستگاه روتاری، عصاره الکلی به دست آمده در دمای ۳۷ درجه سانتی - گراد در انکوباتور به صورت پودر در آمد. پس از آن مقدار ۱ گرم از پودر عصاره الکلی گیاه را به ۵ سی سی از حلال دی -

است. بنابراین استفاده از درمان های جدید و یا استفاده از داروهای گیاهی با عوارض کم تر ضروری به نظر می رسد (۴). گیاه خرزهره با نام علمی *Nerium oleander* گیاهی است چندساله، پر شاخه، سمی و همیشه سبز از راسته گل سپاسی سانان^۱، تیره ی خرزهرگان^۲ که به صورت بوته ای و یا درختچه ای می روید. این گیاه که بومی مناطق مدیترانه ای است، به عنوان گیاه زینتی در بسیاری از نقاط دنیا کاشته می شود (۵). برگ های آن سبز تیره با قوامی چرمی و رگبرگ های واضح، باریک، نیزه ای کشیده به طول ۱۰ تا ۲۰ سانتی متر هستند. تمام قسمت های گیاه شامل برگ، گل، دانه، ساقه، پوست، ریشه و شیره آن سمی بوده و حاوی گلیکوزیدهای قلبی^۳ هستند (۱). عصاره برگ این گیاه برای کاهش ورم، درمان گال و همچنین برای افرادی که بیماری تنفسی نیز دارند مؤثر است. در مطالعه های مختلف اثرهای درمانی این گیاه همچون اثرهای ضدسرطانی، ضد استرس، ضد التهابی و ضد درد، تعدیل کنندگی سیستم ایمنی همچنین اثر بر روی مراحل اسپرماتوزن نشان داده شده است (۶، ۱۲). باکتری ها از شایع ترین عوامل ایجاد مسمومیت ها و عفونت های غذایی هستند. در این میان سالمونلا میکروارگانیسمی است که از طریق آب و غذای آلوده وارد دستگاه گوارش می شود و به سطح سلول های اپی تلیوم مخاط روده متصل می گردد. سپس در واکوئل های درون این سلول ها و گاهی نیز در بین اتصال های میان سلولی وارد می شود. باکتری در محل ورود تکثیر می شود و چون توانایی عبور از لامینا پروپریا را دارد از آنجا به گردش خون وارد می شود و به تمام قسمت های بدن منتشر شده و بخش های مختلف سیستم لنفاوی را آلوده می کند. در ماکروفاژها و سیستم رتیکیلو اندوتلیال وارد شده و به تکثیر خود ادامه می دهد. یکی از بیماری ها که از طریق سالمونلا ایجاد می شود تب تیفوئید یا همان حصبه است (۱۳). لیستریا منوسیتوژنز عامل بیماری لیستریوز است که در بزرگسالان غیر باردار، مننژیت اولیه^۴، انسفالیت^۵ و سپتیسمی^۶ ایجاد می کند. بیماران مسن تر یا افرادی که مستعد هستند و ایمنی سلولی آن ها پایین است،

^۱ Gentianales

^۲ Apocynaceae

^۳ Cardiac glycoside

^۴ meningitis Primary

متیل سولفاکساید^۸ اضافه نموده و به وسیله فیلتراسیون استریل گردید (۱۵). جهت استاندارد کردن روش و تکرارپذیری و به منظور مقایسه و ارزیابی اثر ضد میکروبی عصاره های استخراج شده به وسیله آب مقطر و اتانول، وزن خشک عصاره ها تعیین شد. بدین طریق که برای هر کدام از عصاره ها یک لوله آزمایش خالی توسط ترازوی دیجیتالی حساس وزن شد سپس از عصاره تغلیظ شده ۱ میلی لیتر به لوله اضافه و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۶۰ درجه سانتی گراد، عصاره ها به طور کامل خشک شد. لوله ها دوباره توزین و باکم کردن وزن لوله های خالی میانگین وزن خشک عصاره های آبی و اتانولی تعیین شد (۱۶).

باکتری های مورد استفاده در تحقیق

سویه های میکروبی مورد استفاده در این پژوهش شامل *سالمونلا تیفی* PTCC 1609 و *لیستریا منوسیتوژنز* PTCC 1295 بودند که از مرکز کلکسیون قارچ ها و باکتری های صنعتی و عفونی سازمان علمی پژوهشی و صنعتی ایران بخش بیوتکنولوژی به صورت آمپول لیوفیلیزه خریداری شد. کدورت نمونه های میکروبی پس از تلقیح به سرم فیزیولوژی سترون با لوله ۰/۵ مک فارلند^۹ برابر با (CFU /ml) $10^8 \times 1/5$ (Colony forming unit) مقایسه شد و به عنوان کشت تلقیح مورد استفاده قرار گرفت.

بررسی اثر ضد میکروبی

اثر ضد میکروبی عصاره های آبی و اتانولی خرزهره با استفاده از دو روش تهیه رقت در براث و انتشار در آگار به کمک دیسک بررسی گردید (۱۷). در روش انتشار در آگار به کمک دیسک، ابتدا یک لوپ از کشت استاندارد هر سوش بر روی این محیط ها کشت داده شد سپس دیسک های کاغذی (جنس صافی واتمن و به قطر ۶ میلی متر) با غلظت های ۵ mg/ml ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۵، ۳۰ و ۴۰ عصاره ها در آب مقطر استریل تهیه و با عصاره خرزهره آغشته گشت و توسط پنس استریل در سطح محیط کشت قرار داده شد و با کمی فشار روی محیط کشت ثابت گردید. بعد از گرم خانه گذاری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با استفاده از خط-کش به طور دقیق قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی متر اندازه گیری شد. تمامی آزمایش ها با ۳ تکرار انجام گرفت. در تعیین MIC و MBC بر اساس وزن خشک عصاره الکلی مقادیر

۸۶۰ µg/ml از پودر خشک شده عصاره به عنوان MIC و MBC به دست آمد. به منظور تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد^{۱۰} (MIC) از روش تهیه رقت در براث (ماکرو دایلیوشن) طبق دستورالعمل^{۱۱} CLSI استفاده شد. در این مطالعه از آنتی بیوتیک تتراسایکلین (۳۰ mg) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. برای تعیین MIC برای هر عصاره از یک سری ۷ تایی لوله آزمایش استریل استفاده شد، ۶ لوله برای آزمایش رقت های مختلف هر عصاره و یک لوله نیز به عنوان کنترل به کار رفت. کنترل مثبت حاوی سوسپانسیون میکروبی و محیط مولر هینتون براث و کنترل منفی حاوی سوسپانسیون میکروبی و آنتی بیوتیک تتراسایکلین بود. بلافاصله پس از کشت تمام لوله های آزمایش به مدت ۲۴ ساعت در دما ۳۷ درجه سانتی گراد گرم خانه گذاری شدند. پس از گرم خانه گذاری لوله ها از نظر کدورت ناشی از رشد باکتری های تلقیح شده مورد بررسی قرار گرفتند، پایین ترین غلظتی که در آن کدورتی مشاهده نگردید و به طور کامل شفاف بود، به عنوان MIC در نظر گرفته شد (۱۸). حداقل غلظت کشندگی^{۱۲} (MBC) با استفاده از روش رقت لوله ای برای عصاره های آبی و اتانولی خرزهره تعیین گردید. برای تعیین MBC برای هر عصاره از یک سری ۹ تایی لوله آزمایش استریل استفاده شد، ۸ لوله برای آزمایش رقت های مختلف از هر عصاره و یک لوله نیز به عنوان کنترل به کار رفت. پس از کشت تمام لوله های آزمایش به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرم خانه گذاری شدند. از تمام لوله هایی که هیچ رشدی در آن ها مشاهده نشده بود نمونه برداری و جهت تعیین MBC به روش Pour Plate Method کشت داده شد. لوله ای که حاوی کم ترین غلظت عصاره بود و در پلیت مربوط به آن هیچ رشدی مشاهده نشده بود به عنوان MBC در نظر گرفته شد این روش برای هر دو عصاره آبی، اتانولی و هر میکروارگانیزم ۳ بار تکرار گردید (۱۹).

محاسبه های آماری

در این بررسی تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده نرم افزار آماری SPSS نسخه ۱۸ انجام شد. به منظور دستیابی به نتایج آماری دقیق تر هر آزمون با سه بار تکرار انجام شد و از آزمون آنالیز واریانس، تی مستقل، دانکن و منویتی برای مقایسه

^{۱۰} Minimum inhibition concentration

^{۱۱} Clinical and laboratory standards institute

^{۱۲} Minimum Bacterial concentration

^۸ DMSO

^۹ McFarland

میانگین ها استفاده گردید و اختلاف بین گروه ها در سطح معنی دار $P < 0.05$ تعیین شد.

یافته‌ها

در این مطالعه از غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۴۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره‌های اتانولی و آبی به منظور سنجیدن قطر هاله عدم رشد باکتری‌های *لیستریا منوسیتوژنز* و *سالمونلا تیفی* استفاده شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که اثر ضد میکروبی عصاره اتانولی برگ خرزهره وابسته به غلظت بوده و همراه با افزایش غلظت عصاره قطر هاله بازدارندگی به طور معنی داری افزایش می یابد. این مطالعه نشان داد که نوع باکتری و غلظت عصاره بر روی قطر هاله عدم رشد مؤثر است به طوری که قطر هاله بازدارندگی عصاره اتانولی در غلظت ۴۰ میلی گرم بر میلی لیتر بیشترین میزان تأثیرگذاری را بر روی باکتری *سالمونلا تیفی* داشته و از رشد آن روی محیط کشت جلوگیری به عمل آورده است ($P < 0.001$). کمترین میزان حساسیت در ارتباط با باکتری *لیستریا منوسیتوژنز* معادل $6/28 \pm 4/0$ به دست آمد (جدول ۱). یافته‌های این مطالعه نشان داد که اثر مهار عصاره اتانولی خرزهره در غلظت‌های مختلف به مراتب بیشتر و مؤثرتر از عصاره آبی بود و عصاره آبی این گیاه اثر بازدارندگی کمتری را نشان داد. همچنین عصاره‌های اتانولی و آبی گیاه خرزهره تنها در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر اثر مهار ضعیفی بر باکتری *لیستریا منوسیتوژنز* نشان دادند و در سایر غلظت‌ها هیچ گونه اثر بازدارندگی مشاهده نشد ($P < 0.001$). نتایج حاصل از حداقل غلظت بازدارندگی عصاره‌های آبی و اتانولی خرزهره در جدول ۱ آورده شده است. مقایسه دوجه دو میانگین‌های قطر هاله عدم رشد در مورد عصاره آبی و اتانولی بر باکتری *سالمونلا تیفی* نشان داد اختلاف میانگین قطر هاله عدم رشد در مورد غلظت‌های مورد بررسی معنی دار است ($P < 0.001$). همچنین مشخص شد که میانگین قطر هاله عدم رشد *لیستریا منوسیتوژنز* در غلظت‌های ۵ و ۱۰ عصاره‌های اتانولی و آبی اختلاف معنی دار ندارند ($P < 0.001$). یافته‌های حاصل از این تحقیق در ارزیابی اثر آنتی‌بیوتیک‌ها نشان داد که هر دو باکتری به دیسک تتراسایکلین حساس بودند. میانگین قطر هاله عدم رشد برای *لیستریا منوسیتوژنز* $1/28 \pm$ و $16/8$ و *سالمونلا تیفی* $20 \pm 0/38$ میلی متر مشاهده شد. نتایج مربوط به حداقل غلظت مهارکنندگی^{۱۳} و حداقل غلظت

کشندگی باکتری^{۱۴} عصاره‌های اتانولی و آبی علیه باکتری‌های منتخب به روش لوله‌ای در جدول ۲ آمده است. نتایج نشان می‌دهد که در بین باکتری‌های مورد آزمایش، باکتری *سالمونلا تیفی* بیشترین حساسیت را در برابر عصاره‌های اتانولی و آبی گیاه خرزهره دارد (جدول ۲). در تعیین MIC و MBC به روش سریال‌های رقتی، عصاره اتانولی در رقت ۱۲۸ میلی گرم بر میلی لیتر باعث مهار رشد (MIC) و در رقت ۲۵۶ میلی گرم بر میلی لیتر باعث مرگ (MBC) باکتری *سالمونلا تیفی* شد. عصاره آبی مورد استفاده نیز در رقت ۶۴ میلی گرم بر میلی لیتر باعث مهار رشد (MIC) و در رقت ۱۲۸ میلی گرم بر میلی لیتر باعث مرگ (MBC) باکتری *لیستریا منوسیتوژنز* شد. غلظت‌های نهایی استفاده شده در MIC و MBC به ترتیب ۱۲۸ و ۲۵۶ میلی گرم بر میلی لیتر تعیین شد.

بحث

وجود خواص ضد عفونی‌کنندگی علاوه بر اثرهای درمانی از عوامل توجه طب سنتی به گیاهان دارویی در سال‌های اخیر بوده است (۲۰). بر اساس اعلام سازمان بهداشت جهانی، ۱۹٪ از جمعیت کشورهای توسعه یافته، کم و بیش برای درمان از گیاهان دارویی استفاده می‌نمایند (۲۱). وجود ترکیب‌های ثانویه در گیاهان دارویی سبب شده که در بررسی‌های اخیر توجه ویژه‌ای را به خود جلب کنند. به ویژه وجود ترکیب‌های ضد میکروبی موجود در گیاهان دارویی اهمیت این گیاهان را برای تولید پادزیست‌های طبیعی و جدید در علوم پزشکی دو چندان ساخته است. آنتی‌بیوتیک‌ها داروهای ارزشمندی برای درمان بسیاری از بیماری‌های انسانی هستند، با این حال استفاده بیش از حد این داروها مقاومت‌های میکروبی را در پی خواهد داشت. بنابراین دانشمندان تحقیق‌هایی بر روی قسمت‌های مختلف گیاهان دارویی، برای کشف داروهای جدید با منشأ گیاهی را در اولویت قرار داده‌اند (۲۲). در برخی مطالعه‌ها نشان داده شد که عصاره گیاهی که با استفاده از هگزان استخراج شده باشد به عنوان عصاره مؤثرتر علیه فعالیت ضد میکروبی مورد استفاده قرار می‌گیرد و در برخی دیگر عصاره متانولی نسبت به روش‌های استخراج دیگر هم‌چون عصاره آبی، عصاره هگزانولی و یا اتانولی اثرهای بازدارندگی بهتری دارد (۲۳). چنین استنباط می‌شود که اکثر ترکیب‌های شناسایی شده با فعالیت ضد میکروبی از گیاهان دارویی،

ترکیب‌های آروماتیک یا ترکیب‌های آلی اشباع هستند که این ترکیب‌ها در حلال‌های الکلی هم‌چون متانول و اتانول حلالیت بیش‌تری دارند. با این وجود در کلیه موارد علت این اختلاف‌ها، تفاوت در نوع ترکیب‌های گیاهی یافت شده در گیاهان دارویی می‌باشد. تفاوت در قسمت‌هایی از گیاه که برای عصاره‌گیری استفاده شده یا تفاوت روش عصاره‌گیری و هم‌چنین تفاوت در ترکیب‌های گیاه به دلیل تفاوت شرایط جغرافیایی و یا اقلیمی از جمله عواملی هستند که در ترکیب‌های فعال گیاهی نقش دارند (۲۳). در مطالعه بی‌دریغ و همکاران ترکیب‌هایی هم‌چون فلاونوئیدها، ساپونین‌ها، تانین‌ها، آلکالوئیدها و به‌خصوص ترکیب‌های فنولی از عصاره الکلی برگ گیاه جداسازی و شناسایی شده است (۲۴). بر اساس مطالعه‌های انجام شده در بین ترکیب‌های گیاه خرزهره اولئاندرین (Oleandrin) و نرئین از مهم‌ترین سموم گیاهی شناخته شده‌اند که در مقادیر بالاتری در برگ‌های گیاه وجود دارند و اثرهای ضد باکتریایی گیاه به آن‌ها نسبت داده می‌شود (۲۵، ۲۷). نتایج این پژوهش تجربی نشان داد عصاره اتانولی برگ گیاه دارویی خرزهره اثر مهاری قابل قبولی روی باکتری *سالمونلاتیفی* داشته است ولی این اثرها بر لیستریامنوسیتوزنر ناچیز بوده است. که این امر ممکن است به علت استخراج بیش‌تر مواد موثر در خرزهره به‌وسیله اتانول است. به نظر می‌رسد که ترکیب‌های مهم و تأثیرگذار در فعالیت ضد میکروبی، نیمه‌قطبی یا غیرقطبی بوده که در حلال غیرقطبی مانند اتانول حلالیت بیش‌تری دارند (۲۸). نتایج این مطالعه نشان داد که میزان درصد استحصال عصاره (وزن خشک عصاره) هنگامی که از حلال اتانول ۹۶ درجه استفاده شد به میزان ۷ درصد بیش‌تر از زمانی بود که از آب به‌عنوان حلال استفاده شد لذا این اختلاف ۷ درصد وزن خشک را می‌توان دلیلی برای اثر بازدارندگی بیش‌تر عصاره اتانولی ذکر نمود. تحقیق‌های مشابهی در این زمینه بر روی تعدادی از گیاهان دارویی نیز انجام شده که تئوری ذکر شده را تأیید می‌کند. به‌عنوان مثال افشاریان و همکاران (۲۹) اثر ضد میکروبی عصاره‌های آبی و اتانولی هویج فرنگی و کلم برگ قرمز را بر روی دو گونه میکروبی *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیاکلی* در شرایط آزمایشگاهی بررسی کردند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که افزایش فعالیت ضد میکروبی هویج فرنگی و کلم برگ قرمز رابطه مستقیمی با نوع حلال دارد، به نحوی که حلال اتانول باعث بالا رفتن وزن خشک عصاره هویج فرنگی و کلم برگ قرمز شده و وزن خشک عصاره را تا ۶ درصد بالاتر می‌برد این محققان نشان دادند که عصاره‌های اتانولی هویج فرنگی و کلم برگ قرمز نسبت به عصاره‌های آبی دارای

فعالیت و بازدارندگی بیش‌تری بر روی هر دو سوش مورد بررسی است. به‌طور کلی باکتری‌های گرم مثبت نسبت به عصاره‌های گیاهی حساس‌تر از باکتری‌های گرم منفی هستند (۳۰)، که این پدیده ممکن است به علت تحمل ذاتی گرم منفی‌ها و ماهیت و ترکیب‌های گیاهی باشد. مطالعه‌های مختلف نشان داده است که دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی در مقابل بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها، ترکیب‌های شیمیایی ضد میکروبی و حتی بسیاری از داروهای گیاهی حساسیت زیادی دارند (۳۱، ۳۲). در یک مطالعه نشان داده شد که باکتری‌های گرم منفی نسبت به عوامل شیمیایی مقاوم‌تر از انواع گرم مثبت هستند (۳۳). در مطالعه هامون نورد و همکاران دیده شده که عصاره آبی برگ و گل گیاه دارویی خرزهره روی *استافیلوکوکوس اورئوس* اثر مهاری خوبی از خود نشان می‌دهد (۳۴). هم‌چنین در مطالعه رخشنده و همکاران در جهت بررسی اثر ضد میکروبی و ضدقارچی عصاره‌های آبی، الکلی و کلرفرمی اندام‌های هوایی گیاه خرزهره بر روی میکروارگانیسم‌های بیمارستانی و استاندارد از قبیل *استافیلوکوک طلایی* کوآگولاز مثبت، *سودوموناس آئروژینوزا* و *کاندیدا آلبیکانس*، نشان دادند عصاره کلرفرمی، فاقد اثر ضد میکروبی و ضدقارچی بوده ولی عصاره‌های آبی در روش رقت آگار، دارای اثرهای ضد میکروبی و ضدقارچی بودند که عصاره متانولی با غلظت کم‌تر اثرهای ضد میکروبی و ضدقارچی بیش‌تری از عصاره آبی نشان داد (۳۵). درحالی که در این مطالعه مشخص شد بیش‌ترین اثر بازدارندگی مربوط به عصاره اتانولی خرزهره و بر روی باکتری گرم منفی *سالمونلاتیفی* بوده است. نتایج تحلیل آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) نشان داد که با افزایش غلظت عصاره اتانولی خرزهره قطر هاله عدم رشد به‌طور معنی‌داری در سطح $P < 0.05$ افزایش یافت. هم‌چنین بر اساس نتایج حاصل از مقایسه دو به دو میانگین‌ها با کمک آزمون چند دامنه‌ای دانکن، وجود یا عدم وجود تفاوت معنی‌دار میانگین قطر عدم رشد غلظت‌های مختلف را می‌توان به مقدار ماده مؤثر موجود در عصاره‌ها نسبت داد. ولی به‌طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که با افزایش غلظت عصاره‌های آبی و اتانولی برگ گیاه خرزهره میزان قطر هاله عدم رشد افزایش پیدا می‌کند. در مطالعه حاضر اثر عصاره‌های اتانولی و آبی گیاه خرزهره بر روی لیستریامنوسیتوزنر و *سالمونلاتیفی* بررسی شد. درحالی که در برخی مطالعه‌ها خواص ضد میکروبی عصاره برگ گیاه خرزهره با روش‌های استخراج متفاوت بر روی تعدادی از باکتری‌ها بررسی شده است (۳۴). هم‌چنین اثرهای ضدقارچی و

رازیانه اثر کشندگی قابل ملاحظه‌ای بر روی آفت‌های گیاهی دارند (۳۸،۴۰) و علیرغم پتانسیل بالای اسانس‌های گیاهی در کنترل آفت‌ها، مشکل‌هایی مانند فرار بودن اسانس‌های گیاهی، حلالیت کم در آب و ظرفیت اکسیداسیونی بالای آن‌ها سبب شده است که استفاده کاربردی از آن‌ها با محدودیت‌هایی همراه باشد (۴۱). به‌نظر می‌رسد دستیابی به دانش فنی مطلوب در جهت بهبود و توسعه فرموله کردن اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی می‌تواند این محدودیت‌ها را تا حد زیادی مرتفع نماید.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به‌دست آمده از آنالیز واریانس یک‌طرفه می‌توان گفت با افزایش غلظت عصاره اتانولی برگ گیاه خرزهره، هاله بازدارندگی به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد. همچنین، مشاهده شد عصاره اتانولی برگ گیاه خرزهره در مقایسه با عصاره آبی اثر بازدارندگی بیشتری روی باکتری‌های مورد مطالعه دارد. به‌نظر می‌رسد که با بررسی‌های بیشتر روی ترکیب‌های مؤثره در اجزا بتوان ساختار این ترکیب‌ها را مشخص نمود که در مراحل بعد با آگاهی از ساختار آن‌ها به‌طور دقیق‌تر روی مکانیسم احتمالی این ترکیب‌ها در ایجاد اثرهای هم‌افزایی با آنتی‌بیوتیک‌ها بحث کرد.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از مدیریت و کارکنان مجتمع تحقیقاتی، تولیدی و آزمایشگاهی زیست فرآورد پارس که با فراهم نمودن امکانات و وسایل و تجهیزات لازم نویسندگان این مقاله را یاری نمودند؛ نهایت تقدیر و تشکر را دارند.

ضدمیکروبی عصاره‌های مختلف این گیاه بر پاتوژن‌های گیاهی مشخص شده است (۲۴). با این حال تأثیر عصاره آبی و اتانولی برگ گیاه خرزهره به‌صورت مجزا بر گونه‌های مورد مطالعه انجام نشده است. همچنین لازم است برای تأیید فعالیت زیستی ترکیب‌های موجود در گیاه تحقیق‌های بیشتری صورت گیرد. بر اساس نتایج مطالعه حاضر می‌توان گفت عصاره اتانولی گیاه خرزهره می‌تواند در درمان‌های سنتی مورد استفاده قرار گیرد و اثرهای ضدمیکروبی قابل قبولی از خود نشان دهد. در مطالعه Tannua و همکاران عصاره اتانولی گیاه خرزهره نسبت به سایر عصاره‌ها فعالیت ضد میکروبی بیشتری علیه باکتری‌های مورد آزمایش نشان داده است (۳۷). همچنین در یک مطالعه عصاره اتانولی برگ گیاه خرزهره نسبت به عصاره اتانولی گیاه ریحان (*Ocimum basilicum* L.) اثر قوی‌تر و طیف وسیع‌تری از فعالیت ضدمیکروبی داشته است (۲۴). نتایج این تحقیق حاکی از این واقعیت است که عصاره‌های گیاهی دارای مواد ضدمیکروبی مناسبی است که می‌توان از آن‌ها به‌عنوان یک‌پایه دارویی یا یک داروی گیاهی مناسب برای مبارزه با میکروارگانیسم‌ها استفاده کرد. لذا پیشنهاد می‌شود با آنالیز و شناسایی ترکیب‌های مؤثره کارهای تکمیلی با هدف بررسی این ترکیب‌ها بر روی قارچ‌ها و در نهایت در مدل حیوانی مورد توجه قرار گیرد. همچنین پیشنهاد می‌شود با مطالعه بر روی فرمولاسیون و افزودن عصاره این گیاه به عنوان یک عامل ضدمیکروبی قابل قبول در برخی از محصولات غذایی نسبت به افزایش ماندگاری محصولات غذایی با کیفیت بالا گام مؤثری برداشت. تحقیق‌های انجام شده در رابطه با اسانس‌های گیاهی نشان می‌دهد که اسانس گیاهانی مانند رزماری، نعنای فلفلی، آویشن، پونه، زیره سبز و

جدول ۱ - میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری‌های منتخب در حضور عصاره‌های آبی و اتانولی خرزهره برحسب میلی‌متر به روش انتشار درآگار

نوع عصاره	میکروارگانیسم	غلظت عصاره (mg/ml)							
		۵	۱۰	۱۵	۲۰	۲۵	۳۰	۳۵	۴۰
اتانولی	لیستریا	۲/۶±۰/۱۲	۴/۶±۰/۲۸	-	-	-	-	-	-
	منوسیتوزن	-	-	-	-	-	-	-	-
	سالمونلا تیفی	۱۱/۶۰±۰/۴۲	۱۴/۰۶±۰/۲۸	۱۵/۱±۰/۵۳	۱۶/۸±۰/۲۸	۱۷/۱±۰/۵۷	۱۸/۳±۰/۳۴	۲۰/۰±۰/۲۸	۲۲/۲±۰/۳۵
آبی	لیستریا	۴/۰±۰/۳۸	۶/۲±۰/۰۶	-	-	-	-	-	-
	منوسیتوزن	-	-	-	-	-	-	-	-
	سالمونلا تیفی	۶/۶±۱/۱۸	۷/۴۰±۰/۵۷	۸/۶±۰/۳۴	۹/۲±۰/۱۵	۱۱/۸±۰/۵۲	۱۳/۶±۰/۵۰	۱۴/۰±۰/۶۲	۱۴/۲±۰/۸۶

علامت (-) نشان‌دهنده عدم وجود فعالیت ضدمیکروبی عصاره آبی و اتانولی خرزهره هست.

غلظت عصاره (mg/ml)									سویه های میکروبی	نوع عصاره
۲	۴	۸	۱۶	۳۲	۶۴	۱۲۸	۲۵۶	کنترل		
-	-	+	+	+	+	+	+	-	لیستریا منوسیتوژنز	اتانولی
-	-	-	-	-	-	+	+	-	سالمونلا تایفی	
	+	+	+	+	+	+	+	-	لیستریا منوسیتوژنز	آبی
-	-	-	-	-	+	+	+	-	سالمونلا تایفی	

جدول ۲ - حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) عصاره های اتانولی و آبی برگ گیاه خرزهره بر روی لیستریا منوسیتوژنز و سالمونلا تیفی

-: رشد +: عدم رشد

جدول ۳ - حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره های اتانولی و آبی برگ گیاه خرزهره بر روی لیستریا منوسیتوژنز و سالمونلا تیفی

غلظت عصاره (mg/ml)									سویه های میکروبی	نوع عصاره
۲	۴	۸	۱۶	۳۲	۶۴	۱۲۸	۲۵۶	کنترل		
-	+	+	+	+	+	+	+	-	لیستریا منوسیتوژنز	اتانولی
-	-	-	-	-	-	-	+	-	سالمونلا تیفی	
-	+	+	+	+	+	+	+	-	لیستریا منوسیتوژنز	آبی
-	-	-	-	-	-	+	+	-	سالمونلا تیفی	

-: رشد +: عدم رشد

منابع

- 1- Zargari, A., Medicinal Plants, Vol1, 5th edn. Tehran University Publications: Tehran, 1990. P. 43-44.
- 2- Duffy, C. F., et al., Effects of dietary supplementation with *Yucca schidigera* Roetzl ex Ortgies and its saponin and non-saponin fractions on rat metabolism. Journal of agricultural and food chemistry, 2001.49(7): p. 3408-13.
- 3- Cowan, M.M., Plant products as antimicrobial agents. Clinical microbiology reviews, 1999. 12(4): p. 564-82.
- 4- Jalali, N.M., et al., In vivo antibacterial effects of garlic aqueous extract on *Salmonella typhimurium* infected rabbits. 2008. p. 453-457.
- 5- Begum, S., Sultana, R., and Siddiqui, B.S., Triterpenoid from the leaves of *Nerium oleander*. Phytochemistry, 1997. 44(2): p. 329-332.
- 6- Al-Farwachi, M.I., In vivo and in vitro Immunodulatory Activities of *Nerium oleander* Aqueous Leaf Extract in Rabbits. J Anim Vet Adv, 2007.14: p.1047-50.
- 7- Jeong, S.E., et al., Effects of the sap of the common oleander *Nerium indicum* (Apocyanaceae) on male fertility and spermatogenesis in the oriental tobacco budworm *Helicoverpa assulta* (Lepidoptera, Noctuidae). Journal of Experimental Biology, 2001. 204(22): p. 3935-42.
- 8- Langford, S.D., and Boor, P.J., Oleander toxicity: an examination of human and animal toxic exposures. Toxicology, 1996.109(1): p. 1-13.
- 9- Smith, J. A., et al., Inhibition of export of fibroblast growth factor-2 (FGF-2) from the prostate cancer cell lines PC3 and DU145 by Anvirezal and its cardiac glycoside component, oleandrin. Biochemical pharmacology, 2001.62(4): p4. 69-472.
- 10- Siddiqui, B.S., et al., Cardenolides from the methanolic extract of *Nerium oleander* leaves possessing central nervous system depressant activity in mice. Journal of natural products, 1997.60(6): p. 540-544.
- 11- Pathak, S., et al., AnvirezalTM, an extract of *Nerium oleander*, induces cell death in human but not murine cancer cells. Anti-cancer drugs, 2000. 11(6): p. 455-463.
- 12- Zia, A., et al., Studies on the constituents of the leaves of *Nerium oleander* on behavior pattern in mice. Journal of ethnopharmacology, 1995.49(1): p. 33-39.
- 13- Davidson, P.M., Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In: Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ, editors. Food microbiology fundamentals and frontiers. 2nd ed. Washington, DC: ASM Press, 2001: p. 593-628.
- 14- Jacquet, C., et al., La listériose humaine en France en 1991, 1992 et 1993. Bull. Epidemiology. Hebdom, 1994. 28: p.123-125.
- 15- Abbasi, N., et al., A Comparative Study of the Antimicrobial Effect of *Scrophularia striata* Boiss. Extract and Selective Antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Medicinal Plants, 2007.1(21): p. 10-18.
- 16- Babayi, H., et al., The antimicrobial activities of methanolic extracts of *Eucalyptus camaldulensis* and *Terminalia catappa* against some pathogenic microorganisms. Biokemistri, 2004.16(2): p. 106-11.
- 17- Andrews, J. M., and BSAC Working Party on Susceptibility Testing, F. T. BSAC standardized disc susceptibility testing method. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2001. 48(suppl_1): p. 43-57.
- 18- Sindambiwe, J.B., et al., Screening of seven selected Rwandan medicinal plants for antimicrobial and antiviral activities. J Ethnopharmacology, 1999. 65(1): p. 71-7.
- 19- Espinel-Ingroff, A., et al., Testing conditions for determination of minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for *Aspergillus* spp.: NCCLS collaborative study. J Clin Microbio, 2002. 40(9): p. 3204-8.
- 20- Amin, GH., Traditional pharmaceutical plants of Iran. Iranian Ministry of Health & Medical Education Publications, Tehran. 1991: p. 8-10.
- 21- Barnes, P.M., et al., "Complementary and alternative. Medicine use among adults: United States, 2002," Advance data, 2004. 343: p. 1-19
- 22- Islam, S., et al., .2010. In vitro antibacterial activity of methanol seed extract of *elettaria cardamomum* (L.) maton. Agri Conspec Sci, 2010. 75(3): p.113-7.

- 23- Matu, E.N., van Staden, J., Antibacterial and anti-inflammatory activities of some plants used for medicinal purposes in Kenya. J Ethnopharmacol, 2003. 87(1): p. 35-41.
- 24-Bidarigh, S., et al., Antimicrobial (screening) properties of various plant extracts from *Ocimum basilicum* L. and *Nerium oleander* L. against fungal common rots of potato in vitro bioassay. J Basic Appl Sci Res, 2012. 7: p. 6810-5.
25. Goktas, O., et al., Application of extracts from the poisonous plant, *Nerium Oleander* L., as a wood preservative. Afr J Biotechnol, 2010. 6(17): p. 2000-3.
26. Jawarkar, A., et al., Brief review on medicinal potential of *Nerium indicum*. Int J Inst Pharm Life Sci, 2012. 2(2): p. 521-7.
27. Zibbu, G., Batra, A., A review on chemistry and pharmacological activity of *Nerium oleander* L. J Chem Pharm Res, 2010. 2(6): p. 351-8
- 28-Mahzooni-Kachapi, S.S., et al., The effect of altitude on chemichal composition and function of essential oils in *Stachys lavandulifolia* Vahl. (Iran). Int J Med Arom Plants, 2014. 4(2): p. 107-6.
- 29-Afsharian, S.H., Study of antimicrobial effects of aqueous and ethanolic extracts of *Brassica oleracea* and *Daucus carota* against *Staphylococcus aureus* PTCC 1337 *Escherichia coli* PTCC 1330 "in vitro". MSc Thesis. 2014. Ferdowsi University of Mashhad.
- 30-Bayoub, K., et al., Antibacterial activities of the crude ethanol extracts of medicinal plants against *Listeria monocytogenes* and some other pathogenic strains. African Journal of Biotechnology, 2010. 9(27): p. 4251-8.
- 31- McDonnell, G., Russell, A.D., Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. Clinical microbiology reviews, 2001. 14(1): p. 227.
- 32- Schlievert, P.M., et al., Effect of glycerol monolaurate on bacterial growth and toxin production. Antimicrobial agents and chemotherapy, 1992. 36(3): p. 626-31.
- 33- Mazzola, P.G., Martins, A.M., and Penna, T.C., Chemical resistance of the gram-negative bacteria to different sanitizers in a water purification system. BMC infectious diseases, 2006. 6(1): p. 131.
- 34- Hamoonnavard, S., et al., Evaluation of *Nerium oleander* aqueous extract effect on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermis*. Journal of Shahrekord University of Medical Sciences, 2013. 15(1): p.46-56.
- 35- Rakhshandeh, H., et al., Antimicrobial effect of different extracts of *Nerium oleander* L on standard and clinically isolated microorganism. Koomesh, 2004. 6(1): p.37-42.
- 36- Hussain, M.A., et al., Antimicrobial activity of *Nerium oleander* Linn. Asian J Plant Sci, 2004. 3(2): p. 177-80.
- 37- Tannu, G., et al., Anti-microbial activity of *Nerium oleander* stem extract. International Journal of Pharma Professional's Research Article, 2011. 2(1): p. 210-1.
- 38- Floris, I., et al., Comparison between two thymol formulations in the control of *Varroa destructor*: effectiveness, persistence, and residues. Journal of economic entomology, 2004. 97(2): p. 187-91.
- 39- Delaplane, K.S., Controlling tracheal mites (Acari: Tarsonemidae) in colonies of honey bees (Hymenoptera: Apidae) with vegetable oil and menthol. Journal of economic entomology, 1992. 85(6): p. 2118-24.
- 40- Araújo, M.J., et al., Acaricidal activity and repellency of essential oil from *Piper aduncum* and its components against *Tetranychus urticae*. Experimental and applied acarology. 2012. 57(2): p. 139-55.
- 41- Moretti, M.D., et al., Essential oil formulations useful as a new tool for insect pest control. AAPs PharmSciTech, 2002. 3(2): p. 64-74.

