مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره هشتم، شماره سی و یکم - تابستان ۱۳۹۷

Research Article
مقاله تحقیقی

بررسی اثربخشی فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌های آبی و اتانولی برگ گیاه خرزهره (*Nerium oleander*) در مقابل سویه‌های استاندارد *سالمونلا تیفی* و *لیستریا منوسیتوژنز* در شرایط آزمایشگاهی

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

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

چکیده

سابقه و هدف: مقاومت آنتی‌بیوتیکی، زمینه را برای جایگزین نمودن روش‌های درمانی گیاهی دارای عوارض جانبی کم‌تر نسبت به داروهای رایج فراهم نموده است. این مطالعه باهدف تعیین اثر ضد میکروبی گیاه خرزهره (*Nerium oleander*) بر باکتری‌های *سالمونلا تیفی* و *لیستریا منوسیتوژنز* انجام‌شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی برگ‌های گیاه خرزهره از محل مرکز تحقیقات گل و گیاه استان گیلان شهر لاهیجان جمع‌آوری و پس از عصاره‌گیری، اثر ضدباکتریایی عصاره‌های آبی و اتانولی گیاه علیه دوسویه استاندارد *سالمونلا تیفی* PTCC 1609 و *لیستریا منوسیتوژنز* PTCC 1295 مورد ارزیابی قرار گرفت. فعالیت ضدمیکروبی، حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره‌ها با استفاده از تکنیک رقت‌های سریال در آبگوشت و انتشار در آگارتعیین شد.

یافته‌ها: در روش انتشار در آگار همه غلظت‌های عصاره اتانولی گیاه خرزهره بر روی *سالمونلا تیفی* اثر بازدارندگی داشت، بااین‌وجود، اثرهای مهاری عصاره اتانولی آن در مقایسه با عصاره آبی به‌مراتب بالاتر بود. کم‌ترین غلظت بازدارندگی عصاره اتانولی ۱۲۸ mg/ml و حداقل غلظت کشندگی ۲۵۶ mg/ml تعیین شد. عصاره‌های آبی و اتانولی این گیاه بر روی سویه استاندارد *لیستریا منوسیتوژنز* اثری نداشت.

بحث: به‌نظر می‌رسد عصاره‌های اتانولی و آبی گیاه خرزهره در شرایط آزمایشگاهی دارای اثر ضد میکروبی قابل ملاحظه‌ای بر روی باکتری گرم منفی *سالمونلا تیفی* است. بنابراین می‌توانند به‌عنوان ترکیب‌های دارویی و یا نگه‌دارنده مفید باشند.

واژه‌های کلیدی : اثر ضد میکروبی، *Listeria monocytogenes* ، *Salmonella Typhi*

مقدمه

مطالعه‌های انجام‌شده در دنیا حاکی از آن است که عصاره بسیاری از گیاهان توانایی مهار رشد میکروارگانیسم‌ها را دارند و به این لحاظ گیاهان دارویی به‌عنوان عوامل ضدمیکروبی کاربردهای زیادی پیدا نموده‌اند (۱). وجود ترکیب‌های فعال از لحاظ بیولوژیک در میان گیاهان دارویی منجر به استفاده از آن‌ها به‌عنوان داروهای گیاهی، مکمل‌های غذایی، غذاهای هدفمند و بسته‌بندی مواد غذایی شده است. گیاهان هم‌چنین در دارو درمانی بیماری‌های مختلفی نظیر افزایش فشارخون، کلسترول، اگزما و اسهال برای قرن‌ها استفاده شده‌اند و امروزه نقش آن‌ها به دنبال شناسایی و جداسازی ترکیب‌های فیتوشیمیایی فعال بیولوژیک نشان داده‌شده است (۲). این ترکیب‌های متابولیت‌های ثانویه‌ای هستند که به چندین زیرگروه از مواد فعال زیستی گیاهی نظیر آنتی‌اکسیدان‌ها، ترکیب‌های ضدمیکروبی، ضدویروسی، ضدسرطان و غیره تقسیم می‌شوند (۳). آنتی‌بیوتیک‌ها با حذف یا توقف تکثیر میکروب‌ها با عامل بیماری‌زا مقابله می‌کنند. ایجاد عوارض جانبی جبران‌ناپذیر و بروز و انتشار مقاومت دارویی در بین میکروب‌ها از جمله مشکل‌های اساسی کاربرد آنتی‌بیوتیک‌ها

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

است. بنابراین استفاده از درمان‌های جدید و یا استفاده از داروهای گیاهی با عوارض کم‌تر ضروری به نظر می‌رسد (۴). گیاه خرزهره بانام علمی *Nerium oleander* گیاهی است چندساله، پر شاخه، سمی و همیشه‌سبز از راسته گل‌سپاسی‌سانان[۱]، تیره‌ی خرزهرگان[۲] که به‌صورت بوته‌ای و یا درخت‌چه‌ای می‌روید. این گیاه که بومی مناطق مدیترانه‌ای است، به‌عنوان گیاه زینتی در بسیاری از نقاط دنیا کاشته می‌شود (۵). برگ‌های آن سبز تیره با قوامی چرمی و رگبرگ‌های واضح، باریک، نیزه‌ای کشیده به طول ۱۰ تا ۲۰ سانتی‌متر هستند. تمام قسمت‌های 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 مطالعه‌های مختلف اثرهای درمانی این گیاه هم‌چون اثرهای ضدسرطانی، ضداسترس، ضدالتهابی و ضددردی، تعدیل‌کنندگی سیستم ایمنی هم‌چنین اثر بر روی مراحل اسپرماتوژنز نشان داده‌شده است (۶،۱۲). باکتری‌ها از شایع‌ترین عوامل ایجاد مسمومیت‌ها و عفونت‌های غذایی هستند. در این میان سالمونلا میکروارگانیسمی است که از طریق آب و غذای آلوده وارد دستگاه گوارش می‌شود و به سطح سلول‌های اپی‌تلیوم مخاط روده متصل می‌گردد. سپس در واکوئل‌های درون این سلول‌ها و گاهی نیز در بین اتصال‌های میان سلولی وارد می‌شود. باکتری در محل ورود تکثیر می‌شود و چون توانایی عبور از لامینا پروپریا را دارد ازآنجا به گردش خون وارد می‌شود و به تمام قسمت‌های بدن منتشرشده و بخش‌های مختلف سیستم لنفاوی را آلوده می‌کند. در ماکروفاژها و سیستم رتیکلو اندوتلیال وارد شده و به تکثیر خود ادامه می‌دهد. یکی از بیماری‌ها که از طریق سالمونلا ایجاد می‌شود 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 می‌کند. بیماران مسن‌تر یا افرادی که مستعد هستند و ایمنی سلولی آن‌ها پایین است، مانند گیرندگان پیوند اعضاء، مبتلایان به لنفوم و ایدز به‌طور مشخص مستعد بیماری هستند (۱۴). این مطالعه باهدف ارزیابی و مقایسه فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌های آبی و اتانولی برگ گیاه خرزهره بومی استان گیلان علیه برخی از میکروارگانیسم‌های شاخص عفونت و مسمومیت در شرایط آزمایشگاهی طراحی و اجراشده است.

روش کار

جمع‌آوری گیاه

در این مطالعه تجربی برگ‌های گیاه خرزهره از محل مرکز تحقیقات گل و گیاه شمال ایران واقع در شهر لاهیجان در طی آبان ماه ۱۳۹۵ جمع‌آوری گردید. شناسایی و تأیید نام علمی گیاه با استفاده از کلیدهای شناسایی توسط متخصص گیاه‌شناسی و هماهنگی‌های لازم با هرباریوم و آزمایشگاه سیستماتیک گیاهی دانشکده علوم پایه و دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی لاهیجان صورت پذیرفت. برگ‌ها در شرایط دمای اتاق و در سایه خشک و با استفاده از آسیاب مدل WARINGجهت عصاره‌گیری به‌صورت پودر آماده تهیه شدند.

تهیه عصاره

برای تهیه عصاره آبی به ازاء هر گرم پودر ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل در بشر ریخته و پس از جوش آمدن، پودر گیاه را اضافه نموده و به‌مدت ۱۵ دقیقه جوشانده شد، عصاره به‌دست آمده، به‌منظور 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 میلی‌پور مدل GSWP آمریکا) با فیلترهای ۰/۴۵ میکرون در غلظت‌های مختلف به‌روش چاهک دیفیوژن- پلیت مورد آزمایش ضدمیکروبی قرار گرفت. برای تهیه عصاره اتانولی، ۱۰۰ گرم از پودر خشک شده گیاه با ۵۰۰ سی‌سی اتانول ۸۰ درصد مخلوط و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق (۲۲ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شد و پس از حذف حلال توسط دستگاه روتاری، عصاره الکلی به‌دست آمده در دمای ۳۷ درجه سانتی-گراد در انکوباتور به‌صورت پودر در آمد. پس از آن مقدار ۱ گرم از پودر عصاره الکلی گیاه را به ۵ سی‌سی از حلال دی-

---

۱ Gentianales

۲ Apocynaceae

۳ Cardiac glycoside

۴ meningitis Primary

متیل سولفاکساید[۸] اضافه نموده و به‌وسیله فیلتراسیون استریل گردید (۱۵). جهت استاندارد کردن روش و تکرارپذیری و به‌منظور مقایسه و ارزیابی اثر ضدمیکروبی عصاره‌های استخراج‌شده به‌وسیله آب مقطر و اتانول، وزن خشک عصاره‌ها تعیین شد. بدین طریق که برای هرکدام از عصاره‌ها یک لوله‌آزمایش خالی توسط ترازوی دیجیتالی حساس وزن شد سپس از عصاره تغلیظ شده ۱ میلی‌لیتر به لوله اضافه و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۶۰ درجه سانتی‌گراد، عصاره‌ها به‌طور کامل خشک شد. لوله‌ها دوباره توزین و باکم کردن وزن لوله‌های خالی میانگین وزن خشک عصاره‌های آبی و اتانولی تعیین شد (۱۶).

باکتری‌های مورد استفاده در تحقیق

سویه‌های میکروبی مورد استفاده در این پژوهش شامل *سالمونلا تیفی* PTCC 1609 و *لیستریا منوسیتوژنز* PTCC 1295 بودند که از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی و عفونی سازمان علمی پژوهشی و صنعتی ایران‌بخش بیوتکنولوژی به‌صورت آمپول لیوفیلیزه خریداری شد. کدورت نمونه‌های میکروبی پس از تلقیح به سرم فیزیولوژی سترون با لوله ۰/۵ مک فارلند[۹] برابر با (CFU /ml) $۱/۵\times۱۰^{۸}$ (Colony forming unit) مقایسه شد و به‌عنوان کشت تلقیح مورد استفاده قرارگرفت.

بررسی اثر ضد میکروبی

اثر ضد میکروبی عصاره‌های 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 محیط‌ها کشت داده شد سپس دیسک‌های کاغذی (جنس صافی واتمن و به قطر۶ میلی‌متر) با غلظت‌های ۵ mg/ml ، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ ، ۳۰، ۳۵ و ۴۰ عصاره‌ها 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 گرم‌خانه‌گذاری به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با استفاده از خط-کش به‌طور دقیق قطر هاله عدم رشد برحسب میلی‌متر اندازه-گیری شد. تمامی آزمایش‌ها با ۳ تکرار انجام گرفت. در تعیین MIC و MBC بر اساس وزن خشک عصاره الکلی مقادیر ۸۶۰µg/ml از پودر خشک شده عصاره به‌عنوان MIC و MBC به‌دست آمد. به‌منظور تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد[۱۰] (MIC) از روش تهیه رقت در براث (ماکرو دایلیوشن) طبق دستورالعمل CLSI[۱۱] استفاده شد. دراین مطالعه از آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین (۳۰mg) به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. برای تعیین MIC برای هر عصاره از یک سری ۷ تایی لوله‌آزمایش استریل استفاده شد، ۶ لوله برای آزمایش رقت‌های مختلف هر عصاره و یک لوله نیز به‌عنوان کنترل به‌کار رفت. کنترل مثبت حاوی سوسپانسیون میکروبی و محیط مولرهینتون براث و کنترل منفی حاوی سوسپانسیون میکروبی و آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین بود. بلافاصله پس از کشت تمام لوله های آزمایش به مدت ۲۴ ساعت دردما ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شدند. پس از گرم‌خانه‌گذاری لوله‌ها از نظر کدورت ناشی از رشد باکتری‌های تلقیح شده مورد بررسی قرارگرفتند، پایین‌ترین غلظتی که در آن کدورتی مشاهده نگردید و به‌طورکامل شفاف بود، به‌عنوان MIC در نظر گرفته شد (۱۸). حداقل غلظت کشندگی[۱۲] (MBC) با استفاده از روش رقت لوله‌ای برای عصاره‌های آبی و اتانولی خرزهره تعیین گردید. برای تعیین MBC برای هر عصاره از یک‌سری ۹ تایی لوله آزمایش استریل استفاده شد، ۸ لوله برای آزمایش رقت‌های مختلف از هر عصاره و یک لوله نیز به‌عنوان کنترل به‌کار رفت. پس از کشت تمام لوله‌های آزمایش به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شدند. از تمام لوله‌هایی که هیچ رشدی در آن‌ها مشاهده نشده بود نمونه‌برداری و جهت تعیین MBC به روش Pour Plate Method کشت داده شد. لوله‌ای که حاوی کم‌ترین غلظت عصاره بود و در پلیت مربوط به آن هیچ رشدی مشاهده نشده بود به‌عنوان MBC در نظر گرفته شد این روش برای هر دو عصاره آبی، اتانولی و هر میکروارگانیسم ۳ بار تکرار گردید (۱۹).

محاسبه‌های آماری

دراین بررسی تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده نرم افزار آماری SPSS نسخه ۱۸ انجام شد. به‌منظور دست‌یابی به نتایج آماری دقیق‌تر هر آزمون با سه بار تکرار انجام شد و از آزمون آنالیز واریانس، تی مستقل، دانکن و منویتنی برای مقایسه

[۸] DMSO

[۹] McFarland

[۱۰] Minimum inhibition concentration

[۱۱] Clinical and laboratory standards institute

[۱۲] Minimum Bacterial concentration

میانگین ها استفاده گردید و اختلاف بین گروه ها در سطح معنی دار P<۰/۰۵ تعیین شد.

یافته‌ها

در این مطالعه از غلظت‌های ۵ ، ۱۰ ، ۱۵ ، ۲۰ ، ۲۵ ، ۳۰ ، ۳۵ و ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره‌های اتانولی و آبی به‌منظور سنجیدن قطر هاله عدم رشد باکتری‌های *لیستریا مونوسیتوژنز* و *سالمونلا تیفی* استفاده شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که اثر ضدمیکروبی عصاره اتانولی برگ خرزهره وابسته به غلظت بوده و همراه با افزایش غلظت عصاره قطر هاله بازدارندگی به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد. این مطالعه نشان دادکه نوع باکتری و غلظت عصاره بر روی قطر هاله عدم رشد مؤثر است به‌طوری‌که قطر هاله بازدارندگی عصاره اتانولی در غلظت ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بیش‌ترین میزان تأثیرگذاری را بر روی باکتری *سالمونلاتیفی* داشته و از رشد آن روی محیط کشت جلوگیری به‌عمل آورده است (P<۰/۰۰۱). کم-ترین میزان حساسیت در ارتباط با باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* معادل ۶/۲۸ ±۴/۰ به‌دست آمد (جدول ۱). یافته‌های این مطالعه نشان داد که اثر مهاری 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 ۱۰میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثر مهاری ضعیفی بر باکتری *لیستریا منوسیتوژنز* نشان دادند و در سایر غلظت‌ها هیچ‌گونه اثر بازدارندگی مشاهده نشد (P<۰/۰۰۱). نتایج حاصل از حداقل غلظت بازدارندگی عصاره‌های آبی و اتانولی خرزهره در جدول ۱ آورده شده است. مقایسه دوبه‌دو 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 معنی‌دار است (P<۰/۰۰۱). هم‌چنین مشخص شد که میانگین قطر هاله عدم رشد *لیستریا مونوسیتوژنز* در غلظت‌های ۵ و ۱۰ عصاره‌های اتانولی و آبی اختلاف معنی‌دار ندارند (P<۰/۰۰۱). 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* ۱/۲۸ ± ۱۶/۸و *سالمونلا تیفی* ۰/۳۸ ± ۲۰ میلی‌متر 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 *سالمونلاتیفی* 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 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر باعث مهار رشد (MIC) و در رقت ۲۵۶میلی‌گرم بر میلی‌لیتر باعث مرگ (MBC) باکتری *سالمونلاتیفی* شد. عصاره آبی مورد استفاده نیز در رقت ۶۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر باعث مهار رشد (MIC) و در رقت ۱۲۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر باعث مرگ (MBC) باکتری *لیستریامنوسیتوژنز* شد. غلظت‌های نهایی استفاده شده در MIC و MBC به‌ترتیب ۱۲۸ و ۲۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تعیین شد.

بحث

وجود خواص ضدعفونی‌کنندگی 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 توسعه‌یافته، کم و بیش برای درمان از گیاهان دارویی استفاده می‌نمایند (۲۱). وجود ترکیب‌های ثانویه درگیاهان دارویی سبب شده که در بررسی‌های اخیر توجه ویژه‌ای را به‌خود جلب کنند. به‌ویژه وجود ترکیب‌های ضدمیکروبی 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 این‌حال استفاده بیش‌از 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 به‌عنوان عصاره مؤثرتر علیه فعالیت ضدمیکروبی مورد استفاده قرارمی‌گیرد و در برخی دیگر عصاره متانولی نسبت به‌روش‌های استخراج دیگر هم‌چون عصاره آبی، عصاره هگزانولی و یا اتانولی اثرهای بازدارندگی بهتری دارد (۲۳). چنین استنباط می‌شود که اکثر ترکیب‌های شناسایی‌شده با فعالیت ضدمیکروبی از گیاهان دارویی،

[۱۳] MIC

[۱۴] MBC

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 ازگیاه که برای عصاره‌گیری استفاده شده یا تفاوت روش عصاره‌گیری و هم‌چنین تفاوت در ترکیب‌های گیاه به‌دلیل 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 فلانوئیدها، 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 ترکیباهای 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 آن ها نسبت داده می‌شود (۲۷،۲۵). 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 *لیستریامنوسیتوژنز* ناچیز بوده است.که این امر ممکن است به‌علت استخراج بیش‌تر مواد موثر در خرزهره به‌وسیله اتانول است. به‌نظر می‌رسد که ترکیب‌های مهم و تأثیرگذار در فعالیت ضدمیکروبی، 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) هنگامی‌که 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 مشابه‌ای 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 ضدمیکروبی 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 ضدمیکروبی 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. به‌طورکلی باکتری‌های گرم مثبت نسبت به عصاره‌های گیاهی حساس‌تر از باکتری‌های گرم منفی هستند (۳۰)، که این پدیده ممکن است به‌علت 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 شیمیائی ضدمیکروبی و حتی بسیاری از داروهای گیاهی حساسیت زیادی دارند (۳۱،۳۲). دریک مطالعه نشان داده شدکه 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 ضدمیکروبی 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 کلروفرمی، فاقد اثر ضدمیکربی و ضدقارچی بوده ولی عصاره-های آبی در روش رقت آگار، دارای اثرهای ضدمیکربی و ضدقارچی بودند که عصاره متانولی با غلظت کم‌تر اثرهای ضدمیکربی و ضدقارچی بیش‌تری از عصاره آبی نشان داد (۳۵). درحالی‌که 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 $P< ۰/۰۵$ 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 به‌طورکلی 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 *لیستریامنوسیتوژنز* و *سالمونلاتیفی* بررسی شد. درحالی‌که در برخی مطالعه‌ها خواص ضدمیکروبی عصاره برگ گیاه خرزهره با روش‌های استخراج متفاوت بر روی تعدادی از باکتری‌ها بررسی‌شده است (۳۴). هم‌چنین اثرهای ضدقارچی و

ضدمیکروبی عصاره‌های مختلف این گیاه بر پاتوژن‌های گیاهی مشخص‌شده است (۲۴). با این‌حال 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 می شود با آنالیز و شناسائی ترکیب‌های مؤثره کارهای تکمیلی با هدف بررسی این ترکیب‌ها بر روی قارچ‌ها و در نهایت در مدل حیوانی مورد توجه قرارگیرد. هم‌چنین پیشنهاد می‌شود با مطالعه برروی فرمولاسیون و افزودن عصاره این گیاه به عنوان یک عامل ضدمیکروبی قابل قبول در برخی از محصول‌های غذایی نسبت به افزایش ماندگاری محصول‌های غذایی با کیفیت بالا گام مؤثری برداشت. تحقیق‌های انجام شده در رابطه با اسانس‌های گیاهی نشان می دهد که اسانس گیاهانی مانند رزماری، نعناع فلفلی، آویشن، پونه، زیره سبز 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 تقدیرو تشکر را دارند.

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

نوع عصاره	میکروارگانیسم	غلظت عصاره(mg/ml)							
		۵	۱۰	۱۵	۲۰	۲۵	۳۰	۳۵	۴۰
اتانولی	*لیستریا منوسیتوژنز*	۲/۶±۰/۱۲	۴/۶±۰/۲۸	-	-	-	-	-	-
	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	۲۰/۰۰±۰/۲۸	۲۲/۲±۰/۲۵
آبی	*لیستریا منوسیتوژنز*	۴/۰۰±۰/۳۸	۶/۲±۰/۰۶	-	-	-	-	-	-
	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.

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

جدول ۲ –حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) عصاره‌های اتانولی و آبی برگ گیاه خرزهره بر روی *لیستریا مونوسیتوژنز*و *سالمونلا تیفی*

-: رشد +: عدم رشد

جدول ۳ - حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره‌های اتانولی و آبی برگ گیاه خرزهره بر روی *لیستریا مونوسیتوژنز* و *سالمونلا تیفی*

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

-: رشد +: عدم رشد

منابع

1- Zargari, A., Medicinal Plants, Vol1, 5th edn. Tehran Uni- versity Publications: Tehran, 1990. P. 43–44.
2- Duffy, C. F., et al., Effects of dietary supplementation with Yucca schidigera Roezl 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 Anvirzel 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., AnvirzelTM, 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 *Pesudomonas aeroginosa*. 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 Ethnopharmaco, 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 lavandulifulia 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.