مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۱۵، شماره ۲، تابستان ۸۴، صفحات ۹۱ تا ۹۴

Original Article

اولین بررسی فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌های آبی و متانولی گیاه Heracleum Persicum

علی ناظمی*، مهرداد هاشمی، محمدرضا خاتمی نژاد*، کامران پورشمسیان ***

* دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن
** دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پزشکی تهران

چکیده

سابقه و هدف: *ترکیبات ضدمیکروبی با منبع گیاهی دارای قابلیت درمانی بی‌شماری هستند. در این مطالعه خصوصیات ضدمیکروبی عصاره‌های آبی و متانولی میوه گیاه گلپر ایرانی Heracleum Persicum بصورت in vitro مورد مطالعه قرار گرفت.*

روش بررسی: *در این مطالعه که به صورت مداخله‌ای انجام شد، گیاه مورد نظر در تیرماه ۱۳۸۱ از ارتفاعات اشکور تنکابن (ناحیه‌ای در شمال ایران) جمع‌آوری گردید. فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌ها علیه ۱۴ گونه باکتریایی و ۲ گونه قارچی بر اساس قطر هاله ممانعت از رشد در روش سنجش انتشار دیسک (Disc Diffusion) و روش سنجش مقادیر حداقل غلظت مهاری (MIC) و حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC) مورد ارزیابی قرار گرفت.*

یافته‌ها: *عصاره آبی Heracleum Persicum فاقد اثر ضدمیکروبی علیه میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه بود، در حالیکه عصاره متانولی بر روی رشد ۵ گونه باکتریایی از جنسهای باسیلوس، استرپتوکوکوس، انتروکوکوس ونوکاردیا اثر مهاری داشت.*

نتیجه‌گیری: *عصاره متانولی گلپر ایرانی شامل مواد ضدمیکروبی با اثرات ضدباکتریایی است، پس شاید بتوان تحقیقاتی در مورد استفاده از آن در درمان بیماران عفونی انجام داد.*

واژگان کلیدی: *فعالیت ضدمیکروبی، گلپرایرانی، عصاره متانولی، حداقل غلظت مهاری، حداقل غلظت باکتری‌کشی.*

مقدمه

Heracleum Persicum یا گیاه گلپر ایرانی (که از خانواده Apiaceae است) یکی از ۱۰ گونه جنس هراکلوم در ایران است. گیاه گلپر ایرانی یک گیاه یک ساله می‌باشد که در نیمه شمالی کشور در ارتفاعات ۱۵۰۰ متر و بالاتر رشد می‌نماید. میوه آن به طور متداول در کشور به منزله چاشنی در تهیه ترشی‌جات و در طب محلی به مثابه داروی ضد نفخ به کار می‌رود (۱،۲).

اخیراً با توجه به اثرات جانبی و مقاومتی که میکروارگانیسم‌های پاتوژن علیه آنتی‌بیوتیکها کسب نموده‌اند، در پزشکی به عصاره‌ها وترکیبات با خواص بیولوژیکی گونه‌های گیاهی توجه زیادی شده است. ترکیبات ضدمیکروبی گیاهی یکی از منابع با ارزش در پزشکی به شمار می‌آیند و در نتیجه گسترش بیماریهای عفونی شناسایی تعداد بیشتری از این عصاره‌ها و ترکیبات در درمان بیماران مفید خواهد بود. ترکیبات ضدمیکروبی با منبع گیاهی دارای قابلیت درمانی بی‌شماری هستند. آنها نه تنها در درمان بیماریهای عفونی موثرند، بلکه به طور همزمان تعداد زیادی از اثرات جانبی را که اغلب با ترکیبات ضدمیکروبی همراه هستند، کاهش می‌دهند (۳). این مطالعه، خواص ضدمیکروبی عصاره‌های آبی و متانولی گیاه گلپر ایرانی بر علیه طیفی از میکروارگانیسم‌ها را بررسی می‌کند.

آدرس نویسنده مسئول: تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، علی ناظمی
(**email**: alinazemy@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۳/۱۰/۸
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸٤/۲/۲۷

مواد و روشها

در این مطالعه مداخله‌ای، گیاهان در تیرماه ۱۳۸۱ از ارتفاعات اشکور تنکابن، واقع در غرب استان مازندران در شمال کشور، جمع‌آوری گردیدند. تاکسونومیکی (taxonomiky) مواد گیاهی در بخش بیولوژی دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن شناسایی و تایید گردید. مواد گیاهی جمع‌آوری شده در سایه خشک گردید و میوه آن از ساقه گیاه جدا شد، سپس از طریق مکانیکی به پودر تبدیل گردید. از نمونه پودر شده ابتدا به وسیله غوطه‌ورسازی در متانول و سپس به وسیله آب داغ عصاره‌گیری صورت گرفت. تقریباً ۲۰۰ گرم از پودر میوه گیاه در ۶۰۰ میلی‌لیتر متانول به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق ۲۵ درجه سانتیگراد همراه با تکان‌دهی ملایم مخلوط گردید. برای عصاره‌گیری با آب داغ، ۲۰۰ گرم نمونه پودر شده در ۶۰۰ میلی‌لیتر آب به مدت ۲ ساعت جوشانده شد. هر یک از عصاره‌ها بواسطه کاغذ واتمن شماره یک فیلتر گردید. عصاره‌های فیلتر شده در دمای اتاق در جریان ثابت هوا تبخیر گردیدند و کاملا خشک شدند. عصاره خشک شده به وسیله تشعشع UV به طور شبانه استریل گردید و میزان استریل بودن آن توسط کشت دادن عصاره گیاه بر روی محیط نوترینت آگار بررسی شد. تمامی عصاره‌های خام خشک شده تا زمان آزمایش در دمای اتاق ذخیره گردیدند (۴،۵).

در مرحله بعد عصاره‌های آبی و متانولی گیاه گلپر ایرانی به طور مجزا علیه ۱۶ میکروارگانیسم آزمایش شدند (جدول ۱). میکروارگانیسم‌ها در بخش میکروبیولوژی دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، تهیه شدند. هویت ارگانیسم‌های مورد آزمایش توسط سیستم شناسایی میکروبی همین بخش تایید گردید.

برای ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی، سنجش انتشار دیسک (Disc- Diffusion assay) به صورت زیر انجام گرفت.

عصاره‌های گیاهی خشک شده در محلول دی‌متیل‌سولفوکسید (DMSO)۵۰٪ با غلظت نهایی ۵۰۰mg/ml حل گردیدند و به وسیله فیلتراسیون با فیلترهای ۰/۴۵ میکرونی استریل شدند. آزمایشهای ضدمیکروبی سپس توسط روش انتشار دیسک (۶) با استفاده از ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون شامل ۱۰۸cfu/ml باکتری، ۱۰۶cfu/ml مخمر و ۱۰۴spore/ml قارچ به ترتیب روی محیطهای مولر هینتون آگار (MHA)، سابوراد دکستروزآگار (SDA) و پوتاتو دکستروز آگار(PDA) (شرکت Merck) کشت داده شد. دیسک‌ها (به قطر ۶mm) (شرکت پادتن طب) با ۱۰ میکرولیتر از عصاره در غلظت ۵۰۰mg/ml آغشته گردید (۵mg/disc) و روی محیطهای مورد نظر قرار داده شدند. کنترل منفی با استفاده از همان محلولی که برای حل کردن عصاره‌های گیاهی به کار گرفته شد، DMSO (µl/disc) ۵۰٪ فراهم گردید. آنتی‌بیوتیکهای Furazolidone (۱۰۰mg/disc)واسترپتومایسین (۱۰mg/disc) به منزله استانداردهای مثبت برای تعیین حساسیت هر گونه میکروب مورد آزمایش، استفاده شدند. پلیت‌های محیط کشت که در آنها میکروارگانیسم‌ها تلقیح شده بودند در دمای ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت برای سویه‌های باکتریایی، ۴۸ ساعت برای مخمر و ۷۲ ساعت برای قارچ انکوبه شدند. فعالیت ضدمیکروبی ازطریق اندازه‌گیری هاله ممانعت از رشد تعیین شد و هر سنجش (در این آزمایش) دوبار تکرار گردید (۴،۷).

در مرحله بعد، سنجش Microdilution به صورت زیر انجام شد. حداقل غلظت مهاری (MIC) برای میکروارگانیسم‌هایی که به عصاره متانولی گیاه گلپر ایرانی (در روش سنجش انتشار دیسک) حساس بودند، تعیین شد. MIC به کمترین غلظت از ترکیبات که رشد میکروارگانیسم را مهار می‌نماید، اطلاق می‌شود. MBC، غلظتی است که هیچ میکروبی قادر به رشد در آن نیست. تلقیح میکروارگانیسم‌ها از کشت ۱۲ ساعته در محیط مایع فراهم شد و برای رسیدن به کدورت استاندارد مک فارلند ۰/۵رقیق گردید. عصاره گلپر ایرانی حل شده در دی‌متیل‌سولفوکسید۵۰٪ ابتدا در بالاترین غلظت ۵۰۰mg/ml برای آزمایش فراهم شد و سپس رقت‌های متوالی در محدوده غلظت از ۵۰۰mg/ml-۵ (۵۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۰ و ۵) تهیه گردید. MIC و حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC) عصاره گلپر ایرانی علیه سویه‌های باکتریایی بر اساس روش micro-well dilution (۸) با بعضی اصلاحات که در زیر شرح داده می‌شود، تعیین گردید:

پلیت‌های ۹۶ چاهکی به کمک توزیع ۹۵ میکرولیتر از محیط مولرهینتون براث و ۵ میکرولیتر از تلقیح میکروبی به داخل هر یک از چاهک‌ها فراهم گردید. ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره گلپر ایرانی با غلظت ۵۰۰mg/ml به چاهک اول هر میکروارگانیسم اضافه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های متوالی دیگر عصاره به داخل ۶ چاهک بعدی انتقال داده شد. چاهک آخر شامل ۹۵ میکرولیتر محیط مولر هینتون براث با ۱۰۰ میکرولیتر DMSO۵۰٪ و ۵ میکرولیتر از تلقیح میکروبی در هر ردیف به منزله کنترل منفی مورد استفاده قرار گرفت. حجم نهایی در تمامی چاهک‌ها ۲۰۰ میکرولیتر بود. آمپی‌سیلین در محدوده غلظتی۵۰۰mg/ml-۵ همراه با محیط

مولرهینتون براث و تلقیح میکروبی مشابه با چاهک‌های دیگر به مثابه داروی استاندارد برای کنترل مثبت استفاده گردید. به دلیل رنگی بودن عصاره گلپر ایرانی، ۱۰۰ میکرولیتر محیط مولر هینتون براث و ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره گلپر ایرانی در محدوده غلظت ۵-۵۰۰mg/ml به داخل یک ردیف از چاهک‌ها به ترتیب منتقل شد و به منزله کنترل زمینه، مورد استفاده قرار گرفت. پلیت ELISA با درپوش پلیت استریل پوشانده شد. محتویات هر چاهک روی شیکر به مدت ۶۰ ثانیه با دور ۱۰۰rpm مخلوط گردید و سپس در دمای ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. رشد میکروبی با میزان جذب در طول موج ۶۲۰nm با استفاده از reader میکروپلیت 2100 (شرکت Awareness Technology) تعیین شد و به کمک کشت ۵ میکرولیتر از نمونه‌های چاهک‌های شفاف روی محیط مولر هینتون آگار تایید گردید.

جدول ۱- فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌های هراکلوم پرشیکم (5mg/disc) علیه گونه های باکتریایی و قارچی آزمایش شده بر اساس روش انتشار دیسک

میکروارگانیسم	ATCC CODE	قطر منطقه مهاری اطراف دیسک			
		عصاره متانولی (mm)	عصاره آبی	کنترل منفی	آنتی‌بیوتیک استاندارد (mm)
Bacillus polymixa	۱۰۲۰	۱۲	-	-	*۲۲
Bacillus subtilis	۶۰۵۱	۹	-	-	*۲۵
Corynebacterium Diphtheria	۱۰۳۰	-	-	-	-
Enterococus faecalis	۲۹۲۱۲	۷	-	-	*۱۸
Escherichia coli	۱۰۴۶	-	-	-	§۱۶
Micrococcus Luteus	۱۱۰۹	-	-	-	§۱
Nocardia	۵۰۲۷	۱۴	-	-	*۵۰
Proteus vulgaris	۱۰۷۹	-	-	-	§۱۵
Pseudomonas aeruginosa	۱۰۷۴	-	-	-	§۱۰
Salmonella gallinarum	۱۰۹۳	-	-	-	§۲۰
Shigella dysenteriae	۱۱۸۸	-	-	-	§۱۵
Staphylococcus aureus	۲۹۲۱۳	-	-	-	*۱۵
Staphylococcus epidermidis	۱۱۱۴	-	-	-	§۲۱
Streptococcus	۱۴۴۷	-	-	-	§۲۱
Candida albicans	۱۰۲۳۹	-	-	-	تست نشد
Aspergillus flavus	۹۱۱۰	-	-	-	تست نشد

* استرپتومایسین (10/mg/disc) § فورازولیدون (100mg/disc)

در پژوهش حاضر سنجش عصاره علیه هر میکروارگانیسم دوبار بررسی گردید.

یافته‌ها

نتایج نشان داد که عصاره متانولی بر رشد ۵ گونه باکتری شامل Bacillus subtilis، Bacillus Polymixa، Staphylococcus aureus، Nocardia و Enterococcus faecalis دارای اثر مهاری است (جدول۱). عصاره آبی گلپر ایرانی فاقد فعالیت ضدمیکروبی علیه هر یک از گونه‌های باکتریایی یا قارچی آزمایش شده در این مطالعه است. حداکثر هاله‌های مهاری و مقادیر MIC و MBC برای میکروارگانیسم‌های حساس به عصاره متانولی گلپر ایرانی به ترتیب در محدوده ۷-۱۴mm، ۲۵-۲۵۰mg/ml و ۵۰-۵۰۰mg/ml بود. (جدول ۱و۲).

جدول ۲- مقادیر MBC و MIC عصاره متانولی هراکلوم پرشیکم علیه میکروارگانیسمهای آزمایش شده از طریق سنجش Microdilution

میکروارگانیسم	عصاره متانولی		داروی استاندارد آمپی سیلین (mg/ml)
	MBC (mg/ml)	MIC (mg/ml)	
Bacillus polymixa	۵۰	۲۵	۱۰۰
Baxillus subtilis	۱۰۰	۵۰	۲۰۰
Enterococus faecalis	۵۰۰	۲۵۰	۵۰۰
Nocardia	۲۰۰	۱۰۰	۲۰۰
Staphylococcus aureus	۵۰۰	۲۰۰	۵۰۰

بحث

در پژوهش حاضر، ترکیبات ضدمیکروبی میوه گلپر ایرانی جمع‌آوری شده از ارتفاعات اشکور تنکابن که در شمال ایران واقع است، علیه برخی از میکروارگانیسم‌ها بر اساس روش سنجش انتشار دیسک و سنجش Microdilution عصاره‌گیری گردیدند. فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌های آبی و متانولی گلپر ایرانی علیه میکروارگانیسم‌ها بررسی شد و این قابلیت به طور کمی به وسیله حضور یا عدم حضور هاله مهاری و قطر هاله (جدول۱) و مقادیرMIC و MBC (جدول ۲) تعیین گردید.

عصاره متانولی بر رشد ۵ گونه باکتری دارای اثر مهاری بود حال آنکه عصاره آبی گلپر ایرانی فاقد فعالیت ضدمیکروبی

علیه هر یک از گونه‌های باکتریایی یا قارچی آزمایش شـده در این مطالعه بود.

این اولین پژوهشی است که اثبات می‌کند عصاره متانولی گلپر ایرانی شامل مواد ضدمیکروبی با اثرات ضدباکتریایی است. بـه علاوه این نتایج، مطالعات قبلی را مبنی بر اینکه متـانول بـرای استخراج مواد ضد میکروبی از گیاهـان دارویـی در مقایـسه بـا دیگر حلالها از جمله آب، اتانول و هگزان حلال بهتـری اسـت، تایید می‌نماید (۴،۸). پیشنهاد می‌شود که عصاره متانولی گلپر ایرانی که دارای ترکیبات با خواص ضدباکتریایی است به منزله عوامل ضدمیکروبی در داروهای جدیـد بـرای درمـان بیمـاران عفونی مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از اساتید و کارکنان بخش بیولـوژی دانـشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن تشکر و قدردانی می شود.

REFERENCES

۱. زرگری علی، مولف. گیاهان دارویی. انتشارات دانشگاه تهران، صفحه ۶۱۹.

2. Mandenova I. Heracleum. In: Rechinger KH, editor. Flora Iranica, Umbelliferae, No, 162. 1987;p:492-502.
3. Kokoska L, Polesny Z, Resa V, et al. Screening of some Siberian medicinal plants for antimicrobial activity. Journal of Ethanopharmacology 2002;82:51-3.
4. Karaman I, Sahin F, Gullule M, et al. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extraets of Juniperus Oxycedrus L. Journal of Ethanopharmacology 2003;85:231-5.
5. Okeke MI, Iroegbu GU, Eze EN, et al. Evaluation of extracts of the root of Landolphia Owerrience for antibacterial activity. Journal of Ethanopharmacology 2001;78:119-27.
6. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, et al (editors). Manual of clinical microbiology. ASM, Washington D.C., 1995.
7. Masika PJ, Afolayan AJ. Antimicrobial activity of some plants used for the treatment of livestock disease in the Eastern Cape, South Africa. Journal of Ethanopharmacology 2002;83:129-34.
8. Zgoda LR, Porter JR. A convenient microdultion method for screening natural products against bacteria and fungi. Pharmaceut Biol 2001;39(3):221-5.