

مقایسه اثر مهاری عصاره های مختلف گیاه تشنه داری بر باکتری های استافیلوکوک اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا و هلیکوباکتریلوری در شرایط *in vitro*

محمدرضا نظری^۱، ایرج پاکزاد^{۲*}، عباس ملکی^۳، علی همتیان^۴

(۱) گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی کرج
(۲) گروه میکروب شناسی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

تاریخ دریافت: ۹۲/۵/۱۶

تاریخ پذیرش: ۹۲/۸/۲۳

چکیده

مقدمه: باکتری های استافیلوکوک اورئوس، سودوموناس آئروژینوزا و هلیکوباکتریلوری از مهم ترین باکتری های ایجاد کننده عفونت های بیمارستانی هستند. صدها گیاه در سراسر جهان در درمان سنتی عفونت های باکتریال استفاده می شوند استفاده از گیاهان دارویی به عنوان یک راه جایگزین جهت درمان عفونت های باکتریال مطرح می باشد. هدف این تحقیق بررسی اثر مهاری عصاره آبی و الکلی گیاه تشنه داری بر روی باکتری های استافیلوکوک اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا و هلیکوباکتریلوری در شرایط *in vitro* بود.

مواد و روش ها: عصاره گیری به صورت آبی و الکلی انجام گرفت، اثر مهاری این عصاره در محیط مولر هینتون آگار بر روی باکتری های استافیلوکوک اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا بررسی گردید. سپس MIC و MBC در لوله های محیط کشت TSB به روش براث ماکرودایلوشن انجام شد و جهت تعیین MIC و MBC عصاره در مورد هلیکوباکتریلوری از روش آگار دیفیوژن استفاده گردید.

یافته های پژوهش: هاله عدم رشد عصاره آبی در مورد باکتری استافیلوکوک اورئوس ۱۶ میلی متر و سودوموناس آئروژینوزا ۲۴ میلی متر و هاله عدم رشد عصاره اتانلی و متانلی در مورد استافیلوکوک اورئوس به ترتیب ۱۱ و ۱۲ میلی متر و هاله عدم رشد عصاره اتانلی و متانلی در مورد سودوموناس آئروژینوزا به ترتیب ۱۲ و ۱۶ میلی متر بود. عصاره کلروفرمی فاقد هر گونه اثر مهاری بود. در بین عصاره ها، عصاره آبی جوشانده ۰/۵ ساعته موثرتر از سایرین بود و عصاره جداگانه ریشه و ساقه فاقد هر گونه اثر مهاری بودند. MIC و MBC عصاره آبی برای باکتری استافیلوکوک اورئوس به ترتیب ۱۵ میکروگرم بر میلی لیتر و ۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر تعیین گردید. MIC و MBC عصاره آبی برای باکتری سودوموناس آئروژینوزا به ترتیب ۵ میکروگرم بر میلی لیتر و ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد. MIC و MBC عصاره آبی برای باکتری هلیکوباکتریلوری به ترتیب ۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر و ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر تعیین گردید.

بحث و نتیجه گیری: از بین عصاره های مختلف عصاره آبی و متانلی بیشترین اثر مهاری را داشته اند و جوشانده ۰/۵ ساعته گیاه بیشترین اثر را دارا می باشد. با توجه به مقادیر MIC و MBC به نظر می رسد که عصاره آبی این گیاه یکی از ترکیبات گیاهی موثر بر باکتری ها باشد.

واژه های کلیدی: گیاه درمانی، *Scrophularia striata*، عصاره، MIC

* نویسنده مسئول: گروه میکروب شناسی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

مقدمه

صدها گیاه در سراسر جهان در درمان سنتی عفونت های باکتریال استفاده می شوند و اثرات ضد میکروبی آن ها در شرایط *in vitro* اثبات شده است، (۱،۲). سهولت استفاده از گیاهان دارویی و مقبولیت عام آن ها بستری مناسب برای استفاده از گیاهان دارویی فراهم نموده است، (۳،۲۳). در همین راستا با توجه به تنوع آب و هوایی ایران و در نتیجه فلور گیاهی بسیار متنوع آن امکان تولید این مواد به مقدار زیاد در سطح صنعتی وجود دارد. این کار به ویژه در مورد گیاهانی که منحصر به ایران هستند و تاکنون کمتر مورد بررسی قرار گرفته اند اهمیت ویژه ای دارند، (۵،۴). گیاه *Scrophularia striata* گیاهی از تیره گل میمون است که در مناطق کوهستانی رشته کوه های زاگرس رویش دارد و نام محلی آن در استان ایلام تشنه داری است، (۸).

مواد و روش ها

عصاره گیری: عصاره آبی با افزودن ۵ گرم پودر گیاه خشک شده در آب مقطر استریل به مدت ۲/۵ ساعت جوشاندن سپس عصاره فیلتر گردید. عصاره الکلی کلروفرمی با افزودن ۱۰ گرم پودر خشک شده گیاه تشنه داری به ۱۰۰ میلی لیتر اتانل (مرک)، متانل (مرک) و کلروفرم (مرک) و بعد از ۷۲ ساعت عصاره فیلتر گردید، (۱۴،۱۶).

بررسی تاثیر عصاره های مختلف بر باکتری های استافیلوکوک اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا: از سوسپانسیون باکتریایی ۰/۵ مک فارلند از باکتری های فوق طبق اصول آنتی بیوگرام به صورت چمنی کشت داده شد، سپس چاهک هایی در محیط کشت با پیت پاستور استریل تعبیه گردید و حجم مشخصی از عصاره های مختلف در این چاهک ها ریخته شد و

پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون هاله عدم رشد اطراف چاهک ها قرائت گردید، (۱۱،۱۳). تعیین MIC و MBC با استفاده از عصاره آبی گیاه تشنه داری: از عصاره خشک شده غلظتی معادل ۵ میکروگرم بر میلی لیتر تهیه گردید سپس به ۱۰ لوله استریل حاوی ۱ میلی لیتر محیط کشت T.S.B و سوسپانسیون میکروبی طوری اضافه گردید که کدورت نهایی معادل ۰/۵ مک فارلند باشد. سپس مقادیر مختلفی از عصاره به این محیط های کشت اضافه گردید به طوری که غلظت نهایی آن ها معادل ۵،۱۰،۱۵،۲۰،۲۵،۳۰،۳۵،۴۰،۴۵،۵۰ و ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر رسید. سپس لوله ها در انکوباتور قرار گرفته بعد از ۲۴ ساعت نتیجه قرائت گردید، (۹،۱۷).

در تعیین MIC و MBC از ۳۰ ایزوله بالینی استافیلوکوک اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا در کنار سویه های استاندارد استافیلوکوک اورئوس ATCC و سودوموناس آئروژینوزا استفاده گردید، (۶،۷). برای تعیین MIC و MBC باکتری هلیکوباکتریلوری غلظت های مختلف از عصاره (۵،۱۰،۱۵،۲۰،۲۵،۳۰،۳۵،۴۰،۴۵،۵۰) در محیط کشت اختصاصی تهیه و سپس باکتری در آن کشت داده شد بعد از ۳ روز نتیجه قرائت گردید، (۱۴،۱۵).

یافته های پژوهش

نتایج نشان داد که عصاره آبی این گیاه در حجم ۵۰ μl بسیار موثرتر می باشد. با توجه به این که عصاره های ریشه و ساقه به تنهایی موثر نمی باشند احتمال می رود این رقت حاوی موادی باشند که پس از ترکیب با همدیگر خاصیت ضد باکتریایی آن ها نمایان شود، (۱۹،۲۰،۲۱).

جدول شماره ۱ اثر عصاره های مختلف (آبی، الکلی و کلروفرمی) گیاه تشنه داری در حجم ۵۰ میکرولیتر بر روی باکتری های استافیلوکوک اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا، را نشان داد که عصاره آبی بیشترین اثر مهاری بر باکتری های فوق دارد.

نام عصاره	هاله عدم رشد سودوموناس آئروژینوزا (برحسب میلی متر)	هاله عدم رشد استافیلوکوک اورئوس (برحسب میلی متر)
آبی در حجم ۵۰ میکرولیتر	۲۴	۱۴
اتانولی در حجم ۵۰ میکرولیتر	۱۲	۱۱
متانولی در حجم ۵۰ میکرولیتر	۱۶	۱۲
کلروفرمی در حجم ۵۰ میکرولیتر	صفر	صفر

جدول شماره ۲ نشان می دهد که در بین عصاره های مختلف آبی این گیاه، عصاره ۳۰ دقیقه ای بیشترین تاثیر را بر روی استافیلوکوک اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا دارد.

نام عصاره آبی	هاله عدم رشد سودوموناس آئروژینوزا (برحسب میلی متر)	هاله عدم رشد استافیلوکوک اورئوس (برحسب میلی متر)
عصاره جوشانده ۳۰ دقیقه ای	۲۴	۱۴
عصاره جوشانده ۲/۵ ساعته	۱۴	۱۰
عصاره نجوشانده ۷۲ ساعته	صفر	صفر

اثر عصاره های مختلف آبی: جدول شماره ۳ که نتایج مقایسه اثر عصاره ریشه و ساقه با عصاره کل گیاه را نشان داد. مشاهده می شود که عصاره های مختلف آبی، اتانلی، متانلی و کلروفرمی ریشه و ساقه به صورت جداگانه فاقد هر گونه اثر مهاری می باشند.

نام عصاره	هاله عدم رشد سودوموناس آئروژینوزا (برحسب میلی متر)	هاله عدم رشد استافیلوکوک اورئوس (برحسب میلی متر)
آبی ریشه در حجم ۵۰ میکرولیتر	صفر	صفر
اتانولی ریشه در حجم ۵۰ میکرولیتر	صفر	صفر
متانولی ریشه در حجم ۵۰ میکرولیتر	صفر	صفر
کلروفرمی ریشه در حجم ۵۰ میکرولیتر	صفر	صفر
آبی ساقه در حجم ۵۰ میکرولیتر	صفر	صفر
اتانولی ساقه در حجم ۵۰ میکرولیتر	صفر	صفر
متانولی ساقه در حجم ۵۰ میکرولیتر	صفر	صفر
کلروفرمی ساقه در حجم ۵۰ میکرولیتر	صفر	صفر
آبی کل گیاه در حجم ۵۰ میکرولیتر	۲۴	۱۴
اتانولی کل گیاه در حجم ۵۰ میکرولیتر	۱۲	۱۱
متانولی کل گیاه در حجم ۵۰ میکرولیتر	۱۶	۱۲
کلروفرمی کل گیاه در حجم ۵۰ میکرولیتر	صفر	صفر

جدول شماره ۴ نشان می دهد که میانگین MIC و MBC عصاره آبی برای باکتری استافیلوکوک اورئوس به ترتیب ۵ و ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر می باشد.

جدول شماره ۴. تعیین MIC و MBC عصاره آبی برای باکتری های استافیلوکوک اورئوس، سودوموناس آئروژینوزا و هلیکوباکتری پیلوری

مقادیر مختلف عصاره (µg/ml)										MIC	MBC
۵	۱۰	۱۵	۲۰	۲۵	۳۰	۳۵	۴۰	۴۵	۵۰	۵	۱۰
۲/۵	۵	۷/۵	۱۰	۱۲/۵	۱۵	۱۷/۵	۲۰	۲۲/۵	۲۵	۵	۱۰
۵	۱۰	۱۵	۲۰	۲۵	۳۰	۳۵	۴۰	۴۵	۵۰	۵	۱۰
۲/۵	۵	۷/۵	۱۰	۱۲/۵	۱۵	۱۷/۵	۲۰	۲۲/۵	۲۵	۵	۱۰

جدول شماره ۵ نشان می دهد که میانگین MIC و MBC عصاره آبی باکتری سودوموناس آئروژینوزا به ترتیب ۱۵ و ۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر می باشد.

مقادیر مختلف عصاره (µg/ml)										MIC	MBC
۵	۱۰	۱۵	۲۰	۲۵	۳۰	۳۵	۴۰	۴۵	۵۰	۱۵	۲۰
۲۵	۵	۷/۵	۱۰	۱۲/۵	۱۵	۱۷/۵	۲۰	۲۲/۵	۲۵	۱۵	۲۰
۱۲/۵	۱۵	۱۷/۵	۲۰	۲۲/۵	۲۵	۲۷/۵	۳۰	۳۲/۵	۳۵	۱۵	۲۰
۵	۱۰	۱۵	۲۰	۲۵	۳۰	۳۵	۴۰	۴۵	۵۰	۱۵	۲۰

جدول شماره ۶ نشان می دهد که میانگین MIC و MBC عصاره آبی باکتری هلیکوباکتری پیلوری به ترتیب ۴۰ و ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر می باشد.

شماره سویه	مقدار عصاره (µg/ml)										MIC	MBC
۱	۵	۱۰	۱۵	۲۰	۲۵	۳۰	۳۵	۴۰	۴۵	۵۰	۴۰	۵۰
۲	۱۰	۱۵	۲۰	۲۵	۳۰	۳۵	۴۰	۴۵	۵۰	۵۵	۴۰	۵۰
۳	۲۰	۳۰	۴۰	۵۰	۶۰	۷۰	۸۰	۹۰	۱۰۰	۱۱۰	۴۰	۵۰
۴	۱۰	۲۰	۳۰	۴۰	۵۰	۶۰	۷۰	۸۰	۹۰	۱۰۰	۴۰	۵۰

بحث و نتیجه گیری

نتایج نشان می دهد که از بین عصاره های مختلف، عصاره آبی موثرتر از مابقی عصاره ها می باشد که نشانگر این است که ماده موثره این عصاره در فاز آبی بهتر استخراج می شود، (۱۰)، از طرف دیگر عصاره معمولی آبی در مقیاس با عصاره آبی فاقد هر گونه اثر مهاری است و نشانگر این است که ماده موثره با جوشاندن از سلول های گیاهی خارج می شود. (۵)

عصاره آبی، اتانلی و متانلی مجزا ریشه، ساقه فاقد هر گونه اثر مهاری می باشند، (۱۲). احتمالاً ماده موثره این گیاه از اجزای مختلفی تشکیل شده است که باید در کنار هم قرار گیرند تا اثر مهاری داشته باشند. (۲۰)

عصاره کلروفرمی فاقد هر گونه تاثیر مهاری بود که نشانگر این است که حلال قادر به جداسازی ماده موثره از این

گیاه نمی باشد، (۱۴). هم چنین عصاره های آبی مختلف تاثیرات متفاوتی داشته اند که در بین آن ها بیشترین تاثیر مربوط به عصاره جوشانده نیم ساعته است یعنی اگر کمتر جوشانده شود استخراج ماده موثره کامل نمی باشد و اگر بیشتر جوشانده شود حرارت باعث تخریب ماده موثره می شود. (۲۱)

این گیاه از اجزای مختلفی تشکیل شده است که باید در کنار هم قرار گیرند تا اثر مهاری داشته باشند، (۱۸). از نتایج حاصل از MIC و MBC عصاره آبی این گیاه این طور به نظر می رسد که اثر مهاری آن بر باکتری سودوموناس آئروژینوزا بیشتر از استافیلوکوک اورئوس است، (۱۴). عصاره آبی این گیاه نسبت به سایر عصاره ها موثرتر می باشد و نیز اثر آن بر باکتری های گرم منفی بیشتر از باکتری های گرم مثبت می باشد. (۲۲)

References

1. Tavakoli-Saberi MR. [Therapeutic her-bs]. Rozbehan Publication: Tehran; 1990. (Persian)
2. Haji-Akhondi MK, Baligh N. [Applied herbal medicine]. Scientific Publication of Islamic Azad University; 2001. (Persian)
3. Rahimi MK, Athari A. [Medical microbiology]. Aeizh Publication. 2002.P.485. (Persian)
4. Samsam Shariat H. [Herbal medicine cultivation]. Mani Publication; 2004. (Persian)
5. Eidi A, Eidi M. [Herbal medicine in Iran]. Publication of Islamic Azad University; 2005. (Persian)
6. Mozafaryan V. [Plant flora of Ilam province]. Park and Jungle Research Institute: Ministry of Agronomy; 2005. (Persian)
7. Adeniyi BA, Anyiam FM. In vitro potential of methanol extract of *Allium ascalonicum* Linn. (Liliaceae) Leaf; Susceptibility and effect on urease activity. *J Microbiol* 2004;18: 357-61.
8. Agil F. Effect of certain bioactive plant extracts on clinical isolates of beta lactamase producing methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *J Basic Microbiol* 2005; 45; 106-14.
9. Baron F. Diagnostic Microbiology. Massby: Missouri USA; 1990.
10. Basile A. Antibacterial and antioxidant activities in *Sideritis italica* (Miller) Greuter et Burdet essential oils. *J Ethnopharmacol* 2006; 8:562-7.
11. Braga LC. Synergic interaction between pomegranate extract and antibiotics against *Staphylococcus aureus*. *Can J Microbiol* 2005;10:237-42.
12. Cellini A. Inhibition by garlic extract (*Allium sativum*). *FEMS Immunol Med Microbiol* 1996;11:437-42.
13. Collee JG. Practical medical microbiology Charchill livingstone. UK; 1990.
14. Ferenadez MA. Antibacterial activity of the phenolic acids fraction of *Scrophularia frutescens* and *Scrophularia sambu-cifolia*. *J Ethnopharmacol* 1996;8:628-32.
15. John JR. Screening for antimicrobial activity of ten medicinal Colombian folk-lore medicine: A possible alternative treatment of non-nosocomial infections. *J Ethnopharmacol* 2006;10:1186-472.
16. Karenm A, Ernest E. Herbal medicines for treatment of bacterial infection; are view of controlled clinical trials. *J Antimicrob Chem* 2003;21:987-92.
17. Liu IX. Baicalin synergy with beta-lactam antibiotics against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and other beta-lactam resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *J Pharm* 2000;6:286-94.
18. Newton SM. The evaluation of forty-three plant species for in vitro antimicrobial activities, isolation of active constituents from *Psoralea corylifolia* and *Sanguinaria canadensis*. *J. Ethnopharmacol* 2002;7:118-22.
19. Rasooly M, Weis A. In vitro Antibacterial Activities of phloxine and other Halogenated fluorescens against Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agent Chem* 2003;9:17-25.
20. Romero CD. Antibacterial properties of common herbal remedies of the south-west. *J Ethnopharmacol* 2005;23:578-84.
21. Tadege H. Antimicrobial activities of some selected traditional Ethiopian medicinal plants used in the treatment of skin disorders. *J Ethnopharmacol* 2005;5:66-72.
22. Yang Z. The synergistic activity of antibiotics combined with eight traditional Chinese medicines against two different strains of *Staphylococcus aureus*. *Coll Surf Biointer Faces* 2005;21:246-52.
23. Zaidi MA, Crow SA. Biologically active traditional medicinal herbs from Balochistan, Pakistan. *J Ethnopharmacol* 2005; 6:191-8

Comparison of in vitro inhibitory effects of different extracts of *Scrophularia striata* plant on *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Helicobacter pylori*

Nazari MR¹, Pakzad F^{2*}, Maleki A², Hematian A²

(Recived: 7August, 2013 Accepted: 14November, 2013)

Abstract

Introduction: The most important nosocomial infectious agents are *Staphylococcus aureus* (S. aureus), *Pseudomonas aeruginosa* (P. aeruginosa), and *Helicobacter pylori* (H. pylori). An alternative way for treatment of bacterial infection is herbal therapy. The aim of this study was to evaluate the inhibitory effects of alcoholic and water extracts of *Scrophularia striata* (S. striata) plant on S. aureus, P. aeruginosa and H. Pylori at in vitro condition.

Materials & Methods: Water and alcoholic extracts of S. striata plant were prepared. Inhibitory effect of these extracts was examined on S. aureus and P. aeruginosa in Mueller-Hinton agar medium. MIC and MBC of the extracts was determined in TSB medium by macro dilution method. MIC and MBC of H. Pylori was determined by agar diffusion method.

Findings: Inhibitory zone of water extraction for S. aureus and P. aeruginosa was 16 mm and 24 mm, respectively. Inhibitory zone of ethanol extract for S. aureus and P. aeruginosa was 11 mm and 12 mm and that of methanol extract was 12 mm and 16 mm, respectively.

The chloroform extract had not any inhibitory effect. The MIC of water extract of S. striata for S. aureus, P. aeruginosa and H. Pylori were 15µg/ml, 20µg/ml, and 5µg/ml, respectively. Also, the figures of MBC were 10µg/ml, 40µg/ml and 50µg/ml, respectively.

Discussion & Conclusion: Water and methanol extracts of S. striata had better inhibitory effect then other extracts. The best effect was belonged to the 5-hour boiled extract of the plant. Given to the MIC and MBC values, water extract of S. striata may be a candidate for herbal therapy in bacterial infections.

Keywords: Herbal, *Scrophularia striata*, extraction, MIC

1. Dept of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran

2. Dept of Clinical Microbiology, Faculty of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran

* (Corresponding author)