مجله دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی
1391؛4(ویژه نامه فرآورده های طبیعی و گیاهان داروی):154-149

Journal of North Khorasan University of Medical Sciences
2012;4(Natural Products & Medicinal Plants Suplemntry): 149-154

بررسی فعالیت آنتی باکتریایی عصاره های مختلف گیاه آدمک (Biebersteinia multifida DC.)

ناهید قدرتی[1]، جواد اصیلی[2]، علی محمدی ثانی[3]، بی بی صدیقه فضلی بزاز[4]*

[1] دانش آموخته ی کارشناسی ارشد صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قوچان، قوچان، ایران
[2] دانشیار گروه فارماکوگنوزی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
[3] استادیار گروه صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قوچان، قوچان، ایران
[4] استاد گروه شیمی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
[*] **نویسندهٔ مسئول**: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قوچان، قوچان، ایران
پست الکترونیک: n_ghodrati@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: *عصاره‌های گیاهی، از منابع خوب ترکیبات ضد میکروبی هستند. در دهه‌های اخیر، نیاز به نگهدارنده های طبیعی در صنایع غذایی، موجب انجام تحقیقات علمی گسترده‌ای بر روی عصاره ها و اسانس های روغنی گیاهان شده است. هدف از این پژوهش، بررسی تأثیر آنتی‌باکتریایی عصاره های ریشه ی گیاه .Biebersteinia multifida DC بود.*

مواد و روش کار: *عصاره های هگزانی، دی کلرومتانی و اتانولی ریشه ی گیاه آدمک به روش خیساندن تهیه شد. فعالیت آنتی باکتریایی عصاره ها به روش رقت مایع و در برابر باکتری های Staphylococcus aureus (PTCC 1431)، Salmonella enterica (PTCC 1709)، Escherichia coli (PTCC 1399)، Bacillus cereus (PTCC 1015)، Enterobacter aerogenes (PTCC 1221) و Clostridium perfringens (PTCC 1765) بررسی شد. مقادیر حداقل غلظت مهار کننده ی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشنده (MBC) عصاره ها تعیین شد.*

یافته ها: *حساسیت باکتری های گرم مثبت نسبت به عصاره ها بیشتر از باکتری های گرم منفی بود. حداقل غلظت مهارکننده ی رشد عصاره ها ی اتانولی و هگزانی بر روی C. perfringens، 0/195 و حداقل غلظت کشنده ی آن ها 0/391 میلی گرم بر میلی لیتر بود.*

نتیجه گیری: *یافته های این بررسی نشان داد که عصاره های اتانولی و هگزانی ریشه ی این گیاه بر C. perfringens اثر آنتی باکتریایی داشتند. به منظور اثبات این اثر، مطالعات بیشتری در مدل های غذایی مورد نیاز است.*

واژه های کلیدی: *Biebersteinia multifida DC.؛ فعالیت آنتی باکتریایی؛ حداقل غلظت مهار کننده؛ حداقل غلظت کشنده*

مقدمه

ابتلا به بیماری های غذازاد، حتی در کشورهای توسعه یافته نیز مشکلی جدی محسوب می شود. برآورد شده است که تنها در ایالات متحده ی آمریکا 6 تا 81 میلیون مورد از بیماری ها، و بیش از 9000 مرگ در سال، در اثر بیماری زاهای غذازاد به وجود می آید [1]. در حقیقت، مسمومیت غذایی هنوز هم تهدیدی برای مصرف کنندگان و نیز صنعت تولید مواد غذایی محسوب می شود. از سوی دیگر نگرانی مصرف کنندگان در مورد استفاده از غذاهایی که در تولید آنها از نگهدارنده های شیمیایی استفاده می شود، موجب شده است که روش های مختلف برای تولید مواد غذایی بهداشتی، بدون استفاده از این ترکیبات مورد توجه بسیاری از محققان قرار گیرد. به این منظور، استفاده از ترکیبات آنتی میکروبی از منابع طبیعی مانند گیاهان، برای رسیدن به سطوح بالای ایمنی مواد غذایی بررسی شده است [۲،۳].

گیاه آدمک (چله داغ) با نام علمی .Biebersteinia DC multifida از تیره ی شمعدانی (Geraniacea) و جنس (Biebersteinia) است که به حالت خودرو در بسیاری از اراضی ایران، سوریه، لبنان، ارمنستان، آسیای مرکزی و

افغانستان می روید. ریشه ی این گیاه درشت، سنگین و به رنگ قهوه ای روشن یا تیره است. از این گیاه، در طب سنتی برای رفع بیماری های روماتیسمی و بهبود دردها و شکستگی های استخوانی استفاده می شود. اثرات ضد التهاب و ضد درد این گیاه نیز بررسی شده است [4]. جداسازی آلکالوئید vasicinone و برخی پلی ساکارید ها و ترکیبات پپتیکی از این گونه گزارش شده است [۵،۶،۷]. فعالیت آنتی باکتریایی عصاره ی متانولی ریشه ی این گیاه بر روی چند گونه ی باکتریایی نیز بررسی شده است [8]. این مطالعه به منظور افزایش اطلاعات در زمینه ی فعالیت آنتی باکتریایی ریشه ی این گیاه، بر روی عصاره های مختلف آن انجام شد.

روش کار

مواد شیمیایی و معرف ها: حلال های اتانول، دی کلرومتان و هگزان از محصولات شرکت Scharlau اسپانیا بود. دی متیل سولفوکساید (DMSO)، کلیه ی محیط کشت ها، تری فنیل تترازولیوم کلراید (TTC) و توئین 80 محصول شرکت Merck آلمان بود.

جمع آوری و آماده سازی گیاه: ریشه ی گیاه آدمک در اردیبهشت ماه سال 1391 از منطقه ی اسدلی (5 کیلومتری جاده ی بجنورد- اسفراین) جمع آوری شد. پس از قطعه قطعه کردن به صورت برش های عرضی، در سایه خشک و در نهایت آسیاب شد.

عصاره گیری: بر روی گیاه آسیاب شده عملیات عصاره گیری به روش خیساندن، در سه مرحله و با سه حلال هگزان نرمال، دی کلرومتان و اتانول انجام شد. به این ترتیب که ابتدا پودر ریشه به مدت 48 ساعت در حلال هگزان نرمال خیسانده شد. پس از جداسازی کامل عصاره، باقیمانده ی گیاه کاملاً خشک و به مدت 48 ساعت در دی کلرومتان خیسانده شد و مراحل قبلی مجدداً تکرار شد. در مرحله ی آخر هم به باقیمانده ی خشک شده ی گیاه، اتانول اضافه و بقیه ی مراحل مانند قبل انجام شد. عصاره های حاصل با دستگاه روتاری اواپراتور و در فشار کاهش یافته، تغلیظ شد. همه ی عصاره ها تا زمان انجام آزمون در ظروف غیر قابل نفوذ نسبت به هوا و نور، در یخچال نگهداری شد.

سویه های باکتریایی: در این بررسی از باکتری های Staphylococcus aureus (PTCC 1431)، (PTCC 1709) Salmonella enterica (PTCC 1399)، Escherichia coli (PTCC 1015)، Bacillus cereus (PTCC 1221)، Enterobacter aerogenes و Clostridium perfringens (PTCC 1765) استفاده شد.

تعیین حداقل غلظت مهار کننده ی رشد (MIC): برای بررسی اثر آنتی باکتریایی از روش رقیق سازی (رقت مایع) استفاده شد. برای تعیین حداقل غلظت مهار کننده ی رشد (MIC)، غلظت های مختلفی از هر یک از عصاره ها با استفاده از حلال DMSO و محیط کشت مولر هینتون براث (MHB) تهیه شد (مقدار نهایی DMSO نسبت به محیط کشت، 1 به 16 بود).μL 200 از هر یک از غلظت های تهیه شده به خانه های یک پلیت 96 خانه انتقال داده شد. به عنوان کنترل منفی، از حلالDMSO همراه با محیط کشت MHB (با نسبت 1 به 16) تهیه شد. به عنوان کنترل مثبت نیز از 200μL محیط کشت همراه با 10 μL آنتی بیوتیک جنتامایسین یا کلرامفنیکل (در مورد باکتری کلستریدیوم) استفاده شد.

سوسپانسیون میکروبی با کدورت معادل سوسپانسیون نیم مک فارلند از کشت یک شبه ی میکروارگانیسم تهیه شد و رقت یک صدم از آن در سرم فیزیولوژی ساخته شد. به همه ی خانه های هر پلیت (شامل خانه های حاوی عصاره، کنترل مثبت و کنترل منفی)، 20μL از سوسپانسیون میکروبی انتقال داده شد. پس از 24 ساعت گرمخانه گذاری پلیت ها در دمای 37 درجه ی سلسیوس (کلستریدیوم در شرایط بی هوازی گرمخانه گذاری شد)، به تمام خانه های هر پلیت، 50μL محلول تری فنیل تترازولیوم کلراید (TTC) با غلظت $5\ mg\ mL^{-1}$ اضافه شد. و دوباره به مدت 3 ساعت گرمخانه گذاری شد. پس از گذشت این مدت، میکروپلیت ها از گرمخانه خارج و از نظر ایجاد رنگ قرمز بررسی شد. یک غلظت بالاتر از آخرین غلظتی که رنگ قرمز تترازولیوم را به خود گرفته بود به عنوان MIC عصاره برای باکتری مورد بررسی در نظر گرفته شد.

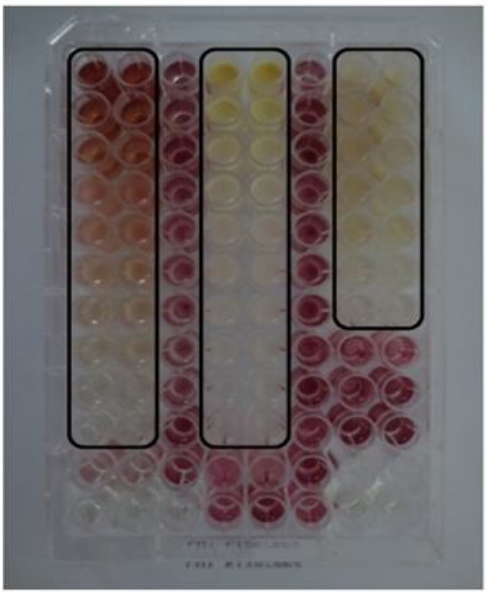
تعیین حداقل غلظت کشنده (MBC): برای تعیین MBC عصاره ها از هر کدام از خانه های پلیت که در آن ها رنگ قرمز ایجاد نشده بود، 10 میکرولیتر بر روی محیط کشت MHA (مولرهینتون آگار) انتقال و کشت داده شد. پس از 24 ساعت گرمخانه گذاری در دمای 37 درجه، پلیت ها از نظر رشد باکتری بررسی و آخرین غلظتی که در پلیت مربوط به آن، کلنی رشد نکرده بود، به عنوان MBC عصاره برای میکروب در نظر گرفته شد. همه ی آزمایش ها سه بار تکرار شد [9].

یافته ها

مطابق نتایج ارائه شده در جدول 1 و 2، هیچ یک از عصاره ها و در هیچ کدام از سطوح غلظتی بر روی باکتری های S. enterica و E. aerogenes اثر آنتی باکتریایی نداشتند. در بین سه عصاره ی مورد بررسی، عصاره ی اتانولی بیشترین خاصیت آنتی باکتریایی را نشان داد. هر سه عصاره بر باکتری های C. perfringens و S. aureus اثر آنتی باکتریایی داشتند.

به طور کلی حساس ترین باکتری نسبت به عصاره های مورد بررسی، C. perfringens بود. عصاره های اتانولی و هگزانی ریشه ی آدمک در غلظت 0/195 میلی گرم در میلی لیتر، بر باکتری C. perfringens اثر مهار کننده نشان داد و در غلظت 0/391 میلی گرم در میلی لیتر بر این باکتری اثر کشنده داشت. MIC این عصاره برای باکتری S. aureus 0/781 به دست آمد و MBC آن 3/125 میلی گرم بر میلی لیتر بود.

در این شکل ها دو ردیف اول خانه های هر پلیت مربوط به عصاره ی اتانولی، ردیف های چهارم و پنجم مربوط به عصاره ی هگزانی، ردیف های هفتم و هشتم هم مربوط به عصاره ی دی کلرومتانی می باشند (از بالا به پایین غلظت عصاره ها کاهش می یابد). در ضمن ردیف های سوم و ششم مربوط به کنترل منفی (حاوی DMSO، محیط کشت و باکتری) هستند. در خانه هایی که داخل کادر قرار داده شده اند، تغییر رنگ ایجاد نشده است که نشان دهنده ی خاصیت آنتی باکتریایی عصاره هاست.



شکل 1: شکل سمت راست مربوط به S. aureus و شکل سمت چپ مربوط به C. perfringens

جدول 1: حداقل غلظت مهارکننده (MIC) عصاره های اتانولی، دی کلرومتانی و هگزانی ریشه ی Biebersteinia multifida DC. به روش رقت مایع

MIC (mg mL^{-1})

عصاره ها	سویه های باکتریایی					
	C. perfringens	S. aureus	B. cereus	E. coli	S. enterica	E. aerogenes
اتانولی	0/195*	0/781	25	25	>50	>50
دی کلرومتانی	1/562	>50	>50	>50	>50	>50
هگزانی	0/195	50	>50	>50	>50	>50

*نتایج مربوط به 3 بار تکرار و به صورت میانگین است.

جدول 2: حداقل غلظت کشنده (MBC) عصاره های اتانولی، دی کلرومتانی و هگزانی ریشه ی Biebersteinia multifida DC. به روش رقت مایع(MBC (mg mL^{-1}

عصاره ها	سویه های باکتریایی					
	C. perfringens	S. aureus	B. cereus	E. coli	S. enterica	E. aerogenes
اتانولی	0/391	3/125	50	50	>50	>50
دی کلرومتانی	3/125	>50	>50	>50	>50	>50
هگزانی	0/391	>50	>50	>50	>50	>50

*نتایج مربوط به 3 بار تکرار و به صورت میانگین است.

بحث

در این مطالعه خاصیت آنتی باکتریایی عصاره های اتانولی، دی کلرومتانی و هگزانی ریشه ی گیاه آدمک بر سه باکتری گرم منفی و سه باکتری گرم مثبت بررسی شد. همان طور که در بخش یافته ها بیان شد، هیچ یک از عصاره ها بر باکتری های S. enterica و E. aerogenes اثر آنتی باکتریایی نداشتند، بر روی E. coli و B. cereus نیز تنها عصاره ی اتانولی، در غلظت بالا (50 میلی گرم بر میلی لیتر) اثر کشنده نشان داد. یافته های بسیاری در زمینه ی اثرات آنتی باکتریایی فراورده های طبیعی نشان داده است که اکثر گیاهان دارویی که خاصیت آنتی میکروبی دارند بر باکتری های گرم مثبت تاثیر دارند، در حالی که تعداد کمی از آن ها بر باکتری های گرم منفی اثر می گذارند [۱۰،۱۱،۱۲].

علت حساسیت بیشتر باکتری های گرم مثبت نسبت به ترکیبات آنتی باکتریایی، ممکن است ناشی از وجود تفاوت در دیواره ی سلولی آن ها با این دیواره در باکتری های گرم منفی باشد به این صورت که باکتری های گرم مثبت در دیواره ی خود تنها یک لایه دارند، در حالی که در باکتری های گرم منفی این دیواره از چند لایه تشکیل شده است [13].

همان طور که گفته شد، عصاره ی اتانولی ریشه ی آدمک بر E. coli و B. cereus تنها در غلظت 50 میلی گرم بر میلی لیتر اثر آنتی باکتریایی داشت. این موضوع شاید نشان دهنده ی این باشد که عصاره ی این گیاه بر این باکتری ها اثرات آنتی باکتریال قوی ندارد و برای رسیدن به اطمینان باید مواد خالص تر از عصاره را (مانند اسانس) استخراج و بررسی کرد.

در مطالعه ی ناجی و همکاران در سال بر روی خواص آنتی میکروبی عصاره ی متانولی ریشه ی آدمک (جمع آوری شده از منطقه ی دماوند)، گزارش شد که این عصاره در بین سه سویه ی گرم منفی و سه سویه ی گرم مثبت تنها بر S. aureus، S. epidermidis و P. aeruginosa اثر آنتی باکتریایی داشته است. این عصاره بالاترین تاثیر را بر باکتری S. aureus نشان داد. MIC عصاره برای این باکتری، 200ppm و مقدار MBC آن 400 ppm به دست آمد. این نتایج، یافته های به دست آمده در مطالعه ی حاضر را (MIC و MBC عصاره ی اتانولی به ترتیب برابر 0/195 و 0/391 میلی گرم بر میلی لیتر)، تایید می کند. در این مطالعه هم چنین در غلظت های کمتر از 5 میلی گرم در میلی لیتر عصاره، اثر آنتی باکتریایی بر باکتری های E. coli و B. cereus، مشاهده نشد در تحقیق حاضر نیز عصاره ی اتانولی تنها در غلظت 50 میلی گرم بر میلی لیتر بر این باکتری ها اثر آنتی باکتریایی نشان داد [8].

نتیجه گیری

یافته های این بررسی نشان داد که عصاره های گیاه آدمک بر روی باکتری های گرم منفی اثر آنتی باکتریایی نداشتند، در حالی که بر روی باکتری های گرم مثبت مورد مطالعه موثر بودند. در میان باکتری های گرم مثبت، این عصاره ها بر C. perfringens اثر آنتی باکتریایی قوی تری نشان دادند. البته به منظور اثبات این اثر، مطالعات بیشتری در مدل های غذایی مورد نیاز است تا بتوان عصاره های این گیاه را به عنوان نگهدارنده ی غذایی معرفی کرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله بر خود لازم می دانند که از معاونت پژوهشی، معاونت غذا و دارو و هم چنین مرکز تحقیقات گیاهان دارویی و فراورده های طبیعی دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی برای حمایت از این پروژه تشکر نمایند.

References

1. Mead, P.S., Slutsker L., Dietz V., McCaig L.F., Breese J.S., Shapiro C., Griffin P.M., Tauxe R.V., 1999, Food related illness and death in the United States, Emerg. Infect. Dis. 5, 607–625.

2. Otshudi A.L., Foriers A., Vercruysse A., Van Zeebroeck A., Lauwers S. 1999, In vitro antimicrobial activity of six medicinal plants traditionally used for the treatment of dysentery and diarrhoea in Democratic Republic of Congo (DRC), Phytomedicine 7, 167–172.

3. Essawi T., Srour M., 2000, Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity , J. Ethnopharmacol. 70, 343– 349.

4. Farsam H., Amanlou M., Dehpour A.R. and Jahaniani F, (2000), Antiinflammatory and analgesic activity of Biebersteinia multifida DC, root extract. Journal of Ethnopharmacology, 71(3): 443-447.

5. Kurbanov D., Zharekeev B.K.h., 1974, Alkaloid of Biebersteinia multifida and Peganum harmala from the karakalpak ASSR. Khim. Prir. Soedin. 5, 685–686,Through Chemical Abstract. 1975, 82, 83023b.

6. Arifkhodzhaev A.O., Arifkhodzhaev Kh.A., Kondratenko E.S., 1985, Polysaccharides from Saponin-containing plants. II. Isolation and characterization of polysaccharides from Biebersteinia multifida, Khim. Prir. Soedin. 16, 755-757, Through Chemical Abstract 1986, 104, 165369f.

7. Arifkhodzhaev A.O., Rakhimov D.A. 1986. Polysaccharides of saponin-forming plants. III. Polysaccharides of the aerial parts of Biebersteinia multifida. Khim. Prir. Soedin. 6, 773–774,Through Chemical Abstract 1987, 106, 153118.

8. Naji T., Kazemipour m., Bagheri F, 2010, Evaluation of antibacterial effects of Biebersteinia multifida DC, root extract. Food and biotechnology conference, Kermanshah.

9. Duffy C. f., Power R.F, 2001, Antioxidant and antimicrobial properties of some Chinese plant extracts, Internat. J. Antimicro. Age., 17, 527-529.

10. Herrera R.M., Perez M., Mart´ın-Herrera D.A., Lopez-Garcia R., Rabanal R.M., 1996, Antimicrobial activity of extracts from plants endemics to the Canary Islands, Phytotheraphy Research 10, 364– 366.

11. Meng J.C., Zhu Q.X., Tan R.X., 2000, New antimicrobial mono- and sesquiterpenes from Soroseris hookeriana subsp, erysimoides, Planta Medica 66, 541–544.

12. Scrinivasan D., Nathan S., Suresh T., Perumalsamy O., 2001, Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine, Journal of Ethnopharmacology 74, 217–220.

13. Enzo A., Palombo E.A. Susan J. Antibacterial activity of traditional Australian medicinal plants, J. Ethnopharmacol., 77, 151-157.

Evaluation of Antibacterial activities of different roots extracts of Biebersteinia multifida DC.

Ghodrati n.[1], Asili J.[2], Mohammadi Sani A.[3], Fazli Bazzaz B. S[4].*

[1]MSc, Quchan Branch, Islamic Azad University, Quchan, Iran.
[2]Associated Professor, Department of Pharmacognosy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.
[3]Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Quchan Branch, Islamic Azad University, Quchan, Iran.
[4]Professor, Department of Medicinal Chemistry, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

[*]**corresponding Author**: Quchan Branch, Islamic Azad University, Quchan, Iran
Email: n_ghodrati@yahoo.com

Abstract

Background & Objectives: *Plant extracts are rich sources of natural antibacterial compounds. In recent decades, the need for using natural preservative in foods, has promoted extensive scientific research on plants extracts and essential oils. The purpose of this investigation was to determine the antibacterial activities of root extracts of Biebersteinia multifida DC.*

Material and Methods: *the hexane, chloroform and ethanol roots extracts of Biebersteinia multifida DC. are obtained by maceration method. Antibacterial activity of extracts determined against Staphylococcus aureus (PTCC 1431), Salmonella enterica (PTCC 1709), Escherichia coli (PTCC 1399), Bacillus cereus (PTCC 1015), Enterobacter aerogenes (PTCC 1229), Clostridium perfringens (PTCC 1765). The micro-dilution method was applied for the determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) of selected bacteria strains.*

Results: *gram positive bacteria were more sensitive to the extracts to gram negative bacteria. The minimum inhibitory concentration and the minimum bactericidal concentration against C. perfringens were 0.195 mg mL^{-1} and 0.391 mg mL^{-1}.*

Conclusion: *The findings indicate that hexane and ethanol roots extracts of Biebersteinia multifida DC. exerts antibacterial effects on C. perfringens. More studies, such as examinations in food models are needed to unravel the antimicrobial effects of this plant extracts.*

Keywords: *Biebersteinia multifida DC., antibacterial activity, minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC)*