مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی سمنان- جلد ۸، شماره۳ (پیاپی ۲۳)، بهار ۱۳۸۶

بررسی اثرات عصاره الکلی برگ و میوه سه گیاه داروئی بومی خراسان بر مدل رشد باکتری E.coli 0157 به روش اسپکتروفتومتری

منصور مشرقی[1*](Ph.D) ، صدیقه ملائی[1](B.Sc)، زهرا غلامی[1](B.Sc) ، شیما تولایی[2] (M.Sc)

۱ مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی و مهندسی بافت، دانشکده علوم پایه، دانشگاه فردوسی مشهد

۲ بخش بیوشیمی و تغذیه، پژوهشکده بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

چکیده

سابقه و هدف: استفاده از گیاهان داروئی برای درمان بیماری‌ها یکی از مفیدترین راه‌ها بوده است که کم‌ترین اثرات جانبی را ایجاد می‌کند. سویه‌های باکتری E.coli 0157 یکی از خطرناک‌ترین عوامل بیماری‌زای دستگاه گوارشی می‌باشند که تا به حال جان تعداد زیادی را در اقصا نقاط جهان گرفته است لذا یافتن عصاره گیاهی که بر رشد این سویه مقاوم تاثیر بگذارد می‌تواند در تهیه داروهای موثر کمک زیادی نماید.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق علاوه بر روش‌های معمول نظیر تعیین MIC، چاهک پلیت یا دیسک حاوی عصاره گیاهی سعی شده است اثر عصاره گیاهی بر روی مراحل مختلف رشد باکتری با استفاده از اسپکتروفتومتری و رسم تعداد زیادی منحی رشد بطور دقیق‌تری سنجیده گردد. بدین منظور سویه غیر بیماریزا E.coli 0157 (NCTC 1290) به عنوان مدل از دانشگاه آبردین انگلستان سفارش داده شد و بعد از بررسی‌های لازم مراحل مختلف رشد آن در حضور عصاره الکلی گیاهان اوکالیپتوس Eucalyptus globulus، گردو Juglans regia ، ویتکس یا پنج انگشت Vitex angus castus بررسی گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که اختلاف قابل ملاحظه ای در مراحل رشد سویه باکتری مزبور در حضور و یا عدم حضورعصاره های الکلی اوکالیپتوس و گردو مشاهده نمی‌گردد. البته گیاه ویتکس اثر ممانعت کنندگی قابل ملاحظه‌ای بر رشد باکتری مزبور در زمان‌های ۴-۱۱ ساعت بعد از تلقیح داشته است که این اثر در مراحل اولیه رشد باکتری مشاهده نگردید.

نتیجه‌گیری: نتایج بدست آمده می‌تواند استنباط جدیدی در درک هر چه دقیق‌تر اثرات ضد میکروبی گیاهان داروئی بر روی مراحل رشد باکتری ایجاد کند که خود راه‌گشای هر چه موثرتر استفاده کردن از آن در زمان مناسب باشد.

واژه‌های کلیدی: باکتری E.coli0157 ، گیاهان داروئی، منحنی رشد، اسپکتروفتومتری، اثرات ضد میکروبی

مقدمه

اگرچه بیشتر سوش‌های *E.coli* بی ضرر شناخته شده‌اند، اما چندین گونه از آنها می‌توانند بیماری‌های خفیف تا جدی ایجاد کنند [۱و ۲]. سویه *E.coli 0157* می‌تواند اسهال شدید ایجاد کند که در بعضی حالات منجر به عوارض جدی و حتی مرگ می‌شود[۳]. سه خصوصیت منحصر به فردی که *E.coli* 0157 را از دیگر سوش‌های *E.coli* متمایز می‌سازد عبارتند از: عوارض خطرناکی که بر سلامتی دارد، مقاومت غیر طبیعی آن در محیط (*E.coli 0157* در درجه حرارت‌های پایین و تحت شرایط اسیدی زنده می‌ماند)، مقدار

* نویسنده مسئول: تلفن: ۸۷۹۷۶۶۰ – ۰۵۱۱ فاکس: ۸۷۹۶۴۱۶ – ۰۵۱۱ E_mail: mashrghi@ferdowsi.um.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۸۶/۲/۲۶؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۶/۵/۳

مورد لزوم بسیار کم برای عفونت زایی، تعداد کمی باکتری، از ۱۰ تا ۱۰۰ سلول برای ایجاد بیماری کافی است [۴ و ۵]. *E.coli 0157* در تمام جهان تشخیص داده شده، اما بیش‌ترین شیوع در کانادا، ایالات متحده و اسکاتلند ثبت شده است [۶ و ۷ و ۸].

اهمیت استفاده از گیاهان داروئی در درمان بیماری‌ها و جلوگیری و ممانعت از رشد باکتری‌های پاتوژن به خوبی شناخته شده است [۹، ۱۰، ۱۱]. ولی با وجود تنوع بسیار زیادی که این نوع گیاهان چه در سطح جهانی و یا منطقه وکشور دارند و همچنین ظهور بیماری‌ها و عوامل بیماری زای جدید مطالعه و تحقیق در این زمینه همچنان ادامه دارد [۱۲، ۱۳، ۱۴].

در این راستا با توجه به اینکه پتانسیل بالایی در تنوع گیاهان داروئی در منطقه خراسان وجود دارد گیاهانی که اثرات داروئی موثری داشته اند [۱۵] و مطالعاتی در زمینه اثرات ضد باکتریایی آنها صورت گرفته است سه گیاه داروئی انتخاب گردیدند تا با توجه به پتانسیل درمانی گیاهان داروئی و همچنین اثرات ضد باکتریایی این گیاهان و از طرف دیگر خطراتی که سوش جدید *E.coli 0157* و انواع مقاوم به آنتی‌بیوتیک آن ممکن است در حال حاضر یا آینده برای کشور ایجاد کند، راه‌های درمان مناسبی در پیش رو قرار داده شود.

گیاه اوکالیپتوس (*Eucalyptus globules*) درختی است که برگ‌های آن دارای ترکیبات شیمیایی مختلف بوده و دارای خواص درمانی متعددی می‌باشد. مصرف اوکالیپتوس در تب‌های نوبه، به طور محسوس موجب پیدایش بهبودی در بیمار می‌شود وجود دو خاصیت توأم ضد قابض و ضد میکروبی که اوکالیپتوس دارد باعث گردیده که در بیماری‌های مختلف مجاری ادرار، بیماری‌های منشاء نزله و وجود میکروب در مجرای بول، کلی باسیلوز و در دستگاه تناسلی زن، به‌منظور رفع ترشحات مهبلی و غیره از آن استفاده به عمل می‌آید [۱۶ و ۱۷].

گیاه گردو (*Juglans regia*) گیاه دیگری می‌باشد که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت و قسمت مورد استفاده درخت گردو، برگ، قسمت گوشتدار میوه سبز، پوست ثانوی (پوست چسبیده به چوب که معمولا آبکش را همراه دارد) و چوب آن است. از قدیم از قسمت‌های مختلف درخت گردو مصارف درمانی مختلفی صورت می‌گرفته است که اثر درمانی برگ درخت گردو را به علت دارا بودن تانن، نمی‌توان برای درمان سل انکار کرد زیرا برگ درخت گردو با دارا بودن تانن و مواد موثر دیگر، بر روی دستگاه هضم و ماهیچه‌ها، اثرمفید و تقویت کننده دارد [۱۸].

گیاه ویتکس *Vitex angus castus* یا گیاه پنج انگشت یکی دیگر از انواع گیاهان دارویی است‌که در این تحقیق بر روی اثرات ضد باکتریایی عصاره آن مطالعه گردیده است. خواص دارویی متفاوت این گیاه نظیر فعالیت ضد باکتری برخی ترکیب‌های موجود در اسانس این گیاه در بهبود دسته‌ای از ناراحتی‌های گوارشی سبب توجه بیشتر محققان به این گیاه شده است. قسمت مورد استفاده درمانی گیاه میوه آن است که به بزرگی ۰/۵ سانتیمتر بوده ودارای رنگ سیاه می‌باشد. بسیاری از گونه‌های جنس مورد نظر مصارف دارویی فراوان دارند که در درمان برخی از ناراحتی‌های گورارشی نیز موثر می‌باشد. اسانس گیاه در مقابل باکتری‌های اشرشیاکلی، پسودوموناس آئروجینوزا، باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس‌از خود فعالیت ضدباکتریایی نشان داده است. در هر حال خواص درمانی این گیاه به خوبی شناخته نشده است و انجام یک رشته بررسی‌های دقیق عملی درباره آن ضرورت‌دارد.

در این تحقیق علاوه بر روش‌های معمول نظیر تعیین MIC (تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده)، چاهک پلیت یا دیسک حاوی عصاره گیاهی سعی شده است اثر عصاره گیاهان منتخب بر روی مراحل مختلف رشد باکتری (لگ، لگاریتمی، ثابت) با استفاده از اسپکتروفتومتری اندازه گیری گردد تا بتوان زمان تاثیر عصاره بیشتر مشخص گردد.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه‌های گیاه با همکاری آزمایشگاه سیستماتیک گیاهی گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم پایه و از گلخانه پژوهشکده علوم گیاهی صورت گرفت.

استخراج (عصاره‌گیری): عصاره‌گیری توسط حلال اتانول ۹۶ درجه و به روش خیساندن (عصاره‌گیری با حلال الکلی) با استفاده از روش‌های استاندارد انجام گرفت. برای تهیه عصاره ابتدا مقدار معینی از قسمت‌های مختلف گیاه (۱۰گرم برگ اوکالیپتوس خشک، ۲۰گرم برگ گردو تازه، و ۲۰ گرم میوه ویتکس خشک) را با ترازوی دیجیتالی وزن نمودیم و پس از شستشوی اولیه با آب و آب مقطر استریل به مدت ۱۵ دقیقه در محلول ضدعفونی کننده ومیکروب‌کش ۱۰ درصد Benzalkonium chloride ضدعفونی کرده، مجدداً با آب مقطر استریل شستشو نمودیم تا محلول ضد عفونی کننده پاک شود. سپس گیاه را خرد نموده و با هاون چینی‌کوبیده و در کاغذ آلومینیم سربسته به مدت سه روز پیاپی عمل تندالیزاسیون صورت گرفت. پس از آن با۱۵۰ میلی لیتر (۷۷ میلی‌لیتر در موردگیاه سیر) الکل اتیلیک ۹۶ درجه مخلوط نمودیم. پس از خارج سازی از دستگاه شیکر بعد از ۴۸ ساعت در دستگاه دوار تقطیر در خلاء با دور ۱۰ به مدت چندین ساعت در دمای حدود ۸۲ درجه حذف حلال شد تا اینکه در این دما دیگر حلالی استخراج نگردید.

تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده (MIC): این آزمایش بر اساس منابع معتبر پایه گذاری گردید [۱۹] و مراحل مختلف آن بر حسب آزمایش بهینه سازی گردید. برای تهیه محیط کشت دو برابر غلیظ شده مولرهینتون آگار ۷۶ گرم در ۱ لیتر آب مقطر حل گردید. محیط کشت ذوب شده را درون پتری‌های مولر ریخته، صبر می‌کنیم تا سفت شود، سپس از میکروب مورد بررسی *(E.coli0157)* که قبلاً روی محیط کشت شیبدار نوترینت آگار کشت داده شده بود و سپس در ۱۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع نوترینت براث تلقیح نموده و به مدت ۱۸ ساعت در دستگاه Shaker قرار داده شده بود و رشدکرده بود به به غلظت حدود نیم مک‌فارلند برسد سپس با سوآب استریل روی سطح محیط کشت جامد، کشت یک‌نواخت دادیم. آنگاه حلقه‌های فلزی پانچ را در محیط کشت فرو برده، درون چاهک‌ها را که با فاصله از هم قرار دارند، با ۰/۴ میلی‌لیتر از عصاره گیاه به مقادیر متفاوت پر نمودیم. پس از قرار دادن ظروف به مدت ۲۴ ساعت در گرم‌خانه (انکوباتور) در دمای ۳۷ درجه، قطر هاله ممانعت از رشد مورد بررسی قرار گرفت.

اسپکتروفتومتری: رسم منحنی رشد باکتری بروش اسپکتروفتومتری و بر طبق منابع معتبر صورت گرفته است [۲۰ و ۲۱]. دستگاه اسپکتروفتومتری مورد استفاده ما Lightwave UV/Vis Diode Array Specterophotometer بود. یک روز قبل از آغاز مراحل اسپکتروفتومتری در مورد هر گیاه حداقل ۱۴ ارلن که هر یک حاوی ۱۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع نوترینت براث استریل بودند آماده می‌شد که اغلب در دستگاه همزن با حرارت ۳۷ درجه سیلسیوس و با دور حدود rpm ۱۲۰ قرار داده می‌شد. معمولاً حدود ۱۸ ساعت قبل به یکی از این ارلن‌ها دو لوپ از نمونه میکروب مورد بررسی، از نمونه‌های استوک قبلاً تهیه شده بود *E.coli0157* تلقیح می‌گردید. ارلن Inoculum در ابتدای مراحل اسپکتروفتومتری از ارلن Inoculum ۱ میلی‌لیتر میکروب به هر یک از ارلن‌هایی که باید جذب آنها سنجش شود تلقیح می‌نمودیم. ارلن‌هایی که باید میزان رشد آنها در فواصل زمانی ۱ ساعت اندازه‌گیری می‌شد عبارت بودند از ۱ یا ۲ ارلن کنترل که فاقد عصاره بودند و تعدادی ارلن که در آنها رشد میکروب تحت تاثیر غلظت‌های ۰/۴، ۰/۳، ۰/۲ میلی‌لیتر عصاره بودند. یک ارلن که تنها حاوی ۱۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت مورد استفاده (نوترینت براث) بود برای صفر نمودن (عدم دخالت رنگ محیط کشت در جذب نوری) بکار می‌رفت (ارلن شاهد). برای عصاره‌های یک ارلن مجزا با نام شاهد عصاره در نظر گرفته می‌شد که حاوی ۱۵۰ میلی لیتر محیط کشت (نظیر دیگر ارلن‌ها) به اضافه میانگینی از غلظت‌های عصاره بکار رفته

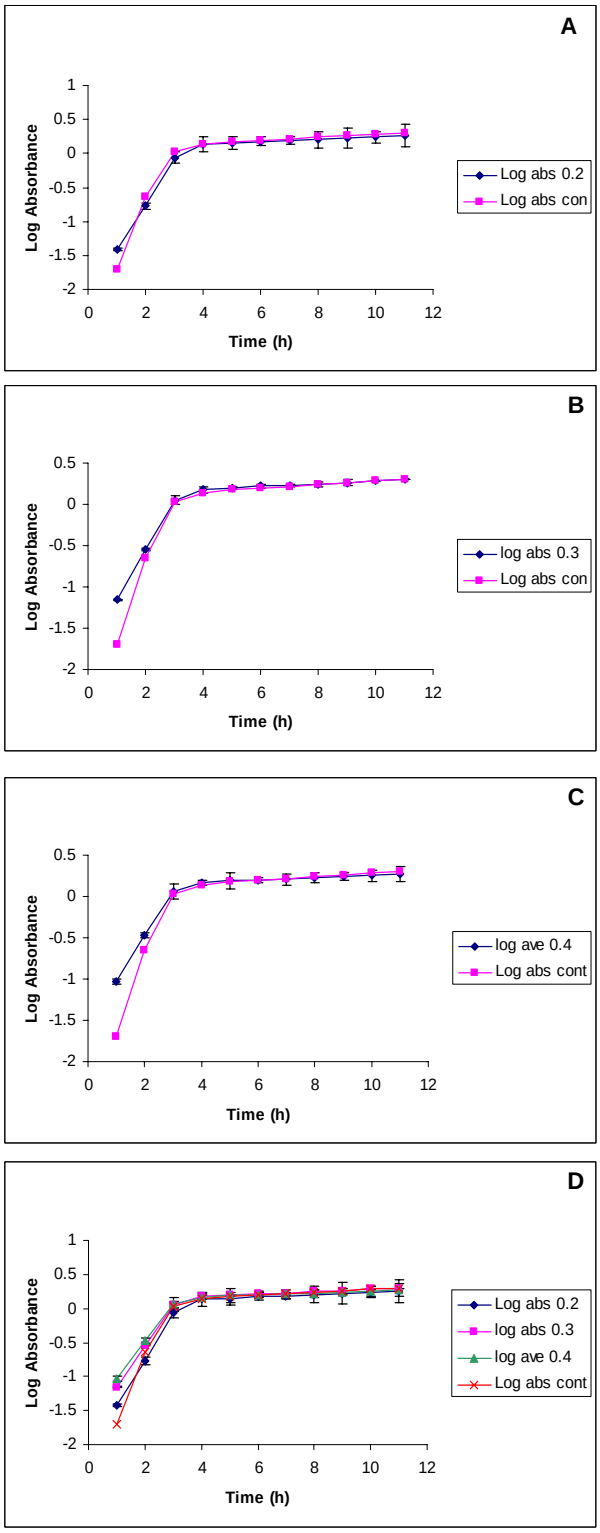
(یعنی ۰٫۳میلی لیتر) بود. بدین ترتیب اثر جذب نوری رنگ عصاره نیز صفر می‌شد تا در سنجش رشد میکروب ارلن‌های حاوی عصاره مشکل ایجاد نشود. ثبت جذب هر یک از ارلن‌ها پس از زمان صفر (بلافاصله پس از تلقیح ۱ میلی‌لیتر میکروب به هر یک از آنها (بجز به ارلن‌های شاهد) و نیز افزودن‌عصاره‌ها به ارلن‌های لازم) آغاز شد و سپس در فواصل زمانی تکرار می‌شد. ضمناً تمامی این مراحل در زیر هود که با اشعه UV در آغاز کار استریل شده بود و با تهویه مناسب و کنار شعله روشن انجام می‌شد. ارلن‌ها در دستگاه همزن با همان حرارت ۳۷ درجه سیلسیوس (حرارت مطلوب رشد *E.coli*) و با دور حدود rpm ۱۲۰ قرار داده می‌شد. در هر سری ابتدا با نمونه‌های شاهد مربوط، جذب دستگاه صفر می‌شد (شاهد عصاره برای خواندن ارلن‌های حاوی عصاره‌ها و حذف اثر غلظت رنگ عصاره و همچنین ارلن شاهد برای خواندن جذب ارلن‌های کنترل) سپس داده‌های مورد نیاز از دستگاه اسپکتروفتومتر یعنی میزان جذب Absorbance (Abs)، دانسیته نوری (OD) و درصد عبور T% تا حدود حداقل ۱۱ ساعت پس از زمان صفر ثبت شد که این مدت زمان به میزان جذب یا رشد باکتری بستگی داشت. تمامی مراحل اسپکتروفتومتری در جذب نوری ۶۰۰ نانومتر صورت گرفته است.

نتایج

اثرات عصاره الکلی گیاه اوکالیپتوس *Eucalyptus globules*: بعد از تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده (MIC) با مشاهده هاله ممانعت از رشد از بین هشت غلظت، سه غلظت ۰/۲، ۰/۳ و ۰/۴ میلی لیتر عصاره الکلی اوکالیپتوس برای مراحل بعدی آزمایش انتخاب گردید البته بررسی‌هاله ممانعت از رشد در مورد دو گیاه دیگر نیز نتایج یک‌سانی را نشان داد. رشد علظت‌های برر روی پلیت با اضافه نمودن ۰/۲ میلی لیتر عصاره الکلی گیاه اکالیپتوس به ۱۰۰ میلی لیتر کشت نوترینت براث تلقیح شده با باکتری اشریشیا کلی ۰۱۵۷ مراحل مختلف رشد توسط دستگاه اسپکتروفتومتری UV/visible در طول موج ۶۰۰ نانومتر مورد مطالعه قرار گرفت و کار در سه ارلن به صورت سه تایی صورت گرفته و یک نمونه کنترل مثبت (ارلن تلقیح شده با باکتری ولی بدون عصاره) و کنترل منفی (ارلن حاوی عصاره فاقد باکتری تلقیح شده) نیز در نظر گرفته شد. بررسی نمودار رشد (تصویر ۱- الف) نشان می دهد که تغییرات رشد باکتری *E.coli 0157* در حضور و عدم حضور عصاره الکلی به میزان ۰/۲ میلی لیتر کاملا محسوس نبوده و تنها اختلاف کمی در مراحل رشد اولیه آن مشاهده می‌گردد که آن اختلاف نیز معنی دار نمی‌باشد.

با بررسی اثرات غلظت ۰/۳ و ۰/۴ میلی لیتر عصاره و مقایسه آن با کنترل بطور قابل توجهی مشاهده می‌گردد که با افزایش غلظت عصاره الکلی در ساعت های اولیه رشد باکتری با توجه به یک‌سان بودن ماده اولیه تلقیح اختلاف جذب بین رشد باکتری در حضور و عدم حضور عصاره الکلی افزایش می‌یابد (تصاویر ۱-B و ۱-C). همچنین مقایسه غلظت‌های مختلف عصاره الکلی گیاه اکالیپتوس (۰/۲، ۰/۳ ، ۰/۴ میلی لیتر) (تصویر ۱-D) نشان می‌دهد که عصاره الکلی گیاه مزبور بر ساعات اولیه شروع منحنی رشد با توجه به یک‌سان بودن ماده تلقیح نسبت به دیگر زمان‌های رشد تاثیر قابل ملاحظه‌تری داشته به طوری که جذب در یک ساعت بعد از تلقیح عصاره الکلی گیاه و باکتری به ترتیب با افزایش غلظت عصاره افزایش یافته است (۱/۴۰-، ۱/۱۵-،۱/۰۲-). البته در دیگر مراحل رشد باکتری اختلاف معنی داری در تغییرات رشد در حضور غلظت‌های مختلف عصاره‌های الکلی گیاه اکالیپتوس مشاهده نگردید.

انحراف معیار برای هر نقطه از منحنی با استفاده از برنامه آماری و نرم افزاری Excel محاسبه گردید که به صورت خطای بار در هر نقطه نمایش داده شده است. نتایج نشان داد که بین رپلیکیت‌های مختلف در یک غلظت معین اختلاف معنی‌داری مشاهده نمی‌گردد که نشان دهنده دقت در نمونه برداری می‌باشد. باکتری *E.coli 0157* با رسم نمودارهای متعدد (تصاویر ۲- A، B، C و D) مورد بررسی قرار گرفت

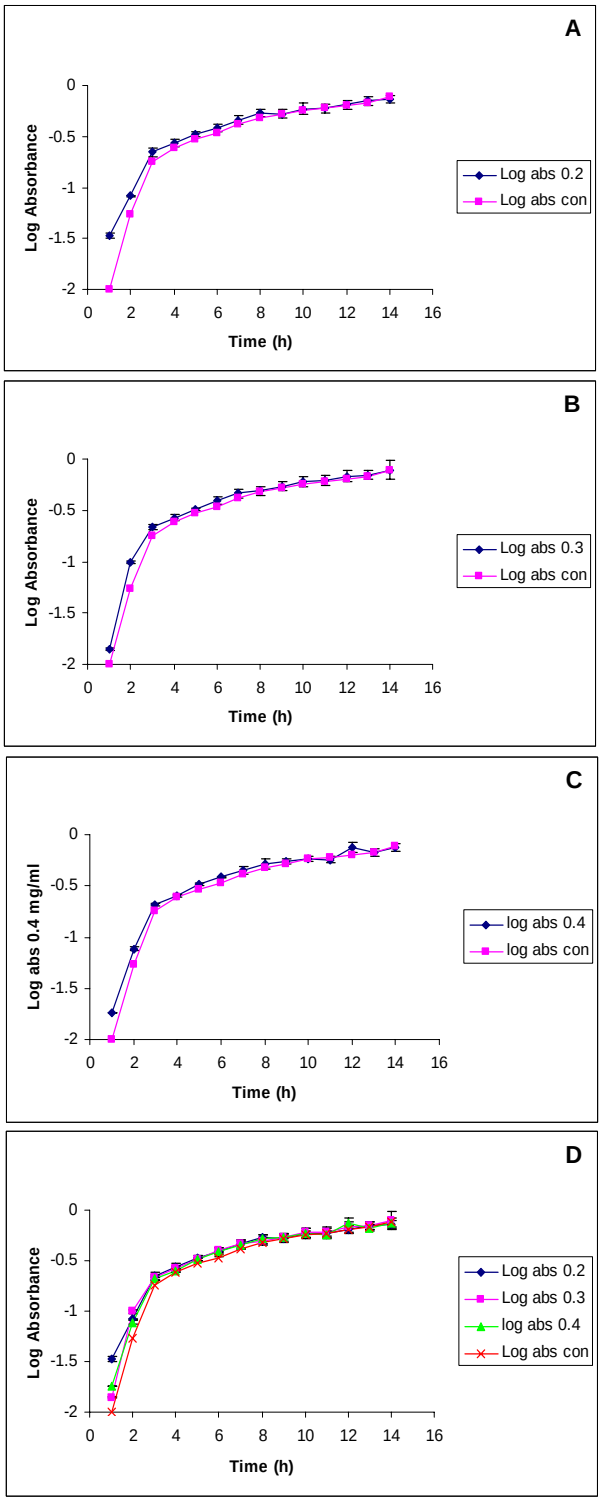


شکل ۱: منحنی رشد باکتری *E.coli* 0157 تحت تاثیر غلظت های مختلف ۰/۲ (A) ، ۰/۳ (B)، ۰/۴ (C) میلی لیترعصاره الکلی گیاه اوکاتیپتوس *Eucalyptus globulus*. مقایسه اثرغلظت های مختلف بر رشد باکتری در مقایسه با کنترل درنمودار D نشان داده شده است.

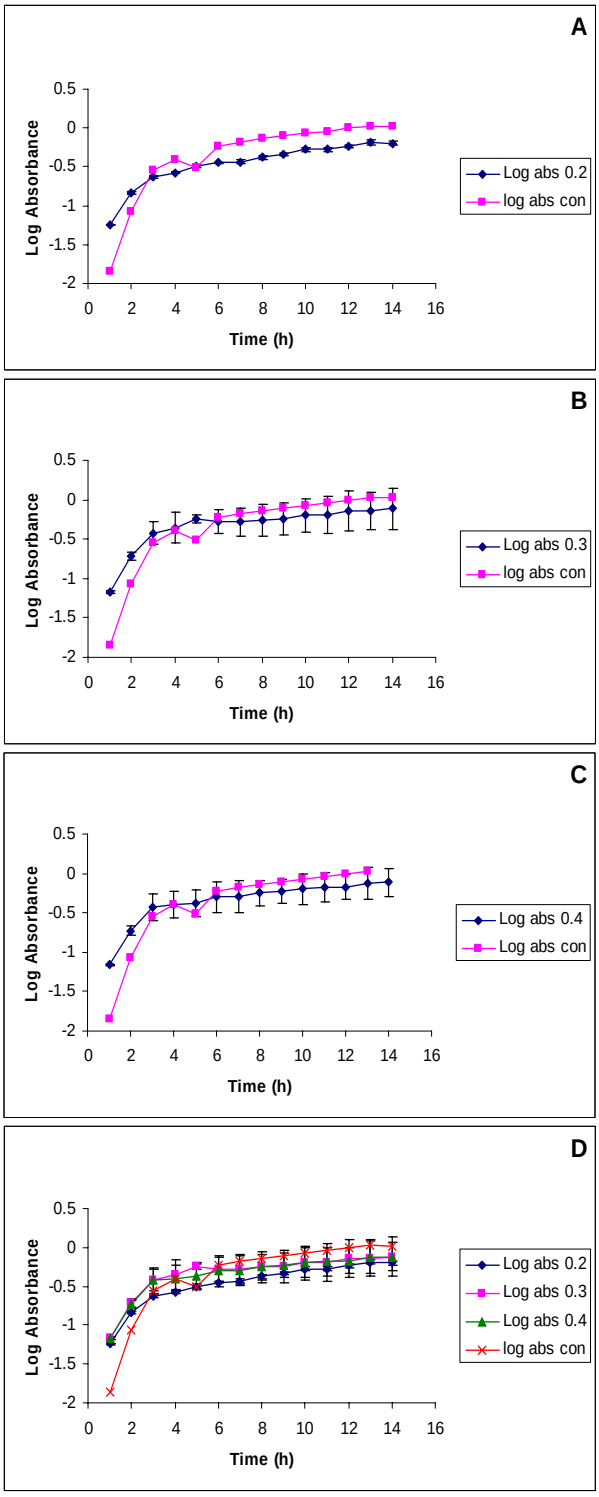
و مشاهده گردید که در ۴ ساعت بعد از تلقیح و بعد از آن از مدل مشابهی با عصاره الکلی گیاه اکالیپتوس متابعت می‌کند به طوری که تفاوتی در رشد باکتری در حضور یا عدم حضور غلظت‌های مختلف عصاره الکلی گیاه گردو مشاهده نمی‌گردد. البته در ساعت اول رشد در حضور غلظت‌های بیشتر عصاره الکل ۰/۳ و ۰/۴ میلی لیتر جذب کمتری (۱/۷۴-، ۱/۸۵-) نسبت به غلظت ۰/۲ میلی لیتر (۱/۴۷-) مشاهده می‌گردد (تصاویر۲- A، B، C). همچنین اختلاف بین منحنی‌های رشد کنترل (محیط کشت باکتری فاقد عصاره الکلی) و نمونه مورد مطالعه (محیط کشت باکتری واجد عصاره الکلی) در ۴ ساعت اولیه رشد در غلظت‌های بالاتر (۰/۳ و ۰/۴ میلی لیتر) کمتر از غلظت پایین (۰/۲ میلی لیتر) می‌باشد. تغییر قابل ملاحظه‌ای که نیز در نمودار مقایسه‌ای رشد باکتری *E.coli 0157* مشاهده می‌گردد (تصویر ۲-D) افزایش رشد نسبی باکتری در مرحله رشد ثابت می باشد که این پدیده در مورد عصاره الکلی گیاه اکالیپتوس (تصویر۲) مشاهده نگردید.

اثرات عصاره الکلی گیاه ویتکس *Vitex angus castus*

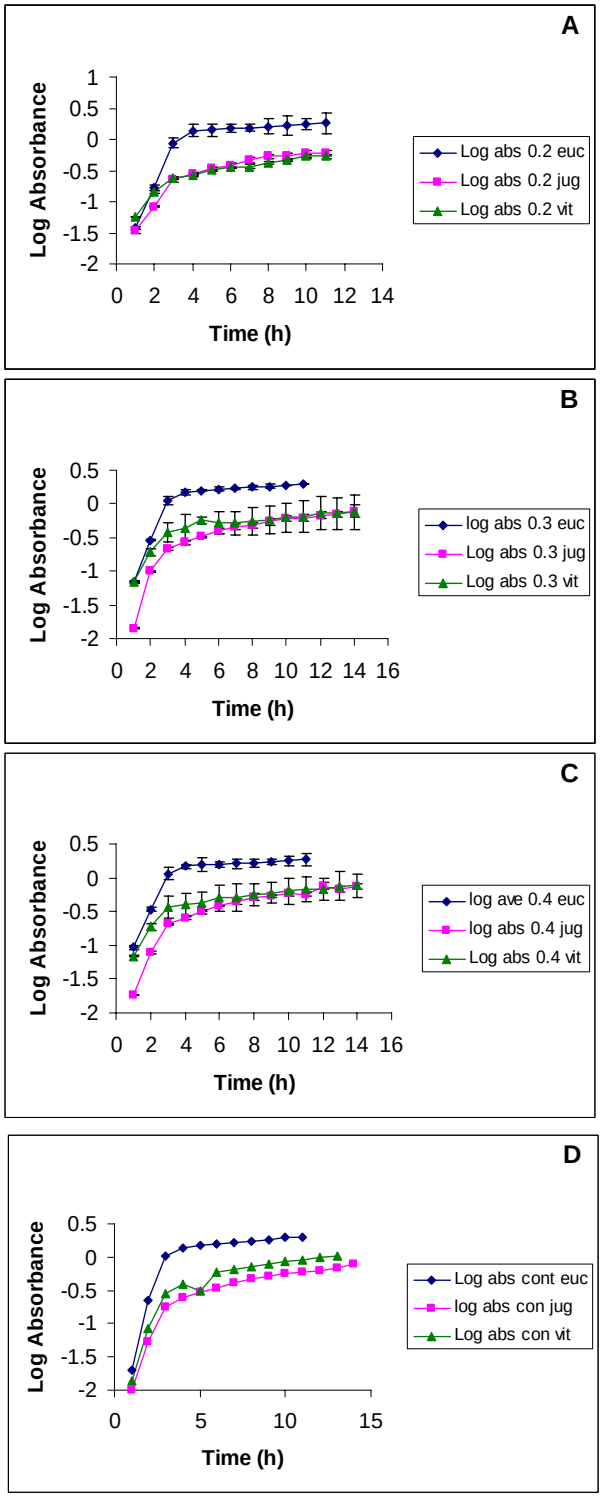
مدل رشد باکتری E.coli 0157 در حضور عصاره الکلی گیاه ویتکس یا پنج انگشت، رفتار متفاوت‌تری با دو عصاره الکلی دیگر نشان داده است. در حضور غلظت ۰/۲ میلی‌لیتری از عصاره گیاه ویتکس (تصویر ۳- A) اگرچه در مراحل اولیه رشد (۰ تا ۴ ساعت) اثراتی مانند دیگر عصاره‌های الکلی داشت به طوری که جذب بیشتر مربوط به رشد باکتری در حضور عصاره الکلی بود ولی در مراحل بعدی رشد باکتری در حضور عصاره گیاه ویتکس کاهش یافته است. همین رفتار در مورد غلظت‌های ۰/۳ و ۰/۴ میلی‌لیتر از عصاره الکلی گیاه مزبور مشاهده گردید (تصاویر ۳- B و ۳- C) ولی بر خلاف تصور مشاهده گردید که با افزایش غلظت عصاره الکلی اختلاف بین نمودار رشد باکتری در حضور و عدم حضور عصاره الکلی به میزان کمی کاهش یافته است. البته بطور قابل ملاحظه‌ای با مقایسه نمودارها (تصویر ۳- D) مشخص گردید که غلظت ۰/۳ و ۰/۴ میلی لیتر از عصاره



شکل ۲: نمودار منحنی رشد باکتری *E.coli* 0157 تحت تـاثیر غلظـت های مختلف ۰/۲ (A) ، ۰/۳ (B)، ۰/۴ (C) میلی‌لیترعصاره الکلـی گیـاه گردو *Juglans regia* . مقایسه اثرغلظت های مختلف بر رشـد بـاکتری در مقایسه با کنترل درنمـودار D نـشان داده شـده اسـت. انحـراف معیـار (standard deviation) برای هر نقطه از منحنی بـا اسـتفاده از برنامـه آماری و نرم افزاری Excel محاسـبه گردیـد کـه بـصورت خطـای بـار (error bar) در هر نقطه نمایش داده شده است.



شکل ۳: نمودار منحنی رشد باکتری *E.coli 0157* تحت تـاثیر غلظـت های مختلف ۰/۲ (A) ، ۰/۳ (B)، ۰/۴ (C) میلی‌لیترعصاره الکلـی گیـاه ویتکس *Vitex angus castus* . مقایسه اثرغلظت‌های مختلف بر رشـد باکتری در مقایسه با کنترل درنمودار D نشان داده شده است. انحراف معیار (standard deviation) برای هر نقطه از منحنی بـا اسـتفاده از برنامـه آماری و نرم افزاری Excel محاسـبه گردیـد کـه بـصورت خطـای بـار (error bar) در هر نقطه نمایش داده شده است.



تصویر ۴: بررسی مقایسه ای تاثیر یک غلظت معین ۰/۲ (A) ، ۰/۳ (B)، ۰/۴ (C) از عصاره الکلی گیاهان مختلف بر نمودار منحنی های رشد باکتری *E.coli 0157* . انحراف معیار (standard deviation) برای هر نقطه از منحنی با استفاده از برنامه آماری و نرم افزاری Excel محاسبه گردید که بصورت خطای بار (error bar) در هر نقطه نمایش داده شده است

الکلی گیاه ویتکس اثر ممانعت کنندگی بیشتری نسبت به ۰/۲ میلی‌لیتر داشته است. برای مقایسه رفتار رشد باکتری *E.coli 0157* در غلظت‌های مختلف، منحنی رشد باکتری در حضور یک غلظت معین از عصاره های الکلی سه گیاه مربوطه مورد بررسی قرارگرفت (تصویر ۴).

نتایج نشان داد که در تمامی نمودارهای ترسیم شده (تصاویر ۴-A، B، C، D) غلظت‌های مختلف (۰/۲ ، ۰/۳ و ۰/۴ میلی‌لیتر) عصاره‌های الکلی گیاهان گردو و ویتکس اثر ممانعت کنندگی بیشتری نسبت به عصاره الکلی گیاه اکالیپتوس داشته اند. این موضوع در غلظت ۰/۲ میلی‌لیتر عصاره الکلی با توجه که جذب میزان رشد باکتری در ساعت اولیه رشد در حضور سه عصاره الکلی بسیار نزدیک می‌باشد قابل توجه است (تصویر ۴- A).

البته باید متذکر شد که اختلافاتی بین میزان جذب باکتری در ساعات اولیه رشد باکتری در حضور غلظت های ۰/۳ و ۰/۴ میلی‌لیتر مشاهده می‌گردد (تصاویر ۴-B و ۴-C) که ممکن است در اختلاف ایجاد شده در دیگر مراحل رشد موثر باشد. همچنین در عدم حضور عصاره الکلی (نمونه کنترل) (تصویر ۱-D) نیز اختلاف در میزان جذب کنترل های مختلف بکار برده شده برای هر گیاه مشاهده می‌گردد که به احتمال قوی به علت اختلاف در ماده تلقیح اولیه می باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

گزاراشات متعددی درمورد اثرات ضد میکروبی عصاره گیاهان داروئی مختلف از نقاط مختلف ایران بدست آمده است[۱۵ و ۲۲] که این تحقیقات بر روی میکروارگانیسم‌های مختلف صورت گرفته است. مطالعات فوق اثرات ضد میکروبی گیاهان مورد بررسی در این تحقیق را بر اساس نتایج بدست آمده از هاله ممانعت از رشد تائید کرده است [۲۲، ۲۳]. همچنین بررسی‌های انجام شده در دیگر نقاط جهان اثرات ممانعت کنندگی عصاره گیاهان مزبور را ثابت می‌کند [۲۴]. مطالعات بر روی اثر ضد میکروبی ۱۸۰ گیاه از ۷۲ خانواده از گیاهان داروئی بومی ایران بر روی دو سویه از(E.coli

PTCC No. 1330, No 1338) نشان داد که ۱۴ گیاه هاله ممانعت از رشدی در حدود ۱۲ میلی‌متر ایجاد کرده‌اند. تحقیقات جدید نشان داده است که سرکه برنج در رقت‌های مختلف در کاهش تعداد باکتری E.coli 0157 در گیاه کاهو موثر بوده است لذا از این ماده برای ضد عفونی کردن کاهو در رستوران‌ها می‌توان استفاده نمود [۲۴]. همچنین در بین چندین نوع روغن گیاهی تست شده روغن گیاه *Cordothymus capitatus* بیش‌ترین اثر را بر روی باکتری E.coli 0157 داشته است [۲۵]. اما در این تحقیق با استفاده از نتایج بدست آمده بوسیله رسم منحنی رشد و اندازه‌گیری آن بروش اسپکتروفتومتری مشخص گردید که غلظت‌های مختلف عصاره الکلی گیاه اکالیپتوس و گردو اثرات مشابهی بر مراحل رشد باکتری E.coli 0157 داشته و اختلاف قابل ملاحظه‌ای در نرخ رشد باکتری در حضور و عدم حضور عصاره الکلی مشاهده نمی‌گردد. تنها در مراحل اولیه رشد تفاوت‌هایی مشاهده می‌گردد که بر خلاف تصور عصاره الکلی اکالیپتوس و گردو سبب تقویت رشد در ۴ ساعت اولیه رشد گردیده است که همین غلظت‌ها ایجاد هاله ممانعت از رشد در سطح پلیت نموده‌اند. اما رفتار رشد باکتری E.coli0157 در حضور عصاره الکلی گیاه ویتکس متفاوت از دو گیاه دیگر بوده و اختلاف معنی‌داری در رشد باکتری در حضور و عدم حضور عصاره خصوصا در ۴ ساعت بعد از رشد مشاهده گردید در صورتی که در ۴ ساعت اولیه رفتار رشد باکتری کاملا متفاوت بوده است. این نتایج نشان دهنده روند جدیدی در مطالعات اثرات عصاره های گیاهی خصوصا بر رشد باکتری E.coli0157 که یکی از سویه های خطرناک بوده و در مطالعات قبلی کمتر گزارشی در مورد اثرات عصاره‌های گیاهی بر این نوع خاص اشریشیا اشاره شده است. همچنین از نتایج این تحقیق میتوان در بررسی اثرات عصاره‌های گیاهان داروئی بر مراحل رشد باکتری استنباط مناسبی داشته به این صورت که در صورت استفاده عملی دارو مشخص گردد که دارو در چه مرحله ای از رشد باکتری موثرتر می‌باشد. در این تحقیق سعی شده است علاوه بر روش‌های معمول در بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره‌های گیاهی مانند اندازه‌گیری قطر هاله ممانعت از رشد اثرات عصاره‌ها بر هر یک از مراحل رشد باکتری E.coli0157 نیز مورد بررسی قرار گیرد. مطالعات بیشتری در مورد اثرات عصاره‌های گیاهان داروئی مختلف دیگر بر مراحل رشد این باکتری در حال انجام بوده که در گزارشات بعدی منتشر خواهد گردید.

منابع

[1] Whittam TS, Wolfe ML, Wachsmuth IK, Orskov FI, Orskov I, Wilson RA. Clonal relationships among *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis and infantile diarrhea. Infect Immun. 1993; 61 :1619–1629

[2] Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic, *Escherichia coli*. Clin Microbiol. Rev. 1998; 11: 1–60

[3] Griffin PM. Escherichia coli O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In: MJ Blaser, PD Smith, JI Ravdin, HB Greenberg and RL Guerrant, Editors, Infections of the gastrointestinal tract, Raven Press, New York 1995. pp. 739–761.

[4] MacDonald IA, Gould IM, Curnow J. Epidemiology of infection due to *Escherichia coli* O157: a 3-year prospective study, Epidemiol Infect 1996; 116: 279–284.

[5] Tarr PI. *Escherichia coli* 0157:H7: clinical, diagnostic, and epidemiological aspects of human infection, Clin. Infect. Dis. 1995; 20: 1–8.

[6] Griffin PM, Tauxe R. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli 0157:H7*, other enterohemorrhagic *E coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. Epidemiol Rev. 1991; 13: 60–98

[7] Waters JR, Sharp JC, Dev JV. Infection caused by *Escherichia coli 0157:H7* in Alberta, Canada, and in Scotland: a five-year review, 1987–1991, Clin. Infect Dis. 1994; 19, pp. 834–843

[8] Reilly WJ. *E coli* 0157 in Scotland–an overview, Scottish Centre for Infection and Environmental Health Weekly Report 1997; (suppl 1,97/13), 4–5.

[9] Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Review 1999; 12(4): 564-582.

[10] Ficker CE, Arnason JT, Vindas PS, Alvarez LP, Akpagana K, Gbeassor M, De Souza C, Smith ML. Inhibition of human pathogenic fungi by ethnobotanically selected plant extracts. Mycoses. 2003; 46: 29-37.

[11] Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. Journal of Applied Microbiology. 1999; 86:985-990

[12] Mansouri S. Inhibition of *Staphylococcus aureus* mediated by extracts of Iranian plants. Pharmaceutical Biology. 1999; 37(5): 375-377

[13] Shahidi Bonjar GH. Evaluation of antibacterial properties of Iranian medicinal-plants against Micrococcus luteus, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae* and *Bordetella bronchoseptica*. Asian Journal of Plant Sciences. 2004a 3(1):82-86

[14] Nariman F, Eftekhar F, Habibi Z, Falsafi T. Anti-*Helicobacter pylori* activities of six Iranian plants. Helicobacter. 2004; 9:146-151

[15] Fazly Bazzaz BS, Haririzadeh G. Screening of Iranian plants for antimicrobial activity. Pharmaceutical Biology. 2003; 41 (8): 573-583

[16] Lee K-G, Shibamoto T. Antioxidant activities of volatile components isolated from *Eucalyptus* species. Journal of the science of Food and Agriculture 2001; 81: 1573-1579

[17] Gray AM, Flatt PR. Antihperglycemic actions of *Eucalyptus globus* are associated with pancreatic and extra pancreatic effects in mice. Journal of Nutrition 1998; 128: 2319-2323

[18] Alkhawajah AM. Studies on the antimicrobial activity of *juglans regia*. Am J Chin Med 1997; 25(2): 175-180

[19] Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS, Trevino EA. Methods for testing antimicrobial effectiveness. In: Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. (Eds E.J. Baron, L.R. Peterson and S.M. Finegold), Mosby Co: St Louis, Missouri, 1990. pp 171-194

[20] Smith RP, Baltch AL, Michelsen PB, Ritz WJ, Alteri R. Use of the microbial growth curve in postantibiotic effect studies of Legionella pneumophila. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2003; 47(3): 1081-1087

[21] Cornu M., Delignette-Muller ML, Flandrois JP. Characterization of unexpected growth of *Escherichia coli 0157:H7* by modeling. Applied and Environmental Microbiology. 1999; 65(12): 5322-5327.

[22] Shahidi Bonjar GH. Screening for antibacterial properties of some Iranian plants against two strains of *Esherichia coli*. Asian Journal of Plant Sciences. 2004b; 3(3): 310-314

[23] Mehrabian S, Majd A, Majd I. Antimicrobial effects of three plants (*Rubica tinctorum*, *Carthamus tintorius*, and *Juglans regia*) on some airborne microorganisms. Aerobiologia. 2000; 16: 455-458

[23] Voravuthikunchai S, Lortheeranuwat A, Jeeju W, Sririrak T, Phongpaichit S, Supawita T. Effective medicinal plants against enterohaemorrhagic *Escherichia coli 0157:H7*. Journal of Ethnopharmacology 2004; 94: 49-54.

[24] Chang J M, Fang T.J. Survivial of *Escherichia coli O157:H7* and *Salmonella enterica* serovars Typhimurium in iceberg lettuce and the antimicrobial effect of rice vinegar against E.coli O157:H7. Food Microbiology 2007; 24: 745-751

[25] Oussalah M, Caillet S, Saucier L, Lacroix M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E.coli O157:H7, Salmonella typhimurium, Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. Food Control. 2007; 414-420