تحقیقی

اثر عصاره‌های آبی و الکلی ریشه باریجه بر سودوموناس آئروژینوزا

محمد صالحی*[1]، دکتر سیدمسعود هاشمی کروئی[2]، دکتر آیت الله نصرالهی عمران[2]، مسعود مبینی[1]، مریم اصغرحیدری[1]

۱- کارشناس ارشد زیست‌شناسی گرایش میکروب‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن. ۲- استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن.

چکیده

زمینه و هدف : *گیاه باریجه (Ferula gummosa Boiss) دارای خواص دارویی و ضدمیکروبی است. این مطالعه به منظور تعیین اثر عصاره‌های آبی و الکی ریشه گیاه باریجه بر سودوموناس آئروژینوزا انجام شد.*

روش بررسی : *در این مطالعه آزمایشگاهی گیاه باریجه در سایه خشک و عصاره‌های آبی و الکلی پودر ریشه باریجه به روش سوکسله تهیه شد. سپس اثر آن در رقت ۰/۱ با مقادیر مختلف روی سویه سودوموناس آئروژینوزا به روش‌های دیسک‌گذاری، چاهک و تعیین MIC و MBC بررسی گردید.*

یافته‌ها : *سودوموناس آئروژینوزا به عصاره‌های آبی کاملاً مقاوم بودند و MIC عصاره‌های متانولی و اتانولی گیاه باریجه به ترتیب برابر با $۱/۲۵\times۱۰^{۴}$ و $۶/۲۵\times۱۰^{۳}$ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد.*

نتیجه‌گیری : *عصاره متانولی و اتانولی ریشه باریجه دارای فعالیت ضدمیکروبی بیشتری علیه سودوموناس آئروژینوزا در محیط آزمایشگاه است.*

کلید واژه‌ها : *عصاره باریجه ، سودوموناس آئروژینوزا ، MIC ، MBC*

* نویسنده مسؤول : محمد صالحی ، پست الکترونیکی mohammadsalehi73@gmail.com

نشانی : تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن ، تلفن ۹-۴۲۷۱۱۰۵ - ۰۱۹۲۴۲۲ ، ۴۲۷۰۵۱۵

وصول مقاله : ۹۱/۳/۷ ، اصلاح نهایی : ۹۲/۳/۱۹ ، پذیرش مقاله : ۹۲/۳/۱۹

مقدمه

مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها روز به روز در حال افزایش است که این مسأله باعث می‌شود تا بشر به فکر جایگزین کردن عوامل ضدمیکروبی مؤثر و با عوارض جانبی کمتر به جای مواد ضدمیکروبی با اثر کمتر و عوارض ناخواسته بیشتر نظیر گیاهان دارویی باشد (۱).

جنس Ferula از تیره چتریان شامل بیش از ۱۳۳گونه پراکنده در نواحی مدیترانه تا آسیای مرکزی است. این جنس بیشتر در نواحی شمال و غرب ایران وجود دارد (۲). در کتاب فلورا ایرانیکا به ۳۰ گونه Ferula در ایران اشاره شده است. برخی از گونه‌های اندمیک این جنس در ایران شامل *persica* ، *tabasensis* و *gummosa* هستند (۳). باریجه (*Ferula gummosa Boiss*) یکی از گیاهان مهم دارویی، صنعتی و آروماتیک ایران است. شیرابه و اسانس باریجه در صنایع مختلف از جمله صنایع داروسازی، غذایی، عطرسازی، چسب‌سازی و نظامی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۴). باریجه چندین فعالیت دارویی از جمله ضدانقباض، خلط‌آور، ضدتشنج و ضدزکام را نیز نشان داده است. ترکیبات اصلی باریجه آلفاپینن و بتاپینن بوده که ممکن است نقش مهمی در فعالیت ضدمیکروبی داشته باشد (۵).

سودوموناس آئروژینوزا باکتری گرم منفی و میله‌ای شکل است که در افراد دارای نقص ایمنی و سوختگی به عنوان یک باکتری بیماری‌زای فرصت طلب عمل می‌کند و به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌های معمول مقاوم است. این باکتری دارای عوامل بیماری‌زای متعددی است و می‌تواند سبب بیماری‌های مختلفی مانند باکتریمی، سپتی‌سمی، عفونت‌های دستگاه تنفسی، ادراری و گوارشی شود. سودوموناس آئروژینوزا ۲۳ درصد از کل باکتری‌های جدا شده از بیماران، ۱۶ درصد از پنومونی‌های بیمارستانی، ۱۲ درصد از عفونت‌های مجاری ادراری کسب شده از بیمارستان، ۸ درصد از عفونت‌های زخم بعد از عمل جراحی و ۱۰ درصد از عفونت‌های خون بیمارستانی را تشکیل می‌دهد. استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها و افزایش بیماران دارای نقص ایمنی باعث بروز مقاومت‌های دارویی به سودوموناس شده است (۵). بنابراین استفاده از درمان‌های جایگزین برای کنترل عفونت‌های ناشی از این

باکتری ضروری است.

در مطالعه قاسمی و همکاران اثر اسانس باریجه روی قارچ‌ها و باکتری‌های انسانی بررسی شد و هاله عدم رشد سودوموناس آئروژینوزا در اطراف دیسک‌های دارای ۷-۳ میکرولیتر اسانس ۱۴ میلی‌متر تعیین شد (۶). این مطالعه به منظور تعیین اثر عصاره‌های آبی و الکی ریشه گیاه باریجه بر سودوموناس آئروژینوزا انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه آزمایشگاهی در دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن طی سال ۱۳۹۰ انجام شد.

ریشه گیاه باریجه از ارتفاعات خراسان شمالی تهیه شد و به تایید بخش هرباریوم دانشکده علوم دارویی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی (شماره ۵۶۳) رسید. گیاه با تایید بخش زیست‌شناسی دانشگاه پیام نور بجنورد در جایی گرم و بدون نور خورشید خشک گردید. با تهیه پودر از آن به روش سوکسله عصاره‌گیری شد. در ادامه این مرحله بعد از خشک کردن عصاره با DMSO و سرم فیزیولوژی استریل رقت ۱/۱۰ از آن تهیه شد.

سویه باکتریایی

میکروارگانیسم به کار رفته در این مطالعه سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا (PTCC 1430) بود که از مرکز کلکسیون میکروبی و قارچی ایران در پژوهشگاه صنعتی شهریار به صورت لیوفیلیزه تهیه شد.

اثر ضدمیکروبی عصاره به روش دیسک

در محیط مولر هینتون آگار از کشت ۲۴ ساعته باکتری سودوموناس آئروژینوزا PTCC 1430 سوسپانسیونی با کدورت معادل ۰/۵ مک فارلند تهیه و ۱۰ میکرولیتر آن به محیط کشت وارد شد. سپس از آن کشت سفره‌ای تهیه گردید. روی هر پلیت ۵ عدد دیسک حاوی مقادیر ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰و۵۰ میکرولیتر ازرقت ۱/۱۰ عصاره‌های مختلف اضافه گردید. بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، قطر هاله عدم رشد اندازه‌گیری شد. این عمل برای هر عصاره سه بار تکرار شد و در پایان میانگین قطر هاله‌های ایجاد شده محاسبه شد (۷).

اثرضدمیکروبی عصاره به روش چاهک

در محیط مولر هینتون آگار ۵ چاهک در شرایط استریل ایجاد و مقادیر مختلف ۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰و ۱۰۰میکرولیتر از رقت ۱/۱۰ عصاره‌های مختلف اضافه شد. برای مدتی صبر نمودیم تا عصاره در محیط پخش گردد؛ سپس از سوسپانسیون باکتری سودوموناس آئروژینوزا PTCC 1430 برابر با کدورت معادل ۰/۵ مک‌فارلند ۱۰میکرولیتر به محیط کشت وارد نمودیم و کشت سفره‌ای تهیه کردیم. بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قطر هاله عدم رشد اندازه‌گیری شد. این عمل برای هر عصاره سه بار تکرار شد و در پایان میانگین قطر هاله‌های ایجاد شده محاسبه شد (۸).

تعیین MIC و MBC

در این مرحله از روش رقیق‌سازی مایع براساس توصیه NCCLS برای تعیین حداقل غلظت کشندگی عصاره‌های ریشه باریجه استفاده شد. برای انجام این آزمایش ۱۰میکروگرم از سوسپانسیون باکتریایی شامل 10^8 CFU/ml به محیط مولر- هینتون براث حاوی غلظت‌های مختلف از عصاره‌های ریشه باریجه تلقیح شد. سپس محیط‌های کشت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ساعت انکوبه شدند. بعد از انکوباسیون MIC تعیین شد و برای تعیین MBC متعاقباً ۱۰میکرولیتر از لوله‌های قبل از لوله MIC بر روی محیط مولر- هینتون آگار کشت داده شد و در دمای ۳۷درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ساعت انکوبه شد؛ سپس MBC تعیین شد (۹).

یافته‌ها

هر دو روش دیسک و چاهک عصاره آبی روی رشد سودوموناس آئروژینوزا موثر نبود و هاله عدم رشد مشاهده نشد.

سودوموناس آئروژینوزا در اطراف دیسک‌های دارای مقادیر مختلف انواع عصاره‌ها به طور کامل رشد نمود.

نتایج فعالیت ضدباکتریایی عصاره آبی و الکلی ریشه باریجه علیه سودوموناس آئروژینوزا در جدول یک آمده است.

جدول ۱ : میانگین MIC و MBC انواع عصاره علیه سودوموناس آئروژینوزا (میکروگرم بر میلی‌لیتر)

عصاره آبی		عصاره اتانولی		عصاره متانولی	
MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
$>5\times10^4$	$>5\times10^4$	$6/25\times10^3$	$2/5\times10^4$	$1/25\times10^4$	5×10^4

در روش چاهک عصاره اتانولی سبب مهار رشد سودوموناس آئروژینوزا گردید. به طوری که در برابر چاهک دارای ۹۰ میکرولیتر عصاره اتانولی، هاله ممانعت از رشدی به قطر میانگین ۱۲ میلی‌متر و در برابر چاهک دارای ۱۰۰ میکرولیتر عصاره اتانولی، هاله ممانعت از رشدی به قطر میانگین ۱۵میلی‌متر ایجاد شد.

رشد سودوموناس آئروژینوزا در برابر مقادیر مختلف عصاره متانولی مهار شد. به ترتیبی که در برابر چاهک دارای ۹۰میکرولیتر عصاره متانولی، هاله ممانعت از رشدی به قطر میانگین ۱۲/۶۶میلی‌متر و در برابر چاهک دارای ۱۰۰میکرولیتر عصاره متانولی، هاله ممانعت از رشدی به قطر میانگین ۱۵میلی‌متر ایجاد گردید. همچنین MIC و MBC بعد از ۳ بار تکرار برای عصاره‌های متانولی به ترتیب $1/25\times10^4$ و 5×10^4 میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای عصاره اتانولی به ترتیب برابر با $6/25\times10^3$ و $2/5\times10^4$ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد (جدول یک).

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره‌های الکلی ریشه باریجه اثر ضدباکتریایی بر سودوموناس آئروژینوزا دارند. این یافته با نتایج سایر مطالعات که نشان‌دهنده اثرات ضدباکتریایی اسانس و عصاره گونه‌های هم خانواده باریجه است؛ در برخی جهات مغایرت و در برخی جهات مشابهت دارد.

قاسمی و همکاران اثر ضدباکتری و ضدقارچ اسانس میوه باریجه را به روش دیسک دیفیوژن گزارش کردند. به طوری که هاله عدم رشد سودوموناس آئروژینوزا در اطراف دیسک‌های دارای ۷-۳ میکرولیتر اسانس ۱۴میلی‌متر بود (۶). در مطالعه Masood و همکارش فعالیت ضدمیکروبی عصاره آبی زیره علیه سودوموناس آئروژینوزا به روش انتشار از طریق دیسک برابر با صفر گزارش شد (۱۰). عبدی و همکاران فعالیت ضدمیکروبی الئوگام رزین باریجه را به روش میکروپلیت آلمار بلو (MABA) بررسی کردند. نتایج حاصل از MIC در آن بررسی برای سودوموناس آئروژینوزا ۵۰میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شد (۱۱). در مطالعه Hilan و همکاران فعالیت ضدباکتریایی اسانس *Ferula hermonis* ارزیابی شد. به طوری که اسانس این گیاه در ۱۰دقیقه قادر بود ۳۵۰۰۰ باکتری سودوموناس آئروژینوزا را از بین ببرد (۱۲). در مطالعه صبری و همکاران روی سه جنس از فلفل، دو جنس آن MIC بیشتر از ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و جنس سوم MIC ۳۱۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر را برای عصاره‌های غیرقطبی علیه سودوموناس آئروژینوزا گزارش کردند (۱۳). غریب و همکاران MIC عصاره‌های آبی و اتانولی گیاه اسقف را به ترتیب ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای سودوموناس آئروژینوزا گزارش کردند (۱۴). حداقل غلظت ممانعت از رشد عصاره اتانولی زیره برای سودوموناس آئروژینوزا ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش شده است (۱۵). نتایج حاصل از مطالعه حاضر هیچ‌گونه عدم رشدی را در اطراف دیسک‌ها برای هیچیک از عصاره‌ها نشان نداد که می‌تواند ناشی از غلظت کم مواد مؤثره عصاره در مقایسه با اسانس باشد. همچنین نشان داده شد که MIC عصاره‌های متانولی و اتانولی برای سودوموناس آئروژینوزا به ترتیب ۵/۱۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۶/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر است که در این غلظت‌ها اثر باکتریواستاتیک داشت. اختلاف موجود در مقادیر گزارش شده ناشی از روش‌ها و سویه‌های مختلفی است که درآزمایش‌ها به کار رفته است.

الئوگم رزین باریجه دارای ۵-۳ درصد اسانس، ۷۵-۵۰ درصد رزین، ۴۰-۲۰ درصد مواد صمغی، ۱۰-۱ درصد رطوبت و مواد معدنی است. اسانس باریجه از ۷ گروه ترکیبات مختلف تشکیل شده است که عبارت از هیدروکربن های مونوترپنی است که حدود ۷۵-۶۳ درصد اسانس را تشکیل می دهد و حاوی بتاپینن، آلفاپینن، دلتا ـ ۳ ـ کارن و هیدروکربن‌های دیگر مانند میرسن، پاراسیمن، لیمونن، ترپینولن، الکل های مونوترپنی و استات، سزکوئی‌ترپن ها، آزولن‌ها، استرهای تیول، پیرازین‌ها و هیدروکربن‌های با اسکلت غیرترپنی است (۱۶). از آنجایی که در مطالعات قبلی گزارش شده که دو ترکیب آلفا پینن و بتا پینن دارای اثر ضدمیکروبی مشخصی هستند؛ به احتمال زیاد فعالیت ضدمیکروبی این گیاه در این مطالعه نیز به آلفاپینن و بتاپینن برمی‌گردد (۱۱).

با اثبات اثربخش بودن عصاره‌های متانولی و اتانولی ریشه گیاه باریجه روی سودوموناس آئروژینوزا امید است که در آینده بتوان از عصاره‌های این گیاه برای درمان عفونت‌های ناشی از سودوموناس آئروژینوزا استفاده کرد.

نتیجه‌گیری

عصاره متانولی و اتانولی ریشه باریجه دارای فعالیت ضدمیکروبی بیشتری علیه سودوموناس آئروژینوزا در محیط آزمایشگاه نسبت به عصاره آبی ریشه گیاه باریجه است.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه محمد صالحی برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته زیست‌شناسی گرایش میکروب‌شناسی از دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن بود. نویسندگان مقاله از آقای علی اکبر ثاقب که در جمع‌آوری نمونه‌ها کمک نمودند و نیز از کارکنان محترم دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن کمال تشکر و امتنان خود را اعلام می‌دارند.

References

1. Ríos JL, Recio MC. Medicinal plants and antimicrobial activity. J Ethnopharmacol. 2005 Aug;100(1-2):80-4.

2. Zargari A. Medicinal Plants. Tehran: Tehran University Publication. 2002; p: 947. [Persian]

3. Mozaffarian V. Classification of plant. 1st. Tehran: Sepehr Publication. 1994; p: 609. [Persian]

4. Moreira MR., Ponce AG, Delvalle CE, Roura SI. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a food born pathogen. LWT, Food Science and Technology.2005 Aug;38:565-70.

5. Ramezani M, Hosseinzadeh H, Mojtahedi K. Effects of Ferula gummosa Boiss. fractions on morphine dependence in mice. J Ethnopharmacol. 2001 Sep;77(1):71-5.

6. Ghasemi Y, Faridi P, Mehregan I, Mohagheghzadeh. A Ferula gummosa fruits: an aromatic antimicrobial agent. Chem Nat Compd. 2005; 41(3):312-16.

7. CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. Approved standard M02-A10. 10th. CLSI, Wayne. 2009; PA. 29: 1.

8. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution: antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically M-7-A5. 5th. NCCLS Wayne. 2000; PA, 20: 2.

9. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standards. NCCLS Document M7-A5. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne. 2001.

10. Masood N, Chaudhry A, Tariq P. In vitro antibacterial activities of kalonji, cumin and poppy seed. Pak J Bot. 2008; 40(1):461-7.

11. Abedi D, Jalali M, Asghari G, Sadeghi N. Composition and antimicrobial activity of oleogumresin of Ferula gumosa Bioss. Essential oil using Alamar Blue™. Res Pharm Sci. 2008; 3(1): 41-5.

12. Hilan C, Sfeir R, El hage R, Jawich D, Frem MF, Jawhar K. Evaluation of the antibacreial activites of Ferula hermonis (BOISS). Lebnese Science Journal. 2007; 8(2):135-51.

13. Sabria N, Yassaa N, Fazeli MR, Alavic SHR, Fouladic F, Salimia L, et al. Antibacterial activity of peucedanum ruthenicum, johreniopsis seseloides and cervaria cervariifolia extracts. Iran J Pharm Sci. 2009; 5(1):37-42.

14. Ghareeb AM, Zedan TH, Gharb LA. Antibacterial and antifungal activites of ammi visnaga extracts against pathogenic microorganisms. IRAQI J SCI. 2011;52(1):30-6.

15. Ert¨urk O. Antibacterial and antifungal activity of ethanolic extracts from eleven spice plants. Biologia, Bratislava. 2006;61(3): 275-8.

16. Shahrokhi N. [Quality control methods for raw materials of herbal medicines]. 1st. Tehran: Jahad Daneshgahi Publications of Shahid Beheshti University. 1996; pp: 168-71. [Persian]

Original Paper

Effect of aqueous and alcoholic extracts of roots of *Ferula gummosa Boiss.* on the growth of *Pseudomonas aeruginosa*

**Salehi M (MSc)*[1], Hashemi Karuie SM (PhD)[2], Nasrolahi Omran A (PhD)[2]
Mobini M (MSc)[1], Asghar Hedari M (MSc)[1]**

[1]MSc in Biology, Islamic Azad University, Tonekabon Branch, Tonekabon, Iran.
[2]Assistant Professor, Department of Biology, Islamic Azad University, Tonekabon Branch, Tonekabon, Iran.

Abstract

Background and Objective: *Ferula gummosa Boiss.* (Barije.) contain medical and antimicrobial properties. This study was done to determine the effect of aqueous and alcoholic extracts of roots of *Ferula gummosa Boiss.* on the growth of *Pseudomonas aeruginosa*.

Materials and Methods: In this laboratory study, the plant was dried in dark place and aqueous, alcoholic extracts of Barije's root, powder were prepared using Soxhlet method. The efficacy of 0.1 dilution of different values of extracts of *Ferula gummosa Boiss.* on the strain of *Pseudomonas aeruginosa* (PTCC 1430) were evaluated by disk diffusion, Agar-well diffusion, minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) methods.

Results: *Pseudomonas aeruginosa* was completely resistant to the aqueous extract, and the MIC for the methanol and ethanol extracts was 1.25×10^4 µg/ml and 6.25×10^3 µg/ml, respectively.

Conclusion: Methanolic and ethanolic extracts of *Ferula gummosa Boiss.* have antimicrobial activity against *Pseudomonas aeruginosa* in in-vitro model.

Keywords: *Ferula gummosa Boiss*, *Pseudomonas aeruginosa*, MIC, MBC

*** Corresponding Author: Salehi M (MSc), E-mail: mohammadsalehi73@gmail.com**

Received 27 May 2012 **Revised** 9 June 2013 **Accepted** 9 June 2013

This paper should be cited as: Salehi M, Hashemi Karuie SM, Nasrolahi Omran A, Mobini M, Asghar Hedari M. [Effect of aqueous and alcoholic extracts of roots of *Ferula gummosa Boiss.* on the growth of *Pseudomonas aeruginosa*]. J Gorgan Uni Med Sci. 2014; 15(4): 18-22. [Article in Persian]