Pajouhan Scientific Journal Volume 17, Issue 4, Summer 2019, Pages: 15-24

Original Article

doi: 10.52547/psj.17.4.15

Antibacterial Effect of Alcoholic and Aqueous Extract of Carla on Escherichia coli and Staphylococcus aureus

Shahriar Saeidian (PhD)[1,*], Maryam Eslami (MSc)[2], Alireza Dashipor (PhD)[3]

[1] *Assistant professor of Biochemistry, Payame Noor University, Iran*
[2] *M.s of Biochemistry, Payame Noor University, Iran*
[3] *Assistant professor of Zahedan University of Medical Sciences, Iran*

**** Corresponding Author:*** *Shahriar Saeidian, Payame Noor University, Iran. Email: saeedyan@pnu.ac.ir*

Received: 02/08/2019
Accepted: 09/09/2019

How to Cite this Article:
Saeidian S, Eslami M, Dashipor A. Antibacterial Effect of Alcoholic and Aqueous Extract Of Carla on Escherichia coli and Staphylococcus aureus. *Pajouhan Scientific Journal*. 2019; 17(4): 15-24. DOI: 10.52547/psj.17.4.15

Abstract

Background and Objectives: Today, with increasingresistance of bacteria to antibiotics, the use of medicinal plants has increased. The aim of this study was to investigate the antibacterial properties of Carla extract on Escherichia coli and Staphylococcus aureus to investigate the inhibitory properties and to find alternative drugs.

Materials and Methods: In this research, the antimicrobial activity of Carla inaqueous and alcoholic extraction on escherichia coli and staphylococcus aureus was performed by means of well diffusion method. Consequently, theinhibitory zone, MIC and MBC were determined.

Results: MIC and Mbc for escherichia coli showed the highest sensitivity to alcoholic extract of leaf with mean of 62.5 mg/ml and 125 mg/ml and staphylococcus aureus showed the highest susceptibility to fruit alcoholic extract with mean of 64 mg / ml and 64 mg / ml. The diameter of the inhibition zone of the alcoholic extract of the leaf for E. coli is 19 mm and the diameter of the inhibition zone of the alcoholic extract of fruit for staphylococcus aureus is 2/26 mm, which confirms the results of MIC and Mbc. Minimum inhibitory concentration of E.coli was related to the alcoholic extract of leaf and the minimum concentration of fecundity was related to alcoholic beverage.

Conclusions: Results for staphylococcus aureusac company from the order of aqueous extract of leaf <alcoholic extract of leaf = alcoholic extract of seed = aqueous extract of fruit <alcoholic extract of the fruit. The lowest antimicrobial effect on E. coli is related to the aqueous extract of the fruit. Carla fruit and leaf alcoholic extract have an antimicrobial effect on Escherichia coli and Staphylococcus aureus and can be used as an alternative to commercial antibiotics.

Keywords: Alcoholic Extract; Antibacterial; Aqueous Extract; Carla Plant; Escherichia coli; Staphylococcus aureus

Copyright © 2019 Pajouhan Scientific Journal. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (*http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/*) which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cite.

مقاله پژوهشی

doi: 10.52547 /psj.17.4.15

بررسی اثر آنتی باکتریال عصاره الکلی و آبی کارلا بر باکتری‌های اشریشیا کولی و استافیلوکوکوس اورئوس

شهریار سعیدیان[۱،*]، مریم اسلامی[۲]، علیرضا داشی پور[۳]

[۱] استادیار بیوشیمی دانشگاه پیام نور، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، تهران، ایران

[۲] کارشناسی ارشد بیوشیمی دانشگاه پیام نور، بیجار، ایران

[۳] استادیار دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، ایران

* **نویسنده مسئول:** شهریار سعیدیان، دانشگاه پیام نور، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، تهران، ایران. ایمیل: saeedyan@pnu.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۰۵/۱۱

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۰۶/۱۸

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی همدان محفوظ است.

چکیده

سابقه و هدف: امروزه با افزایش مقاومت باکتری‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها، استفاده از گیاهان دارویی مورد استقبال قرار گرفته است. هدف تحقیقتعیین خواص آنتی‌باکتریال عصاره‌ی گیاه کارلا بر روی باکتریاشریشیا کولی واستافیلوکوکوس اورئوس به منظور بررسی خواص بازدارندگی ویافتن داروهای جایگزین است.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق اثر ضدمیکروبی عصاره‌های آبی و الکلی گیاه کارلا روی اشریشیا کولی و استافیلوکوکوس اورئوس با استخراج عصاره گیاه به روش انتشار در چاهک انجام شده و قطر هاله عدم رشد اندازه گیری و حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی تعیین گردید.

یافته‌ها: حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی اشریشیا کولی بیشترین حساسیت را به عصاره الکلی برگ با میانگین ۶۲/۵ mg/ml و ۱۲۵ mg/ml و استافیلوکوکوس اورئوس بیشترین حساسیت را به عصاره الکلی میوه با میانگین ۶۴ mg/ml و ۶۴ mg/ml نشان دادند. قطر هاله عدم رشد عصاره الکلی برگ برای اشریشیا کولی۱۹ mm و قطر هاله عدم رشد عصاره الکلی میوه برای استافیلوکوکوس اورئوس ۲۶/۲ mm می باشد که تاییدکننده نتایج حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی است. حداقل غلظت مهارکنندگی اشریشیاکلی مربوط به عصاره الکلی برگ و حداقل غلظت کشندگی نیز مربوط به الکلی میوه بود.

نتیجه‌گیری: نتایج برای استافیلوکوکوس از ترتیب عصاره آبی برگ > الکلی برگ= الکلی بذر= آبی میوه > الکلی میوه به لحاظ قدرت بازدارندگی رشد باکتری پیروی می‌کند. کمترین اثر ضدمیکروبی بر روی اشریشیاکولی مربوط به عصاره آبی میوه است. عصاره الکلی برگ و الکلی میوه کارلا خاصیت ضد باکتریایی برای اشریشیاکولی و استافیلوکوکوس اورئوس دارند و می‌توانند به عنوان یک جایگزین برای آنتی بیوتیکهای تجاری مطرح باشند.

واژگان کلیدی: آنتی باکتریال؛ استافیلوکوکوس اورئوس؛ اشریشیا کولی؛ عصاره الکلی؛ عصاره آبی؛ کارلا

مقدمه

بیماری‌های عفونی عامل مرگ‌های زودرس هستند و روزانه باعث مرگ هزاران نفردر سرتاسر جهان می‌شوند[۱].تعداد زیادی از آنتیبیوتیکهای تجاری در سرتاسر جهان برای کنترل عفونت‌ها وبیماری‌های عفونی انسان استفاده می‌شوند. استفاده طولانی مدت از این آنتی بیوتیک‌ها باعث ظهور باکتری‌های مقاوم به چند دارو شده ومشکلات بالینی مهمی را در درمان بیماری‌های عفونی ایجادکرده است[۲].بنابراین لازم است تا بر روی کشف مواد ضدمیکربی جدید از سایر منابع، مانند گیاهان وحیوانات تحقیق‌های گسترده ای انجام شود. گیاهان دارویی به عنوان یک منبع بالقوه ازداروهای درمانی جدید موردتوجه ویژه هستند؛ زیرامشخص شده است که این گیاهان مواد ضدمیکربی متنوعی دارند و دارای اثر سمی کم و یا فاقد اثر سمی هستند.گیاهان طی متابولیسم ثانویه خود ترکیبات بسیاری را با ساختمان مولکولی پیچیده می‌سازند و برخی از آن‌ها خاصیت ضدمیکربی دارند. کارلا با نام علمی (*Momordica charntia*) نام یک سرده از تیره کدوییان است. دارای گل‌های زرد روشن که میوه آن بعد از رسیدن، زرد یا نارنجی رنگ می‌شود و سرشار از ویتامین C است[۳].کارلا یکی از سبزیجات

معروف آسیای جنوبی است که طی یک دهه گذشته در مناطقی از شمال و جنوب استان سیستان وبلوچستان کشت می‌شود. شاید به جرات بتوان گفت اصلی ترین خواص گیاه کارلا درمان دیابت و مقابله با سلول‌های سرطانی است. کارلا شامل مواد فیتوشیمیایی فعال بیولوژیکی است که حاوی ترپن‌ها و استروئیدها است. میوه و بذر کارلا ضد ویروس ایدز، زخم معده، التهاب، دیابت و تومور است[۴]. گسترش رو به رشد این قبیل مقاومت های دارویی باعث شده است تا محققین به دنبال داروهای مناسبی باشند که علاوه بر ممانعت از رشد باکتری ها، اثرات سمی و عوارض جانبی کمتری داشته باشد [۴،۵]. اشریشیا کُلای (E.coli)، نوعی باسیل گرم منفی از خانواده انتروباکتریاسه است که بطور شایع در روده جانوران خونگرم وجود دارد. برخی از سروتیپ‌های آن موجب مسمویت غذایی و اسهال می‌گردند. ایکولای شایعترین عامل عفونت دستگاه ادراری است. استافیلوکوک اورئوس، کوکسی گرم مثبت و بی‌هوازی اختیاری است. این باکتری ممکن است به شکل فلور عادی پوست یا بینی وجود داشته باشد. استافیلوکوکوس اورئوس، گستره وسیعی از عفونت‌ها از عفونت‌های ساده پوستی تا بیماری‌هایی مانند پنومونی و مننژیت را ایجاد می‌نماید. استافیلوکوک اورئوس به عنوان یکی از ۵ عامل شایع ایجادکننده عفونت‌های بیمارستانی به ویژه عفونت‌های زخم پس از جراحی است.با توجه به گستره وسیع بیماریزایی این دو باکتری در زندگی روزمره بررسی اثر آنتی‌باکتریال گیاهان دارویی می تواند، بسیار موثر باشد. بنابراین با توجه به اهمیت گیاه کارلا سعی برآن داریم تا خاصیت آنتی باکتریال کارلا را بر استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکولی بررسی نماییم و در صورت تایید بازدارندگی میکروبی این گیاه با جایگزینی این داروهای طبیعی با داروهای شیمیایی موجود از مقاومت روز افزون باکتری‌ها نسبت به آنتی بیوتیک‌های موجود کاسته خواهد شد. اثرات آنتی باکتریال گیاهان زیادی بر روی باکتری‌های مختلف بررسی شده ولی گیاه کارلا در این نوع تحقیقات برای اولین بار مورد استفاده قرار می‌گیرد[۷،۸].

مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی درسال۱۳۹۶آزمایشگاه کنترل غذا و دارو دانشگاه علوم پزشکی زاهدان انجام گردید.گیاه کارلا از مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی زاهدان جمع آوری وتایید گردید.گیاه کارلا پس از جمع آوری از مزرعه به آزمایشگاه کنترل غذا و دارو زاهدان انتقال داده شد. قسمت‌های مختلف گیاه شامل برگ و میوه از هم جدا و میوه‌ها پس از شستشو در انکوباتور۶۰ درجه خشک گردیدند. سپس نمونه‌ها آسیاب شده و۵۰گرم از آن، در ۵۰۰ میلی‌لیتر اتانول۸۰ درصد به مدت ۴۸ ساعت روی دستگاه شیکر ارلن در دمای ۴۰-۳۷ درجه سانتی‌گراد با دور ۲۰۰ دور در دقیقه به روش ماسراسیون، عصاره‌گیری شد. دلیل استفاده از خیساندن، عدم آسیب مواد موجود در عصاره تهیه شده از گیاهان بوده است. در طول این فرآیند سعی شد تا با همزدن، عصاره یکنواختی حاصل شود. عصاره حاصل با کاغذ واتمن ۰/۴ میکرونی(شرکت واتمن انگلستان) صاف گردید. عصاره اتانولی تحت شرایط خلاء در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد با دور ۸ دور در دقیقه توسط دستگاه روتاری تغلیظ و در پتری‌دیش‌های استریل ریخته و در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد آون خشک گردید. پس از آن عصاره‌ها جمع آوری گردید. میکروارگانیسم مورد نیاز با کد (ATCC 29737) استافیلوکوکوس اورئوسو اشریشیا کولی (ATCC 10536) از مرکز پژوهش‌های علمی وصنعتی تهیه گردید. حساسیت این میکروارگانیسم به عصاره‌ها با استفاده از روش چاهک بررسی گردید[۹]. جهت انجام این آزمایش، مقدار مشخصی از عصاره خشک گیاهی در حلال دی متیل سولفوکسید استریل شده(مقدار ۰/۵ میلی‌گرم در ۱ سی سی محلول)، حل یعنی غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از عصاره تهیه شد و سپس غلظت‌های۵۰۰، ۲۵۰ ، ۱۲۵، ۶۲/۵ و ۳۱/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر در حضور آب دوبار تقطیر و با رقیق سازی تهیه شدند. ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتریایی روی سطح محیط کشت مولر هینتون آگار چکانده شد و با یک سوآپ استریل روی محیط گسترش یافت. ۵ چاهک به قطر ۵ میلی‌متر برای هر عصاره به طور جداگانه توسط پیپت پاستوراستریل روی محیط کشت در زیر دستگاه لامینارفلو ودر مرکز پلیت ایجاد شد و ۲۰ میکرولیتر از محلول عصاره‌ها با غلظت‌های مشخص درون چاهک‌ها چکانده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند.چون عصاره‌ها دارای رنگ بودند، با توجه به انتشار رنگ در محیط انتشار عصاره ردیابی شد. اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد در شرایط آسپتیک با استفاده از میکرومتر ثبت شد.برای حصول اطمینان، این آزمایش برای هر سویه باکتری چهار بار تکرار گردید و میانگین قطر هاله عدم رشد به عنوان قطر نهایی ثبت شد.

تعیین حداقل غلظت بازدارندگیو حداقل غلظت کشندگی: جهت انجام آزمایش‌های کمی برای حداقل غلظت بازدارندگی از روش رشد میکروارگانیسم و برای حداقل غلظت کشندگی میکروارگانیسم از روش رقت لوله‌ای استفاده شد[۱۰].

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی عصاره:برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی(حداقل غلظتی از یک عصاره است که می‌تواند از رشد باکتری در شرایط آزمایشگاهی جلوگیری کند.) با روش رقت لوله ای از میکروپلیت ۹۶ خانه سلولی استفاده شد. یک خانه به عنوان کنترل مثبت (حاوی سوسپانسیون میکروبی و DMSO فاقد عصاره) به منظور بررسی اثرات

احتمالی DMSO بر رشد باکتری، یک خانه به عنوان کنترل مثبت (حاوی سوسپانسیون میکروبی فاقد عصاره) و به عنوان کنترل برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی عصاره مورد استفاده قرار گرفتو یک لوله به عنوان کنترل منفی (دارای محیط کشت و عصاره بدون سوسپانسیون میکروبی) در نظر گرفته شد. به هر کدام از خانه ها ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت نوترینت براث اضافه و به خانه اول ۱۰۰ میکرولیترعصاره استوک با غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اضافه گردید. پس از مخلوط کردن، ۱۰۰ میکرولیتر از خانه اول به خانه دوم و سپس ۱۰۰ میکرولیتراز خانه دوم به خانه سوم، به همین ترتیب تا آخر انجام شد و سرانجام ۱۰۰ میکرولیتر از آن به بیرون ریخته شد. به تمامی خانه ها۵۰ میکرولیتر از هر سوسپانسیون میکروبی اضافه گردید. به این ترتیب غلظت عصاره درخانه ها۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵ و ۳۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. تمامی لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. پس از گذشت ۲۴ساعت کدورت در طول موج ۶۳۰ نانومتر توسط الایزا ریدر جهت تعیین حداقل غلظت بازدارندگی مورد بررسی قرار گرفت.

به منظور تهیه سوسپانسیون باکتریایی از کشت جوان باکتری، به وسیله لوپ از کلنی هر کدام از باکتری ها برداشته و در ۹ میلی لیتر از سرم فیزیولوژی یا محلول نمکی (NaCl 8.5 g/L) استریل در لوله آزمایش افزوده و پس از مخلوط کامل سوسپانسیون کاملا یکنواختی از باکتری مورد آزمایش حاصل شد. جهت یکسان نمودن کدورت سوسپانسیون میکروبی تهیه شده (استاندارد مک فارلند (کدورت معادل^{8}۱۰×۱/۵باکتری در هر میلیلیتر)، جذب نوری در طول موج ۶۳۰ نانومتر در محدوده ۰/۰۸ تا ۰/۱تنظیم گردید.

و جذب نوری در ۶۳۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر در مقابل شاهد آب خوانده شد تا کدورتی معادل ۰/۵ مک فارلند حاصل شود.

کمترین میزان عدد خوانده شده توسط دستگاه به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی گزارش گردید. یعنی بعد از ۲۴ ساعت انکوبه کردن در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، لوله ها از نظر کدورت مورد بررسی قرار گرفتند. لوله‌ای که حاوی کمترین غلظت عصاره بوده و کدورتی در آن مشاهده نشد، به عنوان MIC مشخص گردید به عبارتی حداقل غلظت بازدارندگی به عنوان کمترین غلظتی از مواد که باعث کاهش۹۰ درصدی کدورت در مقایسه با گروه کنترل شده بود در نظر گرفته شد[۱۴،۱۵].

تعیین حداقل غلظت کشندگی عصاره: به منظور تعیین حداقل غلظت کشندگی (کمترین غلظتی از یک عصاره که می‌تواند سبب نابودی بیشترین تعداد باکتری (۹۹/۹٪) شود از هر کدام ازغلظت‌های تهیه شده، ۵ میکرولیتر بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار انتقال داده شد. (محیط کشت مولر هینتون آگار یک محیط غیر انتخابی و غیر افتراقی می باشد که تقریباً تمامی ارگانیسم هایی که بر روی آن کشت داده می شوند، رشد خواهند کرد.این محیط کشت حاوی نشاسته می باشد. نشاسته توکسین های آزاد شده از باکتری ها را جذب می کند، بنابراین آن‌ها نمی‌توانند با آنتی بیوتیک‌ها تداخل ایجاد کنند. انتشار بهتر آنتی بیوتیک‌ها در مولر هینتون آگار منجر به ایجاد ناحیه‌ی واقعی‌تر مهار شدگی خواهد شد. این محیط بیشتر برای انجام تست های تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی مانند آنتی بیوگرام به روش "دیسک دیفیوژن آگارو تست تعیین حداقل غلظت مهاری آنتی بیوتیک استفاده می گدد لذا نسبت به محیط بلاد آگار ارجحیت داده شد). سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه قرار داده شدند. پس از گذشت زمان لازم پلیت‌ها از گرمخانه خارج و نتایج آن بررسی شد. غلظتی که در آن رشدی دیده نشود، به عنوان حداقل غلظت کشندگی عصاره برای میکروب درنظر گرفته می‌شود.در این پژوهش، هاله عدم رشد به روش چاهک و برای هر نمونه ۴ بار تکرار و اندازه گیری شد و اطلاعات بـه دسـت آمـده، جهت مقایسه غلظت‌های مختلف عصاره با توجه به نوع باکتری یعنی اشریشیاکولی یا استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از نرم افزار SPSS16 و از آزمون واریانس یکطرفه و آزمـون چند دامنـه ای تـوکی تجزیـه و تحلیـل شـدند.P کمتر از ۰/۰۰۱ به عنوان سطح معنی داری تلقی گردید. بـرای رسـم نمودارها نیز از نرم افزار اکسل استفاده شد. سطح معنی داری آزمون ها پنج یا یک درصد در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

بر اساس نتایج حاصله برای استافیلوکوکوس اورئوس عصاره آبی برگ بین غلظت‌های مختلف عصاره تفاوت معنی داری را نشان داد (P<۰/۰۱) (جدول ۱). با افزایش غلظت عصاره آبی برگ میانگین بازدارندگی برای استافیلوکوکوس اورئوس افزایش نشان داده و از حدود ۱/۷۵ میلی متر به ۱۹/۵رسیده است. بررسی عدم هاله نشان داد که در غلظت‌های بالاتر افزایش قابل توجهی در میزان بازدارندگی وجود دارد. حداقل غلظت بازدارندگی برای عصاره آبی برگدر غلظت ۲۵۰mg/mlو حداقل غلظت کشندگی نیز در غلظت ۵۰۰mg/ml به دست آمد. نتایج حاصل از عصاره آبی میوهبرای استافیلوکوکوس اورئوس بین غلظت‌های مختلف تفاوت معنی داری را نشان داد (P<۰/۰۱) (جدول ۲). با افزایش غلظت عصاره آبی میوه میانگین بازدارندگی تا غلظت ۱۲۵ افزایش یافت و از ۰/۵ به ۱۶/۲ میلی متر رسیده است و در غلظت ۲۵۰ به ۱۰/۲۵ کاهش یافته است. حداقل غلظت بازدارندگی برای عصاره آبی میوه برای استافیلوکوکوس اورئوس در غلظت mg/ml ۱۲۵ وحداقل

غلظت کشندگی نیز در غلظت ۱۲۵mg/ml به دست آمد. حداقل غلظت بازدارندگی برای عصاره الکلی میوه برای استافیلوکوکوس اورئوس در غلظت ۶۴ mg/ml وحداقل غلظت کشندگی نیز در غلظت ۶۴mg/ml به دست آمد که در این غلظت بیشترین میانگین قطر هاله عدم رشد به دست آمد(جدول ۳).حداقل غلظت بازدارندگی برای عصاره الکلی برگ برای استافیلوکوکوس اورئوس در غلظت ۱۲۵ mg/ml وحداقل غلظت کشندگی نیز در غلظت ۱۲۵mg/ml به دست آمد که در غلظت ۱۲۵بیشترین میانگین قطر هاله عدم رشد یعنی ۱۳/۲ میلی‌متر حاصل آمده است(جدول ۴).بر اساس نتایج به دست آمده برای اشریشیا کولی عصاره آبی برگ بین غلظت‌های مختلف عصاره تفاوت معنی داری را نشان داد (P<۰/۰۱) (جدول ۱). با افزایش غلظت عصاره آبی برگ، میانگین بازدارندگی برای اشریشیاکولی افزایش یافته و در بازه ۱/۷۵ میلی تا ۱۲/۹۷ متغیر است. با بررسی عدم هاله، در غلظت ۱۲۵، افزایش قابل توجهی در میزان بازدارندگی دیده شد. حداقل غلظت بازدارندگی برای عصاره آبی برگ در غلظت mg/ml ۱۲۵ وحداقل غلظت کشندگی نیز در غلظت ۲۵۰mg/ml حاصل شد. نتایج حاصل از عصاره آبی میوه برای اشریشیاکولی بین غلظت‌های مختلف تفاوت معنی‌داری را نشان داد (P<۰/۰۱) (جدول ۲). با افزایش غلظت عصاره آبی میوه، میانگین بازدارندگی تا غلظت ۲۵۰ افزایش یافت و از ۱۶/۲۵ به ۳۱/۲۵ میلی‌متر رسیده است. حداقل غلظت بازدارندگی برای عصاره آبی میوه برای اشریشیا کولی در غلظت ۲۵۰mg/ml وحداقل غلظت کشندگی نیز در غلظت ۵۰۰mg/ml به دست آمد. حداقل غلظت بازدارندگی برای عصاره الکلی میوه برای اشریشیاکولی در غلظت ۱۲۵mg/ml وحداقل غلظت کشندگی نیز در غلظت ۵۰۰mg/ml به دست

جدول ۱: اثر غلظت‌های مختلف عصاره آبی برگ بر قطر هاله عدم رشد باکتری

غلظت عصاره	عصاره آبی برگ						
	میانگین قطر هاله عدم رشد(mm)		کمترین قطر هاله حاصله		بیشترین قطر هاله حاصله		P value
	اشریشیا کولی	استافیلوکوکوس اورئوس	اشریشیا کولی	استافیلوکوکوس اورئوس	اشریشیا کولی	استافیلوکوکوس اورئوس	
۳۱/۲۵	۴/۰۷۵	۱/۷۵	۴	۱/۵	۴/۱	۲	۰/۰۰۱
۶۲/۵	۴/۱۲۵	۱۱/۳۷۵	۴	۱۱	۴/۳	۱۲	۰/۰۰۱
۱۲۵	۱۷/۰۲۵	۱۲/۸۷۵	۱۷	۱۲	۱۷/۵	۱۳/۵	۰/۰۰۱
۲۵۰	۱۲/۹۷۵	۱۹/۵	۸/۱۲	۱۹	۱۳/۱۰	۲۰	۰/۰۰۱

جدول ۲: اثر غلظت‌های مختلف عصاره آبی میوه بر قطر هاله عدم رشد باکتری

غلظت عصاره	عصاره آبی میوه						
	میانگین قطر هاله عدم رشد		کمترین قطر هاله حاصله		بیشترین قطر هاله حاصله		P value
	اشریشیا کولی	استافیلوکوکوس اورئوس	اشریشیا کولی	استافیلوکوکوس اورئوس	اشریشیا کولی	استافیلوکوکوس اورئوس	
۳۱/۲۵	۱۶/۲۵	۰/۵	۱۶	۰/۰۰	۱۷	۱	۰/۰۰۱
۶۲/۵	۳۰/۲۵	۴/۳۵	۲۹	۴	۳۱	۴/۶	۰/۰۰۱
۱۲۵	۲۹/۷۵	۱۶/۲	۲۹	۱۶	۳۰	۱۶/۴	۰/۰۰۱
۲۵۰	۳۱/۲۵	۱۰/۲۵	۳۱/۲۵	۱۰	۳۲	۱۱	۰/۰۰۱

جدول ۳: اثر غلظت‌های مختلف عصاره الکلی میوه بر قطر هاله عدم رشد باکتری

غلظت عصاره	عصاره الکلی میوه						
	میانگین قطر هاله عدم رشد		کمترین قطر هاله حاصله		بیشترین قطر هاله حاصله		P value
	اشریشیا کولی	استافیلوکوکوس اورئوس	اشریشیا کولی	استافیلوکوکوس اورئوس	اشریشیا کولی	استافیلوکوکوس اورئوس	
۳۱/۲۵	۱/۴۲	۲/۳۷۵	۱/۳	۲	۱/۵	۳	۰/۰۰۱
۶۲/۵	۲۶/۲	۲۶/۲	۲۹	۲۷	۲۷	۲۵	۰/۰۰۱
۱۲۵	۲۹/۷۵	۱۱	۲۹	۱۰	۳۱	۱۲	۰/۰۰۱
۲۵۰	۲۲/۲۵	۱۲/۳۷	۲۱	۱۲	۲۳	۱۳	۰/۰۰۱

آمد که در این غلظت بیشترین میانگین قطر هاله عدم رشد دیده شد(جدول ۳).حداقل غلظت بازدارندگی برای عصاره الکلی برگ برای اشریشیاکولی در غلظت ۶۲/۵mg/ml وحداقل غلظت کشندگی نیز در غلظت ۱۲۵mg/ml به دست آمد که در غلظت ۱۲۵بیشترین میانگین قطر هاله عدم رشد یعنی ۱۵/۱ میلیمتر به دست آمد(جدول ۴). جدول ۵ اثر غلظت های مختلف عصاره الکلی بذر بر قطر هاله عدم رشد باکتری را نشان می دهد. همانطور که در شکل ۱ نشان داده شده است.براساس حداقل غلظت بازدارندگی محاسبه شده، باکتری اشریشیاکولی بیشترین حساسیت را به عصاره الکلی برگ نشان داده است و حساسیت آن در برابر عصاره های الکلی میوه و الکلی بذر و آبی برگ یکسان بود. حداقل غلظت مهارکننده عصاره الکلی برگ نسبت به عصاره آبی میوه اختلاف معنا داری (P<۰/۰۵) را نشان داد. مطابق شکل ۲، حداقل غلظت بازدارندگی محاسبه شده نشان داد که باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بیشترین حساسیت را به عصاره الکلی میوه نشان داده است و حساسیت آن در برابر عصاره های الکلی برگ و الکلی بذر و آبی میوه یکسان بوده است طوری که حداقل غلظت مهارکننده عصاره الکلی میوه نسبت به عصاره آبی برگ اختلاف معنا داری(p=۰/۰۳) را نشان داد. در ارزیابی حداقل غلظت کشندگی نیز همانند حداقل غلظت بازدارندگی باکتری اشریشیا کولی بیشترین حساسیت را به عصاره الکلی برگ نشان داد که حداقل غلظت کشندگی برابر با ۱۲۵ mg/ml به دست آمده است. حداقل غلظت کشندگی عصاره الکلی برگ نسبت به عصاره آبی میوه اختلاف معناداری (P<۰/۰۵) را نشان داد (شکل ۳). بررسی

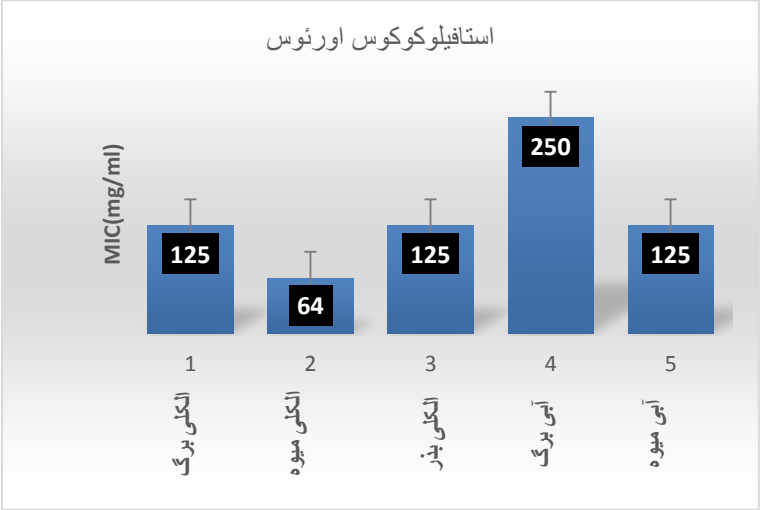
جدول ۴: اثر غلظت‌های مختلف عصاره الکلی برگ بر قطر هاله عدم رشد باکتری

غلظت عصاره	عصاره الکلی برگ						
	میانگین قطر هاله عدم رشد		کمترین قطر هاله حاصله		بیشترین قطر هاله حاصله		P value
	اشریشیا کولی	استافیلوکوکوس اورئوس	اشریشیا کولی	استافیلوکوکوس اورئوس	اشریشیا کولی	استافیلوکوکوس اورئوس	
۳۱/۲۵	۳/۲۲	۱/۵۷	۳/۱	۱/۵۷	۳/۴	۱/۷	۰/۰۰۱
۶۲/۵	۱۹	۱۰/۶۳	۱۸/۰۸	۱۰/۶۲	۱۹/۹۲	۱۱	۰/۰۰۱
۱۲۵	۱۰/۳۰	۱۳/۴۲	۱۰/۴۲	۱۳/۴۲	۱۰/۱۸	۱۴	۰/۰۰۱
۲۵۰	۱۵/۱۰	۱۱/۴۳	۱۵	۱۰/۴۲	۱۵/۲۰	۱۲	۰/۰۰۱

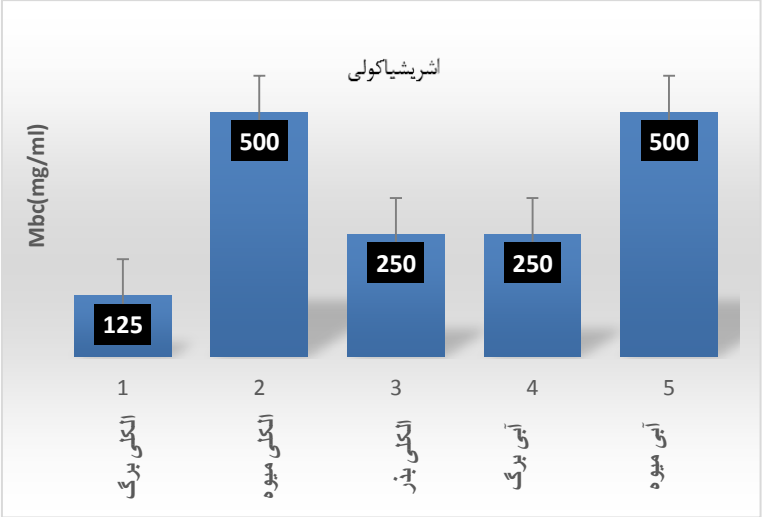
جدول ۵: اثر غلظت‌های مختلف عصاره الکلی بذر بر قطر هاله عدم رشد باکتری

غلظت عصاره	عصاره الکلی بذر						
	میانگین قطر هاله عدم رشد		کمترین قطر هاله حاصله		بیشترین قطر هاله حاصله		P value
	اشریشیا کولی	استافیلوکوکوس اورئوس	اشریشیا کولی	استافیلوکوکوس اورئوس	اشریشیا کولی	استافیلوکوکوس اورئوس	
۳۱/۲۵	۱/۰۷۵	۲	۱	۱/۵	۱/۳	۲/۵	۰/۰۰۱
۶۲/۵	۳/۴۷۵	۴/۷۵	۳/۴	۴	۳/۵	۵	۰/۰۰۱
۱۲۵	۹/۳۷	۱۰/۲۵	۹	۱۰	۱۰	۱۱	۰/۰۰۱
۲۵۰	۸/۷۵	۹/۴۲	۸/۵	۸/۷۵	۹/۷۵	۱۹/۸	۰/۰۰۱

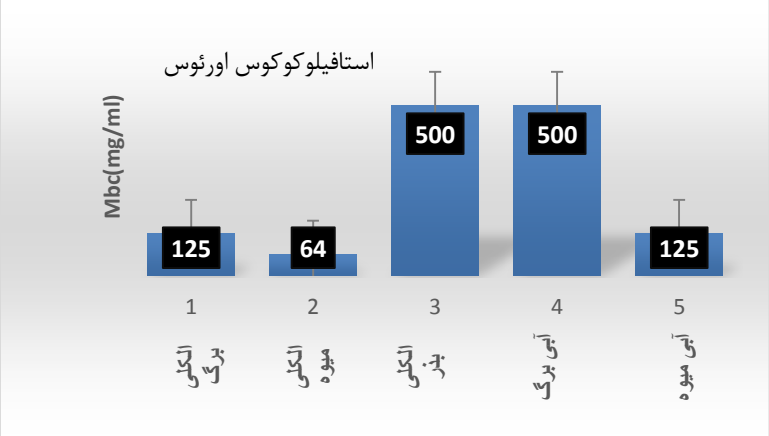
شکل ۱: حداقل غلظت بازدارندگی عصاره‌های الکلی و آبی کارلابر روی اشریشیاکولی



شکل ۲: حداقل غلظت بازدارندگی عصاره‌های الکلی و آبی کارلابر روی استافیلوکوکوس اورئوس



شکل ۳: حداقل غلظت کشندگی عصاره‌های الکلی و آبی کارلابر روی اشریشیاکولی



شکل ۴: حداقل غلظت کشندگی عصاره‌های الکلی و آبی کارلابر روی استافیلوکوکوس اورئوس

انجام شده حداقل غلظت کشندگی برای استافیلوکوکوس اورئوس بیشترین حساسیت را به عصاره الکلی میوه نشان داد. حداقل غلظت کشندگی عصاره الکلی میوه نسبت به عصاره آبی برگ و الکلی بذر اختلاف معناداری ($P<۰/۰۶$) را نشان داد (شکل ۴).

بحث

هر روزه مقاومت باکتری ها در برابر آنتی بیوتیک ها بیشتر می‌شود. تحقیق در مورد کشف مواد جدید با خواص ضد میکروبی قوی‌تر همپای افزایش مقاومت در باکتری ها رو به گسترش است و از آنجا که اسانس‌ها و عصاره گیاهی از دیر باز در درمان بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گرفتند،لذا به عنوان یک انتخاب مناسب برای این نوع تحقیقات به شمار می‌روند. گیاهان از هزاران سال پیش نقش بسیار مهمی در حفظ سلامتی و بهبود کیفیت زندگی انسان ها داشته اند. گیاهان دارویی دارای خواص مفیدی هستند که از جمله می توان به خاصیت ضد باکتریایی، ضد انگلی، ضد قارچی و آنتی اکسیدانی اشاره کرد [۱۱]. اسانس‌های گیاهی با اثرات ضد میکروبی بر روی طیف گسترده ای از ارگانیسم‌ها و همچنین قابلیت مصارف غذایی آنها در برخی موارد وکمتر بودن اثرات جانبی آنها نسبتبه آنتی‌بیوتیک‌های رایج می‌توانند درنهایت جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها شوند. در راستای بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس‌های گیاهی، اثرات ضدمیکروبی و آنتی باکتریال عصاره الکلی وعصاره آبی کارلا بر باکتری اشرشیاکلی هم که یکی از باکتری‌های مهم در ایجاد عفونت‌ها است مورد ارزیابی قرار گرفت. به این صورت که عصاره الکلی وعصاره آبی برگ، میوه و بذر کارلا در رقت‌های مختلف بر باکتری اشرشیا کلی پاتوژن بررسی شد که اثر مهارکنندگی وکشندگی نشان دادند و در تمامی غلظت‌ها دارای اختلاف معنی‌داری است که نشان‌دهنده اثر آنتی باکتریال قوی این عصاره برروایاین باکتری می‌باشد. همچنین عصاره الکلی وعصاره آبی کارلا بر باکتری اشرشیاکلی اثر باکتریوسیدال وهم باکتریواستاتیک داشت که اعداد نزدیک به هم حداقل غلظت کشندگی و حداقل غلظت بازدارندگی نیز نشان دهنده اثر قوی باکتریوسیدال عصاره این گیاه برروی باکتری است. بر اساس نتایج به دست آمده بیشترین قطر هاله عدم رشد مربوط به عصاره آبی میوه و الکلی میوه کارلا بر روی باکتری اشرشیاکلی بود و حداقل غلظت بازدارندگی بدست آمده نیز مربوط به عصاره الکلی میوه و الکلی برگ بود. بر این اساس می‌توان نتیجه گرفت عصاره الکلی میوه بهترین کارایی را برای مهار و ممانعت از رشد اشریشیاکولی از خود نشان داده است.در نتایج اثر باکتریوسایدال حداقل غلظت کشندگی برای عصاره الکلی بذر، آبی برگ، الکلی برگ، الکلی میوه و آبی میوه به ترتیب ۲۵۰،۲۵۰، ۱۲۵، ۵۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. نتیجه اینکه عصاره الکلی برگ بهترین کارایی باکتریوسایدالی را برای اشریشیاکولی از خود نشان داده است. در پژوهش انجام شده توسط Talei و همکاران(۲۰۰۳) حداقل غلظت بازدارندگی سماق، گیاه همیشه سبز و درمنه بر روی استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب ۱۲۵، ۶۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر حاصل شده است که این مقدار در عصاره های مختلف کارلا یعنی عصاره آبی میوه، الکلی میوه، بذر کارلا و الکلی برگ همگی ۱۲۵ و یا کمتر به دست آمده است که نشان‌دهنده کارایی مهارکنندگی بیشتر اشریشیاکولی توسط کارلا است [۱۶]. درحال حاضر یکی از عمده مشکلاتی که در درمان عفونت‌ها و استفاده از آنتیبیوتیک‌ها وجود دارد، ایجاد مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی است که توجه خاصی رابرای درمان می‌طلبد و از آنجا که اثرات ضد باکتریایی عصاره کارلا در تحقیقات برروی گونه اشریشیاکولی به اثبات رسید، استفاده از آن در درمان عفونت‌های ایجاد شده توسط باکتری‌های مقاوم قابل توصیه می‌باشد. در راستای بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس های گیاهی، اثرات ضد میکروبی وآنتی باکتریال عصاره الکلی و عصاره آبی کارلا بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس هم که یکی از باکتری‌های مهم در ایجاد عفونت ها است. عصاره الکلی وعصاره آبی برگ, میوه و بذر کارلا در رقت‌های مختلف بر استافیلوکوکوس اورئوس بررسی شد که اثر مهارکنندگی وکشندگی نشان دادند و در تمامی غلظت‌ها دارای اختلاف معنی داری است که نشان‌دهنده اثر آنتی‌باکتریال قوی این عصاره بر روی این باکتری می‌باشد. همچنین عصاره الکلی وعصاره آبی کارلا بر استافیلوکوکوس اورئوس پاتوژن اثر باکتریوسیدال وهم باکتریواستاتیک داشت که اعداد نزدیک به همحداقل غلظت کشندگی و حداقل غلظت بازدارندگینیز نشان دهنده اثر قوی باکتریوسیدال عصاره این گیاه برروایاین باکتری است.

بر اساس نتایج به دست آمده از اثر کارلا بر استافیلوکوکوس اورئوس بیشترین قطر هاله عدم رشد مربوط به عصاره الکلی میوه کارلا بودو حداقل غلظت بازدارندگی بدست آمده نیز مربوط به عصاره الکلی میوه حاصل شد. بر این اساس می توان نتیجه گرفت عصاره الکلی میوه بهترین کارایی را برای مهار و ممانعت از رشد استافیلوکوکوس اورئوس از خود نشان داده است. در نتایج اثر باکتریوسایدال حداقل غلظت کشندگی برای عصاره الکلی بذر، آبی برگ، الکلی برگ، الکلی میوه و آبی میوه به ترتیب ۵۰۰، ۵۰۰، ۱۲۵، ۶۴ و ۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد نتیجه اینکه عصاره الکلی میوه بهترین کارایی باکتریوسایدالی را برای استافیلوکوکوس اورئوس از خود نشان داده است. در پژوهش انجام شده توسط Talei و همکاران(۲۰۰۳) حداقل غلظت بازدارندگی سماق، گیاه همیشه سبز و درمنه بر روی استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب ۱۵۰، ۶۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر حاصل شده است که این مقدار در عصاره های مختلف کارلا یعنی عصاره آبی میوه، الکلی میوه،

بذر کارلا و الکلی برگ همگی ۱۲۵ و یا کمتر به دست آمده است که نشان‌دهنده کارایی مهارکنندگی بیشتر اشریشیاکولی توسط کارلا است[۱۶].

درحال حاضر یکی از عمده مشکلاتی که در درمان عفونت‌ها واستفاده ازآنتی بیوتیک‌ها وجود دارد، ایجاد مقاومت‌های آنتیبیوتیکی است که توجه خاصی رابرای درمان می‌طلبد و از آنجا که اثرات ضد باکتریایی عصاره کارلا درتحقیقات برروی گونه استافیلوکوکوس اورئوس به اثبات رسید که استفاده از آن در درمان عفونت‌های ایجاد شده توسط باکتری‌های مقاوم قابل توصیه می‌باشد.در مطالعات مختلف و مشابه نیز اثر ضد باکتریایی گیاهان مختلف نیز از جمله گزنه بر باکتری *استافیلوکوکوس* به خوبی نشان داده شده است. Kiaei و همکاران (۲۰۱۱)، تأثیر عصاره اتانولی گزنه را بر باکتری *استافیلوکوکوس اورنوس* مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند این گیاه دارای خاصیت ضد باکتریایی علیه باکتری استافیلوکوکوس اورنوس می باشد [۱۲]. Janssen و همکاران در سال ۱۹۸۵ عصاره گزنه را بر روی رشد باکتری های *استافیلوکوکوس اورنوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیس و استرپتوکوکوسپایوژنز* مورد بررسی قرار دادند و بیان کردند عصاره گزنه قادر به ایجاد هاله عدم رشد بر روی محیط کشت باکتری های مذکور می باشد [۱۳]. نتایج اخیر تاییدی بر نتایج حاصله در این پژوهش است. با مقایسه بین فعالیت عصاره های مختلف کارلا بر روی استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کولی، بیشترین اثر بازدارندگی مربوط به عصاره الکلی میوه بود و از طرف دیگر عصاره آبی برگ و الکلی بذر کمترین اثر را روی اشریشیا کولی نشان می‌دهند. کمترین اثر ضدمیکروبی روی اشریشیا کولی مربوط به عصاره الکلی بذر است که کمترین قطر هاله عدم رشد را نشان می دهد و کمترین اثر ضدمیکروبی روی استافیلوکوکوس اورئوس نیز مربوط به عصاره الکلی بذر است که کمترین قطر هاله عدم رشد را نشان می دهد. بهترین رقت به دست آمده برای عصاره ها نشان داد که این رقت بهینه برای تمام عصاره ها رقت ۱۲۵میلی‌گرم بر میلی لیتر است.

نتیجه‌گیری

با توجه به اثر بالای خاصیت آنتی باکتریال عصاره های الکلی برگ و میوه بر روی استافیلوکوکوساورئوس و اشریشیا کولی و با نتایج حاصل می‌توان از این گیاه به عنوان یک دارو در درمان بیماری‌های ناشی از اثر این باکتری‌ها استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه ثبت شده در دانشگاه پیام نور می‌باشد. مؤلفین این اثر از تمامی اعضای دخیل در دانشگاه علوم پزشکی زاهدان و دانشگاه پیام نور کردستان سپاسگزاری می‌نمایند.

تضاد منافع

این مطالعه برای نویسندگان هیچ‌گونه تضاد منافعی نداشته است.

ملاحظات اخلاقی

پژوهش حاضر در کمیته اخلاق پیام نور مورد تایید قرار گرفته است.

سهم نویسندگان

شهریار سعیدیان، مریم اسلامی، علیرضا داشی پور در جمع آوری داده ها و نگارش علمی مقاله نقش داشته اند.

حمایت مالی

پژوهش حاضر با حمایت مالی دانشگاه پیام نور انجام شده است.

REFERENCES

1. Naghavi M, Faridi A, Pormalak F, Jaafari N, Lake Moradi M, Eshrati B, Mahdavi N, Kazemeni H, Hashemi Bani Tehrani A, Shoaei SH. The rate of diseases and injuries of Iran in the year of 2003. IJE. 2003; 4(1): 1-19. (Persian)
2. Joshi B, Lekhak S, Sharma A. Antibacterial property of different medicinal plant Ocimum sanctum, Cinnamomum zeylanicum, Xanthoxylum armatum and Origanum majorana." Kathmandu University. JSET, 2009.
3. Yadollahi P, Asgharipour MR, Bagheri A, Jabbari B, Sheikhpour S. Effects of sodium nitroprusside and arsenic on quantitive traits of bitter squash (Momordica charantiaL.) medicinal plant. IJCS, 2013;(5)3:215-225. (Persian)
4. Shibib BA, Khan LA, Rahman R. Hypoglycemic activity of Coccinia indica and Momordica charantia in diabetic rats: depression ofthe hepatic gluconeogenic enzymes glucose-6-phosphatase and fructose-1,6 bisphosphatase andelevation of both liver and red-cell shunt enzymeglucose-6-phosphate dehydrogenase. Biochemistry Journal. 1993; 15: 267-270.
5. Rojhan MS. Drug and Meducinal plants. Alavi publication. 2000; 32-47. (Persian)
6. Moaveni P. Medicinal plants. Azad university publication. Shahre ghods unit. 2008; 110-123. (Persian)
7. Yano Y, Satomi M, Oikawa H. Antimicrobial effect ofspices and herbs on Vibrio parahaemoleticus. Int J Foo Microbiol. 2006;111(1):6-11.
8. Chaudhry NMA, Tariq P. Anti-microbial activity of Cinnamomum Cassia against diverse microbial flora with itsnutritional and medicinal impacts. Pak J Bot. 2006; 38(1):169-74.
9. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard-Tenth Edition.2015.

10. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility testsfor bacteria that grow aerobically. Approved Standards. NCCLS Document M7-A5. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne. 2001.
11. Zargari A. Medicinal plants. Tehran university publication. 2001; 25-36. (Persian)
12. Kiaei A, Mazandarani M, Ghaemi A. Effect of ethanolic extract of 7 species of medicinal plant against isolated bacteria Of Patients with Urinary Tract Infection in Gorgan. 2011; 9(34): 74-83. (Persian)
13. Tasdelen FN, Tanriverdi CY, Coban AY, Ozatli D, Tanyel E, Durupinar B, Tulek N. Antimicrobial activity of plant extracts Ankaferd Blood Stopper. Fitoterapia, 2009;80(1): 48-50.
14. Skočibušić M, Bezić N, Dunkić V and Radonić A. Antibacterial activity of Achillea clavennae essential oil against respiratory tract pathogens. Fitoterapia. 2004; 75(7):733-736.
15. Sökmen A, Vardar-Ünlü G, Polissiou M, Daferera D, Sökmen M and Dönmez E. Antimicrobial activity of essential oil and methanol extracts of Achillea sintenisii Hub. Mor.(Asteraceae). Phytotherapy Research. 2003; 17(9):1005-1010.
16. Talei G, Meshkatosadat MH, Delfan B. Antibacterial activity of fruit, leaves extracts of Artemisia Persica Boiss ,Rhus Coriaria, Ephedra Intermedia and Daphne Mucronata Royle of Lorestan. yafte. 2004; 5(3):19-24.