Nova Biologica Reperta 6(4): 454-463 (2020)
Print ISSN: 2423-6330/Online ISSN: 2476-7115
https://nbr.khu.ac.ir; Kharazmi University Press; DOI: 10.29252/nbr.6.4.454

یافته‌های نوین در علوم زیستی
جلد ۶، شماره ۴، صفحات ۴۵۴ الی ۴۶۳ (۱۳۹۸)
انتشارات دانشگاه خوارزمی

بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره متانولی و آبی گل ابریشم مصری

ویدا تفکری و نسیم نصیری
گروه علوم سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران
مسئول مکاتبات: ویدا تفکری، TafakoriV@khu.ac.ir

چکیده. از قدیم گیاهان به‌عنوان دارو برای درمان بسیاری از بیماری‌ها استفاده می‌شده‌اند. یکی از این بیماری‌ها، بیماری‌های عفونی است. در برخی موارد از عصاره‌های گیاهی برای درمان استفاده می‌شود. حلال‌های مختلفی جهت عصاره‌گیری از گیاهان استفاده می‌شود. در این پژوهش اثرات ضدمیکروبی عصاره‌های آبی و متانولی گل ابریشم مصری مورد بررسی قرار گرفت. به‌این‌منظور گل‌های ابریشم مصری کوبیده شدند و آنگاه یک شب در متانول ۱۰۰٪ و آب خیسانده شدند. پس از تبخیر حلال خواص ضدباکتریایی و ضدقارچی به روش انتشار در چاهک، روی باکتری‌های *Candida albicans*، *Bacillus subtilis*، *Staphylococcus aureus*، *Methicilin resistance*، *Pseudomonas aeruginosa* و قارچ مخمری *Candida albicans* انجام شد. نتایج حاکی از آن بود که عصاره این گیاه، بر باکتری‌های مختلف و همچنین قارچ مخمری مؤثر است و یک هاله عدم رشد معنی دار را نشان می‌دهد. به منظور تعیین حداقل غلظت بازدارنده و کشنده نیز تست-های ضدمیکروبی در میکروپلیت انجام گرفت. همچنین نتایج نشانگر این بود که ترکیبات ضدمیکروبی عصاره‌های این گل در دماهای مختلف پایدار است. بنابر نتایج حاصل از این پژوهش می‌توان گفت عصاره‌های آبی و الکلی گل‌های ابریشم مصری خواص ضدمیکروبی خوبی علیه میکروب‌های عفونی مهم امروزی دارند و می‌توان این گل را به‌عنوان منبع خوبی جهت استخراج ترکیبات ضدمیکروبی معرفی کرد.

واژه‌های کلیدی. باکتری، بازدارنده، چاهک، کشنده، مخمر

Anti-microbial effects of aqueous and methanolic extracts of *Erythrostemon gilliesii*

Vida Tafakori & Nasim Nasiri
Department of Cell and Molecular Sciences, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran. Iran
Correspondent Author: Vida Tafakori, TafakoriV@khu.ac.ir

Abstract. Plants have been used as medicines in the treatment of diseases from the past to present. In this research, the anti-microbial effects of aqueous and methanolic extracts of *Erythrostemon gilliesii* were studied. For this purpose, fresh flowers were ground and then macerated in methanol 100% and water overnight. After the evaporation of solvents, anti-microbial activities of the concentrated extracts were evaluated by the well-diffusion method on *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeroginosa*, *Methicilin resistance*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Candida albicans*. The results showed that the extracts were effective on different bacteria and yeasts. In order to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum biocidal concentration (MBC), anti-microbial tests were performed in micro-plates. Subsequently, the results indicated that the extracts were stable at different temperatures. The aqueous and methanolic extracts of the flowers of *E. gilliesii* had exhibited anti-microbial effects against important infectious microbes and could be introduced as an excellent source for anti-microbial agents.

Keywords. Bacteria, Biocidal, Inhibitory, well, yeast

Received 08.08.2018/ Revised 26.02.2019/ Accepted 04.03.2019/ Published 20.01.2020
دریافت: ۱۳۹۷/۰۵/۱۶/ اصلاح: ۱۳۹۷/۱۲/۰۷/ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۱۴/ انتشار: ۱۳۹۸/۱۰/۳۰

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-07-22]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.4.13.4]
[DOI: 10.29252/nbr.6.4.454]

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-07-22]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.4.13.4]
[DOI: 10.29252/nbr.6.4.454]

مقدمه

برای قرن‌های متمادی، گیاهان به عنوان دارو و به منظور درمان بسیاری از بیماری‌ها در جهان مورد استفاده قرار گرفته‌اند. این داروها، بعنوان نمونه اولیه برای گسترش داروهای مؤثرتر و با سمیت کم‌تر، استفاده می‌گردند (Sharma *et al.*, 2009). میکروارگانیسم‌ها مانند باکتری‌ها و قارچ‌ها از عوامل مهم بیماری‌زا در انسان‌ها محسوب می‌گردند. اما متاسفانه امروزه به دلیل کاربرد بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها، برخی باکتری‌های بیماری‌زای مهم مانند استافیلوکوکوس‌های مقاوم به متی سیلین یا MRSA و نیز سودوموناس آئروژینوزا، به انواع آنتی بیوتیک‌های موجود مقاوم شده‌اند و سبب بروز عفونت‌های غیرقابل درمان در انسان شده‌اند (West *et al.*, 2018). به علت بروز مقاومت‌های میکروبی به آنتی‌بیوتیک‌های شیمیایی، نیاز به یافتن منابع و آنتی بیوتیک‌های جدید بیش از پیش ضروری به نظر می‌رسد. به خصوص در کشورهای جهان سوم که بیش از یک سوم مرگ و میرها به دلیل بیماری‌های عفونی رخ می‌دهد (Srivasta *et al.*, 2013). به دلیل عوارض کم داروهای گیاهی، متخصصین عفونی تمایل زیادی به استفاده از این داروها جهت درمان عفونت‌ها دارند (Sharafati-chaleshtori *et al.*, 2010) به گونه‌ای که استفاده از گیاهان و ترکیبات آن‌ها به عنوان جایگزینی برای آنتی‌بیوتیک‌های شیمیایی مورد توجه قرار گرفته است (Frey & Meyers, 2010; Pirnia *et al.*, 2014). در طب سنتی به روش‌های مختلفی از گیاهان دارویی جهت درمان بیماری‌ها استفاده می‌شود. در برخی موارد این گیاهان به صورت دمنوش (حاوی عصاره گیاه)، برخی موارد به صورت پودر مخلوط با مواد خوراکی دیگر مثلا ماست یا شیر و برخی به صورت موضعی روی زخم‌ها و غیره استعمال می‌شود. روش استفاده از گیاهان دارویی در میان جوامع انسانی از نسلی به نسل دیگر منتقل می‌شود (Wangensteen *et al.*, 2015). تا کنون گیاهان مختلفی در طب سنتی استفاده شده‌اند. برخی از این گیاهان از جمله گیاهان زینتی هستند و برخی نیز جزء گیاهان خودرو محسوب می‌گردند.

گل ابریشم مصری با نام علمی *Erythrostemon gilliesii* (Hook.) Klotzsch (مترادف: *Caesalpinia gilliesii* (Hook.) D.Dietr، *Caesalpinia macrantha* Delile، *Poinciana gilliesii* Hook. و *Prosopis gillesii* (Hook.) Macloskie) شناخته می‌شود. این گیاه جزو درختچه‌های زینتی دولپه‌ای‌ها است و به پرنده زرد بهشتی هم معروف است. ابریشم مصری در مناطق گرمسیری می‌روید و دارای گل‌های زرد است. غلاف آن به صورت مسطح و کشیده است. این درختچه بومی آرژانتین است اما تقریبا در همه جا کاشته می‌شود (Osman *et al.*, 2015). ارتفاع این درختچه به یک و نیم تا ۳ متر می‌رسد. برگ آن بین ۷/۵ تا ۱۲/۵ سانتی‌متر طول داشته و بسیار به برگ سرخس شباهت دارد. فصل گلدهی در اوایل تابستان است. گل دارای گل‌آذین خوشه‌ای است و هر گل شامل ۵ گلبرگ زردرنگ و ۱۰ پرچم (پرچم‌ها به رنگ قرمز، بلند با طولی بیش‌تر از ۲۰ سانتی‌متر است (Link *et al.*, 1840). تاکنون هیچ مطالعه‌ای جهت بررسی عصاره‌های این گیاه بر روی میکروارگانیسم‌های مختلف انجام نگرفته است. بنابراین هدف از این پژوهش بررسی اثرات ضدباکتریایی و ضدقارچی عصاره آبی و متانولی گیاه گل ابریشم مصری و پایداری دمایی آن‌ها است.

مواد و روش‌ها

انتخاب گیاه گل ابریشم مصری و استخراج عصاره آن

فصل گل‌دهی درختچه‌های ابریشم مصری در اواخر بهار و اوایل تابستان است. بنابراین در ماه خرداد، گل‌های این گیاه از درختچه-هایی که در منطقه حصارک کرج روییده بودند، جمع‌آوری شد (شکل ۱). سپس به منظور تایید نام علمی گیاه بخش‌های مختلف گیاه شامل ساقه، برگ، گل و میوه آن خشکانده شد، بر روی برگه-های هرباریومی چسبانیده و به گیاکده دانشگاه خوارزمی ارسال شد و شماره هرباریومی ۶۰۲۸۰ برای آن تعیین شد. پس از تأیید، مراحل بعدی کار انجام گرفت.

عصاره‌گیری از گل‌های گیاه ابریشم مصری طبق روش تغییر یافته Stankovi´c و همکاران (Stankovi´c *et al.*, 2016) انجام گرفت. به این منظور ابتدا گل‌ها جدا شده و چندین بار با آب معمولی آب-کشی شدند. در نهایت یک‌بار نیز با آب مقطر آب‌کشی صورت گرفت. سپس ۱۰ گرم از گل‌ها در هاون چینی، کوبیده شدند به گونه‌ای که یک خمیر نرم از آن به دست آمد. در مرحله بعد عصاره‌گیری طبق روش مرسوم خیساندن انجام شد. به این منظور گل‌های کوبیده شده، به مدت یک شب در ۴۰ سی سی متانول ۱۰۰ درصد و دمای اتاق قرار گرفتند. سپس مخلوط حاصل به مدت پنج دقیقه در g ۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد. محلول حاصل که حاوی عصاره متانولی گل ابریشم مصری است، زیر هود شیمیایی قرار گرفت تا حلال متانول کاملا تبخیر شود. وزن خشک به دست آمده تعیین و در آب حل شد به گونه‌ای که غلظت نهایی ۱۹۰ mg/ml از عصاره به دست آید (Stankovi´c *et al.*, 2016). سپس به منظور استریل شدن عصاره از فیلترهای سر سرنگی ۰/۲۲ میکرون استفاده شد. همه مراحل ذکرشده

شکل۱- گل ابریشم مصری.
Fig. 1. *Erythrostemon gilliesii* flower.

در بالا در مورد حلال آبی هم صورت گرفت. یعنی به جای متانول از آب به عنوان حلال جهت عصاره‌گیری استفاده شد. در مورد عصاره آبی غلظت نهایی بدست آمده ۲۴۲ mg/ml به دست آمد.

میکروارگانیسم‌های مورد استفاده و محیط‌های کشت

باکتری‌های گرم منفی مورد استفاده در این پژوهش عبارت بودند از *K. pneumoniae* (ATTC 10031) و *P. aeroginosa* (ATTC 9027) و باکتری‌های گرم مثبت مورد استفاده عبارت بودند از *B. subtilis* (ATTC 6633) و MRSA (ATTC 33593). به منظور بررسی خواص ضدقارچی عصاره‌های به دست آمده نیز از قارچ مخمری *C. albicans* (ATTC 10231) استفاده شد. طبق استانداردهای Clinical & Laboratory CLSI (Standards Institute)، تمام گونه‌های باکتریایی روی محیط کشت مولرهینتون مایع و جامد و گونه قارچی نیز روی محیط کشت مولرهینتون مایع و جامد واجد ۲ درصد گلوکز، کشت داده شدند (Balouiri *et al.*, 2016). تمامی سویه‌های میکروبی از بانک میکروبی مرکز ملی ذخائر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه گردیدند.

بررسی اولیه خواص ضدمیکروبی عصاره‌های گیاهی

به این منظور از روش مرسوم انتشار در چاهک استفاده شد. در این روش ابتدا سوسپانسیونی از میکروب مورد استفاده تهیه می‌شود که معادل با نیم مک فارلند باشد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از میکروب مورد استفاده توسط سواب استریل روی سطح محیط کشت جامد گسترده می‌شود. پس از ۱۰ دقیقه که میکروب‌ها کاملا جذب سطح محیط کشت شدند، توسط اپلیکاتور پلاستیکی استریل مانند تیپ، چاهک‌هایی به قطر ۸-۶ میلی‌متر در شرایط استریل درون آگار تعبیه می‌شود. سپس حجمی معادل ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره به دست آمده درون هر چاهک ریخته می‌شود و پلیت به مدت ۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار می‌گیرد تا عصاره درون آگار منتشر شود. سپس بر حسب میکروب مورد استفاده، پلیت به مدت ۲۴ ساعت در دمای مناسب انکوبه می‌شود (Balouiri *et al.*, 2016). چون عصاره گیاهی حاصل، حاوی انواع مختلفی از ترکیبات است و اغلب ترکیبات ضدمیکروبی تنها درصد کمی از عصاره کل را در برمیگیرد، در برخی منابع هاله عدم رشد قابل مشاهده‌ای بزرگ‌تر از ۱ میلی‌متر از لبه چاهک را، قابل قبول اعلام می‌کنند (Tomova *et al.*, 2015) و پس از آن به بررسی ترکیبات ضدمیکروبی عصاره می‌پردازند. البته در این پژوهش به بررسی خواص ضدمیکروبی عصاره کامل پرداخته می‌شود و نه اجزای آن. به عنوان آنتی‌بیوتیک شاهد نیز داروهای پیپراسیلین (Fluka) و نیستاتین (Fluka) به ترتیب با غلظت‌های ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (CLSI, 2012) و ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (Ginovyan *et al.*, 2017)، استفاده شدند. هر تست سه بار تکرار شد.

تعیین حداقل غلظت بازدارنده و کشنده میکروبی

پس از مشاهده هاله عدم رشد در مجاورت عصاره کامل گیاهی نوبت به تعیین حداقل غلظت بازدارنده و کشنده میکروبی رسید. به این منظور در میکروپلیت ۹۶ خانه، که حاوی مولرهینتون براث برای

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-07-22]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.4.13.4]
[DOI: 10.29252/nbr.6.4.454]

باکتری‌ها و مولرهینتون براث به همراه گلوکز برای مخمر بود، سریال رقت‌های دو برابری از عصاره‌های گیاهی تهیه شد. به این منظور برای عصاره متانولی، رنج رقتی بین mg/ml ۹۵- ۰/۳۷۱ و برای عصاره آبی رنج رقتی بین mg/ml ۱۲۱- ۰/۴۷۲ تهیه شد. سپس از کشت شبانه گونه‌های میکروبی مورد نظر، سوسپانسیون میکروبی با کدورتی معادل نیم مک فارلند تهیه شد و از آن مقادیر یکسان معادل CFU ^{5} ۱۰ سلول وارد هر چاهک شد. میکروپلیت‌ها به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد سرماگذاری شدند. یک چاهک از هر ردیف نیز به عنوان شاهد رشد بدون هیچ عصاره میکروبی در نظر گرفته شد. داروهای پیپراسیلین و نیستاتین به ترتیب با غلظت‌های ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، به عنوان کنترل مثبت استفاده شدند (شکل۲). همه تست‌ها با دو تکرار انجام گرفتند. پس از گذشت ۲۴ ساعت، حداقل غلظت بازدارنده به عنوان کم‌ترین غلظتی از عصاره گیاهی که هیچ رشد قابل مشاهده‌ای از میکروب در آن دیده نشد، در نظر گرفته شد (CLSI, 2018).

به منظور تعیین حداقل غلظت کشنده نیز از رقت‌هایی که هیچ رشد میکروبی در آن‌ها مشاهده نشد، به روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. حداقل غلظت کشنده به عنوان حداقل غلظتی از عصاره گیاهی که سبب کشته شدن ۹۹/۹ درصد از میکروارگانیسم‌ها می‌شود، تعریف می‌شود (CLSI, 2018).

بررسی تاثیر دماهای مختلف بر فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌های آبی و متانولی گل ابریشم مصری

یک تست بسیار مفید در مورد عصاره‌های مختلف با اثر ضدمیکروبی، بررسی اثر فاکتورهای مختلف بر فعالیت آن‌ها است. هر چه یک ماده ضدمیکروبی در گستره وسیع‌تری از فاکتورهای فیزیکوشیمیایی فعالیت خود را حفظ کند، تهیه و نگهداری آن آسان‌تر خواهد بود. در این بخش تاثیر فاکتور دما بر فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌های گل ابریشم مصری بررسی شد. به این منظور مقداری از عصاره‌ها در ویال‌های استریل ریخته شد و سپس هر یک از ویال‌ها به مدت یک ساعت در دمایی خاص قرار گرفت. دماهای مورد استفاده عبارت بودند از دمای اتاق، دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد (به منظور بررسی اثر فریز کردن بر فعالیت عصاره) و دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد (به منظور بررسی اثر جوشاندن بر فعالیت عصاره). پس از طی زمان ذکر شده، فعالیت ض میکروبی این تیمارها به روش انتشار در چاهک، روی یکی از سویه‌ها یعنی *B. subtilis* مورد ارزیابی قرار گرفت. این آزمایش با دو تکرار انجام شد و در نهایت به منظور مقایسه از آزمون t-Test استفاده شد.

نتایج

عصاره گیری از گل ابریشم مصری

رنگ عصاره متانولی حاصل از گل‌های ابریشم مصری، قرمز تیره و رنگ عصاره آبی حاصل از آن‌ها زرد پررنگ بود که این تفاوت رنگ حاکی از استخراج ترکیبات مختلف توسط این دو حلال بود. حتی پس از تبخیر حلال‌ها نیز ماده جامد به دست آمده از نظر رنگ و جرم بسیار متفاوت بودند (شکل ۳). جرم به دست آمده از عصاره آبی بیش‌تر از عصاره متانولی بود.

خواص ضدمیکروبی به روش انتشار در چاهک

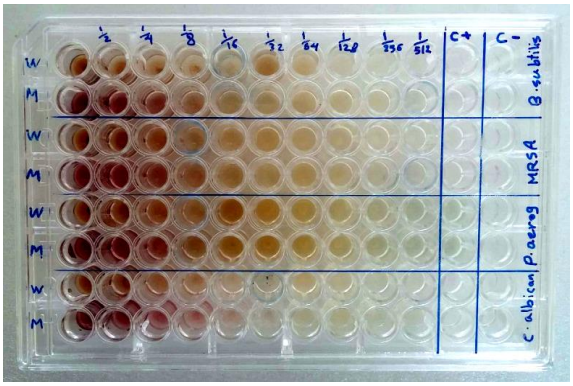
پس از بررسی خواص میکروب‌کشی عصاره‌های به دست آمده از گل ابریشم مصری، مشخص شد که این عصاره‌ها بر روی اغلب میکروب‌های مورد استفاده اثر میکروب‌کشی دارند. همان‌طور که در شکل ۴ نشان داده شده است از میان میکروب‌های مورد استفاده هاله عدم رشدی در اطراف عصاره‌های آبی و متانولی برای باکتری‌های *P. aeroginosa*، *B. subtilis* و MRSA مشاهده شد. در مورد قارچ مخمری *C. albicans* فقط در اطراف عصاره آبی هاله عدم رشد مشاهده شد.

میانگین اندازه هاله اندازه‌گیری شده از لبه چاهک مربوط به سه تکرار، برای هر یک از میکروارگانیسم‌های مورد استفاده در جدول ۱ آورده شده است. همان گونه که مشاهده می‌شود اندازه هاله‌های آبی در تمام موارد از اندازه هاله‌های متانولی بیش‌تر است. البته با توجه به این‌که وزن خشک عصاره آبی اولیه از وزن خشک عصاره متانولی بیش‌تر بود، این تفاوت منطقی به نظر می‌رسید. به منظور اندازه‌گیری اندازه هاله عدم رشد از لبه چاهک اندازه‌گیری صورت گرفت (شکل ۵).

حداقل غلظت بازدارنده و کشنده میکروبی

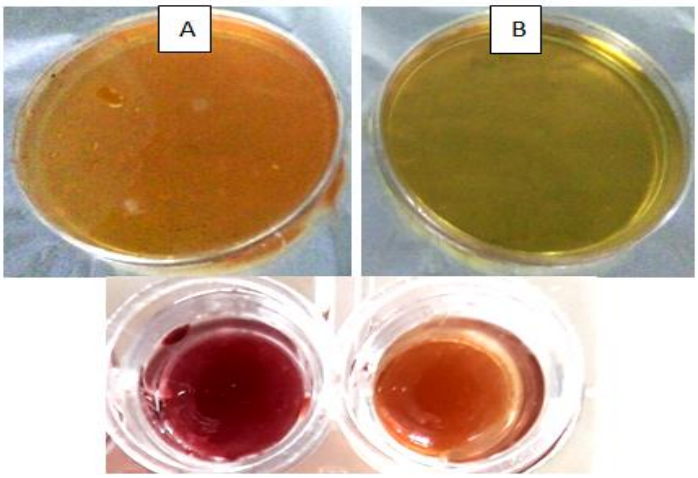
به‌دلیل مشاهده رسوب در کف برخی از چاهک‌های میکروپلیت‌ها قبل از رشد میکروارگانیسم‌ها، به منظور تأیید قطعی‌تر حداقل غلظت بازدارنده پس از یک شب انکوباسیون، از چاهک‌هایی که تعیین کدورت در آن‌ها به‌راحتی قابل تمایز با رسوب عصاره نبود، روی پلیت‌های نوترینت آگار کشت داده شد (شکل ۶). با توجه به نتایج حاصل از کشت می‌توان حداقل غلظت کشنده را برای هر یک از سویه‌های مورد استفاده، طبق جدول ۲ گزارش کرد.

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-07-22]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.4.13.4]
[DOI: 10.29252/nbr.6.4.454]



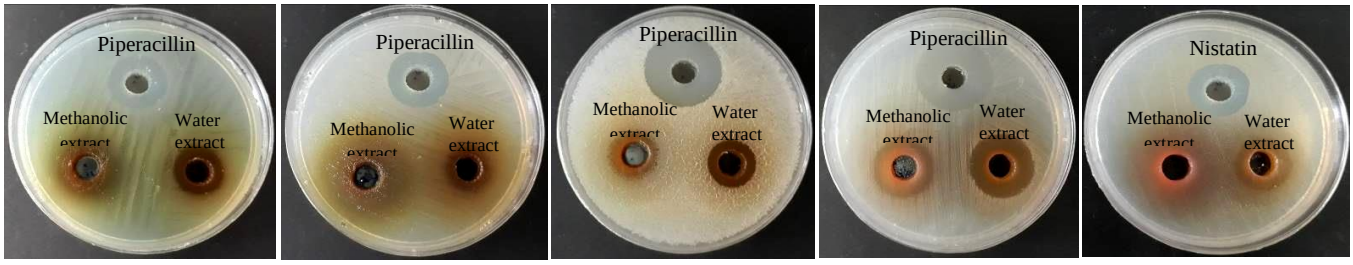
شکل ۲- سریال رقت از عصاره‌های آبی و متانولی گل ابریشم مصری در میکروپلیت به منظور تعیین حداقل غلظت مهارکننده رشد.

Fig. 2. Serial dilution of water and methanolic extracts of *Erythrostemon gilliesii* flower in microplate for MIC determination.



شکل ۳- تفاوت رنگ عصاره های آبی و متانولی گل‌های ابریشم مصری. **A**. عصاره متانولی. **B**. عصاره آبی.

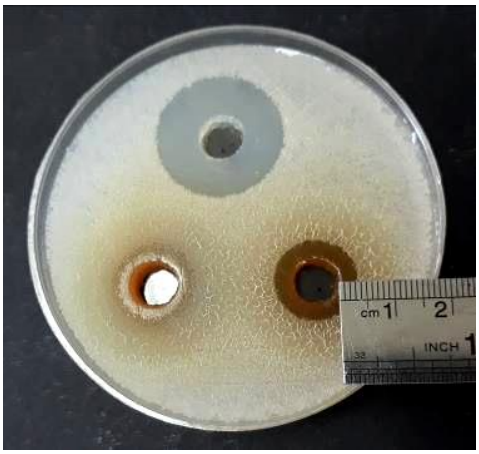
Fig. 3. Difference in color of water and methanolic extracts of *Erythrostemon gilliesii* flowers. **A.** methanolic extract. **B.** water extract.



شکل ۴- بررسی وجود هاله عدم رشد میکروارگانیسم‌های مورد استفاده در مجاورت عصاره‌های متانولی و آبی حاصل از گل ابریشم مصری به روش انتشار چاهک. **A**. *P. aeruginosa* .**B** *K. pneumonia* .**C** *B. subtilis* .**D** MRSA .**E** *C. albicans*.

Fig. 4. Study on inhibition zone of used microorganisms around the methanolic and water extracts of *Erythrostemon gilliesii* flowers by well diffusion method. **A.** *P. aeroginosa*. **B.** *K. pneumonia*. **C.** *B. subtilis*. **D.** MRSA. **E.** *C. albicans*.

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-07-22]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.4.13.4]
[DOI: 10.29252/nbr.6.4.454]



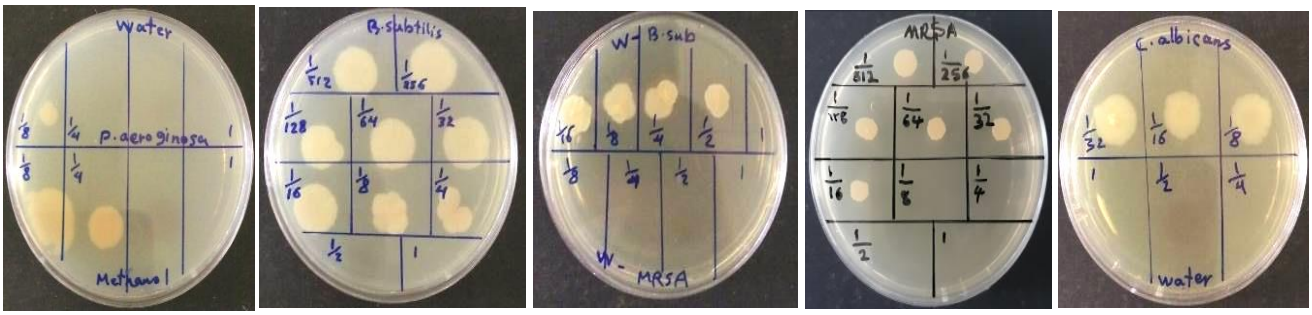
شکل ۵ – اندازه گیری هاله عدم رشد از لبه چاهک با خط کش.

Fig. 5. Measurement of inhibition zone from the well edge with ruler.

جدول ۱- میانگین اندازه هاله عدم رشد برای میکروارگانیسم‌های مورد استفاده.

Table.1. The mean of inhibition zone for used microorganisms

Bacteria	The mean of inhibition zone for water extract (mm+SD)	The mean of inhibition zone for methanolic extract (mm+SD)
P. aeroginosa	4+ 0.05	2 + 0.02
K. pneumonia	0	0
B.subtilis	5+ 0.03	3 + 0.05
MRSA	9 + 0.05	7 + 0.01
C.albicans	5 + 0.01	No inhibition zone



شکل ۶ – کشت از چاهک‌ها به منظور تعیین حداقل غلظت کشنده عصاره‌های گل ابریشم مصری.

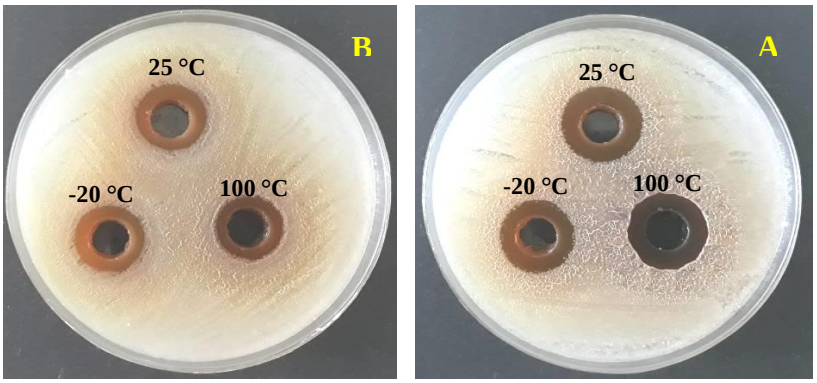
Fig. 6. Cultivation from wells for determination of MBC of extracts of *Erythrostemon gilliesii* flowers.

جدول ۲– حداقل غلظت کشنده عصاره‌های گل ابریشم مصری برای سویه‌های مورد استفاده.

Table. 2. MBC of extracts of *Erythrostemon gilliesii* flowers for used microorganisms.

Bacteria	MBC for water extract (mg/ml)	MBC for methanolic extract (mg/ml)
P. aeroginosa	60.5	95
B.subtilis	121	95
MRSA	15.12	11.87
C.albicans	30.25	-

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-07-22]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.4.13.4]
[DOI: 10.29252/nbr.6.4.454]



شکل ۷ - اثر دما بر فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌های آبی و متانولی گل ابریشم مصری. **A**. عصاره آبی. **B**. عصاره متانولی.

Fig. 7. The Effect of temperature on antimicrobial activity of water and methanolic extracts of *Erythrostemon gilliesii* flowers. **A.** water extract. **B.** methanolic extract.

تعیین اثر دماهای مختلف بر عصاره‌های گل ابریشم مصری

همان گونه که در شکل ۷ مشاهده می‌شود، دماهای مختلف هیچ تاثیری بر فعالیت میکروب‌کشی عصاره‌های متانولی و آبی گل ابریشم مصری ندارد. به گونه‌ای که اندازه هاله‌های مربوط به دماهای ۱۰۰ و ۲۰- درجه سانتی‌گراد هیچ تفاوت معنی‌داری با اندازه هاله‌های ۲۵ درجه سانتی‌گراد ندارد ($p< 0.05$).

بحث

در این پژوهش جهت عصاره‌گیری از گیاه از حلال متانول استفاده شد. گرچه آب قطبی‌تر از متانول است اما ترکیبات موجود در عصاره‌های متانولی شبیه ترکیبات موجود در عصاره‌های آبی است با این مزیت که مرحله تبخیر حلال در مورد متانول آسان‌تر انجام می‌شود (Stankovi´c *et al.*, 2016). البته در این پژوهش به دلیل اهمیتی که عصاره‌های آبی دارند این عصاره نیز تهیه شد. عصاره‌های آبی هیچ سمیت بیولوژیکی برای مصرف کننده ندارند. همچنین تهیه این عصاره برای همه کس قابل انجام است چرا که آب حلالی است که به راحتی در دسترس است. در مرحله آخر پس از تبخیر متانول، عصاره باقیمانده در آب حل شد چرا که طبق گزارشات درصدهای بالای ۳ درصد از حلال متانول خواص میکروب کشی دارد (Wadhwani *et al.*, 2009) و این مانع از کسب نتیجه صحیح از خواص ضدمیکروبی عصاره گیاهی خواهد شد.

در روش انتشار چاهک ماده مؤثره ضدمیکروبی به درون آگار منتشر می‌شود و به این ترتیب غلظت ماده به تدریج از لبه چاهک به سمت خارج، کم‌تر می‌شود. در امتداد این شیب غلظت ایجاد شده تا جایی که غلظت ماده مؤثره، قدرت مهار رشد میکروب مورد نظر را داشته باشد، اجازه رشد در همان فاصله از لبه چاهک را نمی‌دهد و اصطلاحاً یک هاله عدم رشد ایجاد می‌کند. برای مواد با وزن مولکولی و حلال مشابه، هر چه این هاله عدم رشد بیش‌تر باشد قدرت میکروب کشی آن ماده بیش‌تر است. رنگ متفاوت و همچنین وزن متفاوتی که در عصاره‌های آبی و متانولی حاصل از گل ابریشم مصنوعی به دست آمد، می‌تواند ناشی از تفاوت در ترکیبات استخراج شده توسط حلال‌های مختلف باشد. این مساله می‌تواند توجیه‌کننده اختلاف بین نتایج حداقل غلظت کشنده و اندازه هاله‌ها باشد. به گونه‌ای که دقیقا یک رابطه مستقیم بین این دو مشاهده نمی‌شود و در تمام موارد هر چه اندازه هاله عدم رشد یک عصاره بیش‌تر است، حداقل غلظت کشنده کم‌تر نیست. چرا که در مورد ایجاد هاله عدم رشد، قدرت انتشار در آگار مطرح است. هر چه وزن مولکولی ترکیبی کوچک‌تر باشد قدرت انتشار بیش‌تری در آگار دارد به گونه‌ای که حتی یک ترکیب کشنده اگر نتواند در آگار منتشر شود بر میکروب بی‌اثر خواهد بود. اما در تعیین حداقل غلظت کشنده مساله انتشار و وزن مولکولی به آن اندازه اهمیتی ندارد چرا که ترکیب کاملا در مجاورت میکروب قرار می‌گیرد. همان‌گونه که در بخش‌های قبل اشاره گردید داروهای پیپراسیلین و نیستاتین به ترتیب با غلظت‌های ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، به عنوان کنترل مثبت استفاده شدند. این در حالی است که مثلا برای باکتری مقاومی مانند MRSA عصاره آبی این گیاه در غلظتی حدوداً معادل (۱۵/۱۲mg/ml) ۱۵۰۰۰ میکروگرم یعنی ۳۰۰ بار بزرگ‌تر از داروی خالص شاهد پیپراسیلین، کشنده است. این نتیجه نشانگر قدرت میکروب کشی قابل قبول این عصاره است. چرا که این عصاره به صورت عصاره خام

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-07-22]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.4.13.4]
[DOI: 10.29252/nbr.6.4.454]

جدول ۳- نتایج مربوط به پژوهش Dhaked و همکاران (2011).
Table 3. The research results of Dhaked *et al*., 2011.

Bacterial species	Zone of inhibition mean diameter in (cm)			MIC ((µg/ml)		
	Cephalosporin (µg/ml)	Aqueous CPF	Ethanolic CPF	Cephalosporin	Aqueous CPF	Ethanolic CPF
Escherichia coli	**15**	**17**	**19**	**18.9**	**16.7**	**15.5**
Bacillus subtilis	**13**	**15**	**16**	**22.4**	**15.7**	**14.4**
Staphylococcus aureus	**17**	**22**	**20**	**19.1**	**14.8**	**16.3**

مورد استفاده قرار گرفته است که حاوی مواد مختلف از جمله ماده ضدمیکروبی است. در حالی که داروهای شاهد به صورت خالص و تک جزئی است.

به منظور مقایسه قدرت میکروب کشی عصاره استخراجی از گیاه *E. gilliesii* هیچ مورد نزدیکی به دست نیامد. اما گزارشات محققین دیگری که روی خواص ضدمیکروبی عصاره‌های گونه‌های دیگر این درختچه کار کرده‌اند نیز نشانگر وجود فعالیت ضدمیکروبی این جنس است. محققین روی خواص ضدمیکروبی عصاره اتانولی میوه‌های خشک گونه *C. pulcherrima* تحقیق کردند و گزارش کردند که این عصاره بر طیف وسیعی از باکتری‌ها از جمله *E. coli*، *P. vulgaris*، *P. aeroginosa* و *S. aureus* مؤثر است (Sudhakar *et al*., 2006). خواص ضدباکتریایی عصاره متانولی ریشه گونه *C. pulcherrima* بررسی شده و نشان داده شد که این گونه دارای خواص ضدباکتریایی است (Prakash *et al*., 2009). محققان پس از استخراج عصاره متانولی دانه و میوه *C. pulcherrima*، به این نتیجه رسیدند که این گونه با داشتن خواص ضدمیکروبی علیه طیف وسیعی از باکتری‌های گرم مثبت، منفی و همچنین قارچ‌ها و همچنین به واسطه رنج پائین MIC (۱۲۵۰-۷۸ µg/ml)، دارای پتانسیل بسیار بالایی جهت استحصال ترکیبات ضدمیکروبی مفید است (Chanda *et al*., 2010).

روی خواص ضدمیکروبی بخش دیگری از گیاه *C. pulcherrima* کار شده است (Ogu *et al*., 2010). آن‌ها پس از استحصال عصاره آبی و اتانولی پوسته ساقه‌های این گیاه و تاثیر آن بر جدایه‌های کلینیکی مختلفی مانند *P. mirabilis*، *P. aeruginosa*، *S. aureus*، *E. coli*، *S. typhi* و *K. pneumonia* به این نتیجه رسیدند که عصاره پوسته ساقه این گیاه در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های تجاری مانند کلرامفنیکل و آمپی‌سیلین، فعالیت بهتر و بالاتری دارد و قابلیت استفاده در درمان عفونت‌های حاصل از جدایه‌های نامبرده را دارد. پژوهشگران پس از استخراج عصاره آبی و الکلی از گل گونه *C. pulcherrima* خواص ضدمیکروبی آنها را بررسی کردند و مشاهده شد که این عصاره‌ها بر باکتری‌های *S. aureus*، *E. coli* و *B. subtilis* موثر بودند (Dhaked *et al*., 2011). این نزدیک‌ترین مورد به پژوهش حاضر است. جدول ۳ نشان‌دهنده خلاصه‌ای از نتایج به دست آمده در پژوهش این پژوهشگران است. همان گونه که مشاهده می‌گردد عصاره‌های آبی و اتانولی گل‌های گونه *C. pulcherrima* در غلظت‌هایی بسیار کم‌تر از پژوهش حاضر بر سویه‌های استاندارد موثرند. پس از بررسی دقیق‌تر در روش کار و آنالیز نتایج این پژوهشگران این نتیجه به دست آمد که محاسبات و البته واحدهای اندازه‌گیری بسیار اشتباه هستند. به گونه‌ای که قطعا قطر هاله عدم رشد نمی‌تواند معادل ۲۰ سانتی‌متر برای یک گونه باشد. اما متاسفانه پژوهش نزدیک‌تری به پژوهش در دسترس نیست.

نتایج حاصل از تیمارهای دمایی مختلف بر اثر میکروب‌کشی عصاره‌های گل ابریشم مصری، نشان دهنده این بود که با توجه به بی اثر بودن دمای جوش بر فعالیت این عصاره می‌توان برای گرفتن عصاره و همچنین تبخیر حلال از دمای بالا نیز استفاده کرد که سبب تسریع بسیار زیاد عملکرد عصاره‌گیری خواهد شد. همچنین بی اثر بودن دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد بر فعالیت این عصاره‌ها نشانگر این است که می‌توان این عصاره‌ها را در این دما نگهداری و در زمان طولانی‌تری استفاده کرد یا روی آن‌ها آزمایش کرد.

نتیجه گیری

با توجه به آنچه که در بخش نتایج مشاهده شد عصاره‌های گل ابریشم مصری بر روی باکتری‌های مهمی مانند MRSA و *P. aeroginosa* که از جمله معضلات عمده بیماریزای امروزی هستند، مؤثر هستند. بنابراین می‌توان این گل را به عنوان منبع

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-07-22]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.4.13.4]
[DOI: 10.29252/nbr.6.4.454]

خوبی جهت استخراج ترکیبات ضدمیکروبی معرفی کرد. البته آنچه که در این پژوهش انجام شد مربوط به عصاره کلی از گل‌های ابریشم مصری است. قطعا به منظور جداسازی و شناسائی ترکیبات ضدمیکروبی موجود در این عصاره باید تحقیقات گسترده‌تری صورت پذیرد. نکته بسیار حائز اهمیت دیگر در مورد این گیاه این است که به هیچ عنوان برروی خواص ضدمیکروبی بخش‌های مختلف آن پژوهش نشده است و این می‌تواند بستری مناسب برای مطالعات آینده باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از گیاکده دانشگاه خوارزمی تشکر می‌نمایند.

REFERENCES

Balouiri, M., Sadiki, M. and Ibnsouda, S.K. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. – J. Pharm. Analysis 6: 71-79.

Chanda, S., Parekh, J., Baravalia, Y. and Parekh, S. 2010. Antimicrobial and antioxidant efficacy of various solvent extracts of seeds and fruits rind of *Caesalpinia pulchecrrima* Swartz. – Arch. Clin. Microbiol. 1: (4:5) doi: 10:3823/218.

CLSI. 2018. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 28th Edition, CLSI documents M02, M07, and M11. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA.

CLSI. 2012. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-second informational supplement. CLSI documents M100-S22. Vol 32, No 3, Replaces M100-S21. Vol 31, No 1. Clinical and laboratory standards institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA.

Dhaked, P.S., Kshirsagar, S.N. and Sakarar, D.M. 2011. Antimicrobial activity of ethanolic and aqueous extract of *Caesalpinia pulcherrima* flowers. – IJPSR 2: 2643-2646.

Frey, F. M. and Meyers, R. 2010. Antibacterial activity of traditional medicinal plants used by Haudenosaunee peoples of New York State .BMC Complement Altern. Med. 10: 64-74.

Ginovyan, M., Petrosyan, M. and Trchounian, A. 2017. Antimicrobial activity of some plant materials used in Armenian traditional medicine. – BMC Complementary Alternative Medicine 17: 50-59.

Link, J. H. F., Klotzsch. J. F. and Otto, C. F. 1844. Icones plantarum rariorum horti regii botannici berolinensis. Berlin.

Pirnia, M., Edalatian Dovom, M.R., Tabatabaee Yazdi, F. and Shahidi, F. 2014. The antibacterial effects of the aqueous and ethanolic extracts of cordiamyxa fruit on *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* and *Salmonella typhi*. – Qom Univ. Medl. Sci. J. 9: 39-48.

Prakash, S.B., Sharmistha, P. and Ravikumar, A. 2009. Antibacterial activity of methanolic extrac of roots of *Caesalpinia pulcherrima*. – Int. J. Chem. Sci. 7: 16-18.

Ogu, G., Ekeanyanwu, R. and Igborgbor, C. 2010. Phytochemical characteristics and *in vitro* antibacterial activity of *Caesalpinia pulcherrima* stem bark extracts against some clinical isolates. – IJONAS 6: 329-336.

Samir, M., Osman, S.M., Abd El-Khalik, S.M., El-Haddad, A.E. and Wink, M. 2015. A new steroidal compound (ß-sitosterol-3-O-butyl) isolated from *Caesalpinia gilliesii* flowers. – Inl. J. App. Res. Nat. Pro. 8: 14-19.

Sharafati-chaleshtori, R., Sharafati-chaleshtori, F., Sharafati-chaleshtori, A. and Ashrafi, K. 2010. Antimicrobial effects and evaluation of total phenols, flavonoids and flavonols contents of ethanolic extracts of *Scrophularia striata*. – J Shahrekord Univ. Medl. Sci. 11: 32-37.

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-07-22]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.4.13.4]
[DOI: 10.29252/nbr.6.4.454]

Sharma, A., Chandraker, S., Patel, V.K. and Ramteke, P. 2009. Antibacterial activity of medicinal plants against pathogens causing complicated urinary tract infections. – Indian J. Pharm. Sci. 71: 136-139.

Wadhwani, T., Desai, K., Patel, D., Lawani, D., Bahaley, P., Joshi, P. and Kothari, V. 2009. Effect of various solvents on bacterial growth in context of determining MIC of various antimicrobials. – Internet J. Microbiol. 7: 1-14.

Wangensteen, H., Diallo, D. and Paulsen, B.S. 2015. Medicinal plants from Mali: Chemistry and biology. – J. Ethnopharmacol. 176: 429-437.

West, A.M. Teska, P.J. Lineback, C.B. Oliver, H.F. 2018. Strain, disinfectant, concentration, and contact time quantitatively impact disinfectant efficacy. – Antimicrob. Resist. Infect. Control. 7: 49-55.

Stankovi, N., Mihajilov-Krstev, T., Zlatkovi, B., Stankov-Jovanovi, V., Miti, V., Jovi, J., ˇComi, L., Koci, B. and Bernstein, N. 2016. Antibacterial and antioxidant activity from of traditional medicinal plants the Balkan Peninsula. – J. Life Sci. 78: 21-28.

Srivastava, J., Chandra, H., Nautiyal, A. and Kalra, S. 2013. Antimicrobial resistance (AMR) and plant-derived antimicrobials (PDAms) as an alternative drug line to control infections. – Biotech. 4: 451-60.

Sudhakara, M., Rao, Ch.V., Rao, P.M., Rajua, D.B. and Venkateswarlu, Y. 2006. Antimicrobial activity of *Caesalpinia pulcherrima*, *Euphorbia hirta* and *Asystasia gangeticum.* – Fitoterapia 7: 378-380.

Tomova, I., Stoilova-Disheva, M., Lazarkevich, I. and Vasileva-Tonkova, E. 2015. Antimicrobial activity and resistance to heavy metals and antibiotics of heterotrophic bacteria isolated from sediment and soil samples collected from two Antarctic islands. – Front Life Sci. 8: 348-357.

*****

How to cite this article:

Tafakori, V. and Nasiri, N. 2020. Anti-microbial effects of aqueous and methanolic extracts of *Erythrostemon gilliesii*. – Nova Biol. Reperta 6: 454-463. (In Persian)

تفکری، و. و نصیری، ن. ۱۳۹۸. بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره متانولی و آبی گل ابریشم مصری. – یافته‌های نوین در علوم زیستی ۶: ۴۶۳-۴۵۴.

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-07-22]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.4.13.4]

[DOI: 10.29252/nbr.6.4.454]