Iranian Journal of Medical Microbiology | ISSN:2345-4342

Antimicrobial Activity of Aqueous and Alcoholic Extracts of Chamomile, Fleawort, Aquatic Pennyroyal and Nettle Plants on *Klebsiella pneumoniae* and Comparing Their Effects with Common Antibiotics

Fatemeh Azizi Alidoost[1], Masoumeh Anvari[1,*], Somayeh Ataei Jaliseh[1]

1. *Department of Biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran*

10.30699/ijmm.14.4.361

ABSTRACT

Background: In recent years, the use of medicinal plants has increased due to their lower side effects and costs compared to chemical drugs and patients' adaptation to these drugs. This study was performed to investigate the antibacterial effect of aqueous and alcoholic extract of four native medicinal plants of Gilan province against the bacterium *Klebsiella pneumoniae*.

Materials & Methods: In this study, plant species were collected from different areas of Gilan province and extraction was performed. The antibacterial effect of the extracts was investigated by the disc diffusion method. Then, using microdilution method, the minimum inhibitory concentration of bacterial growth was determined.

Results & Conclusion: The results showed that chamomile alcoholic extract with the maximum average halo diameter of 14 mm showed the best effect against *K. pneumoniae*. The bacterium showed resistance against the aqueous and alcoholic extracts of fleawort. Also, the ethanolic extracts of nettle and chamomile plants had the best antibacterial effect at 0.39 mg/ml. The minimum inhibitory concentration of aqueous extract of fleawort plant against *Klebsiella pneumoniae* was 12.5 mg/ml which was lower than other types of extracts. According to the results, these extracts can be used as antibacterial products in the pharmaceutical and food industries and in the treatment of infection symptoms.

Keywords: Antibacterial effect, Chamomile, Fleawort, Aquatic pennyroyal, Nettle, *Klebsiella pneumoniae*

Received: 2020/06/28; **Accepted**: 2020/07/07; **Published Online:** 2020/08/14

Corresponding Information: **Masoumeh Anvari,** Department of Biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran. Email: Anvari@iaurasht.ac.ir

Copyright © 2020, This is an original open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribution of the material just in noncommercial usages with proper citation.

Use your device to scan and read the article online

Azizi Alidoust F, Anvari M, Ataei Jaliseh S. Antimicrobial Activity of Aqueous and Alcoholic Extracts of Chamomile, Fleawort, Aquatic Pennyroyal and Nettle Plants on Klebsiella pneumoniae and Comparing Their Effects with Common Antibiotics. Iran J Med Microbiol. 2020; 14 (4) :361-373

Download citation: BibTeX | RIS | EndNote | Medlars | ProCite | Reference Manager | RefWorks

Send citation to: Mendeley Zotero RefWorks

Introduction

Consumption of medicinal plants for the treatment of ailments has a long history in human life. In recent years, the use of medicinal plants has increased due to lower side effects and costs compared to the chemical drugs with known side effects, and also for the patients' adaptation to these drugs.

Although a large proportion of medicines used today are chemical drugs, it is estimated that at least one-third of all medicinal products are of plant origin or have been modified after extraction from the plant **(1,2)**. Infectious diseases are among the most well-known diseases that have always plagued humans. Lots of efforts have been made to identify their causative agents to help for their treatment and control **(1,3)**.

Chemical drugs, with all their effectiveness, have many adverse effects, and there are fewer pure substances with no adverse effects. In contrast, the active ingredients in medicinal plants have a biological balance due to their association with other substances **(6,7)**.

Due to the fact that Gilan province has a wide range and unique plant diversity in terms of climatic conditions, especially in the case of medicinal species, research on the antimicrobial properties of plant species of this province provides a suitable background and treasure. This study was performed to investigate the antibacterial effect of aqueous and alcoholic extracts of four native medicinal plants of Guilan province (chamomile, fleawort, aquatic pennyroyal and nettle) against the bacterium *Klebsiella pneumoniae*.

Materials and Methods

Plants Identification and Collection

The species were collected from different areas of Gilan province between April to June 2015 and were identified in the herbarium of the Islamic Azad University of Rasht, Gilan, Iran. The parts needed were dried in the air, under shady and dry conditions, and then were ground to extract (Table 1).

Plants Extracts and Bacterial Strain

Ethanol Extract

Maceration method with 70% ethanol was used for ethanol extraction. Thirty gram of the powder of the plant samples was added into the beaker, and then 300 mL of 70% ethanol was added and mixed using a mixer. To extract, the above solution was placed on a shaker at 40°C for 24 hours. In this case, the powdered plant can absorb the solvent and the maximum amount of active ingredients will be dissolved in ethanol. After extraction, the solvent separation from the extract and drying was performed by lyophilization method in Gilan Science and Technology Park and then the weighted powder was dissolved in DMSO and used as an alcoholic extract **(8)**.

Table 1. Specifications of the studied plants

Scientific name of the plant	Plant	Family	Organ used
Anthemis austriaca	Chamomile	Asteraceae	Flower
Plantago major	Fleawort	Plantaginaceae	Leaf
Mentha equatica	Aquatic pennyroyal	Lamiaceace	Leaf
Urtica dioica	Nettle	Urticaceae	Leaf

Aquatic Extract

Distilled water (300 mL) was added to 30 gr of plant powder and placed on the shaker for 24 hours. The solution was passed through 0.45 µm filter to remove larger decanter particles. The resulting extract was dried by freeze dryer (Christ, Germany) and the resulting dry powder was dissolved in distilled water and used as an aqueous extract **(8)**.

Bacterial Strains Studied

The bacterium *Klebsiella pneumoniae* is among the most common bacteria in urinary tract infections **(9)**. It was isolated from clinical samples of the patients referred to Farabi Laboratory in Ardabil in 2014. This bacterium was characterized after growing on nutrient agar microbial culture media (Merck, Germany), using biochemical tests such as TSI, SIM, and MR VP citrate. It was sent to the Microbiology Department for anti-bacterial experiments of medicinal plants.

Dilution of Plant Extracts and Preparing Discs Containing Extracts

The aqueous and ethanolic extracts were dissolved in water and DMSO, respectively. The concentrations of 400 and 200 mg/mL were prepared for the aqueous and alcoholic extracts, respectively. Then, blank discs (Padtan Teb, Iran) were placed into the tubes containing the determined dilutions of the extracts. Following three to five minutes immersion, the discs were placed at 37°C to dry completely **(8)**.

Antibacterial Effect of Extracts

Disc Diffusion Method

First, the bacterial suspension of *Klebsiella pneumoniae* was prepared (0.5 McFarland comparable to a bacterial suspension of 1.5×10^8 cfu/mL). Then, uniform culture was performed with 100 µL of prepared suspension on the surface of nutrient agar medium (Christ, Germany).

The extracts-impregnated discs were then placed at a certain distance from the edge of the plate on the surface of the agar culture medium. The test was repeated three times. The diameter of the non-growth halo was finalized measuring the mean diameter after three repetitions **(10)**. The aura diameter of less than 8 mm growth was considered to be resistant, 8 to 9 mm was relatively resistant and more than 10 to 12 mm was considered to be relatively sensitive and more than 12 mm was considered as sensitive **(11)**.

Microdilution Broth

Using microdilution broth, the minimum inhibitory concentration (MIC) of the aqueous and alcoholic extracts of the studied plants was determined. One mL of 1.5×1^5 cfu/mL bacterial suspension was added to the 0.3-200 mg/mL aqueous extract and 0.1-100 mg/mL of alcohol extract. The optical density (OD) was measured at 680 nm wavelength using the ELISA reader (Update, Belgium).

The samples were then placed at 37°C, and the OD was re-read in periods of 12 and 24 hours. Finally, the minimum concentration of the extract in which the OD decreased was calculated. It was considered as MIC **(12)**.

Results & Discussion

In this study, the antimicrobial effect of aqueous and alcoholic extracts of *Anthemis austriaca*, *Plantago major*, *Mentha equatica* and *Urtica dioica* was evaluated and their effect was compared with common antibiotics. (Tables 2-4).

Table 2. MIC in µg/mL and the diameter of the inhibition zone in millimeters in terms of standard antibiotic discs of *Klebsiella pneumoniae* and result interpretations.

Row	Antibiotics	µg/mL	Disc diffusion	R	I	S
1	Amikasin	0.015	15	14<	16-15	17>
2	Ampicillin	-	-	13<	16-14	17>
3	Ceftazidime	1	12	17<	20-18	21>
4	Cefalotin	-	-	14<	17-15	18>
5	Co-trimoxazole	-	-	10<	15-11	16>
6	Ciprofloxacin	-	-	15<	20-16	21>
7	Gentamicin	-	-	12<	14-13	15>
8	Imipenem	0.007	25	19<	22-20	23>
9	Tetracycline	-	-	11<	14-12	15>
10	Cefixime	-	-	15<	18-16	19>

Table 3. Average diameter of inhibition zone in millimeters of plant extract against bacterium *Klebsiella pneumoniae*

Concentration mg/mL / Aqueous extracts	400	Concentration mg/mL / Alcoholic extracts	200
Anthemis austriaca	12	*Anthemis austriaca*	14
Plantago major	-	*Plantago major*	-
Mentha equatica	8	*Mentha equatica*	9
Urtica dioica	10	*Urtica dioica*	11
Composition of extracts	9	**Composition of extracts**	12

Table 4. The amount of MIC in mg/mL extract of medicinal plants against *Klebsiella pneumoniae*

Aqueous extracts	Concentration mg/mL	Alcoholic extracts	Concentration mg/mL
Anthemis austriaca	0/78	Anthemis austriaca	0.39
Plantago major	5/12	Plantago major	1.56
Mentha equatica	6.25	Mentha equatica	0.78
Urtica dioica	1.5	Urtica dioica	0.39
Composition of extracts	3.12	Composition of extracts	0.78

Among the four plant species studied, the highest inhibition zone diameter was observed for the ethanolic chamomile extract at concentrations of 200 mg/mL and14 mg/mL. However, the aqueous and alcoholic extract of the fleawort had no effect against the bacterium *Klebsiella pneumoniae*. Also, the alcoholic extract of the plants in the amount of 200 mg/mL showed the best antimicrobial efficacy. The lowest antimicrobial effect was assessed for the fleawort (Table 3).

Also, the aqueous and alcoholic extracts of chamomile in the concentration of 0/39 and 0/78 mg/mL showed the lowest inhibitory concentration. The results of this study were consistent with the results of Ataei **(16)**, Dadgar **(13)**, NuriZadeh's **(14)** research outcome.

The results of MIC showed that the ethanolic extract of these plants, even at much lower concentrations, could inhibit the growth of the bacterium *Klebsiella pneumoniae*. So that, the lowest inhibitory concentrations of chamomile

and nettle plants was 0.39 mg/mL. The ethanolic extracts of other plants had also very good effect in their low concentrations (Table 4).

The aqueous and alcoholic extracts of fleawort in 400 and 200 mg/mL concentrations did not develop any inhibition zone against the bacterium *Klebsiella pneumoniae*. It was found that the MICs of aqueous and alcoholic extracts of fleawort had an inhibitory effect at 12.5 and 1.56 mg/mL concentrations, respectively. The results obtained for the aqueous and alcoholic extracts of fleawort MIC were consistent with the study of Kiai **(17)** *et al.* However, the non-inhibitory concentration of *Klebsiella pneumoniae* was lower than that of the present study. Our results were not consistent with the Chiang study in 2002 and the Eshraghi study **(18)**. This can be due to the type of species and habitat of the plant as the habitat and climate of the plant is effective in the concentration of the active ingredients of the plant **(21)**.

We showed that antibacterial effect of the aqueous and alcoholic extracts of aquatic pennyroyal at concentrations of 400 and 200 mg/mL, made an inhibition zone with a diameter of 8 and 9 mL. The results were consistent with Eshraghi **(18)** and NuriZadeh **(14)** studies in terms of antimicrobial effect but different regarding the diameter of the inhibition zone, which can be attributed to the differences in the type of species studied and the concentration of the extract and the type of solvent used **(23)**. In the MIC results of this study, it was found aqueous and alcoholic extracts with the concentrations of 6.25 and 0.78 mg/mL have a minimum inhibitory concentration against *Klebsiella*. The results of the present study were almost similar to those of the Pajouhi **(24)** study, but the minimum inhibitory concentration of peppermint was lower in their study, which can be attributed to the differences in the type of strains studied.

In the present study, it was found that aqueous and alcoholic extracts of nettle at concentrations of 400 and 200 mg/mL, created halos of 10 and 11 mm against *Klebsiella pneumoniae*, respectively. Also, aqueous and alcoholic extracts of nettle against *Klebsiella pneumoniae* in the present study showed minimum inhibitory concentrations at 1/5 and 0/39 mg/mL. This is consistent with the study of Shariat **(26)** and Jafari **(27)**, but the amount of MIC in their research is higher, and this discrepancy can be attributed to the type of species studied.

From the 10 antibiotics used, three, including amikacin, ceftazidime, and imipenem had the greatest inhibitory effect on the bacterium *Klebsiella pneumoniae*. Other antibiotics showed fewer inhibitory effects on this bacterium (Table 2). Comparing the results in Tables 2, 3, and 4 shows the suitability of the studied plants and standard antibiotics for their anti-bacterial effects. Comparing the inhibition zones of the extracts of the studied medicinal plants with a certain concentration was clarified by the diffusion disc method (Table 3).

These results showed the antibacterial effects of the above medicinal plants crude extracts, which is a mixture of the active ingredients. The active ingredients with antimicrobial effect in these extracts should be isolated and purified. They may have better effects compared to antibiotics. Although the present results are laboratory-based, it seems that these findings are justifiable and can be generalized to in vivo experiments and it is useful for further examination on laboratory animals.

Conclusion

The results of this study showed the optimal effect of aqueous and ethanolic extracts of the studied plants (chamomile, fleawort, aquatic pennyroyal and nettle) against *Klebsiella pneumoniae*. The outcome of this study is important due to the fact that medicinal plants are more compatible with the body, their natural nature, fewer side effects and lower chance in antibiotic resistance. In continue the active ingredients of the extracts with antimicrobial properties can be extracted and their antibacterial effects and clinical conditions can be investigated in vivo.

Acknowledgment

The authors thank all those who helped them writing this article.

Conflict of Interest

Authors declared no conflict of interests.

مقاله کوتاه

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۴ ـ شماره ۴ ـ مرداد و شهریور ۱۳۹۹

Journal homepage: www.ijmm.ir

اثر ضد میکروبی عصاره‌های آبی و الکلی گیاهان بابونه، بارهنگ، پونه آبی و گزنه بر باکتری *کلبسیلا پنومونیه* و مقایسه اثر آنها با آنتی‌بیوتیک‌های رایج

فاطمه عزیزی علیدوست [۱]، معصومه انوری [۱*]، سمیه عطائی جلیسه [۱]

۱. گروه زیست شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچهٔ مقاله

دریافت: ۱۳۹۹/۰۴/۰۸

پذیرش:۱۳۹۹/۰۴/۱۷

انتشار آنلاین: ۱۳۹۹/۰۵/۲۴

موضوع: مواد ضد میکروبی

نویسندهٔ مسئول:

معصومه انواری، گروه زیست شناسی ، واحد رشت ، دانشگاه آزاد اسلامی ، رشت ، ایران.

ایمیل: Anvari@iaurasht.ac.ir

چکیده

زمینه و اهداف: در سال‌های اخیر کاربرد گیاهان دارویی باتوجه به عوارض و هزینه کمتر نسبت به داروهای شیمیایی و سازگاری بیماران به این داروها افزایش یافته است. این تحقیق به منظور بررسی اثر ضدباکتریایی عصاره آبی والکلی (اتانولی) چهارگونه از گیاهان دارویی بومی استان گیلان علیه باکتری *کلبسیلا پنومونیه* انجام شده است.

مواد و روش کار: در این تحقیق گونه هایی گیاهی از نواحی مختلف استان گیلان جمع آوری شدند و عصاره گیری انجام شد. بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره ها به روش دیسک دیفیوژن و اندازه‌گیری میانگین قطر هاله عدم رشد صورت گرفت. سپس با استفاده از روش میکرودایلوشن براث حداقل غلظت بازدارندگی از رشد باکتری ها تعیین شد.

یافته‌ها و نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که عصاره الکلی بابونه با حداکثر میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۴ میلی‌متر علیه *کلبسیلا پنومونیه* بهترین اثر را نشان داد. باکتری مورد نظر نسبت به عصاره گیاهان بارهنگ آبی و الکلی مقاومت نشان داد و همچنین عصاره اتانولی گیاهان گزنه و بابونه در مقادیر۰/۳۹میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بهترین اثر ضد باکتریایی را داشت. حداقل غلظت بازدارنگی از رشد عصاره گیاه بارهنگ آبی علیه *کلبسیلا پنومونیه* ۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و پایین تر از سایر انواع عصاره ها بود. با توجه به نتایج می توان این عصاره ها را در فرآورده های ضدمیکروبی در صنایع داروسازی و غذایی و در درمان علایم عفونت به کار گرفت.

کلید واژه‌ها: اثر ضدباکتریایی، بابونه، بارهنگ، پونه آبی، گزنه، *کلبسیلا پنومونیه*

کپی‌رایت © مجله میکروب شناسی پزشکی ایران: دسترسی آزاد؛ کپی برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیرتجاری با ذکر منبع آزاد است.

مقدمه

مصرف گیاهان دارویی برای درمان، سابقه‌ای به قدمت عمر انسان دارد. در سال های اخیر کاربرد گیاهان دارویی با توجه به عوارض و هزینه کمتر و سازگاری بیماران به این داروها به لحاظ وجود اثرات جانبی شناخته شده برای داروهای شیمیایی، افزایش یافته است. گرچه امروزه بخش عظیمی از داروهای مصرفی شیمیایی هستند، تخمین زده شده که دست کم یک سوم تمامی فراورده‌های دارویی منشا گیاهی داشته و یا پس از استخراج از گیاه تغییر شکل یافته اند (۲،۱). بیماری های عفونی در زمره شناخته شده ترین بیماری‌هایی هستند که همواره گریبان‌گیر انسان بوده و تلاش های زیادی برای شناخت عوامل ایجاد کننده، درمان و کنترل آنها صورت گرفته است (۱،۳).

استفاده از آنتی بیوتیک‌ها، هسته اصلی درمان عفونت‌های باکتریایی را تشکیل می دهد ولی به دلیل افزایش روز افزون مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری ها و وجود عوارض جانبی داروها ،کاربرد روش های کمکی از جمله استفاده از گیاهان داروئی برای درمان اهمیت ویژه ای پیدا نموده است (۴،۵).

مطالعات انجام شده در دنیا بیانگر آن است که عصاره بسیاری از گیاهان توانایی مهار رشد میکروارگانیسم ها را دارد و به این لحاظ گیاهان به عنوان عوامل ضد میکروبی کاربردهای زیادی پیدا نموده اند. داروهای شیمیایی با تمام کارایی، اثرات نامطلوب فراوانی به همراه دارند و کمتر ماده خالصی وجود دارد که دارای اثرات سوء نباشد. در مقابل مواد موثر موجود در گیاهان

داروئی به دلیل همراه بودن با مواد دیگر پیوسته از یک حالت تعادل بیولوژیک برخوردارند (۶،۷).

با توجه به اینکه استان گیلان به لحاظ شرایط اقلیمی از تنوع گیاهی وسیع و منحصر به فرد مخصوصا در مورد گونه های داروئی برخوردار است، تحقیقات مورد بررسی خواص ضد میکروبی گونه ها، زمینه مناسبی را فراهم می نماید. که نتایج این بررسی ها جهت جایگزین نمودن داروهای موثر، با منشا طبیعی و کم خطر برای کنترل و درمان عفونت های باکتریایی استفاده شود و می‌تواند موجب کاهش مصرف داروهای شیمیایی و بروز عوارض ناشی از آنها شود. نظر به اینکه مردم بومی استان گیلان از دیر باز از گیاهان در کنترل و درمان بیماری ها به خصوص عفونت ها استفاده نموده اند، لذا انجام این تحقیق به منظور ارزیابی تاثیر عصاره آبی و اتانولی گونه های دارویی بابونه، بارهنگ، پونه آبی و گزنه علیه باکتری *کلبسیلا پنومونیه* بود.

روش پژوهش

شناسایی وجمع آوری گیاهان

گونه های مورد نظر در فاصله اسفند ماه ۹۳ تا بهار ۹۴ از نواحی مختلف استان گیلان جمع آوری و در هرباریوم دانشگاه آزاد اسلامی رشت شناسایی شدند. اندام های مورد نیاز در مجاورت هوا، تحت شرایط سایه وخشک، برای عصاره گیری آسیاب شدند (جدول ۱).

جدول ۱. مشخصات گیاهان مورد بررسی

نام علمی گیاه	نام فارسی	تیره	اندام مورد استفاده
Anthemis austriaca	بابونه	Asteraceae	گل
Plantago major	بارهنگ	Plantaginaceae	برگ
Mentha equatica	پونه آبی	Lamiaceace	برگ
Urtica dioica	گزنه	Urticaceae	برگ

آماده سازی عصاره‌های آبی و الکلی گیاهان

عصاره اتانولی

در این تحقیق از اتانول ۷۰ درجه و روش ماسراسیون استفاده شد. بدین ترتیب که ۳۰ گرم از پودر نمونه های گیاهی مورد نظر را داخل بشر ریخته، سپس به آن ۳۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درجه افزوده شد و با استفاده از همزن، مخلوط همگن شد. برای عصاره گیری محلول فوق را به مدت ۲۴ ساعت در شیکر با دمای ۴۰درجه قرار داده شد. در این حالت گیاه پودر شده می‌تواند حلال را در خود جذب نماید و حداکثر مواد موثره در اتانول حل خواهد شد. پس از عصاره گیری، عمل جدا سازی حلال از عصاره و خشک نمودن آن توسط روش لیوفیلیزاسیون در پارک علم و فن‌آوری استان گیلان انجام شد و سپس پودر حاصل از توزین در DMSO حل گردید و به عنوان عصاره الکلی استفاده شد (۸).

عصاره آبی

۳۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به ۳۰ گرم پودر گیاه اضافه گردید و به مدت ۲۴ ساعت بر روی شیکر قرار گرفت محلول مورد نظر جهت حذف ذرات بزرگتر دکانته و ذرات کوچک تر با عبور از صافی غشائی ۰/۴۵pmحذف گردیدند. عصاره حاصل توسط دستگاه فریزدرایر(کریست، آلمان) خشک شد و پودر خشک حاصل پس از توزین در آب مقطر حل گردیده و به عنوان عصاره آبی استفاده شد (۸).

سویه باکتری مورد بررسی

در این تحقیق باکتری مورد آزمون *کلبسیلا پنومونیه* از جمله باکتری های شایع عفونت ادراری که از نمونه های بالینی بیماران مراجعه کننده به آزمایشگاه فارابی اردبیل در سال ۹۳ جدا شده است. این باکتری پس از کشت روی محیط های کشت میکروبی نوترینت آگار (مرک، آلمان)، با کمک رنگ آمیزی گرم و انجام آزمون های بیوشیمیایی از قبیل TSI,SIM,MR VP سیترات شناسایی و به بخش میکروب‌شناسی جهت بررسی اثر ضدباکتریایی گیاهان دارویی مورد مطالعه، انتقال یافت.

رقیق سازی عصاره گیاهان و تهیه دیسک های حاوی عصاره

هر یک از عصاره‌های آبی با آب و عصاره‌های الکلی (اتانولی) درDMSO رقیق شدند و علاوه بر عصاره خالص، غلظت ۴۰۰میلی‌گرم برمیلی‌لیتر برای عصاره‌های آبی و غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای عصاره‌های الکلی تهیه شد. سپس جهت تهیه دیسک های حاوی عصاره از دیسک های بلانک (پادتن طب، ایران) استفاده شد بدین ترتیب که دیسک های بلانک در لوله های حاوی رقت های تعیین شده عصاره قرار دادهشد و بعد از مدت سه تا

پنج دقیقه پس از جذب کامل، دیسک ها در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس قرار گرفت تا کاملا خشک شده وجهت دیسک گذاری آماده شدند (۸).

بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره ها

روش دیسک دیفیوژن

ابتدا از باکتری مورد آزمون سوسپانسیون میکروبی معادل ۰/۵ مک فارلند $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ cfu/ml تهیه شد و سپس با ۱۰۰میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه شده بر سطح محیط نوترینت آگار (کریست، آلمان) کشت یکنواخت انجام شد. آنگاه دیسک های بلانک استریل حاوی رقت های معین عصاره، با فاصله معین از لبه پلیت بر روی سطح محیط کشت آگار قرار داده شدند پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شده و نتایج اثر ضد باکتریایی با اندازه گیری قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک ها ثبت شده برای حصول اطمینان، این آزمایش برای باکتری *کلبسیلا پنومونیه* سه بار تکرار شد. میانگین قطر هاله عدم رشد در سه بار تکرار به عنوان قطر نهایی ثبت شد (۹). قطر هاله عدم رشد کمتر از ۸ میلی متر به عنوان مقاوم ، ۸ تا ۹ میلی متر نسبتا مقاوم و بیشتر از ۱۰تا ۱۲ میلی متر نسبتا حساس وبیشتر از ۱۲ میلیمتر بعنوان حساس در نظر گرفته شد (۱۰).

میکرو دایلوشن براث

در این روش حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) از رشد، عصاره آبی و الکلی گیاهان مورد مطالعه تعیین شد. بدین ترتیب یک سی سی از سوسپانسیون $۱/۵ \times ۱۰^{۵}$ cfu/ml باکتری *کلبسیلا پنومونیه* را به غلظت های مختلف، عصاره آبی ۲۰۰- ۰/۳میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و عصاره الکلی ۱۰۰-۰/۱میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اضافه شدو بلافاصله OD را با استفاده از دستگاه الایزا در طول موج ۶۸۰nm خوانده و سپس نمونه را در ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفت و مجددا OD آن را در بازه های زمانی ۱۲و۲۴ قرائت شد. ودر نهایت حداقل غلظتی از عصاره که کاهش OD در آن مشاهده می شد. به عنوان MIC در نظر گرفته شد (۱۱).

یافته‌ها و بحث

در این تحقیق اثر ضد میکروبی عصاره آبی و الکلی *Anthemis austriaca* ، *Plantago major*، *Mentha equatica* و *Urtica dioica* و مقایسه اثر ضد میکروبی آنها با آنتی‌بیوتیک‌های رایج بر روی سویه بالینی *کلبسیلا پنومونیه* آزمایش شد. نتایج آنها در جداول ۲ تا ۴ آورده شده است.

جدول ۲. MIC بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ومیانگین قطر هاله عدم رشد بر حسب mm دیسک های آنتی بیوتیک استاندارد بر *کلبسیلا پنومونیه* و تفسیر نتایج

ردیف	نام آنتی بیوتیک	MIC	دیسک دیفیوژن	R	I	S
۱	آمیکاسین	۰/۰۱۵	۱۵	<۱۴	۱۵-۱۶	>۱۷
۲	آمپی سیلین	-	-	<۱۳	۱۴-۱۶	>۱۷
۳	سفتازیدیم	۱	۱۲	<۱۷	۱۸-۲۰	>۲۱
۴	سفالوتین	-	-	<۱۴	۱۵-۱۷	>۱۸
۵	کوتریموکسازول	-	-	<۱۰	۱۱-۱۵	>۱۶
۶	سیپروفلوکساسین	-	-	<۱۵	۱۶-۲۰	>۲۱
۷	جنتامایسین	-	-	<۱۲	۱۳-۱۴	>۱۵
۸	ایمی پنم	۰/۰۰۷	۲۵	<۱۹	۲۰-۲۲	>۲۳
۹	تتراسایکلین	-	-	<۱۱	۱۲-۱۴	>۱۵
۱۰	سیفیکسیم	-	-	<۱۵	۱۶-۱۸	>۱۹

جدول ۳. میانگین قطر هاله عدم رشد بر حسب mm عصاره گیاهان علیه باکتری *کلبسیلا پنومونیه*

عصاره‌های آبی با غلظت ۴۰۰ mg/ml	قطر هاله عدم رشد	عصاره‌های الکلی با غلظت ۲۰۰ mg/ml	قطر عاله عدم رشد
Anthemis austriaca	۱۲	*Anthemis austriaca*	۱۴
Plantago major	-	*Plantago major*	-
Mentha equatica	۸	*Mentha equatica*	۹
Urtica dioica	۱۰	*Urtica dioica*	۱۱
ترکیب عصاره ها	۹	ترکیب عصاره ها	۱۲

جدول ۴. مقدار MIC بر حسب mg/ml عصاره گیاهان داروئی علیه *کلبسیلا پنومونیه*

عصاره‌های آبی	غلظت mg/ml	عصاره‌های الکلی	غلظت mg/ml
Anthemis austriaca	۷/۸	*Anthemis austriaca*	۰/۳۹
Plantago major	۱۲/ ۵	*Plantago major*	۱/۵۶
Mentha equatica	۶/۲۵	*Mentha equatica*	۰/۷۸
Urtica dioica	۱/۵	*Urtica dioica*	۰/۳۹
ترکیب عصاره ها	۳/۱۲	ترکیب عصاره ها	۰/۷۸

در میان ۴ گونه گیاه مورد بررسی، بیشترین مقدار قطر هاله عدم رشد مربوط به غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره اتانولی بابونه، ۱۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. در حالی که عصاره آبی و الکلی بارهنگ تاثیری علیه باکتری *کلبسیلا پنومونیه* نداشت. همچنین عصاره الکلی گیاهان در مقادیر ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بهترین اثر ضد میکروبی را نشان دادند. کمترین اثر ضد میکروبی مربوط به گیاه بارهنگ ارزیابی شد (جدول ۳).

در بررسی انجام شده Dadgar و همکاران در سال ۲۰۰۶، روی اثر ضد باکتریایی بابونه علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم و حساس به متی سیلین مشخص گردید که عصاره الکلی بابونه در غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم به ترتیب هاله عدم رشد علیه MRSA به اندازه ۰، ۰، ۰ و ۸/۸ میلی‌متر و قطر هاله عدم رشد در غلظت های فوق علیه سویه MSSA به ترتیب ۰ ، ۰ ، ۸/۶ ، ۱۰/۶ میلی‌متر ایجاد گردید (۱۲). بر اساس مطالعات NuriZadeh و همکاران در سال ۲۰۰۴، عصاره‌های آبی و الکلی بابونه بر روی *هلیکوباکتر پیلوری* اثر ضد باکتریایی داشت (۱۳). در سال ۲۰۰۶، نتایج بررسی Jalali و همکاران عصاره هیدروالکلی گیاه بابونه بر رشد *لیستر یا مونوسیتوژنز*، هیچگونه اثر مهاری نشان نداد (۱۴). Ataeiو همکاران در سال ۲۰۰۴، تاثیر عصاره‌های هیدروالکلی سه گونه گیاه از جمله بابونه را برروی باکتری های شایع دهانی بررسی نمودند. نتایج نشان داد عصاره هیدروالکلی بابونه بر همه باکتری ها موثر است (۱۵). نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که عصاره‌های آبی و الکلی بابونه به ترتیب در غلظت ۴۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر علیه *کلبسیلا پنومونیه* دارای اثر ضد باکتریایی می باشند. قطر هاله عدم رشد آنها به ترتیب ۱۲ و ۱۴ میلی متر اندازه گیری شد.

همچنین عصاره آبی و الکلی گیاه بابونه در غلظت ۰/۵۶ و ۰/۲۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دارای حداقل غلظت مهارکنندگی می باشند. نتایج این مطالعه با نتایج تحقیق Ataei، NuriZadeh Dadgar مطابقت دارد. اما با نتایج Jalali و همکاران مغایرت نشان می دهد که دلیل این مغایرت می تواند ناشی از نوع سوش مورد بررسی و یا میزان غلظت مورد استفاده عصاره گیاهی باشد. در بررسی صورت گرفته توسط Kiaiو همکاران در سال ۱۹۹۹، روی تاثیر عصاره اتانولی ۷ گیاه دارویی از جمله بارهنگ علیه باکتری های عامل عفونت های ادراری انجام گرفت مشخص شد که *کلبسیلا پنومونیه* نسبت به تمام عصاره‌های مورد بررسی و همچنین عصاره اتانولی بارهنگ علیه باکتری فوق در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر می باشد (۱۶).

نتایج MIC نشان داد که عصاره اتانولی این گیاهان حتی در غلظت های بسیار پایین تر اثر ممانعت از رشد باکتری *کلبسیلا پنومونیه* را دارا است. به طوری که کمترین غلظت ممانعت کننده از رشد گیاهان بابونه و گزنه در غلظت ۰/۳۹میلی‌گرم بر میلی‌لیتر می باشد. و عصاره اتانولی سایر گیاهان نیز تاثیر بسیار خوبی در غلظت های پایین داشتند (جدول ۴). نتایج بدست آمده از بررسی Eshraghiو همکاران در سال ۲۰۰۹، که برروی اثرات ضد باکتریایی ۱۰گونه گیاهی از جمله بارهنگ علیه سوش های نوکاردیا انجام گرفت بارهنگ اثر ضد میکروبی مشخص ازخود نشان نداد (۱۷). نتایج بدست آمده از بررسی Chiang در سال ۲۰۰۲ نشان داد، عصاره اتانولی بارهنگ به همراه چند گیاه دیگر علیه تعدادی از باکتری های گرم منفی از جمله *سودموناس آئروزینوزا، اشرشیاکلی، پروتئوس میرابیلیس، سیتروباکتر، انتروباکتر* و باکتری های گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس، میکروکوکوس لوتئوس* موثرواقع شده که بیشترین اثر علیه باکتری *استافیلوکوکوس* بوده است (۱۸). حال آنکه دربررسی اثر ضد باکتریایی ۱۷۲ گونه گیاهی منطقه پیرتوریکو در آلمان علیه ۱۷ سویه باکتری های گرم مثبت و گرم منفی دریافتند که گیاه بارهنگ نتوانست از رشد هیچ یک از باکتری های مورد بررسی جلوگیری نماید و همه سویه های باکتریایی نسبت به آن مقاوم بودند (۱۹).

در مطالعه حاضر عصاره آبی و الکلی بارهنگ در غلظت ۴۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر علیه باکتری *کلبسیلا پنومونیه* هیچ گونه هاله ی رشدی ایجاد نگردید. همچنین در این مطالعه مشخص گردید که MIC عصاره‌های آبی و الکلی بارهنگ به ترتیب در غلظت ۱۲/۵ و۱/۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر علیه *کلبسیلا* دارای اثر مهارکنندگی است. نتایج مطالعه حاضر از نظر حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره آبی و الکلی بارهنگ با مطالعه Kiaiو همکاران همخوانی دارد. ولی غلظت مهارکنندگی از رشد *کلبسیلا پنومونیه* در مطالعه حاضر کمتر بوده است. مطالعه حاضر با مطالعه Chiang در سال ۲۰۰۲ مطابق و با مطالعه Eshraghi مطابقت ندارد. که

این مساله می تواند به علت نوع سوش و زیستگاه گیاه باشد زیرا زیستگاه و آب و هوای گیاه در میزان غلظت مواد مؤثره گیاه مؤثر است.

در مطالعه ای که توسط Eshraghi و همکارانش در سال ۲۰۰۷، بر روی اثرات ضد باکتریایی و فیتوشیمیایی عصاره تام ۱۲ گونه از گیاهان بومی ایران از جمله پونه بر علیه سوش های بیماری زای نوکاردیا انجام گرفت مشخص گردید که عصاره اتانولی پونه در غلظت های مختلف ۲/۵، ۵، ۷/۵و ۱۰ گرم بر ۱۰۰ میلی متر علیه *نوکاردیا سیلینوس* در غلظت های فوق هاله ای به اندازه ۱۱/۹، ۱۲/۷ ، ۱۲/۵ ، ۱۸/۱ میلی متر ایجاد گردید (۱۷). در مطالعه دیگری که توسط NuriZadeh و همکارانش در سال ۲۰۰۴، با موضوع تاثیر ضد باکتریایی عصاره‌های آبی و الکلی پونه علیه ۸ سویه *هلیکوباکتر پیلوری* انجام گرفت قطر هاله عدم رشد عصاره‌های آبی و الکلی پونه در روش دیسک دیفیوژن در غلظت ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر علیه هلیکوباکتر پیلوری به ترتیب ۸ و ۷/۵ میلی‌لیتر بود (۱۳). بر اساس مطالعات Judi و همکاران در سال ۲۰۰۴، با موضوع خواص ضد میکروبی ترکیبات شیمیایی مهم عصاره و اسانس پونه انجام گرفت حداقل غلظت مهارکنندگی گیاه پونه در ۲۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر علیه استاف و در غلظت ۴۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر علیه *کلبسیلا* مشخص گردید (۲۰).

در نتایج مطالعه حاضر مشخص گردید که عصاره آبی و الکلی پونه آبی در غلظت های ۴۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیترهاله ای به اندازه ۸ و ۹ میلی‌لیتر ایجاد کردند که نتایج این تحقیق از نظر اثر ضد میکروبی پونه با نتایج Rahnama و Eshraghi و NuriZadeh مطابقت دارد ولی از نظر مقدار قطر هاله ایجاد شده متفاوت است که می توان آن را به تفاوت در نوع سوش مورد بررسی و میزان غلظت عصاره و نوع حلال مورد استفاده نسبت داد. درنتایج MIC این مطالعه مشخص گردید که عصاره آبی و الکلی پونه در غلظت ۶/۲۵ و ۰/۷۸ دارای حداقل غلظت بازدارندگی علیه *کلبسیلا* می باشد. که نتایج مطالعه حاضر با مطالعه Pajouhiتقریبا یکسان است ولی حداقل غلظت مهارکنندگی پونه در تحقیق آنها کمتر است که می توان به تفاوت در نوع سوش های مورد بررسی نسبت داد.

بررسی انجام شده توسط Modarrssiو همکارانش در سال ۲۰۱۳، تاثیر عصاره الکلی گزنه علیه *کلبسیلا* در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر هاله ای کمتر از ۹ میلی متر ایجاد می کند (۲۱). در تحقیقی دیگر که توسط Kiaiو همکاران در سال۲۰۰۹، انجام گرفت مشخص شد که عصاره اتانولی گزنه در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر علیه باکتری *کلبسیلا* هاله ای به اندازه ۹/۵ میلی متراجاد کرد (۱۶). Shariatو همکاران در سال ۲۰۱۲تاثیر عصاره آبی گیاه گزنه را بر روی باکتری های *سالمونلا تیفی*، *اشرشیاکلی* و *سودوموناس آئروزینوزا* بررسی نمودند نتایج نشان داد که عصاره آبی گزنه بر هر سه باکتری پاتوزن فوق به ترتیب در غلظت ۲/۱،۵/۲۵ و ۵/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر موثر است (۲۲).

بر اساس مطالعات Jafari و همکارانش در سال۲۰۱۲، بر روی خواص ضد باکتریایی عصاره بخش های مختلف گیاه گزنه علیه باکتری های *سودوموناس آئروزینوزا*، *باسیلوس سوبتلیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اکلای* انجام گرفت مشخص گردید که عصاره‌های اتانولی بذر گزنه بیشترین اثر ضدباکتریایی را بر روی باکتری های گرم مثبت و عصاره برگ گیاه مذکور بر باکتری های گرم منفی بیشترین اثر بازدارندگی را دارد (۲۳).

نتایج تحقیق presto در سال ۲۰۰۶ نشان داد عصاره متانولی گزنه بر باکتری های *باسیلوس سرئوس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا مونوسیتوزنز* اثر ضد میکروبی قوی دارد (۲۴). Kavalali در سال ۲۰۰۳ تاثیر عصاره اتانولی گزنه را بر روی باکتری های *سودوموناس آئروزینوزا*، *سالمونلا*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیا کلی* بررسی نمودند نتایج نشان داد عصاره اتانولی گزنه بر همه باکتری های مذکور موثر است (۱۹).

در تحقیق حاضر مشخص گردید که عصاره‌های آبی و الکلی گزنه در غلظت های ۴۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ترتیب هاله های به اندازه ۱۰ و ۱۱ میلی متر علیه *کلبسیلا پنومونیه* ایجاد کردند نتایج حاضر با نتایج Modarrssiو Kiai و presto و kavalali مطابقت دارد. همچنین عصاره آبی و الکلی گزنه علیه *کلبسیلا پنومونیه* در مطالعه حاضر در غلظت ۳/۱۲ و۰/۲۸ میلیگرم بر میلی‌لیتر دارای حداقل غلظت مهارکنندگی از رشد می باشد. که با مطالعه جعفری و شریعت مطابقت دارد ولی مقدار MIC در تحقیق آنها بیشتر است که این عدم تطابق را می توان به نوع سوش مورد مطالعه نسبت داد.

از بین ۱۰نوع آنتی بیوتیک به کار رفته،سه نوع شامل آمیکاسین، سفتازیدیم و ایمی‌پنم حداکثر اثر مهارکنندگی را برباکتری *کلبسیلا پنومونیه* نشان دادند. سایر آنتی بیوتیک ها آثرات مهار کنندگی کمتری بر باکتری *کلبسیلا پنومونیه* نشان دادند (جدول شماره۲) مقایسه نتایج مندرج در جدول های ۳و ۲ و ۴ تناسب تاثیر گیاهان مورد مطالعه و آنتی بیوتیک های استانداردرا به خوبی نشان می دهد. با مقایسه هاله عدم رشد عصاره گیاهان داروئی مورد مطالعه با غلظت معین به روش دیسک دیفیوژن (جدول شماره ۳) روشن میگردد که اثرات مهارکنندگی عصاره این گیاهان ،با آنتی بیوتیک های آمیکاسین، سفتازیدیم و ایمی‌پنم بر باکتری مورد مطالعه برابری نمی نماید با توجه به این نتایج به نظر می رسد اثرات ضدباکتریایی گیاهان دارویی فوق بصورت تام که مخلوطی از مواد موثره عصاره اتانولی و آبی گیاهان مورد مطالعه می باشد. بسیار کمتر از آنتی بیوتیک های رایج است. و اگر ترکیبات موثره دارای اثر ضد میکروبی موجود در این عصاره ها جدا سازی و خالص گردد اثر بهتری در مقایسه با آنتی بیوتیک ها خواهد داشت اگر چه تجربه

حاضر آزمایشگاهی است لیکن به دلیل نتایج قاطع به دست آمده به نظر می رسد این یافته ها زمینه بسیار مناسبی برای بررسی های بیشتر به صورت درون موجودی روی حیوانات آزمایشگاهی است.

به طور کلی ترکیبات گیاهی خاصیت ضد میکروبی خود را از طریق سازوکار هایی چون تجزیه دیواره سلولی، افزایش اسیددیته سیتوزولی، آسیب به غشای سلولی، آسیب به غشای پروتئین ها، نشت محتویات سلول به خارج، اختلال در نقل و انتقال پروتون واختلال در فعالیت آنزیم های حیاتی نظیر ATPase و جلوگیری از متابولیسم باکتری اعمال می کنند (۲۲) بنابراین با توجه به اثرات بیوشیمیایی این مواد و به علت در دسترس بودن این گیاهان با حجم زیاد در آینده با جدا کردن اجزای موثر می توان از منابع طبیعی به عنوان جایگزینی برای مواد شیمیایی بهره بیشتری برد. تفاوت در تاثیر عصاره‌های گیاهی بر باکتری ها به عوامل مختلفی وابسته است که از آن میان می توان به منطقه جغرافیایی، رویش، رقم و سن گیاه، روش خشک کردن گیاه، روش استخراج ترکیبات موثره، نوع حلال، غلظت عصاره و نوع محیط کشت اشاره نمود (۱۸).

یکی از ویژگی های مهم عصاره‌های گیاهی مرتبط با خاصیت آبگریزی است که عصاره‌های گیاهی را قادر می سازد تا با پیوند روی لایه لیپیدی غشای سلولی باکتری ها و میتوکندری آن باعث پارگی غشاء سلولی و خروج مولکول ها و یون های مهم باکتری از سلول و در نهایت مرگ باکتری می گردد (۲۵). بر اساس مشاهدات انجام گرفته در این مطالعه به نظر می رسد از نظر تاثیر ضد میکروبی به مهمترین گیاه در بین ۴ گیاه مورد مطالعه بابونه بوده است و همچنین عصاره الکلی گیاهان بابونه، بارهنگ، پونه آبی وگزنه اثر کنترل کنندگی بهتری نسبت به عصاره‌های آبی این گیاهان دارند. چرا که عصاره‌های الکلی میزان بالاتری از مواد موثره گیاه را استخراج می کنند.

در مطالعه حاضر عصاره آبی و الکلی بارهنگ در غلظت ۴۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر علیه باکتری *کلبسیلا پنومونیه* هیچ گونه هاله ی رشدی ایجاد نگردید. همچنین در این مطالعه مشخص گردید که MIC عصاره‌های آبی و الکلی بارهنگ به ترتیب در غلظت ۱۲/۵ و۱/۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر علیه *کلبسیلا* دارای اثر مهارکنندگی است. نتایج مطالعه حاضر از نظر حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره آبی و الکلی بارهنگ با مطالعه Kiaiو همکاران همخوانی دارد. ولی غلظت مهارکنندگی از رشد *کلبسیلا پنومونیه* در مطالعه حاضر کمتر بوده است. مطالعه حاضر با مطالعه Chiang در سال ۲۰۰۲ مطابق و با مطالعه Eshraghi مطابقت ندارد. که این مساله می تواند به علت نوع سوش و زیستگاه گیاه باشد زیرا زیستگاه و آب و هوای گیاه در میزان غلظت مواد مؤثره گیاه مؤثر است.

در مطالعه ای که توسط Eshraghi و همکارانش در سال ۲۰۰۷، بر روی اثرات ضد باکتریایی و فیتوشیمیایی عصاره تام ۱۲ گونه از گیاهان بومی ایران از جمله پونه بر علیه سوش های بیماری زای *نوکاردیا* انجام گرفت مشخص گردید که عصاره اتانولی پونه در غلظت های مختلف ۲/۵، ۵، ۷/۵و ۱۰ گرم بر ۱۰۰ میلی متر علیه *نوکاردیا سیلینوس* در غلظت های فوق هاله ای به اندازه ۱۱/۹، ۱۲/۷ ، ۱۲/۵ ، ۱۸/۱ میلی متر ایجاد گردید (۱۷). در مطالعه دیگری که توسط NuriZadh و همکارانش در سال ۲۰۰۴، با موضوع تاثیر ضد باکتریایی عصاره‌های آبی و الکلی پونه علیه ۸ سویه *هلیکوباکتر پیلوری* انجام گرفت قطر هاله عدم رشد عصاره‌های آبی و الکلی پونه در روش دیسک دیفیوژن در غلظت ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر علیه *هلیکوباکتر پیلوری* به ترتیب ۸ و ۷/۵ میلی‌لیتر بود (۱۳). بر اساس مطالعات Judiو همکاران در سال ۲۰۰۴، با موضوع خواص ضد میکروبی ترکیبات شیمیایی مهم عصاره و اسانس پونه انجام گرفت حداقل غلظت مهارکنندگی گیاه پونه در ۲۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر علیه استاف و در غلظت ۴۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر علیه *کلبسیلا* مشخص گردید (۲۰).

در نتایج مطالعه حاضر مشخص گردید که عصاره آبی و الکلی پونه آبی در غلظت های ۴۰۰ و۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیترهاله ای به اندازه ۸ و۹ میلی‌لیتر ایجاد کردند که نتایج این تحقیق از نظر اثر ضد میکروبی پونه با نتایج Rahnama و Eshraghi و NuriZadhمطابقت دارد ولی از نظر مقدار قطر هاله ایجاد شده متفاوت است که می توان آن را به تفاوت در نوع سوش مورد بررسی و میزان غلظت عصاره و نوع حلال مورد استفاده نسبت داد. درنتایج MIC این مطالعه مشخص گردید که عصاره آبی و الکلی پونه در غلظت ۶/۲۵و۰/۷۸ دارای حداقل غلظت بازدارندگی علیه *کلبسیلا* می باشد. که نتایج مطالعه حاضر با مطالعه Pajouhiتقریبا یکسان است ولی حداقل غلظت مهارکنندگی پونه در تحقیق آنها کمتر است که می توان به تفاوت در نوع سوش های مورد بررسی نسبت داد.

بررسی انجام شده توسط Modarressiو همکارانش در سال۲۰۱۳، تاثیر عصاره الکلی گزنه علیه *کلبسیلا* در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر هاله ای کمتر از ۹ میلی متر ایجاد می کند (۲۱). در تحقیقی دیگر که توسط Kiaiو همکاران در سال۲۰۰۹ ، انجام گرفت مشخص شد که عصاره اتانولی گزنه در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر علیه باکتری *کلبسیلا* هاله ای به اندازه ۹/۵ میلی مترایجاد کرد (۱۶). Shariatو همکاران در سال۲۰۱۲، تاثیر عصاره آبی گیاه گزنه را بر روی باکتری های *سالمونلا تیفی، اشرشیاکلی و سودوموناس آئروزینوزا* بررسی نمودند نتایج نشان داد که عصاره آبی گزنه بر هر سه باکتری پاتوزن فوق به ترتیب در غلظت ۲/۱۵/۲۵ و ۵/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر موثر است (۲۲).

بر اساس مطالعات و همکارانش در سال ۱۳۹۱، بر روی خواص ضد باکتریایی عصاره بخش های مختلف گیاه گزنه علیه باکتری های *سودوموناس آئروزینوزا*، *باسیلوس سوبتلیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اکلای* انجام گرفت مشخص گردید که عصاره‌های اتانولی بذر گزنه بیشترین اثر ضدباکتریایی را بر روی باکتری های گرم مثبت و عصاره برگ گیاه مذکور بر باکتری های گرم منفی بیشترین اثر بازدارندگی را دارد (۲۳).

نتایج تحقیق presto در سال ۲۰۰۶ نشان داد عصاره متانولی گزنه بر باکتری های *باسیلوس سرئوس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا مونوسیتوزنز* اثر ضد میکروبی قوی دارد (۲۴). Kavalali در سال ۲۰۰۳ تاثیر عصاره اتانولی گزنه را بر روی باکتری های *سودوموناس آئروزینوزا*، *سالمونلا*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلی* بررسی نمودند نتایج نشان داد عصاره اتانولی گزنه بر همه باکتری های مذکور موثر است (۲۰).

در تحقیق حاضر مشخص گردید که عصاره‌های آبی و الکلی گزنه در غلظت های ۴۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ترتیب هاله های به اندازه ۱۰ و ۱۱ میلی متر علیه *کلبسیلا پنومونیه* ایجاد کردند نتایج حاضر با نتایج Modarrssiو Kiai و presto و kavalali مطابقت دارد. همچنین عصاره آبی و الکلی گزنه علیه *کلبسیلا پنومونیه* در مطالعه حاضر در غلظت ۳/۱۲ و۰/۲۸ میلیگرم بر میلی‌لیتر دارای حداقل غلظت مهارکنندگی از رشد می باشد. که با مطالعه Jafari و Shariat مطابقت دارد ولی مقدار MIC در تحقیق آنها بیشتر است که این عدم تطابق را می توان به نوع سوش مورد مطالعه نسبت داد.

از بین ۱۰ نوع آنتی بیوتیک به کار رفته ،سه نوع شامل آمیکاسین، سفتازیدیم و ایمی‌پنم حداکثر اثر مهارکنندگی را برباکتری *کلبسیلا پنومونیه* نشان دادند. سایر آنتی بیوتیک ها آثرات مهار کنندگی کمتری بر باکتری *کلبسیلا پنومونیه* نشان دادند (جدول شماره۲) مقایسه نتایج مندرج در جدول های ۳و ۲ و ۴ تناسب تاثیر گیاهان مورد مطالعه و آنتی بیوتیک های استاندارد را به خوبی نشان می دهد. با مقایسه هاله عدم رشد عصاره گیاهان داروئی مورد مطالعه با غلظت معین به روش دیسک دیفیوژن (جدول ۳) روشن می‌گردد که اثرات مهارکنندگی عصاره این گیاهان ،با آنتی بیوتیک های آمیکاسین، سفتازیدیم و ایمی‌پنم بر باکتری مورد مطالعه برابری نمی نماید با توجه به این نتایج به نظر می رسد اثرات ضدباکتریایی گیاهان دارویی فوق بصورت تام که مخلوطی از مواد موثره عصاره اتانولی و آبی گیاهان مورد مطالعه می باشد. بسیار کمتر از آنتی بیوتیک های رایج است و اگر ترکیبات موثره دارای اثر ضد میکروبی موجود در این عصاره ها جدا سازی و خالص گردد اثر بهتری در مقایسه با آنتی بیوتیک ها خواهد داشت اگر چه تجربه حاضر آزمایشگاهی است لیکن به دلیل نتایج قاطع به دست آمده به نظر می رسد این یافته ها زمینه بسیار مناسبی برای بررسی های بیشتر به صورت درون موجودی روی حیوانات آزمایشگاهی است.

به طور کلی ترکیبات گیاهی خاصیت ضد میکروبی خود را از طریق سازوکار هایی چون تجزیه دیواره سلولی، افزایش اسیددیته سیتوزولی، آسیب به غشای سلولی، آسیب به غشای پروتئین ها، نشت محتویات سلول به خارج، اختلال در نقل و انتقال پروتون واختلال در فعالیت آنزیم های حیاتی نظیر ATPase و جلوگیری از متابولیسم باکتری اعمال می کنند (۲۲). بنابراین با توجه به اثرات بیوشیمیایی این مواد و به علت در دسترس بودن این گیاهان با حجم زیاد در آینده با جدا کردن اجزای موثر می توان از منابع طبیعی به عنوان جایگزینی برای مواد شیمیایی بهره بیشتری برد. تفاوت در تاثیر عصاره‌های گیاهی بر باکتری ها به عوامل مختلفی وابسته است که از آن میان می توان به منطقه جغرافیایی، رویش، رقم و سن گیاه، روش خشک کردن گیاه، روش استخراج ترکیبات موثره، نوع حلال، غلظت عصاره و نوع محیط کشت اشاره نمود (۱۸).

یکی از ویژگی های مهم عصاره‌های گیاهی مرتبط با خاصیت آبگریزی است که عصاره‌های گیاهی را قادر می سازد تا با پیوند روی لایه لیپیدی غشای سلولی باکتری ها و میتوکندری آن باعث پارگی غشاء سلولی و خروج مولکول ها و یون های مهم باکتری از سلول و در نهایت مرگ باکتری می گردد (۲۵). بر اساس مشاهدات انجام گرفته در این مطالعه به نظر می رسد از نظر تاثیر ضد میکروبی به مهمترین گیاه در بین ۴ گیاه مورد مطالعه بابونه بوده است و همچنین عصاره الکلی گیاهان بابونه، بارهنگ، پونه آبی و گزنه اثر کنترل کنندگی بهتری نسبت به عصاره‌های آبی این گیاهان دارند. چرا که عصاره‌های الکلی میزان بالاتری از مواد موثره گیاه را استخراج می‌کنند.

پیشنهاد می‌شود مطالعات بیشتری از قبیل استفاده از عصاره گیری های متفاوت و نیز استفاده از سوش های مختلف باکتریایی و همچنین استفاده از متدهای متفاوتی از آزمایش آنتی بیوگرام جهت بررسی بهتر آزمایشگاهی این گیاهان انجام پذیرفته و اثرات باکتریایی این گیاهان در مدل حیوانی به خصوص در عفونت زخم ها مورد بررسی قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق بیانگر اثر بهینه عصاره آبی و اتانولی گیاهان مورد مطالعه علیه *کلبسیلا پنومونیه* بود که بیشترین اثر بازدارندگی مربوط به گیاه بابونه و کمترین اثرمربوط به گیاه بارهنگ ارزیابی شد. با توجه به این نکته که گیاهان داروئی به دلیل ماهیت طبیعی

با بدن سازگاری بهتری داشته و دارای عوارض جانبی کمتری هستند. لذا با توجه به افزلیش مقاومت آنتی بیوتیک، نتایج این مطالعه حائز اهمیت می باشد و می توان در صورت امکان مواد موثره فعال با خواص ضد میکروبی موجود در عصاره ها را استخراج کرده و اثرات ضد باکتریال آن را در شرایط invivo و بالینی مورد بررسی قرار داد.

سپاسگزاری

این پژوهش برگرفته از پایان نامه دانشجویی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی می باشد از مساعدت و راهنمایی استاد محترم آقای دکتر خیاطی کمال تشکر و قدردانی را می نمایم.

تعارض در منافع

این مقاله پژوهشی مستقل است که بدون حمایت مالی سازمانی انجام شده است. در انجام مطالعهٔ حاضر، نویسندگان هیچ‌گونه تضاد منافعی نداشته‌اند.

Referance

1. Buhner SH. Herbal antibiotics: natural alternatives for treating drug-resistant bacteria. Storey Publishing; 2012 Jul 17.
2. Moghtader M, Salari H, Farahmand A. Anti-bacterial Effects of the Essential Oil of Teucrium polium L. on Human Pathogenic Bacteria. Iran J Med Microbiol. 2013; 7 (2) :1-7
3. Talei GR, Meshkatalsadat MH, Mosavi Z. Antibacterial activity and chemical composition of essential oils from four medicinal plants of Lorestan, Iran. J Med Plants. 2007 Mar 10;1(21):45-52.
4. Abbasi N, Azizi Jalilian F, Abdi M, Saifmanesh M. A comparative study of the antimicrobial effect of Scrophularia striata Boiss. extract and selective antibiotics against Staphylococcus aureus and Pesudomonas aeroginosa. J Med Plants. 2007 Mar 10;1(21):10-8.
5. Soleymani N, Sattari M, Sepehriseresht S, Daneshmandi S, Derakhshan. Evaluation of reciprocal pharmaceutical effects and antibacterial activity of Bunium persicum essential oil against some Gram positive and Gram negative bacteria. Iran J Med Microbiol. 2010; 4 (1 and 2) :26-34
6. Velag, J. and Studlla, G. The Medicinal Plants. Persian Translation by Zaman S. Sixth ed. Tehran. Naghsh Iran publication. 2005; 9-10.
7. Monavari H, Hamkar R, Norooz-Babaei Z, Adibi L, Noroozi M, Ziaei A. Antiviral effect assay of twenty five species of various medicinal plants families in Iran. Iran J Med Microbiol. 2007; 1 (2) :49-59
8. Mashhadian NV, Rakhshandeh H. Antibacterial and antifungal effects of Nigella sativa extracts against S. aureus, P. aeroginosa and C. albicans. Pak J Med Sci. 2005;21(1):47-52.
9. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical Microbiology E-Book. Elsevier Health Sciences; 2020 Apr 26.
10. Andrews JM, BSAC Working Party on Susceptibility Testing FT. BSAC standardized disc susceptibility testing method. J Antimicrob Chemother. 2001;48(1):43-57. [DOI:10.1093/jac/48.suppl_1.43] [PMID]
11. Nostro A, Germanò MP, D'angelo V, Marino A, Cannatelli MA. Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. Lett Appl Microbiol. 2000;30(5):379-384 [DOI:10.1046/j.1472-765x.2000.00731.x] [PMID]
12. Thornsberry C and Dougal L. Successful use of broth microdilution in susceptibility tests for methicillin resistant Staphylococa. J. Clinical Microbiol. 1983; 18 (5): 1084 - 91. [DOI:10.1128/JCM.18.5.1084-1091.1983] [PMID]
13. Dadgar T, Ghasemi AS; Massoud B, Mazandarani M, Seifi, Bayat. Antibacterial effect of 20 species of plants against methicillin-resistant and sensitive to Staphylococcus aureus. Scientific Journal of University of Medical Sciences, 2007.(1). 62-55.
14. Nourizadeh A., Mirzapour I, Ghasemi K, Razavi Seyed Mehdi, Latifi N. Antibacterial effects of mint, licorice, mint, chamomile and thyme extracts on Helicobacter pylori. Scientific-research bi-monthly of Shahed University. 2004;11(52): 71-67.
15. Jalali M, Abedi D, Ghasemin, Chaharmahal A, Antimicrobial effects of hydroalcoholic extract of a number of medicinal plants against Listeria monocytogenes, Shahrekord University of Medical Sciences,. 2006:(3): 33-25.
16. Atai, Z., Abdolahi, H., Poor, S. N., & Mohamadi, S. (2007). An in vitro study of the effects of Yarrow, Chamomile and Rhubarb herbal extracts on candida albicans and common oral bacteria. Journal of Islamic Dental Association of IRAN, 18(3), 25-.
17. Kiai A, Mazandarani M, Ghaemi A. The effect of ethanolic extract of 7 authorized medicinal plants against bacteria isolated from other virtual ones to urinary tract

infection in Gorgan. Journal of Pharmaceutical Scientists. 2010. 9 (34): 74-83.

18. Eshraghi S, Amin Gh, Fakhri S, Study of antibacterial and phytochemical effects of total extracts of 12 species of Iranian plants on Nocardia pathogenic strains, Veterinary Research. 2009.(82): 73-63.
19. Chiang LC, Chiang W, Chang MY, Ng TL and Lin CC. Antiviral activity of P. major extracts and related compounds in vitro. Antiviral Res 2002; 55: 53 - 62. [DOI:10.1016/S0166-3542(02)00007-4]
20. Kavalali GM. Urtica: therapeutic and nutritional aspects of stinging nettles. CRC; 2003. [DOI:10.4324/9780203351505] [PMCID]
21. Hayder M Alkuraishy , Ali I Al-Gareeb , Ali K Albuhadilly, Salah Alwindy. In vitro Assessment of the Antibacterial Activity of Matricaria chamomile Alcoholic Extract against Pathogenic Bacterial Strains. British Microbiology Research Journal, 2015. 7(2): 55-61. [DOI:10.9734/BMRJ/2015/16263]
22. Judy L,. Investigation of antimicrobial properties and important chemical compounds of extracts and essential oils of marjoram, peppermint and peppermint from the mint family. thesis. Urmia University. 2003.
23. Sourav Das, Barbara Horváth, Silvija Šafranko , Stela Joki'c , Aleksandar Széchenyi , Tamás K ″oszegi . Antimicrobial Activity of Chamomile Essential Oil: Effect of Different Formulations. Molecules Research Journal ,2019. 24(23):4321. [DOI:10.3390/molecules24234321] [PMID] [PMCID]
24. Pajooh M, Tayk H, Akhundzadeh, Gandami H, Ehsani M. Study of chemical composition and antimicrobial activity of origanum and cumin essential oils in soup. Journal of Food Science and Technology. 2012. 36. Pages 45-33.
25. Modarressi Chahardehi A, Ibrahim D, Soleiman SF, Abolhassani F. Evaluation of the effect of alcoholic extracts of nettle plant on a number of gram-negative and gram-positive bacteria, J. Med. Plant. 2012; 42.
26. Shariat E, Hosseini H, Poorahmad R. Investigation of the antibacterial effect of nettle extract and marzengoni extract on total echinacea, salmonellate and soda and Monas Aerogenousa. J. Innov Food Tech. 2012;4:15-9.
27. Jafari Z, Muhammad A, Mehrabian S. Investigation of antibacterial properties of extract of different parts of bipedal nettle plant. National Conference on Natural Products and Medicinal Plants. Bojnourd North Khorasan University of Medical Sciences; 2012
28. Proestos C, Boziaris IS, Nychas GJ, Komaitis M. Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. Food chem. 2006 Apr 1;95(4):664-71. [DOI:10.1016/j.foodchem.2005.01.049]
29. Joshi B, Lekhak S, Sharma A. Antibacterial property of different medicinal plants: Ocimum sanctum, Cinnamomum zeylanicum, Xanthoxylum armatum and Origanum majorana. Kathmandu university journal of science, engineering and technology. 2009;5(1):143-50. [DOI:10.3126/kuset.v5i1.2854]