اثرات ضد میکروبی عصاره‌های هندوانه ابوجهل و کلپوره بر برخی باکتری‌های بیماری‌زای

بهمن فاضلی نسب*[۱]، زهرا یزدان پور[۲]

۱- گروه پژوهشی زراعت و اصلاح نباتات، پژوهشکده کشاورزی، پژوهشگاه دانشگاه زابل، زابل، ایران.
۲- گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زابل، زابل، ایران.

دریافت مقاله: ۸ بهمن ۱۳۹۸، بازنگری: ۲۵ خرداد ۱۳۹۹ ، پذیرش نهایی: ۱۵ تیر ۱۳۹۹

چکیده

در طول تاریخ بشری، بسیاری از بیماری‌های عفونی به‌طور سنتی با داروهای گیاهی درمان شده‌اند، به‌طوری‌که امروزه در بسیاری از کشورهای در حال توسعه، داروهای گیاهی نقش اصلی را در درمان اولیه ایفا می‌کنند. هدف از این تحقیق، بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره‌های اتانولی، متانولی و اتیل استات هندوانه ابوجهل (میوه) و کلپوره (برگ) بر برخی باکتری‌های بیماری‌زا بوده است. گیاهان مورد بررسی از شهرستان زابل جمع‌آوری شده، سپس آسیاب شده و در حلال‌های اتانول، متانول، اتیل استات قرار داده و در نهایت عصاره‌گیری با دستگاه روتاری انجام شد. باکتری با جمعیت استاندارد تهیه شده و حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی با روش میکرودایلوشن بر روی باکتری‌های *ویبریو کلرا*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس*، *شیگلا دیسنتری* و *لیستریا مونوسیتوژنز* تعیین شد. کمترین غلظت مهارکنندگی عصاره اتانولی (۱۲/۵ پی‌پی‌ام)، متانولی (۲۵ پی‌پی‌ام) و اتیل استات (۲۵ پی‌پی‌ام) هندوانه ابوجهل به ترتیب بر باکتری‌های *لیستریا مونوسیتوژنز*، *ویبریو کلرا* و *باسیلوس سرئوس* مؤثر بوده‌اند. عصاره اتانولی کلپوره با کمترین غلظت ۵۰ پی‌پی‌ام تنها توانسته باکتری *ویبریو کلرا* را مهار کند. کمترین غلظت مهارکنندگی عصاره متانولی کلپوره (۲۵ پی‌پی‌ام) در برابر باکتری *ویبریو کلرا* مشاهده و باکتری *باسیلوس سرئوس* در تمام غلظت‌ها رشد کرده است. کمترین غلظت مهارکنندگی عصاره اتیل استات با ۱۲/۵ پی‌پی‌ام بر *باکتری ویبریو کلرا* مشاهده شده است. در کل عصاره اتانولی هندوانه ابوجهل بر باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* و عصاره اتیل استات کلپوره بر *باکتری ویبریو کلرا* مؤثر بوده‌اند لذا پیشنهاد می‌گردد بسته به هدف استفاده از عصاره گیاهی از نوع خاص گیاه به همراه مؤثرترین حلال مربوطه استفاده شود.

واژگان کلیدی: *فعالیت ضد میکروبی، حداقل غلظت مهارکنندگی، حداقل غلظت کشندگی، باکتری بیماری‌زا*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: Bfazeli@uoz.ac.ir

مقدمه

یکی از مشکلات صنعت غذا و دارو، گسترش جدایه‌های میکروبی مقاوم به داروها و آنتی‌بیوتیک‌ها بوده و امروزه به دلیل خاصیت سمی و سرطان‌زایی ترکیبات شیمیایی و سنتزی، استفاده از گیاهان دارویی جهت درمان بیماری‌های مزمن توجه بسیاری از پژوهشگران را به خود معطوف و از این رو، استفاده از ترکیبات ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی طبیعی مانند اسیدهای آلی، عطرمایه‌ها (اسانس‌ها) و عصاره‌های گیاهی می‌توانند جایگزین مناسب و ایمنی در مواد غذایی باشند (۱). همچنین، در بیماری‌های دهان و دندان و ورم مفاصل و استخوان که کلاژن در معرض تخریب قرار می‌گیرد، ترکیبات فنلی و مواد آنتی‌اکسیدانی این گیاهان (که تحت عنوان متابولیت‌های ثانویه معروف هستند) می‌تواند از آن جلوگیری کند (۲).

متابولیت‌های ثانویه ترکیبات آلی هستند که برخلاف متابولیت‌های اولیه به شکل مستقیم در رشد، نمو و تولید مثل یک موجود زنده دخیل نیستند. فقدان متابولیت‌های ثانویه باعث مرگ فوری موجود نمی‌شود بلکه در طولانی مدت می‌تواند سبب اختلال در بقا، باروری و یا تغییرات ظاهری شده و گاهی نیز تغییری ایجاد نمی‌کند (۳). متابولیت‌های ثانویه گیاهان از آغاز زندگی بشر برای درمان عفونت‌ها و بیماری‌ها استفاده شده‌اند. طی صد سال گذشته داروهای شیمیایی ساختگی جایگزین ترکیب‌های طبیعی شده‌اند که برای ساختن داروهای شیمیایی همچون آسپرین و سالیسیلیک اسید نیز از ساختار گیاهان الگو برداری شده است (۴، ۶).

تقاضای رو به رشد بازار امروز برای محصولات طبیعی قابل تجدید و با در نظر گرفتن گیاهان به عنوان کارخانه بالقوه تولیدکننده محصولات بیوشیمیایی، زمینه‌های تحقیقاتی جدیدی برای تولید متابولیت‌های ثانویه ایجاد شود (۴، ۷). از نیمه دوم قرن گذشته، تحقیقات وسیعی روی گیاهان دارویی در بیشتر کشورهای جهان انجام گرفته و در پی آن داروهای گیاهی فراوانی تهیه و به بازار عرضه گردیده است و با توجه به فلور غنی ایران که بیش از ۷۵۰۰ گونه گیاهی بوده و تعداد بسیار زیادی از آنها دارویی هستند ضرورت مطالعه بر روی مواد مؤثر دارویی فلور طبیعی ایران را حائز اهمیت کرده است (۸، ۹).

آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی مرکبات و سبزی‌ها، بازدارنده‌ی رشد بیماری‌های بالینی مهم بوده و برخی تحقیقات، رابطه بین مصرف میوه‌ها و سبزی‌ها با کاهش بیماری‌های مزمن را تائید نموده‌اند (۱۰). گرچه میوه‌ها و سبزی‌ها از نظر ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی متنوع هستند لیکن آنهایی که فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا دارند معمولاً حاوی آنتی‌اکسیدان‌های بیشتری هستند (۱۱، ۱۲).

مواد آنتی‌اکسیدانی کاربردهای زیادی علاوه بر درمان و پیشگیری از بیماری‌های سرطانی و تصلب شرایین داشته مثلاً از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی طبیعی برگ زیتون جهت افزایش انبارمانی چربی‌ها و روغن‌ها، از عصاره پوست بادام‌زمینی به دلیل فعالیت آنتی‌اکسیدانی جهت نگهداری چیپس‌های سیب‌زمینی و غیره استفاده شده است (۱۳). تحقیقات نشان داده که منبع دریافت فنل‌ها و فلاونوئیدها در نقاط مختلف جهان به نوع رژیم غذایی مردم منطقه وابسته است. برای مثال در کشورهایی همچون ژاپن و چین مصرف چای سبز تأمین‌کننده این ترکیبات مورد نیاز بدن هست در حالی‌که این مواد در کشورهای غربی با مصرف سیب و پیاز و در کشورهای شرقی با مصرف سبزی‌ها و مواد غذایی تخمیری تأمین می‌شوند (۱۴).

در کشور ایران به‌طور جامع نوع خاص استفاده از انواع مواد حاوی آنتی‌اکسیدان وجود ندارد اما با تبلیغات مختلف کارهایی ازجمله مصرف سبزی‌ها به‌صورت خام و پخته، برگ گیاهان و درختان مختلف (به‌صورت دم‌نوش، عرقیات، عطرمایه، عصاره، مربا، شربت، ترشی، مواد شوینده (از جمله سدر) و حتی مصرف به صورت دلمه و غیره) صورت گرفته که پیرو تحقیقات مختلف باید از اندام‌های مختلف گیاهان که دارای نوع خاص مواد آنتی‌اکسیدانی بوده استفاده خاصی از آنها بشود (۱۵).

امروزه ترکیبات شناسایی شده در گیاهان دارویی به

عنوان داروهای جدید مورد استفاده قرار می‌گیرند و می‌توانند به عنوان، کلیدی برای شناسایی روش‌های درمانی کم هزینه و دارای عوارض جانبی کمتر در درمان بسیاری از بیماری‌ها به کار روند (۱۶) همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی عصاره‌های گیاهی سال‌های زیادی مورد بررسی قرار گرفته است، اما بیشترین تمرکز و بررسی طی سی سال گذشته است. در این دوره بیشتر روی گیاهانی که کاربرد سنتی داشته به ویژه در کشورهایی نظیر چین و آمریکا کار شده است. درحالی‌که گزارش‌های مربوط به گیاهان بومی کشور ما ایران، بسیار پراکنده و جزئی است (۱۷). بر این اساس در تحقیق حاضر سعی شد تا اثرات ضد میکروبی عصاره‌های اتانولی، متانولی و اتیل استات، هندوانه ابوجهل، کلپوره بر برخی باکتری‌های *ویبریو کلرا* ، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس*، *شیگلا دیسنتری* و *لیستریا مونوسیتوژنز* مورد ارزیابی قرار گیرد.

گیاه دارویی هندوانه ابوجهل (*Citrullus colocynthis* L)، از خانواده *Cucurbitaceae* و راسته کدوئیان *Cucurbitales* بوده که از جمله گیاهان دارویی ارزشمند است که در طب سنتی در درمان بسیاری از بیماری‌ها به کار برده شده است (۱۸). عصاره میوه این گیاه شامل آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، ساپونین‌ها، تری ترپنوئیدها و گلیکوزیدها است (۱۹). از میوه هندوانه ابوجهل به عنوان ضد قند خون، ضد فشار خون، ضد تومور، ضد تب، ضد میکروب ذکر نام شده است (۲۰). این گیاه انتشار بیشتری در ایران، در نواحی جنوب کشور و مناطقی همچون جنوب استان خراسان دارد.

کلپوره (*Teucrium polium*) گیاهی معطر از خانواده نعناعیان است که در نواحی مختلف اروپا، مدیترانه، شمال آفریقا و جنوب غربی آسیا از جمله ایران می‌روید (۲۱). گونه‌های مختلف کلپوره به عنوان گیاه دارویی شناخته شده و اثرات ضد تشنج، ضد التهاب، ضد درد، تب بر، التیام دهندگی زخم در آنها ثابت شده است .این گیاه پراکندگی وسیع در نواحی مختلف شمال، غرب، جنوب و مرکز ایران، منطقه البرز، اطراف تهران، مخصوصاً در غالب نواحی نیمه بایر و کوهستان‌های نیمه خشک دارد (۲۲، ۲۳).

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره اتانولی، متانولی و اتیل استات: گیاهان هندوانه ابوجهل (میوه) و کلپوره (برگ) در شهرستان زابل (در فصل بهار محوطه پژوهشکده کشاورزی منطقه سیستان) جمع‌آوری و خشک گردیدند. برای تهیه عصاره اتانولی، متانولی و اتیل استات، مقدار ۱۰ گرم پودر خشک گیاه در داخل ارلن‌های نیم لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درصد (برای تهیه عصاره اتانولی)، متانول، اتیل استات قرار داده شد. محتوی ارلن‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق توسط دستگاه شیکر (Pars Azma- ایران) با سرعت ۱۳۰ rpm مخلوط شده، سپس به وسیله کاغذ واتمن شماره ۲ صاف گردید. جداسازی حلال از عصاره توسط دستگاه روتاری (Heidolph- آلمان) و با کمک پمپ خلأ (تقطیر در خلأ) انجام گرفت. عصاره به دست آمده وزن شده سپس در حلال DMSO حل شد. عصاره به دست آمده تا زمان استفاده در آزمایش‌های ضد میکروبی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری شد (۲۴، ۲۵).

تهیه باکتری و ذخیره‌سازی: جدایه باکتری‌های ویبریو کلر (ATCC1611)، استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC1189)، باسیلوس سرئوس (ATCC1015)، شیگلا دیسنتری (ATCC1188) و لیستریا مونوسیتوژنز (ATCC1298) از کلکسیون قارچ و باکتری ایران تهیه شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در محیط مایع نوترینت براث گرمخانه‌گذاری شدند و بعد از ۲۴ ساعت در محیط کشت نوترینت براث حاوی ۱۰ درصد گلیسرول استریل در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد برای استفاده بعدی ذخیره‌سازی شدند.

تهیه سوسپانسیون باکتریایی: باکتری‌های *ویبریو کلرا*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس*، *شیگلا دیسنتری* و *لیستریا مونوسیتوژنز* را پس از انجماد زدایی در دمای ۳۷ درجه، در محیط نوترینت براث و همچنین به منظور بررسی کلنی‌های خالص از نمونه‌های باکتریایی روی

محیط جامد TSA (Tripton soy broth) کشت خطی داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه در انکوباتور قرار داده شد و پس از ۲۴ ساعت از کلنی‌های خالص هر باکتری برداشته و در آب مقطر استریل کدورتی معادل نیم مک فارلند ساخته و بعد برای اطمینان از غلظت باکتری‌ها با اسپکتروفتومتر (UV-2100, Unico – آلمان) جذب آن با طول‌موج ۶۰۰ nm قرائت شده، تراکم باکتری‌ها با غلظت ۱/۵ ×۱۰^{۶} cfu/ml جذبی معادل ۰/۱- ۰/۰۸ دارد (۲۶).

تعیین میزان حساسیت جدایه‌های باکتری نسبت به عصاره‌های مختلف گیاهان: تعیین حساسیت جدایه‌های باکتری نسبت به عصاره گیاهان، با استفاده از روش رقت‌سازی در چاهک انجام شد. در محیط کشت جامد تعداد شش چاهک ایجاد شد و به هر چاهک مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر از محیط مایع مغذی مولر هینتون براث اضافه شد. سپس به چاهک اول ۱۰۰ میلی‌لیتر از محلول رقیق شده عصاره‌های گیاهان اضافه شده و پس از مخلوط کردن ۱۰۰ میکرو لیتر از چاهک اول برداشته به چاهک دوم اضافه کرده و بدین ترتیب تا آخرین چاهک این کار انجام داده شد. از چاهک آخر ۱۰۰ میکرو لیتر محیط کشت خارج کرده مقدار ۱۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون میکروبی حاوی ۱۰^{۷} واحد در میلی‌لیتر معادل ۰/۵ مک فارلند اضافه شده و در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. اولین چاهکی که از رشد باکتری پس از قرار دادن در انکوباتور جلوگیری کرده باشد به عنوان حداقل غلظت مهارکننده (MIC)(Minimum inhibitory concentration) در نظر گرفته شد. برای اطمینان از چاهک‌های شفاف ۱۰ میکرولیتر برداشته به محیط مولر هینتون آگار منتقل گردید و پس از ۲۴ ساعت اولین رقتی که توانسته ۹۹/۹ درصد باکتری را از بین ببرد به عنوان حداقل غلظت کشنده (MBC)(Minimum bactericide concentration) محاسبه گردید (۲۷).

نتایج

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که عصاره‌های هندوانه ابوجهل با حلال‌های مختلف دارای اثر مهارکنندگی بر روی باکتری‌های مورد مطالعه است، به طوری‌که کمترین غلظت مهارکنندگی عصاره اتانولی در برابر باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* مشاهده شده است (۱۲/۵ پی‌پی‌ام). بیشترین غلظت مهارکنندگی عصاره اتانولی هندوانه ابوجهل ۵۰ پی‌پی‌ام بود که رشد باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس* و *ویبریو کلرا* در این غلظت مهار شد. کمترین غلظت مهارکنندگی عصاره متانولی هندوانه ابوجهل در برابر باکتری *ویبریو کلرا* مشاهده شد (۲۵ پی‌پی‌ام) و بیشترین غلظت مهارکنندگی در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا مونوسیتوژنز* و *شیگلا دیسنتری* دیده شد و همچنین، کمترین غلظت مهارکنندگی عصاره اتیل استات هندوانه ابوجهل در برابر باکتری *باسیلوس سرئوس* مشاهده شد (۲۵ پی‌پی‌ام) و بیشترین غلظت مهارکنندگی نیز برابر با ۵۰ پی‌پی‌ام بود (جدول ۱).

نتایج حاصل از بررسی عصاره‌های مختلف کلپوره نشان داد که عصاره اتانولی کلپوره با غلظت ۵۰ پی‌پی‌ام تنها توانسته باکتری *ویبریو کلرا* را مهار کند در صورتی‌که باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، لیستریا مونوسیتوژنز* و *شیگلا دیسنتری* در تمام غلظت‌های عصاره، رشد کردند و عصاره اتانولی هیچ اثر مهارکنندگی از خود نشان نداده است. کمترین غلظت مهارکنندگی عصاره متانولی کلپوره در برابر باکتری *ویبریو کلرا* مشاهده شد (۲۵ پی‌پی‌ام) و بیشترین غلظت مهارکنندگی در برابر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا مونوسیتوژنز* و *شیگلا دیسنتری* دیده شد (۵۰ پی‌پی‌ام). باکتری *باسیلوس سرئوس* در تمام غلظت‌ها رشد کرد. کمترین غلظت مهارکنندگی عصاره اتیل استات برابر با ۱۲/۵ پی‌پی‌ام در برابر *باکتری ویبریوکلرا* بود و رشد باکتری *باسیلوس سرئوس* در غلظت ۲۵ پی‌پی‌ام عصاره اتیل استات مهار شد و بیشترین غلظت مهارکنندگی این عصاره، برابر با ۵۰ پی‌پی‌ام، در برابر *شیگلا دیسنتری* مشاهده شد (جدول ۲).

جدول ۱- نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی عصاره‌های اتانولی، متانولی و اتیل استات هندوانه ابوجهل

باکتری	MIC/MBC عصاره اتانولی	MIC/MBC عصاره متانولی	MIC/MBC عصاره اتیل استات
استافیلوکوکوس اورئوس	۵۰ - ۱۰۰	۵۰ - ۱۰۰	۵۰ -۱۰۰
باسیلوس سرئوس	۵۰ -۱۰۰	رشد	۲۵ - ۵۰
ویبریو کلرا	۵۰ -۱۰۰	۲۵ - ۵۰	۵۰- ۱۰۰
لیستریا مونوسیتوژنز	۱۲/۵ -۲۵	۵۰- ۱۰۰	۵۰ - ۱۰۰
شیگلا دیسنتری	۲۵ - ۵۰	۵۰ - ۱۰۰	۵۰ -۱۰۰

جدول -۲: نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره‌های اتانولی، متانولی و اتیل استات کلپوره

باکتری	MIC/MBC عصاره اتانولی	MIC/MBC عصاره متانولی	MIC/MBC عصاره اتیل استات
استافیلوکوکوس اورئوس	رشد	۵۰ - ۱۰۰	۲۵- ۵۰
باسیلوس سرئوس	رشد	رشد	۲۵ - ۵۰
ویبریو کلرا	۵۰ -۱۰۰	۲۵ - ۵۰	۱۲/۵ - ۲۵
لیستریا مونوسیتوژنز	رشد	۵۰ - ۱۰۰	رشد
شیگلا دیسنتری	رشد	۵۰ - ۱۰۰	۵۰ -۱۰۰

بحث

کمترین غلظت مهارکنندگی عصاره اتانولی (۱۲/۵ پی‌پی‌ام)، متانولی (۲۵ پی‌پی‌ام) و اتیل استات (۲۵ پی‌پی‌ام) هندوانه ابوجهل به ترتیب بر باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز*، *ویبریو کلرا* و *باسیلوس سرئوس* مؤثر بوده‌اند. عصاره اتانولی کلپوره با کمترین غلظت ۵۰ پی‌پی‌ام تنها توانسته باکتری *ویبریو کلرا* را مهار کند. کمترین غلظت مهارکنندگی عصاره متانولی کلپوره (۲۵ پی‌پی‌ام) در برابر باکتری *ویبریوکلرا* مشاهده و باکتری *باسیلوس سرئوس* در تمام غلظت‌ها رشد کرده است. کمترین غلظت مهارکنندگی عصاره اتیل استات با ۱۲/۵ پی‌پی‌ام بر *باکتری ویبریو کلرا* مشاهده شده است.

فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های مختلف هندوانه ابوجهل بررسی و مشخص شده است که قطر هاله مهاری عصاره اتیل استات هندوانه ابوجهل در برابر باکتری‌های *B.cereus*، *S.aureus*، *E.faecalis*، *E.coli* و *S.enteritidis*، *P.aeruginosa* به ترتیب برابر با ۱۲/۱±۰/۳، ۱۳/۱±۰/۸، ۲۹/۵±۰/۵، ۷±۰/۵، ۱۳±۰/۵ و ۱۲/۶±۰/۳ میلی‌متر بوده است و حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره اتیل استات در برابر همین باکتری‌ها برابر با ۰/۶۲۵، ۵، ۲/۵، ۱۰>، ۵ و ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است (۲۸). در تحقیق حاضر نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی عصاره‌های اتانولی، متانولی و اتیل استات هندوانه ابوجهل نیز نشان داد که عصاره اتیل استات کمترین غلظت مهارکنندگی در برابر باکتری باسیلوس سرئوس داشته است درحالی‌که عصاره اتانولی و متانولی با کمترین غلظت باکتری‌های لیستریا مونوسیتوژنز و ویبریو کلرا را مهار کرده‌اند.

قطر هاله مهاری عصاره استونی برگ هندوانه ابوجهل با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در برابر باکتری‌های *S.aureus*، *E.coli*، *P.aeruginosa*، *K.pneumonia* و *S.marcescens* برابر با ۱۱/۲ – ۱۱/۸، ۱۴، ۱۰ و ۹ میلی‌متر بوده است (۲۹). قطر هاله مهاری عصاره خام هندوانه ابوجهل در برابر باکتری‌های *E,coli*، *P.aeruginosa*، *P.mirabilis*

K.pneumoniae و *S.aureus* به ترتیب برابر با ۲۱/۸±۰/۴۱، ۲۲±۰/۴۷، ۱۶/۳±۰/۲۶، ۱۳/۱±۰/۵۱، ۲۳/۱±۰/۴۷ میلی‌متر بوده است (۳۰). عصاره متانولی هندوانه ابوجهل مهارکننده باکتری‌های *باسیلوس سابتی لیس*، *استرپتوکوکوس پایوژنز*، و *سالمونلا تیفی موریوم* بوده درحالی‌که هیچ اثری بر روی باکتری‌های *پروتئوس میرابیلیس*، *پروتئوس ویولگری* و *ویبریو کلرا* نداشته است (۳۱). از طرفی عصاره اتانولی هندوانه ابوجهل با غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر قطر هاله مهاری ۱۷، ۱۴، ۱۵ و ۱۲ میلی‌متر در برابر باکتری‌های *باسیلوس سابتی لیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیاکلی*، و *سالمونلا تیفی موریوم* ایجاد کرده است (۳۲). از نتایج تحقیقات ارائه شده و همچنین تحقیق حاضر می‌توان فهمید که بیشترین نقش و تأثیر عصاره هندوانه ابوجهل مربوط به عصاره اتانلی و سپس اتیل استات، آن هم بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا مونوسیتوژنز* بوده است. ضمناً در تحقیقی عدم تأثیر عصاره متانولی هندوانه ابوجهل بر برخی باکتری‌ها از جمله *ویبریو کلرا* ذکر شده و با تحقیق حاضر که هر سه نوع عصاره متانولی، اتانلی و اتیل استاتی بر باکتری نامبرده مؤثر بوده و بیشترین اثر را نیز عصاره متانولی دارا بوده مغایرت داشته است که این می‌تواند به دلیل منطقه رویشی گیاه مورد استفاده و شرایط حاکم بر آزمایش باشد.

اثر ضد میکروبی عصاره الکلی کلپوره بر روی باکتری‌ها بررسی و مشخص شده است که غلظت معینی از عصاره این گیاه دارای بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سوبتی لیس* اثر داشته اما تأثیر عصاره‌ها با کم شدن غلظت آن‌ها کم می‌شده است. همچنین این عصاره تنها در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر *کلبسیلا پنومونیا* بوده و بر روی باکتری *اشریشیاکلی* اثر نداشت (۳۳). حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره کلپوره بر باکتری‌های *S.aureus, S.typhi* برابر با ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است درحالی‌که برای باکتری‌های *Bordetella bronchiseptica, Bacillus anthracis* برابر با ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است (۳۴). در تحقیق حاضر نیز مشخص شد که عصاره اتیل استات کلپوره با کمترین غلظت باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مهار کرده است درحالی‌که *استافیلوکوکوس اورئوس* در تمامی غلظت‌های عصاره اتانولی کلپوره رشد کرده است، همچنین باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* در تمامی غلظت‌های عصاره اتانولی و اتیل استات کلپوره رشد کرده است. ضمناً بر اساس نتایج تحقیق حاضر و تحقیقات ارائه شده مشخص شد که نوع عصاره نقش مهمی در اثر ضد باکتریایی داشته است که همین امر نیز قبلاً ثابت شده است (۳۵). پس جهت به دست آوردن بهترین نتیجه اثر ضد باکتریایی بایستی ابتدا گیاهان را از مناطق رویشی متفاوت جمع‌آوری و سپس انواع عصاره‌های ممکنه را امتحان تا نتیجه دلخواه حاصل شود.

عطرمایه کلپوره بر روی باکتری‌های گرم مثبت *استافیلوکوکوس* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیس* دارای اثر مهارکنندگی داشته است (۳۶) اما عطرمایه و عصاره متانولی کلپوره هیچ‌گونه فعالیت مهارکنندگی از خود بر علیه *P. aeruginosa* و *P. cartovorum* نشان نداده ولی بر *B.nigrifluens*، *R.solanaceaearum*، *S.scabies* و *P.agglomerans* مؤثر بوده است (۳۷). قطر هاله مهاری ۳/۷، ۲ و ۲ میلی‌متر کلپوره بر باکتری‌های *باسیلوس سابتی لیس*، *میکروکوکوس لوتئوس* و *پاراکوکوس پاراترونوس* گزارش شده است (۳۸). در نتایج تحقیق حاضر و همچنین تحقیقات ارائه شده مشخص شد که عصاره‌های مختلف کلپوره بر باکتری‌های مختلفی مؤثر بوده‌اند اما آنچه در تحقیق حاضر نمود بیشتری داشت این است که به ترتیب عصاره‌های اتیل استات، متانولی و اتانلی بیشترین نقش را در مهار *ویبریو کلرا* داشته است که حتی در تحقیقات قبلی از عدم مهار این باکتری توسط عصاره‌های مختلف گزارش شده بود (۳۱).

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که عصاره‌ها با حلال‌های مختلف، فعالیت ضد میکروبی متفاوتی از خود نشان دادند به طوری‌که در کل عصاره هندوانه ابوجهل با

حلال‌های مختلف اثر مهاری بیشتری نسبت به عصاره‌های کلپوره از خود نشان داده که ناشی از مواد مؤثره مختلف گیاه است و می‌توان از این عصاره‌ها برای کاهش آلودگی باکتریایی و کاهش عفونت ناشی از آنها استفاده کرد؛ اما به طور خاص مثلاً بر باکتری *ویبریو کلرا* عصاره اتیل استاتی کلپوره مؤثرتر بوده است لذا پیشنهاد می‌گردد بسته به هدف استفاده از عصاره گیاهی از نوع خاص گیاه به همراه مؤثرترین حلال مربوطه استفاده شود.

Reference

1- Negi PS. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. International Journal of Food Microbiology.2012;156(1):7-17. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.006

2- Kwok CY, Wong CNY, Yau MYC, *et al.* Consumption of dried fruit of *Crataegus pinnatifida* (hawthorn) suppresses high-cholesterol diet-induced hypercholesterolemia in rats. Journal of functional foods. 2010;2(3):179-186. doi: 10.1016/j.jff.2010.04.006

3- Caraci F, Crupi R, Drago F, Spina E. Metabolic drug interactions between antidepressants and anticancer drugs: focus on selective serotonin reuptake inhibitors and hypericum extract. Current drug metabolism. 2011; 12(6): 570-577.

4- Omidi M, Abdollahi P. Biotechnology for large scale production of plants secondary metabolites. Genetics Novin. 2014; 9(4): 391-402.

5- Van Wyk B, Wink M. Medicinal plants of the world. Pretoria: South Africa: Briza Publications, 2004.

6- van Wyk BE, Albrecht C. A review of the taxonomy, ethnobotany, chemistry and pharmacology of Sutherlandia frutescens (Fabaceae). J Ethnopharmacol. 2008; 119(3): 620-629. 10.1016/j.jep.2008.08.003

7- Karuppusamy S. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures. Journal of Medicinal Plants Research. 2009; 3(13): 1222-1239.

8- Zakizadeh M, Nabavi S, Nabavi S, Ebrahimzadeh M. In vitro antioxidant activity of flower, seed and leaves of Alcea hyrcana Grossh. European review for medical and pharmacological sciences. 2011; 15(4): 406-412.

9- Mozdastan S, Ebrahimzadeh MA, Eslami S. Effect of Increasing the Polarity of Solvent on Total Phenol and Flavonoid Contents and Antioxidant Activity of Myrtle (Myrtus communis L.). Journal of Mazandaran University of Medical Sciences. 2015; 25(126): 68-81 [Farsi with abstract English].

10- Hayat K. Citrus: Molecular Phylogeny, Antioxidant Properties and Medicinal Uses. Nova Science Publishers. 2014: 235 Pages. ISBN: 9781631179853

11- Guo C, Yang J. Progress in the study of antioxidant capacity of fruits and vegetables. China public health. 2001; 17(87-88).

12- Fazeli-Nasab B, Sirousmehr A, Mirzaei N, Solimani M. Evaluation of total phenolic, flavenoeid content and antioxidant activity of Leaf and Fruit in 14 different genotypes of *Ziziphus mauritiana* L. in south of Iran. Eco-Phytochemical Journal of Medicinal Plants. 2017; 4(4): 1-14.

13- Rehman Z-U. Evaluation of antioxidant activity of methanolic extract from peanut hulls in fried potato chips. Plant Foods for Human Nutrition. 2003;58(1):75-83. https://doi.org/10.1023/A:1024031522588

14- Wach A, Pyrzyńska K, Biesaga M. Quercetin content in some food and herbal samples. Food chemistry. 2007; 100(2): 699-704. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.10.028

15- Jahantigh Haghighi z, fahmideh l, Fazeli Nasab b. Evaluation and comparison of Leaf antioxidant properties and morphological traits of tomato varieties (*Lycopersicon esculentum* L). Journal of Iranian Plant Ecophysiological Research. 2018; 13(50): 63-76.

16- Abtahi Froushani M, Nafisi S, Esmaili Gourvarchin Galeh H, *et al.* The Effects of Citrullus Colocynthis (L.) Hydroalcoholic Extract on the Function of Lymphocyte Proliferation and Innate Immune System Responses after Challenge with the REV1 Vaccine in Wistar Rats. Journal of Fasa University of Medical Sciences. 2016; 6(2): 227-234.

17- Mohammadi M, Asili J, Kamali H. Study of the antioxidant and antibacterial activity in methanolic, dichloromethan and hexane extracts of aerial parts of *Cyperus longos*. Journal of North Khorasan University of Medical Sciences. 2014; 6(1):161-167.

https:doi.org/10.29252/jnkums.6.1.161

18- Kumar S, Kumar D, Saroha K, *et al.* Antioksidativni potencijal i sposobnost hvatanja slobodnih radikala metanolnog ekstrakta plodova *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. Acta Pharmaceutica. 2008; 58(2): 215-220. https://doi.org/10.2478/v10007-008-0008-1

19- Marzouk B, Marzouk Z, Haloui E, *et al.* Screening of analgesic and anti-inflammatory activities of Citrullus colocynthis from southern Tunisia. J Ethnopharmacol 2010;128(1):15-19. https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.11.027

20- Marzouk Z, Marzouk B, Mahjoub MA, *et al.* Screening of the antioxidant and the free radical scavenging potential of Tunisian Citrullus colocynthis Schrad. from Mednine. Journal of Food, Agriculture & Environment 2010;8(2):261-265. Record Number : 20103205646

21- Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods (a review). International Journal of Food Microbiology. 2004; 94(3): 223-253. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022

22- Fazeli-Nasab B, Rahnama M, Shahriari S. The antimicrobial properties of hydro-alcoholic extracts of 29 medicinal plants on *E. coli* and *Staphylococcus aureus* microbes. New Findings in Veterinary Microbiology. 2018; 2(2): 1-15.

23- Mozafarian V. Classification of plant morphology and taxonomy. Amir Kabir Publications. 2010:512.

24- Fazeli-Nasab B. Evaluation of Antibacterial Activities of Hydroalcoholic Extract of Saffron Petals on Some Bacterial Pathogens. Journal of Medical Bacteriology. 2019; 8(5, 6): 8-20.

25- Rahnama M, Fazeli Nasab B, Mazarei A, Shahriari S. Evaluation of antimicrobial activity hydro alcoholic extract of some medicinal herbs against a range of Gram-positive and gram-negative bacteria. New Findings in Veterinary Microbiology 2018; 2(1): 1-19.

26- Malayeri FA, Yazdanpour Z, Bandani H, *et al.* Antimicrobial and anti-biofilm effects of *Thyme* essential oils and *Peppermint* on *Acinetobacter baumannii* and *Staphylococcus aureus* resistant to different antibiotics. New Findings in Veterinary Microbiology. 2020; 2(2): 41-51.

27- Saeedi S, Sabbagh SK, Sabori RE. A Study of antibacterial activity of plant extract and essential oil of *Myrtus communis* against resistant strains of *Staphyloccocus aureus* bacteria to selective antibiotics. Journal of Zabol University of Medical Sciences and Health Services (Journal of Rostamineh). 2012; 4(3): 21-32.

28- Chawech R, Mhalla D, Trigui M, *et al.* Chemical composition and antibacterial activity of extracts and compounds isolated from *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. 2015; 4(4): 197-203.

29- Priyavardhini S, Vasantha K, Umadevi M. Antibacterial activity on Citrullus colocynthis leaf extract. Anc Sci Life. 2009; 29(1): 12-13. PMCID: PMC3336298; PMID: 22557336

30- Srivastava G, Jain R, Vyas N, *et al.* Antimicrobial activity of the methanolic extract, fractions and isolated compounds from Citrullus colocynthis (L.) Schrad 2013.

31- Gurudeeban S, Rajamanickam E, Ramanathan T, Satyavani K. Antimicrobial activity of Citrullus colocynthis in Gulf of Mannar. International Journal of Current Research. 2010; 2(March): 78-81.

32- Aljabry AS, Alrasheid AA, Ramadan E. Citrullus Colocynthis a Prospective Antimicrobial and Antifungal Agent. American Journal of Medicine and Medical Sciences. 2019; 9(2): 41-45. https:doi.org/10.5923/j.ajmms.20190902.01

33- Teimori M. Investigation of antimicrobial effect of extract of Teucrium polium L. on some gram positive and gram negative bacteria. Scientific Journal Management System. 2012; 8(1): 1-6.

34- Darabpour E, Motamedi H, Nejad SMS. Antimicrobial properties of Teucrium polium against some clinical pathogens. Asian Pac J Trop Med. 2010; 3(2): 124-127. https://doi.org/10.1016/S1995-7645(10)60050-8

35- Fazeli-nasab B, Moshtaghi N, Forouzandeh M. Effect of Solvent Extraction on Phenol, Flavonoids and Antioxidant Activity of some Iranian Native Herbs. Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2019; 27(3): 14-26 https:doi.org/10.29252/sjimu.27.3.14. [In Persian]

36- Moghtader M, Salari H, Farahm A. Evaluation of the antifungal effects of rosemary oil and comparison with synthetic borneol and fungicide on the growth of *Aspergillus flavus*. Journal of Ecology and the Natural Environment. 2011; 3(6): 210-214.

37- Purnavab S, Ketabchi S, Rowshan V. Chemical composition and antibacterial activity of methanolic extract and essential oil of Iranian Teucrium polium against some of phytobacteria. Nat

Prod Res 2015; 29(14): 1376-1379. https://doi.org/10.1080/14786419.2014.1000320

38- Setif A. Antibacterial activity of extract of *Ajuga iva* and *Teucrium polium*. Adv Environ Bio. 2011; 52: 491-495.

Antimicrobial effects of extract of *Citrullus colocynthis* and *Teucrium polium* on some Bacteria

Bahman Fazeli-Nasab*[1], Zahra Yazdanpour [2]

1- Research Department of Agriculture and Plant Breeding, Agricultural Research Institute, University of Zabol, Zabol, Zabol, Iran.
2- Faculty of Medicine, Department of Microbiology, Zabol University of Medical Sciences, Zabol, Iran.

Receive: January 28, 2020; Revise: June 14, 2020; Accept: June 15, 2020

Summary

Throughout human history, many infectious diseases have traditionally been treated with herbal medicines, so today, in many developing countries, herbal medicines play a major role in early treatment. The purpose of this study was to investigate antimicrobial effects of ethanol, methanol, ethyl acetate *Citrullus colocynthis* (Fruit) and *Teucrium polium* (Leaf) on some pathogenic bacteria. The plants were collected from Zabol City, then milled and placed in solvents of ethanol, methanol ethyl acetate. Finally, extraction was carried out using a rotary machine. The bacteria were prepared as standard and the minimum inhibitory concentration and minimum destructive concentration were determined by micro-dilution method. The lowest inhibitory concentrations of ethanolic (12.5 ppm), methanolic (25 ppm) and ethyl acetate (25 ppm) extracts of *Citrullus colocynthis*were observed on the bacteria Listeria *monocytogenes*, *Vibrio chlora* and *Bacillus cereus*, respectively. The ethanolic extract of *Teucrium polium* with a minimum concentration of 50 ppm was only able to inhibit the bacterium *Vibrio cholerae*. The lowest inhibitory concentration of chloroprene methanolic extract of *Teucrium polium* with 25 ppm was observed against *Vibrio cholerae* bacterium and the bacterium *Bacillus cereus* grew at all concentrations. The lowest inhibitory concentration of ethyl acetate extract of *Teucrium polium* was observed with 12.5 ppm on *vibriochlora bacteria*. In general, ethanolic extracts of *Citrullus colocynthis* have been effective on *Listeria monocytogenes* bacteria and Ethyl acetate extracts of *Teucrium polium* have been effective on *Vibrio cholerae*, so it is recommended to use a special type of plant with the most effective solvent depending on the purpose of using herbal extracts.

Key Words: *antimicrobial effect, MIC, MBC, virulence Bacteria*