



مقایسه اثر ضد میکروبی حلال‌های آبی و الکلی گیاه آنگوزه (Frula In-vitro) تحت شرایط

فاطمه مشیری^۱، مصطفی گواهی^{۲*}، هاجر رجایی لیتکوهی^۲

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد زیست‌فناوری میکروبی، دانشکده زیست‌فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران.
۲. گروه نانو زیست‌فناوری، دانشکده زیست‌فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران.

چکیده

نوع مقاله: پژوهشی اصیل

مقدمه: در سال‌های اخیر، با افزایش مشکلات زیست‌محیطی و همچنین مقاومت میکروبی در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها، تلاش‌ها جهت گسترش و توسعه ترکیبات زیست‌فعال با قابلیت ضد میکروبی شدیداً افزایش یافته است. عصاره‌های گیاهی به عنوان منابع بالقوه از این ترکیبات زیستی از اهمیت فراوانی برخوردارند. هدف از مطالعه حاضر، بررسی و مقایسه فعالیت ضد میکروبی عصاره آبی و الکلی صمغ آنگوزه در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد.

روش: در این مطالعه تجربی، فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌های آبی و متانولی آنگوزه به روش انتشار دیسک مورد ارزیابی قرار گرفت. حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره‌ها بررسی شد. آنالیز داده‌ها با استفاده از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و با استفاده از نرم‌افزار SPSS 25 انجام شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد عصاره آبی در مقایسه با عصاره متانولی فعالیت ضد میکروبی بالاتری را داشته است، به گونه‌ای که کمترین مقدار MIC و MBC به ترتیب در غلظت‌های ۰/۷۷ و ۱/۵۵ میلی گرم بر میلی لیتر، برای عصاره آبی و علیه باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که نوع حلال و روش عصاره‌گیری تأثیر بسزایی در اثرات ضد باکتریایی ترکیبات زیست‌فعال دارد. عصاره‌های مختلف آنگوزه با داشتن فعالیت ضدباکتریایی مناسب علیه باکتری‌ها به ویژه باکتری‌های گرم مثبت، می‌توانند به عنوان یک منبع امیدبخش در فرآورده‌های بهداشتی و درمانی استفاده شوند.

کلید واژه‌ها: ترکیبات زیست‌فعال، آنگوزه، فعالیت ضدباکتریایی، حداقل غلظت کشندگی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۲۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۷/۱۵

*نویسنده مسئول: مصطفی

گواهی ۲. گروه نانو زیست‌فناوری، دانشکده زیست‌فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران.

تلفن: ۰۹۱۱۱۵۵۰۰۱۵

پست الکترونیک:

m.govahi@ausmt.ac.ir



مقدمه

با افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی در اکثر میکروارگانیسم ها و گسترش عوارض استفاده از داروهای شیمیایی، مطالعه و بررسی درمان های جایگزین امری ضروری و حیاتی به نظر می رسد. استفاده بی رویه از آنتی بیوتیک ها منجر به افزایش مقاومت های دارویی در اکثر آنتی بیوتیک ها گردید (۱). مقاومت باکتری های بیماری زا نسبت به آنتی بیوتیک های تجاری و شیوع بیماری های عفونی که برای درمان نیاز به این داروها داشتند و همچنین توانایی بالقوه برخی از گیاهان جهت تولید ترکیبات ضد میکروبی موثر، باعث شد تا توجه محققان به جایگزینی گیاهان دارویی^۱ با آنتی بیوتیک های سنتزی جلب گردد (۲). ترکیبات طبیعی موجود در این گیاهان منبع اصلی داروهای نوین به شمار می آیند و استفاده از آن ها به عنوان یک داروی جایگزین جهت درمان بیماری های مختلف در سال های اخیر افزایش یافته است (۳). به دلیل استفاده نادرست و بی رویه از داروهای ضد میکروبی، دانشمندان مجدداً به استفاده از ترکیبات گیاهی برای درمان بیماری های عفونی بازگشته اند. عصاره های گیاهی، دارای اثرات ضدباکتریایی شناخته شده هستند و استفاده از مواد گیاهی به عنوان منابع طبیعی برای درمان بیماری ها، به دلیل کاهش مقاومت دارویی و عوارض جانبی داروهای شیمیایی، بسیار مورد توجه است (۴). آنتی اکسیدان ها، ترکیباتی هستند که از سلول های بدن در برابر اثرات مخرب رادیکال های آزاد محافظت می کنند. گیاهان دارای ترکیبات مؤثری هستند که ممکن است خواص آنتی اکسیدانی، ضدباکتریایی، ضد ویروسی و ... داشته باشند. برخی از این ترکیبات شامل آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، تانن ها، ساپونین ها، گلیکوزیدها و ... هستند. این ترکیبات از طریق مکانیسم های مختلفی مانند مهار رشد میکروب ها، مهار تولید آنزیم های مضر در بدن و خنثی کردن رادیکال های آزاد، خواص درمانی خود را اعمال می کنند. همچنین، گیاهان دارویی می توانند به عنوان منبعی جهت تهیه داروهای جدید استفاده شوند. تحقیقات در این زمینه، بر روی شناسایی و استخراج ترکیبات فعال گیاهی و بررسی خواص درمانی آن ها متمرکز

است. در این فرآیند، ابتدا گیاهان دارای پتانسیل درمانی شناسایی شده و سپس ترکیبات فعال آن ها به طور مجزا استخراج و خواص درمانی آن ها بررسی می گردد. در مجموع، استفاده از گیاهان به عنوان منبعی برای درمان بیماری ها، به دلیل مزایای آن از جمله قیمت ارزان، دسترسی آسان و سازگاری با محیط زیست، همواره مورد توجه بوده است. با گسترش علوم مختلف و تمرکز بر روی شناسایی و استخراج ترکیبات فعال گیاهی، امکان استفاده از این منابع طبیعی برای درمان بیماری ها افزایش یافته است (۵). بر اساس مطالعات انجام شده، مشخص شده است که برخی از گیاهان دارویی که در پزشکی سنتی استفاده می شوند از اثرات ضدباکتریایی مناسبی برخوردارند. گیاهان دارویی سرشار از ترکیبات نوتراسوتیکال^۲ و زیست فعال می باشند که عموماً در قالب متابولیت های ثانویه گیاه شناخته می شوند. از مهم ترین متابولیت های ثانویه می توان به ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی اشاره نمود که دارای اثرات بیولوژیک گسترده ای از جمله فعالیت آنتی اکسیدانی و ضدباکتریایی کارآمد هستند (۶). خانواده چتریان یکی از خانواده های بزرگ گیاهی در ایران است که در مناطق مدیترانه و آسیای مرکزی گسترش یافته است. این خانواده شامل ۱۳۳ گونه است. برخی از اعضای این خانواده به عنوان سبزیجات ریشه ای و گیاهان معطر مصرف شده و میوه ها و دانه های آن ها برای معطر کردن مواد غذایی استفاده می شوند (۷). یکی از این گیاهان دارویی، آنغوزه با نام علمی *ferula assafoetida* است که در زمین های بایر، خشک و آهکی مناطق گرم آسیا می روید و بومی نواحی ایران و بخش هایی از کشور افغانستان است. آنغوزه گیاهی علفی و چن ساله است که متعلق به خانواده چتریان بوده و از رزین (۴۰ تا ۶۵ درصد)، صمغ (۲۰ تا ۲۵ درصد) و روغن فرار (۴ تا ۲۰ درصد) تشکیل شده است (۸). رویشگاه اصلی این گیاه در ایران، فلات مرکزی و نواحی کویری تا رشته کوه های زاگرس در استان های کهگیلویه و بویراحمد، کرمان، خراسان، اصفهان، بوشهر، سیستان و بلوچستان، لرستان، یزد، هرمزگان، فارس و سمنان می باشد



تهیه عصاره‌ی آنگوزه

صمغ گیاه آنگوزه جمع‌آوری شده و پس از تأیید گونه گیاهی در دانشکده گیاهان دارویی، به آزمایشگاه دانشکده زیست فناوری منتقل شد. پس از تمیز کردن و جداسازی آلودگی از نمونه گیاهی، به‌منظور به‌کارگیری موثر، در آسیاب پودر شد. جهت تهیه عصاره‌ی آبی، مقدار ۱۰ گرم از صمغ آسیاب‌شده آنگوزه در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل‌گردید، سپس بر روی همزن مغناطیسی با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت همگن شد. محلول حاصله به مدت ۷۲ ساعت درون انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری گردید و پس از گذشت ۱ ساعت استقرار در دمای اتاق، به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد و سپس با کاغذ صافی شماره ۱ فیلتر گردید. محلول به‌دست‌آمده در این مرحله توسط یک دستگاه خشک‌کن‌انجمادی (OPERON) ساخت کره جنوبی) در دمای ۴۰- درجه سانتی‌گراد خشک و تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد ذخیره شد.

همچنین به‌منظور تهیه عصاره‌ی متانولی آنگوزه، بعد از تغییر حلال به متانول ۷۰ درصد، مراحل فوق عیناً تکرار گردید. سپس، حلال توسط دستگاه روتاری تحت‌خلأ (RV 10 Digital V_C ساخت آلمان) از عصاره جدا شده و تا هنگام استفاده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید (۱۵).

بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره‌ها

به منظور بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های آبی و متانولی آنگوزه، از روش انتشار دیسک^۳ استفاده شد. این ارزیابی با استفاده از باکتری‌های گرم‌مثبت^۴ (PTCC 1431)، لیستریا مونوسیتوژنز^۵ (بالینی)، باسیلوس سوبتیلیس^۶ (PTCC 654) و باکتری‌های گرم منفی سالمونلا تیفی‌موریوم^۷ (PTCC 1709).

(۹). آمبلیفرون^۱، فارنسیفرول‌های A، B و C، کامولونول فرولیک‌اسید^۲ و مشتقات کومارینی فوتتیدین در صمغ آنگوزه وجود دارد (۱۰). صمغ این گیاه از بریدن ریشه یا قطع ساقه آن به‌دست‌می‌آید. این صمغ ترکیبات مؤثره فراوانی نظیر گلوکز، گالاکتوز، رامنوز، گلیکوپروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها را دارا است و برای درمان بیماری‌های متعددی از قبیل اختلالات گوارشی، گرفتگی عضلات، درد کلیه و همچنین درمان گزیدگی حشرات استفاده می‌شود (۱۱). آنگوزه در تهیه داروهای ضد میکروب، ضد قارچ، ضد تشنج و درد معده مؤثر است و در درمان بیماری‌های عصبی و تنفسی مانند آسم و اسپاسم حنجره نیز استفاده می‌شود (۱۲، ۱۳). عصاره‌ی برگ آنگوزه نیز دارای خاصیت ضد باکتریایی، ضد سرطانی و سایتوتوکسیک قابل‌توجهی است. متأسفانه طی سال‌های اخیر به دلیل برداشت بی‌رویه، غیرعلمی و سنتی این گیاه باعث کاهش مقدار رویش این گونه گیاهی شده است و به همین دلیل تراکم بوته‌های آنگوزه در مراتع به شدت پایین‌آمده و نسل این گیاه مفید در معرض خطر انقراض است (۱۴). مطالعات اخیر نشان‌دهنده آنکه عوامل متعددی از قبیل موقعیت جغرافیایی، ترکیبات بستر، تنوع ژنتیکی، استفاده از قسمت‌های مختلف گیاه، تفاوت در ماهیت شیمیایی، شرایط نگهداری و همچنین انتخاب روش‌های متفاوت عصاره‌گیری به‌خصوص تفاوت در نوع حلال مورد استفاده، به‌طور قابل‌توجهی بر میزان فعالیت ضد میکروبی و ظرفیت آنتی-اکسیدانی عصاره و یا میزان ترکیبات زیست‌فعال موجود در آن تأثیر می‌گذارد که می‌تواند منجر به کاهش، ثبات و یا افزایش میزان آن‌ها گردد (۲).

هدف از مطالعه حاضر ارزیابی و مقایسه فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های آبی و متانولی گیاه آنگوزه در برابر تعدادی از باکتری‌های بیماری‌زا و بررسی امکان استفاده از آن در صنایع بهداشتی - دارویی و درمانی می‌باشد.

روش‌ها

Staphylococcus aureus^۴

Listeria monocytogenes^۵

Bacillus subtilis^۶

Salmonella typhimurium^۷

Amblyferon^۱

Ferulic acid^۲

Disk diffusion^۳



ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. کمترین غلظتی که توانست ۹۹/۹٪ باکتری-ها را از بین ببرد به عنوان MBC تعیین شد (۱۷).

آنالیز آماری

برای اطمینان از دقت نتایج آزمایش‌ها، هر آزمایش سه بار انجام شد. تمامی محاسبات با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۵ انجام شد. تجزیه و تحلیل آماری آزمایش‌های انجام شده با استفاده از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون تعقیبی چند دامنه‌ای دانکن به صورت انحراف استاندارد $\pm$ میانگین (mean $\pm$ SD) استفاده شد. از نظر آماری نیز مقدار P-value کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره‌ها

اثر ضد میکروبی عصاره آبی و متانولی آنگوزه بر روی تعدادی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که فعالیت ضد باکتریایی عصاره وابسته به غلظت بوده است. همچنین، مشخص شد که فعالیت ضد باکتریایی عصاره آبی به مراتب بیشتر از عصاره متانولی است. به گونه‌ای که بالاترین میزان بازدارندگی در غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره آبی با قطر هاله عدم رشد $30 \pm 0/2$ بر علیه باکتری گرم مثبت *باسیلوس سوبتیلیس* مشاهده شد. این در حالی است که بیشترین میزان هاله‌ی عدم رشد عصاره متانولی در غلظت مشابه بر علیه همین باکتری به میزان $28 \pm 0/21$ بوده است. کمترین میزان هاله‌ی عدم رشد نیز به میزان $12 \pm 0/13$ در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر علیه باکتری منفی *سالمونلاتیفی موریوم* مشاهده شد. فعالیت ضد میکروبی عصاره آبی و متانولی آنگوزه به ترتیب در جداول ۱ و ۲ آورده شده است.

سودوموناس آئروژینوزا^۱ (PTCC 1074) و *شریشیاکلی*^۲ (PTCC 1399) طبق استاندارد (CLSI M02-A11) انجام شد (۱۶). برای این منظور سوسپانسیون‌های باکتریایی رشد یافته درون محیط کشت نوترینت براث (استاندارد شده با نیم‌مک‌فارلند)، بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار پخش گردید و پس از قرار دادن دیسک‌های کاغذی استریل بر روی سطح آگار، ۲۰ میکرولیتر از هریک از عصاره‌ها با غلظت‌های مختلف (۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر میلی-لیتر)، به دیسک‌ها اضافه شد. از دیسک آنتی‌بیوتیک جنتامایسین (۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) برای باکتری‌های گرم منفی و وانکومایسین (۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) برای باکتری‌های گرم مثبت، به عنوان دیسک‌های استاندارد استفاده شد. در نهایت صفحات تلقیح شده با باکتری‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. مناطق مهار رشد بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری گردید (۱۷).

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC^۳) و حداقل غلظت کشندگی (MBC^۴)

حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره‌های آبی و متانولی آنگوزه توسط روش ماکرودایلوشن براث^۵ منطبق با استاندارد (CLSI M07-A8) ارزیابی شد (۱۸). برای این منظور، ابتدا سوسپانسیون‌های باکتریایی هریک از سویه‌های باکتریایی (مطابق استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند) در محیط کشت نوترینت براث تهیه شده و سپس در لوله‌های آزمایش استریل توزیع گردید. در ادامه حجم معین از رقت‌های دو برابری عصاره (با غلظت ۰/۰۲ تا ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به آن اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. حداقل غلظت عصاره که در آن هیچ کدورتی مشاهده نشده است به عنوان مقدار MIC در نظر گرفته شد. در ادامه نیز به منظور تعیین MBC، ۵۰ میکرولیتر از غلظت‌های فاقد کدورت بر روی پلیت‌های حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴

Minimum bactericidal concentration^۱
Broth Macro dilution^۵

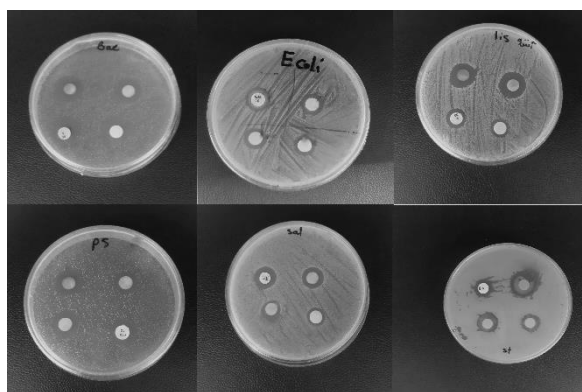
Pseudomonas aeruginosa^۱
Escherichia coli^۲
Minimum inhibitory concentration^۳



جدول ۱- قطر هاله عدم رشد باکتری ها در مقابل غلظت های مختلف عصاره آبی آنغوزه (بر حسب میلی متر)

نوع آنتی بیوتیک	آنتی بیوتیک	غلظت عصاره (میلی گرم / میلی لیتر)			میکروارگانیزم
		۴۰۰	۲۰۰	۱۰۰	
جنتامایسین (۱۰ μg/mL)	۱۸ ± ۰/۰	۱۵ ± ۰/۱۳ ⁱ	۱۴ ± ۰/۱۶ ^j	۱۲ ± ۰/۱۳ ^m	سالمونلا تیفی موریوم
جنتامایسین (۱۰ μg/mL)	۲۰ ± ۰/۰	۱۸ ± ۰/۱۵ ^h	۱۵ ± ۰/۱۹ ⁱ	۱۳ ± ۰/۱۵ ^k	اشریشیا کلی
جنتامایسین (۱۰ μg/mL)	۲۰ ± ۰/۰	۲۵ ± ۰/۲۰ ^d	۲۰ ± ۰/۲۵ ^f	۱۸ ± ۰/۱۶ ^h	سودوموناس آنروژینوزا
وانکومایسین (۳۰ μg/mL)	۲۰ ± ۰/۰	۲۸ ± ۰/۲۴ ^b	۲۵ ± ۰/۲۲ ^d	۱۹ ± ۰/۲۳ ^g	لیستریا مونوسیتوژنز
وانکومایسین (۳۰ μg/mL)	۱۸ ± ۰/۰	۳۰ ± ۰/۲۳ ^a	۲۶ ± ۰/۲۳ ^c	۲۰ ± ۰/۲۱ ^f	باسیلوس سوبتیلیس
وانکومایسین (۳۰ μg/mL)	۱۸ ± ۰/۰	۲۶ ± ۰/۲۱ ^c	۲۴ ± ۰/۲۰ ^c	۱۸ ± ۰/۱۸ ^h	استافیلوکوکوس اورئوس

* میانگین هایی که حداقل دارای یک حرف مشابه هستند، بر مبنای آزمون چند دامنه ی دانکن در سطح ۰/۰۵ تفاوت معنی داری ندارند.



شکل ۱. قطر هاله مهارت تست دیسک دیفیوژن عصاره آبی آنغوزه.

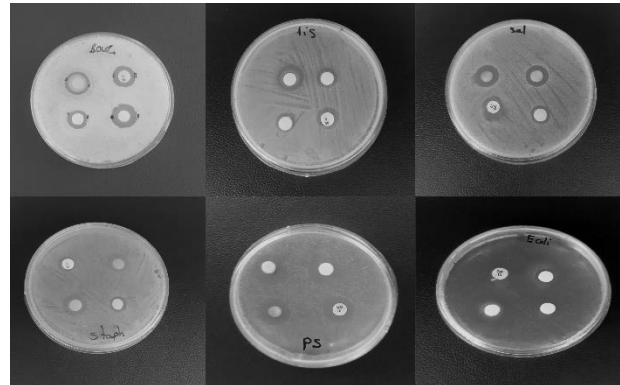
جدول ۲- قطر هاله عدم رشد باکتری ها در مقابل غلظت های مختلف عصاره متانولی آنغوزه (بر حسب میلی متر)

نوع آنتی بیوتیک	آنتی بیوتیک	غلظت عصاره (میلی گرم / میلی لیتر)			میکروارگانیزم
		۴۰۰	۲۰۰	۱۰۰	
جنتامایسین (۱۰ μg/mL)	۱۸ ± ۰/۰	۱۵ ± ۰/۲۰ ^j	۱۴ ± ۰/۲۴ ^k	۱۳ ± ۰/۱۳ ^m	سالمونلا تیفی موریوم
جنتامایسین (۱۰ μg/mL)	۲۰ ± ۰/۰	۱۶ ± ۰/۱۵ ⁱ	۱۴ ± ۰/۱۹ ^k	۱۲ ± ۰/۱۵ ⁿ	اشریشیا کلی
جنتامایسین (۱۰ μg/mL)	۲۰ ± ۰/۰	۲۳ ± ۰/۲۰ ^d	۱۹ ± ۰/۲۵ ^g	۱۵ ± ۰/۱۵ ^j	سودوموناس آنروژینوزا
وانکومایسین (۳۰ μg/mL)	۲۰ ± ۰/۰	۲۵ ± ۰/۲۴ ^b	۲۳ ± ۰/۲۰ ^d	۱۷ ± ۰/۲۳ ^h	لیستریا مونوسیتوژنز
وانکومایسین (۳۰ μg/mL)	۱۸ ± ۰/۰	۲۸ ± ۰/۲۱ ^a	۲۴ ± ۰/۲۴ ^c	۲۰ ± ۰/۱۵ ^f	باسیلوس سوبتیلیس
وانکومایسین (۳۰ μg/mL)	۱۸ ± ۰/۰	۲۵ ± ۰/۲۰ ^b	۲۲ ± ۰/۲۰ ^c	۱۷ ± ۰/۱۸ ^h	استافیلوکوکوس اورئوس

* میانگین هایی که حداقل دارای یک حرف مشابه هستند، بر مبنای آزمون چند دامنه ی دانکن در سطح ۰/۰۵ تفاوت معنی داری ندارند.

بحث

در سال های اخیر، تمایل روز افزونی به استفاده از عصاره های طبیعی به عنوان ترکیبات آنتی اکسیدانی، ضد میکروبی و نگهدارنده وجود دارد. استفاده از آنتی اکسیدان های طبیعی موثر است زیرا این ترکیبات با از بین بردن رادیکال های آزاد و جلوگیری از عوارض جانبی آن ها باعث سلامتی می شوند. گیاهان دارای خواص آنتی اکسیدانی هستند زیرا حاوی مقدار زیادی ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی می باشند. ترکیبات زیست فعال گیاهی پتانسیل زیادی در درمان بیماری ها دارند زیرا بدون عوارض جانبی عمل می کنند. مطالعات نشان می دهد که تشکیل این ترکیبات در گیاهان نتیجه فعال شدن مسیرهای سنتز متابولیت های ثانویه است و می تواند به اشکال مختلف رخ دهد. به نظر می رسد مقدار این متابولیت های ثانویه توسط عوامل محیطی مانند موقعیت جغرافیایی و شرایط استخراج تغییر می کند (۱۹). گیاهان با تولید و ذخیره سازی طیف متنوعی از مولکول های فعال زیستی، به یک منبع غنی و ارزشمند جهت تولید و توسعه انواع مختلف داروها بدل شده اند. عصاره های گیاهی غنی از ترکیبات زیست فعال در شرایط آزمایشگاهی فعالیت ضد میکروبی بالایی را از خود به نمایش گذاشته اند (۲۰).



شکل ۲. قطر هاله مهارتی تست دیسک دیفیوژن عصاره متانولی آنگوزه.

تعیین حداقل غلظت مهارتی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)

میزان MIC و MBC عصاره ی آبی و متانولی گیاه آنگوزه در برابر تعدادی از سویه های باکتریایی در جدول ۳ آورده شده است. نتایج نشان داد که عصاره آبی آنگوزه، به مراتب فعالیت بازدارندگی و کشندگی بالاتری را در برابر باکتری ها از خود به نمایش گذاشته است. به گونه ای که کمترین مقدار MIC و MBC عصاره آبی با بالاترین فعالیت ضد باکتریایی در برابر باکتری گرم مثبت باسیلوس سوبتیلیس به ترتیب در غلظت های ۰/۷۷ و ۱/۵۵ میلی گرم بر میلی لیتر مشاهده شد.

جدول ۳- حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی عصاره آنگوزه (بر حسب میلی گرم در میلی لیتر)

عصاره آبی آنگوزه		عصاره متانولی آنگوزه		باکتری
MBC	MIC	MBC	MIC	
۶/۲۵ ^d	۳/۱۳ ^c	۶/۲۵ ^d	۳/۱۳ ^c	سالمونلا تیفی موریوم
۲۵ ^f	۶/۲۵ ^d	۲۵ ^f	۱۲/۵ ^e	اشریشیا کلی
۲۵ ^f	۶/۲۵ ^d	۲۵ ^f	۱۲/۵ ^e	سودوموناس آئروژینوزا
۶/۲۵ ^d	۳/۱۳ ^c	۱۲/۵ ^e	۶/۲۵ ^d	لیستریا مونوسیتوژنز
۱/۵۵ ^b	۰/۷۷ ^a	۳/۱۳ ^c	۱/۵۵ ^b	باسیلوس سوبتیلیس
۶/۲۵ ^d	۳/۱۳ ^c	۱۲/۵ ^e	۳/۱۳ ^c	استافیلوکوکوس اورئوس
* میانگین هایی که حداقل دارای یک حرف مشابه هستند، بر مبنای آزمون چنددامنه ی دانکن در سطح ۰/۰۵ تفاوت معنی داری ندارند.				



ترکیبات ضد میکروبی گیاهی پتانسیل درمانی زیادی دارند، زیرا می توانند بدون هیچ گونه عوارض جانبی ایفای نقش کنند. مطالعات نشان داده اند که ترشح ترکیبات مؤثره گیاهی به دلیل فعال شدن مسیر سنتز متابولیت های ثانویه آن می باشد که می تواند در گیاهان مختلف، به اشکال متفاوتی دیده شود. به نظر می رسد میزان متابولیت های ثانویه تحت تأثیر شرایط مختلفی از قبیل موقعیت جغرافیایی و نحوه استخراج آن ها از گیاه متفاوت باشد (۱۹). گیاه آنغوزه یکی از گونه های معروف *Ferula* است که در طب سنتی ایران جهت درمان بیماری های گوارشی و مشکلات عصبی استفاده می شود. گزارش های علمی جدید نشان داده اند که آنغوزه دارای خاصیت ضد قارچی، ضد دیابتی، ضد التهابی، ضد ویروسی، ضد سرطان و ضد میکروبی قابل توجهی است (۲۱).

از این رو در مطالعه حاضر، فعالیت ضد باکتریایی عصاره آبی و متانولی آنغوزه ارزیابی و نتایج به دست آمده مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج آزمون انتشار دیسک نشان داد که با افزایش غلظت عصاره ها، قطر هاله عدم رشد باکتریایی نیز افزایش می یابد. به طوری که بیشترین میزان قطر هاله عدم رشد برای عصاره آبی آنغوزه در غلظت ۴۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر، بر علیه باکتری گرم مثبت باسیلوس سوبتیلیس بوده است. نتایج حاصل از آزمون MIC و MBC نیز به طور معنی داری منطبق با یافته فوق بود. اگرچه باسیلوس سوبتیلیس عمدتاً به عنوان یک باکتری غیر بیماری زا شناخته می شود، با این حال مطالعات نشان داده اند که می تواند در شرایط خاص، به ویژه در افراد با سیستم ایمنی ضعیف، باعث ایجاد بیماری شود. همچنین می تواند مواد غذایی را آلوده کند و منجر به مسمومیت غذایی به ویژه در محصولات نانوائی شود. بنابراین نقش آن به عنوان یک پاتوژن فرصت طلب، اهمیت زمینه را هنگام ارزیابی پتانسیل بیماری زایی آن برجسته می کند (۲۲، ۲۳). این در حالی است که باکتری گرم منفی *سالمونلاتیفی موریوم* به

مراتب نسبت به غلظت های مختلف عصاره آبی و متانولی آنغوزه مقاوم تر بوده است. نتیجه به دست آمده مطابق با نتایج توصیف شده توسط دوانسن^۱ و همکاران (۲۰۲۰) است (۲۴). مطالعات نشان داده اند که ترکیبات فنلی موجود در عصاره می تواند با ایجاد اختلال در فعالیت پروتئین های باکتری ها موجب تخریب دیواره سلولی آن ها گردد. علاوه بر این مشخص شده است که ترکیبات زیستی با خاصیت هیدروفوبی می توانند به راحتی از دیواره باکتری های گرم مثبت عبور کنند، از این رو، انتظار می رود که خاصیت ضد باکتریایی آن ها علیه باکتری های گرم مثبت به مراتب بیشتر از گرم منفی باشد. باکتری های گرم منفی به دلیل ساختار خاص دیواره های سلولی، مقاومت بیشتری نسبت به باکتری های گرم مثبت دارند. دیواره سلولی این باکتری ها حاوی لیپوپلی ساکراید (LPS) است که به عنوان یک سد قوی عمل می کند و از ورود بسیاری از آنتی بیوتیک ها و مواد مضر به سلول جلوگیری می کند. علاوه بر این، باکتری های گرم منفی اغلب دارای پمپ های خروجی هستند که سموم و داروها را از سلول خارج می کنند که به افزایش مقاومت آن ها کمک می کند. بنابراین، ترکیب این خواص باعث می شود که باکتری های گرم منفی در برابر درمان با آنتی بیوتیک ها و سایر عوامل ضد میکروبی مقاوم تر شوند. آلوارز^۲ و همکاران (۲۰۲۰) گزارش کردند که باکتری های گرم منفی به دلیل وجود یک لایه نازک از موکوپتید در برابر ترکیبات ضد میکروبی مقاوم تر هستند (۲۵).

بر اساس نتایج به دست آمده از چندین پژوهش مشابه از جمله مطالعه قاسمی^۳ و همکاران (۲۰۲۳) بر روی بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره آبی و هیدروالکلی صمغ گیاه باریجه (۱۷)، وفا^۴ و همکاران (۲۰۲۰) بر روی بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره آبی و متانولی گونه ای از گیاه رزماری (۲۶)، حاجی



نتیجه گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که فعالیت ضد میکروبی عصاره های آبی و متانولی آنغوزه تحت تأثیر نوع حلال متفاوت است. به گونه ای که عصاره آبی نسبت به عصاره متانولی از فعالیت ضد میکروبی بالاتری برخوردار بوده است. علاوه بر این، فعالیت ضد باکتریایی قابل توجه عصاره آنغوزه در برابر باکتری های مورد مطالعه به ویژه باکتری های گرم مثبت، نشان داد که این ترکیبات به دلیل فعالیت های زیستی بالقوه، می توانند جایگزینی مناسب و ارزان قیمت برای آنتی بیوتیک های سنتتیک در نظر گرفته شوند و به عنوان یک ترکیب ضد میکروبی مناسب در صنایع غذایی و فرآورده های بهداشتی - درمانی استفاده شوند. البته لازم است تا توکسیسیته مقدار عصاره توصیه شده قبل از استفاده انسانی بررسی شود و در این زمینه مطالعات بیشتری از قبیل بررسی ترکیبات اصلی و مؤثر این گیاه به همراه مکانیسم عملکرد آن مورد نیاز است که در تحقیقات آینده مورد توجه قرار گیرد.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می کنند که هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

ملاحظات اخلاقی و کد اخلاق

این مقاله مستخرج از پایان نامه سرکار خانم فاطمه مشیری به راهنمایی دکتر مصطفی گواهی و مشاوره دکتر هاجر رجایی لیتکوهی در مقطع کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی میکروبی در دانشکده بیوتکنولوژی دانشگاه تخصصی فناوری های نوین آمل بوده که دارای کد اخلاق IR.ASMT.REC.1402.010 می باشد.

قاسمی^۱ و همکاران (۲۰۲۲) بر روی بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره آبی و هیدروالکلی گیاه عروسک پشت پرده (۲۷) و همچنین مطالعه پاتیل^۲ و همکاران (۲۰۱۵) بر روی ارزیابی فعالیت ضد میکروبی عصاره های مختلف گونه ای از آنغوزه (۸)، این چنین پیش بینی می شد که به دلیل حلالیت بیشتر ترکیبات آروماتیک در حلال های الکلی مانند متانول، فعالیت ضد باکتریایی عصاره متانولی بیشتر از عصاره آبی باشد، اما این نتیجه در مطالعه حاضر مشاهده نشد. در مطالعه غلامی^۳ و همکاران (۲۰۱۶) مشخص شد که عصاره آبی گیاه بن سرخ^۴ دارای فعالیت ضد میکروبی بیشتری نسبت به عصاره متانولی آن است، که این یافته مشابه نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر است. آن ها پیشنهاد کردند که چنین عصاره ای می تواند به عنوان یک عامل ضد میکروبی طبیعی در نگهداری مواد غذایی استفاده شود (۲۸). به نظر می آید علت این اختلاف ها، تفاوت در ماهیت ترکیبات گیاهی یافت شده در گیاهان دارویی مختلف، قسمت های مختلف گیاه که برای عصاره گیری انتخاب می شوند، محل رویش، زمان برداشت و همچنین تفاوت در روش های عصاره گیری و حلال های مختلف باشد (۲۹). در مطالعه ای که توسط سنگچولی^۵ و همکاران (۲۰۲۴) بر روی بررسی فعالیت های آنتی اکسیدانی و ضد باکتریایی اسانس های آنغوزه جمع آوری شده از مناطق مختلف ایران صورت گرفت مشخص شد که اسانس ها با منشأ متفاوت دارای فعالیت ضد باکتریایی متفاوتی هستند. همچنین مشخص شد که باکتری های گرم مثبت در مقایسه با باکتری های گرم منفی اثرات بازدارندگی و باکتری کشی بالاتری را دارند که با نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر منطبق است (۳۰). به طور کلی، با توجه به نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر، پتانسیل ضد میکروبی مناسب عصاره های آبی و متانولی گیاه آنغوزه می تواند نشان دهنده قابلیت بالقوه آن ها جهت مبارزه با پاتوژن های میکروبی انسانی به ویژه گونه های گرم مثبت باشد.



مشارکت نویسندگان

فاطمه مشیری و مصطفی گواهی در ارائه ایده، فاطمه مشیری و مصطفی گواهی و هاجر رجایی لیتکوهی در طراحی مطالعه، فاطمه مشیری در جمع آوری داده‌ها، مصطفی گواهی و هاجر رجایی لیتکوهی در تجزیه و تحلیل داده‌ها مشارکت داشته و همه نویسندگان در تدوین، ویرایش اولیه و نهایی مقاله و پاسخگویی به سوالات مرتبط با مقاله سهیم هستند.

References

1. Larsson DJ, Flach C-F. Antibiotic resistance in the environment. *Nature Reviews Microbiology*. 2022;20(5):257-69.
2. Ghanbari Hassan Kiadeh S, Rahaiee S, Azizi H, Govahi M. Evaluation of biological activities of raw and cooked *Brassica oleracea* sprout extracts rich in bioactive compound Sulforaphane. *Journal of Birjand University of Medical Sciences*. 2021;28(3):236-47.
3. Singh C, Parmar RS. Antimicrobial activity of resin of *Asafoetida* (Hing) against certain human pathogenic bacteria. *Advances in Bioresearch*. 2018;9(1).
4. Al-Rifai A, Aqel A, Al-Warhi T, Wabaidur SM, Al-Othman ZA, Badjah-Hadj-Ahmed AY. Antibacterial, antioxidant activity of ethanolic plant extracts of some *Convolvulus* species and their DART-ToF-MS profiling. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2017;2017.
5. Alipour Kakroudi A, Rahaiee S, Rajaei Litkahi H, Ghanbari Hassan Kiadeh S. Comparison of antioxidant and antibacterial activities of various herbal essential oils: An In vitro study. *Journal of Birjand University of Medical Sciences*. 2021;28(4):322-34.
6. Zakerin A, Ahmadi E, Fasihi-Ramandi M, Abdollahi S, Molazadeh A, Jafari S, et al. The effects of ecologic condition on antimicrobial activity of endemic herbal extracts in fars province. *Journal of Advanced Biomedical Sciences*. 2015;5(1):111-9.
7. Eizadifard F, Tafrihi M, Mohadjerani M. Antioxidant, cytotoxic, and genotoxic potentials of the gum of *Ferula gummosa* Boiss on PC-3 cells. 2023.
8. Patil S, Shinde S, Kandpile P, Jain A. Evaluation of antimicrobial activity of *asafoetida*. *International journal of pharmaceutical sciences and research*. 2015;6(2):722.
9. Khosravi H, & Mehrabi, A. . Economic study of *Ferula* harvesting in Tabass region. 2006.
10. Newall CA AL, Phillipson JD. Herbal medicines: a guide for health-care professionals. 1st ed London: Pharmaceutical Press. 1996.
11. Dehpour AA, Ebrahimzadeh MA, Fazel NS, Mohammad NS. Antioxidant activity of the methanol extract of *Ferula assafoetida* and its essential oil composition. *Grasas y aceites*. 2009;60(4):405-12.
12. Singh R. In-vitro evaluation of aqueous and alcoholic extracts of spices for antifungal properties. *The Indian Journal of Animal Sciences*. 2007;77(8).
13. Sitara U, Niaz I, Naseem J, Sultana N. Antifungal effect of essential oils on in vitro growth of pathogenic fungi. *Pakistan Journal of Botany*. 2008;40(1):409.
14. Zare Karizi A. A review on pharmacological effects of *Ferula assa-foetida* L.: a systematic review. 2011.
15. Salayová A, Bedlovičová Z, Daneu N, Baláž M, Lukáčová Bujňáková Z, Balážová Ľ, et al. Green synthesis of silver nanoparticles with antibacterial activity using various medicinal plant extracts: Morphology and antibacterial efficacy. *Nanomaterials*. 2021;11(4):1005.
16. CLSI WL. M02-A11: Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved Standard. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). 2015;32(1).



17. Ghasemi M, Govahi M, Litkahi HR. Evaluation of antimicrobial and antioxidant activities of aqueous and hydroalcoholic extracts of *Ferula gummosa* Boiss plant gum: An in-vitro study. *Journal of Birjand University of Medical Sciences*. 2023;30(3):243-56.
18. Standard C. M07; Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Approved standard. 2018.
19. Hassanabadi M, Ebrahimi M, Farajpour M, Dejahang A. Variation in essential oil components among Iranian *Ferula assa-foetida* L. accessions. *Industrial crops and products*. 2019;140:111598.
20. Hinds L, Kenny O, Hossain M, Walsh D, Sheehy E, Evans P, et al. Evaluating the antibacterial properties of polyacetylene and glucosinolate compounds with further identification of their presence within various carrot (*Daucus carota*) and Broccoli (*Brassica oleracea*) cultivars using high-performance liquid chromatography with a diode array detector and ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry analyses. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2017;65(33):7186-91.
21. Sirizi MAG, Ghalenoei JA, Allahtavakoli M, Forouzanfar H, Bagheri SM. Anticancer potential of *Ferula assa-foetida* and its constituents, a powerful plant for cancer therapy. *World journal of biological chemistry*. 2023;14(2):28.
22. André S, Vallaey S, Planchon S. Spore-forming bacteria responsible for food spoilage. 2017.
23. Turnbull PC, Kramer J, Melling J. *Bacillus*. *Medical microbiology*. 1996;4:233.
24. Devanesan S, Ponnuragan K, AlSalhi MS, Al-Dhabi NA. Cytotoxic and antimicrobial efficacy of silver nanoparticles synthesized using a traditional phytoproduct, asafoetida gum. *International Journal of Nanomedicine*. 2020;4351-62.
25. Álvarez-Martínez FJ, Barrajón-Catalán E, Encinar JA, Rodríguez-Díaz JC, Micol V. Antimicrobial capacity of plant polyphenols against gram-positive bacteria: A comprehensive review. *Current medicinal chemistry*. 2020;27(15):2576-606.
26. Wafa N, Sofiane G. Antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial activities of aqueous and methanolic extract of *Rosmarinus eriocalyx* Jord. & Fourr. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*. 2020;14(1):254-62.
27. Haji Ghasemi M, Govahi M, Ranjbar M. Evaluation of Antibacterial Activity of Aqueous and Hydroalcoholic Extracts of *Physalis alkekengi* Fruit against Four Standard Strains in vitro. *Journal of Ardabil University of Medical Sciences*. 2022;22(4):323-32.
28. Gholami A, Arabestani MR, Ahmadi M. Evaluation of antibacterial activity of aqueous and methanol extracts of *Allium Jesdianum* plant on a number of pathogenic bacteria resistant to antibiotics. *Pajouhan Scientific Journal*. 2016;14(4):18-26.
29. Ahmed K, Tariq I, Mudassir SUSM. 11. Green synthesis of cobalt nanoparticles by using methanol extract of plant leaf as reducing agent. *Pure and Applied Biology (PAB)*. 2021;5(3):453-7.
30. Sangchooli T, Aboulhassanzadeh S, Aghazadeh H, Paeizi M, Shokri D, Malekzadeh M. Chemical Composition, Antioxidant Properties, and Antimicrobial Activity of *Ferula assa-foetida* L. Essential Oil against Pathogenic Bacteria. 2024.



Comparative Evaluation of the Effects of Aqueous and Alcohol Solvents on the Antibacterial Activities of Stinking Assa (Ferula Assafoetida) under in-vitro Conditions

Fatemeh Moshiri¹, Mostafa Govahi^{*2}, Hajar Rajaei Litkahi²

1- Department of Microbial Biotechnology, Faculty of Biotechnology, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran

2- Department of Nano Biotechnology, Faculty of Biotechnology, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran

Type of Article Original Research

Received: 2024/01/14

Accepted: 2024/10/6

*Corresponding Author:

Mostafa Govahi: Department of Nano Biotechnology, Faculty of Biotechnology, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran

TEL: +989111550015

Email:

(m.govahi@ausmt.ac.ir)

Abstract

Introduction: Due to the increase in environmental problems as well as microbial resistance against antibiotics in recent years, efforts to expand and develop bioactive compounds with antimicrobial capability have greatly increased. Plant extracts are an important source of these compounds. The present study aimed to investigate and compare the antimicrobial activity of the aqueous and methanolic extracts of *Ferula assafoetida*.

Methods: In this experimental study, the antibacterial activity of the aqueous and methanolic extracts of *Ferula assafoetida* was evaluated using the disk diffusion method. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were evaluated. Data analysis was performed using factorial experiments with a completely randomized design using SPSS 25 software.

Results: Results showed that the aqueous extract had higher antimicrobial activity compared to the methanolic extract. The highest zone of inhibition with a diameter of 30 ± 0.2 mm was observed for the aqueous extract at a concentration of 400 mg/mL against the gram-positive *Bacillus subtilis*. The lowest MICs and MBCs were observed for the aqueous extract against gram-positive *Bacillus subtilis* at concentrations of 0.77 and 1.55 mg/mL, respectively.

Conclusion: In general, the results of this study showed that the type of solvent and extraction method significantly affected the antibacterial effects of bioactive compounds. Different extracts of *Ferula assafoetida*, with appropriate antibacterial activity against bacterial strains, especially gram-positive ones, can be used as promising sources for health and therapeutic products.

Keywords: Antibacterial activity, Bioactive compounds, *Ferula assafoetida*, Minimum bactericidal concentration

► Please cite this article as: Moshiri F, Govahi M, Rajaei Litkahi H. Comparative evaluation of the effects of aqueous and alcohol solvents on the antibacterial activities of Stinking assa (*ferula assafoetida*) under in-vitro conditions. J Neyshabur Univ Med Sci 2022;10(4):31-41.