



بررسی اثر ضد میکروبی عصاره‌های هیدروالکلی رازک (*Humulus lupulus*)، پونه (*Mentha longifolia* L) و ریحان (*Ocimum basilicum*) بر روی باکتری بروسلا آبرتوس (*Brucella abortus*) در شرایط آزمایشگاهی

سیدرضا مرتضوی باباحیدری

دانشکده کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تبریز، ایران

Email: mortazavi826@gmail.com

حجت اقبال

گروه فیتوشیمی مرکز تحقیقات علوم پایه، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

رعنا نوتاراج آلودجی

دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

علی اصغر کاظم‌زاده

دانشکده طب سنتی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

چکیده

بروسلوز یا تب‌مالت توسط پاتوژن‌های داخل سلولی از جنس بروسلا ایجاد می‌شود که مخزن طبیعی آن حیوانات خانگی و وحشی می‌باشند. بررسی‌ها نشان می‌دهند که گیاهان دارویی می‌توانند با اطمینان و به‌طور موفقیت‌آمیز در درمان بیماری‌های باکتریایی بدون بروز اثرات مضر و مقاومت‌های دارویی به کاربرده شوند به‌همین منظور تحقیق حاضر با هدف درمان این بیماری با استفاده از گیاهان دارویی انجام شده است. در این مطالعه اثر ممانعتی عصاره‌های هیدروالکلی رازک، ریحان و پونه و مخلوط‌های دو گانه و سه گانه عصاره‌های این گیاهان بر روی رشد باکتری بروسلا آبرتوس در شرایط آزمایشگاهی انجام شد. با توجه به مطالعات انجام شده، گیاهان دارویی فوق اثرات قابل ملاحظه‌ای را در جلوگیری از رشد انواع مختلفی از پاتوژن‌های بیماری‌زا دارا می‌باشند، در این مطالعه به‌منظور بررسی اثر مهارتی عصاره‌ها از دو روش آنتی-بیوگرم و MIC استفاده شد نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که مخلوط سه‌گانه‌ی عصاره‌های پونه، رازک، ریحان با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با قطر هاله ۲۸ میلی‌متر دارای بیش‌ترین قطر هاله عدم رشد و عصاره هیدروالکلی ریحان با غلظت ۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با ایجاد قطر هاله ۵ میلی‌متری کم‌ترین قطر هاله عدم رشد باکتری بروسلا آبرتوس را به‌خود اختصاص می‌دهد. هم‌چنین مخلوط سه‌گانه رازک، پونه و ریحان نتایج نسبتاً مشابهی را نسبت به آنتی‌بیوتیک ریفامپین از خود نشان دادند. نتایج حاصل از حداقل غلظت مهارکنندگی نیز نشان داد که کم‌ترین میزان غلظت مهارکنندگی مربوط به آنتی‌بیوتیک ریفامپین و مخلوط سه‌گانه عصاره هیدروالکلی پونه، رازک و ریحان و بیش‌ترین آن مربوط به عصاره هیدروالکلی گیاه دارویی ریحان می‌باشد.

کلید واژه: تب‌مالت، بروسلوزیس، بروسلا آبرتوس، عصاره هیدروالکلی، Disk diffusion، MIC.

مقدمه

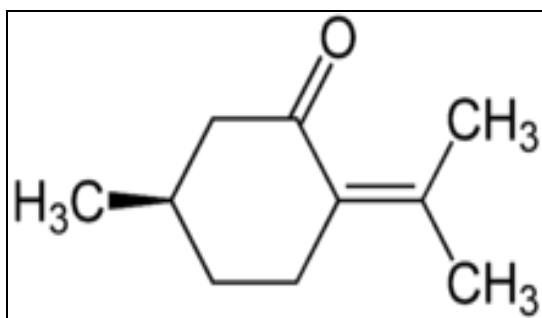
بروسلوز یا تب‌مالت یکی از بیماری‌های مشترک بین انسان و دام است. که عمدتاً در نتیجه‌ی مصرف مواد لبنی غیرپاستوریزه و یا تماس با ترشحات دام آلوده به انسان منتقل می‌شود. این بیماری از یک سو به علت کاهش تولید شیر و از دست رفتن ارزش اقتصادی دام‌های مبتلا، سقط جنین در دام و از سوی دیگر به علت ابتلای انسان به بیماری طاقت فرسا و صعب‌العلاج تب‌مالت، همواره از دو بعد اقتصادی و بهداشتی مورد توجه قرار گرفته است، به طوری که بسیاری از کشورها درصدد ریشه‌کنی این بیماری از جمعیت دامی هستند [۳۰]. با وجود گذشت بیش از یک قرن از شناخت این بیماری، بروسلوز همچنان در بسیاری از کشورهای جهان، به ویژه کشورهای مدیترانه‌ای و خاورمیانه به عنوان یکی از مهم‌ترین بیماری‌های مشترک انسان و دام مطرح است و تنها تعداد محدودی از کشورهای جهان این بیماری را ریشه‌کن کرده یا در آستانه‌ی ریشه‌کنی آن قرار دارند [۶،۲۰]. برای نخستین بار در ایران در سال ۱۳۲۷ بروسلوز ملی‌تسیس از شیر بز توسط دکتر انتصار، در بخش بروسلا موسسه‌ی واکسن و سرم‌سازی رازی جدا شد و اولین مایه‌کوبی جمعیت گوسفند و بز علیه این بیماری مربوط به سال ۱۳۴۲ بوده است. در حال حاضر بروسلوز در ایران یک بیماری بومی محسوب می‌شود [۱۵]. بروسلا باکتری گرم منفی هوازی، به شکل کوکوباسیل و عامل بروسلوز در حیوانات و انسان است [۹]. بروسلا تحت تاثیر پنی‌سیلین، گلیسین و هورمون‌های استروئیدی می‌تواند به شکل ال فرم درآید. بررسی‌ها نشان داده است که بروسلاها با نقص در دیواره سلولی بهتر از باکتری طبیعی باعث نابودی و انهدام مونوسیت‌ها می‌شوند. برخی از این ال فرم‌ها قابل فیلتر شدن هستند و می‌توانند از فیلترهای باکتریولوژیک عبور کنند [۲۱،۲۲]. اشکال ال بروسلا ممکن است در طول بیماری فعال و یا بروسلوز نهفته ایجاد شوند. گزارش‌هایی وجود دارد که ثابت می‌کند گونه‌های بروسلا می‌توانند در اثر تبدیل شدن به ال فرم و سپس بازگشت به فرم طبیعی به گونه

دیگری تبدیل شوند. دو نوع پروتئین باند شونده به پنی‌سیلین (PBP) به نام PBP₁ و PBP₂ در بروسلا شناسایی شده است. PBPها در پاتوژنز باکتری نقش دارند. PBP₂ به عنوان کامل‌کننده برای فعالیت PBP₁ است. PBPها در تبدیل بروسلا به ال فرم نقش دارند [۴]. تتراسایکلین‌ها و ترجیحاً داکسی‌سایکلین به طور کلی در مقابل اکثر سویه‌های بروسلا فعال هستند اما با این حال از آنجایی که این آنتی‌بیوتیک یک داروی باکتریواستاتیک است عود بیماری پس از یک پاسخ موفقیت‌آمیز اولیه، شایع می‌باشد. ثابت شده است که ترکیب داکسی‌سایکلین همراه با ریفامپین یا جنتامایسین در این مورد موثر بوده و باعث کاهش موارد عود بیماری می‌شود. در مدت چند روز پس از شروع درمان، علائم بیماری ممکن است تخفیف یابد اما در هر حال به لحاظ موقعیت داخل سلولی، ارگانسیم‌ها به سهولت ریشه‌کن نمی‌شوند. برای دستیابی به نتایج بهتر، درمان باید طولانی‌تر باشد. از آنجایی که تتراسایکلین‌ها برای کودکان و جنین‌ها سمی هستند، در زنان باردار و نوزادان باید تری‌متوپریم‌سولفامتوکسازول را جایگزین داکسی‌سایکلین نمود [۴،۱۸]. بنابراین استفاده از درمان‌های جایگزین برای کنترل عفونت‌های ناشی از این باکتری ضروری به نظر می‌رسد. هدف از این بررسی، یافتن مواد جدید با فعالیت ضد میکروبی علیه بروسلا بدون داشتن آثار سوء می‌باشد.

گیاه‌شناسی و اثرات دارویی

اولین گیاه مورد مطالعه در این تحقیق، رازک معمولی (Common hop) با نام علمی *Humulus lupulus* از راسته گل‌سرخ (Rosales)، تیره شاهدانگان (Cannabaceae) و جنس رازک‌ها (*Humulus*) است که به صورت گیاهی علفی، چندساله و بالارونده، که اغلب در نواحی شمال و شمال غرب ایران از جمله گرگان، چالوس، تنکابن، رشت و لاهیجان می‌روید مخروط‌های گل‌های این گیاه، که دارای بوی معطر و مطبوع با طعمی تلخ است، در پزشکی جنبه درمانی دارد. از این گیاه به عنوان عاملی مسکن و آرام‌بخش،

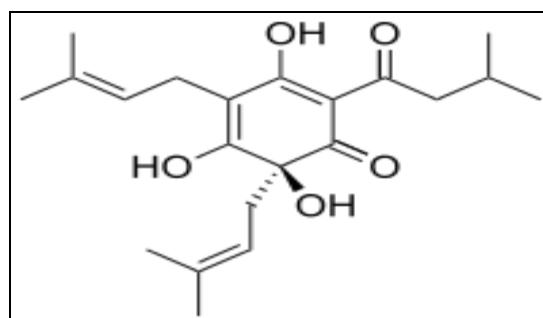
گیاه دارای تانن، مواد رزینی، مواد پکتیکی، قند و اسانس است. اسانس پونه بر حسب آن که از تقطیر اعضاء چه نوع گیاهی به دست آمده باشد مشخصات نسبتاً متفاوتی نشان می‌دهد. به‌طور کلی پونه موجب برطرف شدن حالت تهوع و استفراغ، مشکلات و ناراحتی‌های گوارشی به‌طوری که از ترش کردن معده جلوگیری می‌کند و برای هضم غذا و برطرف کردن سسکه مفید است [۱۶، ۱۲]. هم‌چنین پونه در درمان سرماخوردگی، آنفلوآنزا، آسم، سرفه و سیاه سرفه، گرفتگی بینی نیز مفید است. با توجه به خواص ضد میکروبی که در عصاره و اسانس پونه وجود دارد، می‌توان از این فرآورده‌ها به‌عنوان جایگزین طبیعی برای آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده نمود [۱۷، ۱۱، ۱۰]. بالاترین ترکیب موجود در اسانس پونه به کار رفته در این مطالعه پولگن (شکل ۲) می‌باشد که اثرات ضد میکروبی آن در مطالعه‌های مختلف گزارش شده است. در مطالعه صورت گرفته بر روی خصوصیات اسانس گیاه منتا پیریتا، ترکیب منتول موجود در اسانس نقش بسیار مهمی در فعالیت ضد میکروبی آن داشت [۳].



شکل ۲: فرمول شیمیایی پولگن

سومین گیاه مورد مطالعه در این تحقیق، ریحان با نام علمی *Ocimum basilicum* L. گیاهی از خانواده *Oleaecaima* است که استفاده از آن به‌عنوان گیاهی دارویی از زمان‌های قدیم رایج بوده است. گیاه دارویی ریحان از قدیم به‌طور سنتی به‌عنوان یک گیاه زینتی و دارویی در درمان بیماری‌هایی چون سردرد، سرفه، اسهال، انگل‌ها، زگیل‌ها،

اشتها آور، مسهل، آرام‌کننده تمایلات جنسی، تقویت‌کننده معده و ضد عفونی‌کننده استفاده می‌شود. هم‌چنین رازک در درمان مواردی، چون انسداد مجاری کبد و طحال، سیفلیس و بی‌خوابی مورد استفاده قرار می‌گیرد. در بدنه رزینی رازک، ترکیباتی هم‌چون آلفارزین و بتارزین یافت می‌شود که دارای موثر شیمیایی با خاصیت ضد میکروبی به نام هومولون (شکل ۱) و لوپولون است. مواد تشکیل دهنده هومولون، آلفا و بتا اسیدهای تلخ هستند که مقدار آن‌ها در انواع مختلف گیاه و حتی رازک‌های رشد یافته در نقاط جغرافیایی مختلف، متفاوت است [۳۲-۲۷-۵].



شکل ۱: فرمول شیمیایی هومولون

دومین گیاه مورد مطالعه در این تحقیق، گیاه دارویی پونه با نام علمی *L. Menthelongifolia* که یک گیاه چند ساله ریزوم دار است. دارای ساقه‌های افراشته و گاه‌ها خمیده، که در محل مقطع مربعی و ارتفاع آن در مرحله بالغ به ۱/۵ متر می‌رسد. برگ‌ها ساده، متقابل یا بدون دم‌برگ نیزه‌ای شکل (زیرگونه *capensis*) یا نیزه‌ای کشیده (زیرگونه *polyadena*) که بیش‌تر از ۹۰ میلی‌متر طول و ۲۲ میلی‌متر عرض، کاملاً کرک‌دار در یکی یا هر دو سطح (زیرگونه *capensis*) یا بدون کرک (زیرگونه *polyadena*) با کناره‌های کاملاً دندانه‌دار و نوک تیز می‌باشند. گل‌ها نیز از گلچه‌های کوچک با طول حدود ۳-۵ میلی‌متر به رنگ سفید تا ارغوانی روشن، در دسته‌هایی که یک خوشه‌ای استوانه‌ای شکل به طول ۱۰۰ میلی‌متر و عرض ۱۴ میلی‌متر را تشکیل می‌دهند (محکمی، ۱۳۹۰). قسمت‌های مختلف این

نمونه موجود در هر بار یوم گیاهان دارویی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان اردبیل و دانشکده داروسازی تبریز مورد شناسایی و تطبیق قرار گرفتند و پس از اطمینان از صحت انتخاب، گیاهان مورد نظر خشک شدند. بعد از خشک شدن گیاهان در دمای ۲۸ درجه سانتی-گراد و در سایه، به وسیله آسیاب برقی و با استفاده از الک، قسمت‌های هوایی گیاه به صورت پودر تهیه شدند [۱۹].

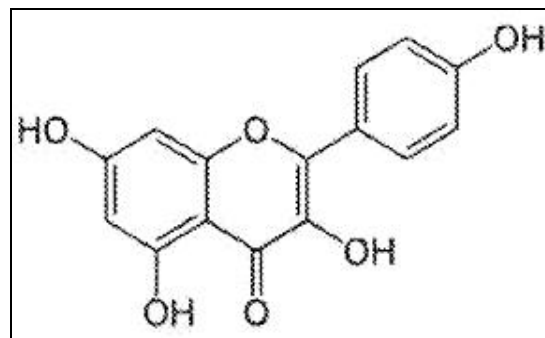
جدول ۱- مشخصات گیاهان دارویی مورد استفاده در تحقیق.

نوع عصاره	اندام مورد استفاده	تیره	نام علمی	نام فارسی	ردیف
هیدروالکلی	اندام هوایی	نعناعیان	Ocimum basilicum	ریحان	۱
هیدروالکلی	اندام هوایی	نعناعیان	Mentha longifolia L.	پونه	۲
هیدروالکلی	اندام هوایی	شاهدانگان	Humulus lupulus	رازک	۳

- تهیه عصاره

پودرهای تهیه شده در داخل بشر ریخته شد و جهت عصاره-گیری به روش خیساندن، به نسبت ۸ به ۱ به آن اتانول ۹۶ درصد اضافه گردید و به مدت یک هفته در یخچال قرار داده شد. در طی این مدت ۲ بار بشرهای محتوی عصاره به-مدت ۱۵ دقیقه به منظور استخراج بهتر و بیش تر ترکیبات موثر گیاه در دستگاه اولتراسونیک (-WiseClean D10H) در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد، به مدت ۳۰ دقیقه، در فرکانس ۴۰ کیلوهرتز و نسبت ماده جامد به حلال ۱/۲۰ (وزن/حجم) قرار داده شدند [۲۴، ۲۶] و پس از آن محتویات داخل بشر بوسیله کاغذ صافی و قیف شیشه‌ای صاف گردید. سپس توسط دستگاه روتاری مدل lab tech، ۳۱۱Ev تغلیظ و جهت خشک شدن داخل پتری دیش ریخته و زیر هود قرار داده شد [۱۹]. بعد از سپری شدن ۴ روز، عصاره‌های خشک به دست آمد.

ناراحتی‌های کلیدی و هم‌چنین برای مداوای بزرگ شدن طحال مورد استفاده قرار می‌گیرد هم‌چنین در طب سنتی از برگ‌ها و نوک گل‌های ریحان به عنوان ضد نفخ، افزایش دهنده‌ی شیر مادر، درمان برخی از ناراحتی‌های قلبی، اشتها آور و داروی گیاهی ضد تشنج هم استفاده می‌شده است [۱۳]. در قرن یازدهم میلادی، از ریحان مخلوطی می‌ساختند که در درمان تومورهای سرطانی استفاده می‌شد. زیرا ریحان با تحریک سیستم ایمنی، تولید پادتن را ۲۰ درصد افزایش می‌دهد. خواص ضد باکتری این گیاه مربوط به فلاونوئیدهایی از جمله ارینتین و ویسنین (شکل ۳) می‌باشد. در قرن هفدهم میلادی، از ریحان برای درمان سرماخوردگی، زگیل‌ها و انگل‌های روده‌ای به طور وسیعی در اروپا استفاده می‌شد. در گیاه درمانی، از عصاره ریحان در مارگزیدگی برای خنک کردن محل گزش استفاده می‌شده است. پژوهش‌گران هندی گزارش کردند که ریحان باکتری‌های پوستی را در محل جوش‌های صورت می‌کشد [۲۹].



شکل ۳: فرمول شیمیایی ویسنین

مواد و روش‌ها

- جمع‌آوری و شناسایی گیاهان

گیاهان مورد استفاده در این تحقیق در جدول شماره ۱ آورده شده است. اندام‌های مورد نظر گیاهان مورد بررسی در تابستان ۱۳۹۴ از مناطق شمال غرب ایران، در استان‌های اردبیل و آذربایجان شرقی جمع‌آوری شدند. پس از جمع‌آوری با استفاده از مجموعه کتب فلور گیاهی ایران و

انکوبه گردید. سپس پلیت‌ها را از نظر وجود هاله عدم رشد بررسی شد. از دیسک‌های استاندارد ری‌فامپین به منظور کنترل مثبت استفاده شد. با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک‌ها به وسیله‌ی خط‌کش میلی‌متری انجام شد و نتایج مورد بررسی قرار گرفت علاوه بر روش دیسک-گذار، حساسیت هر سویه از باکتری‌های مورد نظر نسبت به هر یک از عصاره‌ها با استفاده از روش رقیق‌سازی در محیط مایع در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای ته‌گرد مورد بررسی قرار گرفت. به خانه‌های ردیف اول پلیت فقط محیط کشت و سوسپانسیون باکتری اضافه گردید. در ردیف بعدی به ۶ خانه از پلیت‌ها، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محیط مایع مغذی مولر هیتون اضافه شد. به چاهک اول ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره گیاه رازک به غلظت ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اضافه شده و تا چاهک ششم به ترتیب غلظت‌های ۱۰-۱۲-۱۴-۱۶-۱۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر که با روش رقیق‌سازی تهیه شده بود اضافه گردید. به هر چاهک مقدار ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری معادل ۰/۵ مک فارلند اضافه شد، برای هر یک از عصاره‌ها از یک پلیت جداگانه استفاده شد و تمامی موارد فوق برای آن‌ها نیز تکرار شد. از داروی ری‌فامپین برای کنترل مثبت با غلظت‌های ۶، ۴/۵، ۳، ۱/۵ استفاده شد محتویات هر چاهک ۲ دقیقه بوسیله دستگاه Plate Reader مجهز به تکان دهنده با هم مخلوط شده و در زمان صفر عمل طیف‌سنجی با طول موج ۶۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌داری شدند و کدورت و یا عدم کدورت چاهک‌ها به صورت چشمی مورد ارزیابی قرار گرفتند. اولین رقتی که توانست کم‌ترین میزان کدورت را نشان دهد به عنوان حداقل غلظت کشنده تعیین گردید. این آزمایش در سه تکرار جداگانه انجام و میانگین سه تکرار برای هر چاهک برای تعیین کم‌ترین غلظت بازدارنده مورد استفاده قرار گرفت [۳،۳۰].

- بررسی خاصیت بروسایی

جهت بررسی خواص ضد میکروبی عصاره‌ها از دو روش آنتی‌بیوگرم (Disk diffusion) و حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) استفاده شد.

- رقیق‌سازی عصاره گیاهان و تهیه دیسک‌های حاوی عصاره

جهت انجام آزمایش از ۷ نوع عصاره شامل عصاره هیدروالکلی ریحان، عصاره هیدروالکلی پونه، عصاره هیدروالکلی رازک، مخلوط دوگانه عصاره‌های رازک-پونه، رازک-ریحان، پونه-ریحان و مخلوط سه‌گانه عصاره هیدروالکلی سه گیاه پونه، رازک و ریحان استفاده شد. عصاره‌های مورد نظر را با پروپیلن گلیکول رقیق و علاوه بر عصاره خالص، غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ mg/ml از عصاره تهیه شد، سپس جهت تهیه دیسک‌های حاوی عصاره از دیسک‌های بلانک ساخت پادتن طب استفاده شد. بدین ترتیب که دیسک‌های بلانک را در لوله‌های حاوی رقت‌های تعیین شده عصاره قرار داده شد. بعد از مدت ۵ تا ۳ دقیقه پس از جذب کامل، دیسک‌ها را در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده تا کاملاً خشک شود و جهت دیسک-گذار آماده شوند [۲۱].

بررسی فعالیت ضد میکروبی

جهت بررسی فعالیت‌های ضد میکروبی عصاره‌های مورد نظر از روش بررسی قطر هاله عدم رشد (Disk diffusion) و حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) استفاده شد. در این روش از باکتری‌هایی که در محیط کشت رشد کرده‌اند، سوسپانسیونی در سرم فیزیولوژیک به تعداد 3×10^8 باکتری در میلی‌لیتر تهیه شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون را روی محیط مولر هیتون آگار حاوی ۵ در صد خون تلقیح گردید. سپس دیسک بلانک استریل را روی پلیت گذاشته و عصاره‌های هیدروالکلی در غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر روی دیسک بلانک تلقیح شد و به مدت دو روز در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد

بحث و یافته‌ها

بروسلوزیس یکی از مهم‌ترین بیماری‌های مشترک بین انسان و حیوان است که از طریق خوردن محصولات حیوانات آلوده به انسان منتقل می‌شود. نمای بالینی آن غیر اختصاصی بوده و تظاهرات بسیار متغیری را نشان می‌دهد و می‌تواند از یک بیماری حاد تب‌دار تا یک بیماری خفیف و نامشخص بروز نماید.

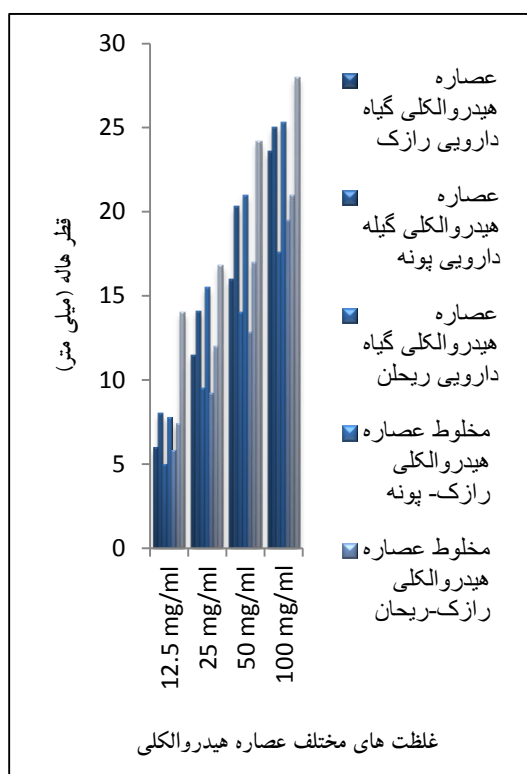
مدت بیماری نیز می‌تواند از چند روز تا چندین سال به درازا کشیده و در حیوانات مبتلا موجب کاهش تولید شیر، گوشت و پشم شود. این بیماری مشکل بهداشتی مهمی است که در سراسر جهان اتفاق می‌افتد اما میزان بروز بروسلوز انسانی در سطح جهان مشخص نیست و این ناشی از تفاوت در کیفیت سیستم گزارش دهی و اطلاع رسانی در کشورهای مختلف است.

سالانه بیش از نیم میلیون مورد جدید بروسلوز از ۱۰۰ کشور جهان به WHO گزارش می‌شود که قسمت اعظم آن خاص کشورهای جهان سوم است [۸]. در ایران نیز بروسلوز انسانی در تمام نقاط کشور آندمیک بوده و طبق آخرین گزارش‌ها شیوع بروسلوز انسانی در ایران ۱۳۲/۴ نفر در هر ۱۰۰۰۰ نفر می‌باشد و گزارشات نشان می‌دهند که کودکان یکی از مهم‌ترین گروه سنی بیماران هستند [۲۷]. در این مطالعه برخلاف آزمایشات قبلی که بیشتر بر روی عصاره‌های تک گیاهی متمرکز بودند، مخلوط‌های دوگانه و سه‌گانه گیاهان مورد نظر هستند. که نتایج نیز نشان از فعالیت ضد میکروبی مناسب مخلوط‌های مورد مطالعه می‌دهند. در تحقیق انجام شده توسط میلیس و همکاران در سال ۱۹۹۲ تاثیر عصاره رازک بر روی لیستریامونوسیتوزنز بیانگر آن است که مقدار ۶ تا ۵۰ ppm از بتا اسید موجود در عصاره رازک در غذاها می‌تواند رشد این باکتری را متوقف نماید [۲۳]. در پژوهش انجام شده توسط جانسون و همکاران در سال ۲۰۰۱ رشد کلستریدیوم دیفیسیل، کلستریدیوم بوتولینوم و هلیکوباکتریلوری بر اثر مجاورت با ۱ ppm یا بیش‌تر از بتا اسیدهای موجود در عصاره رازک

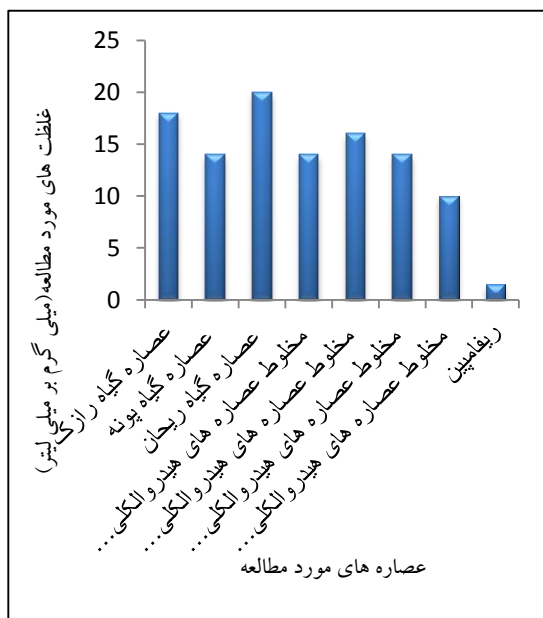
متوقف شد [۱۴]. در تحقیق سیمپسون و همکاران در سال ۱۹۹۲ فعالیت فاکتورهای ضدباکتریایی موجود در عصاره رازک مورد بررسی قرار گرفت که در بین آن‌ها بتا اسیدها دارای اثرات بالای ضدباکتریایی بودند [۲۸]. اثر ضد میکروبی تعدادی از گونه ریحان‌های پر باکتری‌های گرم مثبت و منفی و همین‌طور قارچ‌های بیماری‌زا و غیربیماری‌زا بررسی شده و گونه‌ی ریحان فرانسوی، اثر خوبی روی درماتوفیت‌ها نشان داده است. عصاره‌ی آبی و الکلی برگ‌های ریحان فعالیت ضدزخم‌زایی در دستگاه گوارش موش آزمایشگاهی نشان داده‌اند. این اثر را مربوط به فلاونوئیدهای موجود می‌دانند [۷].

نتایج

در طب سنتی از برخی گیاهان به‌عنوان گیاهان دارای خواص ضد میکروبی نام‌برده شده که از این گیاهان در موارد ابتلا به تب‌مالت استفاده می‌شده است. هم‌اکنون نیز برخی از این گیاهان در بین عشایر و مردم بومی برخی نقاط مانند استان‌های شمال غرب کشور، برای درمان تب‌مالت استفاده می‌گردد. براساس این باورها و اعتقادات تحقیق حاضر به‌منظور تأیید یا رد خواص و اثرات ضدبروسلوزی عصاره‌های هیدروالکلی ریحان، پونه، رازک و مخلوط سه-گانه عصاره‌های سه گیاه بر روی باکتری بروسلا آبرتوس عامل بیماری تب‌مالت انجام شد که نتایج حاصل از این آزمایش در جداول ۳ و ۲۰۲ نمایش داده شده است. پس از انجام آزمون آنتی‌بیوگرام مشخص گردید که در بررسی اثر ممانعت از رشد باکتری، بین عصاره‌های گیاهان دارویی، اختلاف بسیار معنی‌داری وجود دارد. در بررسی اثر ساده عصاره‌های گیاهی بر قطر ممانعت از رشد باکتری بروسلا آبرتوس مشخص شد که بیش‌ترین قطر هاله مربوط به مخلوط سه‌گانه‌ی عصاره‌های پونه، رازک، ریحان و پس از آن مخلوط دوگانه‌ی عصاره‌های رازک و پونه و بعد از آن مخلوط دوگانه‌ی عصاره‌های پونه و ریحان بود و عصاره هیدروالکلی ریحان کم‌ترین میزان قطر هاله را به خود اختصاص داد.



نمودار ۱: قطر هاله عدم رشد (میلی متر) در باکتری بروسلا آبرتوس با غلظت های مختلف عصاره های هیدروالکلی رازک، پونه، ریحان و مخلوط های دو گانه و سه گانه



نمودار ۲: حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره ها (MIC).

نتیجه تحلیل اثر ساده غلظت ها بر قطر هاله ممانعت از رشد باکتری بروسلا آبرتوس مشخص کرد که اختلاف معنی داری بین اثر غلظت های مختلف عصاره های هر گیاه بر قطر هاله ممانعت از رشد باکتری بروسلا آبرتوس وجود دارد. این تحلیل نشان می دهد که غلظت های ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر و ۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر به ترتیب موثرترین غلظت عصاره و کم اثرترین غلظت عصاره بر قطر هاله ممانعت از رشد باکتری بروسلا آبرتوس بودند.

مقایسه نتایج غلظت های مختلف نشان می دهد که بیشترین قطر ممانعت از رشد باکتری مربوط به غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر مخلوط سه گانه ی عصاره ی هیدرو الکلکی پونه، رازک، ریحان با قطر هاله ۲۸ میلی متر و کمترین آن ها مربوط به غلظت ۱۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره هیدروالکلی ریحان می باشد. بررسی اثر متقابل غلظت و عصاره های گیاهان دارویی نمایان گر اثر مثبت عصاره هیدروالکلی گیاه دارویی پونه با غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر و بعد از آن عصاره هیدروالکلی گیاه دارویی رازک با همان غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر بر افزایش قطر هاله عدم رشد باکتری بروسلا آبرتوس بود و عصاره ی هیدروالکلی گیاه دارویی ریحان، اثر کمتری نسبت به عصاره های هیدروالکلی پونه و رازک را از خود نشان داد. در این میان ریپامپین با قطر هاله ۲۹/۵ میلی متر بیشترین قطر هاله عدم رشد را به خود اختصاص داد. با توجه به نتایج مشاهده شده مشخص شد که مخلوط سه گانه رازک، پونه و ریحان نتایج نسبتاً مشابهی را نسبت به آنتی بیوتیک ریپامپین از خود نشان می دهد. براساس نتایج به دست آمده از تست MIC، باکتری مورد مطالعه بیشترین حساسیت را نسبت به آنتی بیوتیک ریپامپین و پس از آن نسبت به مخلوط سه گانه پونه، رازک، ریحان دارد و این در حالی است که گیاه دارویی ریحان حساسیت کمتری را برای باکتری مورد نظر ایجاد می کند.

جدول ۳- نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره‌ها (MIC)

MIC	عصاره‌ی مورد مطالعه	ردیف
18±1	عصاره گیاه رازک	۱
14±1	عصاره گیاه پونه	۲
20±1	عصاره گیاه ریحان	۳
14±1	مخلوط عصاره‌های رازک و پونه	۴
16±1	مخلوط عصاره‌های رازک و ریحان	۵
14±1	مخلوط عصاره‌های پونه و ریحان	۶
10±1	مخلوط عصاره‌های پونه، رازک، ریحان	۷
1/5 ± 0/5	ریفامپین	۸

نتیجه‌گیری

با توجه به اثر مطلوب ضد بروسلائی مخلوط سه گانه عصاره- های هیدروالکلی پونه، رازک و ریحان در تحقیق حاضر، می‌توان چنین استنباط نمود که وجود ترکیبات ثانویه ضد میکروبی در این گیاهان می‌تواند اثرات درمانی موثری بر بیماری تب‌مالت داشته باشد.

سپاس‌گذاری

از بخش هرباریوم مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان اردبیل و هم‌چنین از مسئولین و کارکنان دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد تبریز و نیز شرکت دانش- بنیان پژوهش‌گران داروی سبز که در فعالیت‌های آزمایشگاهی همکاری داشته‌اند قدردانی می‌نمائیم.

منابع

[۱] محکمی، زینب، ۱۳۹۰، ارزیابی برخی خصوصیات مورفولوژیکی و فیتوشیمیایی توده‌های نعنای بومی استان گلستان پاپان‌نامه کارشناسی ارشد در رشته مهندسی کشاورزی- علوم باغبانی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان..

[2] Akova, M., Gur, D., Livermore, D., Kosagoz, T., Akalin, H., 1999, In vitro activities of antibiotics alone and in combination against *Brucella melitensis* at neutral and acidic pHs. *Antimicrob Agents Chemother*. May; 5(43):1298-1300.

[3] Arques, J.L., Rodriguez, E., Gaya, P., Medina, M., Nunez, M., 2005, Effect of combinations of high pressure Treatment and bacteriocin producing lactic acid bacteria on survival of *Listeria monocytogenes* in raw milk cheese. *International Dairy Journal*; 15: 898-900.

جدول ۲- نتایج قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر) در باکتری بروسلا آبرتوس

با غلظت‌های مختلف عصاره‌های هیدروالکلی رازک، پونه، ریحان و مخلوط‌های دو گانه و سه گانه

ردیف	عصاره‌ی مورد مطالعه	غلظت عصاره	قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر)
۱	عصاره گیاه رازک	۱۲/۵	۶
		۲۵	۱۱/۵
		۵۰	۱۶
۲	عصاره گیاه پونه	۱۰۰	۲۳/۶
		۱۲/۵	۸
		۲۵	۱۴/۱
۳	عصاره گیاه ریحان	۵۰	۲۰/۳
		۱۰۰	۲۵
		۱۲/۵	۵
۴	مخلوط عصاره‌های رازک و پونه	۲۵	۹/۵
		۵۰	۱۴
		۱۰۰	۱۷/۶
۵	مخلوط عصاره‌های رازک و ریحان	۱۲/۵	۷/۸
		۲۵	۱۵/۵
		۵۰	۲۱
۶	مخلوط عصاره‌های پونه و ریحان	۱۰۰	۲۵/۳
		۱۲/۵	۵/۸
		۲۵	۹/۲
۷	مخلوط عصاره‌های پونه، رازک، ریحان	۵۰	۱۲/۸
		۱۰۰	۱۹/۵
		۱۲/۵	۷,۴
۸	ریفامپین	۲۵	۱۲
		۵۰	۱۷
		۱۰۰	۲۱

- [22] Meyer, ME., 1976, Evolution and taxonomy in the genus *Brucella*: Progesterone induction of filterable forms of *Brucella abortus* type 2 with revertant characteristics essentially indistinguishable in vitro from those of *Brucella ovis*. *Am. J. Vet. Res.*; 37: 211-4.
- [23] Millis, JR., (Kohler, WI.), 1992, Schendel; Marky. Inhibition of food pathogens by hope acids, US patent; 12 (3): 23 - 5.
- [24] Min, BR., Barry, TN., 2003, Attwood GT, McNabbWC. The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forage: a review. *J food chem.*; 9(1):76-81.
- [25] M. Incidence and control of brucellosis in the Near East region. *Vet Microbiol.* 2002 Dec; 90(1-4): 81-110.
- [26] Moniee, SH., 1981, Giahdarou. Tehran Iran: Ketabsara press; 75.
- [27] Rezaie, M., 2000, Study of *Humulus lupulus* components. Investigation of medical and fragrant plants; 3:1-13.
- [28] Simpson et al. Factors affecting antibacterial activity of hope compounds. *J. of Applied Bacteriol.* 1992; 327 - 34.
- Stevens JF, Page JE. Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health! *Phytochemistry.* 2004; 65(10): 1317-30.
- [29] Svoboda, KP, and Hampson, JB., 1999, Bioactivity of essential selected oils of temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, antiinflammatory and other related pharmacological activities. IENICA Conference, Specialty Chemicals for the 21st Century: Intermediary Products, Cosmetics, Perfumes, and Medicinal Applications, pp: 1 - 17.
- [30] Tabatabayi, A-H. and Firouzi, R; 2001, Disease of animal due to bacteria. Tehran University Press; 326-303.
- [31] WHO / MZCP; Human and Animal Brucellosis . Report of a WHO/MZCP workshop; Damascus, Syrian Arab Republic; 1998.
- [32] Zanoli, P., Zavatti, M., 2008, Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. *Journal of Ethnopharmacology*; 116(3): 383-96.
- [4] Banai, M., Adams, LG., Frey, M., 2002, The myth of *Brucella* L-forms and possible involvement of *Brucella* penicillin binding proteins (PBPs) in pathogenicity. *Vet. Microbio*; 90: 263-79.
- [5] Delmulle, L., Bellahcène, A., Dhooge, W., Comhaire, F., Roelens, F., Huvaere, K., 2006, et al. Anti-proliferative properties of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus* L.) in human prostate cancer cell lines. *Phytomedicine*; 13(9):732-4.
- [6] FAO; *Brucella melitensis* in Eurasia and the Middle East. FAO animal production and health proceedings. 2010 ; 10, Rome.
- [7] Ghasemi Dehkordi, A., 2002, Iranian Herbal Pharmacopeia (in Persian). Vol 1-2. Ministry of Health, Treatment and Medical Training publication. Tehran. Iran, 470 pp.
- [8] Godfroid, J., Kasbohrer, A., 2002, Brucellosis in the European union and norway at the turn of the twenty-first century. *Vet Microbiol*; 90: 135-145. 15- Refai M. Incidence and control of brucellosis in the Near East region. *Vet Microbiol*; 90(1-4): 81-110.
- [9] Gorvel, JP., Moremo, E., 2002, *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replicator. *Vet. Microbio*; 90: 281 - 97.
- [10] Hafedh, H., Fethi, BA., Mejdj, S., Emira, N., Amina, B., 2010, Effect of *Mentha longifolia* L. ssp *longifolia* essential oil on the morphology of four pathogenic bacteria visualized by atomic force microscopy. *Afr J Microbiol Res*; 4:1122-7.
- [11] Hajlaoui, H., Trabelsi, N., Noumi, E., Snoussi, M., Fallah, H., Ksouri, R., 2009, et al. Biological activities of the essential oils and methanol extract of two cultivated mint species (*Mentha longifolia* and *Mentha pulegium*) used in the Tunisian folkloric medicine. *World J Microbiol Biotechnol*; 25:2227-38.
- [12] Jan, S., Khan, MA., Uddin, S., Murad, W., Hussain, M., Ghani, A., 2008, Herbal recipes used for gastrointestinal disorders in Kaghan valley, nwfp, Pakistan. *Pak J Weed Sci Res*; 14:169-200.
- [13] Javanmardi, J., Khalighi, A., Khashi, A., 2002, Bais HP and Vivanco JM. Chemical characterisation of *Basil* (*Ocimum basilicum* L.) found in local accessions and used in traditional medicines in Iran, *J. Agricultural and Food Chem*; 50: 5878 - 83.
- [14] Johnson Erica, A., Haas Gerhard, J., 2001, Antimicrobial activity of hops extract against *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile* and *Helicobacter pylori*. *J. of Applied Bacteriol*; 265 - 71.
- [15] Kaveh, M; 1952, Brucellosis in general. *Revue de la Facultate de medicine veterinaire de Tehran*; 5:17-30.
- [16] Khan, SW., Khatoon, S., 2008, Ethnobotanical studies on some useful herbs of Haramosh and Bugrote valleys in Gilbit, Northern areas of Pakistan. *Pak J Bot*; 40:43-58.
- [17] Khattak, S., Rehman, SU., Khan, T., Shah, HU., Shad, AA., Ahmad, M., 2004, In vitro screening for biological pharmacological effects of indigenous medicinal plants, *Mentha longifolia* and *Aloe vera*. *J Chem Soc Pak*; 26:248-51.
- [18] Kilic, S., Dizbay, M., Hizel, K., Arman, D., 2008, In vitro synergistic activity of antibiotic combinations against *Brucella melitensis* using e-test methodology. *Braz J. Microbiol*; 39: 233-237.
- [19] Koelzer, J., Pereira, DA., Dalmarco, JB., Pizzolatti, MG., 2009, et al. Evaluation of the anti-inflammatory efficacy of *lotus corniculatus*. *J foodchem*; 117(3): 444-450.
- [20] Kolar, J; 1984, Diagnosis and control of brucellosis in small ruminants. *Preventive Veterinary Medicine*; 2: 215.
- [21] Mattman, LH., 2001, Cell Wall Deficient Forms Stealth Pathogens. 3th ed. CRC Press. USA, pp: 351 -61.