Research in Medicine *Original Article*

The Quarterly journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences *Vol.38, No.4, winter 2014*

The effect of different doses of silymarin, extracted from the seeds of the *Silybum marianum L. Gaertn* on the growth of 6 bacterial species

Taherh Hasanloo[*1], Mitra Salehi[2], Roshanak Sepehrifar[1], Somayeh Farahmand[2]

[1] *Department of Molecular Physiology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Karaj, Iran*
2Department of Microbiology, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Iran

(Received 12 May, 2014 Accepted 7 Feb, 2015)

Abstract

Background: Uncontrolled use of chemical drugs increases microbial strains resistant to antibiotics. There is an urgent need for discovery of new anti microbial compounds. Nowadays, many researchers have been done to introduce antibacterial compounds with natural origin. Aim of this study was *in vitro* assessment of antimicrobial effects of methanolic extract from dried fruits of *Silybum marianum*.

Materials and methods: Hungarian seeds of *Silybum marianum* were defatted by ethyl acetate. The flavonolignans were extracted with methanol. Antimicrobial effects of methanolic extract (pure extract, 2000, 1000, 500, 250 125, 62.5 and 0 mg/ml) were examined on six species of microorganisms (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Bacillus antheracis*) with three methods such as disk diffusion, well diffusion, porpelite and spread-plate methods. The experiment was performed three times with three replicates.

Results: According to results of this investigation, there was no growth inhibition zone in disk diffusion method for all dilutions of plant extract. The highest growth inhibition zone (19 mm) was observed in *Strep. pyogenes* in well diffusion method. In porpelite method, the growth inhibition zone was indicated in all of dilutions plant extract for *B. cereus* culture, in 2000 and 1000 mg/ml for *B. antheracis* and in 2000 mg/ml for *Strep. pyogenes*. Our results showed that, the extract had antibacterial effect on *B. Cereus*, *B. anthracis* and *Strep. pyogenes* in spread-plate method but had less effect on *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *E. coli*.

Conclusion: With attention to our finding, it could be concluded that methanolic extract of *Silybum marianum* has antibacterial effects on current clinical pathogen microorganisms. Therefore, it must be evaluated *in vivo* and clinically.

Keywords: *Silybum marianum*, Methalonic extract, Positive and Negative Germ bacteria.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-03]

پژوهش در پزشکی
مقاله پژوهشی
فصلنامه علمی پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
دوره ۳۸، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۳، صفحات ۱۹۳ تا ۱۹۹

بررسی تاثیر غلظت های مختلف سیلیمارین استخراج شده از دانه های گیاه خارمریم (*Silybum marianum L. Gaertn*) بر رشد ۶ گونه باکتری

طاهره حسنلو[1*]، میترا صالحی[2]، روشنک سپهری‌فر[1]، سمیه فرهمند[2]

بخش فیزیولوژی مولکولی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران
[2] گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال

چکیده

سابقه و هدف: با توجه به مصرف بی‌رویه داروهای شیمیایی و به دنبال آن افزایش سویه های میکروبی مقاوم به آنتی بیوتیک، شناسایی و معرفی منابع آنتی بیوتیکی جدید حائز اهمیت فراوانی است. در این پژوهش خصوصیات ضد میکروبی عصاره متانولی دانه های گیاه خار مریم (Silybum marianum) بصورت in vitro در قالب یک تحقیق تجربی مورد مطالعه قرار گرفت.

روش بررسی: تحقیق به روش تجربی انجام گرفت. دانه های گیاه خار مریم با منشاء مجارستانی تهیه شد. پس از روغن گیری دانه های پودر شده با پترلئوم اتر، عصاره متانولی حاوی سیلی مارین به روش سوکسله استخراج شد. فعالیت ضد میکروبی عصاره این گیاه در رقت‌های متوالی ۲۰۰۰، ۱۰۰۰، ۵۰۰ ، ۲۵۰، ۱۲۵ ، ۶۲/۵ و صفر (شاهد) میلی گرم در میلی لیتر علیه ۶ گونه باکتریایی استرپتوکوکوس پایوژنز، استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس آئروژینوزا، اشریشیاکلی، باسیلوس سرئوس و باسیلوس آنتراسیس به روش‌های سنجش انتشار دیسک، انتشار چاهک، پورپلیت و کشت گسترده مورد ارزیابی قرار گرفت. این آزمایش ۳ بار با سه تکرار انجام شد.

یافته‌ها: در روش دیسک گذاری هیچ یک از کشت های باکتری ها در رقت‌های mg/ml ۲۰۰۰، ۱۰۰۰، ۵۰۰ و ۲۵۰، اطراف دیسک‌ها هاله عدم رشد قابل توجهی مشاهده نشد. در روش چاهک گذاری بالاترین میانگین هاله عدم رشد در باکتری استرپتوکوکوس پایوژنز در حضور عصاره خاص برابر با ۱۹ میلی متر مشاهده شد. در روش پورپلیت باکتری باسیلوس سرئوس در تمام رقت‌ها، باسیلوس آنتراسیس در رقت‌های ۲۰۰۰ ، ۱۰۰۰ و استرپتو کوک پایوژنز در رقت mg/ml ۲۰۰۰ عدم رشد باکتری مشاهده شد. با روش کشت گسترده عصاره متانولی گیاه خار مریم دارای اثر ضد باکتریایی بر باسیلوس سرئوس، باسیلوس آنتراسیس و استرپتوکوکوس پایوژنز بود، ولی بر استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس آئروژینوزا و اشریشیاکلی اثری نداشت.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد عصاره متانولی خار مریم حاوی مواد آنتی سپتیک با اثرات ضد باکتریایی می‌باشد.

واژگان کلیدی: خار مریم، Silybum marianum ، باکتری های گرم مثبت و گرم منفی.

مقدمه

علوم پزشکی در سال‌های اخیر پیشرفت های شگرفی در توانایی شناخت و جلوگیری از بیماری ها را داشته است، اما در عین حال مصرف بی رویه داروهای شیمیایی موجب افزایش سویه‌های میکروبی مقاوم به آنتی بیوتیک شده است. به همین دلیل محققان زیادی جهت شناسایی آنتی بیوتیک‌های جدید به مطالعه گیاهان دارویی رو آورده‌اند (۱،۲). هر فردی در طول زندگی خود به برخی از عفونت‌های باکتریایی نظیر مسمومیت غذایی، عفونت‌های خفیف پوستی تا عفونت‌های شدید که زندگی فرد را تهدید می کند، مبتلا می شود. اخیرا به علت مقاوم شدن استافیلوکوک‌ها (خصوصا استافیلوکوکوس اورئوس) و سودوموناس آئروژینوزا در برابر بسیاری از داروهای ضد باکتری، مشکلاتی در درمان آنها فراهم شده است (۳). بعضی استرپتوکوک‌ها (استرپتوکوک پایوژنز) و اشرشیا کولی نیز موجب بیماری‌های

آدرس نویسنده مسئول: کرج، ابتدای جاده ماهدشت، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، دکتر طاهره حسنلو (**e-mail:** thasanloo@abrii.ac.ir)
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۲/۲۲
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۱۱/۱۸

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-03]

عمده‌ای در انسان می‌شوند که می‌توان به گلودرد چرکی و عفونت‌های گوارشی اشاره کرد (۳، ۴). اکثر باسیلوس‌ها در انسان بیماری‌زا است. یکی از بیماری‌های عمده‌ای که توسط این باسیل‌های گرم مثبت ایجاد می‌شوند، بیماری سیاه زخم است که عامل آن باسیلوس آنتراسیس می‌باشد . باسیلوس سرئوس موجب مسمومیت غذایی شده و گاهی عفونت چشم و عفونت های موضعی نیز ایجاد می‌کند (۳).

در قرن حاضر تحقیقات گسترده ای بر روی گیاهان دارویی انجام شده و معرفی داروهایی با مواد موثره طبیعی افق های جدیدی را برای جامعه پزشکان و داروسازان پژوهشگر گشوده است، به طوری که در حال حاضر حدود یک سوم داروهای مورد استفاده در جوامع انسانی را داروهایی با منشاء طبیعی و گیاهی تشکیل می دهند و مساعی جهانی صنایع داروسازی بر این متمرکز است که ساخت شیمیایی اقلام مربوط به دو سوم بقیه داروها نیز به تدریج به منابع گیاهی متکی گردد (۵). گیاهان دارویی و فراورده‌های طبیعی سر منشاء ۶۰ الی ۸۰ درصد آنتی‌بیوتیک‌های کنونی هستند. در همین راستا با توجه به تنوع آب و هوایی و در نتیجه فلور گیاهی بسیار متنوع در ایران امکان شناسایی مواد موثر گیاهی در گیاهان مختلف بومی کشور و استخراج آنها به منظور تولید آنتی بوتیک ها به مقدار زیاد و در سطح صنعتی وجود دارد. این کار به ویژه در مورد گیاهانی که بصورت خودرو و بومی در ایران وجود دارند و تا کنون کمتر مورد بررسی قرار گرفته اند اهمیت ویژه ای دارد (۶).

خار مریم (*Silybum marianum*) گیاهی یک یا دوساله از خانواده کاسنی Compositae است. این گیاه در مناطق مختلف جهان و همچنین در شهرهای شمالی ، غربی و جنوبی ایران به صورت خودرو دیده می‌شود. دانه‌های این گیاه حاوی ترکیبات فلاونولیگنانی هستند که اصطلاحا سیلیمارین نامیده می‌شود و شامل سیلی‌بین (SBN) ، ایزوسیلی‌بین (ISBN)، سیلی‌کریستین (SCN) و سیلی‌دیانین(SDN) می‌باشند. تاکسی فولین که از ترکیب فلاونوئیدی نارینجنین مشتق می‌شود، به عنوان پیش‌ساز در مسیر بیوسنتز سیلی‌بین می‌باشد. سیلی مارین به عنوان یک آنتی اکسیدان در درمان بیماری‌های مختلف کبدی استفاده می‌شود. خواص دیگر از جمله اثرات ضد سرطانی نیز گزارش شده است (۷).

تاکنون گزارش‌های کاملی از اثرات آنتی‌باکتریایی این ترکیبات ارائه نشده است؛ بنابراین در این پژوهش سعی بر این بود که اثر عصاره خار مریم بر شایع‌ترین باکتری‌های ساپروفیت و پاتوژن مطالعه شود.

مواد و روشها

تحقیق به روش تجربی انجام گرفت. باکتری‌های مورد بررسی شامل استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC1113)، استرپتوکوکوس پایوژنز (ATCC 1447)، سودوموناس آئروژینوز (ATCC 1599) و اشرشیاکلی(ISIRI 1552)، از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران همچنین باسیلوس سرئوس و باسیلوس آنتراسیس از آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه آزاد واحد تهران شمال تهیه شدند. برای احیای این باکتری‌ها از محیط مایع Brain Heart Broth (BHI) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت استفاده شد و سپس هر یک از باکتری‌ها در بلاد آگار و نوترینت آگار کشت داده شدند. جهت تایید باکتری ها از روش‌های رنگ آمیزی و بررسی خصوصیات بیوشیمیایی استفاده شد (۸،۹).

تهیهٔ سوسپانسیون باکتری

از هر یک از ظروف حاوی باکتری در کنار شعله با آنس استریل چند کلنی برداشته و در ۵ میلی‌لیتر محیط مایع استریل کشت داده شد. سپس این لوله‌ها به مدت ۱۸-۱۶ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفتند تا از یک کدورت نسبی برخوردار شوند. در نهایت کدورت آنها با شماره ۱ مک فارلند سنجیده شد. چنانچه کدورت سوسپانسیون باکتری کمتر از لولهٔ شمارهٔ ۱ مک فارلند بود، تعدادی کلنی به آن اضافه می‌شد و اگر کدورت بیشتر بود آب مقطر استریل به سوسپانسیون باکتری افزوده می‌شد تا کدورتی مطابق با کدورت مورد نظر به دست آید. این عمل برای تمام باکتری‌های مورد مطالعه انجام گرفت (۸،۹).

تهیه عصاره گیاهی

به منظور تهیه عصاره متانولی از دانه‌های گیاه خار مریم، دانه ها در داخل یک هاون چینی ساییده شدند، روغن گیری به مدت ۱۰ ساعت در حلال پترولئوم اتر در سوکسله انجام شد. نمونه‌های باقی مانده کاملا خشک شدند و به مدت ۱۶ ساعت با استفاده از متانول جهت استخراج سیلی مارین در دستگاه سوکسله قرار گرفتند. با تبخیرمحلول متانول حاصل در دستگاه تبخیر در خلاء پودر زرد رنگی تهیه شد. برای تهیه رقت های مختلف از عصاره استخراج شده ۲ گرم از عصاره با یک میلی لیتر متانول مخلوط شد. سپس رقت‌های متوالی ۲۰۰۰، ۱۰۰۰، ۵۰۰ ، ۲۵۰، ۱۲۵ ، ۶۲/۵ و صفر(شاهد) میلی گرم در میلی لیتر مورد استفاده قرار گرفتند (۱۰).

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-03]

برای بررسی تاثیر عصاره در رقت‌های متفاوت باکتری، از رقت ۱ مک فارلند برابر ۳×۱۰^{۸}، رقت‌های سریال به ترتیب $۱۰^{۷}$ تا $۱۰^{۳}$ ساخته شد. به این ترتیب که جهت تهیه رقت $۱۰^{۷}$، ۱۰۰۰ میکرولیتر از رقت ۱ مک فارلند برداشت نموده و در ۹ میلی لیتر آب مقطر استریل رقیق شده و بقیه رقت‌ها نیز به این ترتیب تهیه شدند (۸،۹).

روش‌های سنجش اثرات ضد میکروبی

برای سنجش اثر ضد میکروبی از روش‌های دیسک گذاری، چاهک گذاری، پورپلیت (کشت آمیخته) و کشت گسترده استفاده شد (۸،۹). این پژوهش سه بار و با سه تکرار انجام شد.

روش دیسک گذاری

ابتدا توسط سواپ استریل از سوسپانسیون میکروبی مقایسه شده با ۱ مک فارلند (در شرایط کاملا" استریل) برداشت نموده، سپس ۵-۳ بار در جهات مختلف روی محیط مولر هینتون آگار کشیده شد. پس از تهیه رقت‌های مورد نظر از عصاره به میزان ۳۰ میکرولیتر از آن را توسط سمپلر روی دیسک بلانک های استریل (شرکت داروسازی پادتن طب با قطر mm ۶/۴)، ریخته و آنها با رعایت فاصله مناسب از یکدیگر و لبهٔ پتری دیش بر روی محیط قرار گرفتند. یک دیسک بلانک نیز آغشته به ۳۰ میکرولیتر متانول به عنوان شاهد در وسط پلیت قرار گرفت. پلیت‌ها در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفتند تا پس از ۲۴ ساعت هاله‌های عدم رشد در اطراف هر دیسک با خط کش اندازه گیری شوند (۸،۹).

روش چاهک گذاری

ابتدا در محیط کشت چاهک‌هایی توسط پیپت پاستور حفرگردید. سپس با آنس استریل این قسمتهای پانچ شده از داخل محیط خارج و انتهای هر چاهک توسط محیط کشت مایع استریل مسدود شد (۸،۹).

از سوسپانسیون باکتری ۱ مک فارلند بر روی محیط چاهک دار مولر هینتون آگار کشت داده شد. آنگاه توسط سمپلر به میزان ۳۰ میکرولیتر از رقت های عصاره وارد چاهک‌ها شد. در ضمن یک چاهک حاوی متانول خالص و یک چاهک حاوی عصاره خالص نیز در نظر گرفته شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند (۸،۹).

روش پورپلیت

در روش پورپلیت پس از تهیه رقت‌های مورد نظر، ۱۰۰۰ میکرولیتر از عصاره درون پتری دیش‌ها ریخته شد و محیط مولر هینتون آگار (دمای ۴۵ درجه سانتی گراد) به آنها اضافه گردید. پلیت‌ها در جهت حرکت عقربه‌های ساعت و خلاف آن تکان داده شدند تا عصاره در محیط پخش شود. پس از بسته شدن محیط‌های حاوی عصاره، به کمک سواپ استریل از سوسپانسیون باکتری در کنار شعله برداشت نموده و بر روی محیط های حاوی عصاره کشت داده شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند(۸،۹).

روش کشت گسترده

در روش کشت گسترده، پس از تهیه رقت های مورد نظر از عصاره، ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره بر روی محیط مولر هینتون آگار جامد ریخته و به کمک پیپت پاستور در سطح محیط کاملا پخش شد و به مدت ۳ – ۴ ساعت در دمای آزمایشگاه قرار گرفت تا متانول موجود در آن تبخیر شود. سپس رقت-های مورد نظر از باکتری‌ها نیز تهیه شد و میزان ۵۰ میکرولیتر به محیط اضافه شد و دوباره توسط پیپت پاستور پخش شد، به طوری‌که عصاره و باکتری روی محیط به خوبی با هم ترکیب شدند. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. یک پلیت به عنوان شاهد در نظر گرفته شد که فاقد عصاره بود و یک پلیت هم فقط حاوی ۱۰۰ میکرولیتر متانول و ۵۰ میکرولیتر باکتری بود که به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد (۸،۹).

یافته‌ها

روش دیسک گذاری

در هیچ یک از کشت‌های باکتری‌ها در رقت های mg/ml ۲۰۰۰، ۱۰۰۰، ۵۰۰ و ۲۵۰ اطراف دیسک‌ها هاله عدم رشد قابل توجهی مشاهده نشد که احتمالا به دلیل عدم انتشار مناسب عصارهٔ درون داخل محیط کشت می باشد.

روش *چاهک* گذاری

قطر هالهٔ عدم رشد اطراف چاهک در عصارهٔ خالص بیشتر از رقت‌ها بود. همچنین در استرپتوکوک پایوژنز و باسیلوس آنتراسیس، قطر هاله با میزان رقت رابطهٔ مستقیم داشت، چنانچه با کاهش رقت عصاره اندازهٔ هالهٔ عدم رشد نیز کاهش می‌یافت. در ضمن، کنترل فاقد هالهٔ عدم رشد بود. بالاترین میانگین هاله عدم رشد در باکتری *Strep. Pyogenes* در

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-03]

جدول ۱. میزان هاله عدم رشد باکتری ها در حضور عصاره متانولی دانه های گیاه خار مریم

رقت عصاره (mg/ml)	*S.aureus*	*Strep. pyogenes*	*p.aeruginosa*	*E.coli*	*B.cereus*	*B.antheracis*
شاهد	-	-	-	-	-	-
عصاره خالص	-	۱۹ ±۰/۰۵	-	-	۵ ±۰/۰۸	۱۷ ±۰/۰۵
۲۰۰۰	-	۱۸±۰/۰۹	-	-	۳ ±۰/۰۷	۱۷ ±۰/۰۹
۱۰۰۰	-	۱۷ ±۰/۱	-	-	-	۱۷ ±۰/۰۶
۵۰۰	-	۱۷ ±۰/۰۴	-	-	-	-
۲۵۰	-	۱۶ ±۰/۰۳	-	-	-	-

- فقدان هاله عدم رشد واضح

جدول ۲. وضعیت رشد باکتری‌ها در روش کشت آمیخته در حضور عصاره متانولی دانه های گیاه خار مریم

رقت عصاره (mg/ml)	*S.aureus*	*Strep.pyogenes*	*p.aeruginosa*	*E.coli*	*B.cereus*	*B.antheracis*
شاهد	+	+	+	+	+	+
۲۰۰۰	+	-	+	+	-	-
۱۰۰۰	+	+	+	+	-	-
۵۰۰	+	+	+	+	-	+
۲۵۰	+	+	+	+	-	+

- عدم رشد باکتری در کل پتری دیش + رشد باکتری

حضور عصاره خاص برابر با ۱۹ میلی متر مشاهده شد. در کشت باکتری *B.cereus* میانگین هاله عدم رشد در حضور عصاره خالص برابر ۵ میلی متر و در حضور غلظت ۲۰۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره برابر با ۳ میلی متر بود. هاله عدم رشد در کشت باکتری *B.antheracis* در حضور عصاره خالص و غلظت‌های ۲۰۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره برابر با ۱۷ میلی متر مشاهده شد. در باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس آئروژینوزا و اشریشیاکلی هیچ گونه هالهٔ عدم رشدی مشاهده نشد. بنابراین می‌توان گفت که این عصاره روی گرم مثبت ها نسبت به گرم منفی‌ها موثرتر می‌باشد، که این امر می‌تواند به دلیل تفاوت ساختار دیواره در این دو نوع باکتری (گرم مثبت و گرم منفی) باشد (جدول ۱).

پورپلیت (کشت آمیخته)

در این روش باکتری باسیلوس سرئوس در تمام رقت‌ها، باسیلوس آنتراسیس در رقت های ۲۰۰۰ ، ۲۵۰۰ و استرپتوکوک پایوژنز در رقت ۲۰۰۰ mg/ml عدم رشد باکتری مشاهده شد (جدول ۲).

کشت گسترده

در این روش از بین ۶ گونه باکتری مورد بررسی تنها روی ۳ باکتری باسیلوس سرئوس ، باسیلوس آنتراسیس و استرپتوکوکوس پایوژنز جواب مثبت به دست آمد، اما در هیچ رقتی از عصاره و باکتری، روی باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس آئروژینوزا و اشریشیاکلی اثری نداشت و در رقت‌های $۱۰^{۶} \times ۳$ ، $۱۰^{۵} \times ۳$ ، $۱۰^{۴} \times ۳$ و $۱۰^{۳} \times ۳$ باکتری باسیلوس سرئوس، هر قدر که از میزان رقت عصاره کاسته می‌شد، به تعداد کلنی‌های باکتری افزوده می‌شد (جدول ۳) . به عبارتی، میزان عصاره با عدم رشد باکتری رابطه مستقیم داشت. به طوری که در رقت $۱۰^{۳}$ از باکتری غلظت ۱۲۵ mg/ml از عصاره دارای اثر باکتریواستاتیک و اثر باکتریوسید در غلظت ۲۵۰ mg/ml از عصاره مشاهده شد. در رقت‌های دیگر باکتری ($۱۰^{۶} \times ۳$ و $۱۰^{۵} \times ۳$) در غلظت‌های ۲۰۰۰ mg/ml تا ۵۰۰ عصاره، تعداد باکتری‌ها بسیار کمتر از سایر مشاهدات و اندازهٔ آنها کوچک‌تر از شاهد بود. همچنین از رقت ۲۵۰mg/ml تا ۶۲/۵ بزرگی کلنی‌ها در حد شاهد بودند (جدول ۳).

در رقت‌های $۱۰^{۵} \times ۳$ ، $۱۰^{۴} \times ۳$ و $۱۰^{۳} \times ۳$ باکتری باسیلوس آنتراسیس، در صورت کاهش میزان رقت عصاره به تعداد کلنی‌ها افزوده می‌شد، به طوری که بهترین اثر ضد باکتریایی عصاره تا غلظت ۵۰۰ mg/ml قابل مشاهده بود (جدول ۴). اما در رقت‌های بالاتر باکتری به ترتیب در غلظت‌های ۲۰۰۰ mg/ml تا ۵۰۰ اندازهٔ باکتری‌ها کوچک‌تر از شاهد بود و از رقت ۲۵۰ mg/ml تا ۶۲/۵ دوباره کلنی‌ها بزرگ می‌شد (جدول ۴).

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-03]

جدول ۳. تعداد کلنی‌های باکتری باسیلوس سرئوس رشد کرده (رقت‌های مختلف) در روش کشت گسترده در حضور عصاره متانولی دانه‌های گیاه خار مریم

رقت عصاره (mg/ml)	رقت باکتری (cfu/ml) ۱۰^۸	۱۰^۷	۱۰^۶	۱۰^۵	۱۰^۴	۱۰^۳
۰	+	+	۱۰۰۰±۰/۱۴	۱۰۰±۰/۰۸	۵۰±۰/۰۳	۳۰±۰/۱۰
۲۰۰۰	+	+	۸۰±۰/۱۲	۳۰±۰/۱۱	۰	۰
۱۰۰۰	+	+	۸۰±۰/۱۰	۵۰±۰/۱۰	۰	۰
۵۰۰	+	+	۱۰۰±۰/۱۲	۵۰±۰/۰۶	۲۰±۰/۰۵	۰
۲۵۰	+	+	۵۰۰±۰/۰۸	۶۰±۰/۰۹	۳۰±۰/۰۸	۰
۱۲۵	+	+	۸۰۰±۰/۰۷	۹۰±۰/۰۹	۴۰±۰/۱۰	۲۵±۰/۰۹
۶۲/۵	+	+	۱۰۰۰±۰/۱۲	۱۰۰±۰/۰۸	۵۰±۰/۱۱	۳۰±۰/۰۷

+ رشد کامل

جدول ۴: تعداد کلنی های باکتری باسیلوس آنتراسیس در روش کشت گسترده در حضور عصاره متانولی دانه های گیاه خار مریم

رقت عصاره (mg/ml)	رقت باکتری (cfu/ml) ۱۰^۸	۱۰^۷	۱۰^۶	۱۰^۵	۱۰^۴	۱۰^۳
۰	+	+	+	۳۰۰±۰/۱۲	۵۰±۰/۰۹	۳۰±۰/۰۹
۲۰۰۰	+	+	+	۱۰۰±۰/۱۰	۱۰±۰/۱۰	۱۰±۰/۱۰
۱۰۰۰	+	+	+	۱۰۰±۰/۱۰	۱۰±۰/۰۸	۱۰±۰/۱۴
۵۰۰	+	+	+	۱۳۰±۰/۱۳	۲۰±۰/۰۸	۲۰±۰/۱۲
۲۵۰	+	+	+	۱۶۰±۰/۱۰	۲۰±۰/۰۷۷	۲۰±۰/۱۰
۱۲۵	+	+	+	۲۰۰±۰/۱۱	۲۵±۰/۱۲	۲۵±۰/۱۰
۶۲/۵	+	+	+	۳۰۰±۰/۱۰	۳۰±۰/۱۱	۳۰±۰/۰۸

+ رشد کامل

جدول ۵. تعداد کلنی‌های باکتری استرپتوکوکوس پایوژنز در روش کشت گسترده در حضور عصاره متانولی دانه های گیاه خار مریم

رقت عصاره (mg/ml)	رقت باکتری (cfu/ml) ۱۰^۸	۱۰^۷	۱۰^۶	۱۰^۵	۱۰^۴	۱۰^۳
۰	+	+	+	+	۱۰۰±۰/۱۰	۳۰±۰/۰۷
۲۰۰۰	+	+	+	+	۵۰±۰/۱۲	۱۰±۰/۰۸
۱۰۰۰	+	+	+	+	۴۰±۰/۱۰	۱۰±۰/۰۹
۵۰۰	+	+	+	+	۴۰±۰/۰۹	۲۰±۰/۰۶
۲۵۰	+	+	+	+	۶۰±۰/۱۰	۲۰±۰/۰۶
۱۲۵	+	+	+	+	۶۰±۰/۰۸	۲۰±۰/۰۹
۶۲/۵	+	+	+	+	۶۰±۰/۰۸	۳۰±۰/۰۷

+ رشد کامل

مشاهده شد که در رقت‌های ۱۰۴ × ۳ و ۱۰۳ × ۳ باکتری استرپتوکوکوس پایوژنز، با کاهش میزان غلظت عصاره به تعداد کلنی‌ها افزوده می‌شد. به طوری که تا غلظت mg/ml ۵۰۰ عصاره، کاهش رشد مشاهده شد. اما درقت‌های بالاتر باکتری به ترتیب در غلظت‌های mg/ml ۲۰۰۰ تا ۵۰۰ اندازهٔ باکتری‌ها کوچکتر از شاهد شده و از غلظت‌های mg/ml ۲۵۰ تا ۶۲/۵ اندازه کلنی‌ها مشابه شاهد بود (جدول ۵).

بحث

تحقیق نشان داد که در اطراف دیسک‌های آغشته به عصاره، هاله عدم رشد واضحی مشاهده نشد. بررسی های فتوشیمیایی و کروماتوگرافی عصارهٔ خار مریم، وجود تعداد زیادی از ترکیبات فلاونوئیدی را ثابت کرده است. این ترکیبات پلی فنلی و پانزده کربنه گیاهی در خار مریم به نام سیلی مارین خوانده می‌شوند (۱۱). سیلی مارین متشکل از فلاونولیگنان هایی به نامهای سیلی بین A و B، ایزوسیلی بین A و B، سیلی کریستین، سیلی دیانین و یک پیش ساز به نام تاکسی فومین می‌باشد (۱۱، ۱۲).

بنابراین جهت بررسی بیشتر از روش چاهک گذاری استفاده شد. در این روش هاله‌های عدم رشد در مورد باکتری‌های استرپتوکوک پایوژنز و باسیلوس آنتراسیس کاملا قابل مشاهده بود. نکته قابل توجه جهت مقایسه روش‌های انتشار این بود که با وجود اینکه در انتهای اکثر چاهک‌ها مقداری از عصاره باقی مانده بود، اما استفاده از عصاره به حالت مایع امکان انتشار را بیشتر می‌کند. به همین دلیل در روش دیسک گذاری این ماده شیمیایی به علت تبخیر حلال، توانایی انتشار کامل از دیسک‌های کاغذی به محیط کشت را ندارد. بنا براین عدم رشد نسبت به روش دیگر کمتر می‌باشد. Sfeir و همکاران (۲۰۱۳) اثرات آنتی باکتریایی ۱۸ اسانس از گیاهان دارویی را با روش دیسک گذاری بر باکتری استرپتوکوک پایوژنز بررسی نمودند. نتایج نشان داد که ۱۴ اسانس اثرات ضد باکتریایی مناسبی بر این باکتری داشتند (۱۳). Koochaki و همکاران (۲۰۱۰) اثرات آنتی باکتریایی عصاره‌های چهار گونه گیاه دارویی را بر تعدادی از باکتری‌های گرم مثبت و منفی بررسی کردند. بالاترین اثر بازدارندگی رشد در روش دیسک گذاری با عصاره متانولی گیاه *Polygonum patulum* در باکتری استرپتوکوک پایوژنز مشاهده شد (۱۴).

در روش کشت آمیخته، باسیلوس سرئوس و باسیلوس آنتراسیس حساسیت نشان دادند. همچنین در روش کشت گسترده که روش دقیق‌تری به نظر می‌رسید و غلظت‌های پایین باکتری تاثیر کامل عصاره را نمایش می‌دهد، باسیلوس سرئوس، باسیلوس آنتراسیس و استرپتوکوکوس پایوژنز حساس بودند. نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر بیانگر اثر

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-03]

عصاره (سیلیمارین) بر سه باکتری گرم مثبت (باسیلوس سرئوس، باسیلوس آنتراسیس و استرپتوکوکوس پایوژنز) و عدم تاثیر آن بر باکتری های گرم منفی (سودوموناس آئروژینوزا و اشریشیاکلی) است. نتایج Dong و همکاران (۲۰۰۳) نشان داد که سیلی بین دارای فعالیت آنتی باکتریال در مقابل باکتریهای گرم مثبت می‌باشد که این اثر بسیار قوی‌تر از سیلی مارین است در حالیکه سیلی بین هیچ اثری بر روی باکتری‌های گرم منفی ندارد . بر اساس نظر این پژوهشگران، اثر بازدارندگی سیلی بین بر روی سنتز RNA و پروتئین باکتری‌های گرم مثبت می‌باشد (۱۵،۱۶). تفاوت عمده نتایج Dong با این پژوهش به این صورت است که فقط دو نوع از ترکیبات موجود در عصارهٔ بذر این گیاه (سیلی بین و سیلی مارین) به طور جداگانه و در مدت زمان کوتاه (۱۰ ساعت) مورد بررسی قرار گرفته است، در صورتی که در این پژوهش عصارهٔ تام مورد استفاده قرار گرفته است.

در پژوهش لطفی پور و همکارانش در سال ۱۳۸۶، اثرات ضد باکتریایی عصاره گیاهان *Salvia sahendica* و *Phlomis caucasica* علیه تعدادی از سویه های باکتریایی گرم مثبت و گرم منفی با روش دیسک گذاری بررسی شد و نشان داد که عصاره متانولی این گیاهان روی گرم مثبت‌ها موثرتر از گرم منفی است و در این میان باسیلوس سرئوس در رقت ۶۰٪ نسبت به گیاه *Salvia sahendica* حساس‌تر از *Phlomis caucasica* بود که این پژوهش در مورد باسیلوس سرئوس با تحقیق حاضر مطابقت دارد (۱۷). همچنین در تحقیق آخوندزاده و همکاران (۱۳۸۳)، که روغن فرار آویشن شیرازی را روی باسیلوس سرئوس در محیط آبگوشت قلب و مغز اثر داده بودند، نشان داد که در طی ۴۳ روز در غلظت های ۰/۰۳ و ۰/۴۵ رشد باسیلوس سرئوس کاملا" متوقف شده بود . این نتیجه با تحقیق حاضر در رقت‌های 10^{3} و 10^{4} از باکتری مطابقت داشت (۱۸).

در این مطالعه، حضور رقت‌های عصاره در تغییراندازهٔ کلونی تشکیل شده موثر واقع شده است. چنانچه کلونی‌ها نسبت به شاهد کوچکتر به نظر می رسیدند. این تغییر را می‌توان این گونه توضیح داد که این عصاره بر روی مورفولوژی باکتری‌ها تاثیر می‌گذارد (۱۶). البته استفاده از میکروسکوپ الکترونی می‌تواند جهت بررسی دقیق‌تر مفید واقع شود. Ruikar و همکاران (۲۰۰۹) اثرات آنتی باکتریایی *Artemisia pallens* را بر ۶ سویه باکتریایی با روش دیسک گذاری بررسی نمودند. نتایج نشان داد که باسیلوس سرئوس حساس ترین باکتری به عصاره متانولی این گیاه است (۱۹).

تحقیق حاضر اولین گام در جهت بررسی اثر ضد میکروبی گیاه خار مریم بود. با توجه به نحوه اثر عصاره بر عدم رشد باکتری‌ها در این بررسی و نتایج اثر سیلی مارین در سلول‌های انسانی که توسط Machicaoو همکاران انجام شد و بر تحریک فعالیت آنزیمی RNA پلی مراز I وابسته به DNA سلول به وسیله سیلی مارین تاکید می‌کنند (۲۱) و همچنین گزارش Sonnenbichler (۱۹۹۹) مبنی بر تاثیر سیلی مارین و سیلی بین در مراحل رونویسی سلول های کبدی (۲۰) و نتایج Dong و همکاران (۲۰۰۳) که اثرات بازدارندگی سیلی بین را بر روی سنتز RNA و پروتئین برخی از پروکاریوت‌ها و مکانیسم عمل دارویی سیلی‌بین را بیان می‌کند (۱۶)، پیشنهاد می شود که DNA و RNA و پروتئین باکتری‌های مورد مطالعه استخراج و در حضور و عدم حضور سیلی مارین یا اجزاء فلاونولیگنان تشکیل دهنده آن بررسی شوند.

همچنین با توجه به اینکه تاثیر عصاره در عدم رشد باسیلوس سرئوس و آنتراسیس بیشتر بود، زمینه تحقیقات گسترده‌تری جهت بررسی اثر مهار کنندگی عصاره بر طیف نسبتا وسیع از باکتری‌های اسپور دار فراهم می‌کند تا در صورت امکان به بررسی اثر فلاونوئیدهای عصاره در روند اسپورزایی پرداخته شود.

تشکر و قدردانی

این طرح با حمایت‌های مالی پژوهشکده بیوتکنولوزی کشاوزی (شماره مصوب ۸۶۰۰۷-۰۵-۰۵-۲) انجام شده است. از کلیه همکارانی که در انجام این طرح ما را یاری نمودند، کمال تشکر و قدردانی را داریم.

REFERENCES

1. World Health Organization. Traditional Medicine Strategy. 2002-2005. Geneva, Switzerland: WHO; 2002. P.1-47.
2. Andrews REJ, Parks LW, Spence KD. Some effects if Diuglas fir terpenes on certain microorganisms. Appl Environ Microbiol 1980; 40: 301–40.
3. Nowroozi J, ed. Medical microbiology. Tehran, Iran: Hayyan Press; 2002. P.326. [In Persian]
4. Nowroozi J, ed. Pathogenic bacteria. Tehran, Iran: Noor-e- Danesh Press; 2001. P.326. [In Persian]

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-03]

5. Omidbaighi R, ed. Approaches to production and processing of medicinal plants. Tehran, Iran: Tarrahan Press; 1997. P.235-40.

6. Taghizadeh M, Pesian M, eds. Methods in quality control of medicinal plants. Tehran, Iran: Nashre jahad Press; 2001. P.192-200.

7. Kumar Kalla P, Chitti S, Aghamirzaei ST, Senthilkumar R and Arjunan S. Anti-cancer activity of silymarin on MCF-7 and NCIH-23 cell lines. Adv Biol Res 2014; 8: 57-61.

8. Karim G, ed. Microbiological testing of food. 4th ed. Tehran, Iran: University of Tehran; 2002.

9. Hashim I, Pharma S, eds. Microbiological culture media in pharmaceutical industry. Foster city, USA: OMICS Group eBooks; 2013.

10. Hasanloo T, Khavari-Nejad RA, majidi E, Ziai SA, Shams- Ardakani MR. Determination of flavonolignan of dried fruits of Silybum marianum L. Gaertn collected from different areas of Iran by spectrophotometer, TLC and HPLC. J Med Plants 2004; 4: 25-32.

11. Hasanloo T, Khavari Nejad RA, and Majidi E, Evaluation of phenotypic coefficient and flavonolignan content in dried fruits of cultivated and endemic Silybum marianum (L.) Gaertn. J Med Plants. 2007; 22: 77-90.

12. Samuelsson G, ed. Drugs of natural origin. 4th ed. Stockholm, Sweden: Swedish Pharmaceutical Press; 1999. P.226–33.

13. Julien Sfeir J, Lefrançois C, Baudoux D, Derbré S, Licznar P. In vitro antibacterial activity of essential oils against *Streptococcus pyogenes*. Evid Based Complement Alternat Med 2013; 2013: 1-9.

14. Koochak H, Seyyednejad SM, Motamedi H. Preliminary study on the antibacterial activity of some medicinal plants of Khuzestan (Iran). Asian Pacific J Trop Med 2010; 180- 84.

15. Ding, M, Tian SJ, Zhang ZX, Gu DZ, Chen Y, Shi YH, et al. Determination of active component in *Silybum marianum* by HPLC and LC / MS. J Pharmacol Biochem Anal 2001; 26: 155–61.

16. Dong Gun L, Hyung Keun K, Yoonkyung P, Seong – Cheol P, Eun – Rhan W, Hye Gwang J, et al. Gram positive bacteria specific prooerties of silybin derived from *Silybum marianum*. Arch Pharm Res 2003; 26: 597-600.

17. Lotfipur F, Smiei M, Nazemiieh H. Evaluation of antimicrobial effects of *Salvia sahendica* and *Phlomis coucasia* on some of gram positive and negative bacteria. J Pharm Sci 2008; 29-35.

18. Akhundzadeh Basti A, Misaghi A, Gheibee S. Effect of *Zataria multiflora* Boiss essential oil on probability of growth initiation of *Bacillus cereus* in a brain heart infusion broth. J Med Plants 2006; 4: 48-55.

19. Ruikar AD, Kamble GS, Puranik VG, Deshpande NR. Antimicrobial screening of medicinal plant– *Artemisia pallens*. Int J Pharm Tech Res 2009; 1: 1164-66.

20. Sonnenbichler J, Scaleram F, sonnenbichler I, Weyhemeyer R. Stimulatory effects silibinin and silichristin from the Milk thistle silybum marianum on Kidney cells. J Pharmacol Exp Ther 1999; 290: 1375-83.

21. Machicao F, Sonnonbichler J. Mechanism of the stimulation of RNA synthesis in rat liver nuclei by silybin. Hoppe Seylers Z Physiol Chem 1977;358:141-47.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-03]