



مقایسه اثر ضد باکتریایی و ضد قارچی عصاره آبی و الکی گیاه ریش بز (*Ephedra gerardiana*) با کلرگزیدین ۱٪ بر روی سویه‌های بیماری‌زای دهان

مجید زارع بیدکی: دانشیار، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران
سجاد صدری نیا: دانشجوی دندانپزشکی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران
پروین پروایی: استادیار، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

فاطمه نیکومانesh: استادیار، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، ایران (* نویسنده مسئول) g.nikoomanesh@yahoo.com

چکیده

کلیدواژه‌ها

گیاه ریش بز،
کلرگزیدین ۱٪،
انتروکوک فکالیس،
استرپتوکوکوس موتانس،
لاکتوباسیل کازئی،
کاندیدا آلبیکنس

زمینه و هدف: گیاه ریش بز با نام علمی *Ephedra* از گیاهان دارویی هست که در درمان آسم، گرفتگی بینی و اختلالات سیستم اعصاب مرکزی کاربرد داشته است. تقریباً تمام گونه‌های این گیاه تطابق و سازگاری با شرایط محیطی و آب و هوایی ایران را دارند و دارای اثرات ضد میکروبی قابل ملاحظه می‌باشند. لذا هدف ما در این مطالعه بررسی اثر ضد میکروبی عصاره آبی و الکی گیاه ریش بز گونه *gerardiana* در مقایسه با کلرگزیدین ۱٪ بر روی تعدادی از باکتری‌های فلور هان و نیز قارچ کاندیدا آلبیکنس در محیط آزمایشگاهی می‌باشد.

روش کار: اثر ضد میکروبی عصاره ها با روش میکروداپلوشن برات بر سوش‌های باکتریایی استرپتوکوکوس موتانس (ATCC35668)، لاکتوباسیل کازئی (ATCC39392)، انتروکوک فکالیس (ATCC:29212) و قارچ کاندیدا آلبیکنس (ATCC10231) مورد ارزیابی قرار گرفت. حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)، (MFC) با استفاده از شمارش کلنی بر روی محیط بلاد آگار تعیین گردید. تمامی مراحل برای عصاره‌ها و کلرگزیدین ۱٪ دو بار انجام شد.

یافته‌ها: باکتری‌های انتروکوک فکالیس و استرپتوکوکوس موتانس به عصاره آبی مقاومت نشان دادند. در حالیکه عصاره آبی بر روی لاکتوباسیل کازئی و کاندیدا آلبیکنس اثر بازدارندگی نشان داد. انتروکوک فکالیس به عصاره الکی نیز مقاوم بود، اما عصاره الکی بر روی استرپتوکوکوس موتانس، لاکتوباسیل کازئی و کاندیدا آلبیکنس اثر بازدارندگی داشت. کلرگزیدین ۱٪ بر روی تمامی سوش‌های باکتریایی و کاندیدا آلبیکنس اثر بازدارندگی نشان داد.

نتیجه‌گیری: در مطالعه حاضر صرف نظر از انتروکوک فکالیس که به تمام رفتهای عصاره آبی و الکی مقاوم بود، نشان داد عصاره آبی و الکی گیاه ریش بز بر روی باکتریهای گرم مثبت مورد مطالعه و کاندیدا آلبیکنس دارای خاصیت بازدارندگی می‌باشند. در مقایسه با کلرگزیدین ۱٪ به عنوان محلول دهانشویه تجاری که دارای عوارض جانبی تغییر رنگ دندان می‌شود، می‌توان از عصاره گیاه ریش بز به تنهایی یا همراه با سایر عوامل ضد میکروبی به عنوان دهان شویه استفاده نمود.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت کننده: دانشگاه علوم پزشکی بیرجند

شیوه استناد به این مقاله:

Zare Bidaki M, Sadrinia S, Parvaie P, Nikoomanesh F. Comparison of Antibacterial and Antifungal effect of Hydroalcoholic extract of *Ephedra Gerardiana* with Chlorhexidine 1% on Oral Pathogenesis isolates. *Razi J Med Sci.* 2020;27(8):129-138.

*انتشار این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با [CC BY-NC-SA 3.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/) صورت گرفته است.



Original Article

Comparison of Antibacterial and Antifungal effect of Hydroalcoholic extract of Ephedra Gerardiana with Chlorhexidine 1% on Oral Pathogenesis isolates

Majid Zare Bidaki: Associate Professor, Infectious Diseases Research Center, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran

Sajjad Sadrinia: MD Student, School of Dentistry, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran

Parvin Parvaie: Assistant Professor, School of Dentistry, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran

Fatemeh Nikoomanesh: Assistant Professor, Infectious Diseases Research Center, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran (*Corresponding author) g.nikoomanesh@yahoo.com

Abstract

Background: Infectious diseases such as tooth decay are a challenge to oral health in humans. Mouthwashes are an auxiliary tool and in addition to this, mechanical dental plaque control i.e. brushing and flossing, play an important role in controlling plaque. In the past three decades, the pharmaceutical industry has produced a significant number of antibiotics, but the resistance of microorganisms to these drugs has increased. Thus, the increasing spread of microbial resistance has made the treatment of infectious diseases difficult and costly. Much research has been done on chlorhexidine-containing solutions, which is a gold standard. Chlorhexidine belongs to the group of medicines called antiseptic antibacterial agents and its only side effect is a change in tooth color. Therefore, now days it is sought to replace the products with herbal antimicrobial properties due to their availability and low side effects, instead of antibiotics. Ephedra gerardiana is an herbal medicine that has been used in the treatment of asthma, nasal congestion and disorders of the central nervous system. Almost all species of this plant are adapted to the environmental and climatic conditions of Iran and have significant antimicrobial effects. The aim of this study was to investigate the effect of aqueous and alcoholic extracts of Ephedra gerardiana with chlorhexidine on normal flora of oral bacteria and *Candida albicans* in vitro.

Methods: In this experimental study, the conical section of Ephedra gerardiana was collected and then approved by an expert of medicinal plants of the Faculty of Agriculture department in Birjand University. Extraction was performed by soaking the conical parts of the plant after drying and grinding. To prepare hydroalcoholic extracts, the plant powder was boiled for one hour and then condensed in a rotary evaporator at a temperature of 60 degrees to reach a volume of 20 ml. The antimicrobial effect of the extracts was determined by broth microdilution method on *Enterococcus faecalis* (ATCC29212), *Streptococcus mutans* (ATCC35668), *Lactobacilli casei* (ATCC39392) and *Candida albicans* (ATCC 10231). Thus, the concentrations of chlorhexidine 1% (0.03-10 mg/ml) and hydroalcoholic extract of Ephedra gerardiana (0.01-20 mg/ml) were prepared in 96-well plate wells, respectively. Bacterial cell suspension was adjusted to the turbidity of 0.5 McFarland standard and for *Candida albicans* and 5×10^3 cells mL⁻¹ was prepared by spectrophotometry and confirmed by hemocytometric counting. The extract-free wells were considered as positive control and extract control were

Keywords

Ephedra gerardiana,
Chlorhexidine 1%,
Enterococcus faecalis,
Streptococcus mutans,
Lactobacilli casei,
Candida albicans

Received: 11/08/2020

Published: 10/11/2020

considered as negative control. A well microtiter plate was incubated in a 96-well for 24 h at 37 °C. At the end of this incubation, minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) and minimum fungicidal concentration (MFC) was determined by using colony count on blood agar medium.

Results: The results showed that *E. gerardiana* aqueous extract did not affect the growth of *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus mutans*. *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus mutans* were resistant to aqueous extracts while aqueous extract showed an inhibitory effect on *Lactobacilli casei* and *Candida albicans*. *Lactobacilli casei* and *Candida albicans* had MIC 2.5 and 0.31 mg / ml, MBC/ MFC 0.62 and 5.0 mg / ml, respectively. *Enterococcus faecalis* was also resistant to alcoholic extracts. The results of the alcoholic extract showed that different concentrations of extract did not affect the growth of *Enterococcus faecalis*. However, *Streptococcus mutans* and *Lactobacilli casei* and *Candida albicans* were susceptible to alcoholic extracts. *Lactobacilli casei*, *Streptococcus mutans*, and *Candida albicans* had MICs at 0.07, 1.25, 2.5, mg / ml and MBC/ MFC at 0.3, 2.5, 5.0 mg / ml, respectively. Also, chlorhexidine 1% showed an inhibitory effect on all bacterial strains and *Candida albicans*. All three bacterial strains (*Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus casei*) had MIC at 1.25 and 0.07 mg / ml and MBC 2.5 and 0.3 mg / ml to chlorhexidine 1% respectively. Furthermore, *Candida albicans* demonstrated MIC at 0.3 mg / ml and MFC at 0.62 mg / ml to chlorhexidine.

Conclusion: The results of the effect of hydroalcoholic extract of *Ephedra gerardiana* showed that it has antibacterial effects on some gram-positive bacteria of normal oral flora, including *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei* and *Candida albicans*. Compared to the effect of different concentrations of chlorhexidine 1% and hydroalcoholic extract it did not have a significant effect on the growth of *Enterococcus faecalis*. According to the study, with the exception of *Enterococcus faecalis*, which was resistant to all aqueous and alcoholic extracts, *Ephedra gerardiana* extract has antibacterial and antifungal properties and therefore can be an effective antimicrobial agent compared with chlorhexidine 1% as a commercial mouthwash solution that has side effects of tooth discoloration; *Ephedra gerardiana* extract can be used alone or in combination with other antimicrobial agents as mouthwashes. To better identify the performance and antimicrobial properties of *Ephedra*, it is recommended that different species of *Ephedra* be collected from different areas and examined phytochemically.

Conflicts of interest: None

Funding: Birjand University of Medical Science

Cite this article as:

Zare Bidaki M, Sadrinia S, Parvaie P, Nikoomanesh F. Comparison of Antibacterial and Antifungal effect of Hydroalcoholic extract of *Ephedra Gerardiana* with Chlorhexidine 1% on Oral Pathogenesis isolates. *Razi J Med Sci.* 2020;27(8):129-138.

*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.

مقدمه

امروزه با پیشرفت‌های نوین در صنایع داروسازی اتفاق افتاده است، به دلیل بروز مقاومت‌های دارویی در سوش‌های مختلف باکتریایی و قارچی نیاز به داروهای ضد میکروبی جدید با عوارض جانبی کمتر بیش‌ازپیش احساس می‌شود. استفاده از گیاهان دارویی در درمان بسیاری از بیماری‌ها سابقه چندین هزارساله دارد. طب سنتی و گیاهان دارویی از جمله منابعی هستند که در آن به جستجوی داروهای ضد میکروبی پرداخته می‌شود. گیاه ریش بز با نام علمی *Ephedra* به خانواده *ephedraceae* از راسته *Ephedrales* تعلق دارد (۱). این گیاه یک پایه یا دو پایه، بالا رونده و به صورت بوته‌هایی با اعضای چوبی به ارتفاع حدود یک متر یا بیشتر می‌شوند. این گیاه دارای گونه‌های متعدد شامل: *E. procera*, *E. strobiliacea*, *E. pachyclada* و *geradiana* می‌باشد. تقریباً تمام گونه‌های این گیاه تطابق و سازگاری با شرایط محیطی و آب و هوایی ایران را دارند و از مناطق مختلف ایران از جمله خراسان جنوبی رویش می‌نماید (۲-۴).

فلور میکروبی دهان انسان شامل طیفی از باکتری‌های گرم مثبت هوازی و بی‌هوازی از جمله *استرپتوکوکوس موتانس*، *لاکتوباسیل کازئی*، *انتروکوک فکالیس* و گونه‌های قارچی از جمله *کاندیدا آلبیکنس* می‌باشد. این میکروارگانیسم‌ها به ندرت بیماری‌زا هستند اما در صورت بیماری‌زایی، موجب عفونت‌های سیستمیک متعدد و در مواردی پوسیدگی دندان را به وجود می‌آورند (۵-۷). پوسیدگی دندان بیماری عفونی- میکروبی بوده که همراه با تخریب بافت‌های دندان است. پلاک‌دندانی در بروز پوسیدگی‌های دندان و بیماری‌های پریدونتال نقش مهمی به عهده دارد. از نظر بالینی پلاک‌دندانی به عنوان یک ماده زرد رنگ متمایل به خاکستری، که قابلیت انعطاف داشته و دارای ساختار مشخص تعریف می‌شود که اتصال قوی به سطوح سخت داخل دهانی دارد (۵، ۸). تحقیقات نشان داده است که ایجاد میکروکلنی‌ها یا همان بیوفیلم در افزایش بیماری‌زایی و بروز مقاومت دارویی میکروارگانیسم بسیار مؤثر می‌باشد (۷).

دهان شویه‌ها به عنوان ابزار کمکی و در کنار مهار مکانیکی پلاک‌دندانی یعنی مسواک زدن در کنترل

پلاک‌ها نقش مهمی دارد (۹). تحقیقات بسیاری در ارتباط با محلول‌های حاوی کلرهگزیدین انجام شده است که این ترکیب به عنوان یک استاندارد طلائی مطرح می‌باشد. کلرهگزیدین از گروه آنتی‌سپتیک‌ها می‌باشد و تنها عارضه جانبی آن ایجاد تغییر در رنگ دندان است (۱۰، ۱۱). در چندین سال اخیر با گرایش مردم به استفاده از داروهایی با منشأ گیاهی به دلیل عوارض جانبی و سوء داروهای شیمیایی توجه جهانیان به این مبحث بیشتر شده است (۱۲، ۱۳). محصولات گیاهی به تازگی تحت بررسی دقیق‌تر برای پتانسیل آنها برای پیشگیری از بیماری‌های دهان و دندان به خصوص بیماری‌های مربوط به پلاک و پوسیدگی دندان قرار گرفته است (۱۴، ۱۵). گیاهان و ترکیبات آنها شامل اسانس‌ها و عصاره‌های مختلف دارای توان بالقوه جهت جایگزینی با داروهای شیمیایی هستند. اغلب این عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی دارای خواص ضد قارچی، ضد انگلی، ضد باکتری، ضد ویروسی و آنتی‌اکسیدان و سیتوتوکسیک می‌باشند (۱۶، ۱۷).

لذا در این مطالعه، هدف بررسی اثر غلظت‌های مختلف عصاره‌های آبی و الکلی گیاه ریش بز در مهار از رشد سوش‌های باکتریایی دهان (*انتروکوکوس فکالیس*، *استرپتوکوکوس موتانس* و *لاکتوباسیلوس کازئی*) و نیز قارچ *کاندیدا آلبیکنس* در محیط آزمایشگاهی و همچنین مقایسه اثر آنتی میکروبیال عصاره‌های آبی و الکلی گیاهی ریش بز با اثر ضد میکروبی کلرهگزیدین ۱٪ می‌باشد.

روش کار

در این مطالعه ی تجربی، از سه سویه استاندارد باکتری شامل: *استرپتوکوکوس موتانس* (ATCC35668)، *لاکتوباسیل کازئی* (ATCC39392)، *انتروکوک فکالیس* (ATCC:29212) و *قارچ کاندیدا آلبیکنس* (ATCC10231) استفاده شد. سویه‌های فوق به صورت لیوفیلیزه از بانک میکروبی انستیتو پاستور تهران تهیه شد. مطالعه حاضر در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی بیرجند با کد اخلاق به شماره IR.bums.REC.1398.217 مورد تایید قرار گرفت.

تهیه عصاره: ابتدا قسمت مخروطی گیاه ریش بز (گونه *gerardiana*) جمع‌آوری شد و سپس توسط

میکرو لیتر محیط برات و یک چاهک کنترل مثبت حاوی ۲۰۰ میکرو لیتر محیط برات و ۱۰ میکرو لیتر سوسپانسیون سلولی در نظر گرفته شد. میکرو پلیتها در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت برای باکتری و در انکوباتور ۲۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت برای قارچ انکوبه شدند. جهت تعیین MIC, MBC, MFC عصاره ها پس از اتمام مدت انکوباسیون ۱۰ میکرو لیتر از محتویات هر چاهک بر روی محیط بلاد آگار کشت خطی داده شد. کمترین رقتی از عصاره که از ۹۰٪ رشد باکتری ها و کاندیدا/آلبیکنس ممانعت کرد به عنوان MIC و کمترین رقتی که فاقد رشد میکرو ارگانیسم بود به عنوان MFC و MBC در نظر گرفته شد (۲۰).

جهت مقایسه اثرات ضد میکروبی عصاره ها با یک ماده ضد میکروبی تجاری از کلرهگزیدین ۱٪ با روش میکرو دایلوژن برات استفاده شد. از کلرهگزیدین ۱٪ به ترتیب غلظت‌های سریالی (۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵، ۰/۶۲، ۰/۳۱، ۰/۰۷، ۰/۰۳، ۰/۰۱ میلی گرم بر میلی لیتر) در محیط برات تهیه شد و MIC و MBC برای هر کدام از سوش‌های باکتریایی و کاندیدا آلبیکنس ارزیابی شد (۱۰). تمامی مراحل برای عصاره ها و کلرهگزیدین ۱٪ دو بار انجام شد.

یافته‌ها

چاهک‌های حاوی عصاره فاقد عدم رشد بودند. باکتری *انتروکوک فکالیس* به تمام رقت‌های دو عصاره آبی و الکلی مقاوم بود. عصاره آبی کمترین فعالیت ضد باکتریایی را نسبت به عصاره الکلی دارا بود به طوری که *انتروکوک فکالیس* و *استرپتوکوکوس موتانس* به آن مقاوم بودند و *کاندیدا آلبیکنس* MIC در رقت ۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر و MFC در رقت ۱/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر را نسبت به عصاره آبی دارا بود. *لاکتوباسیل کازئی* بیشترین حساسیت را نسبت به عصاره آبی نشان داد. رقت‌های MIC و MFC و MBC عصاره آبی در جدول ۱ نشان داده شده است.

عصاره الکلی بر خلاف عصاره آبی به *استرپتوکوکوس موتانس* اثر بازدارندگی داشت، به طوری که این عصاره MIC در غلظت ۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر و MBC در رقت ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر برای *استرپتوکوکوس*

کارشناس ارشد گیاهان دارویی دانشکده کشاورزی دانشگاه بیرجند تایید گردید.

عصاره گیری به روش خیساندن از قسمت‌های مخروطی گیاه پس از خشک شدن و آسیاب شدن انجام شد (۱۸). بدین ترتیب ابتدا مقدار ۳۰ گرم از پودر گیاه خشک شده در ۲۰۰ میلی لیتر از حلال‌های آب و اتانول در یک ارلن مخلوط گردید. جهت تهیه عصاره آبی و الکلی، پودر گیاه به مدت یک ساعت جوشانده شد و سپس در دستگاه روتاری اوپوراتور در دمای ۶۰ درجه تغلیظ گردید تا حجم به ۲۰ میلی لیتر برسد. این عمل طی ۴۸ ساعت انجام شد تا حجم مایع باقی مانده در بالن تقطیر به ۲۰ میلی لیتر برسد و هر میلی لیتر از مایع حاوی ۱/۵ گرم پودر گیاه باشد. تمامی مراحل عصاره گیری در آزمایشگاه جامع تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی بیرجند انجام شده است.

تهیه سوسپانسیون سلولی از سویه های باکتری و کاندیدا آلبیکنس:

جهت احیاء سویه های باکتریایی و کاندیدا/آلبیکنس کشت اولیه بر روی محیط مولر هیلتون آگار (مرک آلمان) به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت انجام شد. بدین ترتیب برای تهیه کدورت‌های استاندارد نیم مک فارلند، به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۰ نانومتر کدورت اندازه گیری و کدورت نیم مک فارلند از سوش‌های باکتریایی تهیه شد. جهت تهیه سوسپانسیون سلولی استاندارد کاندیدا/آلبیکنس، از شمارش سلولی توسط لام نئوبارو رسیدن به تراکم سوسپانسیون قارچی معادل 1×10^6 cell/ml استفاده شد (۱۹).

روش آزمایش اثرات ضد میکروبی:

برای تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده (MIC) و حداقل غلظت کشنده (MBC, MFC) عصاره ها از روش میکرو دایلوژن برات و میکرو پلیت ۹۶ خانه ای استفاده شد (۱۹). بدین ترتیب ابتدا به هریک از چاهک‌های میکرو پلیت ۹۶ خانه ای ۲۰۰ میکرو لیتر از محیط مولر هیلتون برات حاوی رقت‌های سریالی شامل غلظت‌های ۲۰، ۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵، ۰/۶۲، ۰/۳۱، ۰/۰۷، ۰/۰۳ و ۰/۰۱ میلی گرم بر میلی لیتر از عصاره ها به چاهکها افزوده شد. در نهایت به تمام چاهک ها ۱۰ میکرو لیتر سوسپانسیون سلولی اضافه شد. یک چاهک کنترل منفی صرفا حاوی ۱۰۰ میکرو لیتر عصاره و ۱۰۰

جدول ۱- مقدار MIC و MBC عصاره آبی گیاه ریش بز در روش میکرو دایلوژن برات بر روی سویه‌های مورد مطالعه

عصاره آبی mg/ml	عصاره میکروارگانیزم
MBC/MFC	MIC
۰/۶۲	۰/۳۱
مقاوم	مقاوم
مقاوم	مقاوم
۰/۵	۲/۵

جدول ۲- مقدار MIC و MBC عصاره الکلی گیاه ریش بز در روش میکرو دایلوژن برات بر روی سویه‌های مورد مطالعه

عصاره الکلی mg/ml	عصاره میکروارگانیزم
MBC/MFC	MIC
۰/۳	۰/۰۷
۰/۵	۲/۵
مقاوم	مقاوم
۲/۵	۱/۲۵

جدول ۳- مقدار MIC و MBC کلرگزیدین در روش میکرویرات دایلوژن بر روی سویه‌های مورد مطالعه

کلرگزیدین ۱٪ mg/ml	باکتری
MBC/MFC	MIC
۰/۳	۰/۰۷
۲/۵	۱/۲۵
۲/۵	۱/۲۵
۰/۶۲	۰/۳

بیماری‌های واگیر و غیر واگیر در سرتاسر دنیا و از طرفی دیگر با توجه به تجویز بسیار زیاد داروهای شیمیایی و سنتتیک و به طبع استفاده بیش از حد و عوارض ناشی از استفاده از این داروها روشهای درمانی رایج را باشکست مواجه کرده است. در نتیجه تمایل افراد به استفاده از روش‌های جایگزین از جمله طب مکمل و طب سنتی به منظور پرهیز از عوارض درمان‌های نامبرده افزایش قابل توجهی پیدا کرده است (۱۲).

امروزه با توجه به شیوع بالای پوسیدگی دندانی در جامعه و همچنین تاثیر بسیار زیاد برخی باکتری‌های از جمله *استرپتوکوکوس موتانس*، *انتروکوک فکالیس* و *لاکتوباسیل کازئی* در شروع و پیشرفت پروسه پوسیدگی دندانی از بین بردن یا مهار رشد این باکتری‌ها در سطح دندان‌های افراد منجر به کاهش میزان پوسیدگی دندانی می‌شود (۲۱، ۲۲). *کاندیدا*

موتانس داشت. در نتیجه *استرپتوکوکوس موتانس*، *لاکتوباسیلوس کازئی* و *کاندیدا آلبیکنس* به عصاره الکلی حساس بودند. اما *انتروکوکوس فکالیس* به این عصاره نیز مقاوم بود (جدول ۲).

نتایج حاصل از MIC، MFC و MBC نشان داد *انتروکوکوس فکالیس* مقاومترین باکتری به عصاره آبی و الکلی می‌باشد و *لاکتوباسیلوس کازئی* نسبت به هر دو عصاره حساسیت خوبی نشان داد. *کاندیدا آلبیکنس* به عنوان سوش فارچی در این مطالعه نسبت به هر دو عصاره حساس بود. هر سه سوش باکتریایی و *کاندیدا آلبیکنس* نسبت به کلرگزیدین ۱٪ حساس بودند. نتایج MIC، MBC و MFC نسبت به کلرگزیدین در جدول ۳ نشان داده شده است.

بحث

طی چند دهه اخیر با توجه به افزایش چشمگیر

انتروکوک فکالیس به عصاره الکلی نیز مقاوم بود. عصاره الکلی قدرت خوبی را بر علیه باکتری های گرم مثبت مورد مطالعه و کاندیدا/آلبیکنس نشان داد. صرف نظر از انتروکوک فکالیس که به تمام رقتهای عصاره آبی و الکلی مقاوم بود، عصاره الکلی نسبت به عصاره آبی اثر ضد باکتریایی و ضد قارچی قویتری داشت. قدرت کمتر عصاره آبی ممکن است به دلیل نوع حلال (آب) و توانایی کمی در انحلال با استخراج مواد مؤثر گیاه باشد. در هر صورت عصاره آبی گیاه ریش بز *gerardiana* اثرات ضد باکتریایی و ضد قارچی می باشد زیرا لاکتوباسیل کازئی و کاندیدا/آلبیکنس که در این تحقیق مورد آزمایش قرار گرفته اند به این عصاره حساسیت نشان دادند.

آزمایش MIC، MBC و MFC نشان می دهد که عصاره الکلی اثر ضد باکتریایی و ضد قارچی قویتری بر روی باکتریهای/استریپتوکوکوس موتانس، لاکتوباسیل کازئی و قارچ کاندیدا/آلبیکنس را داشت. با توجه به اینکه/استریپتوکوکوس موتانس به عصاره الکلی پاسخ داد و به عصاره آبی مقاوم بود، دلیل احتمالی این موضوع ممکن است به استخراج مواد متفاوتی مربوط باشد که با حلال الکلی (اتانول) صورت گرفته است و میکروارگانیسم ها ممکن است نسبت به این مواد دارای حساسیت متفاوتی باشند. حلالهای مختلف دارای توانایی متفاوتی از نظر میزان انحلال و استخراج یک ماده خاص دارند.

در مقایسه اثر ضد میکروبی عصاره ها با کلرهگزیدین ۱٪، نشان داد که هر سه سوش باکتریایی و کاندیدا/آلبیکنس به این ماده حساسیت نشان داده اند. در حالیکه انتروکوک فکالیس و استریپتوکوکوس موتانس حساسیت مشابه به کلرهگزیدین نشان دادند (جدول ۳). لاکتوباسیل کازئی و کاندیدا/آلبیکنس نسبت به کلرهگزیدین تیز حساسیتی مشابه با عصاره الکلی نشان دادند (جدول ۲ و ۳)، این نشان می دهد عصاره الکلی دارای اثر ضد میکروبی نزدیک به کلرهگزیدین ۱٪ را دارا می باشند.

در ارتباط با فعالیت ضد میکروبی گیاه ریش بز در ایران مطالعات اندکی انجام شده است. تحقیق پارسائی مهر و همکاران بر روی گونه های *Procera*، *Strobilacea* و *Pachyclada* نشان داد که این گونه ها

آلبیکنس، قارچ مخمری است که به صورت فلو نرمال بر روی نواحی مخاطی بدن حضور دارد و در افراد دارای نقص سیستم ایمنی، دیابت و مصرف آنتی بیوتیکهای وسیع الطیف، ایجاد عفونت فرصت طلب کاندیدیایی می کند. شیوع روز افزون عفونتهای میکروبی و از سوی دیگر افزایش مقاومت دارویی در بین بسیاری از گونه های میکروبی اقتضا می کند که در توسعه عوامل ضد میکروبی نوین با پایه طبیعی و گیاهی و استراتژی های نوین درمانی اقداماتی صورت گیرد (۲۳-۲۵).

گیاه ریش بز از گیاهان دارویی هست که در درمان آسم، گرفتگی بینی و اختلالات سیستم اعصاب مرکزی کاربرد داشته است (۴). این گیاه در مناطق وسیعی از جهان پراکنده اند و ترکیبات شیمیایی آن بستگی به گونه، اندام گیاه، زمان برداشت، منطقه جغرافیایی و تکنیک استخراج آن دارد. چندین گونه مهم گیاه ریش بز شناخته شده است که اثرات ضد میکروبی بر روی باکتریهای بیماریزا شناخته شده است (۲۷). در مورد اثرات ضد میکروبی گیاه ریش بز گونه *gerardiana* اطلاعات کاملی در دست نمی باشد. لذا در این مطالعه به بررسی اثر ضد میکروبی عصاره های آبی و الکلی گیاه ریش بز گونه *gerardiana* بر روی برخی سویه های باکتری فلور دهان (استریپتوکوکوس موتانس، انتروکوک فکالیس و لاکتوباسیل کازئی) و قارچ کاندیدا/آلبیکنس انجام و اثر ضد باکتری ضد قارچی عصاره ها در برابر کلرهگزیدین ۱٪ مقایسه شد.

مطالعه حاضر نشان داد، عصاره آبی گیاه ریش بز (*gerardiana*) را میتوان دارای قدرت عمل متوسط بر روی سوش های باکتریایی و کاندیدا/آلبیکنس نامید. نتایج بررسی حاضر نشان میدهد که/استریپتوکوکوس موتانس و انتروکوک فکالیس به رقتهای این عصاره مقاوم است. از سوی دیگر عصاره آبی بر روی لاکتوباسیل کازئی دارای اثر بازدارندگی قابل توجهی داشته است. همچنین این عصاره بر روی کاندیدا/آلبیکنس نیز اثر بازدارندگی (MIC و MFC) داشته است. اما بر روی/استریپتوکوکوس موتانس و انتروکوک فکالیس فاقد اثر بازدارندگی بود.

در مقابل عصاره آبی، عصاره الکلی دارای اثر بازدارندگی بر روی/استریپتوکوکوس موتانس بود.

خواص داروئی متعددی که در طب سنتی در مورد این گیاه شناسایی شده است، در مورد اثرات ضد میکروبی این گیاه (اثر بازدارندگی بروی سایر باکتریها، قارچها، تک یاخته ها و ویروسهای بیماریزا) نیاز به تحقیقات بیشتری می باشد.

نتیجه گیری

مطالعه حاضر نشان داد، عصاره آبی و الکلی گیاه ریش بز *gerardiana* بر روی باکتریهای گرم مثبت مورد مطالعه (استرپتوکوکوس موتانس، لاکتوباسیل کازئی) و کاندیدا آلبیکنس دارای خاصیت بازدارندگی می باشند. در مقایسه با کلرگزیدین ۱٪ به عنوان محلول دهانشویه تجاری که دارای عوارض جانبی تغییر رنگ دندان می شود، میتوان از عصاره گیاه ریش بز *gerardiana* تنهائیبا همراه با سایر عوامل ضد میکروبیبه عنوان دهان شویهاستفاده نمود.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند به دلیل پشتیبانی و حمایت بی دریغشان در مورد این مطالعه کمال تشکر را داریم. این مطالعه حاصل پایان نامه دکترای عمومی دندانپزشکیبا کد اخلاق Ir.bums.REC.1398.21 مجوز از کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی بیرجند اخذ شد. نویسندگان این مقاله تعارض منافی برای انتشار این مقاله ندارند.

References

1. Khan A, Jan G, Khan A, Gul Jan F, Bahadur A, Danish M. In Vitro Antioxidant and Antimicrobial Activities of Ephedra gerardiana (Root and Stem) Crude Extract and Fractions. Evid.-Based Complemen Altern. Med. 2017.
2. Rustaiyan A, Javidnia K, Farjam MH, Aboe-Mehrizi F, Ezzatzadeh E. [Antimicrobial and antioxidant activity of the Ephedra sarcocarpa growing in Iran]. J Med Plants Res. 2011;5(17):4251-5. (Persian)
3. Awan MR IZ, Shah SM, Jamal Z, Jan G, Afzal M. Studies on traditional knowledge of economically important plants of Kaghan Valley, Mansehra District, Pakistan. J Med Plants Res. 2011;5(16):3958-67.

دارای اثرات ضد باکتریایی هستند (۲۸). در مطالعه تراب زاده و همکاران، اثر ضد میکروبی عصاره های آبی، الکلی (اتانولی و متانولی) و استنی گونه *major* را بررسی نمودند. نتایج مطالعه اخیر نشان داد، عصاره استنی از گیاه دارای اثر ضد میکروبی بر روی سوش های باکتریایی سودو مونس آئروژینوزا، استافیلوکوکوس آئروس و استرپتوکوکوس پیوژن می باشد اما بر روی اشرشیا کلی اثر بازدارندگی مشاهده نشد (۱۸). در تحقیق Ghanem و همکاران در هند، اثر ضد میکروبی گونه *alata* بر روی چهار سوش باکتریایی (استافیلوکوکوس آئروس، سودومونس آئروژینوزا، باسیلوس سوبتیلیس و اشرشیا کلی) و چهار گونه قارچی (آسپرژیلوس فومیگاتوس، پنسیلیوم ایتالیکوم، سفالاسپوروم راسموزوم و کاندیدا آلبیکنس) تایید شد (۲۹). در این مطالعه فراکشنهای مختلف استخراج شده از عصاره *alata* با روش کرو ماتوگرافی تخلیص و مورد بررسی قرار گرفت. طاهر خانی و همکاران در مطالعه خود اثر عصاره الکلی گونه *sarcocarpa* در غلظت های ۵۱۲-۶۴ میلی گرم بر میلی لیتر را بررسی نمودند. عصاره گونه *sarcocarpa* دارای اثر بازدارندگی بر روی طیفی از باکتریهای گرم مثبت مورد مطالعه داشته است (۳۰).

نتایج آزمایشات انجام شده گیاه ریش بز *gardiana* نشان داد، این گونه نیز دارای خواص ضد باکتریایی و ضد قارچی می باشد و از این حیث می تواند بر علیه طیفی از میکروارگانیسم ها مؤثر باشد. تفاوت در میزان بازدارندگی گونه *gardiana* در مقایسه با سایر گونه های گیاهی ریش بز از لحاظ قدرت و طیف اثر میتواند به نحوه ی استخراج عصاره، گونه گیاه، موقعیت جغرافیایی محل رویش گیاه، استرسهای وارد شده به گیاه و نوع ترکیبات شیمیایی و در نهایت خواص زیستی گیاه مؤثر می باشد.

برای شناسایی بهتر نحوه عملکرد و ضد میکروبی گیاه ریش بز پیشنهاد می شود گونه های مختلف گیاه و بخصوص گونه *gardiana* از مناطق مختلف جمع آوری و مورد بررسی فیتوشیمیایی قرار بگیرد. همچنین پیشنهاد می شود که روش های دیگر استخراج در مورد این گیاه و گونه هایش انجام شود تا بهترین روش و بهترین حلال جهت استخراج مشخص گردد. با توجه به

4. Walter C, Shinwari ZK, Afzal I, Malik RN. Antibacterial activity in herbal products used in Pakistan. *Pak J Bot.* 2011;43:155-62.
5. Coogan MM, Mackeown J, Galpin J, Fatti L. Microbiological impressions of teeth, saliva and dietary fibre can predict caries activity. *J Dentist.* 2008;36(11):892-9.
6. Hooper SJ, Crean S-J, Fardy MJ, Lewis MA, Spratt DA, Wade WG, et al. A molecular analysis of the bacteria present within oral squamous cell carcinoma. *J Med Microbiol.* 2007;56(12):1651-9.
7. Davari A, Haerian A, Danesh KA, Zallaghi PM, Akbarian B. [Prevalence and comparison of dmft in 15 year old male high school students of Yazd city, 2002-2009]. *JSSU.* 2011;19(1):45-53. (Persian)
8. Ghafournia M, Tehrani MHNA. [Casein Phosphopeptides in oral and dental health]. *J Isfahan Dent Sci.* 2008-2009:211. (Persian)
9. Ghasemi M, Jenab SH, Valaei N. [Anti-plaque efficacy of chlorhexidine mouthrinses with and without alcohol]. *J Res Dental Sci.* 2014;10(4). (Persian)
10. Torkzaban P, Zarandi A, Khatami M, Jafari F. [Evaluation of the Effect of Chlorhexidine in Combination with Sodium Perborate on Gingivitis Plaque and Tooth Surface Staining]. *Avicenna J Clin Microbiol Infect.* 2011;18(3):12-6. (Persian)
11. Azizi A, Fath Allah Zade B, SHams Pour A, Lavvaf SH. [The effect of chlorhexidine for 12 percent of the normal oral streptococci pathogenic Microflora]. *Journal of Shiraz Dental School.* 2008;9(3):299-303. (Persian)
12. Zare P, Saeedi M, Akbari J, Morteza-Semnani K. [A Review on Herbal Oral Care Products]. *J Mazandaran Univ Med Sci.* 2017;26(144):394-410. (Persian)
13. Ahvazi M, Akbarzadeh M, Khalighi-Sigaroodi F, Kohandel A. [Introduce some of the medicinal plants species with the most traditional usage in East Mazandaran Region]. *J Med plants.* 2012;4(44):164-75. (Persian)
14. Da Silva NB, Alexandria AK, De Lima AL, Claudino LV, Carneiro TFDO. In vitro antimicrobial activity of mouth washes and herbal products against dental biofilm-forming bacteria. *J Contemp Dent Pract.* 2012;3(3):302.
15. Hossaini S, Abarsaji G. [Medicinal plants of Golestan province]. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants.* 2009;24(4):472-99. (Persian)
16. Zare Bidaki M, Arab M, Khazaei M, Afkar E, Zardast M. [Anti-bacterial effect of zataria multiflora boiss. Essential oil on eight gastrointestinal pathogenic species]. *Horizon Med Sci.* 2015;21(3):155-61. (Persian)
17. Zare Bidaki M, Arab M, Khazaei M, Afkar E. [Anti-bacterial effect of *Mentha spicata* L. essential oil on eight standard species of gastrointestinal pathogens]. *J Birjand Univ Med Sci.* 2014;21(3):274-282. (Persian)
18. Torabzadeh P, Panahi P, Sabokbar A, Mokhtari AR. [Investigation of the antibacterial effects of ephedra major host on the standard strains of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* species]. *J Compar Patho Biol.* 2010;6(4):91-8. (Persian)
19. Nikoomanesh F, Bashardoust B. [Effect of Farnesol on Responsive Gene Expressions in Hyphal Morphogenesis Transformation of *Candida albicans*]. *Infect Epidemiol Microbiol.* 2018;4(2):73-7.
20. Ebrahimi M, Sadraei J, Roudbarmohammadi S, Nikoomanesh F. [The effect of acetone extract of *Moringa peregrina* on *Trichomonas vaginalis*, *Candida albicans* and macrophage cells in vitro]. *Scientific J Kurdistan Univ Med Sci.* 2018;23(1). (Persian)
21. Rezaei-Soufi L, Rafieian N, Jazaeri M, Abdolsamadi H, Kasraei S, Alikhani MU, et al. [Comparison of the Anti-caries Effect of Polyphenol Extract of Green Tea with 0.05 Fluoride, 0.2 Chlorhexidine and Fluoride-Chlorhexidine, An In Vitro Study]. *J Mashhad Dent Sch.* 2012;36(4):301-8. (Persian)
22. Eshghpour M, Mortazavi H, Rezaei NM, Nejat A. [Effectiveness of green tea mouthwash in postoperative pain control following surgical removal of impacted third molars: double blind randomized clinical trial]. *DARU J Pharm Sci.* 2013;21(1):59. (Persian)
23. Woolford CA, Lagree K, Xu W, Aleynikov T, Adhikari H, Sanchez H, et al. Bypass of *Candida albicans* filamentation/biofilm regulators through diminished expression of protein kinase Cak1. *PLoS Gene.* 2016;12(12):e1006487.
24. Chandra J, Mukherjee P, Leidich S, Faddoul F, Hoyer L, Douglas L, et al. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J dental res.* 2001;80(3):903-8.
25. Nett J, Andes D. *Candida albicans* biofilm development, modeling a host-pathogen interaction. *Curr Opin Microbiol.* 2006;9(4):340-5.
26. Fukushima K. Bioactivity of Ephedra: integrating cytotoxicity assessment with real-time biosensing 2004. <http://hdl.handle.net/1903/1715>
27. Hegazi G, El-Lamey T. Callus induction and extraction of ephedrine from *Ephedra alata* Decne. cultures. *American-Eurasian. JAES.* 2011;11(1):19-25.
28. Parsaeimehr A, Sargsyan E, Javidnia K. [A comparative study of the antibacterial, antifungal and antioxidant activity and total content of phenolic compounds of cell cultures and wild plants of three endemic species of Ephedra]. *Molecules.* 2010;15(3):1668-78. (Persian)
29. Ghanem S, El-Magly UI. Antimicrobial activity and tentative identification of active compounds from

the medicinal Ephedra alata male plant. J Taibah Univ Med Sci. 2008;3(1):7-15.

30. Taherkhani M, Rustaiyan A, Rasooli I, Taherkhani T. [Chemical composition, antimicrobial activity, antioxidant and total phenolic content within the leaves essential oil of Artemisia absinthium L. growing wild in Iran]. Afr J Pharm Pharmacol. 2013;7(2):30-6. (Persian)