بررسی تاثیر عصاره اسطوخودوس و رزماری بر روی برخی از باکتری‌های کاندید در میکروبیوم روده‌ای کودکان مبتلا به اختلالات طیف اوتیسم

شیما ابوالحسنی

چکیده

مقدمه: مشکلات گوارشی در کودکان با نداشتن توانایی در زبان آموزی، ویژگی وسواس و جامعه گریزی چشمگیر است و فعالیت میکروبیوم روده‌ای در این افراد نسبتبه افراد دیگر متفاوت می باشد. به منظور بررسی تاثیر خواص ضد باکتریایی گیاه رزماری و اسطوخودوس بر روی *Bacillus subtilis* ابتدا عصاره‌گیری انجام شد.

روش: پلیت‌ها به چهار گروه چهارتایی تقسیم شدند، که یک گروه گواه بود و عصاره مورد استفاده صفر بود و سه گروه پلیت‌ها با غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ درصد از محلول رزماری و سه گروه دیگر اسطوخودوس همراه با باکتری باسیلوس سوبتیلیس آماده سازی شد و در ادامه در روز های اول تا پنجم فعالیت باکتریایی بررسی و اندازه گیری شد.

یافته ها: نتایج بدست آمده نشان دهنده تفاوت معنادار فعالیت باکتری در پلیت گواه با پلیت‌های مورد مطالعه با غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ در گیاه رزماری و اسطوخودوس بود. اما پلیت های با درصدهای ۲۵٪ و ۵۰٪ تفاوت معناداری نداشتند و پلیت مربوط به ۱۰۰٪ با سایر نمونه ها در مراحل بعد تفاوت معناداری نشان داد.

بحث: با توجه به نتایج به دست آمده و تاثیر عصاره گیاه رزماری و اسطوخودوس بر کاهش فعالیت باکتری باسیلوس سوبتیلیس به نظر می‌رسد می‌توان از این روش به عنوان کاهش علایم گوارشی در این بیماران استفاده کرد.

کلمات کلیدی: اسطوخودوس، رزماری، میکروبیوم روده‌ای، باسیلوس سوبتیلیس، اوتیسم

مقدمه

اختلالات طیف اوتیسم،[1] اختلالاتی شناختی و عصبی_ رفتاری بوده و دارای سه ویژگی اصلی اختلال در اجتماعی شدن، اختلال در ارتباطات کلامی و غیرکلامی و الگوهای محدود و تکراری رفتار می‌باشند (انجمن روان‌پزشکی امریکا، ۱۹۹۴). از نظر تاریخچه اولین بار کارنر این اختلال را توصیف کرد (ویلیام و ویلینگ، ۲۰۰۵). علاوه بر نقص در توانایی‌های اجتماعی و رفتارهای کلیشه‌ای و تکراری، کودکان اوتیستیک دارای تأخیر در توانایی‌های حرکتی هستند. تأخیر در توانایی‌های حرکتی در کودکان اوتیستیک متنوع می‌باشد و شامل تأخیر در نشستن، خزیدن، راه رفتن و نیز قدم برداشتن غیرطبیعی، کنترل ضعیف وضعیتی و نیز ناتوانی در برنامه‌ریزی حرکتی می‌باشد (مکدونالد و همکاران، ۲۰۱۷). میکرو فلور روده کودکان اوتیسم نسبت به کودکان سالم دارای باکتری لاکتوباسیلوس و گروه باسیلوس سوبتلیس بالاتری هست که سم تولیدشده توسط این باکتری‌ها بنام انتروتوکسین مولد اسهال و توکسین تهوع زا سبب اختلالات گوارشی در این کودکان می‌شود. تغییر و بر هم خوردن تعادل باکتری‌های خوب در روده و افزایش باکتری‌های مضر نظیر کلستریدیوم تتانی و مخمر کاندیدا آلبیکنس و همچنین افزایش مقدار لاکتو باسیلوس و باسیلوس سوبتلیس و کاهش باکتریوید ها باعث ایجاد بسیاری از مشکلات اعم از مشکلات رفتاری و التهابی در این بیماران می‌شود(ساندلر و همکاران، ۲۰۰۰؛ آدامز و همکاران ۲۰۱۱). میکروبیوم روده در بسیاری از بیماری‌ها نظیر سرطان، بیماری‌های التهابی روده، بیماری‌های سیستماتیک مانند دیابت و سندرم متابولیک تأثیر می‌گذارد و همچنین بر روی بیماری‌های پارکینسون

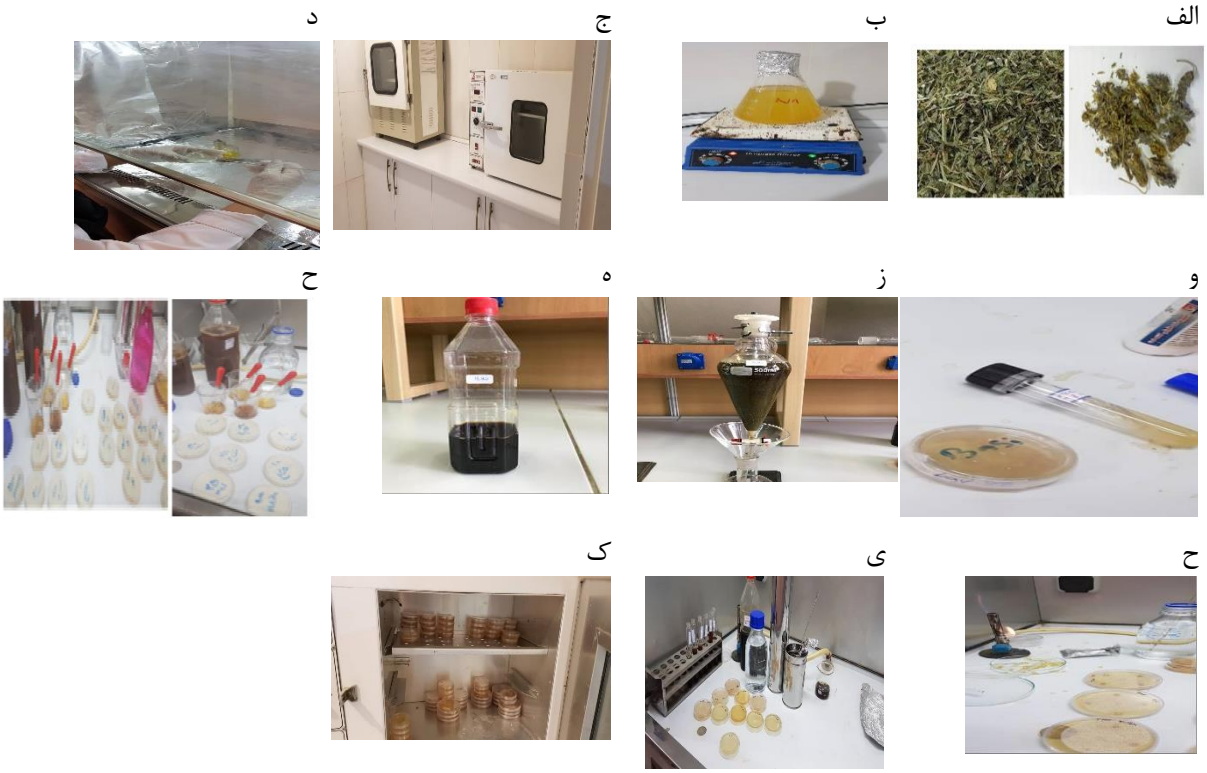
[1] Autism spectrum Disorders

و آلزایمر که از طریق سیستم عصبی مرکزی با اعصاب سمپاتیک و پاراسمپاتیک با روده ارتباط برقرار می‌کند نیز موثر است (لاولی ووالکر، ۲۰۱۳). سیگنال دوطرفه بین دستگاه گوارش و سیستم عصبی مرکزی (**CNS**) به وسیله عصب ستون فقرات و عصب واگ اتفاق می‌افتد، تغییر در ترکیب میکروبیوم روده‌ای سهم مهمی در متابولیسم و برقراری هومئوستاز ایمنی و نیز کنترل فعالیت سیستم عصبی مرکزی از طریق مسیرهای عصبی اندوکرین و ایمنی دارد (استارتری و همکاران، ۲۰۱۷). رزماری با نام علمی *Rosmarinus officinalis L* و یا اکلیل کوهی گیاهی چند ساله و معطر از خانواده نعناعیان می‌باشد. این گیاه بومی منطقه مدیترانه بوده و در حال حاضر تقریبا در همه کشورها به عنوان گیاه دارویی وزینتی شناخته می‌شود ساقه، برگ و گل این گیاه حاوی اسانس می‌باشد(کیارستمی وهمکاران۲۰۰۹). علت بالا بودن فعالیت ضد میکروبی آن هم مربوط به حضور غلظت‌های بالای کارنولول و کارنوسیک اسید واسید رزماریک است (مورینو وهمکاران، ۲۰۰۶). این گیاه به دلیل فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی قوی به‌طور گسترده مورد مطالعه قرارگرفته است. در میان ترکیبات آنتی اکسیدانی آن، دیترپن‌های فنلی توجه بیشتری به خود جلب کرده است (ژینینا و همکاران۲۰۰۸، کوفی و همکاران۲۰۱۰). مطالعات انجام شده بر روی ویژگی‌های گیاه رزماری، خواصی هم چون قابض بودن، ضدالتهابی، ضدافسردگی، ضددیابتی، آنتی تومور، ضد پارکینسون و آنتی اکسیدانی آن اشاره نموده اند (سرایتی و همکاران، ۱۹۹۹؛ اینوی و همکاران۲۰۰۱؛ فریارا و همکاران، ۲۰۱۳). مطالعات نشان داده است که سینئول و آلفا پینن نسبت به سایر ترکیبات فنلی نقش مؤثرتری در خاصیت ضدمیکروبی دارند (هاس سزیمانکزوک، ۲۰۱۱). اثر ترکیبات مؤثر خواص ضد میکروبی رزماری در مناطق گوناگون و شرایط مختلف، مشخصات گیاه، زمان برداشت، روش‌های استخراج عصاره و غلظت‌های عصاره مورد استفاده متفاوت است (زاولی وهمکاران، ۲۰۱۰؛ لوپز و همکاران، ۲۰۰۵). آزمایش‌های متعدد نشان داده است که اسانس رزماری در غلظت‌هایی قدرت یکسان و یا بیشتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌هایی نظیر جنتامایسین، پنی سیلین، استرپتومایسین و اشرشیا کلای نشان می‌دهد و قابل جایگزین با آن‌ها است (بوسنیک وهمکاران، ۲۰۰۶). شیوع اختلال اوتیستیک به دلایل مختلفی در حال افزایشی چشمگیر است. شیوع اوتیسم در پسران ۱ در۴۲ و در دختران ۱ در۱۸۹ است. به عبارتی دیگر، شیوع این بیماری در پسران ۴ برابر بیشتر از دختران است. (کریستنسد، ۲۰۱۲). میزان شیوع اوتیسم در ایالات‌متحده آمریکا در سال۱۹۹۰معادل۴_۵در هر هزار نفر در سال۲۰۰۷ معادل ۱ در۱۵۰ نفر درسال۲۰۱۳ معادل ۱در۵۰ نفر گزارش‌شده است(غفاری وهمکاران، ۲۰۱۶). شیوع تقریبی در سال ۲۰۱۴ طبق گزارش سازمان جهانی آمار سلامت، معادل۲/۲۴٪ تخمین زده شده است، که حدود ۳ برابر بیشتر از سال۲۰۰۰ است. به همین دلیل با افزایش سریع و پیش رونده¬ی اوتیسم تحقیقات فراوانی بر روی آن انجام شده است(ژانگ و همکاران، ۲۰۱۷). کودکان مبتلا به اوتیسم اغلب از مشکلات گوارشی رنج می¬برند (بای وهمکاران،۲۰۱۰). با توجه به اینکه از گذشته از گیاهان به عنوان داروهای ضد میکروبی خام استفاده می¬شده است لذا اهمیت به کارگیری عصاره‌های گیاهان ضد میکروبی نظیر اسطوخودوس، رزماری و ترکیبات جدا شده آن هامانند آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، لاکتون¬ها، دیترپن¬ها، تریپن¬ها که اثر ضد میکروبی دارند بر روی میکروارگانیسم‌های پاتوژن¬زای روده¬ای کودکان اوتیسم حس می-شود تا با استفاده از نتایج احتمالی آن تا حدودی از مشکلات گوارشی کودکان اوتیسم کم شود. میکروبیوم روده ای می تواند در سیستم عصبی افراد اوتیسم نقش داشته باشد، هدف پژوهش حاضر بررسی تاثیر غلظت¬های مختلف عصاره گیاهان اسطوخودوس و رزماری بر روی برخی از باکتری¬های کاندید در میکروبیوم روده‌ای کودکان مبتلا به اختلالات طیف اوتیسم می باشد. در این تحقیق سعی شده است که به بررسی میزان اثر بخشی عصاره¬ی گیاه اسطوخودوس با غلظت¬های مختلف بر روی برخی از باکتری های کاندید در میکروبیوم روده¬ای کودکان مبتلا به اوتیسم و همچنین به بررسی میزان اثر بخشی عصاره ی گیاه رزماری با غلظت های مختلف بر روی برخی از باکتری¬های کاندید در میکروبیوم روده¬ای کودکان مبتلا به اوتیسم پرداخته شود.

روش تحقیق

روش پژوهش حاضر از نظر نوع روش تحقیقی بنیادی می‌باشد و از نظر ماهیت روش از نوع تحقیقات آزمایشی می‌باشد. تحقیق از نوع تجربی و به صورت *in vitro* انجام گرفت. متغیرهای این پژوهش شامل غلظت‌های مختلف عصاره‌های گیاهی (اسطوخودوس lavender و رزماری rozemary)، و سویه باسیلوس سوبتیلیس بود. نمونه‌های گیاهی (اسطوخودوس،رزماری)، از مکان معتبر (جهاد کشاورزی واحد البرز) تهیه شد وسپس در آزمایشگاه دانشگاه پیام نور کرج نمونه‌ها در معرض هوای آزاد و در سایه خشک شدند. نمونه باکتری باسیلوس سوبتیلیس با شماره دستیابی ۱۷۱۵(py79) از مراکز ذخائرژنتیکی وزیستی ایران تهیه گردید. سپس در محیط کشت نوترینت آگار کشت داده شد. پتری ها برای مدت ۲۴ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد در انکوباتور قرار گرفت. برای انجام این تحقیق از دستگاه های زیر استفاده شد: ترازو، اتوکلاو ،phسنج، هود لامینار ،هات پلیت، انکوباتور، اسپکتروفوتومتر به منظور تکثیر باکتری بکار رفته برای آزمایش مورد نظر از محیط کشت نوتریت آگار(NA)بصورت زیر استفاده شد. برای این منظور محیط کشت آماده تجاری ساخت شرکت مرک آلمان خریداری و طبق دستورالعمل وتوصیه شرکت سازنده تهیه و برای تکثیر باکتری مورد استفاده بکار رفت.طبق دستورالعمل ۸/۴ گرم محیط کشت نوتریت آگار را وزن کرده و درون ارلن مایر۵۰۰میلی لیتر ریخته و به میزان۳۰۰میلی لیتر آب مقطر اضافه شد و به مدت پانزده دقیقه بر روی هات پلیت قرار داده ومرتب تکان دادیم، تا محیط کشت خوب حل شود سپس درب ارلن مایر را با پنبه و فویل پوشاندیم. سپس در داخل اتوکلاو و در دمای۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت پانزده دقیقه قرار دادیم تا کاملا استریل شود در نهایت محیط کشت که به دمای ۴۰ درجه سانتیگراد رسید سپس آن را مورد استفاده قرار دادیم، در زیر هود لامینار را که از قبل به مدت بیست دقیقه استریل شده بود و با رعایت کامل موارد بهداشتی و الکل زدن مداوم در حین انجام کار و در کنار شعله، محیط کشت اماده شده را درون ۳۶ عدد پلیت های هشت سانتی متری با دقت توزین کردیم، به صورتی که یک سوم از حجم پلیت ها از محیط کشت پر شدند. سپس بعد از خنک شدن درب گذاری شده و با پارافیلم درب پلیت‌ها بسته شد تا از نفوذ هوا به درون پلیت‌ها جلوگیری شود بعد از این مرحله پلیت‌ها را داخل انکوباتور با دمای ۳۴ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت قرار دادیم. بعد از ۴۸ ساعت محیط کشت‌ها از نظر آلودگی میکروبی بررسی شد و در یخچال نگهداری شدند برای تکثیر باکتری باسیلوس سوبتلیس ابتدا یک انس حلقوی را سترون کرده و مفداری از کلنی باکتری را از منبع اصلی باکتری در زیر هود لامینار در شرایط استریل برداشته وروی سطح محیط کشت نوتریت آگار به صورت خطوط موازی در چند جهت کشیدیم از یک طرف پلیت شروع کرده و چند بار پلیت را به اندازه ۶۰ تا ۹۰ درجه چرخانده ودر منطقه دیگر از انتهای خط منطقه قبلی استفاده کردیم.و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. باسیلوس سوبتلیس شاخه‌ای از فیرمیکوت‌ها ، رده باسیل و تیره باسیلاسه و سرده باسیلوس می‌باشد که به صورت میله‌ای شکل است و می‌تواند یک آندوسپور محافظ سخت و محکم تشکیل دهد و به آن امکان تحمل شرایط سخت را می‌دهد. باسیلوس سوبتلیس یک باکتری هوازی طبقه‌بندی شده است،گرم مثبت و کاتالاز مثبت می‌باشد. سلول‌های باسیلوس سوبتلیس به‌طور معمول از نوع میله‌ای است و در حدود۴-۱۰ میکرومتر و قطری در حدود ۱/۰-۰/۲۵ میکرومتر دارند(یواک و همکاران۲۰۱۴). برای زنده ماندن در شرایط سخت محیطی از جمله درجه حرارت بالا و خشکی زیاد یک آندوسپور تشکیل می‌دهند(مادیگان و مارتینکو۲۰۰۵). باکتری باسیلوس سوبتلیس از مرکز ذخائر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه گردید .عصاره‌ی گیاهان اسطوخودوس ورزماری در مرکز دانشگاه پیام نور کرج آماده سازی شد. روش کار عصاره گیری به این صورت بوده که مقدار ۵۰ گرم گیاه خشک را آسیاب نموده وبا مش۱۸ الی ۳۵ عبور داده،سپس حلال آب به نسبت یک به ده بطور متوالی اضافه گردید داخل سیستم پرکوله ریخته وزمان می دهیم به مدت ۲۴ ساعت و سپس شیر سیستم را باز کرده و عصاره مایع خارج شده را بوسیله کاغذ صافی صاف می کنیم.سپس تا زمان انجام آزمایش در یخچال در درجه حرارت۴+ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. برای هر کدام از عصاره¬ها چهار نوع غلظت در نظر گرفته شده است که شامل ۱. غلظت ۱۰۰٪ عصاره (عصاره خالص): به این ترتیب که ۳۰ میلی لیتر از عصاره خالص را درون بشر ۵۰میلی لیتر ریخته که در هنگام توزیع با پیپت آسانتر باشد. ۲. غلظت۵۰٪ عصاره: ابتدا ۵میلی لیتر از هر کدام از عصاره¬ها داخل بشر ها که دارای مشخصات نوع عصاره و غلظت ان است بصورت جداگانه ریخته و سپس ۵ میلی لیتر آب مقطر استریل بر روی آن اضافه گردید. ۳. غلظت۲۵٪ عصاره: ۲/۵ میلی لیتر از عصاره را درون بشر ۵۰ میلی¬لیتر ریخته و به آن۷/۵میلی لیتر آب مقطر استریل به ان اضافه کردیم. ۴. غلظت صفر(پلیت شاهد) سپس بر روی تمامی بشرها

نوع عصاره گیاهی،میزان غلظت ها یادداشت کرده تا در حین کار اشتباهی رخ ندهد. برای کشت متقابل عصاره‌های گیاهی رزماری و اسطوخودوس با باسیلوس سوبتلیس برای هر عصاره ۱۶ پلیت ۸ سانتیمتری (برای هر غلظت ۴ پلیت در نظر گرفته شد) از محیط کشت نوتریت آگار که از قبل تهیه شده بود و در یخچال نگهداری شده بود،برداشته شدند. چند پیپت پاستور استریل شد ودر چهار طرف پتری دیش با فاصله ۰/۵ سانتیمتری از لبه پلیت‌ها و یکی در مرکز پلیت با پیپت پاستور چاهک‌هایی به قطر ۶ میلی لیتری ایجاد شد. سپس از باکتری باسیلوس سوبتلیس با استفاده از سر سوآپ استریل به میزان مشخصی برداشته و در چاهک مرکزی پلیت قرار داده پس از آن از هر غلظت عصاره‌های گیاه رزماری و اسطوخودوس در چهار پلیت و در چاهک ها بوسیله قطره چکان استریل با دقت بسیاربه صورتی‌که به بیرون از چاهک ها نفوذ پیدا نکند ریخته شد.یک پلیت به عنوان شاهد نگهداری شد که صرفا حاوی باکتری بود ودر چاهک‌ها آب مقطر استریل ریخته شد. سپس هر ۴ پلیت با نوار پارافیلم پوشانده شدند و کلیه پلیت‌ها شماره‌گذاری و نام عصاره، میزان غلظت عصاره به همراه سایر مشخصات مربوطه روی آنها ثبت شد. کلیه پلیت‌ها در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. پلیت‌ها از نظر قطر رشد باکتری هر۲۴ ساعت پایش شدند و این کار تا پر شدن پلیت‌های شاهد ادامه داشت. شکل(۱ الف تا ک).

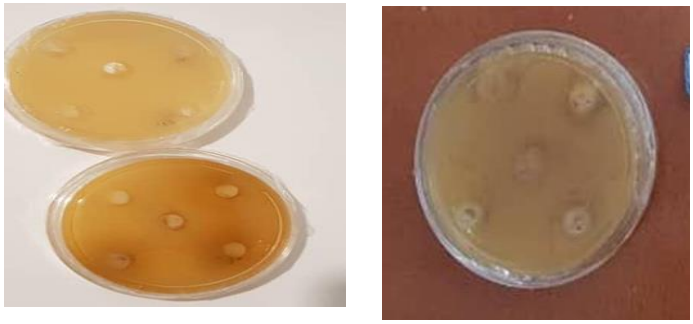


شکل۱- الف: گیاه خشک شده اسطوخودوس، گیاه خشک شده رزماری،ب: مراحل تهیه محیط کشت،حل کردن روی هات پلی، ج: قرار گرفتن پلیت¬ها درون انکوباتور با دمای ۳۴درجه سانتی¬گراد به مدت ۲۴ ساعت، د: تکثیراولیه باکتری بر روی محیط کشت نوتریت آگا، و: منبع اولیه باسیلوس سوبتلی،ز: تهیه عصاره گیاهی اسطوخودوس و رزماری، ه: عصاره گیاهی رزماری، ه تهیه غلظت¬های ۱۰۰٪، ۵۰٪، ۲۵٪ و صفر از عصاره¬های گیاهان اسطوخودوس و رزماری، ح: ایجاد چاهک بوسیله پیپت پاستور بر روی محیط کشت¬های مورد آزمایش در زیر هود لامینا ، ی:پر کردن چاهک¬ها با غلظت¬های مختلف عصاره¬ها، ک: قرار دادن پلیت¬های مورد آزمایش به داخل انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی¬گراد به مدت ۲۴ ساعت

آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک کامل تصادفی انجام شد و برای تجزیه داده‌ها از نرم افزار sas وspss استفاده شد. مقایسه میانگین‌ها با روش دانکن انجام شد و نمودارها با استفاده از نرم افزار اکسل طراحی شدند. تجزیه و تحلیل نتایج با استفاده از برنامه آنالیز واریانس(ANOVA) انجام شد.

نتایج

شاخص‌های آماری تاثیر گیاه رزماری در مهار رشد باکتری باسیلوس سوبتیلیس: شاخص‌های آماری قطر رشد باکتری تشکیل شده در غلظت‌های مختلف محلول گیاه رزماری با درصدهای ۱۰۰٪، ۵۰٪ و ۲۵ ٪ و ۰ ، در روز های اول، دوم، سوم، چهارم، پنجم است که. نشان دهنده عملکرد محلول با درصد غلظت مختلف در روزهای مورد بررسی می‌باشد. به طور کلی اختلاف معنا داری بین اثرات غلظت‌های متفاوت عصاره گیاه رزماری بر مراحل مختلف رشد باکتری باسیلوس سوبتلیس مشاهده شد. در هر سه غلظت مورد استفاده در روزهای اولیه یعنی در دو روز اول تراکم باکتری در حضور عصاره تاثیر زیادی نداشته اما بعد از گذشت پنج روز از رشد باکتری، تراکم باکتری در حضور عصاره با غلظت‌های ۱۰۰٪ و ۵۰٪ نسبت به کنترل کاهش زیادی مشاهده شد شکل(۲). در مقایسه این کاهش در غلظت ۱۰۰٪ نسبت به دو غلظت دیگر بیشتر بوده است. بر اساس نتایج جدول. (۱) این نتیجه‌گیری را می‌توان استنباط نمود که در طول زمان هر اندازه غلظت محلول بالاتر باشد موجب کاهش فعالیت میکروبی (باسیلوس سوبتیلیس) می‌شود شکل(۲).



شکل(۲) سمت راست آزمون کشت باکتری باسیلوس سوبتلیس در مقابل غلظت۵۰٪ عصاره رزماری در روز پنجم. عکس سمت چپ پلیت شاهد در روز پنجم

شکل(۳) سمت راست آزمون کشت باکتری باسیلوس سوبتلیس در مقابل غلظت۱۰۰٪عصاره رزماری در روز پنجم. عکس سمت چپ پلیت شاهد در روز پنجم

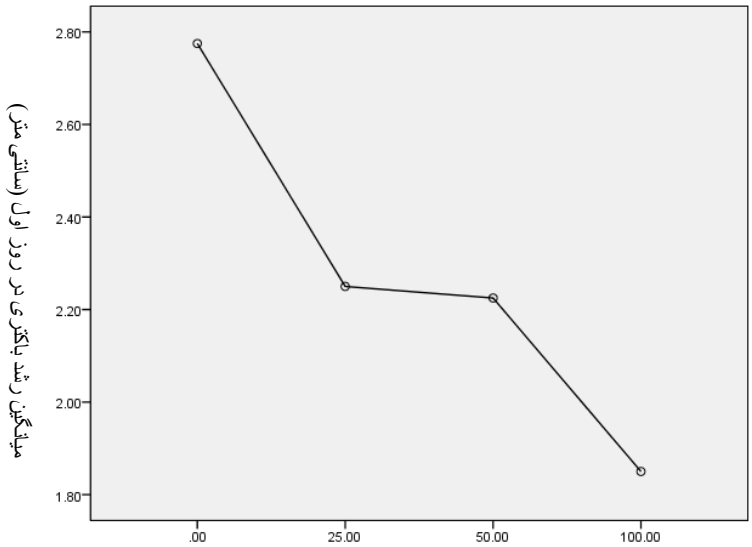
جدول(۱) نتایج آزمون تحلیل واریانس برای بررسی تاثیر گیاه رزماری در رشد باکتری باسیلوس سوبتیلیس در روزهای مختلف

		Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
روز اول	Between Groups	1.735	3	.578	7.931	.004
	Within Groups	.875	12	.073		
	Total	2.610	15			
روز دوم	Between Groups	7.412	3	2.471	8.896	.002
	Within Groups	3.333	12	.278		
	Total	10.744	15			
روز سوم	Between Groups	14.443	3	4.814	10.629	.001
	Within Groups	5.435	12	.453		
	Total	19.878	15			
روز چهارم	Between Groups	25.965	3	8.655	25.933	.000
	Within Groups	4.005	12	.334		
	Total	29.970	15			
روز پنجم	Between Groups	38.647	3	12.882	95.868	.000
	Within Groups	1.612	12	.134		
	Total	40.259	15			

طبق نتایج جدول (۲) نتایج آزمون تحلیل واریانس تفاوت معناداری از تاثیر غلظت‌های مختلف گیاه رزماری با درصدهای ۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ در پیشروی میکروبی در پیلیت‌های مورد مطالعه را نشان داد (P<۰.۰۵). همانطور که در جدول (۴) مشاهده می شود با توجه به گروه بندی صورت گرفته توسط نرم افزار spss (یک گروه بندی در خروجی فوق قابل مشاهده است)، نتیجه گرفته می‌شود اختلاف غلظت‌های مختلف گیاه رزماری در روز اول در پلیت‌های مورد مطالعه معنی‌دار نیست. اما رشد باکتری در برابر غلظت ۱۰۰٪ عصاره گیاه رزماری به نسبت بقیه غلظت‌ها در همان روز اولیه کمتر بوده است. نمودار(۱)

جدول (۲) نتایج آزمون دانکن برای بررسی تاثیر رزماری در روز اول

rozmari	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
100	4	1.8500	
50	4	2.2250	
25	4	2.2500	
0	4		2.7750
Sig.		.069	1.000



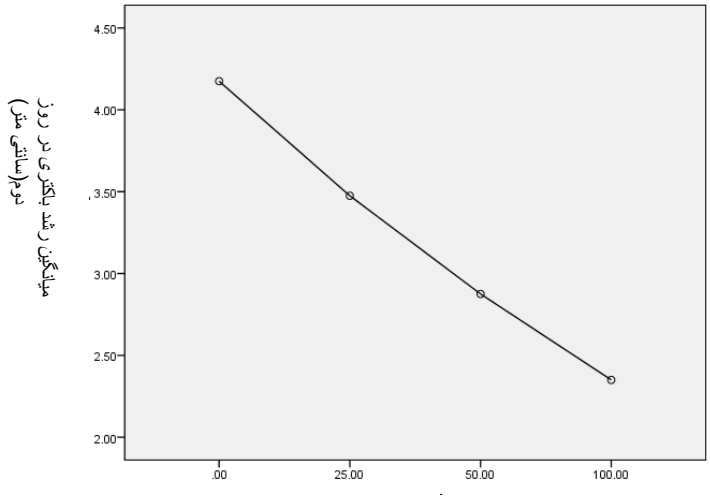
درصد غلظت عصاره گیاه رزماری

نمودار (۱) تفاوت تاثیر تلغیظ رزماری با درصدهای متفاوت در رشد باکتری باسیلوس سوبتیلیس روز اول

همانطور که در جدول (۳) مشاهده می‌شود با توجه به گروه بندی صورت گرفته توسط نرم افزار spss (دو گروه بندی در خروجی فوق قابل مشاهده است)، نتیجه گرفته می‌شود اختلاف غلظت‌های مختلف گیاه رزماری در روز دوم در پلیت‌های مورد مطالعه سه گروه برای غلظت‌های مورد مطالعه جداسازی شده است. در روز دوم آزمون هم غلظت ۱۰۰٪ عصاره توانسته به نسبت بقیه غلظت‌ها کمی بیشتر رشد باکتری را تا حدودی مهار کند. نمودار(۲)

جدول (۳) نتایج آزمون دانکن برای بررسی تاثیر رزماری در روز دوم

rozmari	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
100	4	2.3500		
50	4	2.8750	2.8750	
25	4		3.4750	3.4750
0	4			4.1750
Sig.		.184	.133	.085

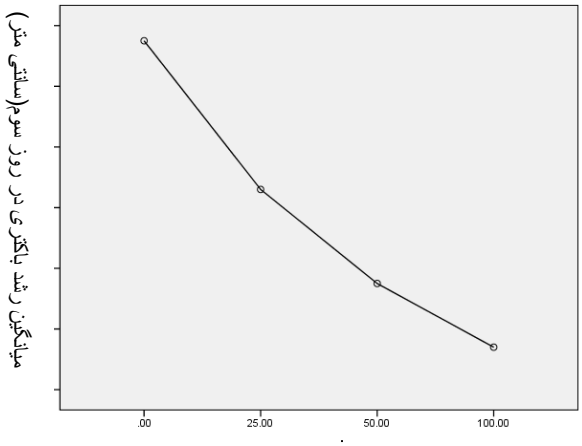


نمودار (۲) تفاوت تاثیر تلغیظ رزماری با درصدهای متفاوت در رشد باکتری باسیلوس سوبتیلیس روز دوم

همانطور که در جدول (۴)مشاهده می‌شود با توجه به گروه بندی صورت گرفته توسط نرم افزار spss (دو گروه بندی در خروجی فوق قابل مشاهده است)، نتیجه گرفته می‌شود اختلاف غلظت‌های مختلف گیاه رزماری در روز سوم در پلیت‌های مورد مطالعه مشاهده می‌شود و سه گروه بندی جداسازی شده است. در روز سوم هم بر منوال روزهای گذشته غلظت ۱۰۰٪ عصاره رزماری غلظت موثر می‌باشد. نمودار(۳)

جدول (۴) نتایج آزمون دانکن برای بررسی تاثیر رزماری در روز سوم

rozmari	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
100	4	2.8500		
50	4	3.3750	3.3750	
25	4		4.1500	
0	4			5.3750
Sig.		.292	.129	1.000



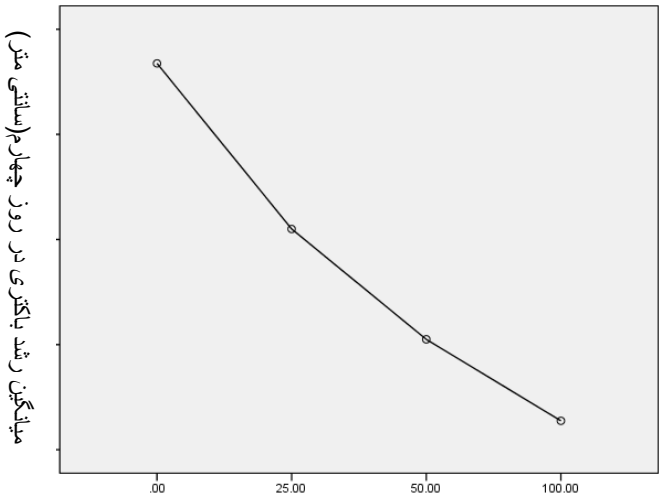
درصد غلظت عصاره گیاه رزماری

نمودار(۳) تفاوت تاثیر تلغیظ رزماری با درصدهای متفاوت در رشد باکتری باسیلوس سوبتیلیس روز سوم

همانطور که در جدول (۶) مشاهده می‌شود با توجه به گروه بندی صورت گرفته توسط نرم افزار spss (دو گروه بندی در خروجی فوق قابل مشاهده است، نتیجه گرفته می‌شود اختلاف غلظت‌های مختلف گیاه رزماری در روز چهارم در پلیت‌های مورد مطالعه مشاهده می‌شود و سه گروه بندی برای قدرت مهار باکتریایی در گروه‌های مورد مطالعه مشاهده می شود. در روز چهارم رقت موثر در مهار باکتری باسیلوس سوبتلیس غلظت ۱۰۰٪ می‌باشد. نمودار(۴)

جدول (۶) نتایج آزمون دانکن برای بررسی تاثیر رزماری در روز چهارم

rozmari	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
100	4	3.2750		
50	4	4.0500		
25	4		5.1000	
0	4			6.6750
Sig.		.082	1.000	1.000



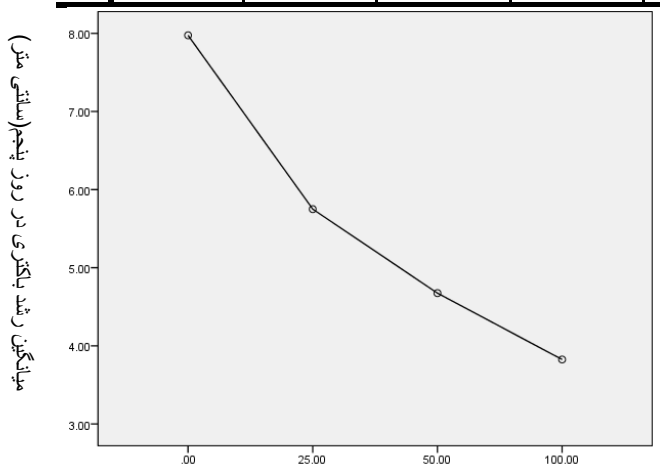
درصد غلظت عصاره گیاه رزماری

نمودار (۴) تفاوت تاثیر تلغیظ رزماری با درصدهای متفاوت در رشد باکتری باسیلوس سوبتیلیس روز چهارم

همانطور که در جدول (۷) مشاهده می‌شود با توجه به گروه بندی صورت گرفته توسط نرم افزار spss (دو گروه بندی در خروجی فوق قابل مشاهده است)، نتیجه گرفته می‌شود اختلاف غلظت‌های مختلف گیاه رزماری در روز پنجم در پلیت‌های مورد مطالعه را نشان می‌دهد. بر اساس نتایج آزمون دانکن چهار گروه برای گروه‌های مورد مطالعه گروه بندی شده است. نتایج این بخش از آزمایش نشان داد که در پلیت‌های با غلظت عصاره ۲۵٪ در روز پنجم برابر با ۶/۲۰ و در پلیت‌های با غلظت عصاره رزماری ۵۰٪ برابر با ۵/۱۰ و در پلیت‌های با غلظت عصاره رزماری ۱۰۰٪ برابر بود با ۴/۱۰ با توجه به مشاهدات به دست آمده نشان داد که غلظت ۱۰۰٪ رزماری توانسته رشد باکتری باسیلوس سوبتلیس را مهار کند. نمودار(۵)

جدول (۷) نتایج آزمون دانکن برای بررسی تاثیر رزماری در روز پنجم

rozmari	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
100	4	3.8250			
50	4		4.6750		
25	4			5.7500	
0	4				7.9750
		1.000	1.000	1.000	1.000



نمودار (۵) تفاوت تاثیر تلغیظ رزماری با درصدهای متفاوت در باسیلوس سوبتیلیس روز پنجم

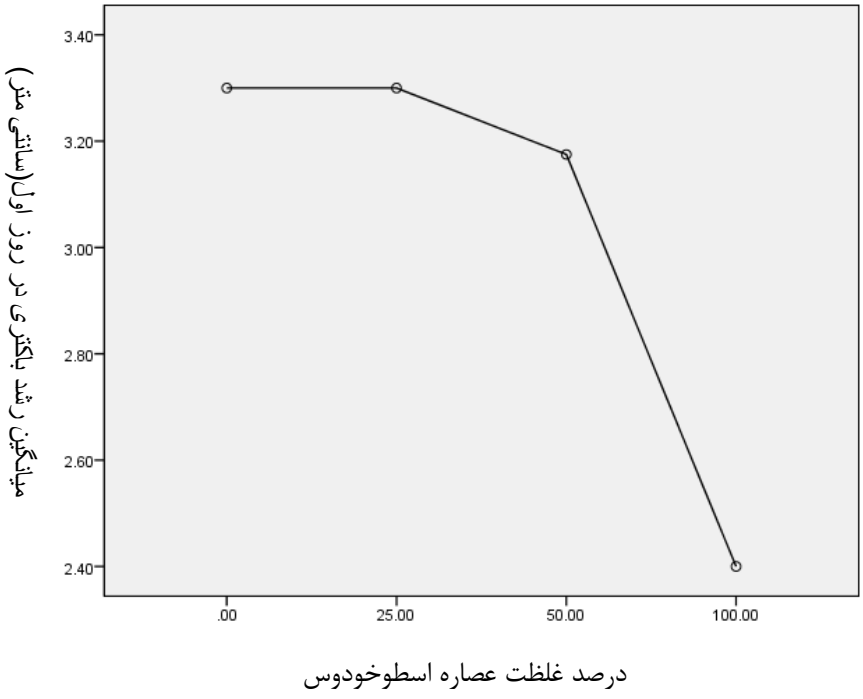
۲شاخص‌های آماری تاثیر گیاه اسطوخودوس در مهار باکتری باسیلوس سوبتیلیس: شاخص‌های آماری قطر رشد باکتری باسیبلوس سوبتلیس تشکیل شده در غلظت‌های مختلف گیاه اسطوخودوس با درصدهای ۱۰۰٪، ۵۰٪ و ۲۵ ٪ و ۰ ، در روزهای اول، دوم، سوم، چهارم، پنجم است که نشان دهنده عملکرد محلول با درصد غلظت مختلف در روزهای مورد بررسی می‌باشد.به طور کلی اختلاف معنا داری بین اثرات غلظت‌های متفاوت عصاره گیاه اسطوخودوس بر مراحل مختلف رشد باکتری باسیلوس سوبتلیس مشاهده شد. در هر سه غلظت مورد استفاده در روزهای اولیه یعنی در دو روز اول تراکم باکتری در حضور عصاره تاثیر زیادی نداشته اما بعد از گذشت پنج روز از رشد باکتری ،تراکم باکتری در حضور عصاره با غلظت‌های ۱۰۰٪ و ۵۰٪ نسبت به کنترل کاهش زیادی مشاهده شد. در مقایسه این کاهش در غلظت ۱۰۰٪ نسبت به دو غلظت دیگر بیشتر بوده است. بر اساس نتایج جدول (۸) این نتیجه‌گیری را می‌توان استنباط نمود که در طول زمان هر اندازه غلظت محلول بالاتر باشد موجب کاهش فعالیت میکروبی (باسیلوس سوبتیلیس) می‌شود.

طبق نتایج جدول(۹) نتایج آزمون تحلیل واریانس نشان داد که تفاوت معناداری در نتایج بدست امده از غلظت‌های مختلف عصاره گیاه اسطوخودوس (درصدهای ۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰) در پیشروی میکروبی در پیلیت‌های مورد مطالعه وجود داشت به طوری که بر اساس نتایج بدست آمده در روزهای چهارم و پنج با توجه به F بدست آمد تفاوت معناداری در تلغیظ‌های مورد اشاره داشته است (P<۰.۰۵). همانطور که در جدول(۱۰) مشاهده می‌شود با توجه به گروه بندی صورت گرفته توسط نرم افزار spss (یک گروه

بندی در خروجی فوق قابل مشاهده است)، نتیجه گرفته می‌شود اختلاف غلظت‌های مختلف گیاه اسطوخودوس در روز اول در پلیت‌های مورد مطالعه معنی دار نیست. ازمون دانکن یک گروه برای تاثیرات گیاه اسطوخودوس در جدول مذکور تشکیل داده است. اما نشان می‌دهد که غلظت ۱۰۰٪ کلنی کمتری ایجاده شده است. نمودار(۶)

جدول (۱۰) نتایج آزمون دانکن برای بررسی تاثیر اسطوخودوس در روز اول

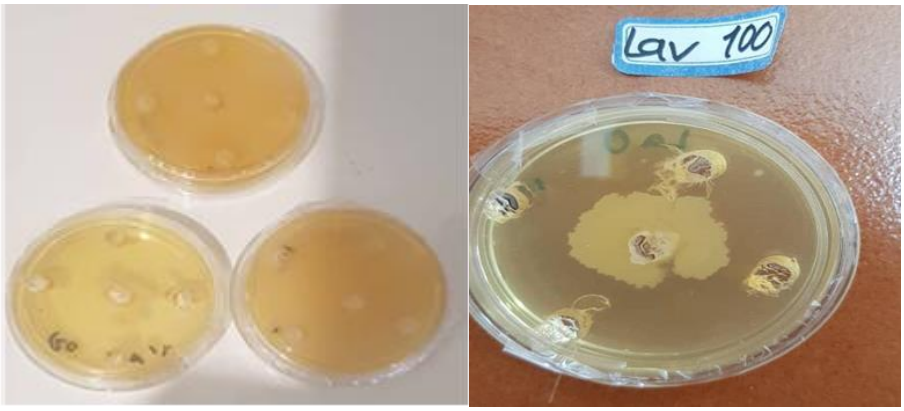
Lavandula	N	Subset for alpha = 0.05
		1
100	4	1.7250
25	4	1.9000
0	4	2.3000
50	4	2.3000
Sig.		.070



نمودار (۶) تفاوت تاثیر تلغیظ اسطوخودوس با درصدهای متفاوت در باسیلوس سوبتیلیس روز اول

همانطور که در جدول (۱۱) مشاهده می‌شود با توجه به گروه‌بندی صورت گرفته توسط نرم افزار spss (یک گروه‌بندی در خروجی فوق قابل مشاهده است)، نتیجه گرفته می‌شود اختلاف غلظت‌های مختلف گیاه اسطوخودوس در روز دوم در پلیت‌های مورد مطالعه معنی دار نیست. ازمون دانکن دو گروه برای تاثیرات گیاه اسطوخودوس در جدول مذکور تشکیل داده است. نتایج

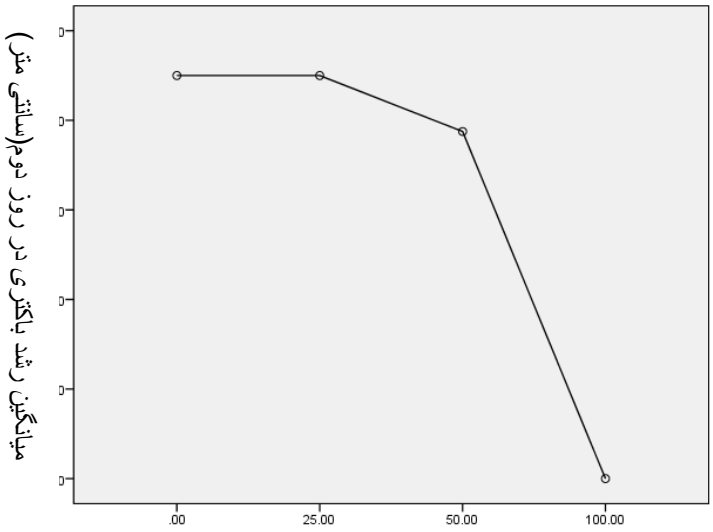
جدول(۶)نشان دهنده اختلاف قابل توجه بین گروه با غلظت ۱۰۰ درصد و نمونه‌های مورد مطالعه می‌باشد. در روز دوم آزمون غلظت ۱۰۰٪ عصاره اسطوخودوس توانسته نسبت به بقیه غلظت‌ها رشد باکتری را کندتر کند. نمودار(۷). شکل(۴)



شکل(۴) آزمون کشت باکتری باسیلوس سوبتلیس در مقابل غلظت ۱۰۰٪عصاره اسطوخودوس در روز دوم

جدول (۱۱) نتایج آزمون دانکن برای بررسی تاثیر اسطوخودوس در روز دوم

Lavandula	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
100	4	2.4000	
50	4		3.1750
0	4		3.3000
25	4		3.3000
Sig.		1.000	.710



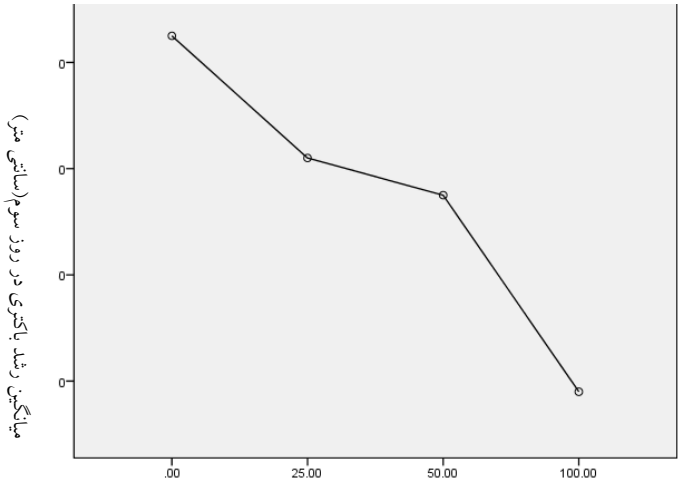
درصد غلظت عصاره اسطوخودوس

نمودار (۷) تفاوت تاثیر تلغیظ اسطوخودوس با درصدهای متفاوت در رشد باکتری باسیلوس سوبتیلیس روز دوم

همانطور که در جدول(۱۲) مشاهده می‌شود با توجه به گروه بندی صورت گرفته توسط نرم افزار spss (یک گروه بندی در خروجی فوق قابل مشاهده است)، نتیجه گرفته می‌شود اختلاف غلظت‌های مختلف گیاه اسطوخودوس در روز سوم در پلیت‌های مورد مطالعه معنی دار نیست. ازمون دانکن دو گروه برای تاثیرات گیاه اسطوخودوس در جدول مذکور تشکیل داده است. نتایج جدول (۱۲) نشان دهنده اختلاف قابل توجه بین نمونه‌های مورد مطالعه می باشد. در روز سوم آزمون غلظت ۱۰۰٪ عصاره اسطوخودوس موثر در مهار رشد باکتری بوده است. نمودار(۸)

جدول(۱۲) نتایج آزمون دانکن برای بررسی تاثیر اسطوخودوس در روز سوم

Lavandula	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
100	4	2.9500	
50	4	3.8750	3.8750
25	4	4.0500	4.0500
0	4		4.6250
Sig.		.068	.198



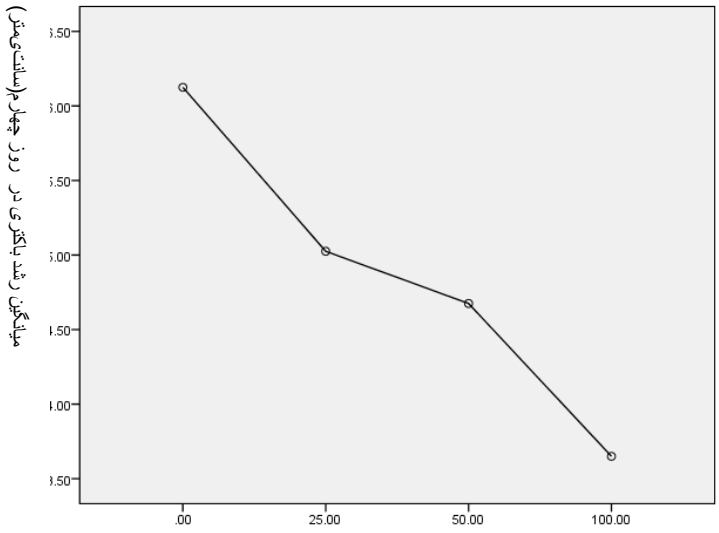
درصد غلظت عصاره گیاه اسطوخودوس

نمودار (۸) تفاوت تاثیر تلغیظ اسطوخودوس با درصدهای متفاوت در رشد باکتری باسیلوس سوبتیلیس روز سوم

همانطور که در جدول (۱۳) مشاهده می‌شود با توجه به گروه بندی صورت گرفته توسط نرم افزار spss (یک گروه بندی در خروجی فوق قابل مشاهده است)، نتیجه گرفته می‌شود اختلاف غلظت‌های مختلف گیاه اسطوخودوس در روز چهارم در پلیت‌های مورد مطالعه معنی‌دار نیست. ازمون دانکن سه گروه برای تاثیرات گیاه اسطوخودوس در جدول مذکور تشکیل داده است. نتایج جدول (۱۳) نشان دهنده اختلاف قابل توجه بین گروه شاهد و نمونه‌های مورد مطالعه می‌باشد. در روز چهارم آزمون متقابل کشت باکتری در مقابل غلظت۱۰۰٪ عصاره اسطوخودوس کمترین قطر رشد باکتری باسیلوس سوبتلیس را داشته است. نمودار(۹)

جدول (۱۳) نتایج آزمون دانکن برای بررسی تاثیر اسطوخودوس در روز چهارم

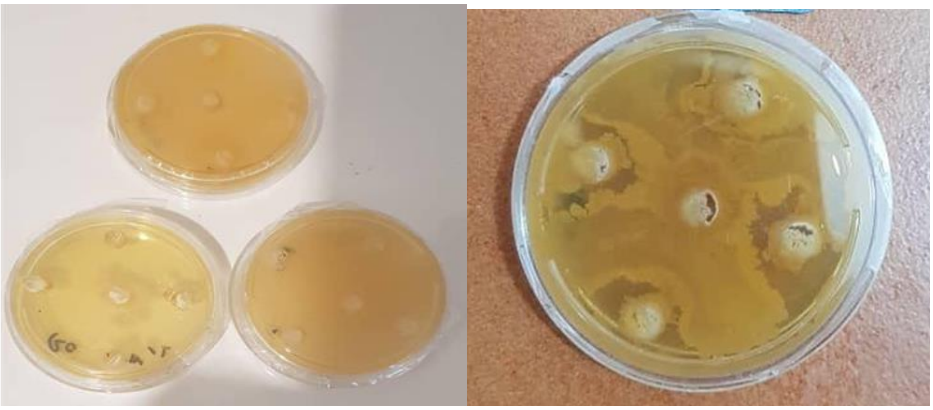
Lavandula	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
100	4	3.6500		
50	4	4.6750	4.6750	
25	4		5.0250	
0	4			6.1250
Sig.		.063	.498	1.000



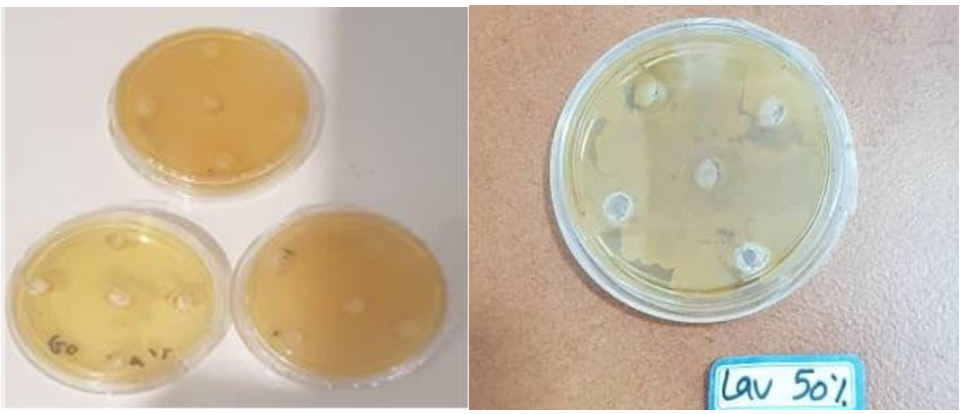
درصد غلظت عصاره اسطوخودوس

نمودار (۹) تفاوت تاثیر تلغیظ اسطوخودوس با درصدهای متفاوت در رشد باکتری باسیلوس سوبتیلیس روز چهارم

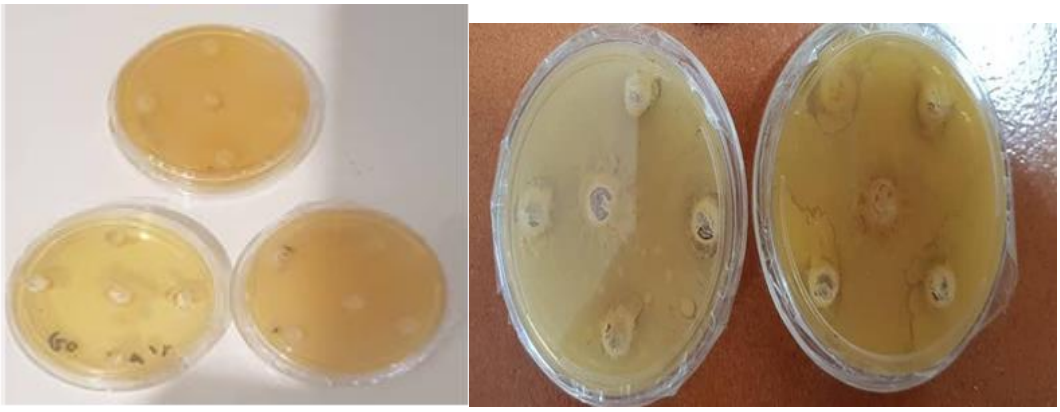
همانطور که در جدول (۱۴) مشاهده می‌شود با توجه به گروه‌بندی صورت گرفته توسط نرم افزار spss (یک گروه بندی در خروجی فوق قابل مشاهده است)، نتیجه گرفته می‌شود اختلاف غلظت‌های مختلف گیاه اسطوخودوس در روز چهارم در پلیت‌های مورد مطالعه معنی-دار نیست. ازمون دانکن سه گروه برای تاثیرات گیاه اسطوخودوس در جدول مذکور تشکیل داده است. نتایج جدول (۱۴) نشان دهنده اختلاف قابل توجه بین گروه شاهد و نمونه های مورد مطالعه می‌باشد. همچنین در روز پنجم بر اساس نتایج جدول ذکر شده میزان تاثیر اسطوخودوس در غلظت ۱۰۰ به طور معناداری با گروه‌های دیگر تفاوت دارد و در یک گروه جداگانه طبقه بندی شده است. به طور کلی اختلاف معنی داری بین اثرات غلظت‌های متفاوت عصاره گیاه اسطوخودوس ۱۰۰٪، ۵۰٪، ۲۵٪ بر مراحل مختلف رشد باکتری باسیلوس سوبتلیس داشته است. کمترین قطر رشد باکتری در برابر غلظت ۱۰۰٪ عصاره بوده و بیشترین قطر رشد در غلظت ۲۵٪ ایجاد شده بود و در گروه شاهد کل پلیت از باکتری مملو بود. نمودار(۱۰)عکس‌های(۵، ۶، ۷)



شکل(۵) آزمون کشت باکتری باسیلوس سوبتلیس در مقابل غلظت ۱۰۰٪عصاره اسطوخودوس در روز پنجم



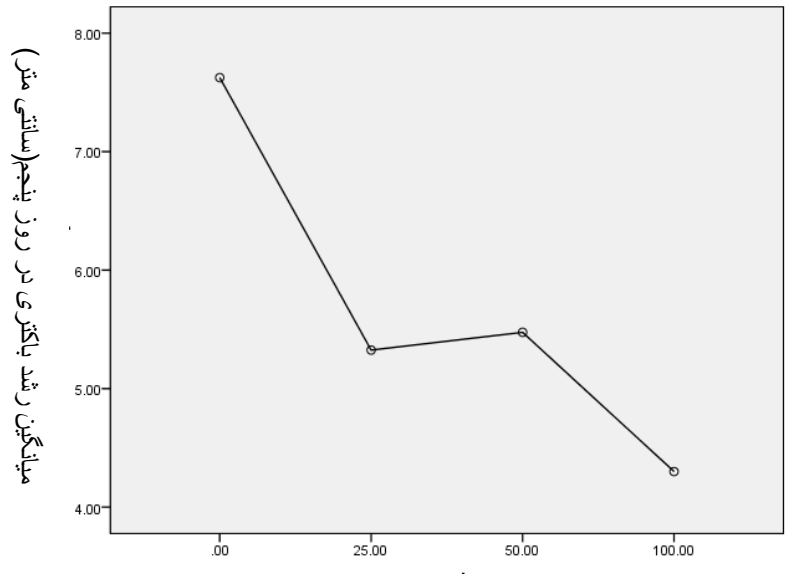
شکل(۶) آزمون کشت باکتری باسیلوس سوبتلیس در مقابل غلظت۵۰٪عصاره اسطوخودوس در روز پنجم



شکل(۷) آزمون کشت باکتری باسیلوس سوبتلیس در مقابل غلظت۲۵٪عصاره اسطوخودوس در روز پنجم

جدول (۱۴) نتایج آزمون دانکن برای بررسی تاثیر اسطوخودوس در روز پنجم

Lavandula	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
100	4	4.3000		
25	4		5.3250	
50	4		5.4750	
0	4			7.6250
Sig.		1.000	.497	1.000



نمودار (۱۰) تفاوت تاثیر تلغیظ اسطوخودوس با درصدهای متفاوت در رشد باکتری باسیلوس سوبتیلیس روز پنجم

بحث

بیماری اوتیسم دارای اساس نوروبیولوژیکی و اختلالات گوارشی بسیار پیچیده و گسترده‌ای می‌باشد که هنوز به‌طور کامل توجیه نشده است.در عین حال هدف درمانی قطعی برای بیماری اوتیسم وجود ندارد، در این پژوهش در میان شمار بسیاری از باکتری‌های روده‌ای تنها به باکتری باسیلوس سوبتلیس (که میزان آن در میکروبیوم روده افراد اوتیسم اختلاف معناداری با گروه سالم داشتند) پرداخته و تاثیر عصاره گیاه رزماری و اسطوخودوس در مهار فعالیت باکتری باسیلوس سوبتلیس بررسی شد. پلیت‌های شاهد پس از کشت متقابل رشد باکتری به لبه‌های پلیت رسید و کاملا پر شدند و ثبت داده‌ها متوقف شد، در نتیجه ثبت و اندازه‌گیری قطرهای رشد باکتری باسیلوس سوبتلیس ایجاد شده در سه گروه دیگر هم در روز پنجم بررسی و اندازه‌گیری شدند. در تمامی پلیت‌های مورد مطالعه فعالیت میکروبی در روزهای اول تا پنجم قابل مشاهده بود، با توجه به نتایج حاصل از پژوهش حاضر غلظت بالای عصاره رزماری و اسطوخودوس موجب کاهش فعالیت میکروبی در مقایسه با گروه کنترل (غلظت صفر درصد) بود، نتایج به دست آمده نشان داد که غلظت‌های مختلف عصاره اسطوخودوس و رزماری در مهار رشد میکروب باسیلوس سوبتلیس موثر بود وتاثیر عصاره با افزایش غلظت عصاره رزماری و اسطوخودوس بیشتر و معنی‌دارتر بود که در غلظت ۱۰۰٪ بیشترین توان کنترلی را از لحاظ آماری نشان داد. نتایج بدست امده از پژوهش حاضر نشان دهنده تاثیر غلظت بالای گیاه رزماری و اسطوخودوس در مهار فعالیت باکتری باسیلوس سوبتیلیس می‌باشد. به طوری که در مقایسه میانگین اثرات متقابل و تجزیه و تحلیل داده‌ها مشخص کرد که رقت ۱۰۰ و ۵۰ درصد عصاره رزماری بیشترین اثر بازدارندگی رشد باکتری باسیلوس سوبتلیس را نسبت به سایر رقت‌ها و همچنین نسبت به رقت ۱۰۰ و ۵۰ درصد عصاره اسطوخودوس داشته و معنی‌دار بوده و با توجه به تحقیقات انجام شده در کودکان اوتیسم و بیماری های روانپزشکی که نشان دهنده فعالیت بیشتر میکروبیوم روده‌ای در این افراد بوده و ارتباط بین میکروبیوم روده‌ای با بیماری‌های اعصاب و روان در تحقیقات مختلف، می‌توان از نتایج پژوهش حاضر در راستای کمک به کودکان اوتیسم در راستای بهبود عملکرد روده‌ای استفاده کرد. همچنین با توجه به نتایج بدست امده از ظرفیت کشاورزی و صنعت دارو سازی می‌تواند در راستای تولید رزماری و اسطوخودوس بهره برد و علاوه بر کمک به مشکلات گوارشی کودکان

اوتیسم می‌تواند به عنوان یک فعالیت اقتصادی استفاده کرد.بر اساس نتایج بدست آمده پیشنهاد می‌شود مطالعات بیشتر و جامع‌تر در زمینه تاثیر عصاره اسطوخودوس و رزماری بر دیگر باکتری‌های موجود در دستگاه گوارش کودکان اوتیسم، مطالعه غلظت‌های مختلف گیاهان دارویی دیگر با اثرات ضدمیکروبی بر باکتری‌های میکروبیوم روده افراد اوتیسم، بررسی تاثیر عصاره گیاهان مورد مطالعه درپژوهش حاضر بر میکروبیوم روی حیوانات مدلینگ آزمایشگاهی و در ادامه بر روی انسان برای تایید نتایج، بررسی تاثیر عصاره گیاهان مورد مطالعه در تحقیق حاضر بر رفتار و عملکرد افراد اوتیسم

منابع

- Al-Sereiti, M. R., Abu-Amer, K. M., & Sena, P. (1999). Pharmacology of rosemary (Rosmarinus officinalis Linn.) and its therapeutic potentials.
- AZIZZADEH, D. A., & FARZAN, A. (2013). The prophylactic capacity of Nepeta Menthoides (Ostokhodus) in prevention of spinal motoneuron injury.
- Christensen, Deborah L (2018) Prevalence and characteristics of autism spectrum disorder among children aged 8 years—autism and developmental disabilities monitoring network, 11 sites, United States, 2012." *MMWR Surveillance Summaries* 65.13: 1
- Diagnostic, A. P. A. (1994). statistical manual of mental disorders. 4th edn American Psychiatric Association. *Washington, DC*.
- Inouye S, Takizawa T, Yamaguchi H(2001). Antibactrial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. J Antimicrob Chemother.;47(5):565-73.
- Kiarostami, K. H., Bahrami, M. A. R. Y. A. M., Talebpour, Z., Nazem-Bokaee, Z., Khanavi, M., & Hadjiakhoondi, A. (2009). Seasonal variation of rosmarinus officinalis L. Essential oils. *Journal of Medicinal Plants*, *4*(32), 84-90
- MohamadkhaniShahri, L., Sabetbirjandi, S., & MohamadkhaniShahri, H. (2013). Effect of massage Aromatherapy with lavandula on the duration of first and second stage of labor in nulliparous women. *Hormozgan Medical Journal*, *17*(2), 145-154.
- Zaouali Y, Bouzaine T and Boussaid M,(2010), Essential oils composition in two Rosmarinus officinalis L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. Food and Chemical Toxicology;48:3144-52.
- Zhang, R., Zhang, H. F., Han, J. S., & Han, S. P. (2017). Genes related to oxytocin and arginine-vasopressin pathways: associations with autism spectrum disorders. *Neuroscience bulletin*, *33*(2), 238-246.
- Zheljazkov, V. D., Cantrell, C. L., Astatkie, T., & Jeliazkova, E. (2013). Distillation time effect on lavender essential oil yield and composition. *Journal of oleo science*, *62*(4), 195-199.
- Zhu, X., Han, Y., Du, J., Liu, R., Jin, K., & Yi, W. (2017). Microbiota-gut-brain axis and the central nervous system. *Oncotarget*, *8*(32), 53829.