

بررسی اثر آنتی باکتریال عصاره های الف ، جوشن ، همیشه سبز و سماق لری بر روی تعدادی از باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی

دکتر غلامرضا طالعی ♦ دکتر محمد هادی مشکوه السادات ♦♦♦ دکتر بهرام دلفان ♦♦♦

یافته / سال پنجم / شماره ۱۸

چکیده

مقدمه : با توجه به افزایش روز افزون مقاومت باکتریها نسبت به آنتی بیوتیکها و عوارض جانبی آنها استفاده از گیاهان دارویی و عصاره های گیاهی مورد توجه زیادی قرار گرفته اند. در این پژوهش اثرات آنتی باکتریال عصاره های سماق لرستان ، الف و درمنه (جوشن) و همیشه سبز بر روی شش باکتری گرم منفی و گرم مثبت استاندارد مورد ارزیابی قرار گرفتند ،

مواد و روشها : برای انجام این پژوهش آزمایشی ابتدا برگ یا میوه تازه گیاه در سایه خشک و تبدیل به پودر شد، سپس در چند مرحله عصاره آن در حلالهای آلی بدست آمد. با تبخیر نمودن حلال ، عصاره در سرم فیزیولوژی استریل بازسازی شده آزمایش دیسک دیفیوژن (DD) و تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) به روش برات میکرودایلوشن انجام گرفت. پس از آماده شدن حداقل غلظت کشندگی باکتریها (MBC) ، مورد استفاده قرار گرفتند .

یافته ها : نتایج نشان داد که عصاره سماق لری (وحشی لرستان) اثر قوی آنتی باکتریال دارد؛ بطوریکه در رقت بسیار پایین ($MIC=5 \mu g/ml$) رشد باسیلوس سروس رامتوقف نمود و در غلظت $MBC=78 \mu g/ml$ موجب مرگ این باکتری شد. اثر عصاره سماق بر باکتریهای گرم مثبت بیشتر از گرم منفی بود؛ به عنوان مثال اثر باکتریواستاتیک و باکتریوسیدال این عصاره بر روی انتروکک فکالیس برابر با $MBC=MIC=30 \mu g/ml$ بود. در حالیکه همین اثر برای سودوموناس و اشرشیاکلی $\mu g/ml$ ۶۰۰ یا بیشتر بود. همچنین عصاره گیاه الف در غلظت های پائین بر باسیلوس سروس اثر آنتی باکتریال داشت و در غلظت $600 \mu g/ml$ بر استاف اپیدرمیدیس و اشرشیاکلی موثر بود. اثر آنتی باکتریال عصاره همیشه سبز بر باکتریهای مورد آزمایش بسیار کم و یا در غلظت مورد آزمایش بی اثر بود. عصاره گیاه جوشن نیز به همین ترتیب بر بعضی از باکتریهای مورد آزمایش موثر بود .

نتیجه گیری : با توجه به نتایج فوق می توان امیدوار بود که عصاره سماق را می توان در درمان بعضی از باکتریهای مقاوم مانند انتروکک فکالیس استفاده نمود. همچنین در صنایع غذایی نیز بعنوان محافظت کننده مواد غذایی قابل استفاده می باشند .

واژه های کلیدی: آنتی باکتریال ، گیاهان دارویی ، عصاره گیاهی

♦ استادیار میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی لرستان

♦♦ استادیار گروه شیمی ، دانشکده علوم پایه ، دانشگاه لرستان ، خرم آباد

♦♦♦ استادیار فارماکولوژی دانشگاه علوم پزشکی لرستان

مقدمه

علم شناسایی و استفاده از گیاهان دارویی به قدمت عمر انسان است. بشر هنگامی که از گیاهان به عنوان غذا استفاده می کرد متوجه برخی از اثرات ویژه از جمله اثر درمانی یا اثرسمی آنها شد. سپس این اطلاعات از نسلی به نسلی دیگر انتقال یافتند. تا همین یک قرن پیش، گیاه درمانی، بخش مهمی از طب معمول بود (۱،۲) و در بیشتر کشورهای جهان، درمان تقریباً با استفاده از منابع طبیعی و به طور عمده گیاهان انجام می گرفت. در ایران، بعثت تنوع آب و هوایی بین ۶ تا ۸ هزار گونه گیاهی روئیده می شود که معادل تقریباً ۶۰ درصد گونه های گیاهی منتشر در سراسر دنیا می باشد (۱،۳).

از آنجا که بیماریهای عفونی و میکروبی دسته بزرگی از بیماریها را تشکیل میدهند و از طرفی شمار سوشهای میکروبی مقام به آنتی بیوتیکها هر روز بیشتر میشوند (۴،۵)، لذا نیاز به مواد ضد باکتریایی جدید و کم ضرر هر روز بیشتر نمایان می گردد. از این رو، بررسی اثرات ضد میکروبی گیاهان طبیعی می تواند راه را برای بدست آوردن آنتی بیوتیکهای جدید هموار سازد.

برای رسیدن به چنین اهدافی در این پژوهش اثرات ضد میکروبی عصاره های چهار گیاه سماق^۱، همیشه سبز^۲، الف^۳ و جوشن^۴ (درمنه) مورد ارزیابی قرار گرفته اند. درمنه در طب قدیم داروی ضد سرفه، اشتها آور و ضد انگل معرفی شده است (۲). همیشه سبز بشکل ضماد در زخمهای پوستی و یا در موارد برونشیت و خلط خونی بکار میرفته است. سماق بعنوان قابض در درمان اسهال و بند آورنده خونریزی و برای تقویت معده مصرف می شد است (۱،۲).

مواد و روشها

گیاه الف از ارتفاعات گرین لرستان جمع آوری شد. گیاه جوشن از ارتفاعات سراب کهمان در نزدیکی شهر الشتر جمع آوری می شد و گیاه همیشه سبز یا ریش بز در نواحی مختلف استان لرستان بخصوص شرق و غرب خرم آباد می روید. گیاه

سماق در ارتفاعات لرستان از جمله اشترانکوه، دامنه های سفید کوه و کوه میل می روید.

برای تهیه عصاره، برگ تازه گیاهان در سایه خشک و سپس پودر شد. ابتدا به مدت ۴۸ ساعت در هگزان خیسانده و با صاف کردن و تبخیر حلال در فشار کم ماده غلیظی بدست آمده که با اضافه کردن حلال جدید و بهم زدن شدید به مدت ۲ ساعت در دمای ۱۵- درجه سانتیگراد نگهداری شد. بعد از خارج کردن رسوبات با سانتریفوژ و تبخیر حلال عصاره خالص بدست آمد. این عصاره برای تهیه دیسک دیفیوژن (DD)^۵ و پس از تبخیر و باز سازی در سرم فیزیولوژی استریل برای انجام آزمایشات حداقل غلظت باکتریو استاتیک (مهار کنندگی) (MIC)^۶ و حداقل غلظت کشندگی (MBC)^۷ استفاده گردید. آزمایش MIC در پلیت ۹۶ خانه استریل و با روش برات میکرو دایلوژن^۸ انجام گرفت (۶). به این ترتیب که ابتدا از محیط کشت مولر هینتون برات (مرک آلمان) ۱۰۰ μl داخل ۹۶ چاهک میکروپلیت ریخته شد؛ سپس به اولین چاهک یک ردیف ۱۰۰ μl عصاره اضافه شد و از خانه دوم به سوم و به همین ترتیب تا خانه دهم رقیق شد. در ردیف دیگری هم ۱۰۰ μl از یکی از آنتی بیوتیکهای سیپروفلوکساسین، جنتامایسین و تتراسایکلین مناسب با حساسیت باکتری مورد آزمایش اضافه و طبق روش بالا رقیق کردیم. در آخر به همه چاهک ها، ۱۰۰ سوسپانسیون میکروبی رقیق شده معادل لوله نیم مک فارلند^۹ اضافه کردیم (۶). بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، بوسیله پایه پلیت tray-reading stand که به همین منظور ساخته شد، کف پلیت را زیر نور در آینه مشاهده کردیم. وجود کدورت که نشان دهنده رشد یا عدم رشد باکتری بود را در جدول مخصوص یادداشت کردیم. طبق تعریف غلظت آخرین (رقیق ترین) چاهکی که هیچ کدورتی در

1. Rhus Coriaria
2. Ephedra Intermedia
3. Daphne Mucronate
4. Artemisia Persica
5. Disk Diffusion test (DD)
6. Minimal inhibitory concentration (MIC)
7. Minimum Bactericidal concentration (MBC)
8. Broth microdilution test
9. Mc Farland 0.5 Standard

جدول ۲: تعیین متوسط (n=3) MBC و MIC عصاره سماق، الف و درمنه، همیشه سبز بر باسیلهای گرم منفی و گرم مثبت (میکروگرم در میلی لیتر)

عصاره	اشرشیاکلی ATCC 25923		سودوموناس ATCC 1228		باسیلوس سروس	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
سماق	۵۰۰	۱۲۵	>۵۰۰	۵۰۰	۷۸	۵
همیشه سبز	>۶۰۰*	>۶۰۰	>۶۰۰	>۶۰۰	۶۰۰	۶۰۰
الف	>۶۰۰	۶۰۰	>۶۰۰	>۶۰۰	۱۵۰	۱۵۰
درمنه	>۶۰۰	۶۰۰	>۶۰۰	>۶۰۰	۴۰	۱۵۰
سپیروفلوکسازین	۵	۱	-	-	۱	۱
جنتامایسین	-	-	۲	۲	-	-

*غلظت بیشتر از ۶۰۰ میکروگرم در میلی لیتر آزمایش نگردید.

همچنین در غلظت ۱۵۰ µg/ml بر استاف اپیدرمیدیس و استاف ارتوس و در غلظت ۱۲۵ µg/ml بر اشرشیاکلی اثر باکتريواستاتیک داشت. اثر MBC این عصاره در غلظت ۷۸ µg/ml بر باسیلوس سروس و در غلظت ۳۰ µg/ml بر انتروکوک فکالیس و در غلظت ۱۵۰ µg/ml بر استاف اپیدرمیدیس مشاهده شد. در روش DD قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک عصاره برای استاف ارتوس ۱۲ mm، استاف اپیدرمیدیس ۱۰ mm، انتروکوک فکالیس ۸ mm، اشرشیاکلی، سودوموناس و باسیلوس سروس ۱۱ mm بود (جدول ۳، ۴).

جدول ۳: متوسط (n=3) قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک

عصاره های گیاهی و کنترل آنتی بیوتیک (بر حسب میلیمتر) در

کشت کوکسی های گرم مثبت

عصاره	غلظت (میکرو گرم)	استاف ارتوس ATCC 25923	استاف اپیدرمیدیس ATCC 1228	انتروکوک فکالیس ATCC 29212
سماق	۲۰۰	۱۲	۱۰	۸
همیشه سبز	۲۰۰	<۵	<۵	۵
الف	۲۰۰	<۵	<۵	<۵
درمنه	۲۰۰	<۵	<۵	<۵
کانامایسین	۳۰	<۵	<۵	<۵
جنتامایسین	۱۰	۲۰	۱۵	۱۱
تتراسایکلین	۳۰	<۵	<۵	<۵

قطر دیک مورد استفاده ۴/۵ میلیمتر بود. هاله کمتر از ۵ میلیمتر منفی فرض میشود.

آن ایجاد نشده بود معادل MIC قرار داده شد. کنترل عصاره، محیط کشت و میکروب نیز جداگانه منظور گردید.

برای تعیین MBC، ۱۰۰ µl از سه خانه ما قبل خانه MIC را جداگانه روی محیط مولر هینتون آگار (مرک آلمان) کشت دادیم. پس از ۲۴ ساعت، کمترین غلظتی از عصاره آنتی بیوتیک که باکتری در آن رشد نکرده بود به عنوان غلظت کشندگی MBC گزارش کردیم (۶). جهت آزمایش DD، باکتریها را روی محیط ایزوسنسی تست آگار^۱ کشت داده، دیسک های حاوی عصاره و دیسک های آنتی بیوتیک را روی آن قرار دادیم. پس از ۲۴ ساعت، انکوباسیون در ۳۷ درجه قطر هاله عدم رشد را از پشت پلیت با خط کش اندازه گیری کردیم و نتایج حاصل از آنتی بیوتیکها را با جداول NCCLS^۲ مقایسه کردیم. بجز یک مورد، همه باکتریهای مورد استفاده در این آزمایش ها، باکتریهای استاندارد دارای کداز ATCC^۳ بودند. همه آزمایش ها سه بار تکرار شدند و نتایج بصورت متوسط آنها ارائه گردیدند.

یافته ها

عصاره سماق در غلظت بسیار پائین ۵ µg/ml بر باسیلوس سروس و در غلظت ۳۰ µg/ml بر انتروکوک فکالیس (سابقا استرپ فکالیس) اثر باکتريواستاتیک نشان داد (جدول ۱، ۲).

جدول ۱: تعیین متوسط (n=3) غلظت MBC و MIC عصاره میوه سماق و برگ گیاهان الف، درمنه و همیشه سبز بر کوکسی های گرم

مثبت (میکروگرم در میلی لیتر)

عصاره	باکتری	استاف ارتوس ATCC 25923				استاف اپیدرمیدیس ATCC 1228	انتروکوک فکالیس ATCC 29212
		MIC	MBC	MIC	MBC		
سماق		۱۵۰	۵۰۰	۱۵۰	۱۵۰	۳۰	
همیشه سبز		>۶۰۰*	>۶۰۰*	۶۰۰	۶۰۰	۶۰۰	
الف		>۶۰۰	>۶۰۰	۶۰۰	۶۰۰	۴۰	
درمنه		>۶۰۰	>۶۰۰	۶۰۰	۶۰۰	۱۵۰	
سپیروفلوکسازین		۲/۵	۰/۵	۱۲	۴	۵	

*غلظت بیشتر از ۶۰۰ میکروگرم در میلی لیتر آزمایش نگردید

1. Isosensitest agar
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards
3. American Type and Culture Collection

جدول ۴- متوسط (n=3) قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک عصاره های گیاهی و کنترل آنتی بیوتیک (برحسب میلیمتر) در کشت

عصاره	باسیلهای گرم منفی و گرم مثبت		
	باسیلوس سروس	سودوموناس اتروژینوزا ATCC 27853	اشرشیاکلی ATCC 25923
سماق	۱۱	۱۱	۲۰۰
همیشه سبز	۷	۶	۱۰۰
الف	<۵	<۵	۲۰۰
درمنه	<۵	<۵	۱۰۰
کانامایسین	۸	<۵	۲۰۰
جتنامایسین	۶	<۵	۱۰۰
تتراسایکلین	۱۰	<۵	۲۰۰
	۶	<۵	۱۰۰
	۳۰	<۵	۳۰
	۲۸	۲۰	۱۰
	۲۵	<۵	۱۸

قطر دیک مورد استفاده ۴/۵ میلیمتر بود. هاله کمتر از ۵ میلیمتر منفی فرض میشود.

عصاره گیاه الف، در غلظت پائین $40 \mu\text{g/ml}$ بر باسیلوس سروس هم اثر باکتریواستاتیکی و هم اثر باکتریوسیدال داشت (جدول ۱، ۲). در غلظت $600 \mu\text{g/ml}$ بر استاف اپیدرمیدیس و اشرشیاکلی اثر باکتریوسیدال نشان داد؛ ولی اثر باکتریوسیدال عصاره فوق بر باکتریهای ذکر شده در غلظت مورد آزمایش مشاهده نگردید. بجز برای باسیلوس سروس که در غلظت g/ml 150μ اثر باکتریوسیدال مشاهده گردید. در روش DD هم قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک، برای باسیلوس سروس 8mm بود که تایید کننده نتیجه آزمایشات MIC و MBC عصاره الف بر باسیلوس سروس می باشد (جدول ۳، ۴).

عصاره جوشن در غلظت $40 \mu\text{g/ml}$ بر باسیلوس سروس و در غلظت $150 \mu\text{g/ml}$ بر استاف اپیدرمیدیس و انتروکوک فکالیس اثر باکتریواستاتیکی نشان داد (جدول ۱، ۲). اثر باکتریوسیدال این عصاره هم بر باسیلوس سروس در غلظت $150 \mu\text{g/ml}$ و هم بر استاف اپیدرمیدیس و انتروکوک فکالیس در غلظت $600 \mu/ml$ مشاهده گردید. قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک این عصاره برای استاف ارئوس 6mm و استاف اپیدرمیدیس 8mm ، استرپ فکالیس 9mm ، اشرشیاکلی 6mm و باسیلوس سروس 10mm بود (جدول ۳، ۴).

عصاره گیاه همیشه سبز در غلظت $600 \mu\text{g/ml}$ بر استاف اپیدرمیدیس، انتروکوک فکالیس و باسیلوس سروس اثر باکتریواستاتیک و در همین غلظت بر استاف اپیدرمیدیس و انتروکوک فکالیس نیز اثر باکتریوسیدال داشت (جدول ۱، ۲).

بحث

عصاره سماق لری در غلظت بسیار پائین بر رشد باسیلوس سروس و انتروکوک فکالیس اثر مهار کننده و کشندگی داشت که نشان دهنده اثر آنتی باکتریال قوی این عصاره بر این دو باکتری گرم مثبت و احتمالا سایر خانواده های باکتریهای گرم مثبت می باشد. عصاره سماق بر استاف اپیدرمیدیس هم اثر باکتریوسیدال و هم باکتریواستاتیک داشت که اعداد نزدیک بهم MBC و MIC نیز نشاندهنده اثر قوی باکتریوسیدال عصاره این گیاه بر این باکتریهاست. به طور کلی می توان نتیجه گرفت که احتمالا اثرات آنتی باکتریال عصاره سماق لری بر کوکسی ها و باسیلهای گرم مثبت نسبت به باسیلهای گرم منفی بیشتر است.

عصاره همیشه سبز در غلظت بالا بر استاف اپیدرمیدیس و انتروکوک فکالیس اثر باکتریواستاتیک داشت. این موضوع شاید نشان دهنده این است که عصاره خام این گیاه اثرات آنتی باکتریال قوی ندارد و جهت رسیدن به اطمینان باید مواد خالص تر را از عصاره استخراج و بررسی کرد. عصاره الف در غلظت پائین بر انتروکوک فکالیس موثر بود و نشاندهنده اثر قوی آنتی باکتریال این عصاره بر انتروکوک فکالیس و احتمالا خانواده باکتریهای استرپتوکوکا^۱ و انتروکوک ها می باشد. در مورد باسیلوس سروس عصاره الف اثر باکتریوسیدال داشت و به طور کلی عصاره الف بر باکتریهای گرم مثبت موثرتر بود در حالیکه بر باسیلهای گرم منفی اثر کمتری داشت. عصاره گیاه جوشن در غلظت پائین بر باسیلوس سروس اثر باکتریواستاتیکی نشان داد که نشاندهنده اثر آنتی باکتریال این عصاره بر باسیلهای گرم مثبت است.

در بررسی مطالعات گذشته، گزارشی از اثر آنتی باکتریال عصاره سماق و همیشه سبز ملاحظه نشده است. در مطالعه ایی

1. Strewptococui Entero cocci

References

- ۱- زمان، م: گیاه دارویی، روشهای کشت و برداشت، تهران، انتشارات ققنوس، ۱۳۷۳، صص ۳-۵
- ۲- شفیق زاده، ف: گیاهان دارویی لرستان، خرم آباد، انتشارات دانشگاه علوم پزشکی لرستان، موسسه فرهنگی انتشاراتی حیان، صص ۸۲
- ۳- دیابتی، ب: تحقیقات گیاهان دارویی، تهران، انتشارات موسسه جنگلها و مراتع، جلد (۱)، ۱۳۷۷، صص: ۱۴-۱۸
- ۴- بخشی، ش: بررسی اثر آنتی باکتریال عصاره گیاهان الف و جوشن بر روی تعدادی از باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی. پایان نامه برای کسب درجه دکترای پزشکی دانشگاه علوم پزشکی لرستان سال ۱۳۸۲
- ۵- رناسی، آ: بررسی اثر آنتی باکتریال عصاره گیاهان سماق و همیشه سبز بر روی تعدادی از باکتریهای گرم مثبت و منفی. پایان نامه برای کسب درجه دکترای پزشکی دانشگاه علوم پزشکی لرستان سال ۱۳۸۲
6. Mahon C R, Manoselis G, Textbook of Diagnostic Microbiology, Chapter 3, 2nd edition WB. Saunders Company, 2000; PP: 62-95
7. Moellering RC. Antibiotic resistance: lessons for the future. Clin Infect Dis 1998; 27: S 135-140
8. Cohen ML Changing patterns of infectious disease. Nature, 2000; 406: 762-767
9. Cho. SH, Na YE, Ahn YJ. Growth-inhibition effects of seco- tanaparholides identified from *Artemisia princeps* var: *orientalis* whole plant on human intestinal bacteria. J Appl Microbiol, 2003; 95: 7-12
10. Cottiglia F, Loy G, Gara D, et al. Antimicrobial evaluation of coumarins and flavonoides from stem of *Daphne gnidium* L. Phytomedicine, 2001; 8: 302-305

که در کره بر روی گیاه (*Artemisia Princeps*) صورت گرفته است تاناپارثولیدهای (*tanaparholides*) استخراجی از این گیاه توانسته است جلو رشد باکتریهای که اسیدلاکتیک تولید نمی کنند مانند کلستریدیوم پرفرنژرز، باکترئیدس فراژپلیس و استافیلوکوک ارئوس را بگیرد؛ در حالیکه بر رشد باکتریهای مانند اشرشیاکلی و بیفیدوباکتریوم اثر ضعیفی داشته است (۷). در مطالعه دیگری استخراج عصاره از ریشه گیاه الف (*Daphne gnidium*) اثر آنتی باکتریایی بر اشرشیاکلی و باسیلوس لنتوس (*B. lentus*) مشاهده شده است اما این اثر بر قارچها مشاهده نشده است (۸).

در پایان می توان نتیجه گیری نمود که از عصاره سماق می توان در صنایع غذایی بعنوان محافظت کننده استفاده نمود. همچنین اثرات آنتی باکتریال این عصاره بر باکتری مقاوم انتروکوک فکالپس را نیز بایستی مورد بررسی و آزمایش بالینی قرار داد تا بتوان در درمان عفونتهای این باکتری مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از همکاری خانمها مهین بهزادی، دکتر آرمیتی روناسی و دکتر شیرین بخشی تشکر و قدردانی می گردد.