مقاله پژوهشی

بررسی اثر ضد میکروبی عصاره گیاه کلپوره بر میکروارگانیسم‌های عامل عفونت در شرایط آزمایشگاهی

دکتر فریده طباطبایی یزدی*، بهروز علیزاده بهبهانی**، مریم حیدری سورشجانی***، دکتر سید علی مرتضوی****

دریافت : ۹۲/۶/۳۰ ، پذیرش : ۹۲/۱۱/۱۵

چکیده:

مقدمه و هدف: کلپوره یا مریم نخودی با نام علمی Teucrium polium متعلق به تیره نعناع، به صورت گسترده در طب سنتی جهت درمان بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گرفته است. با توجه به وجود ترکیبات بیولوژیکی فعال موجود در گیاه کلپوره، به نظر می‌رسد این گیاه دارای اثرات ضد میکروبی قابل ملاحظه‌ای باشد. هدف از این مطالعه ارزیابی اثر ضد میکروبی غلظت‌های مختلف عصاره‌های آبی و اتانولی گیاه کلپوره بر Escherichia coli PTCC 1330، Staphylococcus aureus PTCC 1337، Staphylococcus epidermidis PTCC 1435، Streptococcus pyogenes PTCC 1447 و Pseudomonas aeruginosa PTCC 1310 در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد.

روش کار: در این مطالعه تجربی، اثر ضد میکروبی عصاره به دو روش پخش عصاره در سطح محیط کشت و انتشار در آگار (دیسک) مورد ارزیابی قرار گرفت. حداقل غلظت مهارکنندگی (Minimum Inhibitory Concentration ; MIC) و حداقل غلظت کشندگی (Minimum Bactericidal Concentration ; MBC) با استفاده از روش رقت لوله‌ای تعیین گردید. داده های بدست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS 17 وتوسط آزمون های آماری آنوا و دانکن مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

نتایج: در روش انتشار در آگار همه غلظت‌های عصاره اتانولی بر Staphylococcus epidermidis،Streptococcus pyogenes و Staphylococcus aureus اثر بازدارندگی داشت. MIC عصاره آبی و اتانولی برای Pseudomonas aeruginosa به ترتیب ۶۴ mg/ml و۳۲ و MBC عصاره آبی و اتانولی نیز در خصوص Pseudomonas aeruginosa به ترتیب ۲۵۶ mg/ml و ۱۲۸ بود. Pseudomonas aeruginosa بیشترین مقاومت را در برابر عصاره‌های آبی و الکلی کلپوره نشان داد.

نتیجه نهایی: عصاره اتانولی گیاه کلپوره در شرایط آزمایشگاهی اثر ضد میکروبی قابل ملاحظه ای برPseudomonas aeruginosa و Escherichia coli بعنوان باکتری گرم منفی و Streptococcus pyogenes، Staphylococcus epidermidis وStaphylococcus aureus به عنوان باکتری‌های گرم مثبت نشان داد.

کلید واژه ها: حداقل غلظت کشندگی / حداقل غلظت مهارکنندگی / گیاه کلپوره / میکروارگانیسم ها

مقدمه :

یکی از مهم ترین چالش‌های درمانی، مقابله با عوامل بیماری‌های عفونی و مسمومیت زا به دلیل شیوع و گسترش بالای آن می باشد. استفاده بی رویه از آنتی بیوتیک ها منجر به افزایش مقاومت دارویی در اکثر باکتریها گردیده است لذا یافتن ترکیبات ضدمیکروبی جدید با کم ترین اثرات جانبی امری ضروری به نظر می رسد(۱).

ایران به علت تنوع آب و هوایی و وسعت زیاد دارای طیف وسیعی از گیاهان دارویی می باشد که اساس و پایه طب سنتی کشور را تشکیل می دهد(۲).

* دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

** دانشجو دوره دکتری علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد(behrooz66behbahani@gmail.com)

*** دانشجو دوره کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

**** استاد گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

کلپوره یا مریم نخودی و یا چز متعلق به تیره نعنا، گیاهی پایا، علفی، دارای بوته های تقریباً چوبی به ارتفاع ۳۰ سانتیمتر و دارای ظاهری سفید و پنبه ای است. گل ها در این گیاه به رنگ های سفید، سفید مایل به زرد و یا زرد دیده می شود. این حالت متغیر بودن نه تنها در رنگ گل بلکه در وضع ساقه گیاه که به صورت پرشاخه یا خوابیده در می آید نیز دیده می شود. این گیاه در نواحی بایر و سنگلاخی و ماسه زارهای نواحی مختلف اروپا، مدیترانه، شمال آفریقا و جنوب غربی آسیا از جمله ایران می روید(۳). سابقه استفاده از این گیاه به بیش از ۲۰۰۰ سال می رسد(۴،۵). این گیاه به طور وسیع توسط پزشکان سنتی برای درمان رماتیسم، التیام زخم ها، درمان التهاب و کنترل کننده قند خون استفاده می شده است(۵،۶). حیدری و همکاران برای گیاه کلپوره اثرات ضد التهاب، ضد درد، تب بر، ضد تشنج و فعالیت آنتی اکسیدانی نیز ذکر کرده اند(۷).

تاکنون تنها برخی از ترکیبات گیاه کلپوره که خاصیت ضد میکروبی دارند مشخص شده است. از جمله این ترکیبات می توان به تانن، ترپنوئید، ساپونین، فلاوونوئید، گلیکوزید- آلفا، استرول، لوکوآنتوسیانین، بتاکاریوفیلن، همولن، کاریوفیلن، همولن، کاریوفیلن اکساید، دی ترپنوئید، آسپاراژین، دیترین و مواد صمغی اشاره نمود(۹-۵). لینالول نوعی ترکیب مونوترپنی است که در طب سنتی استفاده های فراوانی داشته و در گیاه کلپوره نیز یافت میشود. این ترکیب دارای اثرات ضدباکتریایی و ضدقارچی قابل ملاحظه ای نیز هست(۱۰). وکو و همکاران گزارش کردند که گیاه کلپوره حاوی مقادیری تانن، ترپنوئید، ساپونین، استرول، فلاونویید و لوکوآنتوسیانین است و می توان از عصاره آن در درمان بیماری های گوارشی بهره برد (۱۱).

باکتری‌ها عمومی‌ترین عامل در ارتباط با مسمومیت‌ها و عفونت‌ها هستند. اکثر عفونت‌ها و مسمومیت‌های غذایی توسط *Pseudomonas aeruginosa*، *Streptococcus pyogenes*، *Staphylococcus epidermidis*، *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* اتفاق می‌افتد و بهمین منظور این مطالعه با هدف تعیین اثر ضد میکروبی عصاره‌های آبی و اتانولی گیاه کلپوره علیه این میکروارگانیسم‌ها انجام گرفت.

روش کار:

این مطالعه تجربی، از بهمن ماه سال ۱۳۹۱ تا تیرماه ۱۳۹۲ در آزمایشگاه میکروبیولوژی صنعتی و فناوری های نوین دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد انجام پذیرفت. سویه های میکروبی مورد استفاده در این مطالعه شامل: *Escherichia coli* PTCC 1330، *Staphylococcus aureus* PTCC 1337، *Staphylococcus epidermidis* PTCC 1435، *Streptococcus pyogenes* PTCC 1447 و *Pseudomonas aeruginosa* PTCC 1310 بودند که توسط دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد اهدا گردید.

بعد از جمع آوری گیاه کلپوره از مناطق محلی شهرستان بیرجند (خراسان جنوبی) این گیاه با همکاری هرباریوم و آزمایشگاه سیستماتیک گیاهی دانشکده علوم پایه و پژوهشکده علوم دانشگاه فردوسی مشهد شناسایی شد و سپس در شرایط مناسب (سایه) خشک و جهت تهیه عصاره با آسیاب مدل WARING پودر گردید.

برای تهیه عصاره از روش خیساندن (ماسراسیون) استفاده شد. به این صورت که مقدار ۲۵ گرم از گیاه کلپوره با دقت توزین و ۱۲۵ میلی لیتر اتانول ۹۶ درجه با آب مقطر به آن اضافه شد. برای تهیه عصاره اتانولی مخلوط حاصل به مدت ۲۴ ساعت در دمای آزمایشگاه نگهداری و هر چند ساعت یکبار با یک میله شیشه ای به هم زده شد. مخلوط آبی نیز به مدت ۲۰ دقیقه با شعله حرارت دید تا مایع کرم رنگی به دست آمد سپس مخلوط حلال و گیاه توسط کاغذ صافی (واتمن) از هم جدا و تفاله‌ها فشرده گردید تا کاملا تخلیه شدند، جهت عمل شفاف سازی مایع رویی پس از جمع آوری با دور ۳۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید، جهت حذف آلودگی های میکروبی و استریل شدن عصاره از صافی ۰/۴۵ µ عبور داده و در ادامه از دستگاه روتاری (تقطیر در خلا) جهت حذف حلال استفاده شد. پس از اینکه عصاره‌ها کاملا خشک شدند عصاره‌ها توسط کاردک آزمایشگاهی کاملا تراشیده شدند. در نهایت برای جلوگیری از اثر نور و گرما بر عصاره ها تا زمان انجام آزمایش، عصاره ها در ظروف استریل با پوشش ورق آلومینیوم در دمای یخچال نگهداری گردیدند (۱۱،۱۲).

برای تعیین وزن خشک عصاره های آبی و الکلی گیاه کلپوره ابتدا وزن یک لوله آزمایش تعیین و پس از آن یک

میلی لیتر از عصاره هـــای آبی و اتانولی در آن ریخته شد، سپس محتوی لوله در دمای اتـاق خـشک گردیـد. بعـد از خشک شدن عصاره، وزن لوله آزمایش مجددا تعیین شـد. اخـتلاف وزن لولـه معـادل بـا وزن یـک میلـی لیتـر از عصاره های آبی یا اتانولی بود. میانگین سه بـار تکـرار، بـه عنوان وزن خشک عصاره محاسبه گردید(۱۲).

برای تهیه سوسپانسیون میکروبی نیاز به کشت تازه از هر میکروارگانیسم بود. بنابراین بیست و چهار ساعت قبـل از انجام آزمایش، از کشت ذخیره به محیط کشت شیب دار نوترینت آگار تلقیح انجام شد، سپس کشت مربوطه توسط محلول رینگر شست و شو و سوسپانسیون میکروبـی تهیـه گردید. مقـداری از ایـن سوسپانـسیون میکروبـی در لولـه آزمایش حاوی محلول رینگر استریل ریخته شد و کـدورت آن توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۰ نانومتر اندازه گیری شد و تا هنگام برابر شدن کدورت محلول با کدورت نیم محلول استاندارد مک فارلنـد، توسـط محلـول رینگـر رقیـق شـد. سوسپانـسیون تولیـدی مـی بایـست حـاوی $1/5 \times 10^8$ CFU/ml باکتری باشد(۱۳).

فعالیت ضد میکروبی عصاره آبی و اتانولی گیاه کلپـوره با استفاده از دو روش پخش عصاره در سطح محیط کشت (تمـام ظـرف) و روش انتـشار در آگـار بـه کمـک دیـسک بررسی شد. در روش تمام ظرف۰/۲ گرم از عـصاره آبـی و اتانولی به پنج میلی لیتر آب مقطر استریل اضافه گردیـد و برای یک نواخت شدن به کمک دستگاه ورتکـس هـم زده شد. سپس یک میلی لیتر از این محلـول بـه ظـرف هـای پتری استریل اضافه و غلظت نهایی عصاره در این حالت به ۲ mg/ml رسـید (۱۴). در مرحلـه بعـد محـیط کـشت استریل مولر هینتون آگار (مـرک آلمـان) بـه ظـرف هـای پتری اضافه شده و در دمـای اتـاق قـرار گرفـت تـا اینکـه محیط کشت ها ببندند. یک لوپ از کـشت اسـتاندارد هـر سوش کشت داده شد و به مدت چهل و هـشت سـاعت در گرمخانه با دمای سـی و هفـت درجـه سـانتی گـراد قـرار گرفت. از محیط دارای عصاره و بدون باکتری نیز به عنوان کنترل استفاده گردید (۱۴). در روش انتـشار در آگـار بـه کمک دیسک، ابتدا یک لوپ از کشت استاندارد هر سـوش بر روی این محیط ها کشت داده شد سپس دیـسک هـای کاغذی (جنس صافی واتمن و بـه قطـر ۶ میلـی متـر) بـا غلظـت هـای mg/ml ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۴۰ عصاره ها درآب مقطر استریل تهیه و با عصاره کلپـــــوره آغشته و توسط پنس استریل در سطح محیط کـشت قـرار داده شدند و با کمـی فـشار بـر روی محـیط کـشت ثابـت گردید. بعد از گرمخانه گذاری به مـدت ۴۸ سـاعت در ۳۷ درجه سانتیگراد با استفاده از خط کش به طور دقیق قطـر هاله عدم رشد بر حسب میلی متر اندازه گیری شد. تمامی آزمایشات با ۳ بار تکرار انجام گرفت (۱۵).

حـــــداقل غلظـــــت مهارکننـــــده رشـــــد (Minimum Inhibitory Concentration ; MIC) عـصاره آبی و اتانولی گیاه کلپوره با استفاده از روش رقت لوله ای، تعیین گردید. برای تعیین MIC بـرای هـر عـصاره از یـک سری ۷ تایی لوله آزمایش اسـتریل اسـتفاده شـد، ۶ لولـه برای آزمایش رقت های مختلف هر عصاره و یک لولـه نیـز به عنوان کنترل بکار رفت. پس از کشت تمـام لولـه هـای آزمایش به مدت ۴۸ در دمای۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری گردیدند. پس از طی زمان گرمخانه گذاری لوله هـا از نظر کدورت ناشی از رشد میکروارگانیـسم هـای تلقـیح شده مورد بررسی قرار گرفتند، این روش برای هر دو عصاره آبی و اتانولی و هر میکروارگانیسم ۳ بار تکرار شد (۱۶).

حداقل غلظت کـشندگی (Minimum Bactericidal Concentration ; MBC) با استفاده از روش رقت لولـه ای برای عصاره آبی و اتانولی گیاه تعیین گردید. بـرای تعیـین MBC برای هر عصاره از یک سری ۹ تـایی لولـه آزمـایش استریل استفاده شـد، ۸ لولـه بـرای آزمـایش رقـت هـای مختلف از هر عصاره و یک لوله نیز به عنوان کنتـرل بکـار رفت. پس از کشت تمام لوله های آزمایش به مدت ۲۴ در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شدند. پس از طی زمان گرمخانه گذاری لوله‌ها از نظر کـدورت ناشـی از رشد میکروارگانیسم‌های تلقـیح شـده مـورد بررسـی قـرار گرفتند، از تمام لوله‌های که هیچ رشدی در آن‌ها مـشاهده نشده بود نمونه برداری و جهت تعیـین MBC کـشت داده شدند. لوله‌ای که حاوی کم‌ترین غلظت عصاره بود و در پلیت مربوط به آن هیچ رشدی مـشاهده نـشده بـود بـه عنـوان MBC در نظر گرفته شد. این روش برای هر دو عصاره آبی و اتانولی و هر میکروارگانیسم ۳ بار تکرار گردید (۱۷).

آنالیز آماری : بـرای تجزیـه و تحلیـل داده هـا از نـرم افـزار آماری SPSS تحت نسخه ۱۷ استفاده شد، از آزمون آنـالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) جهت مقایسه میانگین هـا و از آزمون دانکن (Duncan) جهت بررسی اخـتلاف بـین میانگین ها در سطح $P < 0.05$ استفاده گردید.

نتایج:

نتایج حاصل از بررسی اثر ضد میکروبی عصاره‌های آبی و اتانولی به روش پخش عصاره در سطح محیط کشت (تمام ظرف) در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱: اثر ضد میکروبی غلظت ۲mg/ml عصاره های آبی و اتانولی گیاه کلپوره بر میکروارگانیسم های مورد مطالعه (روش پخش در سطح محیط کشت)

میکروارگانیسم	عصاره آبی	عصاره اتانولی
Streptococcus pyogenes PTCC 1447	S	S
Staphylococcus epidermidis PTCC 1435	S	S
Staphylococcus aureus PTCC 133	R	S
Escherichia coli PTCC 1330	R	R
Pseudomonas aeruginosa PTCC 1310	R	R

R: Resistant , S: Sensitive

این نتایج نشان می دهد که عصاره اتانولی در غلظت ۲mg/ml بر Streptococcus pyogenes ، Staphylococcus epidermidis و Staphylococcus aureus کاملا موثر بوده و از رشد آن ها بر روی محیط کشت جلوگیری به عمل آورده است اما عصاره آبی تنها بر Streptococcus pyogenes،Staphylococcus epidermidis اثر بازدارندگی داشته و هیچ اثر بازدارندگی بر Staphylococcus aureus نشان نداد. عصاره اتانولی و آبی درغلظت ۲mg/ml بر Escherichia coli و Pseudomonas aeruginosa تاثیر نداشت و از رشد آن بر محیط کشت جلوگیری به عمل نیاورد.

نتایج حاصل از بررسی اثر ضد میکروبی عصاره آبی و اتانولی گیاه کلپوره به روش انتشار در آگار در جدول ۲ آورده شده است. این نتایج نشان می دهد که عصاره اتانولی گیاه کلپوره در تمامی غلظت‌ها بر Streptococcus pyogenes ، Staphylococcus epidermidis و Staphylococcus aureus اثر بازدارندگی داشته است. عصاره آبی گیاه در تمامی غلظت‌های (۵ mg/ml، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۴۰) برStreptococcus pyogenes اثر بازدارندگی داشت همچنین در غلظت های (۱۰ mg/ml، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۴۰) بر Staphylococcus aureus وStaphylococcus epidermidis موثر بوده و از رشد این باکتری ها جلوگیری کرده است اما در غلظت (۵ mg/ml) اثر بازدارندگی مشاهده نشد. عصاره آبی و اتانولی گیاه کلپوره در غلظت های (۵ mg/ml، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵) هیچ گونه اثر ضد باکتریایی برEscherichia coli و Pseudomonas aeruginosa نشان نداد و فقط در غلظتهای (۳۰ mg/ml، ۳۵ و ۴۰) از رشد آن جلوگیری نمود.

جدول۲: میانگین قطر هاله عدم رشد میکروارگانیسم های مورد مطالعه در حضور عصاره های اتانولی و آبی گیاه کلپوره (روش انتشار در آگار)

نوع عصاره	میکروارگانیسم	غلظت عصاره گیاه کلپوره (mg/ml) ۵	۱۰	۱۵	۲۰	۲۵	۳۰	۳۵	۴۰
اتانولی									
	Streptococcus pyogenes	۱۰/۸۰±۰/۵۷^{a}	۱۴/۹۰±۰/۵۷^{b}	۱۵/۶±۰/۵۷^{b}	۱۶/۹۰±۰/۵۰^{b}	۱۷/۴۰±۰/۵۷^{b}	۱۸/۸۰±۰/۵۰^{b}	۲۰/۳۰±۰/۵۷^{c}	۲۲/۹۰±۰/۵۲^{d}
	Staphylococcus epidermidis	۹/۴۰±۰/۵۷^{a}	۱۳/۱۰±۰/۲۸^{b}	۱۴/۰۰±۰/۵۷^{b}	۱۴/۹۰±۰/۵۷^{b}	۱۵/۸۰±۰/۵۷^{b}	۱۶/۹۰±۰/۵۳^{b}	۱۷/۷۰±۰/۵۷^{b}	۱۸/۶۰±۰/۵۰^{b}
	Staphylococcus aureus	۸/۶۰±۰/۵۷^{a}	۱۲/۴۰±۰/۲۸^{b}	۱۳/۱۰±۰/۵۷^{b}	۱۴/۱۰±۰/۵۷^{b}	۱۴/۹۰±۰/۵۷^{b}	۱۵/۶۰±۰/۵۳^{b}	۱۶/۹۰±۰/۵۷^{b}	۱۷/۸۰±۰/۵۰^{b}
	Escherichia coli	–	–	–	–	–	۷/۰۰±۰/۵۳^{a}	۸/۲۰±۰/۵۳^{a}	۹/۹۰±۰/۵۳^{b}
	Pseudomonas aeruginosa	–	–	–	–	–	۶/۷۰±۰/۵۳^{a}	۷/۸۰±۰/۵۳^{a}	۸/۸۰±۰/۵۳^{a}
آبی									
	Streptococcus pyogenes	۹/۶۰±۰/۵۷^{a}	۱۲/۳۰±۰/۵۲^{b}	۱۳/۹۰±۰/۵۰^{c}	۱۴/۳۰±۰/۵۰^{c}	۱۵/۱۰±۰/۵۷^{c}	۱۶/۰۰±۰/۵۰^{c}	۱۸/۰۰±۰/۵۷^{d}	۱۹/۱۰±۰/۵۲^{d}
	Staphylococcus epidermidis	–	۱۱/۲۰±۰/۲۸^{a}	۱۱/۹۰±۰/۵۷^{a}	۱۲/۴۰±۰/۵۷^{b}	۱۳/۵۰±۰/۵۷^{b}	۱۴/۱۰±۰/۵۰^{b}	۱۵/۲۰±۰/۵۷^{b}	۱۶/۹۰±۰/۵۰^{c}
	Staphylococcus aureus	–	۱۰/۹۰±۰/۲۸^{a}	۱۱/۶۰±۰/۵۷^{a}	۱۲/۱۰±۰/۵۷^{a}	۱۳/۰۰±۰/۵۷^{a}	۱۴/۰۰±۰/۵۳^{a}	۱۵/۱۰±۰/۵۷^{a}	۱۵/۸۰±۰/۵۰^{a}
	Escherichia coli	–	–	–	–	–	۷/۰۰±۰/۵۰^{a}	۸/۲۰±۰/۵۰^{a}	۹/۹۰±۰/۵۰^{b}
	Pseudomonas aeruginosa	–	–	–	–	–	۶/۳۰±۰/۵۷^{a}	۶/۶۰±۰/۵۷^{a}	۶/۹۰±۰/۵۷^{a}

* علامت (-) نشان دهنده عدم وجود فعالیت ضد میکروبی عصاره های آبی و اتانولی گیاه کلپوره می باشد.

* حروف مشابه در یک ردیف نشان دهنده عدم تفاوت معنی داردر سطح $P< 0.05$ است.

نتایج نشان می‌دهد MIC عصاره اتـانولی گیـاه کلپـوره بـــرای Staphylococcus ،Streptococcus pyogenes epidermidis، Staphylococcus aureus، Escherichia coli و Pseudomonas aeruginosa بـه ترتیـب mg/ml ۸، ۱۶، ۱۶، ۳۲ و ۳۲ بود، در حـالی کـه MIC عـصاره آبـی بـرای Streptococcus pyogenes، Staphylococcus epidermidis، Staphylococcus aureus، Escherichia coli و Pseudomonas aeruginosa بـه ترتیـب mg/ml ۱۶، ۳۲، ۳۲، ۶۴ و ۶۴ بدست آمد(جدول ۳).

نتایج نشان می دهد MBC عصاره اتانولی گیاه کلپـوره بـــرایStreptococcus pyogenes، Staphylococcus epidermidis، Staphylococcus aureus، Escherichia coli وPseudomonas aeruginosa به ترتیب mg/ml ۳۲، ۶۴، ۶۴، ۱۲۸ و ۱۲۸ بود، در حالی که MBC عصاره آبـی بـــرای Streptococcus pyogenes، Staphylococcus epidermidis، Staphylococcus aureus، Escherichia coli و Pseudomonas aeruginosa بـــه ترتیـــب mg/ml ۶۴، ۱۲۸، ۱۲۸، ۲۵۶ و ۲۵۶ بدست آمد (جدول ۴).

جدول۳: نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) عصاره های اتانولی و آبی عصاره گیاه کلپوره بر میکروارگانیسم های مورد مطالعه

نوع عصاره	میکروارگانیسم	غلظت عصاره گیاه کلپوره (mg/ml)						
		۲	۴	۸	۱۶	۳۲	۶۴	کنترل
اتانولی								
	Streptococcus pyogenes	-	-	+	+	+	+	-
	Staphylococcus epidermidis	-	-	-	+	+	+	-
	Staphylococcus aureus	-	-	-	+	+	+	-
	Escherichia coli	-	-	-	-	+	+	-
	Pseudomonas aeruginosa	-	-	-	-	+	+	-
آبی								
	Streptococcus pyogenes	-	-	-	+	+	+	-
	Staphylococcus epidermidis	-	-	-	-	+	+	-
	Staphylococcus aureus	-	-	-	-	+	+	-
	Escherichia coli	-	-	-	-	-	+	-
	Pseudomonas aeruginosa	-	-	-	-	-	+	-

+: عدم رشد -: رشد

جدول۴: نتایج حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره های اتانولی و آبی عصاره گیاه کلپوره بر میکروارگانیسم های مورد مطالعه

نوع عصاره	میکروارگانیسم	غلظت عصاره گیاه کلپوره (mg/ml)							
		۲	۴	۸	۱۶	۳۲	۶۴	۱۲۸	۲۵۶	کنترل
اتانولی										
	Streptococcus pyogenes	-	-	-	-	+	+	+	+	-
	Staphylococcus epidermidis	-	-	-	-	-	+	+	+	-
	Staphylococcus aureus	-	-	-	-	-	+	+	+	-
	Escherichia coli	-	-	-	-	-	-	+	+	-
	Pseudomonas aeruginosa	-	-	-	-	-	-	+	+	-
آبی										
	Streptococcus pyogenes	-	-	-	-	-	+	+	+	-
	Staphylococcus epidermidis	-	-	-	-	-	-	+	+	-
	Staphylococcus aureus	-	-	-	-	-	-	+	+	-
	Escherichia coli	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	Pseudomonas aeruginosa	-	-	-	-	-	-	-	+	-

+: عدم رشد -: رشد

بحث:

امروزه استفاده از گیاهان دارویی در درمان بیماریها به علت مقاومت باکتری ها در برابر آنتی بیوتیک ها رونق یافته است. براساس نتایج به دست آمده عصاره های آبی و اتانولی گیاه کلپوره فعالیت ضد میکروبی قابل توجهی بر میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه در این پژوهش نشان دادند. اثر ضد میکروبی هر دو عصاره اتانولی و آبی بسته به نوع میکروارگانیسم متفاوت بود، به طوری که باکتری های گرم مثبت Streptococcus pyogenes ، Staphylococcus epidermidis وStaphylococcus aureus در مقایسه با باکتری های گرم منفی Escherichia coli و Pseudomonas aeruginosa حساسیت بیشتری داشتند و در غلظت کمتری از عصاره های آبی و اتانولی گیاه کلپوره اثر بازدارندگی نشان دادند. به طور کلی باکتری های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی حساسیت بیشتری نسبت به عصاره گیاه کلپوره از خود نشان می دهند، علت آن اختلاف ساختمانی دیواره باکتری های گرم مثبت نسبت به گرم منفی می باشد، به طوری که باکتری های گرم مثبت در دیواره سلولی خود دارای ترکیب موکوپپتید بوده، در حالی که باکتری های گرم منفی فقط لایه نازکی از موکوپپتید دارند و قسمت اعظم ساختمان دیواره در آنها لیپوپروتئین و لیپو پلی ساکارید است به همین دلیل باکتری های گرم منفی مقاوم ترند در نتیجه مقاومت بالاتر باکتری های گرم منفی را می توان به حضور غشای فسفولیپیدی خارجی تقریبا غیر قابل نفوذ به ترکیبات چربی دوست نسبت داد که این امر در نتایج سایر محققان هم گزارش شده است (۱۸،۱۹). شهرکی و همکاران گزارش کردند که استفاده از عصاره گیاه کلپوره در عفونتهای دستگاه گوارشی و مجاری ادراری که دارای منشاء عفونی با میکروارگانیسمهای گرم منفی باشند، مفید است (۲۰).

نتایج مطالعه حاضر نشان می دهد که عصاره اتانولی برگ گیاه کلپوره در مقایسه با عصاره آبی آن اثر بازدارندگی بیشتری روی سوش های مورد مطالعه دارد. علت آن درصد استحصال بیشتر عصاره اتانولی نسبت به عصاره آبی و در نتیجه استخراج بیشتر مواد موثر در برگ گیاه توسط حلال اتانول می باشد. به نظر می رسد بیشترین خاصیت ضد میکروبی گیاه کلپوره مربوط به ترکیبات ترپنی بویژه α-pinene و β-pinene، β-caryophyllene که بیشترین درصد ترکیبات عصاره این گیاه را تشکیل می دهند، باشد (۲۱).

نتایج حاصل از بررسی اثر ضد میکروبی عصاره های اتانولی و آبی گیاه به روش انتشار در آگار در مطالعه اخیر نشان داد، از نظر تئوری قطر هاله عدم رشد عکس العملی از غلظت ماده موثره موجود در گیاه است. این پدیده یک ارتباط خطی بین اندازه هاله و لگاریتم غلظت ماده مورد آزمایش می باشد (۲۲). بیشترین قطر هاله بازدارندگی مربوط به عصاره اتانولی برگ گیاه بر باکتری گرم مثبت Streptococcus pyogenes بود. نتایج تحلیل آماری نشان داد که با افزایش غلظت عصاره، قطر هاله عدم رشد به طور معنی داری در سطح $P<0.05$ افزایش می یابد همچنین نتایج نشان داد در سطح معنی دار $P<0.05$ بیشترین مقاومت نسبت به عصاره های اتانولی و آبی گیاه کلپوره مربوط به Escherichia coli وPseudomonas aeruginosa بود و در سطح معنی دار $P<0.05$ بیشترین حساسیت به عصاره های اتانولی و آبی مربوط به Streptococcus pyogenes بود.

نتایج حاصل از حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره اتانولی گیاه نشان داد که بیشترین مقاومت مربوط به باکتری های گرم منفی Escherichia coli و Pseudomonas aeruginosa بود. ندیمی و همکاران تاثیر عصاره آبی و الکلی گیاه کلپوره بر Candida albicans و دو گونه مالاسزیا را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد، تأثیر مهاری عصاره اتانولی کلپوره بر هر سه سویه مختلف Candida albicans متفاوت و متناسب با غلظت عصاره در محیط کشت بود (۲۳).

تاکنون تنها برخی ترکیبات موجود در گیاه کلپوره نظیر انواع فیتوالکسین ها، تانین ها، فلاوونوئید ها، ایریدوئیدها و تری ترپن ها، مورد شناسایی قرار گرفته اند. این ترکیبات از جمله ترکیبات اصلی موجود در این گیاه به حساب آمده و در واقع می توان خصوصیات ضد میکروبی این گیاه را به این ترکیبات نسبت می دهند (۱۱).

نتیجه نهایی :

نتایج این مطالعه نشان می دهد که عصاره گیاه کلپوره در شرایط آزمایشگاهی اثر ضد میکروبی قابل ملاحظه ای بر سویه های مورد مطالعه به ویژه باکتری های گرم مثبت دارد در ادامه لازم است مطالعات وسیع تر و دامنه داری در شرایط خارج از آزمایشگاه(in vivo) انجام شود تا دوز مؤثر

این عصاره مشخص شود. انتظار می رود در آینده تحقیقات بیشتری در زمینه اثر ضد میکروبـی و شناسـایی ترکیبـات عصاره گیاه انجام گیرد تا با یافتن مواد موثره ضد میکروبی گیاه کلپوره و فرمولاسیون آن تهیه اشکال دارویی مختلـف ممکن شده و اقـدام ارزنـده ای جهـت بهبـود بیماریهـایی عفـونی و مـسمومیت زا ناشـی از سـوش هـای مختلـف میکروبی، انجام گیرد.

سپاسگزاری :

این مقاله منتج از طرح تحقیقاتی است و بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد کـه در تامین هزینه ها و اجرای آن ما را یاری نموده اند صمیمانه تشکر و قدر دانی می نماییم.

منابع :

1. Trick WE, Weinstein RA, DeMarais PL, Kuehnert MJ, Tomaska W, Nathan C. Colonization of skilled‐care facility residents with antimicrobial‐resistant pathogens. J Am Geriatr Soc 2003; 49(3): 270-6.
2. Rahim Z, Sanyal S, Aziz K, Huq M, Chowdhury A. Isolation of enterotoxigenic, hemolytic, and antibiotic-resistant Aeromonas hydrophila strains from infected fish in Bangladesh. Appl Environ Microbiol 1984; 48(4): 865-7.
3. Esmaeili A, Amiri H. [Effects of antimicrobial and identification of composition of essential oil of Teucrium polium]. J Isfahan Univ 2008; 31(2): 15-22 (Persian).
4. Mirzaei A, Jaberi-Hafshajani H. [Effects of Hydroalcoholic extract of Teucrium polium on biochemical and hematological parameters of hepatotoxic rats]. Armaghan Danesh 2010; 15(1): 67-75 (Persian).
5. Niazmand S, Erfanian-Ahmadpour M, Mousavian M and Saberi Z. [The inotropic and chronotropic effects of aqueous ethanolic extract from Teucrium polium on guinea pig isolated heart]. J Babol Univ Med Sci 2008; 10(1): 7-13. (Persian)
6. Niazmand S, Hajzadeh M, Keshavarzi-Poortafti Z. [The effects of aqueous extract from Teucrium polium L. on rat gastric motility in basal and vagal-stimulated conditions]. Iranian J Basic Med Sci 2007; 10(1): 60-5. (Persian)
7. Heidari MR, Karaminezhad-Ranjbar M, Dadvand E and Jalali S. [Evaluation of the analgesic effect of Teucrium polium extract in mice]. J Kerman Univ Med Sci 1999;6(2):67-76. (Persian)
8. Bonyadpour B, Akbarzdeh M, Pakshir K and Mohagheghzadeh A. [In-vitro susceptibility of fluconazole, clotrimazole and Toucrium polium smoke product on candida isolates of vaginal candidiasis]. Armaghan Danesh 2009; 14(2): 87-96. (Persian)
9. Ansari M, Alizadeh AM, Paknejad M. [Effects of teucrium polium honey on burn wound healing process]. J Babol Univ Med Sci 2009; 11(3): 7-12. (Persian)
10. Hassan M, Muhtadi F, Al-Badr A. GLC-mass spectrometry of Teucrium polium oil. J Pharm Sci 1979; 68(6):800-1.
11. Vokou D, Bessiere J-M. Volatile constituents of Teucrium polium. J Nat Produc 1985; 48(3): 498-9.
12. Alizadeh Behbahani B, Tabatabaei Yazdi F, Mortazavi A, Zendeboodi F, Gholian MM, Vasiee A. Effect of aqueous and ethanolic extract of Eucalyptus camaldulensis L. on food infection and intoxication microorganisms “in vitro”. J Paramed Sci 2013; 4(3): 89-99.
13. Valero M, Salmeron M. Antibacterial activity of 11 essential oils against Bacillus cereus in tyndallized carrot broth. Inter J Food Microbiol 2003; 85(1): 73-81.
14. Babayi H, Kolo I, Okogun J, Ijah U. The antimicrobial activities of methanolic extracts of Eucalyptus camaldulensis and Terminalia catappa against some pathogenic microorganisms. Biokemistri 2004; 16(2): 106-11.
15. Alizadeh Behbahani B, Shahidi F, Tabatabaei Yazdi F, Mohebbi M. Antifungal effect of aqueous and ethanolic mangrove plant extract on pathogenic fungus “in vitro”. Inter Agro Plant Produc 2013; 4(7): 1652-8.
16. Benger S, Townsend P, Ashford RL, Lambert P. An in vitro study to determine the minimum inhibitory concentration of Melaleuca alternifolia against the dermatophyte Trichophyton rubrum. Food 2004; 14(2): 86-91.
17. Espinel-Ingroff A, Fothergill A, Peter J, Rinaldi M, Walsh T. Testing conditions for determination of minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for Aspergillus spp.: NCCLS collaborative study. J Clin Microbiol 2002; 40(9): 3204-8.
18. Heidari Sureshjani M, Tabatabaei Yazdi F, Mortazavi A, Shahidi F, Alizadeh Behbahani B. Antimicrobial effect of *Satureja bachtiarica* extracts aqueous and ethanolic on Escherichia coli and Staphylococcus aureus. Sci J Biol Sci 2013; 2: 24-31.
19. Alizadeh Behbahani B, Tabatabaei Yazdi F, Shahidi F, Mortazavi A. Antimicrobial effects of Lavandula stoechas L. and Rosmarinus officinalis L. extracts on Escherichia coli and Staphylococcus aureus. Sci J Microbiol 2013; 2: 15-22.
20. Shahraki M, Mirshekari H, Palen M. [Comparison of analgesic effect of aqueous extract of Kalporeh and morphine in the rat]. Ofogh-e-Danesh 2006; 12(1): 10-14. (Persian)
21. Autore G, Capasso F, De Fusco R, Fasulo M, Lembo M, Mascolo N. Antipyretic and antibacterial actions of Teucrium polium L. Pharmacol Res Commun 1984; 16(1): 21-9.

22. Neef H, Declercq P, Laekeman G. Hypoglycaemic activity of selected European plants. Phytother Res 1995; 9(1): 45-8.
23. Nadimi M, Zia M, Madani M. [Effect of Aqueous and Ethanolic Extracts of Teucrium polium on Candida Albicans and Two Species of Malassezia]. Zahedan J Res Med Sci 2013; 15(8): 34-8 (Persian).

Original Article

The In vitro Study of Antimicrobial Effect of Teucrium polium Extract on Infectious Microorganisms

F. Tabatabaei Yazdi, Ph.D.[*]; B. Alizadeh Behbahani, Ph.D.[**]
M. Heidari Sureshjani, M.Sc.[***]; S.A. Mortazavi, Ph.D.[****]

Received: 21.9.2013 Accepted: 4.2.2014

Abstract

Introduction & Objective: Teucrium polium belonging to Lamiaceae family has been widely used in traditional medicine for treatment of diseases. Regarding the existence of the active biological compounds in this plant, it seems that this plant has considerable antimicrobial effects. The aim of this study is to investigate the antimicrobial effect of different concentrations of the aqueous and ethanolic extracts of Teucrium polium (different concentrations) on Escherichia coli PTCC 1330, Staphylococcus aureus PTCC 1337, Staphylococcus epidermidis PTCC 1435, Streptococcus pyogenes PTCC 1447 and Pseudomonas aeruginosa PTCC 1310" in vitro".

Materials & Methods: In this experimental study, antimicrobial effect of the extracts was explored by two methods including "Collins method" (spreading of the extract on medium surface) and "disk agar diffusion method". The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) were determined using the dilution method.

Results: The results showed that in "disk agar diffusion method ", the ethanolic extract had the inhibitory effect on Staphylococcus epidermidis, Streptococcus pyogenes and Staphylococcus aureus. The MIC of the aqueous and ethanolic extracts for Pseudomonas aeruginosa was 64 and 32 mg/ml, respectively and the MBC of aqueous and ethanolic extracts for Pseudomonas aeruginsa was 256 and 128 mg/ml, respectively. Pseudomonas aeruginosa showed the highest level of resistance against the aqueous and ethanolic Teucrium polium extracts.

Conclusion: The ethanolic extract of Teucrium polium "in vitro" showed a considerable antimicrobial effect on Pseudomonas aeruginosa as the gram-negative bacteria and Escherichia coli and Staphylococcus epidermidis, Streptococcus pyogenes and Staphylococcus aureus as the gram-positive bacteria.

(Sci J Hamadan Univ Med Sci 2014; 21 (1):16-24)

Keywords: Microorganisms/ Minimum Bactericidal Concentration/ Minimum Inhibitory Concentration Teucrium polium

---

* Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture Ferdowsi University of Mashhad. (behrooz66behbahani@gmail.com)
** Ph.D. Student of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad.
*** M.Sc. Student of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad.
**** Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad.