اثر فعالیت ضد باکتریایی عصاره خرفه (Portulaca oleracea) بر تعدادی از میکروارگانیسم‌های عامل عفونت در شرایط آزمایشگاهی

علیرضا وسیعی[۱]، حسین زنگانه[۱]، بهروز علیزاده بهبهانی*[۲]، فریده طباطبایی یزدی[۳]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۲ . دانشجوی دکترای علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۳ .دانشیار و عضو هئیت علمی گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

* نشانی برای مکاتبه: مشهد، دانشگاه فردوسی، دانشکده کشاورزی، گروه علوم و صنایع غذایی، تلفن : ۸۷۶۳۸۴۲ – ۰۵۱۱ ،
behrooz66behbahani@gmail.com
دریافت مقاله: فروردین نود و سه پذیرش برای چاپ: خرداد نود و سه

چکیده

سابقه و هدف: *امروزه با افزایش استفاده از آنتی بیوتیک ها و نیز گسترش سویه های مقاوم، کمبود ناشی از کاربرد داروهای ضد میکروبی جدید و طبیعی که دارای اثرات جانبی کم تری نسبت به آنتی بیوتیک ها هستند احساس می شود. هدف از این پژوهش تعیین اثر ضد میکروبی خرفه (Portulaca oleracea) بر باکتری‌های Escherichia coli PTCC 1330، Staphylococcu aureus PTCC 1337، Staphylococcus epidermidis PTCC 1435، Streptococcus pyogenes PTCC 1447 و Pseudomonas aeruginosa PTCC 1310 می‌باشد.*

روش‌کار: *در این پژوهش آزمایشگاهی از گیاه خرفه (Portulaca oleracea) برای بررسی اثر ضد میکروبی استفاده شد. حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) با استفاده از روش میکروپلیت انجام گرفت. برای تجزیه و تحلیل آماری داده ها از نرم افزار SPSS نسخه ۱۸ و آنالیز یک طرفه آنووا و آزمون تی استفاده شد، سطح معنی دار بودن ۵ درصد در نظر گرفته شد.*

یافته‌ها: *بیش ترین میزان اثر عصاره اتانولی خرفه بر باکتری‌های استرپتوکوکوس پیوژنز و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و در غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر مشاهده شد. MIC عصاره اتانولی برای باکتری‌های استرپتوکوکوس پیوژنز، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیا کلی و سودوموناس ائروژینوزا به ترتیب ۶/۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و MBC نیز در خصوص آن‌ها به ترتیب ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۱۲/۵، ۵۰ و ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر بود. MIC عصاره آبی خرفه برای باکتری‌های استرپتوکوکوس پیوژنز، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیا کلی و سودوموناس ائروژینوزا به ترتیب ۱۲/۱۲،۵/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و MBC نیز در خصوص آن‌ها به ترتیب ۲۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود*

نتیجه‌گیری: *گیاه خرفه دارای اثرات ضدمیکروبی قابل ملاحظه ای می باشد که می تواند به عنوان جایگزینی مناسب برای آنتی بیوتیک های سنتزی که مقاومت میکروبی به آن ها روز به روز در حال افزایش است به کار رود.*

واژگان کلیدی: ***خرفه، عصاره، روش آمیخته، هاله عدم رشد***

مقدمه

امروزه با افزایش استفاده از آنتی بیوتیک های رایج درمانی و داروهای ضد میکروبی شاهد شیوع و گسترش روز افزون گونه‌های میکروبی بیماری زای مقاوم به آنتی بیوتیک‌ها هستیم. بیماری‌های عفونی از جمله بیماری‌های گسترده و شایع در جهان هستند که هزینه‌های فراوانی را به جوامع بشری تحمیل می‌کنند. هرچند مصرف آنتی‌بیوتیک‌های سنتزی در دهه‌های گذشته توانسته در درمان بیماری‌های عفونی نقش مهمی را ایفا نماید، اما مشکل عمده این مواد، ایجاد مقاومت میکروبی، قیمت بالای این مواد و مشکلات زیست محیطی آنتی بیوتیک‌ها در فرد مصرف کننده، موجب شده است که امروزه بیش از پیش تمایل به مصرف مواد جای گزینی که ضرر کمتری دارند افزایش یابد(۱، ۲).

قرن های متمادی است که مردم از گیاهان برای بهبود، سلامت و درمان بیماری ها استفاده می کنند. در طول تاریخ، از گیاهان به عنوان غذا یا دارو جهت درمان یا پیش گیری از بیماری ها، استفاده شده است(۳)، امروزه با پیش رفت علوم و توسعه کاربرد داروهای سنتزی هنوز گیاهان دارویی از مصرف بالایی برخوردار هستند(۱). با توجه به موقعیت جغرافیایی و تنوع آب و هوایی، ایران دارای انواع مختلفی از گیاهان دارویی می‌باشد که پایه و اساس طب سنتی را تشکیل داده‌اند. به همین جهت در سال‌های اخیر تحقیقات گسترده ای جهت بررسی و ارزیابی اثر ضد میکروبی انواع اسانس‌ها و عصاره‌ها انجام گرفته است(۴).

گیاه خرفه با اسم علمی Portulaca oleracea و با نام انگلیسی Purslane از تیره پرتولاکاسه (Portulacaceae) است که برگ‌های گوشتی و بذرهای سیاه ریز دارد. خرفه گیاهی یک ساله است که به ارتفاعی تا حدود ۴۰ سانتی‌متر در مراحل بذردهی می‌رسد. در خصوص خاست گاه اولیه آن اختلاف نظر وجود دارد، ولی در کشورهای ایران، استرالیا، هند، آفریقای شمالی و در آمریکا رشد می‌کند. خرفه برگ‌های گرد کشیده با ساقه گوشتی به رنگ قرمز ارغوانی دارد. گل‌های آن به رنگ زرد در انتهای ساقه تشکیل شده و اوایل روز تا ساعت ۹ الی ۱۱ باز می‌ماند. در طب سنتی به عنوان تب بر، ضد عفونی کننده، ضد اسکوربوت (بیماری‌های ناشی از کمبود ویتامین C) و ضد اسپاسم استفاده می‌شود. این گیاه در مصرف داخلی قطع کننده و بند آورنده خون‌ریزی است و هم چنین عصاره ساقه و برگ آن برای درمان بیماری‌های کبدی مفید است(۵).

باکتری‌ها عمومی‌ترین عامل در ارتباط با مسمومیت‌ها و عفونت‌ها، می‌باشند. اکثر عفونت‌ها و مسمومیت‌ها توسط سودوموناس آئروژینوزا، استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، اشرشیا کلی و استرپتوکوکوس پیوژنز ایجاد می شود. اشرشیاکلی باکتری میله‌ای شکل، گرم منفی و بدون اسپور است که به خانواده انتروباکتریاسه تعلق دارد(۶). این باکتری‌ها رایج‌ترین باکتری‌هایی هستند که به همراه استافیلوکوک و استرپتوکوک موجب بیماری در انسان می‌شوند. باکتری استافیلوکوکوس اورئوس از عوامل اصلی ایجاد عفونت های بیمارستانی بوده که شیوع آن در حال گسترش می‌باشد. این باکتری در ایجاد طیف وسیعی از بیماری‌ها از جمله اندوکارتیت، استئومیلت، پنومونی، سندروم شوک توکسیک، کورک و غیره نقش دارد(۷). استافیلوکوس اپیدرمیدیس یکی از علل عفونت‌های فرصت طلب می‌باشد و در حال حاضر نیز از جمله باکتری‌هایی محسوب می‌شود که از اهمیت بالایی برخوردار است. این باکتری با ایجاد بیوفیلم بر روی کاتترهای درون عروقی و پروتزهای پزشکی موجب عفونت می‌شود(۷). از بیماری‌های مهمی که توسط استرپتوکوس پیوژنز ایجاد می‌شود می توان به فارنژیت، زرد زخم، باد سرخ، سلولیت، فاسئیت نکروزان (قانقاریا) اشاره نمود. سودوموناس آئروژینوزا سبب عفونت‌های مجاری ادراری، سیستم تنفسی، التهاب و آماس پوست، عفونت‌های بافتهای نرم، باکتریمی (وجود باکتری در خون) عفونت‌های استخوان ومفاصل، عفونت‌های معده و روده‌ای و عفونت‌های سیستمیک گوناگون به ویژه در بیماران با سوختگی‌های شدید، بیماران دچار به سرطان و ایدز که سیستم ایمنی آنها سرکوب شده‌است، می شود(۷).

اهدف مورد نظر برای انجام این پژوهش شامل: ۱- ارزیابی فعالیت ضد میکروبی عصاره خرفه به صورت محلول، 2-تعیین حساسیت پنج گونه سوش بیماری زای عامل عفونت و مسمومیت نسبت به غلظت های مشخص عصاره و ۳- تعیین رابطه بین حلال مورد استفاده در عصاره گیری، استخراج مواد موثره، افزایش وزن خشک عصاره و قدرت ضدمیکروبی عصاره های استخراج شده می باشد.

روش کار

این پژوهش از مهر ماه ۱۳۹۲ تا اسفند ماه ۱۳۹۲ در آزمایشگاه میکروبیولوژی صنعتی و فناوری‌های نوین دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد انجام پذیرفت.

سویه‌هایی که در این پژوهش استفاده شدند شامل: Escherichia coli PTCC 1330، Staphylococcu aureus PTCC 1337، Staphylococcus epidermidis PTCC 1435، Streptococcus pyogenes PTCC 1447 و Pseudomonas aeruginosa PTCC 1310 بودکه از دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد تهیه شد. در این پژوهش آزمایشگاهی از محیط کشت مولر هینتون آگار و مولر هینتون براث ساخت شرکت مرک آلمان استفاده شد. از محلول رینگر (ساخت شرکت مرک آلمان) برای رقیق سازی و تهیه رقت های مناسب جهت کشت میکروبی استفاده شد.

گیاه خرفه از مناطق محلی شهرستان علی‌آباد کتول (گرگان) جمع آوری، سپس جنس و گونه گیاه خرفه با هم کاری هرباریوم و آزمایشگاه سیستماتیک گیاهی دانشکده علوم پایه و پژوهشکده علوم دانشگاه فردوسی مشهد نظر شناسایی و تایید شد. پس از جمع آوری گیاه خرفه و به منظور عصاره گیری مطلوب ابتدا، گیاه در مکانی به دور از آفتاب (سایه) خشک گردید. سپس برگ های خشک شده با آسیاب برقی آزمایشگاهی مدل (Waring) پودر گردید. از روش ماسراسیون (خیساندن) جهت عصاره‌گیری استفاده شد. در این روش ۱۰۰ گرم از برگ های گیاه خرفه به دقت توزین و در ارلن های جداگانه استریل که حاوی ۵۰۰ میلی لیتر اتانول ۹۸درصد (مرک آلمان) و آب مقطر ریخته شده تا کلیه ترکیب های گیاه حل گردد. ارلن حاوی خرفه و حلال به مدت ۷۲ ساعت درون انکوباتور شیکر دار در دمای ۴۰ قرار داده شدند تا حلال اثر خود را به نحو مطلوب اعمال کند. سپس مخلوط حاصل از کاغذ صافی عبور داده شده و جهت شفاف سازی عمل سانتریفوژ انجام گردید. در مرحله بعد از دستگاه روتاری جهت حذف حلال استفاده گردید. در نهایت عصاره های گیاه خرفه در ظروفی استریل و در یخچال نگه داری شد(۸، ۹).

برای تعیین وزن خشک گیاه خرفه از روش علیزاده بهبهانی و هم کاران (۲۰۱۳) استفاده گردید. بدین منظور ابتدا یک لوله آزمایش توسط ترازوی دیجیتال به دقت توزین سپس ml ۱ از عصاره های آبی و اتانولی گیاه خرفه در آن ریخته شد. محتوی لوله که حاوی ml ۱ از عصاره های آبی و اتانولی گیاه خرفه در دمای اتاق (۲۵ درجه سانتی گراد) خشک گردید (جهت کنترل دما از دماسنج نصب شده در آزمایشگاه استفاده گردید). بعد از خشک شدن عصاره های آبی و اتانولی گیاه خرفه، وزن لوله آزمایش مجددا توسط ترازوی دیجتال تعیین گردید. اختلاف وزن لوله معادل ml ۱ از عصاره های آبی و اتانولی گیاه خرفه، است. این روش سه بار تکرار گردید و میانگین سه بار تکرار، به عنوان وزن خشک عصاره های آبی و اتانولی گیاه خرفه گزارش شد (۱۰).

جهت ارزیابی فعالیت ضد میکروبی عصاره های آبی و اتانولی گیاه خرفه از چهار روش استاندارد میکروبی که شامل روش آمیخته (پور پلیت)، انتشار در آگار (دیسک دیفوژن)، حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی(MBC) با استفاد ه از روش میکرو دایلوشن (رقیق سازی در چاهک) استفاده شد.

در روش آمیخته پس از افزودن ۰/۲ گرم از عصاره های آبی و اتانولی گیاه خرفه به ۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل، مخلوط حاصل به کمک دستگاه ورتکس هم زده شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از این محلول به ظرف های پتری استریل اضافه گشت. پس از آنکه محیط کشت استریل مولر هینتون آگار (مرک آلمان) به ظرف‌های پتری اضافه شد یک لوپ از کشت استاندارد که معادل ۰/۵ مک فارلند (حاوی حاوی CFU/ml ۸۱۰×۱/۵) بود بر روی این محیط‌ها کشت داده شد و به مدت ۲۴ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت(۱۱، ۱۲).

در روش انتشار در آگار (دیسک دیفوژن)، ابتدا یک لوپ از کشت استاندارد هر پنج سوش باکتریایی بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار (مرک آلمان) کشت داده شد سپس دیسک‌های کاغذی (جنس صافی واتمن و به قطر ۶ میلی متر) با غلظت‌های mg/ml ۵، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ عصاره‌ها در آب مقطر استریل تهیه و با عصاره های آبی و اتانولی خرفه آغشته و توسط پنس استریل در سطح محیط کشت قرار داده شدند و با کمی فشار بر روی محیط کشت ثابت گردید. بعد از گرمخانه گذاری به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد با استفاده از خط کش به طور دقیق قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی متر اندازه گیری شد. تمامی آزمایشات با ۳ بار تکرار انجام پذیرفت(۱۳، ۱۴).

برای تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد از روش میکرودایلوشن (رقیق سازی در چاهک) استفاده شد. برای این منظور ابتدا از پنج گونه باکتری های عامل عفونت مورد بررسی در این پژوهش آزمایشگاهی، کشت 24ساعته در دمای 37 درجه سانتی گراد و در محیط مولر هینتون براث تهیه شد. سریال های رقت معادل ۴۰۰ میلی گرم در میلی لیتراز ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ عصاره تهیه و 70 میکرو لیتر از آنها به میکرو پلیت های96 خانه ایی که قبلا حاوی 70 میکرولیتر سوسپانسیون باکتری با کدورت نیم مک فارلند بودند اضافه گردید. سپس آزمایشات مشابه برای کنترل مثبت (محیط کشت حاوی باکتری و بدون عصاره) و کنترل منفی (محیط کشت بدون باکتری) نیز انجام شد. میکروپلیت ها سپس به مدت24 ساعت در انکوباتور 37 درجه گرم خانه گذاری گردیدند. کم ترین رقت از عصاره که کدورتی در ان مشاهده نشد، به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی گزارش شد. تمامی آزمایشات در سه تکرار انجام پذیرفت(۱۵، ۱۶).

با توجه به نتایج حاصله از حداقل غلظت مهارکنندگی از رشد، از تمام خانه هایی که رشد باکتری در آن ها کاملا متوقف شده بود، به پلیت های حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد و 24 ساعت در دمای 37 درجه گرم خانه گذاری شدند. غلظت‌هایی که فاقد رشد باکتری بودند، به عنوان حداقل غلظت کشندگی (MBC) گزارش شد(۱۵، ۱۶).

کلیه آزمایش ها سه بار تکرار گردید و نتایج به صورت میانگین سه بار تکرار ± خطای استاندارد نمایش داده شد. برای تجزیه و تحلیل آماری داده ها از نرم افزار SPSS نسخه ۱۸ و آنالیز یک طرفه آنووا و آزمون تی استفاده شد. سطح معنی دار بودن ۵ درصد در نظر گرفته شد.

یافته ها

وزن خشک عصاره اتانولی گیاه خرفه ۱۴ درصد و وزن خشک عصاره آبی خرفه ۹ درصد بود. درنتیجه درصد استحصال عصاره اتانولی خرفه ۵ درصد بیش تر از زمانی است که از آب به عنوان حلال استفاده شده است.

در روش آمیخته عصاره آبی خرفه بر استرپتوکوکوس پیوژنز، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استافیلوکوکوس اورئوس موثر بوده و از رشد این سه گونه باکتریایی در محیط کشت جلوگیری نمود، این در حالی است که همین عصاره فاقد اثر ضد میکروبی مشخص بر روی دو گونه باکتری گرم منفی اشرشیا کلی و سودوموناس ائروژینوزا بود. همچنین عصاره اتانولی خرفه در غلظت ۲ میلی گرم بر میلی لیتر به طور موثری رشد باکتری های استرپتوکوکوس پیوژنز، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلی را کنترل نمود و در این غلظت تنها نتوانست از رشد باکتری گرم منفی باکتری سودوموناس ائروژینوزا جلوگیری کند.

بیشترین قطر هاله عدم رشد عصاره های آبی و اتانولی خرفه در غلظت ۱۰۰mg/ml مربوط به باکتری استافیلوکوکوس پیوژنز و کمترین قطر هاله در این غلظت مربوط به باکتری گرم منفی سودوموناس ائروژینوزا بود(جدول۱).

جدول۱. میانگین قطر هاله عدم رشد بر میکروارگانیسم های مورد مطالعه بر حسب میلی‌متر (دیسک دیفوژن)

		غلظت (میلی گرم بر میلی لیتر)				
	میکروارگانیسم	۵	۲۵	۵۰	۷۵	۱۰۰
آبی	استرپتوکوکوس پیوژنز	^{a}۰/۵۵±۸/۵۰	^{b}۰/۵۵±۱۱/۴۰	^{c}۰/۵۰±۱۳/۶۰	^{c}۰/۵۰±۱۴/۵۰	^{d}۰/۵۰±۱۷/۹۰
آبی	استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس	^{a}۰/۵۷±۸/۰۰	^{b}۰/۵۰±۱۱/۰۰	^{c}۰/۴۵±۱۳/۱۰	^{d}۰/۵۷±۱۵/۴۰	^{e}۰/۵۰±۱۷/۰۰
آبی	استافیلوکوکوس اورئوس	^{a}۰/۵۷±۸/۰۰	^{b}۰/۵۰±۱۰/۱۰	^{c}۰/۴۵±۱۲/۸۰	^{d}۰/۵۷±۱۴/۹۰	^{e}۰/۵۰±۱۶/۶۰
آبی	اشرشیا کلی	-	^{a}۰/۵۰±۷/۰۰	^{b}۰/۵۷±۸/۶۰	^{b}۰/۵۷±۹/۷۰	^{c}۰/۵۰±۱۲/۶۰
آبی	سودوموناس ائروژینوزا	-	^{a}۰/۵۰±۶/۵۰	^{b}۰/۵۴±۸/۵۰	^{c}۰/۵۰±۹/۳۰	^{c}۰/۵۰±۱۱/۶۰
اتانولی	استرپتوکوکوس پیوژنز	^{a}۰/۴۵±۹/۷۰	^{b}۰/۵۰±۱۲/۱۰	^{c}۰/۵۰±۱۴/۴۰	^{c}۰/۵۰±۱۵/۵۰	^{d}۰/۵۰±۱۹/۵۰
اتانولی	استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس	^{a}۰/۵۷±۸/۷۰	^{b}۰/۵۰±۱۱/۴۰	^{c}۰/۴۵±۱۳/۹۰	^{d}۰/۵۷±۱۶/۸۰	^{d}۰/۵۰±۱۸/۸
اتانولی	استافیلوکوکوس اورئوس	^{a}۰/۵۷±۸/۰۰	^{b}۰/۵۰±۱۱/۴۰	^{c}۰/۴۵±۱۳/۳۰	^{d}۰/۵۷±۱۵/۴۰	^{e}۰/۵۰±۱۷/۰۰
اتانولی	اشرشیا کلی	^{a}۰/۵۰±۷/۱۰	^{b}۰/۵۷±۸/۷۰	^{c}۰/۵۷±۱۰/۹۰	^{d}۰/۵۰±۱۳/۰۰	^{d}۰/۵۰±۱۴/۱۰
اتانولی	سودوموناس ائروژینوزا	-	^{a}۰/۵۰±۸/۳۰	^{b}۰/۵۷±۱۰/۰۰	^{b}۰/۵۷±۱۳/۰۰	^{b}۰/۵۰±۱۴/۳۰

- علامت (-) نشان دهنده عدم وجود فعالیت ضد باکتری عصاره های آبی و اتانولی خرفه می‌باشد.
- حروف غیر مشابه در یک ردیف نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار میان اثر ضد میکروبی غلظت‌های مختلف می‌باشد.
- حروف مشابه در یک ردیف نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار میان اثر ضد میکروبی غلظت‌های مختلف می‌باشد.

از لحاظ حساسیت به عصاره های آبی و اتانولی در باکتری های مورد مطالعه اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد وجود دارد. به عبارت دیگر بیش ترین حساسیت در باکتری گرم مثبت استرپتوکوکوس پیوژنز و کم-ترین حساسیت در باکتری گرم منفی سودوموناس ائروژینوزا مشاهده شد. حداقل غلظت مهار کنندگی در باکتری های مورد بررسی بین ۶/۲۵ تا ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر و حداقل غلظت کشندگی بین ۶/۲۵ تا ۲۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر بدست آمد(جدول۲).

جدول۲. نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره های آبی و اتانولی خرفه بر باکتری‌های استرپتوکوکوس پیوژنز، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیا کلی و سودوموناس ائروژینوزا

نوع عصاره	میکرو ارگانیسم	MIC	MBC
اتانولی	استرپتوکوکوس پیوژنز	۶/۲۵	۶/۲۵
اتانولی	استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس	۶/۲۵	۱۲/۵
اتانولی	استافیلوکوکوس اورئوس	۱۲/۵	۱۲/۵
اتانولی	اشرشیا کلی	۲۵	۵۰
اتانولی	سودوموناس ائروژینوزا	۵۰	۵۰
آبی	استرپتوکوکوس پیوژنز	۱۲/۵	۲۵
آبی	استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس	۱۲/۵	۲۵
آبی	استافیلوکوکوس اورئوس	۲۵	۵۰
آبی	اشرشیا کلی	۵۰	۱۰۰
آبی	سودوموناس ائروژینوزا	۱۰۰	۲۰۰

بحث

با توجه به اینکه امروزه یکی از مشکلات اصلی در ارتباط با میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا، افزایش مقاومت آن ها به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد، تلاش های فراوانی برای دستیابی به اطلاعات بیشتر در مورد، مواد موثره موجود در گیاهان و کاربرد آن‌ها در درمان بیماری‌های مختلف در حال انجام است(۱۷). استفاده از مواد ضدمیکروبی با پایه گیاهی می تواند در کنترل بیماری های انسانی نقش با ارزشی ایفا نماید. در همین راستا، در مطالعه اخیر به بررسی خواص ضد باکتریایی خرفه بر پنج گونه باکتری پاتوژن انسانی پرداخته شد.

نتایج به دست آمده از بررسی وزن خشک عصاره‌های آبی و اتانولی گیاه خرفه نشان داد که حلال اتانول به طور موثرتری نسبت به حلال آبی توانسته است با اجزا و مواد تشکیل دهنده گیاه خرفه اینترکشن ایجاد کند و باعث افزایش خروج مواد موثره از گیاه و بالا رفتن غلظت این مواد در عصاره اتانولی نسبت به عصاره آبی گیاه خرفه شود تا آنجایی که نتایج این مطالعه نشان داد که تغییر نوع حلال باعث افزایش ۵ درصدی وزن خشک عصاره اتانولی نسبت به عصاره آبی خرفه می شود.

تحقیقات مشابه ای در این زمینه بر روی تعدادی از گیاهان دارویی نیز انجام شده که تئوری ذکر شده را تایید می کند. به عنوان مثال افشاریان و همکاران (۱۳۹۲) اثر ضد میکروبی عصاره های آبی و اتانولی هویج فرنگی و کلم برگ قرمز را بر روی دو گونه میکروبی استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلی در شرایط آزمایشگاهی بررسی کردند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که افزایش فعالیت ضد میکروبی هویج فرنگی و کلم برگ قرمز رابطه مستقیمی با نوع حلال دارد، به نحوی که حلال اتانول باعث بالا رفتن وزن خشک عصاره هویج فرنگی و کلم برگ قرمز شده و وزن خشک عصاره را تا ۶ درصد بالاتر می برد این محققان نشان دادند که عصاره های اتانولی هویج فرنگی و کلم برگ قرمز نسبت به عصاره های آبی دارای فعالیت و بازدارندگی بیشتری بر روی هر دو سوش مورد بررسی می باشد(۱۸). علیزاده بهبهانی و همکاران (۱۳۹۳) اثر ضد میکروبی عصاره های آبی و اتانولی گیاه مانگرو را بر روی تعدادی از باکتری های گرم مثبت و گرم منفی را در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران حاکی از بالاتر بودن وزن خشک عصاره اتانولی گیاه مانگرو نسبت به عصاره آبی آن می باشد، این محققان دلیل این پدیده را واکنش هایی که باعث افزایش اینترکشن های بین حلال اتانول و گیاه مانگرو ذکر نمودند(۱۹). این نتایج موید این مطلب است که مهم ترین و اساسی ترین عاملی که باید درهنگام استخراج مواد متشکله گیاهان مورد توجه قرار گیرد، حلال مناسب است که انتخاب آن به قسمت های مختلف یک گیاه و نیز به مواد متشکله آن بستگی دارد.

نتایج نشان داد که بیشترین قطر هاله عدم رشد عصاره های آبی و اتانولی خرفه در غلظت ۱۰۰mg/ml مربوط به باکتری استافیلوکوکوس پیوژنز و کمترین قطر هاله در این غلظت مربوط به باکتری گرم منفی سودوموناس ائروژینوزا بود. همچنین نتایج نشان می‌دهد که عصاره آبی در تمامی غلظت‌ها روی استرپتوکوکوس پیوژنز، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استافیلوکوکوس اورئوس موثر بوده اما در غلظت mg/ml ۵ روی سودوموناس ائروژینوزا و اشرشیا کلی اثر بازدارندگی نشان نداد. همچنین مشاهد شد به جز درغلظت-های ۵۰ با ۷۵ عصاره آبی بر روی اشرشیا کلی و استرپتوکوکوس پیوژنز در بقیه موارد اختلاف میانگین قطر عدم رشد (به صورت دو به دو) با هم معنی‌دار می‌باشد. در مقایسه دو به دو میان غلظت‌های عصاره آبی خرفه بر سودوموناس ائروژینوزا نیز اختلاف میانگین قطر بازدارندگی مشاهده شد. همچنین نتایج نشان می‌دهد که عصاره اتانولی در تمامی غلظت‌ها روی استرپتوکوکوس پیوژنز، استافیلو کوکوس اپیدرمیدیس، استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلی موثر بوده اما در غلظت mg/ml ۵ روی سودوموناس ائروژینوزا اثر بازدارندگی نشان نداد. همچنین مشاهد شد به جز درغلظت‌های ۷۵ با ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره اتانولی خرفه بر روی سودوموناس ائروژینوزا و همچنین غلظت ۵۰ با ۷۵ بر استرپتوکوکوس پیوژنز در بقیه موارد اختلاف میانگین قطر عدم رشد (به صورت دو به دو) با هم معنی‌دار می‌باشد. مقایسه دو به دو میانگین‌های قطر هاله عدم رشد در عصاره های آبی و اتانولی بر باکتری‌های مورد بررسی نشان داد که با افزایش غلظت‌ها، میانگین قطر عدم رشد افزایش می یابد. غلظت مؤثر (غلظتی با بیش‌ترین اثر ضد باکتریایی) به کمک نتایج آزمون توکی در سطح معنی‌داری ۵ درصد تعیین شد. بر اساس نتایج حاصل از این آزمون مشاهده شد در مورد عصاره های آبی و اتانولی خرفه غلظت موثر ۱۰۰mg/ml بود. وجود یا عدم وجود تفاوت معنی‌دار میانگین قطر عدم رشد غلظت‌های مختلف را می‌توان به مقدار ماده مؤثر موجود در عصاره های آبی و اتانولی خرفه نسبت داد. ولی به طوری کلی می‌توان نتیجه گرفت که با افزایش غلظت میزان قطر هاله عدم رشد افزایش پیدا می‌کند.

نتایج نشان داد که عصاره های آبی و اتانولی خرفه اثر نسبتا بالایی بر روی میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه دارد، به نحوی که این اثر در مورد باکتری استرپتوکوکوس پیوژنز بالاترین و در مورد باکتری گرم منفی سودوموناس ائروژینوزا کمترین می باشد. این نتایج نشان می دهد که اختلاف در مورد سوش های مورد بررسی بسیار حائز اهمیت است، زیرا تفاوتی که در مورد ساختار باکتری های گرم مثبت نسبت به باکتری های گرم منفی وجود دارد باعث شده که اثر ضد میکروبی در مورد عصاره های آبی و اتانولی گیاه خرفه در سطح احتمال۰/۰۵> P معنی دار باشد. تحقیقات مشابه در مورد اثر ضد میکروبی عصاره های و اسانس های گیاهان دارویی که روی طیف وسیعی از باکتری های گرم مثبت و گرم منفی نیز انجام پذیرفته است مطلب فوق را تایید می‌کند. گلشنی و داودی (۱۳۹۲) اثر ضد میکروبی عصاره متانولی رزماری را بر تعدادی از باکتری های گرم مثبت و گرم منفی در شرایط آزمایشگاهی را مورد بررسی قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره متانولی رزماری بیشترین اثر بازدارندگی را بر روی سوش گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس دارد و این در حالی است که کمترین هاله بازدارندگی بر روی گونه های گرم منفی مورد بررسی گزارش شد(۲۰). حیدری سورشجانی و همکاران (۱۳۹۲) اثر مهارکنندگی و کشندگی عصاره های آبی و اتانولی کرفس کوهی را را بر اشرشیا کلی، باسیلوس سرئوس و لیستریا اینوکوا در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که عصاره اتانولی کرفس کوهی بیشترین بازدارندگی را بر روی گونه گرم مثبت نشان داد(۲۱). علیزاده بهبهانی و همکاران (۱۳۹۳) اثر ضد میکروبی عصاره های آبی و اتانولی گیاه حرا را بر روی لیستریا مونوسایتوژنز، باسیلوس سرئوس، انتروباکتر ائروژینوزا، انتروکوکوس فکالیس و سالمونلا تیفی در شرایط آزمایشگاهی را به روش انتشار در آگار به کمک دیسک مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که عصاره گیاه حرا در شرایط آزمایشگاهی دارای اثر ضد میکروبی قابل ملاحظه ای بر انتروباکتر ائروژینوزا و سالمونلا تیفی به عنوان باکتری گرم منفی و لیستریا مونوسایتوژنز، باسیلوس سرئوس و انتروکوکوس فکالیس به عنوان باکتری‌های گرم مثبت نشان داد، اما هاله بازدارندگی اثر گیاه حرا بر روی باکتری های گرم مثبت به مراتب بیشتر از باکتری های گرم منفی بود(۱۹). بیشترین قطر هاله بازدارندگی مربوط به عصاره اتانولی برگ گیاه خرفه بر باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس بود. نتایج آنالیز آماری نشان داد قطر هاله عدم رشد به طور معنی داری با افزایش غلظت در سطح احتمال۰/۰۵> P افزایش می‌یابد.

نتایج نشان داد که MIC عصاره آبی خرفه برای باکتری‌های استرپتوکوکوس پیوژنز، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیا کلی و سودوموناس ائروژینوزا به ترتیب ۱۲/۱۲،۵/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و MIC عصاره اتانولی برای باکتری‌های استرپتوکوکوس پیوژنز، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیا کلی و سودوموناس ائروژینوزا به ترتیب ۶/۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. نتایج نشان داد MBC عصاره اتانولی خرفه برای باکتری‌های استرپتوکوکوس پیوژنز، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیا کلی و سودوموناس ائروژینوزا به ترتیب ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۱۲/۵، ۵۰ و ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر و MBC عصاره آبی خرفه برای باکتری‌های استرپتوکوکوس پیوژنز، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیا کلی و سودوموناس ائروژینوزا به ترتیب ۲۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت، بیش‌ترین مقاومت مربوط به باکتری گرم منفی سودوموناس ائروژینوزا بود.

نتیجه گیری

گیاه خرفه می تواند به عنوان گیاهی ارزش مند در جهت مقابله با بیماری های عفونی در نظر گرفته شود، زیرا اثرات ضد باکتریایی قابل ملاحظه ای، به خصوص بر روی باکتری های گرم مثبت دارد. پیش نهاد می‌شود در ادامه، مطالعات وسیع‌تری در زمینه اثر ضد میکروبی و شناسایی ترکیبات عصاره گیاه خرفه با استفاده از کروماتوگرافی با کارائی بالا انجام گردد تا با یافتن مواد موثره ضد میکروبی این گیاه، استفاده از آن در ترکیبات مختلف بصورت خوراکی یا به شکل دارویی اقدامی در بهبود از بیماری‌های مربوط به باکتری‌های بیماری زا انجام شود.

تشکر و قدردانی

از خانم مهندس شهناز افشاریان که در انجام آزمایش‌ها ما را یاری کردند، قدردانی می‌شود.

REFERENCES

1. Duque AS, Ferreira AF, Cezario RC, Gontijo Filho PP. Nosocomial infections in two hospitals in Uberlandia, Brazil Rev Panam Infectol 2007;9 (4): 14-18.

2. Izquierdo Cubas F, Zambrano A, Frometa I, Gutierrez A, Bastanzuri M, Guanche H l. National Prevalence of Nosocomial Infections.Cuba 2004. Journal of Hospital Infection 2008; 68: 234-240.

3. Sadeghi J, Maftoon F, Ziaei SA. [Herbal medicine: knowledge, attitude and practice in Tehran. J Med Plants 2005; 4(13): 11-8. [Farsi].

4. Ayatollahi-Moosavi SA, Abdollahi H, Kazemipour N.Study of anti-dermatophyte effect of ten herbalmethanolic extract. J Kerman Med UnivSci 1996; 3(3):115-122.

5. Zargari A. Plants medicine. 6nd ed. Tehran University Press. Vol 4. 1998, pp: 682 - 97.

6. Barrick, J. E., Yu, D. S., Yoon, S. H., Jeong, H., Oh, T. K., Schneider, D., Kim, J. F. Genome evolution and adaptation in a long-term experiment with Escherichia coli. Nature, 2009; 461(7268): 1243-7.

7. Doyle MP, Beuchat LR, Montville T, edithors. Food microbiology: fundamentals and frontiers. Washington: ASM Press: 2001; 24-68.

8. 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.

9. 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”. Journal of Paramedical Sciences 2013; 4(3): 89-99.

10. 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.

11. Babayi H, Kolo I, Okogun J.I, Ijah U. J. J. The antimicrobial activities of methanolic extracts of Eucalyptus camaldulensis and Terminalia catappa against some pathogenic microorganisms. Nigerian Society for Experimental Biology 2004; 16(2):106-11.

12. Alizadeh Behbahani B, Tabatabaei Yazdi F, Mortazavi A, Zendeboodi F, Gholian MM, Vasiee A. Antimicrobial effect of Carboxy Methyl Cellulose (CMC) containing aqueous and ethanolic Eucalyptus camaldulensis L. leaves extract against Streptococcus pyogenes, Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus epidermidis. Journal of Paramedical Sciences 2014; 5(2): 59-69.

13. Tabatabaei Yazdi, F., Mortazavi, A., Koocheki, A., Afsharian, S., & Alizadeh Behbahani, B. Antimicrobial properties of plant extracts of Thymus vulgaris L., Ziziphora tenuior L. and Mentha Spicata L., against important foodborne pathogens in vitro. Sci J Microbiol 2013; 2(2): 23-30.

14. Tabatabaei Yazdi F, Alizadeh Behbahani B. Antimicrobial effect of the aqueous and ethanolic Teucrium polium L. extracts on gram positive and gram negative bacteria "in vitro". Journal of Paramedical Sciences 2013; 4(4): 55-61.

15. Rozman T, Jeršek B. Antimicrobial activity of rosemary extracts (Rosmarinus officinalis L.) against different species of Listeria. Acta agriculturae Slovenica. 2009; 93(1):51-8.

16. Celiktas OY, Kocabas EEH, Bedir E, Sukan FV, Ozek T, Baser KHC. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of Rosmarinus officinalis, depending on location and seasonal variations. Food Chemistry. 2007; 100(2): 553-9.

17. Stanisavljevic I, Stojicevic S, Velickovic D, et al. Antioxidant and antimicrobial activities of Echinacea (Echinacea purpurea L.) extracts obtained by classical and ultrasound extraction. Chin J Chem Eng 2009; 17: 478-83.

18. Afsharian SH. Study of antimicrobial effects of aqueous and ethanolic extracts of Brassica oleracea and Daucus carota against Staphylococcus aureus PTCC 1337 Escherichia coli PTCC 1330 "in vitro". MSc Thesis. 2014. Ferdowsi University of Mashhad.

19. Alizadeh Behbahani B, Tabatabaei Yazdi F, Shahidi F, Mohebbi M, Hossein Zanganeh. Investigation of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of the Aqueous and Ethanolic Avicennia Marina Extracts on Gram Positive and Gram Negative Bacteria "in vitro". Sadra Med Sci J 2014; 2(2): 123-134. [Farsi].

20. Golshani Z, Dawoodi V. In vitro study of antimicrobial effects of Rosmarinus officinalis leaf extract against some pathogens. Arak Medical University Journal (AMUJ) 2013; 16(77): 82-9.

21. Heidari Sureshjani M, Tabatabaei Yazdi F, Mortazavi A, Shahidi F, Inhibitory and Lethal Effects of Aqueous and Ethanolic Extracts of Kelussia odoratissima on Bacillus cereus , Listeria innocua and Escherichia coli "in vitro". Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine 2014; 18(64): 19-24.