فعالیت ضدمیکروبی عصاره مچه بر تعدادی از میکروارگانیسم‌های عامل عفونت در شرایط آزمایشگاهی

فخری شهیدی* [۱]، فریده طباطبایی یزدی[۱]، سحر روشنک[۲]، بهروز علیزاده بهبهانی[۳]، ندا نوروزی[۲]، علیرضا وسیعی[۲]

۱ـ استاد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
۲ـ دانشجوی دکتری، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
۳ـ استادیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران
***نشانی برای مکاتبه:** fshahidi@um.ac.ir

دریافت مقاله :اسفند نود و هفت پذیرش برای چاپ: اردیبهشت نود و هشت

چکیده

سابقه و هدف: *در سال‌های اخیر به دلیل استفاده معمول از داروهای ضدمیکروبی تجاری در درمان بیماری‌های عفونی، مقاومت به یک یا چند آنتی‌بیوتیک، در حال افزایش است. استفاده ازگیاه مچه به عنوان یک گیاه دارویی، از دیرباز در ایران مرسوم بوده است. هدف از این پژوهش، تعیین فعالیت ضدمیکروبی عصاره مچه بر تعدادی از میکروارگانیسم‌های عامل عفونت در شرایط برون‌تنی بود.*

روش کار: *در این پژوهش تجربی، عصاره‌گیری از گیاه مچه با روش خیساندن انجام شد. راندمان بازده استخراج عصاره مچه براساس وزن خشک محاسبه گردید. اثر ضد میکروبی عصاره مچه با روش‌های حداقل غلظت بازدارندگی رشد، حداقل غلظت کشندگی و تعیین هاله عدم رشد میکروبی (دیسک دیفیوژن آگار و چاهک آگار) بر سویه‌های اشرشیا کلی، سالمونلا تیفی، لیستریا اینوکوا، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و کاندیدا آلبیکنس تعیین شد.*

یافته‌ها: *حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره آبی مچه، برای کاندیدا آلبیکانس (حساس‌ترین سویه نسبت به عصاره) به ترتیب ۶۴ و ۱۲۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره مچه برای سویه‌های اشرشیا کلی، سالمونلا تیفی، لیستریا اینوکوا و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس به ترتیب ۲۵۶، ۲۵۶، ۱۲۸ و ۱۲۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. حداقل غلظت کشندگی عصاره برای سویه‌های بیماری‌زا مذکور به ترتیب ۲۵۶، ۲۵۶، ۱۲۸ و ۲۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. تجزیه و تحلیل داده‌ها در سطح معنی‌داری ۵ درصد نشان داد که برای تمام سویه‌های عامل عفونت با افزایش غلظت عصاره، قطر هاله عدم رشد میکروبی (دیسک دیفیوژن آگار و چاهک آگار)، افزایش یافت. نتایج نشان داد که قطر هاله بازدارنده رشد، در روش چاهک آگار بیشتر از روش دیسک دیفیوژن آگار بود.*

نتیجه‌گیری: *عصاره گیاه مچه اثر ضدمیکروبی بر تمامی سویه‌های مورد بررسی داشت. حساس‌ترین و مقاوم‌ترین سویه نسبت به عصاره مچه به ترتیب کاندیدا آلبیکنس و اشرشیا کلی بود. پیشنهاد می‌گردد در ادامه پژوهش‌های بیشتری در شرایط برون‌تنی و مدل حیوانی انجام گیرد تا بتوان از این گیاه برای درمان بیماری‌های عفونی بهره برد.*

واژگان کلیدی: مچه، عصاره، بیماری‌های عفونی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی

مقدمه

گیاهان دارویی در بخش‌های مختلف خود دارای موادی هستند که برای اهداف درمانی یا به عنوان پیش‌سازی برای سنتز سایر داروهای عملگر استفاده می‌گردند. ثابت شده است گیاهانی که به طور طبیعی متابولیت‌های ثانویه از جمله آلکالوئیدها، گلوکوزیدها، تانن‌ها، روغن‌های فرار و مواد معدنی و ویتامین‌ها را تولید و ذخیره می‌کنند، خواص دارویی دارند. گیاهان دارویی سرمایه طبیعی مهمی برای بسیاری از کشورها محسوب می‌شوند، به گونه‌ای که در سراسر جهان پژوهش‌های فراوانی برای یافتن گیاهان دارویی، افزایش یافته است(۱).

در سال‌های اخیر شیوع مقاومت به یک یا چند آنتی بیوتیک در میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای انسانی، به دلیل استفاده معمول از داروهای ضدمیکروبی تجاری در درمان بیماری‌های عفونی، در حال افزایش است. این موضوع دانشمندان را بر آن داشت که برای یافتن

مواد ضدمیکروب جدید از منابع مختلفی مانند گیاهان به جستجو بپردازند. غربالگری عصاره‌های گیاهی و فرآورده‌های گیاهی با هدف بررسی فعالیت ضدمیکروبی آن‌ها نشان داده‌اند که گیاهان دارویی منبع بالقوه‌ای از آنتی بیوتیک‌های گیاهی جدید هستند. مطالعات متعدد ترکیباتی را درون گیاهان شناسایی کرده‌اند که دارای فعالیت ضدمیکروبی موثری هستند(۲و۳).

گیاه مچه با نام علمی Lepidium draba از خانواده Brassicaceae که به نام‌های whitetop و شاهی سفید نیز شناخته می‌شود. گیاه مچه در غرب آسیا از جمله ایران و عراق و شرق اروپا رشد می‌کند. برگ‌ها و بذرهای این گیاه دارای اثرات ملین و مدّر هستند. علاوه بر این برگ‌های گیاه مچه روی برخی باکتری‌های بیماری‌زای انسانی تاثیرگذار هستند(۱). این گیاه در ایران به نام مچه شناخته شده و از آن در انواع موادغذایی مانند انواع آش، سالاد و برنج پخته استفاده می‌شود. دم کردن برگ‌ها و بذرهای این گیاه اثر ضد یبوست و دفع کننده دارد. این گیاه در مناطق مختلف ایران، در نواحی مجاور منابع آب و همچنین در باغ‌ها و زمین‌های برهنه و بدون پوشش رشد می‌کند(۳).

از گیاه مچه سال‌ها است که در طب سنتی علیه انواع مختلف بیماری استفاده می‌گردد. با توجه به استفاده سنتی از این گیاه به عنوان چاشنی مواد غذایی و درمان بیماری‌ها، هدف از این پژوهش بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره گیاه مچه در برابر باکتری‌های گرم منفی (*اشرشیا کلی و سالمونلا تیفی*)، گرم مثبت (*لیستریا اینوکوا* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیس*) و مخمر (*کاندیدا آلبیکانس*) که از عوامل شایع عامل عفونت‌های میکروبی هستند بود.

روش کار

پژوهش حاضر یک مطالعه آزمایشگاهی بود که در سال ۱۳۹۶ در گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد. اثر بازدارندگی عصاره آبی مچه بر سویه‌های میکروبی که از کلکسیون میکروبی بخش میکروب‌شناسی دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد تهیه شده بود بررسی شد. این سویه‌ها عبارتند از کاندیدا آلبیکانس PTCC 5027 ، لیستریا اینوکوا ATCC 33090 ، استافیلوکوکوس اپیدرمیس PTCC 1435 ، اشرشیا کلی ATCC 25922 و سالمونلا تیفی PTCC 1609 بود. سویه‌های میکروبی با استفاده از نیم مک‌فارلند که معادل $1/5 \times 10^8$ CFU/mL میکروارگانیسم می‌باشد، استاندارد شد(۵). گیاه مچه در ابتدای دوره رویشی از مراتع کوه‌های زاگرس (شهرکرد- چهارمحال و بختیاری) جمع آوری شد. پس از انتقال گیاه به مشهد، گیاه مچه در پژوهشکده علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد و توسط جناب آقای مهندس جوهرچی تایید جنس و گونه گردید. نام علمی گیاه در نامه به تاریخ ۱۳۹۶/۲/۲۳ و شماره ۱۴۷ ه Lepidium draba L. تعیین شد. برای تهیه عصاره آبی مچه ۵۰ گرم پودر گیاه خشک شده مچه به ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر افزوده و به مدت ۷۲ ساعت در یک شیکر قرار گرفت. پودر پس از ۷۲ ساعت، مخلوط با کمک کاغذ صافی واتمن صاف شد و در آون با دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد خشک گردید. عصاره‌های به دست آمده تا انجام آزمایش‌ها درون یخچال نگهداری شدند. راندمان عصاره‌دهی بر اساس وزنی/ وزنی محاسبه شد(۶و۷).

عصاره آبی مچه با استفاده از محیط کشت مولرهینتون براث برای باکتری‌ها و محیط پتیتو دکستروز براث برای قارچ‌ها، رقیق شد. رقت‌های ۵۱۲ ، ۲۵۶، ۱۲۸، ۶۴، ۳۲، ۱۶، ۸ ، ۴ ، ۲ و ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره برای آزمون‌های حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC یا MFC) استفاده شد. رقت‌های مورد استفاده برای تعیین هاله ممانعت کنندگی رشد به روش دیسک دیفیوژن و چاهک آگار، ۴۰۰، ۳۰۰، ۲۰۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره بود. قبل از انجام آزمون، رقت‌ها با استفاده از فیلتر سرسرنگی ۰/۴۵ استریل گردید(۸). اتاق کشت به وسیله اتانول ۷۰ درصد و لامپ UV به خوبی استریل شد. آزمون MIC به روش رقیق‌سازی سریالی (میکرودایلوشن براث) انجام شد. برای انجام آزمون MIC در میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ته گرد استریل استفاده شد. هر ردیف به یک میکروارگانیسم اختصاص یافت و ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت به همراه ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی استاندارد (نیم مک‌فارلند) درون خانه‌های شماره ۱ تا ۱۰ ریخته و در خانه ۱۱ محیط کشت تلقیح نشده حاوی عصاره مچه و بدون سوسپانسیون میکروبی (کنترل منفی)، و در خانه ۱۲ محیط کشت تلقیح شده با سوسپانسیون میکروبی فاقد عصاره مچه (کنترل مثبت) ریخته شده و به مدت ۲۴ و ۷۲ ساعت در دمای بهینه (برای باکتری‌ها ۳۷ درجه سانتی‌گراد و برای قارچ‌ها ۲۷ درجه‌سانتی‌گراد) در گرمخانه گذاشه شد. ایجاد رنگ قرمز در نتیجه افزودن معرف تری فنیل تترازولیوم کلراید با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر وگرمخانه‌گذاری مجدد به مدت ۳۰ دقیقه، بررسی شد(۹و ۱۰). کمترین رقت از ماده مورد آزمون که در چاهک مربوط به آن غلظت، تغییر رنگ قرمز رویت نگردید، به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی گزارش شد.

به منظور تعیین MBC یا MFC ، ۱۰۰ میکرولیتر از محتویات چاهک‌های مربوط به MIC و چاهک‌های مربوط به غلظت‌های بیشتر از عصاره مورد آزمایش که تغییر رنگی در آن مشاهده نشد، بر محیط کشت آگار (مولر هینتون آگار برای باکتری‌ها و پتیتو دکستروز برای قارچ‌ها) به صورت سطحی کشت داده شد و به مدت ۲۴ و ۷۲ ساعت در دمای بهینه (برای باکتری‌ها ۳۷ درجه سانتی

گراد و برای قارچها ۲۷ درجه‌سانتی‌گراد)، در گرمخانه گذاشته شد. غلظتی از عصاره مورد آزمایش که بر محیط کشت جامد مربوط به آن هیچ‌گونه رشدی از باکتری مشاهده نشد، به عنوان MBC یا MFC در نظر گرفته شد. به منظور تأیید نتایج حاصل، آزمایش‌ها سه بار تکرار گردید(۱و ۱۲).درروش دیسک دیفیوژن، ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی بر سطح محیط کشت آگار (مولر هینتون آگار برای باکتری‌ها و پتیتو دکستروز برای قارچها) به صورت یکنواخت کشت داده شد. مکان قرارگیری دیسک و غلظت عصاره در پشت پلیت‌ها مشخص گردید. عصاره‌ها توسط شیکر خوب تکان داده شده و ۵۰ میکرولیتر از هر کدام، به کمک سمپلر در پلیتی استریل، روی دیسک ریخته شد، سپس دیسک‌ها با پنس استریل به جای مشخص آن قرار داده شد. در هر پلیت با قطر ۸ سانتی متر، ۳ دیسک قرار گرفت. یک دیسک فاقد عصاره به عنوان کنترل منفی استفاده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ و ۷۲ ساعت در دمای بهینه (برای باکتری‌ها ۳۷ درجه سانتی‌گراد و برای قارچها ۲۵ درجه‌سانتی‌گراد) در گرمخانه‌گذاشته شد. پس از اتمام زمان گرمخانه‌گذاری قطر هاله عدم رشد میکروارگانیسم‌ها با کولیس اندازه‌گیری شد. ازدیسک فاقد عصاره به عنوان کنترل استفاده گردید(۱۳-۱۵). در روش چاهک آگار، محیط کشت آگار پس از استریلیزاسیون در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد تا دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد خنک شده و ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون ۰/۵ مک فارلند میکروارگانیسم به آن افزوده شد و در هر پلیت ۲۰ میلی‌لیتر از آن توزیع شد. پس از منعقد شدن کامل محیط آگار با کمک انتهای سر سمپلر استریل ۱۰۰۰ میکرولیتری، روی هر پلیت، ۳ چاهک با قطر ۶ میلی-متری ایجاد گردید. اطلاعات مربوط به نوع میکروارگانیسم و غلظت مورد استفاده، پشت هر پلیت مشخص گردید. درون هر چاهک ۶۰ میکرولیتر از غلظت مشخص شده، ریخته شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ و ۷۲ ساعت در دمای بهینه (برای باکتری‌ها ۳۷ درجه سانتی‌گراد و برای قارچها ۲۷ درجه‌سانتی‌گراد) در گرمخانه‌گذاشته شد. پس از آن قطر هاله عدم رشد با کولیس اندازه‌گیری و بر حسب میلی‌لیتر گزارش گردید(۱۶و ۱۷). به منظور تأیید نتایج حاصل، آزمایش‌ها برای هر یک از عصاره‌ها و برای هر نمونه میکروبی، سه بار تکرار گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها به روش تجزیه واریانس یک طرفه و با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۸ انجام شد. برای مقایسه میانگین ها از روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن و در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد.

یافته‌ها

میزان بازدهی عصاره آبی مچه ۲۶/۳ درصد بود. حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره آبی مچه، برای کاندیدا آلبیکانس (حساس‌ترین سویه نسبت به عصاره) ۶۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره مچه برای سویه‌های اشرشیا کلی، سالمونلا تیفی، لیستریا اینوکوا و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس به ترتیب ۲۵۶، ۲۵۶، ۱۲۸ و ۱۲۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود(جدول ۱).

جدول ۱- حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) عصاره آبی مچه بر تعدادی از سویه‌های عامل عفونت به روش رقیق سازی سریال

عصاره	میکروارگانیسم	غلظت (میلی‌گرم/ میلی‌لیتر)									
		۵۱۲	۲۵۶	۱۲۸	۶۴	۳۲	۱۶	۸	۴	۲	۱	کنترل
آبی	*Staphylococcus epidermidis*	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
آبی	*Salmonella typhi*	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
آبی	*Listeria innocua*	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
آبی	*Escherichia coli*	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
آبی	*Candida albicans*	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-

(-): تغییر رنگ قرمز یا ارغوانی بعد از افزودن معرف تری فنیل تترازویلیوم کلراید مشاهده نشد (عدم رشد میکروبی).
(+): تغییر رنگ قرمز یا ارغوانی بعد از افزودن معرف تری فنیل تترازویلیوم کلراید مشاهده شد (رشد میکروبی).

حداقل غلظت کشندگی عصاره آبی مچه، برای کاندیدا آلبیکانس (حساس‌ترین سویه نسبت به عصاره) ۱۲۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. حداقل غلظت کشندگی عصاره برای سویه‌های اشرشیا کلی، سالمونلا تیفی، لیستریا اینوکوا و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس به ترتیب ۲۵۶، ۲۵۶، ۱۲۸ و ۲۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود(جدول ۲).

جدول ۲- نتایج حداقل غلظت کشندگی (MBC یا MFC) عصاره آبی مچه بر تعدادی از سویه‌های عامل عفونت

عصاره	میکروارگانیسم	غلظت (میلی‌گرم/ میلی‌لیتر)
آبی	*Staphylococcus epidermidis*	۲۵۶
آبی	*Salmonella typhi*	۲۵۶
آبی	*Listeria innocua*	۱۲۸
آبی	*Escherichia coli*	۲۵۶
آبی	*Candida albicans*	۱۲۸

برای تمام سویه‌های عامل عفونت با افزایش غلظت عصاره، قطر هاله عدم رشد میکروبی در روش دیسک دیفیوژن آگار افزایش یافت. بیشترین هاله عدم رشد میکروبی در غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم بر میلی-لیتر برای کاندیدا آلبیکنس با قطر ۲۵/۵۳ میلی‌متر مشاهده گردید. کم‌ترین هاله عدم رشد میکروبی در غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم بر میلی-لیتر برای باکتری اشرشیا کلی با قطر ۱۷/۴۴ میلی‌متر مشاهده شد. نتایج این آزمون نشان داد که سویه‌های گرم مثبت استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و لیستریا اینوکوا نسبت به سویه‌های گرم منفی اشرشیا کلی و سالمونلا تیفی در غلظت یکسان دارای قطر هاله عدم رشد بیشتری بودند(جدول ۳).

جدول ۳- میانگین قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر عصاره مچه بر بر تعدادی از سویه‌های عامل عفونت به روش دیسک دیفیوژن آگار

عصاره	میکروارگانیسم	غلظت (میلی‌گرم/ میلی‌لیتر)			
		۱۰۰	۲۰۰	۳۰۰	۴۰۰
آبی	*Staphylococcus epidermidis*	۱۱/۵۵ ±۰/۴۶^{a}	۱۸/۲۵ ±۰/۷۳^{b}	۲۰/۳۴ ±۰/۸۲^{c}	۲۳/۴۴ ±۰/۵۰^{d}
آبی	*Salmonella typhi*	۱۱/۲۲ ±۰/۴۲^{a}	۱۷/۷۱ ±۰/۵۵^{b}	۱۹/۰۰ ±۰/۶۴^{b}	۲۰/۳۳ ±۰/۶۶^{b}
آبی	*Listeria innocua*	۱۱/۳۰ ±۰/۵۰^{a}	۱۷/۲۶ ±۰/۳۸^{b}	۲۰/۵۱ ±۰/۷۷^{c}	۲۷/۳۹ ±۰/۷۹^{d}
آبی	*Escherichia coli*	–	۱۲/۲۲ ±۰/۵۰^{a}	۱۴/۶۶ ±۰/۵۰^{b}	۱۷/۴۴ ±۰/۶۸^{c}
آبی	*Candida albicans*	۱۲/۴۵ ±۰/۵۰^{a}	۱۸/۶۲ ±۰/۴۴^{b}	۲۱/۴۵ ±۰/۷۳^{c}	۲۵/۵۳ ±۰/۸۵^{d}

با افزایش غلظت عصاره مچه از ۱۰۰ به ۴۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر قطر هاله عدم رشد میکروبی برای سویه‌های بیماری‌زای عامل عفونت افزایش یافت. تجزیه و تحلیل داده‌ها در سطح معنی‌داری ۵ درصد نشان داد که برای تمام سویه‌های عامل عفونت با افزایش غلظت عصاره، قطر هاله عدم رشد میکروبی در روش دیسک دیفیوژن آگار افزایش یافت. بیشترین هاله عدم رشد میکروبی در غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای *کاندیدا آلبیکنس* با قطر ۲۵/۵۳ میلی‌متر مشاهده گردید. کم‌ترین هاله عدم رشد میکروبی در غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای باکتری اشرشیا کلی با قطر ۱۷/۴۴ میلی‌متر مشاهده شد. در روش چاهک آگار در همه غلظت‌ها برای تمامی سویه‌های بیماری‌زای عامل عفونت قطر هاله عدم رشد مشاهده شد. مقایسه نتایج آزمون چاهک آگار با روش دیسک دیفیوژن آگار نشان داد که، به طور کلی قطر هاله عدم رشد میکروبی در روش چاهک آگار نسبت به روش دیسک دیفیوژن آگار در غلظت یکسان، بزرگتر می‌باشد. بیشترین هاله عدم رشد میکروبی در غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای مخمر کاندیدا آلبیکنس با قطر ۲۶/۸۰ میلی‌متر مشاهده شد، در همین غلظت کم‌ترین هاله بازدارندگی با قطر ۱۷/۸۰ میلی‌متر مربوط به باکتری گرم منفی اشرشیا کلی بود(جدول ۴)

جدول۴-میانگین قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر عصاره مچه بر بر تعدادی از سویه‌های عامل عفونت به روش چاهک آگار

عصاره	میکروارگانیسم	غلظت (میلی‌گرم/ میلی‌لیتر)			
		۱۰۰	۲۰۰	۳۰۰	۴۰۰
آبی	*Staphylococcus epidermidis*	۱۲/۳۳ ±۰/۵۰^{a}	۱۹/۸۵ ±۰/۶۱^{b}	۲۱/۰۰ ±۰/۴۴^{b}	۲۵/۱۰ ±۰/۶۰^{c}
آبی	*Salmonella typhi*	۱۱/۹۵ ±۰/۵۰^{a}	۱۶/۶۶ ±۰/۳۸^{b}	۱۹/۲۰ ±۰/۵۵^{c}	۲۱/۰۰ ±۰/۴۷^{d}
آبی	*Listeria innocua*	۱۲/۷۵ ±۰/۸۵^{a}	۱۸/۶۵ ±۰/۶۸^{b}	۲۲/۱۰ ±۰/۴۱^{c}	۲۸/۱۰ ±۰/۷۳^{d}
آبی	*Escherichia coli*	۹/۵۲ ±۰/۶۷^{a}	۱۲/۹۵ ±۰/۳۱^{b}	۱۶/۵۰ ±۰/۶۹^{c}	۱۷/۸۰ ±۰/۵۰^{c}
آبی	*Candida albicans*	۱۳/۰۰ ±۰/۴۵^{a}	۱۸/۹۰ ±۰/۵۰^{b}	۲۲/۹۰ ±۰/۶۳^{c}	۲۶/۸۰ ±۰/۵۰^{d}

- نتایج حاصل از میانگین سه تکرار (آزمون آماری دانکن) در سطح معنی داری ($p\leq ۰/۰۵$) است و داده ها به صورت میانگین ± انحراف معیار آورده شده است.
- (-) هاله عدم رشد مشاهده نشد.

بحث

در سال‌های اخیر شیوع مقاومت به یک یا چند آنتی بیوتیک در میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای انسانی، به دلیل استفاده معمول از داروهای ضدمیکروبی تجاری در درمان بیماری‌های عفونی، در حال افزایش است. لذا در این پژوهش آزمایشگاهی اثر ضد میکروبی عصاره مچه (ماده ضدمیکروب طبیعی) بر تعدادی از سویه‌های بیماری‌زای عامل عفونی مورد بررسی قرار گرفت.

عصاره گیاه مچه اثر ضدمیکروبی بر تمامی سویه‌های بیماری-زای عامل عفونی مورد بررسی داشت. پژوهش‌های متعدد نشان داده که، اجزای زیست فعال موجود در عصاره و اسانس‌ها، توانایی اتصال به سطح سلول را داشته و پس از اتصال می‌توانند به لایه‌های فسفولیپید غشای سلولی نفوذ نمایند. این عمل باعث می‌شود که یکپارچگی ساختار غشاء سلول میکروارگانیسم از طریق ازدیاد و انباشته شدن این ترکیبات مختل گردیده که با تاثیر بر متابولیسم سلول، باعث مرگ آن می‌شود(۱۸و ۱۹).

نتایج آنالیز آماری آزمون ضدمیکروبی دیسک دیفیوژن آگار نشان داد که در تمامی غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای سویه‌های گرم مثبت استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و لیستریا اینوکوا و همچنین مخمر کاندیدا آلبیکنس در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌داری وجود دارد. نتایج نشان داد که، میان غلظت‌های ۲۰۰ با ۳۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و همچنین غلظت‌های ۳۰۰ با ۴۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای سویه گرم منفی سالمونلا تیفی در سطح آماری ۵ درصد اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید.

نتایج آنالیز آماری آزمون ضدمیکروبی چاهک آگار نشان داد که در تمامی غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای میکروارگانیسم‌های سالمونلا تیفی، لیستریا اینوکوا و کاندیدا آلبیکنس در سطح ۵ درصد اختلاف معنی-داری وجود دارد. نتایج نشان داد که، میان غلظت‌های ۲۰۰ با ۳۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و همچنین غلظت‌های ۳۰۰ با ۴۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ترتیب برای باکتری‌های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و اشرشیا کلی در سطح آماری ۵ درصد اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید.

به طور کلی حساسیت باکتری‌های گرم مثبت نسبت به عصاره مچه از باکتری‌های گرم منفی بیشتر بود. مطالعات فراوانی اثبات کرده‌اند که باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم‌منفی حساسیت بیشتری به عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی دارند. دلیل این امر را می‌توان این گونه توجیه نمود که باکتری‌های گرم منفی حاوی غشای خارجی محکمی هستند که بسیار پیچیده بوده و غنی از لیپوپلی‌ساکارید می‌باشد، بنابراین انتشار ترکیبات را محدود می‌کند، در حالی‌که باکتری‌های گرم مثبت فاقد غشاء پیچیده بوده و توسط یک دیواره پپتیدوگلیکان ضخیم و غیر متراکم احاطه شده‌اند در نتیجه مقاومت لازم در برابر مولکول‌های ضدمیکروبی کوچک را نداشته و باعث، تسهیل دسترسی ترکیبات ضدمیکروبی به غشاء سلول می‌شود(۱۸و ۱۹).

چیاد و همکاران (۲۰۱۷)، فعالیت ضدسرطانی، ضد درد و ضد التهابی عصاره برگ مچه را مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان دادند که گیاه مچه دارای فعالیت‌های ضدسرطانی، ضد درد و ضد التهابی می‌باشد(۱).

رادونیک و همکاران (۲۰۱۱)، اثر ضد میکروبی عصاره‌های فرار مچه به دست آمده از طریق تقطیر آبی و تقطیر با کمک کلروفرم را بر تعدادی از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار دادند. نتایج آن‌ها نشان داد که این عصاره‌ها بر باکتری‌های گرم منفی (انتروباکتر ساکازاکی، اشرشیا کلی، کلبسیلا پنومونیه، سودوموناس آئروژینوزا)، باکتری‌های گرم مثبت (باسیلوس سرئوس، کلستریدیوم پرفریجنس، انتروکوکوس فکالیس، استافیلوکوکوس اورئوس)، کپک‌ها (پنی‌سیلیوم و رایزوپوس استولونیفر) و مخمر (کاندیدا آلبیکانس) موثر بودند. حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره‌ها در محدوده ۴ تا ۱۲۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد، این رنج برای عصاره تقطیر آبی بین ۴ تا ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود(۲۰). یافته‌های این مطالعه با یافته‌های پژوهش حاضر همخوانی داشت، هر چند نتایج حداقل غلظت بازدارندگی عصاره مچه در پژوهش حاضر بزرگتر از مطالعه رادونیک و همکاران (۲۰۱۱)، بود.

در پژوهشی که توسط المزوخی و همکاران (۲۰۱۶)، انجام گردید، اثرات احتمالی فعالیت ضدباکتریایی ترکیبات فعال گیاه مچه روی برخی از باکتری‌های بیماری‌زای انسانی در شرایط برون‌تنی بررسی شد. این محققان بیان نمودند که، اثر ترکیبات فعال در گیاهان یکسان روی میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای مختلف و در غلظت‌های مختلف متفاوت است. این موضوع نشان می‌دهد که باکتری‌های گرم مثبت نسبت به

ترکیبات فعال عصاره حساس‌تر از باکتری های گرم منفی هستند. احتمالا دلیل آن وجود غشای خارجی است که به عنوان سدی قوی در گونه‌های گرم منفی عمل می‌کند. علاوه بر این نتایج این پژوهش ثابت کرد که ترکیبات فعال در گیاه مچه فعالیت ضد میکروبی علیه باکتری‌های گرم منفی علاوه بر باکتری‌های گرم مثبت دارند که ممکن است به وجود اثر ترکیبات فعال روی دیواره سلولی، پروتئین‌ها و سنتز DNA مرتبط باشد. این نتایج می‌تواند از کاربرد این گیاه در طب سنتی حمایت کنند. بنابراین، تحقیقات شیمیایی و داروسازی بیشتری برای جداسازی و شناسایی مواد شیمیایی جرئی و همچنین غربالگری فعالیت زیستی بالقوه در این گیاه توصیه شد(۲). نتایج این پژوهشگران با یافته‌های مطالعه حاضر همخوانی داشت.

محاسنه و همکاران (۱۹۹۹)، بیان کردند که عصاره‌های هگزانی، اتانولی، بوتانولی و آبی تمام بخش‌های هوایی ۹ گیاه مختلف از جمله مچه درجه فعالیت ضدمیکروبی متفاوتی بر اشرشیا کلی، سالمونلا تیفی موریوم، استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، آسپرژیلوس فلاووس و کاندیدا آلبیکنس از خود نشان دادند. عصاره‌های متانولی و هگزانی هیچگونه فعالیتی نشان ندادند. در مقایسه با آنتی بیوتیک‌های استاندارد، عصاره‌ها فعالیت کم تا متوسط داشتند و طیف فعالیت علیه باکتری‌های گرم منفی و مثبت و قارچ‌های آزمایش شده وسیع بود(۲۱).

حسین (۲۰۱۶)، ترکیبات فیتوشیمیایی عصاره اتانولی برگ‌های گیاه مچه را مورد شناسایی قرار داد. جهت شناسایی ترکیبات شیمیایی از تکنیک‌های GC-MS، FTIR و اسپکتروفوتومتری جذب اتمی استفاده نمود. نتایج نشان داد که، برگ‌های این گیاه منبع غنی از ترکیبات شیمیایی زیست فعال، فیبرها و مواد معدنی است. در این تحقیق ۴۶ ترکیب گیاهی از عصاره اتانولی برگ‌های این گیاه توسط آنالیز GC-MS شناسایی شدند. این پژوهشگر اظهار کرد که برگ‌های این گیاه به عنوان یک منبع دارویی چندکاره نوید دهنده می‌تواند مورد استفاده قرار گیرند هر چند آزمون‌ها بالینی لازم است تا کارایی این گیاه ثابت گردد(۲۲).

با توجه به نتایج حاصل از آزمون روش دیسک دیفیوژن آگار و چاهک آگار، هاله‌های مهار رشد اندازه‌گیری شده در روش چاهک آگار به مراتب بزرگتر از هاله‌های به دست آمده در روش دیسک دیفیوژن آگار بود. دلیل این امر نفوذ بهتر و در نتیجه تاثیر گذاری بیشتر روی میکروارگانیسم در روش چاهک آگار بود(۲۳). به طور کلی مقاومت باکتری‌های گرم منفی نسبت به باکتری‌های گرم مثبت در برابر مواد ضد میکروبی بیشتر است. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره مچه برای باکتری‌های گرم منفی نسبت به باکتری‌های گرم مثبت مقدار بالاتری بود. این اختلاف از تفاوت در غشاء سلولی باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت و عدم وجود لایه لیپید خارجی در باکتری‌های گرم مثبت سرچشمه می‌گیرد. اگرچه این مسئله نمی‌تواند توضیح کاملی برای شرح اختلاف در حساسیت باکتری‌های گرم مثبت و منفی باشد به همین علت اختلاف در هیدروفوبیسیتی سطح غشای سلول نیز به عنوان یک عامل موثر پیشنهاد شده است که می‌تواند عدم تطابق برخی موارد را توضیح دهد(۱۷و ۲۴).

نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که گیاه مچه دارای فعالیت ضدمیکروبی بر تمامی میگروارگانیسم‌های بیماری‌زای عامل عفونت داشت. اثر ضدمیکروبی عصاره مچه بر باکترهای گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی بیشتر بود. حساس‌ترین و مقاوم‌ترین سویه نسبت به عصاره مچه به ترتیب کاندیدا آلبیکنس و اشرشیا کلی بود. پیشنهاد می‌گردد در ادامه پژوهش‌های بیشتری در شرایط برون‌تنی و مدل حیوانی انجام گیرد تا بتوان از این گیاه برای درمان بیماری‌های عفونی بهره برد.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر مستخرج از طرح پژوهشی مصوب با کد ۲/۴۵۹۰۹ در دانشگاه فردوسی مشهد می‌باشد. نویسندگان مقاله بر خود لازم می دانند که از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد به دلیل مساعدت‌های مالی جهت اجرای این طرح پژوهشی صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

REFERENCES

1- Chyad A. Evaluation of anticancer, analgesic and anti-inflammatory activities of the ethanolic extract of Lepidium draba Linn. leaves. Adv Anim Vet Sci. 2017;5(1):7-13.
2- Al-Marzoqi AH, Al-Khafaji KR, Kadhim A. Influence of the crude Phenolic, Alkaloid and Terpenoid compounds extracts of Cardaria draba (Lepidium draba L.) on Human Pathogenic Bacteria. World Journal of Pharmaceutical Research. 2015;4(6):456-60.
3- Tabatabaei-Yazdi F, Alizadeh-Behbahani B, Zanganeh H. The comparison among antibacterial activity of Mespilus germanica extracts and number of common therapeutic antibiotics “in vitro”. Zahedan Journal of Research in Medical Sciences. 2015;17(12): 1-6.
4- Haghighi M, Mozafariyan M. The introduction of extinct endemic vegetables of Iran. Journal of Medicinal Plants Research. 2011;5(33):7085-107.
5- Tabatabaei Yazdi F, Alizadeh Behbahani B, Mortazavi SA. Investigating the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of the Lavandula stoechas L. and Rosmarinus officinalis L. extracts on pathogen bacterias “in vitro”. Journal of Paramedical Sciences. 2014;5(2): 91-101.
6- Alizadeh Behbahani B, Tabatabaei Yazdi F, Shahidi F, Riazi F. Antifungal Effect of the Aqueous and Ethanolic Avicennia marina Extracts on Alternaria citri and Penicillium digitatum. Zahedan Journal of Research in Medical Sciences. 2016;18(2): 1-6.
7- Sureshjani MH, Yazdi FT, Mortazavi SA, Alizadeh Behbahani B, Shahidi F. Antimicrobial effects of Kelussia odoratissima extracts against food borne and food spoilage bacteria" in vitro. Journal of Paramedical Sciences (JPS). 2014;5(2): 115-120.
8- Moeini F, Mohammadi-Sichoni M, Shahanipoor K. Evaluation of the antibacterial effect of methanol and aqueous extracts of Vaccinium arctostaphylos Fruit against Salmonella spp in vitro. Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences. 2015;14(4):257-68.
9- Alizadeh Behbahani B, Yazdi FT, Shahidi F, Noorbakhsh H, Vasiee A, Alghooneh A. Phytochemical analysis and antibacterial activities extracts of mangrove leaf against the growth of some pathogenic bacteria. Microbial Pathogenesis. 2018; 114:225-32.
10- Tepe B, Daferera D, Sokmen A, Sokmen M, Polissiou M. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of Salvia tomentosa Miller (Lamiaceae). Food Chemistry. 2005;90(3):333-40.
11- Microbiology ECfASTotESoC, Diseases I. Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. Clinical microbiology and infection. 2000;6(9):503-8.
12- Alizadeh Behbahani B, Yazdi FT, Vasiee A, Mortazavi SA. Oliveria decumbens essential oil: Chemical compositions and antimicrobial activity against the growth of some clinical and standard strains causing infection. Microbial Pathogenesis. 2018; 114:449-52.

13- 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. Journal of clinical microbiology. 2002;40(9):3204-8.
14- Tabatabaei Yazdi F, Alizade Behbahani B, Heidari Sureshjani M. The Comparison of Antimicrobial Effects of Chevil (Ferulago Angulata) Extract with a Variety of Common Therapeutic Antibiotics In Vitro. Journal of Arak University of Medical Sciences. 2014; 17 (3) :35-46. (Persian)
15- Awoyinka O, Balogun I, Ogunnowo A. Phytochemical screening and in vitro bioactivity of Cnidoscolus aconitifolius (Euphorbiaceae). Journal of Medicinal Plants Research. 2007;1(3):63-5.
16- Durán L, Capita R, Alonso-Calleja C. Antibiotic susceptibility of methicillin-resistant staphylococci (MRS) of food origin: A comparison of agar disc diffusion method and a commercially available miniaturized test. Food microbiology. 2018; 72:220-4.
17- Alizade Behbahani B, Fooladi AAI. Evaluation of phytochemical analysis and antimicrobial activities Allium essential oil against the growth of some microbial pathogens. Microbial pathogenesis. 2018; 114:299-303.
18- Chouhan S, Sharma K, Guleria S. Antimicrobial activity of some essential oils—present status and future perspectives. Medicines. 2017;4(3): 1-21.
19- Bozin B, Mimica-Dukic N, Samojlik I, Jovin E. Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (Rosmarinus officinalis L. and Salvia officinalis L., Lamiaceae) essential oils. Journal of agricultural and food chemistry. 2007;55(19):7879-85.
20- Radonić A, Blažević I, Mastelić J, Zekić M, Skočibušić M, Maravić A. Phytochemical analysis and antimicrobial activity of Cardaria draba (L.) Desv. volatiles. Chemistry & biodiversity. 2011;8(6):1170-81.
21- Mahasneh AM, El-Oqlah AA. Antimicrobial activity of extracts of herbal plants used in the traditional medicine of Jordan. Journal of Ethnopharmacology. 1999;64(3):271-6.
22- Hussein HM. Determination of phytochemical composition and ten elements content (CD, CA, CR, CO, FE, PB, MG, MN, NI AND ZN) of CARDARIA DRABA by GC-MS, FT-IR and AAS technique. International Journal of Pharma and Bio Sciences. 2016;7(3): (B) 1009 –17.
23- Kossah R, Zhang H, Chen W. Antimicrobial and antioxidant activities of Chinese sumac (Rhus typhina L.) fruit extract. Food Control. 2011;22(1):128-32.
24- Kossah R, Nsabimana C, Zhang H, Chen W. Evaluation of antimicrobial and antioxidant activities of Syrian sumac fruit extract. Journal of Natural Products. 2013; 6:96-102.