اثر عصاره‌های سیر و هل بر روی خواص مورفولوژی و فیزیولوژی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA) و سودوموناس آئروجینوزا

عباس اخوان سپهی[1]، آنیتا خنافری[1]، شیما سجودی[2*]، مرضیه یاریگرروش[3]، امیرحسین جمشیدی[4]، شمسعلی رضازاده[5]

۱- استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی
۲- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه واحد تهران شمال دانشگاه آزاد اسلامی
۳- کارشناس ارشد، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی
٤- استادیار، مرکز تحقیقات آزمایشگاهی غذا و داروی وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی و پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی
۵- استادیار پژوهش، گروه فارماکوگنوزی و داروسازی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی
* آدرس مکاتبه: تهران، میدان قدس، ابتدای خیابان دربند، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال
تلفن و نمابر: ۲۲۷۲٤۹۳۹ (۰۲۱)
پست الکترونیک: sh_sojoudi@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۸٦/۱/۲٤ **تاریخ تصویب:** ۸٦/۱۱/۱٤

چکیده

مقدمه: سیر با نام علمی ***Allium sativum*** متعلق به خانواده **Liliaceae** و هل با نام علمی ***Elettaria Cardamom Maton*** متعلق به خانواده **Zingiberaceae** دارای کاربردهای درمانی در طب سنتی هستند که برخی از آنها با بررسی‌های علمی اثبات شده است. از این دو گیاه اثرات ضدمیکروبی گزارش شده است.

هدف: هدف از این تحقیق، بررسی اثر عصاره آبی سیر و عصاره متانولی هل بر روی سوش‌های مقاوم استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروجینوزا است.

روش بررسی: ابتدا حبه‌های سیر (۱۰۰گرم) پوست گرفته شده و در آب مقطر استریل به نسبت ۱ به ۱ در مخلوط کن هموژن شدند، پس از سانتریفیوژ محلول رویی سیر جمع‌آوری گردید و از میان یک کاغذ صافی و در نهایت از فیلتر میلی پور (۰/٤۵ میکرون) عبور داده شد و برای انجام آزمایش‌ها در یخچال (٤ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شد. برای تهیه عصاره هل، پس از جمع‌آوری دانه‌های هل، خشک کردن و پودر کردن آنها، عصاره‌گیری با استفاده از متانول و با روش پرکولاسیون انجام گرفت. برای بررسی اثرات ضدمیکروبی عصاره‌های سیر و هل، سوسپانسیون میکروبی با کدورتی مطابق با ۰/۵ مک فارلند تهیه و رقت‌های مختلف عصاره‌ها شامل (v/v ۱:٦٤... ۱:۸، ۱:٤، ۱:۲ برای سیر و رقت‌های **µg/ml** ۵۰، ... ، ٤۰۰، ٦۵۰، ۸۰۰ برای هل) تهیه و علیه سویه‌های **MRSA ATCC 33591** و ***P. aeroginosa* ATCC 27853** آزمایش شد. حداقل غلظت متوقف‌کننده رشد[1] از طریق روش‌های دیسک‌گذاری، چاهک و رقت در لوله تعیین شد. هم‌چنین در این بررسی تغییرات مورفولوژی **MRSA** و ***P. aeroginosa*** با استفاده از میکروسکوپ نوری و خصوصیات فیزیولوژی آنها با استفاده از تلقیح غلظت‌های کمتر از بازدارنده سیر و هل به کشت باکتریایی انجام شد.

نتایج: عصاره هل، هیچ اثری بر روی سو دوموناس آئروجینوزا نداشت، اما عصاره سیر بر روی این باکتری موثر بود. عصاره سیر (رقت‌های ۱:۱٦،۱:۸،۱:٤،۱:۲ حاوی **µg/ml** ۲۷/۵، ۱۱۰، ۵۵، ۲۲۰ آلیسین) رشد **MRSA** را مهار می‌کرد و غلظت‌های (v/v) ۱:۸ تا ۱:۲ آن باعث مهار رشد سودوموناس آئروجینوزا می‌شد. هم‌چنین دیده شد که **MRSA** به عصاره هل در رقت‌های **µg/ml** ۲۰۰ تا ۸۰۰ حساس است.

به طور کلی حداقل غلظت مهارکننده سیر برای **MRSA** (**MIC** سیر =۱:۱٦: مقدار آلیسین **µg/ml** ۲۷/۵۰) کمتر از حداقل غلظت مهارکننده سیر برای سودوموناس آئروجینوزا (**MIC** سیر =۱:۸ و مقدار آلیسین **µg/ml** ۵۵) است بررسی اثر عصاره سیر بر روی مورفولوژی باکتری‌ها شامل تغییر اندازه آنها، تخریب شکل جزئی و تورم سلولی است اما عصاره هل هیچ تغییر شکل آشکاری را بر روی سلول در مقایسه با کنترل نشان نمی‌دهد. هم‌چنین در غلظت‌های پایین سیر، تولید آنزیم کاتالاز و پیگمان پیوسیانین توسط سودوموناس آئروجینوزا کاهش یافت اما توانایی همولیز آن افزایش پیداکرد. نتایج نشان داد که تولید اسید از ساکارز و مانیتول توسط **MRSA** بر خلاف شاهد، منفی شد.

نتیجه‌گیری: این بررسی نشان داد که عصاره سیر، اثرات ضدباکتریایی متفاوتی را علیه ۲ باکتری مورد آزمایش اعمال می‌کند.

گل‌واژگان: سیر، هل، فعالیت ضدمیکروبی، حداقل غلظت مهارکننده

[1] MIC

www.SID.ir

مقدمه

استفاده از گیاهان دارویی به شکل طبیعی و تغییر نیافته خود از زمانی آغاز شده است که تاثیر آنها بر فعالیت روده و خلق و خوی انسان مشاهده شده است. در میان گیاهان خوراکی سیر همواره به عنوان یک داروی معجزه آسا با اثرات درمانی گسترده مورد توجه بوده است [۱]. سیر گیاهی تک لپه با نام علمی *Allium sativum* از تیره آلاله است. سیر به خاطر دارا بودن خواص درمانی از قبیل معالجه ناراحتی‌های قلبی، درد مفاصل، سردرد، سل، جذام، صرع، سرفه و سوء هاضمه در طول هزاران سال استفاده دارویی داشته است. اثرات دارویی سیر به دلیل وجود ترکیبات ارگانوسولفوره (مهم‌ترین آنها آلیسین) است. این ترکیب که حدود ۱/۵ درصد وزن گیاه را تشکیل می‌دهد بوی سیر را به وجود می‌آورد. آلیسین در سیر تازه به صورت یک پیش ماده به نام آلئین[1] که بی‌رنگ و بی‌بو است، می‌باشد. زمانی‌که غشای سلولی سیر با خرد شدن یا جویدن تخریب می‌شود پیش ماده آلئین در تماس با آنزیم آلیناز قرار می‌گیرد و طی یک واکنش شیمیایی آلئین برای تشکیل یک مولکول آلیسین و دو مولکول دی سولفید هیدرولیز می‌شود. مقدار آلیسین تولید شده بستگی به مقدار آلئین در سیر و پایداری آنزیم آلیناز دارد [۲].

هل با نام علمی *Elettaria Cardamom Maton*، متعلق به خانواده Zingiberaceae است و به دو نوع سبز و سیاه وجود دارد. این گیاه برای معطر نمودن اغذیه کاربرد وسیعی دارد اسانس موجود در آن دارای اثرات آنتی اسپاسمودیک، ضدنفخ و ضدویروس است. هل در بعضی از کشورها برای درمان بعضی از بیماری‌ها به طور سنتی استفاده می‌شود مثلاً در هندوستان به طور وسیعی برای درمان عفونت‌های لثه‌ای و دندانی و هم‌چنین برای جلوگیری و درمان ناراحتی‌های گلو، احتقان ریه‌ها، التهاب پلک‌ها و بیماری‌های گوارشی استفاده می‌شود بنابر گزارش‌های رسیده هل به عنوان یک پادزهر علیه سموم مارزدگی و عقرب‌زدگی به کار می‌رود [۳].

استافیلوکوک‌ها باکتری‌های کروی شکلی هستند که حدود یک میکرون قطر دارند و به صورت خوشه‌های نامنظمی قرار می‌گیرند. این باکتری بدون حرکت است و اسپور تولید نمی‌کند. کلونی‌های استافیلوکوکوس اورئوس به رنگ زرد طلایی است. بیماری‌زایی استافیلوکوک به علت قدرت تکثیر زیاد و انتشار سریع آن در بافت‌ها و هم به علت ترشح مواد مختلف خارج سلولی است. چنانچه استافیلوکوکوس اورئوس انتشار یابد و باکتریمی رخ دهد اندوکاردیت استئومیلیت حاد، منتژیت و عفونت ریوی بروز می‌نماید. MRSA، استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین است که یکی از معضلات عفونت‌های بیمارستانی است، در این تحقیق بررسی شده است [٤].

سودوموناس آئروجینوزا باسیلی متحرک به اندازه ۰/٦ تا ۲ میکرون است. این باکتری گرم منفی، فاقد اسپور است و توسط تاژه قطبی حرکت می‌کند و به صورت هوازی اجباری است. هم‌چنین پیگمان سبز مایل به آبی غیر فلورسنس به نام پیوسیانین[1] را تولید می‌کند که به درون محیط کشت انتشار می‌یابد. شناسایی این باکتری براساس شکل کلونی، مثبت بودن اکسیداز، وجود پیگمان و رشد در ٤۲ درجه سانتی‌گراد انجام می‌گیرد. سودوموناس آئروجینوزا، پاتوژن عمده بیمارستانی بوده و عفونت‌های ناشی از آن را نباید با یک دارو درمان کرد زیرا باکتری‌ها به سرعت به آن مقاوم می‌شوند [٥].

عوارض نامطلوب برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها و پیدایش مقاومت در باکتری‌ها بر اثر استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های رایج توجه محققان را به استفاده از فراورده‌های طبیعی نظیر گیاهان جلب نموده است [٦].

مواد و روش‌ها

تهیه سویه‌های باکتری: در این بررسی از استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین ATCC 33591 و سودوموناس آئروجینوزا ATCC 27853 که از آزمایشگاه رفرانس تهیه گردید، استفاده شد. باکتری‌ها در BHI براث و مولرهینتون براث[2] کشت داده شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲٤ ساعت نگهداری شدند سپس برای اطمینان از هویت

[1] S – allyl – cystein sulfoxid (SACS)

[1] Pyocyanin

[2] MERCK

Archive of SID

www.SID.ir

باکتری‌ها، رنگ‌آمیزی گرم و یک سری تست‌های تاییدی شامل مقاومت به متی سیلین، بررسی همولیز، تخمیر قندها، رشد در نمک ۱۰ درصد برای استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین و هم‌چنین آزمایش‌های TSI، SIM، سیمون سیترات و اکسیداز برای سودوموناس آئروجینوزا انجام شد.

تهیه عصاره‌های سیر و هل

الف) تهیه عصاره آبی سیر: پس از جداسازی پوست از حبه‌های سیر همدان، آنها به مدت ۲٤ ساعت در فریزر نگهداری شدند و پس از ایجاد شکاف در هر کدام به مدت ۱ ساعت در هوای آزمایشگاه قرار داده شدند. سپس با استفاده از مخلوط‌کن و با مقدار مشخصی از آب مقطر استریل (به ازای هر گرم سیر، یک میلی‌گرم آب مقطر) مخلوطی از سیر حاصل گردید. مخلوط حاصل از تنظیف استریل و صافی واتمن عبور داده شد و ماده حاصله در سانتریفوژ یخچال‌دار و با دور rpm ۵۰۰۰ و به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. بدین‌ترتیب سایر مواد زاید و ناخواسته از جمله مواد سلولزی، پوسته‌های سلولی، از عصاره حذف گردید و محلولی شفاف و زردرنگ حاصل گردید و با استفاده از صافی میلی پور ۰/۲۲ میکرومتر استریل و برای استفاده‌های بعدی در یخچال نگهداری شد.

ب) تهیه عصاره متانولی هل: پس از جمع‌آوری دانه‌های هل و خشک و پودر کردن آنها عصاره‌گیری با روش پرکولاسیون انجام گرفت. بدین‌صورت که ۲۵۰ گرم از پودر هل را در یک پرکولاتور ریخته و مقداری متانول به طوری‌که ٤-۳ سانتی‌متر بالای پودر قرار بگیرد به آن اضافه شد بعد از ۷۲ ساعت شیر پرکولاتور را باز کرده به طوری که عصاره حاصل قطره قطره خارج شده، سپس به روی پودر باقی‌مانده از مرحله اول مجدداً اتانول اضافه کرده و بعد از ٤۸ ساعت عمل عصاره‌گیری تکرار شد این عمل برای بار سوم در مدت ۲٤ ساعت مجدداً انجام شد عصاره‌های حاصل از مرحله اول تا سوم در یک شیشه جمع‌آوری و سپس جهت تهیه عصاره‌های خالص توسط دستگاه تقطیر در خلا تغلیظ شد.

بررسی اثر ضدباکتریایی عصاره‌های سیر و هل

از عصاره سیر به دست آمده رقت‌های ۱:۲، ۱:٤، ۱:۸، ۱:۱٦، ۱:۳۲ و (V/V) ۱:٦٤ و از عصاره هل نیز غلظت‌های ۸۰۰، ٦۵۰، ٤۰۰،... و µg/ml ۵۰ تهیه شد. هم‌چنین جهت انجام روش‌های دیسک‌گذاری[1] [۷]، چاهک[2] و رقت در لوله[3] سوسپانسیون میکروبی مطابق با محلول استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند تهیه شد. در روش دیسک‌گذاری پس از آغشته شدن دیسک‌ها به عصاره‌های سیر و هل و قرار گرفتن آنها در محیط مولر هینتون آگار حاوی باکتری به مدت ۲٤ ساعت انکوبه و قطر هاله عدم رشد با خط‌کش اندازه‌گیری شد. اما در روش چاهک ابتدا چاهک‌هایی با قطری معادل دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی (٦ میلی‌متر) بر روی ژلوز ایجاد و سپس با سمپلر ۵۰ میکرولیتر از هر کدام از غلظت‌ها به داخل چاهک تخلیه و پس از انکوباسیون قطر هاله عدم رشد اندازه‌گیری شد.

هم‌چنین جهت تعیین حداقل غلظت متوقف کننده رشد به روش Micro dilution از محیط مولر هینتون براث و عصاره سیر و هل و سوسپانسیون میکروبی، مطابق با استانداردهای میکروب‌شناسی استفاده شد [۸].

برای اطمینان از نتایج حاصله انتقال[4] لوله‌ها در طول موج ٦۳۰ نانومتر قبل از انکوباسیون با انتقال آنها در همین طول موج ولی بعد از انکوباسیون مقایسه و اعداد قبل و بعد از انکوباسیون با هم مقایسه و MIC تعیین شد.

بررسی اثر غلظت‌های کمتر از بازدارنده بر روی مورفولوژی باکتری‌ها

از باکتری‌های استافیلوکوک و سودوموناس که هم در محیط شاهد و هم در غلظت‌های پایین[5] عصاره‌های سیر و هل موجود بودند گسترشی بر روی لام تهیه کرده و بعد از اینکه باکتری‌ها ثابت شدند، لام‌ها را رنگ‌آمیزی نموده و در زیر میکروسکوپ نیکون[6] با بزرگنمایی ۱۰۰ ملاحظه شد.

بررسی اثر تراکم‌های پایین عصاره‌های سیر و هل بر روی صفات بیوشیمیایی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین و سودوموناس آئروجینوزا

---

[1] Disc diffusion
[2] Well diffusion
[3] Broth dilution
[4] Transmission
[5] Sub –MIC
[6] Nikon

Archive of SID
www.SID.ir

به منظور این بررسی صفات بیوشیمیایی این دو باکتری هم در محیط شاهد یعنی فاقد عصاره و هم تحت تاثیر غلظت‌های پایین سیر و هل بررسی شد. صفات مورد مطالعه شامل بررسی تخمیر قندهای ساکاروز، مانیتول و تره هالوز، توانایی احیای نیترات، رشد در نمک ۱۰ درصد، رشد در محیط مانیتول سالت آگار برای MRSA و بررسی تست کاتالاز، سیمون سیترات، توانایی پیگمان‌زایی و هیدرولیز ژلاتین و توانایی همولیز برای سودوموناس آئروجینوزا بود.

نتایج

بررسی نتایج اثر عصاره سیر و هل بر روی باکتری‌های مورد مطالعه نشان داد که استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین به هر دو عصاره سیر و هل حساس بود اما سودوموناس آئروجینوزا به عصاره هل مقاومت نشان می‌دهد ولی در رقت‌های ۱:۲، ۱:٤ و ۱:۸ سیر که حاوی ۲۲۰، ۱۱۰ و µg/ml ۵۵ آلیسین است، حساسیت نشان می‌دهد (جدول شماره ۱ و ۲)، هم‌چنین MIC عصاره سیر برای سودوموناس آئروجینوزا رقت ۱:۸ که برابر با µg/ml ۵۵ است، به دست آمد. اما در مورد باکتری MRSA رقت‌های ۱:۲، ۱:٤، ۱:۸ و ۱:۱٦ سیر که حاوی ۲۲۰، ۵۵، ۱۱۰ و µg/ml ۲۷/۵ آلیسین است، رشد این باکتری مهار شد و MIC عصاره سیر در مورد آن رقت ۱:۱٦ که معادل µg/ml ۲۷/۵ است، محاسبه شد. هم‌چنین دیده شد که MRSA به عصاره هل در رقت‌های ۸۰۰، ٦۵۰، ٤۰۰ و µg/ml ۲۰۰ حساس است و حداقل غلظت مهارکننده عصاره هل µg/ml ۲۰۰ به دست آمد. به طور کلی حداقل غلظت مهارکننده سیر برای MRSA (MIC سیر = ۱:۱٦: مقدار آلیسین µg/ml ۲۷/۵) کمتر از حداقل غلظت مهار کننده سیر برای سودوموناس آئروجینوزا (MIC سیر = ۱:۸ و مقدار آلیسین µg/ml ۵۵) است. اثرات آنتی‌بیوتیک‌های مختلف نیز بر روی سودوموناس آئروجینوزا بررسی شد که نتایج آنها در جدول شماره ۳ نشان داده شده است.

اثر غلظت‌های کمتر از بازدارنده عصاره‌ها بر روی مورفولوژی MRSA و سودوموناس آئروجینوزا

در بررسی لام‌های تهیه شده از رقت‌های پایین عصاره سیر، دیده شد که برخی از استافیلوکوک‌ها از اندازه‌های طبیعی کوچک‌تر بودند و تجمع آنها به صورت تک‌تک، دوتایی و کم و بیش به صورت خوشه‌ای و تعداد کلونی‌های مشاهده شده بر روی پلیت کمتر از شاهد است، اما عصاره هل هیچ تغییر شکل آشکاری را بر روی سلول‌ها در مقایسه با کنترل نشان نمی‌دهد (شکل شماره ۱ و ۲).

هم‌چنین نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که بعضی از سلول‌های سودوموناس آئروجینوزا در مجاورت غلظت‌های پایین سیر بیشتر به شکل بینابینی و سلول‌های گرد دیده می‌شوند و کمتر اثری از شکل رشته‌ای باکتری دیده می‌شود و در واقع یک نوع تورم سلولی در حضور عصاره سیر مشاهده شد اما عصاره هل اثری روی مورفولوژی سودوموناس آئروجینوزا نشان نداد.

اثر غلظت‌های کمتر از بازدارنده عصاره‌ها بر روی خصوصیات بیوشیمیایی MRSA و سودوموناس آئروجینوزا

نتایج تست‌های بیوشیمیایی سودوموناس آئروجینوزا تحت تاثیر عصاره سیر و هل

نتایج این مرحله نشان داد که در حضور غلظت‌های پایین عصاره سیر (غلظت‌های کمتر از بازدارندگی)، توانایی همولیز این باکتری افزایش می‌یابد اما عصاره هل تغییری در توانایی همولیز آن نشان نمی‌دهد.

هم‌چنین بر روی محیط‌های ژلاتین حاوی غلظت‌های کمتر از بازدارنده عصاره سیر و هل نسبت به نمونه شاهد در زمان‌های ۱۲، ۱۸ و ۲٤ ساعت اختلافی را در توانایی هیدرولیز ژلاتین توسط این باکتری نشان نداد و دیده شد که پس از ۱۸ ساعت ژلاتین هیدرولیز می‌شود.

هم‌چنین نتایج نشان داد که تولید رنگ‌دانه پیوسیانین توسط سودوموناس آئروجینوزا در حضور عصاره سیر کاهش می‌یابد (شکل شماره ۳). فعالیت آنزیم کاتالاز در غلظت‌های پایین توسط سودوموناس آئروجینوزا در حضور عصاره سیر کاهش می‌یابد اما عصاره هل تغییری در فعالیت این آنزیم نشان نمی‌دهد. تغییر خاصی نیز در فعالیت آنزیم سیترات لیاز دیده نشد و رنگ محیط سیمون سیترات همانند شاهد از سبز به آبی تبدیل شد که نشان‌دهنده عدم تغییر در فعالیت آنزیم سیترات لیاز است.

Archive of SID
www.SID.ir

جدول شماره ۱- نتایج تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره سیر بر روی استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین و سودوموناس آئروجینوزا (روش دیسک‌گذاری)

غلظت عصاره سیر (آلیسین برحسب µg/ml)	قطر هاله عدم رشد برحسب mm در اطراف MRSA	قطر هاله عدم رشد برحسب mm در اطراف سودوموناس آئروجینوزا
۲۲۰ (۱:۲)	۲٤	۱٦
۱۱۰ (۱:٤)	۱۹	۱٤
۵۵ (۱:۸)	۱٤	۱۲
۲۷/۵(۱:۱٦)	۱۲	—
۱۳/۵(۱:۳۲)	—	—
۷ (۱:٦٤)	—	—

جدول شماره ۲- نتایج تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره هل بر روی استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین و سودوموناس آئروجینوزا (روش دیسک‌گذاری)

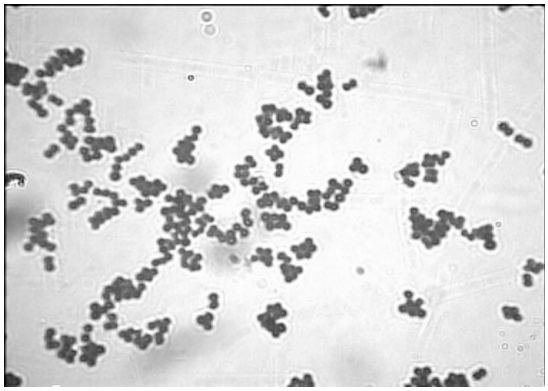
غلظت عصاره هل (برحسب µg/ml)	قطر هاله عدم رشد برحسب mm در اطراف MRSA	قطر هاله عدم رشد برحسب mm در اطراف سودوموناس آئروجینوزا
۸۰۰	۱۳	—
٦۵۰	۱۱	—
٤۰۰	۱۱	—
۲۰۰	۱۰	—
۱۰۰	—	—
۵۰	—	—

جدول شماره ۳ – نتایج تاثیر آنتی‌بیوتیک‌های مختلف بر روی سودوموناس آئروجینوزا

آنتی‌بیوتیک‌ها	قطرهاله عدم رشد بر حسب mm
نورفلوکساسین (NOR)	۲۳
سیپروفلوکساسین (CP)	۲۵
سفتازیدیم (CAZ)	۱٦
آمیکاسین (AN)	۲۳
جنتامیسین (GM)	۲۱
کانامایسین (K)	—
لووفلوکساسین (LOM)	۲۳
پیپراسیلین (PIP)	۲۰
سفوتاکسیم (CTX)	۱۳
افلوکساسین (OFX)	۱۹
سفکسیم (CFM)	—
سفتریاکسون (CRO)	۱۵

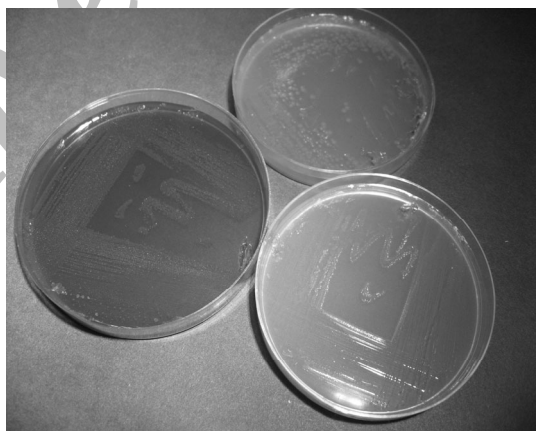
Archive of SID

www.SID.ir



شکل شماره ۱- MRSA قبل از تاثیر غلظت کمتر از بازدارنده عصاره سیر

شکل شماره ۲- MRSA بعد از تاثیرغلظت کمتر از بازدارنده عصاره سیر



شکل شماره ۳- کاهش پیگمان‌زایی سودوموناس آئروجینوزا تحت تاثیرغلظت‌های کمتر ازبازدارنده عصاره سیر و هل

بررسی‌ها نشان داد که در غلظت‌های پایین سیر و هل، تولید اسید از ساکارز و مانیتول توسط MRSA برخلاف شاهد، منفی شد، اما در توانایی رشد باکتری در حضور نمک ۱۰ درصد و هم‌چنین در مانیتول سالت آگار[1] تغییری به وجود نیامد. هم‌چنین باکتری در حضور عصاره سیر و هل مانند شاهد (فاقد

[1] MSA

www.SID.ir

عصاره) قادر به احیای نیترات است (ایجاد رنگ قرمز).

بحث

با توجه به افزایش مقاومت باکتری‌ها به انواعی از آنتی‌بیوتیک‌ها تلاش برای دستیابی به آگاهی‌های بیشتر از موارد استفاده موثر ترکیبات موجود در گیاهان و کاربردشان در درمان بیماری‌های مختلف صورت گرفته است. در این بررسی، اثر عصاره متاتولی هل و عصاره آبی سیر بر روی دو باکتری مقاوم به آنتی‌بیوتیک شامل استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین[1] و سودوموناس آئروجینوزا که جزء پاتوژن‌های عمده بیمارستانی بوده و سیر مقاومت آن به انواعی از آنتی‌بیوتیک‌ها رو به افزایش است، بررسی شده است.

با توجه به MIC های به دست آمده، سیر برروی هر دو باکتری موثر بوده اما عصاره متانولی هل هیچ اثر بارزی را بر روی سودوموناس آئروجینوزا نشان نداده است و تنها بر روی MRSA موثر بوده است. در این بررسی حداقل غلظت متوقف‌کننده رشد عصاره سیر جهت سودوموناس آئروجینوزا رقت ۱:۸ که معادل ۵۵ µg/ml آلسین است، محاسبه شد، در حالی‌که در بررسی که توسط حسامی و همکاران در سال ۷۸ انجام گرفت عصاره کلروفرمی سیر در غلظت ۲۵۰ µg/ml آلیسین از رشد سویه استاندارد سودوموناس آئروجینوزا M ۸۲۲۱ ممانعت به عمل آورد [۹].

تفاوت حاصله در میزان MIC احتمالاً به علت متفاوت بودن نوع عصاره‌ها است، چرا که در بررسی حاضر عصاره آبی سیر و در تحقیق ذکر شده عصاره کلروفرمی سیر مطالعه شده است.

در بررسی دانکرت[2] و همکاران، اثر مهار شده عصاره سیر، پیاز و موسیر به طریقه آگاردیفیوژن تست بر روی تعدادی از باکتری‌ها و مخمرها از جمله سودوموناس آئروجینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس بررسی شد. مطابق این بررسی همه ارگانیسم‌ها به وسیله عصاره سیر مهار شدند ولی غلظت بالایی از عصاره سیر دارای اثر باکتریوسید بر روی سودوموناس آئروجینوزا بود [۱۰] که مطابق با نتیجه به دست آمده در این بررسی است، چرا که در این تحقیق عصاره آبی سیر با غلظتی معادل ۲۷/۵ µg/ml آلیسین باعث مهار رشد استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین شد که کمتر از مقدار آن برای سودوموناس آئروجینوزا بود.

در بررسی که توسط گونزالز[1] و همکاران انجام شد مشخص شد که ترکیبات متفاوت سیر طیف وسیعی از فعالیت ضدباکتریایی را بر علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی شامل انواع Clostridium، Klebsiella، Proteus، E.coli، Salmonella و Staphylococcus اعمال می‌کند حتی باکتری‌های اسید فست نیز مثل Mycobacterium tuberculosis نیز به سیر حساس است. هم‌چنین دیده شد که عصاره‌های سیر می‌توانند مانع تشکیل انتروتوکسین‌های A، B، C_1 و هم‌چنین ترمونوکلئاز استافیلوکوکوس شوند [۱۱].

در بررسی که بر روی خصوصیات شیمیایی سیر انجام شد مشخص شد که عملکرد ضدباکتریایی سیر عمدتاً به علت آلیسین موجود در آن است و حساسیت باکتری‌های مختلف و ایزوله‌های کلینیکی به ترکیبات خالص آلیسین خیلی چشم‌گیر بود [۱۲].

هم‌چنین در یک بررسی مشخص شد که سویه‌های باکتریایی مختلف که به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم هستند و مانند استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین نیز مانند سویه‌های انتروتوکسژینیک Shigella sonnei، Shigella flexneri، Shigella dysenteriae، E.coli که مقاوم به چندین دارو هستند نیز به آلیسین حساس هستند [۱۳].

اما از طرف دیگر سویه‌های موکوییدی سودوموناس آئروجینوزا، استرپتوکوکوس بتا همولیتیکوس و انتروکوکوس فیشیوم تقریباً به عملکرد آلیسین مقاوم هستند. دلیل این مقاومت مشخص نبود اما تصور می‌شد که کپسول هیدروفیلیک یا لایه‌های موکوییدی جلوی نفوذ آلیسین به داخل باکتری را می‌گیرد اما در بررسی ما به علت این‌که سودوموناس آئروجینوزا مورد بررسی یک سوش غیرموکوییدی بود، به آلیسین حساسیت نشان داد. یک نکته خیلی جالب در مورد عملکرد ضدباکتریایی آلیسین، عدم توانایی آشکار بیشتر باکتری‌ها به گسترش مقاومت به آن است زیرا مدل عملکرد آن

[1] MRSA

[2] Dankert

[1] Gonzalez

Archive of SID
www.SID.ir

کاملاً متفاوت از سایر ترکیبات آنتی‌بیوتیکی است. دیده شده که گسترش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام هزار بار آسان‌تر از گسترش مقاومت به آلیسین است [١٤].

در بررسی که توسط حسامی و همکاران در دانشگاه تربیت مدرس در سال ١٣٧٨ بر روی عصاره کلروفرمی سیر انجام شد، مشخص شد که غلظت‌های کمتر از بازدارنده رشد موجب تغییرات مورفولوژیکی، افزایش قدرت همولیز سویه، کاهش تولید کاتالاز توسط سویه، کاهش تولید رنگ‌دانه پیوسیانین در مقایسه با شاهد و عدم تغییر در توانایی هیدرولیز ژلاتین در زمان‌های ١٢، ١٨ و ٢٤ ساعت در مقایسه با شاهد و هم‌چنین عدم تغییر در توانایی رشد سویه در دمای ٤٢ پس از ١٨ ساعت در محیط‌های ١:٢ تا ١:٨ غلظت بازدارنده عصاره سیر در مقایسه با شاهد، می‌شد [٩] که با نتایج بررسی ما بر روی تغییرات خصوصیات بیوشیمیایی سودوموناس آئروجینوزا در مجاورت غلظت‌های پایین سیر کاملاً مشابه بود.

در بررسی دیگر مشخص گردید که عصاره سیر می‌تواند برای کنترل استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین نیز موثر باشد که کاملاً مشابه تحقیق حاضر است آنها نشان دادند که آلیسین در سیر خام وجود ندارد و به سرعت توسط عملکرد آلیناز (alliinlyase ; E.C.4.4.1.4) بر روی S-allyl-L-cysteine-sulphonoide (alliin) هنگامی که سیر له می‌شود، ایجاد می‌گردد [١٥، ٦].

در بررسی که بر روی فعالیت ضدمیکروبی هل انجام شد عصاره دی اتیل اتر دانه هل بر روی *P. aeroginosa*، *S. aureus*، *K. pneumoniae*، *M. smegmatis*، *S. typhimurium*، *E. coli*، *E. faecalis*، *M. luteus* و *C. albicans* با روش دیسک‌گذاری آزمایش شدند و دیده شد که عصاره دانه هل اثرات ضدمیکروبی متفاوتی را بر روی میکروارگانیسم‌های مختلف اعمال می‌نماید. *S. aureus* حساس‌ترین سویه نسبت به میکروارگانیسم‌های دیگر بود ولی از طرف دیگر *P. aeroginosa* مقاوم‌ترین باکتری در برابر عصاره دانه هل بود که در بررسی ما نیز سودوموناس آئروجینوزا به عصاره هل مقاومت نشان داد. نتایج بررسی ذکر شده نشان داد که وسیع‌ترین ناحیه عدم رشد در اطراف S. aureus مشاهده شد [١٦].

در یک بررسی اثر عصاره اتانولی *E. cardamomum* بر روی پاتوژن‌ها به منظور کاربرد ذاتی آنها به عنوان یک ترکیب ضدمیکروبی در غذاها و هم‌چنین اثر آن بر روی مارکرهای متابولیکی، بیومارکرهای استرسی، پارامترهای کلینیکی و صدمات هیستولوژیکی بر روی موش Swiss albinos بررسی و دیده شد که عصاره هل باعث مهار کردن رشد انواعی از سویه‌های پاتوژن مانند استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین می‌شود. کمترین قطر هاله عدم رشد ٢ ± ٧ mm که مربوط به سودوموناس آئروجینوزا ATCC 27853 است، گزارش شد [١٧]، نتیجه‌ای که بر خلاف نتیجه بررسی حاضر است. البته لازم به ذکر است که عصاره اتانولی هل در این مطالعه بررسی شده است که احتمالاً شاید در این نوع عصاره ترکیبات موثره هل بیشتر از عصاره متانولی آن بوده است.

هم‌چنین در این بررسی، تغییرات شکلی آشکاری در مقایسه با کنترل دیده نشد که همانند نتایج بررسی‌ها بر روی تغییرات مورفولوژیکی باکتری‌های ذکر شده تحت تاثیر غلظت‌های Sub-MIC عصاره متانولی هل بوده است.

ساتو[1] و همکارانش نیز ترکیب اسید گالیک را از هلیله سیاه شناسایی کردند و نشان دادند که عصاره اتانولی هلیله سیاه دارای اثرات ضدباکتریایی بوده و برای استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین موثر است [١٨].

ایلگایر[2] و همکارانش فعالیت ضدمیکروبی یک‌سری از روغن‌های گیاهی از جمله روغن هل را بر روی میکروارگانیسم‌های ساپروفیت بررسی کردند آنها نشان دادند که روغن هل تاثیر قابل ملاحظه‌ای در مهار رشد این میکروارگانیسم‌ها ندارد [١٩].

دهقان و همکارانش نشان دادند که هر سه عصاره آبی، الکلی و اتری هل در مقایسه با عصاره‌های زنجبیل و زردچوبه تاثیر قابل ملاحظه‌ای بر روی مهار رشد هلیکوباکترپیلوری ندارد [٢٠].

نتایج فوق نشان می‌دهد که عصاره سیر می‌تواند به عنوان یک ماده ضدمیکروبی موثر به تنهایی یا همراه با AB های دیگر در درمان عفونت‌های میکروبی از جمله عفونت‌های

[1] Sato

[2] Elgayar

Archive of SID

www.SID.ir

حاصل از سودوموناس آئروجینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین استفاده شود. هم‌چنین عصاره سیر می‌تواند در غلظت‌های کمتر از بازدارندگی بر روی رشد، جایگزینی و در نتیجه بیماری‌زایی سودوموناس آئروجینوزا موثر باشد. اثرات ضدمیکروبی هل نیز قابل توجه و بررسی بیشتر است و به طور کلی می‌توان گفت به دلیل خواص پرارزش موجود در گیاهان دارویی می‌توان امیدوار بود که ترکیبات موجود در این گیاهان به کمک روش‌های علمی نوین بررسی و شناخته شود تا داروهای گیاهی به شکل کاربردی استفاده شوند.

تشکر و قدردانی

این بررسی در دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال انجام گرفته و بدین‌وسیله از تمامی کسانی که در انجام این طرح یاری کردند کمال تشکر را داریم.

منابع

1. Hung KC. "The pharmachologa of Chinese herbs" 2 nd edition, chapter 36, florida, CRC press, 1999, pp: 394 – 6.

2. Rabinkov A, Miron T, Konstantinovskil, Wilchek M, Mirelman D, Weiner L. The mode of action of allicin: trapping of radicals and interaction with thiol containing protein, Biochim. Biophys. Acta 1379 (1998) 233 - 44.

3. Alzoreky NS, Nakahara K. Antimicrobial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. *International journal of food Microbiology*, 2003; 80, 223 - 30.

4. Malekzadeh F. Microbiology. Tehran University Press. 2002, pp: 51-70.

5. Nowroozi J. Pathogenic Bacteria. Iran University of Medical Sciences, Noore danesh publication. 2001, pp: 189-193.

6. Cutler RR, Wilson P. Antibacterial activity of a new, stable, aqueous extract of allicin against methicillin – resistant Staphylococcus aureus. *Br. Biomed. Sci.* 2004; 61: 1 - 4.

7. NCCLS M2-A9, performance standards for Antimicrobial Disc susceptibility tests; Approved standard. 9th ed. 2006, pp: 10 - 21.

8. NCCLS M7-A7, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility tests for bacteria that Grow Aerobically; Approved standards. 7th ed. 2006; 26 (2): pp: 22 - 49.

9. Hesami Sh. Effect of garlic extract (Allicin) on morphological and biochemical properties *Pseudomonas aeruginosa*. M.Sc. Bacteriology Thesis. Tarbiat Modarres University. 1999, pp: 100 – 10.

10. Donkert J, Tromp TF, De vries H, klasen HJ. Antimicrobial activity of crude juices of Allium ascalonicum, *Allium Cepa* and *Allium Sativum*. Medizinische Microbiologie and Parasitologie 1979; 245 (1-2): 229 - 39.

11. Gonzalez- fandos E, Garsia – Lopez ML, Sierra ML, Otero A, Staphylococcal growth and enterotoxins (A-D) and thermonuclease synthesis in the presence of dehydrated garlic, *J. Appl. Bacterial*. 1994; 77: 549 - 52.

12. Block E, The chemistry of garlic and onion, *Sci. Am*. 1985; 252: 94 - 9.

13. Chowdhury AK, Ahsan M, Islam SN, Ahmed ZU, Efficacy of aqueous extract of garlic and allicin in experimental shigellosis in rabbits, *Ind. J. Med. Res*. 1991; 93: 33 - 6.

14. Serge A, David M, Antimicrobial properties of allicin from garlic, Weizmann Institute of Science, 1991; 125 - 9.

15. Ellmore GS, Feldberg RS. Alliin lyase localisation in bundle sheaths of garlic cloves (*Allium sativum* L.). *Am J. Bot.* 1994; 81: 89-94.

16. Nursel D, Suleyman A. Antimicrobial Effect of seed Extract of cardamom. YYÜvet Fak Derg 2005: 16: 99 - 101.

17. Jazila ELM, Driss M, Hamid A, Antimicrobial activity of Elettaria cardamomum: Toxicity,

Archive of SID
www.SID.ir

biochemical and histological studies, *Food Chemistry* 2007; 104: 1560 - 8.

18. Sato Y, Oketani H, Singyouchi K, Ohtesuro T, Kihara M, Shibata H, Higuti I. Extraction and purification of effective antimicrobial constituents of terminalia chebula Retz against methicillin – resistance staphylococcus aureus. *Biol. Pharm. Bull.* 1997; 20: 401 - 4.

19. Elgayar M, Draughon FA, Golden DA, Mount JR. Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. *J. Food Prot.* 2001; 64: 1019 - 24.

20. Dehghan M, Noorizadeh E, Latifi M. Antibacterial effects of turmeric, ginger, clove and cardamom extracts on Helicobacter Pylori. *Ardebil University Journal*. 2002; Vol. 1, No.4, 19 - 26.

Archive of SID

www.SID.ir