

## 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 *Staphylococcus aureus* PTCC 1337، *Escherichia coli* PTCC 1330، *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. داده‌های بدست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS 17 و توسط آزمون‌های 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 و ۳۲ mg/ml و MBC عصاره آبی و اتانولی نیز در خصوص *Pseudomonas aeruginosa* به ترتیب ۲۵۶ و ۱۲۸ mg/ml بود. *Pseudomonas aeruginosa* بیشترین مقاومت را در برابر عصاره‌های آبی و الکی کلپوره نشان داد.

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

**کلید واژه‌ها:** حداقل غلظت کشندگی / حداقل غلظت مهارکنندگی / گیاه کلپوره / میکروارگانیسم‌ها

### مقدمه:

باکتری‌ها گردیده است لذا یافتن ترکیبات ضد میکروبی جدید با کم‌ترین اثرات جانبی امری ضروری به نظر می‌رسد (۱). ایران به علت تنوع آب و هوایی و وسعت زیاد دارای طیف وسیعی از گیاهان دارویی می‌باشد که اساس و پایه طب سنتی کشور را تشکیل می‌دهد (۲).

یکی از مهم‌ترین چالش‌های درمانی، مقابله با عوامل بیماری‌های عفونی و مسمومیت‌زا به دلیل شیوع و گسترش بالای آن می‌باشد. استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها منجر به افزایش مقاومت دارویی در اکثر

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

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

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

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

### 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: *Staphylococcus Escherichia coli* PTCC 1330، *Staphylococcus epidermidis aureus* PTCC 1337، *Streptococcus pyogenes* PTCC 1435 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 تفاله ها فشرده گردید تا کاملاً 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 عصاره ها کاملاً خشک شدند عصاره ها توسط کاردک آزمایشگاهی کاملاً 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

کلپوره یا مریم نخودی و یا چیز 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، فلاونوئید، گلیکوزید- آلفا، استرول، لوکوآنتوسیانین، بتاکاریوفیلین، همولن، کاریوفیلین، همولن، کاریوفیلین اکساید، دی ترپنوئید، آسپاراژین، دیتترین و مواد صمغی اشاره نمود (۹-۵). لینالول نوعی ترکیب مونوتروپنی 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، فلاونوئید و لوکوآنتوسیانین است و می توان از عصاره آن در درمان بیماری های گوارشی بهره برد (۱۱).

باکتری ها عمومی ترین عامل در ارتباط با مسمومیت ها و عفونت ها هستند. اکثر عفونت ها و مسمومیت های غذایی توسط *Streptococcus pyogenes*، *Pseudomonas aeruginosa* و *Staphylococcus aureus*، *Staphylococcus epidermidis* و *Escherichia coli* اتفاق می افتد و بهمین منظور این مطالعه با هدف تعیین اثر ضد میکروبی عصاره های آبی و اتانولی گیاه کلپوره علیه این میکروارگانیسم ها انجام گرفت.

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 ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد 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 گرفت (۱۵).

حداقل غلظت مهارکننده رشد (Minimum Inhibitory Concentration ; MIC) عصاره آبی و اتانولی گیاه کلپوره با استفاده از روش رقت لوله ای، تعیین گردید. برای تعیین MIC برای هر عصاره از یک سری ۷ تایی لوله آزمایش استریل استفاده شد، ۶ لوله برای آزمایش رقت های مختلف هر عصاره و یک لوله نیز به عنوان کنترل بکار رفت. پس از کشت تمام لوله های آزمایش به مدت ۴۸ در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری گردیدند. پس از طی زمان گرمخانه گذاری لوله ها از نظر کدورت ناشی از رشد میکروارگانیسم های تلقیح شده مورد بررسی قرار گرفتند، این روش برای هر دو عصاره آبی و اتانولی و هر میکروارگانیسم ۳ بار تکرار شد (۱۶).

حداقل غلظت کشندگی (Minimum Bactericidal Concentration ; MBC) با استفاده از روش رقت لوله ای برای عصاره آبی و اتانولی گیاه تعیین گردید. برای تعیین MBC برای هر عصاره از یک سری ۹ تایی لوله آزمایش استریل استفاده شد، ۸ لوله برای آزمایش رقت های مختلف از هر عصاره و یک لوله نیز به عنوان کنترل بکار 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 لوله ها از نظر کدورت ناشی از رشد میکروارگانیسم های تلقیح شده مورد بررسی قرار گرفتند، از تمام لوله های که هیچ رشدی در آنها مشاهده نشده بود نمونه برداری و جهت تعیین MBC کشت داده شدند. لوله ای که حاوی کمترین غلظت عصاره بود و در پلیت مربوط به آن هیچ رشدی مشاهده نشده بود به عنوان MBC در نظر گرفته شد. این روش برای هر دو عصاره آبی و اتانولی و هر میکروارگانیسم ۳ بار تکرار گردید (۱۷).

آنالیز آماری: برای تجزیه و تحلیل داده ها از نرم افزار آماری SPSS تحت نسخه ۱۷ استفاده شد، از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) جهت مقایسه میانگین ها و از آزمون دانکن (Duncan) جهت بررسی اختلاف بین میانگین ها در سطح  $P < 0.05$  استفاده گردید.

میلی لیتر از عصاره های آبی و اتانولی در آن ریخته شد، سپس محتوی لوله در دمای اتاق خشک گردید. بعد از خشک شدن عصاره، وزن لوله آزمایش مجدداً تعیین شد. اختلاف وزن لوله معادل با وزن یک میلی لیتر از عصاره های آبی یا اتانولی بود. میانگین سه بار تکرار، به عنوان وزن خشک عصاره محاسبه گردید (۱۲).

برای تهیه سوسپانسیون میکروبی نیاز به کشت تازه از هر میکروارگانیسم بود. بنابراین بیست و چهار ساعت قبل 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 میکروبی تهیه گردید. مقداری از این سوسپانسیون میکروبی در لوله آزمایش حاوی محلول رینگر استریل ریخته شد و کدورت آن توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۰ نانومتر اندازه گیری شد و تا هنگام برابر شدن کدورت محلول با کدورت نیم محلول استاندارد مک فارلند، توسط محلول رینگر رقیق شد. سوسپانسیون تولیدی می بایست حاوی  $10^8 \times 1/5$  CFU/ml باکتری باشد (۱۳).

فعالیت ضد میکروبی عصاره آبی و اتانولی گیاه کلپوره با استفاده از دو روش پخش عصاره در سطح محیط کشت (تمام ظرف) و روش انتشار در آگار به کمک دیسک بررسی شد. در روش تمام ظرف ۰/۲ گرم از عصاره آبی و اتانولی به پنج میلی لیتر آب مقطر استریل اضافه گردید و برای یک نواخت شدن به کمک دستگاه ورتکس هم زده شد. سپس یک میلی لیتر از این محلول به ظرف های پتری استریل اضافه و غلظت نهایی عصاره در این حالت به  $2 \text{ mg/ml}$  رسید (۱۴). در مرحله بعد محیط کشت استریل مولر هینتون آگار (مرک آلمان) به ظرف های پتری اضافه شده و در دمای اتاق قرار گرفت تا اینکه محیط کشت ها ببندند. یک لوپ از کشت استاندارد هر سوش کشت داده شد و به مدت چهل و هشت ساعت در گرمخانه با دمای سی و هفت درجه سانتی گراد قرار گرفت. از محیط دارای عصاره و بدون باکتری نیز به عنوان کنترل استفاده گردید (۱۴). در روش انتشار در آگار به کمک دیسک، ابتدا یک لوپ از کشت استاندارد هر سوش بر روی این محیط ها کشت داده شد سپس دیسک های کاغذی (جنس صافی واتمن و به قطر ۶ میلی متر) با غلظت های  $5, 10, 15, 20, 25, 30, 35$  و  $40 \text{ mg/ml}$  عصاره ها در آب مقطر استریل تهیه و با عصاره کلپوره

**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 aureus و Staphylococcus epidermidis ، کاملا موثر بوده و از رشد آن ها بر روی محیط کشت جلوگیری به عمل آورده است اما عصاره آبی تنها بر Staphylococcus epidermidis، Streptococcus pyogenes

بازدارندگی داشته و هیچ اثر بازدارندگی بر Staphylococcus aureus نشان نداد. عصاره اتانولی و آبی در غلظت 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، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۳۵ و ۴۰) بر Streptococcus pyogenes اثر بازدارندگی داشت همچنین در غلظت های (۱۰، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۴۰) بر Staphylococcus aureus و Staphylococcus 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، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵) هیچ گونه اثر ضد باکتریایی بر Escherichia coli و Pseudomonas aeruginosa نشان نداد و فقط در غلظت‌های (۳۰، ۳۵ و ۴۰) از رشد آن جلوگیری نمود.

جدول ۲: میانگین قطر هاله عدم رشد میکروارگانیسم های مورد مطالعه در حضور عصاره های اتانولی و آبی گیاه کلپوره (روش انتشار در آگار)

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

\* 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 دارد سطح  $P < 0.05$  است.

نتایج نشان می دهد MBC عصاره اتانولی گیاه کلپوره برای *Streptococcus pyogenes*، *Staphylococcus aureus*، *epidermidis* و *Pseudomonas aeruginosa* و *coli* به ترتیب ۳۲، ۶۴، ۶۴، ۱۲۸ و ۱۲۸ بود. در حالی که MBC عصاره آبی برای *Streptococcus pyogenes*، *Staphylococcus aureus*، *epidermidis* و *Pseudomonas aeruginosa* به ترتیب ۶۴، ۱۲۸، ۱۲۸، ۲۵۶ و ۲۵۶ بدست آمد (جدول ۴).

نتایج نشان می دهد MIC عصاره اتانولی گیاه کلپوره برای *Streptococcus pyogenes*، *Staphylococcus aureus*، *epidermidis* و *Pseudomonas aeruginosa* به ترتیب ۸، ۱۶، ۱۶، ۳۲ و ۳۲ بود. در حالی که MIC عصاره آبی برای *Streptococcus pyogenes*، *Staphylococcus aureus*، *epidermidis* و *Pseudomonas aeruginosa* و *coli* به ترتیب ۱۶، ۳۲، ۳۲، ۶۴ و ۶۴ بدست آمد (جدول ۳).

جدول ۳: نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) عصاره های اتانولی و آبی عصاره گیاه کلپوره بر میکروارگانیسم های مورد مطالعه

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

+: عدم رشد - : رشد

جدول ۴: نتایج حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره های اتانولی و آبی عصاره گیاه کلپوره بر میکروارگانیسم های مورد مطالعه

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

+: 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 میکروارگانیسم های 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 *Staphylococcus aureus*، *Streptococcus pyogenes* و *epidermidis* 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 باکتری های 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 تقریباً 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 میکروارگانیسم های 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  $\alpha$ -pinene و  $\beta$ -pinene و  $\beta$ -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* و *Pseudomonas 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 مالاسیا 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، فلاونوئید 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

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, Vassiee 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.

این عصاره مشخص شود. انتظار می رود در آینده تحقیقات بیشتری در زمینه اثر ضد میکروبی و شناسایی ترکیبات عصاره گیاه انجام گیرد تا با یافتن مواد موثره ضد میکروبی گیاه کلپوره و فرمولاسیون آن تهیه اشکال دارویی مختلف ممکن شده و اقدام ارزنده ای جهت بهبود بیماریهای عفونی و مسمومیت زاناشی از سوش های مختلف میکروبی، انجام گیرد.

### سپاسگزاری:

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

### 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-Poortafiti 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, Akbarzadeh 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

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 Aque-

ous 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).

Archive of SID



*Original Article*

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

F. Tabatabaei Yazdi, Ph.D. <sup>\*</sup> ; B. Alizadeh Behbahani, Ph.D. <sup>\*\*</sup>  
M. Heidari Sureshjani, M.Sc. <sup>\*\*\*</sup> ; S.A. Mortazavi, Ph.D. <sup>\*\*\*\*</sup>

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 aeruginosa* 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.