

بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره الکلی گیاه *Teucrium polium L*. روی باکتری‌های گرم مثبت و منفی

مریم تیموری¹

تاریخ پذیرش: 90/11/25

تاریخ دریافت: 90/7/14

چکیده

با افزایش روز افزون مصرف گیاهان داروئی در درمان طبی، این شاخه از طب مکمل، جایگاه ویژه‌ای در درمان بیماری‌ها پیدا کرده است. هدف از این مطالعه بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره الکلی گیاه *Teucrium polium* روی چهار سویه مرجع از (PTCC 1454) استافیلوکوکوس اورئوس²، (PTCC 1447) باسیلوس سوبتیلیس³، (PTCC 1335) اشرشیاکولی⁴ و کلبسیلا پونومونیا⁵ می‌باشد. اندام‌های هوایی گیاهان فوق در زمان گلدهی از شهرستان ساوه واقع در استان تهران جمع‌آوری و عصاره‌گیری به روش سوکسله و حلال‌های متانول 80 درصد و آب انجام شد. بررسی اثرات ضد میکروبی به روش انتشار دیسک انجام شد. غلظت‌های معینی از عصاره این گیاه‌دارای اثرات ضد میکروبی مؤثری روی باکتری‌ها بودند و تأثیر و عصاره‌ها با کم شدن غلظت آنها کم می‌شود عصاره گیاه *Teucrium polium* بر باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سوبتیلیس اثر داشت. هم‌چنین این عصاره تنها در غلظت 100 میلی گرم بر میلی لیتر بر کلبسیلا پونومونیا مؤثر بود و بر روی باکتری اشرشیاکولی اثری نداشت. علی‌رغم تأثیر برخی از غلظت‌های عصاره‌های گیاهی بر باکتری‌ها، برای معرفی آنها به عنوان جایگزین داروهای ضد میکروبی، به بررسی‌های وسیع‌تری نیاز است. کلمات کلیدی: اثرات ضد میکروبی، کلبوره، استافیلوکوکوس اورئوس، عصاره.

E - mail: nazaninteimori@yahoo.

1. عضو هیات علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رودهن
com

2. Staphylococcus Aureus

3. Bacillus Subtilis

4. Escherichia Coli

5. Klebsiella Pneumoniae

مقدمه

اسانس‌ها و عصاره‌ها می‌توانند به عنوان منبع غنی جهت تهیه گیاهان دارویی و به عنوان نگه‌دارنده و آنتی‌اکسیدان در فرآورده‌های غذایی، دارویی و محصولات آرایشی و بهداشتی مطرح باشند و به نظر می‌رسد که در آینده به دلیل ایمنی بالاتر، به طور کلی ترکیبات طبیعی مانند این نوع ترکیبات جایگزین سایر عوامل شیمیایی شوند (1، 2). جنس *Teucrium* از خانواده نعنائیان با بیش از 340 گونه در سراسر جهان انتشار وسیعی دارد. نام فارسی آن در ایران مریم نخودی و شامل 12 گونه علفی، بوته‌ای می‌باشد که سه گونه انحصاری ایران است (3). کلپوره گیاهی پایا، علفی و پر شاخه به ارتفاع 10-35 cm و دارای ظاهری سفید پنبه‌ای که به طور معمول در نواحی بایر، سواحل سنگلاخی و ماسه زارهای نواحی مختلف اروپا، منطقه مدیترانه، شمال آفریقا و جنوب غربی آسیا از جمله ایران می‌روید. در نواحی کوهستانی البرز تا ارتفاعات 1500 متری نیز دیده می‌شود. برگ‌های آن باریک، دراز پوشیده از کرک‌های پنبه‌ای در هر سطح پهنک است گل‌هایی متفاوت به رنگ‌های سفید، سفید مایل به زرد و یا زرد و حتی ارغوانی دارد که این حالت متغییر بوده نه تنها در رنگ گل بلکه در وضع ساقه گیاه که به صورت پر پشت و پر شاخه و یا به حالت خوابیده در می‌آید نیز دیده می‌شود. زمان گل دادن به تناسب شرایط محیط زندگی بین خرداد و مرداد است. زنبور عسل به علت وجود نوش در گل‌های آن، به سمت گیاه جذب می‌شود. قسمت مورد استفاده گیاه سر شاخه‌های گلدار آن است (6 و 4) اثر مقوی و ضد تشنج داشته و مصرف آن را برای رفع بیماری‌های دستگاه تناسلی - ادراری و تأخیر یا عدم قاعدگی مفید می‌دانند (6). بیش از 2000 سال است که گونه‌های مختلف *Teucrium* به عنوان گیاه دارویی شناخته شده و اثرات ضد تشنج، ضد التهاب، ضد درد، تب بر، التیام دهنده‌گی زخم در آن‌ها شناسایی شده است. در طب سنتی کشورمان گونه‌هایی نظیر *T. polium* عنوان ضد عفونی کننده، درمان دیابت، ضد اسپاسم، تب بر و ضد

التهابی استفاده می‌شود. در بررسی‌های انجام شده بر روی گیاه کلپوره مشخص شده که این گیاه حاوی مقادیری تانن، تربنویدها، ساپونین، استرول، فلاونوئید، گلیکوزید، آلفا و بتا پینن و لوکوآنتوسیانین است (7، 5). و همچنین دارای اثرات آنتی‌باکتریال بوده و در برخی از نقاط ایران به صورت سنتی برای رفع درد قلب مصرف می‌شود. اثرات پایین آورنده کلسترول و تری گلیسرید سرم (8) و کاهش فشار خون نیز برای این گیاه گزارش شده است (8). مصرف دارویی گیاه کلپوره از زمان‌های بسیار قدیم شناخته شده است. در سال‌های اخیر نیز اثرات ضد دیابت، ضد چربی زیاد خون، ضد میکروبی قوی و ضد التهاب آن گزارش شده است (8). و در سال‌های اخیر علاقه زیادی جهت بکارگیری عصاره و اسانس این گیاه برای بهبود ماندگاری مواد غذایی، تأخیر رشد قارچها و باکتری‌ها و جلوگیری از تولید سموم قارچی به وجود آمده است (14 و 13 و 12 و 11 و 10 و 9) به طوری که بعضی از گونه‌های این جنس بطور وسیعی در تهیه داروهای محلی در جهان به جهت دارا بودن خواص ضد اسپاسمی، ضد التهابی، مقوی و ضد میکروبی استفاده می‌شوند (15 و 12). و مطالعات زیادی روی خاصیت ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی این جنس گزارش شده است (22 و 21 و 20 و 19 و 18 و 17 و 16 و 15). با توجه به دارا بودن خاصیت ضد میکروبی گیاه کلپوره در این مطالعه اثرات عصاره متانولی گیاه *Teucrium polium* L روی برخی از باکتری‌های گرم مثبت و منفی بررسی شد. جمع‌آوری گیاه و عصاره‌گیری: جمع‌آوری گیاه در تیر ماه 1389 از شهرستان ساوه واقع در استان تهران صورت گرفت و به وسیله گیاه شناس دانشگاه شهید باهنر کرمان شناسایی و نگهداری شد. عصاره‌گیری از گیاه با استفاده از روش سوکسله و حلال‌های متانول 80 درصد و آب انجام شد. به طوری که 20g از اندام‌های هوایی گیاه را به وسیله آسیاب پودر کرده و به آن 400 میلی لیتر حلال‌های متانول 80 درصد در داخل یک ارلن اضافه کرده و در پایان حلال توسط دستگاه *Rotavapor* از عصاره جدا شد عمل عصاره‌گیری 48h به طول انجامید.

مواد و روش کار

به منظور بررسی اثرات ضد میکروبی، 4 غلظت 100mg/ml، 75، 50، 25 از عصاره گیاه *Teucrium polium* تهیه شد. بدین منظور مقدار مناسبی از عصاره خشک گیاه را پس از تورین دقیق با ترازوی دیجیتال در حلال دی متیل سولفو کسامید¹ (DMSO) حل کرده و سپس از آن جهت بررسی اثرات ضد میکروبی گیاه استفاده شد (17). میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه شامل: (PTCC1454) استافیلوکوکوس اورئوس، (PTCC1447) باسیلوس سوبتیلیس (PTCC 1335) اشرشیاکولی و کلبسیلا پونومونیا استفاده شد.

میکروارگانیسم‌های مورد نظر از آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده داروسازی دانشگاه تهران تهیه شدند. جهت بررسی اثرات ضد میکروبی از روش دیسک دیفیوژن Kirby-Bauer antibiotic testing (KB testing or disk diffusion antibiotic sensitivity testing) استفاده شد (18، 9). باکتری‌های مورد آزمایش را در محیط کشت جامد تریپتیکس سوی آگار به مدت 24 h کشت داده، سپس به وسیله لوپ از کلنی هر کدام از باکتری‌ها برداشته و در یک لوله آزمایش استریل حاوی 5 ml سرم فیزیولوژی استریل کاملاً مخلوط کرده به طوری که سوسپانسیون کاملاً یکنواختی از باکتری مورد آزمایش به دست آید. این لوله به مدت 30 min در دمای 37°C درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شد تا کدورتی مشابه لوله استاندارد 0/5 مک فارلند ایجاد نماید. توسط سوآپ استریل از لوله حاوی سوسپانسیون باکتری مقداری برداشته و روی پلیت حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده و دیسک‌های حاوی غلظت‌های متفاوت عصاره را با فواصل مناسب روی پلیت‌ها قرار داده شد. سپس پلیت‌های دیسک گذاری شده به مدت 24 h در دمای 37°C درجه سانتی‌گراد در گرمخانه قرار داده شدند تا میکروارگانیسم‌ها رشد کنند. و در نهایت قطر هاله‌های عدم رشد ایجاد شده در اطراف دیسک‌ها با خط کش اندازه گیری شد. در این آزمایش از دیسک آنتی‌بیوتیک جنتامایسین و کلرامفنیکل به عنوان شاهد مثبت و دیسک حاوی دی متیل سولفو کسامید¹ (DMSO)

به عنوان شاهد منفی استفاده شد.

نتایج

در این مطالعه تأثیر عصاره گیاه *Teucrium polium* با غلظت‌های 100(mg/ml)، 75، 50، 25 به روش انتشار دیسک بر روی سوی‌های (PTCC 1454) استافیلوکوکوس اورئوس، (PTCC 1447) باسیلوس سوبتیلیس، (PTCC 1335) اشرشیاکولی و کلبسیلا پونومونیا بررسی شد. نتایج نشان داد که گیاه فوق‌دارای اثرات ضد میکروبی می‌باشد به طوری که همراه با افزایش غلظت عصاره قطر هاله عدم رشد اطراف میکروارگانیسم‌ها نیز افزایش می‌یابد. میانگین قطر هاله‌های عدم رشد سویه‌های مورد مطالعه در برابر غلظت‌های مختلف عصاره متانولی گیاه *Teucrium polium* و قطر هاله عدم رشد سویه‌های فوق در برابر آنتی‌بیوتیک‌های به کار گرفته شده در این مطالعه جهت مقایسه در جدول 1 آورده شده است. در بین باکتری‌های مورد آزمایش عصاره گیاه *Teucrium polium* بر باکتری‌های، باسیلوس سوبتیلیس اثر داشت. هم چنین این عصاره تنها در غلظت 100mg/ml بر کلبسیلا پونومونیا مؤثر بود و بر روی باکتری اشرشیاکولی اثری نداشت (جدول 1).

جدول شماره 1- میانگین قطر هاله عدم رشد سوبه‌های باکتریایی مورد مطالعه در برابر عصاره متانولی گیاه *Teucrium polium* بر حسب میلی متر

کرامنیکل	جنتامایسین	DMSO (شاهد -)	غلظت عصاره (mg/ml)				باکتری
			25	50	75	100	
27	28	-	10	18	22	24	استافیلوکوکوس اورئوس
28	29	-	8	10	16	18	باسیلوس سوبتیلیس
22	20	-	-	-	-	11	کلبسیلا پنومونیا
23	24	-	-	-	-	-	اشریشیا کلی

- بی اثر

: DMSO دی متیل سولفو کسامید

بحث و نتیجه‌گیری

در سال‌های اخیر پژوهش‌های زیادی در زمینه اثرات ضد باکتریایی گیاهان مختلف انجام گرفته است و مشخص شده که برخی از گیاهان دارای اثراتی مشابه داروهای شیمیایی یا حتی بیشتر از آن‌ها می‌باشند (13). نتایج حاصل از بررسی عصاره الکلی این گیاه حاکی از این است که عصاره الکلی گیاه مذکور روی اشریشیاکولی اثر قابل ملاحظه‌ای ندارد. در حالی که اثر این عصاره بر روی باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سوبتیلیس قابل ملاحظه می‌باشد و با افزایش غلظت عصاره اثر ضد باکتریایی آن افزایش می‌یابد. هم چنین این عصاره تنها در غلظت 100 mg/ml بر کلبسیلا پنومونیا مؤثر بود. Hayouni و همکارانش در سال 2007 بیان کردند که باکتری‌های گرم مثبت مثل استافیلوکوکوس اورئوس با سهولت بیشتری نسبت به باکتری‌های گرم منفی مثل *E. coli* مهار می‌شوند. این امر ممکن است به لیپو پلی ساکاریدها در غشای بیرونی باکتری‌های گرم منفی نسبت داده شود. که آنها را به عوامل خارجی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها و شوینده‌ها مقاوم می‌سازد (11). همچنین Basri و همکارانش در سال 2005 بیان نمودند که عصاره‌های گیاهی معمولاً بیشتر در برابر باکتری‌های گرم مثبت فعال هستند تا باکتری‌های گرم

منفی (12). محققان دیگری روی اثر ضد باکتریایی گیاه *Teucrium polium* مطالعاتی انجام داده و آزمایش‌هایی به منظور بررسی اثر ضد میکروبی اسانس و عصاره گیاه فوق روی چند میکروارگانیسم انجام شد و به ماهیت ضد میکروبی گیاه پی بردند. Samec و همکاران در سال 2010 نشان دادند که اسانس گیاه *Teucrium arduini* روی باکتری‌های گرم مثبت مثل استافیلوکوکوس اورئوس بیشترین تأثیر مهار کنندگی داشته در صورتی که دارای هیچ گونه اثر بازدارندگی روی باکتری‌های گرم منفی نظیر *E. coli* نمی‌باشد (5). این نتیجه با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت دارد، به طوری که عصاره گیاه *Teucrium polium* از میان باکتری‌های مورد آزمایش در این مطالعه روی باکتری‌های گرم مثبت نظیر استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سوبتیلیس اثر قابل ملاحظه‌ای داشته و روی اشریشیاکلی (گرم منفی) اثری نداشت. از آنجایی که مطالعات اخیر نشان داده اثر ضد باکتریایی بعضی از داروهای گیاهی در حد و یا بیشتر از داروهای شیمیایی می‌باشد (18)، امید است در آینده تحقیقات بیشتری در زمینه اثر ضد میکروبی این گیاه بر گونه‌های مختلف میکروبی انجام گیرد تا با یافتن مواد مؤثره *Teucrium polium* و فرمولاسیون آن تهیه

و عوارض جانبی داروهای شیمیایی پیشنهاد می‌شود که از داروهای گیاهی به عنوان یک جایگزین مناسب برای داروهای شیمیایی استفاده کرد.

اشکال دارویی مختلف از آن امکان پذیر و اقدامات ارزنده‌ای در جهت بهبود بیماری‌های عفونی ناشی از گونه‌های متفاوت میکروبی انجام گیرد. در مطالعه‌ای توسط Darabpour و همکاران در سال 2005 اثر ضد باکتریایی عصاره‌های آلی (اتانولی و متانولی) گیاه *Teucrium polium* روی تعدادی از عوامل بیماری‌زا بررسی و مشخص شد که عصاره اتانولی گیاه فوق روی باکتری باسیلوس آنتراسیس‌دارای بیشترین اثر مهارکنندگی و بر روی اشریشیاکلی و پروتئوس میرا بیلیس دارای اثر بازدارندگی رشد نمی‌باشد در حالی که عصاره متانولی این گیاه بر روی *Bordetella bronchiseptica* بیشترین اثر مهارکنندگی و پروتئوس میرا بیلیس و باکتریوم پیوژن‌مقاوم‌ترین گونه‌های باکتریایی در مقابل این عصاره می‌باشند (14). Asem و Karaman با مطالعه روی خواص ضد میکروبی گیاه *T. leucocladum* نشان دادند که اسانس این گیاه دارای تأثیر ضد میکروبی مؤثری روی باکترهای گرم مثبت نظیر استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سوبتیلیس و قارچ کاندیدا آلیبکتز داشته در حالی که روی باکتری‌های گرم منفی مثل اشریشیاکلی و سودوموناس آروژینوزادارای اثر مهارتی مؤثری نمی‌باشد (15). در مطالعه دیگری که توسط Ricci و همکاران در سال 2005 روی اثر ضد میکروبی گیاه *Teucrium marum* انجام گرفت مشخص شد که اسانس این گیاه دارای اثرات ضد میکروبی مؤثری به ویژه روی قارچ‌هایی نظیر *Rhizoctonia solani* و *Fusarium oxysporum* می‌باشد (16). همان‌طور که مشاهده می‌شود علی‌رغم وجود گونه‌های متنوع در جنس *Teucrium* انجام آزمون‌های ضد میکروبی بر روی آن‌ها به روش‌های مختلف، اثبات خواص ضد میکروبی گونه‌های مختلف این جنس وسیع می‌باشد. از بین چهار باکتری اشریشیاکلی بیشترین مقاومت را در برابر اثر ضد باکتریایی عصاره داشته است. و با افزایش غلظت عصاره خاصیت ضد میکروبی نیز افزایش می‌یابد و در غلظت بالا اثر ضد باکتریایی عصاره تا حدودی مشابه آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد. به علت افزایش روزافزون مقاومت آنتی‌بیوتیک‌ها، اثرات

