اثر ضد باکتریایی عصاره های چای ترش بر برخی از باکتری های بیماری زای مقاوم به آنتی بیوتیک در شرایط برون تنی

فریده طباطبایی یزدی[1*]، بهروز علیزاده بهبهانی[2]، علیرضا وسیعی[2]، سید علی مرتضوی[3]، سمیرا مرادی[4]

۱- دانشیار و عضو هئیت علمی گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۲- دانشجوی دکتری علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۳- استاد و عضو هئیت علمی گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

٤- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران

(تاریخ دریافت: ۹۳/۸/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۳/۹/۲۹)

چکیده

بیماری های عفونی ایجاد شده توسط سویه های *اشرشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به آنتی بیوتیک، در بسیاری از کشورهای جهان از جمله ایران در حال افزایش چشمگیری می باشد، از این رو تلاش های بسیاری جهت یافتن ترکیبات جدید به عنوان جایگزین برای آنتی بیوتیک ها در حال انجام می باشد. لذا در این پژوهش تجربی، اثر ضد باکتریایی عصاره های آبی و اتانولی چای ترش بر تعدادی از سویه های *اشرشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به آنتی بیوتیک های رایج درمانی مورد پژوهش قرار گرفت. عصاره چای ترش با استفاده از دستگاه خلا از مرکز (روتاری) آماده گردید. ۲۰ سویه اشرشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس از دانشگاه علوم پزشکی مشهد تهیه شد. حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره چای ترش در شش غلظت مختلف با روش رقیق سازی در محیط مایع بر *اشرشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* تعیین گردید. نتایج نشان داد *اشرشیا کلی* به ترتیب مقاوم به آنتی بیوتیک های پنی سیلین (۷۵/۹)، اریترومایسین (۵۸/۳)، تتراسیکلین (۵٦/۹) و سفکسیم (۳۷) درصد و برای *استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب پنی سیلین (۸۳/۵)، سفکسیم (۸۰) اریترومایسین (۵۵/٦) و تتراسیکلین (۲٦/۱) درصد بودند. نتایج این مطالعه بیانگر تاثیر مطلوب عصاره اتانولی چای ترش بر سویه های *اشرشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به آنتی بیوتیک بود، به نحوی که MIC عصاره اتانولی چای ترش برای *اشرشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب ۱٦ و ٤ میلی گرم بر میلی لیتر بود. به طور کلی عصاره چای ترش توانایی مهار سویه های *اشرشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به آنتی‌بیوتیک را دارد. بنابراین با انجام مطالعات گسترده تر می توان از عصاره اتانولی چای ترش در صنعت داروسازی برای درمان های دارویی بهره برد.

کلید واژگان: چای ترش، *اشرشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، ضد باکتری، عصاره

* مسئول مکاتبات: tabatabai@um.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir

۱- مقدمه

چای تُرش با نام علمی هیبیسکوس سابداریفا[1] از خانواده مالواسه آ[2] گیاهی استوایی با پتانسیل های اقتصادی قابل توجه است که در بیشتر نقاط دنیا با نام روسل[3] شناخته می شود [۱]. در ایران به نام چای قرمز، چای مکی و یا چای ترش معروف می‌باشد. بیش از ۳۰۰ گونه این گیاه در سرتاسر جهان و در مناطق گرمسیر و نیمه گرمسیر یافت می شود. موطن اصلی این گیاه غرب آفریقا می باشد و امروزه در سطح وسیعی در غرب، آسیا، آمریکا و استرالیا و بسیاری از کشورها کشت می‌شود. به دلیل ویژگی های منحصر به فرد، زیبایی و کاربردهای گوناگون، کشت آن در سراسر جهان رو به گسترش است [۲]. این گیاه در ایران در استان های سیستان و بلوچستان، فارس و گلستان کشت داده می‌شود. این گیاه دارای ترکیبات با ارزش دارویی بوده و به عنوان گیاهی چند منظوره در صنایع مختلف دارویی، غذایی و آرایشی و بهداشتی کاربرد دارد. این گیاه دارای ترکیبات زیست فعال گوناگونی می باشد که در نتیجه باعث خواص دارویی چشمگیری نظیر کاهش دهنده فشار خون، ضد تورم، حفاظت از کبد، تنظیم قند خون، بازدارنده جهش های سلولی و تقویت کننده سیستم ایمنی بدن می‌باشد [۳].

باکتری های موجود در خانواده کوکسی ها به ویژه جنس *استافیلوکوکوس اورئوس* یکی از گروه‌های بسیار مهم ایجاد کننده بیماری‌های اکتسابی در بیماران بستری شده در مراکز درمانی می‌باشند. سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به آنتی بیوتیک تهدیدی جدی در عفونت ها به شمار می آیند که روند درمان عفونت های این باکتری را با مشکل مواجه و بسیاری از مشکلات بالینی و اپیدمیولوژی در بیمارستان ها را به وجود آورده اند. با توجه به اینکه *استافیلوکوکوس اورئوس* به راحتی می تواند بین کارکنان و بیماران بستری شده در بیمارستان منتقل گردد بنابراین کنترل و درمان آن ضروری به نظر می آید [٤]. مقاومت ضد میکروبی در باکتری گرم منفی *اشرشیا کلی* در کل جهان گزارش شده است و سرعت افزایش مقاومت در این باکتری، نگرانی و مشکلات فروانی را در کشورهای در حال توسعه و حتی توسعه یافته ایجاد نموده است. در حال حاضر مقاومت باکتریایی به یک مشکل بزرگ و تهدید کننده در سرتاسر جهان تبدیل شده است [۵] به طوری که شعار سال ۲۰۱۱ سازمان جهانی بهداشت" مقاومت به داروهای ضد میکروبی یک تهدید جهانی "می باشد.

ترکیبات ضدمیکروبی گیاهان دارویی یکی از منابع با ارزشمند و مفید در عرصه پزشکی و داروسازی به شمار می-رود. با توجه به گسترش بیمار ی های عفونی و مقاومت میکروارگانیسم های بیماری زا شناسایی تعداد بیشتری از گیاهان دارویی و طبیعی در درمان بیماران موثر خواهد بود. ترکیبات ضد باکتریایی با منبع گیاهی دارای قابلیت درمانی بسیاری هستند. گیاهان دارویی نه تنها در درمان بیماری های عفونی، بلکه به طور همزمان تعداد زیادی از آثار جانبی را که اغلب با ترکیبات ضد میکروبی همراه هستند را کاهش می دهند [٦].

هدف از این پژوهش تجربی، بررسی و مقایسه اثر آنتی باکتریال عصاره های آبی و اتانولی چای ترش بر تعدادی از سویه‌های *اشرشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به آنتی بیوتیک های رایج درمانی بود.

۲- مواد و روش‌ها

گیاه مورد استفاده در این پژوهش تجربی از بازار محلی شهر مشهد خریداری و با توجه به مشخصات ظاهری و بررسی لازم توسط محققین پژوهشکده گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد به عنوان چای ترش تشخیص و مورد تایید قرار گرفت. جهت تهیه عصاره آبی و اتانولی چای ترش میزان ۲۰ گرم از گیاه چای ترش با ۱۰۰ سی سی اتانول و آب مقطر مخلوط گردید محلول حاصل، به مدت ۳ روز و هر ٢٤ ساعت تکان داده شد و سپس توسط کاغذ واتمن صاف گردید. خارج کردن اتانول از محلول عصاره با روش تبخیر در خلا و توسط دستگاه روتاری صورت پذیرفت. جهت اطمینان از استریل بودن عصاره، عصاره در محیط مولر هینتون آگار (مرک آلمان) کشت داده شد و عدم رشد میکروارگانیسم نشان دهنده استریل و مورد تایید بودن عصاره های آبی و اتانولی چای ترش بود [۷].

سویه های میکروبی شامل *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیا کلی* بود. ابتدا برای جداسازی باکتری گرم منفی *اشرشیاکلی* در شرایط استریل در روی محیط های ائوزین متیلن بلو (EMB) و آگار خوندار (مرک آلمان) کشت داده شدند، سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد عمل انکوباسیون انجام پذیرفت، و در

1. *Hibiscus Sabdariffa*
2. Malvaceae
3. *Roselle*

Archive of SID

www.SID.ir

فاصله زمانی ٢٤ ساعت مورد بررسی قرار گرفتند. سپس برای جداسازی دقیق و مطمئن تست های تاییدی انجام پذیرفت [۸]. برای باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* بر محیط‌های کشت اختصاصی مانیتول سالت آگار و بلاد آگار (مرک آلمان) کشت و خالص سازی شدند سپس در آزمایشگاه میکروبیولوژی صنعتی، دانشگاه فردوسی مشهد و با استفاده از تست های بیوشیمیایی کاتالاز، کوآگولاز و سایر موارد مورد شناسایی قرار گرفتند [۸].

واکنش حساسیتی گونه های مورد مطالعه (*اشرشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس*) به دیسک های آنتی بیوتیک های تتراسیکلین، اریترومایسین، پنی سیلین و سفکسیم که از شرکت پادتن طب ایران تهیه شده بودند با استفاده از روش استاندارد دیسک دیفیوژن کربی –باثر مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور، در ابتدا از تمام سویه های باکتری، غلظت نیم مک فارلند مطابقت استاندارد تهیه و در محیط مغذی مولر هینتون کشت داده شد. دیسک های بلانک پادتن طب طبق دستور شرکت سازنده به هر آنتی بیوتیک آغشته شده و پس از خشک شدن در شرایط استریل، بر سطح محیط کشت مولر هینتون آگار حاوی باکتری (نیم مک فارلند) به آرامی بر روی محیط کشت قرار داده شد و به وسیله پنس استریل محکم شد. روی هر پلیت یک دیسک آب مقطر به عنوان کنترل منفی قرار داده شد. پلیت ها به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری و قطر هاله های باز دارنده جهت ارزیابی و تعیین مقاومت و حساسیت سویه ها به آنتی‌بیوتیک های مورد نظر، اندازه گیری شد [۹ و۱۰]. هر آزمایش سه بار و به طور مستقل از هم انجام شد و داده های حاصل با استفاده از نرم افزار آماری (SPPS) ویرایش ۱۷ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

برای اندازه گیری حداقل غلظت مهارکننده از رشد از روش میکرو براث دایلوشن برگرفته از پروتکل CLSI با کمی تغییرات استفاده شد. جهت اندازه گیری فعالیت های ضدمیکروبی عصاره های آبی و اتانولی چای ترش علیه *اشرشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* غلظت اولیه در حلال دی متیل سولفوکساید (مرک آلمان) تهیه گردید. آزمایش میکرودایلوشن، در پلیت های ۹٦ خانه استریل و برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی از رشد انجام پذیرفت. در این آزمون ابتدا از محیط کشت مولرهنیتون براث ۱۰۰ میکرولیتر داخل ۹٦ چاهک میکروپلیت ریخته شد. سپس به اولین چاهک هر ردیف ۱۰۰ میکرولیتر عصاره اضافه گردید. سپس از خانه دوم به سوم و به همین ترتیب تا خانه نهم رقیق شدند. سوسپانسیون باکتریایی با کمک استاندارد نیم مک فارلند تهیه گردید حجم ۱۰۰ میکرولیتر سوپانسیون باکتری ها مذکور به تمامی چاهک ها به جز کنترل منفی اضافه گردید. چاهک کنترل مثبت شامل محیط کشت مایع، سوسپانسیون باکتری و حداکثر غلظت حلال بود در حالی که در چاهک کنترل منفی تنها محیط کشت و حلال موجود بود. بعد از زمان انکوباسیون ٢٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد میکروپلیت های مورد آزمایش مطالعه شدند. تشکیل رسوب ته چاهک نشانه رشد باکتری و عدم تشکیل آن نشانه عدم رشد باکتری در نظر گرفته شد. غلظت اولین چاهک عدم رشد به عنوان حداقل غلظت مهار کننده از رشد در نظر گرفته شد، لازم به ذکر است تمامی میکروپلیت ها جهت ارزیابی کدورت حاصل از رشد باکتری در طول موج ٦۲۰ نانومتر خوانده شد [۱۱و ۱۲]، همچنین تمامی آزمایشات برای هر یک از عصاره ها به صورت جداگانه و در ۳ مرتبه تکرار گردید. برای تعیین میزان دقیق حداقل غلظت کشندگی *چای ترش* نیز از تمامی میکروپلیت هایی که در آن کدورتی مشاهده نشده بود نمونه برداری شد و جهت تعیین حداقل غلظت کشندگی کشت داده شد [۱۲]. داده‌های حاصل به روش تجزیه واریانس یک طرفه با استفاده از نرم‌افزار SPSS Ver 17 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. همچنین برای مقایسه میانگین‌ها از روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد استفاده شد.

۳- نتایج و بحث

نتایج حاصل از آنالیزهای بیوشیمیایی و میکروبیولوژی سویه های باکتری های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیا کلای* به ترتیب نشان داد که استرین های جدا و خالص سازی شده برای *استافیلوکوکوس اورئوس* کاتالاز مثبت و همچنین تست‌های کوآگولاز و مانیتول آن ها نیز مثبت بود. از بین ایزوله های مورد بررسی علاوه بر موارد فوق قادر به رشد بر محیط کشت مانیتول سالت آگار بوده و توانستند بر لام شیشه ای آگلوتیناسیون تشکیل دهند. بنابراین به عنوان گونه های *استافیلوکوکوس اورئوس* در نظر گرفته شدند و برای آزمایش های بعدی مورد استفاده قرار گرفتند. برای باکتری گرم منفی

Archive of SID
www.SID.ir

اشرشیا کلی نیز تمامی آزمایش های بیوشیمیایی نیز تایید کننده این باکتری بودند. نتایج جدول [۱]، نشان داد *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده براساس قطر هاله عدم رشد به ترتیب مقاوم به آنتی بیوتیک های پنی سیلین (۸۳/۵)، سفکسیم (۸۰) اریترومایسین (۵۵/٦) و تتراسیکلین (۲٦/۱) درصد بودند و *اشرشیا کلی* به ترتیب مقاوم به آنتی بیوتیک های پنی سیلین (۷۵/۹)، اریترومایسین (۵۸/۳)، تتراسیکلین (۵٦/۹) و سفکسیم (۳۷) درصد بود.

اثر ضد باکتری عصاره آبی چای ترش در غلظت های مختلف جدول (۲) نشان داد ، که علی رغم مقاومت نسبی اکثر سویه‌ها در غلظت های مورد استفاده در مورد عصاره اتانولی چای ترش به خوبی توانست از رشد سویه ها جلوگیری به عمل آورد.

نتایج حاصل از بررسی اثر ضد میکروبی عصاره‌های اتانولی و آبی چای ترش به روش کربی- بوئر یا انتشار در آگار در جدول ۲، آورده شده است. نتایج نشان داد که غلظت ۲۰ میلی گرم بر میلی‌لیتر از عصاره‌های آبی و غلظت های ۱۰ و ۱۵ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره اتانولی دارای اثر ضد میکروبی قابل توجهی روی باکتری ها داشت. تاثیر عصاره ها با کم شدن غلظت آن ها در دیسک، کم شد. عصاره اتانولی در تمامی غلظت ها دار اثر مهاری روی رشد باکتری های *اشرشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* داشتند.

نتایج نشان داد که عصاره اتانولی چای ترش دارای قطر هاله معادل ۵۰/± ۱۹/۹۰در غلظت ۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر بر *استافیلوکوکوس اورئوس* بود. در این مطالعه باکترهای *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیا کلی* به ترتیب بیشترین و کم ترین حساسیت را به عصاره های چای ترش نشان دادند.

همچنین نتایج نشان داد که عصاره آبی در تمامی غلظت‌ها روی *استافیلوکوکوس اورئوس* و در غلظت‌های ۱۵ و ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر *اشرشیا کلی* دارای اثر بازدارندگی بود. همچنین مشاهد شد به جز درغلظت‌های ۵ با ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره آبی بر *استافیلوکوکوس اورئوس* و غلظت ۱۵ با ۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره آبی بر باکتری *اشرشیاکلی* در بقیه موارد اختلاف میانگین قطر عدم رشد (به صورت دو به دو) با هم معنی‌دار می‌باشد. در مقایسه دو به دو میان غلظت‌های عصاره‌های آبی و اتانولی بر *اشرشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* نیز هاله بازدارندگی مشاهده شد. مقایسه دو به دو میانگین‌های قطر هاله عدم رشد در مورد عصاره اتانولی بر باکتری‌های مورد بررسی نشان داد که در تمامی غلظت‌ها، میانگین قطر عدم رشد اختلاف معنی‌دار دارند. بر اساس نتایج حاصل از این آزمون دانکن مشاهده شد هم در مورد عصاره اتانولی و آبی که غلظت موثر ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. تفاوت معنی‌دار میانگین قطر عدم رشد غلظت‌های مختلف دارای علت های متفاوتی می باشد اما یکی از این دلایل نوع حلال به کار رفته جهت انجام عمل عصاره گیری می باشد. ولی به طوری کلی می‌توان نتیجه گرفت که با افزایش غلظت میزان قطر هاله عدم رشد افزایش پیدا می‌کند (جدول ۲).

نتایج این مطالعه بیانگر تاثیر مطلوب عصاره اتانولی چای ترش بر سویه های *اشرشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به آنتی بیوتیک بود، به نحوی که MIC عصاره اتانولی چای ترش برای *اشرشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب ۱٦ و ٤ میلی گرم بر میلی لیتر بود. نتایج حاصل از حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره‌های اتانولی و آبی در جدول ۳، آورده شده است. نتایج نشان داد که *اشرشیا کلی* بیشترین MIC و MBC را داشت.

جدول ۱ درصد حساسیت سویه های باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیا کلی* مورد بررسی نسبت به آنتی بیوتیک ها

باکتری/ حساسیت	پنی سیلین	اریترومایسین	تتراسیکلین	سفکسیم
استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم	۸۳/۵	۵۵/٦	۲٦/۱	۸۰
استافیلوکوکوس اورئوس نیمه حساس	۱٤	۳۷	٤۷/٦	۲۰
استافیلوکوکوس اورئوس حساس	۲/۵	۷/٤	۲٦/۳	۰
اشرشیا کلی مقاوم	۷۵/۹	۵۸/۳	۵٦/۹	۳۷
اشرشیا کلی نیمه حساس	۲۳/۵	۳۵	۳۰/٦	۵۵
اشرشیا کلی حساس	۰/٦	٦/۷	۱۲/۵	۸

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲ میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره‌های اتانولی و آبی چای ترش به روش کربی- بوئر بر *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیا کلی*

نوع عصاره	میکروارگانیسم	حساسیت	غلظت عصاره چای ترش (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)			
			۵	۱۰	۱۵	۲۰
اتانولی	*استافیلوکوکوس اورئوس*	R	۹/۴۰±۰/۵۰^{a}	۱۲/۳۰±۰/۵۴^{b}	۱۷/۳۰±۰/۲۸^{c}	۱۹/۹۰±۰/۵۰^{d}
اتانولی	*استافیلوکوکوس اورئوس*	I	۱۰/۸۰±۰/۵۲^{a}	۱۴/۶۰±۰/۵۷^{b}	۱۸/۳۰±۰/۵۲^{c}	۲۱/۴۰±۰/۵۰^{d}
اتانولی	*استافیلوکوکوس اورئوس*	S	۱۲/۲۰±۰/۵۰^{a}	۱۵/۲۰±۰/۴۵^{b}	۱۹/۴۰±۰/۵۰^{c}	۲۲/۲۰±۰/۵۲^{d}
اتانولی	*اشرشیا کلی*	R	۸/۸۰±۰/۵۰^{a}	۱۰/۹۰±۰/۵۴^{b}	۱۴/۱۰±۰/۲۸^{c}	۱۶/۹۰±۰/۵۰^{d}
اتانولی	*اشرشیا کلی*	I	۹/۵۰±۰/۵۲^{a}	۱۲/۲۰±۰/۵۲^{b}	۱۵/۶۰±۰/۵۰^{c}	۱۸/۳۰±۰/۵۰^{d}
اتانولی	*اشرشیا کلی*	S	۱۰/۳۰±۰/۵۲^{a}	۱۲/۹۰±۰/۵۷^{b}	۱۶/۲۰±۰/۵۲^{c}	۱۸/۹۰±۰/۵۰^{d}
آبی	*استافیلوکوکوس اورئوس*	R	۸/۰۰±۰/۵۰^{a}	۹/۲۰±۰/۵۰^{a}	۱۲/۶۰±۰/۲۸^{b}	۱۵/۴۰±۰/۵۰^{c}
آبی	*استافیلوکوکوس اورئوس*	I	۹/۲۰±۰/۵۲^{a}	۱۲/۰۰±۰/۵۷^{b}	۱۴/۷۰±۰/۵۰^{c}	۱۷/۰۰±۰/۵۰^{d}
آبی	*استافیلوکوکوس اورئوس*	S	۱۰/۳۰±۰/۵۰^{a}	۱۲/۹۰±۰/۴۵^{b}	۱۶/۶۰±۰/۵۴^{c}	۱۹/۱۰±۰/۵۰^{d}
آبی	*اشرشیا کلی*	R	-	-	۹/۰۰±۰/۲۸^{a}	۱۰/۲۰±۰/۵۰^{a}
آبی	*اشرشیا کلی*	I	۸/۶۰±۰/۵۰^{a}	۱۰/۶۰±۰/۵۲^{b}	۱۳/۲۰±۰/۵۰^{c}	۱۵/۰۰±۰/۵۲^{d}
آبی	*اشرشیا کلی*	S	۹/۹۰±۰/۵۰^{a}	۱۱/۷۰±۰/۵۲^{b}	۱۴/۷۰±۰/۵۲^{c}	۱۷/۰۰±۰/۵۰^{d}

- S= Sensitive
- I= Intermediate
- R= Resistant
- علامت (-) نشان دهنده عدم وجود فعالیت ضد باکتری عصاره چای ترش می‌باشد.

جدول۳- نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره‌های اتانولی و آبی چای ترش بر *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیا کلی*

عصاره	میکروارگانیسم	حساسیت	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)	کنترل -	کنترل +
اتانولی	*استافیلوکوکوس اورئوس*	R	٤	٨	-	+
اتانولی	*استافیلوکوکوس اورئوس*	I	٤	٤	-	+
اتانولی	*استافیلوکوکوس اورئوس*	S	٢	٤	-	+
اتانولی	*اشرشیا کلی*	R	١٦	٣٢	-	+
اتانولی	*اشرشیا کلی*	I	٨	١٦	-	+
اتانولی	*اشرشیا کلی*	S	٨	١٦	-	+
آبی	*استافیلوکوکوس اورئوس*	R	١٦	٣٢	-	+
آبی	*استافیلوکوکوس اورئوس*	I	١٦	٣٢	-	+
آبی	*استافیلوکوکوس اورئوس*	S	٨	١٦	-	+
آبی	*اشرشیا کلی*	R	٣٢	٦٤	-	+
آبی	*اشرشیا کلی*	I	٣٢	٦٤	-	+
آبی	*اشرشیا کلی*	S	١٦	٣٢	-	+

مشکل مقاومت به آنتی بیوتیک های رایج درمانی به دلایل مختلف از جمله مصرف نادرست و بدون تجویز پزشک رخ می دهد، که نه تنها باعث افزایش مرگ ومیر می گردد بلکه موجب می شود روز به روز آنتی بیوتیک های جدید ساخته شوند [۱۳]. در بررسی های انجام شده در پژوهش های مختلف افزایش میزان مرگ و میر ناشی از بیماری های عفونی ٤٠ درصد گزارش شده است؛ از طرفی عوارض ناخواسته دارویی یکی از بزرگترین مشکلات درمان است و عوارض دارویی چهارمین عامل مرگ ومیر در ایالات متحده گزارش شده است. با توجه به مشکلات ذکر شده در بالا در صورتی که بتوانیم از داروهای جایگزین گیاهی که دارای اثر ضد میکربی مناسبی هستند، استفاده کنیم، پیشرفتی شایان بزرگ در جهت رفع مقاومت های میکروبی و درمان بیماری های عفونی برداشته شده است. امروزه باکتری های مقاوم به دارو و

Archive of SID
www.SID.ir

انتی‌بیوتیک ها می توانند مهم ترین بیماری های عفونی را ایجاد کنند. یکی از جنبه های این نوع مشکلات شیوع باکتری‌های مقاوم به چند دارو است [١٤]. بسیاری از محققان برای حل این مشکل نوظهور، متوجه اثر عصاره گیاهان بر باکتری‌های یادشده به جای آنتی بیوتیک ها معمول شدند و تحقیقات متعددی انجام شده است.

نتایج این مطالعه نشان داد *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده براساس قطر هاله عدم رشد به ترتیب مقاوم به آنتی بیوتیک های پنی سیلین (٨٣/٥)، سفکسیم (٨٠) اریترومایسین (٥٥/٦) و تتراسیکلین (٢٦/١) درصد بودند و *اشرشیا کلی* به ترتیب مقاوم به آنتی بیوتیک های پنی سیلین (٧٥/٩)، اریترومایسین (٥٨/٣)، تتراسیکلین (٥٦/٩) و سفکسیم (٣٧) درصد بود.

محمدی مهر و همکاران (٢٠٠٨) مطالعه ای را در مورد باکتری *اشرشیا کلی* جداسازی شده در یکی از بیمارستان های استان تهران انجام دادند بیان کردند که ایزوله های *اشرشیا کلی* ایزوله شده نسبت به آنتی بیوتیک های جنتامایسین (٢٧/٧) سفتازیدیم (٦٣/٨٩) و سفتریاکسون (٦٣/٨٨) درصد مقاوم بودند [١٥]. در مطالعه دیگری که توسط سیویک (٢٠٠٧) در کرمانشاه انجام پذیرفت مشخص گردید که ایزوله های جداشده *اشرشیا کلی* نسبت به آنتی بیوتیک سفکسیم (٤٦/٨) درصد مقاوم بوده است [١٦].

بررسی واکنش حساسیت جدایه های *اشرشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* به آنتی بیوتیک ها نشان داد که بالاترین واکنش مقاومتی مربوط به آنتی بیوتیک پنی سیلین می باشد،نتایج مطالعه ی عبدالهی و همکاران (٢٠١٢) که در شهرستان فسا انجام پذیرفت مشخص گردید که مقاومت *اشرشیا کلی* جدا شده نسبت به آنتی بیوتیک تتراسیکلین (٥٩/٤) در صد بود [١٧] که با یافته های مطالعه ما همخوانی داشت.

نتایج نشان داد که غلظت ٢٠ میلی گرم بر میلی‌لیتر از عصاره-های آبی و غلظت های ١٠ و ١٥ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره اتانولی دارای اثر ضد میکروبی قابل توجهی روی باکتری ها داشت. تاثیر عصاره ها با کم شدن غلظت آن ها در دیسک، کم شد. عصاره اتانولی در تمامی غلظت ها دار اثر مهاری روی رشد باکتری های *اشرشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* داشتند.

نتایج نشان داد که عصاره اتانولی چای ترش دارای قطر هاله معادل ٥٠/± ١٩/٩٠در غلظت ٢٠ میلی گرم بر میلی لیتر بر *استافیلوکوکوس اورئوس* بود. در مقایسه دو به دو میان غلظت-های عصاره‌های آبی و اتانولی بر *اشرشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* نیز هاله بازدارندگی مشاهده شد. مقایسه دو به دو میانگین‌های قطر هاله عدم رشد در مورد عصاره اتانولی بر باکتری‌های مورد بررسی نشان داد که در تمامی غلظت‌ها، میانگین قطر عدم رشد اختلاف معنی‌دار دارند. بر اساس نتایج حاصل از این آزمون دانکن مشاهده شد هم در مورد عصاره اتانولی و آبی که غلظت موثر ٢٠ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. آگراوال و همکاران در مطالعه ای که در سال ٢٠١٠ بر اثر ضد میکروبی گلیکوزیدهای ترپنی دانه کهور را تعدادی از میکروارگانیسم های بیماری زا در شرایط محیط کشت مورد بررسی قرار دادند. نتایج این محققان نشان داد که گلیکوزیدهای ترپنی گیاه کهور به خوبی از رشد میکروارگانیسم های بیماری زا جلوگیری کرده و اثر ضد میکروبی آن بر *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشتر از باکتری گرم منفی *اشرشیاکلی* گزارش شد [١٨] که با یافته های مطالعه ما همخوانی داشت. یکی از ویژگی های حائز اهمیت در مورد عصاره های گیاهی خاصیت آب گریزی (Hydrophobicity) است که عصاره‌های گیاهی را قادر می سازد تا با پیوند روی لایه لیپیدی غشاء سلولی باکتری ها و میتوکندری آن ها باعث پاره شدن غشاء سلولی و خروج مولکول ها و یون های مهم باکتری به خارج از سلول و در نهایت موجب از بین رفتن باکتری می گردد [١٩].

نتایج این مطالعه نشان داد که MIC عصاره اتانولی چای ترش برای باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیا کلی* به *ترتیب* ٤ و ١٦ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و MIC عصاره آبی برای باکتری‌های مذکور *به ترتیب* ١٦ و ٣٢ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. نتایج نشان داد که MBC عصاره اتانولی چای ترش برای باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیا کلی* به *ترتیب* ٨ و ٣٢ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و MIC عصاره آبی برای باکتری-های مذکور *به ترتیب* ٣٢ و ٦٤ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. نتایج نشان داد که اشرشیا کلی نسبت به باکتری استافیلوکوکوس اورئوس دارای MIC و MBC بالاتری بود. سینگ و همکاران (٢٠١١) اثر ضد میکروبی ***Prosopis juliflora*** روی باکتری *اشرشیا کلی* مورد بررسی قرار دادند.

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج این محققان نشان داد که عصاره گیاه مذکور تاثیر بسیار خوبی بر باکتری *اشرشیا کلی* داشت به نحوی که این پژوهشگران محدوده حداقل غلظت مهار کنندگی را برای باکتری *اشرشیا کلی* ۲۵ تا ۱۰۰ میکرولیتر در میلی لیتر گزارش کردند [۲۰]. در تحقیق حاضر نیز عصاره اتانولی چای ترش هاله عدم رشد با قطر ۰/۵۰± ۱۶/۹۰ میلی متر روی *اشرشیاکلی* نشان داد و در آزمایش حداقل غلظت کشندگی نیز مشخص گردید که این میزان برای باکتری مذکور ۱۶ میلی گرم بر میلی لیتر بود. در مطالعه ای که توسط طباطبایی یزدی و همکاران (۱۳۹۳) در مورد بررسی مقایسه ای اثر انواع عصاره های (***Hibiscus Sabdariffa***) و آنتی بیوتیک های انتخابی بر سویه های بالینی و استاندارد عامل عفونت در شرایط محیط کشت مورد بررسی قرار گرفت، مشخص گردید باکتری سالمونلا اینتریتدیس بیشترین حساسیت را به عصاره های چای ترش نشان دادند. سالمونلا اینتریتدیس بین سوش های مورد آزمون بیشترین MIC و MBC را داشت. غلظت های ۳۰ و ۴۰ میلی گرم بر میلی لیتر از عصاره های چای ترش دارای اثر ضد میکروبی قابل توجهی روی باکتری ها داشت. اثر ضد باکتریایی عصاره ها با کاهش غلظت آن ها در دیسک، کم شد. یافته های این مطالعه با این پژوهش همخوانی داشت [۲۱].

٤- نتیجه گیری

در یک جمع بندی کلی می توان بیان نمود که نتایج پژوهش حاضر نشان دهنده مقاوم بودن باکتری های بیمارستانی مورد مطالعه در این پژوهش آزمایشگاهی (*اشرشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس*) به آنتی بیوتیک های معمول و رایج بود و تأثیر مثبت عصاره چای ترش نشان دهنده اثر بخش بودن عصاره اتانولی این گیاه بر این سویه های باکتریایی است که می تواند راهکار مناسبی برای معرفی یک آنتی بیوتیک گیاهی با عوارض کمتر، برای درمان بیماری های عفونی حاصل از این سویه های باکتریایی باشد. بنابراین، تحقیقات گسترده برای شناسایی بیشتر پیشنهاد می گردد.

۵- تقدیر و تشکر

مقاله علمی ـ پژوهشی حاضر مستخرج از طرح پژوهشی با کد ۲/۳۲۲۰۸ مصوب در دانشگاه فردوسی مشهد می باشد. 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.

٦- منابع

[1] Herrera-Arellano A, Flores-Romero S, Chavez-Soto M, Tortoriello J. Effectiveness and tolerability of a standardized extract from Hibiscus sabdariffa in patients with mild to moderate hypertension: a controlled and randomized clinical trial. Phytomedicine. 2004; 11(5):375-82.

[2] Ali BH, Wabel NA, Blunden G. Phytochemical, pharmacological and toxicological aspects of Hibiscus sabdariffa L.: a review. Phytotherapy Research. 2005; 19(5):369-75.

[3] Tolulope M. Cytotoxicity and antibacterial activity of methanolic extract of Hibiscus sabdariffa. Journal of medicinal plants research. 2007; 1(1):009-13.

[4] Najar Peerayeh S, Azimian A, Mostafaee M, Siadat SD. Identification of methicillin-resistant Staphylococcus aureus by disk diffusion method, determination of MIC and PCR for mecA gene. Modares Journal of Medical Sciences: Pathobiology. 2009; 12(3):61-9.

[5]Hawser SP, Bouchillon SK, Hoban DJ, Badal RE, Hsueh P-R, Paterson DL. Emergence of high levels of extended-spectrum-β-lactamase-producing gram-negative bacilli in the Asia-Pacific region: data from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART) program, 2007. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2009; 53(8):3280-4.

[6] Alizadeh Behbahani B, Tabatabei Yazdi F, Riazi F, Shahidi F, Noorbakhsh H, Tabatabei Yazdi F. Antifungal potential of mangrove extracts against Aspergillus flavus and Penicillium italicum. Journal of Paramedical Sciences. 2014; 5(4) :32-8.

[7] Alizadeh Behbahani B, Tabatabaei Yazdi F, Shahidi F, Mohebbi M. Antifungal effect of edible film (CMC) containing aqueous and ethanolic mangrove plant extract on

Archive of SID
www.SID.ir

nosocomial infections in the intensive care unit of the hospital, Tehran 2008 Golestan family. Journal of Army University of Medical Sciences, Iran. 2008; (4): 283-290. (In persion).

[16] Civic S H, p Khazaei, Kenan M, King M. Antibiotic resistance patterns of Escherichia coli in urine samples, Imam Reza Hospital, Kermanshah. Journal Kermanshah University of Medical Sciences.2007; (3): 287-295. (In persion).

[17] Abdullahi S, Najafi S, Kafilzadeh F, Abdullahi Ali, Jafari S, AS promoters. Evaluation of antibiotic resistance in Escherichia coli strains isolated from patients admitted to the hospital, but the era of Fasa city. Fasa University of Medical Sciences. 2012; (4), 273-278. (In persion).

[18] Agrawal R, Singh SK, Garg U, Garg HK. Antimicrobial activity of terpene glycoside from the seeds of *Prosopis spicigera.* J Curr Sci 2010; 15(2):399-402.

[19] Abdoli Oskouie S, Ahangarzadeh Rezaee M, Ajhangh A, Abdinia B. Antimicrobial resistance pattern and Minimum Inhibitory Concentration of Vancomycin among *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from Clinical Specimens of Children in Tabriz. Journal of Ardabil University of Medical Sciences. 2013; 13(1):24-34. (In persion).

[20] Singh S, Swapnil, Verma SK. Antimicrobial properties of Alkaloid rich fractions obtained from various parts of *Prosopis juliflora*. Int J Pharma Sci Res 2011; 2(3):114-20.

[21] Farideh Tabatabaei Yazdi, Behrooz Alizadeh Behbahani, Alireza Vasiee, Seyed Ali Mortazavi, Samira Moradi, Forouzan Tabatabaei Yazdi, Sara Jafarian. A comparative study of effect of types of *Hibiscus Sabdariffa* extracts and selective antibiotics on clinical and standard strains of infection agent in vitro. Infectious Diseases and Tropical Medicine.

citrus pathogens in vitro. Agricultural Advances. 2013; 2(1):47-52.

[8] Motevasel M, Okhovat M, Zomorodian K, Farshad S. Antibacterial Effect of Zataria multiflora Extract on MRSA. ISMJ. 2014; 17 (5): 900-906.

[9] Alizadeh Behbahani B, Tabatabaei Yazdi F, Shahidi F, Mohebbi M. Antimicrobial effect of the aqueous and ethanolic Avicennia marina extracts on Staphylococcus epidermidis, Streptococcus pyogenes and Pseudomonas aeruginosa" in vitro". ISMJ. 2014; 17 (5): 879-888.

[10] Jones RN, Ballow CH, Biedenbach DJ. Multi-laboratory assessment of the linezolid spectrum of activity using the Kirby-Bauer disk diffusion method: Report of the Zyvox Antimicrobial Potency Study (ZAPS) in the United States. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2001; 40(1):59-66.

[11] Pfaller MA, Diekema D, Gibbs D, Newell V, Ellis D, Tullio V, et al. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of Candida species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. Journal of clinical microbiology. 2010;48(4):1366-77.

[12] Wiegand I, Hilpert K, Hancock RE. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. Nature Protocols. 2008; 3(2):163-75.

[13] Roodsari MR, Zamanian-Azodi M, Salimpour F. Herbal remedies and medicine; introducing some Iranian plants. Journal of Paramedical Sciences. 2013; 4(2):116-22.

[14] Dombrowski SM, Desai SY, Marroni M, Cucullo L, Goodrich K, Bingaman W, et al. Overexpression of multiple drug resistance genes in endothelial cells from patients with refractory epilepsy. Epilepsia. 2001; 42(12):1501-6.

[15] Mohammad Mehr M, Grace M Badb M, Bahadur Ali. Antibiotic resistance patterns of gram-negative bacilli responsible for

Archive of SID

www.SID.ir

Investigation of the extracts antibacterial effect of *Hibiscus Sabdariffa* against strains of antibiotic resistance on pathogenic bacteria "*in vitro*"

Tabatabaei Yazdi, F. [1*], Alizadeh Behbahani, B. [2], Vasiee, A. R. [2], Mortazavi, S. A. [3], Moradi, S. [4]

1. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
2. Ph.D student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
3. Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
4. M.Sc Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tehran

(Received: 93/8/21 Accepted: 93/9/29)

Infectious diseases created by strains of Antibiotic resistance *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, is increasing in many countries such as Iran. Therefore, many efforts are performing in order to find a new composition as replacement for antibiotics. In this experimental research, an antimicrobial effect of the ethanolic and aqueous extract of *Hibiscus Sabdariffa* was investigated on several strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* resistant to common clinical antibiotics.The extract of *Hibiscus Sabdariffa* was prepared using rotary. Twenty strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* were provided from Mashhad University of Medical Sciences. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were determined using Serial Dilution Method in six concentrations onto strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in broth media.The results showed that *Escherichia coli* was resistant to antibiotics of penicillin (75.9%), *erythromycin (58.3%), tetracycline (56.9%), and* cefixime (37%), and *Staphylococcus aureus* showed resistant to antibiotics of penicillin (83.5%), cefixime (80%), *erythromycin (55.6%), and tetracycline (26.1%), respectively. Also, the* ethanolic extract of *Hibiscus Sabdariffa* has acceptable effect on antibiotic resistant strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* that MIC of the *Hibiscus Sabdariffa* ethanolic extract was 4 and 16 mg/mL for *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, respectively.The overall, the *Hibiscus Sabdariffa* extract has inhibitory ability on Antibiotic resistant *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* strains. So, the ethanolic and aqueous extract of Hibiscus tea can be used in in pharmaceutical industry for medical treatments with perfect study.

Keywords: *Hibiscus Sabdariffa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, Antibacterial effect, Extract

* Corresponding Author E-Mail Address: tabatabai@um.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir