

تحقیقی

اثر ضدباکتریایی ۲۰ گونه از گیاهان دارویی علیه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم و حساس به متی‌سیلین

چکیده

زمینه و هدف: عفونت‌های ایجاد شده به وسیله استافیلوکوکوس اورئوس‌های مقاوم به متی‌سیلین و اکزاسیلین عمده‌تاً با منشاء بیمارستانی هستند که در بسیاری از کشورهای جهان در حال افزایش است. به همین دلیل محققان نیز تلاش‌های زیادی برای یافتن ترکیبات جدید به عنوان جایگزین مناسب این آنتی‌بیوتیک‌ها انجام داده‌اند. این مطالعه نیز به منظور بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره الکلی ۲۰ گونه از گیاهان دارویی استان گلستان علیه سویه‌های بالینی و استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس حساس و مقاوم به متی‌سیلین انجام شد.

روش بررسی: در این تحقیق عصاره‌گیری اکالیپتوس، نعنا، رزماری، آویشن باغی، گل راعی، سیاه دانه، درخت پیرو، گزنه، سیر، زرشک، کلزا، افسنتین، بابونه، زیره سبز، اسپند، گل مخروطی ارغوانی، درمنه، گز و انار به روش پرکولاسیون و استخراج حلال نیز به کمک پمپ خلا انجام شد. بررسی اثر ضدباکتریایی عصاره اتانولی گیاهان علیه سویه‌های MRSA و MSSA به روش انتشار در آگار و به کمک دیسک انجام شد. هر آزمون سه بار تکرار گردید و میانگین قطر هاله عدم رشد روی محیط مولر هیتون آگار اندازه‌گیری و ثبت و خاصیت ضدباکتریایی عصاره‌ها با هم مقایسه گردید. سپس با استفاده از روش *microdilution Broth* حداقل غلظت بازدارنده از رشد (MIC) گیاهانی که بهترین اثر را در روش دیسک - دیفیوژن داشتند، تعیین شد.

یافته‌ها: از بین ۲۰ گیاه مورد بررسی عصاره اتانولی ۸ گیاه اوکالیپتوس، اسپند، درمنه، سیاه‌دانه، زرشک، گل راعی، انار و گز در روش دیسک - دیفیوژن بهترین اثر آنتی‌استافیلوکوکی را با توجه به قطر هاله عدم رشد نشان دادند، به طوری که حداکثر میانگین قطر هاله عدم رشد آنها ۲۲/۴ میلی‌متر ارزیابی شد. کمترین مقدار MIC این گیاهان ۰/۰۱ مربوط به گیاه انار بود. همچنین قطر هاله عدم رشد گیاهان مورد بررسی در اکثر موارد روی سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین بیش از سویه‌های حساس بود.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که گیاهان درمنه، زرشک، اوکالیپتوس، اسپند و گل راعی، سیاه دانه، انار و گز دارای بیشترین اثرات ضدباکتریایی سویه‌های MSSA و MRSA می‌باشند. البته کاربرد بالینی این گیاهان نیازمند مطالعات بیشتر و وسیع‌تری می‌باشد.

کلیدواژه‌ها: اثر ضدباکتریایی - گیاهان دارویی - عصاره اتانولی - استافیلوکوکوس اورئوس

تینا دادگر

کارشناس ارشد میکروبی‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی گرگان

دکتر عزت الله قائمی

دانشیار گروه میکروبی‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی گرگان

مسعود بازوری

کارشناس میکروبی‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی گرگان

دکتر مهدی آسمار

استاد گروه انگل‌شناسی پزشکی، انستیتو پاستور ایران

دکتر معصومه مازندرانی

استادیار سیستماتیک گیاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان

دکتر اختر سیفی

دکترای داروسازی

عضو هیأت علمی دانشگاه علوم پزشکی گرگان

دکتر هومان بیات

دکتر داروساز، شرکت دارونی نیاک

نویسنده مسئول: تینا دادگر

پست الکترونیکی: dadgar_teena@yahoo.com

نشانی: گرگان، ابتدای جاده شصتکلا، دانشگاه علوم پزشکی

گلستان، دانشکده پزشکی، آزمایشگاه میکروبی‌شناسی

تلفن: ۴۴۲۱۶۵۳-۰۱۷۱ داخلی ۲۶۵

نمابر: ۴۴۲۵۱۷۱

وصول مقاله: ۸۵/۲/۸

اصلاح نهایی: ۸۶/۲/۹

پذیرش مقاله: ۸۶/۲/۱۰

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس از عوامل اصلی عفونت‌های بیمارستانی است که شیوع آن نیز رو به ازدیاد است. این باکتری سبب ایجاد طیف وسیعی از بیماری‌ها از جمله اندوکاردیت، استئومیلیت، پنومونی، سندرم شوک سمی، کورک یا دمل و غیره می‌شود (۱). در بسیاری از موارد منشأ عفونت کارکنانی هستند که در بینی خود ناقل این باکتری می‌باشند و تخمین زده می‌شود که ۲۵-۳۰ درصد افراد در جوامع مختلف در بینی خود ناقل استافیلوکوکوس اورئوس هستند (۲).

گسترش روزافزون مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به گونه‌های استافیلوکوکوس اورئوس یکی از معضلاتی است که امروزه پزشکان با آن سر و کار دارند و به علت پیدایش سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در استافیلوکوکوس اورئوس روز به روز تعداد آنتی‌بیوتیک‌های در دسترس برای درمان این عفونت‌ها کاهش می‌یابد (۳).

گزارش EARSS (Europe antimicrobial surveillance system)

نشان می‌دهد که شیوع MRSA در ۲۷ کشور اروپایی از یک درصد در اروپای شمالی تا ۴۰ درصد در اروپای غربی و جنوبی متغیر است. همچنین تحقیقات در ایالت متحده نیز بیانگر آن است که از میان بیش از ۱۰۰۰ ایزوله S.aureus، ۴۳/۷-۴۱ درصد ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین می‌باشند (۳).

مطالعاتی نیز در زمینه میزان افراد ناقل با MRSA صورت گرفته است که براساس آن شیوع MRSA در میان کارکنان مراکز بهداشتی ژاپن و عربستان به ترتیب ۳۶-۱۶ درصد و ۱۸/۳ درصد است (۴).

تحقیقات انجام شده در ایران نیز نشان داد که ۹/۹ درصد از سویه‌های S.aureus جدا شده از بیماران و کارمندان مراکز بهداشتی مقاوم به متی‌سیلین می‌باشد. میزان MRSA و مقاومت ضدباکتریایی بیشتر در سویه‌های S.aureus جدا شده از عفونت‌های بالینی (۲۵ درصد) و ناقلین (۷۹ درصد) بود (۵). دیگر مطالعات انجام شده در ایران نیز بیانگر آن است که شیوع سویه‌های MRSA در کارکنان مراکز بهداشتی ۱۱/۸ درصد می‌باشد (۴).

با توجه به موارد فوق و افزایش روزافزون مقاومت S.aureus نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها نظیر اریترومايسين، تتراسایکلین و حتی سویه‌هایی با مقاومت نسبی یا مقاوم به ونکومايسين، سبب شد که تلاش مستمر برای یافتن داروهای جدید ضد میکروبی صورت گیرد. یکی از منابع یافتن چنین داروهای گیاهانی هستند که در طب غنی و سنتی ایران به صورت تجربی از آنها استفاده شده است (۶). از آنجا که ترکیبات موجود در گیاهان در مقابله با بسیاری از بیماری‌ها به بشر یاری رسانده است، شاید برای غلبه بر بیماری‌های ناشی از این باکتری‌ها یکی از طرق چاره روی آوردن مجدد به گیاهان و ترکیبات موجود در آنها باشد که استفاده از عصاره‌های گیاهی به عنوان درمان بیماری در اواخر سال ۱۹۹۰ مورد توجه قرار گرفته است (۷).

این مطالعه به منظور بررسی اثر ضدباکتریایی عصاره اتانولی ۲۰ گونه از گیاهان دارویی استان گلستان علیه سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم و حساس به متی‌سیلین با روش دیسک - دیفیوژن صورت گرفت.

روش بررسی

شناسایی و جمع‌آوری گیاهان

بعد از شناسایی گیاهان موردنظر (جدول ۱) و جمع‌آوری آنها از نواحی مختلف استان، گیاهان در هر بارיום دانشگاه آزاد اسلامی مورد تایید قرار گرفتند. سپس قسمت‌های موردنیاز گیاهان جدا شده و در شرایط مناسب (تاریک و خشک) نگهداری و به طور کامل خشک گردیدند. بعد از خشک شدن و آسیاب کردن قسمت‌های مورد استفاده عصاره‌گیری انجام شد.

ویژگی‌ها، مصارف بالینی و قسمت‌های مورد استفاده گیاهان در جدول ۱ آمده است.

آماده‌سازی عصاره اتانولی گیاهان

عصاره‌گیری به روش پرکولاسیون انجام شد. بدین ترتیب که ۵۰ گرم از پودر نمونه گیاهی مورد نظر را داخل دکانتور ریخته و سپس مرحله به مرحله به آن اتانول ۷۰ درصد افزودیم. برای عصاره‌گیری بسته به نوع گیاه (جوبی - علفی) زمان ۲۴-۷۲ ساعته صرف شد تا گیاه کاملاً ماسره شده و حداکثر مواد موثره داخل اتانول حل شود (۸).

استاندارد مقایسه شد (۱۰ و ۱۱). نتایج حاصل از آن شامل ۸ سویه *S.aureus* مقاوم به متی‌سیلین، ۴ سویه *S.aureus* حساس به متی‌سیلین بود و همچنین از سویه‌های استاندارد ATCC ۲۵۹۲۳ (حساس به متی‌سیلین) و PTCC ۱۴۳۱ (مقاوم به متی‌سیلین) نیز برای مطالعه استفاده شد.

بررسی اثر ضدباکتریایی عصاره‌ها

الف) روش دیسک دیفیوژن

برای تعیین حساسیت سویه‌های باکتری نسبت به عصاره الکلی گیاهان از روش دیسک دیفیوژن استفاده شد. بدین ترتیب که ابتدا از تمام سویه‌های باکتریایی سوسپانسیون میکروبی معادل ۰/۵ مک فارلند $10^8 \times 1/5$ cfu/ml تهیه شد و سپس با ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه شده بر سطح محیط مولر هیتون آنگاه کشت یکنواخت انجام شد. آنگاه دیسک‌های بلانک استریل (ساخت پادتن طب) را در غلظت‌های مختلف تهیه شده از عصاره الکلی گیاهان ۲۵mg/ml، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ غوطه‌ور کردیم و در نهایت

پس از عصاره‌گیری مرحله بعد، جداسازی عصاره از حلال بود که این مرحله به وسیله دستگاه پمپ خلا (تقطیر در خلاء) انجام شد (۷ و ۹).

سویه‌های باکتری

باکتری‌های مورد استفاده سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس حساس و مقاوم به متی‌سیلین بودند که از نمونه‌های بالینی و از بیماران در شهر گرگان جدا شد.

این باکتری‌ها با استفاده از روش استاندارد شناسایی و به بخش میکروب‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی گرگان انتقال یافت. سپس برای تعیین حساسیت باکتری به متی‌سیلین از روش دیسک دیفیوژن استفاده شد. بدین ترتیب که ۲۰۰ میکرولیتر از کدورت معادل ۰/۵ مک فارلند تهیه شده از هر سویه باکتری به محیط حاوی ۴ درصد نمک طعام تلقیح گردید. پس از انجام کشت دیسک اگزاسیلین را روی آن قرار دادیم و بعد از ۲۴ ساعت اتوگداری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قطر هاله عدم رشد اطراف هر دیسک اندازه‌گیری و با مقدار

جدول ۱: مشخصات ۲۰ گونه گیاه مورد بررسی علیه سویه‌های *MSSA* و *MRSA*

بخش‌های مورد استفاده	خواص درمانی	خانواده گیاه	نام محلی گیاه	نام علمی گیاه
برگ	موثر علیه <i>s.aureus</i> (۱۲)، <i>ketbsiella</i> ، <i>E.coli-pseudomonas.spp</i>	Myrtaceae	همیشه سبز - اکالیپتوس	<i>Eucalyptus. Global</i>
برگ	معمولی، آنتی‌سپتیک (۷)	Limniaceae	نعناع	<i>Menta. Piperita</i>
کل گیاه	معمولی موثر بر <i>s.aureus</i> (۷) و <i>E.coli</i>	Limniaceae	رومارون، رزماری	<i>Rosmarinus. Officinalis</i>
کل گیاه	ضد میکروب، ضدقارچ و گندزدا (۷)	Limniaceae	آویشن باغی	<i>Thymus vulgaris</i>
پوست میوه	درمان زخم، اولسر و درمان کرم (۱۳ و ۱۴)	Limniaceae	انار	<i>Punica granatum</i>
کل گیاه	معمولی (۷)	Hypericaceae	گل راعی، گل تره	<i>Hypericum perforatum</i>
میوه	موثر علیه <i>sviridans</i> ، <i>s.aureus</i> ، <i>p.pyogens</i> ، ضدانگل (۶)	Ranunculaceae	سیاه دانه، سیاه تخمه، شونیز	<i>Nigella . sariva</i>
میوه	آنتی‌سپتیک (۱۵)	Copressaceae	عرعر، ارس، درخت پیرو	<i>Juniperus. Communis</i>
برگ	موثر علیه <i>E.coli</i> ، <i>proteus</i> ، <i>Kleseilla</i> ، <i>Salmonella</i> و ضدقارچ (۱۶)	Urticaceae	گزنه	<i>Urtica.dioica</i>
کل گیاه	ضد ویروس، آنتی‌بیوتیک و دفع کرم (۱۷)	Liliaceae	سیر	<i>Allium. Sativum</i>
ریشه	موثر علیه <i>N. menangiridis</i> ، <i>s.aureus</i> ، <i>E. Coli</i> (۱۵ و ۷)	Berberidaceae	زرشک	<i>Berberis. Vulgaris</i>
میوه	التیام زخم (۱۳)	Brassicaceae	کلم	<i>Brasicu. Napus</i>
کل گیاه	ضد کرم با اثر قوی ضد عفونی‌کننده (۱۵)	Astraceae	افسنطین	<i>Artemisia Absinthium</i>
سرشاخه گلدار	درمان زخم معده، ضدباکتری به خصوص باکتری گرم مثبت ضدقارچ، آنتی‌سپتیک (۱۵ و ۷)	Astraceae	بابونه، بابونه دارویی	<i>Matricaria chamomila</i>
دانه	ضدباکتری درمان سرماخوردگی (۱۳)	Apiaceae	زیره سبز	<i>Cuminum. Cyminum</i>
دانه	درمان اسهال خونی تب‌روده‌ای (۱)	Malvaceae	پنبه	<i>Gossypium herbaceum</i>
کل گیاه	اشتها آور افزایش ضریان قلب (۱)	Rutaceae	اسپند	<i>Peganum Hermalla</i>
ریشه	درمان سرماخوردگی و عفونت مجاری ادراری و تنفسی (۳)	asteraceae	گل مخروطی ارغوانی	<i>Echinacea.purpurea</i>
کل گیاه	معمولی (۳)	Asteraceae	درمنه	<i>Artemisia herbaalba</i>
گل	ضدباکتری ضدقارچ (۳)	Tamariaceae	گزن	<i>Tamarix Aphylla</i>

مقدار عصاره خالص در هر دیسک ۱/۵mg، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۴ بود. دیسک‌های تهیه شده از غلظت‌های مختلف عصاره‌ها با فاصله معین از یکدیگر و از لبه پلیت روی سطح آگار قرار داده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و سپس با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک‌های حاوی عصاره به وسیله خط کش میلی‌متری نتایج مورد بررسی قرار گرفت (۱۸). قطر هاله عدم رشد کمتر از ۷mm به عنوان مقاوم، ۷-۹mm نسبتاً مقاوم، ۱۰-۱۲mm نسبتاً حساس و بیشتر از ۱۲mm به عنوان حساس در نظر گرفته شد (۱۹).

همچنین از دیسک حاوی پروپیلن گلیکول (رقیق کننده عصاره‌ها) به عنوان کنترل منفی و از دیسک حاوی ۳۰ میکروگرم ونکوماسین به عنوان کنترل مثبت استفاده شد و برای حصول اطمینان این آزمایش برای هر سویه باکتری سه بار تکرار گردید و میانگین قطر هاله در سه بار به عنوان قطر نهایی ثبت شد.

(ب) روش Broth Microdilution

در این روش حداقل غلظت بازدارندگی از رشد عصاره الکلی گیاهانی که اثر ضدباکتریایی خوبی در روش دیسک-دیفیوژن داشتند، تعیین می‌شد بدین ترتیب که ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون 5×10^5 cfu/ml باکتری را به چاهک‌های حاوی ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف عصاره ۰/۲-۲۰۰mg/ml اضافه کردیم. تنها چاهک اول (کنترل مثبت) حاوی سوسپانسیون میکروبی و محیط Muller Hinton Broth و چاهک دوم (کنترل منفی) حاوی سوسپانسیون میکروبی و ونکوماسین ۳۰ میکروگرم بود. بلافاصله OD را با استفاده از دستگاه الایزا در طول موج ۶۳۰ نانومتر قرائت کرده و سپس نمونه را در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار دادیم و مجدداً OD آن را در بازه‌های زمانی ۱۲ و ۲۴ ساعت قرائت کردیم که در نهایت حداقل غلظتی از عصاره که کاهش OD در آن مشاهده می‌شد به عنوان MIC در نظر گرفته می‌شد (۲۰-۲۲).

تجزیه و تحلیل داده‌ها بر اساس آزمون‌های F، دانکنو و توکی صورت گرفت. برای تعیین فرض طبیعی بودن داده‌ها و یکسان بودن واریانس‌ها و بررسی تفاوت‌های معنی‌دار قطر

هاله عدم رشد در مقادیر ۰/۵، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۴ میلی گرم از عصاره روی ۸ تیمار از ۲۰ گونه مورد بررسی که اثر ضدباکتریایی بسیار خوبی در همه غلظت‌ها داشتند، از آزمون F در سطح ۰/۰۵ استفاده شد.

برای بررسی و تعیین این که در مقدار ثابت عصاره اثر ضدباکتریایی کدام گیاه با هم اختلاف معنی‌داری دارد، از آزمون توکی و برای تعیین بهترین گیاه از آزمون دانکن استفاده شد.

یافته‌ها

از میان ۲۰ گونه گیاه مورد بررسی اثر ضدباکتریایی عصاره اتانولی گیاهان اسپند، درمنه، سیاه‌دانه، اکالیپتوس، زرشک، گل راعی، انار و گز در همه مقادیر مورد بررسی عصاره (۰/۵، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۴ میلی گرم) اثر ضدباکتریایی بسیار خوبی علیه سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم و حساس به متی‌سیلین داشتند. براساس آزمون دانکن در مقایسه اثر ضدباکتریایی این ۸ گونه گیاهی مؤثر علیه سویه‌ها مؤثرترین گیاه علیه ۱۴ سویه مورد بررسی اسپند، سیاه‌دانه، انار و اکالیپتوس بود و بهترین اثر مربوط به گیاه اسپند و گیاهان اکالیپتوس، انار و سیاه‌دانه اثرات تقریباً برابری داشتند. در مقایسه اثر ضدباکتریایی گیاهان علیه سویه‌های MRSA و MSSA اثر ضدباکتریایی گیاهان درمنه، سیاه‌دانه، گل راعی، انار، زرشک و گل گز علیه سویه‌های MRSA بسیار قوی‌تر از MSSA بوده و گیاه اسپند اثر ضدباکتریایی قوی‌تری علیه سویه‌های MSSA داشت. اما در مورد عصاره اتانولی، اکالیپتوس تقریباً تأثیر ضدباکتریایی برابری علیه سویه‌های MRSA و MSSA داشت.

نتایج حاصل از آزمون F نشان داد که مقادیر P-value آزمون F در تمام مقادیر مورد بررسی عصاره ۸ گیاه درمنه، اسپند، زرشک، اکالیپتوس، گل راعی، سیاه‌دانه، گز و انار صفر بود ($P < 0/05$)، که این خود بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین اثر ضدباکتریایی حداقل دو گیاه در مقدار ثابت عصاره اتانولی گیاهان مختلف بود که با آزمون توکی نیز تعیین شد.

در بررسی تأثیر ضدباکتریایی سایر گیاهان مقدار ۰/۴ میلی گرم از عصاره اتانولی گیاهان افسنتين، کلزا، نعناع

جدول ۲: میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره اتانولی گیاهان علیه سویه های MRSA و MSSA برحسب میلی متر

MSSA					MRSA					سویه باکتری
*R/S	مقدار عصاره (میلی گرم)				مقدار عصاره (میلی گرم)				نام گیاه	
	۴	۲	۱	۰/۵	۴	۲	۱	۰/۵		
R>S	1۴	1۲/۵	11	1۰	1۹	1۵	1۳/۵	1۳	Nigella. sativa	
R>S	1۵/۵	1۴/۵	1۳	1۰/۵	1۷	1۵	1۴/۵	11/۵	Eucalyptus. global	
R>S	1۰/۵	1۴	1۵	1۵/۵	1۳	1۴/۵	1۸/۵	۲۰	Hypericum. perforatum	
R>S	۸	۸	۸	۸	11/۵	1۰/۵	۹/۵	۸	Brasica. napus	
R>S	۸/۵	۸/۵	۸/۵	۸	11/۵	1۰	۹	۸/۵	Cuminum. cyminum	
R=S	۷/۲	۸	۸/۶	۸/۹	۷/۶	۸/۴	۸/۷	۹	Urtica. dioica	
R=S	۷	۷/۵	۷/۷	۸	۷/۵	۷/۵	۷/۵	۸	Juniperus. communis	
R>S	۸/۸	۰	۰	۰	1۰/۶	۸/۶	۰	۰	Matricaria. chammomila	
R=S	۷	۷	۶/۵	۶/۵	۸/۵	۸	۸	۰	Rosmarinus. officinalis	
R=S	۸/۵	۰	۰	۰	۷/۵	۰	۰	۰	Menta. piperita	
R>S	11	1۰	۹	۸	۲۲/۵	1۸	1۵	11/۵	Artemisia. herbaalba	
R<S	۲۰	1۶	1۴/۵	11/۵	1۸	1۵	1۳	11	Peganum. hermala	
R>S	1۵/۵	1۳/۵	1۲	1۰	1۲/۵	11/۵	1۰	۹	Berberis. vulgaris	
R=S	1۲/۸	1۲	11/۲	1۰	1۲/۲	11/۶	11	1۰	Tamarix. aphylla	
R>S	۹	۷/۵	۶	۰	1۰/۵	۸/۲	۷/۵	۰	Thymus. vulgaris	
R=S	۸	۸	۸/۵	۸/۵	۹	۸/۵	۸/۵	۸/۵	Artemisia. absinthium	
R=S	۷	۷/۳	۷/۶	۷/۶	۷	۷	۷	۷	Allium. sativum	
R=S	۹	۸/۵	۹	۹/۵	۷/۵	۹	۹	۹	Gossypium. herbaceum	
P=S	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	Echinaceae. purpurea	
R>S	1۶/۲	1۴/۴	1۲	1۰/۸	1۷/۷	1۶/1	1۴/۶	1۳/۶	Punica. granatum	

 $P < 0.05$

* میانگین قطر هاله عدم رشد گیاهان علیه سویه های MRSA و MSSA با هم مقایسه شد.

می باشد. یعنی با کاهش میزان عصاره اثر ضدباکتریایی کاهش یافته است. به جز گل راعی که بهترین تاثیر ضدباکتریایی آن در مقادیر پایین تر عصاره مشاهده شد. به طوری که در مقدار ۴ میلی گرم عصاره گل راعی، میانگین قطر هاله عدم رشد در مورد ۱۴ سویه مورد بررسی ۱۱ میلی متر و در مقدار ۰/۵ میلی گرم از عصاره میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۶ میلی متر می باشد.

۸ گیاهی که اثر ضدباکتریایی بسیار خوبی در همه مقادیر عصاره داشتند، میانگین قطر هاله عدم رشد آنها در مقایسه با

فلفلای علیه ۳ سویه، زیره سبز و بابونه علیه ۷ سویه و آویشن باغی علیه ۱۲ سویه از ۱۴ سویه مورد بررسی اثر ضدباکتریایی خوبی داشتند. اما در مورد سایر گیاهان از جمله گزنه، سیر، درخت پیرو، اکلی ناسه، عملاً اثر مهارتی مناسبی علیه هیچ کدام از سویه های مورد بررسی به دست نیامد. میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره اتانولی ۲۰ گیاه مورد بررسی در جدول ۲ آورده شده است.

همچنین در این تحقیق مشاهده شد که تاثیر نهایی عصاره ها روی سویه های باکتریایی مورد بررسی وابسته به مقدار عصاره

گل‌راعی، انار و گز بهترین اثر ضدباکتریایی را دارا می‌باشند و حتی در مواردی تاثیر ضدباکتریایی آنها از آنتی‌بیوتیک ونکومايسين (به عنوان کنترل) نیز بیشتر بود.

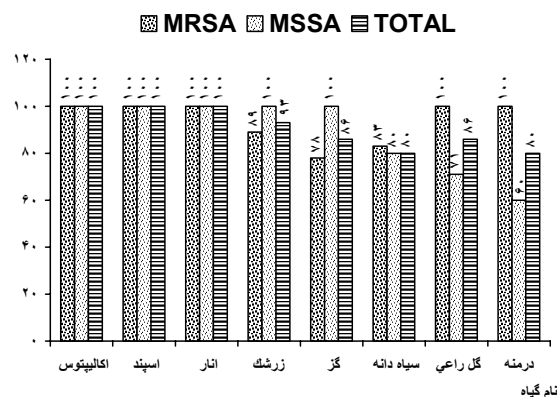
در همه گیاهان به جز گل‌راعی تاثیر عصاره‌ها با کم شدن مقدار آنها در دیسک کاهش می‌یابد. در واقع اثر ضدباکتریایی عصاره‌ها در مقادیر بالاتر به نحو بارزتری پدیدار می‌گردد.

نتایج MIC نیز نشان داد که عصاره اتانولی این گیاهان حتی در غلظت‌های بسیار پایین اثر ممانعت از رشد خوبی را دارا می‌باشند. در مقایسه با بررسی‌هایی که در مورد گیاهان موثر علیه استافیلوکوکوس اورئوس در کشورهای دیگر صورت گرفته است و تعیین MIC این گیاهان نشان می‌دهد که گیاهان مورد بررسی در این مطالعه اثر بسیار خوبی علیه سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس به خصوص استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین دارند. به طوری که بررسی عصاره الکلی ۶ گونه از گیاهان دارویی نیجریه علیه سویه MRSA نشان می‌دهد که حداقل میزان MIC به دست آمده از گیاهان موثر حدود ۰/۱ mg/ml می‌باشد (۲۳). همچنین در مطالعه‌ای که در ایتالیا روی عصاره ۷ گونه گیاهی علیه باکتری‌های مختلف از جمله استافیلوکوکوس اورئوس انجام شد، نیز حداقل میزان MIC حدود ۰/۱ mg/ml را نشان داد (۱۹)، که در مقایسه با حداقل MIC به دست آمده از گیاهان مورد مطالعه در این تحقیق که حدود ۰/۰۲ mg/ml می‌باشد، نشان‌دهنده تاثیر بسیار خوب این گیاهان حتی در غلظت‌های بسیار پایین است.

نتایج آزمون‌های آماری نیز خود بیانگر آن است که اثر ضدباکتریایی این گیاهان در مقادیر ثابت اختلاف معنی‌داری با هم دارند.

همه‌گیری بیمارستانی استافیلوکوکی و گسترش مقاومت استافیلوکوکوس اورئوس خصوصاً MRSA، مشکلی جدی محسوب می‌شود. این باکتری یکی از معضلات بهداشت عمومی است که به خاطر افزایش مقاومت آن به عوامل ضد میکروبی حائز اهمیت است. در طی سالیان متمادی داروهای طبیعی به خصوص گیاهان دارویی اساس و حتی در برخی موارد تنها وسیله درمان محسوب می‌شدند. از آنجا که

میانگین قطر هاله عدم رشد سویه‌های مختلف در برابر ونکومايسين که ۱۶ میلی‌متر بوده و به عنوان کنترل در نظر گرفته شده بود، بیشتر می‌باشد. در بررسی فعالیت ضدباکتریایی گیاهان علیه سویه‌های مورد بررسی عصاره اتانولی اسپند، اکالیپتوس و انار به طور ۱۰۰ درصد بر علیه همه سویه‌ها موثر می‌باشد (نمودار ۱).



نمودار ۱: مقایسه فعالیت عصاره اتانولی گیاهان موثر علیه سویه‌های MRSA و MSSA

با به دست آوردن MIC گیاهان دارویی موثر علیه سویه‌های MRSA و MSSA مشخص شد که تقریباً همه این گیاهان در غلظت‌های پایین نیز در برابر این سویه‌ها اثر بسیار خوبی دارند (جدول ۳).

جدول ۳: مقدار MIC₉₀ عصاره اتانولی گیاهان دارویی موثر بر MRSA و MSSA

نام گیاه	بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر			
	MSSA st	MSSA (n=4)	MRSA st	MRSA (n=8)
<i>Eucalyptus. global</i>	۰/۳۹	۰/۳۹	۰/۰۹	۰/۱۸
<i>Peganum. hermala</i>	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۲
<i>Punica. granatum</i>	۰/۰۴	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۱
<i>Berberis. vulgaris</i>	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۴	۰/۷۸
<i>Tamarix. aphylla</i>	۰/۰۴	۰/۳۹	۰/۰۴	۰/۳۹
<i>Nigella. sativa</i>	۰/۰۲	۰/۰۴	۰/۰۲	۰/۰۴
<i>Hypericum. perforatum</i>	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۱۸	۰/۱۸
<i>Artemisia. herbaalba</i>	۰/۰۲	۰/۳۹	۰/۰۴	۰/۳۹

بحث

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که در بررسی اثر ضدباکتریایی عصاره اتانولی ۲۰ گونه از گیاهان دارویی استان گلستان علیه سویه‌های MRSA و MSSA، عصاره اتانولی گیاهان اکالیپتوس، اسپند، سیاه دانه، درمنه، زرشک،

نتیجه گیری

از آنجا که در کشورهای مختلف مقاومت روزافزون استافیلوکوکس اورئوس نسبت به متیسیلین و سایر آنتی بیوتیک ها دیده می شود، نتایج این مطالعه و به خصوص تاثیر بسیار غلظت های بالای عصاره الکلی گیاهان روی MRSA و MSSA به خصوص MRSA می تواند حائز اهمیت باشد و بیانگر آن است که در کنار نتایج موثر عصاره روغنی، متانولی، کلروفرمی و اسانس این گیاهان که در مطالعات دیگران به اثبات رسیده است، تاثیر عصاره الکلی آنها نیز مطلوب و حائز اهمیت می باشد.

به هر حال کاربرد بالینی این گیاهان نیازمند مطالعات بیشتر و وسیع تر است و در صورت موفقیت آمیز بودن و استاندارد نمودن نتایج آنها می توان از این گیاهان به عنوان جایگزین داروهای ضد میکروبی کم اثر فعلی استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

از کارشناسان محترم آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده پزشکی گرگان و کلیه کارکنان شرکت دارویی نیاک و آزمایشگاه دانش که در طی انجام این تحقیق از مساعدت و همراهی آنان بهره مند شدیم، تشکر می نمایم.

References

- 1) Shopsis B, Kreiswirth BN. *Molecular epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Emerg Infect Dis. 2001;7(2):323-6.
- 2) Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. *Nasal carriage of Staphylococcus aureus: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks*. Clin Microbiol Rev. 1997;10(3):505-20.
- 3) Tiemersma EW, Bronzwaer SL, Lyytikäinen O, Degener JE, Schrijnemakers P, Bruinsma N, et al. *European Antimicrobial Resistance Surveillance System Participants. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Europe, 1999-2002*. Emerg Infect Dis. 2004;10(9):1627-34.
- 4) صادری، ح.، اولیاء، پ.، ظفرقندی، ن.، جلالی ندوشن، م. *ارزیابی مقاومت آنتی بیوتیکی استافیلوکوکوس اورئوس های جدا شده از بینی پرسنل در بیمارستان آموزشی - درمانی دانشگاه شاهد (۱۳۸۱-۱۳۸۲)*. مجله علمی-پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مازندران. بهار ۱۳۸۳. سال چهارم شماره ۴۲. صفحات ۶۹ تا ۷۵.
- 5) Mansouri S, Khaleghi M. *Antibacterial resistance pattern and frequency of methicillin-resistant staphylococcus aureus isolated from different sources in southeastern Iran*. Im J Med Sci. 1997; 22(2&3):93-96.
- 6) World Health organization (WHO). *The promotion and development of traditional medicine*. Thechnical report series.

استفاده از داروهای گیاهی دیدگاهی است که امروزه در درمان و حفظ سلامتی تاکید بسیار بر آن است و از طرفی بسیاری از گیاهانی که در طب سنتی استفاده می کنیم، بومی هستند، بررسی هایی در میزان اثربخشی گیاهان دارویی روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و MRSA در نقاط مختلف جهان صورت گرفته است. تحقیقات انجام شده در نیجریه روی ۶ گونه از گیاهان دارویی آن منطقه نشان داد ۴ گونه که به طور معمول به وسیله گیاه پزشکان در درمان عفونت های پوست و عفونت های دستگاه تنفسی استفاده می شود، بر علیه سویه های MRSA موثرند (۱۱).

بررسی های Sherry نشان داد که اسانس اوکالیتوس علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم بسیار موثر است (۲۴). تحقیقاتی نیز در سال ۲۰۰۴ روی روغن سیاه دانه، عصاره متانولی و کلروفرمی آن در ایران صورت گرفت که بیانگر اثرات بازدارندگی خوب آن علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس می باشد (۹).

در مورد گیاه زرشک مطالعاتی در کلرادو انجام شده است که نشان می دهد در گیاهان تیره berberis ترکیباتی وجود دارد که تاثیر بازدارندگی آن علیه استافیلوکوکوس اورئوس از کلرامفنیکل هم قوی تر است (۲۵).

1978; pp: 622.

- 7) Murphy Cowan M. *Plant Products as Antimicrobial Agents*. Clinical Microbiology Reviews. 1999; 12(4): 564-582.
- 8) Dulger B, Gonuz A. *Antimicrobial activity of certain plants used in Turkish traditional medicine*. Asian Journal of Plant Sciences. 2004; 3(1): 104-107.
- 9) Mashhadian NV, Rakhshandeh H. *Antibacterial and antifungal effects of Nigella sativa extracts against S. aureus, P. aeruginosa and C. albicans*. Pak J Med Sci. 2005;21(1):47-52.
- 10) Roberts S, Young H, Faulkner S, Bilkey M, Eyres S, Renshaw S, et al. *Value of broth cultures in detecting methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. N Z Med J. 2002; 115(1162):U191.
- 11) Finegold M. *Printed in the United States of America, The C.V. 8th Ed. Mosby Company. St Louis. Missouri . 1990; p:329.*
- 12) Tvivedi NA, Hotchandani SC. *Study of the antimicrobial activity of oil Eucalyptus*. Indian Journal of Farmacology. 2004; 36(2): 93-94.
- ۱۳) آخوندزاده، ش. *دایرة المعارف گیاهان دارویی ایران*. تهران. انتشارات ارجمند. ۱۳۷۹. صفحات ۴۷ و ۶۵ و ۸۳.
- ۱۴) زرگری، ع. *گیاهان دارویی*. جلد سوم. تهران. موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران.

۱۳۷۵. صفحات ۸۶ و ۸۸
- ۱۵) حاجی آخوندی، ع.، بلخ، ن. راهنمای کاربردی گیاهانی دارویی. تهران. دانشگاه آزاد اسلامی. مرکز انتشارات علمی. ۱۳۸۱. صفحات ۳۳ و ۶۶.
- 16) Beschia M, Leonte A, Oancea I. *Phenolic constituents with biological activity in vegetable extracts*. Univ-Galati, Fasc. 1984; 6: 23, 27.
- 17) Delola EC, Garagusi VF. *Inhibikion of mycobacteria by garlic (allium sativum) extract*. Animicrobial agents and chemotherapy. 1985;27(4): 485-86.
- 18) Andrews JM. *BSAC standardized disc susceptibility testing method*. J Antimicrob Chemother. 2001; 48-57.
- 19) Nostro A, Ger MP, Angelo VD, Cannatelli MAC. *Extraction methods and biouautography for evallution plant antimicrobial activity*. Applied Microbiology. 2000; 15:379-85.
- 20) National committee for clinical laboratory standards: Methods for dilution anti – microbial suceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 3rd Ed. Approved standartd: NCCLS document. NCCLS, Villanova, PA. 1993; 13(25): M7-A3.
- 21) George Manuselis, Coonie R. Mahon: Diagnostic microbiology. W.B. Saunders company. 1995;pp: 65-70.
- 22) Thornsberry C, McDougal LK. *Successful use of broth microdilution in susceptibility tests for methicillin-resistant (heteroresistant) staphylococci*. J Clin Microbiol. 1983; 18(5):1084-91.
- 23) Akinyemi KO, Oladapo O, Okwara CE, Ibe CC, Fasura KA. *Screening of crude extracts of six medicinal plants used in South-West Nigerian unorthodox medicine for anti-methicillin resistant Staphylococcus aureus activity*. BMC Complement Altern Med. 2005;5:6.
- 24) Trivedi NA, Hotchandani SC. *study of the antimicrobial activity of oil of Eucalyptus*. Indian J Pharmacol. 2004; 36(2): 93-94.
- 25) Colorado state university (cus) cooperative Extenstion: Agricultural Experiment station research discovers herbal treatment for antibiotic resistant staph. 2002; pp:7-5.