مجلهٔ علوم پزشکی مدرس
دورهٔ ۸ ، شمارهٔ ۱: از ۱۹ تا ۲۳
بهار و تابستان ۱۳۸٤

ارزیابی اثر ضد باکتریایی عصاره‌های آبی و الکلی اکالیپتوس بر سودوموناس آیروژینوزا

مرتضی ستاری[1*]، نسرین شهبازی[2]، شهین نجارپیرایه[3]

۱- استادیار، گروه باکتری‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
۲-کارشناس ارشد باکتری شناسی ، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
۳- استادیار، گروه باکتری‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

چکیده

هدف: در تحقیق حاضر اثر بازدارندگی از رشد عصاره اکالیپتوس به‌عنوان یک ماده ضدمیکروبی طبیعی گیاهی بر روی سویه‌های ATCC۲۷۸۵۳ و ۸۸۲۱M سودوموناس آیروژینوزا بررسی شد.

مواد و روشها: کمترین غلظت بازدارنده از رشد عصاره‌های آبی و الکلی به روش تهیه رقت در لوله و آگار تعیین شد. منحنی رشد باکتری در زمانهای مختلف تحت تأثیر عصاره بررسی و با شاهد مقایسه شد. ضریب فنلی عصاره‌ها به روش ریدل- والکر اندازه‌گیری شد.

نتایج و بحث: MIC برای عصاره الکلی رقت ۱/۸ (۳/۲mg/ml) و برای عصاره آبی رقت ۱/٤(۱۷/۵mg/ml) محاسبه شد. در غلظتهای کمتر از بازدارندگی رشد عصاره‌ها، با افزایش مقدار عصاره در مقایسه با نمونه شاهد سرعت رشد کاهش داشت. ضریب فنلی برای عصاره‌های الکلی و آبی اکالیپتوس بترتیب ۰/۰۳۸۱ و۰/۰۱۹ محاسبه شد.

نتیجه‌گیری: براساس نتایج حاصل از تحقیق حاضر، عصاره‌های خام الکلی و آبی اکالیپتوس بخوبی می‌توانند از رشد سودوموناس آیروژینوزا جلوگیری کنند و کاهش رشد سودوموناس آیروژینوزا در غلظتهای Sub-MIC دیده شد. به‌طور کلی گیاهان طیف وسیعی از فعالیتهای ضدمیکروبی را نشان می‌دهند و این می‌تواند به کشف انواع جدیدی از مواد ضد میکروبی در برابر باکتریهای مقاوم به دارو منجر شود.

کلیدواژگان: سودوموناس آیروژینوزا، اکالیپتوس، اثر بازدارندگی.

۱- مقدمه

بروز مقاومتهای دارویی و توانایی باکتریها در ایجاد عفونتهای حاد سبب شده است تا علاقه مجددی به گیاهان به‌منظور بررسی اثرات ضد میکروبی آنها به وجود آید. اکالیپتوس یکی از معروفترین گیاهان دارویی است که از دیرباز اثرات ضدمیکروبی و خواص دیگر آن مورد توجه بوده است. این گیاه منبع غنی از پلی فنلها و ترپنوئیدهاست و ترکیب اصلی برگ آن اکالیپتول یا سینئول(۷۰ تا ۸۰ درصد) می‌باشد [۱].

از اکالیپتوس برای درمان بسیاری از بیماریها مانند آنفلونزا، تونسیلیت، اسهال خونی و بیماریهای پوستی استفاده می‌شده است. عصاره برگ این گیاه دارای خواص ضد سرطانی، ضد التهابی، ضد درد، آنتی اکسیدان، ضد ازدیاد قند خون، ضد مالاریایی، ضد قارچی و ضد ویروسی است [۲، ۳، ٤]. همچنین این عصاره روی طیف وسیعی از باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی نظیر استافیلوکوکوس اورئوس، شیگلا دیسانتری، سالمونلا پاراتیفی، اشرشیا کولی، باسیلوس سرئوس و نیز قارچ کاندیدا آلبیکنس فعالیت ضد میکروبی از خود نشان داده است [۵].

* نشانی مکاتبه: دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه باکتری شناسی، صندوق پستی: ۱۱۱-۱٤۱۱۵
E-mail: sattarim@modares.ac.ir

سودوموناس آیروژینوزا باکتری گرم منفی و میله‌ای شکل است که در افراد دارای نقص ایمنی و سوختگی به‌عنوان یک باکتری بیماریزای فرصت طلب عمل می‌کند و به بسیاری از آنتی‌بیوتیکهای معمول مقاوم است. این باکتری دارای عوامل بیماریزای متعددی است و می‌تواند بیماریهای مختلفی را مانند باکتریمی و سپتی سمی، عفونتهای دستگاه تنفسی، ادراری و گوارشی تولید کند.

سودوموناس آیروژینوزا ۲۳٪ از کل باکتریهای جدا شده از بیماران، ۱٦٪ از پنومونیهای بیمارستانی، ۱۲٪ از عفونتهای مجاری ادراری کسب شده از بیمارستان، ۸٪ از عفونتهای زخم بعد از عمل جراحی و ۱۰٪ از عفونتهای خون بیمارستانی را تشکیل می‌دهد. استفاده گسترده از آنتی بیوتیکها و افزایش بیماران دارای نقص ایمنی باعث بروز مقاومتهای دارویی سودوموناس شده است. بنابراین استفاده از درمانهای جایگزین برای کنترل عفونتهای ناشی از این باکتری ضروری به‌نظر می‌رسد. هدف از این مطالعه بررسی آثار مهاری رشد عصاره‌های اکالیپتوس بر روی سودوموناس آیروژینوزا براساس ضریب فنلی است [٦].

۲- مواد و روشها

۲-۱- تهیه گیاه

برگهای تازه گیاه اکالیپتوس کامالدولنسیس از باغ کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس تهیه و پس از شناسایی استفاده شد.

۲-۲- تهیه عصاره‌های آبی و الکلی برگ اکالیپتوس

مقدار g ۱۰ از برگ تازه گیاه اکالیپتوس کامالدولنسیس را به قطعات کوچک خرد و سپس ۵۰ml اتانول ۹٦ درجه یا آب مقطر به آن اضافه شد. برای عصاره الکلی مخلوط حاصل به مدت ۲٤ ساعت در دمای آزمایشگاه نگهداری و هر چند ساعت یکبار با یک میله شیشه‌ای به هم زده شد. مخلوط آبی نیز به مدت ۲۰ دقیقه با شعله پایین جوشانده شد تا مایع کرم رنگی به‌دست آمد. مایع رویی پس از جمع‌آوری با دور ۳۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. عصاره به‌دست آمده (مایع رویی) را با اتانول یا آب مقطر به حجم اولیه رسانده، پس از عبور از صافی ۰/٤٥μ میکرونی در ظروف تیره ریخته و در دمای یخچال نگهداری شد [۷].

۲-۳- سویه‌های باکتری

سویه موکوئیدی سودوموناس آئروژینوزا ۸۲۲۱M به‌وسیلهٔ آقای دکتر اولیا اهدا گردید؛ سویه سودوموناس آیروژینوزا ATCC۲۷۸۵۳ نیز سویه دارای فلاژل است که از آزمایشگاه رفرانس بیمارستان بوعلی تهیه شد. هر دو سویه به‌صورت جداگانه بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت شده و به‌منظور استفاده در زمانهای مختلف در محیط اسکیم میلک حاوی ۱۰٪ گلیسرول در دمای ۷۰°C- نگهداری شدند.

برای اطمینان از جنس و گونه سویه‌های باکتری از رنگ‌آمیزی گرم، آزمایشهای: اکسیداز ، کاتالاز، اندول، هیدرولیزژلاتین، تولیدH_2S، اکسیداسیون، فرمانتوسیون(OF)، ایجاد همولیز بر آگارخوندار، توانایی حرکت در محیط نیمه‌جامد، تولید رنگدانه پیوسین، تعیین حساسیت به انواع آنتی‌بیوتیکها، توانایی مصرف قندهای: لاکتوز،گلوکز و مالتوز و همچنین آزمایش آرژنین دهیدرولاز استفاده شد.

۲-٤- تعیین وزن خشک عصاره‌های آبی و الکلی اکالیپتوس

ابتدا وزن یک لوله آزمایش تعیین و پس از آن ۱ml از عصاره‌های آبی یا الکلی 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 ۱ml از عصاره‌های آبی یا الکلی است. میانگین سه بار تکرار، به‌عنوان وزن خشک عصاره محاسبه شد.

۲-۵- اندازه‌گیری MIC به روش رقت در لوله

از پرگنه‌های حاصل از کشت ۲٤ ساعته سودوموناس آیروژینوزا (هر دوسویه آزمایشی به طور مجزا) به محیط کشت آبگوشت مولر هینتون تلقیح شد. پس از ٤ تا ٦ ساعت کرمخانه‌گذاری کدورت ۰/۵ مک فارلند ($1/5\times10^6$ باکتری در هر میلی‌لیتر) از سوسپانسیون میکروبی تهیه شد. این سوسپانسیون به هنگام آزمایش ۱:۱۰۰ رقیق گردید؛ سپس رقتهای ۱:۲ تا ۱:۱۰۲٤ از عصاره‌های آبی و الکلی به‌صورت مجزا در محیط آبگوشت مولر هینتون تهیه و از سوسپانسیون باکتریایی هم حجم هر رقت اضافه

شد (رقت نهایی عصاره‌ها ۱:٤ تا ۱:۲۰٤۸ بود). پس از ۲٤ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷°C به دلیل کدورت حاصل از ترکیب عصاره‌ها با محیط کشت تعیین MIC به‌وسیله کشت مجدد روی محیط آگاردار انجام گرفت [۸].

۲-٦- اندازه‌گیری MIC به روش رقت در آگار

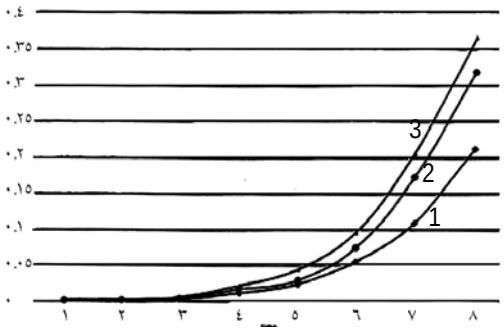
برای اجرای این آزمایش محیط کشت مولر هینتون آگار در حجمهای ۲۰ml حاوی غلظتهای ۱:٤ تا ۱:۲۰٤۸ از هر عصاره تهیه شد. به این ترتیب که برای تهیه ۲۰ml از محیط با غلظت عصاره مورد نظر، پس از توزین مقدار پودر مورد نیاز از مولر هینتون آگار برای حجم معادل ۲۰ml، ابتدا با حجم مناسبی از آب مقطر محیطها ساخته و استریل شدند. زمانی که دمای محیطها به ۵۰°C رسید رقت مناسب عصاره‌ها اضافه، حجم با آب مقطر تا ۲۰ml به تعادل رسانده و در پلیت ریخته شد (حداقل ۵ پلیت برای هر رقت). ۱-۲μl از سوسپانسیون میکروبی برابر با استاندارد ۰/۵ مک فارلند روی سطح کشت شد[۹].

۲-۷- بررسی تغییرات منحنی رشد سویه ATCC۲۷۸۵۳ در محیط حاوی غلظتهای کمتر از بازدارندگی رشد عصاره و شاهد بدون عصاره

هدف از رسم منحنی رشد تعیین تعداد باکتری در واحد زمان می‌باشد. برای تعیین منحنی رشد ۲ تا ۳ پرگنه از کشت ۲٤ ساعته سویه به محیط آبگوشت مولر هینتون اضافه شد (کدورت معادل لوله ۰/۵ مک فارلند). سپس ارلنهایی حاوی غلظت ۱:۳۲ و ۱:٦٤ از عصاره الکلی و نیز محیط فاقد عصاره تهیه شد. سوسپانسیون میکروبی اضافه شد($۰/۳ \times ۱۰^{۹}$ cfu/ml)جذب نوری در ۵۸۰nm در زمانهای صفر، ۱، ۲، ۳، ٤، ۵، ٦، ۷ و۸ ساعت تعیین شد. از روش کشت بر روی محیط نیز هم زمان در هر بار استفاده شد (نمودار ۱).

۲-۸- تعیین ضریب فنلی عصاره‌های آبی و الکلی اکالیپتوس

در روش ریدل- والکر رقتهایی از ماده میکروب‌کش که بتواند با رقتهایی از فنل(۱:۹۵ تا ۱:۱۱۵) معادل باشد، استفاده می‌شود. در این آزمایش، به هر ۵ml از ماده ضدعفونی کننده یا فنل در آب مقطر، در درجه حرارت ۱۸°c-۱۷ ml ۰/۲ از کشت ۲٤ ساعته باکتری ATCC ۲۷۸۵۳ اضافه شد. در فواصل زمانی ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ دقیقه مقدار ۱ لوپ استاندارد از لوله‌های حاوی ۵ml ماده و باکتری برداشته و دوباره وارد حجمهای ۵ml از محیط مایع بازیافت شد. سپس لوله‌ها برای مدت ٤۸-۷۲ ساعت در ۳۷ °C قرار داده شدند. سپس رشد یا عدم سپس رشد بررسی شد. طبق تعریف، ضریب فنلی ریدل- والکر عصاره‌ها از تقسیم رقتی از عصاره‌ها در واحدهای زمانی که بقای باکتری در آنها ادامه می‌یابد(رشد باکتری در زمانهای ۲/۵ و۵ دقیقه و عدم رشد در زمانهای ۷/۵ و۱۰ دقیقه)، تقسیم بر رقتی از فنل که نتیجه‌ای همانند دارند، محاسبه می‌شود [۱۰].



نمودار۱ منحنی رشد سودوموناس آیروژینوزا ATCC ۲۷۸۵۳ در مجاورت غلظتهای ۱/۲ و ۱/٤ کمتر از بازدارندگی عصاره (۱ و۲) در مقایسه با شاهد فاقد عصاره (۳)

۳- نتایج حاصل از تعیین ضریب فنلی برای عصاره‌های آبی و الکلی اکالیپتوس

رقتهای ۱/۱۰۵ فنل، ۱/٤ عصاره الکلی و ۱/۲ عصاره آبی در زمانهای ۲/۵ و ۱۰ دقیقه باعث مرگ تمام باکترها شدند. ضریب فنلی از تقسیم رقتی از عصاره که در زمانهای ۲/۵ و۵ به باکتریها اجازه رشد می‌دهد اما در زمانهای ۷/۵ و۱۰ دقیقه باعث مرگ باکتریها می‌شود، به رقتی از فنل با نتیجه‌ای همانند به‌دست می‌آید.

جدول ۱ رشد باکتری در زمانهای ۲/۵ و ۵ دقیقه و عدم رشد آن در زمانهای ۷/۵ و ۱۰ دقیقه در کشت ثانویه

ماده ضدعفونی کننده	زمان تماس باکتری و ماده ضدعفونی کننده به‌دقیقه			
	۲/۵	۵	۷/۵	۱۰
رقت ۱:٤ عصاره الکلی	+	+	-	-
رقت ۱:۲ عصاره آبی	+	+	-	-
رقت ۱:۱۰۵ فنل	+	+	-	-

ضریب فنلی عصاره الکلی: ۰/۰۳۸۱=٤:۱۰۵
ضریب فنلی عصاره آبی: ۰/۰۱۹=۲:۱۰۵

٤- بحث

امروزه مسأله مقاومت آنتی‌بیوتیکی به شکل بسیار جدی مطرح شده است. یکی از باکتریهای مقاوم به دارو *سودوموناس آیروژینوزا* است. این باکتری به‌عنوان یک عامل بیماریزای فرصت‌طلب و مهم در افراد نقص ایمنی می‌تواند از راههای مختلف به انواع آنتی‌بیوتیکها مقاوم شود. به همین دلیل تحقیق برای به‌دست آوردن مواد ضد میکروبی از منابع دیگری مانند گیاهان ضروری به‌نظر می‌رسد. یکی از این گیاهان اکالیپتوس است که آثار ضد میکروبی عصاره آن از دیرباز مورد توجه بوده و از آن برای درمان آنفولانزا، تونسیلیت، دیسانتری و بیماریهای پوستی در چین و قسمتهای مختلف دنیا استفاده شده است.

این گیاه متعلق به خانواده میرتاسه می‌باشد و از استرالیا به سایر نقاط دنیا انتشار یافته است. اکالیپتوس دارای گونه‌های مختلفی از جمله: آلبا، دگلوتیا، سالیبگنا، کامالدولنسیس، سیتری اودورا و... است [۱]. تقریباً تمام گونه‌های اکالیپتوس دارای آثار ضدمیکروبی‌اند. خصوصیات ضدمیکروبی این گیاه برعلیه باکتریهای مختلف مانند اشریشیا کلی، استاف اوریوس، سالمونلا به اثبات رسیده است.

مطالعات انجام شده بر روی عصاره‌های مختلف اکالیپتوس نشان داده است میکروارگانیزمهای *استافیلوکوکوس اوریوس، شیگلا دیسانتری، اشریشیا کلی، سالمونلا پاراتیفی، کاندیدا آلبیکانس و باسیلوس سوبتیلیس* بترتیب حساسترین تا مقاومترین اجرام میکروبی‌اند [۵].

در سال ۱۹۹٦ در ارتباط با *سودوموناس آیروژینوزا* MIC عصاره متانولی گونه گلوبولوس ۱۰mg/ml گزارش شد [۵]. مشابه آن در سال ۲۰۰۱ سی ری نی و همکارانش قطر هاله بازدارنده از رشد عصاره خام گیاه را برای این باکتری ۳۲mm گزارش و آن را به‌عنوان یک ماده ضدعفونی کننده مناسب معرفی کرد [۱۱]. نتایج حاصل از تحقیق ما نیز نشان داد که عصاره خام الکلی اکالیپتوس با غلظتی معادل ۳/۲ mg/ml و عصاره خام آبی آن با غلظتی معادل ۱۷/۵ mg/ml می‌تواند بخوبی از رشد سویه‌های استاندارد سودوموناس آئروژینوزا جلوگیری به عمل آورد. اختلاف موجود در مقادیر گزارش شده ناشی از روشها و سویه‌های مختلفی است که در آزمایشها به کار گرفته شده‌اند.

در مطالعات مختلفی که بر روی ترکیبات مؤثر اندام این گیاه براساس روشهای گوناگون استخراجی انجام شده است، وجود ترکیبات متعددی به اثبات رسیده است. از بین تمام مواد شناسایی شده اوکالیپتول یا آلفا سینیول بیشترین و مهمترین ماده است که دارای آثار بیولوژیک گوناگون از جمله، ضدمیکروبی است. MIC این ماده برای استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس ساب رینوس٦۷۱۵ بترتیب ۱۲/۵ و ٦/۲۵µm/ml گزارش شده است [۱۲]. در مطالعه حاضر نیز اوکالیپتول موجود در نمونه‌ها استخراج و تعیین عیار شد(نتایج ارائه نشده است).

کاهش رشد سودوموناس آیروژینوزا در مجاورت غلظتهای کمتر از بازدارندگی رشد آنتی‌بیوتیکها انجام شده است. در مورد آمیکاسین، جنتامایسین و توبرامایسین این آثار در سال ۱۹۹۱ به‌وسیلهٔ زانل و همکارانش بر روی سودوموناس آیروژینوزا انجام شد. براساس گزارش آنها با افزایش غلظت آنتی‌بیوتیکها از رشد باکتریها ممانعت بیشتری به عمل می‌آید [۱۳]. در زمینه عصاره‌های گیاهی این مسأله تا به حال زیاد مورد توجه قرار نگرفته است. بررسی منحنی رشد این باکتری در زمانهای مختلف نشان داد که عصاره اکالیپتوس در غلظتهای کمتر از بازدارندگی رشد هم می‌تواند موجب کاهش رشد باکتری شود؛ این کاهش با افزایش غلظت عصاره شدت بیشتری می‌یابد.

تعیین ضریب فنلی هر ماده ضدمیکروبی به‌عنوان میزان اثربخشی آن بر علیه باکتریها معرفی شده است [۱۰]. در زمینه عصاره‌های گیاهی نیز توجه به این مسأله ضروری است، بنابراین در مطالعه حاضر شاخصه مذکور نیز بررسی و ثابت شد عصاره الکلی آن نسبت به عصاره آبی آن ازخاصیت ضدمیکروبی بهتری برخوردار است.

به طور کلی گیاهان طیف وسیعی از فعالیتهای ضدمیکروبی و فعالیتهای دیگر را نشان می‌دهند؛ این موضوع ممکن است به کشف انواع جدیدتر آنتی‌بیوتیکها و داروهای دیگر کمک کند. درحال حاضر با توجه به این که اوکالیپتوس در اشکال مختلف در فارماکوپه‌های دارویی جهان وارد شده است [١٤] و در ایران نیز شرکتهای دارویی آن را به نامهای تجارتی بخور اوکالیپتوس و پماد انوکسولون تولید و عرضه می‌کنند، شایسته است در زمینه مکانیزمهای تأثیر آن بر روی باکتریها و نیز پاسخهای فیزیولوژیک میکروارگانیزمها در تماس با این مواد مطالعه بیشتری انجام شود.

۵- منابع

[۱] صمصام شریعت ه. معطر ف. گیاهان و داروهای طبیعی، چاپ دوم، اصفهان: انتشارات مشعت؛ ۱۳۷۰. ص ٤۳۱-٤۳۲.

[2] Takasaki M, Konoshima T. Etoh H. Cancer chemo preventive activity of euglobal-G1 from leaves of Eucalyptus grandis. Can. Let. 2000; 155: 61-65.

[3] Siddiqui B, Sultana I. Triterpenoidal constituents from Eucalyptus camaldulensis var. Obtusa leves. Phytochem 2004; 54: 861-865.

[4] Adebola O, Olusegun E. Olayide N. Antimicr6bial activity of the essential oils of five Eucalyptus species growing in Nigeria. Fitotera 1999; 70: 526-528.

[5] Srinivasan D, Nathan S, Suresh T. Antimicrobial activity of certain indian medicinal plants used in folkoric medicine. J. Ethnopharmacol. 2001; 74: 217-220.

[6] Van Deleden Ch, Iglewski B.H. Cell to cell signaling and Pseudomonas aeruginosa infections. Emerg. Infect. Dis. 1998; 4: 551-559.

[7] Ahmad I. Beg AZ. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogen. J. Ethnopharmacol. 2001; 74: 113-123.

[8] Finegold S.M, Martin WJ. Diagnostic microbiology. 6nd edition, Missouri: The C.V. Mosby Company Inc., 1982; pp. 532-659.

[9] Davis B.I. The importance of the geometric mean MIC. J. Antimicrob. Chemothar. 1990; 25: 471-472.

[۱۰]فضلی بزاز ص. میکروبشناسی دارویی، چاپ چهارم، مشهد، انتشارات دانشگاه علوم پزشکی مشهد؛ ۱۳۶۷. ص. ۳۱۷ـ ۳۱۹.

[11]Navarro V. Villarreal M.L., Royas G. Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases. J. Ethnopharmacol. 1996; 53: 143-147.

[12]Osava K., Yasuda H., Morita H., Eucalypton from Eucalyptus globolus. Phytochem. 1995; 40: 183-184.

[13]Zhanel G.G., Kavlwosky J.A., Davidson RJ., Hoban DJ. Antimicrobial activity of Sub inhibitory concentration of amino glycosides against Pseudomonas aeruginosa as determined by the killing-curve method and the post antibiotic effect. Chemoth. 1991; 37: 114-121.

[14] Council of Europe. European Pharmacopoeia. 3rd ed., Strasburg: Council of Europe, 1999.