

بررسی اثرات ضدباکتریایی عصاره آبی گیاه شبدر ترشک و مقایسه اثر آن با آنتی بیوتیک‌های متداول در درمان عفونت‌های ناشی از استافیلوکوک اورئوس و اشریشاکلی

هیام حسینی^{۱*}، سمیه هندالی^۱، محمدرضا پریشانی^۲، غلامرضا قزلباش^۲، عبدالغنی عامری^۳

۱- دانشجوی رشته زیست‌شناسی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز
۲- مربی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز
۳- مربی، گروه آب‌شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز
*آدرس مکاتبه: اهواز، دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی
تلفن: ۰۹۱۶۳۲۳۰۸۶۵، نمابر: ۳۳۳۱۰۴۵ (۰۶۱۱)
پست الکترونیک: Hosseini_hayam@yahoo.com

تاریخ تصویب: ۸۸/۶/۳۱

تاریخ دریافت: ۸۶/۱۲/۲۰

چکیده

مقدمه: استافیلوکوک اورئوس و اشریشاکلی از مهم‌ترین عوامل عفونت‌زا برای انسان هستند از طرفی با افزایش مقاومت باکتری‌ها نسبت به داروهای شیمیایی و عوارض جانبی کم گیاهان دارویی، امروزه گیاهان دارویی مورد توجه قرار گرفتند. هدف: در این تحقیق اثر ضدباکتریایی عصاره آبی گیاه شبدر ترشک^۱ از خانواده اکسالیداسه^۲ بر روی سویه‌های استافیلوکوک اورئوس و اشریشاکلی ارزیابی شد.

روش بررسی: در این بررسی از روش انتشار دیسک به خاطر سهولت، صحت و سرعت عمل استفاده شد. پس از تهیه عصاره آبی، اثر ضدباکتری در غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد (۵۰ μl) بررسی شد. سپس نتایج به دست آمده با اثر دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی متداول در درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها مقایسه شد.

نتایج: بررسی‌ها نشان داد که میانگین قطر هاله‌های ایجاد شده توسط گیاه شبدر ترشک بیشتر از آنتی‌بیوتیک‌های داروهای شیمیایی بود. از طرفی با افزایش غلظت عصاره از ۵ تا ۲۰ درصد میانگین قطر هاله ایجاد شده توسط عصاره افزایش پیدا کرد.

نتیجه‌گیری: نتیجه نهایی این تحقیق نشان می‌دهد که در تمامی بین قطر هاله عدم رشد و غلظت عصاره رابطه مستقیمی وجود داشته است. بدین معنی که با افزایش غلظت یا به عبارت دیگر با افزایش ماده موثره اثر ضدباکتری بیشتر می‌شود.

کل واژگان: شبدر ترشک، ضدباکتریایی، استافیلوکوک اورئوس، اشریشاکلی

¹ *Oxalis corniculata* L.

² Oxalidaceae



مقدمه

استفاده از گیاهان دارویی برای درمان بیماری‌ها قرن‌ها سابقه دارد. امروزه با اینکه بخش عظیمی از داروهای مصرفی شیمیایی هستند اما تخمین زده شده که دست کم یک سوم کلیه فرآورده‌های دارویی منشای گیاهی دارند یا پس از استخراج گیاه تغییر شکل یافته‌اند [۱]. در این تحقیق از گیاه شبدر ترشک از خانواده اکسالیداسه^۱ استفاده شد. این گیاه، گیاهی علفی، کوچک، یکساله با ساقه خزنده، پوشیده از کرک خاکستری و دارای دمبرگ دراز می‌باشد. مناطق رویش آن در شمال ایران در گیلان بین رشت و لاهیجان، بندرگز، مینودشت و در سایر نقاط مرطوب شمال ایران در چین و هندوستان و در مناطقی از خوزستان نیز می‌روید [۲]. این گیاه برای درمان سوختگی‌ها و برای رفع اسهال و کم‌خونی مفید می‌باشد همچنین به عنوان ضدسرفه، ضدالتهاب و ضد فشار خون نیز از این گیاه استفاده می‌شود [۳]. در بعضی از کشورها از گیاه شبدرترشک به صورت مخلوط با چند گیاه دیگر جهت درمان اسهال استفاده می‌شود. از شیره این گیاه در دامپزشکی جهت درمان التهاب شدید دستگاه گوارش استفاده می‌شود [۴]. در هندوستان از این گیاه جهت درمان آفت دهان استفاده می‌شود [۵]. ترکیبات برگ‌های آن شامل آب، پروتئین، چربی، کربوهیدرات، فسفر، آهن، نیاسین، ویتامین ث، بتاکاروتن، کلسیم و اسیدگزالیک می‌باشد [۵]. تنها گزارش مستند درباره خاصیت ضد میکروبی این گیاه بر روی باکتری زانتوموناس کامپس تریس^۲ که یک پاتوژن گیاهی بوده انجام شده است [۶]. در طی چهل سال اخیر کوشش‌های فراوانی جهت یافتن آنتی‌بیوتیک‌های جدید که از نظر بالینی مفید باشند، صورت گرفته و این امر موجب تولید بیش از هزار نوع آنتی‌بیوتیک گردیده است [۷]. فرآیند مقاومت باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های شیمیایی توانایی پزشکان را در درمان بعضی از بیماری‌های عفونی که اغلب مرگبار هستند محدود نموده است [۸]. باید یادآور شد که با پیدایش مقاومت‌های روز افزون میکروب‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها انجام اقدامات جدیدتری در این

زمینه ضرورت دارد. هدف از انجام این پژوهش بررسی خاصیت ضدباکتریایی گیاه شبدر ترشک بر روی پاتوژن‌های انسانی است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های میکروبی

در این بررسی از دوسویه استاندارد میکروبی استافیلوکوک اورئوس و اشرشیاکلی تهیه شده از کلیکسیون دکتر محسنی استفاده شد.

محیط کشت مورد استفاده

مولر هینتون آگار محصول شرکت مرک (آلمان)، مولر هینتون براث محصول شرکت زونا (ایتالیا).

دیسک‌های آنتی بیوتیک

دیسک‌های آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه شامل داکسی‌سیکلین، کلرامفنیکل، نالیدیکسیک اسید، کاربنی سیلین، پنی‌سیلین، نوویوسین، متی‌سیلین، جنتامایسین، وانکومایسین، آگراسیلین، تترامایسین، استرپتومایسین، تری متو پریم سولفا متوکسازول که همگی ساخت شرکت DIFCO BACTO U.S.A. بوده است.

تهیه عصاره آبی

برگ‌های این گیاه در اواخر زمستان از مناطق رویش در استان خوزستان جمع‌آوری شده و پس از تایید توسط منابع موجود و گیاه‌شناسان گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم شهید چمران اهواز در سایه خشک شده و به وسیله آسیاب برقی به صورت پودر درآورده شد. جهت عصاره‌گیری از روش جوشاندن استفاده شد که منطبق با مصرف سنتی گیاه در این منطقه می‌باشد. بدین منظور ۱۰ گرم پودر گیاه با ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر جوش مخلوط کرده و به مدت ۲۰ دقیقه ضمن به هم‌زدن دائم آن، عمل حرارت دادن ادامه یافت. سپس مخلوط، در ظرف در پوش‌دار در دمای اتاق نگهداری شد. مخلوط از پارچه با بافت ریز عبور داده شد. سپس محلول عصاره صاف

¹ Oxalidaceae

² *Xanthomonas campestris*



آن پلیت‌ها به انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت منتقل شدند. اثر ضد میکروبی بر اساس هاله عدم رشد در مقیاس میلی‌متر اندازه‌گیری شد در ادامه با انجام آزمون آنتی‌بیوگرام آنتی‌بیوتیک‌های رایج به مقایسه اثر ضدباکتریایی عصاره گیاه شبدر ترشک با این آنتی‌بیوتیک‌ها پرداخته شد [۹]. این عمل ۷ بار تکرار شد.

نتایج

میانگین قطر هاله عدم رشد سویه‌های مورد مطالعه در برابر غلظت‌های مختلف عصاره آبی گیاه شبدر ترشک در جدول شماره ۱ نمایش داده شده است. همچنین قطر هاله عدم رشد سویه‌های فوق در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مختلف به کار گرفته شده در این بررسی جهت مقایسه در جدول شماره ۲ آورده شده است.

شده به مدت ۱۵ دقیقه با ۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و محلول بالای در معرض هوا قرار بر روی شیشه صاف قرار داده تا زمانی که حلال به طور کامل تبخیر شده و پودر عصاره به دست آمد.

اشباع دیسک‌ها با عصاره و آزمون تعیین حساسیت

در این بررسی از دیسک‌های کاغذی استفاده شد. این روش از مفیدترین روش‌های آزمایشگاهی جهت تعیین حساسیت میکروارگانیسم‌ها نسبت به مواد ضد میکروبی می‌باشد. ابتدا با کمک آب مقطر از عصاره خشک شده غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد (۵۰ μ l) تهیه شد. پس از تهیه دیسک‌های مورد نظر در محیط‌های استریل قرار داده و سپس با عصاره مورد نظر در غلظت‌های مختلف خیس‌اندازه شدند. سپس دیسک‌های خشک شده به وسیله پنس استریل بر روی محیط‌های مولر هیتون آگار که با باکتری مورد نظر در غلظت استاندارد مک فارلند تلقیح شده بود، قرار گرفتند. پس از

جدول شماره ۱- میانگین قطر هاله عدم رشد سویه‌های مورد مطالعه در برابر عصاره آبی شبدر ترشک (بر حسب میلی‌متر)

میانگین قطر هاله در برابر در صدهای مختلف عصاره (میلی‌متر)				نوع باکتری
۲۰ (درصد)	۱۵ (درصد)	۱۰ (درصد)	۵ (درصد)	
۲۱	۱۶	۱۳/۳۳	۱۰	استافیلوکوک اورئوس ATCC 29737
۱۹/۳۳	۱۸	۱۵/۶۶	۱۳/۳۳	اشرشیاکلی ATCC 8739

جدول شماره ۲: قطر هاله عدم رشد سویه‌های استاندارد در مقابل آنتی‌بیوتیک‌های مختلف (بر حسب میلی‌متر).

قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر)		محتوی دیسک (میکروگرم)	آنتی‌بیوتیک
اشرشیاکلی ATCC 8739	استافیلوکوک اورئوس ATCC 29737		
۱۵	۱۰	۳۰	داکسی‌سیکلین
۲۵	۲۰	۱۰	استرپتومایسین
۲۵	۲۰	۳۰	کلرامفنیکل
R	۱۰	۱۰۰	کاربنی سیلین
۳۰	۳۰	۳۰	نالیدیکسیک اسید
R	R	۱۰	پنی سیلین
۱۰	R	۳۰	نوسیلین
R	R	۵	متی سیلین
۲۰	۲۰	۱۰	جنتامایسین
R	R	۳۰	وانکومایسین
R	R	۱	اگراسیلین
۳۵	۲۰	۲۵	تری متو پریم - سولفامتوکسازول
R	R	۳۰	تراسیکلین

R: Resistant



بحث

امروزه با توجه به عوارض جانبی داروهای شیمیایی و بی خطر بودن نسبی ترکیبات گیاهی، به تحقیق در مورد گیاهان دارویی توجه فراوانی معطوف شده است.

در تمامی موارد و در برابر سویه‌های مورد آزمایش بین قطر هاله عدم رشد و غلظت عصاره رابطه مستقیمی وجود داشته است. بدین معنی که با کاهش غلظت عصاره در همه حال قطر هاله عدم رشد کاهش داشته است. این روند اثر بر روی این دو سویه حکایت از این واقعیت دارد که عصاره گیاه اثر ضدباکتریایی مشخصی دارد که با افزایش غلظت یا به عبارت دیگر با افزایش ماده موثره این اثر بیشتر می‌شود. در این بررسی سعی شده است که از کمترین غلظت عصاره جهت بررسی خاصیت ضدباکتری استفاده شود. اثر ضدباکتریایی این گیاه در مقایسه با مطالعاتی که در مورد خواص ضدباکتریایی گیاهان دیگر صورت گرفته است در محدوده وسیع‌تری قرار دارد. با توجه به اینکه هر چه قطر هاله ایجاد شده بر محیط کشت بیشتر باشد، اثر ضدباکتریایی می‌تواند بیشتر باشد، بنابراین اثر ضدباکتریایی عصاره نسبت به داروهای شیمیایی مذکور قابل بحث است. به نظر می‌رسد خاصیت ضدباکتریایی عصاره این گیاه بیشتر از اثر عصاره و اسانس‌های گیاهی دیگر برای باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت است برای مثال در تحقیقات انجام شده بر روی اثر ضدباکتریایی عصاره آبی و الکلی کاکل ذرت، هاله عدم رشد در غلظت ۸۰ درصد معادل ۱۵ میلی‌متر بر روی استافیلوکوک اورئوس و ۱۴/۱۴ میلی‌متر بر روی اشیشاکلی بوده است [۱۰]. همچنین اثر عصاره گیاه *Helichrysum italicum* روی استافیلوکوکوس، قطر هاله ایجاد شده در دوزهای بالاتر از تحقیق صورت گرفته ۱۵ میلی‌متر بوده است [۱۱]. در تحقیق دیگر نشان داده شده است اثر چند گونه از گیاه شامل *Achilla taygetea* و *A. holosericea* بر انواع استافیلوکوکوس حدوداً ۱۶ میلی‌متر بوده است و در بعضی از گونه‌های گرم منفی هاله ایجاد شده ۱۵ میلی‌متر بوده است [۱۲]. در تحقیق دیگر نشان داده شده که قطر هاله ایجاد شده توسط گیاه

Salvia ringens بر محیط کشت باکتری استافیلوکوکوس کمتر از ۱۰ میلی‌متر و در باکتری‌های گرم منفی کمتر از ۱۳ بوده است [۱۳]. در صورتی که گیاه شبدر ترشک با غلظت ۵ درصد اثر ضدباکتری آن به اثبات رسیده است. همچنین اثر ضدباکتریایی این گیاه وسیع‌الطیف است، یعنی هم بر روی باکتری‌های گرم مثبت و هم گرم منفی موثر است. همان‌گونه که جدول شماره ۱ نشان داده شد، هاله‌های عدم رشد در غلظت ۲۰ درصد معادل ۲۱ میلی‌متر استافیلوکوک اورئوس و ۱۹/۳۳ میلی‌متر اشیشاکلی که عمدتاً در برابر بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم هستند، می‌باشد. این خود حکایت از دارا بودن اثر ضدباکتریایی بسیار خوب این بخش از گیاه (برگ) می‌باشد. همان‌طور که در جدول شماره ۲ نشان داده شد، برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها هیچ‌گونه هاله عدم رشد ایجاد نکردند. مثلاً این سویه‌ها که نسبت به پنی‌سیلین وانکومايسین و متی‌سیلین مقاوم هستند مطابق جدول هاله عدم رشدی تشکیل نشده است. در صورتی که عصاره مذکور حتی با پایین‌ترین غلظت به کار رفته در این آزمایش (۵ درصد) منجر به تشکیل هاله عدم رشد شده است. همچنین بررسی‌ها نشان می‌دهد که در برخی موارد عصاره اثری بیش از برخی دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی داشته است و اثر کشندگی قوی داشته است اینکه کدامیک از اجزای تشکیل‌دهنده عصاره این گیاه نقش عمده ضدباکتریایی دارد خود سؤالی است که تحقیقات بیشتری را می‌طلبد. برای دستیابی به این منظور لازم است عصاره‌های مختلف این گیاه به روش‌های مختلف شیمیایی استخراج و اجزای عصاره تفکیک و شناسایی شده و اثرات هر کدام از اجزا در مقابل این قبیل باکتری‌ها بررسی شود. افزون بر این با توجه به اثرات قابل ملاحظه عصاره آبی گیاه شبدر ترشک بر روی باکتری‌های استافیلوکوک اورئوس و اشیشاکلی به نظر می‌رسد پس از بررسی‌های گسترده و آزمایش‌های لازم از نظر بالینی، استفاده از آن به صورت فرآورده دارویی می‌تواند جهت درمان عفونت‌ها و زخم‌های چرکی حائز اهمیت و قابل توجه باشد.



1. Eisenberg DM, Davis RB, Ernst SL, Apple S, Wilkey S, Van Rompay M, Kessler RC. Trends in alternative medicine use in the U.S.A. 1990-1997, Results of a follow-up national survey. *JAMA*. 1998; 280: 1569 - 75.
2. Mozaffarian A, Flora Khuzistan, Research center of Natural and husbandry of Khuzistan, Islamic Republic of Iran, 1387, pp: 1 - 2.
3. Han ST. Medicinal plants in the South Pacific, information on 102 commonly use medicinal plants in the South Pacific, WHO Regional Publication, 1998, pp: 135 - 6.
4. Chinthu TU, Narainswami BK, Sheeba Revi. Ethnoveterinary medicine for dairy cow. <http://www.Evetwork.org.uk/puner.htm>.
5. Hebbar SS, Harsha VH, Shripathi V and Hegde GR. "Ethnomedicine of Dharwad district in Karnataka, India-plants used in oral health care" *J. Ethnopharmacol.* 2004; 94: 261 - 6.
6. Satish S, Raveesh KA and Janardhana G. (antibacterial activity of plant extract on phytopathogenic *Xanthomonas campestris* pathogens. 1999, pp: 21 - 2.
7. Mitschel PA, Lea RB and Bathala MS, Antimicrobial agents from Higher Plants. I, Introduction, National and methodology Liodyia. 1972, pp: 157 - 66.
8. Wright GD, Resistance; new chemical strategies for battling superbugs. *Chemistry biology*, 2008, pp: 127 - 32.
9. Hsieh PC, JL. Mau and SH Huang. Antimicrobial effect of various combinations of plants extracts. *Food Microbial.* 2001; 35 - 43.
10. Jamshidian M, Zargarnejad A. Investigation of antibacterial effects of aqueous and hydroalcoholic extract of corn silk and comparing with routine anti-bacterial drugs, *J. of Medical Ahwaz*, 1378; 46 - 50.
11. Nostro A, Germano MP, Angelo VD, Marino A, Cannatelli MA. Extraction method and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity *Letters in Applied Microbiol.* 2000; 30: 309.
12. Magiatis P, Skaltsounis A1, chinov I, Haroutounian SA, chemical composition and in vitro antimicrobial activity of the essential oil of three greek *Achillea* species. *Z Naturforsch.* 2002; 57: 287 - 90.
13. Tzakou O, Pitarokili D, Chinou IB, Harvalac C. composition and Antimicrobial activity oil of *salvia ringens*. *Plant med.* 2001; 67: 61 - 83.

