

آثار ضد میکروبی صمغ درخت کاج تهرانی (Pinus eldarica) و عصاره الکلی آن بر تعدادی از باکتری‌های مولد عفونت‌های پوستی

شکرالله آثار^۱، عبدالله جعفرزاده^۲، محمد محققی^۳، رضا بهرام‌آبادی^۴

دربافت مقاله: ۱۳۸۳/۱۰/۱۳ اصلاح نهایی: ۱۳۸۴/۳/۱۰ پذیرش مقاله: ۱۳۸۴/۴/۱۵

چکیده

سابقه و هدف: از آنجایی که مقاومت باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها و ترکیبات صناعی، روز به روز در حال افزایش است، این مطالعه به منظور بررسی آثار ضد میکروبی صمغ درخت کاج و عصاره الکلی آن بر استافیلوكوکوس آرئوس و اشرشیاکلی دو باکتری مولد عفونت‌های پوستی صورت پذیرفت.

مواد و روش‌ها: پس از تهیه صمغ درخت کاج، آن را با استفاده از اسید اولئیک به نسبت‌های ۵۰٪ و ۷۵٪ رقیق نموده و عصاره الکلی ۵۰٪ و ۷۵٪ نیز با استفاده از روش خیساندن تهیه گردید. سپس این رقت‌ها و همچنین اسید اولئیک و کوتريموکسازول به عنوان کنترل مورد بررسی قرار گرفت و بر روی محیط کشت تلقیح شده با اشرشیاکلی و استافیلوكوکوس آرئوس اثر داده و قطره‌های عدم رشد (در صورت وجود) در اطراف دیسک‌ها با واحد میلی‌متر اندازه‌گیری شد و سپس داده‌ها توسط تست Tukey HSD مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

یافته‌ها: با مقایسه میانگین اثر صمغ‌های ۵۰٪ و ۷۵٪ بر روی اشرشیاکلی مشخص شد که این غلظت‌های صمغ بر روی رشد اشرشیاکلی تفاوت چندانی ندارند اما اثر آن‌ها از کوتريموکسازول در مهار رشد این باکتری بیشتر بود. در مورد استافیلوكوکوس آرئوس، هر چند که صمغ‌های یاد شده و عصاره صمغ ۵۰٪ بر رشد این باکتری تأثیر منفی داشته‌اند، اما اختلاف اثر صمغ ۵۰٪ باعث نبوده؛ همچنین صمغ ۵۰٪ با عصاره صمغ ۷۵٪ نیز از نظر آماری اختلاف معنی‌دار ندارد و صمغ ۷۵٪ معنی‌دار نبوده. (p=۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: با بررسی نتایج فوق مشخص می‌شود که صمغ درخت کاج تهرانی دارای خاصیت ضد میکروبی قوی است که می‌تواند بر روی رشد استافیلوكوکوس آرئوس با کوتريموکسازول رقابت کند و احتمالاً بر روی سوش‌های اشرشیاکلی مقاوم در برابر کوتريموکسازول مؤثر باشد.

واژه‌های کلیدی: کاج تهرانی، اثر ضد میکروبی، اشرشیاکلی، استافیلوكوکوس آرئوس

۱- (نویسنده مسئول) مربی و عضو هیأت علمی گروه آموزشی میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
تلفن: ۰۳۹۱-۵۲۳۴۰۰۳، فاکس: ۰۳۹۱-۵۲۲۵۲۰۹، پست الکترونیکی: assar_sh@yahoo.com

۲- استادیار و عضو هیأت علمی گروه آموزشی میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

۳- پژوهش عمومی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

۴- کارشناس گروه آموزشی میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

آن برای درمان زخم‌های طول کشیده استفاده شده است [۱۷، ۹-۲].

کاج تهرانی زیر گونه‌ای از جنس *Pinus* و تحت جنس *Pinus brutia* است، همیشه سبز و معطر و در هنگام جوانی مخروطی شکل بوده و به تدریج و با افزایش سن گسترده می‌شود. حدود ۷/۵ تا ۹/۵ متر بلندی داشته و برای رشد به نور مستقیم آفتاب احتیاج دارد و نسبت به خشکی هوا مقاوم است و pH خاک رشد آن ۷/۹ تا ۸/۵ می‌باشد و میوه آن که ۵ تا ۸ سانتی‌متر طول دارد بر روی درخت خشک شده و دانه‌های درشت آن از میوه جدا می‌شوند. این درخت در کشور ایران، افغانستان، پاکستان، ترکیه و روسیه قابل رویش است [۱۰].

اکنون با در نظر گرفتن این مسائل و نکات بسیار دیگر، لزوم توجه بیشتر به گیاهان دارویی و ضرورت پژوهش‌های علمی رخ می‌نماید و از آنجایی که مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها به طور روز افزون افزایش می‌یابد، و در این مبارزه با عوامل عفونتزا، بایستی از روش‌ها و مواد بهتری که هم در دسترسی، به آن‌ها آسان و طبیعی‌تر بوده و هم قادر به از بین بردن میکروارگانیسم‌های مضر باشند استفاده نمود [۱۵] و بنابراین مطالعه حاضر به منظور بررسی یکی از اثرات گیاهی به نام کاج تهرانی^۱ انجام پذیرفت که تحت عنوان بررسی اثر ضد میکروبی صمغ درخت کاج تهرانی و عصاره الکلی آن بر تعدادی از باکتری‌های مولد عفونت‌های پوستی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه یک پژوهش تجربی است که در آن اثر صمغ نوعی درخت کاج و عصاره الکلی آن بر روی رشد، دو باکتری عامل عفونت‌های پوستی، اشرشیاکلی^۲ و استافیلکوکوس آرئوس^۳ بررسی شده است. در این پژوهش، ابتدا صمغ درخت کاج تهرانی- درخت کاج رسمی در ایران از این نوع می‌باشد- جمع‌آوری شد. روش جمع‌آوری بدین صورت بود که ابتدا حفره‌هایی به قطر حداقل ۵ میلی‌متر و به عمق ۲۰ میلی‌متر در تنی درخت ایجاد شد و سپس با گذاشتن لوله‌های

استفاده از گیاهان، برای مصارف گوناگون و حیاتی بشر از قدیم معمول بوده و علاوه بر استفاده از آن‌ها برای تهیه مواد غذایی، کاربردهای دیگری از جمله استفاده از آن‌ها به عنوان دارو هنوز هم معمول و مرسوم است. علم پزشکی یکی از علومی است که در سال‌های اخیر پیشرفت شگرفی داشته است و هر روز بر وسعت توانایی آن در شناخت بیماری‌ها افزوده می‌شود. در عین حال عوارض ناشی از استعمال داروهای شیمیایی، در جهانی که بیماران آن هر روزه رو به افزایش‌اند، نگرانی‌هایی را ایجاد نموده است و بیماران به علت عدم کارایی یا عوارض ناشی از مصرف بی‌رویه داروهای شیمیایی، از آن‌ها روگردن شده و در بعضی موارد به گیاهان دارویی رو آورده‌اند. محققان بسیاری به جستجوی خواص گیاهان از راه‌های علمی پرداخته‌اند و نتیجه تحقیقات، تأیید نسخه‌های قدیم و ارزش درمانی آن‌ها بوده و بسیاری اشخاص ناباور را نیز متقاعد کرده است [۴-۵].

طی سه دهه اخیر گیاه درمانی در بسیاری از کشورهای اروپایی، ایالات متحده و سایر کشورهای پیشرفت، ترقی شایانی نموده و مورد استقبال گسترده عموم قرار گرفته است و همین فرآیند یعنی رویکرد دوباره آدمی به داروهای گیاهی و گیاه درمانی، خود یکی از جنبه‌های موج سبز^۱ به شمار می‌آید. خوشبختانه این موج اخیراً به کشور ما نیز رسیده است و امید می‌رود که علاقه‌مندی ملموس و در حال رشد، محققان و مسئولان سیاست‌گزار نظام دارو درمانی کشور باعث توسعه هر چه بیشتر گیاه درمانی علمی و واقعی و بی‌پیرایه گردد [۱، ۸].

از مهم‌ترین خواص درمانی ذکر شده برای گونه‌های مختلف رده کاج، خاصیت ضد میکروبی، خاصیت ضدالتهابی، تسکین دهنده‌گی، برطرف کننده خارش‌های پوستی، درمان کننده زخم‌ها، جوش‌ها و بثورات جلدی و بهبود اولسرها و زخم‌های مزمن قابل ذکر است. در متون طبی کهن ایران از ترکیبات قسمت‌های مختلف انواع رده کاج به خصوص صمغ

2-*Pinus eldarica*
3- *Escherichia coli*

1- Wave Green

دیسک‌های بلانک، آغشته به آنتی‌بیوتیک کوتیریموکسازول، اسید اولئیک، صمغ رقیق شده ۵۰٪/۷۵٪ و عصاره الکلی صمغ ۵۰٪/۷۵٪ گردید و مورد استفاده قرار گرفت.

روش آماری

جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA و مقایسه چندگانه به وسیله Tukey HSD استفاده شد و سطح معنی‌دار آماری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

با توجه به رشد باکتری‌ها، نمونه‌ها پس از این که به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد گذاشته شد، هاله عدم رشد در اطراف دیسک‌ها که توسط صمغ، عصاره، کوتیریموکسازول و اسید اولئیک ایجاد شده بود در مقیاس میلی‌متر مورد ارزیابی قرار گرفت. هیچ‌گونه اثر ضد میکروبی بر روی اشرشیاکلی در نمونه‌های دارای دیسک‌های کوتیریموکسازول، اسید اولئیک، عصاره ۵۰٪/۷۵٪ مشاهده نگردید اما قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک‌های حاوی صمغ به نسبت کوتیریموکسازول بیشتر بود که حاکی از اثر معنی‌دار مهاری نسبی صمغ بر رشد اشرشیاکلی دارد (p=۰/۰۵).

میانگین قطر هاله‌های عدم رشد باکتری استفاده در نمونه‌های صمغ ۵۰٪/۷۵٪ و عصاره صمغ ۵۰٪/۷۵٪ مشخص نموده که این مواد بر رشد باکتری مذکور تأثیر منفی داشته‌اند (p=۰/۰۵) و این در حالی بود که هیچ‌گونه اثر مهار رشدی از دیسک‌های حاوی اسید اولئیک مشاهده نگردید.

وضعیت و مقایسه اثر کوتیریموکسازول به عنوان یک آنتی‌بیوتیک رایج و کاربردی، برای درمان عفونت‌ها و اسید اولئیک به عنوان رقیق کننده صمغ به طور جداگانه در مورد باکتری‌های مورد آزمایش در جدول ۱ نشان داده شده است که در مواردی حاکی از تأثیر نسبی (p=۰/۰۱) موردی کوتیریموکسازول بر روی استافیلکوکوس آرئوس و عدم تأثیر اسید اولئیک بر رشد باکتری‌های مورد آزمایش دارد.

شیشه‌ای یا پلاستیکی به طول ۸ تا ۱۰ سانتی‌متر در دهانه حفره و اتصال سر دیگر آن به یک ظرف شیشه‌ای کوچک، ۴۸ ساعت بر همان حال رها شدند. پس از این مدت صمغ‌ها جمع‌آوری و پس از تهیه مقدار لازم در حدود ۱۰۰ میلی‌لیتر، در محیط آزمایشگاه نگهداری شد [۲،۹].

سپس برای تهیه صمغ رقیق شده ۵۰٪/۷۵٪ میلی‌متر از صمغ‌های جمع‌آوری شده را با نسبت‌های لازم، با اسید اولئیک مخلوط نمودیم و برای تهیه عصاره الکلی از روش خیساندن استفاده شد، بدین طریق که در ابتدا ۸۰ میلی‌لیتر از صمغ‌های جمع‌آوری شده را با ۱۰۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درجه مخلوط نمودیم و ۴۸ ساعت به همین صورت و با بستن درب آن، ظرف در محیط آزمایشگاه باقی ماند. مخلوط مورد نظر به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۵۰۰۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. آنگاه محلول شفاف‌رویی جدا شد و در دستگاه تقطیر قرار گرفت. بدین ترتیب، متانول ۸۰ درجه تبخیر شده و عصاره به صورت پودر سفید مایل به زرد باقی ماند. سپس از این پودر، محلول ۵۰٪/۷۵٪ عصاره به وسیله مخلوط کردن آن با آب مقطر تهیه گردید [۷،۹،۱۱].

در این پژوهش، هر یک از مواد مورد نظر به صورت جداگانه مورد بررسی قرار گرفتند. از محیط کشت مولرهینتون آگار^۲ و از متدهای بائیر^۳ که یک روش آنتی‌بیوگرام استاندارد است استفاده گردید [۱۸] و باکتری‌های مورد استفاده نیز از طریق کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی و عفونی ایران، اشرشیاکولی با کد ۱۰۴۷ و استافیلکوکوس آرئوس با کد ۱۱۱۲ تهیه گردید و بر روی محیط کشت‌های مناسب رشد یعنی بلا‌آگار^۴ و ای‌ام‌بی آگار^۵، رشد داده شد و در آزمایش مورد استفاده قرار گرفت.

برای اطمینان از کار مورد نظر برای هر مورد ۵ پلیت، به این ترتیب که ۷۰ محیط کشت مولر هینتون که زمان و روش تهیه آن‌ها یکسان بود مورد استفاده قرار گرفت. برای هر باکتری ۳۵ محیط به صورت کشت سطحی، کشت گردید و

1- *Staphylococcus aureus*

2- Muller-Hinton Agar

3- Kirby- Bauer Method

4- Blood Agar

5- Eosin Methylene Blue Agar

جدول ۱: قطرهای عدم رشد در اطراف دیسک‌های حاوی صمغ ۵۰٪ و ۷۵٪، عصاره‌الکلی صمغ ۵۰٪ و ۷۵٪، کوتريموکسازول و اسید اولئیک بر حسب میلی‌متر

شماره نمونه											
باکتری						ماده مورد آزمایش					
۵	۴	۳	۲	۱		۵	۴	۳	۲	۱	
اشرشیا کلی	اشرشیا کلی	اشرشیا کلی	اشرشیا کلی	اشرشیا کلی		اشرشیا کلی	اشرشیا کلی	اشرشیا کلی	اشرشیا کلی	اشرشیا کلی	
آرئوس	آرئوس	آرئوس	آرئوس	آرئوس		آرئوس	آرئوس	آرئوس	آرئوس	آرئوس	
۹	۶	۱۱	۶	۹	۹	۱۰	۸	۹	۹	۶*	٪۵۰
۱۲	۹	۱۱	۱۰	۱۲	۸	۱۴	۹	۱۱	۸		٪۷۵ صمغ**
۹	۶	۸	۶	۸	۶	۹	۶	۹	۶*	٪۵۰ عصاره‌الکلی	
۱۰	۶	۸	۶	۷	۶	۸	۶	۸	۶	٪۷۵ صمغ**	
۲۲	۶	۱۹	۷	۲۳	۶	۲۱	۶*	۲۶	۸		کوتريموکسازول**
۶	۶	۶	۶	۶	۶	۶	۶	۶	۶		اسید اولئیک

*: این عدد نشان دهنده میزان قطرهای دیسک مورد استفاده بوده و هاله عدم رشد تشکیل گردیده است.

**: ترتیب مقایسات دو بعدی در بین گروه‌های مورد نظر اختلاف معنی‌دار $P < 0.05$ نشان داده است.

کوتريموکسازول، بر رشد استافیلوكوکوس آرئوس بیشتر است.

لذا می‌توان نتیجه گرفت که مؤثرترین ماده بر روی رشد اشرشیاکلی، صمغ ٪۷۵ بوده و نیز مؤثرترین ماده بر روی رشد استافیلوكوکوس آرئوس بعد از کوتريموکسازول صمغ ٪۷۵ می‌باشد.

در پژوهش هافورد و همکاران اثر مواد موجود در صمغ درخت کاج بر روی باکتری استافیلوكوکوس آرئوس و تعدادی باکتری و قارچ بررسی شده و با توجه به اثر مهاری بر روی رشد استافیلوكوکوس آرئوس، با مطالعه حاضر هم خوانی دارد [۱۳]. همچنین در پژوهش باتیستا و همکاران باکتری استافیلوكوکوس آرئوس و تعدادی باکتری گرم منفی به جز اشرشیاکلی تحت تأثیر مهاری اثر صمغ از جهت رشد قرار گرفته است که باز مؤید وجود اثرات ضد میکروبی در مواد موجود در درخت کاج می‌باشد [۶].

نتیجه‌گیری

از آزمایشات نتیجه‌گیری می‌شود که اسید اولئیک خاصیت ضد میکروبی بر روی باکتری‌های مورد آزمایش ندارد و به همین دلیل هیچ تداخلی در اثر ضد میکروبی صمغ‌های یاد شده نداشته است.

بحث

در این مطالعه، اثر ضد میکروبی صمغ درخت کاج تهرانی با غلظت‌های ۵۰٪ و ٪۷۰، که شواهد متعددی برای اثر باز دارندگی آن بر روی باکتری‌ها از جمله باکتری‌های مولد عفونت‌های پوستی موجود است [۱۴، ۹، ۵] و همچنین عصاره‌الکلی آن با غلظت‌های ٪۵۰ و ٪۷۵ را بر روی باکتری‌های اشرشیاکلی و استافیلوكوکوس آرئوس بررسی نمودیم.

با مقایسه میانگین اثر صمغ ٪۵۰ و صمغ ٪۷۵ بر روی اشرشیاکلی مشخص می‌شود که اختلاف آن‌ها معنی‌دار است بدین معنی که غلظت ٪۷۵ صمغ مؤثرتر از غلظت ٪۵۰ آن بر روی رشد ای کلی می‌باشد اثر صمغ ٪۵۰ با کوتريموکسازول دارای اختلاف معنی‌دار نبوده در حالی که اختلاف صمغ ٪۷۵ با کوتريموکسازول معنی‌دار است در نتیجه صمغ ٪۷۵ مؤثرترین ماده بر مهار رشد اشرشیاکلی در بین گروه‌های مورد آزمایش، حتی مؤثرتر از کوتريموکسازول شناخته شد.

با بررسی نتایجی که از تأثیر عوامل یاد شده بر رشد استافیلوكوکوس آرئوس به دست آمد می‌توان دریافت که هر چند تمامی این مواد بر رشد استاف اثر منفی داشته‌اند و میانگین اثر مهاری صمغ ٪۷۵ از بقیه موارد، به جز

گرفت که مواد مؤثر ضد میکروبی موجود در صمغ به میزان کمتری در الکل محلول می‌باشند.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی رفسنجان انجام پذیرفته است که بدین‌وسیله از اعضاء محترم شورای پژوهشی دانشکده پزشکی که امکان انجام آن را فراهم نمودند تشکر به عمل می‌آید.

در کل با بررسی نتایج فوق می‌توان دریافت که صمغ درخت کاج دارای خاصیت ضد میکروبی قوی می‌باشد [۱۶، ۱۲، ۶]، که می‌تواند بر روی رشد استافیلوکوکوس آرئوس با کوتريموکسازول رقابت نماید و بر روی سوش‌های مقاوم به کوتريموکسازول اشرشیاکلی نیز مؤثر باشد. نتایج از پژوهش انجام شده چنین بر می‌آید که میزان اثر عصاره الکلی صمغ نسبت به صمغ رقیق شده در مهار رشد اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس آرئوس کمتر بوده، بنابراین می‌توان نتیجه

References

- [۱] امامی ا: گیاه درمانی. بخش نخست، چاپ اول، انتشارات راه کمال، ۱۳۸۱، صفحات: ۱۱-۳.
- [۲] زرگری ع: گیاهان دارویی. چاپ پنجم، انتشارات دانشگاه تهران، ۱۳۷۱، جلد پنجم، صفحات: ۶-۳.
- [۳] خراسانی ع: مخزن الادویه، چاپ دوم، انتشارات آموزش انقلاب اسلامی، ۱۳۷۱، صفحات: ۴-۵۷۳.
- [۴] یاوری ن: اسرار گیاهان. چاپ اول، شرکت انتشارات علمی و فرهنگی، ۱۳۶۳، صفحات: ۱۰-۲.
- [۵] Andrews REJr, Parks LW, Spence KD: Some effects of Douglas fir terpenes on certain microorganisms. *Appl Environ Microbiol.*, 1980; 40: 301-4.
- [۶] Batista O, Duarte A, Nascimento J, Simones MF, de la Torre MC, Rodriguez B: Structure and antimicrobial activity of diterpenes from the roots of *Plectranthus hereroensis*. *J Nat Prod.*, 1994; 57(6): 858-61.
- [۷] Brantner A, Grein E: Antibacterial activity of plant extracts used externally in traditional medicine. *J Ethnopharmacol.*, 1994; 44(1): 35-40.
- [۸] Clark AM: Natural products as a resource for new drugs. *Pharm Res.*, 1996; 13(8):1133-44.
- [۹] Cowan MM: Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev.*, 1999; 12(4): 564-82.
- [۱۰] Earle CJ: *Pinus brutia* tenore 1811-1815. From the Gymnosperm Database. Last modified on 2004. URL://www.conifers.org/pi/brutia.htm.
- [11] Eloff JN: Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? *J Ethnopharmacol.*, 1998; 60(1): 1-8.
- [12] Himejima M, Hobson KR, Otsuka T, Wood DL, Kubo I:Antimicrobial terpenes from wood, oleoresin of panderosa pine tree. *J chem Ecol.*, 1992; 18: 1809-18.
- [13] Hufford CD, Jia Y, Croom EM Jr, Muhammed I, Okunade AL, Clark AM, et al: Antimicrobial compounds from *Petalostemum purpureum*. *J Nat Prod.*, 1993; 56(11): 1878-89.
- [14] Kartnig T, Still F, Reinthaler F: Antimicrobial activity of the essential oil of young pine shoots (*Picea abies* L). *J Ethnopharmacol.*, 1991; 35(2): 155-7.
- [15] Moreno MA, Dominguez L, Teshager T, Herrero IA, Porrero MC: Antibiotic resistance monitoring:the Spanish programme. The VAV Network. *Red de Vigilancia de Resistencias Antibioticas en*

- Bacterias de Origen Veterinario. *Int J Antimicrobial Agents.*, 2000; 14(4): 285-90.
- [16] Osawa K, Matsumoto T, Maruyama T, Takiguchi T, Okuda K, Takazoe I: Studies of the antibacterial activity of plant extracts and their constituents against periodontopathic bacteria. *Bull Tokyo Dent Coll.*, 1990; 31(1):17-21.
- [17] Thuille N, Fille M, Nagl M: Bactericidal activity of herbal extracts. *Int J Hyg Environ Health.*, 2003; 206(3): 217-21.
- [18] Wu CC: Disk Diffusion Susceptibility Testing (Kirby-Bauer methods), 1997, Newsletter. www.addl.purdue.edu/newsletters/1997/spring/dds.shtml.