مقاله پژوهشی مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان جلد ۴، شماره ۳، تابستان ۱۳۸۴، ۱۹۱–۱۸۶

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

شكرالله آثار '، عبدالله جعفرزاده'، محمد محققي"، رضا بهرامآبادي ً

پذیرش مقاله: ١٣٨٤/٤/١٥

اصلاح نهایی: ۱۳۸٤/۳/۱۰

دريافت مقاله: ١٣٨٣/١٠/١٣

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 استافیلوکوکوس 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 اسیداولئیک و کوتریموکسازول به عنوان کنترل مورد بررسی قرار گرفت و بر روی محیط کشت تلقیح شده با اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس آرئوس اثر داده و قطر هالههای عدم رشد (در صورت وجود) در اطراف دیسکها با واحد میلیمتر اندازه گیری 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 کوتریموکسازول در مهار رشد این باکتری بیشتر بود. در مورد استافیلوکوکوس آرئوس، هر چند که صمغهای یاد شده و عصاره صمغ ۵۰٪ بر رشد این باکتری تأثیر منفی داشتهاند، اما اختلاف اثر صمغ ۵۰٪ با عصاره صمغ ۵۰٪ و ۷۵٪ نیز از نظر آماری اختلاف معنی دار ندارد و صمغ ۷۵٪ نیز با عصاره ۵۰٪ از نظر نحوه اثر، اختلاف معنی داری ندارد. در این تجربه مؤثر ترین ماده در جلوگیری از رشد اشرشیاکلی صمغ ۵۰٪ و نیز مؤثر ترین ماده در جلوگیری از رشد استافیلوکوکوس آرئوس بعد از کوتریموکسازول، صمغ ۷۵٪ می باشد (p=0.0).

نتیجه گیری: با بررسی نتایج فوق مشخص می شود که صمغ درخت کاج تهرانی دارای خاصیت ضد میکروبی قوی است که می تواند بر روی رشد استافیلوکوکوس آرئوس با کوتریموکسازول رقابت کند و احتمالاً بر روی سوشهای اشرشیاکلی مقاوم در برابر کوتریموکسازول مؤثر باشد.

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

۱- (نویسنده مسئول) مربی و عضو هیأت علمی گروه آموزشی میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

تلفن: ۰۳۹۱-۵۲۳۴۰۳، فاکس: ۰۳۹۱-۵۲۲۵۲۹، پست الکترونیکی: ۵۶۶۵۳_۵۲۲۵۲۹، پست الکترونیکی

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

۳- پزشک عمومی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

۴- کارشناس گروه آموزشی میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

مقدمه

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 افزدوه می شود. 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 بیرویهٔ داروهای شیمیایی، از آنها روگردان شده و در بعضی موارد به گیاهان داروهای علمی پرداختهاند و نتیجه تحقیقات، تأیید داروهای قدیم و ارزش درمانی آنها بوده و بسیاری اشخاص ناباور را نیز متقاعد کرده است [۵-۴].

طی سه دهه اخیر گیاه درمانی در بسیاری از کشورهای اروپایی، ایالات متحده و سایر کشورهای پیشرفته، ترقی شایانی نموده و مورد استقبال گستردهٔ عموم قرار گرفته است و همین فرآیند یعنی رویکرد دوباره آدمی به داروهای گیاهی و گیاه درمانی، خود یکی از جنبههای موج سبز به شمار می آید. خوشبختانه این موج اخیراً به کشور ما نیز رسیده است و امید می رود که علاقه مندی ملموس و در حال رشد، محققان و مسئولان سیاست گزار نظام دارو درمانی کشور باعث توسعهٔ هر چه بیشتر گیاه درمانی علمی و واقعی و بیپرایه گردد [۱،۸].

از مهمترین خواص درمانی ذکر شده برای گونههای مختلف ردهٔ کاج، خاصیت ضد میکروبی، خاصیت ضدالتهابی، تسکین دهندگی، برطرف کننده خارشهای پوستی، درمان کنندهٔ 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

آن برای درمان زخمهای طول کشیده استفاده شده است (۱۷، ۹، ۳-۲].

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 0.00 تا 0.00 متر بلندی داشته و برای رشد به نور مستقیم آفتاب احتیاج دارد و نسبت به خشکی هوا مقاوم است و 0.00 رشد آن 0.00 تا 0.00 میباشد و میوه آن که 0.00 تا 0.00 سانتی متر طول دارد بر روی درخت خشک شده و دانه های درشت آن از میوه جدا می شوند. این درخت در کشور ایران، افغانستان، پاکستان، ترکیه و روسیه قابل رویش است 0.00

اکنون با در نظر گرفتن این مسائل و نکات بسیار دیگر، لزوم توجه بیشتر به گیاهان دارویی و ضرورت پـژوهشهای علمی رخ مینماید و ازآنجایی که مقاومت به آنتیبیوتیکها به طور روز افزون افزایش مییابد، و در این مبارزه با عوامل عفونـتزا، بایستی از روشها و مـواد بهتـری کـه هـم در دسترسی، به آنها آسان و طبیعی تر بوده و هم قادر به از بین بردن میکروارگانیسمهای مضر باشند استفاده نمـود [۱۵] و بنابراین مطالعه حاضر به منظور بررسی یکی از اثرات گیاهی به نام کاج تهرانی آن برسی اثـر فد میکروبی صمغ درخت کاج تهرانی و عصارهٔ الکلـی آن بـر 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^۳ و استافیلوکوکوس آرئوس بررسی شده است. در این پژوهش، ابتدا صمغ درخت کاج تهرانی - درخت کاج رسمی در ایران از این نوع میباشد جمع آوری شد. روش جمع آوری بدین صورت بود که ابتدا حفرههایی به قطر حداکثر ۵ میلیمتر و به عمق ۲۰ میلیمتر در تنه درخت ایجاد شد و سپس با گذاشتن لولههای

²⁻Pinus eldarica

³⁻ Escherichia coli

¹⁻ Wave Green

شیشه ای یا پلاستیکی به طول ۸ تا ۱۰ سانتی متر در دهانه حفره و اتصال سر دیگر آن به یک ظرف شیشه ای کوچک، ۴۸ ساعت بر همان حال رها شدند. پس از این مدت صمغها جمع آوری و پس از تهیه مقدار لازم در حدود ۱۰۰ میلی لیتر، در محیط آزمایشگاه نگهداری شد [۲،۹].

سپس برای تهیه صمغ رقیق شده ۱۰۰ و ۷۵٪، ۲۰ میلی متر از صمغهای جمع آوری 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 میلی لیتر از صمغهای جمع آوری شده را با ۱۰۰ میلی لیتر 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 در دقیقه سانتریفوژ شد. آنگاه محلول شفاف رویی 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 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 7 و از متد کربی بائر 7 که یک روش آنتی بیوگرام استاندارد است استفاده گردید [۱۸] و باکتری های مورد استفاده نیز از طریق کلکسیون قارچها و باکتری های صنعتی و عفونی ایران، اشرشیاکولی با کد ۱۰۴۷ و استافیلوکوکوس آرئوس با کد ۱۱۱۲ تهیه گردید و بر روی محیط کشتهای مناسب رشد یعنی بلاد آگار 4 و ایامبی آگار 6 ، 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

دیسکهای بلانک، آغشته به آنتیبیوتیک کوتریموکسازول، اسید اولئیک، صمغ رقیق شده ۵۰٪ و ۷۵٪ و عصاره الکلی صمغ ۵۰٪ و ۷۵٪ 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.

نتايج

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

میانگین قطر هالههای عدم رشد باکتری استاف در نمونههای صمغ ۵۰٪ و ۷۵٪ و عصاره صمغ ۵۰٪ و ۷۵٪ مشخص نمود که این مواد بر رشد باکتری مذکور تأثیر منفی داشته اند (p=-1/-0) و این در حالی بود که هیچگونه اثر مهار رشدی از دیسکهای حاوی اسیداولئیک مشاهده نگردید.

وضعیت و مقایسه اثر کوتریموکسازول 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=1/1) موردی کوتریموکسازول بر روی استافیلوکوکوس آرئوس و عدم تأثیر اسیداولئیک بر رشد باکتریهای مورد آزمایش دارد.

¹⁻ Staphylococcus aureus

²⁻ Muller-Hinton Agar

³⁻ Kirby- Bauer Method

⁴⁻ Blood Agar

⁵⁻ Eosin Methylene Blue Agar

جدول ۱: قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک های حاوی صمغ ۵۰٪ و ۲۰٪، عصاره الکلی صمغ ۵۰٪ و ۲۰٪ ، کوتریمو کسازول و اسید اولئیک بر حسب میلی،متر

۵		۴		٣		۲		1		شماره نمونه	
استاف آرئوس	اشرشیا کلی	نړی	باک ماده مورد آزمایش								
٩	۶	11	۶	٩	٩	1.	٨	٩	۶*	% ۵ +	
17	٩	11	١٠	17	٨	14	٩	11	٨	% Y &	صمغ **
٩	۶	٨	۶	٨	۶	٩	۶	٩	۶*	% ۵ +	عصارهالكلي
1.	۶	٨	۶	Υ	۶	٨	۶	٨	۶	% Y &	صمغ **
77	۶	۱۹	γ	77	۶	۲١	۶*	78	٨	کو تریمو کسازول**	
۶	۶	۶	۶	۶	۶	۶	۶	۶	۶		اسید اولئیک

^{* :} این عدد نشان دهنده میزان قطر دیسک مورد استفاده بوده و هاله عدم رشد تشکیل نگردیده 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 [۵،۹،۱۴] و همچنین عصاره الکلی آن با غلظتهای ۵۰٪ و ۷۵٪ را بر روی باکتریهای اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس آرئوس بررسی نمودیم.

با مقایسه میانگین اثر صمغ ۵۰٪ و صمغ ۷۵٪ بـر روی اشرشیاکلی مشخص می شود که اختلاف آنها معنی دار است بدین معنی که غلظت ۷۵٪ صمغ مؤثرتر از غلظت ۵۰٪ آن بر روی رشد ای کلی می باشد اثر صمغ ۵۰٪ بـا کوتریموکسازول دارای اختلاف معنی دار نبوده در حالی که اختلاف صمغ ۷۵٪ بـا کوتریموکسازول معنی دار اسـت در نتیجـه صـمغ ۷۵٪ مؤثر ترین ماده بر مهار رشد اشرشیاکلی در بـین گـروههـای مورد آزمایش، حتی مؤثرتر از کوتریموکسازول شناخته شد.

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

کوتریموکسازول، بر رشد استافیلوکوکوس آرئوس بیشتر است. لذا می توان نتیجه گرفت که مؤثرترین ماده بر روی رشد اشرشیاکلی، صمغ ۷۵٪ بوده و نیز مؤثرترین ماده بر روی رشد استافیلوکوکوس آرئوس بعد از کوتریموکسازول صمغ ۷۵٪ می باشد.

در پژوهش هافورد و همکاران اثر مواد موجود در صمغ درخت کاج بر روی باکتری استافیلوکوکوس آرئوس و تعدادی باکتری و قارچ بررسی شده و با توجه به اثر مهاری بر روی رشد استافیلوکوکوسآرئوس، با مطالعه حاضر همخوانی دارد [۱۳]. همچنین در پژوهش باتیستا و همکاران باکتری استافیلوکوکوس 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 می باشد [۶].

نتيجهگيري

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

p=0/0 منایسات دوبهدو در بین گروههای مورد نظر اختلاف معنیp=0/0 را نشان داده است.

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 می آید.

در کل با بررسی نتایج فوق می توان دریافت که صمغ درخت کاج دارای خاصیت ضد میکروبی قوی می باشد [۶،۱۲،۱۶]، که می تواند بر روی رشد استافیلو کوکوس آرئوس با کوتریمو کسازول رقابت نماید و بر روی سوشهای مقاوم به کوتریمو کسازول اشرشیاکلی نیز مؤثر باشد. نتایج از پژوهش انجام شده چنین بر می آید که میزان اثر عصاره الکلی صمغ نسبت به صمغ رقیق شده در مهار رشد اشرشیاکلی و استافیلو کوکوس آرئوس کمتر بوده، بنابراین می توان نتیجه

References

[۱] امامی ا: گیاه درمانی. بخش نخست، چاپ اول، انتشارات راه کمال، ۱۳۸۱، صفحات: ۱-۳. [۲] زرگری ع: گیاهان دارویی. چاپ پنجم، انتشارات دانشگاه تهران، ۱۳۷۱، جلد پنجم، صفحات: ۶-۳۰. [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: ۱-۲۰.

- [5] Andrews REJr, Parks LW, Spence KD: Some effects of Douglas fir terpenes on certain microorganisms. Appl Environ Microbiol., 1980; 40: 301-4.
- [6] Batista O, Duarte A, Nascimento J, Simones MF, de la Torre MC, Rodriguez B: Structure and antimicrobial activity of diterpens from the roots of Plectranthus hereroensis. *J Nat Prod.*, 1994; 57(6): 858-61.
- [7] Brantner A, Grein E: Antibacterial activity of plant extracts used externally in traditional medicine. *J Ethnopharmacol.*, 1994; 44(1): 35-40.
- [8] Clark AM: Natural products as a resource for new drugs. *Pharm Res.*, 1996; 13(8):1133-44.
- [9] Cowan MM: Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev.*, 1999; 12(4): 564-82.
- [10] 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 antimicrobiol 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.