

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 محقی^۳، رضا بهرام‌آبادی^۴

دریافت 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 صنعتی، روز به روز در حال افزایش است، این مطالعه به منظور بررسی آثار ضد میکروبی صمغ درخت کاج و عصاره الکلی آن بر استافیلوکوکوس آرتوس 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 آرتوس اثر داده و قطر هاله‌های 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 کوتریموکسازول در مهار رشد این باکتری بیشتر بود. در مورد استافیلوکوکوس آرتوس، هر چند که صمغ‌های یاد شده و عصاره صمغ ۵۰٪ بر رشد این باکتری تأثیر منفی داشته‌اند، اما اختلاف اثر صمغ ۵۰٪ با ۷۵٪ معنی‌دار نبوده؛ هم‌چنین صمغ ۵۰٪ با عصاره صمغ ۵۰٪ و ۷۵٪ نیز از نظر آماری اختلاف معنی‌دار ندارد و صمغ ۷۵٪ نیز با عصاره ۵۰٪ از نظر نحوه اثر، اختلاف معنی‌داری ندارد. در این تجربه مؤثرترین ماده در جلوگیری از رشد اشرشیاکلی صمغ ۷۵٪ و نیز مؤثرترین ماده در جلوگیری از رشد استافیلوکوکوس آرتوس بعد از کوتریموکسازول، صمغ ۷۵٪ می‌باشد ($p=0/05$).

نتیجه‌گیری: با بررسی نتایج فوق مشخص می‌شود که صمغ درخت کاج تهرانی دارای خاصیت ضد میکروبی قوی است که می‌تواند بر روی رشد استافیلوکوکوس آرتوس 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 آرتوس

۱- (نویسنده مسئول) مربی و عضو هیأت علمی گروه آموزشی میکروبیولوژی و ایمنولوژی، 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 ایمنولوژی، 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 علوم 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 روگردان 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 پیشرفته، 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 سیاست‌گذار 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، تسکین‌دهندگی، برطرف‌کننده خارش‌های پوستی، درمان‌کننده زخم‌ها، جوش‌ها و بثورات جلدی و بهبود اولسرها و زخم‌های مزمن قابل ذکر است. در متون طب 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 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^۲ 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^۳ و استافیلوکوکوس آرتوس^۱ 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 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

دیسک‌های بلانک، آغشته به آنتی‌بیوتیک کوتریموکسازول، اسید اولئیک، صمغ رقیق شده ۵۰٪ و ۷۵٪ و عصاره الکلی صمغ ۵۰٪ و 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، کوتریموکسازول و اسید اولئیک ایجاد شده بود در مقیاس میلی‌متر مورد ارزیابی قرار گرفت. هیچ‌گونه 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 مهارتی نسبی صمغ بر رشد اشرشیاکلی دارد ($p=0/05$).

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 داشته‌اند ($p=0/05$) و این در حالی بود که هیچ‌گونه اثر مهارتی 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 ($p=0/001$) موردی کوتریموکسازول بر روی استافیلوکوکوس آرنوس و عدم تأثیر اسیداولئیک 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٪ و ۷۵٪، ۲۰ 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 در دقیقه سانتریفوژ 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٪ و 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 مولر هینتون آگار^۲ و از متد کربی بائر^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 استافیلوکوکوس آرنوس با کد ۱۱۱۲ تهیه گردید و بر روی محیط کشت‌های مناسب رشد یعنی بلادآگار^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: قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک‌های حاوی صمغ ۰.۵٪ و ۰.۷۵٪، عصاره الکلی صمغ ۰.۵٪ و ۰.۷۵٪، کوتریموکسازول و اسید اولئیک بر حسب میلی‌متر

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

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

** : نتیجه مقایسات دوه‌دو در بین گروه‌های مورد نظر اختلاف معنی‌دار $p=0/05$ را نشان داده 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٪ 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 کوتریموکسازول دارای اختلاف معنی‌دار نبوده در حالی که اختلاف صمغ ۷۵٪ با کوتریموکسازول معنی‌دار است در نتیجه صمغ ۷۵٪ مؤثرترین ماده بر مهار رشد اشرشیاکلی در بین گروه‌های مورد آزمایش، حتی مؤثرتر از کوتریموکسازول شناخته شد. با بررسی نتایجی که از تأثیر عوامل یاد شده بر رشد استافیلوکوکوس 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

کوتریموکسازول، بر رشد استافیلوکوکوس آرئوس بیشتر است. لذا می‌توان 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٪ می‌باشد.

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 استافیلوکوکوس آرئوس، 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 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.

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 [۶، ۱۲، ۱۶]، که می‌تواند بر روی رشد استافیلوکوکوس آرتوس با کوتریموکسازول رقابت نماید و بر روی سوش‌های مقاوم به کوتریموکسازول اثرشیاکلی نیز مؤثر باشد. نتایج از پژوهش انجام شده چنین بر می‌آید که میزان اثر عصاره الکی صمغ نسبت به صمغ رقیق شده در مهار رشد اثرشیاکلی و استافیلوکوکوس آرتوس 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] یآوری ن: اسرار گیاهان. چاپ اول، شرکت انتشارات علمی و فرهنگی، ۱۳۶۳، صفحات: ۱۰-۲.
- [5] Andrews RE Jr, 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, Simões 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 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.