بررسی اثرات آنتی باکتریال عصاره آبی یونجه *Medicago sativa L.* در مقایسه با سه آنتی‌بیوتیک جنتامایسین، سیپروفلوکسازین و پنی سیلین

مریم رضایی[1و2]، مژگان آزادپور[3]، رضا رومیانی[2]، حمید معادی[4]، مرضیه رشیدی پور[5]، غلامرضا طالعی[6]

۱- پژوهشگر، مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران.
۲- گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور مرکز خرم آباد، ایران.
۳- گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات، تهران، ایران.
٤- کارشناس ارشد سلولی و مولکولی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران.
٥- باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی خرم آباد، ایران.
٦- دانشیار، گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران.

یافته / دوره پانزدهم / شماره ۲ / بهار ۹۲ / ویژه نامه گیاهان دارویی

چکیده

دریافت مقاله: ۹۲/۱/۲۲ ، پذیرش مقاله: ۹۲/۳/۱۸

✱ **مقدمه:** در سال های اخیر، استفاده از مواد طبیعی به جای داروهای شیمیایی سنتتیک دارای عوارض جانبی، در پیشگیری و کنترل عفونت های مختلف تاکید شده است. با افزایش روز افزون مصرف گیاهان دارویی در درمان طبی، این شاخه از طب مکمل، جایگاه ویژه‌ای در درمان بیماری‌ها پیدا کرده است. تحقیق حاضر به منظور بررسی اثر ضد میکروبی عصاره آبی بذر یونجه در مقایسه با آنتی بیوتیک های جنتامایسین، پنی سیلین و سیپروفلوکسازین بر روی سویه های استاندارد باکتری های سودوموناس آئروژینوزا، اشرشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا مونوسیتوژنز صورت پذیرفت.

✱ **مواد و روش‌ها:** آزمایشات با استفاده از روش های دیسک دیفیوژن و میکروبراث دایلوشن انجام شد و **MIC** (حداقل غلظت مهارکننده رشد) و **MBC** (حداقل غلظت کشنده) گیاه شناسایی شدند.

✱ **یافته‌ها:** حداقل غلظت مهارکننده رشد عصاره آبی گیاه یونجه بر باکتری های گرم مثبت لیستریا منوسایتوژنز و استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب ۲۰۶/۲۵ و۶۶۰۰ میکروگرم بر میلی بوده و بر باکتری های گرم منفی تست شده در این مطالعه تاثیری نداشت.

✱ **بحث و نتیجه‌گیری:** بر اساس یافته های این تحقیق عصاره آبی گیاه مذکور می تواند کاندید مناسبی برای بررسی های آزمایشگاهی و تکمیلی جهت جداسازی ترکیبات فعال موجود در آن برای دستیابی به داروهای مؤثر ضد میکروبی باشد.

✱ **واژه‌های کلیدی:** اثرات آنتی باکتریال، عصاره آبی، آنتی بیوتیک، یونجه.

آدرس مکاتبه: خرم آباد، انتهای خیابان رازی، معاونت تحقیقات و فناوری، مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی
پست الکترونیک: re.mari@yahoo.com

[Downloaded from yafteh.lums.ac.ir on 2026-11-01]

مقدمه

با توجه به مقاومت دارویی و عوارض جانبی داروهای آنتی باکتریال شیمیایی، رویکرد تحقیقات علمی به منابع طبیعی در چند دهه اخیر بسیار فراوان می باشد. گیاهان را می توان به عنوان منبعی از مواد شیمیایی بالقوه مفید دانست که تنها بخشی از آن مورد بهره برداری قرار گرفته است. یکی از مهم ترین چالش های درمانی، مقابله با بیماری های عفونی به دلیل شیوع و گسترش بالای آنهاست. استفاده بی رویه از داروهای شیمیایی ضد میکروبی منجر به افزایش مقاومت های دارویی علیه آنتی بیوتیک های متفاوت در اکثر باکتری ها گردید(۱). مقاومت باکتری ها به آنتی بیوتیک ها روز به روز در حال افزایش است که این مسئله باعث می شود تا بشر به فکر جایگزین کردن عوامل ضد میکروبی مؤثر و با عوارض جانبی کمتر به جای مواد ضد میکروبی با اثر کمتر و عوارض نا خواسته بیشتر باشد. عصاره های گیاهی دارای موادی هستند که می توانند بر علیه بسیاری از میکروارگانیسم ها بکار روند. این اثرات ضد میکروبی بر علیه باکتری ها و قارچ ها ثابت گردیده است (۲).

یونجه (Medicago sativa) گیاهی است علفی و چند ساله از تیره بقولات (Fabaceae)، سرشار از ویتامین های K E,C,A بوده همچنین دارای آمیلاز که آنزیم مخصوص هضم مواد نشاسته ای است می باشد. آنزیم های بسیاری در یونجه یافت می شود به عنوان مثال می توان از امولسین، اینورتاز و پکتیاز نام برد. یونجه دارای پروتئین، منیزیوم، آهن و مقدر جزیی ارسنیک و سیلیس است (۳).

نظر به این که گیاهان دارویی در کشور ما پراکندگی وسیعی دارند، مطالعات روی این گیاهان از نظر خواص ضد میکروبی آن ها زمینه مناسبی را فراهم می کند که از نتایج این بررسی ها جهت جایگزین نمودن داروهایی با منشأ طبیعی برای کنترل و درمان عفونت های باکتریایی استفاده نمود و این امر می تواند موجب کاهش مصرف داروهای شیمیایی و عوارض ناشی از آن گردد.

پژوهش حاضر تلاشی، در جهت ارزیابی آزمایشگاهی تأثیر ضد میکروبی عصاره آبی این گیاه بر روی تعدادی از باکتری های گرم منفی و گرم مثبت انجام گردید.

مواد و روش‌ها

عصاره گیری

گیاه مورد مطالعه در این پژوهش در مهر ماه ۱۳۹۱ از سازمان جهاد کشاورزی شهرستان خرم آباد تهیه و توسط کارشناس مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی دانشگاه علوم پزشکی لرستان عصاره‌گیری شد. عصاره آبی بذر یونجه به روش ماسراسیون و به مدت ۴۸ ساعت استخراج شد. سپس عصاره با استفاده از قیف بوخنر فیلتر شده و پس از آن به منظور جدا نمودن حلال با استفاده از دستگاه رتاری مدل Heidolph ساخت کشور آلمان تحت خلاء تغلیظ گردید. عصاره حاصل تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شد.

سویه های باکتریایی

باکتری های مورد استفاده در این تحقیق عبارت بودند از استافیلوکوکوس اورئوس(ATCC25923)، سودوموناس آئروژینوزا (ATCC27853)، اشرشیاکلی (ATCC25922)، لیستریا مونوسیتوژنز (ATCC7644) ، که این سویه‌های استاندارد از انستیتو پاستور تهیه و مورد آزمایش قرار گرفتند .

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC)

تعیین MIC(Minimum Inhibitory Concentration) یا حداقل غلظت مهار کننده رشد باکتری با روش میکرو دایلوشن براث انجام شد (۴). بدین صورت که ابتدا از محیط کشت مولر هینتون برات (مرک آلمان) ۱۰۰ µl

[Downloaded from yafteh.lums.ac.ir on 2026-11-01]

داخل ۹۶ چاهک میکروپلیت ریخته، سپس به اولین چاهک هر ردیف ۸۰ µl عصاره اضافه گردید و از چاهک دوم به سوم و به همین ترتیب تا چاهک ۱۲ رقت های یک دوم تهیه شد. در یک ردیف هم به جای عصاره و بـه عنـوان کنتـرل مثبـت ۸۰µl از آنتی بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین، جنتامایسین و پنی سیلین متناسب با حساسـیت بـاکتری مـورد آزمـایش، اضـافه و رقیـق سـازی انجـام شـد. در آخـر بـه همـه چاهـک‌هـا ۱۰۰ µl سوسپانسیون میکروبی، معادل نیم مک فارلند (۴) به محتویـات قبلی چاهک ها اضافه گردید. بعد از ۲۴ سـاعت انکوباسـیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، وجود یا عـدم وجـود کـدورت کـه نشان دهنده رشد و یا مهار رشد بـاکتری بـود مشـاهده و ثبـت شد. طبق تعریف غلظت آخرین (رقیق ترین) چاهکی کـه هـیچ کدورتی در آن ایجاد نشده و رشد باکتری در آن مهار شده بود، به عنوان MIC یا حداقل غلظت مهار کننده رشد عصاره تعیین شد. کنترل مثبت رشد باکتری، شامل محیط کشـت و بـاکتری برای هر سویه و کنترل منفی شامل محیط کشت فاقـد عصـاره و باکتری نیز به طور جداگانه برای هر تیمار منظور گردید .

تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC)

بـــرای تعیـــین minimum Bactericidal concentration (MBC)، ۱۰µl از سـه چاهـک ماقبـل خانـه MIC بطور جداگانه بر روی محیط مولر هینتون آگـار کشـت داده شد. پس از۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای۳۷ درجـه سـانتی گـراد کمترین غلظتی از عصاره که باکتری در آن رشد نکـرده بـود (۹۹٪ عدم رشد)به عنوان غلظت کشندگی MBC گزارش شد (۴).

روش دیسک دیفیوژن(disc diffusion)

به منظور آزمایش دیسک دیفیـوژن (DD) بـاکتری هـا روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شـدند. دیسـک هـای عصـاره ۶/۴ میلی متری بوده و از قبل۲۰ میکرولیتر عصاره به هـر دیسـک اضافه و خشک شدند. از این دیسـک هـای حـاوی عصـاره پـس از کشـت بـاکتری روی محـیط قـرار داده شـد. پـس از ۲۴ سـاعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سـانتی گـراد قطـر هالـه عـدم رشـد را از پشت پلیت با خط کش اندازه گیـری کـرده و نتـایج حاصـل ثبـت شـدند (۵). دیسـک‌هـای آنتـی بیـوتیکی سـفتازیدیم ۱۰µg، سیپروفلوکسازین ۵ µg و پنی سیلین ۱۰µg به عنـوان کنتـرل در این روش نیز به کار برده شدند. همه آزمایشات ۳ بار تکرار شدند.

یافته‌ها

در مطالعه روش میکرو دایلوشن براث، اثـر ضـد میکروبـی عصاره آبی بذر یونجه بر روی سـویه هـای اسـتاندارد لیسـتریا مونوسیتوژنز، استافیلوکوکوس اورئوس، سـودوموناس آئروژینـوزا و اشرشیا کلی مورد بررسـی قـرار گرفـت. نتـایج نشـان دادنـد که MIC عصاره بذر یونجه علیه استافیلوکوکوس اورئوس برابـر ۳۳۰۰µg/ml بوده یعنی در این غلظت دارای اثر مهارکننـدگی (Bactriostatic) و MBC آن در برابر غلظـت۶۶۰۰ µg/ml بـوده و در آن غلظـت اثرکشـندگی (Bactriocide) از خـود نشان داد. عصاره مذکور در غلظت هـای مطالعـه شـده در ایـن مطالعه و با روش های کار شده در آن بر سایر باکتری‌ها تأثیری نداشت. همچنین MIC آن بر علیه لیستریا در غلظت µg/ml ۲۵۰ مشاهده گردیـد و اثرکشـندگی مشـاهده نشـد. بنـابراین عصاره آبی گیاه یونجه بر باکتری های گرم منفـی در ایـن روش فاقد تاثیر بود .

در روش دیسک دیفیوژن قطر هالـه عـدم رشـد در مـورد استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا مونوسایتوژنز به ترتیب برابـر ۱۲,۵ و ۹ میلیمتر بوده و در مورد سایر بـاکتری‌هـا هالـه عـدم رشدی اطراف دیسک حاوی عصاره مشاهده نشد که ایـن نتـایج داده های روش میکرو دایلوشن براث را تأیید می‌کند.

[Downloaded from yafteh.lums.ac.ir on 2026-11-01]

بحث و نتیجه‌گیری

بیماری‌های عفونی در زمره شناخته شده‌ترین بیماری هایی هستند که همواره گریبان گیر انسان بوده و تلاش‌های زیادی برای شناخت عوامل ایجاد کننده، درمان و کنترل آنها صورت گرفته است (۶). با توجه به نتایج به دست آمده، مشخص شد که عصاره آبی بذر یونجه در شرایط آزمایشگاهی دارای قابلیت ضد باکتریایی قابل ملاحظه‌ای بر باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس مورد مطالعه می‌باشد ولی بر سایر باکتری های ذکر شده فاقد تأثیر است. یکی از دلایل احتمالی عدم مشاهده اثرات ضد باکتریایی قوی از عصاره آبی بذر یونجه در این تحقیق این است که ماده مؤثره واجد اثرات ضد باکتریایی این گیاه در اسانس گیاه می‌باشد که با توجه به غلظت پایین اسانس در عصاره یک گیاه، مشاهده نشدن اثرات ضد باکتریایی از آن دور از انتظار نیست. عامل دیگری که ممکن است اثرات ضد باکتریایی عصاره یک گیاه را تحت تأثیر قرار دهد، روش عصاره‌گیری و نوع حلال مورد استفاده می‌باشد. عصاره‌هایی که با روش‌ها و حلال‌های متفاوتی از یک گیاه گرفته شده می‌توانند اثرات ضد باکتریایی متفاوتی بر روی یک باکتری خاص از خود نشان دهند(۷).

همچنین نتایج به دست آمده از تحقیقات انجام شده توسط گروهی از محققان در سال ۲۰۰۴، بیانگر حساسیت سویه های استافیلوکوکوس اورئوس به دوز مشخصی از اسانس اوکالیپتوس است. این مطالعه نشان داد که اسانس اوکالپتوس علیه عفونت های ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس های مقاوم بسیار مؤثر است که این نتایج با نتایج حاصل از اثر ضد استافیلوکوکی عصاره آبی و جوشانده اوکالیپتوس جمع آوری شده در استان گلستان مطابقت دارد(۸).

تحقیقات انجام شده در نیجریه بر روی۶ گونه گیاهی از گیاهان دارویی این منطقه نشان می دهد که ۴ گونه از این گیاهان دارویی که به طور معمول توسط پزشکان در درمان عفونت های پوست و عفونت های دستگاه تنفس استفاده می شد بر علیه سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مؤثرند(۹).

مطالعات مختلف نشان می دهند که یونجه دارای فعالیت ضد میکروبی وسیعی علیه بسیاری از باکتری ها می باشد(۱۰). همچنین درمطالعه ای مشابه که توسط علی احمدی و همکاران در سال ۲۰۱۰ انجام گرفت نیز تأثیر این عصاره در از بین بردن باکتری ها به اثبات رسید (۱۱).

یک مطالعه در سال ۲۰۰۶ اثرات ضد میکروبی در گیاه یونجه را به اثبات رساند (۱۲). نتایج این بررسی پیشنهاد می کند که عصاره آبی بذر یونجه می تواند به تنهایی یا همراه با سایر عوامل ضد میکروبی برای درمان برخی از عفونت های باکتریایی مفید باشد. با این حال آزمایش در سیستم زنده برای ارزیابی سمیت احتمالی عصاره ، بررسی خواص و اثر آن و به دست آوردن غلظت های مناسب این عصاره برای استفاده در بدن موجود زنده لازم است.

مطالعات آینده بایستی اجزاء تشکیل دهنده این گیاه را تجزیه کنند و هر کدام از این اجزاء به تنهایی از نظر اثرات ضد میکروبی مورد بررسی قرار گیرند. همچنین ارزیابی کلینیکی برای پی بردن به امکان استفاده از این گیاه به عنوان مواد ارزان و با اثرات جانبی کم برای پیشگیری و درمان عفونت های رایج بخصوص در مواردی که مقاومت دارویی و خطر عفونت مجدد در آن بالا است مورد نظر می باشد.

تشکر و قدردانی

کلیه مراحل این پروژه در مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی دانشگاه علوم پزشکی لرستان انجام پذیرفت. شایسته است از سرپرست محترم این مرکز جناب آقای دکتر بهرام رسولیان و پرسنل مربوطه که در اجرای آن ما را حمایت نمودند کمال تشکر و قدردانی را داشته باشیم.

[Downloaded from yafteh.lums.ac.ir on 2026-11-01]

References

1. Weinstine RA. Controlling antimicrobial resistance in hospitals: Infection control and use of antibiotics. Emerg Infect Dis. 2001;7:188-192.
2. Lin J, Opoku AR, Geheeb-Keller M, Hutchings AD, Terblanche SE, Jager AK, Van Staden J. Preliminary screening of some traditional Zulu medicinal plants for anti-inflammatory and antimicrobial activities. Journal of Ethnopharmacology. 1999;68:267-274.
3. Chopra, N, Nayar L, and Chopra C. Glossary of Indian Medicinal Plants (Including the Supplement). Council of Scientific and Industrial Research, New Delhi. 1986;16-35.
4. Mahon C R, Manoselis G. Textbook of Diagnostic Microbiology, Chapter 3, 2nd edition WB. Saunders Company. 2000;62-95.
5. Androw JM. BSAC Standardized disc susceptibility testing method.J AntimicrobChemother. 2001;3:48-57.
6. Talei GR, Meshkatalsadat MH, Mosavi Z. Antibacterial Activity and Chemical Composition of Essential Oils from Four Medicinal Plants of Lorestan, Iran. Journal of Medicinal Plants. 2007;1(6):45-52.
7. Nostro A, Germano MP, Angelo VA, Marino A, Connatelli MA. Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. Lett Appl Microbiol. 2000;30(5):389-394.
8. Tvivedi NA, Hotchandani SC. Study of the antimicrobial activity of oil Ecucalyptus. Indian Journal of farmacology. 2004;36(2):93-94.
9. Akinyemi K, Oladapoo , Okware CE , Ibe CC, Fasure KA. Screening of crude extracts of six medical plants used in south-west Nigerian unorthodox medicine for antimethicillin resistant s.aureus activity. BMC Complementory and Alternative medicine. 2005;5:6.
10. Doss V, Parivuguna M. Antibacterial evaluation and phytochemical analysis of Medicago sativa L. against some microbial Pathogens. Indian Journal of Science and Technology. 2011;4:550-552.
11. Aliahmadi A, Roghanian R, Emtiazi G, Ghassempour A. A simple method for primary screening of antibacterial peptides in plant seeds**.** IRAN J MICROBIOL. 2011;3:104-108.
12. Pinarosa A, Rossella B, Aldo T, Cesare V, Antonio R, Marian J. Antimicrobial Activity of Saponins from Medicago sp. Structure-Activity Relationship. Phytother Res. 2006;20:454-457.

[Downloaded from yafteh.lums.ac.ir on 2026-11-01]