بررسی فعالیت ضد میکروبی اسانس و عصاره گیاه مورد (Myrtus communis L.) علیه سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به آنتی بیوتیک های انتخابی

- سعیده سعیدی[۱]
- سید کاظم صباغ*[۲]
- الهام صبوری رباط[۳]

چکیده

مقدمه و هدف

بیماری های عفونی ایجاد شده توسط سویه های گرم مثبت باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به دارو، که اغلب دارای منشأ بیمارستانی می باشند در بسیاری از کشورهای جهان در حال افزایش است، از این رو تلاش های بسیاری جهت یافتن ترکیبات جدید به عنوان جایگزینی مناسب برای آنتی بیوتیک ها صورت گرفته است. در این تحقیق اثر ضد باکتریایی عصاره اتانولی گیاه مورد و اسانس آن علیه چندین سویه بالینی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به آنتی بیوتیک مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

استخراج عصاره و اسانس گونه گیاهی مورد به ترتیب با استفاده از دستگاه روتاری و کلونجر انجام شد. نمونه برداری از نواحی حلق و بینی بیماران انجام و تعداد ۱۷ سویه استافیلوکوکوس اورئوس جدا و خالص سازی گردید. حداقل غلظت باز دارندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره و اسانس گیاه مورد در شش غلظت مختلف با روش رقیق سازی در محیط مایع بر روی باکتری تعیین شد. حساسیت سویه ها به چند آنتی بیوتیک با روش استاندارد دیسک دیفیوژِن کربی- بائر بیوگرام مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها

نتایج این تحقیق نشان داد که حداقل غلظت بازدارندگی عصاره و اسانس گیاهی مورد در غلظت ۵ میلی گرم در میلی لیتر می باشد. در حالیکه

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات کرمان، کرمان، ایران

۲. استادیار گروه گیاه پزشکی و پژوهشکده زیست فناوری کشاورزی دانشگاه زابل، زابل،ایران Sk.sabbagh@uoz.ac.ir

۳. دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتنکولوژی گروه بیوتکنولوژی دانشگاه زابل، زابل، ایران

Archive of SID

www.SID.ir

حداقل غلظت کشندگی از عصاره و اسانس در مقدار ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر مشاهده شد. ارزیابی اثـر ضد باکتریـایی چنـد آنتـی بیوتیـک نشـان داد کـه حساسیت سویه های مورد مطالعه به آنتی بیوتیـک مشابه بود. اما پنی سیلین و سفکسیم کمتـرین اثـر آنتی بیوتیک را نشان داد همه سویه هـا نسـبت بـه وانکومایسین مقاومت نشان دادند.

نتیجه گیری

اسانس و عصاره گیـاه مـورد در غلظـت هـای بـالا دارای اثر ضد باکتریایی مـی باشـند. بنـابراین ایـن ترکیبات می توانند در درمـان هـای دارویـی مـورد استفاده قرار گیرند.

کلمات کلیدی

گیاهان دارویی، حداقل غلظت بازدارندگی، اثـر ضـد باکتریایی، مورد

AStudy of antibacterial activity of plant extract and essential oil of Myrtus communis against resistant strains of Staphyloccocus aureus bacteria to selective antibiotics

- **Saeedi S[1]**
- **Sabbagh SK[*2]**
- **Sabori Robat E[3]**

Abstract

Introduction

Infectious diseases caused by gram-positive bacteria, drug resistant *Staphyloccocus aureus* strains which often originate from hospitals environment, are increasing in many countries of, worldwide. Because of that, lots of efforts have been done to find new compounds as suitable superseded instead of antibiotics. In this research, antibacterial effect of plant ethylic essential oil and extract of *Myrtus communis* against several clinical antibiotic resistant strains of *S. aureus* were investigated.

Methods

Plant extraction and essential oil extraction from *M. comminus* species were performed using Rotary and Clevenger apparatus, respectively. Sampling was carried out from nose and throat area of patients. Seventeen strains of *S. aureus* were isolated and after that purified. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bacterial Concentration (MBC) of plant extract as well as essential oil from *M. comminus* on bacteria were determined using micro dilution broth method at six different concentrations. Sensitivity of strains against some antibiotics was investigated using standard disc's diffusion Corbei-baer method.

Results

The results indicated that plant's essential oil and plant's extract have a significant effect on concentration of 5 mg/ml whereas 10 mg/Kg was belonging to high Minimum Bacterial Concentration (MBC) for both treatments. The Assessment of antibacterial effects of some antibiotics showed that the majority of strains have similar sensitivities. But Penicillin and Cefexime showed the least antibiotic effect. All strains showed resistant reaction to Vancomycin.

Conclusion

Plant's extract and essential oil from *Myrtus communi* have antibacterial effects on *S. aureus* strains at high concentration; such compounds can be used in medical treatments.

1. MSc Student of Microbiology, Faculty of Science, Islamic Azad University, Science and Research Branch of Kerman,Kerman,Iran
2.PhD of Plant Biotechnology, Department of Plant Protection and Institute of Plant Biotechnology, University of Zabol,Zabol,Iran
3. MSc Student of Plant Biotechnology, Department of Plant Biotechnology, University of Zabol,Zabol,Iran

Archive of SID
www.SID.ir

Key words
Plant medical, Minimum bacterial concentration, Antibacterial effect, *M. comminus*

مقدمه

باکتری استافیلوکوکوس اورئوس[1] از عوامل اصلی ایجاد عفونت های بیمارستانی بوده که شیوع آن رو به گسترش است. این باکتری در ایجاد طیف وسیعی از بیماری ها از جمله اندوکاردیت، استئومیلیت، پنومونی، سندروم شوک توکسیک، کورک یا دمل و غیره نقش دارد (۱). بررسی ها نشان داده است که بالغ بر ۲۵ تا ۳۰ درصد افراد در جوامع مختلف، ناقل باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در بینی خود می باشند که در بسیاری از موارد می توانند به عنوان منشأ عفونت های بعدی عمل نمایند (۱). گسترش روز افزون سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به آنتی بیوتیک ها نظیر وانکومایسین، یکی از معضلات بهداشتی است که باعث شده است تعداد آنتی بیوتیک های مؤثر و در دسترس، جهت درمان این عفونت ها کاهش یافته و جامعه پزشکی را در کنترل این بیماری با مشکل روبرو نماید (۲)، در ایران، فرانسه و تعدادی از کشورهای آمریکایی و آسیایی، مقاوت سویه هایی از این باکتری به آنتی بیوتیک وانکومایسین گزارش شده است (۷-۳). اخیراً با توجه به اثرات جانبی آنتی بیوتیک های مصرفی و مقاومت تعدادی از سویه های باکتری، نظیر سویه های استافیلوکوکوس اورئوس در برابر آن ها، به عملکرد ضد میکروبی عصاره ها و ترکیبات طبیعی استخراج شده از گونه های مختلف گیاهی توجه زیادی شده است (۸). بدین ترتیب شناسایی تعداد بیشتری گیاهان دارای خاصیت ضد میکروبی و جداسازی و خالص سازی ترکیبات مؤثر آن ها در درمان بیماری های عفونی می تواند یکی از راههای مؤثر و مفید در درمان عفونتهای مقاوم به آنتی بیوتیکها بشمار آید. عصاره تعداد زیادی از گیاهان دارویی دارای مواد مؤثر بر علیه قارچ ها، باکتری ها، ویروس ها و حشرات بوده و همچنین دارای خاصیت آنتی اکسیدانی نیز می باشند (۱۰-۹). نقش عصاره تعدادی از گیاهان دارویی در جلوگیری از رشد بی رویه سلول های سرطانی به اثبات رسیده (۱۱) و یا از آن ها در نگهداری مواد غذایی استفاده می شود (۱۲). ترکیبات ضد میکروبی با منشا گیاهی دارای پتانسیل های درمانی بی شماری در درمان بیماری های عفونی بوده و گاهاً مصرف همزمان آن ها با آنتی بیوتیک ها، اثرات جانبی ناشی از مصرف آنتی بیوتیک ها را کاهش داده است (۱۴-۱۳). گونه گیاهی مورد[2] (*) گیاهی درختچه ای و همیشه سبز است که به صورت خودرو در دشت های کشور های آسیایی از جمله ایران و کشور های مدیترانه ای رشد می کند. این گیاه به علت دارا بودن برگ های سبز دائمی و گل های زیبا و درشت به صورت زینتی نیز کاشته می شود. از زمان های قدیم، از اسانس گیاه مورد به عنوان ماده ضدعفونی کننده استفاده شده است (۱۵). علاوه بر اثر ضد عفونی کنندگی اسانس این گونه گیاهی، از آن در مصارف داخلی و استعمال خارجی به عنوان تقویت کننده معده و قابض و همچنین جهت رفع بیماری های تنفسی و مجاری ادراری استفاده می شود (۱۵). هدف از این تحقیق در ابتدا بررسی اثر ضد میکروبی عصاره اتانولی و اسانس گیاه مورد علیه جدایه های کلینیکی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به آنتی بیوتیک و در نهایت تعیین غلظت های بازدارنده و کشنده آن ها بر روی استرین های مقاوم در جهت معرفی به صنعت داروسازی می باشد.

1. Staphylococcus aureus

2. Myrtus communis L., Myrtaceae

Archive of SID
www.SID.ir

روش پژوهش

تهیه نمونه

گیاه مورد استفاده در این تحقیق از شهرستان جیرفت جمع آوری و در هرباریوم گیاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد جیرفت با توجه به مشخصات ظاهری و توصیفات گیاه شناسی به عنوان *M. communis L.* تشخیص داده شد. پس از جمع آوری گیاهان، برگ ها در شرایط مناسب و در سایه خشک گردیده و جهت تهیه عصاره با آسیاب خرد شدند.

تهیه عصاره

برای تهیه عصاره از روش ماسراسیون (خیساندن) استفاده شد. بدین منظور پس از خرد کردن برگ ها، ۵۰ گرم از هر نمونه به مدت ۴۸ ساعت در متانول ۸۰ درجه خیسانده و نگهداری شد. سپس عصاره به دست آمده با کاغذ صافی معمولی صاف و با استفاده از دستگاه تقطیر در خلا چرخان، تغلیظ و در دمای۵۰-۴۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲روز خشک گردید .

تهیه اسانس

استخراج اسانس گیاهی با استفاده از روش تقطیر با بخار[1] و دستگاه کلونجر انجام شد. ۲۰۰ گرم از پودر خشک گیاه در یک بالن دو لیتری ریخته و حدود دو سوم بالن آب اضافه گردید و بالن ها به دستگاه کلونجر متصل شد تا عمل تقطیر به مدت ۴ ساعت انجام شود. پس از استخراج اسانس، عمل آب گیری انجام گردید و اسانس به دست آمده در یک ظرف در بسته تیره رنگ در یخچال نگهداری گردید.

1. Steam distillation

تعیین وزن خشک عصاره و اسانس

ابتدا وزن یک لوله آزمایش تعیین و یک میلی لیتر از عصاره و اسانس استخراج شده به درون آن منتقل شد. لوله حاوی اسانس یا عصاره در دمای اتاق خشک گردید. بعد از خشک شدن عصاره و اسانس، لوله آزمایش مجدداً وزن گردید. اختلاف وزن لوله معادل یک میلی لیتر از عصاره و اسانس بود. میانگین سه بار تکرار، به عنوان وزن خشک عصاره و اسانس محاسبه شد.

سویه های باکتری

سویه های مختلف استافیلوکوکوس اورئوس مورد استفاده در این تحقیق از بیماران بستری شده در بخش عفونی بیمارستان امیرالمومنین (ع) شهرستان زابل با عفونت های مختلف جداسازی شده و بر روی محیط های کشت اختصاصی مانیتول سالت آگار و بلاد آگار کشت و خالص سازی شدند و در پژوهشکده زیست فناوری با استفاده از تست های بیوشیمیایی کاتالاز، کوآگولاز، DNase ، رشد بر روی محیط کشت افتراقی مانیتول سالت آگار و همچنین تشکیل آگلوتیناسیون بر روی لام شیشه ای به عنوان گونه استافیلوکوکوس اورئوس شناسایی شدند. وضعیت افتراقی سویه ها به آنتی بیوتیک و مشخصات بیولوژیکی آن ها با توجه به نوع متفاوت عفونت بیمار و سنین مختلف از همدیگر تعیین گردید.

تهیه سوسپانسیون میکروبی ۰/۵ مک فارلند

برای تهیه سوسپانسیون میکروبی، در ابتدا ۲۴ ساعت قبل از انجام آزمایش، از کشت ذخیره به محیط کشت شیبدار آگار مغذی (مرک آلمان) تلقیح شد. پس از رشدکلنی های باکتری، سطح محیط کشت با محلول نرمال سالین شسته و سوسپانسیون غلیظ میکروبی حاصل گردید. سپس مقداری از سوسپانسیون باکتری، داخل لوله استریل درب دار حاوی نرمال سالین ریخته شده و کدورت

Archive of SID
www.SID.ir

آن با اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۳۰ نانومتر اندازه گیری شد و تا هنگام برابر شدن کدورت محلول با کدورت محلول ۰/۵ مک فارلند، با نرمال سالین رقیق و سوسپانسیون باکتری با غلظت 1×10^8 cfu/ml تهیه گردید.

آزمون حساسیت میکروبی به آنتی بیوتیک‌ها

حساسیت ۱۷ سویه خالص شده از گونه استافیلوکوکوس اورئوس به آنتی بیوتیک های تری متوپریم، آمپی سیلین، سفتازیدیم، تتراسیکلین، اریترومایسین، پنی سیلین، سفتریاکسون، آمیکاسین و سفکستین که از شرکت پادتن طب ایران تهیه شده بودند با استفاده از روش استاندارد دیسک دیفیوژِن کربی- بائر مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور، در ابتدا از تمام سویه های باکتری، غلظت ۰/۵ مک فارلند (1×10^8 cfu/ml) در محیط مایع آبگوشتی مولر هینتون تهیه و سپس بر روی محیط آگار مولر هینتون پخش و کشت داده شدند. دیسک های بلانک پادتن طب مطابق دستور شرکت سازنده به هر آنتی بیوتیک آغشته شده و پس از خشک شدن در شرایط استریل، بر روی سطح محیط کشت مولر هینتون آگار حاوی باکتری در نزدیکی لبه پلیت ها قرار داده شدند. بر روی هر پلیت یک دیسک آب مقطر به عنوان شاهد مثبت قرار داده شد. پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه داری و قطر هاله های باز دارنده جهت ارزیابی و تعیین مقاومت و حساسیت سویه ها به آنتی بیوتیک های مورد نظر، اندازه گیری شد. هر آزمایش سه دفعه و بطور مستقل از هم انجام و داده های حاصل با استفاده از نرم افزار آماری SPSS آنالیز گردید. نتایج حاصل از آنالیز داده های به دست آمده با جدول استاندارد NCCLS مقایسه شد .

آزمون ضد میکروبی عصاره و اسانس

حساسیت جدایه های باکتری دارای مقاومت چند گانه نسبت به عصاره و اسانس مورد با استفاده از روش رقیق سازی در محیط مایع[1] در پلیت های ۹۶ خانه ای ته گرد مورد بررسی قرار گرفت. به خانه های ردیف اول پلیت فقط محیط کشت و سوسپانسیون باکتری اضافه گردید. در ردیف بعدی به ۶ خانه از پلیت ها، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محیط مایع مغذی مولر هینتون اضافه شد. به چاهک اول ۱۰۰ میکرولیتر از اسانس و یا عصاره گیاهی به غلظت ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر اضافه شده و تا چاهک ششم به ترتیب غلظت های ۰/۳- ۰/۶۲- ۱/۲۵- ۲/۵ و ۵ میلی گرم در میلی لیتر با روش رقیق سازی تهیه گردید. به هر چاهک مقدار ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری معادل ۰/۵ مک فارلند اضافه شد (غلظت نهایی باکتری در هر چاهک 5×10^5). محتویات هر چاهک ۲ دقیقه بوسیله دستگاه Plate Reader مجهز به تکان دهنده با هم مخلوط شده و در زمان صفر عمل طیف سنجی با طول موج ۶۳۰ نانومتر اندازه گیری شد. پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد گرمخانه داری شدند و کدورت و یا عدم کدورت چاهک ها به صورت چشمی مورد ارزیابی قرر گرفته و عمل طیف سنجی مربوط به هر چاهک در طول موج ۶۳۰ نانومتر اندازه گیری شد. اولین رقتی که توانست کمترین میزان کدورت را نشان دهد به عنوان حداقل غلظت کشنده تعیین گردید. این آزمایش در سه تکرار جداگانه انجام و میانگین سه تکرار برای هر چاهک برای تعیین کمترین غلظت بازدارنده مورد استفاده قرار گرفت.

یافته ها

واکنش باکتری به آنتی بیوتیک

فعالیت ضد باکتریایی چند آنتی بیوتیک علیه سویه های بدست آمده در شرایط آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این آزمون نشان داد که سویه های استافیلوکوکوس اورئوس به اغلب آنتی بیوتیک‌های مورد استفاده، رفتار تقریباً مشابهی در شرایط آزمایش از خود نشان می دهند، اما با این

1. Micro Broth Dilution

Archive of SID

www.SID.ir

وجود تفاوت هایی در بین جدایه ها در بروز عملکرد مقاومت یا حساسیت به آنتی بیوتیک دیده شد، به طوری که ۵ سویه (سویه های شماره ۲، ۸، ۱۰، ۱۳، ۱۴) نسبت به اغلب آنتی بیوتیک ها مقاوم بودند (جدول۱)

جدول۱:: الگوی حساسیت سویه های باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی نسبت به آنتی بیوتیک‌ها

سویه باکتری	آنتی بیوتیکها								
S. aureus	CA	AM	TR	TE	ER	PE	CR	AN	CF
Sa1	R	S	I	S	I	R	I	S	R
Sa2	R	R	R	R	R	R	I	S	R
Sa3	R	S	S	S	I	R	I	S	R
Sa4	R	R	S	I	R	R	I	S	R
Sa5	R	R	S	S	R	R	S	S	R
Sa6	R	R	S	I	R	R	I	S	R
Sa7	R	R	R	R	R	S	I	S	S
Sa8	R	R	S	R	R	R	I	S	R
Sa9	S	S	S	I	R	R	I	S	S
Sa10	R	R	S	I	R	R	R	R	R
Sa11	R	R	S	I	R	R	I	S	R
Sa12	S	R	R	S	R	R	I	S	R
Sa13	R	R	I	R	R	R	I	S	R
Sa14	R	I	R	I	R	R	R	S	R
Sa15	I	R	I	I	R	R	R	S	R
Sa16	S	R	S	I	R	R	R	R	R
Sa17	S	I	R	S	S	I	S	S	I

*VA: Vancomycin, CF: Cefexime, CA: Ceftazidime, CR: Ceftriaoxne, AN: Amikacin, PE: Penicillin, ER: Erithromycin, TE: Tetracycline; AM: Ampicillin, TR: Trimethoprime

Sa*: Staphyloccocus aureus**

R: Resistant

S: Sensitive

I: Intermediate

که در این میان سویه Sa10 بیشترین مقدار مقاومت را از خود نشان داد. از میان آنتی بیوتیک های مورد استفاده دو آنتی بیوتیک پنی سیلین و سفکستین کمترین میزان بازدارندگی از رشد باکتری را نشان دادند که این امر می تواند ناشی از مکانیسم اثر متفاوت آنتی بیوتیک ها بر روی عوامل میکروبی باشد. آنتی بیوتیک وانکومایسن با عدم تاثیر بر روی رشد باکتری به عنوان کم تأثیر ترین آنتی بیوتیک تعیین گردید که این امر نشان دهنده مقاومت نزدیک به ۱۰۰ درصدی سویه ها به این آنتی بیوتیک می باشد. تنها سویه Sa9 به این آنتی بیوتیک حساسیت نشان داد

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۲: درصد حساسیت سویه های باکتری *S. aureus* مورد بررسی نسبت به آنتی بیوتیک ها(٪)

حساسیت	تری متوپریم	آمپی سیلین	سفتازیدیم	تتراسیکلین	اریترومایسین	پنی سیلین	سفتریاکسین	آمیکاسین	سفکستین	وانکومایسین
مقاوم	۷۰/۶	۷۰	۲۹/۴	۲۳/۵	۸۲/۴	۸۸/۲	۲۳/۵	۵/۹	۸۲/۴	۵/۸۸
حساس	۲۳/۵	۱۷/۶	۵۲/۹	۲۹/۴	۵/۹	۵/۹	۵/۹	۹۴/۱	۱۱/۸	۹۴/۱۱
بینابینی	۵/۹	۱۱/۸	۱۷/۶	۴۷/۱	۱۱/۸	۵/۹	۷۰/۶	۰	۵/۹	۰

بیشترین و کمترین غلظت عصاره و اسانس

اثر ضد باکتریایی اسانس و عصاره گیاه مورد در غلظت های مختلف نشان داد که علی رغم مقاومت نسبی اکثر سویه ها در غلظت های مورد استفاده، بیشترین حساسیت در غلظت های ۱۰ و ۵ میلی گرم در لیتر تعیین گردید. علاوه بر این، از بین ۱۷ سویه مورد بررسی تنها سویه ۱۰ Sa در غلظت ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر از عصاره دارای فعالیت رشدی بوده و به این غلظت حساسیت نشان نداد (جدول ۳)، در حالی که همین سویه در غلظت ۵ میلی گرم در میلی لیتر از اسانس، فعالیت رشدی کمتری نسبت به غلظت مشابه از عصاره داشت (جدول۲). سویه Sa۱۰، همچنین نسبت به اکثر آنتی بیوتیک ها مقاوم بود (جدول ۱). به طور تقریبی بیشترین مقدار حداقل غلظت باز دارندگی برای اسانس مورد، غلظت های ۵ و ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر بوده است که به ترتیب دارای میزان بازدارندگی ۸۲/۳۵ و ۱۱/۷۵ درصد می باشند. در حالی که به طور تقریبی بیشترین مقدار حداقل غلظت کشندگی (MBC) در غلظت های ۵ و ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر به ترتیب ۵/۸۸ و ۸۸/۲۳ تعیین گردید (جدول ۴). میزان کدورت محیط کشت حاوی باکتری که تحت تأثیر اسانس و عصاره میزان قابل ملاحظه ای کاهش یافت که این میزان تغییر در کدورت ناشی از کاهش رشد باکتری در محیط کشت با طیف سنجی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از طیف سنجی نشان داد که بیشترین غلظت کشنده اسانس و عصاره در محدوده ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر و به ترتیب ۸۸/۲۳ و ۹۴/۱۱ درصد می باشد. در این غلظت تقریباً ۹۹/۹ درصد از سلول های باکتری در محیط کشت از بین رفتند (جدول۴). غلظت های ۱۰، ۵ و ۲/۵ میلی گرم در میلی لیتر از عصاره به ترتیب با تأثیر بازدارندگی (MIC) به میزان ۵/۸۸، ۷۰/۵۸ و ۱۷/۶۴درصد به ترتیب به عنوان بیشترین و کمترین غلظت بازدارندگی را نشان دادند (جدول ۵). به طور تقریبی ۹۴/۱۱ در صد از سویه ها به غلظت ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر از عصاره حساس بودند، در حالی که با نصف شدن غلظت عصاره در ۵ میلی گرم در میلی لیتر حساسیت سویه ها به ۲۳/۵۲ درصد رسید (جدول۵). نتایج حاصل از این آزمایشات نشان می دهد که در تمام موارد از غلظت های مورد استفاده، عصاره گیاه مورد نسبت به اسانس آن دارای بیشترین اثر بازدارندگی بر روی سویه های باکتری می باشد.

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۳: الگوی شدت بازدارندگی سویه های باکتری *S. aureus* در غلظت های مختلف اسانس (چپ) و عصاره (راست)

	رقت های اسانس گیاه مورد(میلی گرم در میلی لیتر)					
سویه باکتری	۰/۳	۰/۶۲	۱/۲۵	۲/۵	۵	۱۰
Sa1	++/++	++/++	++/++	++/+	+/−	−/−
Sa2	++/++	++/++	++/++	++/+	+/−	−/−
Sa3	++/++	++/++	++/++	++/++	+/+	−/−
Sa4	++/++	++/++	++/++	++/++	+/+	−/−
Sa5	++/++	++/++	++/++	++/++	+/+	−/−
Sa6	++/++	++/++	++/++	++/++	++/+	+/−
Sa7	++/++	++/++	++/++	++/++	++/+	+/−
Sa8	++/++	++/++	++/++	++/++	++/+	+/−
Sa9	++/++	++/++	++/+	++/−	+/−	−/−
Sa10	++/++	++/++	++/++	++/++	+/++	−/+
Sa11	++/++	++/++	++/++	++/++	+/+	−/−
Sa12	++/++	++/++	++/++	++/++	+/+	−/−
Sa13	++/++	++/++	++/++	++/++	+/+	−/−
Sa14	++/++	++/++	++/++	++/++	+/+	−/−
Sa15	++/++	++/++	++/++	++/++	+/+	−/−
Sa16	++/++	++/++	++/++	++/++	+/+	−/−
Sa17	++/++	++/++	++/++	++/+	+/−	−/−

*Sa: Staphyloccocus aureus

++ نشان دهنده رشد بسیار زیاد میکرواورگانیسم ، + نشان دهنده رشد کم میکرواورگانیسم و-نشان دهنده عدم رشد میکرواورگانیسم

جدول ۴: الگوی درصد حساسیتی سویه های *S. aureus* نسبت به رقت های مختلف اسانس گیاه مورد (mg/ml)

غلظت اسانس	۰/۳	۰/۶۲	۱/۲۵	۲/۵	۵	۱۰
MBC	۰	۰	۰	۰	۵/۸۸	۸۸/۲۳
MIC	۰	۰	۰	۵/۸۸	۸۲/۳۵	۱۱/۷۶

جدول۵: درصد حساسیتی سویه های *S. aureus* نسبت به رقت های مختلف عصاره گیاه مورد (mg/mL)

Archive of SID
www.SID.ir

غلظت عصاره	۰/۳	۰/۶۲	۱/۲۵	۲/۵	۵	۱۰
MBC	۰	۰	۰	۵/۸۸	۲۳/۵۲	۹۴/۱۱
MIC	۰	۰	۵/۸۸	۱۷/۶۴	۷۰/۵۸	۵/۸۸

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به افزایش مقاومت باکتری ها به انواع آنتی بیوتیک ها، تلاش های بسیار زیادی برای دستیابی به آگاهی های بیشتر از موارد استفاده از ترکیبات موثره موجود در گیاهان و کاربرد آنها در درمان بیماری های انسانی مختلف صورت گرفته است. گونه باکتریایی استافیلوکوکوس اورئوس یکی از میکروب های مهم ایجاد کننده بیماری های عفونی در انسان است که سویه هایی از آن به آنتی بیوتیک های رایج نظیر وانکومایسین مقاوم شده است و این روند رو به افزایش می باشد. مطالعه اثر عصاره ضد باکتریایی گیاه مورد و اکالیپتوس نشان داده است که عصاره مورد تأثیر بیشتری را در بازدارندگی رشد باکتری های مورد مطالعه از خود نشان می دهد (۱۶). با توجه به سابقه دیرینه این گیاه در درمان و بهبود بیماریهای میکروبی در انسان، در این تحقیق اثر عصاره اتانولی و اسانس گیا ه مورد (*M. communis* L.) بر روی سویه های باکتری استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از بیماران بستری شده در بیمارستان مورد ارزیابی قرار گرفت. تعداد ۱۷ سویه جدا شده از بیماران با استفاده از خصوصیات شیمیایی و ظاهری شناسایی شد و واکنش حساسیت و مقاومت سویه ها به چند آنتی بیوتیک رایج مورد بررسی قرار گرفت. نوع واکنش تمام سویه ها به یک آنتی بیوتیک خاص اغلب مشابه بود که این امر نشان دهنده تنوع ژنتیکی پایین سویه های جمعیت مورد مطالعه و همچنین نحوه واکنش آنتی بیوتیکی آنتی بیوتیک مصرفی می باشد. ولی واکنش سویه ها به آنتی بیوتیک های مختلف تا اندازه ای با هم فرق می‌کرد که این امر با توجه به نوع و نحوه اثر آنتی بیوتیک بر مکان های خاص درون سلولی نظیر میتوکندری، غشاء سیتوپلاسمی و هسته قابل توجیه می باشد. در این تحقیق بررسی اثر چند آنتی بیوتیک بر روی فعالیت سویه ها نشان داد که بیش از ۹۹ درصد سویه ها به این آنتی بیوتیک مقاوم هستند. نقش بازدارندگی ترکیبات مترشحه گیاهی بر روی سویه های مقاوم این باکتری به آنتی بیوتیک وانکومایسین توسط عصاره هیدروالکلی ۸ گیاه دارویی مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج نشان داده است که عصاره بالب گیاه موسیر در غلظت ۱۲۸ میکروگرم در میلی لیتر دارای خاصیت حداقل بازدارندگی بوده است (۱۷). در بررسی اثر بازدارندگی عصاره برگی گیاه مورد بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و همچنین مقایسه نقش ترکیبات مختلف تشکیل دهنده عصاره آن با روش های آنالیز دستگاهی نشان داده شده است که رادیکال های آزاد موجود در عصاره بیشترین تأثیر را در بازدارندگی دارا می باشند (۱۸) که در این میان ترکیب اتیل استات بیشترین اثر بازدارندگی را نشان داد (۱۹). اثر ضد باکتریایی ۲۰ گونه گیاهی بر روی گونه های مقاوم و حساس باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به آنتی بیوتیک متی سیلین نشان داد که حداقل غلظت بازدارندگی، ۲۰۰ مایکروگرم در میلی لیتر می باشد (۲۰). در مطالعه حاضر کمترین غلظت بازدارندگی اسانس و عصاره مورد به ۵ میلی گرم در میلی لیتر بود که این غلظت تقریباً ۲ برابر غلظت تعیین شده در مطالعات قبلی می باشد. در ارزیابی تاثیر عصاره مورد بر روی استرین های کلینیکی باکتری میکوباکتریوم نشان داده شده است که گونه های مختلف این جنس نسبت به یک غلظت مشابه واکنش های حساسیتی و مقاومتی مختلف از خود نشان می دهند (۲۱). واکنش های مختلف گونه های یک جنس و حتی استرین های یک گونه می تواند ناشی از افزایش مسیر های مقاومتی باکتری با

Archive of SID

www.SID.ir

آنتی بیوتیک ها و یـا ترکیبـات شـیمیایی مـوثر در گیاهان باشد. البته تفـاوت در واکـنش بـاکتری بـه غلظت های مختلف از یک گیاه می تواند بـه دلیـل تفاوت سویه های استافیلوکوکوس اورئوس آزمایش شده در پژوهش های مختلف، نحوه عصاره گیـری، نحوه انجام آزمایش و حتی نـوع و گونـه گیاهـان و رویشگاه طبیعی آنها باشد. بررسـی اثـر اسـانس ۱۹ گیاه دارویی در چین بر روی سویه های بیمارستانی استافیلوکوکوس اورئوس نشان داده است که غلظت های اسانس با حـداقل اثـر بازدارنـدگی در حـد ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر می باشد (۲۲) که بـا نتـایج این تحقیق مطابقت دارد. سویه های باکتری مـورد مطالعه در این تحقیق در برابر آنتـی بیوتیـک هـای مختلف واکنش های تقریباً مشابهی از خـود نشـان دادند و این در حالی است که چنانچه باکتری ها بـر اساس واکـنش بـه آنتـی بیوتیـک در گـروه هـای مختلف قرار داده شوند ایـن گـروه بنـدی در تـأثیر اسانس و عصاره بر روی سـویه هـا تغییـری ایجـاد نمـی کنـد و هـیچ ارتبـاطی بـین حـداقل غلظـت بازدارندگی و گروه های مقاومتی حاصل شده دیـده نمی شود و این غلظت در یک میـزان بـرای همـه باکتری ها موثر واقع خواهد شد. از این نتایج چنـین استنباط می شود که مسیر واکنش مقاومتی به آنتی بیوتیـک و اسـانس یـا عصـاره در بـاکتری کـاملاً متفاوت می باشـد و در بـاکتری هـای مقـاوم امیـد بسیار زیادی به اسـتفاده از مشـتقات گیـاهی بـرای کنترل آن ها وجود دارد. با توجه به وجود ترکیبـات متنوع و زیاد در اسانس و عصـاره گیاهـان دارویـی، آنالیز این ترکیبات بـا ابـزاری نظیـر کروماتوگرافی گازی جرمی می تواند بهترین ترکیـب یـا ترکیبـات مؤثر را تعیین و به صنعت داروسازی معرفی نمایـد. تعیین ترکیبات موجود در گیاهان بـا اثـر حـداکثر و حداقل و مقایسه مواد تشکیل دهنده می تواند منجر به معرفی مؤثرترین ماده کارآمد شود. در هر صورت معرفی یک گیاه به عنـوان گیـاه دارویـی، مسـتلزم مطالعات بیشـتر و تکمیلـی در تعیـین مـواد مـؤثره موجود در ترکیبـات و آزمـایش ایـن مـواد بـر روی سلول های باکتری در شرایط آزمایشگاه می باشـد. اگر چه هنوز معلوم نیست کـه بـاکتری بـا مصـرف مکرر گیاهان دارویی به آن ها مقاوم می شود ولـی نباید از اثرات جانبی استفاده بیش از حد آنها غافـل شد. به هر حال با توجه بـه ایجـاد مقاومـت سـویه های باکتری به آنتی بیوتیک هـای رایـج مصـرفی، لازم اسـت دز مصـرف هـر یـک از آن هـا بـرای بیماران، دز دارویی پایین تـری تجـویز شـود و بـه همراه مصرف دارو، جوشانده گیاه مورد و یا گیاهـان دارویی مشابه نیز توصیه شود تا از مقاومـت بیشـتر سویه هـا بـه داروهـای شـیمیایی جلـوگیری شـود. آزمایشات کلینیکی بر روی بیماران بعـد از مصـرف عصاره و اسانس گیاه مورد جهت تأیید این داده هـا توصیه می شـود تـا در نهایـت بتـوان آن را در رده داروهـای گیـاهی فرمولـه شـده در داروخانـه در دسترس بیماران قرار داد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در پژوهشکده زیست فنـاوری دانشـگاه زابل انجام شد که در اینجـا لازم اسـت از زحمـات سرکارخانم مهندس حمیده خواجه کارشناس محترم پژوهشکده تقدیر و تشکر بعمل آید.

References

1. Kluytmans J, Van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of Staphylococcus aureus: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. Clinical microbiology reviews. 1997;10(3):505-20.
2. Tiemersma EW, Bronzwaer S, Lyytikainen O, Degener JE, Schrijnemakers P, Bruinsma N, et al. European antimicrobial resistance surveillance system participants (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe 1992-2002. Emerging infectioud Disease Journal. 2004;10(9):1627-34.
3. Naderi Nasab M, Fateh Manesh P, Shahnavazi B. *Staphylococcus aureus*

Archive of SID
www.SID.ir

resistant against vancomycin. . Rahavard Danesh University of Medical Science. 2004;25(6):51-5.(persian)
4. Ploy M, Grelaud C, Martin C. First clinical isolate of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a French hospital. Lancet. 1998;351:1212-6.
5. Sieradzki K, Roberts B, Haber S, Tomasz A. The development of vancomycin resistance in a patient with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. National England Journal Medecal. 1999;340:517-23.
6. Zhen W, Bin C, Ying-mei L, Li C, Che W, (11):. Investigation of the prevalence of patients cocolonized or infected with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin resistant Enterococci in China: a hospital-based study. Chinese Medical Journal. 2009;122 (11):1283-8.
7. Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. Lancet. 1997;350:1670-3.
8. Prabuseenivasan S, Jayakumar M, Ignacimuthu S. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. BMC Complementary and Alternative Medicine. 2006;6(39):1-8.
9. Kordali S, Kotan R, Mavi A, Cakir A, Ala A, Yildirim A. Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of Artemisia dracunculus and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish Artemisia absinthium, A. dracunculus, Artemisia santonicum, and Artemisia spicigera essential oils. Journal of agricultural and food chemistry. 2005;53(24):9452-8.
10. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. International journal of food microbiology. 2004;94(3):223-53.
11. Sylvestre M, Pichette A, Longtin A, Nagau F, Legault J. Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. Journal of Ethnopharmacology. 2006;103(1):99-102.
12. Faid M, Bakhy K, Anchad M, Tantaoui-Elaraki A. Almond paste: physicochemical and microbiological characterization and preservation with sorbic acid and cinnamon. Journal of Food Protection. 1995;58(5):547-50.
13. Kokoska L, Polesny Z, Rada V, Nepovim A, Vanek T. Screening of some Siberian medicinal plants for antimicrobial activity. Journal of ethnopharmacology. 2002;82(1):51-3.
14. Prabuseenivasan S, Jayakumar M, Ignacimuthu S. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. BMC Complementary and Alternative Medicine. 2006;6(1):39.
15. Zargari A. Plant Medical. University of Tehran Press.1989:645-7.
16. Akin M, Aktumsek A, Nostro A. Antibacterial activity and composition of the essential oils of Eucalyptus camaldulensis Dehn. and Myrtus communis L. growing in Northern Cyprus. African Journal of Biotechnology. 2010;9(4):531-5.
17. Majnouni MB, Abiri R, Afnanzadeh N, Malekkhatabi P. Study of antibacterial effect of hydro alecol essential oil of eight medical plant on *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin. Plant Medical journal. 2012;8(1):103-10.
18. Berka-Zougali B, Ferhat MA, Hassani A, Chemat F, Allaf KS. Comparative Study of Essential Oils Extracted from Algerian Myrtus communis L. Leaves Using Microwaves and Hydrodistillation. International Journal of Molecular Sciences. 2012;13(4):4673-95.
19. Gholamhoseinian Najar A, Mansouri S, Rahighi S. Eeffect of sub-inhibitory concentration of *Myrtus communis* leave extracts on the induction of free radicals in *Staphylococcus aureus*; A possible mechanism for the antibacterial action. Asian Journal of Plant Sciences. 2009;8(8):551-6.
20. Dadgar T, Ghaemi E, Bazueri M, Asmar M, Mazandarani M, Saifi A, et al. The antibacterial effects of 20 herbal plants on methicillin resistant and

Archive of SID
www.SID.ir

sensitive *S.aureus* in Golestan provience. Joural of Gorgan University of Medical Science. 2007;1(9):55-62. (persian)
21. Zanetti S, Cannas S, Molicotti P, Bua A, Cubeddu M, Porcedda S, et al. Evaluation of the Antimicrobial Properties of the Essential Oil of Myrtus communis L. against Clinical Strains of Mycobacterium spp. Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases. 2010;2010.
22. Zuo GY, Wang GC, Zhao YB, Xu GL, Hao XY, Han J, et al. Screening of Chinese medicinal plants for inhibition against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Ethnopharmacol. 2008;120:287-90

.

Archive of SID

www.SID.ir