اثر عصاره متانولی گیاه درمنه ایرانی (*Artemisia persica*) بر سینتیک رشد باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سوبتیلیس

محمد نیاکان[1]*، محمدمهدی عطار پوریزدی[2]، جواد صفایی قمی[3]، مرجان خالویی[4]، زهرا جعفری[5]

۱-استادیار، عضو هیات علمی گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران
۲-مربی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران
۳-دانشیار، پژوهشکده اسانس، دانشگاه کاشان، کاشان
٤-دکترای حرفه ای پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران
۵- کارشناس ارشد، پژوهشکده اسانس، دانشگاه کاشان، کاشان
* آدرس مکاتبه: تهران، بلوار کشاورز، خیابان عبداله‌زاده، پلاک ۳۱، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد
تلفن: ۸۸۹٦٤۷۹۲ (۰۲۱)، نمابر: ۸۸۹٦٦۳۱۰ (۰۲۱)، صندوق‌پستی: ۷٤۳۵ - ۱٤۱۵۵
پست الکترونیک: niakan@shahed.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۸/۷/۱ **تاریخ تصویب:** ۸۹/۵/۱٦

چکیده

مقدمه: درمنه (Artemisia) از گیاهان بوته‌ای و شامل چهارصد گونه می‌باشد. گونه *A. persica* عمدتاً در مناطق شرقی ایران رشد می‌کند.

هدف: هدف تعیین اثر ضدمیکروبی عصاره متانولی گیاه درمنه ایرانی و سینتیک رشد و مرگ باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس وبا سیلوس سوبتیلیس می‌باشد.

روش بررسی: پس از تهیه عصاره و مجاورت با دو نوع باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سوبتیلیس انجام شد. تعیین حساسیت میکروب‌ها با غلظت‌های مختلف (۵، ۲۵، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ٤۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) عصاره با روش کشت در محیط براث بررسی شد. میزان حداقل غلظت موثر بازدارنده (MIC) و حداقل میزان کشنده (MBC) نیز سنجیده شد.

نتایج: در سه نوبت کشت استافیلوکوکوس اورئوس MIC برابر ۱۰۰ و MBC در محدوده ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر حاصل شد. باسیلوس سوبتیلیس MIC عصاره ۱۵۰ و ۲۰۰ ولی MBC عصاره ٤۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بوده و سینتیک مرگ باکتری‌های فوق به ترتیب در ساعت ۵ و ساعت ٤ حاصل شد. اطلاعات در نرم‌افزار SPSS-15 تحلیل شد. با آزمون همبستگی و آزمون T و حد آماری معنی‌دار در این مطالعه ۰/۰۵ می‌باشد.

نتیجه‌گیری: عصاره متانولی گیاه درمنه ایرانی توانست رشد باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس را با ۱۰۰= MIC و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر MBC کنترل نماید. در خصوص باسیلوس سوبتیلیس نیز نتایج مشابه بود ولی با دو تفاوت اول آنکه غلظت MBC عصاره برابر ٤۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بوده دوم آنکه اثرات ضدباکتریایی عصاره نسبت به استافیلوکوکوس اورئوس از نظر زمان تأثیر، کمی زودتر آغاز می‌شود (ساعت ٤ در برابر ساعت ۵). مجموعه یافته حاکی از تاثیر عصاره درمنه ایرانی در شرایط آزمایشگاهی دارد.

گل‌واژگان: *Artemisia persica*، تأثیر ضدمیکروبی، عصاره متانولی

www.SID.ir

مقدمه

با مطالعه بیشتر می‌توان برای داروهای گیاهی نیز مانند داروهای صناعی ارزیابی علمی و آگاهانه را ترسیم و فرهنگ درست تجویز و استفاده از آنها را نهادینه کرد [۱]. در حال حاضر در سراسر دنیا ترکیبات و داروهای مختلفی از گیاهان به دست آمده است که در جهت درمان بیماری‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند، بیش از ۲۵۰ نوع از گیاه درمنه (*Artemisia*) در جهان وجود دارد که حدود ۳٤ نوع آن در ایران رشد می‌کند [۲،۳] گونه *Persica* این گیاه یکی از قدیمی‌ترین و شناخته شده با کاربرد پزشکی در ایران است و مردم ساکن در مرکز و جنوب تا حدودی از ریشه، ساقه و برگ گیاه برای درمان سرفه، سرماخوردگی، تب، کاهش اشتها، دردهای کولیکی، سردرد، گوش درد و بیماری‌های انگلی و مالاریا استفاده می‌کنند [٤]. عصاره متانولی درمنه ایرانی عمدتاً حاوی آرتیمیزین، تانین، ساپونین، آلفاپینن و کامفر می‌باشد و مکانیسم تأثیر مواد موثره این گیاه به صورت مهار Nor A در efflux دیواره باکتری و عمل سینرژیستی ترکیب Epicatechin gallate روی پروتیین اتصال پنی‌سیلین (PBP) و تخریب دیواره باکتری است. سایر مواد موثره شامل Diterpene مانند: Totarol نیز می‌توانند در کاهش غلظت کلسیم داخل سلولی و تحریک ترشح اینتر فرون آلفا و انترلوکین ٦ روی باکتری‌های فوق‌الذکر اثر سایتوتوکسیسیته داشته باشند. سایر مواد جدا شده شامل منوترپن‌ها (گاما ترپینول، آلفا ترپینول، سینولول) و سسکویی‌ترپن، دی‌ترپن، فلاوونویید و آلکالوییدها می‌باشند که نحوه تأثیر ضدباکتریایی آنها تاکنون کاملاً شناخته نشده است. با تحقیقات بیشتر می‌توان از عصاره و اسانس‌های این گیاه در صنعت داروسازی و طب بالینی بیشتر استفاده نمود [۵].

مواد و روش‌ها

گیاه درمنه ایرانی (*Artemisia persica*) در فصل رویش گیاه توسط ایستگاه تحقیقاتی گیاهان دارویی کاشان جمع‌آوری شده و در سایه خشک و سپس پودر شد [٦]. به اندازه ۲۰ گرم از پودر گیاه کامل درمنه را در کارتوش ریخته و با ۵۰۰ میلی‌لیتر حلال متانول به مدت ۸ ساعت عصاره‌گیری شد و حلال محلول‌های به دست آمده با دستگاه روتاری تبخیر و سپس عصاره‌ها جمع‌آوری و بعد حلال آنها تبخیر شد. عصاره‌ها تا زمان آزمایش در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شد [۷]. محیط کشت براث و آگار مولر– هینتون (Muller Hinton) را طبق دستورالعمل آماده نموده و در پلیت و لوله آزمایش به حجم‌های مساوی تقسیم شد. محیط کشت به علاوه سایر وسایل استریل شدند. باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 25923) و باسیلوس سوبتیلیس (PTCC 1023) پس از کشت در محیط‌های انتخابی و گذشت ٤ تا ٦ ساعت به مرحله رشد تصاعدی رسیدند. کدورت هر لوله با استاندارد شمار ۰/۵ مک فارلند که تقریبا معادل $۱/۵\times۱۰^{۸}$ باکتری در یک میلی‌لیتر می‌باشد مقایسه شد. از روش‌های پیشنهادی طبق دستورالعمل CLSI: (Clinical and Laboratory Standards Institute) برای تعیین حساسیت میکروب‌های مورد مطالعه استفاده شد [۸].

سنجش سینتیک رشد و مرگ باکتری‌ها

بعد از تعیین مقدار MBC عصاره‌های مؤثر بر روی باکتری، اثر ضدمیکروبی ترکیبات موردنظر را در غلظت MBC در زمان‌های ۱، ۲، ۳، ٤، ٦ و ۲٤ ساعت مورد بررسی قرار گرفت [۹]، برای این منظور در ۲ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع مولرهینتون، غلظت معادل MBC را تهیه و به عنوان شاهد از لوله حاوی محیط کشت بدون عصاره استفاده شد. سپس در هر لوله شاهد و آزمایش مقدار ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تازه باکتری با کدورت معادل ۰/۵ استاندارد مک فارلند اضافه نموده و در ساعات صفر، ۱، ۲، ۳، ٤، ۵ و ۲٤ به روش ایجاد رقت‌های متوالی، تعداد باکتری‌های زنده به صورت CFU/mL تعیین می‌شد. به این صورت تغییرات تعداد باکتری‌ها محاسبه شد، این آزمایش‌ها برای هر مورد سه بار تکرار شد [۱۰].

نتایج

نتایج حاصل از رشد باکتری‌ها در محیط دارای عصاره و بدون عصاره گیاه درمنه از ساعت صفر الی ۲٤ ساعت با

www.SID.ir

میانگین تعداد باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس در حداقل غلظت کشنده عصاره درمنه (MBC = ۲۰۰µg/ml) نشان داده شده است (جدول شماره ۱). توضیح اینکه رشد باکتری در محیط دارای عصاره درمنه کم شده و از ساعت ٦ به بعد رشد آن منفی می‌شود تا اینکه در ساعت ٢٤ به صفر می‌رسد. در حالی که رشد باکتری‌ها در محیط فاقد عصاره درمنه همچنان سیر صعودی خود را طی می‌کند و در ساعت ٢٤ به حدود $۷/۵\times۱۰^{۹}$ عدد می‌رسد. همان‌گونه که در جدول مذکور مشهود است در ساعت صفر میانگین تعداد باکتری‌ها تفاوتی با یکدیگر ندارد. سپس در ساعت‌های ۱ و ۲ تفاوت در تعداد باکتری‌ها در محیط کشت آغاز شده ولی به لحاظ آماری در حد معنی‌دار نمی‌باشد. لیکن از ساعت ۳ به بعد تفاوت آماری معنی‌داری میان تعداد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در دو محیط دارا و فاقد عصاره درمنه دیده می‌شود (p>٪۵).

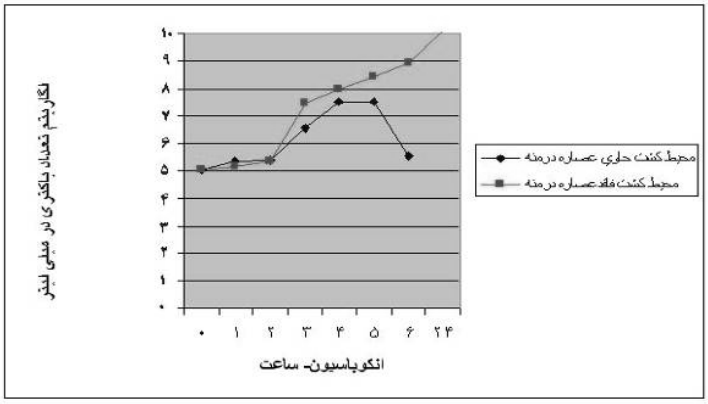
مشابه یافته مذکور را در خصوص باکتری باسیلوس سوبتیلیس در محیط کشت با غلظت ٤۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نیز می‌توان یافت. همان‌گونه که در نمودار شماره ۲ مشاهده می‌شود سینتیک رشد و مرگ باکتری باسیلوس سوبتیلیس در محیط کشت حاوی و فاقد عصاره درمنه در دو ساعت اول به طور مشابهی پیش می‌رود از ساعت سوم به بعد رشد باکتری‌ها در محیط دارای عصاره سرعت کمتری نسبت به محیط فاقد عصاره است و از ساعت پنجم به بعد رشد باکتری منفی شده و در ساعت ٢٤ تعداد باکتری‌ها تقریباً به صفر نزول می‌کند. در حالی که در محیط فاقد عصاره رشد باکتری به شدت افزایش یافته و در ساعت ٢٤ تعداد باکتری‌ها تقریباً به $۹/۱\times۱۰^{۹}$ عدد می‌رسد.

همان‌گونه که در نمودار و جدول شماره ۱ مشهود است در ساعت صفر میانگین تعداد باکتری‌ها در دو محیط کشت تفاوتی با یکدیگر ندارد. سپس در ساعت‌های ۱ و ۲ تفاوت در تعداد باکتری‌ها در محیط کشت آغاز شده ولی در حد معنی‌دار به لحاظ آماری نمی‌رسد (p>۰/۰۵). لیکن از ساعت ۳ به بعد تفاوت آماری معنی‌داری میان تعداد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در دو محیط دارا و فاقد عصاره درمنه دیده می‌شود.

همان‌گونه که در نمودار و جدول شماره ۲ مشاهده می‌شود رشد باکتری باسیلوس سوبتیلیس در محیط کشت حاوی و فاقد عصاره درمنه در دو ساعت اول مشابه آزمایش قبلی پیش می‌رود از ساعت سوم به بعد رشد باکتری در محیط دارای

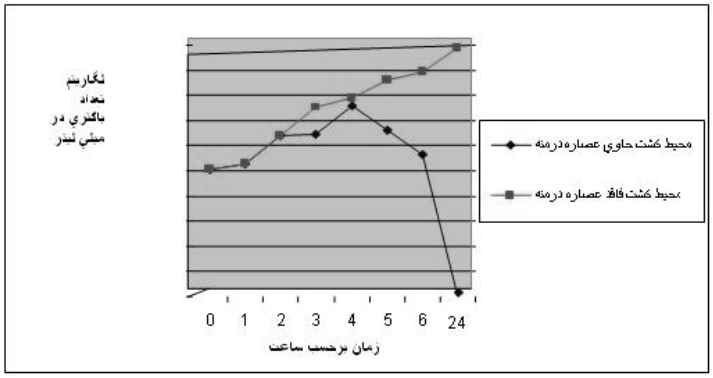
جدول شماره ۱- نتایج حاصل از بررسی سینتیک رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 25923) در حداقل غلظت کشنده عصاره متانولی درمنه (MBC=۲۰۰ µg/ml)

ساعت / تعداد باکتری	۰	۱	۲	۳	٤*	٥	٦	٢٤
آزمایش (حاوی درمنه)	$۱/۲\times۱۰^{۵}$	$۳/۳\times۱۰^{۵}$	$۲/۹\times۱۰^{۶}$	$۵/۲\times۱۰^{۶}$	$۳/۵\times۱۰^{۷}$	$۲/۲\times۱۰^{۶}$	$۱/۵\times۱۰^{۵}$	۰
شاهد (بدون درمنه)	$۱/۲\times۱۰^{۵}$	$۱/۶\times۱۰^{۵}$	$۲/٤\times۱۰^{۶}$	$۳/۱\times۱۰^{۷}$	$۹/٤\times۱۰^{۷}$	$۸/۲\times۱۰^{۸}$	$۸/۹\times۱۰^{۸}$	$۷/۵\times۱۰^{۹}$



نمودار شماره ۱- سینتیک رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC-25923) در محیط کشت حاوی و بدون عصاره متانولی درمنه

Archive of SID
www.SID.ir



نمودا شماره ۲- سینتیک رشد باکتری باسیلوس سوبتیلیس (PTCC-1023) در محیط کشت حاوی و بدون عصاره متانولی درمنه

جدول شماره ۲- نتایج حاصل از بررسی سینتیک رشد باکتری باسیلوس سوبتیلیس (PTCC1023) در حداقل غلظت کشنده عصاره متانولی درمنه (MBC=٤٠٠µg/ml)

ساعت / تعداد باکتری	۰	۱	۲	۳	*٤	۵	٦	٢٤
آزمایش (حاوی درمنه)	$۱/۳\times۱۰^{۵}$	$۱/۵\times۱۰^{۵}$	$۲/۲\times۱۰^{٦}$	$۲/۷\times۱۰^{٦}$	$۳/۳\times۱۰^{۷}$	$۳/۵\times۱۰^{٦}$	$٤/٦\times۱۰^{۵}$	۰
شاهد (بدون درمنه)	$۱/۳\times۱۰^{۵}$	$۱/۷\times۱۰^{۵}$	$۲/۲\times۱۰^{٦}$	$۳/۲\times۱۰^{۷}$	$۹/۸\times۱۰^{۷}$	$۸/۲\times۱۰^{۸}$	$۸/۱\times۱۰^{۸}$	$۹/۱\times۱۰^{۹}$

عصاره سرعت کمتری نسبت به محیط فاقد عصاره است و از ساعت پنجم رشد باکتری منفی بوده و در ساعت ٢٤ تعداد باکتری تقریباً به صفر می‌رسد. در حالی که در محیط فاقد عصاره رشد باکتری به شدت افزایش یافته و در ساعت ٢٤ تعداد باکتری تقریباً به $۹/۱\times۱۰^{۹}$ عدد می‌رسد.

بحث

براساس نتایج سینتیک رشد و مرگ باکتری‌ها حداقل عصاره کشنده عصاره درمنه برای استافیلوکوس اورئوس ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر است. عصاره درمنه توانسته است رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس را در ساعت سوم متوقف نماید و از ساعت چهارم به بعد رشد باکتری منفی می‌گردد به طوری که در ساعت ٢٤ تعداد باکتری‌ها به صفر می‌رسد (سینتیک رشد ومرگ). به منظور کنترل عوامل مخدوش کننده احتمالی، رشد باکتری‌ها در محیط فاقد عصاره درمنه نیز بررسی شد حاصل اینکه تعداد باکتری‌ها از ساعت صفر الی ٢٤ به صورت تصاعدی افزایش می‌یابد. و نتایج به دست آمده کم و بیش مشابه است و تکرار نتایج در سه نوبت نشان‌دهندهٔ صحت نتایج می‌باشد [۱۱]. به منظور بررسی بیشتر همبستگی بیان قطر هاله عدم رشد باکتری با غلظت عصاره درمنه نیز بررسی شده است.

نظیر همین نتیجه درخصوص باسیلوس سوبتیلیس نیز دیده شده است با دو تفاوت: اول اینکه حداقل غلظت کشندهٔ عصاره درمنه برای باکتری باسیلوس سوبتیلیس ٤٠٠ میکروگرم بر میلی‌لیتر است دوم آنکه اثرات عصاره درمنه ضدباکتریایی باسیلوس سوبتیلیس نسبت به باکتری استافیلوکوکوس کمی زودتر آغاز می‌شود (ساعت ٤ در برابر ساعت ۵).

مجموعه این یافته‌ها حاکی از آن است که عصاره درمنه ایرانی (جمع‌آوری شده از منطقه کاشان) توانایی کنترل رشد این دو باکتری گرم مثبت را دارد. این نتایج تا حدودی مشابه به نتایج مطالعات دیگران است، از جمله یافته‌های دکتر رمضانی و همکاران از منطقه خراسان رضوی، Kalemba و YOU گونه‌هایی از شرق آسیا اثرات ضدمیکروبی که تاثیر گونه‌های *Artemisia* را به صورت اثر بر روی دیواره باکتری نشان داده‌اند [۵،۸،۱۰]. یافته‌های این تحقیق از مطابقت نتایج با مطالعات محققین مختلف مبنی بر فعالیت ضدباکتریایی درمنه ایرانی به صورت تأثیر بر دیواره میکروب‌ها را تأیید می‌نماید.

Archive of SID
www.SID.ir

در این بررسی علاوه‌بر مکانیسم‌های سینرژیستی در میزان‌های MBC، MIC و در ضمن سنجش ساعات تأثیر به صورت سینتیک رشد و مرگ این باکتری‌ها در مجاورت عصاره‌های مربوطه نیز گزارش شده است [۱۱،۱۲]. با این حال انجام مطالعات بیشتر با استفاده از گونه‌های دیگر گیاه درمنه، باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی دیگر خصوصاً در شرایط in vivo ضروری به نظر می‌رسد تا ضمن بررسی اثرات ضدمیکروبی عصاره‌های مربوطه، متابولیسم سینتیک آن در بدن موجود زنده مورد مطالعه قرارگرفته و از مزایای دیگر این گیاه نیز بیشتر استفاده شود [۱۳،۱٤].

منابع

1. Rabe T, vanstaden J. Antibacterial activity of South African plants used for medicinal purposes. *J. of Etnopharmacol*. 1997; 56: 81 - 7.

2. Alzoreky NS, Nakahara k. Antibacterial of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. *International Journal of Food Microbiol*. 2003; 80: 223 - 30.

3. Tariq KA, Chishti MZ, Ahmad F, Shawl AS. Anthelmintic activity of extracts of Artemisia absinthium against ovine nematodes**.** *Veterinary Parasitol*. 2009; 160: 83 – 8.

4. Rasooli I, Rezaee MB, Moosavi ML, Jaimand K. Microbial sensitivity and chemical properties of the essential oil of Artemisia Annual. *J. Essential. Oil Res*. 2003; 15: 59 – 62.

5. Kalemba D, Kusewicz D, Swiader K. Antimicrobial properties of the essential oil of Artemisia asiatica Nakai. *Phytotherapy Res*. 2002; 16: 288 - 91.

6. Mahmoudi B, Introduction to herbal oil and treatment effects, Tehran, Noor Danesh edition. 2003, pp: 49 - 54**.**

7. Watson LE. et al. Molecular phylogeny of sub tribe Artemisiinae, including Artemisia and its allied and segregate genera*. BioMed Central Evolutionary Biol*. 2002; 2: 17 - 21.

8. Yu HH, Kim YH, Kil BS, Kim KJ, Jeong SI, You YO. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of Artemisia iwayomogi. *Planta Med*. 2003; 69: 1159 - 62.

9. Jawetz M, Adel bergs Geo FB, Stephan A, *Medical Microbiol*. 24th ed. 2007, pp: 191 – 6.

10. Ramezani M, Behravan J, Yazdinezhed A. Chemical Composition and antimicrobial activity of the volatile oil of Artemisia khorassanica from Iran. *Pharmaceutical Biol.* 2004; 42: 599 - 602.

11. Mirjalili M, Bibi F, Meybody A. Chemical composition of the essential oil from aerial parts, leaves, flowers and roots of Artemisia Persica Boiss From Iran. *Essential Oil Res*. 2006; 18: 544 - 7.

12. Harrison's Internal Medicine, Mohraz M, Translate first edition Teymorzadeh Publish. 2005, pp: 235 – 47.

13. Jafari M, Tissue culture in Artemisia Sp. and antimicrobial effects, Ms, Thesis, Tarbiat Modarres University, Tehran. 2001, pp: 52 - 63.

14. Firouzi A, Vahedi H, Sabbaghi F, Bigdeli M. Composition of the essential oil f Artemisia ciniformis, A. Kopetdaghensis, and A. khorasanica in Iran, *Chemistry of Natural Compounds* 2008; 44: 804 – 6.

Archive of SID

www.SID.ir