

# بررسی فعالیت ضد میکروبی اسانس و عصاره گیاه مورد (*Myrtus communis* L) علیه سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین

موج خالقی<sup>۱</sup>

محمد بکائیان<sup>۲</sup>

سعیده سعیدی<sup>۳\*</sup>

تاریخ دریافت: ۹۱/۶/۲۹

تاریخ تصویب: ۹۱/۱۲/۲۲

## چکیده

از آنجایی که امروزه تعداد باکتری های بیماری زای مقاوم به آنتی بیوتیک های رایج در حال افزایش می باشد، لذا برای کنترل و درمان عفونت های ناشی از میکروبهای مقاوم، کشف عوامل درمانی جدید یک نیاز ضروری می باشد. این مطالعه به منظور بررسی اثر ضد باکتریال عصاره و اسانس مورد علیه سویه های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین انجام شده است. ۷ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین از نواحی حلق و بینی جدا شده. پس بررسی اثر ضد میکروبی عصاره و اسانس گیاه مورد، MIC (حداقل غلظت بازدارندگی) و MBC (حداقل غلظت کشندگی) آنها

<sup>۱</sup> دانشگاه شهید باهنر کرمان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی (نویسنده مسئول)؛ mojkhaleghi@yahoo.com

<sup>۲</sup> دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، مرکز تحقیقات عفونی و گرمسیری

<sup>۳</sup> دانشگاه پیام نور زابل، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

به روش میکروتیتر پلیت بر روی استافیلوکوکوس اورئوس بررسی گردید. نتایج نشان دادند که عصاره و اسانس گیاه مورد در غلظت ۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر بیشترین اثر مهار کنندگی را داشته در حالی که در غلظت ۵ و ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر بیشترین اثر کشندگی را داشته‌اند.

**واژه‌های کلیدی:** استافیلوکوکوس اورئوس، خاصیت آنتی باکتریال، مقاومت آنتی بیوتیکی، اسانس، متی سیلین

#### مقدمه

بیماری‌های عفونی عامل مرگ‌های زود رس هستند و روزانه باعث مرگ هزاران نفر در سرتاسر جهان میشوند (Beg et al., 2000). تعداد زیادی از آنتی بیوتیک‌های تجاری در سرتاسر جهان برای کنترل عفونت‌ها و بیماری‌های عفونی انسان استفاده میشوند. استفاده طولانی مدت از این آنتی بیوتیک‌ها باعث ظهور باکتری‌های مقاوم به چند دارو شده و مشکلات بالینی مهمی را در درمان بیماری‌های عفونی ایجاد کرده است (Singh et al., 2002). بنابراین لازم است تا برای کشف مواد ضد میکروبی جدید از سایر منابع مانند گیاهان و حیوانات تحقیقات گسترده‌ای انجام شود. گیاهان دارویی به عنوان یک منبع بالقوه از داروهای شیمی درمانی جدید مورد توجه ویژه هستند؛ زیرا مشخص شده است که این گیاهان مواد ضد میکروبی متنوعی دارند و دارای اثر سمی

کم و یا فاقد اثر سمی هستند گیاهان طی متابولیسم ثانویه خود ترکیب‌های بسیاری با ساختمان مولکولی پیچیده می‌سازند و برخی از آنها خاصیت ضد میکروبی دارند (De Souza et al., 2005). عصاره تعداد زیادی از گیاهان دارویی دارای مواد موثر بر علیه قارچ‌ها، باکتری‌ها، ویروس‌ها و حشرات بوده و همچنین دارای خاصیت آنتی اکسیدانی نیز می‌باشند (Kordali et al., 2005; Burt, 2004). عصاره تعدادی از گیاهان نیز در کنترل سلول‌های سرطانی موثر بوده (sylvestre et al., 2006) و یا در نگهداری مواد غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Faid et al., 1995). ترکیبات ضد میکروبی در گیاهان دارای پتانسیل‌های درمانی بی‌شماری در درمان بیماری‌های عفونی بوده و گاهی به طور همزمان، اثرات جانبی ناشی از مصرف آنتی بیوتیک‌ها را نیز، کاهش می‌دهند.

پوست ظاهر می شود و در پسروریوسیس، می توان استفاده کرد. هدف از این تحقیق بررسی اثر ضد میکروبی عصاره و اسانس گیاه مورد علیه جدایه های باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین است.

### مواد و روش ها

#### تهیه عصاره و اسانس

تهیه عصاره:

برای تهیه عصاره از روش ماسراسیون استفاده شد. به این صورت که پس از خرد کردن برگ ها، 50 گرم از هر نمونه به مدت 48 ساعت در متانول 80 درجه خیسانده شده و پس از گذشت این مدت زمان با کاغذ صافی صاف گشت. بعد از اتمام عملیات عصاره گیری، عصاره های بدست آمده با استفاده از دستگاه روتاری (تقطیر در خلا) در دمای 40 تا 50 درجه سانتی گراد تغلیظ شد و در دمای 50-40 به مدت ۲ روز خشک گردید.

تهیه اسانس:

برای استخراج اسانس از روش تقطیر با آب مقطر و دستگاه کلونجر استفاده شد. ۲۰۰ گرم از پودر خشک گیاه را وزن کرده و در یک بالن دو لیتری ریخته و حدود دو سوم بالن به آن آب اضافه می کنیم و بالن را به دستگاه کلونجر متصل می کنیم تا عمل تقطیر

دهند (Kokoska et al., 2002; Prabuseenivasan et al., 2006). گونه گیاهی مورد (*Myrtus communis*) 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 روئیده می شود. این گیاه به علت دارا بودن برگ های سبز زیبا دائمی و گل های زیبا و درشت به صورت زینتی نیز کاشته می شود. استفاده از گیاه مورد جهت ضد عفونی دارای سابقه طولانی می باشد. در حال حاضر ثابت شده است که اثر درمانی مورد مربوط به اسانسی است که در قسمت های مختلف آن، مخصوصا در برگ گیاه یافت می شود. علاوه بر اثر ضد عفونی کنندگی و ضد انگلی مورد اثر ضد عفونی کننده و ضدانگلی دارد و از آن در مصارف داخلی و استعمال خارجی به عنوان تقویت کننده معده و قابض نیز مورد استفاده قرار می گیرد (Zargari et al., 1989). مورد در مصارف داخلی بیشتر جهت رفع بیماری های تنفسی، و مجاری ادراری بکار می رود. مصرف فرآورده های مورد در برونشیت، آسم نزله ای، فراخ شدن ناحیا ای یا عمومی برونش ها، موجبات تسهیل خروج اخلاط را فراهم می سازد. در استعمال خارجی، از مورد در رفع بیماری های جلدی که بعلت بروز دانه های جلدی، پوسته های کوچک و سفید رنگ در

بر روی محیط بلاد آگار کشت داده شدند. کلنی‌های مشکوک با انجام تست‌های بیوشیمیایی و آنزیمی مورد تایید قرار گرفتند و از آزمون‌های کاتالاز - کوآگولاز - تخمیر مانیتول و رنگ آمیزی گرم بررسی شدند. استخراج DNA با روش Moon et al انجام شد (Strommenger et al., 2003)، برای تکثیر ژن *mecA* از پرایمرهای اختصاصی (جدول 5) استفاده شد که محصول آن قطعه‌ای به طول ۵۳۲bp بود (Moon et al., 2007). واکنش PCR با حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد که شامل dNTP lit، ۲۰ μM primer F,R، ۱۰ μM MgCl<sub>2</sub>، ۱ μM DNA Taq polymerase ۰/۳۵ بود.

به مدت ۴ ساعت انجام شود. پس از استخراج اسانس سولفات سدیم، عمل آب‌گیری انجام گردید و در یک ظرف در بسته تیره رنگ و در یخچال نگهداری گردید.

تعیین وزن خشک عصاره و اسانس: ابتدا وزن یک لوله آزمایش تعیین و 1 ml از عصاره و اسانس در آن ریخته شد. سپس محتوی پس از آن لوله در دمای اتاق خشک گردید. بعد از خشک شدن عصاره و اسانس، وزن لوله آزمایش مجدداً تعیین گشت. اختلاف وزن لوله معادل 1 ml از عصاره و اسانس است. میانگین سه بار تکرار، به عنوان وزن خشک عصاره و اسانس محاسبه شد.

جدول ۵: توالی بالا دست (F) و پایین دست (R) پرایمر اختصاصی ژن *mecA*

ژن	توالی
<i>mecA</i>	F: 5'- AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC-3'
<i>mecA</i>	R: 5'- AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC-3'

### فعالیت آنتی بیوتیکی

۱۷ سویه خالص از گونه استافیلوکوکوس اورئوس با روش کربی - بائر تعیین آنتی بیوگرام شده و حساسیت آن‌ها نسبت به آنتی بیوتیک‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. آنتی بیوتیک‌های مورد استفاده در این بررسی شامل تری متوپریم SXT، آمپی سیلین AM، سفتازیدیم GAZ، تتراسایکلین TE،

### سویه‌ها باکتری

پژوهش حاضر به روش توصیفی بوده است که به مدت ۲ ماه از قسمت قدامی بینی و حلق ۸۰ نفر شامل ۴۰ نفر بیمار سرپایی و ۴۰ نفر غیر بیمارستانی بیمارستان امیرالمومنین زابل توسط سوآپ استریل پنبه‌ای نمونه برداری انجام شده، از این تعداد ۳۴ نفر مذکر (۴۲/۵) و ۴۶ نفر مونث (۵۷/۵) بودند. نمونه‌ها

که از رشد باکتری پس از قرار دادن در انکوباتور جلوگیری کرده است به عنوان (MIC) در نظر گرفته شده و برای اطمینان از چاهک های شفاف ۱۰ میکرولیتر برداشته به محیط مولر هینتون آگار منتقل کرده و پس از ۲۴ ساعت اولین رقتی که توانسته ۹۹/۹ درصد باکتری را از بین ببرد به عنوان حداقل غلظت کشنده (MBC) نشان داده می شود

### نتایج

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 مقاوم به متی سیلین رفتار تقریباً مشابهی در شرایط حضور آنتی بیوتیک ها از خود نشان می دهند (جدول ۱) به طوری که بیشترین مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های تری متو پریم، آمپی سیلین، اریترومایسین، پنی سیلین، سفکستین بوده است و بیشترین حساسیت نسبت به آنتی بیوتیک آمیکاسین بوده است. جدول ۱: الگوی حساسیتی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف:

اریترومایسین E، پنی سیلین P، سفتریاکسون CRO، آمیکاسین AN و سفکستین (CF) (ساخت شرکت پادتن طب) بودند. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی گراد قطر هاله های باز دارنده اندازه گیری شد و حساسیت و مقاومت سویه ها تعیین و نتایج آن 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 رقت سازی در چاهک بررسی شد. به هفت چاهک از پلیت های میکروتیتر میزان ۱۰۰ میکرولیتر از محیط مایع مغذی مولر هینتون (MHB) اضافه شد. به چاهک اول ۱۰۰ میلی لیتر از محلول رقیق شده اسانس یا عصاره اضافه شده و پس از مخلوط کردن ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک اول برداشته به چاهک دوم اضافه کرده و بدین ترتیب تا آخرین چاهک این کار انجام داده شد از چاهک آخر ۱۰۰ میکرولیتر محیط مایع مغذی مولر هینتون خارج کرده مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی حاوی  $10^7$  واحد در میلی لیتر معادل ۰/۵ مک فارلند اضافه شده و همچنین شاهد آزمایش محیط کشت به همراه باکتری بدون عصاره، همچنین محیط کشت به همراه عصاره بوده است، و در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. اولین چاهکی

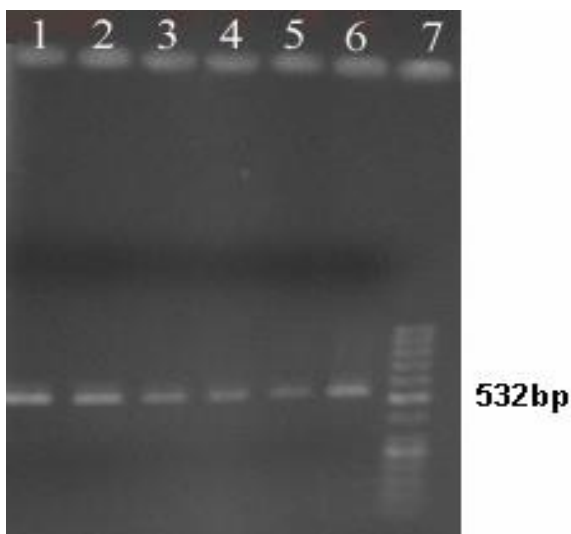
CF	AN	CRO	P	E	TE	GAZ	AM	SXT	سویه باکتری
R	S	I	R	I	S	I	S	R	۱
R	S	I	R	R	R	R	R	R	۲
R	S	I	R	R	I	S	R	R	۳
R	R	R	R	R	I	S	R	R	۴
R	S	I	R	R	I	S	R	R	۵
R	S	I	R	R	S	R	R	S	۶
R	R	R	R	R	I	S	R	S	۷

جدول ۲: الگوی حساسیتی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین نسبت به رقت های مختلف عصاره مورد (میلی گرم بر میلی لیتر):

سویه باکتری	۰/۳	۰/۶۲	۱/۲۵	۲/۵	۵	۱۰
۱	++	++	+	-	-	-
۲	++	++	+	-	-	-
۳	++	++	++	+	-	-
۴	++	++	++	+	-	-
۵	++	+	-	-	-	-
۶	++	++	++	+	-	-
۷	++	++	++	+	-	-

### 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 ۱۰mg و ۵mg می باشد (جدول ۲-۳). علاوه بر این از بین ۷ سویه مورد بررسی بیشترین غلظت مهار کنندگی (MIC) برای عصاره گیاه مورد غلظت ۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر است و در مورد اسانس گیاه مورد نیز ۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر بوده است (جدول ۴).



شکل ۱. محصولات PCR از ژن *mecA*. چاهک های شماره ۱ تا ۶ قطعه ۵۳۲ bp ژن *mecA*; چاهک ۷، مارکر ۵۰ bp.

**بحث:**

با توجه به افزایش مقاومت باکتری ها به انواع آنتی بیوتیک ها تلاش برای دستیابی به آگاهی های بیشتر از موارد استفاده موثر ترکیبات موجود در گیاهان و کاربردشان در درمان بیماری های مختلف صورت گرفته است. در این بررسی اثر عصاره اتانولی گیاه مورد (*Myrtus communis l*) و اسانس آن بر روی سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین که جزء بیمارگر های عمده بیمارستانی بوده و سیر مقاومت آن به انواعی از آنتی بیوتیک ها رو به افزایش است، مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که حداقل غلظت مهارکننده برای عصاره گیاه مورد ۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر بوده است

جدول ۳: الگوی حساسیتی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین نسبت به رقت های مختلف اسانس مورد (میلی گرم بر میلی لیتر):

سویه باکتری	۰/۳	۰/۶۲	۱/۲۵	۲/۵	۵	۱۰
۱	++	++	++	+	-	-
۲	++	++	++	+	-	-
۳	++	++	++	+	-	-
۴	++	++	++	+	-	-
۵	++	++	++	+	-	-
۶	++	++	++	+	-	-
۷	++	++	++	+	-	-

جدول ۴: غلظت های مهارکنندگی عصاره و اسانس مورد برای استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین

سویه باکتری	عصاره		اسانس	
	MBC	MIC	MBC	MIC
۱	۲/۵	۲/۵	۱/۲۵	۲/۵
۲	۲/۵	۲/۵	۱/۲۵	۲/۵
۳	۵	۲/۵	۲/۵	۵
۴	۵	۲/۵	۲/۵	۵
۵	۱/۲۵	۰/۶۲	۲/۵	۵
۶	۵	۲/۵	۲/۵	۵
۷	۵	۲/۵	۲/۵	۵

بازدارندگی از خود نشان داد (Akin et al., 2010) که با توجه به این که نمونه های مورد مطالعه در تحقیق ما از نمونه های کلینیکی بود نتایج مقداری با هم مغایرت داشت. علت این تغییرات می تواند از فشارهای انتخابی ناشی از تاثیر آنتی بیوتیک های مصرفی در بیماران باشد. در مجموع، نتایج حاصل از این پژوهش چنین نشان می دهد که پایین ترین غلظت از عصاره گیاه مورد مطالعه می تواند از بالاترین دوز مصرفی دارو ارجحیت داشته باشد. به هر حال با توجه به ایجاد مقاومت سویه های باکتری به آنتی بیوتیک های رایج مصرفی لازم است دز مصرف هر یک از آن ها برای بیماران، در حد پایین تری تجویز شود و به همراه مصرف دارو، جوشانده گیاه مورد و یا گیاهان دارویی مشابه نیز توصیه شود تا از مقاومت بیشتر سویه ها به داروهای شیمیایی جلوگیری شود. آزمایشات کلینیکی بر روی بیماران بعد از مصرف عصاره و اسانس گیاه مورد جهت تائید این داده ها توصیه می شود تا در نهایت بتوان آن را در رده داروهای گیاهی فرموله شده در داروخانه در دسترس بیماران قرار داد.

که این غلظت برای اسانس گیاه مورد نیز مشاهده می شود. اثر عصاره اتیل استات گیاه مورد با غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر موثر بر روی استافیلوکوکوس اورئوس موثر بوده و به عنوان MIC تعیین شده است (Gholamhoseinian Najar et al., 2009). در مطالعات مشابه، عصاره اتانولی دارای اثر بیشتری بوده و غلظتی که به عنوان MIC برای *S. aureus* گزارش شده ۰/۰۵ میلی گرم بر میلی لیتر بوده است. در مطالعات خالقی در سال ۱۳۷۵ عصاره اتانولی مورد با غلظت ۳۰ میلی گرم بر میلی لیتر بر روی این گونه باکتری موثر بوده است (Khaleghi., 1996). دلیل اینکه عصاره این گیاه در بررسی ما روی باکتری های مورد مطالعه غلظت های پایین تر موثر بوده احتمالاً بدلیل تفاوت سویه های استافیلوکوک اورئوس آزمایش شده در پژوهش های مختلف و نحوه عصاره گیری، نحوه انجام آزمایش و حتی نوع و گونه گیاهان مورد بررسی می باشد. نتایج بدست آمده از بررسی تاثیر اسانس گیاه مورد علیه سویه استاندارد *S. aureus ATCC6538* نشان داد که اسانس مصرفی در یک درصد حجمی ۷/۷۵/۰ بر روی باکتری اثر



## REFERENCES

- Beg, AZ, et al. (2000). Effect of *Plumbago zeylanica* extract and certain curing agents on multidrug resistant bacteria of clinical origin. *World J Microbiol Biotechnol.* 16(8-9): 841-4
- Singh, G, et al. (2002). Studies on essential oils: part 10; antibacterial activity of volatile oils of some spices. *Phytother Res* 2002 Nov; 16(7): 680-2
- De Souza, EL, et al. (2005). Antimicrobial effectiveness of spices: an approach for use in food conservation systems. *Braz Arch Biol Technol.* 48(4): 549-58
- Kordali, S, et al. (2005). Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculoides* and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *A. dracunculoides*, *Artemisia santonicum*, and *Artemisia spicigera* essential oils. *Journal of agricultural and food chemistry.* 53(24):9452-8.
- Burt, S.(2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology.* 94(3):223-53.
- Sylvestre, M, et al. (2006). Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. *Journal of Ethnopharmacology.* 103(1):99-102.
- Faïd, M, et al.(1995). Almond paste: physicochemical and microbiological characterization and preservation with sorbic acid and cinnamon. *Journal of Food Protection.* 58(5):547-50.
- Kokoska, L, et al. (2002). Screening of some Siberian medicinal plants for antimicrobial activity. *Journal of ethnopharmacology.* 82(1):51-3.
- Prabuseenivasan, S, et al.(2006). In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complementary and Alternative Medicine.* 6(1):39.
- 10 Zargari, A(1989). *Plant Medical.* University of Tehran Press. 645-7.
- Gholamhoseinian Najar, A, et al. (2009). Effect 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.* 8(8):551-6.
- Khaleghi, M. (1996). Study of ten plant essential oil effect on Methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* isolated from health vector and clinical samples. MSc Thesis University of Science medical of Kerman. 1996.
- Akin, M, et al. (2010). Antibacterial activity and composition of the essential oils of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. and *Myrtus communis* L. growing in Northern Cyprus. *African Journal of Biotechnology.* 9(4):531-5.
- Strommenger, B, et al. (2003). Multiplex PCR Assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 41:4089–94.
- 15: Moon, JS, et al. (2007). Phenotypic and genetic antibiogram of methicillin-resistant staphylococci isolated from bovine mastitis in Korea. *J Dairy Sci* 90:1176–85.