

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

محمد نیاکان^{۱*}، محمدمهدی عطار پوریزدی^۲، جواد صفایی قمی^۳، مرجان خالویی^۴، زهرا جعفری^۵

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

۴- دکترای حرفه ای پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران

۵- کارشناس ارشد، پژوهشکده اسانس، دانشگاه کاشان، کاشان

* آدرس مکاتبه: تهران، بلوار کشاورز، خیابان عبدالله زاده، پلاک ۳۱، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد

تلفن: ۸۸۹۶۴۷۹۲ (۰۲۱)، نمابر: ۸۸۹۶۶۳۱۰ (۰۲۱)، صندوق پستی: ۷۴۳۵ - ۱۴۱۵۵

پست الکترونیک: niakan@shahed.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۸/۷/۱

تاریخ تصویب: ۸۹/۵/۱۶

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 ضد میکروبی عصاره متانولی گیاه درمنه ایرانی و سینتیک رشد و مرگ باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس 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 ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) عصاره با روش کشت در محیط برات 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 ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بوده و سینتیک مرگ باکتری‌های فوق به ترتیب در ساعت ۵ و ساعت ۴ 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 MIC = ۱۰۰ 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 ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بوده دوم آنکه اثرات ضدباکتریایی عصاره نسبت به استافیلوکوکوس اورئوس از نظر زمان تأثیر، کمی زودتر آغاز می‌شود (ساعت ۴ در برابر ساعت ۵). مجموعه یافته‌ها حاکی از تأثیر عصاره درمنه ایرانی در شرایط آزمایشگاهی دارد.

کل واژگان: *Artemisia persica*، تأثیر ضد میکروبی، عصاره متانولی



مقدمه

میلی لیتر حلال متانول به مدت ۸ ساعت عصاره گیری شد و حلال محلول های به دست آمده با دستگاه روتاری تبخیر و سپس عصاره ها جمع آوری و بعد حلال آنها تبخیر شد. عصاره ها تا زمان آزمایش در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری می شد [۷]. محیط کشت براث و آگار مولر- هیتون (Muller Hinton) را طبق دستورالعمل آماده نموده و در پلیت و لوله آزمایش به حجم های مساوی تقسیم شد. محیط کشت به علاوه سایر وسایل استریل شدند. باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 25923) و باسیلوس سوبتیلیس (PTCC 1023) پس از کشت در محیط های انتخابی و گذشت ۴ تا ۶ ساعت به مرحله رشد تصاعدی رسیدند. کدورت هر لوله با استاندارد شمار ۰/۵ مک فارلند که تقریباً معادل $1/5 \times 10^8$ باکتری در یک میلی لیتر می باشد مقایسه شد. از روش های پیشنهادی طبق دستورالعمل CLSI: (Clinical and Laboratory Standards Institute) برای تعیین حساسیت میکروب های مورد مطالعه استفاده شد [۸].

سنجش سینتیک رشد و مرگ باکتری ها

بعد از تعیین مقدار MBC عصاره های مؤثر بر روی باکتری، اثر ضد میکروبی ترکیبات مورد نظر را در غلظت MBC در زمان های ۱، ۲، ۳، ۴، ۶ و ۲۴ ساعت مورد بررسی قرار گرفت [۹]، برای این منظور در ۲ میلی لیتر از محیط کشت مایع مولر هیتون، 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 میکرو لیتر از سوسپانسیون تازه باکتری با کدورت معادل ۰/۵ استاندارد مک فارلند اضافه نموده و در ساعات صفر، ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ و ۲۴ به روش ایجاد رقت های متوالی، تعداد باکتری های زنده به صورت CFU/mL تعیین می شد. به این صورت تغییرات تعداد باکتری ها محاسبه شد، این آزمایش ها برای هر مورد سه بار تکرار شد [۱۰].

نتایج

نتایج حاصل از رشد باکتری ها در محیط دارای عصاره و بدون عصاره گیاه درمنه از ساعت صفر الی ۲۴ ساعت با

با مطالعه بیشتر می توان برای داروهای گیاهی نیز مانند داروهای صنایع 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 بیماری های مختلف مورد استفاده قرار می گیرند، بیش از ۲۵۰ نوع از گیاه درمنه (*Artemisia*) در جهان وجود دارد که حدود ۳۴ نوع آن در ایران رشد می کند [۲،۳] گونه *Persica* این گیاه یکی از قدیمی ترین 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 بیماری های انگلی و مالاریا استفاده می کنند [۴]. عصاره متانولی درمنه ایرانی عمدتاً حاوی آرتیمیزین، تانین، ساپونین، آلفاپینن و کامفر می باشد و مکانیسم تأثیر مواد مؤثره این گیاه به صورت مهار Nor A در efflux دیواره باکتری و عمل سینرژیستی ترکیب Epicatchin gallate روی پروتیین اتصال پنی سیلین (PBP) و تخریب دیواره باکتری است. سایر مواد مؤثره شامل Diterpene مانند: Totarol نیز می توانند در کاهش غلظت کلسیم داخل سلولی و تحریک ترشح اینتر فرون آلفا و انترلوکین ۶ روی باکتری های فوق الذکر اثر سایتوتوکسیسته داشته باشند. سایر مواد جدا شده شامل منوترپین ها (گاما ترپینول، آلفا ترپینول، سینولول) و سسکویی ترپن، دی ترپن، فلاوونوئید و آکالوئیدها می باشند که نحوه تأثیر ضدباکتریایی آنها تاکنون کاملاً شناخته نشده است. با تحقیقات بیشتر می توان از عصاره و اسانس های این گیاه در صنعت داروسازی و طب بالینی بیشتر استفاده نمود [۵].

مواد و روش ها

گیاه درمنه ایرانی (*Artemisia persica*) در فصل رویش گیاه توسط ایستگاه تحقیقاتی گیاهان دارویی کاشان جمع آوری شده و در سایه خشک و سپس پودر شد [۶]. به اندازه ۲۰ گرم از پودر گیاه کامل درمنه را در کارتوش ریخته و با ۵۰۰



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 ۲۴ تعداد باکتری‌ها تقریباً به صفر نزول می‌کند. در حالی که در محیط فاقد عصاره رشد باکتری به شدت افزایش یافته و در ساعت ۲۴ تعداد باکتری‌ها تقریباً به $9/1 \times 10^9$ 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 ($p > 0/05$). لیکن از ساعت ۳ به بعد تفاوت آماری معنی‌داری میان تعداد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در دو محیط دارا و فاقد عصاره درمنه دیده می‌شود.

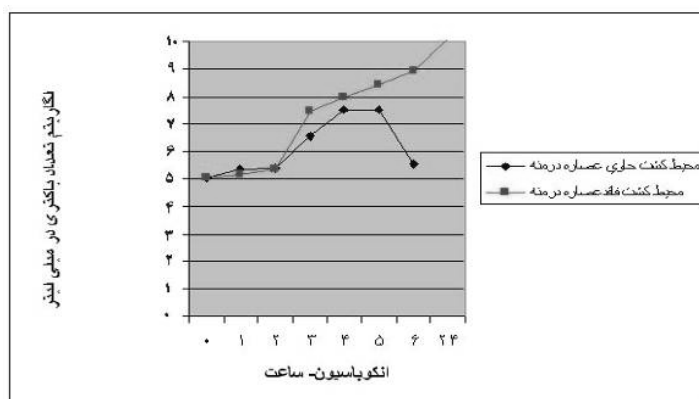
همان‌گونه که در نمودار و جدول شماره ۲ مشاهده می‌شود رشد باکتری باسیلوس سوبتیلیس در محیط کشت حاوی و فاقد عصاره درمنه در دو ساعت اول مشابه آزمایش قبلی پیش می‌رود از ساعت سوم به بعد رشد باکتری در محیط دارای

میانگین تعداد باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس در حداقل غلظت کشنده عصاره درمنه ($MBC = 200 \mu g/ml$) نشان داده شده است (جدول شماره ۱). توضیح اینکه رشد باکتری در محیط دارای عصاره درمنه کم شده و از ساعت ۶ به بعد رشد آن منفی می‌شود تا اینکه در ساعت ۲۴ به صفر می‌رسد. در حالی که رشد باکتری‌ها در محیط فاقد عصاره درمنه همچنان سیر صعودی خود را طی می‌کند و در ساعت ۲۴ به حدود $7/5 \times 10^9$ 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 ($p > 0/05$).

مشابه یافته مذکور را در خصوص باکتری باسیلوس سوبتیلیس در محیط کشت با غلظت ۴۰۰ 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

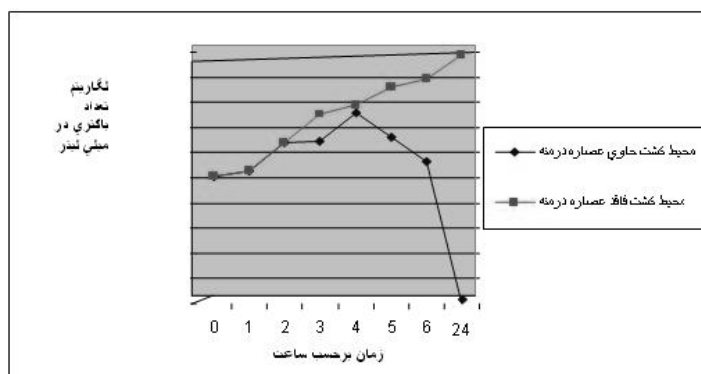
جدول شماره ۱- نتایج حاصل از بررسی سینتیک رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 25923) در حداقل غلظت کشنده عصاره متانولی درمنه ($MBC=200 \mu g/ml$)

ساعت	۰	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۲۴
تعداد باکتری	$1/2 \times 10^5$	$3/3 \times 10^5$	$2/9 \times 10^6$	$5/2 \times 10^6$	$3/5 \times 10^7$	$2/2 \times 10^6$	$1/5 \times 10^5$	۰
آزمایش (حاوی درمنه)	$1/2 \times 10^5$	$1/6 \times 10^5$	$2/4 \times 10^6$	$3/1 \times 10^7$	$9/4 \times 10^7$	$8/2 \times 10^8$	$8/9 \times 10^8$	$7/5 \times 10^9$
شاهد (بدون درمنه)								



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





نمودار 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=۴۰۰ μg/ml)

ساعت	۰	۱	۲	۳	۴*	۵	۶	۲۴
آزمایش (حاوی درمنه)	۱/۳×۱۰ ^۵	۱/۵×۱۰ ^۵	۲/۲×۱۰ ^۶	۲/۷×۱۰ ^۶	۳/۳×۱۰ ^۷	۳/۵×۱۰ ^۶	۴/۶×۱۰ ^۵	۰
شاهد (بدون درمنه)	۱/۳×۱۰ ^۵	۱/۷×۱۰ ^۵	۲/۲×۱۰ ^۶	۳/۲×۱۰ ^۷	۹/۸×۱۰ ^۷	۸/۲×۱۰ ^۸	۸/۱×۱۰ ^۸	۹/۱×۱۰ ^۹

نشان‌دهنده 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 کشنده عصاره درمنه برای باکتری باسیلوس سوبتیلیس ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر است دوم آنکه اثرات عصاره درمنه ضدباکتریایی باسیلوس سوبتیلیس نسبت به باکتری استافیلوکوکوس کمی زودتر آغاز می‌شود (ساعت ۴ 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 رضانی و همکاران از منطقه خراسان رضوی، Kalemba و YOU گونه‌هایی از شرق آسیا اثرات ضد میکروبی 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.

عصاره سرعت کمتری نسبت به محیط فاقد عصاره است و از ساعت پنجم رشد باکتری منفی بوده و در ساعت ۲۴ تعداد باکتری تقریباً به صفر می‌رسد. در حالی که در محیط فاقد عصاره رشد باکتری به شدت افزایش یافته و در ساعت ۲۴ تعداد باکتری تقریباً به ۹/۱×۱۰^۹ عدد می‌رسد.

بحث

براساس نتایج سینتیک رشد و مرگ باکتری‌ها حداقل عصاره کشنده درمنه برای استافیلوکوکوس 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 ۲۴ تعداد باکتری‌ها به صفر می‌رسد (سینتیک رشد و مرگ). 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 ۲۴ به صورت تصاعدی افزایش می‌یابد. و نتایج به دست آمده کم و بیش مشابه است و تکرار نتایج در سه نوبت



باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی دیگر خصوصاً در شرایط *in vivo* ضروری به نظر می‌رسد تا ضمن بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره‌های مربوطه، متابولیسم سینتیک آن در بدن موجود زنده مورد مطالعه قرار گرفته و از مزایای دیگر این گیاه نیز بیشتر استفاده شود [۱۳، ۱۴].

در این بررسی علاوه بر مکانیسم‌های سینترژیستی در میزان‌های MIC، MBC 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،

منابع

1. Rabe T, vanstaden J. Antibacterial activity of South African plants used for medicinal purposes. *J. of Ethnopharmacol.* 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.

