

اثر ضد میکروبی عصاره *Zataria multiflora* Boiss و اگزاسیلین بر استافیلوکوکوس اورئوس

پرویز اولیاء^۱، حوریه صادری^۱، فاطمه نیازمند مطلوب^۲ و محمدباقر رضائی^۳

- ۱- دانشیار میکروبیشناسی، گروه میکروبیشناسی دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد، تهران، صندوق پستی ۷۴۳۵-۱۴۱۵۵، e-mail: owlia@shahed.ac.ir
- ۲- دانش آموزخته پزشکی، دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد، تهران
- ۳- دانشیار شیمی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی مؤسسه جنگلها و مراتع، تهران

چکیده

استافیلوکوکوس اورئوس یکی از باکتریهای بیماریزای مهم می باشد که طیف وسیعی از عفونتها را ایجاد می کند. مصرف روزافزون آنتی بیوتیک ها علیه عفونت ناشی از این باکتری سبب افزایش مقاومت دارویی در این باکتری شده است و همین امر سبب گردیده تا مطالعات وسیعی بر روی داروهای ضد میکروبی جدید با اثر بخشی بیشتر صورت گیرد. هدف از این مطالعه، بررسی اثر ضد میکروبی عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی بر سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس بود. برای این منظور از سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 25923) استفاده شد. از عصاره هیدروالکلی برگ خشک آویشن شیرازی، بعد از حذف اتانل، نیز به عنوان غلظت ۱۰۰ درصد استفاده گردید. برای تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC) و حداقل غلظت کشنده (MBC) عصاره و اگزاسیلین، از روش ماکرودایلوشن پیشنهاد شده از سوی NCCLS استفاده گردید. همچنین تغییرات تعداد باکتریها در مدت ۸ ساعت مجاورت با غلظت های ۲۵ و ۳۰ درصد عصاره و $4 \mu\text{g/ml}$ اگزاسیلین مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج حاصل از این آزمایشها نشان داد که مقدار MIC و MBC عصاره برابر با غلظت ۲۵ درصد و مقادیر MIC و MBC بدست آمده برای اگزاسیلین نیز به ترتیب برابر $0.5 \mu\text{g/ml}$ و $2 \mu\text{g/ml}$ بود. بررسی تغییرات تعداد باکتریها نشان داد که غلظت ۳۰ درصد عصاره بعد از گذشت ۸ ساعت اثری معادل اثر $4 \mu\text{g/ml}$ بعد از گذشت ۴ ساعت دارد. با توجه به افزایش روزافزون مقاومت استافیلوکوکوس اورئوس به آنتی بیوتیک های متداول، استفاده از گیاهان دارویی می تواند یک روش جایگزین مناسب باشد. در این بین آویشن شیرازی جایگاه ویژه ای دارد و می تواند یکی از گیاهان دارویی مؤثر باشد. در این مطالعه مشخص گردید که به روش انجام شده، عصاره هیدروالکلی برگ خشک شده آویشن شیرازی دارای اثر ضد میکروبی علیه سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس است، اما به منظور کاربردی کردن آن نیاز به مطالعات وسیع تر و دقیق تر می باشد.

واژه های کلیدی: آویشن شیرازی، اگزاسیلین، استافیلوکوکوس اورئوس.

مقدمه

بیماریزا است که میزان مقاومت آنتی بیوتیکی در آن روز به روز در حال افزایش می باشد (Low et al., 2003). بروز مقاومت های چندگانه و پیدایش سویه های مقاوم به متی سیلین نیز موجب تشدید نگرانی شده است (Hiramatsu et al., 2001). امروزه رویکرد جدیدی نسبت به استفاده از گیاهان دارویی از جمله اثرات ضد میکروبی آن ایجاد شده است. به طوری که مطالعات بسیار زیادی بر روی اثرات ضد میکروبی عصاره ها و اسانسهای مختلف گیاهان صورت می گیرد. در این مطالعه نیز به بررسی اثر ضد میکروبی عصاره هیدروالکلی برگ

گیاه آویشن شیرازی (*Zataria multiflora* Boiss) یکی از گیاهان تیره نعناع می باشد و بومی نواحی مرکزی و جنوبی ایران است. در طب سنتی این گیاه به عنوان ضد عفونی کننده، ضد انگل، ضد قارچ، ضد نفخ و ضد درد مورد استفاده قرار می گیرد (زرگری، ۱۳۷۵؛ قهرمان، ۱۳۷۲؛ صمصام شریعت، ۱۳۷۰). از اثرات بسیار مهم فرآورده های این گیاه، اثرات ضد میکروبی آن است و مطالعات متعددی بر روی اثرات ضد میکروبی آن صورت گرفته است. استافیلوکوکوس اورئوس از جمله عوامل مهم

آویشن شیرازی علیه سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس در شرایط آزمایشگاهی پرداخته شده است.

مواد و روشها

میکروارگانسیم

در این مطالعه از سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 25923) استفاده شد. این باکتری به صورت دیسک‌های لیوفیلیزه از شرکت دیفکو آمریکا تهیه گردید. برای احیاء باکتری، یک عدد دیسک را در ۵ میلی‌لیتر محیط استریل مولر - هیتون مایع قرار داده و بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در ۳۷ درجه سانتیگراد، با کشت مجدد آن، پرگنه‌های خالص باکتری جداشد. با انجام آزمایشهای غربالی شامل رنگ آمیزی گرم، کوآگولاز، کاتالاز، اکسیداز و تخمیر مانیتول، نوع باکتری تأیید گردید (Baron, 1990). در مراحل مختلف آزمایشها، نیاز به سوسپانسیون باکتری بود. برای این منظور از کشت ۲۴ ساعته باکتری بر روی محیط مولر- هیتون آگار، به قدری در نرمال سالین ۸۵٪ درصد اضافه می‌شد تا کدورتی معادل نیم مک‌فارلند ایجاد شود. در این حالت تعداد تقریبی باکتریها $10^8 \times 1/5$ CFU/ml می‌باشد. این سوسپانسیون به صورت روزانه تهیه می‌شد و در هر سری از آزمایشها از سوسپانسیون یکسان استفاده می‌گردید.

عصاره آویشن شیرازی

گیاه مورد استفاده توسط مرکز تحقیقات گیاهان دارویی مؤسسه جنگلها و مراتع تهیه و عصاره‌گیری شد. برای تهیه عصاره آویشن شیرازی مقدار ۴۰ گرم از برگ خشک شده گیاه را به صورت پودر در ۳۰۰ میلی‌لیتر حلال متشکل از ۵۰ درصد آب و ۵۰ درصد اتانل ۹۶ درجه مخلوط کرده و بعد از ۲۰ ساعت آن را به وسیله کاغذ واتمن شماره یک صاف نموده و سپس اتانل توسط دستگاه روتاری از عصاره خارج شد به طوری که محلول نهایی باقیمانده برابر ۱۰۰ میلی‌لیتر حاصل گردید. این محلول به عنوان غلظت ۱۰۰ درصد عصاره در نظر گرفته

شد و برای استریل کردن آن از فیلتر استریل $0.45 \mu\text{m}$ استفاده گردید.

تعیین MIC و MBC عصاره و اگزاسیلین

برای تعیین حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد (MIC) و حداقل غلظت کشنده (MBC) عصاره، از روش اصلاح شده ماکرودایلوشن توصیه شده توسط NCCLS استفاده شد (NCCLS 2003). در این روش غلظت‌های صفر (شاهد)، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ درصد عصاره آویشن شیرازی در محیط مولر- هیتون برات تهیه گردید. به طوری که حجم نهایی برابر با ۲ میلی‌لیتر بود. سپس از سوسپانسیون باکتری، مقدار ۲۰ میکرولیتر به هریک از لوله‌ها اضافه گردید و بلافاصله از لوله فاقد عصاره به روش رقت‌های متوالی، عمل شمارش باکتری صورت گرفت تا تعداد اولیه باکتریها در زمان صفر در واحد حجم بدست آید. سپس تمام لوله‌ها را به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه‌گذاری کرده و بعد از این مدت با مشاهده لوله‌ها MIC تعیین شد. MIC عبارت بود از حداقل غلظتی از عصاره که در آن کدورت حاصل از رشد دیده نمی‌شد. به منظور تعیین MBC، از اولین غلظتی که کدورت مشاهده نمی‌شد به بعد، تعداد باکتریهای زنده به روش ایجاد رقت‌های متوالی شمارش گردید. MBC عبارت بود از حداقل غلظتی که در آن کاهش تعداد باکتریها بیشتر از یک‌هزارم تعداد باکتریها در زمان صفر بود.

برای تعیین MIC و MBC اگزاسیلین نیز مانند عصاره عمل شد، با این تفاوت که به جای عصاره غلظت‌های صفر (شاهد)، ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۱، ۲، ۴ و ۸ میکروگرم در میلی‌لیتر اگزاسیلین (سیگما، آمریکا) در محیط مولر- هیتون برات تهیه و مورد آزمایش قرار گرفت.

بررسی تغییرات تعداد باکتریها در زمان‌های مختلف در حضور عصاره و اگزاسیلین

تغییرات تعداد باکترها برای غلظت‌های ۲۵ درصد و ۳۰ درصد عصاره و $4^{18}/\text{ml}$ اگزاسیلین در محیط کشت مولر-

و اگزاسیلین

و MBC برابر با غلظت ۲۵ درصد عصاره بدست آمد. مقدار MIC و MBC اگزاسیلین نیز به ترتیب برابر $۰/۵^{HG}/ml$ و $۳^{HG}/ml$ حاصل شد.

نتایج حاصل از بررسی تغییرات تعداد باکتریها

نتایج حاصل از این آزمایش در جدول ۱ آورده شده است. این نتایج نشان می‌دهد که کاهش تعداد باکتریها در ۸ ساعت اول در حضور عصاره زیاد نمی‌باشد، اما در غلظت ۳۰ درصد مقدار کاهش باکتریها نسبتاً بیشتر از غلظت ۲۵ درصد است. با مقایسه نتایج حاصل از تغییر تعداد باکتریها در زمان‌های مختلف مشخص شد که غلظت ۳۰ درصد عصاره بعد از گذشت ۸ ساعت اثری معادل غلظت $۴^{HG}/ml$ اگزاسیلین بعد از گذشت ۴ ساعت دارد، زیرا چنانچه نسبت تعداد باکتریها را در زمان صفر به تعداد باکتریها در زمان ۸ ساعت برای عصاره با غلظت ۳۰ درصد عصاره بدست آوریم، عددی معادل $۴/۱$ بدست می‌آید. اگر همین نسبت را برای تعداد باکتریها در زمان صفر و ۴ ساعت اگزاسیلین با غلظت $۴ \mu g/ml$ بدست آوریم، عدد $۴/۱۵$ حاصل می‌شود که تقریباً نزدیک به عدد $۴/۱$ است.

هیتون براث و در زمان‌های صفر، ۲، ۴، ۶ و ۸ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. مقدار تلقیح از سوسپانسیون باکتری، ۲۰ میکرولیتر بود. با مقایسه تعداد باکتریها در زمان‌های مختلف با تعداد باکتریها در زمان صفر، تغییر تعداد باکتریها بدست می‌آمد و مقدار کاهش تعداد، بین غلظت‌های مختلف عصاره با اگزاسیلین مقایسه شد.

محاسبات آماری

به منظور افزایش دقت کار هر آزمایش ۳ بار تکرار گردید. در مورد تعیین MIC و MBC باید در هر بار آزمایش نتایج یکسان بدست می‌آمد و در مورد تغییرات تعداد باکتریها در حضور عصاره و اگزاسیلین، متوسط نتایج سه بار آزمایش ملاک عمل و مقایسه در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج حاصل از تعیین MIC و MBC عصاره آویشن شیرازی و اگزاسیلین

اولین لوله‌ای که در آن کدورت حاصل از رشد مشاهده نگردید، غلظت ۲۵ درصد از عصاره بود. با شمارش تعداد باکتریها در غلظت‌های ۲۵ درصد به بالا، بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری، مشخص شد که تعداد باکتریها به صفر کاهش یافته بودند. در نتیجه مقدار MIC

جدول ۱- تغییرات تعداد باکتریها در زمان‌های مختلف در حضور ۲۵ و ۳۰ درصد عصاره و $۴^{HG}/ml$ اگزاسیلین

متوسط تعداد باکتریهای زنده (CFU/ml) در زمان‌های (ساعت):*					نوع ترکیب
۸	۶	۴	۲	صفر (شاهد)	
$۹/۸ \times ۱۰^۶$	$۱/۸ \times ۱۰^۷$	$۲/۲ \times ۱۰^۷$	$۰/۲ \times ۱۰^۷$	$۱/۵۴ \times ۱۰^۷$	عصاره ۲۵٪
۱×۱۰^۶	$۲/۹ \times ۱۰^۶$	$۵/۴ \times ۱۰^۶$	$۸/۴ \times ۱۰^۶$	$۴/۱ \times ۱۰^۶$	عصاره ۳۰٪
$۲/۱۳ \times ۱۰^۶$	$۴/۸ \times ۱۰^۶$	$۱/۰۶ \times ۱۰^۶$	$۳/۱ \times ۱۰^۶$	$۴/۴ \times ۱۰^۶$	اگزاسیلین $۴ \mu g/ml$

*متوسط سه بار تکرار

بحث

اثرات بیولوژیکی متعددی است که از جمله آن می‌توان به اثرات تونیک، استفاده در ناراحتی‌های گوارشی، تسکین درد، درمان سرفه و اثرات ضد میکروبی اشاره کرد (قهرمان، ۱۳۷۲؛ Evans, 1996; Duke, 1996). اغلب مطالعاتی که در خارج از کشور صورت گرفته است و درباره جنس مشابه آن یعنی تیموس می‌باشد، زیرا زاتاریا مولتی فلورا یا

امروزه توجه ویژه‌ای نسبت به استفاده از داروهای گیاهی و گیاهان دارویی ایجاد شده است. کم بودن عوارض جانبی و ارزان بودن این فرآورده‌ها سبب شده است که استفاده از آنها متداول گردد. از جمله این گیاهان می‌توان به آویشن شیرازی اشاره کرد. این گیاه دارای

تفاوت مطالعه اخیر نیز نوع باکتریهای بکار رفته است. در مطالعه دیگری که به طور مشابه توسط آقای دکتر طباطبائی نژاد و همکاران انجام گرفت، نشان داده شد که عصاره و اسانس آویشن شیرازی هیچ اثر ضد میکربی علیه سودوموناس آئروجینوزا ندارد. از آنجا که سودوموناس آئروجینوزا یکی از مقاومترین باکتریها در برابر مواد ضد میکربی است، نتیجه حاصل زیاد دور از انتظار نیست.

تفاوت قابل توجهی که در مطالعه حاضر با سایر مطالعات وجود دارد، بررسی تغییرات تعداد باکتریها در زمان های مختلف در حضور عصاره و مقایسه آن با تغییرات تعداد باکتریها در حضور آگزاسیلین است. از آنجا که آگزاسیلین یکی از داروهای انتخابی و مؤثر علیه استافیلوکوکوس اورئوس است، با انجام این عمل مشخص می کند که این دو ترکیب از نظر میزان اثر ضد میکربی چه تشابهی دارند. در نتیجه این آزمایش مشخص شد که در مرحله نخست در ۸ ساعت اول کاهش تعداد باکتریها در حضور عصاره زیاد نیست. این مسأله هم برای غلظت ۲۵ درصد عصاره و هم غلظت ۳۰ درصد عصاره صدق می کند اما کاهش مشاهده شده در غلظت ۳۰ درصد عصاره می کند که غلظت ۳۰ درصد عصاره بعد از گذشت ۸ ساعت، اثری برابر با اثر $4 \mu\text{g/ml}$ آگزاسیلین بعد از گذشت ۴ ساعت دارد. در واقع این آزمایش می تواند معیار خوبی برای مقایسه اثربخشی عصاره باشد.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می دهد که احتمالاً می توان از عصاره این گیاه و فرآورده های آن برای درمان برخی از عفونت ها استفاده کرد، اما مطالعات بیشتر و دقیق تری از جمله بررسی در مورد سایر میکروارگانیزم ها، مطالعات *in vivo* و مطالعه مواد مؤثره آن ضروری است.

سپاسگزاری

بدین وسیله از همکاری معاونت محترم پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد و بخش تحقیقات گیاهان

آویشن شیرازی، بومی ایران است و به طور طبیعی اکثر مطالعات صورت گرفته در مورد آن، مطالعات داخلی است. جنس تیموس دارای اثرات بیولوژیک نزدیک به جنس زاتاریا است و بسیاری از مطالعات خارجی نیز بیانگر اثرات ضد میکربی آن می باشد (Alzoreky, 2003; Rasooli, 2003). از جمله مطالعاتی که بر روی اثرات ضد میکربی آویشن شیرازی صورت گرفته است، می توان به مطالعه رسولی و همکاران (2002) اشاره کرد که در آن اثرات ضد میکربی اسانس آویشن شیرازی علیه اشیشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس بررسی شده است. نتایج این تحقیق نشان داده است که اسانس در روش دیسک دیفیوژن تا رقت یک به ۲۴ دارای اثر ضد میکربی است و مقدار MIC و MBC آن برای اشیشیاکلی به ترتیب معادل رقت $1/16$ و $1/8$ اسانس بود. این مطالعه اخیر تأیید کننده اثر ضد میکربی آویشن شیرازی بود اما تفاوت آن با مطالعه حاضر این است که از اسانس گیاه استفاده شده است. در مطالعه دیگری که توسط جاویدنیا با روش دیسک دیفیوژن صورت گرفت نیز، مشخص گردید که اسانس آویشن شیرازی بر برخی از باکتریها از جمله استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سوبتیلیس، پروتئوس میرابیلیس، کلبسیلا پنومونیا و اشیشیاکلی اثر ضد میکربی دارد. مطالعه حاضر با این مطالعه دو تفاوت مهم روش اجرا دارد که یکی استفاده از اسانس گیاه می باشد و دیگر روش بررسی اثر ضد میکروبی است که به صورت دیسک دیفیوژن صورت گرفته است. اثر آویشن شیرازی بر سایر باکتریها نیز مورد بررسی قرار گرفته است از جمله پیروسی و همکاران نیز نشان داده اند که عصاره این گیاه علیه استرپتوکوکوس های دهانی اثر ضد میکربی دارد. روش مطالعه اخیر مشابه به روش این مطالعه بوده است و مقادیر MIC بدست آمده برای استرپتوکوکوس های سالیواریوس، سنگوئیس و موتانس به ترتیب معادل غلظت های ۲۰، ۱۵ و ۱۵ درصد محاسبه گردیده است.

و اگزاسیلین

- طباطبایی نژاد، س.ا، ۸۲-۱۳۸۱. اثر ضد میکروبی آویشن شیرازی بر سودوموناس آئروجینوزا. پایان نامه، دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد.

- قهرمان، ا.، ۱۳۷۲. کروموفیت های ایران (سیستماتیک گیاهی). جلد سوم، مرکز نشر دانشگاهی، تهران، ۷۶۸ صفحه.

- Alzoreky, N.S. and Nakahara, K., 2003. Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. *Internation. J. Food Microbiol.*, 80: 223-230.
- Baron, E.J. and Finegold, S.M., 1990. *Bailey and Scot's diagnostic microbiology*. 8th ed. Mosby company. USA. 1990.
- Duke, J.A., 2001. *Handbook of medicinal Herbs*. 2nd ed. CRC Press, LLC. USA.
- Evans, W.C., 1996. *Trease and Evan's pharmacognosy*. 14th ed. Saunders Company, UK.
- Hiramatsu, K., Cui, L., Kuroda, M. and Ito, T., 2001. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.*, 9: 486-493.
- Lowy, F.D., 2003. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Invest.*, 9: 1265-1273.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2003. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*. 6th ed. NCCLS publication. USA, M7-A6.
- Rasooli, I. and Rezaei, M.B., 2002. Biocativity and chemical properties of essential oils from *Zataria multiflora* Boiss and *Mentha longifolia* (L). *J. Essent. Oil Res.*, 14: 141-136.
- Rasooli, I. and Mirmostafa, S.A., 2003. Bacterial susceptibility to and chemical composition of essential oils from *Thymus kostchyanus* and *Thymus persicus*. *J. Agric. Food Chem.*, 51: 2200-2205.

دارویی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع که در تصویب و اجرای این پروژه همکاری نموده اند تشکر و قدردانی می شود.

منابع مورد استفاده

- پرویسی، ح.، ۸۲-۱۳۸۱. اثر ضد میکروبی عصاره آویشن شیرازی بر روی استرپتوکوکوس های موتانس، سالیواریوس و سانگوئیس. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد.
- جاویدنیا، ک.، ۷۷-۱۳۷۶. شناسایی ترکیبات موجود در اسانس گیاهان *Ziziphora tenuifolia* و *Zataria multiflora* و بررسی اثرات ضد میکروبی آنها. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران.
- زرگری، ع.، ۱۳۷۵. گیاهان دارویی. جلد اول، چاپ ششم. مؤسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران، تهران، ۹۴۸ صفحه.
- صمصام شریعت، س. ه. و معطر، ف.، ۱۳۷۰. گیاهان و داروهای طبیعی. جلد دوم، انتشارات روزبهان، تهران، ۲۸۸ صفحه.

Antimicrobial Effect of *Zataria multiflora* Boiss Extract and Oxacillin against *Staphylococcus aureus*

P. Owlia¹, H. Saderi¹, F.N. Matloob and M.B. Rezaei²

1-Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Shahed University, P.O.Box 14155-7435, Tehran, Iran, e-mail: owlia@shahed.ac.ir.

2-Department of Medicinal plants, Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, Iran

Abstract

Staphylococcus aureus is an important pathogen that produces widespread infections. Increasing antibiotic usage for *S. aureus* infections, created antibiotic resistance and hence need for production of new antibiotics. Medicinal herb with antimicrobial effect have important role in traditional medicine. The aim of this study was to survey antimicrobial effect of hydroalcoholic extract of *Zataria multiflora* on *S. aureus*. The minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) of extract of dried leaf of *Z. multiflora* were determined by macro-dilution method. The changes of the number of bacteria in the presence of different concentrations (25% and 30%) of extract and time were assessed. The results were compared with changes of the number of bacteria in presence of 4 µg/ml oxacillin. The results showed that MIC and MBC was equal 25% for extract of *Z. multiflora* and reduction of the number of bacteria on the present of 30% of extract after 8h is equal with reduction of the number of bacteria exposed to 4 µg/ml oxacillin after 4h. *Z. multiflora* is native for Iran. Further studies and research on the antimicrobial effects of this medicinal herb, probably, may lead to production of herbal drugs.

Key words: *Staphylococcus aureus*, *Zataria multiflora*, Oxacillin.