

ارزیابی اثر ضد میکروبی اسانسهای *Myrtus communis* L. *Zataria multiflora* Boiss. و *Eucalyptus officinalis* بر استرپتوکوکوس پنومونیه، هموفیلوس آنفلوانزا و موراکسلا کاتارهایلیس با روش *in vitro*

محمدحسین یزدی^۱، محمدرضا پورمند^{۲*}، منصور بیات^۳ و آریو شاهین جعفری^۴

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۲- استادیار میکروبیولوژی مولکولی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، پست الکترونیک: mpourmand@tums.ac.ir

۳- استادیار قارچ شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی - واحد علوم و تحقیقات

۴- دکترای دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی - واحد کرج

* نویسنده مسئول مقاله

تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۸۶

تاریخ اصلاح نهایی: مرداد ۱۳۸۶

تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۸۶

چکیده

در منابع مختلف گیاه درمانی از گیاهانی مثل، آویشن شیرازی (*Zataria multiflora* Boiss.)، اکالیپتوس (*Eucalyptus officinalis*) و مورد (*Myrtus communis* L.) به عنوان عوامل آنتی‌باکتریال یاد شده است. سینوزیت و برونشیت در بین مراجعان سرپایی به پزشک که احتیاج به تجویز آنتی‌بیوتیکی دارند، حدود ۷۵ درصد از موارد را شامل می‌شود. از جمله باکتریهای شایع در ایجاد این بیماریها، می‌توان به استرپتوکوکوس پنومونیه، هموفیلوس آنفلوانزا و موراکسلا کاتارهایلیس اشاره کرد. در این مطالعه که به روش *in vitro* می‌باشد، اثر ضد میکروبی سه نوع اسانس گیاهی بر روی میکروارگانیسمهای استرپتوکوکوس پنومونیه، موراکسلا کاتارهایلیس و هموفیلوس آنفلوانزا که از عوامل مهم سینوزیت و برونشیت می‌باشند، بررسی گردید. ابتدا تست کمی حداقل غلظت مهار کننده رشد (MIC) نسبت به این اسانسها انجام گرفت. سپس تست کیفی (دیسک دیفیوژن) با توجه به غلظت لوله MIC هر باکتری با هر اسانس انجام گرفت. نتایج تست کمی MIC از اسانسهای مورد بررسی در مورد استرپتوکوکوس پنومونیه با آویشن ۱۶۳/۸۸ میکروگرم در میلی‌لیتر، موراکسلا کاتارهایلیس با آویشن ۸۱/۹۴ میکروگرم در میلی‌لیتر و در هموفیلوس آنفلوانزا با اسانس اکالیپتوس ۱۵۲/۶۶ میکروگرم در میلی‌لیتر بدست آمد و در تست دیسک دیفیوژن معلوم شد، بیشترین قطر هاله عدم رشد باکتری استرپتوکوکوس پنومونیه مربوط به آویشن (۵۲ mm) و پس از آن اکالیپتوس (۴۸ mm) و مورد (۳۰ mm) بوده است. در مورد موراکسلا کاتارهایلیس این وضعیت در مورد آویشن (۵۵ mm) مورد (۵۰ mm) و اکالیپتوس (۳۴ mm) بوده است. در مورد هموفیلوس آنفلوانزا، آویشن (۴۰ mm)، مورد (۲۲ mm) و اکالیپتوس (۱۸ mm) بوده است. نتایج، بیانگر اثرات خوب اسانسهای آویشن، اکالیپتوس و مورد بر روی ۳ میکروارگانیسم عامل سینوزیت و برونشیت می‌باشد و می‌توانیم به ساخت داروی مناسب برای از بین بردن این میکروارگانیسمها با منشأ گیاهی و با عوارض بسیار کمتر دارویی امیدوار باشیم.

واژه‌های کلیدی: اسانس، آویشن شیرازی (*Zataria multiflora* Boiss.)، اکالیپتوس (*Eucalyptus officinalis*)، مورد (*Myrtus communis* L.)، حداقل غلظت مهارکننده رشد.

مقدمه

سینوزیت و برونشیت در بین مراجعان سرپایی به پزشک که احتیاج به تجویز آنتی‌بیوتیک دارند حدود ۷۵٪ از موارد را شامل می‌شود (Kasper et al., 2005). از جمله باکتریهای شایع در این بیماریها می‌توان به استرپتوکوکوس پنومونیه، هموفیلوس آنفلونزا، موراکسلا کاتارهایلیس و استافیلوکوکوس اورئوس اشاره کرد (Kasper et al., 2005; Fredrick et al., 2001).

درمان این دو بیماری با توجه به سوشهای شایع و عوامل ایجاد کننده عبارت است از، آنتی‌بیوتیک+ترکیبات موکولیتیک+ضد احتقانها (بنکدارپور، ۱۳۷۹). در منابع مختلف گیاه درمانی، از اسانسهای گیاهی مانند آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*)، اکالیپتوس (*Eucalyptus officinalis*) و مورد (*Myrtus communis*) به‌عنوان یک عامل آنتی‌باکتریال یاد شده است و همچنین در برخی از مقالات به نفوذپذیری بالای این اسانسها اشاره شده است (زرگری، ۱۳۶۹).

اسانس *Zataria multiflora* دارای دو جزء اصلی تیمول و کارواکرول می‌باشد (بنکدارپور، ۱۳۷۹؛ زرگری، ۱۳۶۹). اسانس *Eucalyptus officinalis* دارای یک جزء اصلی به نام اوکالیپتول می‌باشد و اسانس *Myrtus communis* دارای سینئول و میرتنول می‌باشد (بنکدارپور، ۱۳۷۹؛ زرگری، ۱۳۶۹).

تحقیقات انجام شده بیانگر اثرات ضد میکروبی خوبی در مورد اسانسهای گیاهی می‌باشد (زرگری، ۱۳۶۹؛ کلانتر هرمزی و همکاران، ۱۳۸۱؛ Marino et al., 1999). همچنین در ذائقه مردم میل بیشتری نسبت به مصرف ترکیبهای گیاهی به جای داروهای شیمیایی دیده می‌شود. ضمن اینکه بسیاری از پژوهشگران عقیده دارند که

عوارض ناشی از مصرف داروهای گیاهی، بسیار کمتر از داروهای شیمیایی است.

نظر به اینکه گیاهان دارویی در کشور ما پراکندگی وسیعی دارند، مطالعات روی این گیاهان از نظر خواص ضد میکروبی آنها زمینه مناسبی را فراهم می‌کند که از نتایج این بررسیها جهت جایگزین نمودن داروهای با منشأ طبیعی برای کنترل و درمان عفونتهای باکتریایی استفاده نمود و این امر می‌تواند موجب کاهش مصرف داروهای شیمیایی و عوارض ناشی از آن گردد. بدین لحاظ انجام تحقیقات به‌منظور مقایسه اثرات ضد میکروبی اسانسهای گیاهی ضروری می‌نماید. در این تحقیق، اثرات ضد میکروبی اسانسهای گیاهان آویشن شیرازی، اکالیپتوس و مورد بر روی باکتریهای شایع در سینوزیت و برونشیت بررسی گردید.

مواد و روشها

سوشهای باکتریایی

از سوشهای باکتریایی *Streptococcus pneumoniae* ATCC33930، *Moraxella catarrhalis* (clinical isolated) و *Haemophilus influenzae* ATCC33400 استفاده شد.

محیط کشت

محیط کشت‌های مصرف شده عبارت بودند از: Blood Agar، Muller Hinton Agar، Chochlate Agar و Columbia Agar که از شرکت Merck خریداری شدند.

اسانس

اسانسهای مورد استفاده شامل *Zataria multiflora* و *Myrtus communis* از شرکت باریج اسانس (ایران-کاشان) خریداری شدند.

روش کار

در این مطالعه که به صورت آزمایشگاهی صورت گرفت، پس از انتقال نمونه‌های سوش استاندارد به آزمایشگاه ابتدا روی محیط بلاد و شکلات آگار، پاساژ اولیه انجام شد و نمونه‌ها برای ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه انکوبه شدند. سپس تست کمی حداقل غلظت مهار کننده از رشد (MIC) و تست کیفی دیسک دیفیوژن برای نمونه‌ها با اسانسهای یاد شده روی محیط مولر هیتون آگار گذاشته شد.

تست تعیین حداقل غلظت مهار کننده از رشد (MIC)

پس از تهیه سوسپانسیون میکروبی توسط محیط مولر هیتون براث مطابق با نیم مک‌فارلند، ترکیب رقیق شده‌ای (معادل ۱۲۷۲ میکروگرم در میلی‌لیتر) از اسانسها را با حلال دی متیل سولفوکساید (DMSO) تهیه شد. (Karaman et al., 2001). پس از این مرحله، در ۱۰ لوله در پیچ‌دار استریل به جز لوله شماره ۱ به میزان ۱ میلی‌لیتر محیط مولر هیتون براث افزوده و در مرحله بعد به میزان ۱ میلی‌لیتر ترکیب رقیق شده اسانس را پس از تکان دادن (پیپتینگ) از لوله شماره ۱ به لوله ۲ افزوده، پس از تکان دادن در لوله شماره ۲، به میزان ۱ میلی‌لیتر از محلول این لوله را به لوله شماره ۳ انتقال داده و این روند را تا لوله شماره ۹ ادامه داده شد و در نهایت، ۱ میلی‌لیتر از محلول لوله شماره ۹ دور ریخته شد (CLSI, 2007). پس از این مرحله، به میزان ۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون میکروبی برابر با استاندارد نیم مک‌فارلند را به تمام لوله‌ها افزوده و به مدت

۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در نهایت، اولین لوله شفاف، بیانگر MIC ما می‌باشد. برای تأیید یک لوله قبل، خود همان لوله و لوله بعد از آن روی محیط کشت شکلات آگار، کشت داده شد.

لازم به یادآوری است که در این آزمایش لوله شماره ۱ شاهد منفی و لوله شماره ۱۰ شاهد مثبت است و همچنین در مورد هموفیلوس آفلونزا از فاکتورهای رشد (supplement) شامل ۳٪ خون اسب لیز شده و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر NAD (MHA+LYHB) استفاده شد (Forbes et al., 2007).

تست به روش دیسک دیفیوژن

پس از انتقال نمونه‌های سوسپانسیون میکروبی مورد نظر با کدورت معادل نیم مک‌فارلند توسط سواب بر روی پلیت‌های حاوی محیط کشت مولر هیتون آگار به دیسک‌های کاغذی با قطر ۹ میلی‌متر آغشته به ۱۰ میکرولیتر از اسانسهای مطرح شده (غلظت معادل MIC هر باکتری با هر اسانس) قرار داده شد و سپس محیطها در انکوباتور (اتوو) ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند (Gradwohl et al., 1980).

در مورد باکتری هموفیلوس آفلونزا برای انجام تست دیسک دیفیوژن، از محیط مولر هیتون آگار به همراه فاکتورهای رشد (supplement) شامل ۱٪ هموگلوبین گاو (bovine) و ۱٪ ایزوویتال X (MHA+HGB) استفاده شد.

نتایج

پس از انجام تست MIC در مورد استرپتوکوکوس پنومونیه، کمترین MIC مربوط به آویشن (*Zataria multiflora*) با ۱۶۳/۸۸ میکروگرم در میلی‌لیتر در لوله

مربوط به اسانس مورد (*Myrtus communis*) ۱۵۲/۶۶ میکروگرم در میلی‌لیتر در لوله شماره ۳ (رقت ۱/۴) بوده است.

شماره ۳ (رقت ۱/۴) بوده است. در موراکسلا کاتارهایلیس نیز اسانس آویشن با ۸۱/۹۴ میکروگرم در میلی‌لیتر در لوله شماره ۴ (رقت ۱/۸) کمترین MIC را داشته است. در مورد هموفیلوس آنفلوانزا، کمترین MIC

جدول ۱- نتیجه MIC اسانسها بر روی هر کدام از میکروارگانیسمهای مورد بررسی

نام میکروارگانیسم	استرپتوکوکوس پنومونیه	موراکسلا کاتارهایلیس	هموفیلوس آنفلوانزا
نام اسانس	میلی لیتر / میکروگرم	میلی لیتر / میکروگرم	میلی لیتر / میکروگرم
<i>Zataria multiflora</i> TH.101.IV	۱۶۳/۸۸	۸۱/۹۴	۸۱/۹۴
<i>Myrtus communis</i> my.1.80	۱۵۷/۳۲	۷۸/۶۶	۱۵۷/۳۲
<i>Eucolyptus officinalis</i> EU.102.v	۱۱۴/۵۰	۷۶/۳۳	۱۵۲/۶۶

باکتری موراکسلا کاتارهایلیس مربوط به آویشن (۵۵ mm) بوده و در مورد (۵۰ mm) و در اکالیپتوس (۳۴ mm) بوده است و بیشترین قطر هاله عدم رشد باکتری هموفیلوس آنفلوانزا مربوط به آویشن (۴۰ mm) و در مورد (۲۲ mm) و در اکالیپتوس (۱۸ mm) بوده است (جدول شماره ۲).

پس از تعیین MIC برای ۳ باکتری مورد بحث با اسانسهای آویشن، اکالیپتوس و مورد، با توجه به غلظت لوله MIC هر باکتری، با هر اسانس تست قطر هاله عدم رشد گذاشته شد و معلوم شد بیشترین قطر هاله عدم رشد باکتری استرپتوکوکوس پنومونیه مربوط به آویشن (۵۲ mm) و سپس قطر هاله عدم رشد اکالیپتوس (۴۸ mm) و مورد (۳۰ mm) بوده است. بیشترین قطر هاله عدم رشد

جدول ۲- قطر هاله عدم رشد باکتریهای مورد مطالعه در محیط کشت مولر هینتون آگار

نام میکروارگانیسم	استرپتوکوکوس پنومونیه	موراکسلا کاتارهایلیس	هموفیلوس آنفلوانزا
نام اسانس	(mm)	(mm)	(mm)
<i>Zataria multiflora</i> TH.101.IV	۵۲±۱	۵۵±۲	۴۰±۱
<i>Myrtus communis</i> my.1.80	۳۰±۱	۵۰±۱	۲۲±۲
<i>Eucolyptus officinalis</i> EU.102.v	۴۸±۱	۳۴±۲	۱۸±۱

بحث

کلانتر هرمزی و همکاران (۱۳۸۱) در شهر اراک بر روی اثرات ضد میکروبی عصاره میوه خارخاسک انجام شد، عصاره این میوه در مقایسه با آنتی‌بیوتیکهای رایج، بر روی باکتریهای استرپتوکوکوس فکالیس،

در این مطالعه، اثرات ۳ نوع اسانس بر قطر هاله عدم رشد ۳ میکروارگانیسم مؤثر در بیماری سینوزیت و برونشیت مزمن بررسی شد. در تحقیقی که توسط

آویشن، اکالیپتوس و مورد بر سه میکروارگانسیم استرپتوکوکوس پنومونیه، موراکسلا کاتارهایلیس و هموفیلوس آنفلوانزا که عمدتاً سینوسها و برونشها را درگیر می‌کنند، می‌باشد و با توجه به نتایج، می‌توان به ساخت دارویی مناسب جهت از بین بردن این میکروارگانسیمها توسط اسانسهای یاد شده امیدوار بود.

منابع مورد استفاده

- بنکدارپور، ب.، ۱۳۷۹. رینوسینوزیت بزرگسالان: تشخیص و درمان. نوین پزشکی، ۸(۵): ۲۶۸-۲۵۹.
- بیات، م. و خسروی، ع.، ۱۳۸۲. بررسی اثر چند نوع اسانس استاندارد موجود روی میکروبهای مولد عفونتهای بعد از جراحی به صورت *in vitro*. گزارش طرحهای تحقیقاتی شرکت داروسازی باریج اسانس، سال پنجم، ۴۳-۳۷.
- زرگری، ع.، ۱۳۶۹. گیاهان دارویی. جلد دوم انتشارات دانشگاه تهران، ۴۰۰ صفحه.
- کلانتر هرمزی، ع.، دلاور، م.، کیان بخت، س. و پایانی، م.، ۱۳۸۱. بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره میوه خارخاسک بر علیه باکتریهای استرپتوکوکوس فکالیس، استافیلوکوکوس اورئوس، اشیریشیا کلی و سودوموناس آئروژینوزا و مقایسه آن با تعدادی آنتی‌بیوتیک رایج. مجله دانشگاه علوم پزشکی اراک (ره‌آورد دانش)، ۵(۴): ۱۲-۷.
- Fredrick, A.M., Saint, S., Brook, I., Jacobs, M.R., Pelton, S. and Sethi, S., 2001. Diagnosis and Treatment of upper Respiratory tract infection in the primary care setting. *Clinical Therapeutics*, 23(10): 1683-706.
- Forbes, B.A., Sahm, D.F. and Weissfeld, A.S., 2007 *Baily & Scott's Diagnostic microbiology*. Mosby Elsevier, Missouri. 1031p.
- Gradwohl, R.B.H., Sonnenwirth, A.C. and Jarett L., 1980. *Clinical Laboratory Methods and Diagnosis*. The C.V. Mosby Company, St Louis. 2676p.
- Kasper, D.L., Braunwald, E., Fauci, A.S., Hauser, S.L., Longo, D.L. and Jameson, J.L. 2005. *Harrison's Manual of Medicine*. Mcgraw-Hill Education, New York. 1807p.
- Karaman, S., Digrak, M., Ravid, U. and Ilcim, A., استفیلوکوکوس ارئوس، اشیریشیا کلی و سودوموناس آئروژینوزا اثرات مشابه و گاهی اوقات اثرات بهتری از خود نشان داده است. تحقیق دیگری توسط Roussis و همکاران (۱۹۹۶) انجام شد که نشان‌دهنده تغییر در تأثیر اسانسهای گیاهی بر روی فعالیت میکروارگانسیمهای مختلف می‌باشد و متغیر بودن تأثیر بر میکروارگانسیمهای مختلف به نوع و اندازه مولکولهای مؤثر و قدرت نفوذپذیری آنها به داخل میکروارگانسیم وابسته است.
- در تحقیق دیگری توسط بیات و خسروی (۱۳۸۲) نتیجه MIC اسانسهای اکالیپتوس، آویشن و مرزه بر روی میکروارگانسیمهای استافیلوکوکوس اورئوس، اشیریشیا کلی و استرپتوکوکوس فکالیس نشان داد اسانس آویشن پایین‌ترین MIC را نسبت به بقیه اسانسها بر روی هر سه میکروارگانسیم داشته است. در تحقیق دیگری، اثرات مفید ضد میکروبی لاواند و رزماری بر روی باکتریها، کپکها و مخمرها مورد بررسی قرار گرفت (Larrondo *et al.*, 1995). با توجه به اینکه تحقیقات عمدتاً بر میکروبهای خاصی متمرکز نمی‌باشد، بنابراین بررسیهای مقایسه‌ای بین مطالعات صورت گرفته میسر نمی‌باشد. به‌طور مسلم در طب باستان توجه ویژه‌ای بر کارکردهای مختلف عصاره‌های گیاهی بر اساس اندام درگیر در بیماری بوده است، ولی با توجه به عدم برخورداری از تکنولوژی روز کاربرد آنها در طب جدید برای سالیان متمادی، مورد عنایت قرار نگرفت.
- در این بررسی، دقیقاً توجه به کاربرد اسانسها با ارگان مورد توجه مبنا قرار گرفته است. نتایج این پژوهش به این ترتیب بیانگر اثرات خوب اسانسهای

- Thymus vulgaris* L. measured using a bioimpedometric method. Journal of food protection, 62(9): 1017-1023.
- Roussis V., Chinou I., Perdetzoglou D. and Loukis A., 1996. Identification and bacteriostatic activity of the essential oil of *Lamium graganicum* L. spp. *laevigatum* Arcangeli. Journal of Essential Oil Research, 8: 291-93.
 - Larrondo, J.V., Agut, M., Calvo-Torras, M.A., 1995. Antimicrobial activity of essences from labiates. Microbios, 82(332): 171-172.
 - Marino, M., Bersani, C. and Comi, G., 1999. Antimicrobial activity of the essential oils of 2001. Antibacterial and antifungal activity of the essential oils of *Thymus revolutus* Celak from Turkey. Journal of Ethnopharmacology, 76(2): 183-186.

In vitro* antimicrobial effects of *Zataria multiflora* Boiss., *Myrtus communis* L. and *Eucalyptus officinalis* against *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* and *Haemophilus influenzae

M.R. Pourmand¹, M.H. Yazdi², M. Bayat³ and A. Shahinjafari⁴

1- Assistant Professor, Department of Pathobiology, School of Public Health, Medical Sciences University of Tehran, E-mail: mpourmand@tums.ac.ir

2- MSc Student of Medical Microbiology, Department of Pathobiology, School of Public Health, Medical Sciences, University of Tehran

3- Assistant Professor, Department of Mycology, research & science Branch of Islamic azad university

4- DVM, Science Researcher, Karaj Islamic Azad University

Abstract

In order to investigate the antimicrobial effects of Iranian herbal essences of *Zataria multiflora* Boiss., *Myrtus communis* L. and *Eucalyptus officinalis*, this research was conducted under CLSI guidelines *in vitro* situation. Since *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* and *Haemophilus influenzae* are highly involved in Sinusitis and Bronchitis, the antibacterial effects of the essences were investigated on these species. Antibiotic susceptibility testing was performed by disk diffusion method for the essential oils and of determination Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was carried out by serial dilutions. *Zataria multiflora* was effective against all the tested bacterias e.g. *Streptococcus pneumoniae* (52mm), *Moraxella catarrhalis* (55mm) and *Haemophilus influenzae* (40mm) based on disk diffusion method. Furthermore, the highly effective inhibition of *Myrtus communis* was on *Moraxella catarrhalis* (50 mm) (MIC \geq 78.66 μ g/ml). This study showed that the herbal essences are very active against *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* and *Haemophilus influenzae* *in vitro* situation. This confirms the application of herbal medicines for treating a range of infectious diseases in ancient times.

Key words: Essential oil, *Zataria multiflora* Boiss., *Myrtus communis* L., *Eucalyptus officinalis*, MIC.