Medical Journal
of
Tabriz University of Medical Sciences and Health Services

Original Article

The antibacterial activity of Artemisia quettensis essential oil and its synergy with imipenem

Elham Saffari[1], Mohammad Ali Nasiri Khalili[2*], Jalil Fallah MehrAbadi[3]

[1]Department of Chemistry and Essential Oil Technology, Faculty of Chemistry, Islamic Azad University of Pharmaceutical Science, Tehran, Iran
[2]Department of Biochemistry and Biophysics, Education and Research Center of Science and Biotechnology, Malek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran
[3]The Lister Laboratory of Microbiology, Tehran, Iran
*Corresponding author; E-mail: manasiri@alumni.ut.ac.ir

Received: 3 December 2017 Accepted: 8 April 2018 First Published online: 18 November 2019
Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 December-2020 January; 41(5):80-88

Abstract

Background: The widespread use of antibiotics is a cause of mutation in microorganisms and leads to the emergence of new micro organisms and resistance to common antibiotics. The purpose of this study is to investigate the synergistic effect of antibacterial synthetic essential oils of *Artemisia quettensis* and imipenem antibiotic on Pseudomonas aeruginosa isolated from clinical specimens and comparing it with conventional antibiotics.

Methods: In this in vitro study, *Artemisia quettensis*.podlech oil was used alone and combined used with standard antibiotics to evaluate their antimicrobial activities. The disk diffusion method was employed.

Results: The essential oil of the plants with antibiotics led to a synergistic effect in some cases, because of injecting a quarter of antibiotics inhibit the growth of bacteria and prevents the creation of the colony.

Conclusion: The combination of essential oils of the *Artemisia quettensis* with antibiotics may be useful in the fight against emerging microbial drug resistance.

Keyword: Anti Bacterial, Artemisia Quettensis, Essence, Imipenem, Pseudomonas Aeruginosa, Synergy

How to cite this article: Saffari E, Nasiri Khalili M A, MehrAbadi J F. [The antibacterial activity of Artemisia quettensis essential oil and its synergy with imipenem]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 December-2020 January; 41(5):80-88. Persian.

© 2019 The Author(s). This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

مقاله پژوهشی

خاصیت آنتی‌باکتریایی اسانس درمنه کوتنسیس و تاثیر سینرژیسمی آن با ایمی‌پنم روی سودوموناس آئروژینوزا

الهام صفاری[۱]، محمدعلی نصیری خلیلی[۲*]، جلیل فلاح مهرآبادی[۳]

[۱] گروه شیمی و فناوری اسانس، دانشکده شیمی، دانشگاه علوم دارویی، تهران، ایران
[۲] گروه بیوشیمی و بیوفیزیک، پژوهشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران
[۳] آزمایشگاه میکروب‌شناسی لیستر، تهران، ایران
[*] نویسنده مسؤول؛ ایمیل: manasiri@alumni.ut.ac.ir

دریافت: ۱۳۹۶/۹/۱۲ پذیرش: ۱۳۹۷/۱/۱۹ انتشار برخط: ۱۳۹۸/۸/۲۷
مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی تبریز. آذر و دی ۱۳۹۸؛ ۴۱(۵): ۸۰-۸۸

چکیده

زمینه: استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها عامل ایجاد جهش در میکروارگانیسم بوده و باعث ظهور میکروارگانیسم‌های جدید و مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های رایج می‌شود. هدف از این پژوهش بررسی تاثیر سینرژیسمی (هم افزایی) آنتی‌باکتریایی اسانس گیاه *آرتمیزیا کوتنسیس* و آنتی‌بیوتیک ایمی‌پنم روی ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا و مقایسه آن با آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی می‌باشد.

روش کار: در این مطالعه که به روش In vitro انجام شد، از اسانس آرتمیزیا کوتنسیس به تنهایی و در ترکیب با آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد جهت ارزیابی خاصیت آنتی‌باکتریایی آن‌ها استفاده شد.

یافته‌ها: طبق یافته‌های حاصل از این مطالعه ترکیب اسانس گیاهی درمنه کوتنسیس با آنتی‌بیوتیک ایمی‌پنم منجر به اثر سینرژیسمی در بیشتر موارد می‌شود. به‌طوری‌که در بررسی سینرژیسمی با تزریق یک چهارم از آنتی‌بیوتیک، رشد باکتری مهار و مانع از ایجاد کلنی گردید.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان داد که ترکیب اسانس و آنتی‌بیوتیک می‌تواند در مبارزه علیه میکروارگانیسم‌های مقاوم مفید باشد.

کلید واژه‌ها: آنتی‌باکتریال، اسانس، ایمی‌پنم، درمنه کوتنسیس، سودوموناس آئروژینوزا، سینرژیسم

نحوه استناد به این مقاله: صفاری ا، نصیری خلیلی م ع، فلاح مهرآبادی ج. خاصیت آنتی‌باکتریایی اسانس درمنه کوتنسیس و تاثیر سینرژیسمی آن با ایمی‌پنم روی سودوموناس آئروژینوزا. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی تبریز. ۱۳۹۸؛ ۴۱(۵): ۸۰-۸۸

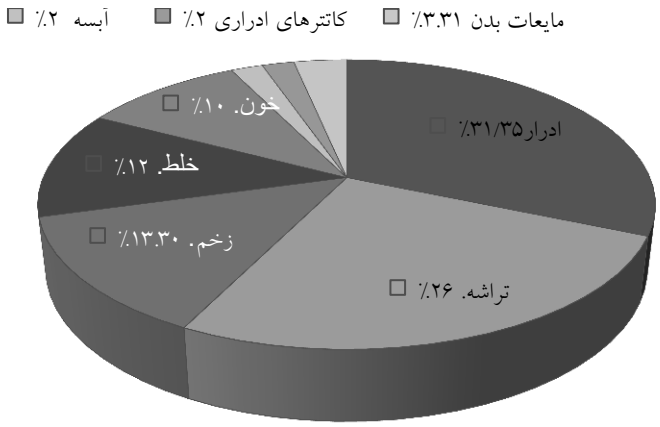
حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است.
این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی تبریز تحت مجوز کریتیو کامنز (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

مقدمه

اسانس‌های گیاهی ترکیباتی فرار و معطر هستند که به دلیل دارا بودن گروه‌های فعال فنولیک و مقادیر زیادی ترکیبات آروماتیک در اندام‌های مختلف گیاه، دارای خواص درمانی و دارویی قابل توجهی می‌باشند. این ترکیبات بواسطه دارا بودن خاصیت ضداکسایشی و ضدمیکروبی ذاتی، نقش مهمی در سیستم دفاعی گیاهان در برابر بیماری‌های میکروبی ایفا می‌کنند (۱، ۲، ۳). متابولیت‌های ثانویه که به صورت پیش‌سازهای غیرفعال ذخیره شده در بافت‌های گیاهی تولید می‌شوند شامل ترکیبات فنلی، فلاوونول‌ها و فلاوونوئیدها، گلیکوزیدها، آلکالوئیدها و پلی‌استیلن‌ها می‌باشند که به علت خاصیت مهارکنندگی و کشندگی میکروارگانیسم‌های پاتوژن مورد توجه قرارگرفته‌اند (۴، ۵، ۶). گیاه درمنه با بیش از ۴۰۰ گونه در سطح جهان در رده‌ی گیاهان چند ساله قرار دارد. درمنه کوتنسیس گونه کمیابی است که در مناطق خاصی از استان آذربایجان یافت می‌شود (۷). بررسی‌های مختلف نشان داده است که از گونه‌های مختلف آرتمیزیا به طور سنتی در درمان عفونت‌های انگلی و باکتریایی استفاده شده است (۸). آنتی‌بیوتیک‌ها داروهای قوی هستند که مانع تکثیر میکروارگانیسم‌ها شده و آن‌ها را از بین می‌برند. مقاومت دارویی به آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی موضوعی است که از گذشته وجود داشته است (۹). مقاومت آنتی‌بیوتیکی به شکل یک موتاسیون رخ می‌دهد، از آن‌جا که جهش کروموزومی در باکتری‌ها بسیار بیشتر از موجودات دیگر می‌باشد، لذا میکروب‌ها مرتب تغییر می‌کنند. در نتیجه پژوهشگران مجبور به تولید آنتی‌بیوتیک‌های جدید با فعالیت ضدمیکروبی مناسب به‌ویژه در طول یک دهه اخیر شده‌اند. تجویز تجربی آنتی‌بیوتیک‌ها بدون آزمایش‌های تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی، منجر به انتخاب نامناسب و غیرضروری آنتی‌بیوتیک‌ها گردیده است و از طرفی باعث ایجاد مقاومت‌های چند گانه نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها شده است. با توجه به این‌که بیماری‌های عفونی و مسمومیت‌زا طیف وسیعی از بیماری‌ها را تشکیل می‌دهند و از سویی شمار سوش‌های میکروبی مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها هر روز بیشتر می‌شوند، لذا نیاز به مواد ضدمیکروبی طبیعی جدید و کم‌خطر به شدت مورد نیاز می‌باشد. از این‌رو، بررسی ضدمیکروبی گیاهان طبیعی می‌تواند دریچه‌ای برای بدست آوردن آنتی‌بیوتیک‌های جدید را هموار سازد (۱۰). *سودوموناس آئروژینوزا* باکتری میله‌ای، گرم منفی با طول متغیر است (۱۱). یک دلیل عمده در برتر بودن این باکتری به‌عنوان یک عامل بیماری‌زا از سایر گونه‌های سودوموناس، مقاومت ذاتی بالای آن به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد (۱۲، ۱۳). این ارگانیسم به‌عنوان یک پاتوژن فرصت‌طلب انسانی عامل مرگ و میر مرتبط با عفونت در بین بیماران بدحال به‌ویژه بیماران با نقص ایمنی که نیاز به بستری شدن طولانی مدت دارند، منجر به عواقب جبران ناپذیری می‌گردد (۱۴، ۱۵). برخورد با عوامل ضدمیکروبی مختلف ممکن است این قبیل بستری شدن را پیچیده نماید و شرایط مساعد را به سمت بروز مقاومت و زنده ماندن در رقابت با فلور باکتریای میزبان یا با سویه‌های منتقل شونده از طریق بیمارستان ایجاد نماید. این باکتری مقاومت بالایی به عوامل ضدمیکروبی متعدد نشان می‌دهد که استفاده بیش از حد از آنتی‌بیوتیک‌ها اغلب باعث مقاومت روزافزون باکتری به این داروها شده است (۱۶، ۱۷). از طرف دیگر مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها غالبا با عوارض جانبی در بدن انسان همراه است، به همین منظور استفاده از گیاهان دارویی با داشتن ترکیبات فعال دارویی در بهبود روش‌های درمانی و احتمالا جایگزینی درمان‌های کلاسیک می‌تواند موثر باشد. مطالعات انجام شده در دنیا حاکی از آن است که اسانس و عصاره‌ی بسیاری ازگیاهان توانایی مهار رشد میکروارگانیسم‌ها را دارند و به این لحاظ گیاهان دارویی به‌عنوان عوامل ضدمیکروبی کاربردهای زیادی پیدا نموده اند (۱۸). با توجه به روند رو به رشد گیاهان دارویی، وجود ترکیبات فعال بیولوژیکی موجود در گیاه درمنه کوتنسیس و خاصیت آنتی‌باکتریایی گیاه، به طور کلی اهداف این پژوهش شامل، تعیین قدرت ضدمیکروبی اسانس درمنه کوتنسیس، بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی، تعیین اثر جداگانه اسانس و ایمی‌پنم و سپس بررسی اثر همزمان آن‌ها و در نهایت میزان مفید بودن اسانس در درمان عفونت‌های سودوموناسی بررسی شود.

روش کار

در این مطالعه تجربی آزمایشگاهی، بر اساس محاسبه حجم نمونه در مجموع ۲۰ نمونه کلینیکی *سودوموناس آئروژینوزا* (P) شامل نمونه‌های تراشه، ادرار، زخم، خلط، خون، مایعات بدن و کاتتر های ادراری و آبسه در مدت زمان ۴ ماه از بیمارستان‌های بقیة الله (عج)، لقمان و شریعتی تهران جمع‌آوری گردید (نمودار۱). پس از انتقال ایزوله‌های بالینی به آزمایشگاه لیستر تهران، جهت تایید باکتریولوژیک، آزمون‌های گوناگون بیوشیمیایی برای هریک از ایزوله‌های جمع‌آوری شده صورت پذیرفت. یک سویه استاندارد *سودوموناس آئروژینوزا* ATCC27853 نیز مورد استفاده قرار گرفت. گیاه *آرتمیزیا کوتنسیس* از مرکز ملی ذخایر خریداری و قسمت‌های هوایی و برگ‌ها جهت اسانس‌گیری انتخاب شد. گیاه پس از شستشو، در هوا خشک گردید و به کمک دستگاه کلونجر به مدت ۴ ساعت در معرض تقطیر آبی قرار داده شد. اسانس تقطیر شده با استفاده از سولفات‌سدیم بدون آب خشک و در بطری تیره در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در این پژوهش از محیط کشت مولرهینتون آگار (ساخت شرکت مرک آلمان) استفاده شد و برای تعیین حساسیت ایزوله‌های بالینی از ۷ دیسک آنتی‌بیوتیکی طبق جدول ۱ استفاده شد (تمام آنتی‌بیوتیک‌ها ساخت کشور Mast انگلستان). جهت تایید عملکرد صحیح دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی، سویه استاندارد *سودوموناس آئروژینوزا* ATCC27853 بر روی محیط مولرهینتون آگار با کمک سواپ استریل به فرم یکدست کشت و سپس دیسک‌های مورد آزمون با فاصله ۲۲ میلی‌متر از یکدیگر و ۱۶ میلی‌متر از جداره پلیت در انکوباسیون ۲۴–۱۸ ساعته در دمای ۳۷°C قرار داده شد. بعد از تهیه محلول نیم مک‌فارلند و کشت بر روی محیط مولرهیلتون آگار، قطر هاله دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی بر اساس جدیدترین معیار CLSI ارزیابی شدند.



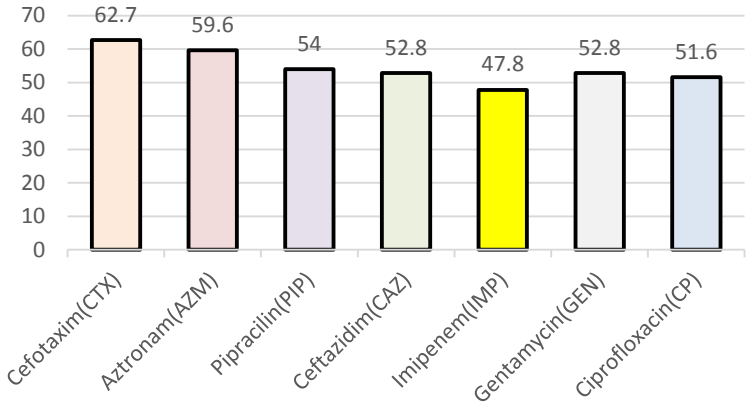
نمودار۱: منبع جداسازی و میزان فراوانی نمونه‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزای جمع‌آوری شده طی ۴ ماه

۲۴ ساعت، تلقیح 10^4 عدد باکتری بدست آمده در قسمت قبل و سویه‌های استاندارد بر روی هر یک از پلیت‌های تهیه شده حاوی غلظت‌های سریالی از آنتی‌بیوتیک ایمی‌پنم و مقدار مشخصی از اسانس گیاه انجام گرفت. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای گرمخانه $37^{\circ}C$ نگهداری شدند. رقت‌های متوالی از اسانس *آرتمیزیا کوتنسیس* و آنتی‌بیوتیک ایمی‌پنم به طور جداگانه روی *سودوموناس آئروژینوزا* و تاثیر همزمان آن روی باکتری مورد نظر مورد آزمایش قرار گرفت. در بررسی سینرژیسمی با تزریق یک چهارم از آنتی‌بیوتیک رشد باکتری مهار شد و مانع از ایجاد کلنی گردید. اسانس توانست قدرت ضد باکتریایی آنتی‌بیوتیک را تا ۴ برابر افزایش دهد. در تعامل و همکاری میان داروی شیمیایی و ترکیب طبیعی اسانس، مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* کاهش یافت.

یافته‌ها

از میان ۲۰ نمونه‌ی مورد آزمایش، ۱۷ سویه *سودوموناس آئروژینوزا* (۸۵٪) به حداقل یک یا بیشتر از یک آنتی‌بیوتیک مقاوم بودند. بیشترین مقاومت مربوط به سفوتاکسیم از گروه سفالوسپورین‌ها (۶۲٪)، آزترئونام از گروه منوباکتام‌ها (۵۹٪) و کمترین مقاومت نیز مربوط به ایمی‌پنم از گروه کاربانم می‌باشد. ادامه نتایج در نمودار شماره ۲ آورده شده است. پس از انجام آزمایشات مشخص شد که ایمی‌پنم در غلظت ۲ µg/ml و *آرتمیزیا کوتنسیس* در غلظت ۰/۵µl/ml به تنهایی و به ترتیب قادر به ممانعت از رشد ۱۵٪ و ۴۰٪ از کل سویه‌های سودوموناس گردیدند. در حالی‌که در تاثیر سینرژیسمی به ترتیب در غلظت ۰/۵µl/ml و ۰/۲۵ µg/ml، ممانعت از رشد آن‌ها به ۱۰۰٪ رسید که این نتایج در جدول۱ نشان داده شده است.

برای اندازه‌گیری حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (Minimum Inhibitory Concentration, MIC)، سوسپانسیون باکتریایی استاندارد تهیه شد که در آن‌ها تعداد باکتری‌ها در حد مشخصی قرار گرفت و به منظور تعیین تعداد باکتری‌ها در محیط مورد نظر محلول‌هایی با کدورت استاندارد توسط مک‌فارلند تهیه شدند. برای تهیه‌ی استانداردها از مخلوط کردن محلول یک درصد سولفوریک‌اسید خالص و محلول ۱/۱۷۵٪ باریم‌کلرید استفاده شد و بر اساس میزانی که این دو ماده با یکدیگر مخلوط شدند کدورت ایجاد شد و هر کدورت شماره مخصوص به خود (معمولا از ۰/۵ تا ۱۰) اختصاص داد. کدورت در لوله ۰/۵ کمترین و در لوله شماره ۱۰ حداکثر است. این محلول‌ها در محل تاریک و در درجه حرارت یخچال نگهداری شدند. پس از تهیه پلیت‌های حاوی محیط کشت آگار و رقت‌های متوالی از هر یک از آنتی‌بیوتیک‌های مورد آزمون، هر پلیت با کمک خط‌کش به تعداد تقریبی ۲۰ خانه مساوی تقسیم گردید. سپس به کمک سمپلر از سوسپانسیون میکروبی تهیه شده از هریک از باکتری‌های مورد آزمون (به روش مشابه دیسک دیفیوژن) پس از رقیق ساختن، میزان حجم ۱ میکرولیتر حاوی 10^4 عدد باکتری بر روی هر خانه پلیت آگار به روش نقطه‌ای چکانده شد. پس از گذشت زمان ۱۵–۱۰ دقیقه، پلیت‌ها در دمای انکوباسیون $37^{\circ}C$ قرار گرفتند و پس از ۲۴–۱۸ ساعت، از گرمخانه خارج و مورد تفسیر قرار گرفتند. در مورد هر یک از آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده، با توجه به سریال رقت تهیه شده، اولین رقت ممانعت کننده از رشد باکتری کشت داده شده به عنوان حداقل غلظت بازدارنده از رشد باکتری (MIC) در نظر گرفته شد. پس از تهیه رقت‌های مورد نیاز آنتی‌بیوتیک ایمی‌پنم و غلظت مورد نیاز از اسانس گیاه، توسط فیلتر درون محیط مولرهینتون آگار مذاب استریل ریخته شد و درون پلیت‌های استریل تقسیم گردید. پس از



نمودار۲: توزیع فراوانی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد آزمایش در سودوموناس آئروژینوزاهای جدا شده

جدول۱: نتایج MIC در سه حالت تاثیر آنتی‌بیوتیک، اسانس و سینرژیسمی

شماره سویه	MIC(µl/ml)		MIC(µl/ml) سینرژیسمی	
	ایمی‌پنم	اسانس	ایمی‌پنم	اسانس
P۱	۳۲	۱۶	۸	۴
P۲	۶۴	۱۶	۱۶	۴
P۳	۶۴	۳۲	۱۶	۴
P۴	۶۴	۳۲	۱۶	۴
P۵	۲	۰/۵	۰/۵	۰/۲۵
P۶	۱۲۸	۶۴	۳۲	۱۶
P۷	۱۲۸	۶۴	۳۲	۱۶
P۸	۶۴	۱۶	۱۶	۴
P۹	۶۴	۳۲	۱۶	۸
P۱۰	۶۴	۶۴	۱۶	۱۶
P۱۱	۸	۲	۲	۰/۵
P۱۲	۳۲	۸	۸	۲
P۱۳	۶۴	۱۶	۱۶	۴
P۱۴	۶۴	۳۲	۱۶	۸
P۱۵	۶۴	۱۶	۱۶	۸
P۱۶	۸	۲	۲	۰/۵
P۱۷	۶۴	۳۲	۱۶	۸
P۱۸	۶۴	۳۲	۱۶	۸
P۱۹	۱۲۸	۶۴	۳۲	۱۶
P۲۰	۶۴	۳۲	۱۶	۸

از میان ۲۰ سویه مورد مطالعه، تنها نمونه‌های P۵، P۱۱، P۱۶ نسبت به آنتی‌بیوتیک ایمی‌پنم حساس بودند در حالی‌که تمام نمونه‌ها نسبت به اسانس درمنه کوتنسیس حساس بودند و قطر هاله‌ی عدم رشد ۲۲–۱ میلی‌متر را نشان دادند. در تاثیر سینرژیسمی که هدف اصلی مطالعه ما می‌باشد، ۲۰ نمونه از عفونت‌های سودوموناس آئروژینوزا حساسیت بالایی از خود نشان دادند و در غلظت‌های یک چهارم نسبت به تاثیر ایمی‌پنم و یک دوم نسبت به تاثیر اسانس قطر هاله‌ی عدم رشد مطلوبی از خود نشان دادند (جدول۲). ۴۰٪ از نمونه‌های مورد مطالعه مقاومت بالایی نشان دادند که می‌تواند مربوط به سویه‌های انتخابی (نمونه‌های سوختگی) باشد. هم‌چنین در تاثیر سینرژیسم، اسانس و آنتی‌بیوتیک توانستند در تعامل با یکدیگر، بر سویه‌های مقاوم غلبه کنند و قادر به ممانعت از رشد ۲۰ سویه باکتری مورد مطالعه شوند.

جدول۲: قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر) در سه حالت تاثیر آنتی‌بیوتیک، اسانس و سینرژیسم

شماره سویه	قطر هاله عدم رشد تیمار ایمی‌پنم	قطر هاله عدم رشد تیمار اسانس	قطر هاله عدم رشد تیمار ایمی‌پنم-اسانس گیاه
P۱	۶ (مقاوم)	۱۲ (مقاوم)	۲۲ (سینرژیسم)
P۲	۲ (مقاوم)	۹ (مقاوم)	۱۹ (سینرژیسم)
P۳	۲ (مقاوم)	۷ (مقاوم)	۱۸ (سینرژیسم)
P۴	۱ (مقاوم)	۵ (مقاوم)	۶ میلی‌متر (مقاوم)
P۵	۲۰ (حساس)	۲۲ (حساس)	۴۱ (سینرژیسم)
P۶	۰ (مقاوم)	۸ (مقاوم)	۱۸ (سینرژیسم)
P۷	۰ (مقاوم)	۱ (مقاوم)	۱ (مقاوم)
P۸	۱ (مقاوم)	۱ (مقاوم)	۱ (مقاوم)
P۹	۳ (مقاوم)	۱۰ (مقاوم)	۱۹ (سینرژیسم)
P۱۰	۲ (مقاوم)	۱ (مقاوم)	۲ (مقاوم)
P۱۱	۱۲(نیمه حساس)	۱۸ (نیمه حساس)	۲۷ (سینرژیسم)
P۱۲	۵ (مقاوم)	۵ (مقاوم)	۶ (مقاوم)
P۱۳	۱ (مقاوم)	۱ (مقاوم)	۱ (مقاوم)
P۱۴	۰ (مقاوم)	۱۲ (مقاوم)	۱۲ (سینرژیسم)
P۱۵	۳ (مقاوم)	۳ (مقاوم)	۴ (مقاوم)
P۱۶	۱۳ (نیمه حساس)	۱۵ (نیمه حساس)	۲۵ (سینرژیسم)
P۱۷	۲ (مقاوم)	۵ (مقاوم)	۶ (سینرژیسم)
P۱۸	۱ (مقاوم)	۱ (مقاوم)	۱ (مقاوم)
P۱۹	۰ (مقاوم)	۷ (مقاوم)	۱۱ (سینرژیسم)
P۲۰	۰ (مقاوم)	۴ (مقاوم)	۸ (سینرژیسم)

بحث

گسترش سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک علاوه بر این‌که روند درمان را با کندی روبرو می‌کند، جان بیمارانی که با این سویه‌های مقاوم آلوده شده‌اند را نیز به خطر می‌اندازد. در این مطالعه اثرات ضدباکتریایی اسانس درمنه کوتنسیس همراه با آنتی‌بیوتیک ایمی‌پنم بررسی شد که نتایج بیانگر وجود خواص آنتی‌باکتریایی اسانس درمنه کوتنسیس بود. گزارشات بسیاری از اثرات ضدباکتریایی و ضدقارچی گونه‌های مختلف اسانس گیاه درمنه در شرایط مختلف بر روی سایر میکروارگانیسم‌ها وجود دارد اما تا به حال مطالعه‌ی سینرژیسمی روی اسانس درمنه کوتنسیس انجام نشده است. اولین مطالعه جهت ارزیابی خاصیت آنتی‌باکتریایی اسانس درمنه توسط kalembaاز لهستان در سال ۲۰۰۲ انجام شد که به خاصیت آنتی‌باکتریایی گونه‌ای از گیاه درمنه به نام درمنه Artemisia asitica nakai پی برد (۱۹). در سال‌های گذشته گزارش‌های بسیاری درباره‌ی مقاومت سودوموناس آیرژینوزا نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در تمام جهان انجام گردیده است. به هر صورت در موارد مشاهده‌ی مقاومت جهت درمان یا بایستی از آنتی‌بیوتیک‌های جدید استفاده کرد که امکان دستیابی به آن‌ها مشکل است یا از ترکیب نمودن آنتی‌بیوتیک‌ها با یکدیگر و تاثیر سینرژیسمی آن‌ها بهره برد که این امر باعث افزایش اثربخشی آن‌ها می‌گردد. طبق مطالعه‌ای که توسط Ihsan و همکاران روی اثرات برخی عصاره‌های گیاهی از جمله میرتوس کومونیس و چند آنتی‌بیوتیک روی باکتری سودوموناس آیرژینوزا انجام گردید، از گیاه مورد و اکالیپتوس جهت بازداری رشد باکتری سودوموناس آیرژینوزا در سوختگی شدید استفاده کردند. ۸۷٪ از نمونه‌ها حساسیت بالایی نسبت به عصاره‌های مذکور نشان دادند که این اثر در مطالعه ما نسبت به اسانس ۱۵٪ بدست آمد. سپس از تاثیر هم‌زمانی تتراسایکلین و عصاره‌های ذکر شده روی باکتری سودوموناس آیرژینوزا استفاده کرد. این مطالعه اولین بررسی سینرژیسمی گیاه و آنتی‌بیوتیک بر میکروارگانیسم سودوموناس آیرژینوزا بود. طبق نتایج، ۲۰/۹٪ از ایزوله‌های باکتری سودوموناس در تاثیر سینرژیسمی مقاومت نشان دادند که این تاثیر در مطالعه‌ی ما ۴۰٪ بدست آمد (۲۰). مقاومت سویه‌های مورد مطالعه‌ی ما نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده نزدیکی بسیاری به سویه‌های مورد مطالعه در آزمایشات wagih و همکاران داشت. طبق مطالعات آن‌ها، حساسیت سودوموناس آیرژینوزا به آنتی‌بیوتیک جنتامیسین بسیار بالا، نسبت به ایمی‌پنم متوسط و نسبت به آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم و آموکسی‌سیلین مقاوم بود. از گیاه زنجبیل و دارچین و آویشن جهت ارزیابی مقاومت سودوموناس آیرژینوزا استفاده کردند که کمترین غلظت مهارکنندگی برای عصاره‌ی زنجبیل، دارچین و آویشن به ترتیب ۴۰۰، ۸۰۰–۶۰۰، ۴۰۰–۳۰۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر بود. در این مطالعه نسبت به مطالعه‌ی ما، اسانس در غلظت بسیار بالایی مانع از رشد میکروارگانیسم شده است (۲۱). بررسی‌های جامع‌تری در زمینه‌ی سینرژیسمی اسانس و آنتی‌بیوتیک بر باکتری‌های مولد بیماری در سال ۲۰۱۴ توسط El-Hosseiny و همکارانش انجام شد که طی آن به بررسی اثر

مهارکنندگی اسانس و آنتی‌بیوتیک‌های مختلف بر ایزوله‌های سودوموناس آیرژینوزا پرداختند. تاثیر سه اسانس آویشن، مرزنجوش، مریم گلی و آنتی‌بیوتیک‌های پیپراسیلین، سفپیم، مروپنم، جنتامیسین و نورفلوکسازین به تنهایی و سپس اثر هم‌زمانی آن‌ها روی نمونه‌ها بررسی شد. طبق نتایجی بدست آمده اسانس آویشن و مرزنجوش فعالیت آنتی‌باکتریایی بالایی داشتند، در حالی‌که اسانس مریم گلی هیچ فعالیتی نسبت به میکروارگانیسم مورد آزمایش نشان نداد. اسانس آویشن همراه با آنتی‌بیوتیک (پیپراسیلین، سفپیم، مروپنم) توانست روی دیواره سلولی باکتری تاثیر مطلوبی بگذارد و خاصیت آنتی‌باکتریایی را دو برابر افزایش دهد. اسانس مریم گلی برخلاف عدم فعالیت خود علیه سودوموناس، در تاثیر سینرژیسمی با آنتی‌بیوتیک‌های پیپراسیلین، مروپنم و جنتامیسین توانست میزان فعالیت خود را به ترتیب ۴۱/۲٪، ۲۰٪/۵، ۳۱٪/۰۳ علیه سودوموناس افزایش دهد و اثر هم‌زمانی اسانس مرزنجوش با آنتی‌بیوتیک‌های پیپراسیلین و مروپنم و جنتامیسین به ترتیب ۲۹/۵٪، ۲۳/۵٪، ۱۳/۷٪ افزایش یافت. در نهایت دریافتند اسانس آویشن با دارا بودن درصد بالای تیمول (۳۳٪) هم به تنهایی و هم درتاثیر سینرژیسمی همراه با تمامی آنتی‌بیوتیک‌ها، بالاترین اثر را روی میکروارگانیسم مورد مطالعه داشته است (۲۲).

در مطالعه ما میزان خاصیت آنتی‌باکتریایی در تاثیر سینرژیسمی ۶۲٪ افزایش یافت در حالی‌که تنها ۵٪ از نمونه‌ها به تاثیر آنتی‌بیوتیک به طور تنها حساسیت نشان دادند. میانگین قطر هاله هنگام استفاده از آنتی‌بیوتیک ایمی‌پنم ۳/۷ و هنگام استفاده از اسانس درمنه کوتنسیس ۱۲/۴ به دست آمد. بهترین تاثیر در پدیده‌ی سینرژیسم هنگامی است که مقادیر قطر هاله عدم رشد در حالت سینرژیسمی، دو تا سه برابر مقادیر قطر هاله عدم رشد در تاثیر آنتی‌بیوتیک باشد که این اصل در مطالعه‌ی Moussaoui و Alaou تحت عنوان بررسی اثرات ضدمیکروبی و اثر سینرژیسمی بین آنتی‌بیوتیک و اسانس که روی گونه‌های مختلف میکروبی انجام گرفت به اثبات نرسید. قطر هاله عدم رشد آنتی‌بیوتیک ایمی‌پنم ۳۰/۶۶ میلی‌متر و در تاثیر سینرژیسمی آنتی‌بیوتیک و اسانس تیموس ویلدنووی ۳۲ میلی‌متر به دست آمد. از طرفی قطر هاله عدم رشد آنتی‌بیوتیک توبرامایسین ۲۳ میلی‌متر و در تاثیر سینرژیسمی با تیموس ویلدنووی ۲۶ میلی‌متر به دست آمد (۲۳). با گذر زمان و مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌های درمانی مقاومت دارویی نیز گسترش پیدا می‌کند از این‌رو محققان گیاهان با خواص دارویی را جایگزین آنتی‌بیوتیک‌های گیاهی می‌کنند. توماس باجر و همکاران به بررسی خاصیت آنتی‌باکتریایی اسانس گیاه *Epilobium parviflorum* از خانواده گل مغربیان بر چندین میکروارگانیسم از جمله سودوموناس آیرژینوزا در سال ۲۰۱۷ پرداختند. کمترین غلظت مهارکنندگی اسانس گیاه مذکور ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بدست آمد که در مقایسه با نتایج بدست آمده توسط تحقیق ما اسانس در غلظت بالاتری توانست مانع از رشد میکروارگانیسم شود (۲۴). عادل الزوبیری و همکاران در سال ۲۰۱۷ به بررسی خاصیت ضدباکتریایی و ضدقارچی چند گونه‌ی گیاهی پرداختند. در بخشی از مطالعه‌ی خود از تاثیر ضدباکتریایی اسانس برنجاسف جنوبی بر سودوموناس آیرژینوزا استفاده کرد و قطر هاله عدم رشد را اندازه‌گیری نمود. قطر هاله (بر حسب میلی‌متر) در غلظت ۲۵ µL از اسانس مورد نظر، ۸– ۱۳/۳ اندازه‌گیری شد که این مقادیر به نتایج ما نزدیک بود (۲۵).

نوآوری انجام شده در این تحقیق نسبت به تمام تحقیقات قبلی، بررسی گیاه درمنه گونه‌ی کوتنسیس و تعیین خاصیت آنتی‌باکتریایی گیاه، هم‌چنین تعیین میزان سینرژیسمی اسانس درمنه کوتنسیس و ایمی‌پنم بود که در هیچ‌کدام از منابع قبلی ذکر شده، موجود نبود. اسانس گیاه درمنه کوتنسیس به طور جداگانه خاصیت ضدباکتریایی خوبی در میزان ۰/۵ میکرولیتر بر میلی‌لیتر علیه سودوموناس آیرژینوزا از خود نشان داد و توانست رشد کلنی‌ها را متوقف نماید. هم‌چنین در تاثیر هم‌زمان اسانس و آنتی‌بیوتیک که قسمت اصلی مطالعه ما می‌باشد، اسانس توانست در میزان ۰/۲ میکرولیتر بر میلی‌لیتر به همراه ۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر از آنتی‌بیوتیک، روی تمام سویه‌های سودوموناس آیرژینوزای آزمایش شده در این پژوهش، مهار رشد کلنی داشته باشد. هدف از این تحقیق بررسی فعالیت ضدمیکروبی مواد فرار درمنه کوتنسیس و مواد اصلی آن جهت تسهیل رویکرد آینده‌ی میکروبیولوژی می‌باشد. با توجه به مقاومت‌هایی که نسبت به سیپروفلوکساسین ایجاد شده است، ممکن است این پادزیست از فهرست پادزیست‌های ضد سودوموناسی خارج شود. بهترین پادزیستی که در مراحل بحرانی می‌توان از آن استفاده کرد ایمی‌پنم است که به دلیل استفاده‌ی روز افزون و نادرست از این آنتی‌بیوتیک، مقاومت سویه‌ها هم‌چون مطالعات ذکر شده رو به افزایش است. مصرف ایمی‌پنم باید کامل کنترل شده باشد تا بتوان از این پادزیست به عنوان یک پادزیست موثر استفاده کرد. مسئله نگران کننده در این تحقیق مربوط به ۱۸ سویه‌ی *سودوموناس آئروژینوزا* بود که نسبت به تمام پادزیست‌ها مقاومت نشان دادند. می‌توان پیش‌بینی کرد سویه‌هایی از این دسته به‌زودی به وجود می‌آیند که درمان بیماران، مخصوصاً بیماران با نقص ایمنی را با مشکلات جدی روبرو خواهد کرد. در آخر پیشنهاد می‌شود که در خصوص باکتری‌های جداسازی شده از نمونه‌های بیماران، پیش از درمان، آزمون‌های آنتی‌بیوگرام و MIC انجام گیرد و هم‌چنین با کامل کردن طول دوره درمان مانع پیدایش سویه‌های مقاوم چند دارویی شویم.

نتیجه‌گیری

از آنجایی که بیماری‌های عفونی و مسمومیت زا طیف وسیعی از بیماری‌ها را تشکیل می‌دهند و از سویی شمار سوش‌های میکروبی مقام به آنتی‌بیوتیک‌ها هر روز بیشتر می‌شوند، لذا نیاز به مواد ضدمیکروبی طبیعی جدید و کم خطر به شدت مورد نیاز می‌باشد. از این‌رو، بررسی اثر ضدمیکروبی گیاهان طبیعی می‌تواند دریچه‌ای برای بدست آوردن آنتی‌بیوتیک‌های جدید را هموار سازد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد، به‌طور کلی اسانس گیاه درمنه کوتنسیس اثرات میکروب‌کشی بسیار مناسب بر سودوموناس آیرژینوزاهای مقاوم به آنتی‌بیوتیک دارند که می‌توان از ترکیبات این گیاه در تهیه آنتی‌بیوتیک‌های جدید بهره برد.

قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه دوره کارشناسی‌ارشد به شماره طرح ۵۸ ف مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی می‌باشد. بدینوسیله از کلیه همکاران محترم آزمایشگاه لیستر استان تهران و جناب آقای سهیل صالحی قدردانی می‌شود.

منابع مالی

منابع مالی ندارد

منافع متقابل

مولف اظهار می‌دارد که منافع متقابلی از تالیف یا انتشار این مقاله وجود ندارد.

مشارکت مولفان

ا ص، م ن و همکاران طراحی، اجرا و تحلیل نتایج را بر عهده داشتند. هم‌چنین مقاله را تالیف نموده و نسخه نهایی آن را خوانده و تایید نمودند.

References

1. Gutierrez J, Barry-Ryan C, Bourke P. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media. *Efficacy, synergistic potential and interactions with food components Food Microbiol* 2009; **26**: 142-150. doi: 10.1016/j.fm.2008.10.008
2. Hammer K A, Carson C F, Riley T V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J Appl Microbiol* 1999; **86**: 985-990. doi: 10.1046/j.1365-2672.1999.00780.x
3. Mogosano G D, Grumezescu A M, Huang K S, Bejenaru C. Prevention of microbial communities: novel approaches based natural products. *Curr Pharm Biotechnol* 2015; **16**(2): 94-111. doi: 10.2174/1389201016020150112145916
4. Aghel N, Moghimipour E, Ameri A. Characterization of an antidermatophyte cream from Zataria multiflora boiss. *Iranian J Pharm Sci* 2007; **3**: 77-84.
5. .Hemaiswarya S, Kruthiventi A K, Doble M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine* 2008; **15**: 639-652. doi: 10.1016/j.phymed.2008.06.008
6. Das S, Pal S, Mujib A. Biotechnology of medicinal plants recent advances and potential. 1st ed. Hyderabad, UK 992 Press, 1999; PP: 126-139. doi: 10.1016/S0734-9750(99)00026-9
7. Azimian F, Roshandel P. Increasing Salt Tolerance and Antioxidant Activity in Artemisia. *Ind J Plant Physiol* 2015; **20**: 264.
8. Ghahreman A. Flora of Iran. *Res Inst Fores Rang* 1984; **15**: 18-19.
9. Neuhauser M M, Weinstein R A, Rydman R, Danziger L H, Karam G, Quinn J P. Antibiotic resistance among gram-negative bacilli in US intensive care units: implications for fluoroquinolone use. *Jama* 2003; **289**(7): 885-888. doi: 10.1001/jama.289.7.885
10. Masomi J, Yadegari D, Mozoni Sh. More appropriate antimicrobial agents for antibiogram. *Iranian Journal of Infectious Disease and Tropical Medicine* 2005; **10**(29): 53-58.
11. Brooks G F, Butel J S, Morse S A. Jawets Melnick and Adelberg's Medical Microbiology. *Lange Basic Science* 2007; **12**: 262-267.
12. Ma Q, Zhai Y, Schneider J C, Ramseier T M, Saier M H. Protein secretion systems of Pseudomonas aeruginosa and P. fluorescens. *Biochim. Biophys. Acta* 2003; **1611**(1-2): 223-233. doi: 10.1016/s0005-2736(03)00059-2
13. Lanini S, D'Arezzo S, Puro V, Martini L, Imperi F, Piselli P. Molecular epidemiology of a Pseudomonas aeruginosa hospital outbreak driven by a contaminated disinfectant-soap dispenser. *PLoS One* 2011; **6**(2): 17-64. doi: 10.1371/journal.pone.0017064
14. Zaborina O, Kohler J E, Wang Y, Bethel C, Shevchenko O, Wu L, et al. Identification of multi-drug resistant Pseudo Mona aeruginosa clinical isolates that is highly disruptive to the intestinal epithelial barrier. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2006; **5**(14): 1-10. doi: 10.1186/1476-0711-5-14
15. Arora D, Jindal N, Kumar R, Romit. Emerging Antibiotic Resistance in Pseudomonas-A Challenge. *Int J Pharm Pharm Sci* 2011; **3**(2): 82-84.

16. Kang C I, Kim SH, Kim H B, Park S W, Choe Y J, Oh M D. Pseudomonas aeruginosa bacteremia: risk factors for mortality and influence of delayed. Receipt of effective antimicrobial therapy on clinical outcome. *Clin Infect Dis* 2003; **37**(6): 745-751. doi: 10.1086/377200
17. Amin G. Traditional medicinal plants of Iran. Tehran: Ministry of Health. *Treatment and Medical Education Press* 1991; **69**: 19-28.
18. Zargari A. *Medicinal plants of Iran*. 4th ed. Tehran, Tehran University Press, 1994; PP: 302-306.
19. Kalemba D, Kusewicz D, Świąder k. Antimicrobial properties of the essential oil of *Artemisia asiatica* Nakai. *Phytoterapy Research* 2002; **16**(3): 288-291. doi: 10.1002/ptr.856
20. Al-Saimary I E. Effects of some plant extracts and antibiotics on Pseudomonas aeruginosa isolated from various burn cases. *Saudi Med J* 2002; **23**(7): 802-805.
21. Wagih A. Sensitivity of Multi-drug resistant pseudomonas aeroginosa Isolated from surgical Wound-infections to Essential oils and plant Extracts. *World journal of medical Sciences* 2009; **4**(2): 104-111.
22. El-Hosseiny L, El-Shenawy L, Haroun M, Abdullah F. Comparative Evaluation of the Inhibitory Effect of Some Essential Oils with Antibiotics against Pseudomonas aeruginosa. *Int J Antibiotics* 2014; **2014**: Article ID 586252, 5 pages. doi: 10.1155/2014/ 586252.
23. Moussaoui F, Alaoui T. Asian Pac J Trop Biomed. Evaluation of antibacterial activity and synergistic effect between antibiotic and the essential oils of some medicinal plants. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2016; **6**(1): 32-37. doi: 10.1016/j.apjtb. 2015.09.024
24. Bajer T, Silha D, Ventura K, Bajerova P. composition and antimicrobial activity of the essential oil, distilled aromatic water and herbal infusion from epilobium parviflorum Schreb. *Industrial Crops and products* 2017; **100**: 95-105. doi: 10.1016/j.indcrop.2017.02.016
25. Al-Zubairi A, Al-Mamary M, Al-Ghasani E. The Antibacterial, Antifungal, and Antioxidant Activities of Essential Oil from Different Aromatic Plants. *Global Advanced Research Journal of Medicine and Medical Sciences* 2017; **6**(9): 224-233.