Original Article

Antibacterial Activity of Essential Oil and Extracts of Achillea tenuifolia against Pathogenic Bacteria

Fatemeh Talebi Varnosfaderani[1], Maryam Mohammadi Sichani[1], Leila Amjad[2]*

[1]*Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.*

[2]*Department of Biology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.*

[*]***Corresponding Author:*** **Maryam Mohammadi Sichani,** Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

Email: mohamadi_m@iaufala.ac.ir

Received: 8 May, 2016

Accepted: 21 Aug, 2016

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 10:16 IRST on Friday October 20th 2017

Abstract

Background and Objectives: Chemical drugs have many side-effects, and for this reason, the approach of using medicinal plants and traditional medicine, has increased. *Achillea tenuifolia* is a plant belonging to the family *Asteraceae*. In this research, the antibacterial properties of essential oil and methanol, ethanol, chloroform, and acetone extracts of *Achillea tenuifolia*, were investigated against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, and *Enterococcus faecalis* bacteria.

Methods: In this experimental study, *Achillea tenuifolia* flowers and leaves, were collected from Ghoroghchi mountain pass in Meymeh township in May 2014 and were dried in shadow. Flower and leaf essential oil was prepared using Clevenger apparatus. The methanol and ethanol extracts of the plant, were prepared using Soxhlet apparatus and the chloroform and acetone extracts, were prepared by maceration method. Antibacterial activity of the essential oil and the extracts was evaluated by well diffusion method. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC), were determined by microdilution method. Data were analyzed using one-way ANOVA, Kruskal-Wallis, and Mann-Whitney post-hoc tests. The significance level was considered to be $p<0.01$.

Results: In this study, the essential oil of *Achillea tenuifolia* flowers and leaves showed antibacterial effects against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, and *Enterococcus faecalis* at the concentrations of 20-50% ($p<0.1$). The MIC of flowers and leaves essential oil was 10-30%. The MBC was obtained 20-40%. The extracts of *Achillea tenuifolia* did not show antimicrobial activity.

Conclusion: The results of this study showed that essential oil of *Achillea tenuifolia* flowers and leaves has antibacterial activity, and the prepared extracts had no antibacterial properties.

Keywords: *Achillea tenuifolia*; Anti-bacterial agents; Plant extracts; Oils, Volatile.

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره یازدهم، شماره هفتم، مهر ۹۶
صفحه ۳۰ الی ۳۷

مقاله پژوهشی
(Original Article)

تأثیر فعالیت ضدباکتریایی اسانس و عصاره‌های مختلف گیاه آکیلاتنوئیفولیا (بومادران)، برعلیه باکتری‌های بیماری‌زا

فاطمه طالبی ورنوسفادرانی[۱]، مریم محمدی سیچانی[۱*]، لیلا امجد[۲]

[۱]گروه میکروب‌شناسی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

[۲]گروه زیست‌شناسی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: داروهای شیمیایی، عوارض جانبی زیادی دارند و به‌همین دلیل رویکرد استفاده از گیاهان دارویی و طب سنتی افزایش یافته است. *آکیلاتنوئیفولیا* گیاهی از تیره کاسنی است. در این پژوهش خاصیت ضدباکتریایی اسانس و عصاره متانولی، اتانولی، کلروفرمی و استونی *آکیلاتنوئیفولیا* بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *اشرشیاکلی* و *انتروکوکوس فکالیس* بررسی گردید.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، ابتدا گلها و برگهای *آکیلاتنوئیفولیا* در خردادماه سال ۱۳۹۳ از گردنه قرقچی شهرستان میمه، جمع‌آوری و در سایه خشک شدند. جهت تهیه اسانس گل و برگ، از دستگاه کلونجر استفاده گردید. عصاره متانولی و اتانولی گیاه، به روش سوکسله و عصاره‌های کلروفرمی و استونی به روش خیسانده تهیه شد. خاصیت ضدباکتریایی اسانس و عصاره‌های مذکور، به روش انتشار چاهک ارزیابی گردید. با استفاده از روش میکرودایلوشن؛ حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) تعیین شد. داده‌ها با استفاده از آزمون‌های واریانس یک‌طرفه، کراسکال والیس و آزمون تعقیبی من‌ویتنی تجزیه و تحلیل شدند. سطح معنی‌داری، $p<۰/۱$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: در این مطالعه، اسانس گل و برگ *آکیلاتنوئیفولیا*، خاصیت ضدباکتریایی علیه باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *اشرشیاکلی* و *انتروکوکوس فکالیس* در غلظت‌های ۵۰-۲۰٪ از خود نشان دادند ($p<۰/۱$). حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس گل و برگ بین ۳۰-۱۰٪ بود. حداقل غلظت کشندگی بین ۴۰-۲۰٪ به دست آمد. عصاره‌های *آکیلاتنوئیفولیا*، خاصیت ضدمیکروبی از خود نشان ندادند.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد اسانس گل و برگ *آکیلاتنوئیفولیا* دارای خاصیت ضدمیکروبی می‌باشد، و عصاره‌های تهیه‌شده فاقد خواص ضدباکتریایی هستند.

کلید واژه‌ها: *آکیلا تنوئیفولیا*؛ عوامل آنتی‌باکتریال؛ عصاره‌های گیاهی؛ اسانس.

*نویسنده مسئول مکاتبات:
مریم محمدی سیچانی، گروه میکروب‌شناسی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:
mohamadi_m@iaufala.ac.ir

تاریخ دریافت:۹۵/۲/۱۸

تاریخ پذیرش:۹۵/۵/۳۰

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Talebi Varnosfaderani F, Mohammadi Sichani M, Amjad L. antibacterial activity of essential oil and extracts of *Achillea tenuifolia* against pathogenic bacteria. Qom Univ Med Sci J 2017;11(7):30-37. [Full Text in Persian]

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 10:16 IRST on Friday October 20th 2017

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 10:16 IRST on Friday October 20th 2017

مقدمه

گیاهان را می‌توان به‌عنوان منبعی از مواد شیمیایی بالقوه مفید دانست که تنها موارد معدودی از آنها مورد بهره‌برداری قرار گرفته است. از سوی دیگر، مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها، روزبه‌روز در حال افزایش است که این مسئله باعث می‌گردد تا شناسایی عوامل ضدمیکروبی مؤثر و با عوارض جانبی کمتر به‌جای مواد ضدمیکروبی با اثر کمتر و عوارض ناخواسته، بیشتر مورد توجه قرار گیرد. گیاه آکیلا (بومادران)، یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی متعلق به تیره آستراسه زیرتیره آستروایده و از طایفه آنتمیده است (۳-۱). این گیاه در حدود ۸۵ گونه دارد که ۱۹ گونه آن در ایران می‌روید و از این تعداد، ۷ گونه انحصاری ایران هستند (۴). گیاه آکیلا از نظر نیازهای اکولوژیکی، به شرایط اقلیمی خاصی نیاز ندارد و تقریباً در هر اقلیمی رشد می‌کند. مناسب‌ترین دما برای رشد و گل‌دهی این گیاه روز بلند، ۲۶-۱۸ درجه سانتیگراد بوده و در خاکهای سبک و شنی، رشد بهتری دارد (۵). *آکیلاتنوئیفولیا*، گیاهی از تیره کاسنی با ارتفاع حدود ۹۰ سانتی‌متر، برگهای منقسم و کرکهای ظریف می‌باشد. برگها حالت سستی دارند و دور از یکدیگر هستند. گل‌آذین‌ها به رنگ زرد تند با اشکال تخم‌مرغی تا نیمه‌کروی است.

این گیاه در ارتفاعات صخره‌ای و کنار جویبارها می‌روید (۶). در ترکیب شیمیایی عصاره‌های سایر گونه‌های آکیلا، مواد مؤثره‌ای مانند آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، گلیکوزید و تانن‌ها شناسایی شده که اثرات ضدالتهابی، ضداسپاسم، ضدمیکروبی و تسکین‌دهنده درد آنها مشخص شده است. از *آکیلاتنوئیفولیا* در طب سنتی برای درمان مشکلات قلبی، خونریزی، مشکلات گوارشی، کبدی و ادراری، همچنین به‌صورت موضعی جهت درمان بیماری‌های پوستی استفاده می‌شود (۶).

با توجه به رویکرد دوباره به شناسایی و استفاده از ترکیبات فعال گیاهی و با توجه به این مسئله که تاکنون تحقیقی در مورد خاصیت ضدباکتریایی گیاه *آکیلاتنوئیفولیا* انجام نشده، در پژوهش حاضر خواص ضدباکتریایی اسانس و عصاره‌های متانولی، اتانولی، کلروفرمی و استونی این گیاه بر تعدادی از باکتری‌های بیماری‌زای عامل عفونت‌های گوناگون انسان شامل: *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیاکلی*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *انتروکوکوس فکالیس* مورد بررسی قرار گرفت و حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی آنها تعیین گردید. نمونه‌های باکتریایی مورد بررسی شامل سویه استاندارد و جدایه‌های بالینی از باکتری‌های مذکور بود.

شکل: گیاه *آکیلاتنوئیفولیا* (گردنه قرقچی شهرستان میمه، خردادماه سال ۱۳۹۳)

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 10:16 IRST on Friday October 20th 2017

روش بررسی

این مطالعه تجربی – آزمایشگاهی، در تابستان سال ۱۳۹۳ انجام شد. *آکیلاتنوئیفولیا* در خردادماه سال ۱۳۹۳ از منطقه گردنه قرقچی شهرستان میمه استان اصفهان جمع‌آوری شد، و توسط کارشناسان هرباریوم گیاه‌شناسی مرکز تحقیقات کشاورزی استان اصفهان مورد تأیید قرار گرفت (شماره هرباریوم ۱۴۹۴۴).

در ابتدا گل و برگها از هم تفکیک و جداگانه در سایه خشک شدند. سپس بعد از آسیاب‌شدن، نمونه‌ها تا زمان آزمایش در یخچال نگهداری شدند. جهت تهیه اسانس، ۵۰ گرم از پودر خشک گل (یا برگ) همراه با ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر در دستگاه کلونجر (پیرکس‌فن، ایران)، اسانس‌گیری شد (۸،۷). از اسانس به‌دست‌آمده در حلال حاوی DMSO (۱۰٪) و توئین ۸۰ (۰/۵٪)؛ رقت‌های ۱۰٪، ۲۰٪، ۳۰٪، ۴۰٪ و ۵۰٪ تهیه گردید. عصاره‌های متانولی، اتانولی، استونی و کلروفرمی از گیاه *آکیلاتنوئیفولیا* به‌وسیله دستگاه سوکسله (شات دوران، آلمان) به مدت ۸ ساعت در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد تهیه شد. پس از حذف حلال و خشک شدن، عصاره‌ها در شرایط کاملاً استریل در ظروف دربسته و در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند (۹).

سویه‌های استاندارد باکتریایی شامل: *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC:۶۵۳۸)، *انتروکوکوس فکالیس* (ATCC:۱۳۹۴)، *اشرشیاکلی* (ATCC:۲۵۹۲۲) و *سودوموناس آئروژینوزا* (ATCC:۹۰۲۷) از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران تهیه گردید. همچنین سویه‌های بالینی این باکتری‌ها از بیمارستان‌ها، جمع‌آوری و به کمک تست‌های بیوشیمیایی مربوطه مورد تأیید قرار گرفت.

سوسپانسیون باکتریایی از کشت ۲۴–۱۸ ساعته با کدورت معادل ۰/۵ مک‌فارلند ($1/5\times10^{8}$ باکتری درهر میلی‌لیتر)، تهیه و به نسبت ۰/۱ رقیق شد. ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری، روی محیط مولر هینتون آگار به‌طور یکنواخت کشت داده شد. سپس در فواصل معین، ۶ چاهک به قطر ۶ میلی‌متر ایجاد گردید. در هر چاهک، ۱۰۰ میکرولیتر از هر غلظت از اسانس اضافه شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، هاله عدم رشد در اطراف چاهک‌ها مورد بررسی قرار گرفت (۱۰). حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس به روش میکرودایلوشن انجام شد.

۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت اسانس به چاهک مربوط در پلیت ۹۶ خانه منتقل گردید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری با رقت cfu/ml $1/5\times10^{7}$، در هر چاهک اضافه شد. سری چاهک‌های شماره ۱۱ (حاوی ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت مولرهینتون براث) به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شدند. در سری چاهک‌های شماره ۱۲ نیز ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری و ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت مولر هینتون براث به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد (۱۲،۱۱). میزان جذب نوری چاهک‌ها در دستگاه ELISA rider در طول موج ۶۳۰ نانومتر بررسی گردید. سپس میکروپلیت‌ها، ۲۴ ساعت درون انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شدند.

پس از این مدت، میزان جذب نوری چاهک‌ها مجدداً به‌وسیله دستگاه ELISA rider خوانده شد. از مقایسه میزان جذب نوری هریک از چاهک‌ها (قبل و بعد از انکوباسیون)، همچنین بررسی چشمی کدورت ایجادشده در چاهک‌ها (پس از انکوباسیون)، کمترین غلظت اسانس که در چاهک آن کدورتی مشاهده نشد، به‌عنوان میزان MIC در نظر گرفته شد. به‌منظور تعیین MBC از چاهک‌های مربوط به MIC و چاهک‌های قبل از آن، که کدورت قابل‌مشاهده‌ای نداشتند، ۱۰ میکرولیتر بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد و پلیت‌ها پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، مورد بررسی قرار گرفتند. غلظتی از اسانس مورد آزمایش که بر روی محیط کشت جامد مربوط به آن، هیچ‌گونه رشدی مشاهده نشد، به‌عنوان حداقل غلظت کشنده در نظر گرفته شد. هر مرحله از آزمایش، ۳ بار تکرار گردید (۱۳).

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۷، آزمون‌های کراسکال والیس و تعقیبی من‌ویتنی (جهت مقایسه میانگین هاله‌های عدم رشد ناشی از تأثیر اسانس *آکیلاتنوئیفولیا*) تجزیه و تحلیل شدند. سطح معنی‌داری، $p<0/1$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج حاصل از فعالیت ضدباکتریایی اسانس گل و برگ *آکیلاتنوئیفولیا* بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیاکلی*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *انتروکوکوس فکالیس* در

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 10:16 IRST on Friday October 20th 2017

جدول شماره ۱ و۲ ارائه شده است. عصاره‌های تهیه‌شده از گل و برگ *آکیلاتنوئیفولیا*، هیچ‌گونه فعالیت ضدمیکروبی از خود نشان ندادند، اما اسانس گل و برگ گیاه *آکیلاتنوئیفولیا* بر باکتری‌های مذکور مؤثر بود.

نتایج حاصل از اسانس گل نشان داد بیشترین اثر اسانس گل بر *استافیلوکوکوس اورئوس* بوده و از مقایسه جدایه‌های استاندارد با جدایه‌های بالینی مشخص گردید قطر هاله عدم رشد در گونه استاندارد نسبت به گونه‌های بالینی بیشتر بوده است.

جدول شماره ۱: میانگین قطر هاله عدم رشد اسانس گل *آکیلاتنوئیفولیا* (برحسب میلی‌متر)

نمونه باکتری	درصد اسانس					کنترل		سطح معنی‌داری
	۵۰	۴۰	۳۰	۲۰	۱۰	مثبت	منفی	
***استافیلوکوکوس اورئوس* (ایزوله بالینی)**	۲۱/۶±۲/۵	۲۴/۸±۲/۰	۲۳/۶±۰/۴	۲۱/۳±۰/۳	۱۵/۸±۸/۴	۱۷/۸±۰/۴	–	۰/۰۰۶
***استافیلوکوکوس اورئوس* (ATTC:۶۵۳۸)**	۲۲/۷±۰/۴	۲۷/۷±۰/۴	۲۴/۰±۰/۰	۲۷/۷±۰/۴	۲۵/۰±۰/۰	۱۷/۳±۰/۳	–	۰/۰۰۷
***سودوموناس آئروژینوزا* (ایزوله بالینی)**	۱۵/۶±۰/۲	۱۵/۱±۱/۱	۱۳/۳±۱/۵	۱۱/۲±۲/۳	۶/۸±۰/۷	۱۹/۰±۰/۳	–	۰/۰۰۵
***سودوموناس آئروژینوزا* (ATTC:۹۰۲۷)**	۱۱/۷±۰/۴	۱۱/۳±۰/۳	۱۰/۰±۰/۰	۱۰/۰±۰/۰	۶/۷±۰/۳	۲۰/۷±۰/۴	–	۰/۰۰۷.
***اشرشیاکلی* (ایزوله بالینی)**	۱۱/۷±۰/۳	۱۰/۸±۰/۲	۹/۷±۰/۷	۸/۸±۰/۷	۶/۴±۰/۴	۱۹/۶±۱/۳	–	۰/۰۰۴
***اشرشیاکلی* (ATTC:۲۵۹۲۲)**	۱۳/۷±۰/۴	۱۵/۳±۰/۳	۹/۷±۰/۴	–	–	۲۱/۷±۰/۳	–	۰/۰۱۸
***انتروکوکوس فکالیس* (ایزوله بالینی)**	۱۲/۶±۱/۵	۱۱/۳±۰/۹	۱۱/۳±۰/۹	۹/۴±۱/۱	۷/۸±۰/۲	۱۷/۹±۰/۴	–	۰/۰۰۵
***انتروکوکوس فکالیس* (ATTC:۲۵۹۲۲)**	۱۸/۰±۰/۵	۱۸/۳±۰/۳	۱۶/۰±۰/۵	۱۴/۰±۰/۰	۱۲/۷±۰/۴	۱۹/۳±۰/۳	–	۰/۰۰۶

کنترل منفی: DMSO (۱۵٪) + توین ۸۰ (۰/۵٪) به نسبت ۱:۱

کنترل مثبت: ونکومایسین(۳۰ میکروگرم) برای باکتری‌های گرم مثبت و جنتامایسین (۱۰ میکروگرم) برای باکتری‌های گرم منفی.

به‌منظور مقایسه مقادیر قطر هاله عدم رشد در غلظت‌های مختلف (۵۰-۱۰٪) اسانس گل *آکیلاتنوئیفولیا*، همچنین قطر هاله چاهک کنترل مثبت و منفی بر باکتری‌های مورد آزمایش؛ از آزمون کراسکال والیس استفاده شد. براساس نتایج به‌دست‌آمده در هر ۴ باکتری، اختلاف معنی‌داری بین قطر هاله‌های عدم رشد مورد مقایسه مشاهده گردید ($p<0/1$). جهت مقایسه دوبه‌دو میان غلظت‌ها در هر باکتری، آزمون تعقیبی من‌ویتنی انجام شد و براساس نتایج به‌دست‌آمده از فعالیت ضدباکتریایی اسانس گل *آکیلاتنوئیفولیا بر باکتری‌های* آزمایش‌شده، قطر هاله عدم رشد در کنترل مثبت به‌طور معنی‌داری بیشتر از قطر هاله در غلظت ۱۰٪ اسانس و کنترل منفی بود.

در مقایسه نتایج جدایه‌های بالینی و استاندارد نیز مشخص گردید فعالیت ضدباکتریایی غلظت ۵۰-۱۰٪ اسانس گل *آکیلاتنوئیفولیا* بر روی سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* و *انتروکوکوس فکالیس* بیشتر از ایزوله‌های بالینی این دو باکتری می‌باشد، ولی فعالیت ضدباکتریایی غلظت‌های ۵۰-۲۰٪ اسانس گل *آکیلاتنوئیفولیا* بر روی سویه‌های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا*، بیشتر سویه استاندارد این باکتری بود و در مورد باکتری *اشرشیاکلی* این وضعیت فقط در مورد غلظت‌های ۴۰ و ۵۰٪ معنی‌دار بود ($p<0/1$).

جدول شماره ۲. میانگین قطر هاله عدم رشد اسانس برگ *آکیلاتنوئیفولیا* (برحسب میلی‌متر)

نمونه باکتری	درصد اسانس					کنترل		سطح معنی‌داری
	۵۰	۴۰	۳۰	۲۰	۱۰	مثبت	منفی	
***استافیلوکوکوس اورئوس* (ایزوله بالینی)**	۱۲/۴±۲/۷	۱۷/۴±۲/۹	۱۲/۸±۳/۹	۱۲/۲±۰/۸	–	۱۷/۸±۰/۴	–	۰/۰۰۹
***استافیلوکوکوس اورئوس* (ATTC:۶۵۳۸)**	۱۶/۷±۰/۴	۱۹/۰±۰/۰	۱۳/۳±۰/۳	۱۱/۳±۰/۳	–	۱۷/۳±۰/۳	–	۰/۰۱۲
***سودوموناس آئروژینوزا* (ایزوله بالینی)**	۱۲/۶±۲/۸	۱۳/۹±۳/۶	۱۴/۴±۳/۷	۹/۷±۱/۹	–	۱۹/۰±۰/۳	–	۰/۰۲۲
***سودوموناس آئروژینوزا* (ATTC:۹۰۲۷)**	۱۲/۰±۰/۰	۱۳/۳±۰/۳	۱۳/۳±۰/۳	۱۱/۰±۰/۰	–	۲۰/۷±۰/۴	–	۰/۰۱۲
***اشرشیاکلی* (ایزوله بالینی)**	۱۹/۰±۰/۶	۱۶/۴±۱/۶	۱۵/۰±۱/۷	۱۱/۷±۱/۷	–	۲۰/۸±۲/۳	–	۰/۰۰۴
***اشرشیاکلی* (ATTC:۲۵۹۲۲)**	۱۳/۶۷±۰/۴	۱۳/۳±۰/۳	۱۲/۰±۰/۰	۹/۷±۰/۴	–	۲۴/۰±۰/۳	–	۰/۰۱۱
***انتروکوکوس فکالیس* (ایزوله بالینی)**	۱۴/۰±۲/۹	۱۳/۲±۲/۸	۱۲/۳±۱/۷	۱۰/۶±۲/۴	۱۰/۳±۰/۳	۱۷/۹±۰/۴	-	۰/۰۱۵
***انتروکوکوس فکالیس* (ATTC:۲۵۹۲۲)**	۱۳/۰±۰/۰	۱۳/۰±۰/۰	۱۳/۰±۰/۰	۱۰/۷±۰/۴	۹/۰±۰/۰	۱۹/۳±۰/۳	–	۰/۰۰۷

کنترل منفی: DMSO (۱۵٪) +توین ۸۰ (۰/۵٪) به نسبت ۱:۱.

کنترل مثبت: ونکومایسین (۳۰ میکروگرم) برای باکتری‌های گرم مثبت و جنتامایسین (۱۰ میکروگرم) برای باکتری‌های گرم منفی.

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 10:16 IRST on Friday October 20th 2017

براساس نتایج به‌دست‌آمده از آزمون کراسکال والیس، در هر ۴ باکتری اختلاف معنی‌داری بین قطر هاله‌های عدم رشد مورد مقایسه مشاهده گردید ($p<۰/۱$). همچنین براساس نتایج به‌دست‌آمده از آزمون تعقیبی من‌ویتنی، در این باکتری‌ها قطر هاله عدم رشد در کنترل منفی و غلظت ۱۰٪ اسانس، به‌طور معنی‌داری کمتر از سایر غلظت‌های اسانس برگ و قطر هاله در کنترل مثبت بود و بین قطر هاله در کنترل منفی و رقت ۱۰٪ اسانس برگ، اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. در مقایسه نتایج جدایه‌های بالینی و استاندارد نیز مشخص گردید فعالیت ضدباکتریایی غلظت ۴۰٪ و ۵۰٪ اسانس برگ *آکیلاتنوئیفولیا* بر روی سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیاکلی*، بیشتر از ایزوله‌های بالینی این دو باکتری بوده است، ولی در هیچ‌یک از غلظت‌های اسانس برگ، اختلاف معنی‌داری بین ایزوله‌های بالینی و سویه استاندارد *سودوموناس آئروژینوزا* و *انتروکوکوس فکالیس* مشاهده نشد ($p<۰/۱$).

نتایج MIC حاصل از این تحقیق نشان داد کمترین غلظت مهارکننده در اسانس گل مربوط به باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* با غلظت ۱۰٪ می‌باشد. در مورد اسانس برگ نیز کمترین غلظت مهارکننده مربوط به *استافیلوکوکوس اورئوس* با غلظت ۲۰٪ بود. کمترین غلظت مهارکننده برای سایر باکتری‌ها در اسانس گل و برگ، ۳۰٪ به دست آمد (جدول شماره ۳).

جدول شماره ۳: مقادیر MIC و MBC اسانس گل و برگ *آکیلاتنوئیفولیا* (درصد)

باکتری مورد آزمایش	گل		برگ	
	MIC	MBC	MIC	MBC
استافیلوکوکوس اورئوس	۱۰	۲۰	۲۰	۴۰
سودوموناس آئروژینوزا	۳۰	۳۰	۴۰	۴۰
اشرشیاکلی	۳۰	۳۰	۴۰	۴۰
انتروکوکوس فکالیس	۳۰	۳۰	۴۰	۴۰

بحث

استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها سبب ایجاد مقاومت‌های رو به گسترش باکتری‌های بیماری‌زا شده و افزایش دوز مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها، عوارض جانبی نامطلوبی را به همراه دارد. عوارض جانبی کمتر متابولیت‌های فعال گیاهی، ضرورت بررسی فلور گیاهی بومی هر منطقه جغرافیایی را توجیه می‌کند. این امر باعث شده تا توجه جوامع پزشکی و محققین به طب سنتی و گیاه درمانی معطوف گردد (۱۴). اسانس، حاوی مهم‌ترین مواد مؤثره گیاهی بوده که ممکن است حاوی متابولیت‌هایی با خاصیت ضدباکتریایی باشد (۱۵).

عروجعلیان و کسری کرمانشاهی در مطالعه خود با بررسی پیکر رویشی گیاه دارویی *آکیلاریفورا* (بومادران شیرازی) در مرحله گل‌دهی نشان دادند کمترین مقاومت نسبت به اسانس گیاه را *استافیلوکوکوس اورئوس* و بیشترین مقاومت را *سالمونلا انتریتیدیس* داشته است (۱۶). در مطالعه حاضر نیز بیشترین حساسیت را باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* از خود نشان داد.

در مطالعه Hammad و همکاران بر روی عصاره اتانولی و آبی گیاه *آکیلافالکاتا*، تمام باکتری‌های گرم مثبت نسبت به عصاره هیدروالکلی این گیاه حساس بودند (۶)؛ درحالی‌که در مطالعه Karaalp و همکاران در ترکیه نسبت به سویه‌های مورد آزمایش، خاصیت آنتی‌بیوتیکی متوسطی داشتند (۱۷). امین‌خانی اثر ضدباکتریایی اسانس سرشاخه هوایی و گل‌دار *آکیلا ویلهلمسی* را مورد بررسی قرار داد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد باکتری‌های *شیگلا فلکسنری*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و *اشرشیاکلی* با قطر هاله عدم رشد ۲۸-۱۷ میلی‌متر نسبت به اسانس حساس بوده؛ درحالی‌که *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس*، *سالمونلا تیفی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* با قطر هاله عدم رشد ۱۳-۱۱ میلی‌متر، حساسیت متوسطی نسبت به اسانس از خود نشان دادند (۱۸). Konakchiev و همکاران بیان داشتند اسانس *آکیلادیستنس* بر *استافیلوکوکوس اورئوس* و *کاندیدا آلبیکنس*، اثر مهاری متوسط داشته و بر *سالمونلا تیفی‌موریوم*، *پروتئوس ولگاریس* و *اشرشیاکلی*، اثر مهاری ضعیفی از خود نشان داده است (۱۹).

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 10:16 IRST on Friday October 20th 2017

در تحقیق حاضر، *استافیلوکوکوس اورئوس*، حساس‌ترین باکتری مورد آزمایش و *اشرشیاکلی*، حساسیت متوسطی از خود نسبت به اسانس گیاه نشان داد. Candan و همکاران در مطالعه خود با بررسی‌هایی روی اسانس و عصاره *آکیلامیلئوفولیوم* (زیرگونه *آکیلافان*) دریافتند اسانس، اثر بهتری از خود نشان می‌دهد و کمترین میزان MIC (۴/۵ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر) در برابر *استرپتوکوکوس پنومونیا*، *کلستریدیوم پرفریجنس* و *کاندیدا آلبیکنس* بوده است، که در کل فعالیت ضدباکتریایی آن ضعیف گزارش شد (۲۰). در نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیق نیز می‌توان بیان داشت اثر ضدباکتریایی ضعیف بوده و این یافته با نتایج مورد انتظار مطابقت ندارد. در مطالعه احمدی و همکاران، با بررسی حداقل غلظت مهارکنندگی رشد بر سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیاکلی*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *کاندیدا آلبیکنس* مشخص گردید *استافیلوکوکوس اورئوس*، حساس‌ترین باکتری بوده و MIC>۰/۵۷۳ و MBC>۱/۱۴۶ این باکتری نسبت به عصاره ساقه و برگ MBC> ۱/۶۶۳، MIC> ۰/۸۳۱ میلی‌گرم بردسی‌لیتر نسبت به عصاره گل به دست آمد. سویه *اشرشیاکلی*، حساسیت متوسطی را با MBC>۲/۲۹۳ و MIC> ۱/۱۴۶ نسبت به عصاره ساقه و برگ MBC> ۶/۶۵ و MIC> ۳/۳۲۵ میلی‌گرم بردسی‌لیتر نسبت به عصاره گل نشان داد. *سودوموناس آئروژینوزا* و *کاندیدا آلبیکنس* نسبت به عصاره‌ها، حساسیت قابل‌توجهی نشان ندادند. همچنین اسانس این گیاه در مقایسه با عصاره، اثرات ضدمیکروبی قابل‌توجهی نداشت (۲۱). Senatore و همکاران نیز اثر ضدباکتریایی اسانس اندام هوایی *آکیلافالکاتا* تهیه‌شده از مصر را بر باکتری‌های بیماری‌زا شامل: *اشرشیاکلی*، *کلبسیلا پنومونیه* و *استافیلوکوکوس اورئوس* بررسی کردند، نتایج حاصل نشان داد حداقل غلظت‌کشندگی برای *اشرشیاکلی*، ۳/۶- ۳/۲ میکروگرم برمیکرولیتر؛ برای *استافیلوکوکوس اورئوس*، ۱/۸- ۱/۴ میکروگرم برمیکرولیتر و برای *کلبسیلا پنومونیه* ۴/۵-۱/۸ میکروگرم برمیکرولیتر می‌باشد (۲۲). درصورتی‌که در مطالعه انجام‌شده، حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس گل *آکیلاتنوئیفولیا* برای باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*، غلظت ۱۰٪ و این عدد برای اسانس برگ به ۲۰٪ می‌رسید. حداقل غلظت کشندگی باکتری مذکور نسبت به اسانس گل این گیاه، ۲۰٪ بود که نسبت به سایر باکتری‌ها کمترین میزان حساسیت را از خود نشان داد، اما براساس نتایج MBC نسبت به اسانس برگ گیاه؛ حساسیت این باکتری با سایر باکتری‌ها یکسان بود. در نتایج به‌دست‌آمده مشاهده گردید قطر هاله عدم رشد اسانس گل و برگ *آکیلاتنوئیفولیا* در مورد اکثر باکتری‌های مورد آزمایش در غلظت ۵۰٪ کمتر یا در همان حدود غلظت ۴۰٪ بوده است. دلیل احتمالی این مسئله ممکن است افزایش غلظت ترکیبات باشد. اکثر ترکیبات موجود در اسانس‌ها غیرقطبی بوده و تمایلی برای حلالیت در آب ندارند و به‌همین دلیل از DMSO برای تهیه غلظت‌های مختلف از اسانس‌ها استفاده می‌کنند. لیکن افزایش غلظت این ترکیبات در غلظت ۵۰٪ می‌تواند میزان حلالیت آنها را کاهش داده و بر روی نتایج اثر بگذارد. بررسی علت قطعی این مشاهده نیاز به آزمایشهای تکمیلی دارد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد اسانس گل و برگ *آکیلاتنوئیفولیا*، خاصیت ضدباکتریایی علیه باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *اشرشیاکلی* و *انتروکوکوس فکالیس* دارد. با توجه به منابع قدیمی پیشنهاد می‌گردد در زمینه خواص دیگر این گیاه، تحقیقاتی صورت گیرد.

References:

1. Ahmed AA, Shalaby AM, Melek FR, Mabry TJ. Swertisin 2-Arabinoside, a New C-Glycosylflavone from Achillea fragrantissima. J Nat Prod 1988;51(5):971-2.

2. Başer KH, Demirci B, Demirci F, Koçak S, Akıncı Ç, Malyer H, et al. Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of Achillea multifida. Planta Med 2002;68(10):941-3.

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 10:16 IRST on Friday October 20th 2017

3. Zaynali A, Rahimmalek M. Effect of of seasonal variation on essential oil yield and morphological traits on Achillea filipendulina Lam. J Herb Drug 2013;3(4):199-208. [Full Text in Persian]

4. Mohammadi-Sichani M, Amjad L, Mohammadi-Kamalabadi M. Antibacterial activity of methanol extract and essential oil of Achillea wilhelmsii against pathogenic bacteria. Zahedan J Res Med Sci 2011;13(3):14-9.

5. Ghani A, Azizi M, Tehrani far A. The study of ornamental potential of five wild Achillea species cultivated in Mashhad climate conditions. J Hortic Sci 2009;23(2):25-31. [Full Text in Persian]

6. Hammad HM, Matar SA, Litescu SC, Abuhamdah S, Al-Jaber HI, Afifi FU. Biological activities of the hydro-alcoholic and aqueous extracts of Achillea fragrantissima (Forssk.) grown in Jordan. Sci Res 2014;6(8);23-30.

7. Duraipandiyan V, Ayyanar M, Ignacimuthu S. Antimicrobial activity of some ethnomedicinal plants used by Paliyar tribe from Tamil Nadu, India. BMC Complement Altern Med 2006;6:35.

8. Tolulope O. Cytotoxicity and antibacterial activity of methanolic extract of Hibiscus sabdariffa. J Med Plants Res 2007;1(1):9-13.

9. Stefanovic O, Comic L, Stanojevic D, Solujic S. Antibacterial activity of Aegopodium podagraria L. extracts and interaction between extracts and antibiotics. Turk J Biol 2009;33(2):145-150.

10. Stojanović G, Radulović N, Hashimoto T, Palić R. In vitro antimicrobial activity of extracts of four Achillea species: The composition of Achillea clavennae L. (Asteraceae) extract. J Ethnopharmacol 2005;101(1-3):185-90.

11. Balouiri M, Sadiki M, Ibnsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. J Pharm Anal 2016;6(2):71-9.

12. Valgas C, Souza SMd, Smânia EFA, Smânia Jr. A. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. Braz J Microbiol 2007;38(2):369-80.

13. Wiegand I, Hilpert K, Hancock REW. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. Nat Protoc 2008;3(2):163-75.

14. Anuar NS, Zahari SS, Taib IA, Rahman MT. Effect of green and ripe Carica papaya epicarp extracts on wound healing and during pregnancy. Food Chem Toxicol 2008;46(7):2384-9.

15. Hemaiswarya S, Kruthiventi AK, Doble M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. Phytomedicine 2008;15(8):639-52.

16. Oroojalian F, Kasra Kermanshahi R. The study on the phytochemical and antibacterial activity of achillea eriophora by microdilution assay. J Hortic Sci 2010;24(1):109-15. [Full Text in Persian]

17. Karaalp C, Yurtman AN, Karabay Yavasoglu NU. Evaluation of antimicrobial properties of Achillea L. flower head extracts. Pharm Biol 2009;47(1):86-91.

18. Aminkhani A. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil Achillea wilhelmsii C. Koch collected from Khoi. J Plant Res 2012;7(3):38-47. [Full Text in Persian]

19. Konakchiev A, Todorova M, Mikhova B, Vitkova A, Najdenski H. Composition and antimicrobial activity of Achillea distans essential oil. Nat Prod Commun 2011;6(6):905-6.

20. Candan F, Unlu M, Tepe B, Daferera D, Polissiou M, Sökmen A, et al. Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of Achillea millefolium subsp. millefolium Afan. (Asteraceae). J Ethnopharmacol 2003;87(2-3):215-20.

21. Ahmadi Z, Sattari M, Tabarraee B, Bigdeli M. Identification of the constituents of Achillea santolina essential oil and evaluation of the anti-microbial effects of its extract and essential oil. Arak Univ Med Sci J 2011;14(3):1-10. [Full Text in Persian]

22. Senatore F, Napolitano F, Apostolides Arnold N, Bruno M, Herz W. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of Achillea falcata L. (Asteraceae). Flavour Frag J 2005;20(3):291-4.