مجله میکرب شناسی پزشکی ایران
سال ۴ شماره های ۱و۲، بهار و تابستان ۱۳۸۹، صفحات ۳۴-۲۶

ارزیابی اثرات متقابل داروئی و فعالیت ضد باکتریایی اسانس زیره سیاه (*Bunium persicum*) بر ضد تعدادی از باکتری‌های گرم مثبت وگرم منفی

ندا سلیمانی[۱]، مرتضی ستاری*[۱]، سعید سپهری سرشت[۲]، سعید دانشمندی[۳]، صفورا درخشان[۱]

۱) گروه باکتری‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
۲) گروه پاتولوژی ، مرکز قلب تهران
۳) گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
نویسنده رابط: مرتضی ستاری، گروه باکتری شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
تلفن: ۸۲۸۸۳۵۶۳-۰۲۱ *sattarim@modares.ac.ir*

تاریخ دریافت مقاله: ۸۸/۱۲/۲ تاریخ پذیرش مقاله:۸۹/٤/۲٤

چکیده:

زمینه و اهداف: مصرف روزافزون آنتی‌بیوتیک‌ها علیه عفونت ناشی از باکتری‌ها سبب افزایش مقاومت دارویی شده است. همین امر سبب گردید تا مطالعات وسیعی بر روی داروهای ضد میکربی جدید با اثر بخشی بیشتر به‌خصوص گیاهان داروئی صورت گیرد. هدف این تحقیق، ارزیابی اثرات متقابل داروئی و فعالیت ضد باکتریایی اسانس زیره سیاه (*Bunium persicum*) بر ضد تعدادی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی بود.

روش بررسی: اسانس زیره سیاه از دانه آن تخلیص شد و با روش کروماتوگرافی گازی/ طیف سنجی جرمی (GC/MS) تجزیه (آنالیز) شد. برای بررسی عملکرد ضد باکتریایی اسانس از روش انتشار از دیسک و تعیین حداقل غلظت‌های مهارکننده (MIC) و کشنده (MBC) بر روی ۸ سویه استاندارد باکتریایی استفاده شد. در بررسی اثرات هم‌افزایی (سینرژیستی) و کاهندگی (آنتاگونیستی) ، سویه‌های استاندارد باکتریایی بر روی محیط حاوی اسانس کشت داده شد و سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیک بر روی آن قرار گرفت.

یافته‌ها: در اسانس زیره سیاه ۱۳ ترکیب شناسایی شد. بر اساس آزمایش انتشار از دیسک در آگار بیشترین میزان هاله عدم رشد مربوط به *باسیلوس سرئوس* با قطر ٤٥ میلی‌متر مشاهده شد. نتایج MIC و MBC نشان داد که اسانس بیشترین میزان مهار کنندگی و کشندگی را بر روی *اشریشیا کلی* دارد. نتایج مربوط به اثرات هم‌افزایی و کاهندگی در مورد *اشریشیا کلی* نشان داد که اسانس موجب افزایش اثر جنتامیسین می شود، اما در مورد سایر باکتری‌ها نتایج متغیر بود.

نتیجه گیری: نتایج این بررسی پیشنهاد می‌کند که اسانس زیره سیاه می‌تواند به تنهایی یا در ترکیب با سایر عوامل ضد میکربی برای درمان عفونت‌های باکتریایی موثر باشد. همچنین این اسانس می‌تواند عملکرد برخی از آنتی-بیوتیک‌ها را تقویت نماید که امکان استفاده از آن را به‌ویژه در موارد مقاومت داروئی مطرح می‌نماید.

کلید واژه‌ها: زیره سیاه، فعالیت ضد باکتریایی، اثرات هم‌افزایی و کاهندگی، اسانس، آنتی‌بیوتیک

مقدمه:

آنتی‌بیوتیک‌های سنتتیک در دهه‌های گذشته توانسته‌اند نقش مهمی را در درمان بیماری‌های عفونی ایفا نمایند (۳-۱). اما، پیدایش مقاومت دارویی در برابر اغلب آنتی-بیوتیک‌ها و بروز عوارض جانبی جدی به‌دنبال مصرف برخی از آنها، انگیزه زیادی را برای جستجو و ارائه ترکیبات ضد میکربی جدید به‌ویژه با منشاء گیاهی فراهم آورده است. در بسیاری از نقاط دنیا ترکیبات گیاهی به شکل سنتی و به منظور درمان برخی بیماری‌ها به‌خصوص بیماری‌های عفونی، اسهال، تب، سرماخوردگی، کنترل زاد و ولد و بهداشت دهان و دندان استفاده می‌شوند. خواص ضد میکربی گیاهان از دیر باز مورد توجه بوده‌است.

گذشتگان بدون اطلاع از وجود میکرب‌ها و تنها از طریق تجربه‌های بالینی از این گیاهان در درمان بیماری‌های عفونی استفاده می‌کردند. با این حال امروزه مطالعه بر روی گیاهان مورد استفاده در طب سنتی با هدف رسیدن به ترکیبات جدید در اولویت قرار گرفته است(۹-٤).

گیاه زیره سیاه یا زیره کوهی*(Bunium persicum)* با نام علمی *persicum* Boiss از خانواده .Apiaceae (Umbelliferae) است. زیره سیاه گیاه دارویی است ، با ساقه‌های صاف و میان تهی که تا ارتفاع ٦۰ سانتی‌متر می‌رسد. برگ‌ها با تقسیم شانه‌ای و دارای زاویه بدون دمبرگ می‌باشند. گل‌ها به رنگ سفید و به صورت مجتمع در گل آذین چتری در خرداد ماه ظاهر می‌شوند. گل‌ها خودبارور هستند و با حشرات گرده افشانی می‌شوند (۱۰). این گیاه بومی خاورمیانه، به ویژه جنوب شرق ایران است و به‌صورت وحشی در مناطق مختلف استان کرمان می-روید. از زیره سیاه در طب سنتی در موارد گرفتگی عضلات، به‌عنوان باد شکن، اشتها آور، خلط آور، افزایش دهنده ترشح شیر، طعم دهنده در صنایع غذایی و تقویت کننده معده استفاده می شود. همچنین این گیاه دارای اثرات ضد سرطانی، کاهش دهنده قند خون و قابض می‌باشد (۱۲). از ترکیبات مهم و عمده گیاه زیره سیاه می‌توان به لیمونن(Limonene)، سابینن (Sabinene)، فلاونوئیدها (Flavonoids)، پلی‌ساکاریدها، کومارین (Cumarin)، کـــومین آلدئید (Cuminaldehyde)، دی-هیدروکاروئول (Dihydrocarveol) ، پینن (Pinene) و ترپینن (Terpinene) اشاره نمود (۱۳).

مصرف روزافزون آنتی‌بیوتیک‌ها علیه عفونت ناشی از باکتری‌ها سبب افزایش مقاومت دارویی شده است. همین امر سبب گردیده تا مطالعات وسیعی بر روی داروهای ضدمیکربی جدید با اثر بخشی بیشتر صورت گیرد. با توجه به کاربردهای ذکر شده و امکان استفاده مفید آن به‌صورت بالینی و برای درک مناسب از اثرات این گیاه داروئی در این مطالعه ارزیابی اثرات متقابل داروئی(اثر سینرژیسمی/هم‌افزایی و آنتاگونیسمی/ کاهندگی) و فعالیت ضد باکتریایی اسانس زیره سیاه علیه تعدادی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی انجام شد.

مواد و روش‌ها:

۱- نمونه گیاهی و استخراج اسانس

دانه‌های گیاه زیره سیاه از گیاهان کشت شده در مرکز تحقیقات گیاهان دارویی (وابسته به جهاد کشاورزی استان تهران) در ۲۵ کیلومتری شمال تهران تهیه شد. دانه‌های گیاهی جمع‌آوری شده توسط مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی استان تهران تایید شدند. سپس این دانه‌ها شسته و با استفاده از آسیاب پودر گردید. ۵۰ گرم از پودر با یک لیتر آب مخلوط شد و به مدت ۳ ساعت به روش تقطیر با آب (Hydrodistillation)در دستگاه کلونجر ((Clevenger) (شرکت شیمی فن، تهران، ایران) اسانس گیری شد (١٤). سپس اسانس جداسازی و تا زمان استفاده برای آزمایش ضدباکتریایی در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

۲- تجزیه (آنالیز) اسانس توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی/ طیف سنجی جرمی (GC/MS)

برای تجزیه (آنالیز) کروماتوگرافی گازی/ طیف سنجی جرمی اسانس استخراج شده از دستگاه GC/MS (PerkinElmer, California, USA) با مشخصات زیر استفاده شد:

گازکروماتوگراف واریان ۳٤۰۰ کوپل شده با دستگاه طیف سنج جرمی (ساترن II) تحت شرایط ذیل: ستون DB-1 به طول ٦۰ متر، قطر ۲۵۰ میکرومتر و ضخامت لایه فاز ساکن ۰/۲۵میکرومتر، گاز حامل هلیوم، فشار گاز سر ستون ۳۵ میلی لیتر در دقیقه، انرژی یونیزاسیون معادل ۷۰ الکترون ولت و دامنه جرمی ٤۰-۳۵۰amu.

برنامه‌ریزی حرارتی گاز کروماتوگراف به این ترتیب انجام

شد: درجه حرارت ۲۳۰-۵۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ٤ درجه سانتی‌گراد در دقیقه و درجه حرارت محفظه تزریق ۲٤۰ درجه سانتی‌گراد. شناسایی اجزای اسانس با مقایسه طیف جرمی و شاخص‌های نگهداری (بازداری) آنها با نمونه‌های تایید شده صورت گرفت.

۳- سویه‌های آزمایش

جهت اررزیابی اثر ضد باکتریایی اسانس زیره سیاه از سویه‌های استاندارد استفاده شد. این سویه‌ها که از آزمایشگاه باکتری‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس تهیه شد، عبارتند از: *اشریشیا کلی* **ATCC ۲۵۹۲۲**، *پسودوموناس آئروژینوزا* **ATCC ۲۷۸۵۳**، *استافیلوکوکوس اورئوس* **ATCC۲۵۹۲۳**، *شیگلا فلکسنری* M90T، *باسیلوس سرئوس* **ATCC ۹٦۳٤**، *باسیلوس سوبتیلیس* PY-79، *سالمونلا تیفی موریوم* **ATCC ۱٤۰۲۸** و *انتروکوکوس فکالیس* **ATCC ۳۳۱۹٦** . سویه‌های مورد مطالعه با استفاده از محیط‌های افتراقی، انتخابی، اختصاصی و با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی تعیین هویت شدند.

٤- تعیین فعالیت ضد باکتریایی اسانس

الف: آزمایش حساسیت به اسانس به روش انتشار از دیسک فعالیت ضد باکتریایی اسانس زیره با دو روش انتشار از دیسک (۱٤) با اندازه‌گیری هاله مهاری و روش رقت سازی در محیط مایع (broth dilution) با اندازه‌گیری حداقل غلظت مهار کننده (MIC)(۱۵) تعیین شد.

در روش انتشار از دیسک، دیسک‌های بلانک استریل (MAST Co. UK) روی سطح ظروف پتری تلقیح شده با باکتری‌ها قرار داده شد و ۵۰ میکرولیتر از اسانس روی دیسک‌ها تزریق شد. سپس ظروف پتری به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شدند. قطر هاله‌های مهار رشد در اطراف دیسک‌ها بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد. یک دیسک تزریق شده با ۵۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی و یک دیسک تزریق شده با ۵۰ میکرولیتر بافر تایرود(۲۸) به عنوان دیسک شاهد منفی در نظر گرفته شد. از دیسک‌های جنتامیسین و اگزاسیلین (MAST Co. UK) به‌عنوان شاهد مثبت دارویی استفاده شد. همه آزمایش‌ها با سه بار تکرار تایید شدند.

ب: تعیین حداقل غلظت مهارکننده Minimum Inhibitory Concentration برای تعیین حداقل غلظت مهار کننده اسانس بر روی سویه‌های آزمایش از روش microbroth dilution استفاده شد (۱۵). ۱۰۰ میکرولیتر از محیط مولر هینتون براث (Merck) به هر چاهک میکروپلیت الیزا اضافه شد. اسانس در بافر Tyrode (NaCl ۰/۸ گرم، CaCl2 ۰/۰۲ گرم، KCl ۰/۰۲ گرم، NaHCO3 ۰/۱ گرم، D-Glucose ۰/۱ گرم، MgCL2 ۰/۱ گرم، NaH2PO4 ۰/۰۰۵ گرم در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر در pH = ۷/٤) به نسبت ۱:۲ رقیق شد. در چاهک اول، ۱۰۰ میکرولیتر از رقت ۱:۲ اسانس اضافه شد و پس از مخلوط کردن، ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک اول برداشته و به چاهک دوم اضافه شد. به‌همین ترتیب سریال رقت در چاهک‌ها ایجاد گردید. سپس ۱۰ میکرولیتر از هر سوسپانسیون باکتریایی (۱۰۸ باکتری در میلی‌لیتر) به صورت جداگانه به چاهک‌ها اضافه شد. به چاهک شاهد منفی بافر Tyrode بدون اسانس اضافه گردید. سپس میکروپلیت به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شد. کم‌ترین غلظتی که جهت توقف رشد باکتری‌ها در پایان ۱۸ ساعت گرمخانه-گذاری مورد نیاز است به عنوان MIC (حداقل غلظت مهار کننده) تعریف شد.

ج: تعیین حداقل غلظت کشنده Minimum Bactericidal Concentration

برای تعیین حداقل غلظت کشنده ۱۰ میکرولیتر از محتوای چاهک‌ها در پایان ۱۸ ساعت گرمخانه‌گذاری، روی محیط مولر هینتون آگار (Merck) کشت داده شد. ظروف پتری به‌منظور بررسی رشد باکتری‌ها به مدت ۱۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. کم‌ترین غلظت اسانس که در آن ۹۹/۹ درصد باکتری‌ها رشد نداشتند به عنوان MBC در نظر گرفته شد (۱۵). تمام آزمایش‌ها سه بار تکرار شد.

۵- بررسی اثرات هم‌افزایی و کاهندگی اسانس زیره سیاه بر آنتی‌بیوتیک‌ها

برای تعیین اثر ترکیبی میان اسانس زیره سیاه و دیسک‌های آنتی‌بیوتیک از روش انتشار از دیسک استفاده شد. بررسی اثرات هم‌افزایی و کاهندگی اسانس بر آنتی‌بیوتیک معمولا با استفاده از غلظت تحت مهاری (sub-MIC) صورت می‌گیرد که برابر با رقت ۱:۲ تا ۱:٤ MIC است. در این مطالعه غلظت تحت مهاری اسانس زیره با رقت ۱:۲ MIC به محیط مولر هینتون آگار اضافه شد و به‌عنوان ظروف پتری آزمایش (تست) استفاده شد. سوسپانسیون باکتریایی با غلظت $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ CFU (معادل نیم مک فارلند) روی محیط کشت آگار حاوی غلظت‌های تحت مهاری اسانس

توسط سواب به‌صورت چمنی کشت داده شد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیک روی سطح آگار قرار داده شدند. سپس قطر هاله‌های مهار رشد دیسک‌ها، پس از ۱۸ ساعت گرمخانه-گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ثبت شد. برای بررسی اثر متقابل اسانس بر آنتیبیوتیک از دیسک‌های آنتی-بیوتیک ونکومایسین (۳۰µg)، سفالوتین (۳۰µg)، پیپراسیلین- تازوباکتام (۱۱۰µg)، آمپی‌سیلین (۱۰µg)، جنتامیسین (۱۰µg)، اریترومایسین (۱۵µg)و اگزاسیلین (۱µg) استفاده گردید (Mast Co., Merseyside, UK).

یافته‌ها:

۱- ترکیب شیمیایی اسانس توسط GC/MS

اجزای شناسایی شده توسط تجزیه‌های GC/MS در جدول **۱** فهرست شده‌اند. در اسانس زیره سیاه در مجموع ۱۳ ترکیب شناسایی شد. از میان آنها کومین آلدهید (۲٤/۲٪)، پارا منتا ۱و۳- دی ان ۷ آل (۱۱/٤٪)، پارا منتا ۱و٤-دی ان ۷ آل (۱۸/۲٪) و گاما ترپینن (۲۰/٦٪) اجزای عمده آن را تشکیل می دادند (جدول ۱).

جدول ۱: ترکیب شیمیایی اسانس تعیین شده توسط GC/MS

شماره	نام ترکیب شیمیایی	اندیس کواتس*	درصد
۱	α-Thujene	۹۳۰	۰/۵
۲	α-Pinene	۹۳۹	۰/۸
۳	Sabinene	۹۷۹	۱/۲
٤	β-Pinene	۹۸۲	۱٤/۱
۵	Myrcene	۹۹۳	۱
٦	ρ-Cymene	۱۰۲۳	۵/۷
۷	β-Phellandrene	۱۰۳۱	**۰/۳**
۸	γ-Terpinene	۱۰۵۸	۲۰/٦
۹	ρ-Menth-3-en-7-al	۱۱۵۲	۲/٦
۱۰	Cumin aldehyde	۱۱۷۹	۲٤/۲
۱۱	ρ-Mentha-1,3-dien-7-al	۱۲۰٦	۱۱/٤
۱۲	ρ-Mentha-1,4-dien -7-al	۱۲۰۹	۱۸/۲
۱۳	Cuminyl alcohol	۱۲٦۷	۲/۳

*شاخص بازداری

۲- فعالیت ضد باکتریایی اسانس (نتایج آزمون‌های انتشار از دیسک، MIC و MBC)

نتایج آزمایش‌های ضد باکتریایی در جدول ۲ آورده شده است. بر اساس آزمایش انتشار از دیسک بزرگ‌ترین هاله عدم رشد مربوط به *باسیلوس سرئوس* با قطر ٤۵ میلی‌متر و بعد از آن بیشترین قطر هاله عدم رشد به‌ترتیب مربوط به *باسیلوس سوبتیلیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *شیگلا فلکسنری* و *اشریشیا کلی* بود. در *انتروکوکوس فکالیس*، *پسودوموناس آئروژینوزا* و *سالمونلا تیفی موریوم* کمترین قطر هاله عدم رشد مشاهده گردید. بررسی نتایج MIC و MBC نشان داد که اسانس زیره سیاه بیشترین اثر مهار کننده و کشنده را بر روی *اشریشیا کلی* دارد (جدول ۳).

جدول ۲: نتایج آزمون انتشار از دیسک، در سویه‌های استاندارد برای اسانس زیره سیاه

باکتری	قطر هاله مهاری رشد انتشار دیسک در آگار†							
	اسانس زیره سیاه*	جنتامیسین	اگزا سیلین	آمپی سیلین	اریترومایسین	وانکومایسین	سفالوتین	پیراسیلین تازوباکتام
شیگلا فلکسنری	۱۸ ± ۰/ ۵	۱٤ ± ۰/٤	۱۱ ± ۰/٦	۲۵ ± ۰/۸	۲۳ ± ۰/۵	۲۰ ± ۰/٦	۳۰ ± ۰/۸	۳۰ ± ۰/۵
انتروکوکوس فکالیس	۷ ± ۰/۳	۰	۰	۱۲ ± ۰/۵	۱۱ ± ۰/۸	۱۲ ± ۰/۹	۰	۱۸ ± ۰/٦
باسیلوس سرئوس	٤۵ ±۰/ ۷	۲۱ ± ۰/۸	۱۷ ± ۰/۸	۲۰ ± ۰/٤	۲۲ ± ۰/۵	۲٤ ± ۰/۸	۵۳ ± ۰/۵	۲۹ ± ۰/۸
سالمونلا تیفی موریوم	۸ ± ۰/۵	۱۵ ± ۰/۳	۰	۰	۰	۰	۰	۱۸ ± ۰/۵
باسیلوس سوبتیلیس	۲۱ ± ۰/۸	۲٤ ± ۰/۸	۱۷ ± ۰/۵	۲۱ ± ۰/۵	۳۰ ± ۰/۵	۱۹ ± ۰/۷	٤۰ ± ۰/٦	۲۷ ± ۰/۹
اشریشیا کلی	۱٦ ± ۰/۳	۲۱ ± ۰/۳	۱٤	۱۲ ± ۰/٦	۱۲ ± ۰/٦	۰	۲۳ ± ۰/ ٤	۲۵ ± ۰/۸
استافیلوکوکوس اورئوس	۲۰ ± ۰/ ۹	۱۲ ± ۰/۸	۲۲ ± ۰/۹	۲۷ ± ۰/٤	۲٤ ± ۰/۵	۱٤ ± ۰/۸	۳۰ ± ۰/۳	۳۰ ± ۰/۹
پسودوموناس آئروژینوزا	۸ ± ۰/۸	۱۵ ± ۰/٦	۰	۱۱ ± ۰/۷	۱۰ ± ۰/٤	۰	۹ ± ۰/۵	۱۰ ± ۰/٤

* برحسب رقت از ذخیره (استوک) (وزن حجمی ذخیره = ۷۵mg/ml میلی گرم در میلی لیتر)؛ † قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر؛ جنتامیسین (۱۰µg)؛ اگزاسیلین (۱µg)، وانکومایسین(۳۰µg)، سفالوتین (۳۰µg)، پیراسیلین-تازوباکتام (۱۱۰µg)، آمپی سیلین (۱۰µg) و اریترومایسین (۱۵µg).

جدول ۳. MIC و MBC در سویه‌های استاندارد برای اسانس زیره سیاه

باکتری	اثر مهارکننده و کشنده در محیط مایع برحسب mg/ml		
	(mg/ml) MIC	(mg/ml) MBC	شاهد (Tyrode)
شیگلا فلکسنری	۰/۰۲۵	۰/۰۵	–
انتروکوکوس فکالیس	–	–	–
باسیلوس سرئوس	۰/۰۱۲۵	۰/۰۲۵	–
سالمونلا تیفی موریوم	–	–	–
باسیلوس سوبتیلیس	۰/۰۵	۰/۱	–
اشریشیا کلی	۰/۰۰۱۵	۰/۰۰۳۱	–
استافیلوکوکوس اورئوس	۰/۰۱۲۵	۰/۰۲۵	–
پسودوموناس آئروژینوزا	–	–	–

(وزن حجمی ذخیره = ۷۵mg/ml میلی گرم در میلی لیتر)

۳-۳- اثرات هم‌افزایی و کاهندگی اسانس زیره سیاه بر آنتی‌بیوتیک‌ها

نتایج مربوط به اثرات هم‌افزایی (سینرژیستی) و کاهندگی (آنتاگونیستی) اسانس زیره سیاه بر روی سه آنتی‌بیوتیک معمول و برای پنج سویه باکتری استاندارد در جدول‌های ٤ و ٥ آورده شده است. در مورد *اشریشیا کلی* اسانس باعث افزایش اثر جنتامیسین و آمپی سیلین شد و بر عملکرد دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها بر روی این باکتری تاثیری نداشت. در مورد *شیگلا فلکسنری* موجب افزایش اثر هر سه آنتی-بیوتیک بکار رفته شد. در مورد *باسیلوس سوبتیلیس* اثری نداشت. نتایج اثرات متقابل دارویی و اسانس بر *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* متغیر بود (جدول‌های ٤ و ٥).

جدول ٤. اثرات هم‌افزایی و کاهندگی اسانس زیره سیاه بر آنتی‌بیوتیک‌ها

باکتری	اگزاسیلین A/AE(%)	جنتامیسین A/AE (%)	آمپی‌سیلین A/AE (%)
شیگلا فلکسنری	۱۱/۱۳ (۱۸/۱۸)	۱٤/۱۷ (۲۱/٤۲)	۲٥/۲٦ (٤)
باسیلوس سرئوس	۱۷/۱۷ (۰)	/۲۷ ۲۱ (۲۸/٥۷)	۲۰/۲۰ (۰)
اشریشیا کلی	۱٤/۱٤ (۰)	۲۱/۱۹ (۹/٥۲)	۱۲/۱٤ (۱٦/٦٦)
استافیلوکوکوس اورئوس	۲۲/۲۲ (۰)	۱۲/۱٤ (۱٦/٦٦)	۲۷/۲۷ (۰)
باسیلوس سویتیلیس	۱۷/۱۷ (۰)	۲٤/۲٤ (۰)	۱۸/۱۸ (۰)

A: قطر هاله عدم رشد برای آنتی‌بیوتیک مورد نظر؛ AE: قطر هاله عدم رشد برای آنتی‌بیوتیک به همراه اسانس زیره سیاه؛ ٪: درصد افزایش و یا کاهش قطر هاله عدم رشد باکتری.

جدول ٥. اثرات هم‌افزایی و کاهندگی اسانس زیره سیاه بر آنتی‌بیوتیک‌ها

باکتری	اثرات برهمکنش اسانس زیره سیاه بر آنتی‌بیوتیک‌ها		
	اگزاسیلین	جنتامیسین	آمپی‌سیلین
شیگلا فلکسنری	S	S	S
باسیلوس سرئوس	IN	S	IN
اشریشیا کلی	IN	S	S
استافیلوکوکوس اورئوس	IN	S	IN
باسیلوس سویتیلیس	IN	IN	IN

S: سینرژیستی (هم‌افزایی)؛ IN: حد وسط (فاقد اثر).

بحث:

گیاهان داروئی در طب سنتی و مصارف صنعتی و خوراکی کاربردهای گسترده دارند و از آنها به‌عنوان چاشنی، طعم دهنده و حتی نگهدارنده استفاده می‌شود. امروزه توجه خاصی به این گیاهان و مشتقات آنها به‌منظور استفاده‌های درمانی و مکمل‌های درمانی در بیماری‌های مختلف شده است (۱۷،۱٦). جستجو برای کشف عوامل ضد میکربی سالم و موثر ادامه دارد که می‌تواند هم از لحاظ درمانی و هم از لحاظ پیشگیری، در مورد طیف وسیعی از عفونت‌های باکتریایی استفاده شود. این نیاز در سال‌های اخیر با ظهور میکروارگانیسم‌های مقاوم به چند دارو نمایان تر شده است (۱۸). بنابراین، شرکت‌های داروسازی در حال حاضر به‌دنبال داروهای جایگزین از سایر منابع از جمله گیاهان هستند. زیرا، مشخص شده گیاهان دارویی موادی با فعالیت ضد میکربی تولید می‌کنند. در مورد اثر ضد میکربی اسانس گیاه زیره سیاه گزارش-هایی انتشار یافته است. نتایج مطالعه حاضر در اسانس زیره سیاه ، سیزده جزء را شناسایی کرد. کومین آلدهید، گاما ترپینن، پارا- منتا ۱و٤ دی ان ۷ ال، بتا پینن و پارا- منتا ۱و۳ دی ان ۷ ال اجزای عمده بودند. حضور میزان بالای کومین آلدهید (حدود ۲۵ درصد) در اسانس زیره سیاه می-تواند فعالیت ضد باکتریایی آنها را توضیح دهد. همچنین اجزای فرعی اسانس یعنی آلفا پینن(α-Pinene) و سابینن (Sabinene) هم دارای فعالیت ضد باکتریایی هستند (۱۹). طی مطالعه‌ای نشان داده شد که اسانس زیره اثر ضد میکربی قابل قبولی روی سویه‌های *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* دارد (۲۰). در پژوهشی دیگر، اثر ضد میکربی زیره روی *اشریشیا کلی* و *سالمونلا تیفی موریوم* بررسی و اثبات شده است (۲۱). رنجبریان و همکاران در سال ۱۳۸۳ طی مطالعه‌ای اثر ضد باکتریایی چهار عصاره گیاهی از جمله زیره سیاه را بر *هلیکوباکتر پیلوری* به روش انتشار از دیسک بررسی کردند. آنها نشان دادند عصاره زیره رشد این باکتری را مهار می‌کند (۲۲). درمطالعه دیگری، اثر ضد میکربی اسانس زیره سیاه بر روی سویه‌های استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیا کلی*، *سالمونلا تیفی* و *شیگلا دیسانتریه* بررسی و به اثبات رسید (۲۳). اثرات ضد باکتریایی ترکیبات تیموکینون (Thymoquinone) و تیموهیدروکینون (Thymohydroquinone) سیاه دانه هم بررسی شد. ثابت شد که این ترکیبات خاصیت ضد باکتریایی و اثرات مختلف هم‌افزایی، کاهندگی یا بی‌اثر را بر روی برخی آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله آمپی‌سیلین و جنتامیسین از خود نشان می‌دهند (۲٤). در مطالعه حاضر، فعالیت ضد باکتریایی اسانس زیره سیاه بر ضد سویه‌های استاندارد ارزیابی شد. نتایج نشان‌دهنده فعالیت ضد باکتریایی خوب این اسانس بر ضد سویه‌های مورد آزمایش است. سویه-های استاندارد *باسیلوس سرئوس*، *باسیلوس سوبتیلیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *شیگلا فلکسنری* و *اشریشیا کلی* بیشترین حساسیت را به ترکیبات اسانس نشان دادند، اما در مورد سویه‌های *انتروکوکوس فکالیس*، *سالمونلا تیفی موریوم* و *پسودوموناس آئروژینوزا* میزان حساسیت چندان قابل توجه نبود. آزمایش‌های MIC و MBC نیز حاکی از آن بود که اسانس زیره در مورد *اشریشیا کلی* حتی تا رقت۱/٤۸۰ (۰/۰۰۱۵ میلی گرم در میلی لیتر) هم اثر مهاری دارد. در مورد باکتری‌های *باسیلوس سرئوس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *شیگلا فلکسنری* نیز تا چند رقت اثر مهار کننده قابل توجهی مشاهده شد. لیکن در مورد سویه‌های *انتروکوکوس فکالیس*، *باسیلوس سوبتیلیس*، *سالمونلا تیفی موریوم* و *پسودوموناس آئروژینوزا* در رقت‌های بیشتر ممانعت از رشد باکتری مشاهده نشد. در آزمایش انتشار از دیسک بیشترین قطر هاله عدم رشد در *باسیلوس سرئوس* و *باسیلوس سوبتیلیس* و سپس *اشریشیا کلی* دیده شد. در حالی که در بررسی MIC بیشترین تاثیر اسانس بر روی *اشریشیا کلی* بود. با توجه به اینکه *باسیلوس سرئوس* و *باسیلوس سوبتیلیس* توانایی اسپور زایی دارد لذا در روش انتشار از دیسک قطر هاله عدم رشد بیانگر تاخیر در رشد (اسپور زایی) یا کشندگی می باشد. در حالی که در روش تعیین حساسیت در محیط مایع در مقابل شرایط نامساعد حاصل از اسانس گیاه، با سرعت بیشتری اسپور تولید می‌کنند و در مقابل اسانس مقاومت بیشتری نشان می‌دهند. چون از آخرین لوله‌ای که رشدی در آن دیده نمی‌شود مجددا محیط فاقد اسانس کشت داده می‌شود. بنابراین، اگر اسپورها زنده باشند بر روی محیط شاهد رشد می کنند. بنابراین، همواره در مورد این باکتری‌ها MIC به روش لوله با چاهک تفاوت دارد، مگر آنکه بحث اسپورکشی مورد توجه قرار گرفته باشد.

از جمله مسائل قابل توجه، برهم‌کنش برخی ترکیبات گیاهی با عده‌ای از داروها است. این تعامل می‌تواند به-

صورت هم‌افزایی(سینرژیستی) و یا به‌صورت کاهندگی (آنتاگونیستی) باشد. در این مطالعه اثرات اسانس گیاه زیره سیاه بر روی عملکرد چند آنتی‌بیوتیک متداول که بر روی سویه‌های استاندارد اثر داده شده بود، بررسی شد. نتایج نشان داد که اسانس زیره سیاه موجب افزایش حساسیت *شیگلا فلکسنری* به اگزاسیلین، جنتامیسین و آمپی‌سیلین می‌شود. این اسانس بر روی عملکرد اگزاسیلین، جنتامیسین و آمپی‌سیلین بر ضد *باسیلوس سوبتیلیس* اثری نداشت. اسانس زیره سیاه بر عملکرد جنتامیسین و آمپی‌سیلین بر ضد سویه‌های استاندارد *اشریشیا کلی* و نیز تنها بر عملکرد جنتامیسین بر ضد *استافیلوکوکوس اورئوس* اثر سینرژیستی داشت. ولی بر عملکرد دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها در این دو سویه اثری نداشت. در مورد *باسیلوس سرئوس*، اسانس زیره سیاه موجب افزایش حساسیت باکتری به جنتامیسین شد. در مجموع اسانس زیره سیاه موجب افزایش اثر جنتامیسین بر ضد هر چهار باکتری مورد آزمایش شد. اهمیت این موضوع از آنجا مشخص می‌گردد که این ترکیبات گیاهی به‌طور گسترده به عنوان چاشنی و نگهدارنده در بسیاری از مواد غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند. از سوی دیگر شناخت مناسب و دقیق‌تر این بر همکنش‌ها می‌تواند به عنوان یک راهکار مفید درمانی به‌ویژه در مورد عفونت‌های میکربی مورد بهره برداری قرار گیرد(۲۵).

نتیجه گیری:

این احتمال وجود دارد که بتوان اسانس زیره سیاه را همچون دیگر مشتقات گیاهان داروئی با خواص ضد-باکتریایی به‌عنوان ترکیب جایگزین و یا مکمل در درمان عفونت‌های باکتریایی بکار برد. البته این موضوع نیاز به پژوهش گسترده بالینی دارد. در حال حاضر یکی از عمده مشکلاتی که در درمان عفونت‌ها و استفاده از آنتی‌بیوتیک-ها مطرح می‌باشد ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی است که توجه خاصی را برای حل این مشکل می‌طلبد (۲۶). از سوی دیگر مواد غذایی و مکمل‌هایی که افراد مختلف و بیماران مصرف می‌کنند می‌توانند بر عملکرد آنتی‌بیوتیک‌ها اثرات تقویتی یا بازدارنده داشته باشند (۲۷). مواد تشکیل دهنده گیاهان دارویی می‌تواند در بازگشت حساسیت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌هایی که در شرایط فعلی به‌دلیل مقاومت دارویی قابلیت‌های درمانی خود را از دست داده-اند، موثر باشند. نتایج این بررسی پیشنهاد می‌کند که اسانس گیاه زیره سیاه می‌تواند به تنهایی یا همراه با سایر عوامل ضد میکربی برای درمان عفونت‌های باکتریایی مفید باشد. با این حال برای ارزیابی سمیت احتمالی اسانس، بررسی خواص و اثر آن و به‌دست آوردن غلظت‌های مناسب آن برای استفاده در بدن موجود زنده آزمایش‌های تکمیلی و in vivo لازم است.

تقدیر و تشکر:

نویسندگان از گروه باکتری شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس که همکاری داشته‌اند، کمال تشکر و قدردانی را می‌نمایند.

فهرست مراجع :

1. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12(4):564-582.
2. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *Int J Food Microbiol* 2004; 94:223-253.
3. Ayfer D, Turgay O. Antimicrobial activities of various medicinal and commercial plant extracts. *Turk J Biol* 2003; 27:157-162.
4. Kudi AC, Umoh JU, Eduvie LO, Gefu J. Screening of Nigerian medicinal plants for antibacterial activity, *J Ethnopharmacol* 1999; 67(2):225-228.
5. Cimanga K, Kambu K, Tona L, Apers S, De Bruyne T, Hermans N, *et al.* Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *J Ethnopharmacol* 2002; 79(2):213-220.
6. Newton SM, Lau C, Gurcha SS, Gurdyal SB, Wright CW. The evaluation of forty-three plant species for in vitro anti-mycobacterial activities: isolation of active constituents from Psoralea corylifolia and Sangivinaria canadiensis. J Ethnopharmalol 2002; 79(1):57-67.
7. Palombo EA and Semple SJ. Antibacterial activity of traditional Australian medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 2001; **77**(2):151- 157.
8. Khafagi IK and Dewedar A. The efficiency of random versus ethno-directed research in the evaluation of Sinai medicinal plants for bioactive Compounds. *J Ethnopharmacol* 2000; **71**(3):365-376.
9. Essawi T and Srour M. Screening of Some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *J Ethnopharmacol* 2000; **70**(3):343-349.
۱۰- قهرمان ا، *فلور رنگی ایران*، جلد دوم.تهران، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع، ۱۳۷۲،.ص ۱٤۰۵
۱۱- زرگری ع، *گیاهان دارویی*، جلد ۵، تهران، انتشارات دانشگاه تهران، ۱۳٦۸، ص ۹٤۰
12. Narayan VK and Giridhar KR. The in vitro efficacy of essential oils of some umbellifera Plants. *Ind Drugs* 1980; 17(12):394-396.
13. Thappa R, Ghoshs K, Agarwal SG, Raina, AK , Jamwal PS. Comparative studies on the major volatiles of Kalazira (*Bunium persicum* seed) of wild and cultivated sources. *Food Chem* 1991; 41(2):129-134.
14. Baydar H, Sagdic O, Ozcan G, Karadogan T. Antibacterial activity and composition of essential oils from Origanum, Thymbra and Satureja species with commercial importance in Turkey. *Food Cont* 2004; 15:169-72.
15. Demirci F, Guven K, Demirci B, Dadandi MY, Baser KHC. Antibacterial activity of two Phlomis essential oils against food pathogens. *Food Cont* 2008; 19(12):1159-1164.
16. Ruffa MJ, Ferraro G, Wagner ML, Calcagno ML, Campos RH, Cavallaro L. Cytotoxic effect of Argentine medicinal plant extracts on human hepatocellular carcinoma cell line. *J Ethnopharmacol* 2002; 79:335-339.
17. Han SY, Li PP. Progress of research in antitumor mechanisms with Chinese medicine. *Chin J Integr Med* 2009; 15(4):316-20.
18. Preuss HG, Echard B, Brook I, Elliott TB. Minimum inhibitory concentrations of herbal essential oils and monolaurin for gram-positive and gram-negative bacteria. *Mol Cell Biochem* 2005; 272(1-2):29-34.
19. Iacobellis NS, Cantore PL, Capasso F, Senatore F. Antibacterial activity of *Cuminum cyminum L.* and *Carum carvi L.* essential oils. *J Agric Food Chem* 2005; **53**(1): 57–61
20. Bonyadian M, Karim G. Study of the effects of some volatile oil of herbs Pennyroyal, Peppermint, Tarragon, Caraway seed and Thyme against *E. coli* and *S. aureus* in broth media. *J Vet Med Tehran Uni* 2003; **57**(4):81-83.
21. Mekawey AAI, Mokhtar MM, Farrag RM. antitumor and antibacterial activities of [1-(2-Ethyl, 6-Heptyl) Phenol] from *Cuminum Cyminum* seeds. *J App Scienc Res* 2009; **5**(11):1881-1888.
22. Ranjbaran P, Sadeghian S, Shirazi MH, Sarraf-Nejad A, Fazeli MR, Amin GH, *et al.* Antibacterial effects of *Cinnamon verum*, *Bunium persicum*, *Foeniculum vulgare* and *Anethum graveolens* extracts on *Helicobacter pylori* via disk diffusion and flow cytometry. *J Hamedan Univ Medl Science* 2005; **33**(3):42-47.
23. Syed. M and Hanif M. Antimicrobial activity of the essential oil of the umbelliferae family part 1. *Cuminum cyminum*, *Coriandrum sativum*, *Foeniculum vulgar* and *Bunium persicum* oils. *Pak J Scient Indust Res* 1985; **55**:116-120.
24. Halawani E. Antibacterial acativity of thymoquinone and thymohydroquinone of *Nigella sativa* L. and their interaction with some antibiotics. *Advan Biol Res* 2009; **3**(6):148-152.
25. Deborah A, Kennedy1 MBA, SickKids ND. Research Fellow & Dugald Seely Clinically based evidence of drug–herb interactions: a systematic review. *Expert Opin Drug Saf* 2010; (9-1):79-124.
26. Spratt BG, Resistance to antibiotics mediated by target alterations, *Science* 1994; (264):388-393.
27. Song W, Studies on traditional Chinese medicines against bacterial infections, *J Beijing Tradit Chin Med* 2002; (21):249-251.
28. Ebtekar M, Hassan ZM. Effect of immunomodulators pyrimethamine and cimetidine on immunosuppression induced by sulfur mustard in mice. Int J Immunopharmacol 1993;**15**:533– 41.

یادی از همکار فرزانه مرحوم دکتر مرتضی ستاری

مرحوم دکتر مرتضی ستاری، عضو هیئت علمی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس بود. ایشان روز ۹ مرداد ۱۳۸۹ بر اثر عاضه ایست قلبی در صحن مرقد مطهرامام علی ابن موسی الرضا (ع) جان را به جان آفرین تسلیم کرد. او که در ۱۳۳۹ در تهران متولد شد در گروه باکتری شناسی فعالیت آموزشی – پژوهشی داشت. حاصل این خدمت ارائه بیش از ۵۳ عنوان مقاله داخلی و خارجی، راهنمایی و مشاوره بیش از ۵۰ عنوان پایان نامه و تربیت صدها دانشجو در مقاطع تحصیلات تکمیلی بود.

در افتخار همراهی و هم‌نشینی با آن مرحوم به ویژه در گردهمایی‌های علمی آموختم که چگونه و تا چه اندازه می توان با قرآن مانوس بود و تا چه حد می‌توان آن را در فعالیت‌های روزمره گنجاند. نحوه و محل درگذشت آن مرحوم ارتباط تنگاتنگی با اعتقادات و انس وی با کتاب الهی و خاندان عصمت و طهارت دارد.

مقاله حاضر را در واپسین ماه‌های زندگی پر برکت تکمیل نمود. به پاس بزرگداشت روح پر فتوح آن مرحوم شورای نویسندگان تعداد جدول‌ها را بدون کم وکاست پذیرفت. روحش شاد

سردبیر مجله