بررسی اثرات ضدباکتریایی عصاره متانولی جوزهندی علیه جدایه های *Streptococcus pyogenes* مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف

الهام نیکوئی[1]، اشرف کریمی نیک[2]*

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرمان، کرمان، ایران
۲. گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرمان،کرمان، ایران

***نویسنده مسئول**: *a.kariminik@iauk.ac.ir*

چکیده

امروزه با توجه به اثرات جانبی آنتی‌بیوتیک‌ها و افزایش مقاومتی که میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا علیه آن‌ها کسب کرده اند تلاش برای جایگزین کردن عوامل ضدمیکروبی با منشأ گیاهی و با عوارض جانبی کمتر ضروری است. این تحقیق نوعی مطالعه آزمایشگاهی بوده که با هدف تعیین اثر ضدباکتریایی گیاه جوزهندی بر جدایه‌های *Streptococcus pyogenes* مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف انجام گرفت. در این تحقیق، عصاره متانولی گیاه به روش ماسراسیون تهیه و عصاره با کاغذ واتمن شماره یک فیلتر شد، سپس توسط سیستم تقطیر در خلا دوار تغلیظ و خشک گردید. غلظت‌های مختلف ۸۰، ۴۰، ۲۰، ۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵ و ۰/۶۲۵ از عصاره در حلال دی‌متیل سولفوکساید و متانول با حجم برابر تهیه شد. شناسایی جدایه‌های مولد بتالاکتاماز به روش فنوتیپی با دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی سفوتاکسیم و دیسک ترکیبی سفوتاکسیم/کلاولونیک اسید صورت گرفت. فعالیت ضدباکتریایی بر علیه ۴۰ ایزوله از باکتری‌های مولد بتالاکتاماز، به روش انتشار چاهک بررسی شد. پس از انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد میزان حساسیت باکتری‌ها، با اندازه‌گیری قطر هاله بازدارندگی از رشد تعیین شد. بر اساس نتایج حاصله، از ۴۰ باکتری *Streptococcus pyogenes* ۵۰ درصد از جدایه‌ها مولد بتالاکتاماز بودند. ایزوله‌های *Streptococcus pyogenes* به عصاره گیاه جوزهندی حساسیت نشان دادند و میانگین حداقل غلظت بازدارندگی از رشد نسبت به استرپتوکوکوس مولد بتالاکتاماز، ۱۰میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. با توجه به بالا بودن اهمیت و خاصیت ضدمیکروبی گیاه جوزهندی و نتایج به دست آمده از این مطالعه ، می‌توان امیدوار بود که در آینده با انجام تحقیقات بیشتر بتوان از این گیاه استفاده بهتر و علمی تری جهت تولید فرآورده هایی با اثربخشی بیشتر و عوارض کمتر برای درمان عفونت های استرپتوکوکی کرد.

واژه های کلیدی: *Streptococcus pyogenes* ، بتالاکتاماز، جوز هندی، فعالیت ضدباکتریایی

مقدمه

استفاده بیش‌ازحد از آنتی‌بیوتیک‌ها عامل اصلی ظهور میکروارگانیسم‌های مقاوم به آن‌ها شده است. شیوع این میکروارگانیسم‌های مقاوم یکی از جدی‌ترین تهدیدها برای درمان موفقیت‌آمیز بیماری‌های میکروبی است. آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام گروه متنوعی از عوامل ضدمیکروبی هستند که برای مدیریت عفونت‌ها در انسان، جامعه و مراقبت‌های اکتسابی استفاده می‌شوند (۱). مقاومت در برابر بتالاکتام‌ها یک پدیده هشداردهنده و رو به رشد و به نوبه خود یک چالش عمومی است.در جامعه امروز مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها امری اجتناب‌ناپذیر است و استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها به‌منظور پیشگیری از عفونت‌های ناشی از باکتری‌ها، نگرانی‌هایی را در ارتباط با ظهور مقاومت میکروبی استرپتوکوکوس‌ها ایجاد نموده است (۲). *Streptococcus pyogenes* یک پاتوژن انسانی حاضر و مسئول بیش از نیم میلیون مرگ در سال در سراسر جهان است. درمان فعلی به آنتی بیوتیک‌های مرسوم و مدیریت علائم بستگی دارد. در حالی که آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام انتخابی برای درمان عفونت‌های خفیف به کار می‌روند، عفونت‌های شدید یا طولانی مدت نیاز به اقدامات اضافی دارد. این

موضوع نشان می‌دهد که نرخ جهانی مقاومت همچنان در حال افزایش است (۳).

با توجه به اثرات جانبی آنتی‌بیوتیک‌ها و مقاومتی که میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا علیه آن‌ها کسب کردند، در پزشکی استفاده از عصاره‌ها و ترکیبات با خواص بیولوژیکی گونه‌های گیاهی متداول شده است و ترکیبات ضدمیکروبی آن‌ها نیز یکی از منابع با ارزش در پزشکی به شمار می‌آید (۴). جوزهندی درختی همیشه‌سبز متعلق به خانواده میریستیکاسه ، خانواده‌ای از گیاهان گل‌دار بومی آسیا، آفریقا، جزایر اقیانوس آرام و آمریکا است که توسط اکثر طبقه‌شناسان شناخته شده است. عضو معروف آن، *Myristica fragrans* می باشد که از قسمت‌های مختلف این گیاه به‌طور سنتی برای درمان بیماری‌های مختلف از جمله: درمان اضطراب، حالت تهوع، اسهال، وبا، گرفتگی معده، انگل، فلج، روماتیسم و داروی تقویت‌کننده جنسی استفاده شده است. علاوه بر این، چندین گزارش علمی نشان می‌دهد که اسانس جوزهندی دارای فعالیت بالقوه آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی، ضدالتهابی، ضدزخم و ضدسرطان است(۵). اسانس جوزهندی کاربرد بالقوه‌ای به‌عنوان ضدقارچ و ضدباکتریایی دارد. اثر ضدباکتریایی از این جهت جالب است که به نظر می‌رسد تنها بر روی باکتری‌های بیماری‌زا اثر کرده درحالی‌که فلور طبیعی بدن را بدون آسیب می‌گذارد.. هدف از این مطالعه، تعیین اثرات ضدباکتریایی عصاره متانولی جوزهندی علیه سوش‌های استرپتوکوکی مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف بوده است.

مواد و روش کار

عصاره گیری

دانه گیاه جوزهندی از مناطق گرمسیری جمع‌آوری و برای انجام آزمایشات میکروبی خرد گردید . عصاره گیری با روش ماسراسیون (خیساندن) انجام شده و عصاره حاصله با فیلتر کاغذی شماره ۱ صاف ، سپس غلظت‌های متفاوت در حلال دی‌متیل سولفوکسید و متانول با حجم برابر تهیه گردید (Cakupewa et al.,2022) .

جداسازی و شناسایی ایزوله های *Streptococcus pyogenes* مولد بتالاکتاماز

در این تحقیق، نمونه برداری به وسیله سوآپ استریل مرطوب از بینی و حلق (بخش فوقانی تنفسی) افراد پرسنل بیمارستانی به‌طور تصادفی انجام شد. نمونه‌ها پس از تهیه، در لوله‌های حاوی سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد استریل به آزمایشگاه منتقل و در طی ۲ ساعت پس از انتقال به آزمایشگاه و بر روی محیط کشت بلاد آگار(مرک آلمان) کشت داده شدند. انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. از کلنی‌های رشد کرده، رنگ‌آمیزی گرم، تست های کاتالاز، همولیز و تست حساسیت باسیتراسین انجام شد. باکتری‌های استرپتوکوکوس شناسایی و جهت تست آنتی‌بیوگرام و سایر آزمایش‌ها مورد استفاده قرار گرفتند(Ahmed et al., 2019). از روش دیسک ترکیبی سفوتاکسیم/کلاولونیک اسید برای شناسایی ایزوله‌های *Streptococcus pyogenes* مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف استفاده شد. از کشت ۲۴ ساعته باکتری‌ها غلظتی معادل ۰/۵ مک‌فارلند در محلول سرم فیزیولوژی استریل تهیه گردید و بر روی محیط کشت مولرهینتون آگار(مرک آلمان) به صورت یکنواخت کشت داده شد . دیسک‌های سفوتاکسیم و دیسک ترکیبی سفوتاکسیم/کلاولونیک با فاصله ۲۰ میلی‌متر از یکدیگر روی محیط کشت قرار داده شد. ایزوله‌هایی‌که قطر هاله عدم رشد دیسک ترکیبی ۵ میلی‌متر بیشتر از قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک منفرد همان آنتی‌بیوتیک داشته باشند، به عنوان باکتری واجد بتالاکتاماز وسیع‌الطیف یا ESBL، در نظر گرفته شدند (۶).

بررسی عصاره متانولی جوز هندی بر جدایه‌های مولد بتالاکتاماز

دراین آزمایش، از روش انتشار چاهک استفاده شد (۸،۷). از سوسپانسیون میکروبی با کدورت معادل نیم مک فارلند، کشت به روش یکنواخت از جدایه‌های مولد بتالاکتاماز انجام شد. سپس چاهک‌هایی به قطر ۶ میلی‌متر ایجاد گردید. از غلظت‌های ۸۰، ۴۰، ۲۰، ۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵ و ۰/۶۲۵ تهیه شده در حلال دی‌متیل سولفوکسید و متانول با حجم برابر میزان ۲۰ میکرولیتر در هر حفره ریخته شد و سپس کشت‌ها در دمای ۳۷

درجه به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. بعد از دوره گرمخانه‌گذاری، قطر هاله ممانعت از رشد اطراف هر چاهک بر حسب میلی متر اندازه‌گیری شد حداقل غلظت ممانعت از رشد، تعیین گردید. از محلول دی‌متیل سولفوکسید و متانول با حجم برابر به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد.

نتایج

در این تحقیق، ۲۰ ایزوله *Streptococcus pyogenes* مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف با مشخصه کوکسی‌های گرم‌مثبت، با آرایش تکی، دوتایی، زنجیره‌ای، کاتالاز منفی، همولیز کامل و تست باسی تراسین مثبت شناسایی شدند و بر اساس نتایج دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی سفوتاکسیم و دیسک ترکیبی سفوتاکسیم/کلاولونیک اسید شناسایی گردید. از ۴۰ جدایه استرپتوکوکی،۲۰ مورد (۵۰درصد) مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف بودند. تاثیر عصاره متانولی دانه جوزهندی در غلظت‌های مختلف نسبت به ۲۰ جدایه *Streptococcus pyogenes* مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف در جدول ۱ و نمودار۱ نشان داده شده است.

جدول ۱- نتایج اثرات ضدباکتریایی عصاره متانولی دانه گیاه جوزهندی بر***Streptococcus pyogenes*** مولد بتالاکتاماز به روش انتشار چاهک (اعداد جدول قطر هاله ممانعت از رشد را بر حسب میلی‌متر نشان می‌دهد)

غلظت(mg/ml)/ جدایه باکتری	۸۰	۴۰	۲۰	۱۰	۵	۲/۵	۱/۲۵	۰/۶
۱	۱۶	۱۵	۱۳	۱۰	–	–	–	–
۲	۱۵	۱۲	۱۱	۹	–	–	–	–
۳	۱۵	۱۴	۱۱	۹	–	–	–	–
۴	۱۴	۱۳	۱۱	۸	–	–	–	–
۵	۱۵	۱۴	۱۲	۱۰	–	–	–	–
۶	۱۵	۱۴	۱۳	۱۱	–	–	–	–
۷	۱۶	۱۵	۱۳	۱۰	–	–	–	–
۸	۱۴	۱۳	۱۰	۸	–	–	–	–
۹	۱۴	۱۳	۱۳	۱۱	–	–	–	–
۱۰	۱۱	۱۰	۸	–	–	–	–	–
۱۱	۱۵	۱۴	۱۰	۸	–	–	–	–
۱۲	۱۳	۱۲	۱۰	–	–	–	–	–
۱۳	۱۴	۱۲	۱۱	۱۰	–	–	–	–
۱۴	۱۵	۱۴	۱۲	۱۰	–	–	–	–
۱۵	۱۶	۱۴	۱۱	۱۰	–	–	–	–
۱۶	۱۶	۱۳	۱۱	۸	–	–	–	–
۱۷	۱۲	۱۰	۸	–	–	–	–	–
۱۸	۱۷	۱۵	۱۲	۱۰	–	–	–	–
۱۹	۱۳	۱۱	۱۰	–	–	–	–	–
۲۰	۱۵	۱۳	۱۱	۱۰	–	–	–	–

نمودار۱- پاسخ غلظت عصاره متانولی دانه جوزهندی نسبت به جدایه‌های *Streptococcus pyogenes* مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف

یافته‌ها نشان داد که ۵۰ درصد از جدایه‌های مورد بررسی مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف بودند و همچنین عصاره متانولی جوزهندی در غلظت‌های۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر باکتری‌های استرپتوکوکی مولد بتالاکتاماز مؤثر واقع شد. میانگین حداقل غلظت بازدارندگی از رشد، ۱۰میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تعیین گردید. با عنایت به نتایج حاصله می‌توان گفت عصاره متانولی گیاه جوزهندی در غلظت‌های اندک دارای تأثیرات ضدباکتریایی بسیار مطلوب بر علیه جدایه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام مورد بررسی بوده است. ازاین‌رو می‌توان این‌چنین نتیجه گرفت که با شناسایی ترکیبات مؤثر و خالص موجود در این گیاه می‌توان در جهت تهیه و تولید مواد ضدباکتریایی مناسب علیه برخی از باکتری‌های گرم‌مثبت و گرم‌منفی بخصوص باکتری مورد مطالعه گام برداشت.

افزایش میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها و مواد ضدمیکروبی باعث بروز مشکلاتی در زمینه درمان عفونت‌ها به‌ویژه عفونت‌های بیمارستانی شده است. به‌طور مثال بر اساس تحقیقات انجام شده، *Streptococcus pyogenes* به دلیل دارا بودن فاکتورهای متعددی که می‌توان در بیماری‌زایی باکتری دخالت داشته باشد، یکی از مهاجم‌ترین پاتوژن‌ها محسوب می‌شود. گزارشات بالینی اخیر مقاومت آنتی‌بیوتیکی بتالاکتام *Streptococcus pyogenes* را با جهش در پروتئین اتصال‌دهنده پنی‌سیلین (PBP) PBP2x مرتبط کرده است (۹). در راستای مطالعه حاضر، سه نوع عصاره اتانولی، استونی و آبی جوزهندی با سوسپانسیون استوک باکتریایی استاندارد، با محیط نوترینت آگار استریل مخلوط شد و پس از گذشتن دوره انکوباتور قطر هاله بازدارنده رشد اندازه گیری گردید. سه نوع عصاره (اتانول، استون، آبی) برای فعالیت ضد باکتریایی در برابر چهار گونه باکتری استاندارد با نام‌های *P.aeruginosa ,E.coli, S.aureus ,B.subtilis* مورد آزمایش قرار گرفت. عصاره متانولی و استونی فعالیت ضدباکتریایی بالایی در برابر باکتری‌های گرم مثبت نشان دادند و قطر منطقه بازدارنده در برابر *S.aureus* به ۲۵ میلی‌متر رسید اما عصاره آبی هیچ فعالیت باکتریایی علیه آن گونه‌های باکتریایی نشان نداد (۱۱). در تحقیقی دیگر، که با موضوع شاخص‌های قدرت عصاره کلروفرمی جوزهندی در برابر پاتوژن‌های غیر بالینی و بالینی در انسان صورت گرفت، مشخصات ضدمیکروبی عصاره جوزهندی ارزیابی کردند. عصاره حلال‌های مختلف برای فعالیت ضدمیکروبی در برابر سویه‌های بالینی و مرجع، با استفاده از روش انتشار دیسک و چاهک و تکنیک‌های میکرو رقیق‌سازی مورد آزمایش قرار دادند. عصاره کلروفرمی قدرت ضدمیکروبی را در برابر باکتری‌های گرم‌مثبت با حداقل غلظت بازدارنده نشان داد (۱۲). همچنین محققی دیگر، پتانسیل شیمیایی، آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی جوزهندی را بررسی کرد و چنین مشاهده شد که عصاره

استون بالاترین خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی را نشان داده است. فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی بالا به علت یکی از ویژگی‌های آلفا-پینن، میرسن، ۸ و ۱-سینئول، کارواکرول، ترپینن-۴-ول، اورژنول و ایزویورژنول گزارش شد. این تحقیق به شدت از اهمیت قومی و دارویی جوزهندی پشتیبانی می‌کند و نشان می‌دهد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی جوزهندی می‌تواند در پیشگیری و کند کردن پیشرفت بیماری‌ها و عفونت‌های مختلف توسط میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا فرصت‌طلب مفید باشد (۱۳).

نتیجه گیری کلی

ازآنجایی‌که همه‌گیری عفونت‌های استرپتوکوکی ممکن است در بخش‌های مختلف جامعه اعم از بیمارستانی و غیر بیمارستانی بروز نمایند بررسی شیوع این باکتری‌ها به‌خصوص بررسی و شناسایی ناقلین این باکتری‌ها از اهمیت به‌سزایی برخوردار است و نظر به اینکه عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها و افزایش مقاومت این عفونت‌ها منجر به افزایش عوارض ناشی از آن‌ها و نیز مرگ‌ومیر می‌شود، کنترل این عفونت اهمیت ویژه‌ای دارد. با توجه به نتایج حاصله می‌توان گفت عصاره متانولی گیاه جوزهندی دارای تأثیرات ضدباکتریایی بسیار مطلوب بر علیه جدایه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام مورد بررسی بوده است. لذا پس از جداسازی و شناسایی ترکیبات موجود در عصاره مذکور، بررسی مکانیسم های اعمال اثر ضدباکتریایی برای درک بهتر اثربخشی گیاه جوزهندی و هدایت مطالعات بعدی جهت کاربردی شدن تحقیقات مورد نیاز می باشد.

منابع

1. Lyer, RN. 2022. 7.02- Beta lactam. Comprehensive pharmacology. 3-63.
2. Taghinejad, J. Barati, B. Sadeghi, A.2018. A study of the drug resistance pattern of Group B Sreptococcus isolated from urinary samples in the city of Salmas during the year 2015.NCMBJ. 8(30):79-84.
3. Johnson, AF. LaRock,Ch N.2021.Antibiotic treatment,mechanisms for failure,and adjunctive therapies for infection by group A Streptococcus.Frontiers.V:12.
4. Rojas, J. Ochoa, V. Ocampo, S. Munoz, J.2006. Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombia folkloric medicin: A possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. BMC complementary and alternative medicine. 62.
5. Ashokkumar, K. Simal-Gandara, J. Murugan, M. Dhanya, MK. Pandian, A.2022. Nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt.) essential oil: A review on its composition, biological, and pharmacological activities. Phytotherapy Research.36(7):2839-51.
6. Dhara, L. Tripathi, A.2020. The use of eugenol in combination with cefotaxime and ciprofloxacin to combat ESBL-producing quinolone-resistant pathogenic Enterobacteriaceae. Journal of Applied Microbiology. 129(6):1566-76.
7. Hassan, A. Ullah, H.2019, Antibacterial and antifungal activities of the medicinal plant veronica biloba. Journal of chemistry. 1-7.
8. Shahabinejad, S. Kariminik, A.2019. Antibacterial activity of methanol extract of Lawsonia inermis against uropathogenic bacteria. MicroMedicine. 7(2):31-6.
14.
9. Hayes, A. Lacey, JA. Morris, JM. Davies, MR. Tong, SYC.2020. Restricted Sequence Variation in *Streptococcus pyogenes* Penicillin binding proteins. Clinical Science and Epidemiology. 5(2):1-6.
10. Ibrahim, KM. Naem, RK. Abd-Sahib, AS.2013. Antibacterial activity of nutmeg (Myristica fragrans) seed extracts against
12.
antimicrobial potential of nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt). Journal of genetic engineering and biotechnology. 11(1):25-31.
.
12. Ahmed, SH. Tolba, S. Al Zawahry, YA.2019, Evaluation of the role of bla genes in beta lactam and methicillin resistant Staphylococcus aureus. Egyptian Journal of Botany. 59(1):29-38.
13. Gupta, AD. Bansal, VK. Babu, V. Maithil, N.2013. Chemistry antioxidant and

Investigating the antibacterial effects of methanolic extract of *Myristica fragrans* against broad-spectrum β-lactamase-producing *Streptococcus pyogenes* isolates

Elham Nikouie[1], Ashraf Kariminik[2*]

1. M.Sc.Graduate of Microbiology, Faculty of basic sciences, Islamic Azad University, kerman Branch, kerman, Iran
2. Department of Microbiology,Islamic Azad University, Kerman Branch, kerman, Iran

***Corresponding author Email:** *a.kariminik@iauk.ac.ir*

Abstract

The increasing development of antibiotic resistance of bacteria has provided the basis for replacing antimicrobial agents with plant origin and with less side effects. This research is a type of laboratory study that was conducted with the aim of determining the antibacterial effect of *Myristica fragrans* on Streptococcus isolates beta lactamase producing antibiotics. The methanol extract of the plant was prepared by maceration method. The extract was filtered with Whatman No.1 paper and concentrated by rotary evaporator system. Different concentrations of 80, 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 of the extract were prepared in DMSO: Methanol (1:1v/v) solvent. Identification of beta-lactamase producing isolates was done by phenotypic method with cefotaxime antibiotic discs and cefotaxime / clavulanic acid combined disc. Antibacterial activity against 40 isolates of beta-lactamase-producing isolates was investigated by agar wells diffusion method. After incubation for 24 hours at 37°C, the sensitivity of bacteria was determined by measuring the diameter of the growth inhibition zone. Based on the results, out of 40 *Streptococcus pyogenes* bacteria, 50% of isolates were beta-lactamase producers, respectively. All isolates of *Streptococcus pyogenes* showed sensitivity to *Myristica fragrans* extract, and the average of minimum growth inhibition concentration to beta-lactamase-producing *Streptococcus pyogenes* was 10 mg/ml. Due to increasing antibiotic resistance, it seems that *Myristica fragrans* extract can be used against beta-lactam-resistant *Streptococcus pyogenes* strains in controlling infections, and in this regard, isolation and identification of the effective substances of the plant extract it is suggested.

Key words: *Streptococcus pyogenes*, Beta-lactamase, *Myristica fragrans*.