Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 11, Number 6 (January - February)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Evaluation of Phytochemical Composition of *Mentha pulegium L.* Essential Oil and Its Antibacterial Activity against Several Pathogenic Bacteria

Fahimeh Rahmani, Roya Rezaeian-Doloei, Leila Alimoradi

Department of Agronomy and Plant Breeding, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

Downloaded from ijmm.ir at 1:41 +0430 on Friday April 27th 2018

Article Information

Article history:
Received: 2017/09/02
Accepted: 2018/01/08
Available online: 2018/02/19

Article Subject:
Antimicrobial Substance

IJMM 2018; 11(6): 167-177

Corresponding author:

Dr. Roya Rezaeian-Doloei
Department of Agronomy and Plant Breeding, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

Tel: 09155120407

Email:
royarezaeian@mshdiau.ac.ir

Abstract

Background and Aims: *Mentha pulegium* L. is one of the medicinal plants used in the food production as a flavoring substance and its antibacterial effect has also been considered. The present study was designed to evaluate the phytochemical composition of *Mentha pulegium L.* originated from Iran and its antimicrobial activity against several pathogenic bacteria.

Materials and Methods: The chemical compounds of this medicinal plant were analyzed by GC-MS and 14 components were identified, representing 86.98% of its total essential mass. The antibacterial activity of the essential oil (EO) of *Mentha pulegium L.*, has been evaluated against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeroginosa*, and *Pseudomonas syringae pv. tomato* using disc diffusion method compared to synthetic antibiotic ciprofloxacin. The minimum inhibitory concentration (MIC) was evaluated against the above tested bacteria using macrobroth dilution method.

Results: Results showed that the EO of *Mentha pulegium* L., was formed by the main components of piperitone (32.1%), piperitenone (21.71%) and pulegone (15.85%). In addition, the results obtained using MIC and MBC showed that the minimum inhibitory concentration of the EO of *M. pulegium* was in the range of 10-40 mg/mL for *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeroginosa* and 20 mg/mL for *Ps. syringae* pv. *tomato*, respectively. According to the results, the maximum zones of inhibition (29.15 mm) was observed on *P. syringae P. tomato* in 40 mg/mL of essential oil, and the minimum zone of inhibition (17.08 mm) was related to *P. aeroginosa* in the same concentration.

Conclusions: The results revealed that EO of *Mentha pulegium* L. had an appropriate inhibitory effect on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

Keywords: Antibacterial activity, *Mentha pulegium*, Essential oil, MIC, MBC

Copyright © 2018 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Rahmani F, Rezaeian-Doloei R, Alimoradi L. Evaluation of Phytochemical Composition of Mentha pulegium L. Essential Oil and Its Antibacterial Activity against Several Pathogenic Bacteria. Iran J Med Microbiol. 2018; 11 (6) :167-177

Downloaded from ijmm.ir at 1:41 +0430 on Friday April 27th 2018

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۱ – شماره ۶ – بهمن-اسفند ۱۳۹۶

Journal homepage: www.ijmm.ir

بررسی ترکیب فیتوشیمیایی اسانس پونه (*Mentha pulegium L.*) و فعالیت ضد باکتریایی آن برعلیه تعدادی از باکتری‌های بیماری‌زا

فهیمه رحمانی، رویا رضائیان دلویی، لیلا علیمرادی

گروه زراعت و اصلاح نباتات، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۶/۰۶/۱۱

پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۱۸

انتشار آنلاین: ۱۳۹۶/۱۱/۲۹

موضوع:

مواد ضدمیکروبی

IJMM1396;11(6): 167-177

نویسنده مسئول:

دکتر رویا رضائیان دلویی

گروه زراعت و اصلاح نباتات، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

تلفن: ۰۹۱۵۵۱۲۰۴۰۷

پست الکترونیک:

royarezaeian@mshdiau.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: پونه از جمله گیاهانی است که در صنایع مواد غذایی به‌عنوان طعم‌دهنده مصرف فراوانی داشته و به اثرات ضد باکتریایی آن توجه شده است. مطالعهٔ حاضر با هدف بررسی خواص فیتوشیمیایی اسانس پونه (*Mentha pulegium* L.) به‌دست آمده از ایران و فعالیت ضد میکروبی آن برعلیه تعدادی از باکتری‌های بیماری‌زا انجام شد.

مواد و روش کار: ترکیبات شیمیایی این گیاه دارویی با GC-MS بررسی شد و ۱۶ ترکیب مختلف که در مجموع ۸۶/۹۶٪ کل وزن اسانس گیاه را تشکیل می‌دهند، شناسایی شدند. فعالیت ضد میکروبی اسانس گیاه پونه در برابر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلی*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *سودوموناس سیرینگه* پاتوار گوجه‌فرنگی به روش انتشار از دیسک در مقایسه با آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین ارزیابی شد. حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس در برابر باکتری‌های مطالعه‌شده با استفاده از روش ماکروبراث دایلوشن بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج به‌دست آمده نشان داد که اسانس پونه از اجزای اصلی پیپریتون (۳۲/۱٪)، پیپریتنون (۲۱/۷۱٪) و پولگون (۱۵/۸۵٪) تشکیل شده است. به‌علاوه، نتایج به‌دست آمده با استفاده از MIC وMBC نشان داد که حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس پونه در محدودهٔ ۴۰-۱۰ mg/mL برای باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلی*، *سودوموناس آئروژینوزا* و ۲۰ mg/mL برای *سودوموناس سیرینگه* است. با توجه به نتایج به‌دست آمده، بیشترین هالهٔ عدم رشد (۲۹/۱۵ mm) در *سودوموناس سیرینگه* و کمترین هالهٔ عدم رشد (۱۷/۰۸ mm) در *سودوموناس آئروژینوزا* در غلظت ۴۰ mg/mL اسانس پونه مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: نتایج به‌دست آمده حاکی از این است که اسانس پونه دارای اثر مهارکنندگی مناسبی برعلیه باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* می باشد.

کلمات کلیدی: ضد باکتریایی، پونه، اسانس گیاهی، MIC، MBC

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

امروزه عوامل بیماری‌زای عفونی و مقاومت آن‌ها به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها از چالش‌های بزرگ علم پزشکی بوده که به طبع آن، تولید آنتی‌بیوتیک‌های جدید روزبه‌روز درحال افزایش است. ازاین‌رو، محقّقین به سمت جایگزین‌های گیاهی روی آورده‌اند که ضمن داشتن اثرات ضد باکتریایی، فاقد عوارض جانبی ناشی از مصرف داروهای شیمیایی هستند.

توجه به اهمیت تغذیهٔ انسان و نقش آن در سلامت فرد و جامعه و سلامت محصولات کشاورزی از اهمیت فوق‌العاده‌ای برخوردار است. استفاده از سموم و مواد شیمیایی به‌منظور از بین بردن آفات و عوامل بیماری‌زای گیاهی باعث می‌شود که این ترکیبات از طریق آب، خاک و هوا وارد زنجیرهٔ غذایی شده و خطر جدی برای سلامت انسان ایجاد کنند (۱). براساس نظرسنجی سازمان جهانی بهداشت، بیش از ۵۰۰۰۰ نفر در کشورهای در حال توسعه مسموم شده و به‌دلیل اثرات عوامل سمی که در کشاورزی کاربرد دارند، سالانه ۵۰۰۰ نفر می‌میرند. با این حال، افزایش نگرانی عمومی دربارهٔ مسائل زیست محیطی و همچنین افزایش مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها، منجر به ایجاد سیستم‌های مدیریت جایگزین برای کاهش ترکیبات وابسته به سموم و استفاده از ترکیبات طبیعی ضد باکتریایی گیاهی برای کنترل عوامل بیماری‌زا شده است (۲). مواد مؤثرهٔ گیاهان دارویی

Downloaded from ijmm.ir at 1:41 +0430 on Friday April 27th 2018

در کنترل عوامل میکروبی به‌ویژه باکتری‌ها نقش ویژه‌ای دارند (۶-۳). بسیاری از گیاهان به‌علت خواص ضد میکروبی آن‌ها، ناشی از ترکیبات سنتز شده در متابولیسم ثانویهٔ گیاه، استفاده می‌شوند. این محصولات از طریق ترکیبات فعال آن‌ها شناخته شده‌اند؛ به‌عنوان مثال، ترکیبات فنلی (۷، ۵) که بخشی از اسانس هستند.

مسمومیت‌های غذایی ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* از مهمترین بیماری‌ها بوده که سالانه هزینه‌های زیادی صرف کنترل و درمان بیماری‌های ناشی از آن‌ها می‌شود. در آمریکا *سالمونلا تیفی موریوم* و *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌ترتیب اولین و دومین عامل ایجاد بیماری با منشاء غذایی شناخته می‌شوند (۸). *اشریشیا کلی* انتروتوکسیژنیک از عوامل عمدهٔ اسهال مسافرین محسوب شده که در اثر مصرف انواع غذاهای آلوده ایجاد می‌شود (۸). *استافیلوکوکوس اورئوس* نیز قادر است با تولید انتروتوکسین در مواد غذایی به‌ویژه آن‌هایی که فرایند حرارتی مناسب نمی‌بینند، باعث مسمومیت غذایی شود (۹).

گزارش‌های زیادی دررابطه با خواص ضد میکروبی اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی بر روی باکتری‌ها و قارچ‌های بیماری‌زا وجود دارد (۱۴-۱۰). اسانس‌ها با داشتن خاصیت آب‌گریزی، موجب نفوذ در چربی غشاء سلول باکتری شده که متعاقب آن یون‌ها و محتویات سلولی از آن خارج می‌شوند. درنتیجه عملکرد سلول دچار اختلال شده و باعث مرگ سلولی می‌شوند (۱۴). Lucas و همکاران دریافتند که اسانس گل میخک باعث کاهش شدت لکه‌های باکتریایی گوجه‌فرنگی شده و فعالیت بتا ۱-۳-گلوکاناز، کیتیناز و پراکسیداز را افزایش می‌دهد (۱۰). Bouaichi و همکاران در مطالعه‌ای اثر ضد باکتریایی تعدادی از گیاهان دارویی از جمله آویشن، روزماری، پونهٔ کوهی را برعلیه *سودوموناس ساواستانوئی* پاتوار *ساواستانوئی* ارزیابی کردند. نتایج مطالعهٔ ایشان نشان داد که گیاه آویشن بیشترین اثر ضد باکتری را دارد (۴). Elshafie و همکاران در مطالعه‌ای اثر ضد میکروبی تعدادی از گیاهان دارویی ناحیهٔ مدیترانه‌ای را برعلیه تعدادی از عوامل بیماری‌زای گیاهی ازجمله *سودوموناس* انجام دادند (۵). Badawy و همکاران اثر ضد باکتریایی ۲۲ اسانس گیاهی ازجمله پونه را برعلیه دو باکتری بیماری‌زای گیاهی *سودوموناس پوتیدا* و *اروینیا هربیکولا* بررسی کردند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که اسانس پونه در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین و آگرومایسین اثر ضد باکتریایی خوبی دارد (۱۵).

جنس Mentha از خانوادهٔ Labiatae ۲۰ گونه دارد و از گسترش جهانی برخوردار است. یکی از گونه‌های این جنس Mentha pulegium L. است که معمولاً به‌عنوان پونه شناخته می‌شود. این گونه در اروپا، شمال آفریقا و آسیای میانه و ایران یافت می‌شود (۱۷، ۱۶). بخش‌های هوایی این گیاه به‌طور سنتی به‌عنوان ضدعفونی کننده و برای درمان سرماخوردگی، سینوزیت، وبا، مسمومیت غذایی، برونشیت و سل استفاده می‌شود. همچنین به‌عنوان ضدسرفه، دیورتیک، ضد سرطانی و مشکلات قاعدگی کاربرد دارد. علاوه‌براین، اثرات آنتی‌اکسیدانی آن تأیید شده است (۱۸).

با توجه به اثر بازدارندگی اسانس‌ها بر رشد باکتری‌ها، خوراکی بودن آن‌ها و افزایش شیوع سوش‌های مقاوم باکتریایی، مطالعهٔ حاضر به‌منظور بررسی اثرات ضد باکتریایی اسانس استخراج شده از گیاه پونه (*Mentha pulegium* L.) در شرایط آزمایشگاهی در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های رایج برعلیه باکتری‌های بیماری‌زای *اشریشیاکلی*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *استافیلوکوکوس* و *سودوموناس سیرینگه* انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه و شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس

اسانس گیاه خشک پونه (Mentha pulegium L.) بعد از تأیید نام علمی ازسوی پژوهشکدهٔ گیاهان دارویی تهران وابسته به جهاد دانشگاهی، با روش تقطیر با آب به‌مدت ۴ ساعت و با استفاده از دستگاه کلونجر (فرهان تجهیز، ایران) استخراج شد. بدین‌ترتیب که ابتدا ۱۰۰ gr از برگ خشک گیاه، آسیاب و به بالن ۲ لیتری منتقل و مقدار ۱L آب مقطر به آن اضافه شد. اسانس تهیه شده به کمک سولفات سدیم بدون آب، آبگیری و بعد از عبور از فیلتر ۰/۴۵µm تا زمان استفاده در ظرف دربسته و تیره در دمای ۴°C نگهداری شد.

جداسازی و شناسایی ترکیبات تشکیل‌دهندهٔ اسانس با استفاده از روش کروماتوگرافی گازی توأم با طیف‌سنجی جرمی انجام شد. دستگاه کروماتوگراف استفاده شده (Hewlett Packard 6890 Alto, CA, USA) با ستون موئینه HP-5MS به طول ۳۰ متر (ضخامت لایهٔ داخلی ۰/۲۵ µm و قطر داخلی ۲۵۰ µm) بود. برنامهٔ دمایی ستون به ترتیب عبارتند از: دمای ابتدایی آون ۵۰°C، توقف در این دما به‌مدت ۵ دقیقه و دمای انتهایی ۲۴۰°C و شیب حرارتی ۳°C در هر دقیقه، افزایش دما تا ۳۰۰°C با سرعت ۱۵ درجه در هر دقیقه و توقف در این دما به‌مدت ۳ دقیقه بود. دمای اتاقک تزریق ۲۹۰°C بود و از گاز هلیوم به‌عنوان گاز حامل با

Downloaded from ijmm.ir at 1:41 +0430 on Friday April 27th 2018

سرعت جریان ۰/۸ mm در دقیقه استفاده شد. طیف‌نگار جرمی استفاده شده مدل Hewlett Packard 5973N با ولتاژ یونیزاسیون ۷۰eV، روش یونیزاسیون EI و دمای منبع یونیزاسیون ۲۲۰°C بود. در انتها ۰/۱µL از نمونه‌های آماده شده به‌صورت دستی و با روش Splitless تزریق شدند. شناسایی طیف‌ها براساس بانک اطلاعات جرمی دستگاه GC-MS، زمان بازداری ترکیبات، محاسبه اندیس کواتس و الگوی شکست آن‌ها در مقایسه با طیف‌های استاندارد موجود در منابع مختلف انجام گرفت (۱۹). درصد نسبی هریک از ترکیبات تشکیل‌دهندهٔ اسانس با توجه به سطح زیر منحنی هر یک از پیک‌های کروماتوگرام دستگاه و مقایسهٔ آن با سطح کل زیر منحنی تعیین شد.

باکتری‌های مطالعه‌شده

در این مطالعه باکتری *سودوموناس سیرینگه* پاتوار *گوجه-فرنگی* IBRC-M ۱۰۷۰۲ به‌صورت کشت فعال از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران و سایر باکتری‌های مطالعه‌شده شامل *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC ۲۵۹۲۳، *اشریشیا کلی* ATCC ۲۵۹۲۲، *سودوموناس آئروژینوزا* ATCC ۲۷۸۵۳ از آزمایشگاه بهداشت مواد غذایی تهیه شدند. هریک از باکتری‌های مطالعه‌شده در شرایط سترون روی ظرف پتری حاوی محیط آگار مغذی کشت داده شد. ظروف مذکور به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای °C ۳۰ برای *سودوموناس سیرینگه* و ۳۷°C برای سایر باکتری‌های مطالعه‌شده گرم‌خانه‌گذاری شد.

تهیهٔ سوسپانسیون باکتریایی

به‌منظور تهیه و محاسبهٔ میزان تلقیح باکتری‌های مطالعه-شده، ابتدا یک پرگنه از کشت تازهٔ این باکتری‌ها به محیط آبگوشت مغز و قلب (BHI، HiMedia، هند) منتقل و به‌مدت ۱۸ ساعت در دمای مناسب گرم‌خانه‌گذاری شد. سپس از کشت تازه رشد کردهٔ هریک از باکتری‌ها برداشته و سوسپانسیونی معادل استاندارد نیم مک فارلند (۱/۵ × ۱۰^۸ CFU/mL) تهیه شد. جذب نوری آن به‌وسیلهٔ دستگاه طیف‌سنج (PerkinElmer، آمریکا) در طول موج ۶۰۰ nm ، معادل ۰/۱-۰/۰۸ بود.

آماده‌سازی اسانس

به‌منظور آماده‌سازی اسانس، ۹/۲۵ گرم پودر آبگوشت مغز و قلب (BHI) در ۲۵۰mL آب مقطر، در یک فلاسک ۵۰۰ میلی-لیتری در بسته با حرارت ملایم حل شد. با توجه به اینکه اسانس پونه در محیط‌های کشت نامحلول است، از مادهٔ دی متیل سولفوکساید (DMSO) ۵٪ که فاقد اثرات ضد میکروبی است به-عنوان امولسیفایر استفاده شد. برای ایجاد پایداری امولسیون آب و روغن در محیط مغذی، آگار آگار ۰/۰۵٪ به‌عنوان تثبیت‌کنندهٔ امولسیون به کار رفت (۷). pH محیط به‌وسیلهٔ دستگاه pH متر اندازه‌گیری شد. محیط کشت واجد دی متیل سولفوکساید و آگار آگار در دمای ۱۲۱°C به‌مدت ۱۵ دقیقه استریل و سپس به‌میزان ۵ mL در لوله‌های درپیچ‌دار استریل توزیع شد. سپس غلظت‌های درنظرگرفتهٔ اسانس پونه همراه با محیط کشت تهیه شد.

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) اسانس پونه

برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس از روش سری دو برابر رقت لوله‌ای (Macrobroth dilution) در محیط کشت مغذی استفاده شد. برای این منظور یک سری ۱۱ عددی لوله آزمایش درنظر گرفته شده و در همهٔ لوله‌ها از غلظت mg/mL ۰/۴ تا ۴۰ اسانس پونه همراه با محیط کشت آگار مغذی تهیه و از باکتری‌های درنظرگرفته به میزان CFU/mL ۱۰^۶ به هرکدام از لوله‌ها تلقیح شد. تمامی آزمایشات در ۳ تکرار انجام و برای هر تکرار، یک لوله کنترل منفی فاقد باکتری و یک لوله کنترل مثبت (فاقد اسانس) تهیه شد. تمامی لوله‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۶°C برای باکتری *سودوموناس سیرینگه* و ۳۷°C برای سایر باکتری‌های آزمایش‌شده، گرم خانه‌گذاری شد. پس از طی این مدت، لوله‌ها ازنظر کدورت حاصل از فعالیت و رشد باکتری بررسی ماکروسکوپی شدند. حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) برای لوله‌ای درنظر گرفته شد که حاوی کمترین غلظت اسانس بوده و کدورت قابل ملاحظه‌ای در آن ایجاد نشده بود. برای تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC) باکتری از لوله‌هایی که در آن‌ها کدورت قابل مشاهده‌ای نبود، بر روی محیط کشت جامد آگار مغذی کشت داده شد. تمامی پلیت‌ها بعد از گرم خانه‌گذاری بررسی شدند و کمترین غلظتی که هیچ رشدی از باکتری در آن مشاهده نشد به-عنوان حداقل غلظت کشندگی درنظر گرفته شد.

بررسی اثر ضد باکتریایی اسانس پونه به روش انتشار از دیسک

به‌منظور ارزیابی اثرات ضد میکروبی اسانس پونه بر روی باکتری‌های *اشریشیاکلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *سودوموناس سیرینگه* از روش انتشار از دیسک استفاده شد. بدین‌منظور سوسپانسیون باکتریایی معادل استاندارد نیم مک فارلند از هریک از باکتری‌های مطالعه‌شده در محلول سرم فیزیولوژی استریل تهیه و سپس ۰/۱ mL از سوسپانسیون باکتری حاوی CFU/mL ۱۰^۸ بر روی محیط آگار مولر هینتون (Merck, Germany) کشت داده شد و با میلهٔ شیشه‌ایL مانند به-

Downloaded from ijmm.ir at 1:41 +0430 on Friday April 27th 2018

طورکامل بر روی محیط پخش شد. سپس روی محیط کشت دیسک آنتی‌بیوتیکی خام به قطر ۶ mm (Oxoid)، گذاشته شد. سپس مقدار ۲۰ µL از غلظت‌های ۲/۵ mg/mL، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ اسانس پونه را بر روی دیسک خام آنتی‌بیوتیکی ریخته و پلیت‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰°C برای *سودوموناس سیرینگه* و ۳۷°C برای سایر باکتری‌های تحت مطالعه گرم‌خانه‌گذاری شدند. به‌منظور مقایسه، مقدار ۲۰ µL از غلظت ۰/۱ mg/mL آنتی-بیوتیک سیپروفلوکساسین برداشته و به دیسک خام اضافه شد. قطر هالهٔ عدم رشد برحسب میلی‌متر و با استفاده از راهنمای ارائه شده از سوی انستیتو استاندارد آزمایشگاهی و بالینی (۲۰) اندازه-گیری و ارزیابی شد. همچنین به‌منظور استانداردسازی روش و بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های تحت مطالعه، از دیسک‌های آنتی‌بیوگرام جنتامایسین (۱۰ µg)، استرپتومایسین (۱۰ µg)، اریترومایسین (۱۵ µg)، تتراسیکلین (۳۰ µg) و افلوکساسین (۵ µg) (پادتن طب، ایران) استفاده شد. از دیسک حاوی ۲۰ µL محلول دی متیل سولفوکساید به‌منظور بررسی اثر آن بر رشد یا رشد نیافتن باکتری‌های درحال مطالعه، استفاده شد.

محاسبات آماری

تمام آزمایش‌ها در ۳ تکرار انجام شدند. داده‌های به‌دست آمده در این مطالعه با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ و همچنین آزمون آنالیز واریانس یک طرفه آنالیز شدند. مقایسهٔ میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای توکی در سطح احتمال ۵٪ تجزیه‌وتحلیل شد.

یافته‌ها

ترکیبات شیمیایی تشکیل‌دهندهٔ اسانس پونه (Mentha pulegium L.)

آنالیز اسانس‌ها با دستگاه گاز کروماتوگرافی- اسپکترومتری جرمی انجام و ترکیبات آن تعیین شد. آنالیز انجام‌شده نشان داد که اسانس پونه از ترکیب شیمیایی پیچیده‌ای برخوردار است. اجزاء تشکیل‌دهندهٔ اسانس‌ها همراه با اندیس بازداری و درصد آن-ها در جدول ۱ آمده است. در آنالیز شیمیایی اسانس پونه ۱۶ ترکیب مختلف و مهم شناسایی شد که ۸۶/۹۸٪ وزن تودهٔ اسانس را تشکیل می‌دهند (جدول ۱). همان‌طورکه جدول ۱ نشان می-دهد، اسانس پونه از ترکیبات مونوترپن تشکیل شده است. پی پریتون (۳۲/۱٪)، پی پریتنون (۲۱/۷۱ ٪) و پولگون (۱۵/۸۵٪) بیشترین ترکیبات تشکیل‌دهندهٔ اسانس پونه بودند.

جدول ۱. ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس گیاه پونه (Mentha pulegium L.)

ردیف	ترکیب شیمیایی	IUPAC name	درصد	شاخص بازداری
۱	Camphene	3,3-DIMETHYL-2-METHYLIDENEBICYCLO[2.2.1]HEPTANE	۰/۲۷	۹۵۳
۲	1,8-Cineole	2,2,4-trimethyl-3-oxabicyclo[2.2.2]octane	۲	۱۰۰۰
۳	Para Cymene	1-METHYL-4-PROPAN-2-YLBENZENE	۰/۳۵	۱۰۲۵
۴	Limonene	(4R)-1-METHYL-4-PROP-1-EN-2-YLCYCLOHEXENE	۱/۲۹	۱۰۳۱
۵	Menthone	(2S,5R)-5-METHYL-2-PROPAN-2-YLCYCLOHEXAN-1-ONE	۳/۳۹	۱۱۵۴
۶	Borneol	4,7,7-TRIMETHYLBICYCLO[2.2.1]HEPTAN-3-OL	۱/۶۸	۱۱۶۵
۷	4-Terpineol	4-METHYL-1-PROPAN-2-YLCYCLOHEX-3-EN-1-OL	۴/۵۲	۱۱۸۹
۸	Ethyl cumene	1-ETHYL-3-PROPAN-2-YLBENZENE	۰/۴	۱۲۱۰
۹	Carvol	(5R)-2-METHYL-5-PROP-1-EN-2-YLCYCLOHEX-2-EN-1-ONE	۰/۳	۱۲۲۰
۱۰	Pulegone	5-METHYL-2-PROPAN-2-YLIDENECYCLOHEXAN-1-ONE	۱۵/۸۵	۱۲۳۷
۱۱	Piperitone	3,3-DIMETHYL-2-METHYLIDENEBICYCLO[2.2.1]HEPTANE	۳۲/۱	۱۲۵۲
۱۲	Isophorene	3,5,5-TRIMETHYLCYCLOHEX-2-EN-1-ONE	۰/۴	۱۲۵۹
۱۳	Bornyl acetate	(4,7,7-TRIMETHYL-3-BICYCLO[2.2.1]HEPTANYL) ACETATE	۰/۷۳	۱۲۸۵
۱۴	Pipeirtenone	3-METHYL-6-PROPAN-2-YLIDENECYCLOHEX-2-EN-1-ONE	۲۱/۷۱	۱۳۲۵
۱۵	Piperitone oxide	6-METHYL-3-PROPAN-2-YLIDENE-7-OXABICYCLO[4.1.0]HEPTAN-2-ONE	۱/۲۳	۱۳۴۰
۱۶	Caryophyllene oxide	(4Z)-4,11,11-TRIMETHYL-8-METHYLIDENEBICYCLO[7.2.0]UNDEC-4-ENE	۰/۷۶	۱۵۸۱
	کل ترکیبات شناخته شده		۸۶/۹۸	

Downloaded from ijmm.ir at 1:41 +0430 on Friday April 27th 2018

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) اسانس پونه

حداقل غلظت بازدارندگی(MIC) اسانس ازطریق سری دو برابری رقت لوله‌ای در محیط آگار مغذی (NB) و سپس مشاهده ماکروسکوپی کدورت ناشی از رشد باکتری در مدت زمان ۲۴ ساعت تعیین شد. نتایج حاصل از حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) اسانس پونه برای ۴ باکتری مطالعه‌شده در جدول ۲ آمده است. همان‌طورکه در جدول ۲ نشان داده شده است حداقل غلظت مهارکنندگی برای *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *اشریشیا کلی* و *سودوموناس سیرینگه* به‌ترتیب برابر mg/mL ۱۰، ۴۰، ۱۰ و ۲۰ از اسانس پونه بود. سایر غلظت‌های کمتر از mg/mL ۱۰ هیچ‌گونه اثر مهارکنندگی بر روی هیچ‌کدام از باکتری‌های مطالعه‌شده نداشت. نتایج حاصل از حداقل غلظت کشندگی اسانس پونه برای *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلی*، *سودوموناس سیرینگه* و *سودوموناس آئروژینوزا*، به‌ترتیب برابر mg/mL ۱۰، ۲۰، ۲۰ و بیشتر از ۴۰ بود (جدول ۲).

جدول ۲. حداقل غلظت (٪) مهارکنندگی (MIC) و کشندگی (MBC) اسانس پونه برعلیه باکتری‌های مطالعه‌شده

باکتری	غلظت اسانس (mg/mL)	
	MIC	MBC
استافیلوکوکوس اورئوس ATCC ۲۵۹۲۳	۱۰[a]	۱۰[a]
سودوموناس آئروژینوزا ATCC ۲۷۸۵۳	۴۰[b]	> ۴۰[b]
اشریشیا کلی ATCC ۲۵۹۲۲	۱۰[a]	۲۰[c]
سودوموناس سیرینگه IBRC-M ۱۰۷۰۲	۲۰[c]	۲۰[d,c]

× حروف غیر یکسان در هر ستون، نشان‌دهندهٔ وجود تفاوت معنی‌دار بین اثر ضد باکتریایی غلظت‌های مختلف اسانس پونه و مهار رشد باکتری‌های مطالعه‌شده است ($p < ۰/۰۵$).

× حروف مشابه در هر ستون، نشان‌دهندهٔ وجود نداشتن تفاوت معنی‌دار بین اثر ضد باکتریایی غلظت‌های مختلف اسانس پونه و مهار رشد باکتری‌های مطالعه‌شده است.

رابطهٔ بین غلظت‌های مختلف اسانس پونه و قطر هالهٔ رشدنیافتگی باکتری

جدول۳ رابطهٔ بین غلظت‌های مختلف اسانس پونه و میانگین قطر هالهٔ رشدنیافتگی باکتری‌های مطالعه‌شده را در مقایسه با آنتی‌بیوتیک تتراسیکلین نشان می‌دهد. همان‌طورکه در جدول ۳ نشان داده می‌شود، با افزایش غلظت اسانس پونه قطر هالهٔ عدم رشد باکتری نیز افزایش یافته است. بیشترین قطر هالهٔ عدم رشد مربوط به باکتری *سودوموناس سیرینگه* و *اشریشیا کلی* در غلظت mg/mL ۴۰ اسانس پونه بود. غلظت‌های mg/mL ۲/۵ در *استافیلوکوکوس اورئوس* و mg/mL ۲/۵ و ۵ اسانس در *سودوموناس آئروژینوزا* هیچ‌گونه اثر ضد باکتریایی نداشتند. آنالیز آماری نتایج نشان داد که بین غلظت‌های مختلف اسانس و قطر هالهٔ عدم رشد در هر باکتری در مقایسه با آنتی‌بیوتیک اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($p < ۰/۰۰۱$).

آنالیز واریانس اثر غلظت‌های مختلف اسانس پونه بر میانگین قطر هالهٔ عدم رشد باکتری‌های مطالعه‌شده در جدول ۴ آمده است. همان‌طورکه در جدول ۴ نشان داده شده است، بین میانگین قطر هالهٔ عدم رشد باکتری‌های مطالعه‌شده و غلظت‌های مختلف اسانس در مقایسه با آنتی‌بیوتیک اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($p < ۰/۰۰۱$).

جدول ۳ . میانگین قطر هالهٔ رشدنیافتگی (mm) در غلظت‌های مختلف اسانس پونه (mg/mL) برعلیه باکتری‌های مطالعه‌شده

باکتری	میانگین ± SD قطر هالهٔ رشدنیافتگی (mm)					سیپروفلوکساسین (۱/۰ mg/mL)	کنترل DMSO
	۲/۵	۵	۱۰	۲۰	۴۰		
استافیلوکوکوس اورئوس	۸/۷۵ ± ۰/۲۵[a]	۱۰/۲۵ ±۰/۶۶[a]	۱۴/۵۰ ±۰/۶۶[b]	۱۸/۳۳ ±۰/۸۰[c]	۲۵/۴۱ ±۰/۶۳[d]	۲۶/۴۲ ±۰/۶۳[e]	+
سودوموناس آئروژینوزا	۳/۷۵ ±۰/۲۵[a]	۵/۲۵ ±۰/۶۶[a]	۸/۷۵ ±۰/۷۵[b]	۱۳/۲۵ ±۰/۶۶[c]	۱۷/۰۸ ±۰/۶۳[d]	۲۳/۱۳ ±۰/۸۱[e]	+
اشریشیا کلی	۶/۶۳ ±۰/۵۷[a]	۱۰/۶۵ ±۰/۶۱[b]	۵/۱۵ ±۰/۵۰[c]	۱۸ ±۰/۵۰[d]	۲۴/۶۰ ±۰/۴۰[e]	۲۴/۵۸ ±۰/۵۲[e]	+
سودوموناس سیرینگه	۱۰/۵۶ ±۰/۵۱[a]	۱۵/۴۷ ±۰/۵۵[b]	۱۷/۵۵ ±۰/۵۸[c]	۲۲/۵ ±۰/۵۰[d]	۲۹/۱۵ ±۰/۵۸[e]	۲۵/۶۰ ±۰/۶۵[f]	+

× حروف غیر یکسان در هر ردیف، نشان‌دهندهٔ وجود تفاوت معنی‌دار بین اثر ضد باکتریایی غلظت‌های مختلف اسانس برعلیه باکتری مربوط است ($p < ۰/۰۵$).

× حروف مشابه در هر ردیف، نشان‌دهندهٔ وجود نداشتن تفاوت معنی‌دار بین اثر ضد باکتریایی غلظت‌های مختلف اسانس برعلیه باکتری مربوط است.

Downloaded from ijmm.ir at 1:41 +0430 on Friday April 27th 2018

جدول ۴ . آنالیز واریانس اثر انواع آنتی‌بیوتیک‌ها بر میانگین قطر هالهٔ رشدنیافتگی (mm) باکتری‌های مطالعه شده

باکتری	مجموع مربعات	درجهٔ آزادی	میانگین مربعات	F	سطح معنی‌داری
استافیلوکوکوس اورئوس	۸۴۲/۱۱۱	۵	۱۶۸/۴۲۲	۴۲۵/۴۸۸*	p <۰/۰۰۱
سودوموناس آئروژینوزا	۸۲۶/۳۱۷	۵	۱۶۵/۲۶۳	۳۸۸/۹۸۲*	p <۰/۰۰۱
اشریشیا کلی	۸۴۶/۹۸۸	۵	۱۶۹/۳۹۸	۶۲۶/۷۵۴*	p <۰/۰۰۱
سودوموناس سیرینگه	۷۱۰/۲۷۴	۵	۱۴۲/۰۵۵	۴۴۵/۸۵۷*	p <۰/۰۰۱

*علامت * نشان‌دهندهٔ اختلاف معنی‌دار بین باکتری‌ها در سطح ۱٪ است.*

رابطهٔ بین آنتی‌بیوتیک‌های مختلف و قطر هالهٔ عدم رشد باکتری

رابطهٔ بین آنتی‌بیوتیک‌های مختلف و میانگین قطر هالهٔ عدم رشد باکتری‌های مطالعه‌شده در جدول ۵ نشان داده شده است. همان‌طورکه در جدول ۵ نشان داده می‌شود، آنتی‌بیوتیک‌های مختلف اثرات متفاوتی بر روی باکتری‌های مطالعه‌شده داشتند. در رابطه با باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشترین قطر هالهٔ عدم رشد مربوط به جنتامایسین (۳۰ mm) و کمترین مربوط به تتراسیکلین (۱۸/۸۳ mm) بود. در رابطه با *اشریشیا کلی* بیشترین قطر هالهٔ عدم رشد مربوط به آنتی‌بیوتیک اریترومایسین (۲۵/۱ mm) و کمترین مربوط به آنتی‌بیوتیک تتراسیکلین (۱۴/۵۸ mm) بود. بیشترین قطر هالهٔ عدم رشد در رابطه با باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* مربوط به افلوکساسین (۲۰/۲۵ mm) و کمترین مربوط به استرپتومایسین (۱۲/۱۵ mm) بود. بیشترین قطر هالهٔ عدم رشد رابطه با باکتری *سودوموناس سیرینگه* مربوط به تتراسیکلین (۳۷/۱۶ mm) و کمترین مربوط به آنتی‌بیوتیک اریترومایسین (۲۳/۲۵ mm) بود (جدول ۵). آنالیز آماری نتایج نشان داد که بین میانگین قطر هالهٔ عدم رشد و آنتی‌بیوتیک در رابطه با باکتری‌های مطالعه‌شده اختلاف معنی‌داری وجود دارد (p <۰/۰۵).

جدول ۵ . میانگین قطر هالهٔ رشدنیافتگی (mm) در آنتی‌بیوتیک‌های مختلف برعلیه باکتری‌های مطالعه شده

باکتری	میانگین ± SD قطر هالهٔ رشدنیافتگی (mm)				
	GM	TE	S	E	OFX
استافیلوکوکوس اورئوس	۳۰/۰۰ ±۲/۰۰^{a}	۱۸/۸۳ ±۱/۲۵^{b}	۲۲/۲۶ ±۰/۶۴^{c}	۲۶/۵۸ ±۱/۲۳^{d}	۱۹/۱۶ ±۰/۷۶^{e,b}
سودوموناس آئروژینوزا	۱۸/۱۰ ±۰/۸۵^{a}	۱۶/۲۷ ±۰/۹۳^{b,a}	۱۲/۱۵ ±۰/۹۰^{c}	۱۵/۵۳ ±۰/۹۵^{d,a}	۲۰/۲۵ ±۱/۱۴^{e,a}
اشریشیا کلی	۲۰/۲۵ ±۱/۳۲^{a}	۱۴/۵۸ ±۱/۲۸^{b}	۱۷/۶۰ ±۱/۳۵^{b,a}	۲۵/۱۰ ±۰/۸۵^{c}	۱۸/۷۵ ±۰/۶۶^{d,a}
سودوموناس سیرینگه	۳۲/۷۰ ±۱/۲۵^{a}	۳۷/۱۶ ±۱/۰۴^{b}	۲۶/۳۳ ±۱/۵۲^{c}	۲۳/۲۵ ±۱/۰۸^{d,c}	۲۵/۱۱ ±۰/۸۷^{e,c}

× *GM=جنتامایسین، TE= تتراسیکین، S= استرپتومایسین، E= اریترومایسین و OFX= افلوکساسین*

× *حروف غیر یکسان در هر ردیف، نشان‌دهندهٔ وجود تفاوت معنی‌دار بین اثر ضد باکتریایی غلظت‌های مختلف اسانس است (p < ۰/۰۵)..*

× *حروف مشابه در هر ردیف، نشان‌دهندهٔ وجود نداشتن تفاوت معنی‌دار بین اثر ضد باکتریایی غلظت‌های مختلف اسانس است.*

آنالیز واریانس اثر انواع آنتی‌بیوتیک‌ها بر میانگین قطر هالهٔ عدم رشد باکتری‌های مطالعه‌شده در جدول ۶ نشان داده شده است. همان‌طورکه در جدول ۶ نشان داده شده است، بین میانگین قطر هالهٔ عدم رشد و آنتی‌بیوتیک، در رابطه با باکتری‌های مطالعه‌شده اختلاف معنی‌داری وجود دارد (p < ۰/۰۰۱).

جدول ۶ . آنالیز واریانس اثر انواع آنتی‌بیوتیک‌ها بر میانگین قطر هالهٔ رشدنیافتگی (mm) باکتری‌های مطالعه‌شده

باکتری	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F	سطح معنی‌داری
استافیلوکوکوس اورئوس	۲۸۱/۲۴۷	۴	۷۰/۳۱۲*	۴۳/۳۹۸	p <۰/۰۰۱
سودوموناس آئروژینوزا	۱۰۹/۵۷۸	۴	۲۷/۳۹۴*	۲۹/۶۰۵	p <۰/۰۰۱
اشریشیا کلی	۱۸۱/۵۵۸	۴	۳۵/۴۹۷*	۳۵/۴۹۷	p <۰/۰۰۱
سودوموناس سیرینگه	۴۰۶/۸۰۲	۴	۱۰۱/۷۰۱*	۷۳/۲۷۱	p <۰/۰۰۱

*علامت * نشان‌دهندهٔ اختلاف معنی‌دار بین باکتری‌ها در سطح ۱٪ است.*

Downloaded from ijmm.ir at 1:41 +0430 on Friday April 27th 2018

بحث

جستجو برای ترکیبات جدید به‌منظور کنترل میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و یا فسادزا برای اکثر محققین جهان قابل توجه است. ترکیبات طبیعی تولیدشده با متابولیسم ثانویهٔ گیاهان، به‌عنوان آنتی‌بیوتیک‌های طبیعی برعلیه تعداد زیادی از عوامل بیماری‌زا استفاده شده‌اند (۲۲، ۲۱). امروزه، یکی از مشکلات اصلی دررابطه با میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا، افزایش مقاومت آنها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها است. به لحاظ طبیعی بودن این ترکیبات، اثرات زیان‌بار سلامتی و محیط زیستی و یا مقاومت‌های دارویی آن‌ها نسبت به مواد نگهدارندهٔ شیمیایی و آنتی‌بیوتیک‌ها بسیار کمتر است. علیرغم تحقیقات روزافزون در این زمینه، به مطالعات بیشتری دربارهٔ فعالیت ضد میکروبی یا ترکیب شیمیایی گیاهان دارویی نیاز است. ازاین‌رو، این مطالعه با هدف بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس پونه بر روی تعدادی از باکتری‌های بیماری‌زای مهم صورت گرفت.

آنالیز اسانس پونه با استفاده از GC-MS نشان داد که حداقل ۱۶ ترکیب مختلف با ۸۶/۹۸٪ در آن وجود دارد. نتایج این مطالعه نشان داد که پی‌پریتون (۳۲/۱٪)، پی‌پریتنون (۲۱/۷۱ ٪) و پولگون (۱۵/۸۵ ٪) بیشترین ترکیبات تشکیل‌دهندهٔ اسانس پونه هستند.

در مطالعهٔ انجام‌شده ازسوی Gulluce و همکاران بر روی پونهٔ کوهی مشخص شد که بیشترین ترکیبات تشکیل‌دهندهٔ اسانس شامل پیپریتون اپوکساید (۱۸/۴٪)، پولگون (۱۵/۵٪) و پی پریتون اکساید است (۲۳). Mahboubi و Haghi میزان بازدهی اسانس را از قسمت‌های هوایی گیاه پونه ۰/۲۷٪ و اجزای اصلی تشکیل‌دهندهٔ آن را به‌ترتیب پی پریتون (۳۸ ٪)، پی پریتنون (۳۳٪)، آلفا ترپینول (۴/۷٪) و پولگون (۲/۳٪) گزارش کردند (۱۷). درحالی‌که Ait-Ouazzou و همکاران بیشترین اجزاء تشکیل‌دهندهٔ اسانس پونه را پولگون (۶۹/۸٪)، پی پریتون (۳/۱٪)، ایزوپولگون (۱/۸٪) و پی پریتون اپوکسید (۱/۷٪) گزارش کردند (۲۲). Lorenzo و همکاران در مطالعه‌ای در اروگوئه بیشترین جزء اسانس پونه را پولگون (۷۳/۴٪) گزارش کردند (۱۹). در مطالعهٔ دیگری که در تونس (۲۱) انجام شد، بیشترین جزء اسانس پولگون با ۷۳/۳۳٪ و ۶۱/۱۱٪ به‌ترتیب بود. نتایج به‌دست آمده در مطالعهٔ حاضر نشان داد که بیشترین اجزاء تشکیل‌دهندهٔ اسانس را پی پریتون، پی پریتنون و پولگون تشکیل می‌دهند که تا حدودی با سایر بررسی‌ها همخوانی دارد. با بررسی مطالعات مختلف مشاهده شد که در ترکیب شیمیایی و اثرات ضد میکروبی اسانس پونه در گزارشات منتشر شده تفاوت وجود دارد (۱۹،۲۱،۲۴، ۱۷). در تمام این گزارشات به اجزاء اصلی تشکیل‌دهندهٔ اسانس پونه اشاره شده است، ولی در مقدار آنها اختلاف وجود دارد. این اختلاف در ترکیبات تشکیل‌دهندهٔ اسانس نه فقط به درجه حرارت، رطوبت نسبی، مدت زمان نور خورشید، شرایط آب و هوایی و بارش باران بلکه به استخراج اسانس از بخش‌های مختلف گیاه، روش استخراج و نوع باکتری آزمایش‌شده نیز بستگی دارد (۲۲).

خاصیت ضد باکتریایی اسانس پونه به‌دلیل مقادیر بالای ترکیبات تشکیل‌دهندهٔ آن به‌ویژه پولگون (۶۱/۱٪)، ایزومنتون (۱۷ ٪)، منتون (۵/۹٪)، و پی پریتون (۲/۶٪) (۲۴) و یا پی پریتون (۳۸٪) و اثرات سینرژیستی سایر ترکیبات است (۱۷).

این مطالعه نشان داد که اسانس پونه خاصیت مهارکنندگی رشد تعدادی از سویه‌های باکتریایی مطالعه‌شده را داشت (جدول ۲). در این مطالعه دامنهٔ MIC بین ۴۰-۱۰ mg/mL و MBC ۱۰ تا بیشتر از ۴۰ mg/mL بود. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که غلظت مهارکنندگی و کشندگی اسانس پونه برای باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* معادل ۱۰ mg/mL بود. درحالی‌که MIC برای باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* ۴۰ mg/mL و MBC بیشتر از ۴۰ mg/mL بود. درخصوص باکتری‌های *اشریشیا کلی* و *سودوموناس سیرینگه* MIC به‌ترتیب برابر ۱۰ mg/mL و ۲۰ و MBC معادل ۲۰ mg/mL بود. در این مطالعه مشاهده شد که مقاوم‌ترین باکتری نسبت به اسانس پونه، *سودوموناس آئروژینوزا* و حساس‌ترین باکتری، *استافیلوکوکوس اورئوس* است که با مطالعاتی که در زیر می‌آید همخوانی دارد. Mohsenzadeh در مطالعه‌ای به بررسی اثر ضد باکتریایی تعدادی از گیاهان دارویی ایران از جمله آویشن، نعناع، زیره، رازیانه و پونه بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* پرداخت. در مطالعهٔ او میزان MIC پونه برعلیه *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌ترتیب معادل ۰/۷٪ و ۰/۵٪ بود (۲۵). Neyriz Naghadehi و همکاران در مطالعه‌ای خواص ضد باکتریایی اسانس نعناع و پونهٔ کوهی را بر روی *باسیلوس سرئوس* و *اشریشیا کلی* O157:H7 در شرایط آزمایشگاهی به روش حداقل غلظت مهارکنندگی بررسی و گزارش کردند که اسانس نعناع قادر است به‌طور کامل از رشد این دو عامل بیماری‌زا جلوگیری کند (۲۶). نتایج مشابه در مطالعات قبلی انجام‌شده نیز به‌دست آمده است؛ به‌طوری‌که گزارش شده اسانس پونه فعالیت ضد باکتریایی خوبی هنگام ارزیابی با روش

Downloaded from ijmm.ir at 1:41 +0430 on Friday April 27th 2018

انتشار از دیسک (۲۱، ۱۷) به‌ویژه برعلیه باکتری‌های گرم منفی با دامنهٔ قطر هالهٔ عدم رشد از ۱۰ mm تا ۳۱ (۲۱) دارد. به‌علاوه این مطالعه نشان داد که اسانس پونه فعالیت باکتریواستاتیک خوبی در دامنهٔ غلظت اسانس بین ۱۰ mg/mL تا ۴۰ برعلیه تمام سویه‌های مطالعه‌شده دارد.

در مطالعهٔ ما از روش انتشار از دیسک به‌منظور بررسی خاصیت ضد باکتریایی اسانس استفاده شد. این روش به‌عنوان روش اولیه برای بررسی خواص ضد باکتریایی اسانس‌ها استفاده می‌شود (۲۴). مطالعهٔ غلظت‌های مختلف اسانس پونه و میانگین قطر هالهٔ عدم رشد در باکتری‌های مطالعه‌شده نشان داد که با افزایش غلظت اسانس قطر هالهٔ رشدنیافتگی افزایش می‌یابد (جدول ۳). مقایسهٔ میانگین‌های قطر هالهٔ عدم رشد بر روی باکتری‌های تحت مطالعه با استفاده از آزمون دانکن در سطح معنی‌داری ۵٪ تعیین شد. نتایج نشان داد که بین غلظت‌های مختلف اسانس پونه و قطر هالهٔ رشدنیافتگی هریک از باکتری‌های مطالعه‌شده در مقایسه با آنتی‌بیوتیک اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($p < ۰/۰۵$). اسانس پونه بیشترین اثر ضد باکتریایی در غلظت ۴۰ mg/mL بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* (۲۵/۴۱ mm) و کمترین اثر بر روی *سودوموناس آئروژینوزا* (۱۷/۰۸ mm) را داشت. اثر ضد باکتریایی اسانس پونه بر روی *سودوموناس سیرینگه* نیز بسیار چشمگیر بود. به‌طوری‌که در غلظت ۴۰ mg/mL اسانس معادل ۲۹/۱۵ mm بود که با مطالعات قبلی انجام‌شده (۳۲-۳۰) همخوانی دارد (جدول ۳). Firouzi و همکاران در مطالعه‌ای نشان دادند که اسانس‌های پونهٔ کوهی و جوز هندی برعلیه *یرسینیا انتروکولیتیکا* و *لیستریا مونوسیتوژنز* در جوجهٔ سرخ‌شده اثر مهارکنندگی و کشندگی دارند (۲۷). Shekarforoush و همکاران نیز نشان دادند که اسانس پونه اثرات مهارکنندگی خوبی برعلیه باکتری *اشریشیا کلی* دارد (۲۸). در مطالعهٔ Chitsaz اثر عصارهٔ متانولی گیاه پونهٔ کوهی بر جلوگیری از رشد باکتری‌های *استافیلوکوکوس آرئوس* گزارش شده است، که با نتایج به‌دست آمده در مطالعهٔ ما همخوانی دارد (۲۹). مطالعات انجام‌شده روی اسانس‌های گیاهی نشان داده است که اسانس‌ها باعث طولانی کردن فاز تأخیری رشد باکتری‌ها شده و سرعت رشد باکتری در فاز لگاریتمی را کاهش می‌دهند. اثر ضد باکتریایی آن‌ها به‌خاطر تجمع آن‌ها در دو لایهٔ لیپیدی غشاء سلول و تخریب ساختار آن است (۱۴، ۱۲). در اسانس پونه ترکیب پولگون می‌تواند به‌عنوان مهم‌ترین ترکیب تأثیرگذار در فعالیت ضد میکروبی آن باشد.

همچنین در مطالعه حاضر اثر ضد باکتریایی آنتی‌بیوتیک‌های رایج بر روی باکتری‌های مطالعه‌شده بررسی شد. آنالیز آماری نتایج به‌دست آمده نشان داد که بین میانگین قطر هالهٔ عدم رشد و آنتی‌بیوتیک استفاده‌شده در بین باکتری‌های تحت مطالعه اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($p < ۰/۰۵$). بیشترین قطر هالهٔ عدم رشد (۳۷/۱۶ mm) مربوط به اثر آنتی‌بیوتیک تتراسیکلین برعلیه باکتری *سودوموناس سیرینگه* بود و کمترین قطر هالهٔ عدم رشد (۱۲/۱۵ mm) مربوط به اثر آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین برعلیه *سودوموناس آئروژینوزا* بود. مطالعات مختلف دیگری مانند این مطالعه وجود دارند که حاکی از مقاومت ذاتی *سودوموناس آئروژینوزا* نسبت به طیف وسیعی از ترکیبات ضد میکروبی و ضد عفونی کننده هستند (۳۱، ۳۰). علاه‌برآن استفادهٔ وسیع از آنتی‌بیوتیک‌ها باعث بروز مقاومت در این باکتری شده است (۳۲). این میکروارگانیسم از عوامل شایع عفونت‌های بیمارستانی محسوب شده و به‌ویژه در زخم‌های سوختگی قادر به سپتی سمی، پنومونی و مننژیت است (۳۳).

درنتیجه، درخصوص اسانس‌های گیاهی که ممکن است به‌عنوان نگهدارنده و یا افزایش زمان نگهداری فرآورده‌های غذایی و یا به‌عنوان ترکیب آنتی‌بیوتیک طبیعی برعلیه عوامل بیماری‌زا به‌کار روند، نیاز به تحقیقات وسیع‌تری است. با درنظرگرفتن این موضوع، مطالعهٔ حاضر اطلاعات جدیدی راجع به ترکیب شیمیایی و خواص ضد باکتریایی پونهٔ جمع‌آوری شده از ایران به‌دست می‌دهد. داده‌های ما امکان استفاده از اسانس پونه (Mentha pulegium L.) را به‌عنوان ترکیب ضد میکروبی طبیعی برعلیه تعدادی از باکتری‌های بیماری‌زا بیان می‌کنند.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد به‌دلیل حمایت مالی تشکر و قدردانی می‌شود. مقالهٔ حاضر، حاصل پایان‌نامهٔ دانشجویی کارشناسی ارشد است.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارضی در منافع گزارش نشده است.

Downloaded from ijmm.ir at 1:41 +0430 on Friday April 27th 2018

References

1. Ramachandra TV, Nagarathna AV. Eco-degradation, biodiversity and health. Book Reviews. Curr Sci. 2003;85(9):1368-9.
2. Mahajan A, Das S. Plants and microbes-Potential source of pesticide for future use. Pesticides Info. 2003;28(4):33-8.
3. Narasimha Murthy K, Soumya K, Srinivas C. Antibacterial Activity of Curcuma longa (Turmeric) Plant Extracts Against Bacterial Wilt of Tomato Caused by Ralstonia solanacearum. Int J Sci Res. 2015;4(1):2136-41.
4. Bouaichi A, Benkirane R, Habbadi K, Benbouazza A, Achbani EH. Antibacterial activities of the essential oils from medicinal plants against the growth of Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi causal agent of olive knot. J Agric Vet Sci. 2015;8(12):41-5.
5. Elshafie HS, Sakr S, Mang SM, Belviso S, De Feo V, Camele I. Antimicrobial activity and chemical composition of three essential oils extracted from Mediterranean aromatic plants. J Med Food. 2016;19(11):1096-103.
6. Rasooli I, Rezaei MB, Allameh A. Growth inhibition and morphological alterations of Aspergillus niger by essential oils from Thymus eriocalyx and Thymus x-porlock. Food Control. 2006;17(5):359-64.
7. Anushia C, Sampathkumar P, Ramkumar L. Antibacterial and antioxidant activities in Cassia auriculata. Glob J Pharmacol. 2009;3(3):127-30.
8. Momtaz H, Dehkordi FS, Rahimi E, Ezadi H, Arab R. Incidence of Shiga toxin-producing Escherichia coli serogroups in ruminant's meat. Meat Sci. 2013;95(2):381-8.
9. Hennekinne JA, De Buyser ML, Dragacci S. Staphylococcus aureus and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. FEMS Microbiol Rev. 2012;36(4):815-36.
10. Lucas GC, Alves E, Pereira RB, Zacaroni AB, Perina FJ, de Souza RM. Indian clove essential oil in the control of tomato bacterial spot. J Plant Pathol. 2012;94(1):45-51.
11. Nakahara K, Alzoreky NS, Yoshihashi T, Nguyen HT, Trakoontivakorn G. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from Cymbopogon nardus (citronella grass). Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ. 2013;37(4):249-52.
12. Diao WR, Hu QP, Feng SS, Li WQ, Xu JG. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil from green huajiao (Zanthoxylum schinifolium) against selected foodborne pathogens. J Agric Food Chem. 2013;61(25):6044-9.
13. Jordan MJ, Lax V, Rota MC, Loran S, Sotomayor JA. Effect of bioclimatic area on the essential oil composition and antibacterial activity of Rosmarinus officinalis L. Food Control. 2013;30(2):463-8.
14. Diao WR, Hu QP, Zhang H, Xu JG. Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (Foeniculum vulgare Mill.). Food Control. 2014;35(1):109-16.
15. Badawy ME, Abdelgaleil SA, Suganuma T, Fuji M. Antibacterial and biochemical activity of pseudoguaianolide sesquiterpenes isolated from Ambrosia maritima against plant pathogenic bacteria. Plant Prot Sci. 2014;50:64-9.
16. Chalchat JC, Gorunovic MS, Maksimovic ZA, Petrovic SD. Essential oil of wild growing Mentha pulegium L. from Yugoslavia. J Essent Oil Res. 2000;12(5):598-600.
17. Mahboubi M, Haghi G. Antimicrobial activity and chemical composition of Mentha pulegium L. essential oil. J Ethnopharmacol. 2008;119(2):325-7.
18. El-Ghorab AH, The chemical composition of Mentha pulegium L. essential oil from Egypt and its antioxidant activity. J Essent Oil Bear Plant. 2006;9:183–95.
19. Lorenzo D, Paz D, Dellacassa E, Davies P, Vila R, Cañigueral S. Essential oils of Mentha pulegium and Mentha rotundifolia from Uruguay. Braz Arch Biol Technol. 2002;45(4):519-24.
20. Cockerill F, Wilkler M, Alder J, Dudley M, Eliopoulos G, Ferraro M, et al. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2012.
21. Hajlaoui H, Trabelsi N, Noumi E, Snoussi M, Fallah H, Ksouri R, et al. Biological activities of the essential oils and methanol extract of tow cultivated mint species (Mentha longifolia and Mentha pulegium) used in the Tunisian folkloric medicine. World J Microbiol Biotechnol. 2009;25(12):2227-38.
22. Ait-Ouazzou A, Lorán S, Arakrak A, Laglaoui A, Rota C, Herrera A, et al. Evaluation of the chemical composition and antimicrobial activity of Mentha pulegium, Juniperus phoenicea, and *Cyperus longus* essential oils from Morocco. Food Res Int. 2012;45(1):313-9.
23. Gulluce M, Sahin F, Sokmen M, Ozer H, Daferera D, Sokmen A, et al. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from Mentha longifolia L. ssp. longifolia. Food Chem. 2007;103(4):1449-56.

24. Elhoussine D, Zineb B, Abdellatif B. GC/MS analysis and antibacterial activity of the essential oil of Mentha pulegium grown in Morocco. Res J Agri Biol Sci. 2010;6(3):191-8.

25. Mohsenzadeh M. Evaluation of antibacterial activity of selected Iranian essential oils against Staphylococcus aureus and Escherichia coli in nutrient broth medium. Pak J Biol Sci. 2007;10(20):3693-7.

26. Neyriz Naghadehi M, Razavi-Rohani SM, Karim G, Razavilar V, Zeynali A, Delshad R. The effect of monolaurin in combination with Mentha pulegium L. And Mentha spicata L. Essential oils on Bacillus cereus and E. coli O157: H7: in vitro study. J Vet Clin Pathol. 2010;3(4):657-66.

27. Firouzi R, Shekarforoush SS, Nazer AH, Borumand Z, Jooyandeh AR. Effects of essential oils of oregano and nutmeg on growth and survival of Yersinia enterocolitica and Listeria monocytogenes in barbecued chicken. J Food Prot. 2007;70(11):2626-30.

28. Shekarforoush SS, Nazer AHK, Firouzi R, Rostami M. Effects of storage temperatures and essential oils of Oregano and Nutmeg on the growth and survival of Escherichia coli O157: H7 in barbecued chicken used in Iran. Food Cont. 2007;18:1428-33.

29. Chitsaz M. In vitro Evaluation of Antibacterial Effect of Stachys schtschegleevii. Med Daneshvar. 2006;67:12-9.

30. Potron A, Poirel L, Nordmann P. Emerging broad-spectrum resistance in Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii: mechanisms and epidemiology. Int J Antimicrob Agents. 2015;45(6):568-85.

31. Mustafa M-H, Chalhoub H, Denis O, Deplano A, Vergison A, Rodriguez-Villalobos H, et al. Antimicrobial susceptibility of Pseudomonas aeruginosa isolated from cystic fibrosis patients in Northern Europe. Antimicrob Agents Chemother. 2016;60(11):6735-41.

32. Shahcheraghi F, Nikbin VS, Feizabadi MM. Prevalence of ESBLs genes among multidrug-resistant isolates of Pseudomonas aeruginosa isolated from patients in Tehran. Microb Drug Resist. 2009;15(1):37-9.

33. Ranjbar R, Owlia P, Saderi H, Mansouri S, Jonaidi-Jafari N, Izadi M, et al. Characterization of Pseudomonas aeruginosa strains isolated from burned patients hospitalized in a major burn center in Tehran, Iran. Acta Medica Iranica. 2011;49(10):675.

Downloaded from ijmm.ir at 1:41 +0430 on Friday April 27th 2018