

میزان اثربخشی خاصیت ضد باکتریایی عصاره هیدروالکلی پونه کوهی *Mentha pulegium* بر روی پاتوژن‌ها به روش میکرودايلوشن در شرایط آزمایشگاهی

تاریخ دریافت مقاله: ۹۹/۱۲/۱۶؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۵

چکیده

زمینه و هدف: استفاده از خواص ضد میکروبی گیاهان دارویی‌ها تواند مشکلات رایج در بکارگیری از آنتی بیوتیک‌ها را بر طرف کند. **هدف** از انجام این مطالعه، ارزیابی خاصیت ضد باکتریایی عصاره هیدروالکلی پونه کوهی بر روی باکتریهای پاتوژن به روش میکروپلیت در شرایط آزمایشگاهی می باشد.

مواد و روش‌ها: پس از جمع آوری پونه کوهی آنها را در مکانی به دور از نورخورشید در سایه برای مدت ۷۲-۴۸ ساعت خشک کرده و عصاره گیری به روش خیساندن (Maceration) صورت گرفت، سپس فعالیت ضد باکتریایی به روش (میکرودايلوشن) بر اساس میزان کدورت حاصل با غلظت ۱۰۰ درصد، میزان حداقل غلظت (رقت) مهارکننده MIC در محیط مولر هینتون براث ارزیابی گردید.

یافته ها: نتایج حاصل از آزمون میکرودايلوشن نشان داد که حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره بر/شریشیالکی در گوده اول (۱۵۰۱)، حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره بر/سالمونلا تیفی موریم در گوده اول (۱۵۰۱)، حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره بر/کلبسیلا پنومونیه در گوده دوم (۲۵۱)، حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره بر/سودوموناس آئروژینوزا در گوده ششم (۱۵۶/۱۱)، حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره بر/باسیلیوس سرئوس در گوده هشتم (۳۹/۰۱)، حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره بر/استافیلوکوک اورئوس در گوده دهم (بدون رشد) را نشان داد.

نتیجه گیری: نتایج به دست آمده نشان داد که اسانس پونه کوهی دارای خاصیت ضدباکتریایی می باشد و می تواند به عنوان یک منبع ارزان و در دسترس برای کاربردهای درمانی در برخی از عفونتهای باکتریایی مورد استفاده قرار گیرد. به عبارتی از پونه کوهی می توان به عنوان جایگزین مناسب آنتی بیوتیک های صنعتی و نگهدارنده مواد غذایی جهت مقابله با باکتریها در نظر گرفته شود. البته اثرات این عصاره ها باید در محیط *in vivo* و *in vitro* به دقت بررسی شوند.

کلمات کلیدی: پونه کوهی، باکتری‌های پاتوژن، عصاره، میکرودايلوشن

احسان استبرقی^۱، مجید صادق پور^۲،
امیر مهربانی^۳، ساره معتمدی حور^۴

^۱ دکترای تخصصی میکروبیولوژی، گروه دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهریارک، شهریارک، ایران
^۲ کارشناس ارشد میکروب شناسی، عضو علمی انجمن میکروب شناسی ایران، تهران، ایران
^۳ کارشناس ارشد بهداشت مواد غذایی، گروه دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران
^۴ کارشناس ارشد مهندسی کشاورزی، گروه کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ابهر، زنجان، ایران

نویسنده مسئول:

کارشناس ارشد میکروب شناسی، عضو علمی انجمن میکروب شناسی ایران، تهران، ایران

۰۹۱۲۷۱۶۰۲۸۱

Email: magid_sadeghpour@yahoo.com

مقدمه

میکروارگانیزم‌ها در اغلب محیط‌های زیستی و غیرزیستی یافت شده اما حضور آنها در افراد بیمار به عنوان محیط زیستی و سطوح بیمارستان به عنوان محیط غیرزیستی بنابر جایگاه و اهمیت منابع مزبور در انتقال و انتشار عفونت از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. وجود سطوحی که توانایی حفظ و نگهداری باکتری‌ها را دارا باشد و حضور یک عامل انتقال دهنده باکتری از این سطوح، از جمله شاخص‌های ایجاد عفونت‌های بیمارستانی بشمار می‌رود. این باکتری‌ها انواع مختلفی از توکسین‌ها را با ایجاد سندرم‌های متعدد بالینی مانند عوارض اسهال‌زا و استفراغ آور به همراه دارد.^{۱،۲}

عفونت مجاری ادراری ناشی از/شرشیاکلی شایع‌ترین عفونت‌های باکتریایی و دومین عفونت شایع از علل عمده مراجعه بیمارمان به بیمارستان‌هاست. از بین عوامل باکتریال یوروپاتوژن در بیمارمان سرپایی و بستری،/شرشیاکلی شایع‌ترین عاملی ست که ۷۵ تا ۹۰٪ از موارد عفونت ادراری جدا می‌شود.^۳ جنس/استافیلوکوک دارای بیش از ۳۰ گونه و ۷ تحت گونه که شایع‌ترین گونه آن اغلب عامل بیماری/استافیلوکوکی به اسم/استافیلوکوک طلایی بوده که این پاتوژن پیوژن است. بیوفیلیم در/استافیلوکوک‌ها که از ترکیبات خارج سلولی به مقادیر متنوعی در همه آنها تولید می‌شود از عوامل مهم حدت و فاکتور بیماری‌زایی می‌باشد.^۴ با توجه به اهمیت سودوموناس آئروژینوزا در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی و عدم آگاهی نسبت به شیوع سوبه‌های MDR و مولد ESBLs در نمونه‌های بالینی و محیط بیمارستان و همچنین افزایش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها و در نتیجه توانایی کسب مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌هایی بسیار حائز اهمیت است.^۵ سروتپ‌های زیادی از باکتری سالمونلا شناسایی شده که همواره نیز بر این تعداد افزوده می‌گردد. سالمونلا انتریکا سرووار اینترتیدیس، تیغی موریوم و انفنتیس از مهم‌ترین عوامل مسمومیت‌های غذایی در انسان و حیوانات در جهان به شمار می‌روند. این ارگانیزم یکی از شایع‌ترین پاتوژن‌های قابل انتقال از حیوانات به انسان‌ها می‌باشد.^۶ کلبسیلا پنومونیه از خانواده انتروباکتریاسه بعنوان باکتری بیماری‌زای فرصت طلب از عوامل مهم و مقاوم عفونت‌های ادراری و تنفسی است. افزایش مقاومت این باکتری به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها درمان عفونت‌های ناشی از آن را با مشکلات جدی مواجه

کرده است.^۷ باسیلوس سرئوس، باسیل اسپوردار از خانواده باسیلاسه است که اسپور آن به صورت گسترده‌ای در طبیعت، آب و خاک پراکنده شده بطوری که می‌توان آن را از مواد غذایی گوناگون جدا نمود. باسیلوس سرئوس در سال ۱۹۵۰ به عنوان عامل مسمومیت غذایی شناخته شد باکتری مولد انتروتوکسین‌های مولد اسهال و تهوع بوده و قادر به ایجاد سندرم اسهال و تهوع است.^۸

در طب سنتی قدیم استفاده از داروهای گیاهی از استرالیا تا مصر رواج بسیار زیادی داشت. پونه کوهی به عنوان درمان مناسب برای رفع بسیاری از مشکلات سلامتی طرفدار داشته است. گیاهان دارویی امروزه در درمان بیماری‌های مختلف استفاده می‌شوند. درمان بیماری‌ها با عصاره‌های گیاهی به زمان‌های خیلی دور برمی‌گردد. پذیرش گیاهان دارویی به عنوان درمان جایگزین در بسیاری از بیماری‌ها و از طرفی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در حال افزایش است و پژوهشگران را وادار به بررسی خواص ضد میکروبی گیاهان دارویی کرده است.^۹

پونه کوهی *Mentha pulegium* بومی جنوب غربی اوراسیا و منطقه مدیترانه است. پونه کوهی بسیار به نعنای نزدیک و در واقع به خانواده نعنائیان تعلق دارد. به همین دلیل، بسیاری از اجزای آلی این دو گیاه و بسیاری از خواص درمانی آن‌ها مشابه است. برگ پونه کوهی بیش از سایر قسمت‌های این گیاه مورد استفاده قرار می‌گیرد، اما عجیب است که عطر و طعم آن پس از خشک شدن به مراتب بیشتر از زمانی است که برگ‌های آن تازه هستند.^{۱۰،۱۱}

پونه کوهی خواص ضد باکتری مشخصی دارد و این خواص به دلیل وجود تیمول و ترکیب دیگری به نام کارواکرول است. این ترکیبات آلی مهم می‌توانند از بدن در برابر طیف وسیعی از باکتری‌ها محافظت کند. این باکتری‌ها می‌توانند پوست، روده، و دیگر قسمت‌های بدن را تحت تاثیر قرار دهند. پونه کوهی یک عامل تحریک کننده است که می‌تواند تولید سلول‌های سفید خون را افزایش دهد، سرعت سوخت و ساز بدن را بالا ببرد و بهبودی از بیماری را سرعت بخشد. کارواکرول موجود در پونه کوهی دلیل بوی خوش و منحصر به فرد برگ‌های این گیاه است اما کارکرد کارواکرول بیش از این‌ها است. مطالعات بسیاری انجام شده و نشان داده‌اند که کارواکرول ترکیبی با اثر ضد میکروبی قوی است. امروزه خصوصیت ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی اسانس و عصاره بسیاری از گونه‌های

تهیه عصاره اتانولی

عصاره‌گیری به روش ماسیراسیون (= خیساندن *Maceration*) صورت گرفت، به این ترتیب که پس از جمع آوری پونه کوهی تازه آنها را در مکانی به دور از نور خورشید و در سایه محلی که جریان ملایم هوا برای مدت ۷۲-۴۸ ساعت خشک کرده و سپس مقدار معینی را با ترازو وزن کرده ۲۰ gr از برگ‌ها و ساقه خشک شده گیاه را نیمه خرد نموده و در ۱۸۰ cc اتانول ۸۰٪ بمدت ۷۲ ساعت در مکان تاریکی خیسانده و در نهایت با کاغذ صافی واتمن ۴۲ محلول عصاره را صاف شد. به کمک دستگاه روتاری (کشور آلمان IKA) حلال مورد استفاده یعنی اتانول را از عصاره جداسازی نموده و پس از تغلیظ عصاره در ظرف جذب رطوبت، جهت انجام آزمایش در ظرف شیشه ای تیره و داخل یخچال نگهداری شد^{۱۲}.

تهیه سوسپانسیون‌های میکروبی استاندارد

سویه های باکتری مورد استفاده بصورت استاندارد از مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران (مرکز کلکسیون میکروارگانیسم های صنعتی ایران) (IROST) خریداری شد.

برای بررسی میزان حداقل غلظت (رقت) مهارکننده از محیط مولر هیتون براث (شرکت مرک کشور آلمان) استفاده شد که در روش چاهک (میکرودايلوشن) میزان کدورت حاصله در گوده‌ها ارزیابی گردید. در کلیه مراحل همراه کنترل مثبت و منفی در چاهک انتهایی در نظر گرفته شد. سویه استاندارد باکتری‌های گرم منفی شامل: باکتری /شریشیا کلی (ATCC ۲۵۹۲۲)، باکتری *سالمونلا* تایفی موریوم (ATCC ۵۳۶۴۷)، باکتری *کلبسیلا* پنومونیه (ATCC ۳۵۶۵۷)، باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* (ATCC ۲۵۹۲۳) و باکتری‌های گرم مثبت شامل: *باسیلوس سرئوس* (ATCC ۱۴۵۷۹)، باکتری *استافیلوکوک اورئوس* (ATCC ۲۵۹۲۳) استفاده شد. باکتریهای فوق جهت تایید و بررسی از نظر بیوشیمیایی جهت پارامترهای مختلف ارزیابی شد. برای تمام مراحل آزمون حساسیت میکروبی از غلظت معادل نیم مک فارلند ($10^4 \times 1/5$) جهت انجام آزمایشات مورد استفاده قرار گرفت.

شریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه بر روی محیط مک کانکی آگار (شرکت مرک کشور آلمان) و محیط EMB (Eosin Methylene

گیاه پونه کوهی شامل؛ منتا پپیترتا، منتا روتوندیغولیا، منتا پولگیرم و منتا لونگیفولیا ثابت شده است^{۱۳، ۱۴}.

رایحه قوی و منحصر به فرد پونه کوهی به خاطر مواد شیمیایی خاص موجود در آن مانند تیمول، لیمونن، اوسیمین است. دو مورد از مهم‌ترین ترکیبات پونه کوهی عبارتند از رزمارینیک اسید و تیمول، که هر دو ترکیبات آنتی اکسیدانی بسیار قدرتمندی بوده و به شدت با کاهش استرس اکسیداتیو در بدن ارتباط دارند. بنابراین اضافه کردن پونه کوهی به رژیم غذایی می‌تواند سیستم ایمنی را تقویت کند. پونه کوهی سرشار از کارواکول و تیمول بوده و به افزایش تولید سلول‌های سفید خون به منظور مبارزه با باکتری‌ها و ابتلا به عفونت‌های ویروسی کمک می‌کند^{۱۵}.

اغلب تحقیقات در زمینه اثرات ضد میکروبی اسانس‌ها ابتدا در محیط آزمایشگاهی انجام گرفته و سپس خصوصیات کاربردی آنها در مدل‌های غذایی ارزیابی شده است. لزوم به کارگیری غلظت‌های بالاتر اسانس‌ها در غذا در مقایسه با شرایط آزمایشگاهی نشان دهنده پیچیده بودن شرایط رشد میکروارگانیسم‌ها در غذا است که می‌تواند اثرات محافظتی روی سلول‌های میکروبی در مقابل ترکیب‌های ضد میکروبی داشته باشد. این امر از یک طرف به دلیل تأثیرات نامطلوب ارگانولپتیکی در غذا و از سوی دیگر به علت اقتصادی نبودن استفاده از یک نگهدارنده به تنهایی در مقادیر زیاد موجب محدود شدن کاربرد اسانس‌های گیاهی به تنهایی در مواد غذایی شده است.^{۱۵} هدف از انجام این مطالعه، ارزیابی خاصیت ضد باکتریایی عصاره هیدروالکلی پونه کوهی بر روی باکتریهای پاتوژن به روش میکروپلیت در شرایط آزمایشگاهی است.

مواد و روش کار

این مطالعه توصیفی در آزمایشگاه میکروب شناسی این گونه آغاز شد که ابتدا گیاه تازه پونه کوهی *Mentha pulegium* جمع آوری شد (تصویر ۱). مرحله بعد گیاه به کمک کارشناس گروه گیاه پزشکی در دانشکده کشاورزی شناسایی و تایید شد. سپس اقدام به خشک کردن بخش‌های هوایی گیاه در سایه و دمای اتاق با شرایط مناسب گردید.

Blue) کشت داده شد. باکتری/اشریشیا کلی در محیط TSI به صورت اسید/اسید و با تولید گاز و H_2S منفی و از نظر تست IMViC به صورت اندول مثبت، MR مثبت، VP منفی و سیترات منفی است. باسیلوس سرئوس و استافیلوکوک/اورئوس بر روی محیط بلاد آگار و بردپارکر آگار (شرکت مرک کشور آلمان) کشت شد و از کلنی های رشد کرده بر روی این محیطها استفاده گردید^{۱۶}.

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی رشد MIC به روش میکرودايلوشن

جهت بررسی میزان حداقل غلظت (رقت) مهارکننده و میزان حداقل غلظت (رقت) کشنده باکتریها از محیط کشت های بلاد آگار، مولر هینتون براث استفاده شد. در این تکنیک $100 \mu l$ از محیط کشت مولر هینتون براث در تمام چاهکها (Wells) وارد کرده و سپس $100 \mu l$ از عصاره هیدروالکلی 100 درصد پونه کوهی به چاهک ابتدایی افزوده و اقدام به رقت سازی نموده تا به خانه دهم رسیده و به همان اندازه ابتدایی خارج شد. در مرحله بعد $100 \mu l$ از سوسپانسیون میکروبی به تمام چاهکها اضافه شد (تصویر ۱)^{۱۶}.

کنترل مثبت حاوی سوسپانسیون میکروبی با غلظت نیم مک فارلند به همراه محیط کشت و کنترل منفی حاوی محیط کشت به همراه عصاره پونه کوهی بود. در ادامه به بررسی میزان حداقل غلظت (رقت) مهارکننده در ردیف اول: باکتری اشریشیاکلی، ردیف دوم: باکتری سالمونلا تیفی موریوم، ردیف سوم: باکتری باسیلوس سرئوس، ردیف چهارم: باکتری کلبسیلا پنومونیه، ردیف پنجم: باکتری سودوموناس آئروژینوزا، ردیف ششم: باکتری استافیلوکوک اورئوس بتوان این مقادیر را ارزیابی کرد.

نتایج

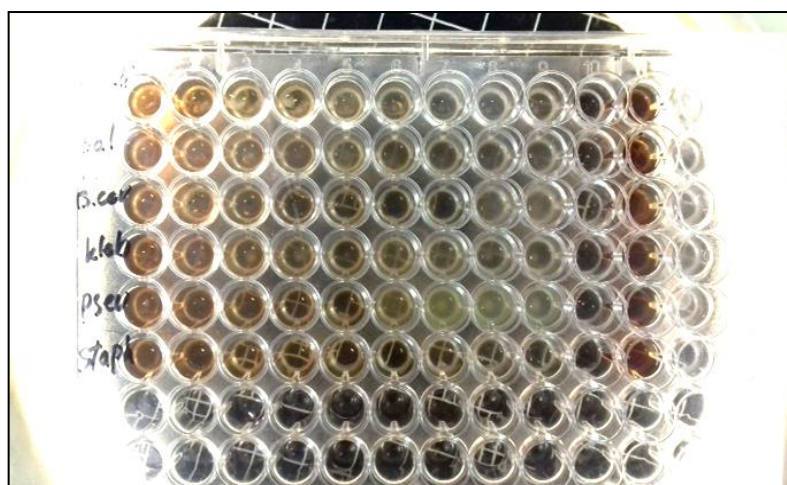
با توجه به اثرات جانبی و هزینه زیاد داروهای شیمیایی، مطالعه بر روی گیاهان کاربردی در طب سنتی با هدف رسیدن به پیشرفت بیشتر در علم پزشکی در اولویت قرار گرفته است. گیاهان دارویی دارای مواد طبیعی با احتمال عوارض جانبی کمتر است. بسیاری از این گیاهان دارای منابع غنی از آنتی اکسیدانهای طبیعی هستند که می توانند اثرات ناشی از اکسیدانها یا عوارض برخی از بیماریها را کاهش دهند. نتایج حاصل از بررسی اثرات ضد باکتریایی عصاره پونه کوهی *Mentha pulegium* با استفاده از تکنیک میکروپلیت بر باکتریهای مورد آزمایش بطور جداگانه در ردیفهای معین انجام شد. نتایج حاصل از آزمایش ممانعت از رشد (MIC) مشخص کرد که میزان رشد باکتری توسط عصاره پونه کوهی با میزان عصاره موجود در رقتها رابطه مستقیم دارد و با افزایش میزان عصاره در هر رقت از تعداد کلنی های باکتری بعد از کشت کاهش یافته است.

بطوری که حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره بر/اشریشیاکلی در گوده اول (50.1μ)، حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره بر سالمونلا تیفی موریوم در گوده اول (50.1μ)، حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره بر کلبسیلا پنومونیه در گوده دوم (25.1μ)، حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره بر سودوموناس آئروژینوزا در گوده ششم ($1/56.1 \mu$)، حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره بر باسیلوس سرئوس در گوده هشتم ($0/39.1 \mu$)، حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره بر استافیلوکوک اورئوس در گوده دهم (بدون رشد) را نشان می دهد که در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.

بر طبق بررسی و نتیجه حاصل اینکه باکتری استافیلوکوک اورئوس حساسترین بوده در حالیکه باکتری اشریشیاکلی مقاومترین میکروارگانیسم مشاهده شد. میزان حساسیت باکتریهای مورد بررسی در زیر به تفکیک قابل مشاهده است:

جدول ۱: نتایج آزمایش تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره MIC به روش میکروپلیت (علامت + نشان دهنده رشد باکتریها می باشد)

رقت های مختلف از عصاره پونه کوهی و امکان رشد باکتری		۱/۱	۱/۲	۱/۴	۱/۸	۱/۱۶	۱/۳۲	۱/۶۴	۱/۱۲۸	۱/۲۵۶	۱/۵۱۲
میکروارگانسیم های مورد آزمایش											
۱	اشریشیاکلی <i>E.coli</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
۲	سالمونلا تیفی موریوم <i>Salmonella Typhimurium</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
۳	کلبسیلا پنومونیه <i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
۴	سودوموناس آئروژینوزا <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
۵	باسیلوس سرئوس <i>Bacillus cerus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
۶	استافیلوکوک اورئوس <i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-



شکل ۱: برای انجام تست میکرودايلوشن چاهک های میکروپلیت در شش ردیف به ترتیب: ردیف اول: اشریشیاکلی، ردیف دوم: سالمونلا تایفی موریوم، ردیف سوم: باسیلوس سرئوس، ردیف چهارم: کلبسیلا پنومونیه، ردیف پنجم: سودوموناس آئروژینوزا، ردیف ششم: استافیلوکوک اورئوس.

بحث

گیاهان، نمی توان مکانیسم واحدی برای اثرات ضد باکتریایی آنها در نظر گرفت بلکه آنها هدفهای متعددی را در سلول خواهند داشت. از ویژگیهای مهم اسانس ها و عصاره ها و اجزای تشکیل دهنده آنها خاصیت آبرگریزی می باشد که موجب نفوذ این مواد به لیپیدهای غشای سلول باکتری و میتوکندری سلول می شود و سبب اختلال در ساختمانهای آنها و ایجاد نفوذپذیری بیشتر می شود. این مسئله موجب خروج و نشت یونها و دیگر

پونه کوهی گیاه محبوبی است که بسیاری از موارد آن را صرفا به عنوان یک ادویه برای بهبود یا افزایش عطر و طعم مواد غذایی خود استفاده می کنند. این گیاه چند ساله با نام علمی منتا پولگیوم (*Mentha pulegium*)، فواید بی شماری برای سلامتی دارد. با توجه به تعداد ترکیبات شیمیایی در اسانس و عصاره

محتویات سلول می شود. اگر چه خروج مقادیر محدود این مواد برای باکتری قابل تحمل است ولی در قابلیت زیستی آن تاثیر گذاشته و خروج مقادیر وسیع محتویات سلولی یا خروج یونها و مولکولهای حیاتی موجب مرگ سلولی خواهد شد.^{۱۷}

تنوع شرایط جغرافیایی و آب و هوایی در ایران موجب شده است که یک منبع متنوع و غنی از گونه های گیاهی در کشورمان وجود داشته باشد. امروزه توجه به سلامت غذا و ارائه راهکارهایی جهت سلامت و محافظت هرچه بیشتر مواد غذایی ضروری بنظر میرسد. کنترل پاتوژنهای غذا بوسیله محصولات و ترکیبات مشتق شده از گیاهان کاربرد گسترده ای پیدا کرده است. امروزه بیشتر مطالعات در جهت جداسازی و شناخت ترکیبات اسانس ها و بررسی فعالیت ضد میکروبی در مواد غذایی با اثرات نامطلوب در ارزش تغذیه ای و حسی ها باشد.^۹ بطور کلی مطالعات صورت گرفته روی اسانس های گیاهی نشان داده است که اسانس ها فاز تاخیری رشد باکتریایی را طولانی کرده در حالی که سرعت رشد در فاز لگاریتمی را کاهش می دهند و عملکرد آنها از یک ساز و کار واحد تبعیت کرده که مربوط به تجمع اسانس در دو لایه لیپیدی غشای سلول و تخریب ساختار آن می باشد.^{۱۸}

ترکیبات عمده عصاره پونه کوهی *Mentha pulegium* که شامل: پولگون (Pulegone)، ۸-۱ سینئول، منتوفوران، سیس ایزوپولگون، آلفا ترپینئول- α ، Terpineol، ژرمارسن دی Germacrene-D، سپاتولنول (Spathulenol)، کمفور (Camphor) و... شناسایی شده است. این مواد دارای خاصیت ضد میکروبی هستند. خاصیت ضد میکروبی روغنهای ضروری را می توان به دلیل وجود گروه های پولگون، منتون و نئومنتون دانست زیرا که می توانند با تغییر نفوذپذیری غشای سلولی و تخریب دیواره باکتریایی سبب در هم گسیختن ساختار لایه های مختلف پلی ساکارید، اسیدهای چرب و فسفولیپیدهای غشای باکتری شوند.^{۱۹، ۲۰}

مطالعات صورت گرفته نشان می دهند که اسانس های

گیاهی اثر ضد میکروبی بیشتری را بر روی باکتریهای گرم مثبت دارند. علت حساسیت کمتر باکتریهای گرم منفی در برابر اسانس ها غشای بیرونی این دسته از باکتریهاست که مانع از انتشار اجزای هیدروفوبیک اسانس به لایه لیپیدی ساکاریدی ها شود. بکارگیری اسانس پونه کوهی در دمای بالاتر (۲۵ درجه سانتیگراد) در مقایسه با دمای ۴ درجه سانتیگراد اثر بهتری بر عملکرد فعالیت ضد میکروبی اسانس داشت. علت آن قرار گرفتن باکتری در فاز لگاریتمی رشد خود در دمای ۲۵ درجه می باشد که در نتیجه حساسیت باکتری به تغییرات محیطی بیشتر می شود.^{۲۱}

البته گزارش ها در این خصوص نشان می دهند که این مکانیسم می تواند با اثر در نمونه ها بر باکتریهای همزیست (bacteria Symbiotic) دستگاه گوارش سبب کاهش کارایی دستگاه گوارش مصرف کننده شود. تحقیقات انجام شده در خصوص پونه نشان میدهند از آنجایی که روغن های ضروری پونه تاثیر بسزایی در جلوگیری از رشد، تکثیر و گسترش چندین گونه باکتری مولد فساد و بیماری زا دارند این گیاه میتواند بعنوان گندزدا، ضد اسپاسم و ضد التهاب مورد استفاده قرار بگیرد بطوری که روغن های ضروری این گیاه در طب سنتی بسیاری از کشورها کاربرد دارد. روغن های ضروری گیاه پونه از نوع سیکلوهازان ها و معطر بوده و پولگون ترکیب اصلی این روغن ها دارای عطر معین در محدوده نعنائی شدید تا تند و سرکه ای است. گزارش ها حاکی از آنست که در زمینه طیف اثر ضدباکتریایی اسانس ها در محیط آبگوشت و شرایط آزمایشگاهی می باشد ولی مطالعاتی که اثر این ترکیبات را به باکتری در سیستم مواد غذایی نشان می دهد محدود است.^{۲۲}

در مطالعه ای که توسط گولوسه و همکاران در سال ۲۰۰۷ روی ترکیبات شیمیایی و فعالیت ضد میکروبی عصاره متانولی و اسانس کوهی صورت گرفت و نشان داد که بیشترین تاثیر اسانس مربوط به ترکیب پولگون می باشد. همچنین آنها نشان دادند که تاثیر ضد میکروبی اسانس پونه بیشتر از عصاره پونه

غلظت های گیاه پونه کوهی بیشتر است.^{۲۶} در مطالعه pozzatti و همکاران فعالیت ضد قارچی اسانس دارچین، آویشن، پونه کوهی و زنجبیل روی گونه های کاندیدای حساس به فلوکونازول و مقاوم به آن بررسی شد که در نهایت اسانس پونه کوهی بیشترین اثر ضد قارچی را داشت.^{۲۶}

از آنجایی که عصاره ماده ناخالص و خام است که ماده موثره بخش بسیار کوچکی از عصاره را تشکیل داده انتظار می رود ماده موثره خالص اثرات ضد باکتریایی موثری از خود نشان دهد. در بررسی حاضر نتایج حاصله نشان دهنده اثر ممانعت از رشد عصاره گیاه پونه کوهی بر باکتری های پاتوژن گرم منفی و مثبت در شرایط آزمایشگاهی بود. رشد و بقای باکتری ها در مواد غذایی به عوامل متعدد بیرونی نظیر: فلور باکتریایی، درجه حرارت، افزودنی هایی که در طی مراحل تهیه غذایی استفاده می شوند و نیز عوامل داخلی ترکیبات مواد غذایی، بستگی دارد.^{۲۷}

عصاره پونه کوهی دارای خاصیت ضد باکتریایی بسیار خوبی بر روی باکتری های گرم مثبت (باسیلوس سرئوس و استافیلوکوک اورئوس) و نیز باکتری های گرم منفی (سودوموناس آئروژینوزا و کلبسیلا پنومونیه) بوده و بر روی سایر باکتری های پاتوژن (اشریشیاکلی و سالمونلا تایفی موریوم) اثر کمتری را از خود نشان داده است. گسترش مقاومت های آنتی بیوتیکی در سال های اخیر اهمیت عفونت های باکتریایی را در بیماران عفونی همچنان پر رنگ نگاه داشته است. با توجه به این امر مهم در سال های اخیر مطالعات مستمر به منظور شناسایی اثرات ضد میکروبی عصاره گیاهی صورت گرفته که نشان دهنده تاثیر مهاری این ترکیبات بر روی طیف گسترده ای از میکروارگانیسم های پاتوژن است.

نتیجه گیری

پائین بودن دوز عفونت زایی بسیاری از پاتوژن های غذایی نیازمند تحقیقات گسترده در زمینه ترکیب های دارویی جدید

است. با بررسی اثر باکتری کشی اسانس پونه کوهی نشان دادند که روی میکروارگانیسم های استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیاکلی، اثر مهاری دارد که با مطالعه حاضر همخوانی دارد.^{۲۳،۱}

در مطالعه الموتی و همکاران در سال ۲۰۱۰ با بررسی ترکیبات شیمیایی و اثرات ضد میکروبی پونه کوهی گزارش شده که اسانس گیاه پونه کوهی بر روی باکتری باسیلوس سرئوس اثر مهاری دارد که با نتایج ما همخوان است. ارزیابی اسانس گیاه پونه کوهی بر روی باکتری های اشریشیاکلی و استافیلوکوک اورئوس، سودوموناس آئروژینوزا و کلبسیلا پنومونیه جدا شده از عفونت های بیمارستانی نشان داده است که اثر این اسانس بر باکتری های اشریشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه نسبت به آنتی بیوتیک تتراسایکلین بیشتر بوده و اثر این اسانس بر باکتری های استافیلوکوک اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا نسبت به آنتی بیوتیک آمیکاسین تفاوت معنی داری نداشت.^{۲۴}

براساس پژوهش محمودی و همکاران در سال ۲۰۱۸ اسانس پونه کوهی از توان ضد میکروبی بسیار بالایی برخوردار می باشد. بنابراین میتوان از آن در ترکیب با نگهدارنده ها جهت محافظت مواد غذایی در مقابل میکروارگانیسم های عامل عفونت و مسمومیت بهره گرفت. بطور کلی مطالعات صورت گرفته بر روی اسانس های گیاهی نشان داده اند که اسانس ها فاز تاخیری رشد باکتریایی را طولانی کرده در حالی که سرعت رشد در فاز لگاریتمی را کاهش می دهند. عملکرد آنها از یک ساز و کار واحد تبعیت کرده که مربوط به تجمع آنها در دو لایه لپیدی غشای سلول و تخریب ساختار آن می باشد.^{۲۵}

در مطالعه موقری پور و همکاران که بر روی کاندیدا آلبیکنس و مقایسه آن با داروی نیستاتین انجام شده نتایج حاصله تاثیر نیستاتین نسبت به غلظت های بکار رفته عصاره آبی و الکلی گیاه پونه کوهی بصورت معنی داری بیشتر بوده و قطر هاله عدم رشد در دیسک های حاوی نیستاتین از تمامی

و کاربردی آنتی بیوتیک های مصنوعی رایج جهت مقابله با جدایه های مورد آزمایش در نظر گرفت. همچنین با در نظر گرفتن ویژگی های بسیار مفید ثابت شده از یک سو خواص ضد باکتریایی و از سوی دیگر ترکیبات مختلف موجود جایگاه ویژه ای را در علوم دامپزشکی دارد.

سپاسگزاری

پژوهش حاضر مطالعه ای در زمینه گیاهان دارویی و طب سنتی است. بدینوسیله از کلیه عزیزانی که در انجام این فعالیت علمی راهنمایی مفید و ارزنده داشتند قدردانی و تشکر می شود.

با توان آنتی باکتریال بوده که در جهت نیل به این هدف استفاده از ترکیب های روغنی حاصل از گیاهان و ادویه جات جهت تأمین سلامت و بهداشت غذایی بسیار حائز اهمیت می باشد. در این راستا آگاهی و شناخت مکانیسم های عملکردی این ترکیبها، می تواند در تشخیص میکروارگانیسم های حساس و افزایش کارایی ترکیبها در سیستم های غذایی بسیار مفید و تأثیر گذار باشد. نتایج بدست آمده نشان دهنده آنست که عصاره پونه کوهی *Mentha pulegium* دارای خاصیت ضد باکتریایی بوده و می تواند به عنوان یک منبع ارزان و در دسترس برای استفاده درمانی در برخی از عفونت های باکتریال مورد استفاده قرار گیرد. بعبارت دیگر می توان پونه کوهی را جایگزین مناسب

References

- Nozohor Y, Rasolifard MH, Ghahremanigermi N. Evaluation of Antibacterial Properties of Oregano Essence on Pathogenic Bacteria Isolated from Hospital Infections. scientific journal of ilam university of medical sciences 2018;25(5): 154-60.
- Schoeni JL, LEE WONG AC. Bacillus cereus food poisoning and its toxins. Journal of food protection 2005;68(3): 636-48.
- Carroll KC, Butel J, Morse S. Jawetz Melnick and Adelbergs Medical Microbiology 27 E: McGraw-Hill Education; 2015.
- Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical microbiology: Elsevier Health Sciences; 2015.
- Vettoretti L, Floret N, Hocquet D, et al. Emergence of extensive-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a French university hospital. European journal of clinical microbiology & infectious diseases 2009;28(10): 1217-22.
- Shareef J. A review of serological investigations of brucellosis among farm animals and humans in northern provinces of Iraq (1974–2004). Journal of Veterinary Medicine, Series B 2006;53: 38-40.
- Pitout JD, Nordmann P, Poirel L. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance. Antimicrobial agents and chemotherapy 2015;59(10): 5873-84.
- Youssef S, Mohammed C, Aboubakr S, et al. Treatment of domestic wastewater by anaerobic denitrification: Influence of the type of support media on the production of extracellular polymer substances. African Journal of Biotechnology 2016;15(4): 77-88.
- Oz AT. Effects of harvest date and conditions of storage of Hayward kiwifruits on contents of L-ascorbic acid. J Food Agric Environ 2010;8(2): 132-4.
- Hashemi M, Amin Zare M, Naghibi S, et al. Chemical composition, antibacterial and antioxidant effect of *Salvia Officinalis*, *Mentha Piperita* and *Mentha Longifolia*. Medical Laboratory Journal 2015;9(3): 47-55.
- Moreno L, Bello R, Primo-Yúfera E, Esplugues J. Pharmacological properties of the methanol extract from *Mentha suaveolens* Ehrh. Phytotherapy research 2002;16(S1): 10-3.
- Brahmi F, Abdenour A, Bruno M, et al. Chemical composition and in vitro antimicrobial, insecticidal and antioxidant activities of the essential oils of *Mentha pulegium* L. and *Mentha rotundifolia* (L.) Huds growing in Algeria. Industrial Crops and Products 2016;88: 96-105.
- Mahboubi M, Haghi G. Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. Journal of ethnopharmacology 2008;119(2): 325-7.
- Abdelli M, Moghrani H, Aboun A, Maachi R. Algerian *Mentha pulegium* L. leaves essential oil: chemical composition, antimicrobial, insecticidal and antioxidant activities. Industrial Crops and Products 2016;94: 197-205.
- Hosseini, born M, Mohammad, Salari, editors.

- Investigation of bacterial effect of oregano essential oil (*Origanum vulgare*) against a number of pathogens of food origin. 4th International Congress of Developing Agriculture, Natural Resources, Environment and Tourism of Iran; 2019.
16. Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G. Textbook of diagnostic microbiology-e-book: Elsevier Health Sciences; 2018.
 17. Lambert R, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas GJ. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of applied microbiology* 2001;91(3): 453-62.
 18. Valero M, Giner M. Effects of antimicrobial components of essential oils on growth of *Bacillus cereus* INRA L2104 in and the sensory qualities of carrot broth. *International journal of food microbiology* 2006;106(1): 90-4.
 19. Şahin F, Güllüce M, Daferera D, et al. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food control* 2004;15(7): 549-57.
 20. Teixeira B, Marques A, Ramos C, et al. European pennyroyal (*Mentha pulegium*) from Portugal: Chemical composition of essential oil and antioxidant and antimicrobial properties of extracts and essential oil. *Industrial Crops and Products* 2012;36(1): 81-7.
 21. Fisher K, Phillips CA. The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems. *Journal of Applied Microbiology* 2006;101(6): 1232-40.
 22. Oueslati S, Karray-Bouraoui N, Attia H, et al. Physiological and antioxidant responses of *Mentha pulegium* (Pennyroyal) to salt stress. *Acta Physiologiae Plantarum* 2010;32(2): 289-96.
 23. Hoque MM, Bari M, Juneja V, Kawamoto S. Antimicrobial activity of cloves and cinnamon extracts against food borne pathogens and spoilage bacteria and inactivation of *Listeria monocytogenes* in ground chicken meat with their essential oils. *Food Res Inst* 2008;72: 9-21.
 24. Mohammad Reza Pa, Hussein T., Afshin A., Hassan Gun, Ali A. Study of chemical composition and antimicrobial activity of oregano essential oils (*Mentha longifolia* L.) and cumin (*Cuminum cyminum* L.) in soup. 2012:258-263.
 25. Mahmoudi, Razzaq, Tajik, Hussein, Abbas A., Ehsani, et al. Determination of chemical composition and antimicrobial effects of oregano essential oil against *Staphylococcus aureus*. *The gift of knowledge*. 2011; 16 (5): 400-12.
 26. Poorabedini M., Ateke, Elahi Shaf, Mahmoud, Zamani P., Abedini, et al. In vitro comparison of antifungal effect of oregano extract with nystatin on *Candida albicans*. *J Mashhad Den School*. 2018; 42 (3): 277-1.
 27. Marino M, Bersani C, Comi G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. *International journal of food microbiology* 2001;67(3): 187-95.

Ehsan Estabarghi¹, Majid Sadeghpour², Amir Mehrabani³, Sara Motamedi Hoor⁴

¹ PhD in Microbiology, Department of Veterinary Medicine, School of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Shahrabak Branch, Shahrabak, Iran

² Master of Microbiology, Scientific Member of Iranian Microbiological Association, Tehran, Iran

³ Master of Food Hygiene, Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran

⁴ Master of Agricultural Engineering, Department of Agriculture, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University, Abhar Branch, Zanjan, Iran

Effectiveness of Antibacterial Properties of Mentha Pulegium Hydroalcoholic Extract on Pathogens by Microdilution in Vitro

Received: 6 Mar 2021 ; Accepted: 26 Dec 2021

Abstract

Background: The use of antimicrobial properties of medicinal plants can solve the problems associated with the use of antibiotics. The aim of this study was to evaluate the antibacterial property of Oregano hydro alcoholic extract on pathogen bacteria by microplate in laboratory conditions.

Purpose: The aim of this study was to evaluate the antibacterial properties of hydro alcoholic extract of oregano on pathogenic bacteria by microplate method in vitro.

Methods: After collecting oregano, they were dried in a place by sunlight and in shade for 48-48 hours, and extraction was carried out by maceration, in order to determine the amount of inhibition (dilution) inhibitor The Muller-Hinton broth was used. The turbidity rate was evaluated in the wells method (microdilution).

Conclusion: The results of microdilution test showed that the minimum inhibitory concentration of extract on *Escherichia coli* in the first ($1\mu 50$), the concentration of extract on *salmonella typhimurium* in the first ($1\mu 50$), the concentration of *Klebsiella pneumonia* in the second ($1\mu 25$), Concentrations of *Pseudomonas aeruginosa* in the sixth poison ($1\mu 1.56$), concentration of *Bacillus cereus* in the eighth grade ($1\mu 0.39$), and the minimum concentration of *Staphylococcus aureus* in the tenth (without growth) strain.

The results showed that Oregano essential oil has antibacterial properties and can be used as a cheap and available source for therapeutic applications in some bacterial infections. In other words, Oregano can be considered as an alternative to synthetic antibiotics to combat the isolates tested. Of course, all the effects of these extracts should be carefully investigated in vivo and in vitro.

*Corresponding Author:

Master of Microbiology, Scientific Member of Iranian Microbiological Association, Tehran, Iran

Tel: 09127160281
E-mail magid_sadeghpour@yahoo.com

Keywords: Oregano, Pathogen bacteria, Extract, Microdilution