

بررسی تأثیر ضد باکتریایی اسانس پونه (*Menta longifolia*) بر علیه انواع باکتری‌های مسبب اسهال و سپس ارزیابی فیتوشیمیایی آن

پروین تیموری^۱، سیما یحیی آبادی^{۲*}، منیردودی^۱

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، فلاورجان، ایران
۲- گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، فلاورجان، ایران

چکیده

سابقه و هدف: افزایش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها و اثرهای جانبی زیان‌بار آن‌ها استفاده از روش‌های درمانی جایگزین از قبیل ترکیب‌های گیاهی را اجتناب‌ناپذیر کرده است. در این تحقیق تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس پونه وحشی بر روی برخی باکتری‌های مسبب اسهال جدا شده از بیماران در شبکه بهداشت و درمان اصفهان بررسی گردید.

مواد و روش‌ها: ۲۵۰ جدایه باکتریایی از مراکز بهداشت شهری، روستایی و بیمارستانی اصفهان تهیه شد و تأثیر غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ درصد اسانس پونه وحشی تحت شرایط خشکاندن در سایه، آفتاب و مایکروویو با روش انتشار دیسک در آگار به روش کربی - بایر روی این جدایه‌ها بررسی شد.

یافته‌ها: تمامی غلظت‌های اسانس پونه خشک شده در سایه اثر مهارکنندگی معنی‌داری بر رشد جدایه‌های باکتریایی داشتند. بیش‌ترین تأثیر مهارکنندگی مربوط به غلظت ۴۰٪ بود. بالاترین مقادیر (MIC) و (MBC) به ترتیب مربوط به غلظت‌های ۲۰ و ۴۰ درصد بود. بالاترین ماده جداسازی شده مربوط به Thymol با ۱۲۹/۳۷٪ و کم‌ترین آن مربوط به alpha-Terpinolene و E Z-Allo با ۱۸۱/۰٪.

نتیجه‌گیری: خاصیت ضدباکتریایی اسانس گیاه پونه وحشی به وجود ترکیب‌های پلی‌فنلی آن مربوط می‌شود. خاصیت ضدباکتریایی اسانس این گیاه باتوجه به میزان بالای تیمول می‌تواند تا حدودی مربوط به این ترکیب شیمیایی باشد. از یافته‌های حاصل چنین نتیجه‌گیری شد که بیش‌ترین غلظت مهارکنندگی اسانس پونه تحت روش خشک کردن در سایه مربوط به غلظت ۴۰٪ آن بود و بالاترین ماده جداسازی شده مربوط به Thymol بود.

واژه‌های کلیدی: پونه وحشی، MIC، MBC، اسانس، GC mass

مقدمه

ظهور و پیدایش بیماری‌های عفونی باعث پیدایش چالش بزرگ افزایش نرخ بیماری و مرگ و میر در سراسر جهان گردیده است. اسهال‌های باکتریایی یکی از اصلی‌ترین تهدیدها برای سلامت انسان است. برای مثال می‌توان به شیگلوزیس که

عامل مرگ و میر در سرتاسر جهان بوده اشاره کرد. بیماری اسهال خونی که به وسیله باکتری‌های منتقل شونده از آب و غذا از قبیل شیگلا *SP*، سالمونلا *SP*، کامپیلوباکتر *SP* و... ایجاد می‌شود، نیز می‌توان اشاره کرد.

از آنجایی که تنها راه ورود اکثر باکتری‌های مسبب انواع اسهال از راه دهان است، لذا پیدایش و شیوع بیماری‌های روده‌ای در نتیجه عدم رعایت اصول بهداشت عمومی و فردی پدید می‌آید. تعدادی از این بیماری‌ها عبارتند از تب تیفوئید، گاستروانتریت، انواع اسهال‌های باسیلی، اسهال خونی باکتریایی، بروسلوز و یا انواع مسمومیت‌های غذایی (۱۰). تب تیفوئید، به دنبال آلودگی دهانی با سالمونلا تیفی و اسهال - های باسیلی ناشی از آلودگی با شیگلا دیسانتریه و آلودگی با

نویسنده مسئول:

گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، فلاورجان، ایران

پست الکترونیکی: yahyaabadisima@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۷/۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۸/۱۵

مصرف می شدند. استفاده از داروهای گیاهی برای درمان و تیمار بیماری های مختلف به دلیل پیدایش و بروز مقاومت پاتوژن هایی که عامل بیماری های عفونی بودند، به داروهای مختلف مورد توجه بیش تری قرار گرفته است. اسانس ها و عصاره های مشتق شده از گیاهان یکی از جایگزین های مناسب برای کنترل پاتوژن هایی است که به آنتی بیوتیک ها مقاوم شده اند (۱۶).

پونه *Mena longifolia* یکی از گیاهان دارویی از خانواده نعنائیان است که برای سالیان طولانی منبع ارزشمندی برای فرآورده های طبیعی برای حفظ سلامت انسان به خصوص در دهه اخیر بوده است و مطالعه های گسترده ای برای درمان طبیعی انواع بیماری ها تاکنون با استفاده از آن صورت گرفته است (۶). روغن های فرار پونه به طور سنتی برای نابسامانی های سیستم تنفسی، عفونت لثه و دندان، آرتریتهای روماتیسمی و نارسایی های سیستم ادراری به کار می رود. به عنوان یک گیاه دارویی، پونه کاربردهای ضدقارچی، ضداسپاسم، ضدباکتری (۵،۱۹)، آنتی اکسیدانی (۱۰)، ضدانعقادی (۱۲) و عامل ضد-التهابی (۴،۹) دارد. یکی از مهم ترین اجزای موجود در روغن پونه ترکیب فنول کارواکرول و فینیل پروپانوئیدها هستند که خاصیت ضد میکروبی قوی از خود نشان داده است (۱۸). مهم ترین اجزا و ترکیب های موجود در اسانس پونه شامل لیمونین، گاما کاریوفیلین، رو-سیمین، کانفور، لینالول، آلفا-پینین، کارواکرول و تیمول است (۲). در بین این ترکیب های کارواکرول و تیمول مهم ترین اجزای روغن پونه هستند که مسئول اثر آنتی اکسیدانی، ضد میکروبی و ضدقارچی آن هستند (۲۳، ۱۵). از آن جایی که بیماری های عفونی ناشی از باکتری های گرم منفی و مثبت همه ساله باعث مرگ و میر افراد زیادی در ایران و جهان می شود و با توجه به توسعه مقاومت باکتری ها به داروهای ضد میکروبی و همچنین اثرهای جانبی زبان بار درمان مداوم با آنتی بیوتیک ها، استفاده از روش های جدید درمان از قبیل کاربرد داروهای با منشا طبیعی و مشتق شده از گیاهان و در کنار آن، برطرف کردن مشکل بروز مقاومت به داروهای شیمیایی، اجتناب ناپذیر است.

روش کار

این مطالعه بر روی ۲۵۰ ایزوله بالینی که به آزمایشگاه نواب-صفوی اصفهان به صورت سوپ مقعدی مدفوعی بر روی محیط کری بلر (Cary Beler; Biolife) که از کل مراکز بهداشتی و درمانی شهری و روستایی و بیمارستان های استان اصفهان به این مرکز ارجاع داده شده بود مورد بررسی قرار گرفت و غربالگری اولیه انجام شد. این ایزوله ها شامل ۲۰ ایزوله شیگلا

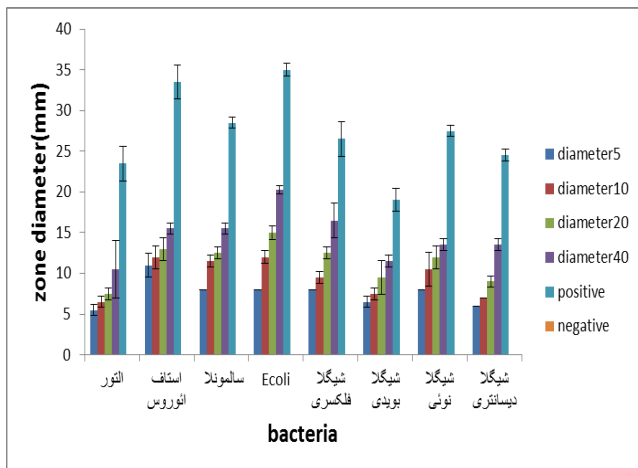
انواع کلی فرم ها به خصوص ۴ گونه *اشرشیا کلی*، *انترو باکتر کلوآکه*، *انتروباکتر آئروژنز وکلیسیلا پنومونیه* از عوامل دیگر منتقل شونده از طریق آب و غذا است. باکتری بروسلا *SP* قادر است از طریق شیر آلوده و یا دستکاری مواد غذایی آلوده انتقال یابد و درمان آن با تتراسایکلین و استرپتومایسین هم-زمان با هم صورت می گیرد. دو عامل اصلی و مهم مسمومیت غذایی انتروتوکسین حاصل از برخی از سویه های استافیلوکوکوس و اگرو توکسین کلاستریدیم بوتولینوم است که در هر دو حالت مسمومیت از خوردن غذایی که در اثر آلوده شدن با باکتری های فوق تحت شرایط مناسب از نظر درجه حرارت، pH، هوا و مدت نگهداری مواد غذایی و عوامل دیگر به وجود آمده اند شکل می گیرد. هر دو توکسین در برابر آنزیم های پروتئولیتیک به نسبت مقاوم هستند و این صفت جذب آن ها را از لوله گوارش امکان پذیر می سازد (۱۰).

کشف آنتی بیوتیک ها به عنوان عوامل شیمیایی برای درمان بیماری های باکتریایی منجر به حذف احتمالی بیماری های عفونی گردید، ولی به دلیل مصرف بیش از حد آنتی بیوتیک ها، باکتری ها به این داروها مقاوم شدند. این افزایش مقاومت به آنتی بیوتیک ها به عنوان یک مشکل اساسی برای درمان تبدیل شد و بنابراین یک نیاز مبرمی برای حل این مشکل احساس شد (۲۰). هم چنین سوء مصرف آنتی بیوتیک ها معضل دیگری بود که علاوه بر افزایش مقاومت باکتری ها به داروها، کاربرد دزهای بالا و درمان طولانی مدت با آن ها را منجر به حذف فلور باکتری های مفید و قرارگیری مجدد افراد در معرض آلودگی کرد. اسهال یکی از رایج ترین اثرهای نامطلوب در برابر آنتی بیوتیک ها است که منجر به کاهش ویتامین های ضروری و مواد معدنی به خصوص ویتامین K، منیزیم و روی در بدن انسان می شود. بیماری های خودآیمنی، کمبود ویتامین، حملات ناگهانی، کاهش پلاکت ها، شوک های آلرژیک، صدمات کلیوی، اندرکنش دارو-دارو و مرگ و نتایج زیان بار دیگر از اثرها و نتایج درمان با آنتی بیوتیک ها هستند (۱۷). بنابراین محققین مجبور به تحقیق و جستجو برای مواد ضد میکروبی جدید از منابع مختلف از جمله گیاهان دارویی شدند (۳). گزارش شده است که داروهای مشتق شده از گیاهان هم سالم و هم بدون هر گونه اثرهای جانبی بوده که آن ها را به-عنوان جایگزین های مناسب برای داروهای سنتتیک مبدل ساخته است. ویژگی های ضد میکروبی گیاهان دارویی به دلیل متابولیت های ثانویه موجود در آن ها از قبیل تانن ها، فلاونوئیدها و اسانس ها یا روغن های ضروری است. گیاهان دارویی از آغاز تمدن به وسیله انسان برای مبارزه با بیماری ها

۸۰ µl از رقت‌های مختلف اسانس اضافه شد و از سیپرو فلوکساسین ۰/۰۲ gr/ml به‌عنوان کنترل مثبت و از سرم فیزیولوژی به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد و در نهایت به هر چاهک مقدار ۲۰ µl از باکتری‌های موردنظر با معادل با نیم‌مک‌فارلند (CFU/ml × ۱۰^۶ × ۱/۵) اضافه شد و به‌مدت ۲۴ ساعت در ۳۷°C انکوبه شد. سپس جذب نوری تمامی چاهک‌ها به کمک دستگاه الیزا ریدر خوانده شد و بر حسب میزان جذب نوری MIC و MBC در نظر گرفته شد.

نتایج

۱- نتایج مربوط به روش چاهک آگار



شکل ۱- مقایسه میانگین و انحراف معیار قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر غلظت‌های مختلف اسانس گیاه پونه را تحت روش خشک کردن در سایه را بر ایزوله‌های باکتریایی و باکتری‌های استاندارد مورد مطالعه به روش چاهک در آگار نشان می‌دهد.

شکل ۱، مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر غلظت‌های مختلف اسانس *Mentha longifolia* تحت روش خشک کردن در سایه بر باکتری‌های مورد مطالعه به روش چاهک در آگار. هر نقطه روی نمودار میانگین سه تکرار است. Error Bar بیانگر Mean⁺, - SD که در سطح P < ۰/۰۵ معنادار است.

۲- نتایج تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی اسانس پونه تحت روش خشک کردن در سایه بر باکتری‌های مورد مطالعه

فلکسنری، ۲۰ نمونه/شرشیا کلای، ۶ نمونه شیگلا سونئی، ۵ نمونه/استافیلوکوکوس ارتوس و ۵ نمونه ویبریولکرا بیوتیپ التور، ۴ نمونه شیگلا بوئیدی، ۳ نمونه سالمونلا تیفی و سالمونلا پاراتیفی و ۲ نمونه شیگلا دیسانتریه که همگی MDR بودند جدا شد. البته برای تشخیص دقیق جنس و گونه های باکتری‌ها از تست‌های بیوشیمیایی و آنتی سرمی استفاده شد و سپس جهت تشخیص مقاومت ایزوله‌ها در برابر ۱۴ آنتی بیوتیک رایج کشور از روش آگار دیفیوژن با متد کربی-بائر استفاده شد.

تهیه اسانس از گیاه *Mentha longifolia*

ابتدا بذر این گیاه از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد و به تأیید هرباریوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان با جنس و گونه *Mentha longifolia* به شماره ۱۱۴/۰۰۵/۰۰۱ رسید و سپس گیاه مربوطه در سایه در دمای C ۲۵ به‌مدت دو روز خشک شد. برای اسانس‌گیری از دستگاه کلونجر استفاده شد.

تهیه سریال رقت از اسانس

برای تهیه رقت‌های ۴۰، ۲۰، ۱۰، ۵ درصد از اسانس‌ها ابتدا در چهار لوله مقدار ۴۸۰ میکرولیتر از محلول DMSO ۱۰٪ و سپس به لوله اول مقدار ۲۰ میکرولیتر از اسانس اضافه و تا آخر سریال رقت تهیه شد.

نحوه اجرای روش کیفی چاهک در آگار

به‌منظور اجرای این روش از کشت میکروبی ۲۴ ساعته باکتری‌های موردنظر با کدورت معادل ۵/۵ مک‌فارلند در محیط کشت (Tryptic Soy Broth; -Biolife) TSB استفاده شد. سپس ۱ ml از سوسپانسیون به‌دست آمده بر روی محیط MHA (Mueller Hinton Agar; Biolife) انتقال داده شد و در ۴ جهت کشت داده شد و با استفاده از پپیت پاستور استریل چاهک‌هایی به قطر ۶ میلی‌متر با رعایت فاصله از یکدیگر بر روی محیط کشت ایجاد شد. سپس ۹۰ µl میکرولیتر از غلظت‌های مختلف اسانس در هر چاهک تلقیح شد. از محلول ۱۰٪ DMSO به‌عنوان کنترل منفی و از آنتی-بیوتیک سیپروفلوکساسین ۰/۰۲ gr/ml به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷°C قطر هاله عدم رشد اطراف هر چاهک با استفاده از خط‌کش میلی‌متری اندازه‌گیری شد. به‌منظور تأیید آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد (۱۹).

نحوه اجرای روش کمی میکرودیالوژن

جهت اجرای این روش از پلیت‌هایی بنام میکرو تیترا پلیت استفاده شد و به هر چاهک ۱۰۰ µl از محیط کشت مولر هینتون برات (Mueller Hinton Broth; Biolife) MHB و

۲۹۳/۰٪	gama-Cadinene	۲۸
۶۰۳/۰٪	delta-Cadinene	۲۹
۸۰۵/۶٪	cis-alpha-bisabolene	۳۰
۰۴۱/۳٪	Elemol	۳۱
۵۵۴/۰٪	Spathulenol	۳۲
۶۶۸/۰٪	Caryophyllene oxide	۳۳
۷۵۰/۱٪	Muurolol	۳۴
۳۶۴/۰٪	ha-Eudesmolgalp	۳۵
۳۷۶/۰٪	Intermedeol	۳۶
۲۹۸/۰٪	alpha-Bisabolol	۳۷

بحث

به طور کلی کاربرد اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی با ویژگی ضد میکروبی شناخته شده می‌تواند اهمیت زیادی در درمان بیماری‌ها داشته باشد. در سال‌های اخیر مطالعه‌هایی در کشورهای مختلف برای اثبات تأثیر اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی روی درمان بیماری‌ها انجام گرفته است. نتایج این پژوهش بیانگر اثر بهینه اسانس پونه وحشی *Mentha longifolia* بر علیه باکتری‌های گرم مثبت و منفی مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک مسبب اسهال باکتریایی بود.

مطابق با نمودار ۱ نتایج یافته‌های حاصل از مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد در باکتری‌های مورد مطالعه در غلظت ۵ درصد از اسانس پونه وحشی تحت روش خشک کردن در سایه نشان داد که بالاترین قطر هاله عدم رشد بر حسب (mm) در کنترل مثبت (۳۳ mm) مشاهده شد. در بین باکتری‌های مورد مطالعه نیز بالاترین قطر هاله عدم رشد با میانگین ۱۳/۵ میلی‌متر مربوط به باکتری شیگلایکسونی در غلظت ۴۰٪ اسانس این گیاه بود و کم‌ترین قطر هاله عدم رشد با میانگین ۷/۵ میلی‌متر در غلظت ۵٪ اسانس مربوط به باکتری شیگلایکسونری مشاهده شد. نتایج مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد جهت اشریشیاکلای در غلظت ۵٪ اسانس با سایر باکتری‌های مورد مطالعه نشان داد که بین قطر هاله عدم رشد در شیگلایکسونری و استافیلوکوکوس آئروس اختلاف معنی‌داری داشت (P < ۰/۰۵). هم‌چنین بین اشریشیاکلای با سایر باکتری‌های مورد مطالعه، قطر هاله عدم رشد در غلظت ۵٪ اسانس این گیاه اختلاف معنی‌دار آماری داشت (نمودار ۱-۱). قطر هاله عدم رشد در شیگلایکسونری با همه باکتری‌های مورد مطالعه به جزء شیگلایکسونی اختلاف معنی‌داری داشت. در حالی که مقایسه بین قطر هاله عدم رشد شیگلایکسونی با سایر باکتری‌های مورد مطالعه نیز اختلاف معنی‌داری را نشان نداد، ولی فقط با سه باکتری استافیلوکوکوس آئروس، شیگلایکسونی و ویبریوکلرا بیوتیپ التور اختلاف معنی‌داری داشت (P < ۰/۰۵). در بین باکتری‌های مورد مطالعه، قطر هاله

جدول ۱- حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) غلظت‌های مختلف اسانس *Mentha longifolia* تحت روش خشک کردن در سایه بر ایزوله‌های باکتریایی مورد مطالعه به روش میکروداپلوشن را نشان می‌دهد.

نام باکتری	MBC (mg/ml) سایه	MIC (mg/ml) سایه
اشریشیاکلای	۴۰	۱۰
شیگلایکسونری	۴۰	۲۰
شیگلایکسونی	۴۰	۲۰
شیگلایکسونتریه	۴۰	۲۰
شیگلایکسونی	۴۰	۲۰
سالمونلاتیفی و پاراتیفی	۴۰	۲۰
استافیلوکوکوس اورئوس	۴۰	۲۰
ویبریوکلرا بیوتیپ التور	۴۰	۲۰

۳- نتایج مربوط به ارزیابی فیتوشیمیایی اسانس پونه-

وحشی

جدول ۲، مهم‌ترین ترکیب‌های فیتوشیمیایی اسانس پونه- وحشی *Mentha longifolia* به کمک دستگاه GC-mass مدل اجیلینگ ۶۸۹۰ با ستونی به طول ۳۰ متر و قطر ۲/۵ میلی‌متر و ضخامت لایه ۲/۵ میکرومتر از نوع BP×۵ را نشان می‌دهد.

جدول ۲- ترکیب شیمیایی اسانس پونه وحشی

ردیف	نام ترکیب شیمیایی	درصد
۱	alpha-Thujene	۴۳/۱٪
۲	alpha-Pinene	۴۰/۳٪
۳	Sabinene	۷۷۴/۰٪
۴	beta-Pinene	۲۲۵/۰٪
۵	beta-Myrcene	۶۲۵/۰٪
۶	alpha-Terpinene	۰/۱۸/۱٪
۷	p-Cymene	۵۸۳/۳٪
۸	Eucalyptol(1,8 Cineole)	۸۲۳/۳٪
۹	cis-beta-Ocimene	۰/۳۷/۱٪
۱۰	trans-beta-Ocimene	۳۱۴/۰٪
۱۱	gama-Terpinene	۶۶۸/۹٪
۱۲	alpha-Terpinolene	۱۸۱/۰٪
۱۳	Linalool	۳۲۲/۰٪
۱۴	E,Z-Alloocimene	۱۸۱/۰٪
۱۵	Geijerene	۲۶۲/۰٪
۱۶	Borneol	۰/۶۷/۰٪
۱۷	Terpinene-4-ol	۲۶۱/۰٪
۱۸	alpha-Terpineol	۲۰۰/۱٪
۱۹	Carvacrol, methyl ether	۸۸۰/۶٪
۲۰	Thymol	۱۲۹/۳۷٪
۲۱	Carvacrol	۵۷۳/۹٪
۲۲	alpha-Copaene	۲۳۷/۰٪
۲۳	beta-Bourbonene	۳۱۵/۰٪
۲۴	trans-Caryophyllene	۹۴۸/۱٪
۲۵	trans-alpha-Bergamotene	۱۵۳/۰٪
۲۶	trans-beta-Farnesene	۴۱۶/۰٪
۲۷	Germacrene D	۰/۵۵/۱٪

باکتری‌های گرم مثبت در این پژوهش حساسیت بیش‌تری نسبت به اسانس و روغن‌های ضروری این گیاه در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی از خود نشان داده بودند (۱۳). نتایج و یافته‌های حاصل از این پژوهش با نتایج اوزکالپ و همکاران (۱۳) در سال ۲۰۱۰ در بررسی خواص ضدباکتریایی اسانس پونه‌وحشی تا حدودی مطابقت داشت.

در مطالعه صورت گرفته به‌وسیله قربانی و همکاران (۱) تأثیر ضد میکروبی غلظت‌های مختلف اسانس پونه‌کوهی بر باکتری سالمونلا انتریتیدیس در سس مایونز در دو دمای ۲۵ و ۴ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفته است و نتایج این محققین نشان داد که اثر ضد میکروبی اسانس پونه‌کوهی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نسبت به دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بیش‌تر بوده و اثر ضد میکروبی با افزایش غلظت اسانس‌ها افزایش یافت. نتایج تحقیق حاضر با یافته‌های قربانی و همکاران هم‌خوانی داشت.

تحقیقات محققان نشان داده که مهم‌ترین اجزاء و ترکیب‌های موجود در اسانس پونه‌وحشی شامل لیمونین، گاما کاربوفیلین، رو-سیمین، کامفور، لینالول، آلفا-پینین، کارواکرول و تیمول است (۲). در بین این ترکیب‌های کارواکرول و تیمول مهم‌ترین اجزای روغن و اسانس این گیاه است که مسئول اثر آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی و ضدقارچی آن است (۱۵، ۲۲). نتایج حاصل از این تحقیق طبق (جدول ۲) نشان داد که، بیش‌ترین ترکیب‌های موجود در اسانس پونه مربوط به ماده تیمول با ۳۷/۱۲۹٪ و ماده کارواکرول با ۹/۵۷٪ بود که با نتایج این محققین هم‌خوانی داشت.

در تحقیق حاضر نتایج به‌دست آمده نشان‌دهنده اثر کشندگی اسانس پونه‌وحشی بر باکتری‌های مورد مطالعه است. نتایج نشان داد با افزایش غلظت‌های اسانس پونه‌کوهی جمعیت باکتری‌های مورد مطالعه کم‌تر می‌شود. پونه‌کوهی به‌دلیل داشتن عوامل ضد میکروبی شامل تیمول و کارواکرول باعث جلوگیری از رشد باکتری‌های گرم مثبت، گرم منفی، کپک و مخمر می‌شود. از ویژگی‌های مهم اسانس‌ها و اجزاء تشکیل دهنده آن‌ها خاصیت آب‌گریزی آن‌ها است که موجب نفوذ این مواد به لیپیدهای غشاء سلول باکتری و میتوکندری‌ها شده و سبب اختلال در ساختمان آن‌ها و ایجاد نفوذپذیری بیش‌تر می‌گردد. این مسئله موجب خروج و نشت یون‌ها و دیگر محتویات سلولی به بیرون می‌شود. اگرچه خروج مقادیر محدود این مواد برای باکتری قابل تحمل است ولی در قابلیت زیستی آن اثر گذاشته و خروج مقادیر وسیع محتویات سلولی یا خروج یون‌ها و مولکول‌های حیاتی موجب مرگ سلول خواهد شد. به‌طور کلی هر چه مقدار مواد فنولی در اسانس

عدم رشد در *استافیلوکوکوس آرئوس* با قطر هاله عدم رشد در همه باکتری‌های مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($P < 0.05$) که بیش‌ترین اثر بازدارندگی مربوط به غلظت ۴۰٪ اسانس تحت روش خشک کردن در سایه و کم‌ترین اثر بازدارندگی مربوط به غلظت ۵٪ اسانس بود و با افزایش غلظت اسانس اثر بازدارندگی بیش‌تر شده بود. به‌طوری‌که، تمام غلظت‌های مورد مطالعه این اسانس اثر معنی‌داری روی کاهش جمعیت باکتری‌های مورد مطالعه داشت. نتایج مطالعه-های پژوهی الموتی (۱۴) و هم‌چنین نتایج تحقیقات سوکوویچ و همکاران (۲۱) در سال ۲۰۱۰ نشان داد که، از بین ۱۰ اسانس مورد بررسی، بیش‌ترین خاصیت ضد باکتریایی متعلق به اسانس پونه‌وحشی بود که با نتایج این تحقیق هم‌خوانی داشت (۱۳، ۲۱). هم‌چنین تأثیر غلظت این اسانس در متوقف کردن رشد باکتری‌های گرم منفی مطابق با نمودار ۱ در مقایسه با باکتری گرم مثبت بیش‌تر بود. نتایج مربوط به تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره پونه‌وحشی بر باکتری‌های مورد مطالعه به روش میکرودیالوشن (جدول ۱) نشان داد که حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره پونه‌وحشی بر باکتری اشرشیاکلی تحت شرایط خشک کردن در سایه به-ترتیب ۴۰ و ۱۰ درصد بود و برای سایر باکتری‌های مورد مطالعه در این تحقیق به‌ترتیب ۴۰ و ۲۰ درصد بود. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که با افزایش غلظت اسانس این گیاه صرف‌نظر از نوع خشک کردن و اسانس‌گیری فعالیت ضدباکتریایی آن افزایش پیدا کرده بود. پژوهی الموتی و همکاران (۱۴) ترکیب‌های شیمیایی و فعالیت ضد میکروبی اسانس پونه‌وحشی و زیره سبز را مورد ارزیابی قرار دادند. این محققین گزارش کردند که، تمامی غلظت‌های مورد مطالعه اسانس *Mentha longifolia* اثر معنی‌داری روی جمعیت باکتری‌های مورد مطالعه نشان داده بود و با افزایش غلظت اسانس این اثر بازدارندگی بیش‌تر شده بود. نتایج تحقیق حاضر با یافته‌های پژوهی الموتی و همکاران هم‌خوانی نشان داد. در مطالعه‌ای که به‌وسیله اوزکالپ و همکاران (۱۳) در سال ۲۰۱۰ صورت گرفته بود، خاصیت ضدباکتریایی *Mentha longifolia* به‌همراه آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین روی برخی سویه‌های باکتریایی از قبیل *اشرشیاکلی*، *کلبسیلا پنومونیه*، *سالمونلا پاراتیفی انتریتیدیس*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *استافیلوکوکوس آرئوس* و *استرپتوکوکوس پیوژنز* مورد بررسی قرار گرفته بود. نتایج مطالعه آن‌ها نشان داد که روغن و اسانس گیاه پونه‌وحشی خاصیت ضد میکروبی خیلی قوی در مقایسه با آمپی‌سیلین از خود نشان داده بود و هم‌چنین

در مطالعه‌ایی که به‌وسیله فورنومیتی و همکاران (۷) در سال ۲۰۱۵ صورت گرفت، فعالیت ضد میکروبی اسانس‌های پونه-وحشی، مریم‌گلی و آویشن باغی روی جدایه‌های کلینیکی *اشریشیاکلی*، *کلبسیلاکسی توکا* و *کلبسیلا پنومونیه* مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه گیاهان موردنظر کشت و پس از ۹ ماه برداشت شدند. استخراج اسانس با استفاده از دستگاه کلونجر صورت گرفت و خاصیت ضدباکتریایی (حداقل غلظت مهارکنندگی رشد باکتری‌های مورد آزمایش) آن‌ها بر روی باکتری‌های مقاوم به دارو مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج آنها نشان داد که حساس‌ترین باکتری، مربوط به گونه *کلبسیلاکسی توکا* بود که میزان حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) برای آن برابر با ۰/۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای اسانس پونه‌وحشی و ۸/۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای اسانس تیموس یا آویشن بود. دومین گونه حساس *کلبسیلا پنومونیه* بود که میانگین مقدار MIC برابر با ۹/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر - لیترا برای اسانس آویشن و ۷۳/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای اسانس پونه‌وحشی بود. باکتری *اشریشیاکلی* مقاوم‌ترین گونه در برابر خاصیت ضدباکتریایی اسانس مورد بررسی بود.

بالتر باشد، خواص ضد میکروبی آن‌ها علیه پاتوژن‌های غذایی بیش‌تر خواهد بود. این ترکیب‌ها شامل کارواکرول، اوژنول و تیمول هستند. مکانیسم اثر این ترکیب‌ها هم مانند سایر ترکیب‌های فنولی شامل موارد زیر است. اختلال در غشاء سیتوپلاسمی، برهم‌زدن نیروی حرکت پروتونی و جریان الکتریکی، انعقاد محتویات سلول (۱). به‌طور کلی مطالعه‌های صورت گرفته روی اسانس‌های گیاهی نشان داده است که اسانس‌ها فاز تأخیری رشد باکتریایی را طولانی کرده در حالی که سرعت رشد در فاز لگاریتمی را کاهش می‌دهند عملکرد آن‌ها از یک ساز و کار واحد تبعیت کرده که مربوط به تجمع آن‌ها در دولایه لیپیدی غشاء سلول و تخریب ساختار آن است (۱).

نتایج تحقیقات فریدمن و همکاران (۸) در سال ۲۰۰۲ نشان داد که، فعالیت ضد میکروبی روغن و اسانس پونه‌وحشی دارای ترکیب‌های فنلی از قبیل کارواکرول و تیمول که به طرز قابل توجهی بر علیه باکتری‌های گرم منفی اثر کشندگی دارند در این گیاه بالا است. این محققین گزارش کردند که به‌دلیل ماهیت آب‌گریزی این ترکیب‌ها، کارواکرول و تیمول با دولایه فسفولیپید غشاء سیتوپلاسمی باکتری‌ها به‌هم آمیخته و از این طریق باعث کاهش یکپارچگی غشاء و نشت مواد درون سلول از قبیل یون‌ها، ATP و اسیدهای نوکلئیک به بیرون از سلول باکتری می‌شوند (۸، ۲۳). نتایج این محققین با یافته‌های حاصل از این پژوهش مطابقت نشان داد.

سوکوویچ و همکاران (۲۱) در سال ۲۰۱۰ فعالیت ضدباکتریایی ۱۰ اسانس گیاه دارویی شامل بالهنگ، لیمو ترش، اسطوخدوس، نعنای فلفلی، ماتریکاریا، اوسیمون، پونه-وحشی، آویشن و مریم‌گلی را با روش چاهک پلیت مورد ارزیابی قرار دادند. این محققین نه تنها فعالیت ضدباکتریایی اسانس این گیاهان را بررسی کردند بلکه، ترکیب‌ها و اجزاء سازنده هر کدام را به کمک GC/MS ارزیابی نمودند و مشاهده کردند که تمامی این گیاهان دارای اجزا مشترکی شامل: کامفور، کارواکرول، ۱-۸ سینئول، لینالول، لینالیل استات، لیمونن، منتول، آلفا پینین، بتا پینین و تیمول بودند که تمامی این اسانس‌ها بر علیه باکتری‌هایی مانند: *باسیلوس سابتیلیس*، *انتروباکتر کلوآسه*، *اشریشیاکلی O157:H7*، *میکروکوکوس فلاووس*، *پروتئوس میرابیلیس*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *سالمونلا انتریتیدیس*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، *سالمونلا تیفی موریوم* و *استافیلوکوکوس آرتوس* مؤثر بودند. نتایج این محققین نشان داد که از بین ۱۰ اسانس مورد بررسی بیش‌ترین خاصیت ضدباکتریایی متعلق به اسانس پونه‌وحشی بود.

نتیجه گیری

با توجه به این نکته که گیاهان دارویی به دلیل ماهیت طبیعی-شان با بدن سازگاری بهتری داشته و دارای عوارض جانبی بسیار کمی هستند، لذا چنین به نظر می رسد که به دلیل افزایش مقاومت به آنتی بیوتیک ها در باکتری ها، نتایج این مطالعه بتواند پس از بررسی کامل در شرایط Invivo و پیدا کردن دز و زمان موثر این اسانس و دستیابی به دز سمی و غیرسمی این اسانس آن را به شرکت های سازنده گیاهان دارویی مانند گل دارو یا باریج اسانس معرفی نمود که نه تنها جهت پیشگیری از انواع مسمومیت باکتریایی بلکه حتی برای درمان آن ها نیز استفاده شود.

سپاسگزاری

با تشکر از همه اساتید سروران و عزیزانی که در این تحقیق مرا یاری نمودند. مخصوصا مسئولین محترم آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان سرکار خانم مهندس شادی شاهسار و مسئولین محترم مرکز بهداشت شماره یک و درمانگاه نواب صفوی اصفهان کمال تشکر و امتنان را داریم.

منابع

1. Adams RP. 2001. Identification of essential oil components by gas chromatography and Mass Spectrometry. Allured, USA. 750p.
2. Arcila-Lozano CC, Loarca-Pina, G, Lecona-Urbe S, & González De Mejia E. 2000. Oregano: Propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 54(1), 100-111.
3. Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential application in foods. A review. International Journal of Food Microbiology, 94: 223-253.
4. Caudhary NMA, Saeed S, Tariq P. 2007. Anti bacterial Effects Of Oregano (*Origanum Vulgare*) Against Gram Negative Bacilli. Pak. J. Bot., 39(2): 609-613.
5. Ertas ON T, Guler M, Ciftci B, Dalkilic UG, Simsek A. 2005. The effect of an essential oil mix derived from Oregano, Clove and Anise on broiler performance. International Journal of Poultry Science, 4(11): 879-884.
6. Force M., Sparks WS, Ronzio RA. 2000. Inhibition of enteric parasites by emulsified oil of Oregano In vivo. Phytother Res, 14(3): 213-214.
7. Fournomiti M, Kimbaris A, Mantzourani L, Plessas S, Theodoridou I, Papaemmanouil V, Kapsiotis I, Panopoulou M, Stavropoulou E, Bezirtzoglou EE, Alexopoulos A. 2015. Antimicrobial activity of essential oils of cultivated oregano (*Origanum vulgare*), sage (*Salvia officinalis*), and thyme (*Thymus vulgaris*) against clinical isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, and *Klebsiella pneumoniae*. Microbial Ecology in Health & Disease, 26: 232-289.
8. Friedman M, Henika PR, Mandrell RE. 2002. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents. against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. J Food Prot, 65: 1545-1560.
9. Kelm MA, Nair MG, Strasburg GM. 2000. Antioxidant and Cyclooxygenase inhibitory phenolic compounds from *Ocimum sanctum* Linn. Phytomedicine, 7(1): 7-13.
10. Lamaison JL, Petitjean-Freytet C, Carnate A. 1991. Medicinal Lamiaceae with anti oxidant properties, a potential source of rosmarinic acid. Pharm Acta Helv, 66(7) : 185-188.
11. Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee. 2004. Food-related illness and death in the United States. Emerg. Infect. Dis. 5: 607-625
12. Okazaki K, Kawazoe K and Takahashi Y. 2002. Human platelet aggregation inhibitors from Thyme (*Thymus vulgaris* L). Phytother Res, 16: 398-399.
13. Ozkalp B, Fatih S, Mustafa Ozcan, Mehmet MO. 2010. The antibacterial activity of essential oil of oregano (*Origanum vulgare* L.). Journal of Food, Agriculture & Environment (JFAE). Vol. 8, Issue 2, pages 272-274.
14. Pajohi Alamoti, M. R, Tajik, H., Akhondzade, A., Gandomi, H., Ehsani, A. 2012. A Study on chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Mentha longifolia* L. and *Cuminum cyminum* L. in soup. JFST No. 36, Vol. 9, Fall 2012 pp33-45 (In Farsi).
15. Proestos CN, Chorianopoulos GJ, Nychas L, Komaitis M. 2005. RP-HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. J. Agric. Food Chem., 53: 1190-1195.
16. Raghavendra MP, Satish S, Raveesha KA. 2006. Phytochemical analysis and antibacterial activity of *Oxalis corniculata*; a known medicinal plant. My science, 1: 72-78
17. Roden DM. 2004. Principles of clinical pharmacology. In: Kasper DL, Braunwald E, eds. Harrison's Principles of Internal Medicine. 16th ed. New York, NY: McGraw-Hill
18. Sadgrove N, Jones G. 2015. A Contemporary Introduction to Essential Oils: Chemistry, Bioactivity and Prospects for Australian Agriculture. Agriculture, 5: 48-102.
19. Silva NCC, Fernandes Júnior A. 2010. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases. vol 16, issue 3 pp 402-413.
20. Sirohi p, Shweta R, Amit Kh, Anuj P, Anil S, Devi S. 2013. Herbal Product Based Remedies Against Microbial Infections And Resistance. Weekly Science Research Journal, Vol-1, Issue-8, 12 September 2013. DOI : 10.9780/2321-7871/182013/24.
21. Sokovic A, Glamoclija J, Marin PD, Brki D, Van Griensven LJ. 2010. Antibacterial Effects of the Essential Oils of Commonly Consumed Medicinal Herbs Using an In Vitro Model. 15:7532-7546.
22. Tian H, Lai DM. 2006. Analysis on the volatile oil in *Origanum vulgare*. Zhong Yao Cai, 29(9) : 920-921.
23. Trombetta D, Castelli F, Sarpietro MG, Venuti V, Cristani M, Daniele C, Saija A, Mozzanti G, Bisignano G. 2005. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. Antimicrob Agents Chemother, 49: 2474-2478.