بررسی اثر ضد میکروبی و ضد بیوفیلمی عطرمایه‌های نعناع فلفلی و آویشن شیرازی بر روی *اسینتو باکتر بومانی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف

فردین‌علی ملایری[۱]، زهرا یزدان‌پور[۲]، حسین بندانی[۳]، بهمن فاضلی‌نسب[۴]، سعیده سعیدی*[۵]

۱- دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی زابل، زابل، ایران.
۲- کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی زابل، زابل، ایران.
۳- دانشجوی دکتری علوم دام، دانشگاه ملی زابل، زابل، ایران.
۴- گروه پژوهشی زراعت و اصلاح نباتات، پژوهشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
۵- پژوهشکده زیست‌فناوری کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

دریافت مقاله: ۸ آبان ۱۳۹۸، بازنگری: ۱۹ بهمن ۱۳۹۸، پذیرش نهایی: ۲۰ اسفند ۱۳۹۸

چکیده

هدف از این مطالعه بررسی اثر ضد میکروبی و ضد بیوفیلمی نعناع فلفلی و آویشن شیرازی بر روی *اسینتو باکتر بومانی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف است. جدایه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اسینتو باکتر بومانی* از بیمارستان‌های شهرستان زابل جداسازی شد و عطرمایه گیاه آویشن شیرازی و نعناع فلفلی با دستگاه کلونجر به دست آمد. حداقل غلظت کشندگی و حداقل غلظت مهارکنندگی با روش میکرودایلوشن تعیین گردید. نتایج حاصل از بررسی نشان داد که کمترین غلظت مهارکنندگی عطرمایه نعناع فلفلی در برابر *اسینتو باکتر بومانی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* برابر با ۱,۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است. نتایج حاصل از مطالعه ما بر روی آویشن شیرازی نشان داد که کمترین غلظت عطرمایه آویشن در برابر *اسینتو باکتر بومانی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* برابر با ۱/۲۵ و ۰/۳۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است. نتایج نشان داد که عطرمایه نعناع فلفلی و آویشن شیرازی مهارکننده رشد باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و اسینتو باکتر بوده است.

واژگان کلیدی: عطرمایه، *استافیلوکوکوس اورئوس* ، *اسینتو باکتر بومانی*، حداقل غلظت مهارکنندگی

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: s.saeedi12@yahoo.com

مقدمه

گیاهان دارویی یکی از منابع دارویی در جهان هستند (۱). امروزه به دلیل تبیین عوارض جانبی داروهای شیمیایی، مصرف داروهای گیاهی در حال افزایش است.

نعناع فلفلی (*Mentha piperita*) حد واسط دو گونه قدیمی *Mentha spicata* و *Mentha aquatic* است و به طور عمده با نام Peppermint شناخته می‌شود. نعناع فلفلی گیاهی علفی و چندساله است. در طب سنتی از گیاه خشک شده نعناع فلفلی و اسانس (عطرمایه) آن برای کاهش اشتها، درمان سرماخوردگی، تهوع، سردرد، سرفه، تب، آماس روده بزرگ (۲) و به عنوان ضد اسپاسم، ضد نفخ، و همچنین در درمان التهاب ریه‌ها (۳-۵) استفاده می‌شود. این گیاه به عنوان سبزی، ادویه و گیاه دارویی کشت و استفاده می‌شود. از برگ‌های خشک‌شده این گیاه برای تهیه دم‌کرده و جوشانده‌های گیاهی، از اندام‌های رویشی تازه برای استفاده به‌عنوان سبزی و از عطرمایه آن به‌عنوان ماده افزودنی در تولید آدامس‌های نعنایی، صنایع بهداشتی مانند خمیردندان و دهان‌شویه و در محصولات مختلف صنایع داروسازی و رایحه‌درمانی استفاده می‌شود. نعناع فلفلی یکی از پرمصرف‌ترین گیاهان دارویی است که مقدار مصرف سالانه عطرمایه آن در جهان به حدود ۷۰۰۰ تن می‌رسد. مقدار عطرمایه این گیاه بسته به شرایط کشت بین ۱ تا ۳ درصد متغیر است. عطرمایه نعناع فلفلی خاصیت ضد باکتری و قارچی (۶، ۷)، آنتی‌اکسیدانی (۸)، ضد تومور و ضد حساسیتی (۹) دارد. از مهم‌ترین ترکیبات تشکیل‌دهنده این گیاه می‌توان به منتول، منتون و متیل‌استات اشاره کرد (۱۰).

آویشن شیرازی گیاهی از خانواده لامیاسیه (معادل فارسی یا لاتین نویس شود) است. مؤثرترین ماده ضد میکروب آن تیمول و کارواکرول است. این گیاه در ایران، پاکستان، هندوستان و افغانستان رشد می‌کند .برگ‌های خشک این گیاه در صنایع غذایی به‌عنوان نگهدارنده و همچنین به دلیل طعم مطلوب آن، برای مزه، مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۱، ۱۲).

بیوفیلم‌های باکتریایی، تجمعات پیچیده باکتری‌ها هستند که در یک پوشش گلیکوکالیکس محصور شده و به سطوح مخاطی می‌چسبند (۱۳). بیوفیلم‌ها با عواملی همچون ضد عفونی‌کننده‌ها و دارو از بین نمی‌روند و بر روی سطح باقی می‌مانند و سبب آلودگی و انتقال بیماری‌های عفونی می‌گردند (۱۴). بیوفیلم‌های میکروبی در ۶۵ درصد عفونت‌های انسان مانند بیماری‌های ریشه دندان، پوسیدگی دندان، عفونت‌های شنت مغزی، مفصل مصنوعی، سوندهای وریدی، زخم‌های ناشی از سوختگی، سوندهای ادراری و تنفسی دیده می‌شوند (۱۵).

با توجه به فراوانی نمونه‌های باکتریایی مشاهده شده در ادرار بیماران مراجعه‌کننده، اهمیت عوامل بیماری‌زا و همچنین حجم و هزینه پژوهش، سعی شد تا در این مطالعه بررسی اثر ضد میکروبی و ضد بیوفیلمی عطرمایه نعناع فلفلی و آویشن شیرازی بر روی *اسینتوباکتر بومانی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روش کار

۱- جداسازی و تأیید آزمایشگاهی اسینتو باکتر بومانی و استافیلوکوکوس اورئوس

۱-۱- اسینتو باکتر بومانی: از ادرار ۵۰ بیمار (۲۳ زن (در محدوده سنی ۲۲ تا ۶۰ سال) و ۲۷ مرد (۲۵ تا ۶۵ سال))، تعداد ۱۰ جدایه اسینتو باکتر بومانی با الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جداسازی و بر روی ژلوز مک کانکی و ژلوز خون‌دار تلقیح گردید و پلیت‌های کشت داده‌شده در حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸-۲۴ ساعت انکوبه شدند. جدایه‌های باکتریایی جداشده به وسیله

تنوعی از واکنش‌های بیوشیمیایی، باکتریولوژیک و آزمون‌های رشد (اکسیداز، کاتالاز، حرکت باکتری، تست‌های قندی از قبیل: تخمیر لاکتوز، سوکروز، گلوکز) و همچنین تست‌های استاندارد از قبیل رنگ‌آمیزی گرم، رنگ‌آمیزی اسید فاست، مورفولوژی و رنگ کلنی قابل شناسایی هستند (۱۶) که در تحقیق حاضر بعد از مشاهده رشد کلونی، از رنگ‌آمیزی گرم و مشاهده کوکسی‌ها و دیپلوکوکسی‌های گرم منفی و همچنین آزمون اکسیداز جهت شناسایی استفاده شد. در مرحله بعد، با استفاده از آزمودن‌های بیوشیمیایی، کشت بر روی مکانکی آگار و انکوباسیون در حرارت‌های ۳۷ درجه و ۴۲ درجه سانتی‌گراد، آزمودن سیترات، آزمودن حرکت و کشت بر روی محیط OF (تخمیر و اکسیداسیون) حاوی قند گلوکز، تشخیص قطعی باکتری‌ها صورت گرفت.

۲-۱- *استافیلوکوکوس اورئوس:* ۱۰جدایه مختلف *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد استفاده در این تحقیق از ادرار بیماران بستری شده در بخش عفونی بیمارستان امیرالمومنین شهرستان زابل جداسازی شده و بر روی محیط‌های کشت اختصاصی مانیتول سالت آگار و ژلوز خون‌دار کشت و خالص‌سازی شدند و با استفاده از آزمودن‌های بیوشیمیایی کاتالاز، کواگولاز، DNase، رشد بر روی محیط کشت افتراقی مانیتول سالت آگار و همچنین تشکیل آگلوتیناسیون بر روی لام شیشه‌ای به‌عنوان گونه *استافیلوکوکوس اورئوس* شناسایی شدند (۱۷).

۲- *تهیه عطرمایه گیاهان آویشن شیرازی و نعناع فلفلی:* گیاه آویشن شیرازی و نعناع فلفلی از مزارع تحقیقاتی مجتمع بقیه ا... الاعظم دانشگاه زابل به دست آمد. این گیاهان در سایه خشک و آسیاب شدند. برای تهیه عطرمایه، ۵۰ گرم پودر خشک از هر دو گیاه در دستگاه کلونجر (شرکت گلدیس، ایران) به مدت ۴-۳ ساعت قرار داده شدند و عطرمایه به دست آمده تا زمان استفاده در یخچال نگهداری گردید.

۳- *تعیین حساسیت جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک:* تعیین حساسیت جدایه‌ها با روش آگار دیسک دیفیوژن استاندارد (Kirby-Bauer) نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مانند جنتامایسین(GM)(۱۰ µg)، آزیترومایسین(AZM)(۱۵ µg)، اگزاسیلین(OX)(۱۰ µg)، سفازولین(CZ)(۳۰µg) و آمپی‌سیلین (AM) (۲۵ µg)، ونکومایسین (V) (۲۵ µg)، آموکسی‌سیلین کلاوید اسید (AMC)(۱۵ µg) (پادتن طب- ایران) انجام گرفت (۱۸). بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، قطر هاله عدم رشد برای هر آنتی‌بیوتیک اندازه‌گیری گردید و نتایج برای هر آنتی‌بیوتیک مطابق با دستورالعمل مربوطه به عنوان حساس، حد واسط و مقاوم ثبت شد (۱۹).

۴- *تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی عطرمایه آویشن شیرازی و نعناع فلفلی بر روی اسینتو باکتر بومانی:* تعیین حساسیت جدایه‌های باکتری نسبت به عصاره گیاهان با استفاده از روش رقت‌سازی در چاهک انجام شد. در محیط کشت جامد تعداد شش چاهک ایجاد شد و به هر چاهک مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر از محیط مایع مغذی مولر هینتون (MHB) اضافه شد. سپس به چاهک اول ۱۰۰ میلی‌لیتر از محلول رقیق شده عصاره‌های گیاهان اضافه شده و پس از مخلوط کردن ۱۰۰ میکرو لیتر از چاهک اول برداشته به چاهک دوم اضافه کرده و بدین ترتیب تا آخرین چاهک این کار انجام داده شد. از چاهک آخر ۱۰۰ میکرو لیتر محیط کشت خارج کرده مقدار ۱۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون میکروبی حاوی 10^7 واحد در میلی‌لیتر معادل ۰/۵ مک فارلند اضافه شده و در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به

مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. اولین چاهکی که از رشد باکتری پس از قرار دادن در انکوباتور جلوگیری کرده باشد به عنوان حداقل غلظت مهارکننده در نظر گرفته شد. برای اطمینان از چاهک‌های شفاف ۱۰ میکرولیتر برداشته به محیط مولر هینتون آگار منتقل گردید و پس از ۲۴ ساعت اولین رقتی که توانسته ۹۹/۹ درصد باکتری را از بین ببرد به عنوان حداقل غلظت کشنده نشان داده شد.

۵- تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی عطرمایه آویشن شیرازی و نعناع فلفلی بر روی استافیلوکوکوس اورئوس: برای تعیین حداقل غلظت مهاری عصاره گیاهان ، میزان ۱۰۰ میکرولیتر از محیط مولر هینتون براث (ساخت شرکت Merk- آلمان) به هر چاهک پلیت میکروتیتر اضافه شد (۲۰، ۲۱). در چاهک اول، ۱۰۰ میکرولیتر از رقت ۲۰mg/ml عصاره اضافه شد و پس از مخلوط کردن، ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک اول برداشته و به چاهک دوم اضافه شد به همین ترتیب ساخت رقت‌های دوبرابری در سایر چاهک‌ها ادامه یافت. سپس ۱۰ میکرولیتر از هر سوسپانسیون باکتریایی($cfu=1/5.10^8$ در هر میلی‌لیتر، نیم مک فارلند) به چاهک‌ها اضافه شد. به چاهک شاهد منفی DMSO اضافه شد (بدون عصاره) سپس پلیت میکروتیتر برای ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شد. حداقل غلظت مهاری، به عنوان پایین‌ترین غلظتی که برای توقف رشد باکتری‌ها در انتهای ۲۲ ساعت گرمخانه گذاری نیاز است، تعریف شد. برای تعیین حداقل غلظت کشندگی(MBC=Minimum Bactericidal Concentration) ۱۰ میکرولیتر از محتوای چاهک‌ها در انتهای ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری، روی محیط نوترینت آگار (ساخت شرکت Merk- آلمان) کشت ثانویه داده شد و پلیت‌ها به منظور بررسی رشد باکتری‌ها به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند، پایین‌ترین غلظت عصاره که در آن ۹۹/۹ درصد باکتری‌ها رشد نداشتند به عنوان MBC در نظر گرفته شد. تمام آزمایش‌های ضد میکروبی حداقل ۳ مرتبه تکرار شدند.

۶- روش میکروتیتر پلیت برای تعیین کمیت تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌ها: برای سنجش قدرت تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌های جداشده یک کشت ۱۸ تا ۲۴ ساعته از هر ایزوله در تریپتیکاز سوی براث (TSB(Tryptic Soy Broth)(شرکت مرک، آلمان) در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد تهیه شد. سپس یک میلی‌لیتر از این محیط کشت به ۱۰ میلی‌لیتر از محیط TSB استریل اضافه شد و کدورت آن از طریق قرائت جذب نوری سوسپانسیون بین ۰/۰۸ تا ۰/۱ در طول موج ۶۲۵ nm تنظیم گردید. این عمل با دستگاه اسپکتروفتومتر انجام شد. کدورت این سوسپانسیون معادل استاندارد ۰/۵ مک فارلند هست و حاوی بیش از ۱۰۸ باکتری در هر میلی‌لیتر است. سپس از این سوسپانسیون ۲۵۰ میکرولیتر به هر چاهک در میکرو پلیت انتقال داده شد. هر هشت چاهک در میکرو پلیت با یک سوسپانسیون باکتریایی مشخص پر شدند که در این صورت در هر چاهک نزدیک به ۲۵×۱۰۶ CFU/well باکتری موجود هست. چاهک‌های شاهد فقط حاوی TSB استریل می‌باشند. جنس میکرو پلیت‌های ۹۶ چاهکی، پلی استرن و ظرفیت هر چاهک ۳۰۰ میکرولیتر بود و ۵۰ میکرولیتر از عصاره گیاه با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نیز استفاده شده است. سپس سطح پلیت‌ها پوشیده شد و انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه صورت گرفت. بعد از گذشت ۲۴ ساعت محلول غذایی و سوسپانسیون میکروبی از چاهک‌ها خارج شد و هر چاهک سه

مرتبه توسط ۳۰۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی استریل شسته شد.

همچنین پلیت‌ها به‌منظور حذف سلول‌های پلانکتونیک یا غیر متصل در حین شستن به شدت تکان داده می‌شوند. سپس باکتری‌های متصل به دیواره و کف چاهک‌ها با ۲۵۰ میکرولیتر اتانول ۹۶ درصد تثبیت شدند. بعد از ۱۵ دقیقه محتویات چاهک‌ها تخلیه شد. پلیت‌ها به مدت ۵ دقیقه با ۲۰۰ میکرولیتر رنگ کریستال (بلوره) ویوله ۲درصد که برای رنگ‌آمیزی گرم مورد استفاده قرار می‌گیرد رنگ‌آمیزی شدند. بعد از شستن رنگ‌های اضافی پلیت‌ها در دمای آزمایشگاه قرار می‌گیرد تا خشک شوند. سپس سنجش کمی تولید بیوفیلم به وسیله اضافه کردن ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک ۳۳درصد به هر چاهک صورت گرفت. سپس جذب نوری رنگ بلوره ویوله موجود در حلال رنگ‌بر در طول موج ۴۹۲ nm به وسیله دستگاه الایزا خوانده شد.

نتایج

نتایج حاصل از بررسی نشان داد که کمترین غلظت مهارکنندگی عطرمایه نعناع فلفلی در برابر *استرپتوکوکوس بومانی* برابر با ۱,۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است که ۴ جدایه باکتری در این غلظت مهار شده‌اند و کمترین غلظت مهارکنندگی عطرمایه آویشن شیرازی ۱,۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده که ۳ جدایه در این غلظت مهار شده است و یک جدایه باکتری در تمام غلظت‌های عطرمایه رشد کرده است (جدول ۱).

جدول ۱- حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی عطرمایه نعناع فلفلی و آویشن شیرازی بر روی *استرپتوکوکوس بومانی*

جدایه باکتری	MIC-MBC نعناع فلفلی	MIC-MBC آویشن شیرازی	الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی
۱	۱/۲۵-۲/۵	۱/۲۵-۲/۵	-
۲	۲/۵ -۵	۱/۲۵-۲/۵	OX
۳	۲/۵ -۵	رشد	OX-Am
۴	۲/۵ -۵	۲/۵ -۵	OX
۵	۲/۵ -۵	۲/۵ -۵	-
۶	۲/۵ -۵	۲/۵ -۵	OX- Am-Amc
۷	۲/۵ -۵	۱/۲۵-۲/۵	OX
۸	۱/۲۵-۲/۵	۲/۵ -۵	-
۹	۱/۲۵-۲/۵	۲/۵ -۵	OX
۱۰	۱/۲۵-۲/۵	۲/۵ -۵	OX-Am

جدول ۲- حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی عطرمایه نعناع فلفلی و آویشن شیرازی بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس*

جدایه باکتری	MIC-MBC نعناع فلفلی	MIC-MBC آویشن شیرازی	الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی
۱	۱/۲۵-۲/۵	۰/۳۱ -۰/۶۲	OX-V
۲	۲/۵ -۵	۰/۳۱ -۰/۶۲	OX
۳	۲/۵ -۵	۰/۶۲-۱/۲۵	OX
۴	۵ -۱۰	۰/۶۲-۱/۲۵	OX
۵	۵ -۱۰	۰/۶۲-۱/۲۵	OX
۶	۵ -۱۰	۰/۳۱ -۰/۶۲	OX
۷	۱/۲۵-۲/۵	۰/۳۱ -۰/۶۲	OX
۸	رشد	۱/۲۵-۲/۵	OX
۹	رشد	۰/۶۲-۱/۲۵	OX
۱۰	رشد	۱/۲۵-۲/۵	OX

جدول ۳- الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی *اسینتو باکتر بومانی*

جدایه باکتری	AZM	CZ	GM	AM	AMC	OX
حساس	۱۰ (۱۰۰)	۱۰ (۱۰۰)	۱۰ (۱۰۰)	۴(۴۰)	۸ (۸۰)	۳ (۳۰)
نیمه حساس	۰(۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	۴ (۴۰)	۱(۱۰)	۰(۰)
مقاوم	۰ (۰)	۰ (۰)	۰(۰)	۲ (۲۰)	۱(۱۰)	۷ (۷۰)

جنتامایسین(GM)، آزیترومایسین(AZM)، اگزاسیلین(OX)، سفازولین(CZ)، آمپی‌سیلین (AM)، ونکومایسین (V)، آموکسی سیلین کلاوید اسید (AMC)

جدول ۴- الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی *استافیلوکوکوس اورئوس*

جدایه باکتری	AZM	CZ	GM	AM	AMC	OX	V
حساس	۸ (۸۰)	۸(۸۰)	۱۰ (۱۰۰)	۸ (۸۰)	۹(۹۰)	۱۰ (۱۰۰)	۸ (۸۰)
نیمه حساس	۲ (۲۰)	۲(۲۰)	۰ (۰)	۲(۲۰)	۱ (۱۰)	۰ (۰)	۱(۱۰)
مقاوم	۰ (۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	۱(۱۰)

جنتامایسین(GM)، آزیترومایسین(AZM)، اگزاسیلین(OX)، سفازولین(CZ)، آمپی‌سیلین (AM)، ونکومایسین (V)، آموکسی سیلین کلاوید اسید (AMC)

کمترین غلظت مهارکنندگی عطرمایه نعناع فلفلی در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* ۱,۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده که دو جدایه در این غلظت مهار شده و ۴ جدایه در تمام غلظت‌های عطرمایه رشد کرده‌اند، بیشترین غلظت کشندگی برابر با ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است. کمترین غلظت مهارکنندگی عطرمایه آویشن ۰,۳۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده که ۴ جدایه در این غلظت مهار شده‌اند درحالی‌که بیشترین غلظت مهارکنندگی برابر با ۱,۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است که ۲ جدایه در این غلظت مهار شده است (جدول ۲).

نتایج حاصل از بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی *اسینتو باکتر بومانی* نشان داد که یک جدایه به همه آنتی‌بیوتیک‌ها حساس بوده است درحالی‌که تنها جدایه شماره ۶ به ۳ آنتی‌بیوتیک (OX-AMC-AM) مقاوم بوده است (جدول ۳).

نتایج الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داد که همه *استافیلوکوکوس اورئوس* به آنتی‌بیوتیک اگزاسیلین مقاوم بوده و تنها جدایه ۱ که هم به آنتی‌بیوتیک اگزاسیلین و هم ونکومایسین مقاوم بوده است (جدول ۴).

نتایج مطالعه نشان داد که با افزایش غلظت عطرمایه میزان تشکیل بیوفیلم کاهش پیدا می‌کند، همچنین عطرمایه آویشن شیرازی مهارکنندگی خوبی در برابر بیوفیلم *اسینتو باکتر بومانی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* از خود نشان داد.

بحث

نتایج حاصل از بررسی نشان داد که کمترین غلظت مهارکنندگی عطرمایه نعناع فلفلی در برابر *اسینتو باکتر بومانی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* برابر با ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است.

در مطالعه امیری و جمعه‌پور که فعالیت ضد میکروبی نعناع فلفلی بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* حساس و مقاوم به متی‌سیلین، *اشریشیاکلی* و *سالمونلا تیفی‌موریوم* بررسی کرده بودند نتایج نشان داده که حداقل غلظت مهارکنندگی در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین، *استافیلوکوکوس اورئوس* حساس به متی‌سیلین، *اشریشیاکلی* و *سالمونلا تیفی‌موریوم* برابر با ۳/۲۵، ۳/۲۵، ۲۵ و ۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است (۲۲). در مطالعه جبلی جوان و همکاران حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی در برابر باکتری *اشریشیاکلی* ۱۴ و ۱۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ، و در برابر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* برابر با ۱۰/۵ و ۱۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است (۲۳) و همچنین در مطالعه الوندی و

همکاران اثر ممانعت‌کننده عطرمایه نعناع فلفلی را بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیاکلی* و *سالمونلا تیفی‌موریوم* به ترتیب ۳۰۰-۱۵۰ و ۲۵۰ پی‌پی‌ام بوده است (۲۴) که نتیجه تحقیق حاضر در مقایسه با تحقیقات ارائه شده نشان داد که عطرمایه نعناع فلفلی قدرت بیشتری در مهار میکروب‌ها داشته است که شاید به علت وجود ماده فیتوشیمیایی منتول موجود در گیاه نعناع فلفلی که قدرت ضد میکروبی بیشتری داشته می‌باشد (۱۲).

در مطالعه محبوبی و همکاران که فعالیت ضد میکروبی عطرمایه آویشن شیرازی و ترکیبات اصلی آن را در برابر *سودوموناس آئروژینوزا* بررسی کردند نتایج نشان داد که ترکیبات اصلی شامل کارواکرول بوده است که کارواکرول بیشترین اثر مهارکنندگی بر فعالیت میکروب‌ها داشته اما فعالیت ضعیفی در برابر بیوفیلم *سودوموناس* از خود نشان داده است (۲۵). در مطالعه دینی و همکاران حداقل غلظت مهارکنندگی عطرمایه برگ گیاه آویشن در برابر باکتری‌های *B.cereus*، *S.aureus*، *E.coli* و *P.aeroginosa* برابر با ۰/۵۲±۲/۶، ۰/۵۲±۲/۰۸، ۰/۱۳±۰/۶۵ و ۰±۱/۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است (۲۶). همچنین در مطالعه افتخاری و همکاران که فعالیت ضد میکروبی و آنالیز فیتوشیمیایی عطرمایه آویشن شیرازی بررسی کرده بودند به این نتیجه رسیدند که MIC و MBC در محدوده ۲/۶۴ و ۰/۶۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بوده است (۲۷). نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که توانایی مهارکنندگی عطرمایه نعناع فلفلی در برابر *اسینتو باکتر بومانی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* برابر با عطرمایه آویشن شیرازی بوده است.

در مطالعه‌ای، اثرات ضد قارچی عطرمایه نعناع فلفلی بررسی و نتایج نشان داده که عطرمایه نعناع فلفلی در غلظت ۱، ۱/۲، ۱/۴، ۱/۸ و ۱/۱۶ میلی‌متر قطر هاله مهاری ۲۶، ۲۱، ۱۶، ۱۲ و ۸ میلی‌متر ایجاد کرده (۲۸) و در مطالعه پرامیلا و همکاران که اثر عصاره متانولی برگ نعناع فلفلی بررسی کردند نتایج نشان داده که قطر هاله مهاری در برابر باکتری‌های *اشریشیاکلی*، *اسینتو باکتر* و *استافیلوکوکوس اورئوس* برابر با ۰/۲۹±۱/۳۷، ۰/۰۵±۰/۸۳۳ و ۰/۱±۱/۱۰ میلی‌متر بوده است و قطر هاله مهاری در برابر قارچ‌های *کاندیدا آلبکانس* و *کاندیدا گلابراتا* برابر با ۰/۰۵۸±۱/۶۳ و ۰/۰۵۸±۰/۵۶۷ میلی‌متر بوده است (۲۹).

بهنام و همکاران فعالیت اثر مثبت ضد قارچی عطرمایه نعناع فلفلی را در برابر قارچ‌های *Rhizopus stolonifer, Botrytis cinerea and Aspergillus niger* اثبات کردند (۷).

در مطالعه آیدا و همکاران (۳۰) که آنالیز فیتوشیمیایی و فعالیت ضد میکروبی عطرمایه آویشن شیرازی در خراسان بررسی کرده بودند به این نتیجه رسیدند که حداقل غلظت مهاری در برابر *باسیلوس سرئوس* برابر با ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است و حداقل غلظت مهاری در برابر مخمر *ساکارومیس سرویسیا* برابر با ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است (۳۰). درصورتی‌که حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی عطرمایه آویشن شیرازی در تحقیق حاضر بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب ۱/۲۵ و ۰/۳۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است.

همچنین در مطالعه محبوبی و کاظم‌پور حداقل غلظت مهارکنندگی عطرمایه نعناع فلفلی در برابر باکتری‌های *S.aureus*، *S.epidermidis*، *S.saprophyticus*، *E.faecalis*، *E.faecium*، *S.pyogenes*، *S.pneumoniae* و *S.agalactica* برابر با ۱، ۱، ۱، ۲، ۲، ۱، ۱ و ۱ میکرو لیتر بر میلی‌لیتر بوده است (۳۱) که با تحقیق حاضر مشابهت داشت.

در مطالعه ایسکان و همکاران که فعالیت ضد میکروبی عطرمایه نعناع فلفلی بررسی کردند نتایج

نشـــان داده عطرمایـــه نعنـــاع فلفلـــی مهارکننـــده ۲۱ پـاتوژن انسـانی و پـاتوژن هـای گیـاهی بـوده و در آنـالیز فیتوشـیمیایی و همچنـین بررسـی‌های ممکنـه بـه ایـن نتیجـه رسـیدند کـه منتـول موجـود در گیـاه نعنـاع فلفلـــی دارای فعالیـــت ضـــد میکروبـــی اســـت (۳۲) همچنـین در مطالعـه میمیکـا دوکـیچ و همکـاران کـه فعالیـت ضـد میکروبـی عطرمایـه نعنـاع فلفلـی بـر *اشریشـیاکلی*، *میکروکوکـوس فـاووس* و *شـیگلا سـونیا* بـه اثبـات رسـیده اسـت (۳۳). در مطالعـه سـحرخیز و همکـاران حـداقل غلظـت مهارکننـدگی عطرمایـه نعنـاع فلفلـــی در برابـــر گونـــه‌های آســـپرژیلوس شـــامل *A.flavus* *A.fumigatus* *A.fumigates* *A.oryza* *A.clavatus* بـه ترتیـب برابـر بـا ۴، ۰/۵، ۲، ۲ و ۰/۵ میکـرو لیتـر بـر میلی‌لیتـر بـوده اسـت (۳۴). در مطالعـه کـاریچری و اتنـونی حـداقل غلظـت مهارکننـدگی عطرمایـه نعنـاع فلفلـی در برابـر ۳۰ گونـه *A. actinomycetemcomitans* بررسـی و نتـایج نشـان داده کـه غلظت‌هـای ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکـرو لیتـر بـر میلی‌لیتـر مهارکننـده باکتری‌هـا بـوده اسـت (۳۵). درصـورتی‌که حـداقل غلظـت مهارکننـدگی و حـداقل غلظـت کشـندگی عطرمایـه نعنـاع فلفلـی و آویشـن شـیرازی در تحقیـق حاضـر بـه ترتیـب ۲/۵ و ۱/۲۵ میلی‌گـرم بـر میلی‌لیتـر و ۱/۲۵ و ۰/۳۱ میلی‌گـرم بـر میلی‌لیتـر بـر روی *اسـتافیلوکوکوس اورئوس* بوده است.

نتیجه‌گیری

بـا توجـه بـه نتـایج ایـن تحقیـق می‌تـوان از عصـاره آویشـن شـیرازی و نعنـاع فلفلـی در برنامـه غـذایی گنجانـده تـا ضـمن درمـان بیماری‌هـای عفـونی از اثـرات سوء استفاده از داروهای شیمیایی نیز کاسته شود.

References

1. Zarayneh S, Sepahi AA, Jonoobi M, Rasouli H. Comparative antibacterial effects of cellulose nanofiber, chitosan nanofiber, chitosan/cellulose combination and chitosan alone against bacterial contamination of Iranian banknotes. Int J Biol Macromol 2018; (118): 1045-1054. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.160

2. Galeotti N, Mannelli LDC, Mazzanti G, *et al.* Menthol: a natural analgesic compound. Neurosci Lett 2002;322(3):145-148. https://doi.org/10.1016/S0304-3940(01)02527-7

3. Fazeli-Nasab B, Mirzaei N. Evaluation of total phenol and flavonoid content in a wide range of local and imported plants. Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences 2018;26(2):141-154. http://doi.org/10.29252/sjimu.26.2.141 [In Persian].

4. Davari A, Solouki M, Fazeli-Nasab B. Effects of jasmonic acid and titanium dioxide nanoparticles on process of changes of phytochemical and antioxidant in genotypes of *Satureja hortensis* L. Eco-Phytochemical Journal of Medicinal Plants 2018; 5(4): 1-20 [In Persian].

5. Keikhaie KR, Fazeli-Nasab B, Jahantigh HR, Hassanshahian M. Antibacterial Activity of Ethyl Acetate and Methanol Extracts of Securigera securidaca, Withania sominefra, Rosmarinus officinalis and Aloe vera Plants against Important Human Pathogens. Journal of Medical Bacteriology 2018; 7(1-2): 13-21.

6. Eteghad S, Mirzaei H, Pour S, Kahnamui S. Inhibitory effects of endemic Thymus vulgaris and Mentha piperita essential oils on Escherichia coli O157: H7. Research Journal of Biological Sciences 2009; 4(3): 340-344. Record Number : 20093100926

7. Behnam S, Farzaneh M, Ahmadzadeh M, Tehrani AS. Composition and antifungal activity of essential oils of *Mentha piperita* and *Lavendula angustifolia* on post-harvest phytopathogens. Commun Agric Appl Biol Sci 2006; 71(3 Pt B): 1321-1326. PMID:17390896

8. Yang S-A, Jeon S-K, Lee E-J, *et al.* Comparative study of the chemical composition and antioxidant activity of six essential oils and their components. Nat Prod Res 2010; 24(2): 140-151. https://doi.org/10.1080/14786410802496598

9. Rasouli H, Farzaei MH, Mansouri K, *et al.* Plant cell cancer: may natural phenolic compounds prevent onset and development of plant cell malignancy? A literature review. Molecules 2016; 21(9): 1104. https://doi.org/10.3390/molecules21091104

10. Mahboubi M, Haghi G. Antimicrobial activity and chemical composition of Mentha pulegium L. essential oil. J Ethnopharmacol 2008; 119(2): 325-327. https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.07.023

11. Fazeli-Nasab B, Rossello JA,

Mokhtarpour A. Effect of TiO2 nanoparticles in thyme under reduced irrigation conditions. Potravinárstvo: Slovak Journal of Food Sciences 2018; 12(1): 622-627. https://doi.org/10.5219/958

12. Fazeli-nasab B, Moshtaghi N, Forouzandeh M. Effect of Solvent Extraction on Phenol, Flavonoids and Antioxidant Activity of some Iranian Native Herbs. Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences 2019; 27(3): 14-26. https:doi.org/10.29252/sjimu.27.3.14 [In Persian].

13. Ghotaslou R, Salahi B. Effects of oxygen on in-vitro biofilm formation and antimicrobial resistance of Pseudomonas aeruginosae. Pharmaceutical Sciences 2013; 19(3): 96-99.

14. Parsek MR, Greenberg E. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. Trends in microbiology 2005; 13(1):27-33. https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.11.007

15. Adal KA, Farr BM. Central venous catheter-related infections: a review. Nutrition 1996; 12(3): 208-213. https://doi.org/10.1016/S0899-9007(96)91126-0

16. Shafiee P, SHOJA AS, Charkhabi AH. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by aerobic mixed bacterial culture isolated from hydrocarbon polluted soils. Iranian Journal Of Chemistry And Chemical Engineering(IJCCE) 2006; 25(3): 73-78 [In Persian].

17. Prashanth K, Badrinath S. Simplified phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* spp. and their antimicrobial susceptibility status. Journal of medical microbiology 2000; 49(9): 773-778. https://doi.org/10.1099/0022-1317-49-9-773

18. Bauer A, Kirby W, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. American journal of clinical pathology 1966; 45(4): 493-496.

19. Wikler MA. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard. CLSI (NCCLS) 2006; 26(M7-A7). NII Article ID (NAID): 20001404762

20. Owuama CI. Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) using a novel dilution tube method. African Journal of Microbiology Research 2017; 11(23): 977-980. https:doi.org/10.5897/AJMR2017.8545

21. Lambert R, Pearson J. Susceptibility testing: accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC) values. J Appl Microbiol 2000; 88(5): 784-790. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01017.x

22. Amiri A, Jomehpour N. Evaluation the Effect of Anti bacterial of *Ferula assa-foetida* L, *Carum copticum*, *Mentha piperita* L Hydroalcoholic Extract on Standard Sensitive and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157H7 and *Salmonella typhimurium*. journal of ilam university of medical sciences 2016; 24(2): 72-79. https:doi.org/10.18869/acadpub.sjimu.24.2.72 [In Persian].

23. Jebelli Javan A, Ahmadi Hamedani M, Bayani M, *et al.* Antioxidant and antimicrobial effects of different mints, the most widely used in Caspian Sea areas, Iran. Journal of Veterinary Laboratory Research 2014; 6(2): 93-102. 10.22075/jvlr.2017.1265

24. Kazem Alvandi R, Sharifan A, Aghazadeh Meshghi M. Study of chemical composition and antimicrobial activity of peppermint essential oil. Journal of Comparative Pathobiology 2010; 7(4): 355-364.

25. Mahboubi M, Heidarytabar R, Mahdizadeh E. Antibacterial activity of *Zataria multiflora* essential oil and its main components against *Pseudomonas aeruginosa*. Herba Polonica 2017; 63(3): 18-24. https:doi.org/10.1515/hepo-2017-0015

26. Dini S, Dadkhah A, Fatemi F. Biological Properties of Iranian *Zataria Multiflora* Essential Oils: A Comparative Approach. Electronic Journal of Biology 2015; 11(3): 57-62.

27. Eftekhar F, Zamani S, Yousefzadi M, *et al.* Antibacterial activity of *Zataria multiflora* Boiss essential oil against extended spectrum β lactamase produced by urinary isolates of *Klebsiella pneumonia*. JJM 2011; 4(Supplement1): S43-S49.

28. Moghtader M. In vitro antifungal effects of the essential oil of *Mentha piperita* L. and its comparison with synthetic menthol on *Aspergillus niger*. African Journal of Plant Science 2013; 7(11): 521-527. https:doi.org/10.5897/AJPS2013.1027

29. Pramila D, Xavier R, Marimuthu K, *et al.* Phytochemical analysis and antimicrobial potential of methanolic leaf extract of peppermint (Mentha piperita: Lamiaceae). Journal of Medicinal Plants Research 2012; 6(2): 331-335. https:doi.org/10.5897/JMPR11.1232

30. Aida A, Ali MS, Behrooz MV. Chemical composition and antimicrobial effect of the essential oil of *Zataria multiflora* Boiss endemic in Khorasan-Iran. Asian Pacific Journal of Tropical Disease 2015; 5(3): 181-185. https://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60649-6

31. Mahboubi M, Kazempour N. Chemical composition and antimicrobial activity of peppermint (*Mentha piperita* L.) Essential oil. Songklanakarin J. Sci. Technol 2014; 36(1): 83-87.

32. İşcan G, Kirimer N, Kürkcüoğlu Mn, *et al.* Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. Journal of agricultural and food chemistry 2002; 50(14): 3943-3946. https://doi.org/10.1021/jf011476k

33. Mimica-Dukić N, Božin B, Soković M, *et al.* Antimicrobial and antioxidant activities of three

Mentha species essential oils. Planta Med 2003; 69(05): 413-419. https:doi.org/10.1055/s-2003-39704

34. Saharkhiz MJ, Motamedi M, Zomorodian K, *et al.* Chemical composition, antifungal and antibiofilm activities of the essential oil of *Mentha piperita* L. ISRN pharmaceutics 2012; 2012(Article ID 718645, 718646 Pages). https:doi.org/10.5402/2012/718645

35. Karicheri R, Antony B. Antibacterial and antibiofilm activities of peppermint (*mentha piperita* linn) and menthol mint (*mentha arvensis* linn) essential oils on aggregatibacter actinomycetemcomitans isolated from orodental infections. European Journal Of Pharmaceutical And Medical Research 2016; 3(7): 577-580.

Antimicrobial and anti-biofilm effects of *Thyme* essential oils and Peppermint on *Acinetobacter baumannii* and *Staphylococcus aureus* resistant to different antibiotics

Fardin Ali Malayer[i1], Zahra Yazdanpour[2], Hosein Bandani[3], Bahman Fazeli Nasab[4]. Saeedeh Saeedi[5]*

1- Faculty of Medicine, Department of Biochemistry, Zabol University of Medical Sciences, Zabol, Iran.
2- MSc in Microbiology, Zabol University of Medical Sciences, Zabol, Iran.
3- PhD Student of Animal Sciences, University of Zabol, Zabol, Iran.
4- Research Department of Agronomy and Plant Breeding, Agricultural Research Institute, University of Zabol, Zabol, Iran.
5- Agricultural Biotechnology Research Institute, University of Zabol, Zabol, Iran.

Receive: October 30, 2019; Revise: February 8, 2020; Accept: March 10, 2020

Summary

The aim of this study was to investigate the antimicrobial and anti-biofilm effects of peppermint and Thyme on the antibiotic-resistant Acinetobacter baumannii and Staphylococcus aureus. Staphylococcus aureus and Acinetobacter baumannii strains were isolated from hospitals in Zabol city. The essential oil of Shirazi thyme and peppermint was obtained by Clevenger apparatus. Minimum lethal concentration and minimum inhibitory concentration were determined by microdilution method. Results showed that the lowest inhibitory concentration of peppermint essential oil against Acinetobacter baumannii and Staphylococcus aureus was 1.25 mg/ml. The results of our study on Thyme showed that the lowest concentration of Thyme essential oil against Acinetobacter baumannii and Staphylococcus aureus was 1.25 and 0.31 mg / ml, respectively. The results indicated that peppermint essential oil and Thymus vulgaris inhibited the growth of Staphylococcus aureus and Acinetobacter.

Keywords: *Essential oil, Staphylococcus aureus, Acinetobacter baumannii, Minimum Inhibitory Concentration*