اثر ضد باکتریایی اسانس نعنا و پونه بر باکتری‌های اصلی ورم پستان گاو

رضا راه‌چمنی*[۱]، سمیرا نوری[۲]، جواد بیات کوهسار[۱]

۱- استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس،گنبد کاووس، ایران.

۲- دانش‌آموخته گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس،گنبد کاووس، ایران.

دریافت مقاله: ۲۵ بهمن ۱۴۰۱، بازنگری: ۰۶ اردیبهشت ۱۴۰۲، پذیرش نهایی: ۰۶ خرداد ۱۴۰۲

چکیده

مقاومت آنتی‌بیوتیکی و عوارض جانبی از مشکلات درمان بیماری‌های باکتریایی توسط آنتی‌بیوتیک‌ها است و با توجه به داشتن اثر ضد باکتریایی، اسانس گیاهان دارویی جایگزین مناسبی برای آنتی‌بیوتیک‌ها هستند. باکتری‌های *اشریشیاکلی*، *استافیلوکوک اورئوس* و *استرپتوکوک آگالاکتیه* هر کدام باعث بیماری‌هایی در انسان و دام می‌شوند ولی هر سه باکتری از عوامل اصلی بیماری ورم پستان گاو نیز هستند. لذا این مطالعه به‌منظور بررسی فعالیت ضد باکتریایی اسانس‌های نعنا و پونه علیه این باکتری‌ها و مقایسه آنها با آنتی‌بیوتیک‌های لینکواسپکتین، جنتامایسین و آموکسی‌سیلین/کلاولونات انجام شد. شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس‌ها به روش GC/MS انجام شد. حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) و حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC) اسانس‌ها به روش رقیق‌سازی لوله‌ای و حساسیت باکتری به اسانس‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها با استفاده از دیسک دیفیوژن تعیین گردید و تأثیر اسانس‌ها بر منحنی رشد باکتری‌ها در ساعت‌های ۰، ۶، ۱۰ و ۲۴ مطالعه شد. مهم‌ترین ترکیبات نعنا کارون (۶۳/۰۲ درصد)، لیمونن (۲۴/۴۸ درصد) و پونه پولگون (۴۸/۱۶ درصد)، اکالیپتول (۱۴/۵۷ درصد) بودند. از نظر MIC و MBC اثر نعنا بر هر سه باکتری مشابه یا قوی‌تر از لینکواسپکتین و اثر پونه بر *استرپتوکوک آگالاکتیه* قوی‌تر از لینکواسپکتین بود ولی در دیسک دیفیوژن اثر ضد باکتریایی نعنا و پونه بر *استافیلوکوک اورئوس* نسبت به جنتامایسین تفاوت معنی‌داری نداشت اما علیه دو باکتری دیگر اثر ضد باکتریایی کمتری از جنتامایسین و آموکسی‌سیلین/کلاولونات داشتند. در منحنی رشد، غلظت Sub-MIC اسانس‌ها در ساعت ۲۴ باعث کاهش معنی‌دار تعداد *اشرشیاکلی* شد. به‌طور کلی هر دو اسانس اثر ضد باکتریایی قابل قبولی داشتند ولی اثر ضد باکتریایی اسانس نعنا قوی‌تر از پونه بود.

واژگان کلیدی: *بیماری‌های باکتریایی، گیاهان دارویی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: Rahchamani@gonbad.ac.ir

مقدمه

باکتری‌های *استافیلوکوک اورئوس*، *استرپتوکوک آگالاکتیه* و *اشریشیاکلی* بیماری‌های مختلفی ایجاد می‌کنند ولی هر سه باکتری از مهم‌ترین عوامل ورم پستان گاو نیز هستند (۷). ورم پستان یک بیماری جهانی است که به‌وسیله عوامل مختلفی ایجاد شده و بر کیفیت و کمیت شیر تأثیر می‌گذارد و عامل بیشترین خسارت‌های اقتصادی در صنعت گاو شیری در بسیاری از کشورهاست (۱). مهم‌ترین درمان ورم پستان در دامداری‌های متداول تزریق داخل پستانی آنتی‌بیوتیک‌هاست که عوارضی مانند ایجاد سویه‌های مقاوم و باقی ماندن دارو در شیر دارد (۲). با توجه به مسائل یاد شده و ممنوع بودن استفاده از آنتی‌بیوتیک در گاوداری‌های ارگانیک نیاز به سایر روش‌های درمانی احساس می‌شود.

اسانس‌ها جزء متابولیت‌های ثانویه گیاهی و دارای اثرات ضد باکتریایی هستند و بعد از استفاده طولانی‌مدت، سویه‌های مقاوم در باکتری‌ها و عوارض جانبی در انسان مشاهده نشده است بنابراین به‌عنوان یک سلاح قوی در مبارزه با بیماری‌های باکتریایی مطرح هستند (۳).

گونه‌های نعناعیان از جمله نعنا با نام علمی *Mentha piperita* (peppermint) و پونه با نام علمی *Mentha pulegium* (pennyroyal) معمول‌ترین گیاهان دارویی هستند (۴) در مطالعات مختلف اثر ضد باکتریایی اسانس نعنا و پونه علیه باکتری‌های گرم‌مثبت و گرم‌منفی مثل *استافیلوکوک اورئوس*، *استافیلوکوک اپیدرمیس*، *سالمونلا انتریدیس*، *اشریشیاکلی*، *سالمونلا تیفی‌موریوم* نشان داده شده و در مورد پونه این اثرات به نئومنتول، پولگون و منتون نسبت داده شده است (۹-۵).

با توجه به این که اثر ضد باکتریایی اسانس نعنا و پونه بر باکتری *استرپتوکوک آگالاکتیه* هنوز مطالعه نشده است با توجه به اهمیت بیماری ورم پستان گاو باکتری‌های *استافیلوکوک اورئوس* و *اشریشیاکلی* نیز انتخاب شدند تا ضمن بررسی اثر ضد باکتریایی اسانس‌ها علیه این سه باکتری (مهم‌ترین عوامل ورم پستان) و مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های معمول بتوان از نتایج این مطالعه در پژوهش‌های بالینی درمان آن و همچنین سایر بیماری‌ها استفاده کرد.

مواد و روش‌ها

شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس‌ها: اسانس‌های نعنا (*Mentha piperita*) و پونه (*Mentha pulegium*) از شرکت درین گلاب کاشان تهیه شدند. جهت حصول اطمینان از عدم آلودگی اسانس‌ها به میکرو ارگانیسم‌های قارچی و باکتریایی، اسانس‌ها را از فیلترهای ۰/۲ µm عبور داده و با انتقال به محیط کشت تریپتیک سوی آگار (Tryptic soy agar) (Biolife, Milano, Italy) هیچ‌گونه آلودگی مشاهده نگردید. برای آنالیز اسانس‌ها از دستگاه گاز کروماتوگرافی کوپل با طیف‌سنج (GC/MS) (Model 5977A, Agilent Technologies, USA) استفاده شد. مشخصات ستون آن شامل: 60DB-1, mmX0.25 mm fused silica capillary column با ضخامت فیلمی ۰/۲۵ µm و برنامه دمایی ۵۰ تا ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد با میزان چهار درجه در دقیقه و دمای ۲۶۰ درجه سانتی‌گراد انژکتور و گاز حامل هلیوم می‌باشد. پس از تزریق اسانس به GC/MS و مشاهده طیف کروماتوگرام با استفاده از زمان بازداری (RT)، اندیس کواتس (KI)، طیف جرمی و مقایسه با ترکیب‌های استاندارد موجود در کتابخانه اطلاعات کامپیوتری، شناسایی ترکیبات اسانس و تعیین درصد کمی در آنها انجام گردید.

باکتری‌ها: کشت لیوفلیزه سویه‌های استاندارد باکتری‌های *استرپتوکوک آگالاکتیه* (*Streptococcus agalactiae* PTCC 1768)، *استافیلوکوک اورئوس* (*Staphylococcus aureus* PTCC 1113) و *اشریشیاکلی* (*Escherichia coli* PTCC 1399) از مرکز تحقیقات و پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. این باکتری‌ها ابتدا به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در محیط کشت تریپتیک سوی براث (Tryptic soy Broth) (TSA) کشت داده شدند، سپس کشت مجدد از کشت

اول داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. از کشت دوم به نسبت ۱ به ۵ با گلیسرین استریل مخلوط و در حجم‌های µl ۱۰۰ در میکروتیوب‌های استریل در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس از این کشت‌ها برای کشت استوک با دو بار کشت در تریپتیک سوی براث و سپس کشت خطی در محیط کشت شیب‌دار تریپتیک سوی آگار استفاده شد. این کشت‌ها در دمای ۴ درجه نگهداری شده و هر ماه یک‌بار تجدید کشت شد (۱۰).

تهیه میزان تلقیح باکتری: ابتدا از کشت استوک به داخل محیط تریپتیک سوی براث برده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. کشت مجدد داده شده از کشت اول نیز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. مقادیر مختلفی از کشت دوم به لوله کووت حاوی ml ۳ محیط کشت براث استریل، تا مادامی انتقال داده شد که میزان جذب نوری با استفاده از دستگاه طیف‌سنج جرمی (Spectrophotometry) (Libra S12, Biochrom Ltd., Cambridge, London) در طول موج nm ۶۰۰، به ۰/۱ برسد. بعد از تهیه رقت‌های متوالی با استفاده از آب پپتونه ۰/۰۱ درصد و انتقال µl ۱۰۰ از هر رقت به پلیت‌های حاوی محیط کشت آگاردار و گرمخانه‌گذاری این پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تعداد باکتری‌ها شمارش شدند. کل آزمایش ۲ مرتبه تکرار شد و میانگین تعداد باکتری در کووت با جذب نوری ۰/۱ برای باکتری *اشریشیاکلی* معادل $۲/۴ \times ۱۰^{۱۱}$ cfu/ml، *استافیلوکوک اورئوس* معادل $۳/۴ \times ۱۰^{۱۰}$ cfu/ml و برای *استرپتوکوک آگالاکتیه* معادل $۱/۶۴ \times ۱۰^{۱۱}$ cfu/ml محاسبه شد. با مشخص شدن این عدد هرگاه که سوسپانسیون باکتریایی با جذب نوری ۰/۱ تهیه شود، تعداد باکتری در آن معادل عدد محاسبه شده بوده و می‌توان از این سوسپانسیون غلظت‌های دلخواه تهیه نمود (۸).

تعیین حداقل غلظت مهاری (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC): این غلظت‌ها به روش ماکرودایلوشن و با استفاده از دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) به‌عنوان امولسیفایر انجام شد. بعد از تهیه محیط کشت تریپتیک سوی براث حاوی ۵ درصد دی‌متیل سولفوکساید غلظت‌های دو برابری اسانس‌های نعنا و پونه در ۱۰ لوله شامل ۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵، ۰/۶۲۵، ۰/۳۱۲، ۰/۱۵۶، ۰/۰۷۸، ۰/۰۳۹ و ۰/۰۱۹ درصد در محیط کشت تهیه شد. سپس به هر لوله µl ۱۰۰ از رقت ۱:۲۵۰ سوسپانسیون میکروبی (با غلظت نهایی مشخص با طول موج nm ۶۰۰ و جذب ۰/۱ برای هر باکتری) تلقیح شد و بعد از آن همه لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند. برای آزمایش رقت‌های مختلف هر اسانس ۱۰ لوله و برای کنترل منفی (حاوی اسانس و محیط کشت)، کنترل مثبت (حاوی باکتری و محیط کشت) و کنترل محیط کشت خالی هر کدام یک لوله قرار داده شد. برای هر کدام از اسانس‌ها آخرین رقتی که در آن هیچ گونه کدورتی مشاهده نگردید (عدم رشد) به‌عنوان حداقل غلظت مهاری در نظر گرفته شد و از تمام لوله‌های بدون کدورت در محیط TSA کشت داده شد. پس از گذشت مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد آخرین غلظتی از اسانس‌ها که قادر به مرگ ۹۹ درصد از باکتری‌های زنده اولیه بود به‌عنوان حداقل غلظت کشندگی گزارش شد (۱). جهت مقایسه اثر اسانس‌ها با یک آنتی‌بیوتیک تجاری معمول از آنتی‌بیوتیک لینکواسپکتینومایسین (لینکومایسین ۵ ٪ + اسپکتینومایسین ۱۰ درصد) (لینکوجکت، رویان دارو، سمنان، ایران) به‌عنوان یک کنترل مثبت استفاده شد.

اثر ضد باکتری اسانس‌ها به روش انتشار از دیسک: طبق روش انتشار در آگار به‌صورت دیسک دیفیوژن (Disk diffusion) به شیوه کربی بائر (Kirby Bauer) ابتدا سوسپانسیون میکروبی (با غلظت نهایی مشخص با طول موج nm۶۰۰ و جذب۰/۱ برای هر باکتری) در سطح محیط تریپتیک سوی آگار کشت داده

شد. مقدار ۲۰µl از محلول رقیق نشده اسانس و رقیق شده با نسبت ۱:۱ با DMSO روی دیسک‌های کاغذی استریل بلانک ساخت شرکت پادتن طب (تهران- ایران) ریخته و بعد از ۲۰ تا ۴۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه دیسک‌ها مقداری خشک شدند. سپس دیسک‌ها با فاصله معین از یکدیگر و از لبه پلیت، روی محیط کشت قرار داده شد. از دیسک‌های آنتی‌بیوتیک آموکسی‌سیلین/ کلاولونات با غلظت ۲۰/۱۰µg/Disk، شماره ۲۰۱۰۳ و جنتامایسین با غلظت ۱۰µg/Disk، شماره ۲۰۳۰۹ (شرکت پادتن طب، تهران، ایران) به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. بعد از انکوباسیون محیط کشت‌های حاوی باکتری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قطر هاله عدم رشد باکتری در اطراف صفحه‌ها اندازه‌گیری شد (۱۱) و نتایج با جداول CLSI مقایسه گردید (۱۲). جهت حصول اطمینان، این آزمایش‌ها برای هر باکتری و هر یک از غلظت‌های مختلف اسانس و آنتی‌بیوتیک‌ها، دو بار تکرار شد.

اثر اسانس‌ها بر نمودار رشد باکتری: اثر غلظت Sub-MIC (یک رقت کمتر از حداقل غلظت مهاری رشد) اسانس‌ها روی باکتری‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت مورد مطالعه قرار گرفت. به محیط کشت استریل حاوی پنج درصد DMSO غلظت اسانس مورد نظر اضافه شد به‌طوری که مقدار اسانس و محیط کشت برای هر ساعت ۱ml بود. سپس ۱۰۰µl از سوسپانسیون باکتریایی (با غلظت نهایی مشخص با طول موج ۶۰۰ nm و جذب۰/۱) به هر لوله اضافه شد. بعد از انکوباسیون لوله‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در ساعت‌های صفر، ۶، ۱۰ و ۲۴ با انتقال یک میلی‌لیتر از ترکیب فوق به لوله حاوی ۹ میلی‌لیتر نرمال سالین استریل رقت‌های متوالی تا 10^{-9} تهیه شد. با شمارش تعداد کلونی، تعداد باکتری‌ها محاسبه و این آزمایشات ۲ بار تکرار شد. نمودار رشد بر اساس $\log_{10}{}^{cfu/ml}$ در واحد زمان (ساعت) رسم شد.

تجزیه و تحلیل آماری: تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS 22 for windows و آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه One- way ANOVA با سطح معنی‌داری ۵ درصد انجام شد اختلاف میانگین‌ها نیز توسط آزمون توکی مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

ترکیبات شیمیایی اسانس نعنا: نتایج آنالیز اسانس نعنا در این مطالعه (جدول ۱) نشان می‌دهد از بین ترکیبات شناسایی شده به‌ترتیب کارون (۶۳/۰۲ درصد)، لیمونن (۲۴/۴۸ درصد) و کاریوفیلن (۳/۱۹ درصد) عمده‌ترین ترکیبات موجود در اسانس را تشکیل می‌دهند.

جدول ۱- ترکیبات شیمیایی اسانس نعنا

ردیف	نام ترکیب	زمان بازداری (دقیقه)	درصد
۱	(-)-β-Pinene	۴/۹۳۱	۰/۹۱
۲	D-Limonene	۶/۰۰۷	۲۴/۴۸
۳	P-menth-8-en-2-1,transe	۱۰/۱۷۷	۲/۸۸
۴	(±)-pulegone	۱۱/۲۳	۲/۱۳
۵	(-)-Carvone	۱۱/۴۳۸	۶۳/۰۲
۶	Carvyl acetate E	۱۴/۳۵۷	۱/۰۸
۷	(-)-β-Bourbonene	۱۵/۰۳۹	۰/۸۸
۸	Caryophyllene	۱۵/۹۳۹	۳/۱۹

ترکیبات شیمیایی اسانس پونه: با توجه به نتایج آنالیز از بین ترکیبات شناسایی شده پولگون (۴۸/۱۶ درصد)، اکالیپتول (۱۴/۵۷ درصد) و پیپریتونون (۱۰/۰۹ درصد) بیشترین ترکیبات موجود در اسانس پونه را

تشکیل می‌دهند (جدول ۲).

جدول ۲- ترکیبات شیمیایی اسانس پونه

ردیف	نام ترکیب	شاخص بازداری	درصد
۱	3-Carene	۴/۱۰	۱/۵۸
۲	Sabinen	۴/۸۱	۱/۴۳
۳	β-Pinene	۴/۹۳	۲/۱۲
۴	β-Myrcene	۵/۱۰	۰/۷۶
۵	Cymene	۵/۸۹	۰/۸
۶	D-Limonene	۶/۰۰	۲/۳۷
۷	Eucalyptol	۶/۰۸	۱۴/۵۷
۸	1-Cyclohexene-1-methanol,α,α,4-trimethyl-	۸/۹۳	۲/۶۱
۹	Menthone	۹/۰۹	۰/۷۹
۱۰	.p-Menthan-3-one	۹/۳۲	۰/۷۸
۱۱	endo-Borneol	۹/۵۱	۰/۹۶
۱۲	Isopulegon	۹/۵۹	۰/۹۲
۱۳	L-.alpha.-Terpineol	۱۰/۱۱	۰/۹۵
۱۴	Pulegone	۱۱/۲۸	۴۸/۱۶
۱۵	Carvone	۱۱/۳۸	۱/۵۵
۱۶	Piperitone	۱۱/۶۴	۱/۴۵
۱۷	Thymol	۱۲/۶۰	۱/۰۲
۱۸	Piperitenone	۱۳/۸۳	۱۰/۰۹
۱۹	Terpinyl acetate	۱۴/۰۵	۱/۰۱
۲۰	3-Methoxy-5-propylphenol	۱۴/۳۹	۴/۱۷
۲۱	Caryophyllene	۱۵/۹۴	۱/۴۲

MIC و MBC اسانس‌های نعنا و پونه: حداقل غلظت مهاری و حداقل غلظت کشندگی اسانس‌های نعنا و پونه علیه باکتری‌های مورد *مطالعه* در جدول ۳ نشان داده شده است. اثر ضد باکتریایی نعنا نسبت به پونه علیه *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوک اورئوس* قوی‌تر و علیه *استرپتوکوک آگالاکتیه* ضعیف‌تر بود. اثر نعنا بر تمام باکتری‌ها مشابه یا قوی‌تر از لینکواسپکتین و اثر پونه بر *استرپتوکوک آگالاکتیه* قوی‌تر از لینکواسپکتین بود.

جدول ۳- حداقل غلظت مهاری و کشندگی اسانس نعنا و پونه بر باکتری‌های مورد آزمایش

	باکتری	حداقل غلظت مهاری(٪)	حداقل غلظت کشندگی(٪)
نعنا	*استافیلوکوک اورئوس*	۰/۰۳	۰/۰۷
	اشریشیاکلی	۰/۰۷	۰/۱۵
	استرپتوکوک آگالاکتیه	۰/۳۱	۰/۶۲
پونه	*استافیلوکوک اورئوس*	۰/۱۵	۰/۳۱
	اشریشیاکلی	۰/۳۱	۰/۶۲
	استرپتوکوک آگالاکتیه	۰/۰۱	۰/۰۳
لینکواسپکتین	*استافیلوکوک اورئوس*	۰/۰۷	۰/۱۵
	اشریشیاکلی	۰/۱۵	۰/۳۱
	استرپتوکوک آگالاکتیه	۰/۳۱	۰/۶۲

انتشار از دیسک: اثر اسانس‌های نعنا، پونه و دو آنتی‌بیوتیک جنتامایسین و آموکسی‌سیلین/ کلاوولانات علیه باکتری‌های مورد آزمایش در جدول ۴ نشان داده شده است. طبق جداول CLSI هر سه باکتری به آنتی‌بیوتیک‌ها حساس بودند. اثر ضد باکتریایی نعنا و پونه بر *استافیلوکوک اورئوس* نسبت به جنتامایسین تفاوت معنی‌داری نداشت اما از آموکسی‌سیلین/ کلاولونات کمتر بود اثر اسانس‌های رقیق نشده و رقیق شده (۱:۱) هر دو گیاه علیه *اشریشیاکلی* و *استرپتوکوک آگالاکتیه* نسبت به هر دو آنتی‌بیوتیک به‌طور معنی‌داری کمتر بود. هر چند اثر نعنا نسبت به پونه از نظر عددی بیشتر بود ولی این تفاوت معنی‌دار نبود.

جدول ۴- مقایسه میانگین هاله عدم رشد باکتری‌ها تحت تاثیر اسانس‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها

باکتری	تیمار						سطح معنی‌داری	میانگین استاندارد
	نعنا	نعنا (۱:۱)	پونه	پونه (۱:۱)	جنتامایسین	آموکسی‌سیلین/ کلاولونات		
استافیلوکوک اورئوس	۱۵/۲۴^{bc}	۱۰/۲۲ ^{cd}	۱۴/۷۰^{bc}	۹/۷۹^{cd}	۱۸/۸۷^{ab}	۲۴/۰۹^{a}	۰/۰۰	۱/۵۵
اشریشیاکلی	۱۰/۹۸^{b}	۸/۳۴^{b}	۱۰/۷۱^{b}	۹/۳۲^{b}	۱۷/۶۰^{a}	۲۲/۶۰^{a}	۰/۰۰	۱/۵۶
استرپتوکوک آگالاکتیه	۱۲/۷۸^{b}	۱۰/۶۴^{b}	۱۲/۵۳^{b}	۱۰/۷۶^{b}	۱۹/۷۶^{a}	۲۵/۴۴^{a}	۰/۰۰	۱/۶۸

^{abcde}حروف نامشابه در هر ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار است ($P<۰/۰۵$).

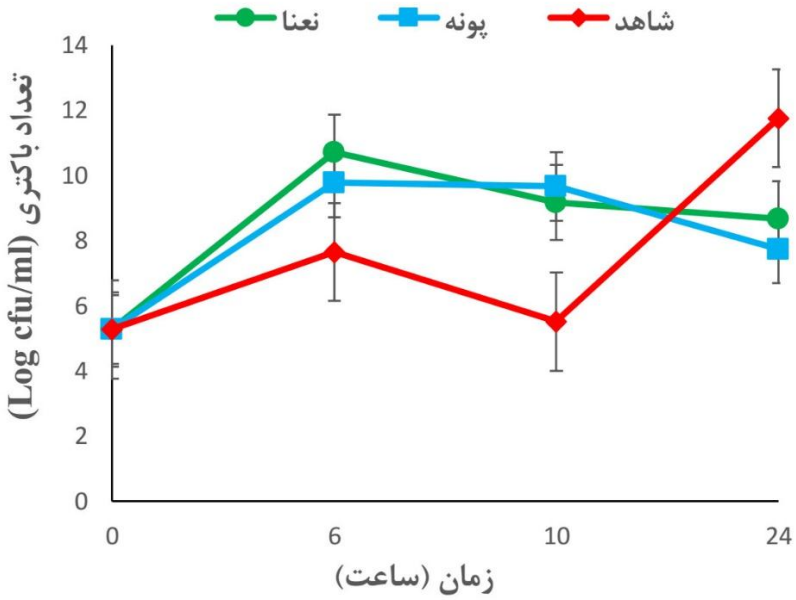
(۱:۱): اسانس رقیق شده با دی‌متیل سولفوکساید به نسبت ۱:۱

اثر اسانس نعنا و پونه بر نمودار رشد باکتری‌ها:

در شکل‌های شماره ۱، ۲ و ۳ اثر اسانس نعنا و پونه بر تعداد باکتری *استافیلوکوک اورئوس*، *استرپتوکوک آگالاکتیه* و *اشریشیاکلی* طی زمان‌های صفر، ۶، ۱۰ و ۲۴ ساعت مشاهده می‌شود. در ساعت شش بین تیمار شاهد و اسانس‌ها تفاوت معنی‌داری وجود نداشت در ساعت ۱۰ هم تنها تفاوت معنی‌دار، کاهش معنی‌دار تعداد باکتری‌های *استرپتوکوک آگالاکتیه* در گروه شاهد بود. در ساعت ۲۴ اسانس نعنا و پونه تعداد هر سه باکتری را کاهش داد هر چند فقط کاهش اشریشیاکلی معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$).

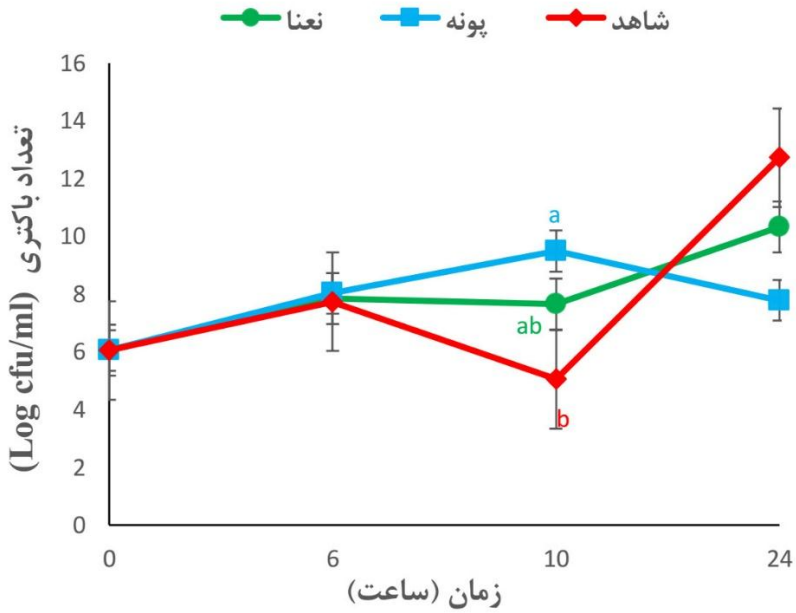
بحث

افزایش روزافزون تعداد سویه‌های باکتریایی مقاوم به آنتی‌بیوتیک و نگرانی‌ها در مورد باقیمانده آنتی‌بیوتیک‌ها در مواد غذایی از جمله شیر باعث گسترش تحقیقات برای جستجوی ترکیبات ضد میکروبی جدید و همچنین جایگزین‌های مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها شده است. با توجه به سابقه تاریخی استفاده از گیاهان دارویی و اسانس آنها در درمان بیماری‌ها، اسانس‌های گیاهی به علت داشتن اثر ضد میکروبی وسیع‌الطیف علیه میکروارگانیسم‌ها و عوارض جانبی کمتر نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها، جایگزین‌های مناسبی برای آنتی‌بیوتیک‌ها هستند. در گاوداری‌های ارگانیک به علت ممنوعیت استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها ورم پستان یک مشکل جدی محسوب می‌شود. و تقاضای زیادی برای داروهای ضد میکروب طبیعی مثل اسانس‌های گیاهی وجود دارد (۱۳). بنابراین در این مطالعه اثر اسانس گیاهان نعنا و پونه بر باکتری‌های مهم عامل ورم پستان گاو مطالعه شد.



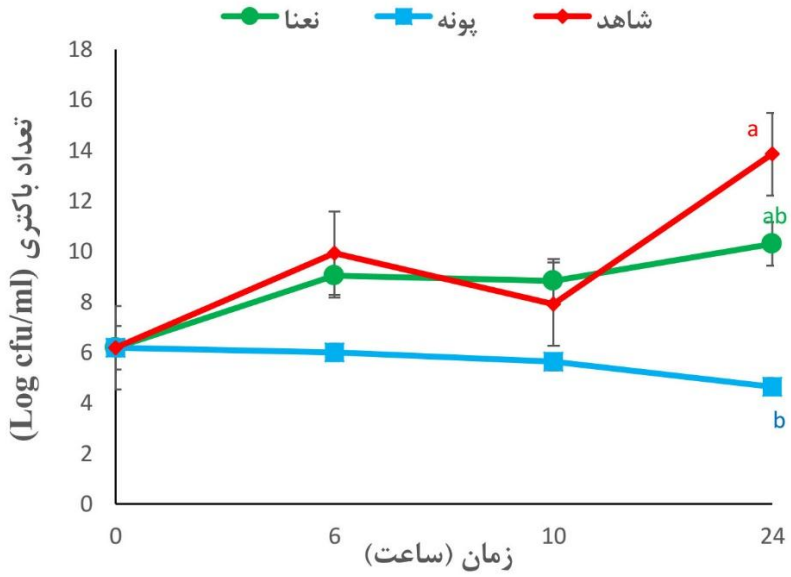
شکل ۱- اثر غلظت‌های صفر (شاهد، قرمز ♦) و Sub-MIC اسانس نعنا (سبز ●) و پونه (آبی ■) بر منحنی رشد *استافیلوکوک اورئوس*.

حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار (P<۰/۰۵) در هر زمان می‌باشد.



شکل ۲- اثر غلظت‌های صفر (شاهد، قرمز ♦) و Sub-MIC اسانس نعنا (سبز ●) و پونه (آبی ■) بر منحنی رشد *استرپتوکوک آگالاکتیه*.

حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار (P<۰/۰۵) در هر زمان می‌باشد.



شکل ۳- اثر غلظت‌های صفر (شاهد، قرمز ♦) و Sub-MIC اسانس نعنا (سبز ●) و پونه (آبی ■) بر منحنی رشد باکتری *اشریشیاکلی*.

حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار (P<۰/۰۵) در هر زمان می‌باشد.

در پژوهش حاضر ۹ ترکیب در نعنا شناسایی شد که بین ترکیبات شناسایی شده به‌ترتیب کارون (۶۳/۰۲ درصد) ، لیمونن (۲۴/۴۸ درصد) و کاریوفیلن (۳/۱۹ درصد) عمده‌ترین ترکیبات موجود در اسانس را تشکیل می‌دهند. در یک مطالعه از هلند ترکیبات عمده اسانس نعنا منتیل استات (۱۹/۲ درصد)، منتون (۲۲/۷ درصد) و منتول (۲۹ درصد) (۱۳) و در مطالعه دیگری از عربستان فراوان‌ترین ترکیبات اسانس نعنا منتوفوران (۶/۸۸ درصد)، منتیل استات (۸/۹۵ درصد)، منتون (۲۴/۵۶ درصد) و منتول (۳۶/۰۲ درصد) بود (۵). ترکیبات عمده اسانس نعنا از برزیل شامل ترپین-۴- ال (۸ درصد)، ۳-اکتانول (۱۰/۱ درصد)، کارون (۲۳/۴۲ درصد) و لینانول (۵۱ درصد) گزارش شد (۱۴). در چندین مطالعه از ایران ترکیبات عمده اسانس نعنا منتون (۳۰/۶۲ درصد)، منتول (۲۵/۱۶ درصد)، منتوفوران (۶/۴۹ درصد)، منتیل استات (۴/۶۱ درصد) و اکالیپتول(۲/۱۵ درصد) (۱۵)، منتول (۵۳/۲۸ درصد)، منتیل استات (۱۵/۱ درصد)، منتوفوران (۱۱/۱۸ درصد) (۱۶) و آلفا- ترپینن (۱۹/۷ درصد)، پیپرتینون اکسید (۱۹/۳ درصد) و ترانس- کارون (۱۴/۵ درصد) (۱۷)، کارون (۵۱/۰۳ درصد) و لیمونن (۲۱/۱۲ درصد) (۱۸) بود. ترکیبات عمده مطالعه حاضر (کارون و لیمونن) بسیار شبیه یکی از مطالعات ایران (۱۸) ولی تا حدی متفاوت از سایر مطالعات ایران (۱۷- ۱۵) بود و منتون و منتول که در اکثر مطالعات سایر کشورها گزارش شده (۱۳، ۵) در مطالعه حاضر یافت نشد.

در مطالعه حاضر پولگون (۴۸/۱۶ درصد)، اکالیپتول (۱۴/۵۷ درصد) و پیپریتونن (۱۰/۰۹ درصد) بیشترین ترکیبات موجود در اسانس پونه را تشکیل می‌دهند. این نتایج شبیه مطالعه دیگری از ایران (۱۹) با ترکیبات عمده سیس- پولگون- اکسید (۴۵/۶۷ درصد)، ۳،۳- دی‌منتول (۱۸/۸۵ درصد) و پی- منتا-۲- ان-۱- ال (۱۲/۱۵ درصد) و مطالعه دیگری از پرتغال (۲۰) با ترکیبات عمده پولگون (۸۶/۶۴ درصد)، ایزومنتون (۴/۶ درصد) و پیپریتنون (۲/۵۸ درصد) است. در پژوهش دیگری از پرتغال ترکیبات عمده اسانس پونه منتون (۳۵/۹ درصد)، پولگون (۲۳/۲ درصد) و نئو- منتون (۹/۲ درصد) گزارش شد (۷). اختلاف در ترکیبات عمده اسانس در مطالعات مختلف می‌تواند ناشی از شرایط آب و هوایی، مکان جغرافیایی، نور آفتاب، مرحله رشد، روش استخراج اسانس و قسمت مورد استفاده گیاه باشد (۲۱).

در مطالعات مختلف مقادیر متفاوتی برای MIC و MBC اسانس نعنا و پونه علیه باکتری‌ها گزارش شده است. در یک مطالعه محدوده MIC، ۳/۱۲ mg/ml - ۰/۳۹ و محدوده MBC، ۱۲/۴۸ mg/ml- ۰/۷۸ برای اسانس نعنا علیه *استافیلوکوک اورئوس* مقاوم به چند دارو گزارش شد (۱۳). در مطالعات دیگر MIC نعنا علیه سویه‌های استاندارد *استافیلوکوک اورئوس* ۰/۵ mg/ml (۸)، ۰/۰۳ µg/ml ± ۰/۷۵ (۵)، ۰/۱درصد (۹) و علیه *اشریشیاکلی* ۰/۰۹ µg/ml± ۰/۲ (۵) و ۰/۲۵ درصد (۹) گزارش شد. MIC پونه علیه *اشریشیاکلی* در یک پژوهش ۲/۳ mg/ml بود (۷). مقادیر متفاوت گزارش شده برای MIC و MBC در مطالعات مختلف می‌تواند به علت سویه‌های مختلف باکتریایی و ترکیبات مختلف اسانس باشد. برای ارزیابی قدرت ضد باکتریایی اسانس‌ها از نسبت MBC/MIC استفاده می‌شود اگر این نسبت بزرگتر از ۴ باشد اسانس باکتریواستاتیک و اگر کمتر یا مساوی ۴ باشد باکتریسید در نظر گرفته می‌شود (۲۱) . طبق این تقسیم‌بندی اسانس‌های مطالعه حاضر اثر باکتریسیدی نشان دادند.

در مطالعه حاضر، با استفاده از روش دیسک دیفیوژن، اثر ضد باکتریایی نعنا و پونه بر *استافیلوکوک اورئوس* نسبت به جنتامایسین تفاوت معنی‌داری نداشت اما علیه دو باکتری دیگر نسبت به هر دو آنتی‌بیوتیک به‌طور معنی‌داری کمتر بود. اثر اسانس رقیق نشده قوی‌تر از رقیق شده (۱:۱) بود بنابراین در مقادیر بالاتر از µL ۲۰ می‌تواند اثرات قوی‌تری داشته و به‌عنوان جایگزین آنتی‌بیوتیک مورد بررسی قرار گیرد. نتایج مطالعه حاضر مشابه نتایج بعضی مطالعات در مورد ارزیابی اثر ضد باکتریایی اسانس نعنا و پونه علیه میکروارگانیسم‌های متعدد است (۲۰، ۲۲، ۱۹، ۸، ۵). اختلاف هاله عدم رشد در مطالعات مختلف می‌تواند به علت سویه‌های مختلف باکتری، اختلاف مقدار و غلظت اسانس و آنتی‌بیوتیک‌ها در هر دیسک و همچنین اختلاف در ترکیب شیمیایی اسانس‌ها باشد. نکته قابل توجه دیگر در مطالعه حاضر، اثر ضد باکتریایی قوی‌تر اسانس‌ها بر باکتری‌های گرم‌مثبت (*استافیلوکوک اورئوس* و *استرپتوکوک آگالاکتیه*) نسبت به باکتری گرم‌منفی *اشریشیاکلی* بود که مورد انتظار ما بود و در سایر مطالعات نیز تایید شده است و علت آن ممانعت از نفوذ اسانس‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها به داخل سلول توسط غشای خارجی در باکتری‌های گرم‌منفی است و علاوه بر آن آنزیم‌های ناحیه پری‌پلاسم گرم‌منفی‌ها ممکن است مواد ضد باکتریایی اسانس‌ها را غیر فعال کند (۲۳).

در مورد منحنی رشد با این که اسانس نعنا و پونه بعد از ۲۴ ساعت فقط تعداد باکتری *اشریشیاکلی* را به‌طور معنی‌داری کاهش دادند و روی دو باکتری دیگر اثر معنی‌دار نداشتند ولی این اثرات مربوط به غلظت تحت حداقل غلظت مهاری رشد است و اگر غلظت مهاری و یا حتی غلظت‌های چند برابر مهاری استفاده می‌شد به احتمال زیاد اثرات ضد باکتریایی خیلی قوی‌تر می‌بود.

ترکیبات اسانس و سویه‌های متفاوت باکتری در مطالعات مختلف عامل تفاوت‌ها در فعالیت ضد باکتریایی اسانس‌ها است. نظرات مختلفی در مورد این که کدام ترکیب یا ترکیبات عامل اثرات ضد باکتریایی هستند بیان شده است در بعضی پژوهش‌ها بیان شده است که اثر ضد باکتریایی اسانس‌ها حاصل فقط ترکیبات اصلی نبوده و به مجموع اثرات تمام ترکیبات ارتباط دارد. و وجود ترکیبات با مقدار کم هم برای اثرات ضد باکتریایی ضروی بوده و اثر سینرژیست دارند و اثر کل اسانس بیشتر از اثر انفرادی ترکیبات اصلی است (۲۳، ۲۴).

به علت وجود چندین گروه شیمیایی در ترکیب اسانس، اثر ضد باکتریایی اسانس‌ها با چند مکانیسم انجام می‌شود اسانس‌ها به کمک خصوصیت آب‌گریزی اسانس یا اجزای آن با اثر بر غشای سلولی باکتری‌ها که حاوی لیپید است باعث افزایش نفوذپذیری غشاء، نشت محتویات و در نهایت مرگ باکتری می‌شوند (۴).

نتیجه‌گیری

اثر ضد باکتریایی نعنا بر هر سه باکتری مشابه یا قوی‌تر از آنتی‌بیوتیک لینکواسپکتین و اثر پونه بر *استرپتوکوک*

آگالاکتیه قوی‌تر از لینکواسپکتین بود و فعالیت ضد باکتریایی نعنا و پونه بر *استافیلوکوک اورئوس* نسبت به جنتامایسین تفاوت معنی‌داری نداشت و هر دو اسانس بعد از ساعت ۲۴ باعث کاهش معنی‌دار تعداد *اشریشیاکلی* شدند. هر دو اسانس نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها اثر ضد باکتریایی قابل قبولی داشتند ولی اثر ضد باکتریایی اسانس نعنا قوی‌تر از پونه بود.

سپاسگزاری: این تحقیق برگرفته از طرح پژوهشی با کد ۶/۱۸۲ و با حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه گنبد کاووس انجام شده است که نویسندگان بدین‌وسیله مراتب تشکر و قدردانی خود را اعلام می‌دارند.

References

1- Contreras GA, Rodríguez JM. Mastitis: Comparative etiology and epidemiology. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2011; 16(4): 339–56.

2- Montironi ID, Cariddi LN, Reinoso EB. Evaluation of the antimicrobial efficacy of *Minthostachys verticillata* essential oil and limonene against *Streptococcus uberis* strains isolated from bovine mastitis. *Rev Argent Microbiol*. 2016; 48(3): 210–6.

3- Alekish MO, Ismail ZB, Awawdeh MS, Shatnawi S. Effects of intramammary infusion of sage (*Salvia officinalis*) essential oil on milk somatic cell count, milk composition parameters and selected hematology and serum biochemical parameters in Awassi sheep with subclinical mastitis. *Vet World.* 2017; 10(8): 895–900.

4- Ananda Baskaran S, Kazmer GW, Hinckley L, Andrew SM, Venkitanarayanan K. Antibacterial effect of plant-derived antimicrobials on major bacterial mastitis pathogen's in vitro. *J Dairy Sci.* 2009; 92(4): 1423-1429.

5- Desam NR, Al-Rajab AJ, Sharma M, Mylabathula MM, Gowkanapalli RR, Albratty M. Chemical constituents, *in vitro* antibacterial and antifungal activity of *Mentha* × *Piperita L.* (peppermint) essential oils. *J King Saud Univ - Sci*. 2019; 31(4): 528–33.

6- Parham S, Kharazi AZ, Bakhsheshi-Rad HR, Nur H, Ismail AF, Sharif S, *et al.* Antioxidant, antimicrobial and antiviral properties of herbal materials. *Antioxidants.* 2020; 9(12): 1–36. [In Persion]

7- Teixeira B, Marques A, Ramos C, Batista I, Serrano C, Matos O, *et al.* European pennyroyal (*Mentha pulegium*) from Portugal: Chemical composition of essential oil and antioxidant and antimicrobial properties of extracts and essential oil. *Ind Crops Prod.* 2012; 36(1): 81–7.

8- Kang J, Jin W, Wang J, Sun Y, Wu X, Liu L. Antibacterial and anti-biofilm activities of peppermint essential oil against *Staphylococcus aureus*. *Lwt- Food Sci Technol*. 2019; 101: 639–45.

9- Catherine AA, Deepika H, Negi PS. Antibacterial activity of eugenol and peppermint oil in model food systems. *J Essent Oil Res.* 2012; 24(5): 481–6.

10- Akhondzadeh Basti A, Misaghi A, Khaschabi D. Growth response and modelling of the effects of *Zataria multiflora Boiss.* essential oil, pH and temperature on *Salmonella Typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. *LWT - Food Sci Technol*. 2007; 40(6): 973–81. [In Persion]

11- Fu YJ, Zu YG, Chen LY, Shi XG, Wang Z, Sun S, *et al.* Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. *Phyther Res.* 2007; 21(10): 989–94.

12- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. *CLSI document M100-S25, Wayne. Ninth Ed*. 2015. p:18.

13- Kot B, Wierzchowska K, Piechota M, Czerniewicz P, Chrzanowski G. Antimicrobial activity of five essential oils from lamiaceae against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Prod Res.* 2019; 33(24): 3587–91.

14- Sartoratto A, Machado ALM, Delarmelina C, Figueira GM, Duarte MCT, Rehder VLG. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian J Microbiol.* 2004; 35(4): 275–80.

15- Moghaddam M, Pourbaige M, Tabar HK, Farhadi N, Hosseini SMA. Composition and antifungal activity of peppermint (*Mentha piperita*) essential oil from Iran. *J Essent Oil-Bearing Plants.* 2013; 16(4): 506–12. [In Persion]

16- Saharkhiz MJ, Motamedi M,

Zomorodian K, Pakshir K, Miri R, Hemyari K. Chemical Composition, Antifungal and Antibiofilm Activities of the Essential Oil of *Mentha piperita L. ISRN Pharm.* 2012; 1–6. [In Persion]

17- Yadegarinia D, Gachkar L, Rezaei MB, Taghizadeh M, Astaneh SA, Rasooli I. Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita L.* and *Myrtus communis L.* essential oils. *Phytochemistry*. 2006; 67(12): 1249–55. [In Persion]

18- Azizi Tabrizzad N, Seyedin Ardebili SM, Hojjati, M. Identification of chemical compounds of pennyroyal, mint and thyme essential oils and investigate their antimicrobial activities. *J Food Sci Tech.* 2019; 16(87): 395-404. [In Persion]

19- Dehghani N, Afsharmanesh M, Salarmoini M, Ebrahimnejad H. Characterization of pennyroyal (*Mentha pulegium*) essential oil as an herbal, antibacterial, and antioxidant substance. *Comp Clin Path.* 2018; 27(6): 1575–81. [In Persion]

20- Luís Â, Domingues F. Screening of the potential bioactivities of pennyroyal (*Mentha pulegium L.*) essential oil. *Antibiotics.* 2021; 10(10): 1266.

21- Hajlaoui H, Mighri H, Aouni M, Gharsallah N, Kadri A. Chemical composition and *in vitro* evaluation of antioxidant, antimicrobial, cytotoxicity and anti-acetylcholinesterase properties of Tunisian *Origanum majorana* L. essential oil. *Microb Patho.* 2016; 95: 86-94.

22- Alexopoulos A, Kimbaris AC, Plessas S, Mantzourani I, Theodoridou I, Stavropoulou E, *et al.* Antibacterial activities of essential oils from eight Greek aromatic plants against clinical isolates of *Staphylococcus aureus. Anaerobe*. 2011; 17(6): 399–402.

23- Bouyahya A, Et-Touys A, Abrini J, Talbaoui A, Fellah H, Bakri Y, *et al.* *Lavandula stoecha* essential oil from Morocco as novel source of antileishmanial, antibacterial and antioxidant activities. *Biocatal Agric Biotechnol.* 2017;12: 179-184.

24- Moosavi-Nasab M, Saharkhiz MJ, Ziaee E, Moayedi F, Koshani R, Azizi R. Chemical compositions and antibacterial activities of five selected aromatic plants essential oils against food-borne pathogens and spoilage bacteria. *Essen Oil Res*. 2016; 83(3): 607-613. [In Persion]

Antibacterial effect of essential oils of peppermint and pennyroyal on major bovine mastitis bacteria

Reza Rahchamani[1]*, Samira Noori [2], Javad Bayat Kouhsar[1]

1- Assistant professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Gonbad Kavous, Gonbad Kavous, Iran.
2- M.Sc. graduate of Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Gonbad Kavous, Gonbad Kavous, Iran.

Receive: February 14, 2023; Revise: April 26, 2023; Accept: May 27, 2023

Summary

Antibiotic therapy of bacterial diseases has some side effects including antibiotic resistance. There is need to investigate new and natural antibacterial agents because of various side effects of antibiotics. According to antibacterial effects, essential oils (EOs) are suitable alternatives. *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* cause various diseases in human and animals. Also, these three bacteria are major bovine mastitis-causing bacteria. So, this study investigated antibacterial activity of *Mentha piperita* (peppermint) and *Mentha pulegium* (pennyroyal) essential oils in comparison with lincospectin, gentamicin and amoxicillin/clavulanate antibiotics on these bacteria. Gas chromatography/mass spectrometry was used for the analysis of EOs. Antibacterial effects of the EOs on bacteria were evaluated with minimum bactericidal concentration (MBC), minimum inhibitory concentration (MIC), disk diffusion method, and time- kill assay in tryptic soy broth (TSB). Major components of peppermint EO were carvone (63.02%) and limonene (24.48%), and those of pennyroyal EO were pulegone (48.16%), eucalyptol (14.57%). According to MIC and MBC results, the antibacterial activity of peppermint was the same or higher than lincospectin and pennyroyal effect on *Streptococcus agalactiae* was higher than lincospectin. The inhibition zone of peppermint and pennyroyal had no significant difference with gentamycin but the effects of two EOs against the other two bacteria were lower than gentamycin and amoxicillin/clavulanate. Sub-MIC concentrations of oils decreased *Escherichia coli* count at 24 h. Generally, the essential oil of peppermint and pennyroyal had a significant antibacterial effect and the effect of peppermint was higher than pennyroyal.

Key words: *Antibiotic resistance, Bacterial disease, Medicinal plant*