نشریه تازه ها در میکروب‌شناسی دامپزشکی
وبگاه: nfvm.uoz.ac.ir
دو فصلنامه - شاپا چاپی: ۲۶۴۵-۴۴۹۱ شاپا الکترونیکی: ۲۶۷۶-۵۰۰۴

دوره ۷، شماره ۲، پائیز و زمستان ۱۴۰۳، صفحات ۹۳- ۱۰۳

بررسی خاصیت ضد میکروبی اسانس‌های رازیانه و زیره سبز بر روی سویه‌های *انتروباکتر فکالیس* و *اسینتوباکتر بومانی* در شرایط آزمایشگاهی

یحیی مرادی[۱]، مهدی رشدی ملکی[۲*]

۱- کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، واحد ملکان، دانشگاه آزاد اسلامی، ملکان، ایران.
۲- - استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد ملکان، دانشگاه آزاد اسلامی، ملکان، ایران.

دریافت مقاله: ۱۵ اردیبهشت ۱۴۰۳، بازنگری: ۲۴ خرداد ۱۴۰۳، پذیرش نهایی: ۲۷ خرداد ۱۴۰۳

10.22034/nfvm.2024.455730.1236

چکیده

برای مقابله با کمبود ترکیبات ضد میکروبی جدید و افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی، گیاهان می‌توانند یک راه حل بالقوه باشند. هدف از مطالعه حاضر بررسی آزمایشگاهی خاصیت ضد میکروبی اسانس‌های رازیانه و زیره سبز بر روی سویه‌های *انتروکوکوس فکالیس* و *اسینتوباکتر بومانی* می‌باشد. در این روش محلول اسانس در غلظت معین به دیسک‌های استریل اضافه و به محیط کشت میکروبی انتقال داده شدند. برای بررسی بازدارندگی رشد به روش دیسک انتشاری از سوسپانسیون باکتری بر روی پلیت حاوی مولر هینتون آگار اضافه گردید و همچنین برای بررسی MIC و MBC اسانس مورد نظر رقت‌های 10^{-1} و 10^{-10} تهیه شد و در آخر دانسیته نوری در طول موج ۵۴۰ اندازه‌گیری گردید. نتایج بازدارندگی از رشد به روش دیسک انتشاری نشان داد که دو باکتری *اسینتوباکتر بومانی* و *انتروباکتر فکالیس* قطر ۱/۲ میلی‌متر ایجاد کرده است. نتایج MIC و MBC اسانس زیره سبز بر روی *اسینتوباکتر بومانی* در رقت 10^{-3} (MIC) به میزان ۰/۰۷۸ در غلظت ppm ۲۰۰۰ اثر مهاری ایجاد کرد و در MBC در رقت 10^{-2} به میزان ۰/۱۳۵ در این باکتری اثر کشندگی نیز دارد. در *انتروباکتر فکالیس* در رقت 10^{-1} هر دو MIC و MBC به میزان ۰/۳۱۱ در غلظت ppm ۲۰۰۰ اثر مهاری و کشندگی دارند. با توجه به گسترش مقاومت دارویی در سویه‌های بیماری‌زا گیاهان دارویی با اثرات ضد میکروبی گزینه مناسب با عارضه کم می‌باشند.

واژگان کلیدی: *اسینتوباکتر بومانی، انتروباکتر فکالیس، اسانس زیره سبز، اسانس رازیانه، مقاومت دارویی*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: Mehdiroshdi@gmail.com

مقدمه

سازمان بهداشت جهانی (WHO) اعلام کرده که ۸۰ درصد کشورهای در حال توسعه از داروهای سنتی مشتق شده از گیاهان دارویی بهره مند هستند (۱، ۲). در حالی که تعداد کل گونه‌های گیاهی تقریباً ۳۷۴۰۰۰ گونه تخمین زده می‌شود، تنها ۲۸۱۸۷ گونه توسط انسان ها به‌عنوان دارو مورد استفاده قرار می‌گیرند. (۳، ۴). WHO همچنین نام بیش از ۲۰،۰۰۰ گونه از گیاهان دارویی را ثبت کرده است و گیاهان دارویی را یکی از منابع بالقوه داروهای جدید توصیف کرده است (۵، ۶).

بیش از ۱۰۰ کشور، مقرراتی را برای گیاهان دارویی تدوین کرده‌اند. و بیش از ۱۳۴۰ گیاه با فعالیت ضد میکروبی مشخص وجود دارد و بیش از ۳۰،۰۰۰ ترکیب ضد میکروبی از گیاهان جدا شده است (۷). علاوه بر این، تخمین زده شده است که ۱۴ تا ۲۸ درصد از گونه‌های گیاهی عالی، دارویی هستند و ۷۴ درصد از ترکیبات زیست‌فعال مشتق‌شده از گیاهان بر اساس کاربردهای پزشکی کشف شده‌اند (۸).

استفاده گسترده، نامناسب، نامنظم و بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها منجر به ظهور مقاومت ضد میکروبی شده است و بسیاری از داروهای موجود در حال حاضر را بی‌اثر کرده است (۹). بنابراین، تقاضای فزاینده‌ای برای تولید عوامل ضد میکروبی جدید وجود دارد که قادر به کاهش استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و مقابله با توسعه مقاومت باشند. این مسأله محققان را به جداسازی و شناسایی مواد شیمیایی زیست فعال جدید از گیاهان، برای مقابله با مقاومت میکروبی هدایت کرده است (۱۰).

ترکیبات ضد میکروبی گیاهان دارویی ممکن است رشد باکتری‌ها، قارچ‌ها، ویروس‌ها و تک‌یاخته‌ها را با مکانیسم‌های متفاوتی نسبت به ضد میکروبی‌های کنونی مهار کنند و ممکن است ارزش بالینی قابل توجهی در درمان سویه‌های میکروبی مقاوم داشته باشند (۱۱). برخی از این ترکیبات فعال هم فعالیت ضد باکتریایی ذاتی و هم فعالیت‌های اصلاح کننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی را نشان می‌دهند و برخی از آنها اگرچه به تنهایی به‌عنوان آنتی‌بیوتیک مؤثر نیستند، وقتی با آنتی‌بیوتیک‌ها ترکیب شوند، می‌توانند به غلبه بر مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها کمک کنند (۱۲).

اسینتوباکتر بومانی شایع‌ترین گونه‌ای است که از نمونه‌های بالینی جدا می‌شود. این باکتری از عوامل بیماری‌زای فرصت طلب بوده که باعث عفونت‌های بیمارستانی می‌شود. *اسینتوباکتر بومانی* از خون، خلط، پوست، مایع پلور و ادرار جدا می‌شود. بیماری‌زایی سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* به توانایی این ارگانیسم در تولید بیوفیلم بر سطوح و سلول‌های انسان و مقاومت آن نسبت به مواد ضد میکروبی مرتبط می‌شود. بسیاری از سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* به چندین دارو مقاوم بوده و درمان عفونت‌های ناشی از آن می‌تواند دشوار باشد (۱۳).

انتروباکتر فکالیس باکتری گرم مثبت، کاتالاز منفی و بی‌هوازی اختیاری می‌باشد. انتقال *انتروکوکوس فکالیس* اغلب زمانی اتفاق می‌افتد که سویه‌های اندوژنوس به سایر نقاط بدن راه پیدا می‌کنند. به‌طور مثال، *انتروکوکوس فکالیس* ممکن است در حین فعالیت لوله گوارش یا دستگاه تناسلی وارد جریان خون شده و قسمت‌های دیگر بدن را آلوده کند و باعث بروز عفونت‌هایی مانند اندوکاردیت شود. با این وجود *انتروکوکوس فکالیس* می‌تواند از فردی به فرد دیگر نیز منتقل شود. این انتقال از طریق تماس مستقیم با افراد و یا استفاده‌ی مشترک از تجهیزات پزشکی آلوده صورت گرفته و اغلب سبب ایجاد سویه‌های مقاوم به چند دارو می‌شود. بیماران دارای نقص ایمنی در معرض خطر بالای ابتلا به عفونت هستند (۱۴).

وانکومایسین معمولاً در موارد عفونت‌های *انتروکوکی* مقاوم به دارو مؤثر است اما در مواردی مقاومت به ونکومایسین نیز گزارش شده است. در صورت بروز مقاومت به ونکومایسین ممکن است لینزولید تجویز شود. معمولاً برای جلوگیری از ابتلای بیماران بستری به عفونت‌های انتروکوکی، به‌ویژه *انتروکوکوس فکالیس*، به بیمارانی که مبتلا به اختلالات دریچه قلب هستند، قبل از

عمل روده یا مجاری ادراری پنی‌سیلین و جنتامایسین داده می‌شود. در حال حاضر واکسنی برای جلوگیری از ابتلا به عفونت ناشی از *انتروکوکوس فکالیس* در دسترس نیست (۱۵). با توجه به گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در برخی باکتری‌ها، مطالعه‌ای تحت عنوان بررسی خاصیت ضد میکروبی اسانس‌های زیره سبز و رازیانه بر روی *اسینتوباکتر بومانی* و *انتروباکتر فکالیس* در شرایط آزمایشگاهی را طراحی کرده تا اثرات مفید اسانس‌های این گیاهان در درمان عفونت‌های حاصله مفید واقع شود.

مواد و روش‌ها

روش اسانس‌گیری: پس از تهیه گیاهان مورد نظر به‌صورت خشک شده، نمونه‌های گیاهی با استفاده از دستگاه آسیاب پودر و برای اسانس‌گیری آماده شدند. برای تهیه اسانس، از کلونجر استفاده شد. به این صورت که مقدار ۶۰ گرم از پودر خشک گیاه را در ۱/۵ لیتر آب مقطر درون بالن دستگاه ریخته و روی بخاری برقی به مدت ۴ ساعت گذاشته تا جوشانده شود و توسط شیر تخلیه عصاره از عرق گیاهی جداسازی شد.

تجزیه ترکیبات شیمیایی اسانس‌های مورد آزمایش به روش GC/MS: آنالیز کروماتوگرافی اسانس با استفاده از کروماتوگرافی گازی نوع Perkin Elmer انجام شد. در این روش، از ستون، با استفاده از ضربه الکترونیکی تحت انرژی ۷۰ eV طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت فیلم ۰/۲۵ میکرومتر استفاده شد. برنامه‌ریزی دما به این شکل بود که در ابتدا دما به مقدار ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه تنظیم شد، سپس با افزایش ۸ درجه سانتی‌گراد در دقیقه به مدت ۱۸ دقیقه به دمای ۲۹۰ درجه سانتی‌گراد رسید. بردار گاز از هلیوم با جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه استفاده گردید. تحلیل اسپکتروم‌های جرمی (GC-MS) از روغن‌های اسانسی به‌وسیله مقایسه‌آنها با اسپکتروم‌های جرمی موجود درکتابخانه‌های وایلی Wiley NBS75K.L و NIST/EPA/NIH (نسخه ۲۰۰۲، مؤسسه استانداردهای ملی آمریکا) انجام شد. این روش به‌ویژه برای شناسایی ترکیبات مختلف در روغن‌های اسانسی استفاده می‌شود. اسپکتروم‌های جرمی حاصل از این تجزیه و تحلیل با اسپکتروم‌های موجود در کتابخانه‌ها مقایسه شده و ترکیبات شناسایی می‌شوند (۱۶).

باکتری‌های مورد استفاده: در این مطالعه از باکتری‌های *اسینتوباکتر بومانی* ATCC 1137 و *انتروکوکوس فکالیس* ATCC 29212 استفاده گردید. این سویه‌ها از شرکت راساژن شیراز تهیه شدند.

آزمایش دیسک آگار دیفیوژن: این روش معمول‌ترین شکل ارزیابی مواد ضد میکروبی است. در این روش ابتدا محلول اسانس را در غلظت معین به دیسک‌های استریل اضافه کرده و سپس دیسک‌ها به محیط کشت میکروبی انتقال داده می‌شود. برای این منظور ابتدا محیط کشت مولر هینتون آگار (مرک- آلمان) برای باکتری‌ها تهیه گردید. سپس غلظت نیم مک فارلند از نمونه‌های میکروبی مورد آزمون که در مرحله رشد لگاریتمی بودند تهیه گردید و در سطح محیط‌های کشت، کشت داده شد. دیسک‌های آماده شده از عصاره‌ها و فراکشن‌های مورد بررسی، پس از خشک شدن کامل حلال ترکیبات، بر روی محیط‌های کشت داده شده منتقل گردید. به‌منظور مشخص نمودن اثرات ضد میکروبی حلال مورد استفاده برای ترکیبات که DMSO بود، یک دیسک DMSO حاوی غلظت مشابهی از نمونه‌های مورد بررسی تهیه و استفاده شد. کشت‌ها در دمای ۳۷- ۳۵ درجه سانتی‌گراد و مدت ۲۴- ۱۸ ساعت برای باکتری‌ها گرماگذاری شد. نتایج بر اساس روش Kirby bauer و بر حسب میلی‌متر قطر هاله عدم رشد اندازه‌گیری شدند (۲۴).

بررسی بازداری از رشد به روش دیسک انتشاری: پس از تلقیح سوسپانسیون باکتری با استفاده از سواپ استریل بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار، پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس

در انکوباتور نگهداری شدند. سپس مقدار ۵۰ میکرولیتر از هر اسانس معادل ۵ میلی‌گرم، با استفاده از سمپلر روی دیسک‌های کاغذ صافی به قطر شش میلی‌متر بارگزاری شده و متانول به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. سپس دیسک‌های کاغذی حاوی اسانس در فاصله‌های مشخص قرار داده شد و پس از ۲۴ ساعت قطر هاله عدم رشد با کولیس اندازه‌گیری شد.

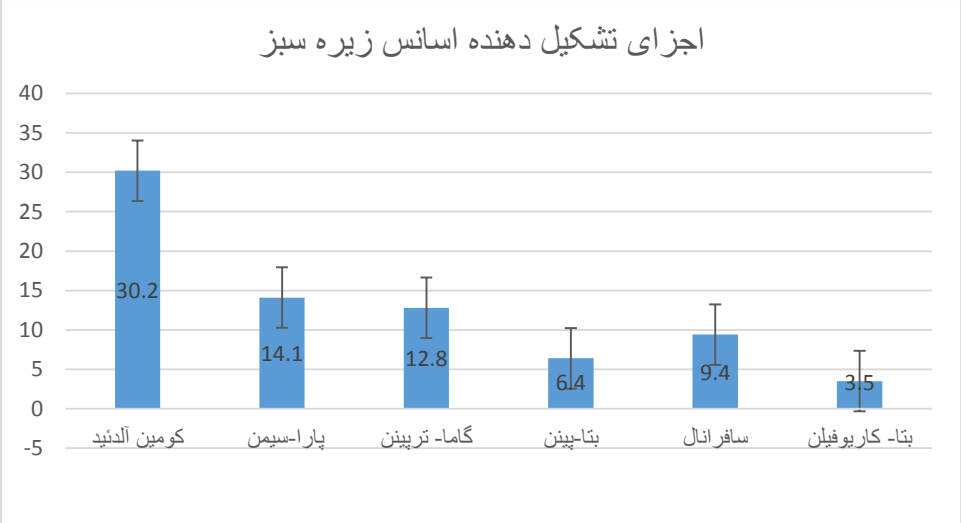
تعیین حداقل غلظت بازدارنده (MIC): برای حل نمودن اسانس‌های رازیانه و زیره سبز از محلول ۱۰ درصد دی‌متیل سولفوکساید استفاده شد، به این صورت که ابتدا به میزان ۰/۱ گرم از اسانس‌های مورد مطالعه به لوله‌های آزمایش محتوی ۱ میلی‌لیتر از محلول ۱۰ درصد دی‌متیل سولفوکساید افزوده شد و با استفاده از شیکر لوله آزمایش تا ایجاد یک سوسپانسیون شیری رنگ تکان داده شد.

تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC): جهت تعیین کمترین غلظت کشندگی اسانس‌های گیاهی، ابتدا با کمک پنس استریل، دیسک‌هایی را که به‌منظور تعیین MIC در سطح آگار گذاشته شده بودند برداشته و سپس توسط لوب استریل از ناحیه عدم رشد ایجاد شده در زیر هر دیسک، نمونه‌برداری کرده و در سطح محیط کشت مولر هینتون آگار به‌صورت خطی کشت داده شد. پلیت‌های کشت به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوباتور شدند.کمترین رقتی از اسانس‌ها که توانسته بود موجب مرگ باکتری شود، از عدم رشد باکتری در پلیت مشخص گشته و به‌عنوان MBC آن اسانس در نظر گرفته شد.

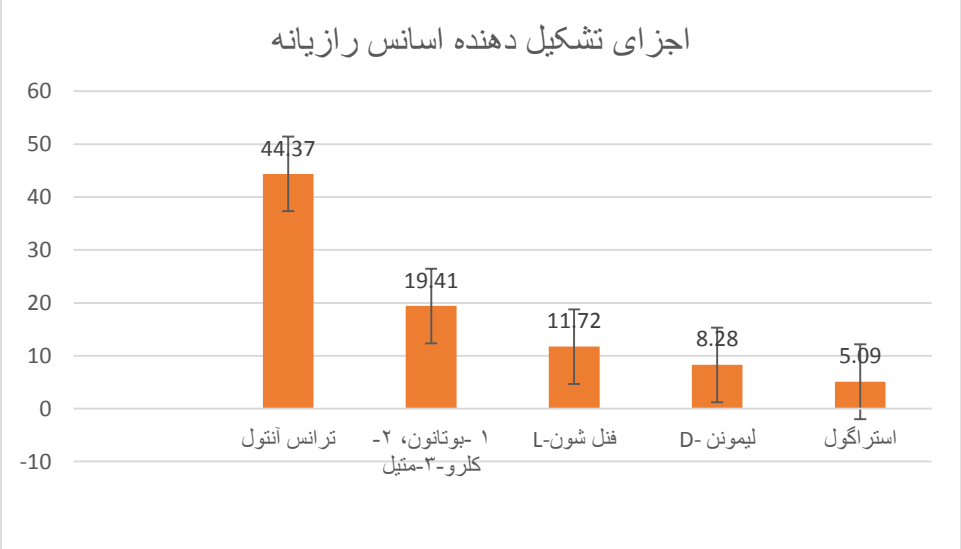
تست دانسیته نوری (OD): برای مشاهده جذب نمونه‌ها، روی ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع، غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ ، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اسانس‌های گیاهی اضافه گردید. سپس مقدار ۰/۵سی‌سی باکتری در غلظت نیم مک فارلند به محیط کشت‌های حاوی باکتری تلقیح شد. نمونه‌های کنترل مثبت (حاوی محیط کشت و میکروارگانیسم فاقد اسانس گیاه) برای نشان دادن مشخصات رشد میکروبی میکروارگانیسم و کنترل منفی (حاوی محیط کشت و عصاره گیاه فاقد میکروارگانیسم) تا نشان دهد که هیچ آلودگی باکتریایی در محیط وجود ندارد. نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. بعد از ۲۴ ساعت جذب نوری نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانده شد (۱۷).

نتایج

نتایج حاصل از تجزیه و ترکیب اسانس‌ها به روش GC/MS: در اسانس زیره سبز ۲۰ ترکیب فعال شناسایی گردید که فراوانی ۸۳/۷ درصد از اسانس را تشکیل داد. اجزای مهم تشکیل‌دهنده این ترکیب شامل کومین آلدئید (۳۰/۲ درصد)، پارا- سیمن (۱۴/۱ درصد)، گاما- ترپینن (۱۲/۸ درصد)، بتا- پینن (۶/۴ درصد)، سافرانال (۹/۴ درصد) و بتا- کاریوفیلن (۳/۵ درصد) تعیین شد. در اسانس رازیانه ۲۵ ترکیب فعال شناسایی گردید که فراوانی ۹۷/۵۲ درصد از اسانس را تشکیل داد. اجزای مهم تشکیل‌دهنده این ترکیب شامل ترانس آنتول (۴۴/۳۷ درصد)، ۱ - بوتانون، ۲-کلرو-۳- متیل (۱۹/۴۱ درصد)، L- فنل شون (۱۱/۷۲ درصد)، D- لیمونن (۸/۲۸ درصد) و استراگول (۵/۰۹ درصد) شناسایی شد. تمامی ترکیبات و شاخص کواتس هر دو اسانس رازیانه و زیره را نشان می‌دهد. نمودارهای ۱و ۲ مقدار فراوانی ترکیبات فعال اسانس‌های زیره سبز و رازیانه را نمایش می‌دهد.



نمودار ۱- اجزای تشکیل‌دهنده اسانس زیره



نمودار ۲- اجزای تشکیل‌دهنده اسانس رازیانه

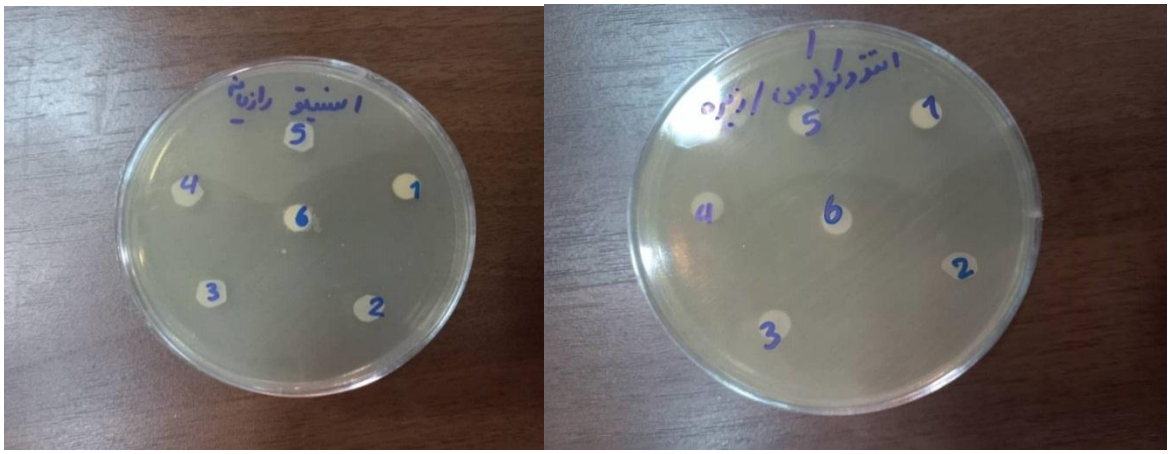
نتایج بازداری از رشد به روش دیسک انتشاری:

نتایج این روش نشان داد که اسانس زیره سبز عملکرد بهتری بر روی دو باکتری *انتروباکتر فکالیس* و *اسینتوباکتر بومانی* دارد نظر به اینکه هر دو باکتری از جمله میکروارگانیسم‌های مقاوم شناخته شده دهه‌های اخیر می‌باشد. اما اسانس رازیانه نتیجه منفی در برابر باکتری‌ها از خود نشان داد. جدول ۱ میزان عدم ایجاد هاله را نشان می‌دهد.

جدول ۱- نتایج بازداری اسانس‌ها به روش دیسک انتشاری

	اسانس زیره سبز			اسانس رازیانه		
نام باکتری	قطرهاله عدم رشد					
انتروباکتر فکالیس	۱/۱	۱/۱	۱/۲	R	R	R
اسینتوباکتر بومانی	۱/۱	۱/۲	۱/۱	R	R	R

R= Resistant

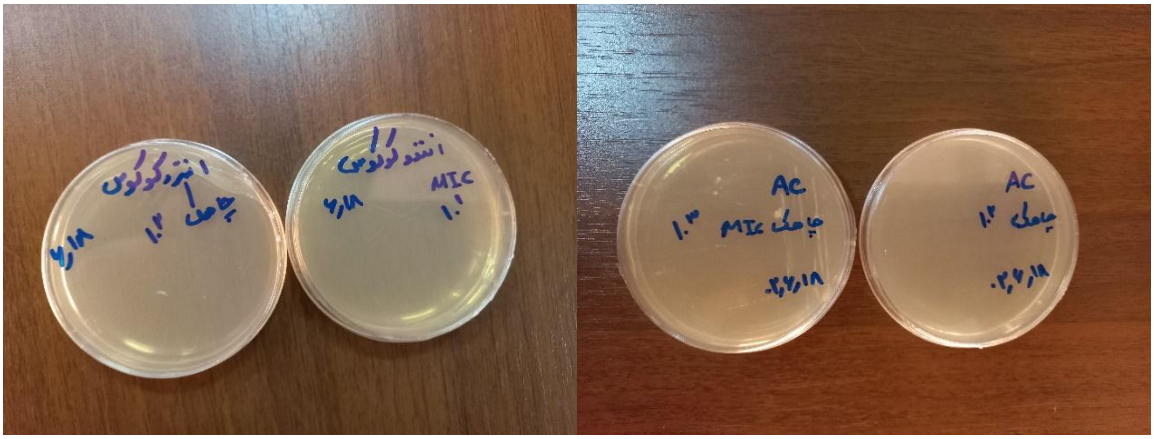


شکل ۱- انتشار دیسک اسانس‌های زیره سبز و رازیانه بر روی دو باکتری *انتروباکتر فکالیس* و *اسینتوباکتر بومانی*

نتایج آزمایش‌های MIC و MBC: نتایج MIC و MBC نشان داد که اسانس زیره سبز دارای اثرات ضد باکتریایی بر روی باکتری‌های مورد مطالعه می‌باشد. به‌طوری که MIC اسانس زیره سبز بر روی *اسینتوباکتر بومانی* در رقت 10^{3} به میزان ۰/۰۷۸ در غلظت ppm ۲۰۰۰ اثر مهاری دارد و MBC در رقت 10^{2} به میزان ۰/۱۳۵ در این باکتری اثر کشندگی دارد. همچنین بر روی *انتروباکتر فکالیس* در رقت 10^{1} به میزان ۰/۳۱۱ در غلظت ppm ۲۰۰۰ اثر مهاری و کشندگی را ایجاد می‌کند. جدول ۳ نتایج MIC و MBC اسانس زیره سبز را در غلظتppm ۲۰۰۰ نشان می‌دهد.

جدول ۳- نتایج MIC و MBC اسانس زیره سبز با غلظتppm ۲۰۰۰

باکتری	اسانس	رقت ۱	رقت ۲	رقت ۳	رقت ۴	رقت ۵	رقت ۶	رقت ۷	رقت ۸	رقت ۹	رقت ۱۰	شاهد
اسینتوباکتر بومانی	زیره	۰/۲۱۱	۰/۱۳۵	۰/۰۷۸	۰/۱۲۴	۰/۱۰۱	۰/۰۸۴	۰/۱۶۲	۰/۳۸۶	۰/۳۳۰	۰/۴۳۹	۰/۴۴۳
انتروکوکوس فکالیس	زیره	۰/۳۱۱	۰/۲۴۶	۰/۲۷۹	۰/۳۴۷	۰/۵۱۸	۰/۵۶۳	۰/۵۴۱	۰/۵۲۵	۰/۷۶۱	۰/۵۸۴	۰/۵۶۳



شکل ۲- MIC زیره سبز در *انتروباکتر فکالیس* و *اسینتوباکتر بومانی*

محاسبه درصد بازدارندگی از رشد اسانس زیره سبز: نتایج نشان داد که اسانس زیره سبز با غلظت ppm۲۰۰۰ و رقت ۰/۰۷۸ بیشترین اثر بازدارندگی (۵۳/۷۲ درصد) را بر *استیتوباکتر بومانی* و همچنین در رقت ۰/۳۱۱ کمترین اثر بازدارندگی(۱۷/۰۵ درصد) را بر *انتروباکتر فکالیس* داشت.

جدول ۴- درصد بازدارندگی از رشد اسانس زیره سبز

باکتری	اسانس	dt	dc	GI%
استیتوباکتر بومانی	زیره سبز	۰/۲۰۵	۰/۴۴۳	۵۳/۷۲
انتروکوکوس فکالیس	زیره سبز	۰/۴۶۷	۰/۵۶۳	۱۷/۰۵

GI %=(dc-dt)/dc*100

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه نتایج بازداری از رشد به روش دیسک انتشاری نشان داد که اسانس زیره سبز در *انتروباکتر فکالیس* و *استیتوباکتر بومانی* با قطر هاله عدم رشد ۱/۲ میلی‌متر مشاهده گردید. در اسانس رازیانه هاله عدم رشد مشاهده نشد.

دانشمند و همکاران در مطالعه خود، نتایج آزمون ضد میکروبی بر اساس تست انتشار دیسک را این‌گونه گزارش کردند که، اثر ضد میکروبی اسانس زیره سبز با ایجاد بزرگ‌ترین هاله عدم رشد به *باسیلوس سرئوس* با قطر ۴۴ میلی‌متر و بعد از آن به‌ترتیب به *باسیلوس سوبتلیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *شیگلا فلکسنری* و *اشریشیاکلی* مشاهده گردید. در مطالعه حاضر اثر اسانس زیره سبز در هر دو باکتری *انتروباکتر فکالیس* و *استیتوباکتر بومانی* به یک میزان قطر هاله عدم رشد مشاهده شد. نتایج هر دو مطالعه نشان داد که با توجه به نوع باکتری مقاوم در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها تضاد وجود دارد (۱۸).

در مطالعه جلالی و همکاران، نتایج انتشار دیسک در چند عصاره گیاهی از جمله آویشن، اکالیپتوس، بابونه، رزماری و مریم‌گلی نشان داد که فقط عصاره اکالیپتوس روی هر دو تیپ *لیستریا مونوسیتوژنز* 4a و 4b اثر گذاشته و هاله عدم رشد ایجاد شده ۱۱/۲۵ میلی‌متر می‌باشد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که از دو اسانس مورد استفاده فقط زیره سبز روی دو باکتری مورد مطالعه اثر گذاشته و هاله عدم رشد ۱/۲ میلی‌متری را ایجاد کرد. می‌توان گفت که نتایج هر دو مطالعه در یک راستا می‌باشد (۱۹).

نتایج انتشار دیسک در مطالعه عابدی و همکاران نشان داد که اسانس زیره سبز با ایجاد هاله عدم رشد به‌ترتیب بر روی *کاندیدا آلبیکنس* با ۳۳/۵۷ میلی‌متر، *ساکارومایسس سروزیه* با ۳۳/۵۱ میلی‌متر، *باسیلوس سرئوس* با ۲۰/۵ میلی‌متر و *استافیلوکوکوس اورئوس* با ۱۹/۱ میلی‌متر بیشترین و کمترین قطر هاله را ایجاد کردند. نتایج انتشار دیسک در مطالعه حاضر نشان داد که زیره سبز در دو باکتری مورد مطالعه *انتروباکتر فکالیس* و *استیتوباکتر بومانی* با هاله عدم رشد ۱/۲ میلی‌متر به‌طور یکسان ایجاد کرده است که با توجه به بیشترین مقدار هاله ایجاد شده در مطالعه عابدی و همکاران در هر دو مطالعه تضاد وجود دارد (۲۰).

تحقیقات دانشمندان اهمیت آنتی‌میکروبی گیاهان دارویی در سال‌های اخیر را بر همه آشکار و به خاطر عوارض جانبی آنتی‌بیوتیک‌ها بر بدن انسان توصیه به تولید و مصرف داروهای طبیعی کردند. تا به‌حال بیش از ۲۰۰۰ گونه از گیاهان دارویی با خاصیت ضد میکروبی شناسایی شده‌اند که در طی تحقیقات آزمایشگاهی از اسانس این گیاهان بیشترین کاربرد درمانی را گزارش کردند (۲۱). امروزه مسئله مقاومت آنتی‌بیوتیکی میکروارگانیسم‌ها به یک معضل جهانی تبدیل شده است. همان‌طور که در طی مطالعات انجام شده مشخص گردیده، میزان مقاومت در هر منطقه متفاوت می‌باشد که

بستگی به فرهنگ و آگاهی اجتماعی آن منطقه دارد. راه حل مناسب برای مبارزه با میکروب‌های مقاوم استفاده از ترکیبات بدون عارضه یا با کمترین عارضه برای انسان می‌باشد که اسانس‌های گیاهی دارای عملکردی مناسب بوده و چون دارای ترکیبات آلی طبیعی می‌باشند شانس بقاء برای درمان بلندمدت و حتی جایگزین برای آنتی‌بیوتیک‌ها را می‌توانند داشته باشند (۲۲).

نتایج آزمایش‌های MIC و MBC در مطالعه حاضر نشان داد که MIC اسانس زیره سبز بر روی *اسینتوباکتر بومانی* در رقت 10^{-3} به میزان ۰/۰۷۸ در غلظت ۲۰۰۰ ppm اثر مهاری دارد و MBC در رقت 10^{-2}به میزان ۰/۱۳۵ در این باکتری اثر کشندگی دارد. همچنین بر روی *انتروکوکوس فکالیس* در رقت 10^{-1} به میزان ۰/۳۱۱ در غلظت ۲۰۰۰ ppm اثر مهاری وکشندگی ایجاد می‌کند (۲۵).

علیزاده بهبهانی و همکاران با بررسی MIC و MBC اسانس رازیانه به این نتایج دست پیدا کردند که به‌ترتیب در حداقل غلظت مهارکنندگی برای *اشریشیاکلی* ۱۰۰ میلی‌گرم، *استافیلوکوکوس اورئوس* ۲۵ میلی‌گرم و *کاندیدا آلبیکنس* ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. همچنین میزان حداقل غلظت کشندگی برای *اشریشیاکلی* ۲۰۰ میلی‌گرم، *استافیلوکوکوس اورئوس* ۵۰ میلی‌گرم و *کاندیدا آلبیکنس* ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از خود نشان داد. در مطالعه حاضر اسانس رازیانه در هر دو باکتری مورد مطالعه *اسینتوباکتر بومانی* و *انتروباکتر فکالیس* مقاومت ۱۰۰ درصدی نشان داد و با مطالعه علیزاده بهبهانی تضاد نتایج ملاحضه گردید (۲۳).

در مطالعه شیری و همکاران بر روی اسانس زیره سبز و شوید با اثرات آنتی‌باکتریال بر روی *اشریشیاکلی* O157 و *استافیلوکوکوس اورئوس*، نتایج MIC و MBC نشان داد که اثرات مهاری روی دو باکتری مذکور به‌ترتیب ۱۰ و ۵ میلی‌لیتر بوده و اثرات کشندگی هر دو اسانس بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشتر از *اشریشیاکلی* O157 بود. در مطالعه حاضر اثرات آنتی‌باکتریال زیره سبز بر روی دو باکتری *اسینتوباکتر بومانی* و *انتروباکتر فکالیس* بیشتر بوده و در اسانس رازیانه مقاومت از خود نشان داد و می‌توان این‌طور نتیجه گرفت که به‌خاطر خواص قوی آنتی‌باکتریال اسانس زیره سبز هر دو مطالعه در یک راستا بودند (۲۴).

مطالعه مریم برراهی و همکاران در مراکش، با بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس رازیانه بر روی باکتری‌های *اشریشیاکلی*، *کلبسیلا پنومونیه*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *اسینتوباکتر بومانی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* انجام شد. نتایج MIC نشان داد که اثرات ضد میکروبی اسانس رازیانه در رقت‌های ۱/۱۰۰ تا ۱/۵۰۰۰ در *اشریشیاکلی* خاصیت بازدارندگی دارد اما در *اسینتوباکتر بومانی* در رقت‌های ۱/۳۰۰۰ و ۱/۵۰۰۰ خاصیت بازدارندگی مشاهده شد که نشان از توانایی ایجاد مقاومت حتی برای گیاه در این باکتری وجود دارد. در نتایج MBC خاصیت کشندگی در هر دو باکتری *اسینتوباکتر بومانی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در رقت‌های ۱/۵۰۰ تا ۱/۲۰۰۰ مشاهده گردید.

گیاهان دارویی به‌دلیل دارا بودن ترکیبات فیتوشیمیایی مختلف دارای خواص درمانی زیادی از جمله خواص ضد میکروبی هستند. علاوه بر گونه‌های گیاهی مختلف، یک گونه گیاهی خاص روئیده شده در مناطق جغرافیایی مختلف نیز، از نظر ترکیبات فیتوشیمیایی و در نتیجه اثرات ضد میکروبی متفاوت است. همچنین فرآوری‌های مختلفی که روی گیاهان صورت می‌گیرد بر روی توان ضد میکروبی آنها موثر می‌باشد. میکروارگانیسم‌های مختلف، مقاومت متفاوتی نسبت به اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی دارند کمااینکه باکتری‌های گرم مثبت معمولاً حساس‌تر از باکتری‌های گرم منفی هستند، اما از آنجا که روش یا روش‌های استاندارد برای ارزیابی فعالیت ضد میکروبی گیاه وجود ندارد، نتایج به‌دست آمده از مطالعات مختلف بسیار متفاوت می‌باشد.

سپاسگزاری

نتایج این مطالعه برگرفته از پایان نامه کارشناسی

ارشد متعلق به آقای یحیی مرادی به کد ۲۸۰۰۲۹۰۵۰۷۰۱۸۱۶۵۳۰۰۲۰۱۶۲۸۰۶۴۲۹ بوده که تمامی هزینه مطالعه حاضر به‌صورت شخصی و بدون حمایت انجام شده است. در پایان از زحمات آقای جاوید تقی‌نژاد تشکر می‌گردد.

References

1- Mishra A, Sharma AK, Kumar S, Saxena AK, Pandey AK. Bauhinia variegata leaf extracts exhibit considerable antibacterial, antioxidant, and anticancer activities. *Biomed Res Int.* 2013.

2- Chin YW, Balunas MJ, Chai HB, Kinghorn AD. Drug discovery from natural sources. *AAPS*. 2006; 8: E239-53.

3- Christenhusz MJ, Byng JW. The number of known plants species in the world and its annual increase. *Phytotaxa*. 2016; 261(3): 201-17.

4- MNPS Medicinal Plant Names Services (MNPS) [accessed on 14 August 2021]. Available online: https://www.kew.org/science/our-science/science-services/medicinal-plant-names-services.

5- Srinivasan D, Nathan S, Suresh T, Perumalsamy PL. Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. *J Ethnopharmacol.* 2001; 74(3): 217-20.

6- Yadav RN, Agarwala M. Phytochemical analysis of some medicinal plants. *J. Phytol*. 2011; 3(12).

7- Pandey AK, Kumar S. Perspective on plant products as antimicrobials agents: a review. *PHARMA*. 2013; 4(7): 469-80.

8- Baym M, Stone LK, Kishony R. Multidrug evolutionary strategies to reverse antibiotic resistance. *Science*. 2016; 351(6268):aad3292.

9- Khameneh B, Diab R, Ghazvini K, Bazzaz BS. Breakthroughs in bacterial resistance mechanisms and the potential ways to combat them. *Microb Pathog*. 2016; 95: 32-42.

10- Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2010; 74(3): 417-33.

11- Shankar SR, Rangarajan R, Sarada DV, Kumar CS. Evaluation of antibacterial activity and phytochemical screening of Wrightia tinctoria L. *Phcog J*. 2010; 2(14): 19-22.

12- Ody P. The complete medicinal herbal: a practical guide to the healing properties of herbs. Simon and Schuster. 2017.

13- Anton Y P, Harald S, David L P. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev*. 2008 Jul;21(3):538-82.

14- Saito HE, Harp JR, Fozo EM. Incorporation of exogenous fatty acids protects *Enterococcus faecalis* from membrane-damaging agents. *Appl. Environ. Microbiol*. 2014; 80(20): 6527-38.

15- Van Tyne D, Gilmore MS. Friend turned foe: evolution of *enterococcal* virulence and antibiotic resistance. *Annu. Rev. Microbiol.* 2014; 68: 337-56.

16- Barrahi M, Esmail A, Elhartiti H, Chahboun N, Benali A, Amiyare R, *et al.* Chemical composition and evaluation of antibacterial activity of fennel (Foeniculum vulgare Mill) seed essential oil against some pathogenic bacterial strains. *Casp. J. Environ. Sci*. 2020; 18(4): 295-307.

17- Akbarpour A, Rahimnejad Najarkalani M, Sadeghi agbash M, Feyzi F. Investigating the antibacterial properties of the extracts of the thirst-quenching plant and henna leaves against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteria.3 th International Conference on Researches in Nanotechnology& Nanoscience,Tehran-Iran. 2022; 1-12. [In Persian]

18- Daneshmandi S, Soleimani N, Sattari M, Pourfathollah A. Evaluation of the drug synergistic and antibacterial effects of cuminum cyminum essential oil. *AMUJ*. 2010; 13(2): 75-82. [In Persian]

19- Jalali M, Abedi D, Gasemi N, Chaharmahali A. Investigating the antimicrobial effects of hydroalcoholic extracts of a number of medicinal plants against Listeria monocytogenes bacteria. *JSKUMS*. 2006; 8(3): 25-33. [In Persian]

20- Abedi T, Asefi N, Hanifian S, Dehghan S. Inhibitory effect of Carum copticum, Rosa damascene mill, Anethum graveolens and Cuminum cyminum essential oils on some food-borne microbes. 2022; 11(44): 31-44. [In Persian]

21- Singh R, Shushni MA, Belkheir A. Antibacterial and antioxidant activities of Mentha piperita L. *Arab. J. Chem.* 2015; 8(3): 322-8.

22- Kalemba D, Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med.*

Chem. 2003; 10(10): 813-29.

23- Alizadeh behbahani B, Noshad M, Falah F. Investigation of antimicrobial activity of Fennel essential oil on some pathogenic microorganisms causing infection and food poisoning and its interaction with kanamycin antibiotic. *FSCT*. 2019; 16(91): 233-241. [In Persian]

24- Shiri Y, Neyriz NM. Co-effects of lactic acid and sodium chloride on the antibacterial activity of cumin and dill essential oils under laboratory conditions. 2022; 27(98): 1-13. [In Persian]

25- Barrahi M, Esmail A, Elhartiti H, Chahboun N, Benali A, Amiyare R, *et al*. Chemical composition and evaluation of antibacterial activity of fennel (Foeniculum vulgare Mill) seed essential oil against some pathogenic bacterial strains. *Casp. J. Environ. Sci*. 2020; 18: 295-307.

New Findings in Veterinary Medicine
Homepage: nfvm.uoz.ac.ir
Semiannual - Print ISSN: 2645-4491 Online ISSN: 2676-5004

Volume 7, Issue 2, Autumn & Winter 2024, pages: 93-103

Investigation of the antimicrobial properties of fennel and green cumin essential oils on strains of *Enterobacter faecalis* and *Acinetobacter baumannii* under laboratory conditions

Yahya Moradi[1], Mehdi Roshdi Maleki[2*]

1- Graduated student, Department of Microbology, Malekan Branch, Islamic Azad University, Malekan, Iran.
2- Assistant Professor, Department of Microbology, Malekan Branch, Islamic Azad University, Malekan, Iran.

Receive: May 4, 2024; Revise: June 13, 2024; Accept: June 16, 2024

10.22034/nfvm.2024.455730.1236

Summary

To combat the shortage of new antimicrobial compounds and the increase in antibiotic resistance, plants could be a potential solution. The aim of the present study is to investigate the antimicrobial properties of fennel and green cumin essential oils against strains of *Enterococcus faecalis* and *Acinetobacter baumannii* under laboratory conditions. In this method, the essential oil solution was added at a specific concentration to sterile discs and transferred to a microbial culture medium. To examine growth inhibition, the disc diffusion method was used with a bacterial suspension on a plate containing Mueller-Hinton agar, and the MIC and MBC of the essential oil were also examined at dilutions of 10^1 and 10^{10}, and finally, the optical density was measured at a wavelength of 540 nm. The results of the growth inhibition by the disc diffusion method showed that both bacteria, *Acinetobacter baumannii* and *Enterococcus faecalis*, created a 1.2 mm diameter. The results of MIC and MBC of green cumin essential oil on *Acinetobacter baumannii* at a dilution of 10^3 (MIC) showed an inhibitory effect at 0.078 in a concentration of 2000 ppm, and at MBC in a dilution of 10^2, it had a lethal effect at 0.135 in this bacterium. In *Enterococcus faecalis*, at a dilution of 10^1, both MIC and MBC had an inhibitory and lethal effect at 0.311 in a concentration of 2000 ppm. Given the spread of drug resistance in pathogenic strains, medicinal plants with antimicrobial effects are a suitable option with fewer side effects.

Keywords: *Acinetobacter baumannii, Enterococcus faecalis, green cumin essential oil, fennel essential oil, drug resistance*