**مقاله تحقیقی**

# بررسی اثر ضد میکروبی اسانس گیاه نعناع فلفلی علیه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین

**محبوبه جعفری[1]، معصومه مهدوی اورتاکند[2,*]، سحر هنرمند جهرمی[1]**

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین-پیشوا، ایران
۲. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین-پیشوا، ایران

***مسئول مکاتبات:** آدرس الکترونیکی: masumehmahdavi@gmail.com

**محل انجام تحقیق:** گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین-پیشوا، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۵/۱۱ تاریخ پذیرش: ۹۶/۹/۱۸

فصلنامه علمی پژوهشی دانش زیستی ایران
جلد ۱۲- شماره ۳- پاییز ۱۳۹۶

## چکیده

شیوع روزافزون سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA) به همراه توانایی این باکتری در ایجاد مقاومت چند دارویی، درمان عفونت های ناشی از این باکتری را با مشکل همراه ساخته است. با توجه به تاثیرات ضدمیکروبی اسانس‌ها، در تحقیق حاضر سعی بر پیدایش راهی مناسب برای غلبه بر مشکل مقاومت آنتی بیوتیک با استفاده از اسانس ها شده است. این تحقیق با هدف بررسی اثر ضد میکروبی اسانس گیاه نعناع فلفلی بر علیه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین انجام گرفت. در این مطالعه تعداد ۵۰ سویه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس از نمونه های عفونی جمع آوری شد. نمونه های مقاوم به متی سیلین با استفاده از دیسک آنتی بیوتیک سفوکسیتین شناسایی شدند. فعالیت ضدمیکروبی اسانس نعناع فلفلی به روش میکرودایلوشن براث روی ۲۰ سویه MRSA بررسی شد و حداقل غلظت بازدارنده از رشد (MIC) آن به دست آمد. بر اساس نتایج به دست آمده، کاربرد اسانس نعناع فلفلی، با دارا بودن اثرضدمیکروبی روی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین، می‌تواند جایگزین مناسبی آنتی بیوتیک ها، در درمان عفونت های ناشی از این باکتری‌ها باشد.

**واژه های کلیدی:** استافیلوکوکوس اورئوس، MRSA، اسانس نعناع فلفلی، اثر ضدمیکروبی.

## مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس بیماریزاترین گونه استافیلوکوک است که به واسطه تولید آنزیم کواگولاز شناسایی شده و با توجه به توکسین ها و فاکتورهای خارج سلولی متعددی که دارد به شدت پاتوژن است (۶). این باکتری قادر به ایجاد اشکال مختلفی از بیماری ها از قبیل مسمومیت غذایی و باکتریمی های خطرناک منجر شونده به عفونت های موضعی از قبیل اندوکاردیت، مننژیت، استئومیلیت حاد و آبسه های منتشر در تمام اعضا می‌باشد (۷). این باکتری تنوع ژنتیکی قابل توجهی برای مقاومت نسبت به بسیاری از آنتی بیوتیک ها را داشته و بسیاری از جدایه های این باکتری به دلیل مقاومت نسبت به انواع مختلف آنتی بیوتیک ها باعث ایجاد عفونت های وخیم بیمارستانی می شوند. باکتری استافیلوکوکوس اورئوس

مقاوم به متی سیلین (MRSA[1]) به دلیل مقاومت به عوامل و داروهای ضد میکروبی به یکی از نگرانی های عمده سلامت عمومی تبدیل شده است. فراوانی MRSA در سالهای اخیر افزایش قابل توجهی را نشان داده است (۸). استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین یکی ازعوامل اصلی عفونت های بیمارستانی و اکتسابی از جامعه است که امروزه مقاومت چندگانه‌ای را نسبت به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک ها از جمله بتالاکتام ها، آمینوگلیکوزید ها، تتراسایکلین ها، فلوروکینولون ها و ماکرولید ها کسب کرده است. آنتی بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی مانند جنتامیسین و استرپتومایسین زمانی به خوبی مانع رشد استافیلوکوک‌ها می‌شدند، اما استافیلوکوکوس به مرور زمان به این آنتی بیوتیک‌ها نیز مقاوم شد (۹).

در دو دهه اخیر برای افزایش طیف اثر ضد میکروبی آنتی بیوتیک ها از ترکیب های مختلف از جمله ترکیبات موثره گیاهان استفاده شده است. همچنین عوارض جانبی داروهای شیمیایی و الزامات زیست محیطی سبب گرایش تدریجی به سمت گیاه درمانی شده است. گیاه نعناع فلفلی با نام علمی *Mentha piperita* یکی از گیاهان دارویی پر مصرف است که علاوه بر آثار درمانی به عنوان طعم دهنده در تولید محصولات غذایی مختلف بکار می رود (۱۰). خواص ضد میکروبی اسانس این گیاه بر روی تعداد زیادی از میکروارگانیسم پاتوژن انجام شده است بر طبق نتایج به دست آمده از مطالعاتی که روی اسانس نعناع فلفلی انجام شده است، خاصیت ضد میکروبی قوی این گیاه علیه استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی نشان داده شده است. ترکیبات اصلی اسانس این گیاه شامل منتول و منتون می باشد و دارای خاصیت آنتی اکسیدانی بوده و قادر به دام انداختن رادیکال های آزاد می باشد (۱). از این رو در این پژوهش به بررسی روش های مختلف استفاده از گیاه دارویی نعناع فلفلی با خواص ضد میکروبی بر علیه سویه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین پرداخته شد.

[1] Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*

## مواد و روش‌ها

### جمع‌آوری نمونه‌های بالینی و تهیه نمونه استاندارد

در این مطالعه تعداد ۵۰ سویه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس از نمونه های عفونی مختلف افراد مراجعه کننده به بیمارستان پیامبر اکرم (ص) در بهار ۱۳۹۵، جمع‌آوری شد و نمونه ها توسط تست های بیوشیمیایی افتراقی شامل کاتالاز، کواگولاز، تخمیر قند مانیتول و DNase مورد بررسی قرار گرفت. نمونه استاندارد باکتریایی مورد مطالعه در این تحقیق (ATCC 25923) *Staphylococcus aureus* بود که به صورت لیوفیلیزه از کلکسیون میکروبی ایران در انستیتیو پاستور خریداری شد.

### سنجش فنوتیپی حساسیت آنتی بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن

تعیین حساسیت جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به آنتی بیوتیک ها با استفاده از روش انتشار دیسک (Kirby- Bauer)مطابق با دستورالعمل CLSI, 2016 انجام شد (۱۱). تمامی محیط های کشت استفاده شده از شرکت Merckآلمان تهیه شد. دیسک های مورد استفاده در این مطالعه شامل آنتی بیوتیک های پنی سیلین (10 units)، سفوکسیتین (30 µg)، جنتامایسین (10 µg)، اریترومایسین (15 µg)، تتراسایکلین (30 µg) سیپروفلوکسازین (5 µg)، تری متوپریم-سولفامتوکسازول (1.25/23.75 µg)، ریفامپین(15 µg) (پادتن طب، ایران) بودند. برای انجام آنتی بیوگرام سوسپانسیون باکتری با غلظت ۰/۵ مک فارلند تهیه و بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد و دیسک های آنتی بیوتیک با فاصله منظم، روی آنها قرار گرفت. همچنین از سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 25923 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. پلیت ها به مدت ۱۶-۲۰ ساعت در دمای ۲±۳۵ درجه سانتی گراد نگه داری می شوند در هر نمونه باکتری این آزمایش سه بار تکرار شد. بعد از ۲۴

ساعت انکوباسیون، قطر هاله های عدم رشد باکتری به وسیله خط کش میلی متری، به طور دقیق و در زیر نور اندازه گرفته می شود و عدد میانگین هر سه پلیت (بر حسب میلی متر) محاسبه گردید. نتایج حاصل از آنالیز داده های به دست آمده هر سویه باکتری به صورت مقاوم، حساس و نیمه حساس با جدول CLSI, 2016 گزارش شد. جهت شناسایی فنوتیپی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین، مطابق پروتکلCLSI, 2016 حساسیت نمونه باکتری مورد نظر را نسبت به آنتی بیوتیک سفوکسیتین (30 µg) و بر اساس قطر هاله ایجاد شده در اطراف دیسک در محیط مولر هینتون مورد بررسی قرار گرفت. در صورتی که قطر هاله ایجاد شده ۲۲ ≤ باشد نمونه را حساس و در صورتی که قطر هاله ۲۱ ≥ باشد نمونه مقاوم در نظر گرفته می شود.

## استخراج اسانس نعناع فلفلی و آنالیز ترکیبات تشکیل دهنده آن

به منظور تهیه اسانس اندام های هوایی، گیاه نعناع فلفلی *Mentha piperita*جمع آوری شده از مزارع تحقیقاتی، به وسیله آسیاب برقی خرد شده و سپس ۲۰۰ گرم از پودر گیاه خشک پس از توزین با دستگاه کلونجر به مدت۳ ساعت اسانس گیری شد .در ادامه، اسانس با سولفات سدیم بدون آب، آبگیری و در ظرف دربسته تیره رنگ، دور از نور و در یخچال نگهداری شد. نمونه آماده شده توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی توام با طیف سنجی جرمی ( GC-MS) تزریق گردید از آنجایی که ترکیبات موجود در اسانس ها به لحاظ وزن مولکولی و قطبیت بعنوان مواد فرار شناخته می شوند از این رو عمل جداسازی و شناسایی ترکیبات متشکله اسانس بدست آمده توسط روش کروماتوگرافی گازی توام با طیف سنجی جرمی انجام گردید. مشخصات و شرایط دستگاه GC: 7890A شرکت Agilent Technologies، نوع ستون HP-5MS بـا قطر داخلی ستون ۰/۲۵ میلی متر، ضخامت فیلم ۰/۳۲ میکرومتر و طول ستون ۳۰ متر، گاز حامل هلیوم با سرعت ۱ میلی متر در دقیقه بود. مشخصات و شرایط دستگاه MS: مدل 5975C شرکت Agilent Technologies ، انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت و دمای یونیزاسیون ۲۴۰ درجه سانتی گراد بود. طیف های جرمی بدست آمده از دستگاه GC-MS با طیف های جرمی استاندارد موجود در منابع مقایسه گردید (۱۲). برای تایید شناسایی های انجام شده توسط طیف های جرمی، از شاخص بازداری کواتس مطابق GC-MS استفاده شد. برای تهیه استوک ذخیره اسانس از محلول ۵ درصد DMSO استفاده شد. جهت استریل کردن، محلول ذخیره از فیلترهای میکروبی سر سرنگی ۰/۲ میکرون عبور داده شد.

## تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC[2]) اسانس نعناع فلفلی در سویه‌های MRSA

این بررسی به روش میکرودایلوشن براث انجام شد. در این روش از میکروپلیت ۹۶ خانه ای استفاده گردید. ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت های ۱۲۸، ۶۴، ۳۲، ۱۶، ۸، ۴، ۲، ۱، ۰/۵، ۰/۱۲و ۰/۰۶ میکرولیتر بر میلی لیتر از اسانس گیاه نعناع فلفلی بر اساس روش سریال دایلوشن به یک ردیف از چاهک های میکروپلیت ۹۶ تایی افزوده شد. سوسپانسیون میکروبی که با نیم مک فارلند برابر شده بود به وسیله محیط کشت مولر هینتون براث به میزان ۱/۱۰۰، جهت به دست آوردن تعداد CFU/ml ۱۰^۶ × ۱ رقیق شد و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از آن به هر چاهک افزوده شد، در این آزمون به منظور کنترل محیط کشت، از محیط کشت خالی( بدون اسانس گیاه نعناع فلفلی و سوسپانسیون میکروبی) استفاده گردید. به منظور کنترل زمینه از اسانس گیاه نعناع فلفلی و محیط کشت (بدون سوسپانسیون میکروبی) استفاده شد. یک چاهک هم به منزله کنترل DMSO (محیط کشت و سوسپانسیون میکروبی به همراه DMSO ۵ درصد) در نظر گرفت شد. همچنین سوسپانسیون میکروبی و محیط کشت بدون اسانس نعناع

[2] Minimum Inhibitory Concentration

فلفلی به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. حجم نهایی تمام چاهک ها ۲۰۰ میکرولیتر بود. در نهایت میکروپلیت ها بر روی شیکر (۲۵۰ rpm) به مدت ۱ دقیقه قرار داده شد تا مخلوط کاملا یکنواخت گردد. سپس میکروپلیت ها در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد به مدت۲۰-۲۴ ساعت، انکوبه شد. بعد از ۲۴ ساعت وجود کدورت (در مقایسه با ردیف کنترل) حاکی از رشد باکتری و شفافیت نشان دهنده عدم رشد باکتری می باشد. پایین ترین غلظتی که در آن هیچ گونه رشد باکتری مشاهده نشد و فاقد کدورت ناشی از رشد باکتری بود به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) تعیین شد. تمام مراحل برای ۲۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین با ۳ بار تکرار انجام شد. حداقل غلظت بازدارندگی آنتی بیوتیک ونکومایسین نیز به همین روش تعیین شد

## نتایج

### نتایج آنالیز ترکیبات تشکیل دهنده اسانس نعناع فلفلی

آنالیز ترکیبات موجود در اسانس نعناع فلفلی توسط دستگاه GC-MS انجام شد. طیف های مربوط به هر ترکیب تفسیر و ترکیبات عمده تشکیل دهنده اسانس شناسایی شدند. ترکیب ال- منتول با ۲۳/۸۵ درصد، منتول با ۲۱/۸۲ و منتافوران با ۹/۶ درصد بیشترین مقدار را دارا بود. آنالیز ترکیبات اسانس نعناع فلفلی ترکیبات موجود و درصد آن در جدول ۱ نشان داده شده است.

### نتایج تعیین حساسیت جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس

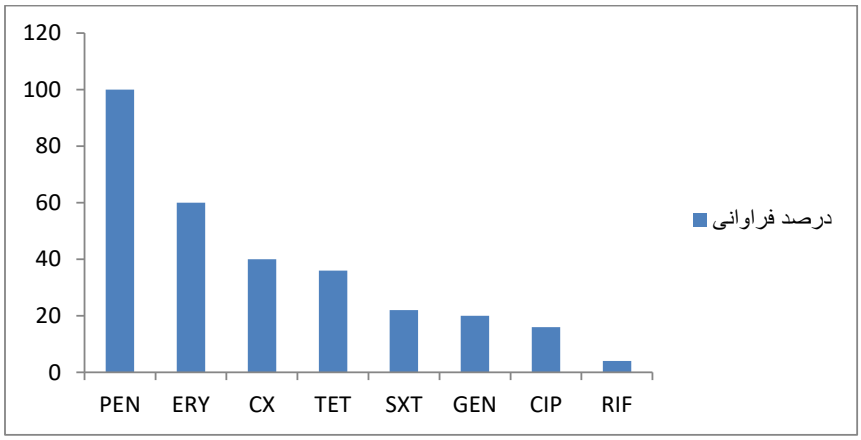
پس از دیسک گذاری و بررسی قطر هاله عدم رشد و تطبیق دادن با جدول CLSI, 2016 باکتری های حساس و مقاوم به آنتی بیوتیک های مورد شناسایی شد. قطر هاله ایجاد شده در اطراف دیسک آنتی بیوتیک سفوکسیتین (30 µg) جهت شناسایی فنوتیپی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین در شکل ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱- ترکیبات و درصد موجود در اسانس نعناع فلفلی.

| No | Ret Time | Compound | CAS Number | % |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 1.794 | Hexane | 000110-54-3 | 0.973591 |
| 2 | 7.457 | 1S-.alpha.-Pinene | 007785-26-4 | 1.286096 |
| 3 | 8.894 | Sabinene | 003387-41-5 | 0.841934 |
| 4 | 9.015 | 2-.Beta.-Pinene | 000127-91-3 | 1.633306 |
| 5 | 11.153 | Dl-Limonene | 000138-86-3 | 5.155022 |
| 6 | 11.329 | 1,8-Cineole | 000470-82-6 | 5.91622 |
| 7 | 17.005 | L-Menthol one | 014073-97-3 | 23.85068 |
| 8 | 17.257 | Menthofuran | 000494-90-6 | 9.606207 |
| 9 | 17.399 | Neoisomenthol | 000000-00-0 | 7.746569 |
| 10 | 18.012 | Menthol, | 015356-70-4 | 21.82066 |
| 11 | 18.5 | .alpha.-Terpineol | 000098-55-5 | 0.712291 |
| 12 | 20.64 | Pulegone | 000089-82-7 | 4.218176 |
| 13 | 20.857 | Carvol | 000099-49-0 | 2.928555 |
| 14 | 21.243 | Piperitone | 000089-81-6 | 0.549897 |
| 15 | 23.024 | Carane | 000554-59-6 | 8.48243 |
| 16 | 28.157 | trans-Caryophyllene | 000087-44-5 | 2.701452 |

شکل ۱ - تصویر دیسک آنتی بیوتیک سفوکسیتین جهت تعیین سویه های MRSA.

الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی ۵۰ سویه های استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به آنتی بیوتیک های رایج بررسی شد و نتایج به صورت نمودار در شکل ۲ نشان داده شده است. مقاومت ۱۰۰ درصد نسبت به پنی‌سیلین در همه استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی مشاهده شد. سپس به ترتیب، مقاومت به اریترومایسین ۶۰٪ (۳۰ سویه)، سفوکسیتین ۴۰٪ (۲۰ سویه)، تتراسایکلین ۳۶٪ (۱۸ سویه)، تری متوپریم-سولفامتوکسازول ۲۲٪ (۱۱ سویه)، جنتامایسین ۲۰٪ (۱۰ سویه)، سیپروفلوکساسین ۱۶٪ (۸ سویه) و ریفامپین ۴٪ (۲ سویه) دیده شد. بر اساس نتایج از ۵۰ سویه مورد مطالعه، ۲۰ سویه (۴۰٪) مقاوم به متی-سیلین تشخیص داده شد. این سویه ها شماره ۳-۷-۱۱-۱۳-۱۴-۲۵-۲۰-۲۳-۲۶-۲۹-۳۰-۳۲-۳۶-۳۷-۳۹-۴۱-۴۳—۴۶-۴۹-۵۰ می باشند. بنابراین برای ادامه کار، این سویه از بین ۵۰ باکتری جدا شد و بقیه مراحل بر روی این ۲۰ سویه انجام شد.




شکل ۲ – نمودار مقایسه توزیع فراوانی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس. پنی‌سیلین (PEN)، اریترومایسین (ERY)، سفوکسیتین (CX)، تتراسایکلین(TET)، تری متوپریم-سولفامتوکسازول (SXT)، جنتامایسین (GEN)، سیپروفلوکسازین (CIP) و ریفامپین (RIF).

**نتایج بررسی حداقل غلظت بازدارندگی(MIC) اسانس نعناع فلفلی**

پس از شناسایی ۲۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین، این سویه ها از نظر تاثیر اسانس نعناع فلفلی مورد بررسی قرار گرفتند. MIC نعناع فلفلی به‌طور جداگانه در ۲۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین به روش میکرودایلوشن براث تعیین شد همچنین MIC آنتی بیوتیک ونکومایسین هم برای این سویه ها بررسی شد (جدول ۲). بر اساس استاندارد CLSI, 2016 تمام سویه های MRSA مورد بررسی در این آزمایش، حساس به آنتی بیوتیک ونکومایسین بودند و MIC آنها کمتر از ۲ میکروگرم بر میلی لیتر بود. MIC نعناع فلفلی بین µl/ml ۳۲- ۰/۲۵ حاصل شد. نتایج به دست آمده از MIC ونکومایسین و اسانس نعناع فلفلی، به روش آنالیز واریانس با اندازه های تکراری توسط نرم افزار SPSS, 19 انجام شد. آزمون یکنواختی واریانس- کواریانس (Mauchly Sphericity Test) انجام گرفت و سطح معنی داری ۰/۰۳۴ نشانه عدم وجود خطای واریانس است. در ادامه مقدار F با فرض کرویت واریانس ها برابر با ۲/۰۶۹ و معناداری ۰/۱۴۰ محاسبه شد که نشان می دهد بین MIC ونکومایسین و اسانس نعناع فلفلی اختلاف معنی دار وجود ندارد.

جدول ۲ - نتایج MIC اسانس نعناع فلفلی و آنتی بیوتیک ونکومایسین بر علیه ۲۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA).

| MRSA | MIC نعناع فلفلی (µl/ml) | MIC ونکومایسین (µg/mL) |
|---|---|---|
| سویه ۳ | ۱ | ۰/۲۵ |
| سویه ۷ | ۰/۲۵ | ۰/۱۲ |
| سویه۱۱ | ۳۲ | ۰/۱۲ |
| سویه۱۳ | ۱۶ | ۰/۵ |
| سویه۱۴ | ۴ | ۱ |
| سویه۱۵ | ۳۲ | ۰/۲۵ |
| سویه ۲۰ | ۳۲ | ۰/۲۵ |
| سویه ۲۳ | ۸ | ۰/۵ |
| سویه ۲۶ | ۳۲ | ۰/۵ |
| سویه ۲۹ | ۱ | ۰/۵ |
| سویه ۳۰ | ۴ | ۰/۵ |
| سویه ۳۲ | ۱۶ | ۰/۲۵ |
| سویه۳۶ | ۲ | ۰/۲۵ |
| سویه ۳۷ | ۱ | ۰/۲۵ |
| سویه ۳۹ | ۱ | ۰/۱۲۵ |
| سویه ۴۱ | ۳۲ | ۰/۲۵ |
| سویه ۴۳ | ۱ | ۰/۲۵ |
| سویه ۴۶ | ۱ | ۰/۵ |
| سویه ۴۹ | ۴ | ۰/۵ |
| سویه ۵۰ | ۸ | ۰/۲۵ |

## بحث و نتیجه گیری

استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین یکی از عوامل اصلی عفونت های بیمارستانی و اکتسابی از جامعه است که امروزه مقاومت چندگانه ای را نسبت به طیف وسیعی از آنتی بیوتیک‌ها از جمله بتالاکتام‌ها، آمینوگلیکوزیدها، تتراسایکلین‌ها، فلوروکینولون‌ها و ماکرولیدها کسب کرده است. آنتی بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی مانند جنتامیسین و استرپتومایسین زمانی مانع از رشد استافیلوکوک‌ها می‌شدند، اما شیوع عفونت های استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین روز به روز در حال افزایش است (۲، ۱۳ و ۱۴).

افزایش استفاده از آنتی بیوتیک ها و استفاده نابجا و نامناسب مانند مصرف بیش از حد نیاز و یا عدم رعایت دوز توصیه شده توسط بیماران منجر به گسترش مقاومت باکتریایی به آنتی بیوتیک ها شده است, این امر منجر به افزایش تمایل به توسعه ترکیب های جدید ضد میکروبی موثرتر و بدون سمیت شده است (۱۵). درمان عوامل عفونی مقاوم به آنتی بیوتیک نیازمند مواد ضد میکروبی جدید از منابع خاص می‌باشد تا بتوان به وسیله راهکارهایی قدرت و طیف اثر ضد میکروبی را افزایش داد. در دو دهه اخیر برای کاهش مقاومت ناشی از آنتی بیوتیک ها از ترکیب های مختلف از جمله ترکیبات موثره گیاهان استفاده شده است (۱۶). خواص ضدمیکروبی اسانس های گیاهی شناخته شده است. از ویژگی های مهم اسانس‌ها و اجزاء تشکیل دهنده آنها خاصیت آبگریزی آنها می‌باشد که موجب نفوذ این مواد به لیپیدهای غشاء سلول باکتری و میتوکندری‌ها می‌شود و سبب اختلال در ساختمان های آنها و ایجاد نفوذپذیری بیشتر می‌گردد. این مسئله موجب خروج و نشت یون‌ها و دیگر محتویات سلولی 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 ملکول های حیاتی موجب مرگ سلول خواهد شد. ساختار شیمیایی یک اسانس هم بر مکانیسم آن اثر میگذارد و اهمیت حضور گروه هیدروکسیل تأیید شده است. با توجه به این تاثیرات بیولوژیک، اسانس‌ها به عنوان جایگزین مناسب برای آنتی بیوتیک ها با اهداف درمانی مورد توجه هستند (۳).

در این مطالعه تعداد ۵۰ سویه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس از نمونه های عفونی مختلف افراد مراجعه کننده به بیمارستان پیامبر اکرم (ص) در بهار ۱۳۹۵، جمع‌آوری شد و نمونه ها توسط تست های بیوشیمیایی افتراقی مورد بررسی و تائید قرار گرفت. مقاومت ۱۰۰ درصد نسبت به پنی‌سیلین در همه استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی مشاهده شد. سپس به ترتیب، مقاومت به اریترومایسین ۶۰٪ (۳۰ سویه)، سفوکسیتین ۴۰٪ (۲۰ سویه)، تتراسایکلین ۳۶٪ (۱۸ سویه)، تری متوپریم-سولفامتوکسازول ۲۲٪ (۱۱ سویه)، جنتامایسین ۲۰٪ (۱۰ سویه)، سیپروفلوکساسین ۱۶٪ (۸ سویه) و ریفامپین ۴٪ (۲ سویه) دیده شد. ترکیبات اسانس های مورد مطالعه با استفاده از روش GC- MS آنالیز شد و ترکیب ال- منتول با ۲۳/۸۵ درصد، منتول با ۲۱/۸۲ و منتافوران با ۹/۶ درصد بیشترین مقدار را دارا بود. در بررسی‌های مختلف مهمترین ترکیب های شیمیایی اسانس برگهای نعناع فلفلی را به حضور منتول (۲۱ -۵۷٪)، منتون (۲۴٪-۶)، منتوفوران (۸٪-۱) گزارش شده است (۴). منتول مهمترین ترکیب نعناع فلفلی و جز ترپن ها است و در ساختار خود دارای یک گروه هیدروکسیلی می باشد. ترپن ها قادر هستند که به غشای سلولی صدمه بزنند و در ساختار لیپید دیواره سلولی باکتری‌ها نفوذ کنند که این امر منجر به دناتوراسیون پروتئینها و از هم پاشیدن ساختار سلولی و تراوش سیتوپلاسم و در نهایت مرگ سلول می شود (۳ و ۱۷). در مطالعه حاضر پس از شناسایی ۲۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین از طریق دیسک سفوکسیتین، این سویه ها از نظر تاثیر اسانس نعناع فلفلی مورد بررسی قرار گرفتند و MIC نعناع فلفلی برای سویه های مقاوم به متی سیلین بین µl/ml ۳۲- ۰/۲۵ حاصل شد. Shalayel و همکارانش در سال ۲۰۱۷ اثر ضدباکتریایی عصاره الکلی *Mentha piperita* را برعلیه چند

سویه باکتری های پاتوژن انسانی با مقاومت چندگانه دارویی شامل *Streptococcus pyogenes*، *Enterococcus faecalis*، *Escherichia coli* ، *Klebsiella pneumoniae*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Acinetobacter baumannii* و *Stenotrophomonas maltophilia* مطالعه نمودند. نتایج آنها نشان داد که این عصاره در غلظت بین ۱/۲۵-۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر روی باکتری های مورد نظر موثر است (۱۸). Singh و همکارانش در سال ۲۰۱۵ اثر ضدمیکروبی و آنتی اکسیدانی اسانس نعناع فلفلی را بر علیه باکتری‌های *Staphylococcus aureus*، *Escherchia coli*، *Klebsiella pneumonia* و *Streptococcus pyogenes* بررسی نمودند و MIC آن را ۰/۴- ۰/۷ میکرولیتر بر میلی لیتر به دست آوردند (۱۹). در مطالعه ای که Mahbuobi و همکارانش در سال ۲۰۱۴ انجام دادند، ضمن بررسی ترکیبات اسانس نعناع فلفلی، و اثر ضد میکروبی آن را بر علیه باکتری‌های طیف وسیعی از یاکتری ها بررسی نمودند و MIC این اسانس را بین ۰/۱۲۵ تا بیش از ۶۴ میکرولیتر بر میلی‌لیتر گزارش نمودند (۲۰). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۳ انجام شد متوسل و همکارانشان به بررسی اثرات ضد باکتریال عصاره آویشن شیرازی بر استافیلوکوک های مقاوم به متی سیلین پرداختند. نتایج این مطالعه نشان داد که حداقل غلظت مهار کننده این عصاره از ۲ تا ۱۶ میکروگرم در میلی لیتر موثر بود (۵). کاظم‌الوندی و همکاران، (۱۳۸۹) به بررسی ترکیب شیمیایی و اثر ضد میکروبی اسانس گیاه نعناع فلفلی پرداختند. میزان حداقل غلظت بازدارندگی اسانس بر روی باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیا کلی و سالمونلا تیفی به ترتیب ۱۵۰، ۳۰۰ و ۲۵۰ میکرولیتر بر میلی لیتر بدست آمد (۱).

در تحقیق حاضر اثر ضدمیکروبی اسانس نعناع فلفلی با آنتی بیوتیک ونکومایسین مقایسه شد. در حال حاضر ونکومایسین تنها داروی درمان در MRSA است و در مطالعه حاضر نیز سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین در برابر آنتی بیوتیک ونکوماسین حساسیت نشان دادند، ولی استفاده نامناسب و بی رویه از این آنتی بیوتیک در سالهای آینده سبب افزایش مقاومت میکروبی نسبت به آن شود و مطالعات وجود سویه‌های مقاوم (VRSA[3]) یا حدواسط (VISA[4]) در برابر ونکومایسین را با نشان می دهد که هشداری برای جامعه پزشکی است (۲۱ و ۲۲). از این رو در تحقیق حاضر سعی بر پیدایش راهی مناسب برای غلبه بر بروز احتمالی این مشکل شده است. یافته‌های این پژوهش، خاصیت ضد باکتریایی نعناع فلفلی روی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین را آشکار ساخت و نشان داد که استفاده از این اسانس می تواند منجر به بازدارندگی و مهار رشد این باکتری ها شود. با توجه به اثرات ترکیبات گیاهی، به نظر میرسد کاربرد این ترکیبات می‌تواند راهکاری مناسب جهت چیره شدن بر مشکل مقاومت میکروبی باشد. حل این معضل بزرگ بهداشت جهانی با انجام پژوهش‌های بیشتر و کامل‌تر امکان پذیر است.

## تقدیر و تشکر

مطالعه حاضر مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد رشته میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین-پیشوا می باشد.

## منابع مورد استفاده

۱. کاظم الوندی ر.، شریفان ا.، آقازاده مشگی م.، ۱۳۸۹. بررسی ترکیب شیمیایی و اثر ضد میکروبی اسانس گیاه نعناع فلفلی. پاتوبیولوژی مقایسه ای ایران، ۷(۴): ۳۶۴-۳۵۵.

[3] Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus

[4] Vancomycin intermediate Staphylococcus aureus

۲. سبحانی پور، م. ح.، منصوری، ش.، سعیدعادلی، ن.، ۱۳۹۳. بررسی شیوع استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA) و تعیین الگوی مقاومت پادزیستی باکتری های جدا شده از بینی سربازان آموزشی در شهر کرمان در سال ۱۳۹۰. مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران، ۸(۳): ۱۵-۲۱.

۳. شهینا، م. خاکسار، ر. ۱۳۹۱. بررسی اثرات ضد میکروبی و روش های تعیین حداقل غلظت بازدارندگی اسانس های گیاهی بر باکتری های پاتوژن. مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران، ۵(۷): ۹۵۵-۹۴۹.

۴. عباس عظیمی ر.، رضایی م.، و جایمند ک.، ۱۳۹۴. مقایسه ترکیب های شیمیایی اسانس و آناتومی برگ گونه *Mentha piperita* در دو مرحله رویشی و گلدهی. فصلنامه اکوفیتوشیمی گیاهان دارویی، ۱۲(۳): ۱۵-۲۷.

۵. متوسل، م.، اخوت، م.، زمردیان، ک.، فرشاد، ش.، ۱۳۹۳. اثر ضد میکروبی عصاره آویشن شیرازی بر استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین، نشریه طب جنوب، ۱۷(۵): ۹۰۰-۹۰۶.

6. Zamani A., Sadeghian S., Ghaderkhani J., Alikhani M. Y., Najafimosleh M., Taghi Goodarzi M., 2007. Detection of methicillin-resistance (*mec-A*) gene in *Staphylococcus aureus* strains by PCR and determination of antibiotic susceptibility. Ann Microbiol 57(2): 273-276.
7. Rahimi F., Bouzari M., Vandyousefi J., Maleki Z., Saberi Kashani S., Davoudi S., 2008. Analysis of antibiotic resistance and detection of *mecA* gene in *Staphylococcus aureus* isolated from hospitals and medical laboratories in Tehran. Iran Biological J 21: 64-74.
8. Alan, I., Hartstein, M. D., Thomas, T., Ward, M. D., 2016. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, Infection Control and Hospital. Epidemiologhy 12(1): 9-10.
9. Raygada J. L. and Levine D. P., 2009. Managing CA-MRSA Infections: Current and Emerging Options. Infections in Medicine 26(2): 49-58
10. Rita, P. and Animesh, D. K., 2011. An updated overview on peppermint (*Mentha piperita* L.). International Research Journal of Pharmacy 2(8): 1-10.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2016. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 26th ed. CLSI supplement M100S. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
12. Adams R. P., 2001. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadropole mass spectroscopy carol stream IL: Allured Publishing Crop, p. 465.
13. Chambers, H. F., DeLeo, F. R., 2009. Waves of resistance: Staphylococcus aureus in the antibiotic era. Nature Reviews Microbiology 7(9): 629.
14. Fuda, C., Suvorov, M., Vakulenko, S., B., Mobashery, S., 2004. The basis for resistance to β-lactam antibiotics by penicillin-binding protein 2a of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Journal of Biological Chemistry 279(39): 40802-40806.
15. Alvarez-Uria G., Reddy R., 2012. Prevalence and antibiotic susceptibility of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus in a rural area of India: is MRSA replacing methicillin-susceptible Staphylococcus aureus in the community. ISRN Dermatology 2012: 1-5.
16. Zouhir, A., Taieb, M., Lamine, M.A., Cherif, A., Jridi, T., Mahjoubi, B., Mbarek, S., Fliss, I., Nefzi, A., Sebei, K. and Hamida, J.B., 2017. ANTISTAPHYBASE: database of antimicrobial peptides (AMPs) and essential oils (EOs) against methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) and Staphylococcus aureus. Archives of Microbiology 199(2): 215-222.
17. Izadi, Z., Esna-Ashari, M., Ahmadvand, G., Davoodi, P., Piri, K. H., 2009. Chemical composition and antibacterial activity of the essence oil of peppermint (*Mentha piperita* L.). Armaghane Danesh Bimonthly Journal 14(3): 45-54.
18. Shalayel, M. H. F., Asaad, A. M., Qureshi, M. A., Elhussein, A. B., 2017. Anti-bacterial activity of peppermint (*Mentha piperita*) extracts against some emerging multi-drug

resistant human bacterial pathogens. Journal of Herbal Medicine 7: 27-30.

19. Singh, R., Shushni, M. A., Belkheir, A., 2015. Antibacterial and antioxidant activities of Mentha piperita L. Arabian Journal of Chemistry 8(3): 322-328.
20. Mahboubi M., Kazempour N., 2014. Chemical composition and antimicrobial activity of peppermint (*Mentha piperita* L.) essential oil. Songklanakarin J Sci Technol 36 (1): 83-87.
21. Saderi, H., Owlia, P., Maleki, Z., Habibi, M., Rahmati, N., 2008. Susceptibility to vancomycin in Staphylococcus aureus isolated from patients of four university-affiliated hospitals in Tehran. Iranian Journal of Pathology 3(3): 161-167.
22. Mahboubi, M., Bidgoli, F. G., 2010. Anti-staphylococcal activity of *Zataria multiflora* essential oil and its synergy with vancomycin. Phytomedicine 17(7): 548-550.