

بررسی اثر ضد باکتریایی مخلوط عصاره آبی نعنای و کاسنی بر روی استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کلی در شرایط آزمایشگاهی

حسین وزینی^۱، نیما خرم آبادی^۲، سیمین شاه حسینی^۳

^۱دکتری تخصصی انگل شناسی پزشکی، گروه پرستاری و مامایی، واحد همدان

^۲دانشگاه آزاد اسلامی، همدان، ایران

^۳دکتری تخصصی باکتری شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

^۴کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی گرایش میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی، همدان، ایران.

چکیده

با توجه به سرعت ظهور باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، گیاهان دارویی به عنوان یکی از رایج ترین منابع طبیعی عوامل ضد میکروبی می‌توانند به عنوان جایگزین برای درمان بیماری‌های عفونی مورد استفاده واقع شوند. این مطالعه به منظور بررسی فعالیت ضد میکروبی گیاه نعنای و کاسنی طراحی شده است. در این مطالعه تجربی، اثر ضد باکتری عصاره آبی نعنای و کاسنی و همچنین برخی آنتی‌بیوتیک‌های رایج به روش انتشار دیسک استاندارد بررسی شد. همچنین حداقل غلظت مهار (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) تعیین شد. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از آزمون ANOVA توسط SPSS V23 انجام شد. هر دو عصاره فعالیت ضد باکتریایی در برابر برخی گرم مثبت (استافیلوکوکوس/اورئوس) و همچنین باکتری‌های گرم منفی (اشریشیا کلی) را نشان دادند. عصاره نعنای علیه باکتری‌های استافیلوکوکوس/اورئوس و اشریشیا کلی به ترتیب دارای میانگین هاله‌ی عدم رشد ۱۶ و ۱۱/۶۶ میلی‌متری بودند. همچنین عصاره کاسنی علیه این باکتری‌ها به ترتیب دارای میانگین هاله‌ی عدم رشد ۱۳ و ۹/۶۶ میلی‌متری بود. پس از مخلوط کردن عصاره‌ها به ترتیب دارای میانگین هاله‌ی عدم رشد ۱۷/۶۶ و ۱۳/۶۶ میلی‌متری بودند. آنالیزها نشان داد که سیپروفلوکساسین به صورت معنی‌داری بیشتر از عصاره‌ها علیه اشریشیا کلی اثر دارد. عصاره نعنای به صورت معنی‌داری بیشتر از ونکومایسین علیه استافیلوکوکوس/اورئوس اثر دارد ($P=0/038$). همچنین نتایج نشان می‌دهد که مخلوط عصاره‌ها به صورت معنی‌داری بیشتر از ونکومایسین علیه استافیلوکوکوس/اورئوس اثر دارد ($P=0/006$). از طرفی اختلاف هاله‌ی عدم رشد مخلوط عصاره‌ها از عصاره‌ی تکی کاسنی معنی‌دار بوده است ($P=0/018$). بر اساس این نتایج می‌توان پیشنهاد کرد که گیاهان نعنای و کاسنی به ویژه ترکیب آن‌ها خواص ضد باکتری موثر دارند که می‌تواند به عنوان یک منبع جدید آنتی‌بیوتیک در برابر پاتوژن‌های باکتریایی به ویژه پاتوژن مانند استافیلوکوکوس/اورئوس و اشریشیا کلی استفاده شوند.

کلمات کلیدی: عصاره آبی، کاسنی، نعنای، استافیلوکوکوس/اورئوس، اشریشیا کلی

مقدمه

با توجه به افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی، استفاده از ترکیبات گیاهی مانند نعناع برای مقابله با باکتری‌ها اهمیت یافته است. نعناع از دیرباز در درمان سردرد، سرماخوردگی و نورالژی کاربرد داشته و روغن آن با بوی تند و رنگ زرد کم‌رنگ، خاصیت ضدعفونی‌کننده و ضد میکروبی دارد. یکی از ترکیبات مؤثر آن منتول است که نقش مهمی در فعالیت ضد باکتریایی این گیاه ایفا می‌کند.

ادبیات نظری

نعناع فلفلی (*Mentha piperita* L) به دلیل تولید روغن‌های ضروری به‌ویژه منتول، در صنایع دارویی، غذایی، آرایشی و بهداشتی دهان کاربرد گسترده‌ای دارد. منتول با خاصیت ضد قارچی و ضد باکتریایی قوی، به ترکیبی پرتقاضا در صنعت عطر و اسانس تبدیل شده است. (Scavroni, Boaro, Marques, & Ferreira, 2005).

گیاه شناسی

گونه دارویی: *Mentha piperita*

خانواده گیاهی: Leguminosae

توصیف گیاه: گیاهی چند ساله است و ۵۰-۶۰ سانتی متر (۳ تا ۴ فوت) ارتفاع دارد. ساقه‌ی مربع شکل آن معمولاً ارغوانی مایل به قرمز بوده و صاف است. برگ‌ها کوتاه، مستطیلی تخم مرغی و دندانه‌دار است. دارای گل‌های بنفش مایل به صورتی هستند و در ماه‌های تابستان ظاهر می‌شود (Gardiner, 2000).



شکل ۱- برگ‌های گیاه نعناع

ترکیبات شیمیایی نعناع

منتول، جزء اصلی اسانس نعناع است و عمدتاً مسئول اثرات ضد اسپاسم است. ترکیبات مختلف روغن نعناع شامل Limonene، Cineole، Menthone، Menthofuran، Isomenthon، Menthyl acetate، Carvone و Pulegone، Menthol، Isopulegol می‌باشد.

گیاه کاسنی

این گیاه متعلق به خانواده Asteraceae می‌باشد (Piluzza, Sulas, & Bullitta, 2014). یک گیاه چند ساله چوبی با ارتفاع حدود ۱ متر و دارای ریشه عمودی گوشتی تا ۷۵ سانتی متر طول و برگ‌های بزرگ است (Street, Sidana, & Prinsloo, 2013). ریشه و برگ‌های کاسنی به دلیل دارا بودن ترکیبات زیست‌فعال مانند فروکتان، پلی‌فنول‌ها و گلیکوزیدهای فنلی، در داروهای گیاهی برای دفع صفرا، ادرارآوری، تحریک گوارش و ترشح شیر معده کاربرد دارند. این ترکیبات شامل مشتقات Quercetin، Apigenin، Luteolin و اسیدهای کلروژنیک و سیکوریک هستند که نقش مهمی در بهبود متابولیسم غذایی ایفا می‌کنند.

مقاومت آنتی‌بیوتیکی

مقاومت ضد میکروبی به‌عنوان یکی از چالش‌های مهم جهانی در حال گسترش است و مصرف بی‌رویه و نادرست آنتی‌بیوتیک‌ها نقش مهمی در تشدید آن دارد. توانایی باکتری‌ها در انتقال ژن‌های مقاومت به گونه‌های دیگر موجب کاهش اثربخشی درمان‌های رایج شده است. عوامل بین‌المللی مانند مهاجرت، گردشگری و سفرهای کاری نیز در انتشار گونه‌های مقاوم به چند دارو نقش مؤثری ایفا می‌کنند.

اشریشیا کلی

/اشریشیا کلی یک باکتری گرم منفی، اکسیداز منفی و میله ای شکل از خانواده انتروباکتریاسه است و قادر به رشد هوازی و غیرهوازی می‌باشد و ترجیحا در ۳۷ درجه سانتی گراد رشد نموده و دارای تاژک پرپریش است. از تغییر در pH به دلیل تخمیر لاکتوز می‌توان برای تمایز بین سویه‌ها استفاده نمود. کلنی‌های لاکتوز مثبت، به رنگ قرمز و یا صورتی در مک کانکی آگار ظاهر خواهند شد. اغلب سویه‌های EIEC و سویه‌های باکتری شیگلا، لاکتوز را تخمیر نمی‌کنند، بنابراین باید هنگام استفاده از این آزمایش دقت نمود (Croxen et al., 2013).

سروتایپینگ

قبل از شناسایی عوامل ویژه‌ی حدت در سویه‌های /اشریشیا کلی مولد اسهال، تجزیه و تحلیل سروتیپیک، ابزاری غالب بود که توسط آن سویه‌ها را افتراق می‌دادند. در سال ۱۹۳۳، آدام با طبقه بندی سِرولوژیک نشان داد که گونه های "dyspepsiekoli" می‌تواند در شیوع بیماری اسهال کودکان نقش داشته باشد.

مقاومت به کینولون

کینولون‌ها طیفی گسترده از داروهای ضد باکتریایی مصنوعی می‌باشند و برای اولین بار در طول سنتز کلروکین^۱ به دست آمده‌اند. نالیدیکسید اسید، نمونه‌ی اولیه‌ی کینولون‌ها، برای اولین بار در سال ۱۹۶۲ برای مصرف بالینی در دسترس قرار گرفت و به طور عمده برای عفونت‌های دستگاه ادراری ناشی از اشریشیاکلی و دیگر باکتری‌های پاتوژن گرم منفی استفاده می‌شود.

باکتری استافیلوکوکوس اورئوس

باکتری /استافیلوکوکوس اورئوس، هم کامنسال و هم پاتوژن انسان است. در حدود ۳۰ درصد از جمعیت انسانی وجود دارد. به طور همزمان علت عمده باکتریی و اندوکاردیت عفونی (IE) و همچنین عفونت پوست و بافت نرم مفصلی و آلودگی‌های مربوط به دستگاه‌ها و اشیاء می‌باشد.

تظاهرات بالینی استافیلوکوک اورئوس

استافیلوکوک اورئوس به دلیل تولید جوش، گل مژه، زرد زخم و دیگر عفونتهای سطحی پوست در انسان، شناخته شده است. همچنین ممکن است باعث عفونت‌های خیلی جدی مخصوصا در اشخاص ناتوان مبتلا به بیماری‌های مزمن، تراتوما، سوختگی یا سرکوب سیستم ایمنی بدن شود.

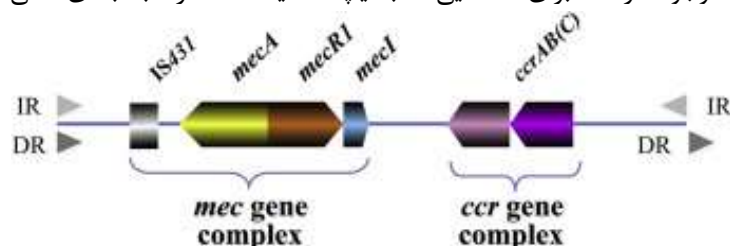
مقاومت استافیلوکوکوس اورئوس

استافیلوکوکوس اورئوس در ابتدا به بیشتر آنتی‌بیوتیک‌ها حساس بود و همین ویژگی منجر به کشف پنی‌سیلین توسط فلمینگ شد. با این حال، تنها چند سال پس از کاربرد بالینی پنی‌سیلین، مقاومت در برابر آن در بیمارستان‌ها ظاهر شد و تا یک دهه بعد به یک مشکل جدی در جامعه تبدیل گردید. مقاومت این باکتری اغلب از طریق انتقال ژن از منابع خارجی ایجاد می‌شود، اما جهش‌های کروموزومی و انتخاب دارویی نیز نقش دارند.

¹ Chloroquine

کاست کروموزومی استافیلوکوکی *mec* یا *SCCmec*

کشف Hiramatsu و همکارانش مبنی بر وجود ژن *mecA* در عناصر متحرک *SCCmec*، گامی مهم در درک مقاومت به متی‌سیلین و روابط تکاملی میان MRSAها بود. *SCCmec* به ژن *orfX* متصل می‌شود و تاکنون هشت آلوتیپ از آن شناسایی شده است؛ طبقه‌بندی آن‌ها بر اساس ژن‌های *mec* و *ccr* انجام می‌گیرد. تفاوت‌هایی در توالی‌های الحاقی و ژن‌های مقاومت ضد میکروبی میان *SCCmec*ها وجود دارد که برای شناسایی ساب‌تایپ‌ها مفیدند، اما در طبقه‌بندی اصلی کاربرد ندارند.



شکل ۲- کاست کروموزومی استافیلوکوکی *mec* (Hiramatsu et al., 2014)

پیشینه تحقیق

دو مطالعه به بررسی خواص ضد میکروبی گیاهان دارویی پرداختند: یکی اسانس رزماری استخراج‌شده با آب را بررسی کرد که هاله عدم رشد ۱۷ تا ۳۳ میلی‌متر و اثر قوی بر استافیلوکوکوس اورئوس نشان داد. دیگری اثر عصاره اتانولی دانه رازیانه را با روش‌های دیسک کاغذی و رقت لوله‌ای بررسی کرد که بیشترین مهار رشد را بر اشریشیاکلی با MIC برابر ۳/۲ میلی گرم بر میلی‌لیتر داشت. در هر دو مطالعه، حساسیت میکروارگانیسم‌ها متفاوت بود و نتایج نشان‌دهنده پتانسیل ضدباکتریایی این عصاره‌ها هستند. (سانتویو و همکاران، ۲۰۰۵) (سعیدی و همکاران، ۲۰۱۰).

در این مطالعه، اسانس بومادران شیرازی به روش میکرودايلوشن بررسی شد و مشخص گردید که میزان استخراج آن بیشتر از سایر گونه‌های بومادران است. آنالیز GC-MS وجود ۳۶ ترکیب را در اسانس تأیید کرد و MIC آن علیه باکتری‌های گرم مثبت بین ۱۵/۰ تا ۷۵/۰ و علیه گرم منفی بین ۵/۱ تا ۳ میلی گرم بر میلی‌لیتر بود. *S. aureus* حساس‌ترین و *Salmonella enteritidis* مقاوم‌ترین پاتوژن نسبت به این اسانس شناخته شدند. (عروجعلیان، ۲۰۱۰).

در این مطالعه، عصاره متانولی و اسانس گل‌های گونه‌ی بومی *Achillea wilhelmsii* C.Koch اثر مهارکننده‌ای بر رشد استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس و اشریشیاکلی نشان دادند. غلظت مهارکننده عصاره بین ۲۵ تا ۲۵/۶ میلی گرم بر میلی‌لیتر و غلظت مؤثر اسانس ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود، اما هیچ‌کدام بر سودوموناس آئروژینوزا تأثیر نداشتند. (محمدی سیچانی و همکاران، ۲۰۱۱).

در این مطالعه، عصاره متانولی گل و برگ بومادران پس از استخراج با روش سوکسله بیشترین اثر ضد باکتریایی را بر استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس نشان داد. اثر این عصاره‌ها بر اشریشیاکلی ضعیف‌تر بود و هیچ‌گونه مهار رشدی بر سودوموناس آئروژینوزا مشاهده نشد؛ همچنین افزایش غلظت موجب افزایش اثربخشی ضد میکروبی شد (امجد و همکاران، ۲۰۱۱).

فرضیه‌ها

- الف: عصاره آبی نعنای دارای خاصیت ضد باکتری علیه ارگانیسم گرم مثبت (*استافیلوکوکوس/اورئوس* به عنوان گونه مدل) می‌باشد.
- ب: عصاره آبی نعنای دارای خاصیت ضد باکتری علیه ارگانیسم گرم منفی (*اشریشیاکلی* به عنوان گونه مدل) می‌باشد.
- پ: عصاره آبی کاسنی دارای خاصیت ضد باکتری علیه ارگانیسم گرم مثبت (*استافیلوکوکوس/اورئوس* به عنوان گونه مدل) می‌باشد.
- ت: عصاره آبی کاسنی دارای خاصیت ضد باکتری علیه ارگانیسم گرم منفی (*اشریشیاکلی* به عنوان گونه مدل) می‌باشد.
- ث: مخلوط عصاره‌های آبی نعنای و کاسنی دارای خاصیت هم افزایی ضد باکتری علیه ارگانیسم گرم مثبت (*استافیلوکوکوس/اورئوس* به عنوان گونه مدل) می‌باشد.

ج: مخلوط عصاره‌های آبی نعناع و کاسنی دارای خاصیت همافزایی ضد باکتری علیه ارگانیزم گرم منفی (شریشیا کلی به عنوان گونه مدل) می‌باشد.

چ: خاصیت ضد باکتریایی مخلوط عصاره‌های آبی نعناع و کاسنی بر روی شریشیا کلی در مقایسه با آنتی بیوتیک‌های تجاری اختلاف معنی داری دارد.

اهداف تحقیق

هدف کلی

بررسی اثر ضد باکتریایی مخلوط عصاره آبی نعناع و کاسنی بر روی استافیلوکوکوس/اورئوس و شریشیا کلی در شرایط آزمایشگاهی

اهداف جزئی

الف) ارزیابی خاصیت ضد باکتریایی عصاره آبی نعناع بر روی استافیلوکوکوس/اورئوس

ب) ارزیابی خاصیت ضد باکتریایی عصاره آبی نعناع بر روی شریشیا کلی

پ) ارزیابی خاصیت ضد باکتریایی عصاره آبی کاسنی بر روی استافیلوکوکوس/اورئوس

ت) ارزیابی خاصیت ضد باکتریایی عصاره آبی کاسنی بر روی شریشیا کلی

ث) ارزیابی خاصیت ضد باکتریایی مخلوط عصاره‌های آبی نعناع و کاسنی بر روی استافیلوکوکوس/اورئوس

ج) ارزیابی خاصیت ضد باکتریایی مخلوط عصاره‌های آبی نعناع و کاسنی بر روی شریشیا کلی

چ) مقایسه‌ی خاصیت ضد باکتریایی مخلوط عصاره‌های آبی نعناع و کاسنی بر روی شریشیا کلی با آنتی بیوتیک‌های تجاری

مواد و وسایل مورد نیاز

در بخش مواد مورد نیاز در مطالعه حاضر ابتدا گیاهان مورد استفاده از عطاری‌های معتبر سطح شهر تهیه گردید. کلرور باریم و سولفات باریم برای تهیه نیم مک فارلند مورد نیاز بود. محیط کشت و آنتی بیوتیک هایمورد نیاز نیز تهیه گردید. لیست تمامی مواد و وسایل مورد نیاز در مطالعه حاضر همراه با شرکت‌های سازنده در جدول‌های ۱ و ۲ آورده شده است.

جدول ۱- وسایل مورد استفاده

شرکت سازنده	وسایل مورد نیاز
Bosch	یخچال
.....	آون
Sartorias	ترازو
صنایع پزشکی ایران تولید	اتوکلاو
شیمی فن	شیکر
.....	انکوباتور
Besat	هود میکروسکوپی کلاس دو
BioRAD	اسپکتروفتومتر

جدول ۲- مواد مورد استفاده

شرکت سازنده	مواد مورد استفاده
-----	گیاهان مورد استفاده
Sina Gene	کلرور باریم

Sina Gene	سولفات باریم
.....	سرم فیزیولوژی
Merck	آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین و ونکومايسين
Sina Gene	دیسک های آنتی بیوگرام بلانک
.....	سواب
سازمان پژوهش های صنعتی ایران	سویه های استاندارد
Merck	محیط کشت نوترینت براث، نوترینت آگار، مولر هینتون آگار و TSB

مدت زمان انجام، نوع تحقیق و متغیرها

این پروژه در طول مدت ۶ ماه انجام گرفت. این تحقیق از نوع تجربی است. همچنین متغیرهای مطالعه شامل نوع باکتری (کیفی-اسمی)، نوع عصاره (کیفی-اسمی)، مقدار MIC و MBC (کمی-نسبی).

تهیه و فعال کردن سویه های استاندارد

سویه ای استاندارد/شریشیا کلی ATCC 25922، استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 25923 از کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش های علمی و صنعتی تهیه شد.

عصاره گیری

در این مطالعه، عصاره گیری گیاهان نعناع و کاسنی با روش ماسراسیون (خیساندن در آب مقطر سرد به مدت ۴۸ ساعت) انجام شد. پس از صاف سازی و سانتریفیوژ، محلول رویی در دستگاه روتاری در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد و خلأ تغلیظ گردید. در نهایت، عصاره به دست آمده با استفاده از فریز درایر خشک شد تا برای آزمون های بعدی آماده گردد.

تعیین حساسیت آنتی بیوتیک به روش انتشار از دیسک

متداول ترین آزمایش سنجش حساسیت به مواد ضد میکروبی، روش انتشار از دیسک در محیط آگار است که بنام تست کربی-بویر^۲ معروف است. این روش که به صورت استاندارد شده توسط بویر و همکارانش در ۱۹۶۶ ارائه شد، به طور معمول در اغلب آزمایشگاه های تشخیص طبی مورد استفاده قرار می گیرد و آنتی بیوگرام نامیده می شود.

مواد و وسایل مورد نیاز

محیط مولر هینتون آگار (ساخت مرک المان) دیسک های آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین و ونکومايسين، سرم فیزیولوژی استریل، لوله استاندارد نیم-مک فارلند، سوسپانسیون میکروبی، سواب پنبه ای، پنس استریل، کولیس.

آماده کردن محیط کشت

محیط کشتی که برای انجام آزمایش بکار می رود معمولاً مولر هینتون آگار است. ضخامت محیط در قسمت های مختلف پلیت باید به صورت یکنواخت و حدود ۴ میلی متر باشد. pH این محیط نیز باید بین ۷/۲ تا ۷/۴ تنظیم شود (تنظیم pH توسط اضافه کردن NaOH برای بالا بردن pH و اضافه کردن HCl برای پایین آوردن pH).

² Kirby-Bauer

روش تهیه استاندارد نیم-مک‌فارلند

برای تهیه سوسپانسیون میکروبی استاندارد جهت آنتی بیوگرام، باید تراکم باکتری‌ها برابر با $10^8 \times 1,5$ سلول در میلی لیتر باشد که با جذب نوری ۰,۰۸ تا ۰,۱۳ در طول موج ۶۲۵ نانومتر تنظیم می شود. برای این منظور، سوسپانسیون سولفات باریم با ترکیب کلرور باریم و اسید سولفوریک تهیه شده و در لوله‌های پیچ‌دار نگهداری می گردد. قبل از هر بار استفاده، باید به خوبی هم زده شود و در صورت مشاهده ذرات بزرگ یا گذشت زمان، با استاندارد تازه جایگزین گردد. (Harrigan & McCance, 2014).

تهیه سوسپانسیون میکروبی

ابتدا محیط نوترینت براث تهیه شد و در هر لوله آزمایش، ۴ میلی لیتر ریخته و سپس اتوکلاو شد. در هر لوله، مقداری از کلنی باکتری تلقیح شد تا کدورتی مشابه نیم-مک‌فارلند داشته باشند.

تلقیح سوسپانسیون میکروبی به محیط کشت

پس از تهیه سوسپانسیون میکروبی مطابق با کدورت استاندارد نیم-مک‌فارلند، یک سوآپ استریل را آغشته به سوسپانسیون میکروبی نموده سوآپ در سطح محیط مولر هینتون آگاری در تمام جهات با زاویه ۶۰ درجه به طور یکنواخت در سطح پلیت تلقیح شد تا در آگار نفوذ کند.

قرار دادن دیسک آنتی بیوتیک‌ها

دیسک آماده‌ی سیپروفلوکساسین برای /شریشیا کلی و ونکومايسين برای /ستافیلوکوکوس /اورئوس استفاده شد. دیسک‌ها در سطح پلیت قرار داده شدند. سپس پلیت را برعکس کرده و به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ تا ۳۷ درجه گرم‌خانه گذاری شدند. پس از انکوباسیون ۲۴-۱۸ ساعته، قطر هاله عدم رشد توسط کولیس اندازه‌گیری شد. این تست در سه تکرار انجام شد (Harrigan & McCance, 2014).

سنجش خاصیت ضد میکروبی عصاره‌ها**انتشار دیسک**

در این مطالعه، عصاره‌گیری گیاهان نعنای و کاسنی با روش ماسراسیون (خیساندن در آب مقطر سرد به مدت ۴۸ ساعت) انجام شد. پس از صاف‌سازی و سانتریفیوژ، محلول رویی در دستگاه روتاری در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد و خلأ تغلیظ گردید. در نهایت، عصاره به دست آمده با استفاده از فریز درایر خشک شد تا برای آزمون‌های بعدی آماده گردد.

تعیین کمترین غلظت مهارکنندگی و کمترین غلظت کشندگی

برای این مرحله عصاره و آنتی بیوتیک‌ها به صورت زیر تهیه شد:

- پودر سیپروفلوکساسین از شرکت مرک تهیه شد و مقدار ۲۵ میلی گرم در ۱۰۰۰ میلی لیتر DMSO حل گردید و از فیلتر ۰/۰۲ عبور داده شد (غلظت ۰/۰۲۵ mg/ml).
- پودر ونکومايسين از شرکت مرک تهیه شد و مقدار ۱۰۰ میکروگرم در ۱۰ میلی لیتر DMSO حل گردید و از فیلتر ۰/۰۲ عبور داده شد (غلظت ۰/۰۱ mg/ml).
- ۳ گرم از هر کدام از عصاره‌های کاسنی و نعنای در ۱۰ میلی لیتر DMSO حل شد و سپس از فیلتر ۰/۰۲ عبور داده شدند (غلظت ۳۰۰ mg/ml).
- ترکیب عصاره‌ها نیز به این صورت بود که ۱/۵ گرم از هر عصاره در ۱۰ میلی لیتر حل شد و سپس از فیلتر ۰/۰۲ عبور داده شدند (غلظت ۳۰۰ mg/ml).

مراحل انجام:

۱. این روش برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره‌ها و مواد آنتی‌بیوتیکی استفاده می‌شود. تست MIC و MBC به این صورت انجام گردید که یک سری متشکل از ۸ لوله آزمایش با رقت‌های متوالی تهیه گردید.

۲. یک میلی‌لیتر سوسپانسیون میکروبی به تمامی لوله‌ها اضافه گردید.

۳. یک میلی‌لیتر از عصاره‌ی مورد بررسی به لوله‌های شماره ۱ اضافه شد.

۴. سپس یک میلی‌لیتر از لوله شماره ۱ برداشته و به لوله شماره ۲ افزوده و پس از مخلوط کردن این عمل تا لوله شماره ۷ ادامه داده شد و سپس از لوله شماره ۷ یک میلی‌لیتر برداشته و دور ریخته شد و بدین ترتیب رقت‌های ۲ برابر تهیه گردید.

۵. لوله‌ی شماره ۸ فقط دارای باکتری و به جای عصاره ۱ میلی‌لیتر DMSO اضافه گردید و این لوله به عنوان شاهد استفاده شد.

۶. کلیه لوله‌ها به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در حرارت ۳۵ تا ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند.

۷. برای محاسبه مقدار MIC و MBC لازم است ۱۰۰ میکرولیتر از هر لوله را درروی یک پلیت حاوی نوترینت آگار کشت داد.

۸. در این روش، MBC به عنوان کمترین غلظتی از عصاره تعریف می‌شود که ۹۵٪ باکتری‌ها را از بین ببرد؛ بنابراین اگر از لوله آزمایش دقیقاً ۱۰۰ میکرولیتر برداشته شود و شمارش کلنی‌ها ۵ یا کمتر باشد، آن غلظت به عنوان MBC پذیرفته می‌شود. همچنین، غلظتی که تعداد کلنی‌های آن نصف تعداد سویه‌های شاهد باشد، به عنوان MIC (حداقل غلظت مهارکننده رشد) در نظر گرفته می‌شود. (Harrigan & McCance, 2014).

❖ این مراحل برای هر ۲ باکتری جداگانه انجام می‌شود. در این مرحله ما سه عصاره‌ی آبی نعنای، کاسنی و ترکیب این دو و همچنین آنتی‌بیوتیک‌های ونکومایسین و سیپروفلوکساسین خواهیم داشت؛ بنابراین برای هر کدام از باکتری‌ها ۵ سری لوله‌های رقت بندی برای عصاره‌ها و آنتی‌بیوتیک خواهیم داشت.

عصاره‌گیری

عصاره‌گیری بر اساس روش گفته شده انجام گردید؛ بنابراین در این مطالعه عصاره‌ی آبی برای نعنای و کاسنی به دست آمد؛ بنابراین ۲ نوع عصاره در این مطالعه استفاده شد. از مراحل عصاره‌گیری عکس‌هایی تهیه شده است که در زیر آورده شده است.

وزن خشک عصاره‌ها نیز در جدول زیر آورده شده است:

جدول ۳- وزن خشک عصاره‌ها

عصاره	وزن خشک بر حسب mg/g
آبی - نعنای	۱۴۵
آبی - کاسنی	۱۷۲/۸



شکل ۳- عکس‌های گرفته‌شده از مراحل عصاره‌گیری

انتشار دیسک برای عصاره‌ها و آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی

همانطور که در جدول ۴ دیده می‌شود عصاره‌ی نعناع علیه/استافیلوکوکوس/اورئوس بیشترین اثر را داشته است به صورتی که هاله‌ی ۱۶ میلی‌متری ایجاد کرده است و کمترین هاله نیز عصاره‌ی کاسنی علیه/شریشیا کلی با هاله‌ی ۹/۶۶ میلی‌متری بوده است. از طرفی مخلوط عصاره‌ها از عصاره‌ها به صورت منفرد اثر بهتری داشته به صورتی که مخلوط عصاره‌ها علیه/استافیلوکوکوس/اورئوس و/شریشیا کلی به ترتیب هاله‌ی عدم رشد برابر با ۱۷/۶۶ و ۱۳/۶۶ میلی‌متری ایجاد کرده است.

جدول ۴- میانگین و انحراف معیار هاله عدم رشد عصاره‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها بر حسب میلی‌متر

عصاره و آنتی‌بیوتیک‌ها	اندازه هاله عدم رشد علیه/استافیلوکوکوس/اورئوس (mm)	اندازه هاله عدم رشد علیه/شریشیا کلی (mm)
آبی- نعناع	16 ± 2	$11/66 \pm 2/08$
آبی- کاسنی	13 ± 1	$9/66 \pm 0/57$
مخلوط عصاره‌ها	$17/66 \pm 0/57$	$13/66 \pm 1/52$
سیپروفلوکساسین	-----	$24 \pm 2/64$
ونکومايسين	$12 \pm 1/73$	-----



شکل ۴- نمونه‌هایی از عکس‌های گرفته شده از انتشار دیسک عصاره‌ها

آنالیز آماری بین داده‌های انتشار دیسک

آنالیز قطر هاله‌ها علیه/شریشیا کلی

بر اساس خروجی SPSS برای آنالیز ANOVA بین هاله‌ی عدم رشد سیپروفلوکساسین و تمامی عصاره‌ها به صورت تکی و مخلوط آن‌ها اختلاف معنی‌داری یافت شد به این صورت که سیپروفلوکساسین به صورت معنی‌داری بیشتر از عصاره‌ها علیه/شریشیا کلی اثر دارد. درست است که مخلوط عصاره‌ها دارای هاله‌ی عدم رشد بیشتری نسبت به عصاره‌های منفرد داشته اما این اختلاف معنی دار نبوده است.

جدول ۵- خروجی SPSS برای آنالیز ANOVA/شریشیا کلی

Dependent Variable: *E. coli*

Tukey HSD

(I) antimicrob	(J) antimicrob	Mean Difference (I-J)	Sig.	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
Mentha	chicory	2.00000	.583	-2.8917	6.8917
	ciprofloxacin	-12.33333*	.000	-17.2250	-7.4417
	Mix	-2.00000	.583	-6.8917	2.8917
chicory	Mentha	-2.00000	.583	-6.8917	2.8917
	ciprofloxacin	-14.33333*	.000	-19.2250	-9.4417
	Mix	-4.00000	.114	-8.8917	.8917
ciprofloxacin	Mentha	12.33333*	.000	7.4417	17.2250
	chicory	14.33333*	.000	9.4417	19.2250
	Mix	10.33333*	.001	5.4417	15.2250
Mix	Mentha	2.00000	.583	-2.8917	6.8917
	chicory	4.00000	.114	-.8917	8.8917
	ciprofloxacin	-10.33333*	.001	-15.2250	-5.4417

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

آنالیز قطر هاله‌ها علیه/استافیلوکوکوس اورئوس

در اینجا بر اساس خروجی SPSS برای آنالیز ANOVA بین هاله‌ی عدم رشد ونکومایسین و عصاره‌ی نعناع اختلاف معنی‌دار بوده است ($p = 0/038$) به صورتی که عصاره‌ی نعناع به صورت معنی‌داری بیشتر از ونکومایسین علیه/استافیلوکوکوس اورئوس اثر دارد. همچنین نتایج نشان می‌دهد که مخلوط عصاره‌ها به صورت معنی‌داری بیشتر از ونکومایسین علیه/استافیلوکوکوس اورئوس اثر دارد ($p = 0/006$). از طرفی اختلاف هاله‌ی عدم رشد مخلوط عصاره‌ها از عصاره‌ی تکی کاسنی معنی‌دار بوده است ($p = 0/018$).

جدول ۶- خروجی SPSS برای آنالیز ANOVA/استافیلوکوکوس اورئوس

Dependent Variable: *S. aureus*

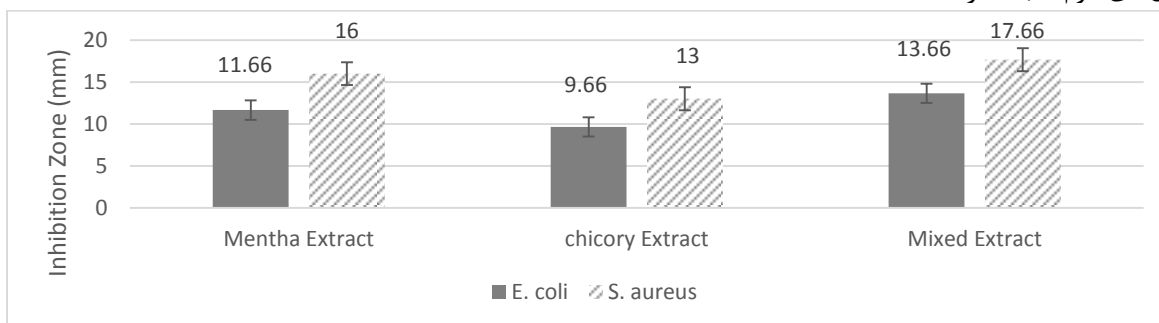
Tukey HSD

(I) antimicrob	(J) antimicrob	Mean Difference (I-J)	Sig.	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
Mentha	chicory	3.00000	.126	-.7740	6.7740
	vancomycin	4.00000*	.038	.2260	7.7740
	Mix	-1.66667	.525	-5.4407	2.1073
chicory	Mentha	-3.00000	.126	-6.7740	.7740
	vancomycin	1.00000	.830	-2.7740	4.7740
	Mix	-4.66667*	.018	-8.4407	-.8927
vancomycin	Mentha	-4.00000*	.038	-7.7740	-.2260
	chicory	-1.00000	.830	-4.7740	2.7740
	Mix	-5.66667*	.006	-9.4407	-1.8927
Mix	Mentha	1.66667	.525	-2.1073	5.4407
	chicory	4.66667*	.018	.8927	8.4407
	vancomycin	5.66667*	.006	1.8927	9.4407

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

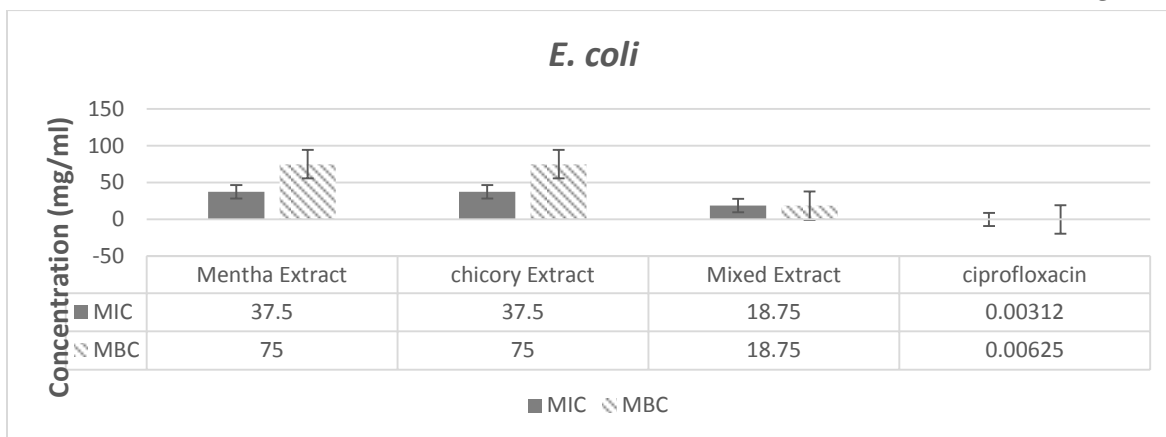
مقایسه قطر هاله در اش‌ریشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس

در مورد باکتری/اش‌ریشیا کلی بیشترین قطر هاله مربوط به ترکیب دو عصاره و کمترین مربوط به عصاره کاسنی بود. در مورد باکتری/استافیلوکوکوس اورئوس کمترین قطر هاله مربوط به ترکیب عصاره کاسنی و بیشترین مربوط به ترکیب دو عصاره است. در کل عصاره‌ها بر روی باکتری/استافیلوکوکوس اورئوس بیشتر اثر داشته است. بنابراین عصاره‌های این مطالعه اثر انتخابی بیشتری روی باکتری‌های گرم مثبت دارد.

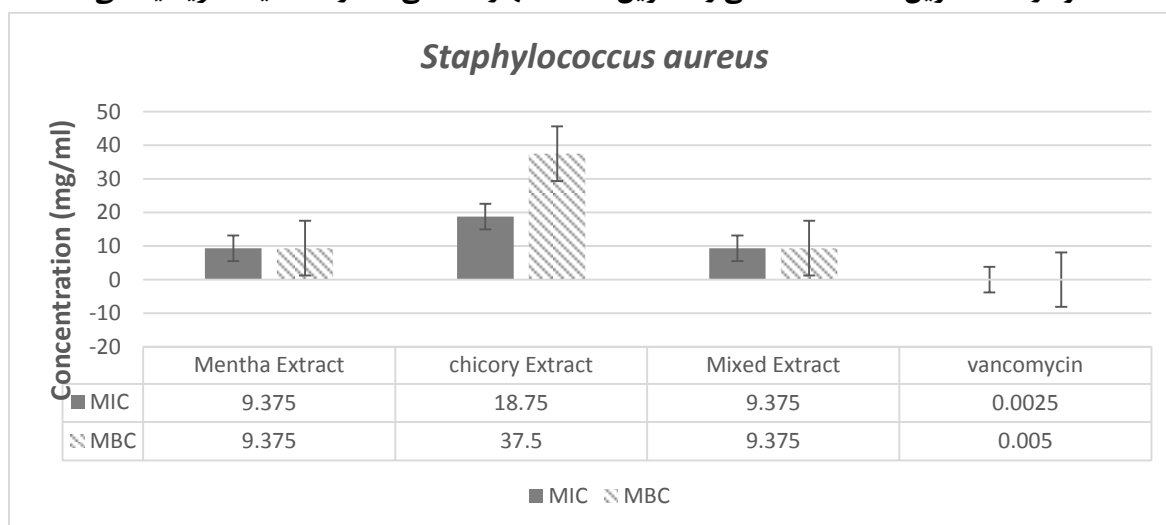


نمودار ۱- میانگین هاله‌های عدم رشد در دو باکتری مورد بررسی

نتایج تعیین MIC و MBC



نمودار ۲- کمترین غلظت کشندگی و کمترین غلظت مهارکنندگی عصاره‌ها علیه/شریشیا کلی



نمودار ۳- کمترین غلظت کشندگی و کمترین غلظت مهارکنندگی عصاره‌ها علیه/استافیلوکوکوس/اورئوس



شکل ۵- نمونه‌هایی از تست‌های MIC و MBC

نتیجه گیری

در این مطالعه، عصاره‌های نعناع و کاسنی به صورت تکی و ترکیبی بررسی شدند و ترکیب آن‌ها بیشترین اثر مهاری را داشت، در حالی که سیپروفلوکساسین مؤثرتر از عصاره‌ها علیه اشیریشیا کلی بود. تفاوت نتایج بین روش‌های انتشار دیسک و Broth Dilution به دلیل ماهیت ترکیبات قطبی بود که در محیط محلول بهتر آزاد شده و اثر ضد میکروبی بیشتری نشان دادند (Ncube et al, 2008).

خاصیت ضد میکروبی گیاه نعناع می‌تواند مربوط به ترکیبات مختلف داخل آن باشد. در مطالعات گذشته ترکیبات مختلفی از عصاره و اسانس نعناع جداسازی شده است. مهمترین و بیشترین ترکیبات جدا شده شامل Pulegone, Cineol, Limonene, Carvone, Spathulenol, Calamenene, Phytol, Menthol, Terpinen-4-ol و Beta-Bourbonene است (Almeida et al, 2012). بنابراین هر یک از این ترکیبات یا گروهی از آن‌ها می‌تواند باعث خاصیت ضد میکروبی آن باشند.

مکانیسم ضد باکتری از ترپن‌ها به طور کامل مشخص نیست اما ممکن است با توجه به خاصیت آگریزی ترکیب فنلی که بالقوه است بتواند عملکرد سلول‌ها و نفوذپذیری و تمامیت غشای آن‌ها (Seyyednejad et al. 2010; Karray-Bouraoui et al. 2010) را مختل کنند (به عنوان مثال cineole موجود در نعناع ترپن است). همچنین مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۲ توسط آگاروال^۳ انجام گردید که خاصیت ضد میکروبی ترکیبات گیاه نعناع را مورد بررسی قرار دادند و مشاهده کردند که دو ترکیب Limonene و Carvone دارای خاصیت ضد باکتریایی و ضد قارچی هستند. بنابراین خاصیت ضد میکروبی عصاره‌ها احتمال دارد مربوط به این دو ترکیب باشد (Aggarwal et al, 2002).

در مطالعه‌ی معتمدی و همکاران (۲۰۱۴)، مشخص شد که اجزای فعال گونه‌ی *Mentha pulegium* از خانواده نعنایان می‌توانند دیواره سلولی باکتری را تحت تأثیر قرار دهند. اختلال یا مهار بیوسنتز دیواره سلولی یکی از مکانیسم‌های رایج و مؤثر عوامل ضد باکتری است که نقش مهمی در جلوگیری از رشد و عود عفونت دارد. این ویژگی باعث می‌شود ترکیبات مذکور به عنوان عوامل ضد میکروبی پایدار و مؤثر شناخته شوند. (Motamedi et al. 2014).

در مورد نحوه عمل اسانس‌ها و عصاره‌ها در مورد مرگ باکتری‌ها، چنین اظهار نظر شده است که متابولیت‌های فنلی موجود در گیاهانی چون نعناع، توانایی این را دارند که یک هیدروژن از گروه هیدروکسیل موجود در حلقه آروماتیک خود رها کرده و باعث اکسیداسیون رادیکال‌های آزاد چربی‌ها و دیگر بیومولکول‌های غشای سلولی و تخریب آن شوند و به این ترتیب، خاصیت آنتی اکسیدانی، ضد میکروبی و ضد التهابی خود را اعمال مینمایند (Strycharz et al, 2002).

Padmini و همکاران، با بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره نعناع به روش آگار ژل دیفیوژن، اثر چشمگیر نعناع بر ضد باکتری‌های سالمونلا تیفی و سودوموناس ایروژینوزا را گزارش کردند (Padmini et al, 2010).

محبوبی و حقی در سال ۲۰۰۸، خواص ضد میکروبی اسانس نعناع را به دو روش دیسک دیفیوژن و براث میکرودايلوشن، مورد بررسی قرار دادند و MIC آن را برای باکتری‌های گرم مثبت، بین ۰/۲۵-۴ میکرولیتر در میلی‌لیتر و برای لیستریا مونوسیتوژنز ۱ میکرولیتر در میلی‌لیتر گزارش نمودند. اسانس نعناع بر روی اشیریشیا کلی اثر نداشت (Mahboubi et al, 2008). تفاوت مطالعه آن‌ها با مطالعه حاضر در این بود که آن‌ها اسانس را بررسی کردند و مطالعه حاضر عصاره گیاه را استفاده کرده بودند.

³ Aggarwal

نیریز نقدهی و همکاران، خواص ضد باکتریایی اسانس نعناع و پونه کوهی را بر روی *باسیلوس سرئوس* و *شریشیا کلی* H7:O157 در شرایط آزمایشگاهی به روش حداقل غلظت مهارکنندگی بررسی کردند و نشان دادند که اسانس نعناع، به صورت کامل می‌تواند رشد این دو عامل بیماری‌زا را مهار کند (Neyriz et al, 2010).

در مطالعه عطایی و همکاران مشخص شد که عصاره گیاه نعناع، دارای اثر ضد قارچی می‌باشد؛ به طوریکه در رقت ۱/۵، از رشد قارچ *کاندیدا آلبیکنس* جلوگیری میکند و در رقت ۱/۲ دارای اثر کشندگی است (Ataei et al, 2007).

وجود برخی تفاوت‌ها در میزان اثرات ضد میکروبی مشاهده شده در این مطالعه و مطالعات مشابه می‌تواند به دلیل تفاوت مکان‌های رشدی گیاهان، استفاده از روش‌های مختلف برای استخراج و... باشد.

مطالعات اندکی برای تعیین ترکیبات فعال موجود در عصاره و اسانس گیاه کاسنی انجام شده است. بنابراین چگونگی مکانیسم ضد میکروبی این گیاه تا کنون مشخص نشده است. به هر حال بنا بر نتایج این مطالعه عصاره کاسنی علیه باکتری‌های گرم مثبت و منفی اثر ضد میکروبی دارد هرچند از عصاره‌ی نعناع اثر کمتری داشت.

در یک مطالعه که در سال ۲۰۰۴ در کشور هندوستان توسط Rani و Khullar جهت بررسی اثرات ضد باکتری عصاره الکلی و آبی ۵۴ گیاه دارویی از جمله کاسنی انجام گرفت، مشخص شد که عصاره الکلی کاسنی دارای اثرات ضد باکتریال متوسط بر علیه سالمونلا تیفی مقاوم به سایر داروها می‌باشد (Rani et al, 2004).

نتایج مطالعه Petrovic و همکاران در سال ۲۰۰۴ بر روی عصاره الکلی، آبی و اتیل استات کاسنی، نشان داد که همه عصاره‌ها دارای اثر ضد باکتریال می‌باشند اما اثر ضد باکتریال عصاره اتیل استات بارزتر بود؛ همچنین نشان داده شد که عصاره آبی دارای اثر ضد باکتری روی سودوموناس می‌باشد (Petrovic et al, 2004).

در مطالعه‌ی قادری و همکاران (۲۰۰۴)، عصاره الکلی کاسنی تنها بر استافیلوکوکوس اورئوس (گرم مثبت) اثر داشت و بر باکتری‌های گرم منفی بی‌تأثیر بود، در حالی که در مطالعه‌ی حاضر عصاره آبی کاسنی خاصیت ضد میکروبی متوسطی علیه هر دو نوع باکتری نشان داد. این تفاوت می‌تواند ناشی از تفاوت در شرایط اقلیمی و منطقه‌ی رشد گیاه باشد که بر ترکیبات فعال آن تأثیر می‌گذارد. همچنین نوع عصاره‌گیری (آبی در مطالعه‌ی حاضر و الکلی در مطالعه‌ی قبلی) نقش مهمی در استخراج ترکیبات مؤثر دارد و احتمالاً عصاره‌ی آبی توانسته ترکیبات محلول در آب را بهتر استخراج کند.

بنا بر این در کل دیده می‌شود که هم عصاره نعناع و هم عصاره کاسنی دارای خاصیت ضد میکروبی بر روی میکروب‌های مختلف هستند.

نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره‌های مورد بررسی علیه باکتری گرم مثبت بیشتر خاصیت ضد میکروبی دارند. شواهدی در مقالات وجود دارد که باکتری‌های گرم مثبت به اسانس و عصاره گیاهی از باکتری‌های گرم منفی حساس‌تر هستند (Mahboubi and Haghi 2008; Marzouk et al. 2008; Boukhebt et al. 2011). که آن مقاومت باکتری‌های گرم منفی به دلیل لیپوپلی ساکارید آبگریز موجود در غشاء خارجی است که حفاظت در برابر عوامل مختلف را فراهم می‌کند (Nikaido et al. 2008).

در این مطالعه، خاصیت ضد میکروبی سیپروفلوکساسین و ونکومايسين در دوزهای مورد بررسی بیشتر از عصاره‌های گیاهی بود، زیرا این آنتی‌بیوتیک‌ها به صورت خالص استفاده می‌شوند. عصاره‌ها شامل ترکیبات متعدد و ناخالصی‌هایی هستند که همگی خاصیت ضد میکروبی ندارند، بنابراین اثربخشی آن‌ها در غلظت مشابه کمتر است. با خالص‌سازی و بررسی جداگانه ترکیبات فعال موجود در عصاره‌ها، ممکن است به موادی دست یافت که حتی از آنتی‌بیوتیک‌ها نیز مؤثرتر باشند.

با توجه به مقاومت روزافزون نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها، عصاره‌های گیاهی مانند کاسنی و نعناع با خاصیت ضد باکتریایی نسبتاً خوب می‌توانند در فیتوتراپی و صنایع دارویی، آرایشی و بهداشتی کاربرد درمانی و اقتصادی داشته

باشند. نوآوری این مطالعه بررسی اثر ضد میکروبی ترکیب عصاره‌های کاسنی و نعناع نسبت به استفاده منفرد آن‌هاست.

پیشنهاد

- انجام عصاره گیری به روش‌های الکلی، آبی-الکلی و غیره
- استفاده از سویه‌های میکروبی دیگر
- انجام آزمایش با غظت‌های بیشتر از دو گیاه
- استفاده از مخلوط عصاره گیاه نعناع و گیاه کاسنی با آنتی بیوتیک‌ها
- استفاده از مخلوط عصاره گیاه نعناع و گیاه کاسنی با نانوذرات

منابع

1. Ataei, Z., Ansari, M., AYAT, E. M. A., & MIRZAEI, A. (2007). IN-VITRO STUDY OF ANTIFUNGAL EFFECTS OF SELECTED HERBAL EXTRACTS ON STANDARD AND WILD STRAINS OF CANDIDA ALBICANS. *MAJALLAH-I-DANDANPIZISHKI*, 19(2), 91-97.
2. Alankar, S. (2009). A review on peppermint oil. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 2(2), 27-33.
3. Allocati, N., Masulli, M., Alexeyev, M. F., & Di Ilio, C. (2013). Escherichia coli in Europe: an overview. *International journal of environmental research and public health*, 10(12), 6235-6254.
4. Almeida, P. P., Mezzomo, N., & Ferreira, S. R. (2012). Extraction of Mentha spicata L. volatile compounds: evaluation of process parameters and extract composition. *Food and bioprocess technology*, 5(2), 548-559.
5. Anes, J., McCusker, M. P., Fanning, S., & Martins, M. (2015). The ins and outs of RND efflux pumps in Escherichia coli. *Frontiers in Microbiology*, 6, 587. doi:10.3389/fmicb.2015.00587
6. Argudín, M. Á., Mendoza, M. C., & Rodicio, M. R. (2010). Food Poisoning and Staphylococcus aureus Enterotoxins. *Toxins*, 2(7), 1751-1773. doi:10.3390/toxins2071751
7. Aggarwal, K. K., Khanuja, S. P. S., Ahmad, A., Santha Kumar, T. R., Gupta, V. K., & Kumar, S. (2002). Antimicrobial activity profiles of the two enantiomers of limonene and carvone isolated from the oils of Mentha spicata and Anethum sowa. *Flavour and Fragrance Journal*, 17(1), 59-63.
8. Bajaj, P., Singh, N. S., & Virdi, J. S. (2016). Escherichia coli β -Lactamases: What Really Matters. *Frontiers in Microbiology*, 7, 417. doi:10.3389/fmicb.2016.00417
9. Balakrishnan, A. (2015). Therapeutic Uses of Peppermint—A Review. *J. Pharm. Sci. & Res*, 7, 474-476.
10. Bello Gonzalez, T. D. J., Zuidema, T., Bor, G., Smidt, H., & van Passel, M. W. J. (2016). Study of the aminoglycoside subsistence phenotype of bacteria residing in the gut of humans and zoo animals. *Frontiers in Microbiology*, 6.

11. Boukhebt, H., Chaker, A. N., Belhadj, H., Sahli, F., Ramdhani, M., Laouer, H., & Harzallah, D. (2011). Chemical composition and antibacterial activity of *Mentha pulegium* L. and *Mentha spicata* L. essential oils. *Der Pharmacia Lettre*, 3(4), 267-275.
12. Naeem, A., Badshah, S. L., Muska, M., Ahmad, N., & Khan, K. (2016). The Current Case of Quinolones: Synthetic Approaches and Antibacterial Activity. *Molecules*, 21(4), 268.
13. Narayanan, N., Johnson, L., & MacDougall, C. (2016). Beyond Susceptible and Resistant, Part III: Treatment of Infections due to Gram-Negative Organisms Producing Carbapenemases. *The Journal of Pediatric Pharmacology and Therapeutics*, 21(2), 110-119.
14. NEYRIZ, N. M., RAZAVI, R. S., KARIM, G., RAZAVILAR, V., ZEYNALI, A., & DELSHAD, R. (2010). THE EFFECT OF MONOLAURIN IN COMBINATION WITH MENTHA PULEGIUM L. AND MENTHA SPICATA L. ESSENTIAL OILS ON BACILLUS CEREUS AND E. COLI O157: H7: IN VITRO STUDY. *VETERINARY CLINICAL PATHOLOGY*. 8(1):7657-666.
15. Nikaido H (2009). "Multidrug Resistance in Bacteria". *Annu. Rev. Biochem.* 78 (1): 119-46.
16. Oogai, Y., Matsuo, M., Hashimoto, M., Kato, F., Sugai, M., & Komatsuzawa, H. (2011). Expression of Virulence Factors by *Staphylococcus aureus* Grown in Serum. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(22), 8097-8105. doi:10.1128/aem.05316-11
17. Paterson, D. L., & Bonomo, R. A. (2005). Extended-Spectrum β -Lactamases: a Clinical Update. *Clinical microbiology reviews*, 18(4), 657-686. doi:10.1128/cmr.18.4.657-686.2005
18. Padmini, E., Valarmathi, A., & Rani, M. U. (2010). Comparative analysis of chemical composition and antibacterial activities of *Mentha spicata* and *Camellia sinensis*. *Asian J. Exp. Biol. Sci*, 1(4), 772-781.
19. Petrovic, J., Stanojkovic, A., Comic, L. J., & Curcic, S. (2004). Antibacterial activity of *Cichorium intybus*. *Fitoterapia*, 75(7), 737-739.
20. Piluzza, G., Sulas, L., & Bullitta, S. (2014). Dry matter yield, feeding value, and antioxidant activity in Mediterranean chicory (*Cichorium intybus* L.) germplasm. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 38(4), 506-514.
21. Rani, P., & Khullar, N. (2004). Antimicrobial evaluation of some medicinal plants for their anti-enteric potential against multi-drug resistant *Salmonella typhi*. *Phytotherapy Research*, 18(8), 670-673.
22. Salgado-Pabón, W., Herrera, A., Vu, B. G., Stach, C. S., Merriman, J. A., Spaulding, A. R., & Schlievert, P. M. (2014). *Staphylococcus aureus* β -toxin Production is Common in Strains With the β -toxin Gene Inactivated by Bacteriophage. *The Journal of Infectious Diseases*, 210(5), 784-792. doi:10.1093/infdis/jiu146
23. Seyyednejad, S. M., Koochak, H., Darabpour, E., & Motamedi, H. (2010). A survey on *Hibiscus rosa-sinensis*, *Alcea rosea* L. and *Malva neglecta* Wallr as antibacterial agents. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 3(5), 351-355.

24. Scavroni, J., Boaro, C. S. F., Marques, M. O. M., & Ferreira, L. C. (2005). Yield and composition of the essential oil of *Mentha piperita* L.(Lamiaceae) grown with biosolid. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17(4), 345-352.
25. Shallcross, L. J., Fragaszy, E., Johnson, A. M., & Hayward, A. C. (2013). The role of the Panton-Valentine leucocidin toxin in staphylococcal disease: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, 13(1), 43-54. doi:10.1016/s1473-3099(12)70238-4
26. Strycharz, S., & Shetty, K. (2002). Peroxidase activity and phenolic content in elite clonal lines of *Mentha pulegium* in response to polymeric dye R-478 and *Agrobacterium rhizogenes*. *Process Biochemistry*, 37(8), 805-812.
27. Spaulding, A. R., Salgado-Pabón, W., Kohler, P. L., Horswill, A. R., Leung, D. Y. M., & Schlievert, P. M. (2013). Staphylococcal and Streptococcal Superantigen Exotoxins. *Clinical microbiology reviews*, 26(3), 422-447. doi:10.1128/cmr.00104-12
28. Street, R. A., Sidana, J., & Prinsloo, G. (2013). *Cichorium intybus*: Traditional uses, phytochemistry, pharmacology, and toxicology. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.
29. Suwantararat, N., Logan, L. K., Carroll, K. C., Bonomo, R. A., Simner, P. J., Rudin, S. D., . . . Tamma, P. D. (2016). The Prevalence and Molecular Epidemiology of Multidrug-Resistant Enterobacteriaceae Colonization in a Pediatric Intensive Care Unit. *Infection control and hospital epidemiology*, 37(5), 535-543. doi:10.1017/ice.2016.16
30. Tokajian, S. (2014). New epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections in the Middle East. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(7), 624-628.
31. Zinnah, M., Bari, M., Islam, M., Hossain, M., Rahman, M., Haque, M., . . . Islam, M. (2007). Characterization of *Escherichia coli* isolated from samples of different biological and environmental sources. *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine*, 5(1), 25-32.