مقاله تحقیقی

مطالعه اثر ضد میکروبی و سینرژیک اسانس گیاه پونه (*Mentha pulegium* L.) و آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین در سویه های اشریشیاکلی جدا شده از عفونت ادراری

مارال غفاری[1]، معصومه مهدوی اورتاکند[1,*]، فهیمه باغبانی آرانی[2]

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

***مسئول مکاتبات:** گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین-پیشوا، ایران، ادرس الکترونیکی: masumehmahdavi@gmail.com

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

تاریخ دریافت:۹۵/۹/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۱/۲۴

فصلنامه علمی پژوهشی دانش زیستی ایران
جلد ۱۰- شماره۴- زمستان ۱۳۹۴

چکیده

عفونت دستگاه ادراری (UTIs) یکی از شایع‌ترین عفونتهای بیمارستانی می‌باشد که عامل این عفونت در اغلب موارد باکتری‌ها به خصوص باکتری‌های گرم منفی مانند اشرشیاکلی می‌باشد. با توجه به عوارض عفونت های ادراری، درمان سریع آنها اهمیت خاصی دارد. از بین فلوروکینولون‌ها، آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین بیشترین کاربرد را جهت درمان عفونت ادراری دارد، ولی در سال های اخیر میزان مقاومت این میکروارگانیسم ها به آن افزوده شده است. این امر منجر به افزایش تمایل به توسعه ترکیب های جدید ضد میکروبی موثرتر و بدون سمیت شده است. لذا، مطالعه حاضر به بررسی اثر ضد میکروبی و سینرژیک اسانس گیاه پونه (*Mentha pulegium*) و آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین در سویه های اشریشیاکلی جدا شده از عفونت ادراری پرداخت.۳۰ سویه اشریشیاکلی از عفونت ادراری بیماران مراجعه کننده به بیمارستان شرکت نفت جدا و توسط تستهای بیوشیمیایی شناسایی شد. سپس حداقل غلظت بازدارندگی اسانس پونه و سیپروفلوکساسین در سویه استاندارد و سویه‌های پاتوژن باکتری اشریشیاکلی به تنهایی تعیین شد. برای بررسی برهم کنش های ضدمیکروبی بین اسانس پونه با آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین از روش تیتراسیون چکربورد استفاده شد و شاخص غلظت های ممانعت کننده‌ی سهمی (FICI) محاسبه شد. اسانس پونه به تنهایی تاثیرات ضدمیکروبی علیه سویه‌های پاتوژن *E. coli* نشان داد. همچنین، اسانس پونه و آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین به طور توام روی۴۰ درصد از باکتری های پاتوژن اشریشیاکلی اثر سینرژیسم داشت. بر اساس نتایج به دست آمده اسانس پونه و آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین دارای اثر هم افزایی ضدباکتریایی قابل توجهی علیه باکتری *E. coli* می-باشد.

واژه های کلیدی: سینرژیک، سیپروفلوکساسین، اسانس پونه، اشریشیاکلی

مقدمه

اشریشیا کلی به عنوان یکی از مهمترین اعضای خانواده انتروباکتریاسه از عوامل شایع ایجاد کننده عفونت های ادراری می باشد (۱). اساس درمان مناسب در عفونت‌های ادراری، انتخاب یک آنتی‌بیوتیک با کارایی بالا، با کمترین مقاومت و بیشترین حساسیت می باشد (۲). در

هه های گذشته آنتی بیوتیک هایی از قبیل آمپی‌سیلین کوتریموکسازول برای درمان عفونت های ادراری ناشی از شریشیا کلی استفاده می گردید، ولی امروزه لوروکینولون‌ها آنتی بیوتیک ارجح در شروع درمان جربی عفونت های ادراری می باشند. به همین خاطر حث مقاومت به آن همیشه مورد توجه قرار گرفته است. از ین فلوروکینولون ها سیپروفلوکساسین خوراکی یا وریدی ه خاطر جذب سریع و ترشح مناسب به داخل ادرار یشترین کاربرد را جهت درمان عفونت ادراری دارد (۳). لوروکینولون ها به طور انتخابی و برگشت پذیر، زیرواحد A آنزیم DNA جیراز و توپوایزومراز IV را مهار نموده و شکیل آنالوگ کمپلکس باز شدن پیچ های اضافی Rilaxation) را القا می نمایند (۴). به دلیل مصرف بیش ز حد و بی رویه این آنتی بیوتیک ها، مقاومت دارویی چندگانه و شکست درمان در این ارگانیسم ها افزایش افته است. مقاومت به کینولون ها به طور عمده به واسطه وتاسیون در زیر واحد A آنزیم DNA جیراز وابسته به روموزوم می باشد (۵). در باکتری های گرم منفی، وپوایزومراز IV، یک هدف ثانویه برای کینولون ها است. ن های qnr مسئول مقاومت پلاسمیدی به کینولون ها وده و از اثر مهاری این آنتی بیوتیک ها بر آنزیم های DNA جیراز و توپوایزومراز IV جلوگیری می کنند (۶).

در دو دهه اخیر عوارض جانبی داروهای شیمیایی و زامات زیست محیطی سبب گرایش تدریجی به سمت یاه درمانی شده است. به این منظور و برای افزایش طیف ثر ضد میکروبی آنتی بیوتیک ها از ترکیبات موثره گیاهان ه صورت سینرژیک با آنتی بیوتیک ها استفاده شده است. ز جمله این مطالعات می توان به بررسی اثر سینرژیک صاره زردچوبه و آنتی بیوتیک های مختلف را روی شکیل بیوفیلم باکتری های گرم مثبت و گرم منفی اشار مود که توسط Kali و همکارانش در سال 2016 انجام شد نتایج آن نشان داد که عصاره زردچوبه می تواند نقش وثری در درمان عفونت‌ها به عنوان مکمل با آنتی‌بیوتیک- ا داشته باشد (۷). در سال ۲۰۱۳، Coelho و همکارانش ثر سینرژیک اسانس گیاهان *Cinnamomum zeylanicum* و *Melaleuca alternifolia* و *Cymbopogon martin* با سیپروفلوکساسین را روی بیوفیلم سودوموناس آئروژینوزا بررسی و تایید نمودند (۸). همچنین مطالعه‌ی دیگر نشان داد اسانس لیمو *Citrus limon* و دارچین *Cinnamomum zeylanicum* با آنتی بیوتیک‌های آمیکاسین، جنتامایسین روی باکتری *A. baumanii* اثر سینرژیک دارد (۹). گیاه پونه (*Mentha pulegium*) یکی از گونه‌های دارویی تیره نعناع است و تحقیقات نشان می دهند که اسانس این گیاه دارای قدرت ضد باکتریایی در برابر سالمونلا تیفی موریوم، لیستریا مونوسیتوژنز، اشریشیاکلی، باسیلوس‌سرئوس، کلستریدیوم پرفرینجنز، استافیلوکوکوس اورئوس، هلیکوباکتر پیلوری، سودوموناس آئروژینوزا، کلبسیلا پنومونی و بروکوتریکس ترموسفاکتا هستند (۱۰،۱۱).

هدف از مطالعه بررسی برهم کنش های ضد میکروبی اسانس پونه *Mentha pulegium* با آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین بر علیه باکتری اشریشیاکلی به شکل یکی از چهار حالت احتمالی هم افزایی، افزایشی، عدم تأثیر و یا کاهش اثر می باشد. این گونه مطالعات در گام اول در شرایط آزمایشگاهی (مشابه با پژوهش پیش روی)، سپس تعمیم در سیستم های مدل حیوانی و در صورت نتایج مفید و مثبت، در نهایت به شکل کاربردی در صنعت دارو قابل اجرا می باشند.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌های بالینی و تهیه نمونه استاندارد

در این مطالعه تعداد ۳۰ سویه باکتری اشریشیاکلی از کشت ادراری بیماران مبتلا به عفونت مجاری ادراری مراجعه کننده به بیمارستان شرکت نفت در بهار ۱۳۹۵، جمع‌آوری شد. به منظور شناسایی و اطمینان از خالص بودن نمونه ها، هر نمونه به طور مجزا، توسط رنگ آمیزی گرم و سپس توسط آزمون‌های بیوشیمیایی متداول برای انتروباکتریاسه مانند کشت در محیط EMB، TSI، SIM، سیمون سیترات و اوره، بررسی و باکتری اشریشیاکلی تأیید شد. نمونه‌ها برای نگهداری طولانی مدت، در محیط کشت BHI براث حاوی ۱۵٪ گلیسرول کشت و در فریزر منهای ۲۰ درجه سانتیگراد ذخیره‌سازی شدند تا در آزمایشات بعدی، مورد استفاده قرار گیرند. نمونه استاندارد مورد مطالعه *E. coli* (ATCC 25922) بود که به صورت

لیوفریزه از کلکسیون میکروبی ایران در انستیتیو پاستور خریداری شد.

استخراج اسانس پونه و آنالیز ترکیبات تشکیل دهنده آن

به منظور تهیه اسانس اندام های هوایی، گیاه پونه *Mentha pulegium* 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 پونه 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[1]) اسانس پونه و آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین به تنهایی

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی اسانس پونه بر اساس استاندارد CLSI, 2016 به روش میکرودایلوشن براث انجام شد. در این روش از میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای استفاده گردید. ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های ۱۲۸، ۶۴، ۳۲، ۱۶، ۸، ۴، ۲، ۱، ۰/۵، ۰/۲۵، ۰/۱۲، ۰/۰۶ میکروگرم بر میلی لیتر از اسانس گیاه پونه براساس روش سریال دایلوشن به یک ردیف از چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ تایی افزوده شد. ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی که با نیم مک فارلند برابر شده بود به هر چاهک افزوده شد. در این آزمون به منظور کنترل محیط کشت، از محیط کشت خالی (بدون اسانس گیاه پونه و سوسپانسیون میکروبی) استفاده گردید. به منظور کنترل زمینه از اسانس گیاه پونه و محیط کشت (بدون سوسپانسیون میکروبی) استفاده شد. یک چاهک هم به منزله کنترل محلول ۵ درصد DMSO در نظر گرفته شد. همچنین سوسپانسیون میکروبی و محیط کشت بدون اسانس گیاه پونه به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. حجم نهایی تمام چاهک ها ۲۰۰ میکرولیتر بود. در نهایت میکروپلیت بر روی شیکر (۲۵۰ rpm) به مدت ۱ دقیقه قرار داده شده تا مخلوط کاملاً یکنواخت گردد. سپس میکروپلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، انکوبه شد. بعد از ۲۴ ساعت، پایین‌ترین غلظتی که در آن هیچ گونه رشد باکتری مشاهده نشد به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) تعیین شد. تمام مراحل برای سویه استاندارد و ۳۰ سویه پاتوژن باکتری اشریشیاکلی با ۳ تکرار انجام شد. حداقل غلظت بازدارندگی آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین نیز به همین روش تعیین شد.

بررسی برهم کنش های ضدمیکروبی بین اسانس پونه با آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین به صورت توام

برای بررسی برهم کنش های ضدمیکروبی بین اسانس پونه با آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین از روش تیتراسیون

[1] Minimum Inhibitory Concentration

چکربورد[2] استفاده شد. با توجه به MIC به دست آمده در قسمت قبل، رقت های ۳۲، ۱۶، ۸، ۴، ۲، ۱، ۰/۵ ، ۰/۲۵ میکرولیتر بر میلی لیتر از اسانس پونه و رقت‌های ۸، ۴، ۲، ۱، ۰/۵، ۰/۲۵، ۰/۱۲، ۰/۰۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر از آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین در نظر گرفته شد. نتایج حاصل از این آزمون به صورت غلظت ممانعت کننده‌ی سهمی (FIC[3]) بیان شد (۱۳).

$$\text{FIC (آنتی‌بیوتیک یا اسانس)} = \frac{\text{MIC (آنتی‌بیوتیک یا اسانس) در ترکیب}}{\text{MIC (آنتی‌بیوتیک یا اسانس) به تنهایی}}$$

از مجموع FIC هر یک از عوامل ضد میکروبی (اسانس و آنتی‌بیوتیک)، شاخص غلظت های ممانعت کننده‌ی سهمی[4] (FICI) به دست می‌آید. پس از محاسبه FICI تفسیر نتایج با استفاده از دستورالعمل کمیته‌ی اروپایی آزمون سنجش حساسیت ضدمیکروبی (EUCAST) صورت پذیرفت. بر این اساس چنان‌چه FICI کوچک‌تر یا مساوی با ۰/۵ باشد، برهم کنش از نوع هم‌افزایی (Synergism)، بزرگ تر از ۰/۵ تا ۱ از نوع افزایشی (Additive) و بزرگ‌تر از ۱ تا کوچک تر از ۲ از نوع عدم تأثیر(Indifferent) و مساوی یا بزرگ تر از ۲ از نوع نامساوی (Antagonism) می‌باشد (۱۴).

نتایج

نتایج آنالیز ترکیبات تشکیل دهنده اسانس پونه

اسانس استخراج شده از گیاه به آزمایشگاه تخصصی منتقل شد و در آنجا حجم ۱ میکرولیتر از آن به دستگاه GC-MS تزریق شد. با توجه به الگوی خروج آلکان های نرمال، شاخص بازداری و اندیس کواتس و تطبیق آنها با الگوهای کتابخانه ای، طیف های مربوط به هر ترکیب تفسیر و ترکیبات عمده تشکیل دهنده اسانس شناسایی شدند. شکل ۱ کروماتوگرام حاصل از آنالیز ترکیبات موجود در اسانس گیاه پونه را نشان می دهد. مهمترین ترکیبات تشکیل دهنده عبارت بودند از پولگون درصد ۴۴/۶، پیپریتون ۲۰/۱۹ درصد، منتون ۹/۷ درصد، آلفا ترپینئول ۳/۷ درصد ، کاریوفیلن ۳ درصد.

بررسی حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) اسانس پونه و آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین

حداقل غلظت بازدارنده اسانس پونه به تنهایی و صورت توام با آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین برای تمام باکتری های مورد مطالعه به روش میکرودایلوشن براث به دست آمد (شکل ۲). در چاهک های کنترل محیط کشت، کنترل زمینه، کنترل DMSO هیچ کدورتی مشاهده نشد چاهک کنترل مثبت کدر بود که حاکی از رشد باکتری ها می باشد. در جدول ۱ نتایج MIC اسانس پونه و سیپروفوکساسین به تنهایی و نیز در ترکیب با یکدیگر برای سویه استاندارد و ۳۰ سویه پاتوژن باکتری اشریشیاکلی نشان داده شده است.

بررسی برهم کنش های ضدمیکروبی بین اسانس پونه با آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین

برای بررسی برهم کنش ضدمیکروبی اسانس پونه و سیپروفلوکساسین، ابتدا غلظت ممانعت کننده‌ی سهمی (FIC) محاسبه شد که از تقسیم MIC در ترکیب یک عامل ضد میکروب در MIC به تنهایی آن عامل ضد میکروب به دست آمد. در نهایت از مجموع FIC عوامل ضد میکروبی (اسانس و آنتی‌بیوتیک)، شاخص غلظت های ممانعت کننده‌ی سهمی (FICI) حاصل شد. پس از محاسبه FICI تفسیر نتایج با استفاده از دستورالعمل کمیته‌ی اروپایی آزمون سنجش حساسیت ضدمیکروبی (EUCAST) صورت می گیرد. نتایج FIC اسانس پونه و FIC سیپروفلوکساسین و نیز FIC index و نحوه برهم کنش ضد میکروبی آنها روی سویه های باکتری اشریشیاکلی در جدول ۱ نشان داده شده است.

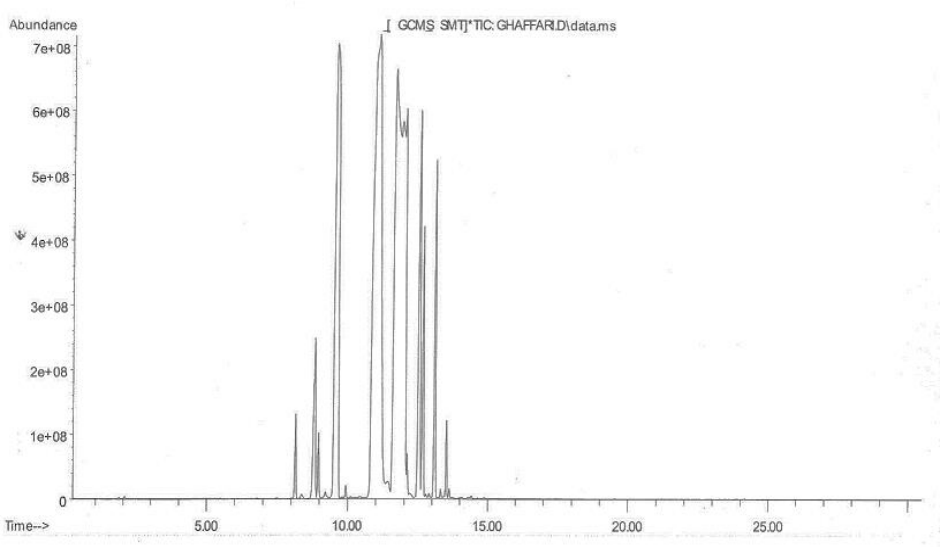
درصد فراوانی نسبی نوع بر همکنش اسانس پونه و سیپروفلوکساسین برای ۳۰ سویه پاتوژن باکتری اشریشیاکلی در جدول ۲ نشان داده شده است. بر اساس نتایج به دست آمده اسانس پونه و سیپروفلوکساسین به صورت توام بر روی ۴۰ درصد از باکتری های پاتوژن مورد

[2] Checkerboard titration
[3] Fractional Inhibitory Concentration
[4] Fractional Inhibitory Concentration Index

مطالعه اثر سینرژیک و روی ۱۷ درصد دیگر از آنها اثر افزایشی داشت.

بحث و نتیجه گیری

عفونت ادراری دومین عفونت شایع جامعه و از علل عمده مراجعه بیماران به بیمارستان ها می‌باشد و سالانه صد و پنجاه میلیون نفر به عفونت ادراری مبتلا می شوند. باکتری های فراوانی قادر به ایجاد عفونت در سیستم ادراری می باشند که در بین آن‌ها اشریشیاکلی در اغلب موارد، عامل عفونت ادراری است (۱۵). از آنجایی که مقاومت به کینولون ها در انتروباکتریاسه به طور افزاینده ای گزارش شده است و شکست درمان عفونت های ناشی از این باکتری ها هزینه های سنگینی را برای سیستم بهداشتی فراهم می آورد، می توان با تجویز توام آنتی بیوتیک و اسانس های گیاهی به درمان عفونت های ناشی از این باکتری و کاهش مقاومت باکتری ها کمک نمود و در نتیجه منجر به کاهش بار اقتصادی ناشی از درمان نمود.



شکل ۱- کروماتوگرام اسانس گیاه پونه بدست آمده از دستگاه GC-MS.

شکل ۲- یکی از میکروپلیت‌های ۹۶ خانه ای برای تعیین MIC اسانس پونه و سیپروفلوکساسین به صورت توام.

این پژوهش با هدف بررسی اثر هم‌افزایی اسانس گیاه پونه و سیپروفلوکساسین بر سویه های اشریشیا کلی جدا شده از عفونت ادراری انجام گرفت. ترکیب اصلی تشکیل دهنده اسانس شامل پولگون با ۴۴/۶ درصد به دست آمد که یک ترکیب آروماتیک از نوع مونوترپن است که دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی قوی می-باشد. در مطالعه ای که Tutar و همکارانش در سال۲۰۱۶ انجام داد، بیشترین ترکیبات اصلی اسانس *M. pulegium* را پیپریتنون (۱۶٫۳۴٪) و پولگون (۱۳٫۷۲٪) گزارش داد (۱۶). Zanjani و همکارانش در سال ۲۰۱۵ ترکیب شیمیایی اسانس *M. pulegium* را با استفاده از روش GC-MSتعیین نمودند. عمده ترکیبات تشکیل دهنده

عبارت بودند از پولگون ۲۰ درصد و پیپریتنون ۱۴/۱۵ درصد (۱۷). Agnihotri و همکارانش نیز ترکیبات اصلی اسانس این گیاه را که از مناطق مختلف هند جمع‌آوری شده بود، پولگون (۱٪-۸۳٪/۹-۶۵٪) و منتون (۷٪-۸٪) گزارش نمودند (۱۸). اصولاً کمیت و کیفیت ترکیبات متشکله اسانس بـه شدت تحت تأثیر عوامـل محیطی مختلف مانند مناطق جغرافیایی، عوامل ژنتیکی، دوران رشد و نموی گیاه و زمان برداشت بستگی دارد.

جدول ۱- نتایج MIC اسانس پونه و سیپروفوکساسین به تنهایی، MIC اسانس پونه و سیپروفوکساسین در ترکیب با یکدیگر، نتایج FIC اسانس پونه و سیپروفلوکساسین، نتایج FIC index و نحوه برهم کنش ضد میکروبی آنها برای سویه استاندارد و ۳۰ سویه پاتوژن باکتری اشریشیاکلی. CIP سیپروفلوکساسین و EO اسانس پونه.

اشریشیاکلی	MIC CIP به تنهایی (µg/mL)	MIC EO به تنهایی (µl/ml)	MIC CIP در ترکیب (µg/mL)	MIC EO در ترکیب (µl/ml)	FIC CIP	FIC EO	FIC index	اثر برهم کنش ضدمیکروبی
ATCC 25922	۲	۰/۵	۰/۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۵	۰/۷۵	افزایشی
سویه ۱	۱	۲	۰/۲۵	۱	۰/۲۵	۰/۵	۰/۷۵	افزایشی
سویه ۲	۰/۲۵	۱	۰/۰۶	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۵	سینرژیک
سویه ۳	۸	۶۴	۸	۴	۱	۰/۰۶	۱/۰۶	بی تاثیر
سویه ۴	۱	۱۶	۰/۵	۴	۰/۵	۰/۰۳	۰/۵۳	افزایشی
سویه ۵	۰/۵	۴	۲	۰/۲۵	۴	۰/۰۶	۴/۰۶	آنتاگونیسم
سویه ۶	۲	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۲۵	۱	۱/۲۵	بی تاثیر
سویه ۷	۸	۳۲	۱	۸	۰/۱۲	۰/۲۵	۰/۳۷	سینرژیک
سویه ۸	۱۶	۱۲۸	۲	۳۲	۰/۱۲	۰/۲۵	۰/۳۷	سینرژیک
سویه ۹	۴	۴	۲	۰/۲۵	۰/۵	۰/۰۶	۰/۵۶	افزایشی
سویه ۱۰	۸	۲	۰/۵	۰/۲۵	۰/۰۶	۰/۱۲	۰/۱۸	سینرژیک
سویه ۱۱	۱۶	۶۴	۲	۱۶	۰/۰۶	۰/۲۵	۰/۳۱	سینرژیک
سویه ۱۲	۰/۱۲	۱	۰/۵	۲	۴/۱۶	۲	۶/۱۶	آنتاگونیسم
سویه ۱۳	۱۶	۱۲۸	۱	۴	۰/۲۵	۰/۰۳	۰/۲۸	سینرژیک
سویه ۱۴	۴	۸	۰/۵	۴	۰/۵	۰/۲۵	۰/۷۵	افزایشی
سویه ۱۵	۰/۵	۰/۲۵	۲	۰/۲۵	۴	۱	۵	آنتاگونیسم
سویه ۱۶	۱	۸	۲	۰/۲۵	۰/۵	۰/۰۳	۰/۵۳	افزایشی
سویه ۱۷	۱	۱	۰/۵	۰/۲۵	۰/۰۶	۰/۲۵	۰/۳۱	سینرژیک
سویه ۱۸	۸	۳۲	۰/۰۶	۳۲	۰/۰۶	۱	۱/۰۶	بی تاثیر
سویه ۱۹	۰/۱۲	۰/۲۵	۰/۵	۰/۲۵	۴/۱۶	۱	۵/۱۶	آنتاگونیسم
سویه ۲۰	۰/۰۶	۱	۰/۵	۰/۲۵	۸/۳۳	۰/۲۵	۸/۵۸	آنتاگونیسم
سویه ۲۱	۴	۸	۲	۱	۰/۵	۰/۱۲	۰/۶۲	افزایشی
سویه ۲۲	۱۶	۶۴	۴	۱۶	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۵	سینرژیک
سویه ۲۳	۸	۳۲	۰/۵	۸	۰/۰۶	۰/۲۵	۰/۳۱	سینرژیک
سویه ۲۴	۴	۳۲	۰/۲۵	۴	۰/۰۶	۰/۱۲	۰/۱۸	سینرژیک
سویه ۲۵	۱	۸	۱	۴	۱	۰/۵	۱/۵	بی تاثیر

سویه ۲۶	۴	۸	۲	۴	۰/۵	۰/۵	۱	افزایشی
سویه ۲۷	۸	۶۴	۲	۱۶	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۵	سینرژیک
سویه ۲۸	۴	۲	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۰۶	۰/۱۲	۰/۱۸	سینرژیک
سویه ۲۹	۴	۴	۲	۸	۰/۵	۲	۲/۵	آنتاگونیسم
سویه ۳۰	۲	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۱۲	۱	۱/۱۲	بی تاثیر

جدول ۲- تعداد و درصد فراوانی نسبی نوع بر همکنش اسانس پونه و آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین در سویه های پاتوژن اشریشیاکلی

	تاثیر			
	سینرژیسم	افزایشی	بی تاثیر	آنتاگونیسم
تعداد باکتری	۱۲	۷	۵	۶
درصد فراوانی نسبی	۴۰	۲۳	۱۷	۲۰

اثر ضدمیکروبی اسانس پونه به روش میکرودایلوشن براث بررسی شد و MIC آن در ۳۰ سویه مورد بررسی بین ۱۲۸ -۰/۲۵ µl/ml به دست آمد. در سایر تحقیقات مشابهی که اثر ضدمیکروبی اسانس پونه مطالعه نموده اند، میزان MIC بر علیه اشریشیاکلی بین ۳/۲ -۱۶۰ µl/ml گزارش شده است که علت این مقادیر متفاوت می‌تواند به دلیل انتخاب قسمت‌های مختلف گیاه برای اسانس‌گیری در این مطالعات یا مقادیر متفاوت ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس آنها باشد (۱۹ و ۲۰). در بخش دیگر این تحقیق از روش میکروبراث دایلوشن برای تعیین حداقل غلظت بازدارنده آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین استفاده شد و MIC سویه های پاتوژن اشریشیاکلی به دست آمد که این نتایج نشان می دهد ۱۷ سویه (۵۶ درصد) از باکتری های مورد بررسی MIC بیشتر یا مساوی از ۴ µg/mL برای آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین دارند و بر اساس استاندارد CLSI, 2016 نسبت به این آنتی بیوتیک مقاوم هستند. Mandal و همکاران در سال ۲۰۱۰ در هندوستان، مطالعه ی بر روی ۲۷۶۱ نمونه اشریشیاکلی انجام دادند و در نهایت ۷۳ درصد آنها را مقاوم به سیپروفلوکساسین گزارش نمودند (۲۱). Santiso و همکارانش در سال ۲۰۰۹ از ۹۵ گونه بالینی اشریشیاکلی، ۷۴ ایزوله مقاوم به سیپروفلوکساسین (۷۷/۹ درصد) را مشاهده کردند (۲۲). در مطالعه ای دیگر Colodner و همکارانش در سال ۲۰۰۸، مقاومت اشریشیاکلی به سیپروفلوکساسین را ۵۰ درصد گزارش کردند (۲۳). این مطالعات موید نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر است.

در یافته های حاصل از تحقیق حاضر اسانس پونه به صورت ترکیبی با آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین دارای اثرات افزایشی (۲۳٪) و سینرژیک (۴۰٪) علیه سویه‌های باکتری اشریشیاکلی جدا شده از عفونت ادراری بود و همچنین در۲۰ درصد نمونه ها اثر آنتاگونیسم داشته و در ۱۷ درصد نمونه ها تاثیری مشاهده نشد. مشابه این تحقیق، می توان به بررسی اثر سینرژیک اسانس گیاه *Thymus maroccanus* و *Thymus broussonetii* و آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین اشاره کرد که بر روی تعدادی باکتری عامل عفونت بیمارستانی مانند سالمونلا، اشریشیاکلی، باسیلوس سرئوس، باسیلوس سوبتیلیس، استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس آئروژینوزا، کلبسیلا پنومونی بررسی شد و نتایج آن نشان داد که اسانس گیاهان مذبور با آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین بر روی باکتری اشریشیاکلی اثر هم افزایی دارد (۲۴). در مطالعه ای دیگر اثر هم افزایی گیاه *Pelargonium graveolens* با آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین روی باکتری های کلبسیلا پنومونیه و استافیلوکوکوس اورئوس با تعیین شاخص FIC اثبات شد (۲۵). عبدی‌عالی و همکاران نیز اثر سینرژیستی

عصاره بوتانلی گیاه *Cyclamen coum* و آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین را بر مهار تشکیل بیوفیلم سودوموناس آئروژینوزا بررسی نمودند. آنها فعالیت ضد بیوفیلمی معنی‌داری را در حضور ترکیب عصاره گیاه و آنتی بیوتیک مذکور گزارش نمودند (۲۶).

گرچه در مطالعه حاضر نیز مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های اشریشیاکلی جدا شده از عفونت ادراری در حضور آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین علیه برخی سویه های باکتری مشاهده شد، ولی سیپروفلوکساسین هنوز در درمان عفونت های ادراری به عنوان یکی از آنتی بیوتیک های موثر مطرح می باشد که باکتری های مولد عفونت ادراری نسبت به آن حساسیت دارند. ولی ممکن است استفاده نامناسب و بی رویه از این آنتی بیوتیک سبب افزایش مقاومت میکروبی نسبت به آن شود، از این رو در تحقیق حاضر سعی بر پیدایش راهی مناسب برای غلبه بر بروز احتمالی این مشکل شده است. طبق نتایج به دست آمده، کاربرد توام سیپروفلوکساسین و اسانس گیاه پونه می تواند جایگزین مناسبی درمان عفونت های ادراری باشد.

یافته‌های این پژوهش، خاصیت ضد باکتریایی سینرژیک اسانس پونه و آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین را روی ۴۰ درصد از سویه های پاتوژن اشریشیاکلی به خوبی آشکار ساخت و نشان داد که در صورت استفاده توام آنها می تواند به مهار رشد باکتری ها منجر شود. با توجه به اثرات هم افزاینده‌ی آنتی بیوتیک‌ها و ترکیبات گیاهی، به نظر می رسد کاربرد توأم 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 می‌باشد.

منابع مورد استفاده

1. Murray, P. R., Rosenthal, K. S., Pfaller, M. A., 2009. Medical Microbiology. Elsevier Mosby. 6th ed. 303-307.
2. Hamid-Farahani, R., Tajik, A., Noorifard, M., Keshavarz, A., 2012. Antibiotic resistance pattern of *E.coli* isolated from urine culture in 660 Army clinical laboratory center in Tehran 2008. J Army Univ Med Sci 10(1): 45-49.
3. Brooks, G. F., Karroll, K. C., Butel, J. S., Morse, S. A., Mietzner., T. A., Melnick, J., Adelberg's., 2013. Medical Microbiology. McGraw-Hill. 26th ed. Pp. 233-236.
4. Balous, A., Isenberg, H. D., 2011. Manual of clinical microbiology, 6th ed. pages: 1099-1103.
5. Heisig, P., 1996. Genetic evidence for a role of par C mutations in development of high-level fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy 40: 879-885.
6. Fu, Y., Zhang, W., Wang, H., Zhao, S., Chen, Y., Meng, F., et al., 2013. Specific patterns of gyrA mutations determine the resistance difference to ciprofloxacin and levofloxacin in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. BMC Infectious Diseases 13: 8-15.
7. Kali, A., Bhuvaneshwar, D., Charles, P. M., & Seetha, K. S. 2016. Antibacterial synergy of *curcumin* with antibiotics against biofilm producing clinical bacterial isolates. Journal of Basic and Clinical Pharmacy 7(3): 93.
8. Coelho, F. A. B. L., Pereira, M. O., 2013. Exploring new treatment strategies for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections based on plant essential oils. Microbial pathogens and strategies for combating them: Science, Technology and Education 1: 83-89.
9. Guerra, F. Q. S., Mendes, J. M., De Sousa, J. P., et al., 2012. Increasing antibiotic activity against a multidrug-resistant *Acinetobacter spp*. By essential oils of *Citrus limon* and *Cinnamomum zeylanicum*. Nat Prod Res 26: 2235-2238.
10. Bonyadian, M., Moshtaghi, H., 2009. Bacteriocidal activity of some plants essential oil on isolates of *Klebsialla sp*. Pakistan J Biol Sci 12(2): 183-5.
11. Mahboubi, M., Haghi, G., 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. Journal of Ethnopharmacology 119(2): 325-327.
12. Adams, R.P., 2001. Identification of essential oil components by gas chromatography/ quadropole mass spectroscopy carol stream IL. Allured Publishing Crop. Pp. 465.

13. Pillai, S. K., Moellering, R. C., Eliopoulos, G. M., 2005. Antimicrobial combinations. In: Lorian V, ed. Antibiotics in laboratory medicine. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins, 365-440.
14. EUCAST. 2000. Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (EUCAST) definitive document E. Def 1.2, 503–508, CMI, Vol. 6.
15. Hamid-Farahani, R., Tajik, A., Noorifard, M., Keshavarz, A., 2012. Antibiotic resistance pattern of *E. coli* isolated from urine culture in 660 Army clinical laboratory center in Tehran. J Army Univ Med Sci 10(1): 45-49.
16. Tutar, U., Çelik, C., Karaman, İ., Ataş, M., Hepokur, C., 2016. Anti-biofilm and antimicrobial activity of *Mentha pulegium* L essential oil against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Tropical Journal of Pharmaceutical Research 15(5): 1039-1046.
17. Zanjani, K., Mohammadi, N., Zojaji, M., Bakhoda, H., 2015. Chemical composition of the essential oil of *Mentha pulegium* L. and its Antimicrobial Activity on *Proteus mirabilis*, *Bacillus subtilis* and *Zygosaccharomyces rouxii*. Journal of Food Biosciences and Technology 5(2): 31-40.
18. Agnihotri, V. K., Agarwal, S. G., Dhar, P. L., Thappa, R. K., Kapahi, B. K., Saxena, R. K., Qazi, G. N., 2005. Essential oil composition of *Mentha pulegium* L. growing wild in the North-Western Himalayas India. Flavour Fragr J 20(6): 607-610.
19. Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Batista, I., Serrano, C., Matos, O., Neng, N. R., Nogueira, J. M., Saraiva, J. A., Nunes, M. L., 2012. European pennyroyal (*Mentha pulegium*) from Portugal: Chemical composition of essential oil and antioxidant and antimicrobial properties of extracts and essential oil. Industrial Crops and Products 36(1): 81-87.
20. Marzouk, B., Fredj, M. B. H., Chraief, I., Mastouri, M., Boukef, K. and Marzouk, Z., 2008. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from Tunisian *Mentha pulegium*. Journal of Food Agriculture 6(1): 78.
21. Mandal, J., Acharya, N. S., Buddhapriya, D., Parija, S. C., 2012. Antibiotic resistance pattern among common bacterial uropathogens with a special reference to ciprofloxacin resistant *Escherichia coli*. The Indian Journal of Medical Research 136: 842-9.
22. Saniso, R., Tamayo, M., Fernandez, J. L., Fernandez, D. L. M., Molina, F., Villanueva, R., et al., 2009. Rapid and simple determination of ciprofloxacin resistance in clinical strains of *Escherichia coli*. J Clin Microbiol 47: 2593-5.
23. Colodner, R., Kometiani, I., Chazan, B., Raz, R., 2008. Risk factors of community-acquired urinary tract infection due to quinolone-resistant *E. coli*. Infection 36: 41-5.
24. Fadli, M., Saad, A., Sayadi, S., et al., 2012. Antibacterial activity of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* essential oils against nosocomial infection–bacteria and their synergistic potential with antibiotics. Phytomedicine 19: 464–71.
25. Malik, T., Singh, P., Pant, S., et al., 2011. Potentiation of antimicrobial activity of ciprofloxacin by *Pelargonium graveolens* essential oil against selected uropathogens. Phytother Res 25: 1225–8.
26. Abdi-Ali, A., ahafiei, M., Ahahcheraghi, F., Saboora, A., Ghazanfari, T., 2015. The Study of Synergistic Effects of n. butanolic *Cyclamen coum* Extract and Ciprofloxacin on inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. BJM 3(12): 25-32.