Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences and Health Services
Vol. 37, No. 3, Aug. – Sep. 2015, Pages: 18-25

Antibacterial Effects of the Essential Oils and Ethanol Extracts of the Native Plants; *Ziziphora Clinopodioides* on 3 Species of Urinary Tract Isolated Bacteria in Rats' Experimental Model

Younes Anzabi, Arash Khaki*

Department of Pathobiology, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran

Received: 28 Feb, 2015 Accepted: 3 May, 2015

Abstract

Background and Objectives: After *Staphylococcus aureus* and *E.coli*, *Pseudomonas aeroginosa* has been the third most common cause of nosocomial infections and their active opportunistic transport, occurs due to the disregarding public health, So this study was done in order to investigate the antibacterial effects of Essential oils and Ethanol extracts of the Native Plants, *Ziziphora Clinopodioides* on the isolated bacteria from the urinary tract of laboratory rats, as an experimental model.

Materials and Methods: Under sterile conditions, required amount of urine collection was taken from 40 healthy Wistar rats and after identifying the isolates with standard microbiologic methods, to determine the antimicrobial effects of essential oils and ethanol extracts of that native plants on the isolates, MIC, MBC and antibiogram tests was performed.

Results: The results showed that both essential oils and ethanol extracts of *Ziziphora Clinopodioides* have inhibitory and bactericidal effects on all isolated bacteria except for *Pseudomonas aeruginosa* and comparison of the inhibitory and bactericidal effects of these compounds revealed that the essential oils of this plant compared to its extracts is able to inhibit the growth isolated bacteria with low concentrations. Also, there was a significant difference between the antibacterial activity of these plants ($P<0.05$).

Conclusions: It seems that we can use the compounds of *Ziziphora Clinopodioides* as the appropriate antibacterial materials against bacteria such as opportunistic pathogens (except for *Pseudomonas aeruginosa*), that may cause the human infections

Keywords: Antibacterial effects, Essential oils, Ethanol extracts, Urinary Truct, Rats

*Corresponding Author:
E-mail: khaki@iaut.ac.ir

اثرات ضد باکتریایی اسانس و عصاره اتانولی گیاه بومی کاکوتی کوهی بر سه گونه از جدایه‌های مجرای ادراری در مدل تجربی موش صحرائی

یونس انزابی، آرش خاکی*

گروه پاتوبیولوژی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی تبریز، تبریز، ایران

دریافت: ۹۳/۱۲/۹ پذیرش: ۹۴/۲/۱۳

چکیده

زمینه و اهداف: بعد از استافیلوکوکوس آرئوس و اشرشیا کلی، سودوموناس آئروژینوزا سومین عامل شایع عفونت‌های بیمارستانی بوده و انتقال فعال و فرصت طلبانه آنها غالباً به علت عدم رعایت موازین بهداشت عمومی صورت می‌گیرد، لذا این پژوهش با هدف بررسی اثرات ضد باکتریائی گیاه بومی کاکوتی کوهی بر روی جدایه‌های باکتری‌های مذکور از مجرای ادراری موش‌های صحرائی آزمایشگاهی، به عنوان مدل تجربی، انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: از ۴۰ سر موش صحرائی نژاد ویستار سالم، تحت شرایط استریل، مقدار لازم نمونه ادرار اخذ و پس از شناسائی جدایه‌های مذکور با استفاده از روش‌های استاندارد میکروبشناسی، به منظور تعیین اثرات ضد باکتریائی اسانس و عصاره اتانولی گیاه بومی مورد آزمایش بر روی جدایه‌های مورد نظر، آزمایشات تعیین MIC، MBC و آنتی‌بیوگرام انجام گردید.

یافته‌ها: مشخص شد که هم اسانس و هم عصاره اتانولی کاکوتی کوهی برجدایه‌های مورد بررسی به جز جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا دارای اثرات ضد باکتریایی بوده و مقایسه اثرات مهار رشد و باکتری کشی ترکیبات مذکور نشان داد که اسانس این گیاه در غلظت‌های کمتری نسبت به عصاره دارای اثرات ضد باکتریائی می‌باشد. همچنین مشخص شد که در سطح اطمینان $P < ۰/۰۵$ بین اثر ضد باکتریائی ترکیبات گیاه مذکور و آنتی بیوتیک استاندارد آمیکاسین اختلاف معنی‌دار وجود دارد.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که از ترکیبات گیاه خوراکی و بومی کاکوتی کوهی، به عنوان مواد آنتی باکتریال مناسب، می‌توان علیه اغلب پاتوژن‌های فرصت‌طلب (بجز سودوموناس آئروژینوزا) که توانائی ایجاد عفونت‌های مختلف در انسان را هم دارا هستند، استفاده کرد.

کلید واژه‌ها: اثرات ضد باکتریایی، اسانس، عصاره اتانولی، مجرای ادراری، موش صحرا

* ایمیل نویسنده رابط: khaki@iaut.ac.ir

مقدمه

عفونت‌های بیمارستانی از جمله معضلات و مشکلات مهم پزشکی در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه محسوب می‌شود (۱). در این خصوص بعد از استافیلوکوکوس آرئوس و اشرشیاکلی در بیشتر موارد سودوموناس آئروژینوزا سومین عامل شایع عفونت‌های مذکور می‌باشد که انتقال فعال نوزوکومیالی آنها غالباً به علت عدم رعایت موازین بهداشت عمومی پرسنل بیمارستانی، بیماران ناقل و استفاده از تجهیزات پزشکی آلوده اتفاق می‌افتد (۲). همچنین سودوموناس آئروژینوزا معمول‌ترین عامل عفونت‌های بعد از سوختگی بوده و البته بعد از آن به ترتیب سویه‌های باکتری استافیلوکوکوس آرئوس و برخی از گونه‌های متعلق به خانواده آنتروباکتریاسه بویژه اشرشیاکلی قرار دارند (۳). اما افزایش روز افزون مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در میان انواع باکتری‌ها بویژه سه گونه باکتری مذکور که در ابعاد مختلف بهداشت انسان حائز اهمیت فراوانی می‌باشند، مسایل مهم و جدی در درمان و کنترل عفونت‌ها را در میان بیماران مطرح می‌کند (۴) بطوریکه کنترل سریع این عفونت به علت مصرف بی‌رویه دارو و وجود مقاومت دارویی بالا در میان باکتری‌ها به ویژه علیه آنتی‌بیوتیک‌های متداول، غالباً با شکست روبرو می‌گردد (۲). لذا یکی از نکات مورد توجه در امر درمان بیماری‌های عفونی، انجام آزمایش تعیین مقاومت پادزیستی می‌باشد که باید قبل از شروع درمان انجام شود. از طرف دیگر باید از مصرف بی‌رویه پادزیست‌ها پرهیز شود، تا علاوه بر امکان ایجاد درمان موثر، از پیدایش سویه‌های مقاوم باکتری‌ها ممانعت گردد (۵).

اما در این راستا در سالهای اخیر و در مناطق مختلف دنیا، به تاثیر عصاره ای گیاهی، اسانس‌های معطر و مواد موثر آن‌ها بر روی بسیاری از باکتری‌های بیماری‌زا توجه زیادی شده است (۶).

یافته‌های محققان مختلف نشان داده که خاصیت ضدمیکروبی اسانس و عصاره انواع گیاهان در درجه اول به ترکیبات شیمیایی

تشکیل دهنده آنها بستگی دارد که تجزیه و بررسی فیتوشیمیائی عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهان مختلف هم وجود ترکیبات متفاوتی را در آنها نشان داده است، بطوریکه تاکنون بیش از ۳۴۰ گونه گیاهی با خاصیت ضدمیکروبی شناسائی و بیش از ۳۰ هزار ترکیب با خاصیت ضد میکروبی از عصاره‌ها و اسانس‌های مختلف گیاهی جدا شده است (۷ و ۸). در کشور ما هم یکی ازگیاهانی که در طب سنتی به خواص درمانی ترکیبات مختلف آن اشاره شده گیاه بومی کاکوتی کوهی می‌باشد. بطوریکه در بررسی اتنوفارماکولوژی گیاه مذکور می‌توان به خواص درمانی این گیاه نظیر خلط آوری، بادشکنی و مقوی معده بودن اشاره کرد. حتی در بعضی نواحی مخلوط گرد دانه آن با عسل، جهت درمان دیسانتری به کار می‌رود. این گیاه در معالجه امراض معده و به عنوان ضدعفونی کننده برای رفع سرما خوردگی هم مورد استفاده دارد (۹ و ۱۰).

اما درکشورمان علی رغم استفاده فراوان از این گیاه با کاربرد-های مختلف، تحقیقات مدونی پیرامون اثر ضدباکتریائی آن مخصوصا بر روی باکتری‌های بیماری‌زا انجام نشده است. لذا این پژوهش با هدف ارزیابی اثر ضد باکتریائی اسانس و عصاره اتانولی گیاه کاکوتی کوهی بر روی ۳ گونه مهم از جدایه های مربوط به دستگاه ادراری ۴۰ سر از موش‌های صحرای نر و ماده نژاد ویستار (که در بهداشت عمومی اهمیت داشته و توانائی احتمالی در ایجاد عفونت‌های فرصت‌طلب را دارا هستند) نگهداری شده در مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز به عنوان مدل تجربی، در شرایط آزمایشگاهی و از طریق تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی از رشد (MIC) و باکتری-کشی(MBC) و نیز ارزیابی حساسیت و یا مقاومت نسبت به ترکیبات مختلف با خاصیت احتمالی ضد میکروبی، با انجام آزمایش آنتی‌بیوگرام به روش انتشار دیسک در آگار بر مبنای روش اصلاح شده Kirby & Bauer و بر اساس رهنمودهای NCCLS انجام گرفت (۱۱).

مواد و روش‌ها

مقدار لازم از گیاه کاکوتی کوهی در ماه‌های اردیبهشت و خرداد سال ۱۳۹۳ و در محدوده زمانی گلدهی از تپه‌های اطراف شهرستان شبستر در استان آذربایجان‌شرقی جمع‌آوری گردیده و سپس در دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شبستر با بررسی خواص گیاه‌شناسی هویت آن تائید شد. سپس برگ‌های گیاه مذکور به دقت جدا شده و در شرایط مناسب دمای اتاق و در سایه خشک گردیده و در ادامه جهت تهیه عصاره و اسانس از این گیاه، با استفاده از دستگاه آسیاب برقی آزمایشگاه میکروبشناسی گروه پاتوبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، خرد شده و به صورت پودر در آمدند. برای تهیه عصاره الکلی این گیاه در آزمایشگاه میکروبشناسی گروه پاتوبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز از روش پرکولاسیون استفاده گردید. بدین منظور ابتدا ۵۰ گرم از پودر تهیه شده از برگ‌های گیاه کاکوتی را در داخل دکانتور ریخته، سپس مرحله به مرحله به آن اتانول ۷۰ درجه گرم افزودیم. افزودن اتانول را تا جایی ادامه دادیم که تمامی حجم گیاه داخل دکانتور خیس شده و مقداری از اتانول هم در روی سطح نمونه داخل دکانتور بماند، که در این حالت پودر مذکور بهتر می-تواند حلال را در خود جذب نموده و حداکثر مواد موثره آن در اتانول حل شود. مطابق روش مذکور و برای عصاره‌گیری کامل، حدود ۲۴ ساعت زمان بکار رفت و سپس عمل جداسازی حلال از عصاره نیز توسط دستگاه روتاری با کمک پمپ خلاء انجام شد (۱۲). همچنین برای تهیهٔ اسانس این گیاه هم از روش تقطیر با آب به کمک دستگاه کلونجر استفاده گردید (۱۳).

باکتری‌های مورد بررسی در این تحقیق شامل ۳ گونه باکتری از جدایه‌های مربوط به نمونه ادرار ۴۰ سر موش صحرای آزمایشگاهی نژاد ویستار با ظاهر سالم (۲۰ سر نر و ۲۰ سر ماده) که در مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز نگهداری می‌شدند، بود که پس از اخذ مقدار لازم ادرار از آنها تحت شرایط استریل، با استفاده از روش‌های بیوشیمیائی و بیولوژیکی استاندارد در آزمایشگاه میکروبشناسی گروه پاتوبیولوژی شناسائی و تعیین هویت شده بودند (۱۴).

با توجه به اینکه برای تهیه سوسپانسیون میکروبی نیاز به کشت ۲۴ ساعته از هر باکتری می‌باشد، بنابراین ۲۴ ساعت قبل از انجام هر آزمایش، مقداری از کشت ذخیره هر کدام از جدایه‌های مورد آزمایش را بطور جداگانه به محیط کشت BHI agar تلقیح کرده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری می‌کردیم. سپس در مورد هر جدایه کلونی‌های خالص ایجاد شده در سطح محیط کشت را با محلول نرمال سالین شسته و سوسپانسیون میکروبی بدست آمده را دوباره با محلول مذکور تا حدی رقیق می‌کردیم تا کدورت ایجاد شده در لوله حاوی سوسپانسیون میکروبی هر کدام از جدایه‌ها، معادل کدورت لوله استاندارد ۰/۵ مک فارلند تنظیم گردد. یعنی سوسپانسیون میکروبی همه جدایه‌های مورد استفاده در آزمایش‌های مختلف در پژوهش حاضر حاوی ۱/۵×۱۰۸ CFU/ml از باکتری‌های مورد آزمایش بودند (۱۵).

به منظور بررسی اثرات ضد باکتریایی اسانس و عصاره گیاه کاکوتی کوهی مورد آزمایش در پژوهش حاضر از روش انتشار در آگار به کمک دیسک استفاده شد. لازم به توضیح است بدین منظور از دیسک‌های بلانک استریل ساخت شرکت پادتن طب (تهران – ایران) استفاده گردید. به این ترتیب که دیسک‌های بلانک را در لوله‌های حاوی اسانس و عصاره گیاه مذکور بطور جداگانه قرار داده و بعد از مدت ۳۰ تا ۵۰ دقیقه و پس از جذب شدن کامل آنها توسط دیسک، دیسک‌های مذکور را در دمای حدود ۴۵ درجهٔ سانتی‌گراد قرارمی‌دادیم تا کاملاً خشک شده و جهت استفاده در دیسک‌گذاری آماده شوند. سپس در مورد همه جدایه-های مورد آزمایش، با استفاده از ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی که مطابق استاندارد لوله ۰/۵ مک فارلند تهیه شده بود، بر سطح محیط مولرهینتون آگار جداگانه کشت یکنواخت انجام می-شد. در مرحله بعد با استفاده از پنس استریل دیسک‌های آغشته شده به اسانس و عصاره کاکوتی کوهی که در مرحله قبل تهیه شده بود جداگانه، با فاصله معین از یکدیگر و از لبه پلیت در سطح

محیط کشت مذکور قرار داده شده و با کمی فشار بر روی این محیط ثابت می‌گردید. سپس پلیت‌ها به مدت ۴۸ – ۲۴ ساعت دردمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد انکوبه شده و نتایج اثر ضدباکتریایی عصاره و اسانس گیاه مورد آزمایش بطور جداگانه و با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک‌های مذکور با استفاده از خط-کش مدرج با دقت بالا ثبت می‌شد. لازم به ذکر است که برای حصول اطمینان بیشتر، این آزمایش برای هر یک از جدایه‌های مورد آزمایش جداگانه سه بار تکرار شده و سپس میانگین قطر هاله عدم رشد در سه بار تکرار به عنوان قطر نهایی منطقه عدم رشد آن جدایه ثبت می‌شد (۱۴و۱۶). همچنین در همه مراحل آزمایش مذکور از آنتی بیوتیک استاندارد آمیکاسین (۳۰ میکروگرم بر دیسک) به عنوان کنترل مثبت استفاده می‌گردید. استفاده از روش رقت لوله‌ای حداقل غلظت ممانعت از رشد و حداقل غلظت باکتری کشی اسانس و عصاره گیاه کاکوتی کوهی بطور جدا گانه تعیین گردید. بدین ترتیب که برای تعیین MIC اسانس و عصاره اتانولی گیاه کاکوتی کوهی، از یک سری ۱۰ تایی از لوله‌های آزمایش استفاده شد، که ۸ لوله برای آزمایش بر روی رقت های مختلف اسانس و عصاره و یک لوله به عنوان کنترل مثبت و یک لوله هم به عنوان کنترل منفی بکار رفت، به این ترتیب که لوله شماره یک حاوی ۸mg/ml از اسانس و یا عصاره تا لوله شماره ۸ که دارای ۶۲/۵mcg/ml از ترکیبات مذکور بود، همچنین همه لوله-ها حاوی ۹ml از محیط کشت BHI و همچنین ۱ml از سوسپانسیون میکروبی مربوط به هر یک از جدایه‌ها بود. لازم به ذکر است که در هر سری از آزمایشات مذکور همزمان یک لوله حاوی ۹ml از محیط کشت یادشده به علاوه ۱ml از اسانس یا عصاره به عنوان کنترل اسانس وعصاره و نیز یک لوله حاوی ۹ml از همان محیط کشت به علاوه ۱ml از سوسپانسیون میکروبی هر جدایه به عنوان کنترل باکتری استفاده می‌شد. در ادامه همه لوله‌های آزمایش ذکر شده در بالا به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه می‌شد. پس از طی زمان انکوباسیون، همه لوله‌ها از نظر کدورت ناشی از رشد جدایه مورد آزمایش بررسی می-گردید. لازم به ذکر است که این آزمایش برای اسانس و عصاره اتانولی گیاه کاکوتی کوهی و نیز برای هر کدام از جدایه‌ها بطور جداگانه ۳ بار تکرار شده و میانگین رقت مورد نظر محاسبه می-گردید . در نهایت رقتی از عصاره و اسانس مورد آزمایش که حاوی کمترین غلظت بوده و از افزایش کدورت ناشی از رشد باکتری مورد آزمایش ممانعت کرده بود، به عنوان MIC عصاره و یا اسانس گیاه کاکوتی کوهی جداگانه در نظر گرفته شد. همچنین در ادامه از لوله‌هائی که در آزمایش تعیین MIC در آنها عدم رشد باکتری مشاهـــده می‌گردید، نمونـــه برداری کرده و جهت تعیین MBC عصاره و اسانس مورد آزمایش، جداگانه به روش پورپلیت کشت داده می‌شد. بدین منظور ۱ml از محتویات لوله‌های مربوط به آزمایش MIC که در آن لوله ها رشد باکتری متوقف شده و اصطلاحا عدم رشد باکتری مشاهده گردیده بود، با ۲۰ml از محیط کشت BHI آگار استریل شده در دستگاه اتوکلاو (با دمای حدود ۴۵ درجه سانتی‌گراد)را در پتری دیش مخلـــوط کرده و پس از سرد شدن تدریجی در دمای آزمایشگاه و به اصطلاح بسته شدن آگار، همه پلیت‌ها به مـــدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه می‌گردید و در ادامه کار، پلیت‌های کشت داده شده از نظر وجود رشد باکتری کنترل می‌شد. در نهایت بالاترین رقتی که در واقع حاوی کمترین غلظت عصاره و یا اسانس مورد آزمایش بود و در پلیت مربوطه هیچ کلنی از باکتری مورد نظر مشاهده نمی‌گردید، به عنوان MBC آن عصاره در نظر گرفته می-شد (۱۶). برای یافتن ارتباط بین حساسیت و مقاومت جدایه‌ها نسبت به نوع ترکیب با خاصیت ضد باکتریائی (آنتی بیوتیک، اسانس و عصاره گیاهی) از آزمون‌های آماری Chi-Square و نیز Independent T- test استفاده گردید. همچنین برای مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد مربوط به اسانس و عصاره گیاهی با قطر هاله عدم رشد مربوط به آنتی‌بیوتیک استاندارد از آزمون واریانس یکطرفه و تست دانکن استفاده شده و همچنین داده‌ها در رنج ۰/۰۵< **P** معنی‌دار تلقی گردید (**P**<0.05, Subset for alpha = 0.05). لازم به ذکراست که روش آماری به کار رفته برای مقایسه نتایج بدست آمده در آزمایشات مربوط به تعیینMIC و MBC اسانس و عصاره گیاه مورد مطالعه، آمار توصیفی می‌باشد.

نتایج

نتایج حاصله از بررسی اثرات ضد باکتریایی اسانس و عصاره اتانولی گیاه کاکوتی کوهی و آنتی‌بیوتیک استاندارد آمیکاسین در پژوهش حاضر با استفاده از آزمایش آنتی‌بیوگرام به روش انتشار دیسک در آگار در جدول (۱) زیر آورده شده است. نتایج مربوط به آزمایشات بررسی اثرات ممانعت از رشد اسانس و عصاره اتانولی گیاه کاکوتی کوهی بر روی جدایه‌های مورد آزمایش که بطور جداگانه انجام گرفته در جداول ۲ و۳ آورده شده است.

جدول ۱: میانگین قطر هاله عدم رشد جدایه های مورد نظر در آزمایش آنتی بیوگرام

	نام ترکیبات مورد آزمایش با اثر ممانعت از رشد برای باکتری ها		
نام جدایه‌های مورد آزمایش	**آنتی‌بیوتیک آمیکاسین (۳۰میکروگرم در دیسک)**	**عصاره اتانولی کاکوتی کوهی (۳۰ میکرولیتر در دیسک)**	**اسانس کاکوتی کوهی (۳۰ میکرولیتر در دیسک)**
	میانگین قطر منطقه عدم رشد (mm)±SD	میانگین قطر منطقه عدم رشد (mm)±SD	میانگین قطر منطقه عدم رشد (mm)±SD
سودوموناس ائروژینوزا	۵ ± ۰/۱	۷ ± ۰/۱	۸ ± ۰/۱
اشرشیاکلی	۱۳ ± ۰/۲	۲۶ ± ۰/۲	۲۸ ± ۰/۲
استافیلوکوکوس آرئوس	۱۶ ± ۰/۲	۱۷ ± ۰/۲	۱۹ ± ۰/۲

(Significant difference: P<0.05, Subset for alfa=0.05)

جدول۲: نتایج آزمایشات تعیین حداقل غلظت ممانعت از رشد (MIC) غلظت‌های مختلف اسانس کاکوتی کوهی

	غلظت‌های مختلف استفاده شده از اسانس گیاه کاکوتی کوهی بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر در آزمایش تعیین MIC							
جدایه مورد آزمایش	۶۲/۵	۱۲۵	۲۵۰	۵۰۰	۱۰۰۰	۲۰۰۰	۴۰۰۰	۸۰۰۰
سودوموناس آئروژینوزا	+	+	+	+	+	+	+	+
اشرشیا کلی	+	+	+	+	−	−	−	−
استافیلوکوکوس آرئوس	+	+	+	+	+	−	−	−

تذکر: علامت (+) نشان دهنده رشد باکتری و علامت (−) نشان دهنده عدم رشد باکتری می‌باشد.

جدول۳: نتایج آزمایشات تعیین حداقل غلظت ممانعت از رشد (MIC) غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی کاکوتی کوهی

	غلظت های مختلف استفاده شده ازعصاره اتانولی گیاه کاکوتی کوهی بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر در آزمایش تعیین MIC							
جدایه مورد آزمایش	۶۲/۵	۱۲۵	۲۵۰	۵۰۰	۱۰۰۰	۲۰۰۰	۴۰۰۰	۸۰۰۰
سودوموناس آئروژینوزا	+	+	+	+	+	+	+	+
اشرشیا کلی	+	+	+	+	+	−	−	−
استافیلوکوکوس آرئوس	+	+	+	+	+	−	−	−

تذکر: علامت (+) نشان دهنده رشد باکتری و علامت (−) نشان دهنده عدم رشد باکتری می‌باشد.

نتایج مربوط به آزمایشات تعیین میزان قدرت باکتری‌کشی اسانس و عصاره گیاه کاکوتی کوهی بر روی جدایه‌های مورد آزمایش در پژوهش حاضر نیز که بطور جداگانه انجام گرفته در جداول ۴ و ۵ نشان داده شده است.

جدول۴: نتایج آزمایشات تعیین حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC) غلظت‌های مختلف اسانس کاکوتی کوهی

	غلظت‌های مختلف استفاده شده از اسانس گیاه کاکوتی کوهی در آزمایش تعیین MBC برحسب میکروگرم بر میلی‌لیتر							
جدایه مورد آزمایش	۶۲/۵	۱۲۵	۲۵۰	۵۰۰	۱۰۰۰	۲۰۰۰	۴۰۰۰	۸۰۰۰
سودوموناس آئروژینوزا	+	+	+	+	+	+	+	+
اشرشیا کلی	+	+	+	+	−	−	−	−
استافیلوکوکوس آرئوس	+	+	+	+	+	−	−	−

تذکر: علامت (+) نشان دهنده رشد باکتری و علامت (−) نشان دهنده عدم رشد باکتری می باشد.

جدول ۵: نتایج آزمایشات تعیین حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC) غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی کاکوتی کوهی

	غلظت‌های مختلف استفاده شده ازعصاره اتانولی گیاه کاکوتی کوهی بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر در آزمایش تعیین MBC							
جدایه مورد آزمایش	۶۲/۵	۱۲۵	۲۵۰	۵۰۰	۱۰۰۰	۲۰۰۰	۴۰۰۰	۸۰۰۰
سودوموناس آئروژینوزا	+	+	+	+	+	+	+	+
اشرشیا کلی	+	+	+	+	+	−	−	−
استافیلوکوکوس آرئوس	+	+	+	+	+	−	−	−

ذکر: علامت (+) نشان دهنده رشد باکتری و علامت (−) نشان دهنده عدم رشد باکتری می‌باشد.

بحث

با توجه به نتایج ثبت شده در جدول شماره ۱ مربوط به بخش یافته‌های پژوهش حاضر ملاحظه می‌شود که اسانس و همچنین عصاره گیاه کاکوتی کوهی در آزمایش آنتی‌بیوگرام به روش انتشار دیسک در آگار اثر قابل ملاحظه‌ای بر روی سودوموناس آئروزینوزا نداشتند (قطر منطقه ممانعت از رشد توسط ترکیبات مذکور در مورد این باکتری به ترتیب ۸ و ۷ میلی‌متر می‌باشد که در مقایسه با مقدار ۵ میلی‌متر مربوط به اثر آنتی‌بیوتیک آمیکاسین مطابق جدول استاندارد آزمایش آنتی‌بیوگرام شرکت پادتن طب تهران – ایران همگی در محدوده مقاوم قرار می‌گیرند). از طرف دیگر با مقایسه نتایج آزمایش آنتی‌بیوگرام مربوط به عصاره و اسانس اتانولی گیاه کاکوتی کوهی با نتایج مربوط به اثر آنتی‌بیوتیک استاندارد آمیکاسین به عنوان کنترل مثبت در آزمایش مذکور، مشاهده می‌شود که در مورد دیگر جدایه‌های مورد آزمایش در پژوهش حاضر هم، هم اسانس و هم عصاره اتانولی گیاه خوراکی کاکوتی کوهی، فعالیت ضدباکتریایی به مراتب بالاتری در مقایسه با آنتی‌بیوتیک مذکور از خود نشان دادند که این مسئله در مورد اسانس مقداری بیشتر مشهود می‌باشد. این موضوع همسو با نتایج پژوهش موهان نیر و همکاران (۲۰۰۵) در مورد اثر ضدلیستریایی گیاه سیاه دانه در محیط کشت می‌باشد، که مشخص گردیده عصاره‌های گیاه مذکور عملکرد بهینه‌ای علیه باکتری لیستریا داشتند، به طوریکه اثر ضدلیستریائی سیاه دانه بسیار بیشتر از آنتی-بیوتیک جنتامایسین بوده است (۱۷) و نیز این موضوع همچنین تایید کننده یافته‌های اتنوفارماکولوژی این تحقیق می‌باشد، بطوریکه در بررسی اتنوفارماکولوژی گیاه مذکور در کشورمان می‌توان به خواص درمانی این گیاه نظیر، معالجه امراض معده، درمان دیسانتری و استفاده موثر به عنوان ضدعفونی کننده برای رفع سرما

خوردگی اشاره کرد. همچنین نتایج ثبت شده در جدول ۲ هم نشان می‌دهد که حداقل غلظت مهار کنندگی اسانس کاکوتی کوهی برای جدایه‌های مربوط به باکتری گرم منفی اشرشیا کلی در پژوهش حاضر ۵۰۰ میکروگرم برمیلی‌لیتر می‌باشد. همچنین حداقل غلظت باکتری‌کشی این اسانس برای جدایه‌های مذکور با حداقل غلظت مهار کنندگی برابر می‌باشد (جداول ۲ و ۴). البته این درحالیست که نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که اسانس مذکور تاثیری بر جدایه سودوموناس آئروژینوزا نداشته است. از طرف دیگر حداقل غلظت مهار کنندگی اسانس مورد آزمایش برای جدایه‌های باکتری گرم مثبت مورد آزمایش یعنی استافیلوکوکوس اورئوس ۱۰۰۰ میکروگرم برمیلی‌لیتر ثبت شده است (جدول۲).

به طور کلی نتایج حاصل از آزمایشات مربوط به تعیین MIC وMBC عصاره اتانولی کاکوتی کوهی نیز در پژوهش حاضر نشان داد که این عصاره بر همه باکتری‌های مورد آزمایش بجز سودوموناس آئروژینوزا دارای اثر مهار کنندگی از رشد و نیز اثر باکتری‌کشی نسبتا خوبی بوده و حداقل غلظت باکتری کشی عصاره مذکور هم برای اکثر جدایه‌ها با حداقل غلظت مهار کنندگی از رشد آن برابر می‌باشد (جداول شماره ۳ و ۵).

در ارتباط با خواص گیاه استفاده شده در پژوهش حاضر مشخص شده است که ترکیب اصلی تشکیل دهنده اسانس و عصاره‌های گیاهان تیره نعناعیان که کاکوتی کوهی هم متعلق به این تیره گیاهی می‌باشد، عمدتا تیمول و کارواکرول می‌باشد که در این میان اثر قوی ضدمیکروبی کارواکرول توسط محققین بیان شده است (۱۸ و ۱۹). از طرف دیگر در این ارتباط همچنین تحقیقات نشان داده که یکی از ترکیبات اصلی اسانس در تعدادی از گیاهان خانواده نعناعیان از جمله کاکوتی، ماده‌ای بنام پولگون می‌باشد، بطوریکه تحقیقات Ozturk وErcisli در سال ۲۰۰۶ در کشور ترکیه نشان داده است که اسانس کاکوتی کوهی دارای ۳۱/۸۶ درصد پولگون، ۱۲/۲۱ درصد سینئون، ۱۰/۴۸ درصد لیمونن، ۹/۱۳ درصد منتول، ۶/۸۸ درصد بتاپینن، ۶/۷۳ درصد منتون، ۵/۳ درصد پیپریتنون و ۴/۱۸ درصد پیپریتون می‌باشد (۲۰). نشان داده شده که این ماده دارای خاصیت ضد باکتریائی و ضد قارچی بوده و بویژه بر روی ایزوله‌های مختلف سالمونلاها که از جمله باکتری‌های گرم منفی مقاوم در مقایسه با بسیاری از باکتری‌های گرم منفی هستند، موثر بوده است (۹ و ۲۱). با توجه به این که در پژوهش حاضر هم اسانس گیاه کاکوتی کوهی نسبت به عصاره اتانولی آن تاثیر ضدباکتریایی بیشتری مخصوصا نسبت به ایزوله-های گرم منفی از خود نشان داده است، به نظر می‌رسد که احتمالاً فعالیت مذکور می‌تواند بیشتر در ارتباط با پولگون باشد که به عنوان ترکیب اصلی تشکیل دهنده اسانس کاکوتی کوهی گزارش شده است. ازطرف دیگر نتایج حاصله از مطالعات صالحی و همکاران در سال ۲۰۰۵ که در مورد اثر ضدمیکروبی عصاره آلی گیاه کاکوتی کوهی انجام گرفته نشان داده است که عصاره مذکور می‌تواند از رشد دو گونه از باکتری‌های گرم منفی یعنی کلبسیلا پنومونیه و اشریشیا کلی ممانعت نماید. از طرف دیگر عدم فعالیت ضد باکتریایی عصاره مذکور در مقابل سودوموناس آئروژینوزا در مطالعات نامبردگان هم مشاهده شده بود (۱۳). با توجه به جداول قسمت یافته‌های پژوهش حاضر، ملاحظه می‌شود که نتایج مذکور هم با یافته‌های پژوهش ما همخوانی دارد. چرا که نتایج ثبت شده در پژوهش حاضر نشان می‌دهد که در هیچ یک از آزمایشات مربوط به بررسی و ارزیابی خاصیت ضدباکتریائی اسانس و عصاره اتانولی گیاه کاکوتی کوهی فعالیت مشخصی از این نظر بر علیه جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا مشاهده نمی‌شود. همچنین مطالعات Ercili و Ozturk که در کشور ترکیه طی سال‌های ۲۰۰۶ و ۲۰۰۷ انجام گرفته نیز نشان داده است که عصاره‌های کاکوتی کوهی و کاکوتی پرسیکا قادرند از رشد طیف وسیعی از باکتری-های گرم مثبت و گرم منفی بیماری زا جلوگیری نماید. در پژوهش حاضر نیز، هم عصاره اتانولی و هم اسانس کاکوتی کوهی و مخصوصا اسانس گیاه مذکور بر جدایه‌های گرم منفی اثر مهار کنندگی و باکتری‌کشی بسیار قوی و بر جدایه‌های گرم مثبت هم اثرات ضد باکتریائی نسبی داشته است (جداول ۱ تا ۵) که این یافته‌ها هم همخوانی با مطالعات ذکر شده را نشان می‌دهد. البته همانطور که نتایج ثبت شده در جداول مذکور نشان می‌دهد نه عصاره و نه اسانس گیاه کاکوتی کوهی در پژوهش حاضر نتوانست بر علیه سودوموناس آئروژینوزا اثر مهار رشد و باکتری-کشی نشان دهد که البته این یافته با نتایج مطالعاتErcili و Ozturk همخوانی نشان نمی‌دهد (۲۰ و ۲۲).

در توجیه این مسئله می‌توان به نوع ترکیبات موجود در عصاره و اسانس که در مناطق مختلف می‌تواند متفاوت باشد اشاره کرد. در تائید این موضوع حتی برخی از پژوهشگران اعلام نموده‌اند که مقایسه نتایج مشاهده شده در مورد خواص ضدباکتریائی گیاهان بسیار دشوار می‌باشد که از دلایل این موضوع به تفاوت در روش-های مختلف آزمایشگاهی به هنگام بررسی خواص ضد باکتریائی عصاره ها، سویه و نوع گیاه و منابع تهیه آنها، مرحله رشد گیاه و نیز سویه‌های باکتریائی بکاربرده شده، اشاره نموده‌اند. از طرف دیگر در برخی پژوهش‌های انجام گرفته در گذشته هم اعلام شده است که درمورد برخی از گیاهان عصاره‌های الکلی و عصاره اتری و نیز درمورد برخی دیگر از آنها اسانس گیاهان تاثیر مشخصی بر باکتریها داشته است. لذا بنظر می‌رسد که نوع عصاره و اسانس هم در میزان اثر ضد باکتریائی گیاهان بسیار موثر می‌باشد. بنابراین احتمالا از جمله دلایل عدم مشاهده اثرات ضدباکتریائی قابل ملاحظه از برخی از گیاهان را می‌توان به نوع مواد موثر در عصاره و یا اسانس و همچنین روش عصاره‌گیری و نوع حلال مرتبط دانست (۲۳- ۲۶).

از طرف دیگر با مراجعه به جداول ۱ تا ۵ مشاهده می‌شود که بیشترین اثرات ضدباکتریائی عصاره و اسانس گیاه کاکوتی کوهی در پژوهش حاضر، نسبت به باکتری‌های گرم منفی می‌باشد، بطوریکه قطر منطقه عدم رشد در آزمایش آنتی‌بیوگرام با استفاده از اسانس و عصاره اتانولی گیاه کاکوتی کوهی در مورد جدایه‌های باکتری گرم منفی اشرشیاکلی مورد آزمایش، به ترتیب ۲۸ و ۲۶ میلی‌متر و برای جدایه‌های باکتری گرم مثبت مورد آزمایش یعنی

استافیلوکوکوس آرئوس به ترتیب ۱۹ و ۱۷ میلی‌متر می‌باشد. در توجیه این موضوع هم اکثر مطالعات بیان می‌دارد که حساسیت باکتری‌های گرم منفی در مقابل ترکیبات ضدمیکروبی در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت کمتر است، که این موضوع بنظر می‌رسد به خاطر نوع ترکیبات موجود در دیواره سلولی این نوع باکتری‌ها باشد، چرا که فقط لایه نازکی از موکوپپتید دارند و قسمت اعظم ساختمان دیواره سلول در باکتری‌های مذکور را لایه خارجی (outer membrane) تشکیل می‌دهد که قسمت عمده ترکیبات تشکیل دهنده آن از جنس لیپوپلی ساکارید (LPS) می‌باشد، در حالیکه باکتری‌های گرم مثبت در دیواره سلولی خود دارای مقدار زیادی ترکیب پیچیده و نسبتا مقاوم موکوپپتیدی هستند و بنظر می‌رسد به همین علت در مقابل مواد ضدباکتریایی مقاوم ترند (۲۷). اما بالاخره به نظر می‌رسد که علاوه بر دلایل اعلام شده در بالا احتمالا مهمترین دلیل توجیه کننده این موضوع که چرا جدایه‌های باکتری گرم منفی سودوموناس آئروژینوزا نسبت به تمام آزمایشات ضدباکتریائی انجام گرفته در پژوهش حاضر مقاومت نشان داده است می‌توان به پدید آمدن سویه‌های مقاوم به انواع ترکیبات ضدباکتریائی و آنتی‌بیوتیک‌ها و بوجود آمدن پدیده مقاومت چندگانه در میان باکتری‌ها مخصوصا باکتری مذکور اشاره کرد. در تائید و توجیه موضوع ذکر شده مطالعات نشان می‌دهد که بین مقاومت آنتی‌بیوتیکی سودوموناس آئروژینوزا با مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها ارتباط وجود دارد و این مقاومت می‌تواند ذاتی (با منشأ کروموزومی) و یا اکتسابی (با منشأ پلاسمیدی) باشد (۲۸). همچنین در این خصوص نشان داده‌اند که باکتری سودوموناس آئروژینوزا با تشکیل بیوفیلم توانایی محافظت از خود در برابر سیستم ایمنی میزبان و عوامل ضدمیکروبی مختلف را ایجاد می‌کند. از طرف دیگر با مصرف گسترده آنتی‌بیوتیک‌ها سویه های سودوموناس آئروژینوزای مقاوم به چند دارو (MDR) در سراسر جهان به طور فزاینده‌ای افزایش یافته است (۲۹). عقیده محققین در این زمینه بر این است که در واقع یکی از مشکلات در رابطه با مبارزه با عفونت‌های مرتبط با سودوموناس آئروژینوزا ایجاد مقاومت چند دارویی توسط باکتری مذکور می‌باشد که از طریق سازوکارهای مختلفی نظیر تولید آنزیم‌های سفالوسپورینار، تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز، کاهش نفوذ پذیری غشای خارجی، سنتز آنزیم‌هایی مانند فسفریل ترانسفرازها و استیل ترانسفرازها (که علت اصلی ایجاد مقاومت نسبت به آمینوگلیکوزیدها می‌باشند) و همچنین تغییر در توپوایزومرازهای II و IV (که علت اصلی ایجاد مقاومت نسبت به کینولون ها می‌باشد) ایجاد می‌شود. همچنین اخیرا علاوه بر موارد ذکر شده سازوکار جدید دیگری در خصوص علت ایجاد مقاومت پادزیستی در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا، تحت عنوان افلوکس پمپ مطرح شده است (۳۰). در خصوص موارد مطرح شده در بالا، بنظر می‌رسد که نتیجه پژوهش حاضر هم علاوه بر اینکه آنها را تائید می‌کند در عین حال به یک موضوع مهم دیگر یعنی ارتباط بین سویه‌های انسانی و حیوانی باکتری‌های مذکور هم تاکید می‌کند که این مسئله امر مهم لزوم رعایت اصول بهداشتی در بیمارستان‌ها و اماکن عمومی و انبارهای مختلف مورد استفاده در جوامع انسانی را جهت جلوگیری و کنترل عفونت‌های فرصت طلب در انسان بیشتر از پیش نشان می‌دهد.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش مشخص شد که هم اسانس و هم عصاره اتانولی کاکوتی کوهی بر ایزوله‌های مربوط به مجاری ادراری مورد بررسی بجز سودوموناس آئروژینوزا دارای اثرات ضد باکتریایی هستند و البته با مقایسه تاثیر مهار از رشد و باکتری‌کشی اسانس و عصاره گیاه بومی مذکور، می‌توان نتیجه گرفت که اسانس این گیاه در غلظت‌های کمتری نسبت به عصاره آن قادر به ایجاد اثرات ضد باکتریائی برروی ایزوله‌های مذکور می‌باشد. همچنین با توجه با اینکه نتایج آزمایشات آنتی‌بیوگرام انجام گرفته در پژوهش حاضر نشان می‌دهد که قطر منطقه عدم رشدی که توسط آنتی‌بیوتیک استاندارد آمیکاسین در قبال اکثر ایزوله‌های مورد آزمایش ایجاد شده به مراتب کوچکتر از قطر هاله‌های ایجاد شده توسط اسانس و عصاره اتانولی گیاه کاکوتی کوهی درمقابل ایزوله‌های مذکور می‌باشد و آنالیز آماری هم در این خصوص در سطح اطمینان $P < ۰/۰۵$ اختلافی معنی‌دار نشان می‌دهد، لذا به نظر می‌رسد که می‌توان از ترکیبات فوق به عنوان مواد آنتی باکتریال مناسب بطور موثر بر علیه طیف وسیعی از باکتری‌های فرصت طلب ایجاد کننده عفونت‌های مجرای ادراری مخصوصا سویه‌های عفونت‌زای باکتری‌های استافیلوکوکوس آرئوس و اشرشیا کلی بجای آنتی‌بیوتیک‌های سنتتیک استفاده کرد. اهمیت این موضوع زمانی بیشتر مشخص می‌شود که توجه داشته باشیم که ترکیبات طبیعی نظیر انواع میوه‌ها و گیاهان بومی و در دسترس موجود در بیشتر مناطق جغرافیائی کشور پهناور ایران (مخصوصا در منطقه آذربایجان شرقی)، غالبا عوارض جانبی احتمالی آنتی‌بیوتیک‌های ساختگی دست بشر مخصوصا ایجاد سویه‌های مقاوم به داروها را نداشته و نیز از نظر اقتصادی هم هزینه‌های به مراتب کمتری را به مصرف کنندگان تحمیل می‌کند و از طرف دیگر هم بسیاری از گیاهان خوراکی در عین حال معمولا اثرات مفید دیگری نظیر خاصیت آنتی‌اکسیدانی را هم علاوه بر خواص ضدمیکروبی دارا هستند. البته در این خصوص مطالعات بیشتری نیاز است تا بتوان اثرات ضد میکروبی اسانس و انواع عصاره‌های مختلف گیاه مورد مطالعه در پژوهش حاضر را دقیق‌تر بررسی کرد. بطوریکه بنظر می‌رسد استفاده از روش‌های دیگر عصاره‌گیری و یا استفاده از غلظت‌های دیگری به غیر از غلظت‌های بکار برده شده در این تحقیق در مورد اسانس و عصاره می‌تواند اثرات ضد باکتریائی گیاه بومی کاکوتی کوهی را بیشتر از این روشن نماید.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از کلیه همکاران محترم در دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شبستر، مخصوصا جناب آقای دکتر دانشیان که در امر شناسائی و آماده سازی اولیه گیاه بومی مورد مطالعه در پژوهش حاضر، ما را یاری فرمودند، کمال تشکر را داریم.

References

1. Aranitidou M, Katikaridou E, Douboyas J, Tsakria A. Prognostic factors for nosocomial bacteremia outcome: a prospective study in a Greek teaching hospital. *J. Hospital Infection* 2005; **61(3)**: 219-224.
2. Wolfgang Z. Zinsser Microbiology 2004; 295.
3. Song W, Lee KM, Kang HJ, Shin DH, Kim DK. Microbiologic aspects of predominant bacteria isolated from the burn patints in Korea. *Burns* 2001; **27**(2): 136-139.
4. Li J, Zeng H, Xu X. A study of methicillin resistant staphylococcus aureus (MRSA) in a burn unit with repetitive - DNA-sequence - based PCR fingerprinting. *Chinese Journal of Burns* 2001; **17**(2): 88-90.
5. Clinical and Laboratory Standards institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing Twenty-Third Informational Supplement, M100-S23. CLSI 2013. Pennsylvania.
6. Valero M, Giner MJ. Effects of antimicrobial components of essential oils on growth of Bacillus cereus INRA L2104 in and the sensory qualities of carrot broth. *International Journal of Food Microbiology* 2006; **106**(1): 90-94.
7. Tajkarimi MM, Ibrahim SA and Cliver DO. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Journal of Food Control* 2010; **21**: 1199-1218.
8. Tiwari BK, Valdramidis VP, O. Donnell CP, Muthukumarappan K, Bourke P and Cullen, PJ. Application of natural antimicrobial for food preservation. *J. Agricultural Food Chemistry* 2009; **57**: 5987-6000.
9. Babakhanloo P, Mirzae M, Sefidkan F, Barazandeh M. Chemical components of essential oils of Ziziphora clinopodioides. *Medical Plants Research Journal* 1998; **2**: 103-114 (Persian).
10. Sajadi SE, Ghasemi Dehkordi N, Baloochi M. Volatile Constituents of Ziziphora clinopodioides Lam. *Journal of Pajoohesh va Sazandeghi*. 2003; **8**: 1-9 (Persian).
11. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Supplemental Tables; Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twelfth Informational Supplement. NCCLS Publication; M100-S12, Vol. 22, No. 1. M2-A7 and M7-A5. 2002. Villanova, PA.
12. Mashhadian N.V and Rakhshandeh H. Antibacterial and antifungal effects of Nigella sativa extracts against S. aureus, P. aeroginosa and C. albicans. *Pakistan Journal of Medical Scinces* 2005; **21**(1): 47-52.
13. Salehi P, Sonboli A, Eftekhar F, Nejad-Ebrahimi S, Yousefzadi M. Essential oils composition, antibacterial and antioxidant activity of the oils and various extracts of Ziziphora clinopodioides subsp. rigida (BOISS.) RECH. F. from Iran. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 2005; **28**: 1892-1896.
14. Quinn, Carter, Markey and Carter. *Clinical Veterinary Microbiology*. Mosby-Year Book Europe, London. 1994; PP: 95-102.
15. Babayi L, Kolo JI, Ijah UJ. The antimicrobial activities of methanolic extracts of Eucalyptus camaldulensis and Terminalia catappa against some pathogenic microorganisms. *Biochemistry* 2004; **16**(2): 106-110.
16. Inouye Sh, Takizawa T, Yamaguchi H. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact.*The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2001; **47**: 565-573.
17. Mohan Nair MK, Vasudevan P and Venkitanarayanan k. Antibacterial effect of black seed oils on Listeria monocytogenes. *Journal of Food Control* 2005; **16**(5): 395-398.
18. Chami N, Chami F, Bennis S, Trouillas J, Remmal A. Antifungal treatment with carvacrol and eugenol of oral candidiasis in immunosuppressed rats. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2004; **8**(3): 217-226.
19. Aghajani Z, Assadian F, Masoudi Sh, Chalabian F, Esmaeili A, Tabatabaei M, et.al. Chemical composition and invitro antibacterial activities of the oils of Ziziphora clinopodioides and Ziziphora capitata from Iran. Chemistry of Natural Compounds 2008; **44**(3): 387-389.
20. Ozturk S, Ercisli S. The chemical composition and invitro antibacterial activities of essential oils and methanol extracts of Ziziphora persica bunge. Journal of Ethnopharmacology 2006; **106**(3): 327- 376.
21. Amiri H. Composition and antioxidant activity of the essential oils and methanolic extracts of Ziziphora clinopodioides Lam. in preflowering stage. *Journal of Kerman University of Medical Sciences* 2009; **16**(1): 79-86 (Persian).
22. Ozturk S, Ercisli S. Antibacterial activity and chemical constitutions of Ziziphora clinopodioides. *Food Control* 2007; **18**(5): 535- 540.
23. Jalali M, Abedi D, Ghasemi dehkordi N and Chaharmahali A. Evaluation of antibacterial activity of ethanol extracts of some medicinal plants against Listeria monocytogenes. *Journal of Shahrekord University of Medical Sciences* 2006; **8**(3): 25-33 (Persian).
24. Moreno S, Scheyer T, Romano CS, Vojnov AA. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radical Research* 2006; **40**(2): 223-231.
25. Singh A, Singh RK, Bhunia AK and Singh N. Efficacy of plant essential oils as antimicrobial agents against Listeria monocytogenes in hotdogs. *Food Science & Technology* 2003; **36**(8): 787-794.
26. Mashak Z, Moradi B, Akhonzdade A, Abasifar A and Gandomi H. Study the behavior of Listeria monocytogenes during the production process of Iranian white cheese under the influence of Zataria multiflora Boiss essential oils. *Journal of Medicinal Plants* 2008; **29**: 114-122 (Persian).
27. Schaechter, Medoff, Fchlessinger. *Mechanisms of Microbial Disease*. International Edition (Williams and Wilkins). 1989; 17-50.
28. Bayat E, Kamali M, Zare'ei Mahmoodabadi A, Mortazavi Y, Ebrahim Habibi A, Amini B. Isolation , determination and cloning of translocation domain of exotocin-A from Pseudomonas aeruginosa. *Kowsar Medical Journal* 2010; **15**(3): 149-154.
29. Chanawong A, M'zali FH, Heritage J, Lulitanond A, Hawkey PM. SHV-12, SHV-5, SHV-2a and VEB-1 extended-spectrum β–lactamase in Gram-negative bacteria isolated in a university hospital in Thailand. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2001; **48**: 839-852.
30. Van Bambeke F, Balzi E, Tulkens PM. Antibiotic efflux pumps. *Biochemical Pharmacology* 2000; **60**(4): 457-470.