دوماهنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijmapr.2018.115843.2164
جلد ۳۴، شماره ۳، صفحه ۳۹۰- ۳۸۰ (۱۳۹۷)

اثر ضدمیکروبی اسانس مرزه (*Satureja* spp.) بر تولید همولیزین و بیوفیلم در استافیلوکوکوس اورئوس

الهه تقیان[۱]، نوید سعیدی[۱]، فاطمه سفیدکن[۲]، حوریه صادری[۳]، ایرج رسولی[۳]، رضا محمد صالحی[۴] و پرویز اولیاء[۵*]

۱- کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی مولکولی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
۲- استاد، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، تهران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
۳- استاد، مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی مولکولی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
۴- دانشجوی دکترا، مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی مولکولی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
۵*- نویسنده مسئول، استاد، مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی مولکولی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران، پست الکترونیک: powlia@gmail.com

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۶ تاریخ اصلاح نهایی: بهمن ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۹۶

چکیده

درمان عفونت‌های ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* به یک مشکل در جهان تبدیل شده است. این باکتری با داشتن عوامل بیماری‌زایی متعدد، یکی از پاتوژن‌های مهم به‌حساب می‌آید. هدف از این مطالعه ارزیابی اثر ضدمیکروبی ۴ گونه از اسانس گیاه مرزه (*Satureja khuzistanica* Jamzad، *Satureja bachtiarica* Bunge، *Satureja rechingeri* Jamzad، *Satureja mutica* Fisch. & C. A. Mey.) بر تشکیل بیوفیلم و تولید همولیزین در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* است. حداقل غلظت مهاری در سویه‌های استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 29213 و ATCC 33591 برای اسانس‌های گیاه مرزه به روش micro dilution broth تعیین گردید. سپس از غلظت‌های Sub-MIC از اسانس‌های گیاه مرزه برای آزمایش تشکیل بیوفیلم و تولید همولیزین استفاده شد. نتایج این مطالعه نشان داد که اسانس هر ۴ گونه مرزه مورد آزمایش اثر ضد میکربی بر علیه هر دو سویه استاندارد استافیلوکوکوس داشته و همچنین میزان تشکیل بیوفیلم و تولید همولیزین باکتری‌ها در حضور غلظت‌های Sub-MIC از اسانس‌ها به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. نتایج این بررسی نشان‌دهنده این امر است که اسانس‌های ۴ گیاه مرزه مورد آزمایش، بر روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* دارای اثرات ضدمیکروبی می‌باشد و با مطالعات بیشتر می‌توان از آن برای کنترل عفونت‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: اثرات ضد میکروبی، *استافیلوکوکوس اورئوس*، مرزه (*Satureja*).

مقدمه

گیاه مرزه با اسم جنس (*Satureja*) متعلق به تیره نعناعیان (Lamiaceae) و راسته Lamiales می‌باشد. گونه های این جنس عمدتاً بومی مناطق مدیترانه شرقی و غرب آسیا هستند و عموماً در مناطق با اقلیم مرطوب و خاک های عمیق تا مناطق با اقلیم خشک، آفتابی و خاک های سنگلاخی رشد می‌کنند. ایران یکی از مهمترین مخازن ژرم‌پلاسم مرزه در دنیاست. بیش از ۱۴ گونه از این گیاه در ایران شناسایی شده است که ۹ گونه آن انحصاری ایران با نام‌های *S. edmondi*، *S. sahendica*،

Archive of SID
www.SID.ir

S. kallarica، *S. bachtiarica*، *S. intermedia*، *S. rechingeri*، *S. isophylla*، *S. atropatana* و *S. khuzistanica* هستند (Sefidkon *et al*., 2007a). سایر گونه ها علاوه‌بر ایران در تالش، ترکمنستان، ترکیه، قفقاز، ماورای قفقاز و عراق نیز می‌رویند. گونه های این جنس بیشتر در دامنه‌های کوهستانی مناطق شمال، شمال‌غربی، شمال‌شرقی، مرکزی و جنوب‌غربی ایران پراکندگی داشته و روی صخره‌های آهکی و یا دامنه‌های سنگلاخی رشد می‌کنند (Sefidkon & Jamzad, 2005). استفاده از گیاه مرزه در مصارف پزشکی و طب سنتی به‌عنوان اشتهاآور، آرام‌بخش، ضدعفونی‌کننده و مسکن رایج می‌باشد (Sefidkon *et al*., 2005؛ Emami *et al*., 2004). اسانس‌ها ترکیب های شیمیایی پیچیده‌ای هستند که اغلب بیش از صد جزء اصلی در ترکیب هایشان موجود است که عامل اصلی طعم و بوی آنها می باشد. هیدروکربورها، الکل‌ها، کتون‌ها، آلدهیدها، اترها و اکسیدها ازجمله مواد شیمیایی موجود در اسانس‌ها هستند (Majd *et al*., 2009). در این پژوهش از اسانس ۴ گونه گیاه مرزه شامل *Satureja bachtiarica*، *S. khuzistanica*، *S. rechingeri* و *S. mutica* استفاده شده است که دارای ترکیب‌های فنلی کارواکرول و تیمول می‌باشند. تیمول یک ترکیب شیمیایی فنولی است که دارای خاصیت ضدباکتریایی می باشد. کارواکرول نیز یک منوترپن فنلی به‌صورت مایعی بی‌رنگ و چسبناک بوده که در مجاورت هوا و نور تیره می شود. از کارواکرول در تولید محصولات بهداشتی به‌عنوان ضدعفونی‌کننده به‌طور گسترده استفاده می‌شود (Sefidkon *et al*., 2007a). با توجه به تحقیقات قبلی و بالا بودن میزان ترکیب‌های فنلی کارواکرول و یا تیمول در اسانس گیاه مرزه، تصمیم به بررسی اثرات ضدمیکروبی آن گرفته شده است (Farsam *et al*., 2004). همچنین مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها یکی از بزرگترین چالش‌هایی است که سلامت انسان عصر مدرن را تهدید می‌کند و با توجه به افزایش مقاومت باکتری‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک، جهان نیاز مبرمی به تغییر الگو و روی آوردن به سمتی دیگر دارد. یکی از این باکتری ها *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشد. این باکتری عفونت‌های متعددی ایجاد می‌کند و گزارش‌های متعدد مقاومت دارویی از آن گزارش شده‌است. به‌ویژه بروز و شیوع سویه های مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) باعث افزایش نگرانی شده است. این باکتری تولید عوامل بیماری‌زایی متعددی می‌کند. ازجمله این عوامل می‌توان به تولید همولیزین و بیوفیلم اشاره کرد (Hoseini *et al*., 2015؛ Carroll *et al*., 2016). این باکتری به‌عنوان دومین عامل عفونت های بیمارستانی محسوب می شود. چندین سال است که محققان به دنبال مواد ضدمیکروبی علیه آن می‌باشند. ازجمله این موارد می‌توان به اثرات ضد میکروبی گیاهان دارویی اشاره کرد، اما کمتر مطالعه‌ای به بررسی اثرات غلظت های subMIC پرداخته است. در این مطالعه به بررسی اثر چهار اسانس مرزه بر تولید دو فاکتورهای بیماری‌زا پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتری *Staphylococcus aureus*

در این مطالعه از دو باکتری *S. aureus* ATCC 29213 و *S. aureus* ATCC 33591 استفاده شد. به‌ترتیب این دو باکتری حساس (MSSA) و مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) هستند. برای نگهداری، بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار (MHA) کشت داده شد و برای انجام آزمایش از کشت‌های ۲۴ ساعته و کلنی های تک استفاده گردید. کلنی ها مرتب از لحاظ خالص بودن مورد ارزیابی قرار می‌گرفت تا احتمال آلودگی و خطا در کار کاهش یابد (Mann *et al*., 2009).

اسانس‌های مورد استفاده

اسانس گیاه مرزه استفاده شده در این تحقیق عبارت بودند از: اسانس ۴ گونه خوزستانی (*Satureja khuzistanica*)، رشینگری (*Satureja rechingeri* Jamzad)، بختیاری (*Satureja bachtiarica*) و موتیکا (*Satureja mutica*). این

Archive of SID
www.SID.ir

اسانس‌ها توسط مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور تهیه و تأیید شد و در ظروف شیشه‌ای دربسته بدون تماس با نور خورشید و هوای آزاد به مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی مولکولی دانشگاه شاهد منتقل گردید.

آماده‌سازی استوک اسانس‌ها

در ابتدا وزن اسانس‌ها اندازه‌گیری شد. این عمل برای بدست آوردن رابطه بین وزن و حجم اسانس ها بدست آمد. برای تهیه استوک اسانس ها به یک حلال مناسب نیاز است. همچنین این حلال نباید دارای خاصیت ضدمیکروبی باشد. از این‌رو از ماده دی‌متیل سولفواکساید DMSO به‌عنوان حلال استفاده شد. برای تهیه استوک، اسانس ها به نسبت ۱ به ۱ با حلال مذکور مخلوط گردیدند (Anand *et al*., 2011).

بررسی اثر ضد میکروبی اسانس‌ها به روش دیسک دیفیوژن

برای این آزمایش از دستورالعمل CLSI استفاده گردید. در این مرحله طبق دستورالعمل مذکور پس از تهیه سوسپانسیون از باکتری‌های مورد نظر به کدورت ۰/۵ مک فارلند به‌وسیله یک سوآب بر روی محیط کشت های از قبل آماده شده مولرهینتون آگار (MHA) به روش چمنی کشت داده شد. سپس مقدار ۱۰ میکرولیتر از استوک هر اسانس را به‌وسیله سمپلر برداشته و روی دیسک بلانک (فاقد آنتی‌بیوتیک) ریخته و دیسک های حاوی اسانس‌ها روی محیط تلقیح شده با باکتری قرار داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید (Gradwohl *et al*., 1980). این آزمایش در سه تکرار سه‌تایی انجام شد.

بررسی حداقل غلظت مهارکننده رشد (MIC) و بررسی حداقل غلظت کشندگی (MBC)

برای تعیین MIC از روش میکرو دایلیوشن براث براساس دستورالعمل CLSI استفاده شد. برای این منظور بر اساس وزن اسانس در استوک، مقادیری از استوک به چاهک‌ها اضافه می‌شد که دامنه غلظتی نهایی صفر (شاهد) تا ۲۰۴۸µg/ml در چاهک‌ها ایجاد شود. همچنین برای تهیه سوسپانسیون باکتری از غلظت ۰/۵ مک فارلند در محیط کشت مولر هینتون براث (MHB) استفاده شد. اولین چاهک دارای پایین‌ترین غلظت اسانس، که در آن رشد مشاهده نشد، به‌عنوان MIC تعیین گردید. به‌منظور تأیید MIC و تعیین MBC از اولین چاهک بدون کدورت، شمارش تعداد کلنی نیز انجام شد.

نمونه ها بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد. پس از انکوباسیون ۲۴ ساعته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، پلیت‌ها از لحاظ رشد و تشکیل کلنی بررسی شده و کمترین رقّتی که توانسته بود ۹۹/۹۹٪ تعداد باکتری‌ها را بکشد به‌عنوان MBC در نظر گرفته شد (CLSI., 2015).

اثر اسانس‌ها بر تشکیل بیوفیلم

برای بررسی اثر اسانس ها بر تشکیل بیوفیلم از روش میکروتیترپلیت استفاده شد. ابتدا باکتری در محیط MHB به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد. سپس از این کشت، 10^8cfu/ml باکتری درون محیط MHB حاوی غلظت ½MIC اسانس تلقیح شد. از این سوسپانسیون مقدار ۲۰۰ میکرولیتر به چاهک های میکروپلیت منتقل گردید. همچنین از چاهک فاقد اسانس به‌عنوان شاهد مثبت و از چاهک فاقد باکتری به‌عنوان شاهد منفی استفاده شد. سپس میکروپلیت به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. بعد از گذشت زمان مذکور ابتدا محیط درون میکروپلیت ها دور ریخته شد، سپس ۲۰۰ میکرولیتر محیط PBS به چاهک‌ها اضافه گردید. برای شستشوی بهتر ۳ مرتبه این کار تکرار شد. در مرحله بعد ۱۰۰ میکرولیتر متانول درون چاهک ها ریخته و بعد از گذشت ۱۵ دقیقه دوباره چاهک‌ها خالی گردید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر رنگ کریستال ویوله ۱٪ به چاهک ها اضافه کرده و بعد از ۱۵ دقیقه رنگ را با آب شسته و به‌مدت ۲ ساعت اجازه داده شد تا کاملاً خشک شود. در پایان ۲۰۰ میکرولیتر

Archive of SID
www.SID.ir

استیک اسید ۳۳٪ به چاهک‌ها اضافه گردید و میکروپلیت برای خوانش در طول موج ۴۹۰ نانومتر به دستگاه الایزا ریدر منتقل شد. در نهایت جذب نمونه شاهد مثبت با نمونه‌های دارای اسانس مقایسه شد. این آزمایش ۳ بار تکرار گردید (Zmantar *et al*., 2010).

اثر اسانس‌ها بر تولید همولیزین

برای شروع کار به یک کشت اولیه از باکتری در محیط MHB نیاز بود که بعد از گذشت ۲۴ ساعت، 10^8cfu/ml باکتری در محیط MHB حاوی غلظت ½MIC اسانس تلقیح شد. سوسپانسیون حاصل درون ارلن ریخته شد و به‌مدت ۱۸ ساعت در درمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۸۰rpm انکوبه گردید. کنترل مثبت ارلن فاقد عصاره و کنترل منفی ارلن فاقد باکتری بود. بعد از گذشت زمان مذکور از هر ارلن مقدار ۱cc برداشته و درون میکروتیوب ریخته شد و در ۷۰۰۰rpm سانتریفیوژ و مایع رویی جدا گردید و به میکروتیوب دیگری انتقال یافت. به‌منظور بررسی فعالیت همولیتیکی، در هر میکروتیوب مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از مایع رویی کشت و ۸۷۵ میکرولیتر PBS و ۲۵ میکرولیتر خون خرگوش ریخته شد و پس از مخلوط کردن به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس نمونه‌ها دوباره در ۷۰۰۰rpm و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و به‌مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ و بعد از آن خوانش توسط الایزاریدر انجام شد. همه مراحل کار در ۳ تکرار انجام شد (Shi *et al*., 2015).

تجزیه‌وتحلیل آماری

تجزیه‌وتحلیل نتایج در تمام مراحل به‌وسیله نرم‌افزار Excel برای بدست آوردن میانگین داده‌ها و رسم نمودار و از نرم‌افزار SPSS22 به‌منظور بررسی سطح معنی‌داری داده‌ها استفاده شد. همچنین در تحلیل اولیه داده‌ها از آنالیز واریانس و برای بخش پس تبعی داده‌ها از روش Fisher LSD استفاده گردید. معنی‌دار بودن تفاوت‌ها با P value کمتر از ۰/۰۵ ارزیابی شد.

نتایج

تعیین وزن حجمی اسانس‌ها

در ابتدا وزن هر سی‌سی از اسانس ۴ گونه گیاه مرزه به طور دقیق اندازه‌گیری شد که نتایج حاصل از توزین آنها در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱- وزن هر میلی‌لیتر از اسانس‌ها

نام اسانس	مرزه خوزستانی	مرزه رشینگری	مرزه بختیاری	مرزه موتیکا
وزن اسانس (mg/mL)	۹۳۴	۹۱۵	۹۴۰	۸۹۵

نتایج حاصل از آزمایش دیسک دیفیوژن

اثر ضد میکروبی ۴ گونه اسانس مرزه علیه دو سویه حساس و مقاوم به متی‌سیلین *استافیلوکوکوس اورئوس* ارزیابی شد. نتایج این بخش از پژوهش در جدول ۲ قابل مشاهده می‌باشد. تمامی اسانس‌ها برای هر دو سویه دارای فعالیت ضدمیکروبی بودند.

نتایج حاصل از تعیین MIC و MBC

در بررسی‌های انجام شده، میزان حداقل غلظت مهارکننده رشد MIC و حداقل غلظت کشنده رشد MBC در محیط حاوی ۴ گونه اسانس گیاه مرزه بر دو باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مطابق جدول ۳ بود. براساس مشاهدات کمترین میزان غلظت MIC در اسانس مرزه خوزستانی در هر دو باکتری ثبت گردید.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲- فعالیت ضد میکروبی اسانس‌ها علیه سویه‌های باکتری استافیلوکوکوس اورئوس

باکتری	قطر هاله عدم رشد (mm) در اسانس			
	مرزه خوزستانی	مرزه رشینگری	مرزه بختیاری	مرزه موتیکا
***S. aureus* ATCC 29213**	۴۸ ±۴/۳۱	۴۰ ±۱/۶۳	۴۰/۶۶ ±۳/۳۹	۴۰/۶۶ ±۴/۱۰
***S. aureus* ATCC 33591**	۴۰ ±۳/۲۶	۳۲/۶۶ ±۳/۳۹	۳۰/۶۶ ±۴/۷۱	۳۲ ±۲/۸۲

جدول ۳- نتایج حاصل از تعیین MIC و MBC

باکتری	اسانس مرزه	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)
***S. aureus* ATCC 29213**	خوزستانی	۲۵۶	۵۱۲
	رشینگری	۲۵۶	۱۰۲۴
	بختیاری	۵۱۲	۲۰۴۸
	موتیکا	۱۰۲۴	۲۰۴۸
***S. aureus* ATCC 33591**	خوزستانی	۲۵۶	۵۱۲
	رشینگری	۵۱۲	۱۰۲۴
	بختیاری	۱۰۲۴	۲۰۴۸
	موتیکا	۱۰۲۴	۲۰۴۸

نتایج تأثیر اسانس‌ها بر تشکیل بیوفیلم

نتایج حاصل از میزان تشکیل بیوفیلم و درصد کاهش بیوفیلم در حضور ۴ اسانس گیاه مرزه برای سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 29213 و ATCC 33591 در جدول‌های ۴ و ۵ ذکر شده است. همچنین مقایسه تشکیل بیوفیلم ۲ سویه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در شکل ۱ قابل مشاهده می‌باشد. البته هر چهار اسانس توانستند تشکیل بیوفیلم را در هر دو سویه به‌طور معنی‌داری کاهش دهند ($P\leq0.001$).

جدول ۴- تأثیر ۴ گونه اسانس مرزه بر تشکیل بیوفیلم *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 29213

نمونه	شاهد	اسانس			
		خوزستانی	رشینگری	بختیاری	موتیکا
OD	۰/۱۸۱ ± ۰/۰۱۷	۰/۱۱۰ ± ۰/۰۱۸	۰/۰۶۸ ± ۰/۰۰۶	۰/۰۸۲ ± ۰/۰۱۱	۰/۰۶۳ ± ۰۰۴
درصد کاهش	---	۳۹/۳۴	۶۲/۵۰	۵۴/۷۸	۶۵/۲۶
معنی‌دار بودن تفاوت	---	+	+	+	+

+: دارای اختلاف معنی‌دار

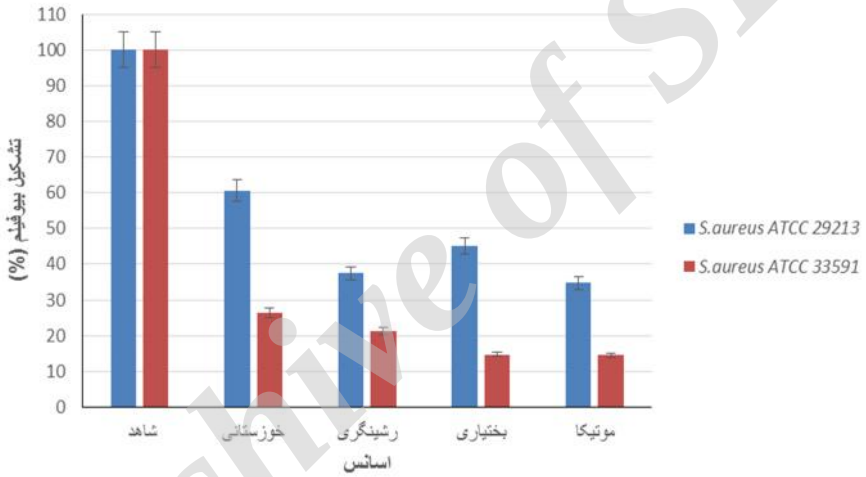
Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۵- تأثیر ۴ گونه اسانس مرزه بر تشکیل بیوفیلم *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 33591

نمونه	شاهد	اسانس			
		خوزستانی	رشینگری	بختیاری	موتیکا
OD	۰/۳۵۹ ±۰/۰۱۶	۰/۰۹۴ ±۰/۰۰۴	۰/۰۷۶ ±۰/۰۰۸	۰/۰۵۳ ±۰/۰۰۵	۰/۰۵۲ ±۰/۰۰۶
درصد کاهش	---	۷۳/۷۵	۷۸/۷۶	۸۵/۲۵	۸۵/۵۳
معنی‌دار بودن تفاوت	---	+	+	+	+

+: دارای اختلاف معنی‌دار



شکل ۱- مقایسه تشکیل بیوفیلم دو سویه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در محیط حاوی ۴ گونه اسانس مرزه با نمونه شاهد

جدول ۶- تأثیر۴ گونه اسانس مرزه بر فعالیت همولیتیکی *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 29213

نمونه	شاهد	اسانس			
		خوزستانی	رشینگری	بختیاری	موتیکا
OD	۰/۳۵۸ ± ۰/۰۲۷	۰/۱۸۱ ± ۰/۰۱۳	۰/۱۰۹ ± ۰/۰۱۶	۰/۲۱۱ ± ۰/۰۲۴	۰/۲۴۲ ± ۰/۰۰۷
درصد کاهش	---	۴۹/۳۹	۶۹/۵۲	۴۰/۹۱	۳۲/۲۵
معنی‌دار بودن تفاوت	---	+	+	+	+

+: دارای اختلاف معنی‌دار

Archive of SID

www.SID.ir

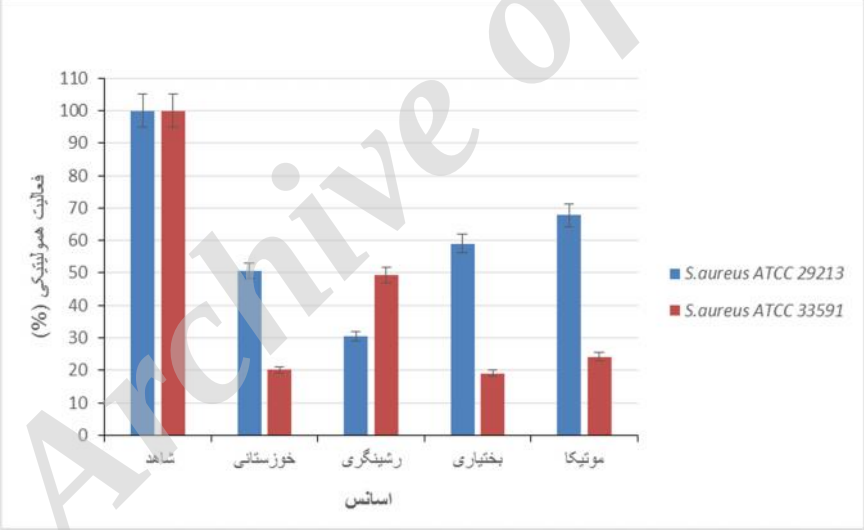
نتایج تأثیر اسانس‌ها بر تولید همولیزین

میزان فعالیت همولیتیکی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 29213 و ATCC 33591 در محیط‌های حاوی ۴ اسانس گیاه مرزه در جدول‌های ۶ و ۷ و همچنین مقایسه فعالیت همولیتیکی این دو سویه در شکل ۲ قابل مشاهده است. نتایج نشان‌دهنده کاهش معنی‌دار فعالیت همولیتیکی هر دو سویه حساس و مقاوم به متی‌سیلین *استافیلوکوکوس اورئوس* در حضور هر ۴ اسانس بود ($P\leq0.001$).

جدول ۷- تأثیر۴ گونه اسانس مرزه بر فعالیت همولیتیکی *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 33591

نمونه	شاهد	خوزستانی	رشینگری	بختیاری	موتیکا
OD	۰/۳۳۶ ± ۰/۰۲۱	۰/۰۶۸ ± ۰/۰۰۲	۰/۱۶۶ ± ۰/۰۱۷	۰/۰۶۴ ± ۰/۰۰۳	۰/۰۸۱ ± ۰/۰۰۴
درصد کاهش	---	۷۹/۸۴	۵۰/۶۵	۸۰/۹۳	۷۵/۷۷
معنی‌دار بودن تفاوت	---	+	+	+	+

+: دارای اختلاف معنی‌دار



شکل ۲- مقایسه فعالیت همولیتیکی دو سویه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در محیط حاوی ۴ گونه اسانس مرزه با نمونه شاهد

بحث

هدف از این مطالعه، بررسی اثرات ضدمیکروبی چهار گونه اسانس گیاه مرزه بر دو گونه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌عنوان جایگزینی برای استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها بود. در پژوهش انجام شده توسط Sefidkon و همکاران (۲۰۰۷b) به بررسی اثرات ضدمیکروبی اسانس دو گونه مرزه بختیاری و خوزستانی در دو مرحله برداشت، بر ۵ نوع باکتری گرم مثبت و ۳ نوع باکتری گرم منفی پرداخته‌اند.

Archive of SID
www.SID.ir

نتایج آنان نشان داد که اسانس‌های *S. khuaistanica* در هر دو مرحله برداشت و اسانس *S. bachtiarica* در مرحله قبل از گلدهی دارای اثرات ضدمیکروبی قابل ملاحظه‌ای هستند که می‌توانند به‌عنوان جایگزینی مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌های سنتزی که مقاومت باکتری‌ها به آنها روز به روز در حال افزایش است بکار روند. در مطالعه قطر هاله عدم رشد بیشترین میزان مهار توسط اسانس مرزه خوزستانی بر باکتری *S. aureus* ATCC 29213 بوده‌است. همچنین در بررسی‌های انجام شده در این تحقیق در تشکیل بیوفیلم در محیط حاوی ۴ گونه اسانس مرزه و با توجه به جدول‌های ۶ و ۷ می‌توان مشاهده کرد که بیشترین درصد مهار تشکیل بیوفیلم در محیط حاوی اسانس مرزه موتیکا در دو باکتری بوده است. همچنین با توجه به شکل ۱ می‌توان مشاهده نمود که میزان مهار تشکیل بیوفیلم در سویه *S. aureus* ATCC 33591 در هر یک از چهار اسانس گیاه مرزه دارای موفقیت بیشتری نسبت به سویه *S. aureus* ATCC 29213 بوده است. علاوه‌بر این در تحلیل‌های آماری انجام شده تفاوت بین هر یک از اسانس‌ها در مهار تشکیل بیوفیلم در سطح ۰/۰۵٪ کاملاً معنی‌دار است. در بررسی دو به دو بین هر یک از اسانس‌ها و آزمون کنترل مثبت، تفاوت معنی‌دار مشاهده گردید. در مطالعه درصد کاهش همولیز خون خرگوش توسط ۴ گونه اسانس، بیشترین درصد کاهش مربوط به اسانس مرزه خوزستانی و مرزه بختیاری در سویه *S. aureus* ATCC 33591 است. البته لازم به ذکر است که بین اسانس مرزه خوزستانی و مرزه بختیاری در کاهش درصد همولیز تفاوت معنی‌داری وجود ندارد اما در مقایسه بین این دو اسانس با آزمون کنترل مثبت تفاوت کاملاً معنی‌دار است. اما در بررسی سویه *S. aureus* ATCC 29213 بیشترین درصد کاهش همولیز مربوط به اسانس مرزه رشینگری می باشد. البته تفاوت هر یک از اسانس‌ها با شاهد در هر دو باکتری معنی‌دار است. در مطالعه‌ای که توسط Mohmmadpour و همکاران (۲۰۱۱) بر خواص ضد باکتریایی و ضد قارچی اسانس گونه‌هایی از سه جنس آویشن (Thyme) و دو اکوتیپ کاکوتی و گونه مرزه بختیاری (*Satureja bachtiarica*) انجام شد اسانس مرزه بختیاری بیشترین اثر ضدمیکروبی را در بین دیگر اسانس‌های گیاهی مورد بررسی در این تحقیق داشت که با نتایج مطالعات ما همخوانی دارد. در مطالعه دیگری که توسط Habibian Dehkordi و همکاران (۲۰۱۳) در ارزیابی اثرات ضدمیکروبی عصاره مرزه بختیاری انجام شد نتایج نشان داد که استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی در حضور مرزه بختیاری با غلظت ۲٪ و ۵٪ در مقایسه با زمان صفر با کاهش مواجه شد اما این کاهش در مورد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* چشمگیرتر بود. همچنین تفاوت معنی‌داری در تعداد میکروارگانیسم‌های شمارش شده در زمان‌های مختلف بین گروه شاهد و گروه‌های آزمایشی در هر دو باکتری مورد آزمایش وجود داشت. مطالعات مختلفی در مورد اثرات ضدمیکروبی اسانس‌های گیاهی، به‌ویژه مرزه انجام شده است. فعالیت ضد میکروبی اسانس‌ها به‌ویژه خانواده Lamiaceae به گروهی از ترپنوئیدهای کوچک و ترکیب های فنولیک (پولگون، تیمول و کارواکرول) نسبت داده می‌شود. البته هرچه درصد ترکیب‌های فنلی بالاتر باشد خاصیت ضدمیکروبی آن گیاه بیشتر است. در مطالعه انجام شده توسط Kim و همکاران (۱۹۹۵) اثرات ضدباکتریایی و محاسبه MIC و MBC کارواکرول بر روی سالمونلا تیفی موریوم و سویه مقاوم به ریفامپسین آن در محیط تریپتیک سوی آگار (با استفاده از دیسک‌های آغشته به غلظت‌های مورد نظر کارواکرول و تعیین منطقه جلوگیری از رشد) و در محیط Trypticase Soy Broth (از روی اندازه‌گیری کدورت رشد با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۵۰ نانومتر) و بعد کشت بر روی تریپتیک سوی آگار مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان دادند که کارواکرول اثرات ضدباکتریایی قوی بر هر دو سویه مورد مطالعه داشت.

اسانس‌های گیاهی یکی از منابع بالقوه واجد ترکیب‌های ضدباکتریایی می‌باشند (Adiguzel *et al.*, 2007) و برای این منظور بسیار مؤثر و مفید هستند (Bagamboula *et al.*, 2004). مقایسه نتایج گزارش شده در مورد خواص

Archive of SID

www.SID.ir

ضدباکتریایی اسانس های مختلف بسیار دشوار است. از دلایل آن می‌توان به تفاوت در روش‌های مختلف بررسی خواص ضدباکتریایی بکار برده شده، اشاره کرد (Akhundzadeh Basti *et al.*, 2005). به‌طور کلی ترکیب‌های اسانس‌های گیاهی برحسب منطقه جغرافیایی رویش گیاه، سن گیاه، واریته گیاهی و روش استخراج اسانس متفاوت است (Bagamboula *et al.*, 2004). مدل های مختلفی در مطالعات گوناگون به‌منظور بررسی اثرات ضد باکتریایی اسانس‌های گیاهی انجام شده است (Kotan *et al.*, 2013؛ Bahador *et al.*, 2015). در برخی از این روش‌ها از مدل‌های آزمایشگاهی مثل محیط کشت و در برخی دیگر از مدل‌های غذایی برای بررسی اثرات ضدمیکروبی اسانس‌ها استفاده شده است (Kout Soumanis *et al.*, 1999؛ Valero & Salmeron, 2003). با توجه به اینکه عمدتاً تحقیقات بر میکروب‌های خاصی متمرکز نیستند، بنابراین بررسی‌های مقایسه‌ای بین مطالعات انجام شده میسر نمی‌باشد. باوجود این نتایج این پژوهش بیانگر اثرات مثبت اسانس های مرزه بر استافیلوکوکوس اورئوس بوده‌است. با توجه به این نتایج و مطالعات تکمیلی می‌توان به استفاده از اسانس‌های مذکور در کنترل باکتری‌های نامبرده امیدوار بود.

به‌عنوان نتیجه‌گیری باید گفت که با توجه به نتایج یادشده می‌توان بیان کرد که هر یک از چهار اسانس گیاه مرزه که در این تحقیق مورد ارزیابی قرار گرفت توانایی کاهش تولید دو فاکتور بیماری‌زایی را بر دو سویه استافیلوکوکوس اورئوس داشته است. این امر می‌تواند باعث کاهش بیماری‌زایی باکتری در حضور این اسانس‌ها شود. بنابراین باید در نظر داشت که این اثرات در غلظت‌های subMIC بررسی شد، زیرا در غلظت های MIC و MBC دارای اثرات بازدارندگی رشد و کشندگی بود و عملاً نمی شد این آزمایش‌ها را انجام داد (Lambert *et al.*, 2001). از این‌رو شاید بتوان با مطالعات بیشتر به‌ویژه بررسی ترکیب‌های مؤثر این اسانس‌ها به داروهای گیاهی مؤثر علیه این باکتری دست پیدا کرد.

سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه شاهد انجام شده است. از همکاران بخش تحقیقات گیاهان دارویی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور نیز به‌دلیل تهیه اسانس‌ها تشکر می‌گردد.

منابع مورد استفاده

- Adiguzel, A., Ozer, H., Kilic, H. and Cetin, B., 2007. Screening of antimicrobial activity of essential oil and methanol extract of *Satureja hortensis* on foodborne bacteria and fungi. Czech Journal of Food Sciences, 25(2): 81-89.
- Akhundzadeh Basti, A., Razavilor, V., Misaghi, A., Radmehr, B., Abbasifar, R., Yazdani, D. and Akhundzadeh, S., 2005. Effect of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil on probability of growth initiation of Staphylococcus aureus in a brain heart infusion broth. Journal of Medicinal Plants, 2(10): 60-63.
- Anand, A.K., Mohan, M., Haider, S.Z. and Sharma, A., 2011. Essential oil composition and antimicrobial activity of three *Ocimum* species from Uttarakhand (India). International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 3(3): 223-225.
- Bagamboula, C.F., Uyttendaele, M. and Debevere, J., 2004. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and ρ-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. Food Microbiology, 21: 33-42.
- Bahador, A., Saghi, H., Ataeekachoei, R. and Esmaeili, D., 2015. The study of inhibition effects *Satureja khuzistanica* essence against gene expression bap *Acinetobacter baumannii* with Real time PCR technique. Iranian Journal Medical Microbiology, 9: 42-49.
- Carroll, K.C., Hobden, J.A., Miller, S., Morse, S.A., Mietzner, T.A., Detrick, B., Mitchell, T.G., Mckerrow, J.H. and Sakanari, J.A., 2016. Jawetz Melnick & Adelbergs Medical Microbiology. Mc Graw Hill, USA, 864p.
- CLSI., 2015. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Approved Standard. M07-A10.
- Emami, A., Shams-Ardakani, M.R. and Mehregan, I., 2004. Encyclopedia of Medicinal Plants. TMRC, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences, 44p.

Archive of SID
www.SID.ir

- Farsam, H., Amanlou, M., Radpour, M., Salehnia, A.N. and Shafiee, A., 2004. Composition essential oils of wild and cultivated *Satureja khuzistanica* Jamzad from Iran. Flavors and Fragrance Journal, 19: 308-310.
- Gradwohl, R.B.H., Sonnenwirth, A.C. and Jarett, L., 1980. Gradwohl's Clinical Laboratory Methods and Diagnosis. Mosby. USA, 2676p.
- Habibian Dehkordi, S., Gholipour, S., Moshtsghi Broojeni, H. and Fallah, A., 2013. Evaluating antibacterial effects of alcoholic extract of Satureja bactiarica on some foodborne pathogenic bacteria of meat. Pajouhesh & Sazandegi, 104: 28-37.
- Hoseini, S., Niakan, M., Saderi, H. and Emaneini, M., 2015. Comparison of cefoxitin disk diffusion and PCR for *mecA* gene methods for detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Daneshvar Medicine, 22: 41-46.
- Kim, J.M., Marshall, M.R., Cornell, J.A., Preston, J.F. and Well, C.L., 1995. Antibacterial activity of carvacrol, citral and geraniol against *Salmonella typhimurium* in culture medium and fish cube. Journal of Food Science, 60: 1346-1368.
- Kout Soumanis, K., Lambropoulon, K. and Nychas, G.J.E., 1999. A predictive model for the non-thermal inactivation of *Salmonella enteritidis* in a food model system supplemented with a natural antimicrobial. International Journal of Food Microbiology, 49: 63-74.
- Kotan, R., Dadasoglu, F., Karagoz, K., Cakir, A., Ozer, H., Kordali, S. and Dikbas, N., 2013. Antibacterial activity of the essential oil and extracts of *Satureja hortensis* against plant pathogenic bacteria and their potential use as seed disinfectants. Scientia Horticuturae, 153: 34-41.
- Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P.J. and Nychas, G.J., 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. Journal of Applied Microbiology, 91(3): 453-462.
- Majd, A., Tahernejad Satari, I., Khavarinejad, R. and Dosti, B., 2009. Evaluation of quantitative and qualitataive constituents of essential oil of Khuzestan drug savory (*Satureja khuzistanica* (during development of antimicrobial properties of the essential oils in vitro. Journal of Sciences Islamic Azad Univercity, 18: 51-60.
- Mann, E.E., Rice, K.C., Boles, B.R., Endres, J.L., Ranjit, D., Chandramohan, L., Tsang, L.H., Smeltzer, M.S., Horswill, A.R. and Bayles, K.W., 2009. Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. PLoS One, 4(6): e5822.
- Mohmmadpour, Gh., Majd, A., Nejad Satari, T., Merabian, S. and Hoseinzadeh, A., 2011. antibacterial and antifungal effects of three genus of thyme plants and two *Ziziphora* ecotypes and *Satureja bachtiarica* species. Journal of Science (Islamic Azad University), 78(1): 111-120.
- Sefidkon, F., Jamzad, Z. and Barazandeh, M.M., 2005. Essential oil of *Satureja bachtiarica* Bunge, A potential source of carvacrol. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 20: 425-439.
- Sefidkon, F. and Jamzad, Z., 2005. Chemical composition of the essential oil of three Iranian *Satureja* species (*S. mutica*, *S. macrantha* and *S. intermedia*). Food Chemistry, 91: 1-4.
- Sefidkon, F., Abbasi, Kh., Jamzad, Z. and Ahmadi, Sh., 2007a. The effect of distillation methods and stage of plant growth on the essential oil content and composition of *Satureja rechingeri* Jamzad. Food Chemistry, 100(3): 1054-1058.
- Sefidkon, F., Sadeghzadeh, L., Teimouri, M., Asgari, F. and Ahmadi, Sh., 2007b. Essential oils of two *Satureja* species (*S. Khuzistanica* Jamzad and *S. bachtiarica* Bunge) in two harvesting time. Iranian Journal of Medical Microbiology, 23: 174-182.
- Shi, C., Zhao, X., Li, W., Meng, R., Liu, Z., Liu, M., Guo, N. and Yu, L., 2015. Inhibitory effect of totarol on exotoxin proteins hemolysin and enterotoxins secreted by *Staphylococcus aureus*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 31(10): 1565-1573.
- Valero, M. and Salmeron, M.C., 2003. Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. International Journal of Food Microbiology, 85: 73-81.
- Zmantar, T., Kouidhi, B., Miladi, H., Mahdouani, K. and Bakhrouf, A., 2010. A microtiter plate assay for *Staphylococcus aureus* biofilm quantification at various pH levels and hydrogen peroxide supplementation. The New Microbiologica, 33(2): 137-145.

Archive of SID

www.SID.ir

Effect of *Satureja* essential oils on biofilm formation and hemolysin production in *Staphylococcus aureus*

E. Taghian[1], N. Saidi[1], F. Sefidkon[2], H. Saderi[1], I. Rasooli[1], R. Mohammad Salehi[1] and P. Owlia[3*]

1- Molecular Microbiology Research Center (MMRC), Shahed University, Tehran, Iran
2- Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran
3*- Corresponding Author, Molecular Microbiology Research Center (MMRC), Shahed University, Tehran, Iran
E-mail: powlia@gmail.com

Received: October 2017 Revised: January 2018 Accepted: January 2018

Abstract

Treatment of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) infection is a problematic subject in the world. The aim of this study was an evaluation of the antimicrobial effect of four species of *Satureja* essential oils on biofilm formation and hemolysin production in *S. aureus*. MIC of *Satureja* essential oils (*Satureja khuzistanica* Jamzad, *Satureja bachtiarica* Bunge, *Satureja rechingeri* Jamzad, *Satureja mutica* Fisch. & C. A. Mey.) were determined by micro dilution broth method against standard strains of *S. aureus* ATCC 29213(MSSA) & ATCC 33591(MRSA). Sub- MICs of *Satureja* essential oils were used to assay biofilm formation and hemolysin production. The results showed that all essential oils had antimicrobial effect against standard strains of *S. aureus*. In the presence of sub- MICs of essential oils, biofilm formation and hemolysin production were significantly reduced. The results show the potent antimicrobial effects of *Satureja* essential oils against *S. aureus* and more study is recommended to use it in controlling *S. aureus* infections.

Keywords: Antimicrobial activities, *Staphylococcus aureus*, *Satureja*.

Archive of SID

www.SID.ir