DOI: 10.22092/vj.2019.123253.1494
شماره ۱۲۶ بهار ۱۳۹۹
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

بررسی اثرات ضدباکتریایی عصاره اتانولی گیاهان پنیرباد و رزماری بر استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از بینی گوسفند

• **علی مقصودی (نویسنده مسئول)**
گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی؛ گروه بیوانفورماتیک؛ و پژوهشکده زیست فناوری کشاورزی، دانشگاه زابل, زابل، ایران
• **سعیده سعیدی**
پژوهشکده زیست فناوری کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران
تاریخ دریافت: ۱۸-۰۶-۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: ۲۱-۰۱-۱۳۹۸
Email: Alimaghsoudi@uoz.ac.ir

چکیده

استافیلوکوکوس اورئوس *(Staphylococcus aureus)* از جمله رایج‌ترین عوامل شیوع مسمومیت‌های غذایی باکتریایی است و می‌تواند از دام و محصولات دامی به انسان منتقل شود. لذا اهداف این پژوهش شامل جداسازی باکتری *S. aureus* از بینی گوسفندان بومی منطقه سیستان؛ بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های جداسازی شده به آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم؛ و مطالعه اثر ضدمیکروبی عصاره‌های اتانولی گیاهان پنیرباد *(Withania somnifera)* و رزماری *(Rosmarinus officinalis)* بر روی باکتری‌های جدا شده بود. به کمک روش‌های بیوشیمیایی از نمونه‌های بینی گوسفند ۱۵ سویه *S. aureus* جداسازی شد. عصاره اتانولی پنیرباد و رزماری توسط دستگاه روتاری و با کمک تقطیر در خلاء تهیه شد. با استفاده از روش استاندارد دیسک دیفیوژِن کربی- بائر، حساسیت سویه‌های باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم تعیین شد. همچنین تعیین حساسیت سویه‌های باکتری نسبت به عصاره گیاهان رزماری و پنیرباد با استفاده از روش رقت‌سازی در چاهک انجام شد. در بین آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی اگزاسیلین هیچگونه تأثیری بر ۱۵ سویه مورد مطالعه نداشت، ولی جنتامایسین موجب کشته شدن تمامی باکتری‌ها شد. بررسی حداقل غلظت مهارکننده و حداقل غلظت کشنده عصاره پنیرباد نشان داد که این عصاره در غلظت‌های کمتری نسبت به عصاره رزماری موجب مهار رشد باکتری‌ها می‌شود. هرچند به دلیل حساسیت سویه‌های مختلف این باکتری در تیمار با آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم درمان آنتی‌بیوتیکی به سرعت موجب کاهش جمعیت این میکروب می‌شود، اما به دلیل احتمال افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی پیشنهاد می‌شود از عصاره گیاهان دارویی به‌جای آنتی‌بیوتیک استفاده شود. مقایسه خواص ضدمیکروبی پنیرباد و رزماری در مطالعه حاضر نشان داد که عصاره اتانولی پنیرباد می‌تواند جایگزین مناسبی برای درمان با آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم باشد.

کلمات کلیدی: حداقل غلظت مهارکننده، حداقل غلظت کشنده، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، سیستان

www.SID.ir

Archive of SID

● Veterinary Researches & Biological Products No 126 pp: 16-25

Evaluation of antibacterial effects of ethanol extracts of Withania somnifera and *Rosmarinus officinalis* plants on *Staphylococcus aureus* isolated from sheep nose

By: Maghsoudi A., (Corresponding Author), Department of Animal Science, Faculty of Agriculture; Department of Bioinformatics, Center of Agricultural Biotechnology, University of Zabol and Saeedi S., Center of Agricultural Biotechnology, University of Zabol.

Received: 2018-09-09 **Accepted: 2019-04-10**

Email: Alimaghsoudi@uoz.ac.ir

Staphylococcus aureus considered as one of the commonest agents of bacterial food poisoning which may transfer to human from animals and animal-originated foods. Therefore, the aim of this study were isolation of the *S. aureus* from native sheep nose of Sistan region; evaluation of antibiotic resistance of isolated strains treated with common antibiotics; and studying the antimicrobial effects of ethanol extracts of *Withania somnifera* and *Rosmarinus officinalis* on isolated strains. A total of 15 strains of *S. aureus* were isolated through biochemical methods. Ethanol extracts of *W. somnifera* and *R. officinalis* obtained using Rotary apparatus and distillation in vacuum methodology. Susceptibility of the isolated strains to common antibiotics was determined via Kirby-Bauer disk diffusion standard test. Through dilution in well method susceptibility of the isolated strains were determined in treatment with ethanol extracts of *W. somnifera* and *R. officinalis*. Among evaluated antibiotics, the studied strains were not influenced by Oxacillin but Gentamicin controlled the bacterial growth completely. In comparison with *R. officinalis*, minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of *W. somnifera* arises in a lower amount to inhibit the growth of the bacteria. While due to susceptibility of the bacteria to the common antibiotics, treatment of the bacteria with antibiotics resulted in rapid decreasing in the bacterial population, however, due to probable antibiotic resistance, it is recommended that antibiotics would be replaced with plant extracts. Comparison between two treated extracts in the current study have shown that ethanol extract of *W. somnifera* could be introduced as a suitable replacement with common antibiotics.

Key words: Minimum Inhibitory Concentration, Minimum Bactericidal Concentration, Antibiotic Resistant, Sistan

مقدمه

استافیلوکوکوس‌ها متعلق به رده فیرمی‌باکتریا و خانواده میکروکوکاسه هستند و از جمله باکتری‌های گرم مثبت، بی‌حرکت، فاقد اسپور، هوازی و بی‌هوازی اختیاری می‌باشند (۱۱). اعضاء این جنس دارای بیش از ۲۰ گونه می‌باشد که در زیستگاه‌های مختلف پراکنده‌اند و آنتروتوکسین استافیلوکوکی تولید می‌کند. این سم در مقابل حرارت مقاوم بوده و از جمله مهمترین عوامل مسمومیت غذایی در انسان می‌باشد. هرساله آلودگی با این دسته از میکروب‌ها موجب خسارات اقتصادی زیادی در انسان و دام می‌شود (۱۹). این باکتری‌ها از طریق محصولات دامی از جمله فرآورده‌های لبنی و گوشت و منابع محیطی مثل گرد و غبار، هوا و آب به انسان منتقل می‌شوند (۵، ۸، ۱۳). استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*) احتمالاً شناخته‌شده‌ترین عضو این جنس است و یکی از رایج‌ترین عوامل شیوع مسمومیت‌های غذایی باکتریایی است. هرچند *S. aureus* بطور طبیعی در مخاط بینی، دستگاه تنفس و پوست انسان و دام دیده می‌شود، اما عامل ایجاد زخم‌های پوستی و دمل بوده و در برخی موارد باعث ایجاد عفونت‌های بیمارستانی بسیار خطرناک و مقاوم به درمان می‌گردد (۲۰). مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها موجب پیدایش *S. aureus* مقاوم به متی‌سیلین (Methicillin-Resistant *S. aureus*) شده است که مطالعات گسترده‌ای بر روی آن در حال انجام است (۱۰). مقاومت آنتی‌بیوتیکی *S. aureus* در فرآورده‌های دامی بدست آمده از گوسفند نیز گزارش شده است (۳۳).

از جمله موفقیت‌های تمدن‌های باستانی، توجه ویژه آن‌ها به سلامت افراد جامعه می‌باشد. طب سنتی که قدمتی برابر با تمدن‌های کهن دارد، در خواستگاه‌های اصلی تمدن باستان از جمله چین، هند، ایران، یونان مصر و امریکای لاتین توسعه داشته است. در طب سنتی تمرکز اصلی بر روی درمان با مواد طبیعی بویژه ترکیبات بدست آمده از گیاهان است (۳۸). تا اوایل قرن نوزدهم همچنان طب سنتی مهم‌ترین شیوه بشر برای درمان و پیش‌گیری از بیماری‌ها بود. اما تولید انبوه ترکیبات دارویی شیمیایی و فراگیر شدن آنها به دلیل قیمت مناسب آنها و از طرفی آموزش پزشکان با اصول پزشکی مدرن برای تجویز داروهای شیمیایی به مرور موجب شد طب سنتی و مصرف ترکیبات دارویی طبیعی به حاشیه برود. اما اثرات بعضاً نامناسب و عوارض ناشی از مصرف داروهای شیمیایی در سال‌های اخیر موجب شده است تا رویکرد جدیدی به پدیده طب سنتی، گیاهان دارویی و داروهای گیاهی در جهان شکل بگیرد؛ به شکلی که برخی کشورها تجارت گیاهان دارویی و داروهای گیاهی موجب گردش مالی

www.SID.ir

Archive of SID

بسیار بزرگی شده است (۱). رویش گیاهان دارویی در ارتباط با اقلیم می‌باشد و هر گیاهی در هر اقلیمی امکان زیستن ندارد. تنوع اقلیمی قابل ملاحظه در کشور ایران موجب شده است که دامنه بسیار متنوعی از گیاهان دارویی از جمله پنیرباد و رزماری امکان زیستن در ایران را داشته باشند.

گیاه پنیرباد (*Withania somnifera*) که به گیلاس زمستانی، انگورفرنگی سمی و جنسینگ هندی نیز معروف است و به خانواده سیب‌زمینیان (Solanaceae) تعلق دارد. این گیاه وحشی بوده و دارای بوته‌های چندساله ترد و کوتاه است (۷۵ cm - ۳۵). محل رویش این گیاه اغلب در چین، شبه‌قاره هند و کشورهای همسایه هندوستان می‌باشد اما در جنوب شرق ایران بویژه استان سیستان و بلوچستان نیز دیده می‌شود. به دلیل کوتاهی دوره زنده‌مانی بذر و افت سریع قوّه آن، نامیه امکان کشت این گیاه بصورت تجاری مهیا نشده است. اغلب مواد مؤثره این گیاه که دارای خاصیت دارویی می‌باشند (فلاونوئیدها)، در ریشه و برگ-های آن متمرکز شده‌اند (۳۶). مطالعات متعدد نشان داده‌اند که متابولیت‌های ثانویه پنیرباد دارای خواص ضدتوموری (۲۸)، ضدپیری، آنتی‌اکسیدانی (۱۵) و ضدمیکروبی (۲۴) هستند. همچنین این گیاه به عنوان یک داروی ضد اضطراب و محرک سیستم ایمنی مورد استفاده بوده و برای نارسایی کبدی و تحریک گیرنده‌های عصبی در سیستم عصبی مغز نیز مورد استفاده قرار می-گیرد. در طب یونانی از ریشه، برگ و دانه گیاه برای درمان رماتیسم نیز استفاده می‌شده است (۳۲).

گیاه رزماری (rosemary) با نام علمی *Rosmarinus officinalis* از خانواده نعناعیان (Lamiaceae) بوده و یک گیاه چندساله با ساقه چوبی است. رزماری از گیاهان بومی اقلیم‌های مدیترانه‌ای است ولی در ایران و بسیاری از نقاط جهان نیز بصورت خودرو و کشت شده دیده می‌شود. این گیاه به دلیل عطر ویژه برگ‌های آن شناخته می‌شود و به عنوان یکی از مهم‌ترین منابع گیاهی برای تولید تجاری مواد زیست‌فعال فرار و غیر فرار شناخته می‌شود (۲۷). از ترکیبات بدست آمده از رزماری (بویژه ترکیبات فنولی) بطور تجاری به عنوان یک ماده آنتی‌اکسیدان در صنایع غذایی و یک ماده ضدمیکروبی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۸, ۲۲) اما برخی خواص دیگر آن از جمله خاصیت حفاظتی برای کبد و سم‌زدایی از بدن نیز برای آن نشان داده شده است (۳۰). برای این گیاه خواص ضدسرطانی و ضدویروسی نیز گزارش شده است (۲۷). اخیراً در یک مطالعه استفاده از برگ رزماری در تغذیه گوسفند مورد بررسی قرار گرفته است (۷). بر همین اساس، اهداف این پژوهش شامل ۱) جداسازی باکتری *S. aureus* از بینی گوسفندان بومی منطقه سیستان (حومه شهر زابل)؛ بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های جداسازی شده به آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم؛ و ۳) در نهایت مطالعه اثر ضدمیکروبی عصاره‌های اتانولی گیاهان پنیرباد و رزماری بر روی باکتری‌های جدا شده بود.

مواد و روش‌ها

جداسازی *S. aureus* از گوسفندان

بخش عمده افراد ناقل *S. aureus* این باکتری را در مجاری تنفسی و بینی خود دارند. به همین دلیل از ۱۳۵ رأس گوسفند سالم در منطقه سیستان نمونه‌های سواپ آغشته به رطوبت بینی گرفته شد. در ادامه به کمک روش‌های بیوشیمیایی از نمونه‌ها ۱۵ سویه S. aureus جداسازی شده و بر روی محیط‌های کشت بلاد آگار و نوترینت آکار کشت شد. خلوص باکتری‌های جداشده با آزمون مانیتول، کاتالاز و رنگ‌آمیزی گرم تایید شد (۳).

تهیه عصاره

بخش هوایی گیاهان رزماری و پنیرباد از منطقه سیستان جمع‌آوری شد و هویت آنها توسط متخصصین پژوهشکده کشاورزی دانشگاه زابل تایید گردید. سپس نمونه‌های گیاهی در دمای اتاق و شرایط سایه خشک گردید. برای تهیه عصاره اتانولی پنیرباد و رزماری، مقدار ۱۰ g پودر خشک گیاه بطور جداگانه به همراه ۱۰۰ mL از اتانول ۹۶٪ (به عنوان حلال) در ظروف شیشه‌ای قرار داده شد. محتوی ظروف به مدت ۲۴ h در دمای اتاق توسط دستگاه شیکر (Pars Azma-ایران) با سرعت rpm ۱۳۰ مخلوط شده، سپس به وسیله کاغذ واتمن شماره دو صاف گردید. جداسازی حلال از عصاره توسط دستگاه روتاری (Heidolph-آلمان) و با کمک پمپ خلاء (تقطیر در خلاء) انجام گرفت. عصاره به دست آمده پس از توزین در حلال DMSO (۱۰٪) حل شد. عصاره بدست آمده تا زمان استفاده در آزمایشات ضدمیکروبی در دمای چهار درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری شد.

تهیه سوسپانسیون ۰/۵ مک فارلند

برای تهیه سوسپانسیون میکروبی استاندارد، ابتدا ۲۴ h قبل از انجام آزمایش، باکتری از کشت ذخیره به محیط کشت شیب‌دار آگار مغذی تلقیح شد. پس از رشد کلونی‌های باکتری، سطح محیط کشت با محلول نرمال سالین شستشو داده شد تا سوسپانسیون غلیظ میکروبی حاصل گردد. سپس مقداری از سوسپانسیون باکتری، داخل لوله استریل درب‌دار حاوی محلول نرمال سالین ریخته شده و کدورت آن از طریق اندازه‌گیری جذب با دستگاه اسپکتروفوتومتر (Unico- آمریکا) در طول موج ۶۳۰ nm اندازه‌گیری شد و تا هنگام برابر شدن کدورت محلول با کدورت ۰/۵ مک فارلند، با محلول نرمال سالین رقیق گردید. بدین ترتیب سوسپانسیون باکتری با غلظت ۱×۱۰۸ cfu/mL تهیه گردید (۲۴).

تعیین حساسیت باکتری به آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم

با استفاده از روش استاندارد دیسک دیفیوژن کربی- بائر (Kirby-Bauer Disk Diffusion)، حساسیت سویه‌های باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های اُگزاسیلین (Oxacillin, OXA)، آموکسی‌سیلین-کلاوولانیک اسید (Amoxicillin-clavulanic acid, AMC، که در این مقاله اختصاراً آموکسی‌سیلین گفته می‌شود)، آمپی‌سیلین (Ampicillin, AMP)، جنتامایسین (Gentamicin, GEN)، سفتازیدیم (Ceftazidime, CAZ)، آزیترومایسین (Azithromycin, AZM) و ونکومایسین (Vancomycin, VAN) (پادتن طب، ایران) مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور، در ابتدا از تمام سویه‌های باکتری، غلظت ۰/۵ مک فارلند در محیط مایع آبگوشتی مولر هینتون (Muller-Hinton Broth, MHB) تهیه و سپس بر روی محیط آگار مولر هینتون (Muller-Hinton Agar, MHA) پخش و کشت داده شدند. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی در فاصله مناسب از یکدیگر

www.SID.ir

Archive of SID

قرار گرفتند و پلیت‌ها به مدت ۲۴ h در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در انکوباتور قرار گرفته و هاله‌های بازدارنده جهت ارزیابی و تعیین مقاومت/حساسیت سویه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های مورد نظر، مشخص شد. این آزمایش در سه تکرار انجام گردید.

تعیین میزان حساسیت ۱۵ سویه *S. aureus* نسبت به عصاره اتانولی گیاهان پنیرباد و رزماری

تعیین حساسیت سویه‌های باکتری نسبت به عصاره اتانولی گیاهان رزماری و پنیرباد با استفاده از روش رقت‌سازی در چاهک انجام شد. برای این منظور از میکروپلت ۹۶ خانه استفاده شد. ابتدا به هر چاهک مقدار ۱۰۰ µL از محیط مایع آبگوشتی مولر هینتون (MHB) اضافه شد. سپس به چاهک اول ۱۰۰ µL از محلول رقیق شده از هر یک از عصاره‌های اتانولی رزماری یا پنیرباد اضافه شد. پس از مخلوط کردن ۱۰۰ µL از چاهک اول برداشته به چاهک دوم اضافه شد. بدین ترتیب تا آخرین چاهک رقت‌سازی انجام شد. از چاهک آخر ۱۰۰ µL محیط کشت خارج گردید. مقدار ۱۰ µL از سوسپانسیون میکروبی (حاوی ۱×۱۰۸ cfu/mL باکتری، معادل ۰/۵ مک فارلند) به همه چاهک‌ها اضافه شده و در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ h نگهداری شد. اولین چاهکی که پس از قرار دادن در انکوباتور از رشد باکتری جلوگیری کرده بود، به‌عنوان حداقل غلظت مهارکننده (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) در نظر گرفته شد. برای اطمینان، از چاهک‌های شفاف ۱۰ µL برداشته به محیط مولر هینتون آگار منتقل گردید و پس از ۲۴ h اولین رقتی که توانست ۹۹/۹ ٪ باکتری را از بین ببرد، به‌عنوان حداقل غلظت باکتری‌کشی (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) در نظر گرفته شد. این آزمایش در سه تکرار انجام گردید.

نتایج

نتایج حاصل از بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ۱۵ سویه *S. aureus* جدا شده از بینی گوسفندان سیستان در جدول ۱ نشان داده شده است. چنانچه مشاهده می‌شود آنتی‌بیوتیک اگزاسیلین هیچگونه تاثیری بر ۱۵ سویه مورد مطالعه نداشت و تمامی سویه‌ها در تیمار با این آنتی‌بیوتیک زنده ماندند (R = ۱۰۰ ٪)، در حالی که جنتامایسین موجب کشته شدن

جدول ۱- مقاومت آنتی بیوتیکی ۱۵ سویه *S. aureus* جدا شده از بینی گوسفندان سیستان به برخی آنتی بیوتیک های متداول

کد باکتری	اگزاسیلین	آموکسی سیلین	آمپی سیلین	جنتامایسین	سفتازیدیم	آزیترومایسین	ونکومایسین
S. aureus 1	R	S	S	S	S	I	R
S. aureus 2	R	S	S	S	S	S	S
S. aureus 3	R	S	S	S	S	I	S
S. aureus 4	R	S	S	S	S	S	S
S. aureus 5	R	I	I	S	I	S	S
S. aureus 6	R	S	S	S	S	S	S
S. aureus 7	R	S	S	S	S	S	S
S. aureus 8	R	S	I	S	I	S	I
S. aureus 9	R	S	S	S	S	S	S
S. aureus 10	R	S	S	S	S	S	S
S. aureus 11	R	S	S	S	S	I	R
S. aureus 12	R	S	S	S	S	S	S
S. aureus 13	R	S	S	S	S	I	S
S. aureus 14	R	S	S	S	I	S	S
S. aureus 15	R	I	I	S	S	S	S

n *S. aureus*: سویه های مختلف *S. aureus* مورد مطالعه؛ R: مقاوم (Resistant)؛ I: نیمه حساس (Intermediate)؛ S: حساس (Sensitive).

www.SID.ir

Archive of SID

تمامی باکتری‌ها شد (S= ۱۰۰). بجز آنتی‌بیوتیک ونکومایسین که تأثیری بر سویه‌های یک و ۱۱ باکتری نداشت، سایر آنتی‌بیوتیک‌ها موجب کشته شدن سویه-های مختلف *S. aureus* مورد مطالعه نشدند. درصد مقاومت/حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها در جدول ۲ نشان داده شده است. چنانچه در جدول ۱ نیز نشان داده شد، تمامی سویه‌های مورد مطالعه نسبت به اگزاسیلین بطور کامل مقاوم بودند و جنتامایسین موثرترین آنتی‌بیوتیک علیه ۱۵ سویه *S. aureus* بود. پس از جنتامایسین، بیشترین حساسیت باکتری‌ها در تیمار با آنتی‌بیوتیک آموکسی‌سیلین بود، در حالی‌که حساسیت باکتری‌ها در تیمار با آمپی‌سیلین، سفتازیدیم و ونکومایسین به یک اندازه بود (S= ۸۰). هرچند ٪ ۲۰ از سویه‌های جداسازی شده باکتری نسبت به آمپی‌سیلین و سفتازیدیم نیمه‌حساس بودند. پس از اگزاسیلین که هیچ‌گونه تاثیر کشندگی بر باکتری‌های مورد مطالعه نداشت، ۱۳/۳۳ درصد باکتری‌ها در تیمار با ونکومایسین نیز مقاومت نشان دادند. بجز اگزاسیلین، آنتی‌بیوتیک آزیترومایسین دارای کمترین درصد کشندگی باکتری‌ها به میزان ۷۳/۳۳ درصد بود. با این وجود می‌توان گفت تنها از اگزاسیلین نمی‌توان جهت مهار رشد باکتری‌ها استفاده نمود و سایر آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه درجات مختلفی از کشندگی باکتری را نشان دادند.

در جدول ۲ الگوی شدت بازدارندگی سویه‌های باکتری *S. aureus* در غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی پنیرباد و رزماری نشان داده شده است. رشد تمامی سویه‌ها در غلظت ppm ۲۰ عصاره هر دو گیاه دارویی بطور کامل متوقف شد (علامت "-" در جدول ۳). در مقابل با رقیق کردن متوالی عصاره، در رقت ppm ۰/۶۲ و ۰/۳۱ تمامی سویه‌ها در تیمار با عصاره رزماری بطور کامل رشد کردند (در این دو رقت عصاره خاصیت ممانعت‌کنندگی از رشد یا کشندگی نداشت) و در رقت ppm ۰/۳۱ از عصاره پنیرباد ٪ ۸۶/۶۷ سویه‌ها بطور کامل و ٪ ۱۳/۳۳ بطور نسبی رشد کردند. در غلظت ppm ۱۰ عصاره اتانولی رزماری رشد سویه-های ۳ و ۱۲ مهار شد و سایر سویه‌ها بطور کامل کشته شدند و در همین غلظت از عصاره اتانولی پنیرباد سویه‌های ۵ و ۱۳ مهار شده و سایر سویه‌ها کشته شدند. این نتایج نشان می‌دهد که دو نوع عصاره اتانولی مورد مطالعه تأثیر مشابهی بر روی ۱۵ سویه باکتری *S. aureus* مورد مطالعه نداشتند. لذا در مطالعه حاضر مقاوم‌ترین سویه‌ها در تیمار با عصاره

جدول ۲-الگوی شدت بازدارندگی سویه های باکتری *S. aureus* در غلظت های مختلف (ppm) عصاره اتانولی پنیرباد و رزماری (پنیرباد/رزماری)

کد باکتری	۲۰	۱۰	۵	۲/۵	۱/۲۵	۰/۶۲	۰/۳۱
S. aureus 1	-/-	-/-	-/+	-/++	+/++	++/++	++/++
S. aureus 2	-/-	-/-	-/-	-/+	-/++	+/++	++/++
S. aureus 3	-/-	-/+	-/++	+/++	++/++	++/++	++/++
S. aureus 4	-/-	-/-	+/+	++/++	++/++	++/++	++/++
S. aureus 5	-/-	+/-	++/-	++/+	++/++	++/++	++/++
S. aureus 6	-/-	-/-	-/+	-/++	+/++	++/++	++/++
S. aureus 7	-/-	-/-	-/-	+/-	++/+	++/++	++/++
S. aureus 8	-/-	-/-	-/-	-/+	-/++	-/++	+/++
S. aureus 9	-/-	-/-	+/-	++/-	++/+	++/++	++/++
S. aureus 10	-/-	-/-	-/+	+/++	++/++	++/++	++/++
S. aureus 11	-/-	-/-	-/-	-/+	-/++	-/++	+/++
S. aureus 12	-/-	-/+	+/++	++/++	++/++	++/++	++/++
S. aureus 13	-/-	+/-	++/-	++/-	++/+	++/++	++/++
S. aureus 14	-/-	-/-	-/+	-/++	+/++	++/++	++/++
S. aureus 15	-/-	-/-	+/-	++/-	++/+	++/++	++/++

n *S. aureus*: سویه های مختلف *S. aureus* مورد مطالعه؛ "-": عدم رشد (کشته شدن باکتری)؛ "+": تا حدی رشد؛ و "++": رشد کامل.

www.SID.ir

Archive of SID

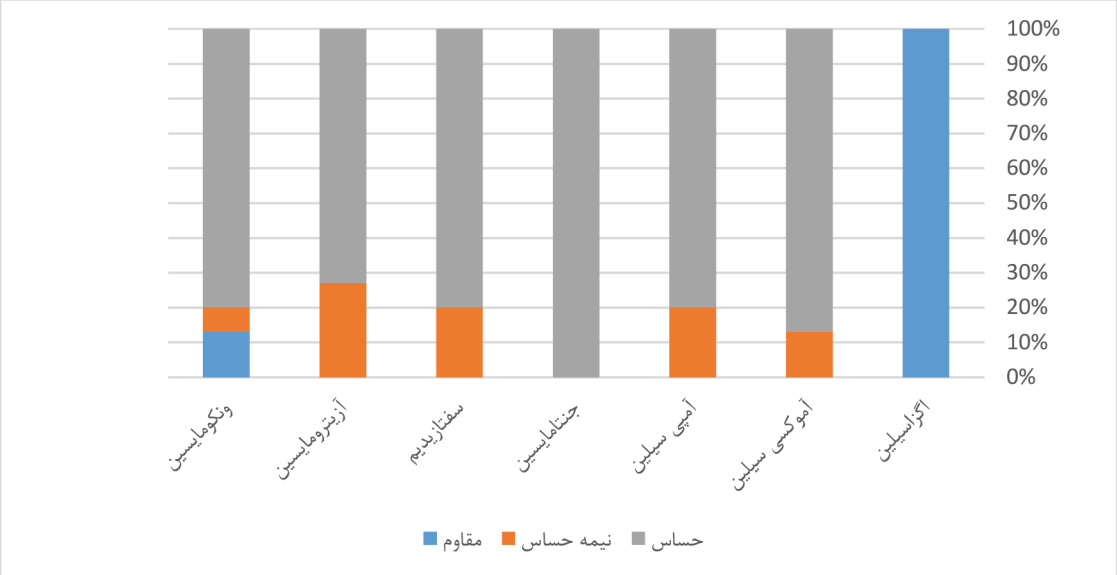
پـنیرباد سویه‌های ۵ و ۱۳ و در تیمار با عصاره رزماری سویه‌های ۳ و ۱۲ بودند. سویه‌های ۸ و ۱۱ نیز حساس‌ترین سویه‌های باکتری در تیمار با پنیرباد بودند که در غلظت ۰/۶۲ ppm کشته شدند. بطورکلی مقایسه دو عصاره مورد مطالعه نشان داد که عصاره پنیرباد در غلظت‌های کمتر نیز قابلیت مهار و کشتن باکتری‌ها را دارد (مقایسه نتایج در جداول ۳ و ۴)، و از این نظر قوی‌تر از عصاره رزماری است.

الگوی حساسیت سویه‌های مختلف *S. aureus* نسبت به رقت‌های مختلف عصاره اتانولی پنیرباد (جدول ۳) و رزماری (جدول ۴) نشان می‌دهد که تمامی سویه‌های مورد مطالعه در غلظت ۲۰ ppm هر دو عصاره اتانولی کشته شده‌اند. همچنین حداقل غلظت کشندگی (MBC) و حداقل غلظت مهارکنندگی (MBC) در غلظت ۱۰ ppm هر دو عصاره برابر بود (به ترتیب ۸۶/۶۷٪ و ۱۳/۳۳٪)، هرچند مهار رشد بر روی سویه‌های متفاوتی اتفاق افتاد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که چنانچه عصاره اتانولی پنیرباد تا ۰/۶۲ ppm نیز رقیق شود، قدرت میکروب‌کشی خواهد داشت (کشته شدن ۱۳/۳۳٪ از سویه‌ها)، در حالی‌که عصاره رزماری تا غلظت ۲/۵ ppm قدرت میکروب‌کشی داشت (۲۶/۶۷٪). در هر دو مورد عصاره اتانولی پنیرباد و رزماری با افزایش رقت عصاره روند کاهشی ثابتی برای حداقل غلظت باکتری‌کشی مشاهده شد ولی برای حداقل غلظت مهارکنندگی با کاهش غلظت عصاره‌ها روندی مشاهده نشد.

بحث

پرورش گوسفند از دیرباز در منطقه سیستان رواج داشته است و نژاد بلوچی به عنوان یکی از بهترین نژادهای گوسفند گوشتی ایران در این منطقه نگهداری می‌شود که علی‌رغم جثه کوچک بر روی مراتع بسیار فقیر و پس‌چر مزارع پرورش داده می‌شود. بیشترین جمعیت در بین نژادهای مختلف گوسفند در ایران مربوط به این نژاد است و در تمامی نواحی شرق ایران توسعه پیدا کرده است. ویژگی بارز این نژاد سرسختی و مقاومت بسیار خوب به شرایط اقلیمی ناسازگار می‌باشد، بصورتی که تحت شرایط مدیریتی بسیار ضعیف و اقلیم خشن منطقه قادر به زندگی و تولید می‌باشد. پرورش گوسفند نژاد بلوچی هنوز به شیوه سنتی رواج دارد و به دلیل قانع بودن این نژاد و تولید کم آن در سیستم‌های صنعتی بازده اقتصادی مناسبی ندارد. به همین دلیل این نژاد اغلب در سیستم‌های پرورش باز و در گله‌های پراکنده و با تعداد گوسفند کم تا متوسط پرورش داده می‌شود و بجز برنامه متداول واکسیناسیون، معمولاً درمان‌های دارویی بر روی آن مرسوم نیست. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ترشحات بینی گوسفندان بومی منطقه سیستان آلوده به باکتری *S. aureus* است. هرچند مطالعه مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های جدا شده این باکتری از بینی گوسفندان نشان داد که به اغلب آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم مقاوم نشده‌اند، اما وجود آلودگی‌های میکروبی هرچند به دلیل مقاومت ذاتی این نژاد موجب بیماری در این حیوان نمی‌شود، ولی می‌تواند عملکرد حیوان را تضعیف نماید. لذا به‌کار بردن ترکیبات ضدمیکروبی جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها ممکن است در عملکرد این گوسفندان تأثیر مثبت داشته باشد.

مطالعه ژنوم باکتری *S. aureus* مقاوم به متی‌سیلین نشان داد که درمان آنتی‌بیوتیکی بیماران مبتلا به S. aureus حساس به متی‌سیلین (Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus*) منجر به انتقال



نمودار ۱- مقاومت آنتی بیوتیکی (٪) ۱۵ سویه *S. aureus* جدا شده از بینی گوسفند به برخی آنتی بیوتیک های متداول

www.SID.ir

Archive of SID

سویه مقاوم به بیمار می‌شود. این یافته نشان می‌دهد که درمان بی‌رویه با آنتی‌بیوتیک و افزودن آنتی‌بیوتیک به جیره حیوانات برای مقاصد غیردرمانی (Subtherapeutic) منجر به ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در افراد جامعه می‌شود که پدیده‌ای بسیار خطرناک است (۴). در بررسی ۱۲۸ نمونه از سویه‌های مختلف Staphylococcus نشان داده شد که به دلیل تنوع در مقاومت آنتی‌بیوتیکی، پیش از تجویز آنتی‌بیوتیک مناسب بهتر است آزمون القاء به منظور تعیین آنتی‌بیوتیک مناسب انجام شود (۲۵). اخیراً بررسی آلودگی *S. aureus* در افراد داوطلب ساکن شهرستان زابل نشان داد که بیش از ۴۰ درصد از موارد آلودگی مقاوم به متی‌سیلین بودند (۲۱). همچنین در یک پژوهش دیگر بیش از ۹۰ درصد نمونه‌های *S. aureus* مقاوم به پنی‌سیلین بودند در حالی که ریفامپین و ونکومایسین بطور کامل موجب کشته شدن باکتری‌های جداسازی شده شدند (۳۱). با این وجود در یک مطالعه دیگر تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی *S. aureus* به روش دیسک انتشاری حاکی از مقاومت میکروب به آنتی‌بیوتیک‌های ونکومایسین، اکساسیلین و سفتازیدیم بود (۳۹). مقاومت متفاوت *S. aureus* در مطالعات مختلف و در تیمار با آنتی‌بیوتیک‌های مختلف نشان‌دهنده ماهیت متغیر این باکتری در محیط‌های مختلف و احتمالاً مسیرهای مختلف ابتلای انسان به باکتری است. تحقیقات نشان داده است که احتمالاً یکی از مهمترین راه‌های انتقال *S. aureus* از دام به انسان از طریق شیر آلوده می‌باشد (۱۶)؛ بطوری که در بین نمونه‌های مثبت مبتلا به ورم پستان در گاوهای شیری استان ایلام، *S. aureus* از جمله مهمترین باکتری‌های موجود در بافت پستان حیوانات مبتلا بود (۲). بررسی نمونه‌های پنیر و کره محلی در شهر تبریز نیز شواهدی از آلودگی محصولات با *S. aureus* نشان دادند و در بین ایزوله‌های جداسازی شده، درجات متفاوتی از مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها مشاهده شد (۲۳). در یک مطالعه مقاومت آنتی‌بیوتیکی *S. aureus* جدا شده از چشم بیماران در تیمار با اگزاسیلین، پنی‌سیلین، اریترومایسین (Erythromycin)، ونکومایسین، تئی‌کوپلانین (Teicoplanin)، تری‌متوپریم/سولفامتوکسازول (Trimethoprim/Sulfamethoxazole) و ونکومایسین مورد بررسی قرار گرفت. این مطالعه که در فاصله سال‌های ۱۹۹۹ تا ۲۰۰۸ در کشور تایوان انجام شد نشان داد که بیش از نیمی از سویه‌های باکتری جداسازی شده به آنتی‌بیوتیک‌های متداول مقاوم هستند (٪ ۵۲/۸) (۶). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که هنوز بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم (۷ باکتری مورد بررسی) بر روی باکتری *S. aureus* خاصیت مهاری دارند، اما علی‌رغم حساس بودن باکتری‌های گرم مثبت به درمان آنتی‌بیوتیکی، مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها به سرعت می‌تواند منجر به شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی شود. لذا یافتن جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها (از جمله گیاهانی که دارای خواص ضدمیکروبی هستند) برای مقاصد درمانی و غیردرمانی اجتناب‌ناپذیر است.

در یک مطالعه خواص ضد باکتریایی عصاره الکلی ۲۰ گیاه دارویی بومی استان گلستان (شامل اکالیپتوس، نعناء، رزماری، آویشن باغی، گل راعی، سیاه دانه، درخت پیرو، گزنه، سیر، زرشک، کلزا، افسنطین، بابونه، زیره سبز، پنبه، اسپند، گل مخروطی ارغوانی، درمنه، گز و انار) علیه *S. aureus* مقاوم به متی‌سیلین و اگزاسیلین مورد ارزیابی قرار گرفته است (۳۵). همچنین در مطالعات مشابه دیگر خواص ضدمیکروبی پوست میوه انار (۱۲) و آویشن شیرازی (۲۹) بر روی *S. aureus* مورد بررسی قرار گرفته است. بر اساس مطالعات اخیر نشان داده شد که غلظت ۱۲/۵ µL از عصاره هیدرومتانولی پوست میوه انار و همچنین غلظت ٪۰/۰۱۵ اسانس آویشن شیرازی بر روی *S. aureus* خاصیت مهارکنندگی (MIC) داشت. در مطالعه دیگر، بررسی خواص ضدباکتریایی اسانس گیاه پنیر باد بر روی ۱۲ سویه *Pseudomonas aeruginosa* و ۱۲ سویه *Acinetobacter baumannii* جداشده از بیماران منطقه زابل نشان داد که غلظت‌های

جدول ۳- الگوی حساسیت سویه های مختلف *S. aureus* نسبت به رقت های مختلف عصاره اتانولی پنیرباد

سری رقت	۲۰	۱۰	۵	۲/۵	۱/۲۵	۰/۶۲	۰/۳۱
MIC (٪)	-	۱۳/۳۳	۲۶/۶۷	۲۰	۲۰	۶/۶۷	۱۳/۳۳
MBC (٪)	۱۰۰	۸۶/۶۷	۶۰	۴۰	۲۰	۱۳/۳۳	-

جدول ۴- الگوی حساسیت سویه های مختلف *S. aureus* نسبت به رقت های مختلف عصاره اتانولی رزماری

سری رقت	۲۰	۱۰	۵	۲/۵	۱/۲۵	۰/۶۲	۰/۳۱
MIC (٪)	-	۱۳/۳۳	۳۳/۳۳	۲۶/۶۷	۲۶/۶۷	-	-
MBC (٪)	۱۰۰	۸۶/۶۷	۵۳/۳۳	۲۶/۶۷	-	-	-

www.SID.ir

Archive of SID

متفاوتی از اسانس از ۱۲/۵ تا ppm ۱۰۰ بر روی باکتری‌های جداسازی شده خواص مهارکنندگی (MIC) دارند؛ و همچنین حداقل غلظت کشنده برای سویه‌های مختلف مورد بررسی مقادیر ۲۵ تا ppm ۲۰۰ بود (۱۷). فلاونوئیدها مهمترین ترکیبات موجود در ریشه و برگ پنیرباد هستند که دارای خواص دارویی می‌باشند (۳۶) و میزان آنها در هر g ۱۰۰ ریشه و برگ خشک شده این گیاه تقریباً برابر و حدود mg ۵۲۵ است. در بررسی خواص ضدمیکروبی و ضدقارچی چند گیاه بومی کشور کنیا، بهترین عملکرد ضدمیکروبی با کمترین غلظت عصاره (۱/۵۶ mg/mL) علیه *S. aureus*، *S. aureus* مقاوم به متی‌سیلین، *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa* مربوط به گیاه پنیرباد بود (۲۴). در مطالعه حاضر نیز خواص ضدباکتریایی عصاره اتانولی پنیرباد بیشتر از عصاره اتانولی رزماری بود. در مطالعه دیگری که بر روی خواص ضدباکتریایی و ضدقارچی عصاره برگ، ریشه و ساقه پنیرباد بر روی باکتری‌های گرم منفی *Proteus mirabilis*، *E. coli* و *P. aeruginosa* و باکتری گرم مثبت *S. aureus* و قارچ‌های *Aspergillus flavus*، *Candida albicans* و *Aspergillus niger* انجام شده بود، حساس‌ترین میکروارگانیسم‌ها به عصاره پنیرباد به ترتیب قارچ *P. mirabilis*، *S. aureus*، *C. albicans*، *E. coli* و *P. aeruginosa* بودند (۳۴). بنابراین مطابق انتظار به نظر می‌رسد عصاره پنیرباد به ترتیب بر روی قارچ‌ها، باکتری‌های گرم مثبت و باکتری‌های گرم منفی بیشترین خاصیت ضدمیکروبی را نشان دهد. هرچند در مطالعه حاضر مقایسه بین گونه‌های مختلف میکروارگانیسم‌ها انجام نشد، اما نتایج نشان داد که عصاره اتانولی پنیرباد حتی در غلظت‌های کم نیز بر روی سویه‌های مختلف *S. aureus* خاصیت مهارکنندگی و کشندگی دارد که علاوه بر توان میکروب‌کشی عصاره به ماهیت باکتری (گرم مثبت) نیز برمی‌گردد. در مطالعه دیگری خواص ضدمیکروبی عصاره ریشه پنیرباد بر روی *S. aureus* مقاوم به متی‌سیلین جداسازی از محیط و افراد بیمار بررسی شد که نشان داد ماده حلال در تهیه عصاره نقش مهمی در خواص ضدمیکروبی آن دارد و موثرترین عصاره‌ها از متانول، اتانول و بوتانول بدست آمدند در حالی‌که عصاره آبی کمترین خاصیت کشندگی را داشت. نتایج مطالعه مزبور نشان داد تهیه عصاره پنیرباد بویژه توسط حلال بوتانول می‌تواند یک روش درمانی جایگزین مناسب به جای آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم ارائه دهد (۹). نتایج مطالعه اخیر تائیدکننده نتایج مطالعه حاضر بود.

اسانس رزماری به دلیل رایحه مناسب در نگهداری محصولات غذایی در مقابل فساد میکروبی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲۶). در یک مطالعه خواص ضدمیکروبی، ضدقارچی و آنتی‌اکسیدانی اسانس تجاری (Commercial Essential Oil) بدست آمده از چهار گیاه آویشن، گل میخک، رزماری و درخت چای برای بسته‌بندی مواد غذایی مورد مقایسه قرار گرفت و خواص مهارکننده و کشنده اسانس‌ها علیه سه قارچ *Penicillium corylophilum*، *Fusarium graminearum* و *Aspergillus brasiliensis* و سه باکتری *Escherichia coli*، *Staphylococcus aureus* و *Listeria monocytogenes* که بطور مرسوم در فساد مواد غذایی نقش دارند به روس انتشار دیسک بررسی شد. نتایج این بررسی نشان داد که بجز رزماری بقیه اسانس‌ها و بویژه اسانس آویشن خواص ضدمیکروبی بسیار خوبی دارند (۳۷). هرچند در مطالعه اخیر خواص ضدمیکروبی اسانس رزماری مورد بررسی قرار گرفت، اما با نتایج مطالعه حاضر مبنی بر خواص ضدمیکروبی ضعیف‌تر عصاره اتانولی رزماری در مقایسه با عصاره اتانولی پنیرباد قابل مقایسه بود. در مطالعه دیگری بر روی پاتوژن‌های آلوده‌کننده پنیر نشان داده شد که استفاده از عصاره اتانولی و استونی رزماری بطور مشابه در طی سه روز پس از تیمار پنیر موجب کاهش جمعیت میکروبی باکتری‌های *E. coli*، *Salmonella typhimurium* و *S. aureus* می‌شود ولی تأثیر چندانی بر روی *Listeria monocytogenes* ندارد. به نظر می‌رسد عصاره گیاهان با کاهش pH داخلی باکتری، تخریب دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی و هایپرپلاریزاسیون غشای آنها موجب کشته شدن آنها می‌گردد (۱۴).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ترشحات مخاط بینی گوسفندان بومی منطقه سیستان به باکتری *S. aureus* آلوده است. هرچند درمان آنتی‌بیوتیکی به سرعت موجب کاهش جمعیت این میکروب می‌شود (به دلیل حساسیت سویه‌های مختلف این باکتری در تیمار با آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم)، اما به دلیل احتمال افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی پیشنهاد می‌شود از عصاره گیاهان دارویی به‌جای آنتی‌بیوتیک به منظور بهبود عملکرد دام استفاده شود. مقایسه خواص ضدمیکروبی پنیرباد و رزماری در مطالعه حاضر نشان داد که عصاره اتانولی پنیرباد می‌تواند جایگزین مناسبی برای درمان با آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم باشد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه زابل (شماره پژوهانه UOZ-GR9618-47) انجام شده است. نویسندگان مقاله حاضر از دانشجویان دانشکده دامپزشکی جهت تهیه نمونه‌های اولیه میکروبی از گوسفند و کارکنان پژوهشکده زیست‌فناوری کشاورزی دانشگاه زابل جهت کمک‌های آن‌ها در اجرای مراحل آزمایش نهایت تشکر را دارند.

منابع مورد استفاده

1- Ashcroft D.M. and A.L. Po. 1999. Herbal remedies: issues in licensing and economic evaluation. *Pharmaco Economics* 16, 321-328.

2- Bahrami A., M. shamsi, A. Bahrami, S. Soltani, M. Ahmadi, F. Talebimaymand and L. Abasian. 2016. *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis milk livestock and the study of antibiotic resistance. *Journal of Ilam University of Medical Sciences* 24, 18-26. In Persian.

3- Bautista-Trujillo G.U., J.L. Solorio-Rivera, I. Renteria-Solorzano, S.I. Carranza-German, J.A. Bustos-Martinez, R.I. Arteaga-Garibay, V.M. Baizabal-Aguirre, M. Cajero-Juarez, A. Bravo-Patino and J.J. Valdez-Alarcon. 2013. Performance of culture media for the isolation and identification of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. *Journal of Medical Microbiology* 62, 369-376.

www.SID.ir

Archive of SID

4- Bloemendaal A.L., E.C. Brouwer and A.C. Fluit. 2010. Methicillin resistance transfer from *Staphylocccus epidermidis* to methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in a patient during antibiotic therapy. *PloS One* 5, e11841.

5- Bortolaia V., C. Espinosa-Gongora and L. Guardabassi. 2016. Human health risks associated with antimicrobial-resistant enterococci and *Staphylococcus aureus* on poultry meat. *Clinical Microbiology and Infection*: the Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 22, 130-140.

6- Chuang C.C., C.H. Hsiao, H.Y. Tan, D.H. Ma, K.K. Lin, C.J. Chang and Y.C. Huang. 2012. *Staphylococcus aureus* ocular infection: methicillin-resistance, clinical features, and antibiotic susceptibilities. *PloS One* 8, e42437.

7- Cobellis G., Z. Yu, C. Forte, G. Acuti and M. Trabalza-Marinucci. 2016. Dietary supplementation of *Rosmarinus officinalis* L. leaves in sheep affects the abundance of rumen methanogens and other microbial populations. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 7, 27.

8- Daka D., G.S. S and D. Yihdego. 2012. Antibiotic-resistance *Staphylococcus aureus* isolated from cow's milk in the Hawassa area, South Ethiopia. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 11, 26.

9- Datta S., N.K. Kumar Pal and A.K. Nandy. 2011. Inhibition of the emergence of multi drug resistant *Staphylococcus aureus* by Withania somnifera root extracts. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 4, 917-920.

10- Eckmann C., W. Lawson, D. Nathwani, C.T. Solem, J.M. Stephens, C. Macahilig, D. Simoneau, P. Hajek, C. Charbonneau, R. Chambers, J.Z. Li and S. Haider. 2014. Antibiotic treatment patterns across Europe in patients with complicated skin and soft-tissue infections due to meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a plea for implementation of early switch and early discharge criteria. *International Journal of Antimicrobial Agents* 44, 56-64.

11- Emran T.B., M.A. Rahman, M.M. Uddin, R. Dash, M.F. Hossen, M. Mohiuddin and M.R. Alam. 2015. Molecular docking and inhibition studies on the interactions of *Bacopa monnieri's* potent phytochemicals against pathogenic *Staphylococcus aureus*. *Daru: Journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences* 23, 26.

12- Estabraghi E., M. Sadeghpour and A. Mehrabani. 2018. Study of pomegranate hydromethanol extract on *Staphylococcus aureus* and Escherichia coli by microplate in laboratory conditions. *Payavard Salamat* 12, 183-192. In Persian.

13- Gasc C., J.Y. Richard and P. Peyret. 2016. Genome sequence of *Staphylococcus aureus* strain HUK16, isolated from hexachlorocyclohexane-contaminated soil. *Genome Announcements* 4(2), e00274-16.

14- Gonelimali F.D., J. Lin, W. Miao, J. Xuan, F. Charles, M. Chen and S.R. Hatab. 2018. Antimicrobial properties and mechanism of action of some plant extracts against food pathogens and spoilage microorganisms. *Frontiers in Microbiology* 9, 1639.

15- Hameed A. and N. Akhtar. 2018. Comparative chemical investigation and evaluation of antioxidant and tyrosinase inhibitory effects of *Withania somnifera* (L.) Dunal and *Solanum nigrum* (L.) berries. *Acta Pharmaceutica* 68, 47-60.

16- Jahed Khaniki G.R., A. Kamkar and M.A. Tehrani. 2005. The prevalence of coagulative – positive *Staphylococcus aureus* in milk by received in to the milk collecting center of Garmsar city. *Journal of School of Public Health and Institute of Public Health Research* 3, 67-74. In Persian.

17- Javadian F., A.A. Nasiri, M. Arefnezhad, Z. Kiani, A. Sargazi, Z. Sepehri and M. Arefi. 2016. Antibacterial activity of wind cheese (*Withania somnifera*) extract against antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumanni*. *Journal of Zabol University of Medical Sciences and Health Services* 7, 1-8. In Persian.

18- Jordán M.J., V. Lax, M.C. Rota, S. Lorán and J.A. Sotomayor. 2013. Effect of bioclimatic area on the essential oil composition and antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L. *Food Control* 30, 463-468.

19- Kaier K. and U. Frank. 2009. An econometric view of the dynamic relationship between antibiotic consumption, hand disinfection and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 63, 630-631.

20- Kejela T. and K. Bacha. 2013. Prevalence and antibiotic susceptibility pattern of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among primary school children and prisoners in Jimma Town, Southwest Ethiopia. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 12, 11.

21- Khaleghi M., H. Zarei, M. Bokaeian and S. Saeidi. 2015. Evaluation of colonization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in hospitals of Zabol city in 1389. *Applied Biology* 28, 51-58. In Persian.

22- Mekonnen A., B. Yitayew, A. Tesema and S. Taddese. 2016. In vitro antimicrobial activity of essential oil of *Thymus schimperi*, *Matricaria chamomilla*, *Eucalyptus globulus*, and *Rosmarinus officinalis*. *International Journal of Microbiology* 2016, 9545693.

23- Mirzaei H., A. Javadi, M. Farajli, A.R. Shah Mohammadi, A.R. Monadi and A. Barzegar. 2012. Prevalence of *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin in traditional cheese and cream: a study in city of Tabriz, Iran. *Journal of Veterinary Research* 67, 65-70. In Persian.

www.SID.ir

Archive of SID

24- Mwitari P.G., P.A. Ayeka, J. Ondicho, E.N. Matu and C.C. Bii. 2013. Antimicrobial activity and probable mechanisms of action of medicinal plants of Kenya: *Withania somnifera*, *Warbugia ugandensis*, *Prunus africana* and *Plectrunthus barbatus*. *PloS One* 8, e65619.

25- Naderinasab M., Z. Farshadzadeh and F. Yousefi. 2007. Determine the inducible resistance phenotype in methicillin resistance *Staphylococcus aureus* and coagulase negative Staphylococci. *Iranian Journal of Medical Microbiology* 1, 25-31. In Persian.

26- Ntzimani A.G., V.I. Giatrakou and I.N. Savvaidis. 2011. Combined natural antimicrobial treatments on a ready-to-eat poultry product stored at 4 and 8 degrees C. *Poultry Science* 90, 880-888.

27- Ojeda-Sana A.M., C.M. van Baren, M.A. Elechosa, M.A. Juárez and S. Moreno. 2013. New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components. *Food Control* 31, 189-195.

28- Palliyaguru D.L., S.V. Singh and T.W. Kensler. 2016. *Withania somnifera*: From prevention to treatment of cancer. *Molecular Nutrition & Food Research* 60, 1342-1353.

29- Parsaeimehr M., A. Akhondzade Basti, A. Misaghi, T. Zahraei Salehi, B. Radmehr and H. Gandomi Nasrabadi. 2010. Effect of *Zataria multiflora* boiss. essential oil on enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. *Journal of Medicinal Plants* 1, 98-102. In Persian.

30- Raskovic A., I. Milanovic, N. Pavlovic, T. Cebovic, S. Vukmirovic and M. Mikov. 2014. Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil and its hepatoprotective potential. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 14, 225.

31- Saderi H., P. Owlia, N. Zafarghandi and M.R. Jalali nadoshan. 2004. Evaluation of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from nose of two teaching hospitals staff of shahed university. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences* 14, 69-75. In Persian.

32- Sharma H., L. Parihar and P. Parihar. 2011. Review on cancer and anticancerous properties of some medicinal plants. *Journal of Medicinal Plants Research* 5, 1818-1835.

33- Simko S. and P. Bartko. 1996. Antibiotic resistance in *Staphylococcus* aureus mastitis in sheep, sheep milk and its products. *Veterinary Medicine Journal* 41, 241-244.

34- Singh G. and P. Kumar. 2011. Evaluation of antimicrobial efficacy of flavonoids of *Withania somnifera* L. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 73, 473-478.

35- Dadgar T., E. Ghaemi, M. Bazueri, M. Asmar, M. Mazandarani, A. Saifi and H. Bayat. 2007. The antibacterial effects of 20 herbal plants on methicillin resistant and sensitive *S. aureus* in Golestan provience. *Journal of Gorgan University of Medical Sciences* 9, 55-62. In Persian.

36- Udayakumar R., S. Kasthurirengan, T.S. Mariashibu, M. Rajesh, V.R. Anbazhagan, S.C. Kim, A. Ganapathi and C.W. Choi. 2009. Hypoglycaemic and hypolipidaemic effects of *Withania somnifera* root and leaf extracts on alloxan-induced diabetic rats. *International Journal of Molecular Sciences* 10, 2367-2382.

37- Vasile C., M. Sivertsvik, A.C. Mitelut, M.A. Brebu, E. Stoleru, J.T. Rosnes, E.E. Tanase, W. Khan, D. Pamfil, C.P. Cornea, A. Irimia and M.E. Popa. 2017. Comparative analysis of the composition and active property evaluation of certain essential oils to assess their potential applications in active food packaging. *Materials* 10, 45.

38- Zeinalian M., M. Eshaghi, H. Naji, S.M. Marandi, M.R. Sharbafchi and S. Asgary. 2015. Iranian-Islamic traditional medicine: An ancient comprehensive personalized medicine. *Advanced Biomedical Research* 4, 191.

39- Zia M., S. Beheshti, H. Khalkhali and S. Saffari. 2013. Detection of antibiotic resistance in different strains of *Staphylococcus aureus* using disc diffusion Agar. *Razi Journal of Medical Sciences* 20, 70-78. In Persian.

www.SID.ir