DOI: 10.22092/vj.2020.128256.1641
شماره ۱۳۰ بهار ۱۴۰۰
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

بررسی اثر ضدباکتریایی اسانس نعنا، زیره ی سبز و پپتید باکتریوسین انتروسین P بر روی برخی باکتری‌های مولد ورم پستان گاو در شرایط آزمایشگاهی

• **زهرا موسوی**
گروه علوم دامی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران
• **فهیمه محمدی**
گروه علوم دامی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران
• **عباس تنهاییان (نویسنده مسئول)**
گروه علوم پزشکی شاهرود، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸-۰۸-۰۷ تاریخ پذیرش:۱۳۹۸-۱۰-۱۴
Email: ab_tanhaeian@yahoo.com

چکیده

از جمله بیماری‌هایی که علاوه بر خسارات و هزینه‌های زیاد منجر به تهدید سلامت انسان نیز می‌گردد، می‌توان به ورم پستان دام اشاره کرد. استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان این بیماری علاوه بر فواید، مضررات زیادی همچون ایجاد سویه‌های باکتریایی مقاوم به آنتی‌بیوتیک و ایجاد بقایای دارویی در شیر را در این صنعت ایجاد می‌کند. امروزه استفاده از جایگزین‌های طبیعی همچون پپتیدهای ضد میکروبی و اسانس‌های گیاهی بجای آنتی‌بیوتیک موردتوجه قرار گرفته‌اند. هدف از این پژوهش بررسی و مقایسه‌ی اثرات ضد باکتریایی دو پپتید باکتریوسین اینتروسین p و تاناتین با دو اسانس گیاهی نعناع و زیره سبز می‌باشد. پپتید نوترکیب باکتریوسین انتروسین p در سلول‌های تخمدان همستر چینی (CHO) بیان شد. فرآیند اسانس‌گیری نیز توسط دستگاه کلونجر انجام شد. در نهایت تست حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) بر روی باکتری‌ها صورت گرفت. نتایج نشان داد دو پپتید باکتریوسین اینتروسین p و تاناتین دارای اثرات ضد باکتری قوی‌تری در غلظت‌های کمتری نسبت به دو اسانس نعناع سبز و زیره سبز بر روی باکتری‌های E.coli ، Staphylococcus aureus HV ۰۱۵۷ و E.coli هستند. به طوریکه باکتری Staphylococcus aureus نسبت به پپتید باکتریوسین انتروسین p و E.coli HV ۰۱۵۷ نسبت به پپتید تاناتین حساسیت بیشتری داشتند. از آنجاییکه از مزایای استفاده از پپتیدها نسبت به اسانس‌ها می‌توان به مقاومت نسبت به حرارت، اکسیداسیون و امکان دست‌ورزی از طریق اتصال به سایر پپتیدها جهت افزایش فعالیت آن اشاره کرد، امید است بتوان از این پپتیدها در آینده به‌عنوان داروی جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان بیماری‌های دامی از جمله ورم پستان دام استفاده کرد.

کلمات کلیدی: ورم پستان، MIC ،MBC، باکتریوسین اینتروسین P، تاناتین

www.SID.ir

Archive of SID

● Veterinary Researches & Biological Products No 130 pp: 38-45

Antibacterial effect of mentha spicata, cuminum cyminum essential oils and bacteriocin enterocin P peptide on some bovine mastitis bacteria in vitro

By: Mousavi. Z., Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. Mohammadi, F., Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. and Tanhaeian, A., (Corresponding Author) Shahroud University of Medical Sciences.

Received: 2019-10-29 Accepted: 2020-01-04

Email: ab_tanhaeian@yahoo.com

Nowadays, milk and dairy products form an important part of the requirements of the people around the world. Animal diseases have important impacts on animal productivity and welfare and on human health. Mastitis is the most common disease in dairy cattle. Unfortunately, using common antibiotics to treat animal infection is increasing in which leads to undesirable side effects such as antibiotic residuals in animal products and occurrence bacterial resistance to antibiotics. Hence, the use of natural alternatives such as antimicrobial peptides and essential oils has been considered. In this study the antibacterial effects of two bacteriocin enterocin P and thanatin peptides with two essential oils of mentha spicata and cuminum cyminum against some mastitis pathogens were evaluated. The recombinant bacteriocin enterocin p peptide were expressed in CHO cells. The extraction of mentha spicata and cuminum cyminum essential oils was performed by Clevenger apparatus. Finally, the minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration were tested on bacteria. The results have shown that the two peptides have stronger antibacterial effects at lower concentrations than the two essential oils. Staphylococcus aurous and Escherichia coli were sensitive to bacteriocin enterocin p and thanatin peptide respectively. Since the benefits of using peptides over essential oils associated with their high thermal stability, resistant to oxidation and the ability of peptide modification, it is hope that antimicrobial peptides provide an excellent potential strategy for treating animal diseases in future.

Key words: Mastitis, MBC, MIC, Bacteriocin Enterocin P, Thanatin

مقدمه

امروزه استفاده از شیر و فرآورده‌های لبنی به یکی از ملزومات در زندگی مردم جهان تبدیل شده‌است. ابتلای دام به بیماری‌های مختلف مرتبط با کاهش تولید شیر، خسارات و هزینه‌های زیادی را در پی دارد که ازجمله این بیماری‌ها می‌توان به ورم پستان دام اشاره کرد. ورم پستان به التهاب بافت پارانشیم یا غدد پستانی گفته می‌شود که یکی از شایع‌ترین و پرهزینه‌ترین بیماری‌های صنعت گاوهای شیری است. زیان‌های اقتصادی ناشی از این بیماری به صورت مستقیم و غیرمستقیم بوده که سهم قابل‌توجهی از هزینه‌های درمانی و مصرف آنتی‌بیوتیک در گاوداری‌ها را شامل می‌شود (۱۰). این بیماری در اثر عوامل عفونی و غیرعفونی ایجاد می‌شود ولی مهم‌ترین عامل ایجادکننده‌ی آن عوامل عفونی باکتریایی می‌باشند. از جمله عوامل باکتریایی رایج در ایجاد این بیماری می‌توان به باکتری‌های گرم‌مثبت مانند Staphylococcus و Streptococcus، باکتری‌های گرم‌منفی مانند گونه‌های E.coli اشاره کرد (۳۰، ۱۹، ۹). استفاده از تزریق درون‌پستانی آنتی‌بیوتیک جهت کنترل ورم پستان و بیماری‌های سیستمیك و موضعي در گله‌های گاو شیری به امری رایج تبدیل شده است (۱۹، ۹، ۲۳). اگرچه استفاده از آنتي‌بیوتیك‌ها در پیشگیری، کنترل و درمان بیماری‌های عفوني در دام نقش بي‌نظیری دارند اما استفاده نادرست و بی رویه از آن، سلامت عمومی را به خطر می‌اندازد (۱). از جمله مهم‌ترین عوارض ناشی از مصرف غیراصولی آنتی‌بیوتیک‌ها می‌توان به افزایش شمار باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک و انتقال آن از دام به انسان (۳۴) و بقایای دارویی در شیر (۳۹) اشاره کرد. پیش‌بینی می‌شود که تا سال ۲۰۵۰؛ تعداد مرگ‌ومیر ناشی از مقاومت دارویی به ۱۰ میلیون نفر برسد که این رقم بیش‌تر از تمام مرگ‌ومیرهایی است که بوسیله سرطان در هر سال اتفاق می‌افتد (۴۳). بنابراین لازم است برای کاهش مصرف برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها و جلوگیری از ایجاد باکتری‌های مقاوم و کاهش احتمال بروز و شیوع بیماری‌های مشترک انسانی و دامی راهکارهایی را مد نظر قرار داد. امروزه طیف وسیعی از ترکیبات با منشاء طبیعی مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته‌اند که پتانسیل بالقوه‌ای را در ارتباط با فعالیت‌های ضدمیکروبی از خود نشان داده‌اند. از جمله این ترکیبات می‌توان به اسانس‌های گیاهی مانند اسانس زیره سبز و نعناع سبز و همچنین پپتیدهای ضدمیکروبی مانند باکتریوسین انتروسین p و تاناتین شاره کرد. دانه زیره سبز دارای ۷ درصد روغن، ۱۲ درصد رزین، ۲/۵ تا ۴ درصد اسانس و مقداری تانن است. اصلی‌ترین و مهم‌ترین ترکیب استحصالی از دانه زیره سبز، اسانس آن است که در صنایع آرایشی، بهداشتی و صنایع غذایی استفاده می‌شود.

www.SID.ir

Archive of SID

اصلی‌ترین ماده تشکیل‌دهنده اسانس زیره سبز کومین آلدئید یا کومینال (Cominaldehyde) ($C_{10}H_{12}O$) نام دارد که حداکثر تا ۶۳٪ از کل میزان اسانس را تشکیل می‌دهد (۵). مطالعات متعددی اثرات ضد باکتریایی این گیاه را به اثبات رسانیده‌اند (۶). گیاه نعناع سبز نیز یکی از مهم‌ترین گونه‌های نعناع می‌باشد که در سراسر جهان مورد استفاده است. اسانس حاصل از این گیاه از ترکیبی بنام کاروون (Carvon) تشکیل شده که ۷۳ درصد از اسانس حاصل از این گیاه را شامل می‌شود (۱۶). مطالعات مختلفی اثرات ضدباکتریایی، ضدقارچی، ضدسرطانی (۲۴) ضدانگلی و آنتی‌اکسیدانی (۸) گونه‌ی نعناع را به اثبات رسانیده‌اند. علاوه بر اسانس‌های گیاهی، از ترکیبات مناسب دیگری که امروزه مورد توجه خاص قرار گرفته‌اند می‌توان به پپتیدهای ضدمیکروبی اشاره کرد. پپتیدهای ضدمیکروبی گروه بزرگی از ترکیبات طبیعی با وزن مولکولی کم هستند که از گیاهان و حیوانات استخراج می‌شوند. این پپتیدها در واقع آنتی‌بیوتیک‌هایی با منشاء طبیعی و بسیار قوی بوده که طیف وسیعی از فعالیت ضدمیکروبی را در برابر میکروارگانیسم‌ها شامل باکتری‌ها، قارچ‌ها و علاوه بر این‌ها انگل‌های تک‌یاخته و چندیاخته‌ی فعال نشان می‌دهند (۴۲، ۲۷). از جمله مزیت‌های این ترکیبات می‌توان به استفاده‌ی همزمان همراه با آنتی‌بیوتیک‌ها و اثرات سینرژیسم (۱۳)، از بین بردن برخی از باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک (۳۷)، قدرت انتخابی بالا بین پاتوژن بیماری‌زا و سلول‌های بدن میزبان، سمیت کم، گرایش به ایجاد مقاومت دارویی کم و تعدیل کننده‌ی سیستم ایمنی (۲۰) اشاره کرد. از این پپتیدها می‌توان به پپتیدهای کاتیونی و پپتیدهای آنیونی اشاره کرد (۲۸). از جمله پپتیدهای کاتیونی می-توان به پپتید باکتریوسین انتروسین p و تاناتین اشاره کرد. پپتید باکتریوسین انتروسین p یک پپتید ضدمیکروبی متشکل از ۴۴ اسیدآمینه است. منشاء این پپتید مربوط به باکتری به نام انتروکوکوس فاسیوم P۱۳ (Enterococcus faecium) می‌باشد که نوعی باکتری ایمن پروبیوتیکی است. مطالعات متعدد نشان داده‌اند که این پپتید به‌عنوان نگهدارنده‌ی مناسب مواد غذایی بدون خواص سمیت و یک ماده‌ی ضد میکروبی قوی علیه طیف وسیعی از باکتری‌ها می‌باشد (۲۶). تاناتین نیز یکی از پپتیدهای کوچک خانواده مارپیچ بتا (پپتیدهای کاتیونی) بوده که دارای بار مثبت، غیرهمولیتیک و آمفی‌پاتیک بوده که برای اولین بار از حشره‌ی Podisus maculiventris بعد از تحریک سیستم ایمنی استخراج شده‌است. این پپتید جز اولین خط دفاعی بدن حشره است که فعالیت گسترده‌ای را در برابر پاتوژن‌های مختلف از جمله باکتری‌های گرم مثبت و منفی و همچنین قارچ‌ها نشان داده‌است (۱۴).

هدف از این مطالعه، بررسی خواص ضد باکتریایی اسانس زیره سبز و نعناع سبز و مقایسه‌ی آن با فعالیت ضد باکتریایی پپتیدهای باکتریوسین انتروسین p و تاناتین بر روی سه باکتری E.coli، Staphylococcus aureus، E.coli O۱۵۷ H۷ به‌عنوان رایج‌ترین باکتری‌های مولد ورم پستان در گاو شیری هلشتاین در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه باکتری‌های مورد استفاده

باکتری‌های E.coli 0157 H7، Staphylococcus aureus و E.coli استحصال شده از بیماری ورم پستان در دام از دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد (مشهد، ایران) تهیه شد و برای بررسی اثرات ضد باکتریایی مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج مربوط به اثرات ضد باکتریایی پپتید تاناتین از مطالعات قبلی ما در دانشگاه فردوسی مشهد به منظور مقایسه مورد استفاده قرار گرفت (۲).

بیان پپتید باکتریوسین انتروسین p

کانستراکت پپتید باکتریوسین انتروسین p از مطالعات قبلی ما در دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شد و بررسی به منظور بیان این پپتید انجام گرفت (۴۱). به‌طور کلی سلول‌ها یا به صورت تک‌لایه (monolayer) چسبیده به سطح و یا به حالت معلق (suspension) می‌توانند رشد کنند. در این تحقیق از تکنیک کشت تک‌لایه استفاده شد. اکثر سلول‌ها به صورت تک‌لایه گسترش یافته و به سطوح شیشه‌ای یا پلاستیکی بستر کشت لنگر می‌اندازند. این تکنیک روش مناسبی برای تولید پپتیدها و پروتئین‌های نوترکیب و واکسن‌ها می‌باشد. برای کشت سلول‌های ترانسفکت شده تخمدان همستر چینی (Chinese Hamster Ovary Cells (CHO)) با قابلیت سنتز پپتید انتروسین p، از محیط کشت DMEM استفاده شد. محیط کشت DMEM محتوی ۶ g/L glucose، ۲۰ mM NaHCo۳، ۵۰ mM HEPES, pH ۷,۴ بود که در زمان استفاده ۱۰ درصد FBS (Fetal bovine serum)، ۱ درصد ۱X Amphoterypcin و ۱ درصد (Penicillin-Streptomycin) ۱x pen/strep به هر یک از بطری‌ها اضافه شد. آنتی‌بیوتیک و آمفوتریپسین برای جلوگیری از رشد قارچ و باکتری‌های گرم‌مثبت و گرم‌منفی به آن اضافه گردید. تمامی مراحل کار در زیر هود لامینار روشن انجام گرفت تا احتمال انتقال آلودگی به محیط کشت به حداقل برسد. همزمان با رشد و ازدیاد سلول‌ها، رنگ محیط به دلیل آزادسازی اسید لاکتیک تولید شده توسط سلول‌ها و اسیدی شدن به سمت زرد شدن پیش می‌رود. زیرا با توجه به انجام واکنش‌های مختلف نظیر گلیکولیز و تخمیر گلوکز و تولید اسید و CO_2، pH محیط با پیشرفت کشت کاهش می‌یابد که باید با اقدامات مناسب از کاهش pH که موجب آسیب دیدن سلول‌ها می‌شود جلوگیری نمود. همچنین به دلیل کاهش مواد مغذی پس از ازدیاد سلول‌ها بایستی محیط کشت به طور متناوب تعویض شود. پس از اینکه رشد سلول‌ها به حدی رسید که تراکم آن‌ها در کف فلاسک حدود ۸۰-۷۰ درصد بود، بایستی نسبت به کاهش تراکم سلول‌ها اقدام کرد چرا که تراکم بیش از حد سلول‌ها موجب از بین رفتن آن‌ها خواهد گردید. در صورتی که پاساژ (passage) سلولی در زمان مناسبی صورت نگیرد، سلول‌ها به سبب کمبود مواد غذایی از بین رفته و از کف فلاسک کشت جدا می‌شوند. در صورت ادامه این روند و عدم انجام پاساژ، سلول‌ها به طور کامل از کف فلاسک جدا می‌شوند. وکتور استفاده شده به نحوی طراحی شده بود که محصولات بیان‌شده در داخل سلول سریعاً به محیط کشت منتقل گردند. لذا بعد از گذشت ۲۴ ساعت محتویات محیط کشت در ظروف استریل جمع‌آوری شد. به منظور حذف بقایای سلولی از محیط کشت جمع‌آوری شده، مایعات حاصل با سرعت ۲۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۲ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. مایع رویی با استفاده ازفیلتر سر سرنگی ۰,۲۲ µm محصول شرکت JET BIOFill (Cat.No. 295-4545) تصفیه و جمع‌آوری گردید. محصولات جمع‌آوری

www.SID.ir

Archive of SID

شده تا زمان شروع خالص‌سازی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در نهایت از ستون نیکل به منظور خالص‌سازی استفاده گردید.

آماده‌سازی اسانس نعناع و زیره سبز

پس از جمع‌آوری گیاهان از رویشگاه‌های طبیعی و انتقال به آزمایشگاه گیاهان در گروه باغبانی دانشگاه فردوسی مشهد، شستشوی سطحی بافت‌های گیاهی توسط آب مقطر استریل انجام شد و گیاهان در شرایط استاندارد (دمای اتاق و سایه) خشک شدند. سپس از قسمت‌های مختلف گیاهان برای تهیه اسانس و عصاره گیاهی استفاده گردید. بدین صورت که ابتدا ۱۰۰ گرم از بافت گیاهی خرد و سپس توسط دستگاه کلونجر از طریق فرآیند تقطیر به مدت ۶ ساعت استخراج و نهایتا اسانس به دست آمده به وسیله سولفات سدیم آب‌گیری و در شیشه‌های تیره استریل در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

حداقل غلظت بازدارندگی (MIC)

آزمایش MIC در میکروپلیت ۹۶ خانه استریل و با روش براث میکرودایلوشن انجام شد (Microdilution broth). ابتدا از محیط کشت مولرهینتون براث (مرک آلمان) و در مورد ارزیابی پاتوژن‌های گیاهی از نوترینت براث (مرک آلمان) استفاده شد. ۱۰۰ میکرولیتر داخل هر یک از چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته شد. سپس به اولین چاهک ردیف اول ۱۰۰ میکرولیتر از پپتید یا اسانس مورد مطالعه اضافه گردید و پس از چند بار پیپت کردن از چاهک دوم به سوم و به همین ترتیب تا چاهک ۱۱ رقیق شد (غلظت‌های هر چاهک به ترتیب در هر ردیف نسبت به ردیف بالایی به نصف تقلیل می‌یابد). در آخر به همه چاهک‌ها ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی معادل 1×10^{8} ml/cfu اضافه شد البته چاهک شماره ۱۱ هر ردیف به عنوان شاهد تیمار (کنترل منفی)، فقط حاوی محیط کشت، DMSO و ترکیب مورد استفاده بود و باکتری در آن کشت نشد تا آلودگی احتمالی سبب بروز خطا نشود و چاهک شماره ۱۲ هر ردیف به عنوان شاهد باکتری (کنترل مثبت) استفاده شد تا از شرایط مناسب کشت و رشد نرمال باکتری اطمینان حاصل شود که برای تعیین کدورت باکتری حاوی محیط کشت، DMSO و باکتری بود. بعد از تلقیح باکتری، میکروپلیت بر روی دستگاه چرخاننده قرار گرفت و ۱۶ تا ۱۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد اعمال شد. بعد از اتمام انکوباسیون، کدورت یا عدم کدورت در چاهک به صورت چشمی مشاهده و جذب نوری توسط دستگاه خوانش‌گر پلیت الیزا (STAT FAX ۲۱۰۰) در طول موج ۶۳۰ نانومتر خوانده شد. برای تعیین MIC از کمترین غلظتی که در آن کدورتی مشاهده نگردید استفاده شد.

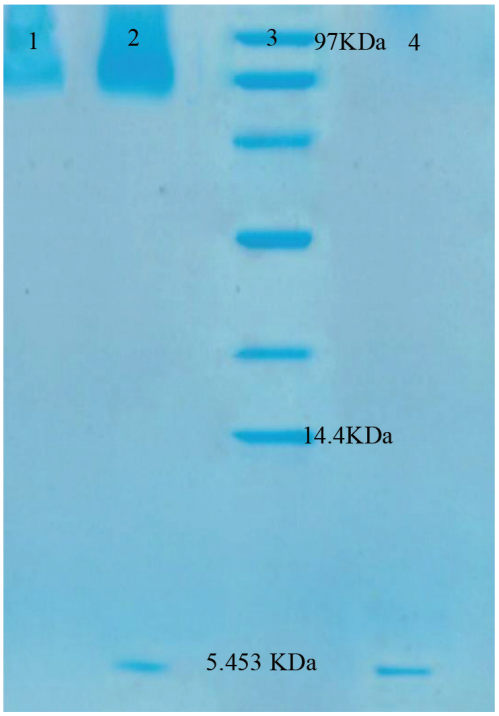
حداقل غلظت کشندگی (MBC)

برای اندازه‌گیری حداقل غلظت کشندگی (MBC)، از چاهک‌های فاقد کدورت ارزیابی حداقل بازدارندگی، مقدار ۱۰ میکرولیتر در شرایط استریل برداشته شد و بر روی محیط آگار غذایی (NA) کشت داده شد. پس از انکوباسیون ۲۴ ساعته در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد، کمترین رقتی که توانسته ۹۹/۹ درصد از باکتری‌ها را بکشد، به عنوان MBC در نظر گرفته شد. کلیه مراحل آزمایش سه بار تکرار شد و نتایج به صورت میانگین ارائه گردید.

نتایج و بحث

پپتید باکتریوسین انتروسین p تولیدی پس از رنگ آمیزی با کوماسی بلو بر روی ژل آکریل آمید به صورت باند ۵/۴۵۳ KDa مشاهده شد که نشان از این داشت که پپتید مورد نظر به درستی بیان شده است (شکل ۱). در چاهک شماره‌ی ۲ باندهای بالایی آن مربوط به پروتئین‌های دیگر موجود در محیط کشت از جمله FBS می‌باشند، که نشان از عدم خلوص پپتید مورد مطالعه دارد. در چاهک شماره‌ی ۴ پپتید به درستی بیان و خالص شده است (شکل ۱).

نتایج حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی اسانس‌های زیره سبز و نعناع سبز و همچنین پپتیدهای باکتریوسین P و تاناتین بر روی دو باکتری مورد مطالعه در جدول ۱ ارائه گردیده‌است. کمترین مقدار حداقل غلظت بازدارندگی مربوط به پپتید باکتریوسین انتروسین (µg/mL ۶/۰۳۱ P) بر روی باکتری Staphylococcus aureus و بیشترین میزان مربوط به اسانس زیره سبز (۵۰۰ µg/mL) بر روی باکتری‌های Staphylococcus aureus و



شکل ۱. تجزیه و تحلیل پپتید تاناتین و پپتید باکتریوسین انتروسین p توسط SDS-PAGE.

۱.گروه شاهد

۲.پپتید باکتریوسین انتروسین ۵/p KDa۴۵۳

۳.ماکر پروتئینی

۴.پپتید تخلیص شده ی باکتریوسین انتروسین ۵/p KDa۴۵۳

www.SID.ir

Archive of SID

E.coli گزارش شد. همچنین کمترین مقدار برای حداقل غلظت کشندگی مربوط به پپتید تاناتین (۱۲,۵ µg/mL) بر روی باکتری E.coli HV ۰۱۵۷ و بیشترین میزان (۵۰۰ µg/mL) مربوط به باکتری E.coli می‌باشد. لازم به ذکر است که غلظت مورد استفاده از اسانس زیره سبز (۱۰۰۰ µg/mL) در این بررسی بر روی دو باکتری مورد مطالعه اثر کشندگی نداشته و در بررسی‌های بعدی باید از غلظت‌های بیشتری استفاده شود.

مطالعات مختلفی به بررسی اثر پپتیدها و اسانس‌های گیاهی مختلف بر روی باکتری‌های مولد ورم پستان پرداخته‌اند. این مطالعه برای اولین بار به بررسی اثر دو پپتید باکتریوسین انتروسین p و تاناتین بر روی باکتری‌های مولد بیماری ورم پستان درگاو پرداخته است. نوردین و همکاران ۲۰۰۶، a۲۰۰۷، b۲۰۰۷ نشان دادند استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی sunflower, Cuminum Cyminum, Curcuma zedoaria و Curcuma manga موجب بهبود بیماری ورم پستان، تولید شیر و باکتری‌های شکمبه می‌شوند (۳۱، ۳۲، ۳۳). هرچند ثابت شده است که همه غلظت‌های عصاره‌ی زیره سبز در شرایط درون آزمایشگاهی (In vitro) اثرات ضد باکتریایی روی اشرشیاکلی دارد، اما غلظت ۲٪ این عصاره بیشترین تأثیر را نسبت به غلظت‌های ۰/۵، ۱ و یا ۱/۵ درصد روی این باکتری داشته است و با افزایش زمان عصاره زیره سبز در محیط کشت و همچنین افزایش غلظت آن، تعداد باکتری‌های اشرشیاکلی بطور خطی کم شده‌اند و زیره سبز به‌عنوان یك ماده مهارکننده‌ی E.coli معرفی شده‌است (۴۰). اثر دو اسانس زیره سبز و سیاه را بر روی فعالیت انواع باکتری‌ها نیز مورد بررسی قرار گرفته و نتایج حاکی از کاهش و مهار رشد میکروارگانسیم‌های مختلف بوده‌است (۲۵). همچنین بررسی‌ها نشان داده‌است که در بین باکتری‌ها، باکتری‌های گرم مثبت (E.coli) بیشترین حساسیت و پزودوموناس بیشترین مقاومت را در برابر اسانس زیره سبز داشته‌اند و حداقل غلظتی از اسانس زیره سبز که رشد و فعالیت میکروارگانیسم‌ها در آن مهار می‌شود (MIC) برای Staphylococcus aureus تقریباً دو برابر باکتری‌های گرم مثبت گزارش شده‌است (۴۰).

مطابق با نتایج ما، حداقل غلظت اسانس زیره سبز که باعث مهار رشد و فعالیت باکتری‌های Staphylococcus aureus و E.coli مولد ورم پستان شده است تقریبا ۴ برابر باکتری E.coli HV ۰۱۵۷ است و از این رو باکتری E.coli HV ۰۱۵۷ نسبت به این اسانس حساسیت بیشتری دارد.

مطالعات انجام شده بر روی اثر ضد باکتریایی لیمونن، منتول، پولگون و منتون موجود در اسانس نعناع بر روی باکتری‌های Salmonella و Listeria monocytogenes حاکی از اثر بیشتر پولگون روی Salmonella بوده‌است (۱۷). اثرات ضد لیستریایی اسانس نعناع بر گونه‌های مختلف جنس لیستریا نیز مورد بررسی قرار گرفته‌است (۳۸). از مجموع مطالعاتی که در ارتباط با اثرهای ضد باکتری نعناع صورت گرفته است، می‌توان استنباط نمود که ترکیب‌هایی چون کارون، لیمونن و پولگون در این گیاه دارای اثر مشخص ضد باکتری هستند (۷، ۲۹). اثرات ضد باکتریایی اسانس نعناع بر ۳ سویه باکتری Listeria monocytogenes، E.coli و Vibrio alginolyticus نیز حاکی از قوی بودن خاصیت ضدباکتریایی اسانس نعناع بر این باکتری‌ها بوده که می‌توان از این اسانس در کنترل باکتری‌های بیماری‌زا استفاده کرد (۳). همچنین اثر ضد باکتریایی اسانس نعناع سبز بر روی هشت گونه باکتری بیماری‌زای مهم در دستگاه گوارش نیز مورد بررسی قرار گرفته و نتایج نشان‌دهنده‌ی وجود اثرات ضد باکتریایی انتخابی در اسانس این گیاه بوده‌است. بطوریکه بیشترین حساسیت در باکتری Bacillus cereus و کمترین حساسیت مربوط به باکتری Klebsiella pneumoniae و Staphylococcus aureus بوده‌است (۳). اما پیرستانی و همکاران، ۲۰۱۳ نشان دادند که استفاده از اسانس نعناع سبز mentha spicata تاثیری بر روی باکتری‌های E.coli ، Staphylococcus aureus و Streptococcus agalactiae مولد ورم پستان گاو ندارند (۳۶). با این وجود طبق نتایج ما، حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس نعناع سبز در هر سه باکتری مورد مطالعه یکسان بوده اما حداقل غلظت کشندگی در باکتری Staphylococcus aureus دو برابر باکتری‌های E.coli و E.coli HV ۰۱۵۷ بود.

جدول۱- نتایج حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی اسانس زیره سبز، نعناع سبز، پپتید باکتریوسین و پپتید تاناتین بر روی باکتریهای مولد ورم پستان.

نام باکتری	اسانس زیره سبز		اسانس نعناع سبز		پپتید باکتریوسین انتروسین P		پپتید تاناتین	
	MIC (µg / mL)	MBC (µg / mL)	MIC (µg / mL)	MBC (µg / mL)	MIC (µg / mL)	MBC (µg / mL)	MIC (µg / mL)	MBC (µg / mL)
Staphylococcus aureus	۵۰۰	-	۱۲۵	۲۵۰	۶,۰۳۱	۲۴,۱۲۵	۱۲,۵	۲۵
E.coli HV ۰۱۵۷	۱۲۵	-	۱۲۵	۱۲۵	۲۴,۱۲۵	۹۶,۵	۶,۲۵	۱۲,۵
E.coli	۵۰۰	۵۰۰	۱۲۵	۱۲۵	۴۸,۲۵	۹۶,۵	۲۵	۱۰۰

- غلظت مورد استفاده بر روی دو باکتری مورد مطالعه اثر کشندگی نداشته است. غلظت اسانس ها در استوک اولیه در ابتدای آزمایش ۱۰۰۰ µg/mL بود.

www.SID.ir

Archive of SID

فعالیت آنتی‌باکتریایی پپتید باکتریوسین انتروسین p نیز مورد بررسی قرار گرفته و گزارش شده که این پپتید علاوه بر تأثیر روی برخی از باکتری‌های گرم‌مثبت، روی باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک نیز مؤثر است. این پپتید در برابر گرما و غلظت بالای نمک مقاوم است و همچنین وجود His-taq (توالی از شش تا نه باقیمانده اسیدآمینه هیستیدین است که به انتهای کربوکسی یا آمینه یک پروتئین نوترکیب جهت بیان و خالص‌سازی آن متصل می‌شود) برای اهداف خالص‌سازی موجب افزایش بار مثبت و در نتیجه افزایش خاصیت ضد باکتری پپتید می‌شود (۴۱). استفاده از پپتیدهای ضدمیکروبی این مزیت را دارد که مقاومت دارویی را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها به دلیل داشتن چندین سایت هدف و مکانیسم‌های غیراختصاصی آنها کاهش می‌دهد. باکتریوسین‌ها در برابر pH، لئوفلایز کردن و حرارت مقاوم هستند در نتیجه از آن‌ها می‌توان به‌عنوان نگهدارنده‌های غذایی طبیعی و غیرسمی نیز استفاده شوند که یک ویژگی مهم است (۴۵) و اثر ضدمیکروبی این پپتید در برابر باکتری‌ها به ویژه پاتوژن‌های منتقله از مواد غذایی از جمله Listeria monocytogenes، Clostridium botulinum، Clostridium perfringens، و Staphylococcus aureus به اثبات رسیده‌است (۴۵؛ ۱۸). علاوه بر این، این پپتید در pH و لیوفیلیزاسیون پایدار است (۱۸، ۲۱ ، ۱۱، ۴۵) و از رشد انواع مختلف باکتری‌ها و همچنین باکتری‌های مقاوم به چند دارو در محیط نمکی بالا و پلاسما انسانی با پایداری حرارتی قابل قبول جلوگیری می‌کند (۴۱). حداقل غلظت مهارکنندگی این پپتید در مطالعه ما، در باکتری E.coli HV ۰۱۵۷ تقریبا ۴ برابر و در باکتری اشرشیاکلی تقریبا ۸ برابر باکتری Staphylococcus aureus بود. همچنین حداقل غلظت کشندگی در باکتری E.coli HV ۰۱۵۷ و E.coli تقریبا ۴ برابر باکتری Staphylococcus aureus بود که حاکی از حساسیت بیشتر باکتری Staphylococcus aureus به این پپتید می‌باشد.

قابلیت تاناتین در ایجاد محدودیت رشد و ممانعت از شکل‌گیری بیوفیلم و عامل مقاومت در برابر استافیلوکوک‌ها به اثبات رسیده و همچنین نشان داده شده که تاناتین سمیت و اثرات نامطلوبی در ارزیابی‌های اولیه انسانی ندارد (۴۶). علاوه بر این، این پپتید در مقایسه با برخی از آنتی بیوتیک‌ها آلرژی‌زایی بسیار کمتری دارد (۴۴). بررسی اثر تاناتین بر روی باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک نظیر Methicillin-epidermis Resistant Staphylococcus نیز منجر به معرفی این پپتید به‌عنوان یک جایگزین برای آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان گستره‌ی وسیعی از بیماری‌ها شده است (۲۲). پروتئین نوترکیب تاناتین قادر است که فعالیت برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها ازجمله کلرامفنیکل و تتراسایکلین را بر روی باکتری E.aerogenes بهبود بخشد (۳۵) و نه تنها اثر قابل توجهی را بر روی Pseudomonas aeruginosa نسبت به درمان‌های رایج دارد بلکه می‌تواند به عنوان یک جایگزین برای آنتی‌بیوتیک‌های شیمیایی باشد (۱۲). همچنین بررسی خواص ضدمیکروبی سازه ژنی هیبریدی متشکل از لاکتوفریسین گاوی و تاناتین و بیان آن در باکتری E.coli و سپس خالص‌سازی، حاکی از افزایش عملکرد ضدمیکروبی کایمر حاصل بود (۱۵). در مطالعه حاضر، حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی پپتید تاناتین در باکتری Staphylococcus aureus تقریبا ۲ برابر باکتری E.coli HV ۰۱۵۷ و در باکتری E.coli تقریبا ۴ برابر باکتری E.coli HV ۰۱۵۷ بود که حاکی از حساسیت بیشتر باکتری E.coli HV ۰۱۵۷ به این پپتید می‌باشد.

نتیجه‌گیری کلی

آزمون ضدباکتریایی انجام شده در این مطالعه نشان داد که پپتیدهای باکتریوسین انتروسین p و تاناتین دارای اثرات ضدباکتری قوی‌تری در غلظت‌های کمتری نسبت به دو اسانس نعناع سبز و زیره سبز بر روی برخی باکتری‌های مولد ورم پستان در گاو مانند Staphylococcus aureus، E.coli HV ۰۱۵۷ و E.coli هستند. به طوریکه باکتری Staphylococcus aureus نسبت به پپتید باکتریوسین انتروسین p و E.coli HV ۰۱۵۷ نسبت به پپتید تاناتین حساسیت بیشتری داشتند. از میان دو اسانس گیاهی مورد مطالعه نیز، باکتری‌های Staphylococcus aureus و E.coli نسبت به هر دو اسانس نعناع سبز و زیره سبز حساسیت یکسانی داشت اما باکتری E.coli HV ۰۱۵۷ نسبت به زیره سبز حساسیت بیشتری داشت. هرچند دلایلی برای جلوگیری از استفاده از برخی پپتیدهای ضدمیکروبی به عنوان مثال سمیت همولیتیک وجود دارد، اما از مزایای استفاده از پپتیدها نسبت به اسانس‌ها می‌توان به مقاومت نسبت به حرارت، اکسیداسیون و همچنین امکان دست‌ورزی از طریق اتصال به سایر پپتیدها جهت افزایش فعالیت آن اشاره کرد. امید است بتوان از این پپتیدها در آینده به عنوان داروی جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان بیماری‌های دامی از جمله ورم پستان دام مورد استفاده قرار داد.

منابع مورد استفاده

1-Amer, S., Gálvez, F. L. A., Fukuda, Y., Tada, C., Jimenez, I. L., Valle, W. F. M., & Nakai, Y. (2018). Prevalence and etiology of mastitis in dairy cattle in El Oro Province, Ecuador. *Journal of Veterinary Medical Science*, 17-0504.

2-Javadmanesh, A., Mousavi, Z., Tanhaeian, A., Azghandi, M. (2020). Comparison of antimicrobial activity of thanatin peptide with cinnamon and oregano essential oils on some pathogenic bacteria. Veterinary Researches & Biological Products, 33(1), 47-53. In persion.

3- Zare Bidaki, M., Arab, Mina., Khazaei, M., Afkar, E. Anti-bacterial effect of Mentha spicata L. t'essenceon eight standard species of gastrointestinal pathogens. *Scientific Journal of Birjand University of Medical Sciences*, 21 (3), 274-282. In persion

4-Ekhtelat, M., Bahrani, Z., Siahpoosh, A., & Ameri, A. (2019). Evaluation of antibacterial effects of Mentha spicata L., Cuminum cyminum L. and Mentha longifolia L. essential oils individually and in combination with sodium benzoate against Escherichia coli O157: H7 and Listeria monocytogenes. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 14 (3)

5-Petretto, G. L., Fancello, F., Bakhy, K., Faiz, C. A., Sibawayh, Z., Chessa, M., ... & Pintore, G. (2018). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from Cuminum cyminum L.

www.SID.ir

Archive of SID

.collected in different areas of Morocco. Food bioscience, 22, 50-58

6.Abbaszadegan, A., A., Gholami, Y., Ghahramani, R., Ghareghan, M., Ghareghan, A., Kazemi and Y., Ghasemi. (2016). Antimicrobial and cytotoxic activity of Cuminum cyminum as an intracanal medicament compared to chlorhexidine gel. *Iranian Endodontic journal* 11(1), 44.

7.Agrawal, K.K., S.P.S., Khanuja, A., Ateeque, T.R., Santha Kumar, V.K., Gupta and S., Kumar. 2002. Antimicrobial activity profiles of the two enantiomers of limonene and carvone isolated from the oils of Mentha spicata and Anthum sowa. *Flavour and Fragrance Journal* 17(1): 59-63.

8.Bakkali, F., S., Averbeck, D., Averbeck, M., Idaomar. 2008. Biological effects of essential oils--a review. *Food Chem Toxicol* 46(2): 446-75.

9.Barkema, H.W., M.J., Green, A.J., Bradley, R.N. Zadoks. 2009. Invited review: The role of contagious disease in udder health. *Journal of Dairy Science* 92: 4717-4729.

10.Bolourchi, M., D.M.R., Mokhber, R., Kasravi, E.A., E.A., Moghimi, P., Hovareshti. 2008. An estimation of national average of milk somatic cell count and production losses due to subclinical mastitis in commercial dairy herds in Iran. *Journal of Veterinary Research* 63:263-266.

11.Cintas, L. M., P., Casaus, L. S., Håvarstein and I. F., Nes. 1997. Biochemical and genetic S. Herna´ndez, P. E., genetic characterization of enterocinP, a novel Enterococcus faecium P13 spectrum. *Applied and Environmental Microbiology* 63:4321–4330

12.Cirioni, O., G., Wu, L., Li, F., Orlando, C., Silvestri, R., Ghiselli and M., Provinciali. 2011. S-thanatin in vitro prevents colistin resistance and improves its efficacy in an animal model of Pseudomonas aeruginosa sepsis. *Peptides* 32(4), 697-701.

13.Diarra, M.S., D., Petitclerc and P., Lacasse. 2002. Effect of lactoferrin in combination with penicillin on the morphology and the physiology of Staphylococcus aureus isolated from bovine mastitis. *Journal of Dairy Science* 85:1141-1149.

14.Fehlbaum, P., P., Bulet, S., Chemysh. 1996. Structure activity analysis of thanatin, a 21-residue inducible insect defense peptide with sequence homology to frog skin antimicrobial peptides. Proceedings of the National Academy of Sciences 93:1221–1225.

15.Feng, X., C., Liu, J., Guo, X., Song, J., Li, W., Xu and Z., Li. 2012. Recombinant expression, purification, and antimicrobial activity of a novel hybrid antimicrobial peptide LFT33. *Applied microbiology and biotechnology* 95(5), 1191-1198.

16.Feo, V.D., A.I., Ricciardi, D., Biscardi and F., Senatore. 1998. Chemical composition and antimicrobial screening of the essential oil of Minthostachys verticillate (Griseb) Ep1 (Lamiaceae). *Journal of Essential oil Research* 10(1): 61-65.

17.Flamin, G., P.L., Cioni, R., Pleio, I., Morlli and L., Panizzi. 1999. Antimicrobial activity of essential oil of Calamintha nepta and its constituent pulegon against bacteria and fungi. Phytotherapy Research: *An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives* 13(4): 349-351.

18.Franz, C. M., M. J., Van Belkum, W. H., Holzapfel, H., Abriouel and A., Gálvez. 2007. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS microbiology reviews* 31(3), 293-310.

19.Guler, L., U., Ok, K., Gunduz, Y., Gulcu and H. H., Hadimli. 2005. Antimicrobial susceptibility and coagulase gene typing of Staphylococcus aureus isolated from bovine clinical mastitis cases in Turkey. *Journal of Dairy Science* 88:3149-3154.

20.Hancock, R. E. W. and A., Patrzykat. 2002. Clinical development of cationic antimicrobial peptides: from natural to novel antibiotics. Current drug targets-Infectious disorders 2(1), 79-83.

21.Hou, Z., F., Da, B., Liu, X., Xue, X., Xu, Y., Zhou ans M., Jia. 2013. R-thanatin inhibits growth and biofilm formation of methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis in vivo and in vitro. Antimicrobial agents and chemotherapy 57(10), 5045-5052.

22.Hu, C. B., W., Malaphan, T., Zendo, J., Nakayama and K., Sonomoto. 2010. Enterocin X, a novel two-peptide bacteriocin from Enterococcus faecium KU-B5, has an antibacterial spectrum entirely different from those of its component peptides. *Applied and environmental microbiology* 76(13), 4542-4545

23.Iacobellis, N. S., P., Lo Cantore, F., Capasso and F., Senatore. 2005. Antibacterial activity of Cuminum cyminum L. and Carum carvi L. essential oils. *Journal of agricultural and food chemistry* 53(1): 57-61.

24.Kalmus, P., B., Aasmae, A., Karssin, T., Orro, K., Kask. 2011. Udder pathogens and their resistance to antimicrobial agents in dairy cows in Estonia. *Journal of Acta Veterinaria Scandinavica,* 53:4.

25.Kumar, P., S., Mishra, A., Malik and S., Satya. 2011. Insecticidal properties of Mentha species: A review. *Industrial Crops and Products* 34(1): 802-17.

26.Le, T. N., T. H., Do, T. N., Nguyen, N. T., Tran, S. O., Enfors and H., Truong. 2014. Expression and Simple Purification Strategy for the Generation of Anti-microbial Active Enterocin P from Enterococcus faecium Expressed in Escherichia coli ER2566. *Iranian Journal of Biotechnology* 12(4), 17-25.

27.Liu, Y., J., Luo, C., Xu, F., Ren, C., Peng, G., Wu and J., .Zhao. 2000. Purification, characterization, and molecular cloning of

www.SID.ir

Archive of SID

the gene of a seed-specific antimicrobial protein from pokeweed. *Plant Physiology* 122 (4):1015-1024.

28.Marshall, S.H. and G., Arenas. 2003. Antimicrobial peptides: A natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology. *Electronic Journal of Biotechnology* 6(3):271-84.

29.Naigre, R., P., Kalck, C., Paques, I., Roux and G., Michel. 1996. Comparison of the antimicrobial properties of monoterpens and their carbonylated products. *Journal of Plant Medicine* 62(3): 275-277.

30.Nam, H.M., S.K., Lim, H.M., Kang, J.M., Kim, J.S., Moon, K.C., Jang, Y.S., Joo and S.C., Jung. 2009. Prevalence and antimicrobial susceptibility of gram-negative bacteria isolated from bovine mastitis between 2003 and 2008 in Korea. *Journal of dairy science* 92 (5): 2020-2026.

31.Nurdin, E., 2006. Effect of sunflower and Bioplus against milk production and dairy cow rations efficiency FH. *Agrisistem J*., 2: 59-62.

32.Nurdin, E., 2007. [The effect of supplementation sunflowers (Helianthus annuus L.) and BIOPLUS in the solid nun fat, total solid and milk acidity of sub-clinical mastitis's holstein dairy cows]. *J. Anim. Prod.*, 9: 79-81.

33.Nurdin, E., 2007. Effect of sunflower and probiotics cob decline against mastitis in dairy cattle degree FH patients with subclinical mastitis. *J. Trop. Livestock Dev*., 32: 76-79.

34.Oliver, S. P. and S. E., Murinda. (2012). Antimicrobial resistance of mastitis pathogens. Veterinary Clinics: *Food Animal Practice* 28(2), 165-185.

35.Pagès, J. M., J. L., Dimarcq, S., Quenin and C., Hetru. 2003. Thanatin activity on multidrug resistant clinical isolates of Enterobacter aerogenes and Klebsiella pneumoniae. *International journal of antimicrobial agents* 22(3), 265-269.

36.Pirestani, A., Galamkari, G., Eghbalsaied, S., Jafarpour, M., & Por, N. G. (2013). The effect of Mentha piperita, peppermint and Matricaria chamomilla extracts on agents causing Bovine mastitis in vitro condition. *Technical Journal of Engineering and Applied Sciences,* 24, 364-3646.

37.Redwan, E.M., N.A., El-Baky, A.M., Al-Hejin, M.N., Baeshen, H.A., Almehdar, A., Elsaway, A.B., Gomaa, S.B., Al-Masaudi, F.A., Al-Fassi, I.E., AbuZeid and V.N., Uversky. 2016. Significant antibacterial activity and synergistic effects of camel lactoferrin with antibiotics against methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). *Journal of Research Microbiology* 167:480-91.

38.Rozman,T. and B., Jersec. 2009. Antimicrobial activity of rosemary extracts (Rosmarinus officinalis against different species of Listeria. *Acta agriculturae Slovenica* 1:14-20

39.Ruegg PL. 2005. Relationship between bulk tank milk somatic cell count and antibiotic residues. In Proceeding of the 2005 National Mastitis Council Meeting. *National Mastitis Council* 28 –35.

40.Shetty, R. S., R. S., Singhal and P. R., Kulkarni. 1994. Antimicrobial properties of cumin. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 10(2), 232-233.

41.Tanhaeian, A., M.S., Damavandi, D., Mansury and K., Ghaznini. 2019. Expression in eukaryotic cells and purification of synthetic gene encoding enterocin P: a bacteriocin with broad antimicrobial spectrum. *AMB Express* 9(1), 6.

42.Vizioli, J. and M., Salzet. 2003. Antimicrobial peptides: new weapons to control parasitic infections. *Journal of Trends in Parasitology* 18.

43.Wang, S., X., Zeng, Q., Yang and S., Qiao. 2016. Antimicrobial Peptides as Potential Alternatives to Antibiotics in Food Animal Industry. *International journal of molecular sciences* 17(5):603.

44.Wu, G., X., Li, X., Fan, H., Wu, S., Wang, Z., Shen and T., Xi. 2011. The activity of antimicrobial peptide S-thanatin is independent on multidrug-resistant spectrum of bacteria. *Peptides* 32(6), 1139-1145

45.Zhou, X. and X. Wang. 2011. Characterization of pathogenic or non-pathogenic Enterococcus faecalis isolated from lambs from Xinjiang, a remove North-west province of China. *African Journal of Microbiology Research* 5(18): 2827-2833.

46.Zhou, Y., R., Zhao, B., Ma, H., Gao, X., Xue, D., Qu and Z., Hou. 2016. Oligomerization of RNAIII-inhibiting peptide inhibits adherence and biofilm formation of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in vitro and in vivo. *Microbial Drug Resistance* 22(3), 193-201.

www.SID.ir