

اثر ضد میکروبی اسانس مرزه (*Satureja spp.*) بر تولید همولیزین و بیوفیلیم در استافیلوکوکوس اورئوس

الهه تقیان^۱، نوید سعیدی^۱، فاطمه سفیدکن^۲، حوریه صادی^۳، ایرج رسولی^۴، رضا محمد صالحی^۴ و پرویز اولیاء^{۵*}

۱- کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات میکروب شناسی مولکولی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

۲- استاد، مؤسسه تحقیقات جنگل ها و مراتع کشور، تهران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

۳- استاد، مرکز تحقیقات میکروب شناسی مولکولی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

۴- دانشجوی دکترا، مرکز تحقیقات میکروب شناسی مولکولی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

۵- نویسنده مسئول، استاد، مرکز تحقیقات میکروب شناسی مولکولی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران، پست الکترونیک: powlia@gmail.com

تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۹۶

تاریخ اصلاح نهایی: بهمن ۱۳۹۶

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۶

چکیده

درمان عفونت های ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس به یک مشکل در جهان تبدیل شده است. این باکتری با داشتن عوامل بیماری زایی متعدد، یکی از پاتوژن های مهم به حساب می آید. هدف از این مطالعه ارزیابی اثر ضد میکروبی ۴ گونه از اسانس گیاه مرزه (*Satureja rechingeri* Jamzad، *Satureja bachtiarica* Bunge، *Satureja khuzistanica* Jamzad، *Satureja mutica* Fisch. & C. A. Mey) بر تشکیل بیوفیلیم و تولید همولیزین در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس است. حداقل غلظت مهاری در سویه های استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 29213 و ATCC 33591 برای اسانس های گیاه مرزه به روش micro dilution broth تعیین گردید. سپس از غلظت های Sub-MIC از اسانس های گیاه مرزه برای آزمایش تشکیل بیوفیلیم و تولید همولیزین استفاده شد. نتایج این مطالعه نشان داد که اسانس هر ۴ گونه مرزه مورد آزمایش اثر ضد میکروبی بر علیه هر دو سویه استاندارد استافیلوکوکوس داشته و همچنین میزان تشکیل بیوفیلیم و تولید همولیزین باکتری ها در حضور غلظت های Sub-MIC از اسانس ها به طور معنی داری کاهش یافت. نتایج این بررسی نشان دهنده این امر است که اسانس های ۴ گیاه مرزه مورد آزمایش، بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس دارای اثرات ضد میکروبی می باشد و با مطالعات بیشتر می توان از آن برای کنترل عفونت های استافیلوکوکوس اورئوس استفاده کرد.

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

مقدمه

خاک های عمیق تا مناطق با اقلیم خشک، آفتابی و خاک های سنگلاخی رشد می کنند. ایران یکی از مهمترین مخازن ژرم پلاسما مرزه در دنیا است. بیش از ۱۴ گونه از این گیاه در ایران شناسایی شده است که ۹ گونه آن انحصاری ایران با نام های *S. sahendica*، *S. edmondi*

گیاه مرزه با اسم جنس (*Satureja*) متعلق به تیره نعناعیان (*Lamiaceae*) و راسته *Lamiales* می باشد. گونه های این جنس عمدتاً بومی مناطق مدیترانه شرقی و غرب آسیا هستند و عموماً در مناطق با اقلیم مرطوب و

نیاز مبرمی به تغییر الگو و روی آوردن به سمتی دیگر دارد. یکی از این باکتری‌ها *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشد. این باکتری عفونت‌های متعددی ایجاد می‌کند و گزارش‌های متعدد مقاومت دارویی از آن گزارش شده‌است. به ویژه بروز و شیوع سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) باعث افزایش نگرانی شده‌است. این باکتری تولید عوامل بیماری‌زایی متعددی می‌کند. از جمله این عوامل می‌توان به تولید همولیزین و بیوفیلیم اشاره کرد (Carroll et al., 2016; Hoseini et al., 2015). این باکتری به‌عنوان دومین عامل عفونت‌های بیمارستانی محسوب می‌شود. چندین سال است که محققان به دنبال مواد ضد میکروبی علیه آن می‌باشند. از جمله این موارد می‌توان به اثرات ضد میکروبی گیاهان دارویی اشاره کرد، اما کمتر مطالعه‌ای به بررسی اثرات غلظت‌های subMIC پرداخته‌است. در این مطالعه به بررسی اثر چهار اسانس مرزه بر تولید دو فاکتورهای بیماری‌زا پرداخته شده‌است.

مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتری *Staphylococcus aureus*

در این مطالعه از دو باکتری *S. aureus* ATCC 29213 و *S. aureus* ATCC 33591 استفاده شد. به ترتیب 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 کلنی‌های تک استفاده گردید. کلنی‌ها 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

S. intermedia، *S. bachtiarica*، *S. kallarica* و *S. atropatana*، *S. isophylla*، *S. rechingeri* و *S. khuzistanica* هستند (Sefidkon et al., 2007a). سایر گونه‌ها علاوه بر ایران در تالش، ترکمنستان، ترکیه، قفقاز، ماورای قفقاز و عراق نیز می‌رویند. گونه‌های این جنس بیشتر در دامنه‌های کوهستانی مناطق شمال، شمال غربی، شمال شرقی، مرکزی و جنوب غربی 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 اشتها آور، آرام‌بخش، ضد عفونی‌کننده و مسکن رایج می‌باشد (Sefidkon et al., 2005; Emami et al., 2004). اسانس‌ها ترکیب‌های شیمیایی پیچیده‌ای هستند که اغلب بیش از صد جزء اصلی در ترکیب‌هایشان موجود است که عامل اصلی طعم و بوی آنها می‌باشد. هیدروکربورها، الکل‌ها، کتون‌ها، آلدئیدها، اترها و اکسیدها از جمله 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 می‌باشد. کارواکرول نیز یک منوترین فنلی به‌صورت مایعی بی‌رنگ و چسبناک بوده که در مجاورت هوا و نور تیره می‌شود. از کارواکرول در تولید محصولات بهداشتی به‌عنوان ضد عفونی‌کننده 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 ضد میکروبی 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

چاهک‌ها اضافه می‌شد که دامنه غلظتی نهایی صفر (شاهد) تا $2048 \mu\text{g/ml}$ در چاهک‌ها ایجاد شود. همچنین برای تهیه سوسپانسیون باکتری از غلظت $0/5$ مک فارلند در محیط کشت مولر هینتون برات (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. نمونه‌ها بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد. پس از انکوباسیون ۲۴ ساعته در دمای 37°C درجه سانتی‌گراد، پلیت‌ها از لحاظ رشد و تشکیل کلنی بررسی شده و کمترین رقتی که توانسته بود $99/99\%$ تعداد باکتری‌ها را بکشد به‌عنوان MBC در نظر گرفته شد (CLSI, 2015).

اثر اسانس‌ها بر تشکیل بیوفیلم

برای بررسی اثر اسانس‌ها بر تشکیل بیوفیلم از روش میکرو تیتربلیت 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 $1/2 \text{MIC}$ اسانس تلقیح شد. از این سوسپانسیون مقدار 200 میکرولیتر به چاهک‌های 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 37°C درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. بعد از گذشت زمان مذکور ابتدا محیط درون میکروپلیت‌ها دور ریخته شد، سپس 200 میکرولیتر محیط PBS به چاهک‌ها اضافه گردید. برای شستشوی بهتر ۳ مرتبه این کار تکرار شد. در مرحله بعد 100 میکرولیتر متانول درون چاهک‌ها ریخته و بعد از گذشت ۱۵ دقیقه دوباره چاهک‌ها خالی گردید. سپس 100 میکرولیتر رنگ کریستال ویوله 1% به چاهک‌ها اضافه کرده و بعد از ۱۵ دقیقه رنگ را با آب شسته و به مدت ۲ ساعت اجازه داده شد تا کاملاً خشک شود. در پایان 200 میکرولیتر

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

آماده‌سازی استوک اسانس‌ها

در ابتدا وزن اسانس‌ها اندازه‌گیری شد. این عمل برای بدست آوردن رابطه بین وزن و حجم اسانس‌ها بدست آمد. برای تهیه استوک اسانس‌ها به یک حلال مناسب نیاز است. همچنین این حلال نباید دارای خاصیت ضد میکروبی باشد. از این‌رو از ماده دی‌متیل سولفواکساید DMSO به‌عنوان حلال استفاده شد. برای تهیه استوک، اسانس‌ها به نسبت 1 به 1 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 $0/5$ مک فارلند به‌وسیله یک سوآب بر روی محیط کشت‌های از قبل آماده شده مولر هینتون آگار (MHA) به روش چمنی کشت داده شد. سپس مقدار 10 میکرولیتر از استوک هر اسانس را به‌وسیله سمپلر برداشته و روی دیسک بلانک (فاقد آنتی‌بیوتیک) ریخته و دیسک‌های حاوی اسانس‌ها روی محیط تلقیح شده با باکتری قرار داده شد و در دمای 37°C 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 برات براساس دستورالعمل CLSI استفاده شد. برای این منظور بر اساس وزن اسانس در استوک، مقادیری از استوک به

۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس نمونه‌ها دوباره در ۷۰۰ rpm و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ و بعد از آن خوانش توسط الیزابدر انجام شد. همه مراحل کار در ۳ تکرار انجام شد (Shi et al., 2015).

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل نتایج در تمام مراحل به وسیله نرم افزار Excel برای بدست آوردن میانگین داده‌ها و رسم نمودار و از نرم افزار SPSS22 به منظور بررسی سطح معنی‌داری داده‌ها استفاده شد. همچنین در تحلیل اولیه داده‌ها از آنالیز واریانس و برای بخش پس‌تبعی 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

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

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.

استیک اسید ۳۳٪ به چاهک‌ها اضافه گردید و میکروپلیت برای خوانش در طول موج ۴۹۰ نانومتر به دستگاه الیزابدر 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، 10^8 cfu/ml باکتری در محیط MHB حاوی غلظت $1/2$ MIC اسانس تلقیح شد. سوسپانسیون حاصل درون ارلن ریخته شد و به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۸۰ rpm انکوبه گردید. کنترل مثبت ارلن فاقد عصاره و کنترل منفی ارلن فاقد باکتری بود. بعد از گذشت زمان مذکور از هر ارلن مقدار ۱ cc برداشته و درون میکروتیوب ریخته شد و در ۷۰۰ rpm سانتریفیوژ و مایع رویی جدا گردید و به میکروتیوب دیگری انتقال یافت. به منظور 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

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 ضد میکروبی بودند.

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

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

جدول ۳- نتایج حاصل از تعیین MIC و MBC

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

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 ($P = 0.001$).

نتایج تأثیر اسانس‌ها بر تشکیل بیوفیلم نتایج حاصل از میزان تشکیل بیوفیلم و درصد کاهش بیوفیلم در حضور ۴ اسانس گیاه مرزه برای سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 29213 و ATCC 33591 در جدول‌های ۴ و ۵ ذکر شده است. همچنین مقایسه

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

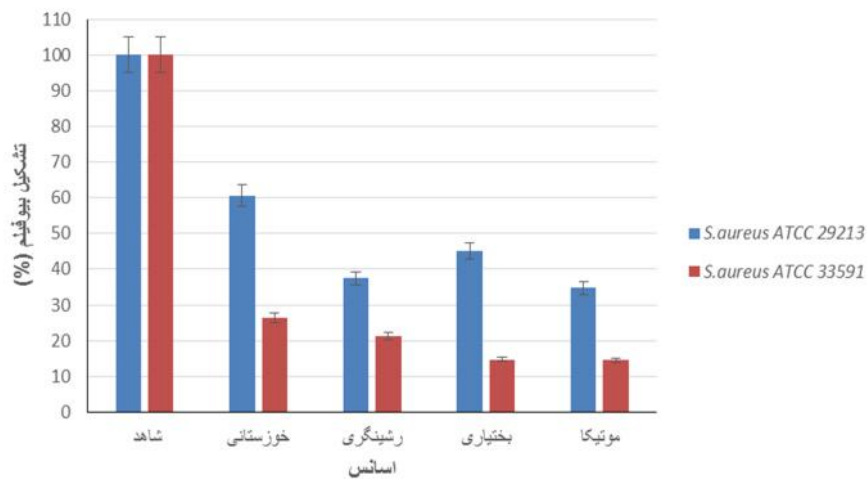
اسانس				شاهد	نمونه
موتیکا	بختیاری	رشینگری	خوزستانی		
۰/۰۶۳	۰/۰۸۲	۰/۰۶۸	۰/۱۱۰	۰/۱۸۱	OD
±۰۰۴	±۰/۰۱۱	±۰/۰۰۶	±۰/۰۱۸	±۰/۰۱۷	
۶۵/۲۶	۵۴/۷۸	۶۲/۵۰	۳۹/۳۴	---	درصد کاهش
+	+	+	+	---	معنی‌دار بودن تفاوت

+: دارای اختلاف معنی‌دار

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

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

+: دارای اختلاف معنی دار



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

جدول ۶- تأثیر ۴ گونه اسانس مرزه بر فعالیت همولیتیکی استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 29213

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

+: دارای اختلاف معنی دار

نتایج تأثیر اسانس‌ها بر تولید همولیزین

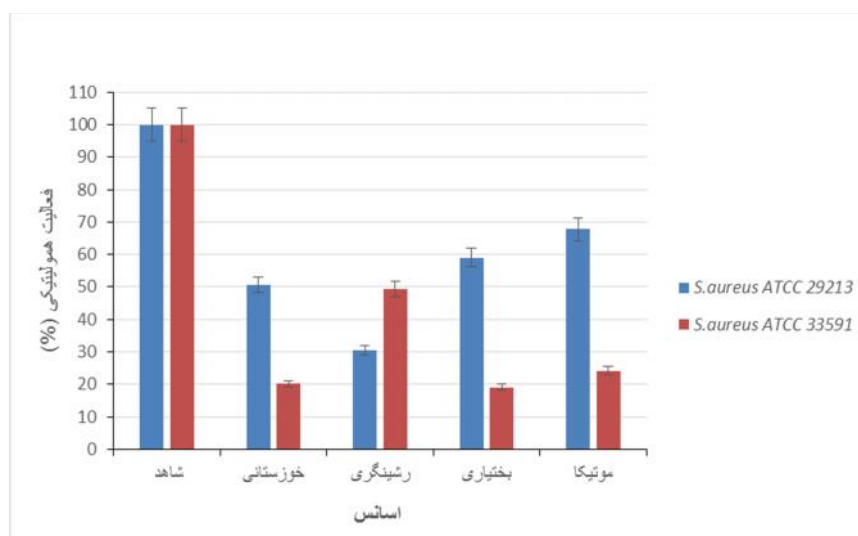
میزان فعالیت همولیتیکی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 29213 و ATCC 33591 در محیط‌های حاوی ۴ اسانس گیاه مرزه در جدول‌های ۶ و ۷ و همچنین مقایسه فعالیت همولیتیکی این دو سویه در شکل ۲ قابل

مشاهده است. نتایج نشان‌دهنده کاهش معنی‌دار فعالیت همولیتیکی هر دو سویه حساس و مقاوم به متی‌سیلین *استافیلوکوکوس اورئوس* در حضور هر ۴ اسانس بود ($P = 0.001$).

جدول ۷- تأثیر ۴ گونه اسانس مرزه بر فعالیت همولیتیکی *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 33591

نمونه	شاهد	خوزستانی	رشینگری	بختیاری	موتیکا
OD	۰/۳۳۶	۰/۰۶۸	۰/۱۶۶	۰/۰۶۴	۰/۰۸۱
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

بود. در پژوهش انجام شده توسط Sefidkon و همکاران (۲۰۰۷b) به بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس دو گونه مرزه بختیاری و خوزستانی در دو مرحله برداشت، بر ۵ نوع باکتری گرم مثبت و ۳ نوع باکتری گرم منفی پرداخته‌اند.

هدف از این مطالعه، بررسی اثرات ضد میکروبی چهار گونه اسانس گیاه مرزه بر دو گونه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌عنوان جایگزینی برای استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها

کاکوتی و گونه مرزه بختیاری (*Satureja bachtiarica*) انجام شد اسانس مرزه بختیاری بیشترین اثر ضد میکروبی 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 ضد میکروبی 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 ضد میکروبی اسانس‌های گیاهی، به ویژه مرزه انجام شده است. فعالیت ضد میکروبی اسانس‌ها به ویژه خانواده Lamiaceae به گروهی از ترپنوئیدهای کوچک و ترکیب‌های فنولیک (پولگون، تیمول و کارواکرول) نسبت داده می‌شود. البته هرچه درصد ترکیب‌های فنلی بالاتر باشد خاصیت ضد میکروبی 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 اسپکتروفوتومتر 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

نتایج آنان نشان داد که اسانس‌های *S. khusistanica* در هر دو مرحله برداشت و اسانس *S. bachtiarica* در مرحله قبل از گلدهی دارای اثرات ضد میکروبی قابل ملاحظه‌ای هستند که می‌توانند به عنوان 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 بوده است. 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. علاوه بر 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 می‌باشد. البته تفاوت هر یک از اسانس‌ها با شاهد در هر دو باکتری معنی‌دار است. در مطالعه‌ای که توسط Mohammadpour و همکاران (۲۰۱۱) بر خواص ضد باکتریایی و ضد قارچی اسانس گونه‌هایی از سه جنس آویشن (Thyme) و دو اکوتیپ

سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه شاهد انجام شده است. از همکاران بخش تحقیقات گیاهان دارویی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور نیز به دلیل 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 p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiology*, 21: 33-42.
- Bahador, A., Saghi, H., Ataekachoei, 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.

ضدباکتریایی اسانس‌های 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). مدل‌های 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 ضد میکروبی 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. با وجود این نتایج این پژوهش بیانگر اثرات مثبت اسانس‌های مرزه بر استافیلوکوکوس اورئوس بوده است. 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 غلظت‌های MIC و MBC دارای اثرات بازدارندگی رشد و کشندگی بود و عملاً نمی‌شد این آزمایش‌ها را انجام داد (Lambert *et al.*, 2001). این‌رو شاید بتوان با مطالعات بیشتر به‌ویژه بررسی ترکیب‌های مؤثر این اسانس‌ها به داروهای گیاهی مؤثر علیه این باکتری دست پیدا کرد.

- 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.
- Mohammadpour, 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.
- 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., Moshstghi Broojeni, H. and Fallah, A., 2013. Evaluating antibacterial effects of alcoholic extract of *Satureja bachtiarica* on some foodborne pathogenic bacteria of meat. Pajouhesh & Sazandegi, 104: 28-37.
- Hoseini, S., Niakan, M., Saderi, H. and Emameini, 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., Lambropoulou, 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 Horticulturae, 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 qualitative 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 University, 18: 51-60.

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

E. Taghian¹, N. Saidi¹, F. Sefidkon², H. Sadari¹, I. Rasooli¹, R. Mohammad Salehi¹
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*.