نشریه علمی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۶، شماره ۲، صفحه ۲۰۸-۱۹۵ (۱۳۹۹)

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijmapr.2020.126820.2586
شناسه دیجیتال (DOR): 98.1000/1735-0905.1399.36.195.100.2.1575.1575

# اثر اسانس‌های مرزه (*Satureja* spp.) بر عوامل بیماری‌زایی سودوموناس آئروجینوزا

**نوید سعیدی[۱]، حوریه صادری[۲]، الهه تقیان[۱]، فاطمه سفیدکن[۳]، ایرج رسولی[۴]، رضا محمدصالحی[۵] و پرویز اولیاء[۶*]**

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

۲- استاد، مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی مولکولی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

۳- استاد، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

۴- استاد، مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

۵- دانش‌آموخته دکترا، مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی مولکولی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

۶*- نویسنده مسئول، استاد، مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی مولکولی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران، پست الکترونیک: powlia@gmail.com

تاریخ دریافت: تیر ۱۳۹۸ تاریخ اصلاح نهایی: آبان ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۸

## چکیده

سودوموناس آئروجینوزا یکی از شایع‌ترین باکتری‌های فرصت‌طلب در عفونت‌های بیمارستانی است که مقاومت قابل توجهی در برابر مواد ضدمیکروبی دارد. با توجه به محدودیت‌های استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها، گرایش به جایگزینی آنها با فرآورده‌های طبیعی افزایش یافته است. در این مطالعه اثر ضدمیکروبی اسانس ۴ گونه گیاه مرزه (*Satureja mutica*، *S. bachtiarica*، *S. rechingeri*، *S. khuzistanica*) بر عوامل بیماری‌زایی سودوموناس آئروجینوزا ارزیابی شد. حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس‌های گیاه مرزه در سویه‌های استاندارد سودوموناس آئروجینوزا PAO1 و سودوموناس آئروجینوزا 8821M به روش میکرودایلوشن براث تعیین گردید. در ادامه اثر غلظت‌های پایین‌تر از حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد (sub-minimum inhibitory concentration; sub-MIC) اسانس‌ها بر عوامل بیماری‌زایی این باکتری شامل حرکت، تشکیل بیوفیلم و تولید آلژینات، الاستاز و آلکالین‌پروتئاز این دو سویه بررسی شد. هر ۴ اسانس مرزه دارای اثرهای ضدمیکروبی علیه سویه‌های استاندارد سودوموناس آئروجینوزا بودند، همچنین غلظت‌های sub-MIC اسانس‌ها موجب کاهش معنی‌دار تولید عوامل بیماری‌زایی این سویه‌ها شدند. در این مطالعه اثرهای مطلوب آنتاگونیستی اسانس‌های گیاه مرزه در برابر سویه‌های استاندارد سودوموناس آئروجینوزا مشاهده شد. با انجام مطالعات بیشتر می‌توان از این اسانس‌ها به‌عنوان یک ترکیب ضدمیکروبی علیه این باکتری استفاده کرد.

**واژه‌های کلیدی:** اسانس، سودوموناس آئروجینوزا، عوامل بیماری‌زایی، مرزه (*Satureja*).

## مقدمه

سودوموناس آئروجینوزا یک باکتری گرم منفی است که قادر به بقاء در شرایط مختلف محیطی است. این باکتری یک پاتوژن فرصت‌طلب است که توانایی کلونیزه شدن در افراد سالم و محیط‌های مرطوب در بیمارستان‌ها را دارد (Carroll *et al.*, 2015). این باکتری عامل ۷۵٪ از باکتریمی‌های

بیمارستانی و همچنین سومین عامل مهم در باکتریمی‌های گرم منفی است (Mahon *et al.*, 2015). توانایی بیماری‌زایی سودوموناس آئروجینوزا به مقدار زیادی به ترشح آنزیم‌های خارج سلولی و سموم آن برمی‌گردد (Murray *et al.*, 2015). ازجمله این آنزیم‌ها می‌توان به پروتئازها اشاره کرد. الاستاز و آلکالین پروتئاز از مهمترین پروتئازهای این باکتری هستند که در تهاجم بافتی نقش دارند. همچنین آلکالین پروتئاز قادر به حفاظت از باکتری با مهار برخی مسیرهای سیستم ایمنی میزبان می‌باشد. الاستاز از عوامل اصلی ایجاد عفونت‌های مختلف در افراد مبتلا به سیستیک فیبروزیس است (Raj *et al.*, 2012؛ Saleem, 2012). سودوموناس آئروجینوزا ازجمله باکتری‌های ایجادکننده بیوفیلم است، یکی از مهمترین ساختارهایی که طی تشکیل بیوفیلم این باکتری تولید می‌شود، یک اگزوپلی‌ساکارید خارج سلولی به نام آلژینات است. آلژینات از باکتری در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها و فاگوسیتوز توسط گلبول‌های سفید محافظت می‌کند (Cotton *et al.*, 2009؛ Leid *et al.*, 2005). تشکیل بیوفیلم سودوموناس آئروجینوزا در مجاری تنفسی بیماران سیستیک فیبروزیس، یکی از عوامل مهم در طولانی شدن دوره درمان، تشدید علائم بالینی و حتی مرگ بیماران است (Ghotaslou & Salahi Eshlaqghi, 2013). این باکتری متحرک بوده و قابلیت حرکت آن موجب شده که توانایی انتشار سریع را در محل آلودگی و به‌دنبال آن تهاجم و انتشار سیستمیک داشته باشد (Drake & Montie, 1988). مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها یکی از بزرگترین چالش‌هایی است که سلامت انسان‌ها را تهدید می‌کند (Carroll *et al.*, 2015). معرفی ترکیب‌های جدید برای کنترل عفونت‌های مربوطه می‌تواند کمک شایانی در این مورد باشد.

گیاهان دارویی از منابع بالقوه‌ای هستند که از دیرباز خواص درمانی و دارویی آنها مورد توجه قرار گرفته است. اسانس، مایعی است آبگریز و حاوی ترکیب‌های آروماتیک فرّار که از اجزای مختلف گیاهان بدست می‌آید (Hammer *et al.*, 1999). اسانس‌ها حاوی ترکیب‌های شیمیایی متعددی بوده که این ترکیب‌ها عامل اصلی طعم و بوی آنهاست. هیدروکربورها، الکل‌ها، کتون‌ها، آلدهیدها، اترها و اکسیدها ازجمله مواد شیمیایی موجود در اسانس‌ها به‌شمار می‌روند (Majd *et al.*, 2009). جنس مرزه با نام علمی *Satureja* متعلق به تیره نعناعیان (Lamiaceae) است. این گیاه عمدتاً بومی مناطق مدیترانه شرقی و غرب آسیاست (Sefidkon *et al.*, 2007). جنس مرزه دارای گونه‌های متعددی است. ۱۵ گونه از این گیاه در ایران شناسایی شده است که ۹ گونه آن انحصاری ایران با نام‌های *S. edmondi*، *S. sahendic*، *S. kallarica*، *S. bachtiarica*، *S. intermedia*، *S. rechingeri*، *S. isophylla*، *S. atropatana* و *S. khuzistanica* هستند (Sefidkon & Jamzad, 2005). گونه‌های مختلف جنس مرزه دارای خواص دارویی بوده و در طب سنتی کاربرد دارند. اسانس این گیاه مایعی بی‌رنگ و یا مایل به زرد است و دارای عطر و بوی تندی می‌باشد. مهمترین ترکیب‌های شیمیایی اسانس این گیاه مربوط به گروه منوترپنوئیدها بوده و از میان آنها دو ترکیب فنولی تیمول و کارواکرول جزء ترکیب‌های شاخص به حساب می‌آیند (Yazdanpanah *et al.*, 2011). در این مطالعه اثر اسانس ۴ گونه گیاه مرزه بر تعدادی از عوامل بیماری‌زایی سودوموناس آئروجینوزا شامل حرکت، بیوفیلم، آلژینات، الاستاز و آلکالین‌پروتئاز بررسی شد.

## مواد و روش‌ها

### سویه‌های میکروبی مورد استفاده

در این مطالعه از دو سویه استاندارد سودوموناس آئروجینوزا شامل سودوموناس آئروجینوزا PAO1 و سودوموناس آئروجینوزا 8821M استفاده شد. باکتری‌ها در دمای ۷۰°C- و در محیط نوترینت براث حاوی ۱۵٪ گلیسرول نگهداری شدند. برای رشد باکتری‌ها از محیط مولر هینتون آگار (MHA) استفاده شد. کشت باکتری‌ها مرتب از لحاظ خالص بودن مورد ارزیابی قرار گرفت تا احتمال آلودگی و خطا در کار کاهش یابد (Tille, 2013).

**اسانس‌های مورد استفاده**

از اسانس‌های ۴ گونه گیاه مرزه در دسترس استفاده شد. این گونه‌ها عبارت بودند از مرزه خوزستانی (*Satureja khuzistanica*)، مرزه رشینگری (*S. rechingeri*)، مرزه بختیاری (*S. bachtiarica*) و مرزه موتیکا (*S. mutica*). این اسانس‌ها توسط مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور از سرشاخه‌های در زمان گلدهی کامل گیاه (زمانی که ۵۰٪ گلها باز شده‌اند) تهیه شد و پس از تأیید و شناسایی ترکیب‌ها در ظروف شیشه‌ای دربسته و بدون تماس با نور خورشید و هوای آزاد به مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی مولکولی دانشگاه شاهد منتقل گردید.

**تجزیه اسانس‌ها و شناسایی ترکیب‌های تشکیل‌دهنده**

پس از تزریق اسانس‌ها به دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC) و یافتن مناسب‌ترین برنامه‌ریزی حرارتی ستون، برای دستیابی به بهترین جداسازی، اسانس‌های حاصل با دی‌کلرومتان رقیق شده و به دستگاه گاز کروماتوگراف متصل شده با طیف‌سنج جرمی (GC/MS) تزریق شده و طیف‌های جرمی و کروماتوگرام‌های مربوطه بدست آمد. سپس با استفاده از زمان بازداری، شاخص بازداری، مطالعه طیف‌های جرمی و مقایسه با ترکیب‌های استاندارد و استفاده از اطلاعات موجود در نرم‌افزار SATURN ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس‌ها مورد شناسایی کمّی و کیفی قرارگرفت (Adams, 1995؛ Shibamoto, 1987). برای محاسبه اندیس‌های بازداری از تزریق هیدروکربن‌های نرمال ۹ تا ۲۳ کربنه در شرایط برنامه‌ریزی حرارتی (مشابه با تزریق نمونه) استفاده گردید. محاسبات کمّی (تعیین درصد هر ترکیب) به کمک داده‌پرداز R3A-Chromatepac به روش نرمال کردن سطح (Area normalization method) و نادیده گرفتن ضرایب پاسخ (Response factors) مربوط به طیف‌ها انجام شد.

**آماده‌سازی ذخیره اسانس‌ها**

ابتدا برای بدست آوردن واحد وزن به حجم، وزن اسانس‌ها اندازه‌گیری و در ادامه از اسانس‌ها ذخیره تهیه شد. برای تهیه اسانس ذخیره به یک حلال مناسب نیاز است. این حلال نباید دارای خاصیت ضدمیکروبی باشد، ازاین‌رو از ماده دی‌متیل‌سولفوکساید (DMSO) به‌عنوان حلال استفاده شد. برای تهیه ذخیره، اسانس‌ها به نسبت ۱ به ۱ با حلال مذکور مخلوط گردیدند (Anand *et al*., 2011).

**بررسی اثر ضد میکروبی اسانس‌ها به روش انتشار از دیسک**

برای این آزمایش از دستورالعمل اصلاح شده انیستیتو استاندارد آزمایشگاه بالینی (Clinical Laboratory Standard Institute; CLSI) استفاده گردید. در ابتدا به‌منظور آماده‌سازی دیسک‌ها، مقدار ۱۰ میکرولیتر از ذخیره هر اسانس روی دیسک‌های بلانک ریخته شد. آنگاه از کشت ۲۴ ساعته باکتری سوسپانسیونی برابر نیم مک‌فارلند تهیه و به‌صورت چمنی روی محیط MHA کشت داده شد. سپس دیسک‌های حاوی اسانس روی محیط قرار گرفت. در ادامه گرمخانه‌گذاری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C انجام شد. در نهایت قطر هاله عدم رشد اطراف هر دیسک توسط خط‌کش اندازه‌گیری گردید. آزمایش به‌صورت ۳ بار تکرار انجام شد (CLSI, 2015).

**تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) باکتری توسط اسانس‌ها**

برای تعیین MIC از روش میکرودایلوشن براث براساس دستورالعمل CLSI استفاده شد. با افزودن مقادیر مناسب محیط MHB به اسانس ذخیره، غلظت‌های متوالی دو برابری با دامنه ۱۶-۸۱۹۲μg/ml تهیه و از هر غلظت ۱۰۰ میکرولیتر به چاهک‌های میکروپلیت اضافه شد. از کشت ۲۴ ساعته باکتری سوسپانسیونی برابر نیم مک‌فارلند تهیه و به نسبت ۱:۱۰ با محیط MHB رقیق شد. از این

سوسپانسیون، ۵ میکرولیتر به چاهک‌ها تلقیح شد. غلظت نهایی باکتری در هر چاهک برابر با $10^5$cfu/ml بود. چاهک فاقد اسانس به‌عنوان شاهد مثبت و چاهک فاقد باکتری به‌عنوان شاهد منفی بود. میکروپلیت به گرمخانه ۳۷°C منتقل و پس از ۲۴ ساعت چاهک‌ها از نظر رشد مورد بررسی قرار گرفتند. حداقل غلظت اسانس که در آن کدورت حاصل از رشد دیده نمی‌شد به‌عنوان MIC تعیین گردید. از چاهک‌های فاقد کدورت، شمارش کلنی انجام شد و حداقل غلظتی که جمعیت باکتری را ۹۹/۹٪ نسبت به زمان صفر کاهش داده بود به‌عنوان MBC ثبت گردید (CLSI, 2012).

**اثر اسانس‌ها بر عوامل بیماری‌زایی سودوموناس آئروجینوزا**

در این مطالعه اثر اسانس‌های مرزه بر حرکت، تشکیل بیوفیلم، تولید آلژینات، تولید الاستاز و تولید آلکالین پروتئاز سودوموناس آئروجینوزا بررسی شد. برای آزمایش آلژینات از سویه 8821M سودوموناس آئروجینوزا و برای انجام سایر آزمایش‌ها از سویه PAO1 سودوموناس آئروجینوزا استفاده گردید.

**اثر اسانس‌ها بر حرکت**

به‌منظور بررسی اثر اسانس‌ها بر حرکت، از محیط مولر هینتون دارای ۰/۳٪ آگار استفاده شد. این محیط به‌دلیل پایین بودن درصد آگار اجازه حرکت را به باکتری می‌دهد. در ابتدا پلیت‌هایی حاوی محیط MHA (۰/۳٪) دارای غلظت‌های $\frac{1}{2}$ و $\frac{1}{4}$ MIC اسانس تهیه شد. از کشت ۲۴ ساعته باکتری، سوسپانسیونی برابر نیم مک‌فارلند تهیه شد و به‌صورت سوزنی در مرکز پلیت‌ها تلقیح گردید. از محیط فاقد اسانس به‌عنوان شاهد مثبت استفاده شد. در ادامه محیط‌های تلقیح شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C گرمخانه‌گذاری شدند. پس از این مدت، مقدار حرکت باکتری در محیط کشت، از طریق اندازه‌گیری کدورت حلقوی هاله اطراف محل نقطه تلقیح سنجیده شد (Fonseca *et al*., 2004). آزمایش به‌صورت ۳ بار تکرار انجام شد.

**اثر اسانس‌ها بر تشکیل بیوفیلم**

برای بررسی اثر اسانس‌ها بر تشکیل بیوفیلم از روش میکروتیترپلیت استفاده شد (Zmantar *et al*., 2010). ابتدا باکتری در محیط MHB به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد. این کشت به نسبت ۱:۱۰۰ با محیط MHB حاوی غلظت $\frac{1}{2}$ MIC اسانس رقیق شد و سوسپانسیونی برابر نیم مک‌فارلند بدست آمد ($10^8$ cfu/ml). از این سوسپانسیون مقدار ۲۰۰ 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 به‌مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۷°C قرار گرفت. در ادامه، محیط درون چاهک‌ها تخلیه و ۳ مرتبه با بافر فسفات سالین (PBS) شسته شد. بعد از خشک شدن چاهک‌ها، ابتدا بیوفیلم توسط اتانول ۹۵٪ فیکس و بعد با افزودن ۲۰۰ µl رنگ کریستال ویوله ۱٪ به‌مدت ۵ دقیقه رنگ‌آمیزی شد. سپس به‌منظور حذف رنگ اضافی، چاهک‌ها توسط آب جاری شسته شد. پس از خشک شدن چاهک‌ها با افزودن ۱۵۰ µl اسید استیک ۳۳٪، رنگ کریستال ویوله آزاد و به‌صورت محلول درآمد. جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۴۹۰ nm توسط دستگاه Microplate Reader (ELx808, BioTek, USA) قرائت گردید. آزمایش ۳ بار تکرار شد.

**تأثیر اسانس‌ها بر تولید آلژینات**

برای بررسی اسانس‌ها بر تولید آلژینات از روش Knutson و Jeanes (۱۹۶۸) استفاده شد. به‌طور مختصر، از کشت ۲۴ ساعته باکتری سوسپانسیونی برابر نیم مک‌فارلند تهیه شد. در یک ارلن، ۴ میلی‌لیتر محیط حاوی غلظت $\frac{1}{2}$ MIC اسانس ریخته و بعد مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی به آن اضافه شد. از ارلن فاقد اسانس به‌عنوان شاهد مثبت و از ارلن فاقد باکتری به‌عنوان شاهد منفی استفاده شد. ارلن‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در شیکر انکوباتور ۳۷°C قرار گرفتند. به‌منظور اندازه‌گیری آلژینات تولید شده، مقدار

۷۰ میکرولیتر از کشت باکتری به ۶۰۰ میکرولیتر محلول بوراتاسیدسولفوریک در حمام آب یخ اضافه و ۴ ثانیه ورتکس گردید. سپس ۲۰ میکرولیتر محلول کاربازول ۰/۲٪ به آن اضافه شد و در دمای ۵۵°C قرار گرفت. پس از گذشت ۳۰ دقیقه، OD در طول موج ۵۴۰ nm اندازه‌گیری شد. OD بالاتر نشان‌دهنده تولید بالاتر آلژینات بود. آزمایش ۳ بار تکرار شد.

### تأثیر اسانس‌ها بر تولید الاستاز

برای بررسی فعالیت الاستازی از روشی که قبلاً توسط Ohman و همکاران (۱۹۸۰) شرح داده شده بود، استفاده شد. به این منظور چند کلنی از باکتری در محیط PTSB (۵٪ پپتون + ۰/۲۵٪ تریپتیک سوی آگار) تلقیح شد و تا زمان رسیدن به مرحله لگاریتمی ($OD_{600}$= ۰/۸) انکوبه گردید. این کشت با محیط PTSB حاوی غلظت $\frac{1}{2}$ MIC اسانس رقیق شد و سوسپانسیونی برابر نیم مک‌فارلند بدست آمد ($۱۰^{۸}$ cfu/ml). از این سوسپانسیون، ۵ میلی‌لیتر به یک ارلن منتقل شد. از محیط فاقد اسانس به‌عنوان شاهد مثبت و از محیط فاقد باکتری به‌عنوان شاهد منفی استفاده شد. ارلن‌ها به مدت ۱۶ ساعت در ۳۷°C گرمخانه‌گذاری شدند. سپس محتویات ارلن‌ها سانتریفیوژ و سوپرناتانت از فیلتر ۰/۴۵ µm عبور داده شد. در ادامه در یک لوله درپیچ‌دار، ۱۰ میلی‌گرم الاستین کنگورد و ۲ میلی‌لیتر ریکشن بافر (0.1 M Tris-maleate و 1 mM $CaCl_2$) با ۱ میلی‌لیتر سوپرناتانت مخلوط شد. لوله‌ها به‌مدت ۲ ساعت به‌صورت افقی در انکوباتور شیکردار قرار گرفتند (۳۷°C، ۱۸۰ rpm). پس از آن، ۲ میلی‌لیتر بافر سدیم فسفات (pH 6) به لوله‌ها اضافه گردید و بلافاصله لوله‌ها در حمام آب یخ قرار گرفت. در نهایت محتویات لوله‌ها فیلتر و OD آنها در طول موج ۴۹۰ nm قرائت گردید. آزمایش به‌صورت ۳ بار تکرار انجام شد.

### تأثیر اسانس‌ها بر تولید آلکالین پروتئاز

به‌منظور سنجش اثر اسانس‌ها بر تولید آلکالین پروتئاز، ابتدا پلیت‌هایی حاوی محیط Skim Milk Agar دارای غلظت $\frac{1}{2}$ MIC اسانس تهیه شد. از یک کشت ۲۴ ساعته باکتری سوسپانسیونی برابر نیم مک‌فارلند تهیه و آن مقدار ۱۰ میکرولیتر در مرکز پلیت تلقیح شد. از محیط فاقد اسانس به‌عنوان شاهد مثبت استفاده شد. در ادامه پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C گرمخانه‌گذاری شدند. در نهایت فعالیت پروتئولیتیکی با اندازه‌گیری قطر هاله شفاف اطراف محل رشد باکتری بررسی شد. این آزمایش به‌صورت ۳ بار تکرار انجام شد (Kazanas, 1968).

### تجزیه‌وتحلیل آماری

هر یک از آزمایش‌ها حداقل ۳ بار تکرار شد. نتایج بدست‌آمده در مقایسه با نمونه شاهد با آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و آزمون مقایسه‌ای LSD مورد بررسی قرار گرفتند. معنی‌دار بودن تفاوت‌ها با مقدار $P$ کمتر از ۰/۰۵ ارزیابی شد.

## نتایج

### شناسایی ترکیب‌های اسانس‌ها

ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس‌های ۴ گونه مرزه در جدول ۱ نشان داده شده‌است. کارواکرول، پارا-سیمن و گاما-ترپینن ترکیب‌های عمده موجود در اسانس‌های مرزه رشینگری، خوزستانی و بختیاری بودند. کارواکرول بیش از ۸۰٪ از ترکیب‌های اسانس‌های مرزه رشینگری و خوزستانی را تشکیل می‌داد. مقدار این ترکیب برای مرزه بختیاری ۵۵/۵٪ بود. ترکیب‌های عمده اسانس مرزه موتیکا به‌ترتیب تیمول، گاما-ترپینن، پارا-سیمن و کارواکرول بودند.

جدول ۱- ترکیب‌های شناسایی شده در اسانس ۴ گونه مرزه مورد مطالعه

| ردیف | نام ترکیب | شاخص بازداری | اسانس مرزه | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | رشینگری | خوزستانی | بختیاری | موتیکا |
| ۱ | α-thujene | ۹۲۶ | ۰/۱ | – | ۰/۳ | ۰/۸ |
| ۲ | α-pinene | ۹۳۷ | ۰/۳ | – | ۰/۶ | ۰/۴ |
| ۳ | camphene | ۹۵۲ | – | – | ۰/۲ | – |
| ۴ | β-pinene | ۹۷۷ | ۰/۴ | – | – | ۱/۱ |
| ۵ | myrcene | ۹۸۹ | ۱/۰ | ۱/۰ | ۱/۳ | ۰/۷ |
| ۶ | α-phellandrene | ۱۰۰۳ | ۰/۲ | ۰/۱ | – | – |
| ۷ | α-terpinene | ۱۰۱۳ | ۰/۵ | ۰/۲ | ۱/۲ | ۲ |
| ۸ | ρ-cymene | ۱۰۲۱ | ۴/۲ | ۳/۸ | ۱۷/۶ | ۱۶/۹ |
| ۹ | 1,8-cineole | ۱۰۳۰ | ۰/۳ | ۰/۶ | – | – |
| ۱۰ | γ-terpinene | ۱۰۵۸ | ۱/۶ | ۱/۴ | ۹/۶ | ۱۷/۶ |
| ۱۱ | ρ-mentha,3,8-diene | ۱۰۷۱ | ۰/۱ | ۰/۲ | – | – |
| ۱۲ | terpinolene | ۱۰۸۳ | ۱/۰ | ۰/۳ | ۱/۰ | ۰/۱ |
| ۱۳ | n-nonanal | ۱۱۰۰ | ۱/۰ | ۰/۵ | ۲/۰ | – |
| ۱۴ | borneol | ۱۱۶۵ | ۰/۵ | ۰/۲ | ۱/۳ | ۰/۲ |
| ۱۵ | methyl ether thymol | ۱۲۳۳ | ۱/۰ | ۱/۱ | – | – |
| ۱۶ | thymol | ۱۲۹۰ | ۰/۶ | ۰/۹ | ۳/۰ | ۴۶ |
| ۱۷ | carvacrol | ۱۲۹۵ | ۸۳ | ۸۷/۵ | ۵۵/۵ | ۷/۶ |
| ۱۸ | E-caryophyllene | ۱۴۲۴ | – | – | ۲/۱ | ۲/۵ |
| ۱۹ | germacrene D | ۱۴۸۳ | ۱/۴ | – | – | – |
| ۲۰ | spathulenol | ۱۵۷۵ | – | – | ۰/۵ | ۰/۳ |
| | مجموع | | ۹۷/۲ | ۹۷/۸ | ۹۶/۲ | ۹۶/۲ |

**فعالیت ضدمیکروبی اسانس‌ها**

این مطالعه اثر ضد میکروبی اسانس ۴ گونه مرزه علیه دو سویه استاندارد سودوموناس آئروجینوزا با دو روش مورد بررسی قرار گرفت. برای تعیین هاله عدم رشد از روش دیسک دیفیوژن و برای تعیین MIC از روش میکرودایلوشن براث استفاده شد. تمامی اسانس‌ها دارای فعالیت ضدمیکروبی علیه هر دو سویه مورد مطالعه بودند. نتایج حاصل در جدول ۲ نشان داده شده‌است.

**جدول ۲- فعالیت ضدمیکروبی اسانس‌های مرزه علیه سویه‌های سودوموناس آئروجینوزا**

| باکتری | اسانس مرزه | قطر هاله عدم رشد (mm) | MIC (µg/ml) | MBC (µg/ml) |
|---|---|---|---|---|
| سودوموناس آئروجینوزا PAO1 | بختیاری | ۹/۳ ±۰/۶ | ۴۰۹۶ | ۴۰۹۶ |
| | خوزستانی | ۱۲/۳ ± ۱/۲ | ۲۰۴۸ | ۲۰۴۸ |
| | موتیکا | ۸/۸ ± ۰/۸ | ۴۰۹۶ | ۴۰۹۶ |
| | رشینگری | ۱۰/۲ ± ۱/۵ | ۲۰۴۸ | ۲۰۴۸ |
| سودوموناس آئروجینوزا 8821M | بختیاری | ۱۱/۵ ± ۱/۴ | ۲۰۴۸ | ۸۱۹۲ |
| | خوزستانی | ۱۳/۲ ± ۱/۴ | ۲۰۴۸ | ۴۰۹۶ |
| | موتیکا | ۱۱ ± ۱/۹ | ۲۰۴۸ | ۸۱۹۲ |
| | رشینگری | ۱۳/۱ ± ۱/۳ | ۲۰۴۸ | ۴۰۹۶ |

### تأثیر اسانس‌ها بر حرکت

با توجه به نتایج بدست‌آمده، تمامی اسانس‌ها در غلظت $\frac{1}{2}$ MIC موجب مهار کامل حرکت شدند. همچنین غلظت $\frac{1}{4}$ MIC اسانس‌ها نیز موجب کاهش معنی‌دار حرکت باکتری شد ($P\leq0.001$). در این آزمایش، اسانس مرزه خوزستانی بیشترین اثر مهارکنندگی را داشت (جدول ۳).

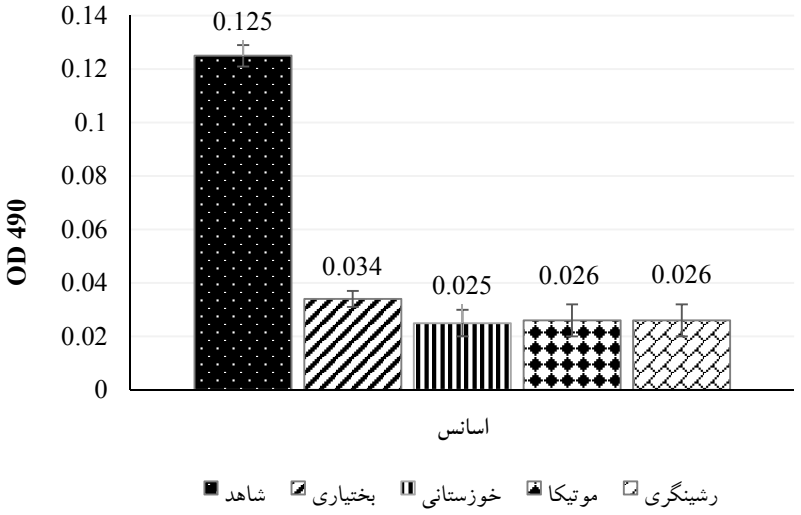
**جدول ۳- تأثیر غلظت $\frac{1}{4}$ MI اسانس‌های ۴ گونه مرزه بر حرکت سویه سودوموناس آئروجینوزا PAO1**

| | شاهد | اسانس مرزه | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | بختیاری | خوزستانی | موتیکا | رشینگری |
| قطر هاله حرکت (mm) | ۷/۸۳ ± ۰/۷۶ | ۶/۶۷ ± ۰/۵۸ | ۵/۱۷ ± ۰/۲۹ | ۶/۱۷ ± ۰/۲۹ | ۵/۵ ± ۰/۵ |
| درصد کاهش | --- | ٪ ۱۴/۹ | ٪ ۳۴ | ٪ ۲۱/۳ | ٪ ۲۹/۸ |
| مقدار *P* | --- | ۰/۰۲* | <۰/۰۰۱* | ۰/۰۰۳* | <۰/۰۰۱* |

*: دارای اختلاف معنی‌دار

### تأثیر اسانس‌ها بر تشکیل بیوفیلم

نتایج نشان داد هر ۴ اسانس مرزه دارای فعالیت ضد بیوفیلمی علیه سودوموناس آئروجینوزا PAO1 بودند. همه اسانس‌ها در غلظت $\frac{1}{2}$ MIC موجب کاهش معنی‌دار تشکیل بیوفیلم شدند ($P\leq0.001$). نتایج حاصل در شکل ۱ نمایش داده شده‌اند. همچنین درصد کاهش تشکیل بیوفیلم در جدول ۴ ذکر شده است.




**شکل ۱- مقایسه تأثیر غلظت $\frac{1}{2}$ MIC اسانس‌های مرزه بر تشکیل بیوفیلم سویه سودوموناس آئروجینوزا PAO1**

**جدول ۴- میزان کاهش تشکیل بیوفیلم سویه سودوموناس آئروجینوزا PAO1 در حضور غلظت $\frac{1}{2}$ MIC اسانس‌های مرزه**

| | اسانس مرزه | | | |
|---|---|---|---|---|
| | بختیاری | خوزستانی | موتیکا | رشینگری |
| درصد کاهش نسبت به شاهد | ٪۷۲/۸ | ٪۸۰/۳ | ٪۷۹/۲ | ٪۷۹/۲ |
| مقدار *P* | <۰/۰۰۱* | <۰/۰۰۱* | <۰/۰۰۱* | <۰/۰۰۱* |

*: دارای اختلاف معنی‌دار

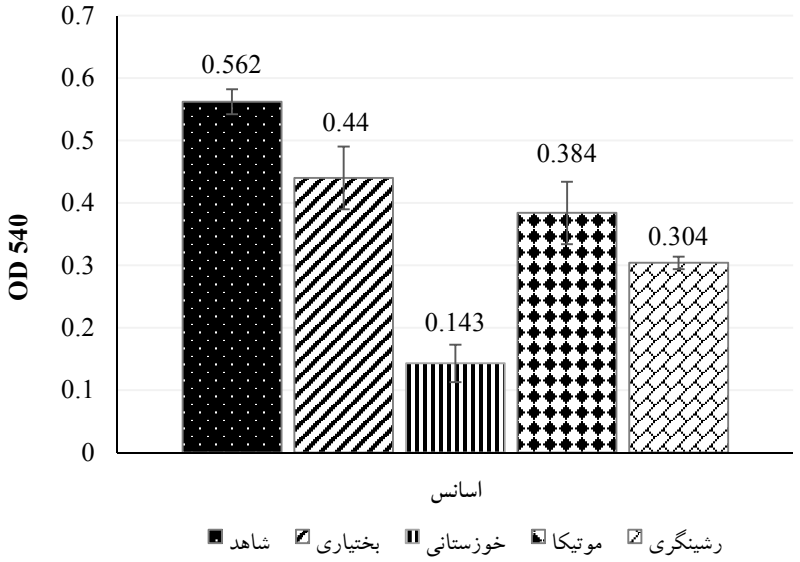
## تأثیر اسانس‌ها بر تولید آلژینات

نتایج نشان دادند که تمامی اسانس‌ها در غلظت $\frac{1}{2}$ MIC موجب کاهش معنی‌دار تولید آلژینات در سویه سودوموناس آئروجینوزا 8821M می‌شوند ($P \leq 0.05$). در بین اسانس‌ها، مرزه خوزستانی اثر کاهشی بیشتری داشت و توانست به میزان بیشتری تولید آلژینات را کاهش دهد. نتایج حاصل در شکل ۲ نمایش داده شده‌اند. همچنین درصد کاهش تولید آلژینات در جدول ۵ نشان داده شده است.

**جدول ۵- میزان کاهش تولید آلژینات سویه سودوموناس آئروجینوزا 8821M در حضور غلظت $\frac{1}{2}$ MIC اسانس‌های مرزه**

| | اسانس مرزه | | | |
|---|---|---|---|---|
| | بختیاری | خوزستانی | موتیکا | رشینگری |
| درصد کاهش نسبت به شاهد | ٪۲۱/۶ | ٪۷۴/۶ | ٪۳۱/۷ | ٪۴۵/۹ |
| مقدار P | ۰/۰۱۳* | <۰/۰۰۱* | ۰/۰۰۲* | <۰/۰۰۱* |

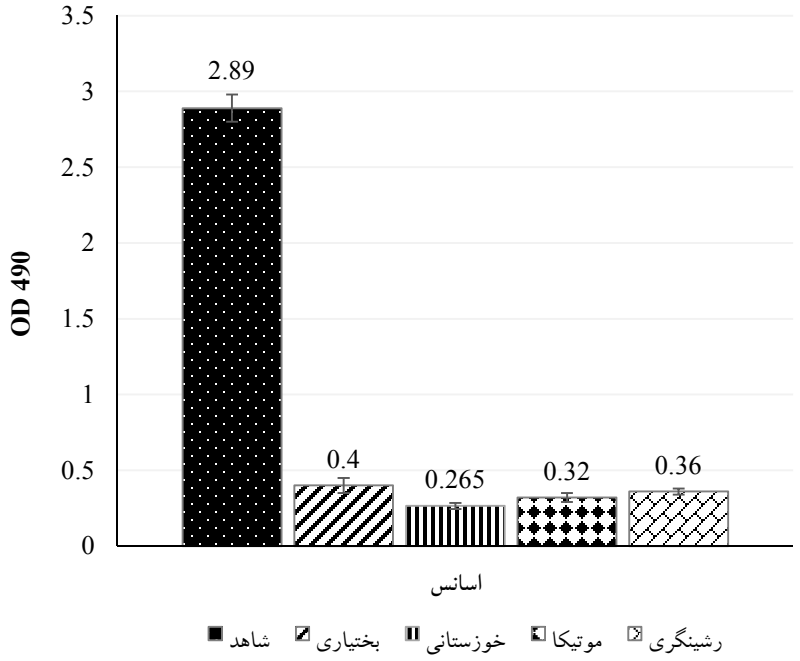
*: دارای اختلاف معنی‌دار




**شکل ۲- مقایسه تأثیر غلظت $\frac{1}{2}$ MIC اسانس‌های مرزه بر تولید آلژینات سویه سودوموناس آئروجینوزا 8821M**

**تأثیر اسانس‌ها بر تولید الاستاز**

در این مطالعه اثر اسانس ۴ گونه مرزه بر تولید الاستاز سویه سودوموناس آئروجینوزا PAO1 بررسی گردید. غلظت $\frac{1}{2}$ MIC هر ۴ اسانس موجب کاهش معنی‌دار تولید الاستاز شد ($P\leq0.001$). نتایج حاصل از این آزمایش در شکل ۳ نشان داده شده است. همچنین درصد کاهش تولید الاستاز در جدول ۶ ذکر شده است.




**شکل ۳- مقایسه تأثیر غلظت $\frac{1}{2}$ MIC اسانس‌های مرزه بر تولید الاستاز سویه سودوموناس آئروجینوزا PAO1**

**جدول ۶- میزان کاهش تولید الاستاز سویه سودوموناس آئروجینوزا PAO1 در حضور غلظت $\frac{1}{2}$ MIC اسانس‌های مرزه**

| | اسانس مرزه | | | |
|---|---|---|---|---|
| | بختیاری | خوزستانی | موتیکا | رشینگری |
| درصد کاهش نسبت به شاهد | ٪۸۶/۲ | ٪۹۰/۸۵ | ٪۸۸/۹۶ | ٪۸۷/۵ |
| مقدار *P* | <۰/۰۰۱* | <۰/۰۰۱* | <۰/۰۰۱* | <۰/۰۰۱* |

*: دارای اختلاف معنی‌دار

## تأثیر اسانس‌ها بر تولید آلکالین پروتئاز

در این مطالعه اثر ۴ گونه اسانس مرزه بر تولید آلکالین‌پروتئاز سویه سودوموناس آئروجینوزا PAO1 بررسی گردید. غلظت $\frac{1}{2}$ MIC تمامی اسانس‌ها موجب کاهش معنی‌دار تولید آلکالین‌پروتئاز شد ($P \leq 0.001$). نتایج حاصل از این آزمایش در جدول ۷ آورده شده است.

**جدول ۷- تأثیر غلظت $\frac{1}{2}$ MIC اسانس‌های مرزه بر تولید آلکالین‌پروتئاز سودوموناس آئروجینوزا PAO1**

| نمونه | شاهد | اسانس مرزه | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | بختیاری | خوزستانی | موتیکا | رشینگری |
| قطر هاله (mm) | ۲۱/۳۳± ۰/۵۸ | ۱۵/۳۳ ± ۰/۵۸ | ۱۲/۵ ± ۰/۸۷ | ۱۲/۶۷ ± ۱/۱۵ | ۱۴/۰۰ ± ۱/۰۰ |
| درصد کاهش | --- | ٪ ۲۸/۱۳ | ٪ ۴۱/۴ | ٪ ۴۰/۶ | ٪۳۴/۴ |
| مقدار *P* | --- | <۰/۰۰۱* | <۰/۰۰۱* | <۰/۰۰۱* | <۰/۰۰۱* |

*: دارای اختلاف معنی‌دار

## بحث

سودوموناس آئروجینوزا یکی از شایع‌ترین باکتری‌های گرم منفی فرصت‌طلب در عفونت‌های بیمارستانی است که مقاومت قابل توجهی در برابر مواد ضدمیکروبی دارد. با توجه به افزایش روزافزون مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی، گرایش به جایگزین کردن آنها با فرآورده‌های طبیعی افزایش یافته است. اسانس‌های گیاهی با دارا بودن ترکیب‌های ضدمیکروبی مختلف می‌توانند به‌عنوان راه حلی برای پیشگیری و مهار عفونت‌های میکروبی باشند (Tajkarimi *et al*., 2010). برخی مطالعات نشان داده‌اند که اسانس مرزه دارای فعالیت ضدمیکروبی قابل توجهی در برابر باکتری‌های گرم مثبت و منفی است (Tepe & Cilkiz, 2016). Sefidkon و همکاران (۲۰۰۷) در مطالعه‌ای اثرهای ضدمیکروبی اسانس دو گونه مرزه بختیاری و خوزستانی را در دو مرحله برداشت قبل و بعد از گلدهی در برابر چند باکتری پاتوژن گرم مثبت و گرم منفی ازجمله سودوموناس آئروجینوزا با روش دیسک دیفیوژن مورد بررسی قرار دادند. هر دو اسانس در هر دو مرحله برداشت دارای اثرهای ضدمیکروبی علیه همه باکتری‌ها بودند. در مرحله قبل از گلدهی هر دو اسانس اثرهای ضدمیکروبی مشابهی داشتند اما در مرحله بعد از گلدهی مرزه خوزستانی عملکرد مؤثرتری داشت و توانست قطرهای هاله عدم رشد بزرگتری ایجاد کند. ما در این مطالعه اثرهای ضدمیکروبی اسانس چهار گونه گیاه مرزه را بر سودوموناس آئروجینوزا مورد بررسی قرار دادیم. در این آزمایش دیسک دیفیوژن، قطر هاله عدم رشد ایجاد شده توسط

اسانس‌های مرزه خوزستانی و رشینگری در هر دو سویه سودوموناس آئروجینوزا نسبت به اسانس‌های مرزه بختیاری و موتیکا بیشتر بود که از این جهت با مطالعه Sefidkon و همکاران (۲۰۰۷) مطابقت دارد. همچنین نتایج حاصل از آزمایش میکرودایلوشن براث نیز با نتایج دیسک دیفیوژن مطابقت دارد. نتایج نشان دادند هر ۴ اسانس مرزه دارای اثر مهارکنندگی رشد و کشندگی در هر دو سویه سودوموناس آئروجینوزا هستند. مقدار MIC و MBC در سویه سودوموناس آئروجینوزا PAO1 برای اسانس‌های مرزه خوزستانی و رشینگری برابر نصف مقدار MIC و MBC اسانس‌های مرزه بختیاری و موتیکا بود. در سویه سودوموناس آئروجینوزا 8821M مقدار MIC همه اسانس‌ها برابر بود اما MBC اسانس‌های مرزه خوزستانی و رشینگری نصف دو اسانس مرزه دیگر بود. در مجموع در هر دو سویه، اسانس‌های مرزه خوزستانی و رشینگری اثربخشی بیشتری داشتند و در غلظت‌های کمتری موجب مهار رشد و یا کشتن سویه‌ها شدند. Seghatoleslami و همکاران (۲۰۰۹) در مطالعه‌ای توانایی اسانس مرزه خوزستانی را در مهار رشد چند باکتری هوازی، میکروآئروفیل و بی‌هوازی با روش آگار دایلوشن مورد ارزیابی قرار دادند. این اسانس موجب مهار رشد تمامی باکتری‌ها شد. بیشترین مقدار MIC برابر با ۱۲۵۰ µg/ml برای سودوموناس آئروجینوزا بود. مقدار MIC برای سایر باکتری‌ها کوچکتر مساوی با ۳۱۰ µg/ml بود (Seghatoleslami *et al*., 2009). در این مطالعه MIC اسانس مرزه خوزستانی برای هر دو سویه، ۲۰۴۸ µg/ml بدست آمد که به‌مقدار بدست آمده در مطالعه Seghatoleslami و همکاران (۲۰۰۹) بسیار نزدیک است. این تفاوت جزئی نیز می‌تواند به دلیل تفاوت در ترکیب‌های اسانس‌ها و یا تفاوت روش آگار دایلوشن و میکرودایلوشن براث باشد.

عملکرد عوامل ضدمیکروبی برای درمان عفونت‌ها، فقط به اثرهای باکتریسیدال و باکتریواستاتیک آنها وابسته نیست، بلکه به توانایی آنها در مهار تولید عوامل بیماری‌زایی باکتری‌ها نیز بستگی دارد (Rohinishree & Negi, 2016). نتایج این مطالعه نشان داد که اسانس‌های چهار گونه مرزه مورد بررسی نه‌تنها سبب مهار رشد و یا کشتن سودوموناس آئروجینوزا می‌شود، بلکه موجب کاهش و مهار عوامل بیماری‌زایی این باکتری شامل حرکت، تشکیل بیوفیلم و تولید آلژینات، الاستاز و آلکالین‌پروتئاز نیز می‌گردد. نتایج برخی از تحقیقات دیگر نیز تأییدکننده این مطلب است، اما روش کار میکروارگانیسم یا عوامل بیماری‌زایی آن متفاوت می‌باشند. تنها مطالعه انجام شده در زمینه تأثیر اسانس مرزه بر عوامل بیماری‌زایی سودوموناس آئروجینوزا مطالعه Islamieh و همکاران (۲۰۱۹) است. آنان با استفاده از روش Real-time PCR نشان دادند که اسانس مرزه خوزستانی موجب کاهش معنی‌دار بیان ژن‌های کدکننده الاستاز در سودوموناس آئروجینوزا می‌شود (Islamieh *et al*., 2019). در این مطالعه نیز اسانس گونه‌های مرزه موجب کاهش معنی‌دار تولید الاستاز شد. با وجود تفاوت در روش سنجش، نتایج این مطالعه با مطالعه Islamieh و همکاران (۲۰۱۹) مطابقت دارد. در مطالعه دیگری Vitanza و همکاران (۲۰۱۹) اثر اسانس گونه *Satureja montana* L. را بر تشکیل بیوفیلم باکتری‌های *S. aureus*، *L. monocytogenes* و *E. coli* بررسی کردند. نتایج نشان‌دهنده کاهش تشکیل بیوفیلم در همه باکتری‌ها بود (Vitanza *et al*., 2019). در این مطالعه نیز اسانس‌های مرزه موجب کاهش تشکیل بیوفیلم در سودوموناس آئروجینوزا شدند.

همچنین در این مطالعه، اسانس هر ۴ گونه مرزه موجب کاهش معنی‌دار تولید عوامل بیماری‌زایی سودوموناس آئروجینوزا شد، با این حال تفاوت‌هایی در میزان تأثیر اسانس‌ها وجود داشت. همانطور که گفته شد اسانس‌های مرزه خوزستانی و رشینگری دارای فعالیت ضدمیکروبی بیشتری بودند و مقدار MIC آنها نصف دو اسانس دیگر بود. همچنین در مجموع اسانس مرزه خوزستانی در مورد اغلب عوامل بیماری‌زایی، بیشترین اثر کاهشی را داشت. این تفاوت‌ها می‌تواند به‌دلیل ترکیب‌های متفاوت اسانس‌ها باشد. طبق بررسی‌ها و تحقیقات انجام شده، خواص ضدباکتریایی و ضدقارچی

برای برخی از اجزای سازنده اسانس گیاه مرزه گزارش شده است و تحقیقات زیادی انجام شده تا مشخص گردد که کدامیک از ترکیب‌های سازنده اسانس، مسئول خواص ضدمیکروبی آنها هستند. عمده فعالیت ضدمیکروبی اسانس‌های گیاهان خانواده Lamiaceae به گروهی از ترپنوئیدهای کوچک و ترکیب‌های فنولیک نسبت داده می‌شود. البته هرچه درصد ترکیب‌های فنولی بالاتر باشد خاصیت ضدمیکروبی آن گیاه نیز بیشتر است (Dorman & Deans, 2000). تیمول و کارواکرول از عمده ترکیب‌های فنولیک در اسانس‌های گیاه مرزه هستند که خواص ضدمیکروبی قابل توجهی برای آنها گزارش شده است. پارا-سیمن یکی دیگر از ترکیب‌های عمده در اسانس گونه‌های مرزه است. این ماده یک ترپنوئید است که به تنهایی اثر ضدمیکروبی چندانی ندارد اما هنگامی که با کارواکرول ترکیب شود دارای اثر هم‌افزایی بوده و موجب افزایش فعالیت ضدمیکروبی آن می‌شود (Burt, 2004). در این مطالعه میزان ترکیب‌های فنولی اسانس‌های مرزه خوزستانی، رشینگری، بختیاری و موتیکا به‌ترتیب برابر با ۸۸/۴٪، ۸۳/۶٪، ۵۹/۲٪ و ۵۳/۵٪ بود. در تمامی اسانس‌ها بجز مرزه موتیکا کارواکرول ترکیب فنولی غالب بود اما در اسانس مرزه موتیکا تیمول ترکیب غالب بود. در کل اسانس مرزه خوزستانی دارای بیشترین درصد از ترکیب‌های فنولی بوده است که این امر می‌تواند توجیه کننده فعالیت ضدمیکروبی بیشتر آن باشد.

به‌عنوان نتیجه‌گیری با توجه به نتایج یادشده می‌توان بیان کرد که هر چهار اسانس گونه‌های مرزه که در این تحقیق مورد ارزیابی قرار گرفتند دارای فعالیت ضدمیکروبی بوده و توانایی کاهش تولید عوامل بیماری‌زایی سودوموناس آئروجینوزا را داشته‌اند. این امر می‌تواند باعث کاهش بیماری‌زایی این باکتری در حضور این اسانس‌ها شود. ازاین‌رو مطالعات بیشتر در زمینه اثر ترکیب‌های این گیاهان پیشنهاد می‌گردد.

## سپاسگزاری

از بخش تحقیقات گیاهان دارویی مؤسسه جنگلها و مراتع کشور برای تهیه، تأیید و آنالیز اسانس‌ها تشکر می‌شود. همچنین از دست‌اندرکاران مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی مولکولی دانشگاه شاهد نیز بدلیل تأمین تجهیزات و امکانات، قدردانی می‌گردد.

## منابع مورد استفاده

- Adams, R.P., 1995. Identification of Essential oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. 1st Edn., Allured Publishing, Illinois, USA., 469p.
- 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: 223-225.
- Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. International Journal of Food Microbiology, 94: 223-253.
- Carroll, K.C., Butel, J.S. and Morse, S.A., 2015. Jawetz Melnick & Adelbergs Medical Microbiology. McGraw-Hill Education, 864p.
- CLSI., 2015. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard. M02-A12.
- CLSI., 2012. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard. M7-A9.
- Cotton, L.A., Graham, R.J. and Lee, R.J., 2009. The role of alginate in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm structural resistance to gentamicin and ciprofloxacin. Journal of Experimental Microbiology and Immunology, 13: 58-62.
- Dorman, H.J. and Deans, S.G., 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. Journal of Applied Microbiology, 88: 308-316.
- Drake, D. and Montie, T.C., 1988. Flagella, motility and invasive virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of General Microbiology, 134: 43-52.
- Fonseca, A.P., Extremina, C., Fonseca, A.F. and Sousa, J.C., 2004. Effect of subinhibitory concentration of piperacillin/tazobactam on *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Medical Microbiology, 53: 903-910.
- Ghotaslou, R. and Salahi Eshlaqghi, B., 2013. Biofilm of pseudomonas aeruginosa and new preventive measures and anti-biofilm agents. Journal of

Journal of Food Science and Technology, 53: 1092-1100.
- Saleem, A.J. 2012. Relationship Study between the Alkaline Protease Production and the Growth Phases of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Patients. Advances in Microbiology, 2: 354-357.
- 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., Sadeghzadeh, L., Teimouri, M., Asgari, F. and Ahmadi, S., 2007. Antimicrobial effects of the essential oils of two *Satureja* species (*S. Khuzistanica* Jamzad and *S. bachtiarica* Bunge) in two harvesting time. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research, 23(2): 174-182.
- Seghatoleslami, S., Samadi, N., Salehnia, A. and Azimi, S., 2009. Antibacterial activity of endemic *Satureja Khuzistanica* Jamzad essential oil against oral pathogens. Iranian Endodontic Journal, 4: 5-9.
- Shibamoto, T., 1987. Retention Indices in Essential Oil Analysis: 259-274. In: Sandra, P. and Bicchi, C., (Eds.). Capillary Gas Chromatography in Essential Oil Analysis. Huethig-Verlag, New York, USA., 435p.
- Tajkarimi, M.M., Ibrahim, S.A. and Cliver, D.O., 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. Food Control, 21(9): 1199-1218.
- Tepe, B. and Cilkiz, M., 2016. A pharmacological and phytochemical overview on *Satureja*. Pharmaceutical Biology, 54: 375-412.
-Tille, P., 2013. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology, Elsevier Health Sciences, 1056p.
- Vitanza, L., Maccelli, A., Marazzato, M., Scazzocchio, F., Comanducci, A., Fornarini, S., Crestoni, M. E., Filippi, A., Fraschetti, C. and Rinaldi, F., 2019. *Satureja montana* L. essential oil and its antimicrobial activity alone or in combination with gentamicin. Microbial Pathogenesis, 126: 323-331.
- Yazdanpanah, L., Aminaii, M.M., Panahi, B., Emamifar, M. and Mahdian, M., 2011. Effect of antifungal essential oil from *Satureja hortensis* on Alternaria citri. Plant Products Technology, 10: 83-90.
- 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. New Microbiologica, 33: 137-145.
Rafsanjan University of Medical Sciences, 12: 747-768.
- Hammer, K.A., Carson, C.F. and Riley, T.V., 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. Journal of Applied Microbiology, 86P: 985-990.
- Islamieh, D.I., Afshar, D. and Esmaeili, D., 2019. Effect of *Satureja khuzistanica* essential oil (SKEO) extract on expression of lasA and lasB genes in *Pseudomonas aeruginosa*. Iranian Journal of Microbiology, 11: 55-59.
- Kazanas, N., 1968. Proteolytic activity of microorganisms isolated from freshwater fish. Journal of Applied Microbiology, 16: 128-132.
- Knutson, C.A. and Jeanes, A., 1968. A new modification of the carbazole analysis: application to heteropolysaccharides. Analytical Biochemistry, 24: 470-481.
- Leid, J.G., Willson, C.J., Shirtliff, M.E., Hassett, D.J., Parsek, M.R. and Jeffers, A.K. 2005. The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN-gamma-mediated macrophage killing. Journal of Immunology, 175: 7512-7518.
- Mahon, C., Lehman, D. and Manuselis, G., 2015. Textbook of Diagnostic Microbiology. Elsevier Saunders, 1096p.
- Majd, A., Nejad Satart, T., Khavarinejad, R. and Dosti, B., 2009. Evaluation of quantitative and qualitataive constituents of essential oil of Khuzestan drug Savory (*Satureja.J khuzistanica*) during development of antimicrobial properties of the essential oils in vitro. Journal of Sciences Islamic Azad Univercity, 18: 51-60.
- Murray, P.R., Rosenthal, K.S. and Pfaller, M.A., 2015. Medical Microbiology. Elsevier, 848p.
- Ohman, D.E., Cryz, S.J. and Iglewski, B.H., 1980. Isolation and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* -PAO mutant that produces altered elastase. Journal of Bacteriology, 142: 836-842.
- Raj, A., Khess, N., Pujari, N., Bhattacharya, S., Das, A. and Rajan, S.S., 2012. Enhancement of protease production by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from dairy effluent sludge and determination of its fibrinolytic potential. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2: S1845-S1851.
- Rohinishree, Y.S. and Negi, P.S., 2016. Effect of licorice extract on cell viability, biofilm formation and exotoxin production by *Staphylococcus aureus*.

# The effect of savory (*Satureja* spp.) essential oils on *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors

**N. Saidi[1], H. Saderi[1], E. Taghian[1], F. Sefidkon[2], I. Rasooli[3], R. Mohammad Salehi[1] and P. Owlia[4*]**

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

Received: June 2019 Revised: November 2019 Accepted: February 2020

## Abstract

*Pseudomonas aeruginosa* is one of the most common opportunistic bacteria in nosocomial infections, which has a significant resistance to antimicrobials. Due to the restrictions in the use of antibiotics, the tendency to replace them with natural products has increased. In this study, the antimicrobial effect of four species of *Satureja* essential oils (*S. mutica*, *S. bachtiarica*, *S. rechingeri* and *S. khuzestanica*) on virulence factors of *P. aeruginosa* was evaluated. The minimum inhibitory concentration of *Satureja* essential oils was determined by microdilution broth method against standard strains of *P. aeruginosa* including PAO1 and 8821M. In the following, the effect of sub-minimum inhibitory concentrations (sub-MIC) of essential oils was investigated on virulence factors of this bacterium including motility, biofilm formation and alginate, elastase, and alkaline protease production of these two strains. All four *Satureja* essential oils had antimicrobial effects against the standard strains of *P. aeruginosa*, and also sub-MIC concentrations of the essential oils significantly reduced the virulence factors production of these strains. In this study, the suitable antagonistic effects of *Satureja* essential oils were observed against *P. aeruginosa* standard strains. By further study, these essential oils can be used as an antimicrobial compound against this bacterium.

**Keywords:** Essential oils, *Pseudomonas aeruginosa*, virulence factors, *Satureja*.