

ارزیابی ترکیبات شیمیایی و فعالیت ضد باکتریایی، ضد بیوفیلمی و آنتی‌اکسیدانی اسانس و عصاره‌ی ساتوریا خوزستانیکا

شیرین محمدی سیچانی^۱، مریم محمدی سیچانی^۲، لاله هویدا^۳

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: در سال‌های اخیر، مشکلات درمان عفونت ناشی از باکتری‌های بیماری‌زای مقاوم، توجه به مواد مؤثره گیاهی را به همراه داشته است. هدف از این مطالعه، بررسی اثرات ضد بیوفیلمی، ضد باکتریایی و آنتی‌اکسیدانی ساتوریا خوزستانیکا و تعیین ترکیبات شیمیایی آن بود.

روش‌ها: برگ گیاه ساتوریا خوزستانیکا، از منابع طبیعی استان اصفهان تهیه شد. اثر ضد باکتریایی، به روش انتشار چاهک و حداقل غلظت مهارکنندگی به روش میکرودايلوشن روی سوبه‌های استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا بررسی شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی، به روش اندازه‌گیری کاهش ظرفیت رادیکالی بررسی گردید. ترکیبات شیمیایی گیاه، به روش گاز کروماتوگرافی طیف‌سنجی جرمی تعیین گردید.

یافته‌ها: عصاره‌ی متانولی ساتوریا خوزستانیکا، در غلظت ۱۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، مانع از رشد استافیلوکوکوس اورئوس شد، اما روی رشد سودوموناس آئروژینوزا اثری نداشت. در همه‌ی موارد، رابطه‌ی مستقیمی بین قطر هاله‌ی عدم رشد و غلظت عصاره‌ها و اسانس گیاه وجود داشت. اسانس گیاه، در غلظت ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به میزان ۱۰۰ درصد، از تولید بیوفیلم هر دو باکتری مورد مطالعه، ممانعت کرد. همچنین اسانس گیاه، با ۸۶ درصد مهار DPPH، بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را داشت. میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با افزایش غلظت، به طور معنی‌داری افزایش نشان داد ($P < 0.001$). کارواکرول با ۳۲/۶۱ درصد، اصلی‌ترین ترکیب ساتوریا خوزستانیکا را تشکیل داد و پس از آن فراوانی سیمن، تربین و بیزابولن بیشتر از سایر ترکیبات بود.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که اسانس و عصاره‌ی ساتوریا خوزستانیکا، اثر ضد باکتریایی بر استافیلوکوکوس اورئوس و اثر ضد بیوفیلمی بر روی استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا دارند. این گیاه، حاوی ترکیباتی با فعالیت ضد میکروبی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی است.

واژگان کلیدی: ساتوریا؛ عوامل ضد باکتریایی؛ عصاره‌ی گیاهی؛ بیوفیلم؛ فعالیت آنتی‌اکسیدانی

ارجاع: محمدی سیچانی شیرین، محمدی سیچانی مریم، هویدا لاله. ارزیابی ترکیبات شیمیایی و فعالیت ضد باکتریایی، ضد بیوفیلمی و

آنتی‌اکسیدانی اسانس و عصاره‌ی ساتوریا خوزستانیکا. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۱؛ ۴۰ (۶۵۷): ۸-۱

مقدمه

استفاده‌ی نامناسب، نامنظم و غیر منطقی از آنتی‌بیوتیک‌ها، منجر به بروز مقاومت میکروارگانیسم‌ها در مقابل ترکیبات ضد میکروبی شده است. ایجاد مقاومت در میکروارگانیسم‌ها در ایجاد عفونت‌های حاد، موجب گردیده که استفاده از متابولیت‌های گیاهان برای بهره‌مندی از اثرات ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی آن‌ها مورد توجه قرار گیرد (۱). حذف عفونت‌های باکتریایی به ویژه عفونت‌های ناشی از سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس که طیف وسیعی

از عفونت‌ها را در محیط‌های بیمارستانی و خارج از بیمارستان ایجاد نموده و با انواع استراتژی‌های مقاومت ذاتی، تطبیقی و اکتسابی در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت نشان می‌دهد، بسیار اهمیت دارد. سوبه‌هایی از این باکتری‌ها، عفونت بیوفیلم ایجاد می‌کنند (۲، ۳). تولید بیوفیلم نه تنها باکتری‌ها را از دسترس سیستم دفاعی بدن میزبان در امان می‌دارد، بلکه باکتری‌های مستقر در بیوفیلم، مقاومت بالایی در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها از خود نشان می‌دهند و درمان عفونت را با مشکل مواجه می‌سازند (۴).

۱- کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، اصفهان، ایران

۲- استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، اصفهان، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: مریم محمدی سیچانی؛ استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، اصفهان، ایران

ایمی پنم با غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. محیط‌های کشت به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت. قطر هاله‌ی عدم رشد بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد. این آزمون برای هر ترکیب و هر باکتری، سه بار تکرار شدند (۱۰-۱۲).

حداقل غلظت مهارکنندگی **Minimum inhibitory concentration** (MIC) و حداقل غلظت کشندگی **Minimum bactericidal concentration** (MBC) عصاره‌ها و اسانس ساتوریا خوزستانیکا به روش میکروتیتر دابلوشن در میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ته گرد استریل و با غلظت‌های ۱/۵۶، ۳/۱۲، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ترکیبات گیاه انجام شد.

بررسی فعالیت ضد بیوفیلمی عصاره‌ها و اسانس: فعالیت ضد بیوفیلمی عصاره‌ها و اسانس ساتوریا خوزستانیکا به روش میکروتیترپلیت انجام شد. غلظت‌های تحت‌کشنده از عصاره‌ها (۱/۵۶ تا ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و اسانس (۰/۱۹۵ تا ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در محیط مولر هیتون برات، حاوی ۱ درصد گلوکز تهیه گردید. چاهک‌های میکروپلیت با ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف عصاره و ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری ($10^7 \times 1/5$) در هر میلی‌لیتر) تلقیح شد. در چاهک‌های ستون ۱۲ به عنوان کنترل مثبت، ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری و ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت مولر هیتون برات با ۱ درصد گلوکز اضافه گردید. در چاهک‌های ستون ۱۱ نیز فقط ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت اضافه شد. جذب نوری چاهک‌ها در دستگاه خواننده‌ی الیزا در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت گردید. میکروپلیت‌ها، ۷۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شدند. برای تثبیت ساختارهای بیوفیلمی ۱۵۰ میکرولیتر اتانول به مدت ۱۵ دقیقه و برای رنگ‌آمیزی بیوفیلم به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله‌ی ۲ درصد اضافه شد. پس از شستشوی رنگ، ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک گلاسیسیال ۳۳ درصد به هر چاهک اضافه و میکروپلیت، ۲۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه قرار گرفت. جذب نوری چاهک‌ها در دستگاه خواننده‌ی الیزا در طول موج ۵۹۵ نانومتر به دست آمد. میزان درصد کاهش بیوفیلم از طریق رابطه‌ی زیر محاسبه گردید.

$$\text{درصد کاهش بیوفیلم} = \frac{(C-B)-(T-B) \times 100}{C-B}$$

در رابطه‌ی فوق، C، نشان‌دهنده‌ی میانگین جذب نوری چاهک‌های کنترل مثبت، B، نشان‌دهنده‌ی میانگین جذب نوری چاهک‌های کنترل منفی و T، میانگین جذب نوری چاهک‌های مورد آزمایش را نشان می‌دهد (۱۳).

مرزهی خوزستانی با نام علمی (Satureja Khozestanica Jamzad) متعلق به تیره‌ی نعناعیان (Labiata) است. جنس ساتوریا دارای ۲۰۰ گونه‌ی گیاهی و درختچه‌ای می‌باشد (۵، ۶). در ایران، رویشگاه طبیعی و اصلی این گیاه دارویی و ارزشمند، زاگرس میانی، مناطق جنوب لرستان و شمال خوزستان است.

بررسی‌های مختلف، اثرات مطلوب دارویی این گیاه که حاکی از فعالیت‌های ضد درد و التهاب، ضد دیابت و کاهش‌دهنده‌ی چربی است را نشان داده‌اند (۷، ۸). از آن‌جایی که تاکنون تحقیقی در مورد تعیین ترکیبات تشکیل‌دهنده‌ی ساتوریا خوزستانیکا به عنوان یکی از گیاهان بومی ایران انجام نشده و هیچ اطلاعات منتشر شده‌ای در مورد فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد بیوفیلمی عصاره‌های متانولی و استونی و اسانس این گیاه در دسترس نیست؛ این مطالعه با هدف بررسی فعالیت ضد بیوفیلمی و ضد باکتریایی این گیاه بر روی استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا و ارزیابی توان آنتی‌اکسیدانی و تعیین ترکیبات تشکیل‌دهنده‌ی آن به روش کروماتوگرافی طیف‌سنجی جرمی انجام شد.

روش‌ها

جمع‌آوری گیاه و تهیه‌ی عصاره و اسانس از گیاه: این مطالعه‌ی آزمایشگاهی، بهار سال ۱۳۹۹ در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان اصفهان انجام شد. برگ‌های ساتوریا خوزستانیکا از منابع طبیعی استان اصفهان تهیه گردید. عصاره‌های متانولی و استونی به روش سوکسله و اسانس با دستگاه اسانس‌گیری کلونجر استخراج گردیدند و با افزودن سولفات سدیم، آبگیری شدند. عصاره‌ها و اسانس در ظروف تیره و در دمای ۴ درجه نگهداری شد. برای بررسی فعالیت ضد میکروبی غلظت‌های ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵ و ۱۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره‌ها و نیز غلظت‌های ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از اسانس آماده شد (۹).

سویه‌های باکتریایی مورد مطالعه: سویه‌های باکتریایی مورد مطالعه شامل استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC:۲۵۹۲۳) و سودوموناس آئروژینوزا (ATCC:۲۷۸۵۳) و همچنین ۳ سویه‌ی بالینی از استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا بودند.

بررسی فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌ها و اسانس ساتوریا خوزستانیکا: تعیین فعالیت ضد باکتریایی، به روش انتشار چاهک انجام شد. پس از کشت یکنواخت سوسپانسیون باکتری ($10^7 \times 1/5$) باکتری در هر میلی‌لیتر) بر روی محیط کشت مولر هیتون آگار، در هر پلیت، ۵ چاهک به قطر ۶ میلی‌متر ایجاد گردید. در هر چاهک، ۱۰۰ میکرولیتر از هر غلظت عصاره تلقیح شد. آنتی‌بیوتیک

بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس و عصاره‌ها: فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس و عصاره‌های ساتوریا خوزستانیکا به روش اندازه‌گیری کاهش ظرفیت رادیکالی به کمک ۲،۲ دی‌فنیل ۱ پیکریل‌هیدرازیل (DPPH) مورد ارزیابی قرار گرفت. محلول ذخیره با حل کردن ۰/۰۲ گرم عصاره و ۱۰۰ میکرولیتر اسانس در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر تهیه شد. در لوله‌های جداگانه، مقادیر مختلف از محلول ذخیره با آب مقطر به حجم ۱ میلی‌لیتر رسید و به هر لوله، ۳ میلی‌لیتر محلول سمپل بلانک (۰/۰۱ گرم DPPH در ۳۰۰ میلی‌لیتر متانول خالص) اضافه شد. لوله‌ها، ۳۰ دقیقه در تاریکی بر روی شیکر ۱۲۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر در مقابل بلانک (متانول) قرائت شد. درصد بازدارندگی رادیکال‌های آزاد از طریق فرمول $Sc (\%) = [(A_0 - As) / A_0] \times 100$ محاسبه گردید. A_0 : جذب نوری کنترل، As : جذب نوری نمونه و Sc : درصد مهار رادیکال آزاد یا میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی را نشان می‌دهد (۱۴).

تعیین ترکیبات مؤثر گیاهی با گاز کروماتوگرافی - طیف‌سنجی جرمی (GC-MS): در این پژوهش، از دستگاه GC-MS شامل ردیاب جرمی اجیلنت با منبع یونیزان الکترونی کوپل شده با کروماتوگرافی گازی اجیلنت ۷۸۹۰ با ستون RTX-Wax (Restek آمریکا) با طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر استفاده شد. دمای محل تزریق دستگاه، ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد، دمای منبع یونیزان ردیاب جرمی، ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد، دمای آنالایزر (کوادرول) ۲۳۰ درجه سانتی‌گراد و دمای واسط بین GC-MS، ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم گردید (۱۵). داده‌های به دست آمده با نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۷

یافته‌ها

میانگین قطر هاله‌ی عدم رشد سویه‌های مختلف استافیلوکوکوس اورئوس در مجاورت غلظت‌های مختلف عصاره‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است. هاله‌ی عدم رشد ایمی‌پنم، ۳۶ میلی‌متر بود. عصاره‌های متانولی، استونی و اسانس ساتوریا خوزستانیکا اثر مهارکنندگی بر روی رشد هیچ یک از سویه‌های بالینی و استاندارد سودوموناس آئروژینوزا را نشان ندادند.

در هر یک از جدایه‌های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس و سویه‌های استاندارد، با افزایش غلظت ترکیبات میانگین قطر هاله‌ی عدم رشد افزایش داشت. در جدایه‌ی بالینی A، B، C و استافیلوکوکوس اورئوس ATCC:25923 تفاوت معنی‌داری در قطر هاله‌ی عدم رشد بین غلظت‌های مختلف عصاره‌ی استونی و متانولی مشاهده شد ($P < 0/05$) (جدول ۲).

تجزیه و تحلیل‌های آماری نشان داد، در جدایه‌ی بالینی A، B، C و استافیلوکوکوس اورئوس استاندارد در غلظت‌های ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ($P = 0/050$) و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ($P = 0/050$) قطر هاله‌ی عدم رشد عصاره‌ی متانولی، به طور معنی‌داری بیشتر از عصاره‌ی استونی بود و در سایر غلظت‌ها، تفاوت معنی‌داری بین دو عصاره مشاهده نگردید.

جدول ۱. میانگین قطر هاله‌ی عدم رشد (mm) در غلظت‌های مختلف عصاره‌ی استونی و متانولی ساتوریا خوزستانیکا در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس بالینی و استاندارد

سویه‌ی باکتری	عصاره	غلظت (mg/ml)				
		۱۲/۵	۲۵	۵۰	۱۰۰	۲۰۰
استافیلوکوکوس اورئوس	استونی	۱۱/۳۳ ± ۲/۳۱ ^a	۱۲/۸۳ ± ۲/۲۵ ^a	۱۶/۱۷ ± ۳/۴۰ ^b	۱۹/۳۳ ± ۳/۳۳ ^c	۲۶/۳۳ ± ۱/۶۱ ^d
جدایه‌ی بالینی A	متانولی	۱۱/۱۷ ± ۱/۲۶ ^a	۱۵/۳۳ ± ۰/۷۶ ^b	۱۶/۶۷ ± ۰/۵۸ ^b	۲۵/۱۷ ± ۱/۶۱ ^d	۳۱/۶۷ ± ۵/۱۱ ^d
استافیلوکوکوس اورئوس	استونی	۱۰/۰۰ ± ۲/۰۰ ^a	۱۱/۱۷ ± ۱/۲۶ ^a	۱۴/۱۷ ± ۳/۶۲ ^b	۱۷/۵۰ ± ۳/۲۸ ^b	۲۳/۵۰ ± ۲/۲۹ ^d
جدایه‌ی بالینی B	متانولی	۸/۰۰ ± ۰/۰۱ ^a	۱۰/۵۰ ± ۰/۰۱ ^a	۱۳/۵۰ ± ۰/۵۰ ^b	۲۰/۱۷ ± ۱/۰۴ ^c	۲۸/۵۰ ± ۶/۵۰ ^d
استافیلوکوکوس اورئوس	استونی	۸/۰۰ ± ۰/۰۱ ^a	۹/۵۰ ± ۰/۰۱ ^a	۱۲/۵۰ ± ۱/۸۰ ^b	۱۴/۵۰ ± ۰/۰۱ ^b	۲۱/۰۰ ± ۰/۸۷ ^c
جدایه‌ی بالینی C	متانولی	۱۰/۵۰ ± ۰/۸۷ ^a	۱۲/۶۷ ± ۲/۸۹ ^a	۱۶/۳۳ ± ۱/۵۳ ^b	۲۱/۸۳ ± ۳/۳۳ ^c	۳۰/۳۳ ± ۱/۸۹ ^d
استافیلوکوکوس اورئوس	استونی	۸/۰۰ ± ۰/۰۱ ^a	۸/۰۰ ± ۰/۰۱ ^a	۱۰/۰۰ ± ۰/۰۱ ^a	۱۵/۱۷ ± ۱/۲۶ ^b	۲۱/۸۳ ± ۱/۰۴ ^c
ATCC:25923	متانولی	۸/۰۰ ± ۰/۰۱ ^a	۸/۰۰ ± ۰/۰۱ ^a	۱۲/۵۰ ± ۱/۵۰ ^a	۱۹/۵۰ ± ۰/۸۷ ^c	۲۵/۶۷ ± ۰/۵۸ ^d

*: حروف متفاوت در هر ستون اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های مورد آزمایش را نشان می‌دهد.

جدول ۲. میانگین قطر هاله‌ی عدم رشد (mm) در غلظت‌های مختلف اسانس ساتوریا خوزستانیکا در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس بالینی و استاندارد

غلظت (mg/ml)					سویه باکتری
۳۱/۲۵	۶۲/۵	۱۲۵	۲۵۰	۵۰۰	
۸/۰۰ ± ۰/۰۱ ^a	۸/۰۰ ± ۰/۰۱ ^a	۱۷/۶۷ ± ۲/۸۴ ^b	۳۲/۶۷ ± ۸/۰۸ ^c	۴۸/۰۰ ± ۲/۰۰ ^d	استافیلوکوکوس اورئوس جدایه‌ی بالینی A
۸/۰۰ ± ۰/۰۱ ^a	۸/۰۰ ± ۰/۰۱ ^a	۱۱/۸۳ ± ۰/۷۶ ^a	۳۳/۱۷ ± ۸/۶۱ ^c	۴۲/۳۳ ± ۲/۵۲ ^d	استافیلوکوکوس اورئوس جدایه‌ی بالینی B
۸/۰۰ ± ۰/۰۱ ^a	۸/۰۰ ± ۰/۰۱ ^a	۱۴/۱۷ ± ۳/۸۲ ^b	۱۹/۵۰ ± ۳/۵۰ ^b	۴۱/۰۰ ± ۴/۳۶ ^d	استافیلوکوکوس اورئوس جدایه‌ی بالینی C
۸/۰۰ ± ۰/۰۱ ^a	۸/۰۰ ± ۰/۰۱ ^a	۱۵/۰۰ ± ۳/۰۴ ^b	۱۸/۵۰ ± ۳/۲۸ ^b	۳۴/۶۷ ± ۴/۰۷ ^c	استافیلوکوکوس اورئوس ATCC:25923

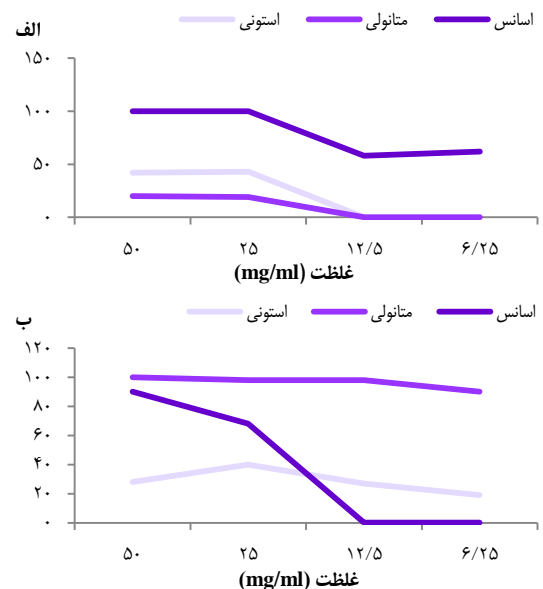
*: حروف متفاوت در هر ستون اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های مورد آزمایش را نشان می‌دهد

اسانس، در غلظت ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به میزان ۱۰۰ درصد از تولید بیوفیلیم باکتری‌های مورد آزمایش، ممانعت کرد. عصاره‌ی متانولی در غلظت ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به میزان ۱۰۰ درصد، مانع از تولید بیوفیلیم استافیلوکوکوس اورئوس شد، ولی با کاهش غلظت عصاره‌ی متانولی به ۶۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، کارایی ضد بیوفیلیمی عصاره‌ی متانولی کاهش یافت. عصاره‌ی متانولی در غلظت ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر فقط به میزان ۲۰ درصد بر روی بیوفیلیم سودوموناس آئروژینوزا اثر مهاری داشت. عصاره‌ی استونی ساتوریا خوزستانیکا در غلظت ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، ۴۴/۳ درصد از تشکیل بیوفیلیم سودوموناس آئروژینوزا جلوگیری کرد، ولی در همین غلظت، فقط به میزان ۲۷/۲ درصد روی بیوفیلیم استافیلوکوکوس اورئوس تأثیر داشت. نکته‌ی جالب اینکه با کاهش غلظت عصاره‌ی متانولی تا ۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، اثر افزایشی در ممانعت از تشکیل بیوفیلیم سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس مشاهده شد.

بر طبق شکل ۲، نتایج نشان داد که عصاره‌ها و اسانس ساتوریا خوزستانیکا از خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالایی برخوردارند. بر اساس آنالیز واریانس در غلظت‌های کمتر، اختلاف معنی‌داری بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس و عصاره‌های استونی و متانولی این گیاه وجود داشت. در غلظت ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر، اسانس گیاه تا ۶۳/۲ درصد فعالیت مهارکنندگی را نشان داد و با افزایش غلظت اسانس تا ۶ میکروگرم در میلی‌لیتر، فعالیت مهارکنندگی به ۸۶/۵ درصد افزایش یافت. آزمون‌های آماری اختلاف معنی‌داری در فعالیت مهارکنندگی غلظت‌های مختلف اسانس نشان ندادند ($P < ۰/۰۰۱$). اما فعالیت مهارکنندگی عصاره‌ی متانولی و عصاره‌ی استونی در غلظت‌های مختلف، معنی‌دار بود ($P < ۰/۰۰۱$). با توجه به شکل ۲، با افزایش غلظت عصاره‌ی متانولی، میزان درصد مهارکنندگی آن به ۷۷/۸ درصد افزایش یافت. بیشترین فعالیت مهارکنندگی عصاره‌ی استونی، ۵۹/۴ درصد به دست آمد (شکل ۲).

در جدایه‌های بالینی و استافیلوکوکوس اورئوس ATCC:25923 تفاوت معنی‌داری در میزان قطر هاله‌ی عدم رشد بین غلظت‌های مختلف اسانس وجود داشت ($P = ۰/۰۰۹$). در غلظت‌های ۵۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اسانس، میانگین قطر هاله‌ی عدم رشد در جدایه‌های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به سویه‌ی استاندارد بیشتر بود و با جدایه‌ی A اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($P < ۰/۰۰۹$). حداقل غلظت مهارکنندگی رشد استافیلوکوکوس اورئوس اسانس، عصاره‌ی متانولی و استونی ساتوریا خوزستانیکا به ترتیب ۳۱/۲۵، ۱۲/۵ و ۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و حداقل غلظت کشندگی آن‌ها ۶۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به دست آمد (جدول ۲).

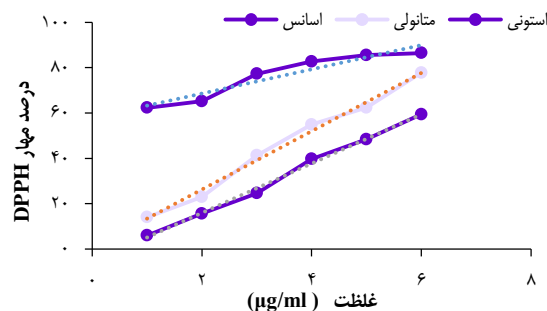
فعالیت ضد بیوفیلیمی عصاره‌های متانولی، استونی و اسانس ساتوریا خوزستانیکا در غلظت‌های تحت‌کشنده بر روی تشکیل بیوفیلیم استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا بررسی شد (شکل ۱).



شکل ۱. درصد فعالیت مهارکنندگی عصاره‌ها و اسانس ساتوریا خوزستانیکا بر روی بیوفیلیم: الف) سودوموناس آئروژینوزا و ب) استافیلوکوکوس اورئوس

استافیلوکوکوس اورئوس تأثیری نداشت (۱۶). به نظر می‌رسد استخراج مواد مؤثر گیاه با متانول، نتایج بهتری داشته باشد. محققان بنگلادشی نیز در پژوهشی نشان دادند که عصاره‌ی متانولی برگ ساتوریا خوزستانیکیا در غلظت‌های ۴۰۰، ۲۰۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بر روی استافیلوکوکوس اورئوس خاصیت ضد باکتریایی دارد و نتایج مربوط به MIC عصاره‌ی متانولی برگ این گیاه در محدوده‌ی ۱۰ تا ۴۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر گزارش شد (۱۷). طبق یافته‌های به دست آمده در مطالعه‌ی حاضر، عصاره‌ی ساتوریا برگ ساتوریا خوزستانیکیا بعد از اسانس و عصاره‌ی متانولی، بالاترین تأثیر بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و سویه‌های بالینی این باکتری داشت.

Mahboubi و Kazempour در مطالعه‌ای با عنوان اثر ضد باکتریایی عصاره‌ی ساتوریا خوزستانیکیا، اعلام کردند که میانگین قطر هاله‌ی عدم رشد عصاره‌ی ساتوریا خوزستانیکیا بر روی اشرشیا کلی در غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، ۱۶ میلی‌متر و میانگین قطر هاله‌ی عدم رشد عصاره‌ی مذکور در همین غلظت در استافیلوکوکوس اورئوس، ۱۳ میلی‌متر بود (۸). گروهی از پژوهشگران، اثر عصاره‌ی آبی گیاه ساتوریا خوزستانیکیا را با غلظت‌های ۲۰۰، ۱۵۰ و ۱۰۰ بر باکتری‌های مختلف سنجیدند. کم‌ترین غلظت مؤثر بر سودوموناس آئروژینوزا در مطالعه‌ی آن‌ها، غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و قطر هاله‌ی عدم رشد، ۱۲ میلی‌متر اعلام شد.



شکل ۲. مقایسه‌ی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ی متانولی، ساتونی و اسانس ساتوریا خوزستانیکیا در غلظت‌های مختلف

نتایج حاصل از سنجش ترکیبات موجود در ساتوریا خوزستانیکیا با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی طیف‌سنجی در جدول ۳ ارائه شده است. اصلی‌ترین ترکیب فنلی موجود در ساتوریا خوزستانیکیا، کارواکرول می‌باشد. همچنین سایر ترکیبات فنلی مانند سیمن و ترپن هم با مقادیر نسبتاً بالایی شناسایی شدند.

بحث

در مطالعه‌ی حاضر مشخص شد که اسانس ساتوریا خوزستانیکیا، بیشترین اثر مهارتی را بر روی استافیلوکوکوس اورئوس و سویه‌های بالینی این باکتری دارد. نتایج یک مطالعه نشان داد، عصاره‌ی اتانولی ساتوریا خوزستانیکیا بر روی رشد استافیلوکوکوس اپیدرمیس، اثر مهارکنندگی به میزان ۰/۷۵ درصد داشت، ولی روی اشرشیا کلی و

جدول ۳. مهم‌ترین ترکیبات شناسایی شده در ساتوریا خوزستانیکیا به روش GC-MS

ردیف	ترکیبات شناسایی شده	درصد ترکیب	درصد احتمال حضور در گیاه	زمان رها سازی
۱	Carvacrol	۳۲/۶۱	۹۵	۳۷/۴۳
۲	Cymene	۸/۴۳	۹۷	۱۳/۶۹۴
۳	Terpinene	۶/۱۱	۹۷	۱۲/۵۴۸
۴	β-Bisabolene	۵/۹۵	۹۸	۲۷/۶۴۸
۵	Terpinene	۳/۲۹	۹۸	۲۴/۵۴۶
۶	Linalool	۳/۲۸	۹۷	۲۳/۳۴۶
۷	Thymol	۲/۹۳	۹۵	۳۶/۹۱۸
۸	β-Myrecene	۲/۳۷	۹۶	۸/۲۰۷
۹	α - Terpinene	۲/۲۷	۹۸	۸/۷۱۹
۱۰	Bisoflex	۲/۱۶	۹۱	۶۱/۳۲۶
۱۱	β-Caryophyllene	۱/۷۲	۹۹	۲۴/۲۹۳
۱۲	α-Terpineol	۱/۷۱	۹۱	۲۶/۸۸۴
۱۳	Caryophyllene	۱/۶۰	۹۴	۳۳/۵۶۳
۱۴	α-Thujene	۰/۳۸	۹۶	۳/۷۴۴

ساتوریا موتیکا، کم‌ترین تأثیر را نسبت به سایر گونه‌ها نشان داد (۷). در پژوهشی دیگر، میزان کم‌ترین غلظت مهارکنندگی مرزهی تابستانی برای سودوموناس آئروژینوزا و اشرشیاکلی، ۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و برای استافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا تیفی‌موریوم در محدوده‌ی ۱۲۵-۶۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش شد. همچنین مشخص گردید، اسانس مرزهی خوزستانی در غلظت بالا، اثر ضد بیوفیلمی بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی دارد (۲۳). این نتایج با یافته‌های ضد بیوفیلمی اسانس ساتوریا خوزستانیکا در تحقیق حاضر مشابهت داشت.

یکی از مهم‌ترین ترکیبات مؤثره شناسایی شده در ساتوریا خوزستانیکا، کارواکرول بود. کارواکرول، ترکیبی ۱۰ کربنه از گروه پلی‌فنل‌هاست. خواص ضد میکروبی این گیاه را می‌توان به مقادیر بالای این ترکیب (۳۲/۶۱ درصد) مربوط دانست. این ماده‌ی شیمیایی گیاهی به عنوان طعم‌دهنده در چندین محصول استفاده می‌شود و دارای خواص ضد میکروبی، ضد التهابی، آنتی‌اکسیدانی، ضد توموری، ضد درد و حشره‌کش است (۲۲، ۲۴).

در یک مطالعه، بیزابولن و کارواکرول به ترتیب ۵۰ و ۱۸ درصد ترکیبات تشکیل‌دهنده‌ی ساتورا خوزستانیکا را گزارش کردند (۲۵). در حالی که در مطالعه‌ی دیگر، کارواکرول، ۹۴ درصد ترکیبات تشکیل‌دهنده‌ی این گیاه و بیزابولن، تنها ۱/۷ درصد اعلام گردید (۲۶). این تحقیقات نشان دادند که کارواکرول و بیزابولن از ترکیبات اصلی تشکیل‌دهنده‌ی ساتوریا خوزستانیکا هستند، ولی احتمالاً برحسب فصل برداشت، رقم و ناحیه‌ی کشت، مقادیر متفاوتی در گیاه دارند.

نتیجه‌گیری

اسانس و عصاره‌های ساتوریا خوزستانیکا از رشد استافیلوکوکوس اورئوس جلوگیری کردند، اما بر روی سودوموناس آئروژینوزا تأثیری نداشتند. همچنین غلظت‌های تحت‌کشنده عصاره‌ها و اسانس گیاه، اثر ضد بیوفیلمی بر روی استافیلوکوکوس آئروس و سودوموناس آئروژینوزا داشتند. اسانس و عصاره‌های ساتورا خوزستانیکا بر اساس روش مهارکنندگی DPPH، فعالیت آنتی‌اکسیدانی نشان دادند.

تشکر و قدردانی

مقاله‌ی حاضر، حاصل پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد رشته‌ی زیست‌شناسی سلولی مولکولی گرایش میکروبیولوژی است که با شماره‌ی ۱۷۲۳۰۵۴۸۷۹۱۱۰۱ در حوزه‌ی معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان تصویب و اجرا شده است.

این عصاره، بالاترین قطر هاله‌ی عدم رشد در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر را بر روی باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس و اشرشیاکلی به ترتیب به اندازه‌ی ۱۸/۲، ۱۶/۱ و ۱۹/۲ میلی‌متر نشان داد (۱۸). این نتایج با یافته‌های پژوهش حاضر در مورد باکتری گرم منفی که مهار رشد مشاهده نشد، مغایرت داشت. اختلاف بین نتایج مطالعات با پژوهش حاضر را می‌توان به تفاوت عصاره‌گیری از گیاه، ارقام مختلف گیاهی مورد آزمایش و مقاومت زیاد سودوموناس آئروژینوزا نسبت به عصاره‌های گیاهی دانست (۱۹، ۲۰).

سایر عصاره‌های گیاهی معمولاً در غلظت بالا بر روی سودوموناس آئروژینوزا مؤثر بوده‌اند. به عنوان مثال، در مطالعه‌ای اثر عصاره‌ی الکلی مرزهی تابستانی در غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بر روی سودوموناس آئروژینوزا بررسی و قطر هاله‌ی عدم رشد، ۱۸/۵ میلی‌متر اندازه‌گیری گردید. همچنین در این آزمایش مشاهده شد که این باکتری کاملاً به سفالکسین و پنی‌سیلین مقاومت داشته است (۲۱).

در مطالعه‌ی حاضر، نتایج فعالیت ضد بیوفیلمی ترکیبات ساتوریا خوزستانیکا در غلظت‌های مختلف، کاهش تشکیل بیوفیلم باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا را نشان داد؛ به طوری که اسانس عصاره‌ی متانولی ساتوریا خوزستانیکا، بالاترین قابلیت ممانعت را در غلظت ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به میزان ۱۰۰ درصد در تولید بیوفیلم باکتری‌ها را نشان داد. با کاهش غلظت اسانس، کارایی ضد بیوفیلمی کاهش یافت. فعالیت ضد بیوفیلمی عصاره‌ی استونی نسبت به اسانس و عصاره‌ی متانولی، از قابلیت پایینی در جلوگیری از تولید بیوفیلم باکتری‌های مورد آزمایش برخوردار بود.

در مطالعه‌ی، اثر ضد بیوفیلمی عصاره‌ی آبی ریشه‌ی ساتوریا خوزستانیکا را مورد بررسی قرار دادند که مشخص شد، عصاره‌ی آبی در غلظت‌های ۳۵، ۴۰ و ۶۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، ۵۶ درصد از تشکیل بیوفیلم استافیلوکوکوس اورئوس ممانعت کرد (۲۲). این نتایج با مطالعه‌ی حاضر در مورد استافیلوکوکوس اورئوس مشابهت داشت. یزدانی و همکاران در مطالعه‌ی، اثر ضد باکتریایی و ضد بیوفیلمی اسانس‌های چهار گونه‌ی ساتوریا را بر روی رشد و تولید آنزیم‌های اوره‌از و بتالاکتاماز کلبسیلا پنومونیه مورد بررسی قرار دادند. طبق نتایج آن‌ها، MIC اسانس ساتوریا خوزستانیکا، ۴۰۹۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد و غلظت‌های زیر MIC اثر ممانعتی بر روی تشکیل بیوفیلم کلبسیلا پنومونیه داشت. اسانس

References

- Anand U, Jacobo-Herrera N, Altemimi A, Lakhssassi N. A comprehensive review on medicinal plants as antimicrobial therapeutics: Potential avenues of biocompatible drug discovery. *Metabolites* 2019; 9(11): 258.
- Magalhães AP, Jorge P, Pereira MO. *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* communication in biofilm infections: insights through network and database construction. *Crit Rev Microbiol* 2019; 45(5-6): 712-28.
- Jafari R, Karbasizade V, Moghim S. Frequency and resistance patterns of bacterial isolates from burn wounds infections in Isfahan, Iran. *J Isfahan Med Sch* 2013; 31(246): 1134-40. [In Persian].
- Günther F, Scherrer M, Kaiser SJ, DeRosa A, Mutters NT. Comparative testing of disinfectant efficacy on planktonic bacteria and bacterial biofilms using a new assay based on kinetic analysis of metabolic activity. *J Appl Microbiol* 2017; 122(3): 625-33.
- Sefidkon F, Emami Bistgani Z. Integrative review on ethnobotany, essential oil, phytochemical, agronomy, molecular and pharmacological properties of *Satureja* species. *J Essent Oil Res* 2021; 33(2): 114-32.
- Hadian J, Mirjalili MH, Kanani MR, Salehnia A, Ganjipoor P. Phytochemical and morphological characterization of *Satureja khuzestanica* Jamzad populations from Iran. *Chem Biodivers* 2011; 8(5): 902-15.
- Yazdani F, Rasooli I, Sefidkon F, Saidi N, Owlia P. The effect of subinhibitory concentrations of *satureja* spp. essential oils on the biofilm formation and urease activity of *Klebsiella pneumoniae*. *J Med Plants* 2020; 19(73): 63-70.
- Mahboubi M, Kazempour N. Chemical composition and antimicrobial activity of *Satureja hortensis* and *Trachyspermum copticum* essential oil. *Iran J Microbiol* 2011; 3(4): 194-200.
- Golpasand Hagh L, Arefian A, Farajzade A, Dibazar S, Samiea N. The antibacterial activity of "*Satureja hortensis*" extract and essential oil against oral bacteria. *Dent Res J (Isfahan)* 2019; 16(3): 153-9.
- Marasini BP, Baral P, Aryal P, Ghimire KR, Neupane S, Dahal N, et al. Evaluation of antibacterial activity of some traditionally used medicinal plants against human pathogenic bacteria. *BioMed Res Int* 2015; 2015: 265425.
- CLSI C. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 11th ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018. p. 1-112.
- Atef NM, Shanab SM, Negm SI, Abbas YA. Evaluation of antimicrobial activity of some plant extracts against antibiotic susceptible and resistant bacterial strains causing wound infection. *Bull Natl Res Cent* 2019; 43(1): 144.
- Mansouri S, Safa A, Gholamhoseinian Najar S, Gholamhoseinian Najar A. Inhibitory activity of Iranian plant extracts on growth and biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Malays J Microbiol* 2013; 9(2): 176-83.
- Azizkhani M, Puramin S. Antioxidant potential of *eugenia caryophyllus*, *satureja hortensis* and *artemisia dracunculus* essential oils in grape seed oil. *Iran J Vet Med* 2019; 13(2): 217-27. [In Persian].
- Wong YF, Yan D, Shellie RA, Sciarone D, Marriott PJ. Rapid plant volatiles screening using headspace SPME and person-portable gas chromatography-mass spectrometry. *Chromatographia* 2019; 82(1): 297-305.
- Kudumela RG, McGaw LJ, Masoko P. Antibacterial interactions, anti-inflammatory and cytotoxic effects of four medicinal plant species. *BMC Complement Altern Med* 2018; 18(1): 199.
- Hossan MS, Jindal H, Maisha S, Raju CS, Sekaran SD, Nissapatorn V, et al. Antibacterial effects of 18 medicinal plants used by the Khyang tribe in Bangladesh. *Pharm Biol* 2018; 56(1): 201-8.
- Abbasi A, Bahador A, Esmaeili D, Mahbubi A, Amiri M, Amiri M. The study of inhibitory effects of *satureja khuzestanica* against MDR isolates of *pseudomonas aeruginosa*. *Int J Cur Microbiol App Sci* 2014; 3(2): 614-8.
- Mombeshora M, Mukanganyama S. Antibacterial activities, proposed mode of action and cytotoxicity of leaf extracts from *Triumfetta welwitschii* against *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Complement Altern Med* 2019; 19(1): 315.
- Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis* 2002; 34(5): 634-40.
- Fierascu I, Dinu-Pirvu CE, Fierascu RC, Velescu BS, Anuta V, Ortan A, et al. Phytochemical profile and biological activities of *satureja hortensis* L.: A review of the last decade. *Molecules* 2018; 23(10): 2458.
- Khaledi A, Meskini M. A systematic review of the effects of *satureja khuzestanica* jamzad and *zataria multiflora* boiss against *pseudomonas aeruginosa*. *Iran J Med Sci* 2020; 45(2): 83-90.
- Kim G, Gan RY, Zhang D, Farha AK, Habimana O, Mavumengwana V, et al. Large-scale screening of 239 traditional chinese medicinal plant extracts for their antibacterial activities against multidrug-resistant *staphylococcus aureus* and cytotoxic activities. *Pathogens* 2020; 9(3): 185.
- Suntres ZE, Coccimiglio J, Alipour M. The bioactivity and toxicological actions of carvacrol. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2015; 55(3): 304-18.
- Mahmoudvand H, Beyranvand M, Nayebzadeh H, Fallahi S, Mirbadie SR, Kheirandish F, et al. Chemical composition and prophylactic effects of *Saturja khuzestanica* essential oil on acute toxoplasmosis in mice. *Afr J Tradit Complement Altern Med* 2017; 14(5): 49-55.
- Mahboubi M, Kazempour N. The antibacterial activity of *satureja khuzestanica* essential oil against clinical isolates of *E. coli*. *Jundishapur J Nat Pharm Prod* 2016; 11(2): e30034.

Evaluation of Chemical Compounds and Antibacterial, Antibiofilm, and Antioxidant Activities of *Satureja khuzestanica* eEssence and Extracts

Shirin Mohammadi-Sichani¹, Maryam Mohammadi-Sichani², Laleh Hoveida²

Original Article

Abstract

Background: In the past decades, problems in treating infections caused by resistant pathogenic bacteria were coupled with an increased focus on herbal active ingredients. The aim of this study was to evaluate the anti-biofilm, antibacterial and antioxidant effects of *S. khuzestanica* and to determine its chemical composition.

Methods: *Satureja khuzestanica* leaf was prepared from the Natural Resources Center of Isfahan Province. The antibacterial effect of extracts and essential oils was determined by well diffusion method and their minimum inhibitory concentration (MIC) were determined by microdilution method on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* strains. The antioxidant activity was also investigated by measuring the reduction of radical capacity. The chemical composition of the plant was determined by gas chromatography-mass spectrometry.

Findings: The MIC of methanolic extract and essential oil of *S. khuzestanica* were 12.5 and 31.25 mg/ml for *S. aureus*, respectively. In all cases, there was a direct relationship between the diameter of the growth inhibition zone and the concentrations of the plant extracts. The essential oil of the plant at a concentration of 50 mg/ml inhibited 100% of the biofilm production of both bacteria. Essential oil also had the highest antioxidant activity with 86% inhibition of DPPH. The level of antioxidant activity of extracts showed a significant increase with increasing the concentrations ($P < 0.001$). Carvacrol with 32.61% was the main compound of *S. khuzestanica* and then Cymene, Terpinene and Bisabolone was more than other compounds.

Conclusion: The results showed that *S. khuzestanica* essential oil and extracts have antibacterial effect against *S. aureus* and antibiofilm effect on *S. aureus* and *P. aeruginosa*. This plant contains compounds with antimicrobial activity and antioxidant properties.

Keywords: *Satureja*; Anti-bacterial agents; Plant extract; Biofilm; Antioxidant activity

Citation: Mohammadi-Sichani S, Mohammadi-Sichani M, Hoveida L. Evaluation of Chemical Compounds and Antibacterial, Antibiofilm, and Antioxidant Activities of *Satureja khuzestanica* Essence and Extracts. J Isfahan Med Sch 2022; 40(657): 1-8.

1- MSc, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Falavarjan Branch, Isfahan, Iran

2- Assistant Professor, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Falavarjan Branch, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Maryam Mohammadi-Sichani, Assistant Professor, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Falavarjan Branch, Isfahan, Iran; Email: mohamadi_m@iaufala.ac.ir