بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره‌های اتانولی، متانولی و اتیل استات کلپوره (*Teocrum polium*) بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از گوسفند

علی مقصودی[۱،۲،۳*]، سعیده سعیدی[۳]

۱- گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران
۲- گروه بیوانفورماتیک، دانشگاه زابل، زابل، ایران
۳- پژوهشکده زیست‌فناوری کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

دریافت مقاله: ۱۲ شهریور ۱۳۹۷، بازنگری: ۳۰ مهر ۱۳۹۷، پذیرش نهایی: ۲۶ بهمن ۱۳۹۷

چکیده

باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس*(*Staphylococcus aureus*) از جمله رایج‌ترین عوامل شیوع مسمومیت‌های غذایی باکتریایی است و بین انسان و دام شایع است. بر همین اساس، هدف مطالعه حاضر جداسازی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* از بینی گوسفندان بومی منطقه سیستان و بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیک سویه‌های جداسازی شده به آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم بود. همچنین اثر ضد میکروبی عصاره‌های اتانولی، متانولی و اتیل استات گیاه کلپوره (*Teocrum polium*) بر روی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* بررسی شد. برای این منظور گیاه کلپوره از منطقه سیستان جمع‌آوری گردید. تهیه عصاره به کمک دستگاه روتاری و با کمک روش تقطیر در خلاء انجام گرفت. تعداد ۱۰ سویه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* از بینی گوسفندان بومی منطقه سیستان به کمک روش‌های بیوشیمیایی جداسازی شد. با استفاده از روش استاندارد دیسک دیفیوژن کربی- بائر، حساسیت سویه‌های باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های اکساسیلین، آموکسی سیلین-کلاولانیک اسید، آمپی‌سیلین، جنتامایسین، سفازولین و ونکومایسین مورد ارزیابی قرار گرفت. حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره‌ها در تیمار با عصاره‌های گیاه کلپوره با استفاده از روش رقت‌سازی در چاهک تعیین شد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که هر سه عصاره اتانولی، متانولی و اتیل استات درجات متفاوتی از مهارکنندگی را بر روی ۱۰ سویه باکتری جداسازی شده دارند. با این وجود عصاره اتیل استات گیاه کلپوره در غلظت‌های پایین‌تری خاصیت مهارکننده بر روی بیشتر سویه‌های باکتری جداسازی شده داشت. همانند خاصیت مهارکنندگی قوی‌تر عصاره اتیل استات کلپوره، این عصاره در مقایسه با عصاره‌های اتانولی و متانولی خواص کشندگی قوی‌تری نیز علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد عصاره اتیل استات گیاه کلپوره می‌تواند جایگزین مناسبی برای آنتی‌بیوتیک‌های متداول باشد.

واژگان کلیدی: *آنتی‌بیوتیک، استافیلوکوکوس اورئوس، حداقل غلظت مهارکنندگی، سیستان، فعالیت ضد میکروبی، کلپوره*

* نویسنده مسئول: Alimaghsoudi@uoz.ac.ir

مقدمه

جنس استافیلوکوکوس‌ها متعلق به رده فیرمی باکتریا و خانواده میکروکوکاسه هستند و آنتروتوکسین استافیلوکوکی تولید می‌کند. این سم در مقابل حرارت مقاوم بوده و از جمله مهم‌ترین عوامل مسمومیت غذایی در انسان می‌باشد. این باکتری‌ها، گرم مثبت، بی‌حرکت، فاقد اسپور، هوازی و بی‌هوازی اختیاری‌اند (۱). اعضاء این جنس دارای بیش از ۲۰ گونه می‌باشد که در زیستگاه‌های مختلف پراکنده‌اند. برخی از آنها در پوست، غدد پوستی و غشاهای مخاطی جانوران مختلف وجود دارند و از طریق فرآورده‌های حیوانی از جمله پنیر، شیر و گوشت و منابع محیطی مثل خاک و شن و گرد و غبار، هوا و آب‌های طبیعی به انسان منتقل می‌شوند (۴-۲). برخی از گونه‌های این باکتری برای انسان و حیوان بیماری‌زا هستند (۱) و برخی دیگر در فساد مواد غذایی نقش دارند (۵). *استافیلوکوکوس اورئوس* یکی از رایج‌ترین عوامل شیوع مسمومیت‌های غذایی باکتریایی است. علاوه بر این عامل ایجاد زخم‌های پوستی و دمل نموده و در برخی موارد باعث ایجاد عفونت‌های بیمارستانی بسیار خطرناک و مقاوم به درمان می‌گردد (۶). مقاومت آنتی‌بیوتیکی *استافیلوکوکوس اورئوس* در فرآورده‌های دامی به‌دست آمده از گوسفند نیز گزارش شده است (۷).

پیش از انقلاب صنعتی، گیاهان دارویی به عنوان منبع اصلی مواد دارویی به طور وسیع توسط مردم مورد استفاده قرار می‌گرفت، تا اینکه داروهای مدرن شیمیایی به بازار آمدند و به دلیل تولید انبوه، این داروها در مقیاس وسیع و قیمت نسبتاً ارزان در دسترس همگان قرار گرفتند. دانش پزشکی نوین نیز بر پایه درمان با ترکیبات مؤثر دارویی شیمیایی شکل گرفت و به تدریج طب سنتی به حاشیه رفت. متعاقب فراگیر شدن داروهای شیمیایی، استفاده از مواد طبیعی دارویی به طور چشمگیری کاهش یافت، ولی در سال‌های اخیر به دلیل افزایش آگاهی در مورد خواص و آثار مفید مواد دارویی طبیعی زمینه استفاده روزافزون از آنها فراهم شده است (۸). علاوه بر داروهای گیاهی (که مواد متشکله آنها بر اساس ترکیبات گیاهی فرموله شده است)، گیاهان دارویی نیز به تنهایی می‌توانند بخشی از نیاز به دارو را مرتفع نمایند. از آن جمله می‌توان به عصاره و اسانس این گیاهان اشاره نمود. این‌گونه ترکیبات اغلب به دلیل خواص ضد باکتریایی، ضد قارچی، آنتی اکسیدانی و ضد سرطانی شناخته می‌شوند (۹).

هرچند در دنیا کلپوره (*Teucrium polium*) به عنوان یک گیاه بومی مناطق مدیترانه‌ای شناخته می‌شود، اما در بین خزانه بزرگ گیاهان دارویی بومی ایران، این گیاه را می‌توان نام برد که به خواص دارویی متعدد آن پرداخته شده است (۱۰). کلپوره گیاهی خوش‌بو و متعلق به تیره نعناع بوده و گیاهی پایا، علفی، دارای بوته‌های تقریباً چوبی به ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر و دارای ظاهر سفید و پنبه‌ای می‌باشد. گل‌های کلپوره به رنگ‌های سفید، سفید مایل به زرد و یا زرد دیده می‌شود. وضع ساقه گیاه نیز به صورت پرشاخه یا خوابیده دیده می‌شود. این گیاه در زمین‌های شنی و ماسه‌ای، در نواحی مختلف اروپا، مدیترانه، شمال آفریقا و جنوب غربی آسیا از جمله ایران می‌روید (۱۱). کلپوره در طب سنتی به طور وسیع برای درمان رماتیسم، التیام زخم‌ها، درمان التهاب و کنترل قند خون استفاده می‌شده است (۱۲). برای کلپوره اثرات ضد درد، تب بر، ضد تشنج و فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز ذکر شده است (۱۳). بر همین اساس، در مطالعه حاضر نخست جداسازی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* از بینی گوسفندان بومی منطقه سیستان (حومه شهر زابل) انجام شد. سپس مقاومت آنتی‌بیوتیک سویه‌های جداسازی شده به آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم بررسی

گردید و در نهایت اثر ضد میکروبی عصاره‌های اتانولی، متانولی و اتیل استات کلپوره بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از بینی گوسفندان منطقه سیستان بررسی شد.

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره: گیاه کلپوره از منطقه سیستان جمع‌آوری شده و در دمای اتاق و شرایط سایه خشک گردید. برای تهیه عصاره اتانولی، متانولی و اتیل استات کلپوره مقدار ۱۰ گرم پودر خشک گیاه به طور جداگانه به همراه ۱۰۰ میلی‌لیتر از هر یک از حلال‌ها در ظروف شیشه‌ای قرار داده شد. محتوی ظروف به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق توسط دستگاه شیکر (Pars Azma - ایران) با سرعت rpm ۱۳۰ مخلوط شده، سپس به وسیله کاغذ واتمن شماره ۲ صاف گردید. جداسازی حلال از عصاره توسط دستگاه روتاری (Heidolph- آلمان) و با کمک پمپ خلاء (تقطیر در خلاء) انجام گرفت. عصاره به دست آمده وزن شده سپس در حلال DMSO (۱۰درصد) حل شد. عصاره به‌دست آمده تا زمان استفاده در آزمایشات ضد میکروبی در دمای ۴ درجه سانتیگراد در یخچال نگهداری شد.

جداسازی استافیلوکوکوس اورئوس از گوسفندان: از بینی گوسفندان بومی منطقه سیستان ۱۰ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی شده و بر روی محیط‌های کشت بلاد آگار و نوترینت آکار کشت شد. خلوص باکتری‌های جدا شده با آزمون مانیتول، کاتالاز و رنگ آمیزی گرم تأیید شد.

تهیه سوسپانسیون ۰/۵ مک فارلند: برای تهیه سوسپانسیون میکروبی، ابتدا ۲۴ ساعت قبل از انجام آزمایش، باکتری از کشت ذخیره به محیط کشت شیب‌دار آگار مغذی تلقیح شد. پس از رشد کلونی‌های باکتری، سطح محیط کشت با محلول نرمال سالین شستشو داده شد تا سوسپانسیون غلیظ میکروبی حاصل گردد. سپس مقداری از سوسپانسیون باکتری، داخل لوله استریل دربدار حاوی محلول نرمال سالین ریخته شده و کدورت آن از طریق اندازه‌گیری جذب با دستگاه اسپکتروفوتومتر (Unico- آمریکا) در طول موج ۶۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و تا هنگام برابر شدن کدورت محلول با کدورت ۰/۵ مک فارلند، با محلول نرمال سالین رقیق گردید. بدین ترتیب سوسپانسیون باکتری با غلظت $1/5\times10^8$ cfu/mL تهیه گردید.

تعیین حساسیت باکتری به آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم: با استفاده از روش استاندارد دیسک دیفیوژن کربی- بائر (Kirby-Bauer Disk Diffusion)، حساسیت سویه‌های باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های اکساسیلین، آموکسی سیلین-کلاولانیک اسید، آمپی سیلین، جنتامایسین، سفازولین و ونکومایسین (پادتن طب، ایران) مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور، در ابتدا از تمام سویه‌های باکتری، غلظت ۰/۵ مک فارلند در محیط مایع آبگوشتی مولر هینتون (Muller-Hinton Broth, MHB) تهیه و سپس بر روی محیط آگار مولر هینتون (Muller-Hinton Agar, MHA) پخش و کشت داده شدند. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی در فاصله مناسب از یکدیگر قرار گرفتند و پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در انکوباتور قرار گرفته و هاله‌های بازدارنده جهت ارزیابی و تعیین مقاومت/حساسیت سویه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های مورد نظر، مشخص شد. این آزمایش در سه تکرار انجام گردید.

تعیین میزان حساسیت سویه S. aureus نسبت به عصاره‌های گیاه کلپوره: تعیین حساسیت سویه‌های باکتری نسبت به عصاره‌های گیاه کلپوره با استفاده از روش رقت‌سازی در چاهک

انجام شد. در محیط کشت جامد تعداد شش چاهک ایجاد شد و به هر چاهک مقدار ۱۰۰ µL از محیط آبگوشت مولر هینتون (MHB) اضافه شد. سپس به چاهک اول ۱۰۰ µL از محلول رقیق شده از هر یک از عصاره‌های اتانولی، متانولی و اتیل استات کلپوره اضافه شده و پس از مخلوط کردن، ۱۰۰ µL از چاهک اول برداشته به چاهک دوم اضافه شد. بدین ترتیب تا آخرین چاهک این کار انجام شد. از چاهک آخر ۱۰۰ µL محیط کشت خارج گردید. مقدار ۱۰ µL از سوسپانسیون میکروبی حاوی $1/5\times10^8$ cfu/mL باکتری(معادل ۰/۵ مک فارلند) به همه چاهک‌ها اضافه شد و در نهایت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. اولین چاهکی که پس از قرار دادن در انکوباتور از رشد باکتری جلوگیری کرده بود، به عنوان حداقل غلظت مهارکننده (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) در نظر گرفته شد. برای اطمینان، از چاهک‌های شفاف ۱۰ µL برداشته به محیط مولر هینتون آگار منتقل گردید و پس از ۲۴ ساعت اولین رقتی که توانست ۹۹/۹ درصد باکتری را از بین ببرد به‌عنوان حداقل غلظت باکتری‌کشی (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) در نظر گرفته شد. این آزمایش در سه تکرار انجام گردید.

نتایج

الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در تیمار با آنتی‌بیوتیک‌های در جدول ۱ نشان داده شده است. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که به ترتیب ۱۰۰ و ۱۰ درصد سویه‌ها مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های اکساسین و ونکومایسین هستند، در حالی که درصد حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین (۱۰۰ درصد)، آموکسی سیلین- کلاولانیک اسید(۹۰ درصد)، آمپی سیلین- سفازولین و ونکومایسین (۸۰ درصد) بوده است (جدول۲).

جدول۱- الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ۱۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی

سویه باکتری	وانکومایسین	سفازولین	جنتامایسین	آمپی‌سیلین	آموکسی‌سیلین- کلاولانیک اسید	اکساسیلین
S. aureus 1	مقاوم	حساس	حساس	حساس	حساس	مقاوم
S. aureus 2	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	مقاوم
S. aureus 3	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	مقاوم
S. aureus 4	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	مقاوم
S. aureus 5	حساس	نیمه حساس	حساس	نیمه حساس	نیمه حساس	مقاوم
S. aureus 6	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	مقاوم
S. aureus 7	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	مقاوم
S. aureus 8	نیمه حساس	نیمه حساس	حساس	نیمه حساس	حساس	مقاوم
S. aureus 9	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	مقاوم
S. aureus 10	حساس	حساس	Sحساس	حساس	حساس	مقاوم

جدول ۲- درصد مقاومت آنتی‌بیوتیکی استافیلوکوکوس اورئوس

	وانکومایسین	سفازولین	جنتامایسین	آمپی‌سیلین	آموکسی‌سیلین- کلاولانیک اسید	اکساسیلین
حساس	۸۰	۸۰	۱۰۰	۸۰	۹۰	۰
نیمه حساس	۱۰	۲۰	۰	۲۰	۱۰	۰
مقاوم	۱۰	۰	۰	۰	۰	۱۰۰

حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) عصاره‌های اتانولی، متانولی و اتیل استات کلپوره بر *استافیلوکوکوس اورئوس* در جدول ۳ نشان داده شده است. بیشترین غلظت مهارکنندگی عصاره اتانولی بر روی ۴ سویه باکتری (سویه‌های ۱، ۴، ۶، ۹) بود که نشان می‌دهد مواد مؤثره محلول در اتانولِ گیاه کلپوره در غلظت‌های بالاتری بر روی این سویه‌ها خاصیت مهارکنندگی دارند، در حالی که رشد سویه ۱۱ با کمترین غلظت (۳/۷۵ ppm) عصاره اتانولی مهار می‌شود. بیشترین غلظت عصاره متانولی مؤثر بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* نیز ۳۰ ppm بود که بر روی سویه‌های ۳، ۷ و ۸ ثبت شد. کمترین غلظت عصاره اتانولی برای مهار باکتری نیز بر روی چهار سویه (سویه‌های ۲، ۵، ۶ و ۹) به مقدار ۷/۵ ppm ثبت گردید که بالاتر از حداقل غلظت مهارکننده عصاره اتانولی بود. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که عصاره اتیل استات گیاه کلپوره در غلظت‌های پایین‌تری خاصیت مهارکننده بر روی سویه‌های باکتری جداسازی شده داشت، به طوری‌که کمترین غلظت بر روی تمام سویه‌ها در بین سه عصاره، مربوط به عصاره اتیل استات با غلظت ۱/۸۷ بود (بر روی سویه‌های ۳ و ۱۰ باکتری). بر اساس این نتایج نشان داده شد که اتیل استات قابلیت استحصال بخش بیشتری از ترکیبات ضد باکتریایی کلپوره را نسبت به حلال‌های اتانول و متانول دارد. بیشترین غلظت مورد نیاز عصاره اتیل استات کلپوره نیز برای مهار سویه‌های ۲ و ۶ ثبت شد (۱۵ ppm).

جدول ۳- حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) (ppm) عصاره‌های اتانولی، متانولی و اتیل استات کلپوره علیه *استافیلوکوکوس اورئوس*

سویه باکتری	اتانول	متانول	اتیل استات
S. aureus 1	۳۰	۱۵	۷/۵
S. aureus 2	۱۵	۷/۵	۱۵
S. aureus 3	۱۵	۳۰	۱/۸۷
S. aureus 4	۳۰	۱۵	۳/۷۵
S. aureus 5	۷/۵	۷/۵	۷/۵
S. aureus 6	۳۰	۷/۵	۱۵
S. aureus 7	۱۵	۳۰	۳/۷۵
S. aureus 8	۱۵	۳۰	۳/۷۵
S. aureus 9	۳۰	۷/۵	۷/۵
S. aureus 10	۷/۵	۱۵	۱/۸۷

حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره‌های اتانولی، متانولی و اتیل استات کلپوره بر *استافیلوکوکوس اورئوس* در جدول ۴ نشان داده شده است. کمترین غلظت کشنده عصاره اتانولی کلپوره بر روی سویه ۱۱ *استافیلوکوکوس اورئوس* ثبت شد (۷/۵ ppm). بنابراین سویه شماره ۱۱ در مجاورت عصاره اتانولی کلپوره سریعتر از سایر سویه‌ها کشته می‌شود؛ در حالی که برای کشته

شدن اغلب سویه‌ها به غلظت بیشتری از عصاره نیاز است (۳۰ ppm برای ۸ سویه). نیمی از سویه‌ها با غلظت ۱۵ ppm و نیم دیگر با غلظت ۳۰ ppm عصاره متانولی کلپوره کشته شدند در حالی که برای کشته شدن باکتری با عصاره اتیل استات به حداکثر ۳۰ ppm و حداقل ۳/۷۵ ppm عصاره نیاز است. همانند خاصیت مهارکنندگی قوی‌تر عصاره اتیل استات کلپوره، این عصاره در مقایسه با عصاره‌های اتانولی و متانولی خواص کشندگی قوی‌تری نیز علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داد.

جدول ۴- حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره‌های اتانولی، متانولی و اتیل استات کلپوره (ppm) علیه *استافیلوکوکوس اورئوس*

سویه باکتری	اتانول	متانول	اتیل استات
S. aureus 1	۳۰	۳۰	۱۵
S. aureus 2	۳۰	۱۵	۳۰
S. aureus 3	۳۰	۳۰	۳/۷۵
S. aureus 4	۳۰	۳۰	۷/۵
S. aureus 5	۱۵	۱۵	۱۵
S. aureus 6	۳۰	۱۵	۳۰
S. aureus 7	۱۵	۳۰	۷/۵
S. aureus 8	۳۰	۳۰	۳/۷۵
S. aureus 9	۳۰	۱۵	۱۵
S. aureus 10	۱۵	۱۵	۳/۷۵

بحث

پرورش گوسفند در منطقه سیستان به شیوه سنتی متداول است و گله‌های پرورشی اغلب با تعداد رأس گوسفند کم تا متوسط نگهداری می‌شوند. لذا علاوه بر برنامه واکسیناسیون متداول، معمولاً درمان‌های دیگر از جمله مصرف آنتی‌بیوتیک مرسوم نیست. عدم مقاومت سویه‌های مختلف *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از گوسفندان منطقه سیستان به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین و آموکسی‌سیلین بر اساس نتایج پژوهش حاضر می‌تواند به دلیل متداول نبودن مصرف آنتی‌بیوتیک در پرورش گوسفند در منطقه سیستان باشد. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که هرچند ممکن است ظاهر یک حیوان درگیر بودن آن را با عوامل عفونی بیماری‌زا نشان ندهد، اما وجود پاتوژن‌ها موجب افت عملکرد حیوان می‌شود (۱۴). چنانچه در مطالعه حاضر نشان داده شد، تیمار *استافیلوکوکوس اورئوس* با آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم به طور قابل ملاحظه‌ای موجب کشته شدن باکتری می‌شود که این کار می‌تواند به بهبود عملکرد دام کمک کند (به همین دلیل در گذشته به آنتی‌بیوتیک‌ها محرک رشد نیز گفته می‌شد). اما مصرف مداوم آنتی‌بیوتیک برای بهبود عملکرد دام ممکن است موجب شود که بقایای آنتی‌بیوتیک‌ها وارد گوشت و شیر حیوان شده و سلامت مصرف‌کنندگان را تهدید کند. از طرفی مصرف دراز مدت این باکتری ممکن است موجب بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* گردد. لذا مصرف گیاهان دارویی به منظور کاهش جمعیت میکروبی مضر و بهبود عملکرد حیوان می‌تواند مؤثر باشد.

از جمله مهم‌ترین ویژگی‌های گیاهان دارویی خواص ضد میکروبی آنها برای درمان عفونت‌ها است. برخی متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارای خاصیت ضد میکروبی هستند و به روش‌های مختلف از جمله تخریب دیواره سلولی موجب مرگ میکروب

می‌شوند. در یک مطالعه مهم‌ترین مواد مؤثره اسانس گیاه کلپوره شامل آلفا کادینول (alpha-cadinol)، اکسید کاریوفیلن (caryophyllene oxide)، آلفانورولول اپی (alpha muurolol epi)، کادالن (cadalene) و لانجیویربینون (longiverbenone) معرفی شد که مقادیر آنها به ترتیب برابر با ۴۶/۲، ۲۵/۹، ۸/۱، ۳/۷ و ۲/۹ درصد بود (۱۵). آلفا کادینول و آلفانورولول در یک گیاه بومی آمریکای لاتین (*Hedyosmum sprucei*) نیز وجود دارد که به دلیل خواص دارویی ضد میکروبی آن بسیار مورد توجه می‌باشد (۱۶، ۱۷). وجود ماده مؤثره آلفا کادینول همچنین در گیاهان دیگری از جمله *Senecio nutans*، *Tetradenia riparia*، *Saurauia lantsangensis* و *Phoebe formosana* نیز گزارش شده است (۲۰-۱۸).

علاوه بر خواص ضد میکروبی عصاره گیاه کلپوره در محیط کشت علیه میکروب‌های مختلف (۲۱)، خواص متعدد دیگری نیز برای عصاره و اسانس کلپوره ذکر شده است. در یک مطالعه علاوه بر فعالیت ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی، برای کلپوره اثرات ضد تشنج، ضد التهاب، ضد درد، تب بر و التیام دهنده زخم نیز گزارش شده است (۲۲). همچنین طبق بررسی‌های به عمل آمده بر روی موش نشان داده شده است که مصرف کلپوره در رفع درد، تقویت عملکرد دستگاه گوارش و رفع بیماری‌های دستگاه تناسلی- ادراری نیز مؤثر می‌باشد (۲۳).

در مطالعه دیگری که تاثیر عصاره آبی و الکلی گیاه کلپوره بر قارچ‌های *کاندیدا آلبیکنس* و دو گونه *مالاسزیا* مورد بررسی قرار گرفته بود، نتایج نشان داد که تأثیر مهاری عصاره اتانولی کلپوره بر هر سه گونه قارچ متفاوت و در ارتباط با غلظت عصاره در محیط کشت بود (۲۴). در مطالعه حاضر نیز علاوه بر غلظت عصاره، نوع حلال (اتانول، متانول یا اتیل استات) و سویه باکتری عواملی بودند که تأثیر بازدارندگی یا کشندگی عصاره‌ها را تحت تأثیر قرار دادند. در یک مطالعه برای بررسی اثر اسانس کلپوره در کنترل باکتری گرم منفی *سالمونلا تیفی موریوم* موجود در ماست، نتایج نشان داد که اسانس مذکور در دو غلظت ppm ۶۰ و ۸۰ و در تیمار توأم با پروبیوتیک از بالاترین تأثیر بر ممانعت از رشد *سالمونلا* برخوردار بود (۲۵). اخیراً اثر ضد میکروبی انواع عصاره‌های گیاه کلپوره (هیدروالکلی، اتانولی و متانولی) علیه برخی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی ارزیابی شده است و نشان داده شد که عصاره هیدروالکلی این گیاه از اثرات ممانعت‌کننده مناسبی علیه رشد *سالمونلا* برخوردار است و بیشترین فعالیت ضد میکروبی عصاره اتانولی آن علیه *باسیلوس آنتراسیس* گزارش شد، با وجود این *بوردتلا برونشیسپتیکا* حساس‌ترین میکرواورگانیسم نسبت به عصاره متانولی این گیاه بود (۲۶). فعالیت ضد میکروبی اسانس گیاه کلپوره همچنین توسط پژوهشگران غیر ایرانی نیز بررسی شده است و گزارش شده است که این اسانس از اثر باکتری‌کشی علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* در غلظت ۱:۱۰۰ برخوردار می‌باشد، درحالی که فاقد اثرات ضد میکروبی علیه *سالمونلا تیفی موریوم* و *اشریشیا کلی* بود (۲۷) که نشان می‌دهد نوع دیواره خارجی باکتری (گرم مثبت یا گرم منفی بودن باکتری) بر مقاومت یا حساسیت آن در تیمار با متابولیت‌های ثانویه کلپوره مؤثر است.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از گوسفندان بومی منطقه سیستان نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم مقاوم نیست و رشد آن در تیمار با آنتی‌بیوتیک مهار می‌شود. از طرفی با توجه به تاثیر پاتوژن‌ها بر افت عملکرد حیوان به نظر می‌رسد استفاده از مواد ضد میکروبی در پرورش گوسفند ضروری باشد. با توجه

به احتمال باقی‌ماندن آنتی‌بیوتیک در گوشت و شیر گوسفند تهدید سلامت مصرف‌کنندگان و از طرفی مقاوم شدن سویه‌های مختلف باکتری‌ها از جمله *استافیلوکوکوس اورئوس* در اثر مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها، استفاده از ترکیبات به‌دست آمده از عصاره گیاهان دارویی می‌تواند مفید باشد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد عصاره اتیل استات گیاه کلپوره می‌تواند جایگزین مناسبی برای آنتی‌بیوتیک‌های متداول باشد.

References

1- Emran TB, Rahman MA, Uddin MM, Dash R, Hossen MF, Mohiuddin M, *et al*. Molecular docking and inhibition studies on the interactions of Bacopa monnieri's potent phytochemicals against pathogenic Staphylococcus aureus. Daru: J Faculty of Pharmacy, Tehran Univ Med Sci. 2015;23:26. Epub 2015/04/18.

2- Bortolaia V, Espinosa-Gongora C, Guardabassi L. Human health risks associated with antimicrobial-resistant enterococci and Staphylococcus aureus on poultry meat. Clinical Microbiol Infect. 2016;22(2):130-40. Epub 2015/12/27.

3- Daka D, S GS, Yihdego D. Antibiotic-resistance Staphylococcus aureus isolated from cow's milk in the Hawassa area, South Ethiopia. Annals of Clinical Microbiol Antimicrob. 2012;11:26. Epub 2012/01/01.

4- Gasc C, Richard JY, Peyret P. Genome Sequence of Staphylococcus aureus strain HUK16, isolated from Hexachlorocyclohexane-contaminated soil. Genome announcements. 2016;4(2). Epub 2016/04/16.

5- Wu X, Santos RR, Fink-Gremmels J. Analyzing the antibacterial effects of food ingredients: model experiments with allicin and garlic extracts on biofilm formation and viability of Staphylococcus epidermidis. Food Sci & Nutr. 2015;3(2):158-68. Epub 2015/04/04.

6- Kejela T, Bacha K. Prevalence and antibiotic susceptibility pattern of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) among primary school children and prisoners in Jimma Town, Southwest Ethiopia. Annals Clinical Microbiol Antimicrob. 2013;12:11. Epub 2013/06/05.

7- Simko S, Bartko P. Antibiotic resistance in Staphylococcus aureus mastitis in sheep, sheep milk and its products. Veterinarni medicina. 1996;41(8):241-4. Epub 1996/08/01. Rezistencia na antibiotika u Staphylococcus aureus pri mastitidach oviec, v ovcom mlieku a vyrobkoch z neho.

8- Snowden R, Harrington H, Morrill K, Jeane L, Garrity J, Orian M, *et al*. A comparison of the anti-Staphylococcus aureus activity of extracts from commonly used medicinal plants. J Alt Complement Med. 2014;20(5):375-82. Epub 2014/03/19.

9- Sama Fonkeng L, Mouokeu RS, Tume C, Njateng GS, Kamcthueng MO, Ndonkou NJ, *et al.* Anti-Staphylococcus aureus activity of methanol extracts of 12 plants used in Cameroonian folk medicine. BMC Res Notes. 2015;8:710. Epub 2015/11/26.

10- Purnavab S, Ketabchi S, Rowshan V. Chemical composition and antibacterial activity of methanolic extract and essential oil of Iranian Teucrium polium against some of phytobacteria. Nat Prod Res. 2015;29(14):1376-9. Epub 2015/01/15.

11- Sadeghi Z, Kuhestani K, Abdollahi V, Mahmood A. Ethnopharmacological studies of indigenous medicinal plants of Saravan region, Baluchistan, Iran. J. Ethnopharmacol. 2014;153(1):111-8. Epub 2014/02/11.

12- Mosaddegh M, Naghibi F, Moazzeni H, Pirani A, Esmaeili S. Ethnobotanical survey of herbal remedies traditionally used in Kohghiluyeh va Boyer Ahmad province of Iran. J. Ethnopharmacol. 2012;141(1):80-95. Epub 2012/03/01.

13- Boroomand N, Sadat-Hosseini M, Moghbeli M, Farajpour M. Phytochemical components, total phenol and mineral contents and antioxidant activity of six major medicinal plants from Rayen, Iran. Nat Product Res. 2017:1-4. Epub 2017/04/14.

14- Lu D, Jiao S, Tiezzi F, Knauer M, Huang Y, Gray KA, *et al.* The relationship between different measures of feed efficiency and feeding behavior traits in Duroc pigs. J Anim Sci. 2017;95(8):3370-80. Epub 2017/08/15.

15- Khani A, Heydarian M. Fumigant and repellent properties of sesquiterpene-rich essential oil from Teucrium polium subsp. capitatum (L.). Asian Pacific J Tropic Med. 2014;7(12):956-61. Epub 2014/12/07.

16- Guerrini A, Sacchetti G, Grandini A, Spagnoletti A, Asanza M, Scalvenzi L. Cytotoxic effect and tlc bioautography-guided approach to detect health properties of Amazonian Hedyosmum sprucei essential oil. Evidence-based Complement Alt Med: eCAM.;2016:1638342. Epub 2016/04/28.

17- Ahmad MS, Aslam MS, Hatim MI, Mamat AS, Nisar A. Antioxidant and Total Phenolic Content of Catharanthus roseus Using Deep Eutectic Solvent. Recent Adv Biol Med. 2017;03:7.

18- Su YC, Ho CL. Composition of the Leaf Essential Oil of Phoebe formosana from Taiwan and its

in vitro Cytotoxic, Antibacterial, and Antifungal Activities. Nat Prod Commun. 2016;11(6):845-8. Epub 2016/08/19.

19- Paredes A, Leyton Y, Riquelme C, Morales G. A plant from the altiplano of Northern Chile Senecio nutans, inhibits the Vibrio cholerae pathogen. Springer Plus. 2016;5(1):1788. Epub 2016/11/01.

20- Gazim ZC, Amorim AC, Hovell AM, Rezende CM, Nascimento IA, Ferreira GA, *et al.* Seasonal variation, chemical composition, and analgesic and antimicrobial activities of the essential oil from leaves of Tetradenia riparia (Hochst.) Codd in southern Brazil. Molecules. 2010;15(8):5509-24. Epub 2010/08/18.

21- Oganesian GB, Galstyan AM, Mantsatanyan VA, Shashakov AS, Agababjiyan PV. Phenyl propanoid glycosidded of Teucrium polium. Chem Nat Compounds. 1991;27(5):556-9.

22- Niazmand S, Erfanian-Ahmadpour M, Mousavian M, Saberi Z. The inotropic and chronotropic effects of aqueous ethanolic extract from Teucrium polium on guinea pig isolated heart. Iranian J Basic Med Sci. 2008;10(1):7-13.

23- Heidari MR, Karaminezhad-Ranjbar M, Dadvand E, Jalali S. Evaluation of the analgesic effect of Teucrium polium extract in mice. J Kerman Univ Med Sci. 1999;6(2)::67-76. (Persian).

24- Nadimi M ZM, Madani M. Effect of aqueous and ethanolic extracts of Teucrium polium on Candida albicans and two species of Malassezia. Zahedan J Res Med Sci. 2013;15(8):34-8 (Persian).

25- Mahmoudi R, Zare P, Nosratpour S, Mardani K, Safari A. Hygienic effects of Teucrium polium essential oil against Salmonella typhimorium LT2 in probiotic yoghurt. Urmia Medic J 2014;25(8):769-77.

26- Darabpour E, Motamedi H, Seyyed Nejad SM. Antimicrobial properties of Teucrium polium some clinical pathogens. Asian Pacific J Tropic Medicine. 2010:124-7.

27- Akin M, Oguz D, Saracoglu HT. Antibacterial activity of essential oil from Thymbra spicata var. spicata L. and Teucrium polium (Stapf Brig.). Int J Pharm Appl Sci. 2010;1:55-8.

Evaluation of Inhibitory and Bactericidal Effects of *Teocrum polium* Extracts on Isolated *Staphylococcus aureus* from Nasal Samples of Sistan Indigenous Sheep

Ali Maghsoudi[1,2,3,*], Saeideh Saeidi[3]

1- Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran.
2- Department of Bioinformatics, University of Zabol, Zabol, Iran.
3- Center of Agricultural Biotechnology, University of Zabol, Zabol, Iran.

Receive: September 3, 2018; Revise: October 22, 2018; Accept: February 15, 2019

Summary

Staphylococcus aureus is a gram positive bacterium which has been considered as one of the most common agents of food bacterial poisoning and also as a zoonotic disease. Therefore, the aim of the current study was to isolate different strains of *S. aureus* from nasal samples of sheep from Sistan region and to evaluate antibiotic resistance of the isolated bacteria against common antibiotics. Moreover, the antibacterial activity of ethanol, methanol and ethyl acetate extracts of *Teucrium polium* plant on *S. aureus* was assessed. The plant samples were gathered from Sistan region. Ethanol extracts of plant samples was obtained using vacuum from the center (rotary) apparatus. A total number of 10 *S. aureus* strains were isolated from the sheep nasal samples from Sistan region. Susceptibility to Oxacillin, Amoxicillin-clavulanic acid, ampicillin, Gentamicin, Cefazolin and Vancomycin antibiotics was evaluated by the Kirby-Bauer disk diffusion standard method. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of different concentrations of plant extracts were determined on bacteria using dilution in well method. Results of the current study indicated that all of the three ethanol, methanol and ethyl acetate extracts had various bactericidal effects on 10 isolated bacteria. Nevertheless, the ethyl acetate extract was batter than two other extracts due to its higher MIC and MBC in lower concentrations against *S. aureus*. Results obtained from the current study suggest that ethyl acetate extract of *T. polium* would be a suitable alternative for common antibiotics.

Keywords: *Antibiotics, Staphylococcus aureus, Minimum inhibitory concentration, Sistan, antimicrobial activity, Teucrium polium*