بررسی اثر ضد میکروبی اسانس مرزه (*Satureja hortensis* L.) بر تعدادی از میکروارگانیسم های بیماری‌زا و عامل فساد

مینا فراهانی[۱]، فخری شهیدی[۲*]، فریده طباطبایی یزدی[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۲- استاد، گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه فردوسی مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد گروه علوم و صنایع غذایی
۳- استاد، گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه فردوسی مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد گروه علوم و صنایع غذایی
(تاریخ دریافت: ۹۶/ ۱۱/۰۷ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۳/۰٤)

چکیده

هدف از این مطالعه ارزیابی ترکیبات شیمیایی و اثر ضد میکروبی اسانس گیاه مرزه (*Satureja hortensis* L.) بر *اشریشیا- کلی* ATCC 25922، *سودوموناس فلورسنس* OS8، *آلترناریا آلترناتا* PTCC 5224 و *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 2592 در شرایط آزمایشگاهی است. دراین مطالعه، اسانس مرزه از شرکت داروسازی باریج اسانس (ایران- کاشان) خریداری شد. آنالیز شیمیایی اسانس با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی و اسپکترومتری جرمی انجام شد. عملکرد ضد میکروبی اسانس با روش انتشار در آگار (دیسک و چاهک) و میکرودایلوشن براث طبق استاندارد CLSI تعیین گردید. نتایج نشان داد که ترکیبات اصلی در این اسانس ایزوپروپیل میریستات (۵۹/۱٤٪) و کارواکرول (۳۷/۸۳٪) بودند. اسانس بر همه ی سویه های مورد آزمایش موثر بود. حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) اسانس مرزه *براشریشیا کلی*، *سودوموناس فلورسنس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *آلترناریا آلترناتا* به ترتیب ۱،۲، ۰/۵و ۱ میلی گرم بر میلی لیتر بود. نتایج حاصل از بررسی اثر ضد میکروبی اسانس مرزه در روش انتشار در آگار نشان داد با کاهش غلظت اسانس، اثر بازدارندگی آن در همه ی سویه های مورد بررسی به طور موثری کاهش می یابد. لذا؛ می توان از اسانس مرزه در صنایع غذایی و دارویی به عنوان یک ماده ی طبیعی ضد میکروبی استفاده نمود. با توجه به نتایج حاصل و افزایش روز افزون مقاومت باکتری ها نسبت به آنتی‌بیوتیک های شیمیایی، پیشنهاد می گردد با مطالعات بیشتر روی ترکیبات ضد میکروبی این گیاه، امکان استفاده از آن ها برای درمان برخی از عفونت ها استفاده گردد.

کلمات کلیدی : مرزه (*Satureja hortensis*)، اسانس، اثر ضد میکروبی

[*] مسئول مکاتبات: fshahidi@ferdowsi.um.ac.ir

۱- مقدمه

بیماری های عفونی یکی از چالش های بزرگ علم پزشکی در قرن بیست و یکم است و به تبع آن، تولید آنتی‌بیوتیک های جدید روز به روز افزایش می یابد. در عین حال، بروز مقاومت روز افزون باکتری های بیماری‌زا و تغییر مداوم الگوهای حساسیت میکروارگانیسم ها به آنتی‌بیوتیک ها، درمان بیماری های عفونی را مشکل و پرهزینه کرده و مسئله نگران کننده، جان باختن بسیاری از انسان ها در اثر ابتلا به عفونت های مقاوم به درمان آنتی‌بیوتیکی است[۱ ، ۲]. باکتری ها عمومی ترین عامل در ارتباط با مسمومیت ها و عفونت های غذایی هستند. *استافیلوکوکوس اورئوس*[1] باکتری گرم مثبت کوکسی شکل از جمله مهمترین عوامل ایجاد کننده عفونت های بیمارستانی و اکتسابی از جامعه می باشد و به دلیل قدرت بیماری‌زایی بالقوه و مقاومت روز افزون در برابر عوامل ضد باکتریایی به یکی از مشکلات بهداشتی مهم در جهان تبدیل شده است. این باکتری توانایی ایجاد طیف وسیعی از بیماری ها را دارد و ازطریق تولید انواع توکسین ها، تهاجم مستقیم و تخریب بافت ها، تظاهرات بالینی متنوعی را پدید می آورد [۳]. *اشریشیا کلی*[2] باکتری میله ای گرم منفی از خانواده انتروباکتریاسه[3] و جز مهمترین باکتری ها به عنوان شاخص آلودگی مدفوعی مواد غذایی است. همچنین با داشتن ژن های حدت نقش مهمی را در ایجاد بیماری در انسان و حیوان ایفا می کند. شایع ترین عامل عفونت های بالینی در انسان؛ اسهال و بیماری های روده ای، عفونت های مجاری ادراری، سپتی سمی و مننژیت *باکتری اشریشیا کلی* است. *سودوموناس*[4] ها باکتری های میله ای گرم منفی، اکسیداز و کاتالاز مثبت هستند و بوسیله یک یا چند تاژک قطبی متحرک اند. *سودوموناس* ها فاکتورهای ساختمانی، آنزیم و توکسین های بسیاری به منظور افزایش ویرولانس و مقاومت به آنتی‌بیوتیک های معمول تولید می کنند. این جنس شامل گونه هایی با عملکرد های اکولوژیکی، اقتصادی و پزشکی است که برخی اعضای آن قادرند مواد شیمیایی آلوده کننده را در محیط متابولیزه کنند. با انتشار وسیع در خاک، مواد معدنی، گیاهان و آب یافت می شوند و قادرند در محیط های مرطوب با مقادیر بسیار کمی ازمواد غذایی رشد کنند که این توانایی باعث حضور مداوم آنها در محیط بیمارستان شده است [٤، ٥]. *آلترناریا*[5] جنسی از کپک ها و متعلق به رده ی دوترومیست ها است. ساپروفیت بوده و روی پیش ماده های زیادی رشد می کند. *آلترناریا* در انسان بیشتر باعث عفونت های پوستی می گردد، اما می تواند عامل عفونت های چشمی نیز باشد. به علاوه کونیدی های موجود در هوای گونه های این قارچ در افراد مبتلا به بیماری های مزمن پوستی، عامل بروز آسم می باشد [٦، ٧].

خواص ضد میکروبی گیاهان از دیرباز مورد توجه بوده و استفاده از آن ها به منظور درمان با تاریخ زندگی انسان هم زمان بوده است. از سوی دیگر، ایران به لحاظ موقعیت جغرافیایی و تنوع آب و هوایی یکی از بهترین مناطق جهان در زمینه رشد انواع مختلف گیاهان دارویی محسوب می شود و در گذشته نیز منبع تولید و مصرف گیاهان دارویی بوده است. خواص دارویی و درمانی گیاه به نوع و میزان ترکیبات موثره آن بستگی دارد. مواد موثره موجود در گیاهان به طور اساسی با هدایت فرایندهای ژنتیکی ساخته می شوند اما عوامل محیطی مانند شرایط آب و هوایی، بافت خاک و همچنین سن و مراحل رشد گیاه، روش خشک کردن و استخراج اسانس نیز باعث تغییرات کمی و کیفی در مواد موثره می شود [۸]. بهره گیری از روش های نوین، امکان شناسایی مواد موثره درمانگر موجود درگیاهان را فراهم کرده

1. *Staphylococcus aureus*
2. *Escherichia coli*
3. Enterobacteriaceae
4. *Pseudomonas*
5. *Alternaria*

است؛ لذا در سال های اخیر تحقیقات گسترده ای جهت بررسی و ارزیابی اثرات ضد میکروبی فرآورده هایی با منشاء گیاهی از جمله اسانس ها و ادویه ها صورت گرفته و نتایج بیانگر قدرت و توانایی این ترکیبات در ممانعت از رشد دامنه وسیعی از میکروارگانیسم های بیماری زا و عامل فساد می باشد [۹].

گیاه (*Satureja hortensis* L.) که به مرزه ی تابستانه معروف است و به خانواده نعناعیان[1] تعلق دارد، گیاهی است یک ساله یا چند ساله که منشاء اولیه ی آن نواحی مدیترانه بوده، اما به علت پراکندگی در تمام جنوب اروپا و نواحی دیگرمشاهده می گردد، پراکنش عمده آن در ایران، قفقاز، ترکمنستان، آناتولی و عراق است و در ایران ۱۲ گونه علفی یک ساله یا چند ساله دارد که ۸ گونه آن مختص ایران می باشد. مرزه دارای ساقه ای منشعب با ارتفاع ۳۰-۱۰ سانتی متر به رنگ سبز متمایل به خاکستری، برگ های نرم و تقریبا بدون دمبرگ، باریک، نوک تیز، پوشیده از کرک و دارای تارهای غده ای اسانس دار است [۱۰، ۱۱]. در مطالعات متعدد، خواص ضد میکروبی، ضد ویروسی و ضد قارچی، ضد اسپاسم، تقویت کننده معده و تسهیل کننده هضم این جنس گزارش شده است [۱۲، ۱۳].

جهت کاربردی کردن گیاهی در طب مکمل، بررسی اثرات ضد میکروبی آنها بر رشد باکتری های بیماری‌زا در شرایط آزمایشگاهی ضرورت دارد [۱٤]؛ اثرات ضد میکروبی عصاره و اسانس گیاه مرزه در دنیا شناخته شده است [۱۵،۱٦،۱۷] اما تا کنون مطالعه‌ی چندانی در مورد اثر ضد میکروبی اسانس مرزه برکپک *آلترناریا آلترناتا* و باکتری *سودوموناس فلورسنس* انجام نشده است. با توجه به اهمیت این سویه ها از نظر بیماری‌زایی، ایجاد فساد درمواد غذایی و نیز اقتصادی، در این پژوهش، ضمن بررسی مطالعات پیش‌تر، اثر ضد میکروبی اسانس مرزه علیه برخی از میکروارگانیسم های عامل عفونت و فساد مواد غذایی بررسی می شود.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- محیط کشت و سویه های میکروبی

این پژوهش در آزمایشگاه میکروبیولوژی صنعتی و فناوری های نوین دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد انجام پذیرفت. محیط کشت های مورد استفاده شامل مولرهینتون آگار[2]، مولر هینتون براث[3]، پوتیتو دکستروز آگار[4]، پوتیتو دکستروز براث[5](مرک آلمان) بود. ٤ سویه میکروبی که جهت ارزیابی فعالیت ضد میکروبی اسانس مرزه در شرایط آزمایشگاهی استفاده شدند، در جدول شماره ۱، آورده شده است. این سویه ها از دانشگاه فردوسی مشهد و سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران[6](IROST) تهیه شد و فعال سازی آن ها در شرایط استریل صورت گرفت. اسانس مرزه نیز از شرکت داروسازی باریج اسانس (کاشان- مشهد اردهال) خریداری شد.

Table 1 The Microorganism used in the study

Microorganism	Number
Escherichia coli	ATCC 25922
Staphylococcus aureus	ATCC 25923
Alternaria alternata	PTCC 5224
Pseudomonas fluorescens	OS8

۲-۲- مواد و دستگاه های مورد استفاده

مواد مصرفی و دستگاه های مورد استفاده در این پژوهش در جدول ۲، آمده است.

1. Lamiaceae

2. Muller Hinton Agar
3. Muller Hinton Broth
4. Potato Dextrose Agar
5. Potato Dextrose Broth
6. Iranian Research Organization for Science and Technology

Table 2 The Materials and Equipments

NO	Materials/Equipments	Company	Comments
1	Triphenyltetrazolium chloride-2,3,5(TTC)	SigmaAldrih USA	
2	Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Merck, Germany	
3	Ringer Tablets	Merck, Germany	
4	Gentamicin Antibiotic Disk	Padtanteb, Iran	
5	Vancomycin Antibiotic Disk	Padtanteb, Iran	
6	Amphotericin B Antibiotic Disk	Padtanteb, Iran	
7	Sterilized 96-well Microplates		
8	Syring Filter		0/45µm
9	Digital scale		EK 300i, 0.01
10	Incubator		Flash shaker CIT 53
11	Autoclave		Memmert
12	spectrophotometer		Sigma , 3-30K
13	sampler		Eppendorf

۲-۳- شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس

۲-۳-۱- مشخصات دستگاه گازکروماتوگرافی- طیف سنج جرمی

برای شناسایی ترکیبات اسانس مرزه از دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف نگار جرمی مدل TRACE MS (شرکت سازنده: ThermoQuset- Finnigan) دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی حاوی ستون DB-5 طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی متر و ضخامت فاز ساکن ۰/۲۵ میکرومتر متصل به طیف سنج جرمی مدل Quadrupole استفاده شد. ۰/۲ میکرولیتر از اسانس به دستگاه تزریق گردید. دمای ستون از ٤۰ درجه سانتی گراد تا ۲۵۰ درجه سانتی گراد با سرعت ۲/۵ درجه سانتی گراد بر دقیقه افزایش یافت. از گاز هلیم با سرعت ۱/۱ میلی لیتر در دقیقه و از انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون استفاده شد. نوع ترکیبات اسانس با کمک طیف نرمال آلکان ها و به دست آوردن شاخص بازداری آن (شاخص کوارتز) و مراجعه به فرهنگ ترکیبات طبیعی شناسایی گردید [۱۸].

۲-٤- ارزیابی اثر ضد میکروبی اسانس مرزه به روش های کمی و کیفی

۲-٤-۱- تهیه ی سوسپانسیون میکروبی

به منظور دستیابی به کشت فعال و تازه از باکتری های مورد آرمایش، ۲٤ ساعت قبل از انجام آزمایش، باکتری های منجمد را در دمای آزمایشگاه از انجماد خارج کرده و پس از کشت خطی آنها روی محیط کشت مولر هینتون آگار به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه گرمخانه گذاری گردیدند. از آنجا که تعداد باکتری های تلقیح شده یکی از مهمترین متغیرهایی است که بر نتیجه تحقیق اثر می گذارد، تراکم سوسپانسیون میکروبی تلقیحی باید استاندارد و معادل نیم مک فارلند ($۱/۵\times ۱۰^{۸}$CFU/ml) باشد؛ لذا پس از رشد کلنی های باکتری، سطح محیط کشت با محلول رینگر شسته و سوسپانسیون غلیظ میکروبی حاصل گردید. سپس مقداری از این سوسپانسیون به لوله های استریل درب دار حاوی محلول رینگر منتقل وکدورت آن با اسپکتروفوتومتر در طول موج ٦۳۰ نانومتر اندازه گیری شد. تا هنگام برابر شدن کدورت محلول با کدورت محلول نیم مک فارلند، توسط محلول رینگر رقیق گردید [۱۹]. سوسپانسیون تهیه شده در تعیین اثر ضد میکروبی اسانس به دو صورت کمی و کیفی مورد استفاده قرار گرفت. ارزیابی اثر ضد میکروبی اسانس به صورت کیفی به روش انتشار در اگار (دیسک و چاهک) و به صورت کمی با روش میکرودایلوشن براث و در پلیت ۹٦ خانه ی استریل جهت تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC)[1]انجام شد. پس از آن حداقل غلظت کشندگی (MBC)[2] تعیین شد. برای این منظور؛ ابتدا غلظتی برابر ۵۱۲ میلی گرم بر میلی لیتر از اسانس در محلول دی متیل سولفوکساید تهیه و با استفاده از فیلتر سرنگی با اندازه قطر ذرات ۰/٤۵ میکرومتر استریل شد و پس از آن غلظت های متوالی به ترتیب

1. Minimum Inhibitory Concentration
2. Minimum Bactericidal Concentration

۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۱،۰/۵، ۲، ۸،٤، ۱٦، ۳۲، ٦٤، ۱۲۸، ۲٥٦ میلی گرم بر میلی لیتر از اسانس تهیه گردید. روش های انتشار چاهک در آگار و انتشار دیسک جهت غربالگری اولیه فعالیت ضد میکروبی اسانس ها و عصاره های گیاهی به کار گرفته می شوند [۲۰].

۲-٤-۲- انتشار دیسک به روش کربی- بائر

در روش کیفی از روش انتشار دیسک به شیوه کربی- بائر[1] استفاده شد که طی آن از سوسپانسیون میکروبی استاندارد هر سوش بر سطح محیط مولر هینتون آگار (برای باکتری ها) و پوتیتودکستروز آگار (برای قارچ) کشت سطحی انجام گرفت، سپس دیسک های کاغذی بلانک توسط پنس استریل و در کنار شعله با فاصله ی معین از یکدیگر و از لبه ی پلیت بر سطح آگار آلوده به باکتری قرار داده شدند.۲۰ میکرولیتر از رقت های ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱،۲،٤ و ۸ میلی گرم بر میلی لیتر تهیه شده از اسانس به دیسک ها اضافه گردید. DMSO (حلال اسانس) به عنوان کنترل منفی و از دیسک های آنتی‌بیوتیک جنتامایسین و ونکومایسین به ترتیب برای باکتری های گرم منفی و گرم مثبت وآنتی‌بیوتیک آمفوتریپسین B به عنوان کنترل مثبت برای قارچ استفاده شد. محیط کشت حاوی باکتری و قارچ به ترتیب در دمای ۳۷ و ۲۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲٤ و ۷۲ ساعت گرمخانه گذاری شدند. قطر هاله های تشکیل شده در اطراف دیسک ها بوسیله خط کش اندازه گیری و به صورت میلی متر گزارش شد. نتایج حاصل از آنتی‌بیوتیک ها با جداول انستیتوی استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی[2](CLSI) مقایسه گردید [۲۱].

۲-٤-۳- انتشار چاهک در آگار

در روش انتشارچاهک مانند روش انتشار در آگار به کمک دیسک کشت یکنواخت از سوسپانسیون میکروبی استاندارد هر سوش بر محیط های کشت انجام شد. سپس در هر پلیت ۵ چاهک به قطر ٦ میلی متر با استفاده از انتهای پیپت پاستور استریل در سطح محیط کشت ایجاد شد وته چاهک ها با استفاده از محیط کشت مذاب آگار پوشانده شد. هر یک از چاهک ها با ۲۰ میکرولیتر ازغلظت های ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵،۱،۲، ٤ و ۸ تهیه شده از اسانس پر شد. چاهک هشتم پنجم نیز به عنوان شاهد با محلول DMSO پر شد. پس از گرمخانه گذاری به مدت معین، کشت های میکروبی از نظر تشکیل یا عدم تشکیل هاله عدم رشد در اطراف چاهک ها مورد بررسی قرار گرفتند و قطر هاله عدم رشد بوسیله خط کش اندازه گیری و برحسب میلی متر گزارش شد [۲۲].

۲-٤-۵- تعیین حداقل غلظت بازدارندگی از رشد (MIC)

به منظور تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی از روش میکرودایلوشن در پلیت ۹٦ خانه ای استریل استفاده شد. ۷۰ میکرولیتر محیط کشت مولر هینتون براث (برای باکتری ها) و پوتیتو دکستروز براث (برای قارچ ها) به چاهک ها اضافه شد. ۷۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی نیم مک فارلند که حاوی برای هر یک از سوش ها به چاهک های میکروپلیت اضافه شد. سپس ۷۰ میکرولیتر از رقت های مختلف تهیه شده از اسانس به هر چاهک اضافه گردید. چاهک های حاوی سوسپانسیون میکروبی و محیط کشت به عنوان کنترل مثبت و چاهک های حاوی محیط کشت بدون میکروارگانیسم و اسانس به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شدند سپس گرمخانه گذاری میکروپلیت ها به مدت ۲٤ و ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ و ۲۷ به ترتیب برای باکتری و قارچ انجام شد. در مرحله ی بعد ۲۰ میکرولیتر از نمک تترازولیوم حل شده در آب مقطر (با غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر به چاهک ها اضافه شدو به مدت نیم ساعت برای باکتری ها و ۲٤ ساعت برای قارچ گرمخانه گذاری شد. پس از گذشت مدت زمان ذکر شده در خانه هایی که میکروب رشد کرد، رنگ قرمز تیره یا ارغوانی ایجاد شد و اولین خانه ای که در آن رشد میکروبی روی نداد و رنگ قرمز تشکیل نشد، به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی رشد گزارش شد [۲۰، ۲۳].

۲-٤-٦- تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC)

از غلظتی که به عنوان MIC گزارش شد و غلظت های بیشتر از آن ۵ میکرولیتر روی محیط کشت مولر هینتون آگار برای باکتری ها و محیط کشت پوتیتو دکستروز آگاربرای قارچ کشت داده شد و پس از گرمخانه گذاری، پلیت ها از نظر رشد باکتری مورد بررسی قرار گرفتند. غلظتی که در آن هیچ گونه باکتری رشد نکرده بود به عنوان حداقل غلظت باکتری/ قارچ کش گزارش شد [۲٤].

1. Kirby–Bauer
2. Clinical and Laboratory Standards Institute

۲-۵- تجزیه و تحلیل آماری

در این پژوهش کلیه ی آزمون های بررسی اثر ضد میکروبی اسانس در سه تکرار انجام شدند. نتایج بدست آمده با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال ۹۵ درصد انجام پذیرفت. جهت تجزیه و تحلیل داده ها از نرم افزار آماری SPSS نسخه۲۰ (SPSS Inc. Chicago,USA) استفاده شد. نمودار ها با استفاده از نرم‌افزار EXCEL ترسیم شدند.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- شناسایی ترکیبات اسانس مرزه

ترکیبات شیمیایی اسانس ها با توجه به موقعیت جغرافیایی، محل رشدگیاه (نوع خاک، آب و هو، ارتفاع از سطح دریا و میزان آب موجود) می تواند متفاوت باشد و در نتیجه متابولیت های ثانویه متنوعی تحت شرایط محیطی و نیز ژنتیکی متفاوت بیوسنتز می شود. استفاده صحیح از گیاهان دارویی مستلزم اطلاعات دقیق و شناخت ترکیبات شیمیایی موجود در آن ها است، زیرا وجود ترکیبات شیمیایی درگیاه باعث اثر درمانی می گردد [۲۵].

نتایج حاصل از آنالیز اسانس مرزه در جدول ۳، آورده شده است. در آنالیز اسانس مرزه به روش گاز کروماتوگرافی جرمی[1](GC-MS)، ۱۶ ترکیب شناسایی شد که ترکیبات عمده آن را (۵۹/۱۴٪) ایزوپروپیل میریستات و (۳۷/۸۳٪) کارواکرول تشکیل می دهند. علاوه بر این ترکیبات اصلی دیگر شامل ایزوپروپیل دودکانوات(۰/۱٪)، تیمول(۰/۳۳٪) ، لیمونن (۰/۱٪) ، پارا سیمین (۰/٤٤٪) نیز ترکیبات غالب بودند. نتیجه این تحقیق با نتایج سایر پژوهشگران تا حدود زیادی همخوانی داشت [۲۶،۲۷،۲۸،۲۹].

براساس تجزیه شیمیایی انجام شده ترکیبات ضدمیکروبی اسانس ها به طورعمده شامل ترپن ها و دیگر ترکیب ها با ماهیت فنولیک یاگروه هیدروکسیل آزاد بود که همگی به عنوان فعال ترین ترکیب های ضدمیکروبی شناخته شده اند، این ترکیبات درگیاه مورد مطالعه نیز شناسایی گردیدند. ترکیبات فنولی اسانس در لایه فسفولیپید غشاء سلول گیاه ساخته شده و هر چقدر میزان

مواد این ترکیبات، فنولی در اسانس بیشتر باشد خواص ضد میکروبی آن نیز بیشتر می گردد [۳۰]. نتایج تحقیقات یعقوبی و همکاران(۲۰۰۷) نیز اثرات ضد باکتریایی ترکیبات فنولی و فلاوونوئید ها را تائید کرده است [۳۱].

محبوبی و کاظم پور (۲۰۱۱) ترکیب شیمیایی و اثر ضد میکروبی دو اسانس مرزه و زنیان را بر تعدادی باکتری گرم مثبت وگرم منفی مورد بررسی قرار داده و با یکدیگر مقایسه کردند. نتایج نشان داد تیمول، گاماترپینن و پارا سیمن عمده ترین ترکیبات اسانس زنیان و مرزه بود. وجود ترکیب فنولی تیمول در هر دو اسانس نقش موثری در اثر ضد میکروبی آنها ایفا می کند. اثر ضد میکروبی تیمول به دلیل آسیب دیدن یکپارچگی غشاء سلولی می باشد که باعث تغییر در هموستازی pH و از دست دادن تعادل یونی می گردد. پارا سیمن به تنهایی خاصیت ضد میکروبی نداشته و اثر ضد میکروبی تیمول و کارواکرول را افزایش می‌دهد [۲۹].

Table 3 Compounds identified in the using gas chromatography mass spectrometry (GC-MS)
[a]KI: The Kovats retention indices relative to n-alkanes were determined on DB5column capillary column

NO	Compound name	%	KI[a]
1	α-Pinene	0.04	934
2	Camphene	0.02	950
3	p-Cymene	0.44	1026
4	Limonene	0.1	1030
5	1,8-Cineol	0.8	1033
6	Terpinene(gamma)	0.04	1059
7	p-Allylanisole	0.87	1204
8	Thymol	0.33	1305
9	Carvacrol	37.83	1322
10	Spathulenol	0.07	1584
11	Isopropyl dodecanoate	0.1	1628
12	Tridecanoic acid	0.04	1727
13	Isobicyclogermacrenal	0.04	1743
14	Isopropyl Myristate	59.14	1838
15	n-Nonadecane	0.02	1898
16	Isopropyl Palmitate	0.12	1024

1. Gas chromatography–mass

۳-۲- نتایج ارزیابی اثر ضد میکروبی اسانس مرزه

۳-۲-۱- نتایج ارزیابی اثر ضد میکروبی اسانس مرزه به روش انتشار در آگار(دیسک و چاهک)

نتایج حاصل از اندازه گیری قطر هاله عدم رشد به روش انتشار در اگار (دیسک و چاهک) نشان داد، که اسانس مرزه بر همه ی میکروارگانیسم های مورد بررسی موثر بوده است. از نظر تئوری قطر هاله که نشان دهنده عدم رشد میکروب ها (ریزاندام ها) می باشد، عکس العملی از غلظت ماده موثره موجود در گیاه است [۳۲]. این پدیده یک ارتباط خطی بین اندازه قطر هاله عدم رشد و لگاریتم غلظت ماده مورد آزمایش است . نتایج حاصل از بررسی اثر ضد میکروبی اسانس در هر دو روش ذکر شده نشان داد با کاهش غلظت اسانس اثر بازدارندگی آن نیز کاهش می یابد به طوری که غلظت ۰/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر بر هیچ یک از باکتری های مورد آزمون موثر نبوده و نتوانسته هاله عدم رشد ایجاد کند. براساس نتایج حاصل کمترین میانگین قطر هاله عدم رشد مربوط به غلظت ۰/۵ درصد بود که در روش چاهک گذاری با میانگین قطر ۸/۳۳ و ۹/۸۳ میلی متر و در روش دیسک ۷/٤ و ۹/۷٦ میلی متر به ترتیب برای کپک *آلترناریا* و باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* می باشد. بیشترین میانگین قطر هاله نیز در غلظت ۸ درصد با مقادیر ۱٤/۱٦، ۱۵/۳۳، ۱۸/۱٦ و ۱۹/۵ میلی متر در روش چاهک گذاری و در روش دیسک با مقادیر ۱۱/۳۳، ۱۲/۷، ۱٤ و ۱۵/۵۳ به ترتیب برای باکتری *اشریشیا کلی*، *سودوموناس فلورسنس*، *آلترناریا آلترناتا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* می باشد.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد، وجود یا عدم وجود تفاوت معنی دار بین میانگین قطر هاله عدم رشد در غلظت های مختلف را می توان به مقدار ماده موثر موجود در اسانس نسبت داد. ارتباط مستقیمی بین افزایش غلظت اسانس و افزایش اثر مهارکنندگی وجود دارد. به طور کلی می توان نتیجه گرفت که با افزایش غلظت، قطر هاله عدم رشد به طور معنی داری افزایش می یابد ($p<۰/۰۵$). نتایج حاصل از بررسی اثر ضد میکروبی اسانس مرزه به روش دیسک دیفیوژن و چاهک در آگار به ترتیب در شکل های ۲ و ۳، آورده شده است.

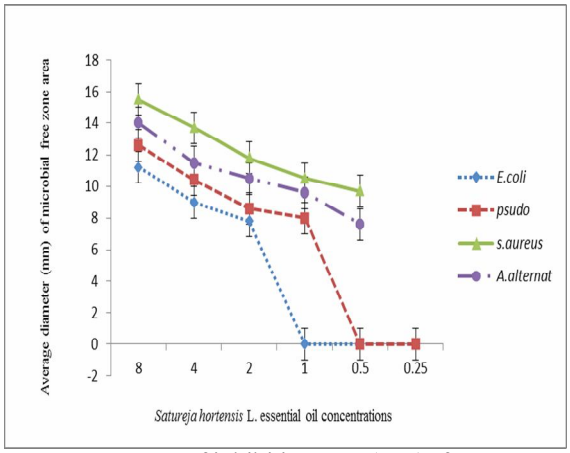

Fig 2 Average of inhibition zone(mm)of *Satureja hortensis* L. essential oil concentrations on some pathogenic bacteria and fungi Disk Diffusion Agar

متوسط قطر هاله ی عدم رشد اسانس مرزه در روش دیسک دیفیوژن برای باکتری های گرم منفی، باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* وکپک *آلترناریا* به ترتیب ۹/۷، ۱۲/۳ و ۱۰/۷٦ میلی متر و برای آنتی‌بیوتیک های وانکومایسین، جنتامایسین و آمفوتریسین B به ترتیب حدود ۱۳، ۱٦/۲۵ و ۱۱/۳ میلی متر، و متوسط قطرهاله ی عدم رشد در روش چاهک گذاری برای باکتری های گرم منفی، گرم مثبت وکپک *آلترناریا* به ترتیب ۱٤/۱۱،۳۵/۸۷ و ۱۰/۹٤ میلی متر بود. همچنین بررسی نتایج آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) نشان دادکه فعالیت ضد میکروبی اسانس وابسته به غلظت می باشد، به نحوی که با افزایش غلظت اسانس، قطر هاله بازدارندگی به طور معنی دار افزایش یافت($p<۰/۰۵$).

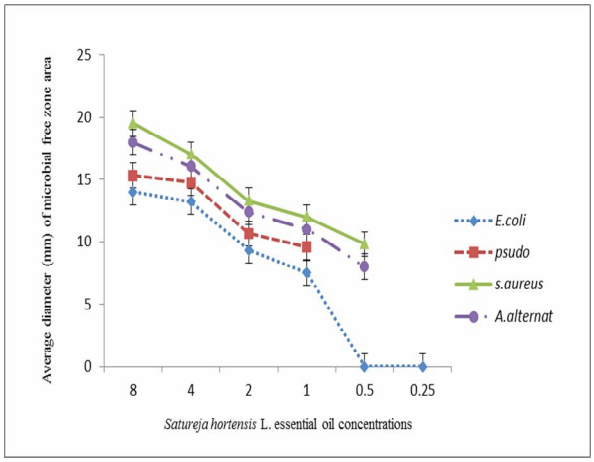

Fig 3 Average of inhibition zone(mm)of *Satureja hortensis* L. essential oil concentrations on some pathogenic bacteria and fungi Well Diffusion Agar

پیربلوطی وهمکاران (۲۰۱۲) اثر ضد باکتریایی اسانس مرزه بختیاری (*Satureja bachtiarica Bunge*) را به روش دیسک و رقیق سازی در محیط مایع بر باکتری های گرم مثبت *باسیلوس سرئوس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا مونوسیتوژنز* و باکتری های گرم منفی *پروتئوس ولگاریس* و *سالمونلا تیفی موریوم* مورد بررسی قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد، اسانس مرزه بختیاری به دلیل وجود ترکیبات فنولی تیمول و کارواکرول اثر ضد میکروبی قوی بر باکتری های مورد مطالعه داشته و بیشترین اثر مهارکنندگی مربوط به دو باکتری گرم مثبت *باسیلوس سرئوس* و *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* گزارش شد [۳۳].

حیدری سورشجانی و همکاران (۲۰۱۳) اثر ضد میکروبی عصاره های آبی، اتانولی، متانولی و گلیسیرین مرزه بختیاری را بر *استرپتوکوکوس پیوژنز* و *سودوموناس آئروژینوزا* مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهش نشان داد عصاره آبی و الکلی مرزه بختیاری اثر بازدارندگی قوی بر پاتوژن های مورد مطالعه داشته و بیشترین اثر مهارکنندگی بر باکتری گرم مثبت *استرپتوکوکوس پیوژنز* گزارش شد [۳٤].

طباطبایی یزدی و همکاران (۲۰۱٤) اثر ضد میکروبی رزماری و اسطوخودوس را بر شش سوش میکروبی گرم مثبت و گرم منفی در شرایط ازمایشگاهی مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که اثر ضد میکروبی رزماری و اسطوخودوس بر باکتری های گرم مثبت به مراتب بیشتر از باکتری های گرم منفی می باشد [۳۵].

نتایج آزمون دیسک دیفیوژن و چاهک در آگار نشان داد، قطر هاله بازدارندگی در روش چاهک بیشتر از روش دیسک می باشد، که علت آن را می توان به نفوذ بهتر اسانس در محیط کشت و تماس مستقیم بین اسانس و باکتری در روش چاهک و ناکارآمدی روش دیسک در جذب کافی اسانس و انتشار آن درون محیط کشت نسبت داد. بیشترین قطر هاله عدم رشد در هر دو روش چاهک گذاری و دیسک دیفیوژن ۱۹/۵ و ۱۵/۵۳ میلی متر در غلظت ۸ درصد گزارش شد که مربوط به باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* بود. صالحی و همکاران (۲۰۰۷) اثر ضد میکروبی قسمت های هوایی گیاه *Nepeta ispahanica* (نوعی گیاه بومی ایران و متعلق به خانواده نعناعیان)، را مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که رشد باکتری های گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیس* و *باسیلوس سوبتیلیس*) نسبت به باکتری های گرم منفی (*اشریشیا کلی*، *کلبسیلا پنومونیه* و *سودوموناس آئروژنوزا*) در غلظت های کمتری از اسانس گیاهی متوقف شد و اسانس گیاه بشترین اثر را بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* با قطر هاله عدم بازدارندگی ۲٤/۳ میلی متر داشت حساسیت بیشتر باکتری های گرم مثبت نسبت به گرم منفی اختلاف دیواره سلولی می باشد که مورد تایید اکثر پژوهشگران نیز می باشد [۳٦، ۳۷،۳۸] .

۳-۲-۲- نتایج حداقل غلظت بازدارندگی از رشد(MIC) و حداقل غلظت کشندگی(MBC/MFC) اسانس مرزه

نتایج مربوط به حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) به روش میکرودایلوشن براث و حداقل غلظت بازدارندگی از رشد (MBC/MFC) اسانس مرزه بر میکروارگانیسم های مورد مطالعه در جدول ٤، آمده است نتایج نشان داد که MIC اسانس برای باکتری های *اشریشیا کلی*، *سودوموناس فلورسنس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و کپک *آلترناریا آلترناتا* به ترتیب ۱،۰/۵،۱،۲ میلی گرم بر میلی لیتر و MBC نیز به ترتیب باکتری های ذکر شده ٤، ۲، ۱و ۱ میلی گرم بر میلی لیتر بود. بنابراین می توان نتیجه گرفت، مقاوم ترین باکتری، باکتری گرم منفی *اشریشیا کلی* بود.

Table 4 MIC and MBC/MFC of *Satureja hortensis* L. essential oil on some pathogenic bacteria and fungi

Microorganism	MIC(mg/ml)	MBC/MFC(mg/ml)
Escherichia coli	2	4
Pseudomonas fluorescens	1	2
Staphylococcus aureus	0.5	1
Alternaria alternata	1	1

با توجه به نتایج حاصل از ارزیابی اثر ضد میکروبی اسانس مرزه بر میکروارگانیسم های مورد مطالعه می توان میکروارگانیسم ها را از مقاوم ترین به حساس ترین به ترتیب؛ باکتری های گرم منفی *اشریشیاکلی*، *سودوموناس فلورسنس*، کپک *آلترناریا آلترناتا* و باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* در برابر غلظت های مختلف اسانس مرزه در این پژوهش معرفی کرد.

سرانو و همکاران (۲۰۱۱) اثر ضد باکتریایی عصاره مرزه زمستانی (*Satureja montana* L.) را بر باکتری های *بروکوتریکس ترموسفاکتا*، *لیستریا مونوسیتوژنز*، *لیستریا اینوکووا*، *سودوموناس پوتیدا*، *سالمونلا تیفی موریوم*، *شوانلا پوتریفشینس* مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد حداقل غلظت بازدارنده عصاره مرزه زمستانی بر باکتری های مورد بررسی در محدوده ۰/۸ تا ۲/۱ میلی گرم بر میلی لیتر بود. باکتری گرم مثبت *بروکوتریکس ترموسفاکتا* با حداقل غلظت بازدارنده برابر با ۰/۸ میلی گرم بر میلی لیتر حساس ترین و باکتری های گرم *منفی اشریشیا کلی*، *سالمونلا* و *شوانلا* با حداقل غلظت بازدارنده برابر با ۲/۱ میلی گرم بر میلی لیتر مقاوم ترین باکتری ها به عصاره بودند [۳۹].

میهاجیلو و همکاران (۲۰۰۹) اثر ضد میکروبی اسانس مرزه را با استفاده از روش رقت سازی در چاهک بر تعدادی از باکتری های گرم مثبت و گرم منفی مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد حداقل غلظت مهارکننده اسانس مرزه بر باکتری های در محدوده ی ۰/۷۸ تا ۵۰ میکرولیتر بر میلی لیتر بود. *کلبسیلا اکسی توکا*، *اسینتوباکتر* و *استافیلوکوکوس اورئوس*، حساس ترین باکتری ها بودند و حداقل غلظت مهارکننده اسانس برای این باکتری ها به ترتیب ۰/۷۸، ۳/۱۲۵ و ۳/۱۲۵ µl/ml بود. باکتری گرم منفی *سودوموناس آئروژینوزا* با حداقل غلظت مهارکننده ۵۰ µl/ml مقاوم ترین باکتری نسبت به اثر ضد میکروبی اسانس مرزه بود [۱۶].

نتایج نشان داد، اثر ضد میکروبی اسانس بسته به نوع میکروارگانیسم متفاوت می باشد. به طورکلی باکتری های گرم مثبت نسبت به باکتری های گرم منفی حساسیت بیشتری نسبت به اسانس مرزه از خود نشان می دهند و رشد باکتری های گرم مثبت نسبت به گرم منفی در غلظت کمتری از اسانس متوقف شود علت آن اختلاف ساختمان دیواره باکتری گرم مثبت به گرم منفی می باشد. به طوری که باکتری های گرم مثبت در دیواره ی سلولی خود دارای ترکیب موکوپپتید بوده، در حالی که باکتری های گرم منفی فقط لایه نازکی از موکوپپتید دارند و قسمت اعظم ساختمان دیواره در آنها لیپوپروتئین و لیپوپلی ساکارید است. به همین دلیل باکتری های گرم منفی مقاوم ترند. در نتیجه مقاومت بالاتر باکتری های گرم منفی را می توان به حضور غشای فسفولیپیدی خارجی تقریبا غیر قابل نفوذ به ترکیبات چربی دوست نسبت داد. با توجه به تعداد ترکیبات شیمیایی در اسانس گیاهان، نمی توان مکانیسم واحدی برای اثرات ضد میکروبی آنها در نظر گرفت، بلکه آنها هدف های متعددی در سلول خواهند داشت. این مکانیسم ها جداگانه عمل نمی کنند و بعضی از آنها توسط سایرین تحت تاثیر قرار می گیرد. به نظر می رسد ترکیبات فنولی موجود دراسانس از طریق تغییر ساختار و عمل غشاء سلولی اثرات ضدمیکروبی خود را اعمال می کنند. این ترکیبات با افزایش نفوذپذیری غشاء منجر به افزایش حجم و متورم شدن سلول می شوند [۲۴].

باکتری های گرم منفی غشاء دولایه دارند که لایه پپتیدوگلیکان در فضایی بین غشای داخلی و خارجی به نام فضای پری پلاسمی قرار دارد. پری پلاسم بسیار فعال بوده و دارای آنزیم های مختلف تجزیه کننده و سم زدا است. آنزیم های موجود در فضای پری پلاسمی (فسفاتاز و پروتئازها از گروه آنزیم های تجزیه ای و بتالاکتامازها) پنی سیلیناز و آنزیم های فسفوریله کننده آمینوگلیکوزید از گروه آنزیم های سم زدا قادرند مولکول های وارد شده را تجزیه کنند. در مورد باکتری های گرم مثبت مواد ضدمیکروبی به راحتی دیواره سلولی و غشاء سیتوپلاسمی را تخریب نموده که منجر به نشت سیتوپلاسم و انعقاد آن می شود. مکانیسم دیگر توانایی ترکیبات فنولی در اتصال با پروتئین ها است. این ترکیبات با تخریب گیرنده های سطحی دیواره باکتری ها، در سنتز پروتئین ها اختلال ایجاد می کنند؛ لذا دلیل بالاتر بودن حداقل غلظت کشندگی میکروارگانیسم های گرم منفی با توجه به توضیحات گفته شده به خوبی توجیه می شود [۴۰، ۴۱].

بیماری های عفونی و مسمویت زا طیف وسیعی از بیماری ها را تشکیل می دهند، همچنین افزایش استفاده از آنتی بیوتیک ها و یا عدم رعایت دوز مصرف شده توسط بیماران منجر به گسترش مقاومت باکتری ها به آنتی بیوتیک ها گردیده است [۴۲]. با توجه

به موقعیت جغرافیایی و تنوع آب و هوایی در بخش های مختلف ایران و شناخت روزافزون گیاهان داروئی، در سال های اخیر تحقیقات زیادی جهت ارزیابی آثار ضد میکروبی انواع اسانس، عصاره و ادویه ها صورت گرفته است، که حاکی از قدرت و توانایی این ترکیبات در ممانعت از رشد دامنه وسیعی از میکروارگانیسم ها ی بیماری زا و عامل فساد می باشد [۹].

٤- نتیجه گیری

با توجه به نتایج بدست آمده از این پژوهش می توان گفت که اسانس مرزه در شرایط "In Vitro" فعالیت ضد میکروبی قابل ملاحظه ای بر سویه های مورد مطالعه داشت؛ لذا با انجام مطالعات بالینی در این زمینه می توان این اسانس را به عنوان یک ماده ی ضد میکروبی طبیعی برای شناسایی روش های درمانی کم هزینه و دارای عوارض جانبی کمتر در درمان بسیاری از بیماری ها معرفی نمود.

٥- منابع

[1] Şahin, F., Karaman, I., Güllüce, M., Öğütçü, H., Şengül, M., Adıgüzel, A., Kotan, R. (2003). Evaluation of antimicrobial activities of Satureja hortensis L .*Journal of ethnopharmacology, **87***(1), 61-65 .

[2] Tongnuanchan, P., & Benjakul, S. (2014). Essential oils: extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. *Journal of Food Science, **79***(7).

[3] Archer, N. K., Mazaitis, M. J., Costerton, J. W., Leid, J. G., Powers, M. E., & Shirtliff, M. E. (2011). Staphylococcus aureus biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence, **2***(5), 445-459 .

[4] Garrido-Sanz, D., Meier-Kolthoff, J. P., Göker, M., Martín, M., Rivilla, R., & Redondo-Nieto, M. (2016). Genomic and genetic diversity within the Pseudomonas fluorescens complex. *PloS one, **11***(2), e0150183 .

[5] Meyer, J. a., & Abdallah, M. (1978). The fluorescent pigment of Pseudomonas fluorescens: biosynthesis, purification and physicochemical properties. *Microbiology, **107***(2), 319-328 .

[6] Jawetz, M. (2010). Adelberg's Medical Microbiology> Chapter 17. *Vibrios, Campylobacters, Helicobacter, & Associated Bacteria>, 25th Edition edn* .

[7] Meme, W., Weatherall, M., Perrin, K., Crane, J., & Beasley, R. (2009). International trends in asthma mortality rates in the 5-to 34-year age group. *Chest, **135***(4), 1045-1049 .

[8. Rustaiyan, A., Masoudi, S., Yari, M., Rabbani, M., Motiefar, H. R., & Larijani, K. (2000). Essential oil of Salvia lereifolia Benth. *Journal of Essential Oil Research, **12***(5), 601-602 .

[9. Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews, **12***(4), 564-582 .

[10. Lahooji, A., Mirabolfathy, M., & Karami-Osboo, R. (2010). Effect of Zataria multiflora and Satureja hortensis essential oils, thymol and carvacrol on growth of Fusarium gramineum isolates and deoxynivalenol production. *Iranian Journal of Plant Pathology, **46***(1).

[11. Deans, S., & Svoboda, K. P. (1989). Antibacterial activity of summer savory (Satureja hortensis L) essential oil and its constituents. *Journal of Horticultural Science, **64***(2), 205-210 .

[12. Dorman, H., & Hiltunen, R. (2004). Fe (III) reductive and free radical-scavenging properties of summer savory (Satureja hortensis L.) extract and subfractions. *Food Chemistry, **88***(2), 193-199 .

[13. Hajhashemi, V., Zolfaghari, B., & Yousefi, A. (2012). Antinociceptive and anti-inflammatory activities of Satureja hortensis seed essential oil, hydroalcoholic and polyphenolic extracts in animal models. *Medical Principles and Practice, **21***(2), 178-182.

[14. Andrade, E. H. A., Alves, C. N., Guimarães, E. F ,.Carreira, L. M. M., & Maia, J. G. S. (2011). Variability in essential oil composition of Piper dilatatum LC Rich. *Biochemical systematics and ecology, **39***(4), 669-675 .

[15. Kotan, R., Dadasoğlu, F., Karagoz, K., Cakir, A., Ozer, H., Kordali, S., Dikbas, N. (2013). Antibacterial activity of the essential oil and extracts of Satureja hortensis against plant pathogenic bacteria and their potential

depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry,* ***100***(2), 553-559.

[25] Daferera, D. J., Ziogas, B. N., & Polissiou, M. G. (2000). GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on Penicillium digitatum. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* ***48***(6), 2576-2581 .

[26] Baher, Z. F., Mirza, M., Ghorbanli, M., & Bagher Rezaii, M. (2002). The influence of water stress on plant height, herbal and essential oil yield and composition in Satureja hortensis L. *Flavour and Fragrance Journal,* ***17***(4), 275-277 .

[27] Fathi, A., Sahari, M., Zangiabadi, M., & Barzegar, M. (2011). Application of Satureja hortensis L. and Zataria multiflora Boiss. Essential Oils as Two Natural Antioxidants in Soybean Oil During Microwave Heating. *Journal of Medicinal Plants,* ***3***(39), 12-21 .

[28] Güllüce, M., Sökmen, M., Daferera, D., Ağar, G., Özkan, H., Kartal, N., Şahin, F. (2003). In vitro antibacterial, antifungal, and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of herbal parts and callus cultures of Satureja hortensis L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* ***51***(14), 3958-3965 .

[29] Mahboubi, M., & Kazempour, N. (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of Satureja hortensis and Trachyspermum copticum essential oil. *Iranian journal of microbiology,* ***3***(4), 194 .

[30] Moreira, M., Ponce, A., Del Valle, C., & Roura, S. (2005). Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT-Food Science and Technology,* ***38***(5), 565-570 .

[31] Yaghoubi, M., Gh, G., & Satari, R. (2007). Antimicrobial activity of Iranian propolis and its chemical composition. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences,* ***15***(1), 45-48 .

[32] Neef, H., Declercq, P., & Laekeman, G. (1995). Hypoglycaemic activity of selected European plants. *Phytotherapy Research,* ***9***(1), 45-48.

[33] Pirbalouti, A. G., Malekpoor, F., Enteshari, S., Yousefi, M., Momtaz, H., & Hamedi, B. (2010). Antibacterial activity of some folklore medicinal plants used by Bakhtiari tribal in use as seed disinfectants. *Scientia Horticulturae, 153,*34-41.

[16] Mihajilov-Krstev, T., Radnović, D., Kitić, D., Stojanović-Radić, Z., & Zlatković, B. (2010). Antimicrobial activity of Satureja hortensis L. essential oil against pathogenic microbial strains. *Archives of Biological Sciences,* ***62***(1), 159-166 .

[17] Oke, F ,.Aslim, B., Ozturk, S., & Altundag, S. (2009). Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of Satureja cuneifolia Ten. *Food Chemistry,* ***112***(4), 874-879 .

[18] Küçükbay, F. Z., Kuyumcu, E., Çelen, S., Azaz, A. D., & Arabaci, T. (2014). Chemical composition of the essential oils of three Thymus taxa from Turkey with antimicrobial and antioxidant activities. *Records of Natural Products,* ***8***(2), 110 .

[19] Valero, M., & Salmeron, M. (2003). Antibacterial activity of 11 essential oils against Bacillus cereus in tyndallized carrot broth. *International Journal of Food Microbiology,* ***85***(1), 73-81 .

[20] Behbahani, B. A., Shahidi, F., Yazdi, F. T., Mortazavi, S. A., & Mohebbi, M. (2017). Use of Plantago major seed mucilage as a novel edible coating incorporated with Anethum graveolens essential oil on shelf life extension of beef in refrigerated storage. *International Journal of Biological Macromolecules, 94*, 515-526 .

[21] Wayne, P. (2007). Clinical and laboratory standards institute. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 17* .

[22. Afsharzadeh, M., Naderinasab, M., Najaran, Z. T., Barzin, M., & Emami, S. A. (2013). In-vitro antimicrobial activities of some iranian conifers. *Iranian journal of pharmaceutical research, IJPR,* ***12***(1), 63 .

[23] Corbo, M., Speranza, B., Filippone, A., Granatiero, S., Conte, A., Sinigaglia, M., & Del Nobile, M. (2008). Study on the synergic effect of natural compounds on the microbial quality decay of packed fish hamburger. *International Journal of Food Microbiology,* ***127***(3), 261-267 .

[24] Celiktas, O. Y., Kocabas, E. H., Bedir, E., Sukan, F. V., Ozek, T., & Baser, K. (2007). Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of Rosmarinus officinalis,

Southwest Iran. *International Journal of Biology,* 2(2), 55.

[34] Heidari Sureshjani, M., Tabatabaei Yazdi, F., Mortazavi, S. A., Shahidi, F., & Alizadeh Behbahani, B. (2013). Antimicrobial effect of Satureja bachtiarica extracts aqueous and ethanolic on Escherichia coli and Staphylococcus aureus. Scientific Journal of Biological Sciences, 2 .

[35] Yazdi, F. T., Behbahani, B. A., & Mortazavi, A. (2014). Investigating the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of the Lavandula stoechas L. and Rosmarinus officinalis L .extracts on pathogen bacterias "in vitro". Journal of Paramedical Sciences, 5(2).

[36] Bachir, R. G., & Benali, M. (2012). Antibacterial activity of the essential oils from the leaves of Eucalyptus globulus against Escherichia coli and Staphylococcus aureus. Asian Pacific journal of tropical biomedicine, 2(9), 739-742 .

[37] Elgayyar, M., Draughon, F., Golden, D., & Mount, J. (2001). Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. Journal of food protection, 64(7), 1019-1024 .

[38] Salehi, P., Sonboli, A., & Allahyari, L. (2007). Antibacterial and antioxidant properties of the essential oil and various extracts of Nepeta ispahanica from Iran. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 10(4),324-331.

[39] Serrano, C., Matos, O., Teixeira, B., Ramos, C., Neng, N., Nogueira, J., Marques, A. (2011). Antioxidant and antimicrobial activity of Satureja montana L. extracts. Journal of the Science of Food and Agriculture, 91(9), 1554-1560 .

[40] Duffy, C. F., & Power, R. F. (2001). Antioxidant and antimicrobial properties of some Chinese plant extracts .International journal of antimicrobial agents, 17(6), 527-529 .

[41] Negi, P., Jayaprakasha, G., & Jena, B. (2003). Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. Food Chemistry, 80(3), 393-397 .

[42] Weinstein, R. A. (2001). Controlling antimicrobial resistance in hospitals: infection control and use of antibiotics. Emerging infectious diseases, 7(2), 188 .

Evaluation of Antimicrobial Activites of *Satureja hortensis* L. Essential Oil Against Some Food Born Pathogenic and Spoilage Microorganism

Farahani, M. [1], Shahidi, F. [2*], Tabatabaei yazdi, F. [3]

1. Master student, Department of Food Science and Technology, Collegeof Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
2. Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
3. Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad

(Received: 2018/01/27 Accepted:2018/05/25)

The aim of this study was to evaluate the chemical compositions and antimicrobial activity of *Satureja hortensis* essential oil against *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas fluorescens* OS8, *Alternaria alternata* PTCC 5224 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *in vitro*. In this study, *S.hortensis* essential oil was purchased from Barij Essence Pharmaceutical Company (Kashan, Iran). The chemical analysis of the essential oil was performed by using Gas chromatography/ mass spectrophotometer (GC/MS). The antimicrobial activity was determined through agar diffusion method (well and disc) and broth micro-dilution based on the CLSI protocol . The results showed that the main compounds in the oil were carvacrol (37.83%) and Isopropyl Myristate (59.14%). The oil showed activity against all tested strains. In all treatments, Gram-negative strains tested were more resistant to the antimicrobial activity of essential oil. Minimum inhibitory concentration (MIC) of S.hortensis essential oil on the *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus* and *Alternaria alternata* was 2 , 1 , 0.5 and 1(mg/ml) respectively. The agar difiusion tests showed, the reduction of essential oil concentration significantly reduces the diameter of inhibition zone for all tested microorganisms. According to the result of this study and increasing resistance of bacteria to chemical antibiotics, it is recommended that more studies on this plant and antibacterial compounds are needed for treating infections.

Keywords: *Satureja hortensis*, Essential oil, Antimicrobial activity

* Corresponding Author E-Mail Address: fshahidi@ferdowsi.um.ac.ir