DOI: 10.22092/vj.2020.341736.1687
شماره ۱۳۱ تابستان ۱۴۰۰
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

اثر اسانس مریم‌گلی و مرزه بر باکتری‌های استافیلوکوک آرئوس، استرپتوکوک آگالاکتیه و اشرشیاکلی

• رضا راه چمنی (نویسنده مسئول)
گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس،گنبد کاووس، ایران
• سامان ضرونی
گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس،گنبد کاووس، ایران
• فرزاد قنبری
گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس،گنبد کاووس، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸-۱۱-۰۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹-۰۱-۱۹
Email: Rahchamani@gonbad.ac.ir

چکیده

برای درمان بیماری‌های باکتریایی با توجه به عوارض مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها نیاز به مواد ضدباکتریایی جدید و طبیعی است و یکی از این مواد روغن‌های اسانسی گیاهان دارویی هستند لذا این مطالعه به‌منظور بررسی فعالیت ضدباکتریایی اسانس‌های مرزه و مریم‌گلی و مقایسه آن‌ها با آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین و آموکسی‌سیلین علیه باکتری‌های استافیلوکوک آرئوس، استرپتوکوک آگالاکتیه و اشرشیاکلی انجام شد. شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس با آنالیز به‌روش GC/MS انجام شد. حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) و حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC) اسانس‌ها به روش رقیق‌سازی لوله‌ای و حساسیت باکتری به اسانس‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها با استفاده از دیسک دیفیوژن تعیین گردید و تاثیر اسانس‌ها بر منحنی رشد باکتری‌ها در ساعت‌های ۰، ۶، ۱۰ و ۲۴ مطالعه شد. مهم‌ترین ترکیبات مریم‌گلی کارواکرول(۶۱/۰۱٪) و تیمول(۲۰/۴۱٪) و مرزه اکالیپتول(۳۲/۴۵٪) و کارواکرول(۲۸/۲۴٪) بود. از نظر MIC و MBC اسانس مریم‌گلی بیشترین تأثیر را علیه باکتری استافیلوکوک آرئوس (به‌ترتیب ۰/۰۰۹ ٪ و ۰/۰۱۹٪) و اسانس مرزه بیشترین تأثیر را علیه باکتری استرپتوکوک آگالاکتیه(به‌ترتیب ۰/۰۷۸٪ و ۰/۱۵۶٪) داشت. در دیسک دیفیوژن نیز اثر ضدباکتریایی اسانس‌ها تفاوت معنی‌داری با جنتامایسین و آموکسی سیلین/کلاولانات نداشت و تاثیر مریم‌گلی قوی‌تر از مرزه بود. در منحنی رشد، غلظت MIC اسانس‌ها ساعت ۲۴ باعث کاهش معنی‌دار تعداد باکتری‌ها شدند. به‌طورکلی اسانس مریم‌گلی با دارا بودن ترکیبات ضدباکتریایی قوی (کارواکرول و تیمول) بیشتر، اثر قوی‌تری از مرزه علیه باکتری‌ها داشت و اثر ضدباکتریایی هر دو اسانس تفاوت معنی‌داری با دو آنتی‌بیوتیک جنتامایسین و آموکسی سیلین/کلاولانات نداشت که نشان دهنده اثر قابل قبول اسانس‌هاست.

کلمات کلیدی: ضد باکتریایی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، گیاهان دارویی، بیماری‌های باکتریایی، ورم پستان

Veterinary Researches & Biological Products No 131 pp: 40-49

Effect of Essential Oils of *Salvia officinalis* and *Satureja hortensis* on *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* and *Escherichia coli*

By:Rahchamani, R., (Corresponding Author) Department of Animal Science, College of Agriculture and Natural Resources, University of Gonbad Kavous, Gonbad Kavous, Iran. Zarooni, S., Department of Animal Science, College of Agriculture and Natural Resources, University of Gonbad Kavous, Gonbad Kavous, Iran. and Ghanbari, F., Department of Animal Science, College of Agriculture and Natural Resources, University of Gonbad Kavous, Gonbad Kavous, Iran.

Received: 2020-01-27 Accepted: 2020-04-07

Email: Rahchamani@gonbad.ac.ir

There is need to investigate new and natural antibacterial agents because of various side effects of antibiotics. Essential oil of medicinal plants is one of these agents. The aim of this study was to determine the antibacterial activity of Salvia officinalis (sage) and Satureja hortensis (savory) essential oils in comparison with Gentamicin and Amoxicillin / Clavulanate antibiotics on Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae and Escherichia coli. Chemical compositions of essential oils were determined by GC/MS. Minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC) of oils and the inhibition zones of oils and antibiotics were determined using serial broth dilution and disk diffusion method, respectively. The effect of MIC concentrations of oils on growth curve of bacteria were obtained at 0, 6, 10 and 24 hour. Major compositions of sage and savory oils were carvacrol (61.01%), thymol (20.41%) and eucalyptol (32.45%), thymol (28.24%), respectively. According to MIC and MBC results, the most antibacterial activity of sage was against Staphylococcus aureus (0.009% and 0.019%, respectively) and those of savory were against Streptococcus agalactiae (0.078%, 0.156%, respectively). The inhibition zone of oils had no significant difference with antibiotics and antibacterial effect of sage was more than savory. MIC concentrations of oils decreased bacterial count at 24 h. Generally, the essential oil of sage had a stronger antibacterial effect than savory because of more strong antibacterial components (carvacrol and thymol) and Antibacterial effects of two oils had no significant difference with gentamycin and amoxicillin/ clavulanate that show satisfactory antibacterial effect of oils.

Keywords: Antibacterial, Antibiotic resistance, Medicinal plant, Bacterial disease, Mastitis

مقدمه

بیماری‌های مختلفی توسط هر یک از باکتری‌های استافیلوکوک آرئوس، استرپتوکوک آگالاکتیه و اشریشیاکلی ایجاد می‌شود ولی هر سه باکتری از مهم‌ترین عوامل ورم پستان گاو هستند (۲۶). ورم پستان شایع‌ترین (۲۶) و در بسیاری از کشورها پرهزینه‌ترین (۱۵) بیماری صنعت پرورش گاو شیری است. معمول‌ترین درمان ورم پستان در دامداری‌های متداول تزریق داخل پستانی آنتی‌بیوتیک‌هاست که عوارضی مانند ایجاد سویه‌های مقاوم و باقیماندن دارو در شیر دارد (۳). با توجه به مسائل یاد شده و ممنوع بودن استفاده از آنتی‌بیوتیک در گاوداری‌های ارگانیک نیاز به سایر روش‌های درمانی احساس می‌شود.

مواد طبیعی نقش کلیدی در کشف داروهای جدید دارند (۴). متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی از مهم‌ترین منابع کشف داروهای ضد میکروبی برای مبارزه با بیماری‌های باکتریایی هستند یکی از متابولیت‌های ثانویه در گیاهان آروماتیک روغن‌های اسانسی (Essential oils) است که ترکیبی از مواد آلی مختلف هستند کلمه " oil " به حالت هیدروفوب و محلول در چربی بودن و "Essential" به بوی مشخص آنها اشاره دارد (۹). اسانس‌ها اثرات بیولوژیک متعددی از جمله اثرات ضدباکتریایی، ضدقارچی و ضدویروسی داشته و مطالعات زیادی برای یافتن ترکیبات ضدمیکروبی جدید بر روی آن‌ها انجام شده است (۵). با توجه به اثرات ضدباکتریایی اسانس‌های گیاهی مطالعه این اثرات علیه عوامل باکتریایی ضروری به‌نظر می‌رسد (۱۵).

مریم‌گلی با نام علمی (*Salvia officinalis*) Sage یکی از قدیمی‌ترین و معمول‌ترین گیاهان دارویی است که به‌وفور در دنیا کشت می‌شود علاوه بر خواص درمانی اثرات ضدالتهابی، ضدعفونی‌کنندگی و ضدباکتریایی آن علیه تعدادی از باکتری‌ها به اثبات رسیده است (۲،۲۳). در نام لاتین این گیاه نام جنس (Salvia) به‌معنی درمان کردن و نام گونه آن (officinalis)

به‌معنی دارویی و طبی است که نشان دهنده خاصیت درمانی و سلامت‌بخش آن می‌باشد(۲۰). مرزه (Savory) (*Satureja hortensis*) گیاهی با کاربردهای تغذیه‌ای و طبی مختلف است و در مطالعات فارماکولوژیک اثرات ضد اسپاسم، ضداسهال، آرام‌بخش و ضدباکتریایی آن گزارش شده است (۱۶،۱۳). بسیاری از گونه‌های این جنس دارای مونوترپن‌های اکسیژنه مثل کارواکرول و تیمول هستند و گیاهان دارای مقادیر بالای کارواکرول و تیمول خاصیت ضدمیکروبی قوی دارند(۲۵). با توجه به مطالعات بسیار کم درباره اثر ضد باکتریایی اسانس این گیاهان بر باکتری استرپتوکوک آگالاکتیه، باکتری‌های استافیلوکوک آرئوس و اشریشیاکلی نیز انتخاب شدند تا با در نظر گرفتن این نکته که هر سه باکتری از نظر ایجاد بیماری ورم پستان جزء مهم‌ترین عوامل ورم پستان مسری و محیطی هستند بتوان از نتایج این مطالعه در پژوهش‌های بالینی درمان آن و سایر بیماری‌ها استفاده کرد.

مواد و روش‌ها

تهیه اسانس

اسانس‌های مریم‌گلی(*Salvia officinalis*) و مرزه (*Satureja hortensis*) از شرکت درین گلاب کاشان تهیه شدند. جهت حصول اطمینان از عدم آلودگی اسانس‌ها به میکروارگانیسم‌های قارچی و باکتریایی، اسانس‌ها را از فیلترهای ۰/۲ mμ عبور داده و با انتقال به محیط کشت تریپتیک سوی آگار (Tryptic soy agar) (TSA) هیچ‌گونه آلودگی مشاهده نگردید.

آنالیز اسانس‌ها

اسانس هر نمونه به دستگاه گاز کروماتوگرافی کوپل با طیف‌سنج (GC/MS) (Model۵۹۷۷A, AgilentTechnologies,USA)تزریق گردید. مشخصات ستون آن شامل:

$60_{DB۱}$,mmX0.25 mm fused silica capillary column با ضخامت فیلمی ۰/۲۵ mμ و برنامه دمایی ۵۰ تا ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد با میزان ۴ درجه در دقیقه و دمای ۲۶۰ درجه سانتی‌گراد انژکتور و گاز حامل هلیوم می‌باشد. پس از تزریق اسانس به‌GC/MS و مشاهده طیف کروماتوگرام که حضور تعداد زیادی ترکیب را نشان می‌داد، با استفاده از زمان بازداری(RT)، اندیس کواتس(KI)، طیف جرمی و مقایسه با ترکیب‌های استاندارد موجود در کتابخانه اطلاعات کامپیوتری، شناسایی ترکیبات اسانس و تعیین درصد کمی در آن‌ها انجام گردید.

تهیه باکتری و تعیین بار میکروبی

باکتری‌های استرپتوکوک آگالاکتیه (*Streptococcus agalactiae* PTCC۱۷۶۸)، استافیلوکوک آرئوس (*Staphylococcus aureus PTCC*۱۱۱۳) و باکتری اشرشیاکلی (*Escherichia coli PTCC*۱۳۹۹) از مرکز تحقیقات و پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. ابتدا کشت لیوفلیزه باکتری‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در محیط کشت تریپتیک سوی براث (Tryptic soy Broth) کشت داده شد. سپس کشت مجدد از کشت اول داده شده و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. از کشت دوم برای تهیه استوک به نسبت ۱ به ۵ با گلیسرین استریل مخلوط شد و در حجم‌های ۱۰۰ lμ در میکروتیوب‌های استریل در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. جهت میزان تلقیح باکتری از کشت استوک به داخل محیط تریپتیک سوی براث برده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. سپس از کشت اول کشت مجددی داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. مقادیر مختلفی از کشت دوم به لوله کووت حاوی ۳ ml محیط کشت براث استریل، تا مادامی انتقال داده شد که میزان جذب نوری با استفاده از دستگاه طیف‌سنج جرمی(Spectrophotometry) (LibraS۱۲Biochrom Ltd., Cambridge London) در طول‌موج nm ۶۰۰، به ۰/۱ برسد. با انتقال ml ۱ از سوسپانسیون باکتریایی داخل کووت به لوله حاوی ml ۹ آب پپتونه ۰/۰۱٪، رقت‌های متوالی تا $۱۰^{-۷}$ تهیه شد. سپس lμ ۱۰۰ از هر رقت به پلیت‌های حاوی محیط کشت آگاردار انتقال داده شد. پلیت‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور نگهداری شدند و پس از این مدت، تعداد باکتری‌ها شمارش شدند. کل آزمایش ۲ مرتبه تکرار شد و میانگین تعداد باکتری در کووت با جذب نوری ۰/۱ برای باکتری اشرشیاکلی معادل $۳/۶ \times ۱۰^{۶}$، استافیلوکوک آرئوس معادل $۱/۲ \times ۱۰^{۸}$ و برای استرپتوکوک آگالاکتیه معادل $۴/۱ \times ۱۰^{۷}$ cfu/ml محاسبه شد. با مشخص شدن این عدد هرگاه که سوسپانسیون باکتریایی با جذب نوری ۰/۱ تهیه شود، تعداد باکتری در آن معادل عدد محاسبه‌شده بوده و می‌توان از این سوسپانسیون غلظت‌های دلخواه تهیه نمود (۱۴).

تعیین MIC و MBC به روش ماکرودایلوشن

ابتدا محیط کشت براث حاوی ۵ درصد دی متیل سولفوکساید(DMSO) تهیه و اتوکلاو شد. سپس غلظت‌های متوالی و دو برابری اسانس‌های مریم‌گلی و مرزه در ۱۰ لوله شامل ۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵، ۰/۶۲۵، ۰/۳۱۲، ۰/۱۵۶، ۰/۰۷۸، ۰/۰۳۹ و ۰/۰۱۹٪ در محیط کشت تهیه شد. سپس به هر لوله µl ۱۰۰ سوسپانسیون میکروبی (با غلظت نهایی مشخص با طول موج nm ۶۰۰ و جذب ۰/۱ برای هر باکتری) با رقت ۱:۲۵۰ تلقیح شد و بعد از آن همه لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه و سپس نتایج قرائت گردید. ۱۰ لوله برای آزمایش رقت‌های مختلف هر اسانس و یک لوله برای کنترل منفی (حاوی اسانس و محیط کشت)، یک لوله برای کنترل مثبت (حاوی باکتری و محیط کشت) و یک لوله برای کنترل محیط کشت خالی قرار داده شد. برای هرکدام از اسانس‌ها آخرین رقتی که در آن هیچ گونه کدورتی مشاهده نگردید (عدم رشد) به‌عنوان حداقل غلظت بازدارندگی در نظر گرفته شد و از تمام لوله‌های بدون کدورت در محیط TSA کشت داده شد. پس از گذشت مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد آخرین غلظتی از اسانس‌ها که قادر به مرگ ۹۹٪ از باکتری‌های زنده اولیه بود به‌عنوان حداقل غلظت کشندگی گزارش شد (۷).

بررسی خاصیت ضد باکتری اسانس‌ها به روش انتشار از دیسک

از روش انتشار در آگار به صورت دیسک دیفیوژن (Disk disffusion) به شیوه کربی بائر(Kirby Bauer) استفاده شد. ابتدا سوسپانسیون میکروبی (با غلظت نهایی مشخص با طول موج nm ۶۰۰ و جذب ۰/۱ برای هر باکتری) در سطح محیط تریپتیک سوی آگار کشت داده شد. سپس برای

بررسی خواص ضد باکتریایی اسانس‌ها، مقدار µl ۲۰ از رقت‌های ۱ (رقیق نشده) و ۰/۵ (رقیق‌شده با نسبت ۱:۱ با DMSO) اسانس روی دیسک‌های کاغذی استریل بلانک ساخت شرکت پادتن طب (تهران-ایران) ریخته و به مدت ۲۰ تا ۴۰ دقیقه دیسک‌ها را در انکوباتور قرار داده تا دیسک‌ها مقداری خشک شود. سپس دیسک‌ها با فاصله معین از یکدیگر و از لبه پلیت، روی محیط کشت قرار داده شد. برای مقایسه فعالیت ضدباکتریایی اسانس‌ها، دیسک‌های آنتی‌بیوتیک آموکسی‌سیلین/ کلاوولانات با غلظت ۲۰/۱۰ µg/Disk ، شماره ۲۰۱۰۳ و جنتامایسین با غلظت۱۰µg/Disk، شماره ۲۰۳۰۹ از شرکت پادتن طب تهیه و به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. سپس محیط کشت‌های حاوی باکتری به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد باکتری در اطراف صفحه‌ها، نتایج مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاصل از آنتی‌بیوتیک‌ها با جداول CLSI مقایسه گردید. جهت حصول اطمینان هر یک از غلظت‌های مختلف اسانس و آنتی‌بیوتیک‌ها، این آزمایش‌ها برای هر باکتری، ۲ بار تکرار شد (۱۰).

اثر اسانس‌ها بر منحنی رشد باکتری

در این مرحله اثر غلظت MIC از اسانس‌ها روی باکتری‌های مورد مطالعه در طی ۲۴ ساعت و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مورد ارزیابی قرار گرفت. ابتدا محیط کشت حاوی ۵٪ DMSO و استریل تهیه و غلظت اسانس مورد نظر به آن اضافه شد. حجم این محلول طوری تنظیم شد که مقدار اسانس و محیط کشت برای هر ساعت ml ۱ بود. سپس µl ۱۰۰ از سوسپانسیون باکتریایی (با غلظت نهایی مشخص با طول موج nm ۶۰۰ و جذب۰/۱ برای هر باکتری) به هر لوله اضافه و حجم محلول برای هر ۴ ساعت در یک لوله کلی تهیه شد. لوله‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری و در ساعت‌های صفر، ۶، ۱۰ و ۲۴ با انتقال ml ۱ از ترکیب فوق به لوله حاوی ml ۹ نرمال سالین استریل رقت‌های متوالی تا 10^{-9} در زمان‌های فوق تهیه شد. سپس با انتقال µl ۱۰۰ از هر رقت به پلیت حاوی محیط کشت TSA در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد، سپس شمارش تعداد کلونی انجام و تعداد باکتری‌ها در ساعات مورد نظر محاسبه و این آزمایشات ۲ بار تکرار شد. نمودار رشد بر اساس Log_{10} cfu/ml در واحد زمان (ساعت) رسم شد.

تجزیه و تحلیل آماری

تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS ۲۰for windows صورت گرفت. جهت مقایسه داده‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه One-way ANOVA استفاده شد و اختلاف میانگین داده‌ها در سطح ۵٪ از لحاظ آماری معنی‌دار تلقی شد. اختلاف میانگین‌ها توسط آزمون توکی مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

ترکیبات شیمیایی اسانس مریم‌گلی

نتایج آنالیز اسانس مریم‌گلی مورداستفاده در این مطالعه در جدول ۱ آورده شده است. همان‌طور که در این جدول دیده می‌شود از بین ترکیبات شناسایی‌شده به‌ترتیب کارواکرول با۶۱/۰۱٪ ، تیمول با ۲۰/۴۱٪ و ۱آر-آلفا- پینن با ۷/۸۸٪ عمده‌ترین ترکیبات موجود در اسانس را تشکیل می‌دهند

ترکیبات شیمیایی اسانس مرزه

همان‌طور که در جدول ۲ دیده می‌شود از بین ترکیبات شناسایی‌شده اکالیپتول با ۳۲/۴۵٪، کارواکرول با ۲۸/۲۴٪ و آلفا- پینن با ۱۳/۴۲٪ بیشترین ترکیبات موجود در اسانس مرزه را تشکیل می‌دهند.

تعیین MIC و MBC اسانس‌های مریم‌گلی و مرزه

نتایج حداقل غلظت مهاری و حداقل غلظت کشندگی اسانس‌های مریم‌گلی و مرزه علیه باکتری‌های استافیلوکوک اورئوس، اشرشیاکلی و استرپتوکوک آگالاکتیه در جدول ۳ ارائه شده است. اسانس مریم‌گلی بیشترین تأثیر را علیه باکتری استافیلوکوک آرئوس (به ترتیب ۰/۰۰۹٪

جدول ۱- ترکیبات شیمیایی اسانس مریم‌گلی.

ردیف	نام ترکیب	شاخص بازداری	درصد
۱	۱R a-Pinene	۴/۱۱۷	۷/۸۸
۲	o-Cymol	۵/۹۰۹	۳/۶۱
۳	Eucalyptol	۶/۰۹۲	۴/۵۷
۴	y-Terpinene	۶/۶۷۶	۲/۵۲
۵	Thymol	۱۲/۶۶۴	۲۰/۴۱
۶	Carvacrol	۱۲/۹۳۵	۶۱/۰۱

و ۰/۰۱۹٪) و اسانس مرزه بیشترین تأثیر را علیه باکتری استرپتوکوک آگالاکتیه (به ترتیب ۰/۰۷۸٪ و ۰/۱۵۶٪) داشت.

نتایج حاصل از آزمایش دیسک دیفیوژن

اثر اسانس‌های مریم‌گلی، مرزه و دو آنتی‌بیوتیک جنتامایسین و آموکسی‌سیلین/کلاوولانات علیه باکتری‌های مورد آزمایش در جدول ۴ نشان داده شده است. طبق جداول CLSI هر سه باکتری به آنتی‌بیوتیک‌ها حساس بودند. اثر اسانس‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها بر اشرشیاکلی و میانگین هر سه باکتری تفاوت معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵) در مورد استرپتوکوک آگالاکتیه و استافیلوکوک آرئوس فقط تیمار مرزه ۰/۵ نسبت به آموکسی سیلین/کلاولانات کاهش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵) ولی سایر تیمارها با آنتی‌بیوتیک‌ها تفاوت معنی‌داری نداشتند (P>۰/۰۵). همچنین علیه استرپتوکوک آگالاکتیه و میانگین هر سه باکتری غلظت ۱ مریم‌گلی نسبت به غلظت ۰/۵ مرزه و علیه استافیلوکوک آرئوس غلظت ۱ مریم گلی نسبت به غلظت ۱ مرزه اثر ضدباکتریایی بیشتر معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵).

اثر اسانس مریم‌گلی و مرزه بر منحنی رشد باکتری‌ها

در شکل ۱، اثر اسانس مریم‌گلی و مرزه بر تعداد باکتری اشرشیاکلی طی زمان‌های۰، ۶، ۱۰ و ۲۴ ساعت مشاهده می‌شود. در ساعت ۶ و۱۰ بین تیمار شاهد و اسانس‌ها تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (P>۰/۰۵) ولی در ساعت ۲۴ اسانس مرزه در مقایسه با گروه شاهد تقریباً کاهش ۵ لگاریتمی و اسانس مریم‌گلی کاهش ۳ لگاریتمی دارد و هر دو اسانس با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری داشتند (P<۰/۰۵). اثر بازدارندگی اسانس‌ها بر رشد باکتری اشرشیاکلی تا ساعت ۱۰ تقریباً ناچیز بوده اما بعد از آن به‌تدریج افزایش یافت. اثر اسانس‌ها بر تعداد باکتری استافیلوکوک آرئوس در زمان‌های مختلف در شکل ۲ نشان داده شده است. تا ساعت ۱۰ اختلاف معنی‌داری بین تیمارها نبود (P>۰/۰۵) ولی در ساعت ۲۴ هر دو اسانس اختلاف معنی‌داری با شاهد داشتند (P<۰/۰۵). در شکل ۳ مشاهده می‌شود که در ساعت‌های ۶ و ۱۰ اسانس‌ها باعث کاهش غیر معنی‌دار تعداد باکتری استرپتوکوک آگالاکتیه شدند (P>۰/۰۵) اما در ساعت ۲۴ اسانس‌های مریم‌گلی و مرزه کاهش ۶ لگاریتمی را نشان داده و اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد داشتند (P<۰/۰۵).

بحث

روز به روز مقاومت باکتری‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها بیشتر می‌شود و در مقابل، تحقیقات برای یافتن مواد جدید ضدمیکروبی رو به گسترش است. از آنجا که گیاهان دارویی و اسانس آن‌ها از زمان‌های دور در درمان بیماری‌ها استفاده می‌شده‌اند یک انتخاب مناسب برای این گونه تحقیقات هستند. اسانس‌های گیاهی با داشتن اثر ضدمیکروبی علیه

جدول ۲- ترکیبات شیمیایی اسانس مرزه.

ردیف	نام ترکیب	شاخص بازداری	درصد
۱	a-Pinene	۴/۱۱۷	۱۳/۴۲
۲	m-Cymene	۵/۹۰۹	۳/۵۴
۳	p-Menth-۸-en-۱-ol, acetate	۶/۰۱۸	۲/۳
۴	Eucalyptol	۶/۰۹۹	۳۲/۴۵
۵	b-Terpinene	۶/۶۷۶	۱/۰۱
۶	Linalool	۷/۶۶	۲/۵۸
۷	(+)-۲-Bornanone	۸/۸۸۹	۱/۴۱
۸	Isoborneol	۹/۳۲۴	۱/۰۶
۹	p-Menth-۱-en-۴-ol, (R)-(-)-	۹/۷۶۵	۱/۴۲
۱۰	y-Terpineol	۱۰/۱۳۸	۱/۴۹
۱۱	Linalyl acetate	۱۱/۵۵۴	۱/۳۸
۱۲	Thymol	۱۲/۶۳۶	۹/۷۱
۱۳	Carvacrol	۱۲/۸۷۴	۲۸/۲۴

طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها و کمتر بودن عوارض جانبی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج، می‌توانند در نهایت جایگزین آنتی‌بیوتیک شوند. ورم پستان در گاوداری‌های ارگانیک به علت شیوع و نبود درمان‌های موثر یک معضل جدی محسوب می‌شود. و تقاضای روزافزونی برای داروهای ضد میکروب قابل استفاده در تولید غذاهای ارگانیک بدون خطر بروز مقاومت‌های دارویی وجود دارد (۱۸). بنابراین در این مطالعه اثر اسانس گیاهان مریم‌گلی و مرزه بر باکتری‌های مهم عامل ورم پستان مطالعه شد.

در پژوهش حاضر ۱۳ ترکیب در مرزه شناسایی شد که اکالیپتول (۱و۸-سینئول) با ۳۲/۴۵٪ ، کارواکرول با ۲۸/۲۴٪ ، آلفا-پینن با ۱۳/۴۲٪ و تیمول با ۹/۷۱٪ بیشترین ترکیبات موجود در اسانس مرزه را تشکیل می‌دادند. جعفری و همکاران (۲۰۱۸) در اسانس مرزه استان اردبیل ۲۲ ترکیب گزارش کردند که فراوان‌ترین ترکیبات گاما-ترپینن (۳۷٪)، کارواکرول (۳۲٪) و پی- سیمن (۱۳٪) بودند (۱۳) در حالی که در یک نمونه مرزه از استان شیراز کارواکرول (۵۴٪) و گاما-ترپینن (۲۶٪) به عنوان مواد اصلی تشکیل‌دهنده اسانس معرفی شدند(۱۶). در مطالعات دیگر از ایران کارواکرول (۵۶٪)، گاما-ترپینن (۲۴٪)، پی- سیمن (۵٪) (۱۱) و تیمول (۴۱٪)، گاما-ترپینن(۳۷٪)، و پی- سیمن (۱۲٪) (۱۶) به‌عنوان ترکیبات اصلی گزارش شد. در مطالعه حاضر در اسانس مریم‌گلی ۶ ترکیب شناسایی و فراوان‌ترین ترکیبات کارواکرول (۶۱/۰۱٪) و تیمول (۲۰/۴۱٪) بودند. در یک مطالعه از ایتالیا سیس-توجون (۲۳/۹۰٪)، کامفور (۱۹/۲۲٪)، اکالیپتول (۱۰/۶۲٪) (۱۹) و در یک مطالعه دیگر از مریم‌گلی رشد یافته در ۱۸ مکان کشور ایتالیا فراوان‌ترین ترکیبات آلفا-توجون (۲۰/۱-۷/۸٪)، کامفور (۲۰/۸-۸/۴٪)، بورنئول (۱۶/۹-۲/۵٪)، سی-مورولن (۱۳/۸-۲/۹٪) و اسکلارئول (۲۳/۱-۵/۹٪) (۲۰) گزارش شد. تفاوت در ترکیبات شیمیایی گیاهان در مطالعات مختلف می‌تواند به عللی مثل مکان رشد گیاه، مرحله رشد، شرایط آب و هوایی، شرایط تهیه اسانس یا عصاره و اندام مورد استفاده گیاه باشد (۱۲).

جدول ۳- حداقل غلظت مهاری و کشندگی اسانس مریم‌گلی و مرزه بر باکتریهای مورد آزمایش.

اسانس	باکتری	حداقل غلظت مهاری(٪)	حداقل غلظت کشندگی(٪)
مریم‌گلی	استافیلوکوک آرئوس	۰/۰۰۹	۰/۰۱۹
	اشرشیاکلی	۰/۰۱۹	۰/۰۳۹
	استرپتوکوک آگالاکتیه	۰/۰۱۹	۰/۰۳۹
مرزه	استافیلوکوک آرئوس	۰/۱۵۶	۰/۳۱۲
	اشرشیاکلی	۰/۱۵۶	۰/۳۱۲
	استرپتوکوک آگالاکتیه	۰/۰۷۸	۰/۱۵۶

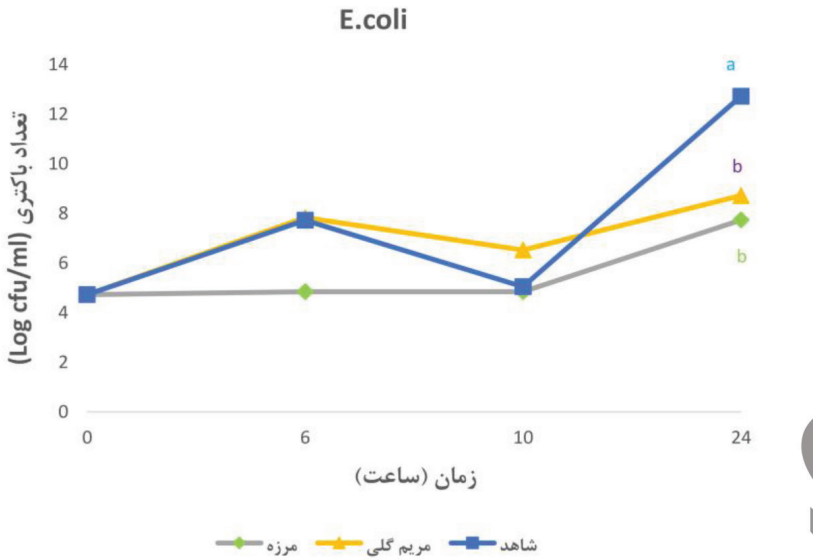
جدول۴- مقایسه میانگین (میلی متر) هاله عدم رشد باکتری‌ها تحت تاثیر غلظت‌های مختلف اسانس‌ها (۱ و ۰/۵) و آنتی‌بیوتیک‌ها.

	تیمار							
باکتری	مریم‌گلی ۱	مریم‌گلی ۰/۵	مرزه ۱	مرزه ۰/۵	جنتامایسین	آموکسی سیلین/ کلاولونات	سطح معنی داری	میانگین استاندارد
استافیلوکوک آرئوس	۲۷/۲۴ ab	۱۹/۴۶ abc	۱۶/۹۱ cde	۹/۸۳ e	۱۸/۱۶ abcde	۲۴/۰۶ bc	۰/۰۰	۱/۳۶
اشرشیاکلی	۲۲/۵۹	۱۸/۱۹	۱۳/۵۰	۲۱/۶۹	۱۷/۶۰	۲۲/۶۰	۰/۱۵	۱/۱۸
استرپتوکوک آگالاکتیه	۲۵/۴۲ ab	۲۴/۶۵ ab	۲۱/۹۸ ab	۱۴/۴۰ c	۱۹/۷۵ abc	۲۵/۴۴ a	۰/۰۰	۰/۹۶
هر سه باکتری	۲۵/۰۸ a	۲۰/۷۷ ab	۱۷/۴۶ ab	۱۵/۳۱ b	۱۸/۵ ab	۲۴/۰۳ ab	۰/۰۳	۱/۰۹

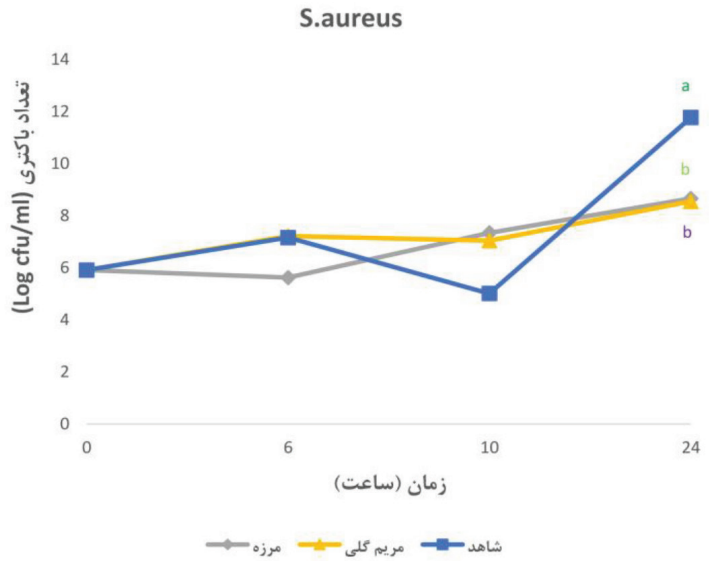
abcde حروف نامشابه در هر ردیف نشان دهنده تفاوت معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

در این پژوهش حداقل غلظت مهاری و کشندگی اسانس مریم‌گلی علیه باکتری‌ها ۰/۰۰۹٪ تا ۰/۰۳۹٪ و مرزه ۰/۰۷۸٪ تا ۰/۱۵۶٪ بدست آمد. در مطالعات مختلف مقادیر متفاوتی ذکر شده است. در یک مطالعه از کشور اردن، حداقل غلظت مهاری و کشندگی اسانس مریم‌گلی علیه استافیلوکوک آرئوس به‌ترتیب ۱۲/۵٪ و ۶/۱٪ اعلام شد (۲). در یک مطالعه دیگر در مورد دو سویه از اشرشیاکلی این غلظت‌ها به طور مساوی و ۰/۳۷-۰/۷۴٪ و در مورد استافیلوکوک آرئوس حداقل غلظت مهاری ۰/۷۴٪ و حداقل غلظت کشندگی ۱/۴۹٪ گزارش شد (۱) . جعفری و همکاران (۲۰۱۸) حداقل غلظت مهاری و کشندگی مرزه علیه اشرشیاکلی را به‌ترتیب ۰/۰۱۲٪ و ۰/۸٪ و در مورد استافیلوکوک آرئوس ۰/۲٪ اعلام کردند (۱۳). در یک مطالعه دیگر حداقل غلظت مهاری و کشندگی مرزه علیه استافیلوکوک آرئوس به‌ترتیب ۰/۰۱٪ و ۰/۰۵٪ نشان داده شد (۱۱). نسبت MBC/MIC برای ارزیابی قدرت ضدباکتریایی اسانس‌ها استفاده می‌شود اگر این نسبت بزرگتر از ۴ باشد اسانس باکتریواستاتیک و اگر کمتر یا مساوی ۴ باشد باکتریسید در نظر گرفته می‌شود (۱۲). طبق این تقسیم‌بندی اسانس‌های مطالعه ما اثر باکتریسیدی نشان دادند و اسانس مریم‌گلی اثرات ضدباکتریایی قوی‌تری از مرزه داشت.

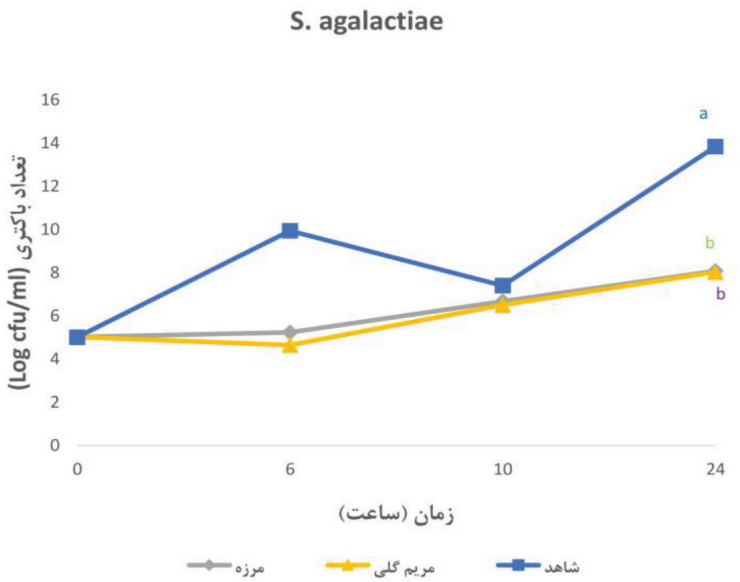
در مطالعه حاضر هاله عدم رشد استافیلوکوک آرئوس و اشرشیاکلی بعد از استفاده از ۲۰ µl/Disk اسانس مریم‌گلی به‌ترتیب ۲۷/۲۴ و ۲۲/۵۹ میلی متر و اسانس مرزه به‌ترتیب ۱۶/۹۱ و ۱۳/۵ میلی‌متر بود. در انتشار دیسک اثر ضدباکتریایی اسانس‌ها (غیر از غلظت ۰/۵ مرزه) تفاوت معنی‌داری با جنتامایسین و آموکسی‌سیلین/کلاولانات نداشت (P>۰/۰۵) و تاثیر مریم‌گلی قوی‌تر از مرزه بود (P>۰/۰۵) که نشان‌دهنده اثر قابل ملاحظه و مشابه اسانس‌ها با آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه بود. موسوی نصاب و همکاران (۲۰۱۶) با استفاده از ۱۰ µl اسانس مرزه هاله عدم رشد استافیلوکوک آرئوس را ۲۸ mm و اشرشیاکلی را ۱۷ mm گزارش کردند (۱۶). در یک مطالعه ۱۰ µl اسانس مریم گلی باعث ایجاد هاله عدم رشد ۱۶ mm برای استافیلوکوک آرئوس (بیشتر از هاله عدم رشد µl/ Disk ۳۰ تتراسیکلین و کمتر از آمپی‌سیلین و کلرامفنیکل) و ۱۸ mm برای اشرشیاکلی (بیشتر از هاله عدم رشد µl/Disk ۳۰ آمپی‌سیلین، کلرامفنیکل و تتراسیکلین) شد (۴). در مطالعه دیگری در مورد اسانس مریم‌گلی، غلظت µg/µl ۹۴۰ با هاله عدم رشد ۷ mm و غلظت µg/µl ۴۷۰ با هاله عدم رشد ۲/۶۷ mm اثر ضدباکتریایی کمتری از µg/µl ۱۶۰۰ تتراسیکلین نشان دادند (۸). اختلاف هاله عدم رشد در مطالعات مختلف می‌تواند به علت اختلاف مقدار و غلظت اسانس و آنتی‌بیوتیک‌ها در هر دیسک و همچنین اختلاف در ترکیب شیمیایی اسانس‌ها باشد. نکته قابل توجه دیگر اثر ضد باکتریایی قوی‌تر (آزمایش انتشار دیسک و بعضی نتایج MIC و MBC) و یا مشابه (بعضی نتایج MIC و MBC) اسانس‌ها بر باکتری‌های گرم مثبت (استافیلوکوک آرئوس و استرپتوکوک آگالاکتیه) نسبت به باکتری گرم منفی اشرشیاکلی بود که مورد انتظار ما بود و در سایر مطالعات نیز تایید شده است و علت آن وجود غشای خارجی در باکتری‌های گرم منفی است که از نفوذ اسانس‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها به داخل سلول ممانعت می‌کند و علاوه بر آن آنزیم‌های موجود در ناحیه پری‌پلاسم گرم منفی‌ها ممکن است مواد ضدباکتریایی اسانس‌ها را غیر



شکل ۱- اثر غلظت‌های صفر (کنترل، آبی) و MIC اسانس مریم‌گلی (زرد) و مرزه (خاکستری) بر منحنی رشد باکتری اشرشیاکلی.
حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار (P<۰/۰۵) در هر زمان می‌باشد.



شکل ۲- اثر غلظت‌های صفر (کنترل، آبی) و MIC اسانس مریم‌گلی (زرد) و مرزه (خاکستری) بر منحنی رشد باکتری استافیلوکوک آرئوس.
حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار (P/۰۵>۰) در هر زمان می‌باشد.



شکل ۳- اثر غلظت‌های صفر (کنترل، آبی) و MIC اسانس مریم‌گلی (زرد) و مرزه (خاکستری) بر منحنی رشد باکتری استرپتوکوک آگالاکتیه.
حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار (P/۰۵>۰) در هر زمان می‌باشد.

فعال کند (۵).

از نظر منحنی رشد هر دو اسانس ۲۴ ساعت بعد اثر معنی‌داری در کاهش تعداد باکتری‌ها داشتند ($P<0/05$). که این فاصله زمانی می‌تواند به علت غلظت مورد استفاده (حداقل غلظت مهاری) باشد و طبق نتایج انتشار دیسک مطالعه ما با افزایش غلظت این اسانس‌ها اثر ضدباکتریایی آن‌ها هم افزایش یافت و در صورت استفاده از غلظت‌های بالاتر مثل حداقل غلظت کشندگی این فاصله زمانی احتمالا کاهش خواهد یافت.

تفاوت‌ها در فعالیت ضدباکتریایی اسانس‌ها در مطالعات مختلف به ترکیبات آن‌ها مربوط می‌شود. در مورد اینکه کدام ترکیب یا ترکیبات عامل اثرات ضدباکتریایی هستند نظرات مختلف بیان شده است در بعضی مطالعات عنوان شده است که اثر ضدباکتریایی اسانس‌ها فقط به علت ترکیبات اصلی نبوده و حاصل مجموع اثرات تمام ترکیبات است و وجود ترکیبات با مقدار کم هم برای اثرات ضدباکتریایی ضروی بوده و اثر سینرژیست دارند و اثر کل اسانس بیشتر از اثر انفرادی ترکیبات اصلی است (۱۶،۵). در مطالعات زیادی نشان داده شده که اسانس‌هایی قوی‌ترین اثرات ضدباکتریایی را دارند که غنی از ترکیبات فنولیک مثل کارواکرول، تیمول و اوگنول باشند و اثر باکتریسیدی یا باکتریواستاتیکی به غلظت آنها بستگی دارد. کارواکرول و تیمول از نظر ساختمانی بسیار به هم شبیه بوده و تنها تفاوت در موقعیت گروه هیدروکسیل است بنابراین مکانیسم عمل آن‌ها نیز شبیه است. این ترکیبات با افزایش نفوذپذیری غشاء سیتوپلاسمی، اختلال در نیروی محرکه پروتون، جریان الکترون، انتقال فعال مواد و انعقاد محتویات سلول باعث مهار رشد یا مرگ باکتری می‌شوند (۱۷،۶). کارواکرول اثر ضدباکتریایی وسیع‌الطیف بر باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت از جمله اشرشیاکلی و استافیلوکوک آرئوس دارد و با تعویض گروه هیدروکسیل خود با یون پتاسیم به عنوان حامل یون‌های یک ظرفیتی در غشاء عمل کرده و با برهم زدن شیب غلظتی در غشاء سیتوپلاسمی اثر ضدباکتریایی خود را اعمال می‌کند (۲۴). هر چند اثر ضدباکتریایی، حاصل اثر ترکیبات اصلی و ترکیبات با مقادیر کم می‌باشد ولی اثر ضد باکتریایی بعضی ترکیبات از جمله کارواکرول و تیمول بیشتر است و قوی‌تر بودن اثرات ضدباکتریایی مریم‌گلی نسبت به مرزه در این مطالعه می‌تواند به مقدار بیشتر مجموع کارواکرول و تیمول در مریم‌گلی (٪۸۱/۴۶) نسبت به مرزه (٪۳۷/۹۵) مربوط باشد.

نتیجه‌گیری نهایی

اسانس مریم‌گلی با دارا بودن ترکیبات ضدباکتریایی قوی (کارواکرول و تیمول) بیشتر، اثر قوی‌تری از مرزه علیه باکتری‌های استافیلوکوک آرئوس، اشرشیاکلی و استرپتوکوک آگالاکتیه داشت و اثر ضد باکتریایی هر دو اسانس تفاوت معنی‌داری با دو آنتی‌بیوتیک جنتامایسین و آموکسی‌سیلین/ کلاولانات نداشت که نشان‌دهنده اثر قابل قبول اسانس‌هاست و مطالعات بالینی برای اثر درمانی در بیماری‌های مختلف از جمله ورم پستان توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه گنبد کاووس انجام شده است که نویسندگان بدین وسیله مراتب تشکر و قدردانی خود را اعلام می‌دارند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

منابع مورد استفاده

1.Adrar, N., N. Oukil and F. Bedju. 2016. Antioxidant and antibacterial activities of *Thymus numidicus* and *Salvia officinalis* essential oils alone or in combination. Industrial Crops and Products 88: 112-119.

2.Alekish, M.O., Z.B. Ismail, M.S. Awawdeh and S. Shatnawi. 2017. Effects of intramammary infusion of sage (*Salvia officinalis*) essential oil on milk somatic cell count, milk composition parameters and selected hematology and serum biochemical parameters in Awassi sheep with subclinical mastitis. Veterinary World 10(8): 895-900.

3.Ananda Baskaran, S., G.W. Kazmer, L. Hinckley, S.M. Andrew and K. Venkitanarayanan. 2009. Antibacterial effect of plant-derived antimicrobials on major bacterial mastitis pathogen's in vitro. *Journal of Dairy Science* 92(4): 1423-1429.

4.Aumeeruddy-elalfi, Z., A. Gurib-fakim and F. Mahomoodally. 2015. Antimicrobial, antibiotic potentiating activity and phytochemical profile of essential oils from exotic and endemic medicinal plants of Mauritius. Industrial Crops & Products 71: 197-204.

5.Bouyahya, A., A. Et-Touys, J. Abrini, A. Talbaoui, H. Fellah, Y. Bakri and N. Dakka. 2017. *Lavandula stoechas* essential oil from Morocco as novel source of antileishmanial, antibacterial and antioxidant activities. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 12: 179-184.

6.Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology* 94: 223-253.

7.CLSI. 2015. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. CLSI document M100-S25, Wayne.

8.Elshafie hazem, S., S. Sakr, S.M. Mang and S. Belviso. 2016. Antimicrobial activity and chemical composition of three essential oils extracted from Mediterranean aromatic plants. *Journal Of Medicinal Food* 19(11): 1-8.

9.Essid, R., F. Zahra, K. Msaada, I. Sghair, M. Hammami, A. Bouratbine, K. Aoun and F. Limam. 2015. Antileishmanial and cytotoxic potential of essential oils from medicinal plants in Northern Tunisia. Industrial Crops & Products 77: 795-802.

10.Fu, Y., Y. Zu, L. Chen, , X. Shi, , Z. Wang, S. Sun and T. Efferth. 2007. Antimicrobial Activity of Clove and Rosemary Es-

sential Oils Alone and in Combination. Phytotherapy Research 994 March: 989-994.

11.Golparvar, A.R., M.M. Gheisari, A. Hadipanah and M. Khorrami. 2018. Antibacterial, Antifungal Properties and Chemical Composition of Essential Oils of *Satureja hortensis* L. and Sat*ureja khuzestanica* Jamzad. *Journal of Herbal Drugs*, 8(4): 243-249.

12.Hajlaoui, H., H. Mighri, M. Aouni, N. Gharsallah and A. Kadri. 2016. Chemical composition and in vitro evaluation of antioxidant, antimicrobial, cytotoxicity and anti-acetylcholinesterase properties of Tunisian *Origanum majorana* L. essential oil. Microbial Pathogenesis 95: 86-94.

13.Jafari, F., F. Farmani, K. Zomorodian, M. Moein, P. Faridi and M.M. Zarshenas. 2018. A Study on Essential Oil Chemical Compositions, Antioxidant, and Antimicrobial Activities of Native and Endemic Satureja Species Growing in Iran. *Pharmaceutical Chemistry Journal* 52(1): 63-68.

14.Misaghi, A. and A.A. Basti. 2007. Effects of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil and nisin on *Bacillus cereus* ATCC 11778. Food Control 18(9):1043-1049.

15.Montironi, I.D., L.N. Cariddi and E.B. Reinoso. 2016. Evaluation of the antimicrobial efficacy of *Minthostachys verticillata* essential oil and limonene against *Streptococcus uberis* strains isolated from bovine mastitis. Revista Argentina de Microbiología 48(3): 210-216.

16.Moosavi-Nasab, M., M.J. Saharkhiz, E. Ziaee, F. Moayedi, R. Koshani and R. Azizi. 2016. Chemical compositions and antibacterial activities of five selected aromatic plants essential oils against food-borne pathogens and spoilage bacteria. Essential Oil Research 83(3): 607-613.

17.Mozafari, S., A. Seidavi, S. Gharahveysi and I. Kadim. 2018. Savory (*Satureja hortensis* L.) powder and extract effects on broiler chicken ileal *Escherichia coli* and *lactobacillus bacteria*. *Journal of Applied Animal Research* 46(1): 639-642.

18.Park, Y.K., L.K. Fox, D.D. Hancock, W. McMahan and Y.H. Park. 2012. Prevalence and antibiotic resistance of mastitis pathogens isolated from dairy herds transitioning to organic management. *Journal of Veterinary Science* 13(1): 103-105.

19.Raffaella, C., L. Casettari, L. Fagioli, M. Cespi, G. Bonacucina and W. Baffone. 2017. Activity of essential oil-based microemulsions against *Staphylococcus aureus* biofilms developed on stainless steel surface in different culture media and growth conditions. *International Journal of Food Microbiology* 241: 132-140.

20.Russo, A., C. Formisano, D. Rigano, F. Senatore, S. Delfine, V. Cardile, S. Rosselli and M. Bruno. 2013. Chemical composition and anticancer activity of essential oils of Mediterranean sage (*Salvia officinalis* L.) grown in different environmental conditions. Food And Chemical Toxicology 55: 42-47.

21.Sharifi, A., A. Mohammadzadeh, T. Zahraei Salehi and P. Mahmoodi. 2018. Anti-bacterial, anti-biofilm and anti-quorum sensing effects of *Thymus daenensis* and *Satureja hortensis* essential oils against *Staphylococcus aureus* isolates. *Journal of Applied Microbiology* 124(2): 379-388.

22.Solórzano-Santos, F. and M.G. Miranda-Novales. 2012. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. Current Opinion in Biotechnology 23(2): 136-141.

23.Stefanovi, O.D., D.D. Stanojevi and L.R. Omi. 2012. Synergistic Antibacterial Activity Of *Salvia Officinalis* And *Cichorium Intybus* Extracts And Antibiotics. Natural Drugs 69(3): 457-463.

24.Suntres, Z.E., J. Coccimiglio and M. Alipour. 2015. The Bioactivity and Toxicological Actions of Carvacrol. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 55(3): 304-318.

25.Tepe, B. and M. Cilkiz. 2016. A pharmacological and phytochemical overview on Satureja. Pharmaceutical Biology 54(3): 375-412.

26.Zhu, H., M. Du, L. Fox and M.J. Zhu. 2016. Bactericidal effects of Cinnamon cassia oil against bovine mastitis bacterial pathogens. Food Control 66: 291-299.