DOI: 10.22092/VJ.2020.342383.1707
شماره ۱۳۲ پاییز ۱۴۰۰
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

بررسی فعالیت ضدمیکروبی و سمیت پپتید انتروسین P و دو اسانس گیاهی بر باکتری‌های بیماری‌زای دامی

• **سیده زهرا موسوی**
دانشکده ی کشاورزی، گروه علوم دامی، دانشگاه فردوسی مشهد
• **سید امین کاظمی**
دانشکده ی کشاورزی، گروه علوم دامی، دانشگاه فردوسی مشهد
• **محسن محروقی**
گروه علوم دامی، دانشگاه فردوسی مشهد
• **عباس تنهاییان (نویسنده مسئول)**
گروه علوم دامی، دانشگاه فردوسی مشهد

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹-۰۱-۰۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹-۰۳-۲۶
Emali: zaramousavi@yahoo.com

چکیده

مقاومت آنتی‌بیوتیکی یکی از بزرگترین تهدیدات برای سلامتی انسان و حیوانات است. پپتیدهای ضدمیکروبی و اسانس‌های گیاهی ترکیبات طبیعی هستند که می‌توانند به عنوان جایگزینی برای آنتی‌بیوتیک‌های رایج استفاده شوند. در این مطالعه حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) بر اساس روش میکروبراث به وسیله‌ی پلیت ۹۶ خانه با چهار تکرار با استفاده از دو اسانس کنگر فرنگی و رزماری و همچنین پپتید باکتریوسین انتروسین P بر روی باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا، اشرشیاکلای، استرپتوکوکوس آگالاکتیه **دامی صورت گرفت. بعد از اندازه‌گیری MIC، باکتری‌ها کشت داده شدند و حداقل غلظت کشندگی باکتری (MBC) سنجیده شد. با استفاده از روش MTT میزان سمیت این پپتید بر روی سلول‌های نرمال مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد کمترین میزان MIC و MBC برای هر سه باکتری مورد مطالعه مربوط به پپتید باکتریوسین انتروسین P می‌باشد. کمترین مقدار MIC مربوط به پپتید (۱۲,۰۶ µg/mL) بر روی باکتری** سودوموناس آئروژینوزا و استرپتوکوکوس آگالاکتیه **و بیشترین میزان مربوط به اسانس کنگر فرنگی (۵۰۰ µg/mL) بر روی باکتری** سودوموناس آئروژینوزا **گزارش شد. همچنین کمترین مقدار MBC مربوط به پپتید (۱۲,۰۶ µg/mL) بر روی باکتری** استرپتوکوکوس آگالاکتیه **می‌باشد. علاوه بر این، نتایج مربوط به تست MTT نشان از عدم سمیت این پپتید بر روی سلول‌های نرمال داشت. در نهایت با توجه به اثرات ضدباکتریایی قوی و عدم سمیت این پپتید بر سلول می‌توان نتیجه گرفت که انتروسین P می‌تواند بعنوان جایگزینی برای آنتی‌بیوتیک‌ها برای کنترل و مبارزه با عفونت‌های باکتریایی در صنعت دامپروری باشد.**

کلمات کلیدی: دام، باکتریوسین اینتروسین P، کنگر فرنگی، رزماری، اسانس

Veterinary Researches & Biological Products No 132 pp: 48-54

Evaluation of antibacterial activity and toxicity of enterocin P peptide and two essential oils against animal pathogens

By: Mousavi, Z., Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. Kazemi, A., Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad,Iran. Mahroghi, M., Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. Tanhaean, A., Shahroud University of Medical Sciences.

Received: 2020-03-24 **Accepted: 2020-06-15**

Emali: zaramousavi@yahoo.com

Antibiotic resistance is one of the biggest threats to human and animal health. Antimicrobial peptides and herbal essentional oils are natural compounds that can act as an alternative to conventional antibiotics. In this study, Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) was performed based on a microbroth dilution method by 96-well microtiter with four replicates with Cynara scolymus and Rosmarinus officinalis essential oils as well as Enterocin P peptide on animal pathogens as listed as *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Streptococcus agalactiae*. After MIC, Bacterial species were cultured and minimum bactericidal concentration (MBC) was evaluated as that showing no growth. The toxicity of this peptide on normal cells was evaluated by MTT assay. The results showed that the lowest amount of MIC and MBC against all three bacteria belonged to Enterocin P peptide. The lowest amount of MIC (12.06 µg / mL) was reported on *Pseudomonas aeruginosa* and *Streptococcus agalactiae* by peptide and the highest amount of MIC (500 µg / mL) was showed on *Pseudomonas aeruginosa* by Cynara scolymus essential oil. The lowest value of MBC (12.06 µg / mL) on *Streptococcus agalactiae* was also observed by peptide. In addition, the results of the MTT assay showed that the peptide was not toxic to normal cells. Finally, as considering strong antibacterial effect and non toxicity of Enterocin P, it could be represent an alternative to classical antibiotics to control and fight bacterial infections in animal industry.

Keywords: Animal, Entrocin P, Cynara scolymus, Rosmarinus officinalis, Essential oil

مقدمه

بررسی‌های به‌عمل‌آمده نشان می‌دهند که مصرف مستمر و طولانی مدت مقادیر تحت درمانی آنتی‌بیوتیک در خوراک دام و طیور ممکن است منجر به حضور بقایای آن‌ها در فرآورده‌های دامی گردیده و پس از مدتی موجب به وجود آمدن میکروارگانیسم‌های مقاوم به داروها در انسان گردد (۲). بر اساس گزارش‌های موجود، افزایش روزافزون ناهنجاری‌های مادرزادی، وقوع بیماری‌های مزمن، عدم تأثیر آنتی‌بیوتیک‌ها و برخی از عوارض دیگر که امروزه از آن‌ها به‌عنوان مشکلات بهداشتی جوامع بشری یاد می‌شود، به مصرف بی‌رویه همین ترکیبات نسبت داده می‌شود. در جوامع توسعه‌یافته شاهد ممنوعیت استفاده از ترکیبات آنتی‌بیوتیکی محرک رشد هستیم. به‌طوری‌که اتحادیه اروپا از سال ۲۰۰۶ استفاده از همه آنتی‌بیوتیک‌ها را در خوراک دام و طیور ممنوع کرده است. در سال ۱۹۸۶ در سوئد استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های محرک رشد ممنوع شد در نتیجه این امر باعث شده است که محققان به دنبال یافتن جایگزینی کارآمد برای این ترکیبات باشند (۱۷).

از زمان‌های بسیار قدیم از گیاهان و مشتقات آنها مانند اسانس‌های گیاهی برای درمان بسیاری از بیماری‌های استفاده شده. در طبیعت نیز اسانس‌های گیاهی نقش مهمی در محافظت از گیاهان بر عهده دارند که می‌توان آن‌ها را در تمام اندام‌های گیاهی اعم از جوانه‌ها، گل‌ها، دانه‌ها، شاخه‌ها و ریشه‌ها یافت که در ساختارهاي ویژه‌اي مانند ساختارهاي ترشحی، غدد، لوله‌هاي ترشحی و یا معابر رزینی و یا فضاهاي ترشحی ذخیره می‌شوند (۳). اسانس، مایعی فرار، روغنی و غلیظ است که در لیپیدها و حلال‌های آلی که چگالی کمتری نسبت به آب دارند حل می‌شود و از ترکیبات مختلفی شامل الکل، استر، مشتقات آلدهیدی، اسیدها، هیدروکربن‌های آلیفاتیک، ترپنوئیدها، فنیل پروپانوئیدها و ترکیبات کمیاب حاوی نیتروژن و گوگرد تشکیل شده است. اسانس‌ها به دلیل ویژگی ضد میکروبی، ضد اکسیداتیو، ضد التهابی و ضد سرطان که دارند می‌توانند جایگزین مناسبی برای آنتی‌بیوتیک‌ها در نظر گرفته شوند (۱، ۶).

رزماری دارای ترکیبات فنولی از جمله کارنوزول، اسیدرزمارینیک،

کافئیک، فلاوونوئیدها شامل دیوسمین، لوتئولین، ژنکوانین و مونوترپن‌ها مثل کامفور، سینئول و بورنئول می‌باشد (۱۵). مطالعات فراوانی بر روی خواص ضدمیکروبی رزماری و ترکیبات تشکیل‌دهنده آن تاکنون انجام شده است ازجمله کسکین و همکاران (۱۸) خاصیت ضدمیکروبی رزماری را بر روی باکتری‌های پاتوژن همچون اشرشیاکلی بررسی کردند. از سوی دیگر یوجی فو و همکاران (۱۲) اثرات ضدمیکروبی اسانس رز ماری را بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس نشان دادند.

کنگرفرنگی به‌واسطه خواص فراوانی که دارد از جمله کاهش‌دهنده کلسترول، رفع‌کننده مشکلات گوارشی و کبدی از گذشته بسیار مورد توجه جوامع بشری قرار گرفته است. در این رابطه بسیاری از محققان گزارش کردندکه اسانس گیاه کنگرفرنگی بواسطه داشتن ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی دارای خاصیت ضدمیکروبی مناسبی علیه باکتری‌های پاتوژن همچون اشرشیاکلی می‌باشد (۱۳). در آزمایشی دیگر نیز گزارش شد که اسانس کنگر فرنگی بواسطه دارا بودن ترکیبات فنلی همچون کلروژنیک اسید، سینارین و سینروزوئید دارای خاصیت ضدمیکروبی و ضدقارچی قدرتمندی است (۲۷).

پپتیدهای ضدمیکروبی دسته دیگر از ترکیبات جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها هستند که امروزه بسیاری از محققین نتایج سودمند را در رابطه با این ترکیبات گزارش کرده‌اند. پپتیدها دارای فعالیت ضدمیکروبی، ضدقارچی و ضدویروسی و حتی ضد پروتوزآ هستند. تحقیقات اخیر نشان داد که پپتیدهای ضدمیکروبی علاوه بر عملکرد اصلی‌شان که همان فعالیت ضدمیکروبی است دارای عملکردهای دیگری نیز هستند که باعث افزایش رشد حیوان و تحریک سیستم ایمنی می‌شوند (۲۰). فعالیت‌های پپتیدهای ضدمیکروبی بیشتر از طریق میانکنش با غشاهای فسفولیپیدی می‌باشد، بطوری که بسیاری از محققین گزارش کردند که اولین مکانیسم ضدمیکروبی اکثر پپتیدها، ایجاد اختلال در غشای سیتوپلاسمی سلول است (۱۶). از دیگر مکانیسم‌های ضدمیکروبی پپتیدها می‌توان به مهار سنتز پروتئین، اسید نوکلئیک و فعالیت آنزیمی علیه میکروب‌ها اشاره کرد (۲۰). از جمله پپتیدهایی که امروزه بسیار مورد توجه محققین قرار گرفته، می‌توان به پپتیدهای کاتیونی و آنیونی اشاره کرد. پپتیدهای کاتیونی شامل پپتید باکتریوسین انتروسین P و تاناتین می‌باشد. پپتید باکتریوسین انتروسین P به‌عنوان یک ترکیب ضدمیکروبی که دارای ۴۴ اسیدآمینه متصل بهم می‌باشد شناخته می‌شود و از باکتری انتروکوکوس فاسیوم P۱۳ *(Enterococcus faecium)* استخراج شده است. بسیاری از محققین گزارش کردند که این پپتید دارای خاصیت ضدمیکروبی علیه باکتری‌های پاتوژن و یک نگهدارنده‌ی مناسب مواد غذایی می‌باشد. تاناتین نیز به‌عنوان یک پپتید کاتیونی از حشره‌ای به نام *Podisus maculiventris* پس از تحریک سیستم ایمنی آن استخراج شد. این ترکیب به‌عنوان اولین خط دفاعی بدن حشره عمل می‌کند که دارای فعالیت ضدمیکروبی گسترده‌ای است (۱۰).

هدف از این مطالعه، بررسی خواص ضد باکتریایی اسانس رزماری و کنگرفرنگی و مقایسه‌ی آن با فعالیت ضدباکتریایی پپتید باکتریوسین انتروسین P علیه پاتوژن‌های دامی در شرایط آزمایشگاهی و بررسی میزان سمیت این پپتید بر سلول‌ها می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد مورد نیاز

باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا، اشرشیاکلای و استرپتوکوک آگالاکتیه استحصال شده از بیماری‌های دامی از دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد (مشهد، ایران) تهیه شد و برای بررسی اثرات ضدباکتریایی مورد استفاده قرار گرفتند. پپتید باکتریوسین انتروسین P و سلول‌های نرمال NIH / 3T3 (ATCC® CRL-1658 ™) و محیط کشت‌ها از مطالعات قبلی در دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شدند (۲۱).

اسانس‌گیری

پس از جمع‌آوری گیاهان از رویشگاه‌های طبیعی واقع در استان خراسان رضوی، شهرستان مشهد و انجام آزمون‌های گیاه‌شناسی براساس فارماکوپه گیاهان ایران به آزمایشگاه گیاهی گروه باغبانی دانشگاه فردوسی مشهد منتقل شد، شستشوی سطحی بافت‌های گیاهی توسط آب مقطر استریل انجام شد و گیاهان جهت جلوگیری از اثر دمای بالا بر روی ترکیبات آن، به مدت یک هفته در شرایط استاندارد (دمای اتاق و سایه) خشک شدند. سپس از قسمت‌های مختلف گیاهان جهت تهیه اسانس و عصاره نمونه‌گیری انجام شد. استخراج به روش تقطیر با آب (Hydrodistillation) بوسیله دستگاه کلونجر (Clevenger) انجام شد، بدین صورت که ابتدا ۱۰۰ گرم از بافت گیاهی خشک شده را خرد و سپس توسط دستگاه کلونجر به‌روش تقطیر به مدت شش ساعت استخراج انجام گردید. پس از عبور مخلوط حاصل از صافی واتمن (Whatman) شماره دو، اسانس توسط سولفات سدیم آب‌گیری و در شیشه‌های تیره رنگ استریل ریخته و تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۲۲).

حداقل غلظت بازدارندگی (MIC)

آزمایش MIC در میکروپلیت ۹۶ خانه استریل و با روش براث میکرودایلوشن (Microdilution broth) انجام شد (۲۲). در ابتدا از محیط کشت مولرهینتون براث (مرک آلمان) میزان ۱۰۰ µl داخل هر یک از چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای مربوط به رقت‌های مورد نظر ریخته شد. در ادامه به اولین چاهک ردیف اول ۱۰۰ µl از پپتید یا اسانس مورد مطالعه اضافه گردید و پس از چند بار پیپت کردن جهت مخلوط شدن کامل ترکیبات، از چاهک دوم به سوم و به همین ترتیب تا چاهک ۱۱ رقیق‌سازی انجام شد (غلظت‌های هر چاهک در هر ردیف نسبت به چاهک قبلی به نصف کاهش می‌یابد). در انتها به همه چاهک‌ها µl ۱۰۰ سوسپانسیون میکروبی معادل 1×10^{8} ml/cfu اضافه شد که در این آزمایش چاهک شماره ۱۱ هر ردیف به عنوان تیمار شاهد (کنترل منفی)، فقط حاوی محیط کشت و ترکیب مورد استفاده بود و باکتری در آن کشت نشد تا آلودگی احتمالی سبب بروز خطا نشود و چاهک شماره ۱۲ هر ردیف به عنوان تیمار شاهد باکتری (کنترل مثبت) استفاده شد تا از شرایط مناسب کشت و رشد نرمال باکتری اطمینان حاصل شود که برای تعیین کدورت حاصل از رشد باکتری حاوی محیط کشت و باکتری بود. بعد از تلقیح باکتری به تمام گروه‌های آزمایشی، تمام میکروپلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. بعد از اتمام انکوباسیون، کدورت یا عدم کدورت در چاهک به صورت چشمی

مشاهده گردید و سپس جذب نوری توسط دستگاه خوانش‌گر پلیت الیزا (STAT FAX ۲۱۰۰) در طول موج ۶۳۰ nm خوانده شد. برای تعیین MIC از کمترین غلظتی که در آن کدورتی مشاهده نگردید استفاده شد.

حداقل غلظت کشندگی (MBC)

برای اندازه‌گیری حداقل غلظت کشندگی (MBC)، از تمام چاهک‌های فاقد کدورت مقدار ۱۰ µl در شرایط کاملاً استریل برداشته شد و بر روی محیط آگار غذایی (NA) کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد، کمترین غلظتی از اسانس که توانسته ۹۹/۹ درصد از باکتری‌ها را نابود کند و عملا باکتری در ان رشد نکرده، به عنوان غلظت کشندگی MBC گزارش گردید. کلیه مراحل آزمایش سه بار تکرار شد و نتایج به صورت میانگین ارائه گردید.

آزمون MTT

جهت بررسی اثر سمیت سلولی پپتید بر رشد و تکثیر سلول‌ها از روش رنگ سنجی MTT استفاده شد. پودر MTT یک نمک تترازولیوم محلول در آب است. نمک‌های تترازولیوم از گروه وسیعی از ترکیبات آلی تشکیل شده‌اند که بعد از احیاشدن اغلب به صورت ترکیب فورمازان پررنگ و غیرمحلول در می‌آیند. این ترکیبات به صورت گسترده‌ای به عنوان نشان‌دهنده پایان واکنش‌های احیا و زنده بودن سلول مصرف می‌شوند. برای تعیین سمیت پپتید بروی سلول نرمال، از روش MTT استفاده شد. سلول‌ها در محیط کشت حاوی سرم جنین گاو کشت داده شدند. وقتی غلظت سلول به ۱×۱۰^{۵} رسید، آن ها به پلیت ۹۶ خانه ای منتقل شدند و در انکوباتور ۵٪ CO_2 به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از یک شبانه روز، سلول‌های کشت شده با ۵ رقت مختلف پپتید ۴۸,۲۵ و ۹۶,۵ و ۱۹۳ و ۳۸۶ و ۷۷۲ µg /ml با سه تکرار تحت تیمار قرار گرفتند و به مدت ۴۸ ساعت در شرایط مشابه انکوبه شدند. پس از آن، سلول‌ها با ۱۰ µl محلول MTT (۵ mg/mL) و به مدت چهار ساعت انکوبه شدند. مایع رویی خارج شد و باقی‌مانده با افزودن ۱۰۰ µl از DMSO در هر چاهک به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد CO_2 انکوبه شدند. سرانجام، میزان جذب در ۵۷۰ nm توسط اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد و نتایج مورد بررسی قرار گرفتند.

آنالیز آماری

به منظور آنالیز داده‌ها از نرم‌افزار (SAS ۹,۱) در قالب طرح کاملا تصادفی استفاده شد. مقایسه‌ی میانگین از طریق رویه‌ی دانکن مورد آزمون قرار گرفت.

نتایج

نتایج حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی اسانس‌های کنگر فرنگی و رزماری و همچنین پپتید باکتریوسین P بر روی سه باکتری مورد مطالعه در جدول یک ارائه گردیده است. به طور کلی کمترین میزان MIC و MBC برای هر سه باکتری مورد مطالعه مربوط به پپتید باکتریوسین انتروسین P می‌باشد. کمترین مقدار حداقل غلظت بازدارندگی مربوط به پپتید باکتریوسین انتروسین P (۱۲,۰۶ µg/mL) بر روی باکتری سودوموناس آئروژینوزا و استرپتوکوک آگالاکتیه و بیشترین میزان مربوط به اسانس ریشه‌ی کنگر فرنگی (۵۰۰ µg/mL) بر روی باکتری سودوموناس آئروژینوزا گزارش شد. همچنین کمترین مقدار برای حداقل غلظت

جدول۱- نتایج حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی (µg/mL) اسانس‌ها و پپتید بر روی باکتری های بیماری زای دامی.

باکتری ها	کنگر فرنگی		رزماری		پپتید	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
سودوموناس آئروژینوزا	۵۰۰	۵۰۰	۲۵۰	۵۰۰	۱۲,۰۶	۲۴,۱۲
اشرشیاکلای	۱۲۵	۲۵۰	۶۲,۵	۱۲۵	۴۸,۲۵	۹۶,۵
استرپتوکوک آگالاکتیه	۲۵۰	۵۰۰	۱۲۵	۲۵۰	۱۲,۰۶	۱۲,۰۶

جدول۲- نتایج مربوط به درصد زنده مانی سلول های نرمال تحت تیمار با پپتید انتروسین P.

غلظت پپتید (µg/mL)	۴۸,۲۵	۹۶,۵	۱۹۳	۳۸۶	۷۷۲	شاهد	SEM	P-value
(٪) میانگین زنده‌مانی سلول‌ها	۸۳,۹۲	۹۳,۱۸	۸۹,۰۲	۸۶,۷۱	۸۹,۹۸	۱۰۰	۰,۵۹۳	۰,۷۱

کشندگی مربوط به پپتید باکتریوسین انتروسین P (۱۲,۰۶ µg/mL) بر روی باکتری استرپتوکوک می‌باشد.

نتایج مربوط به آزمون MTT نشان می‌دهد با وجود افزایش میزان غلظت پپتید تاثیر معنی‌داری در کاهش تعداد سلول‌ها در مقایسه با نمونه شاهد نداشت (P>۰/۰۵)، با وجود اینکه غلظت‌های اعمالی چندین برابر حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی برای باکتری‌های مورد بررسی است (جدول ۲).

بحث

پتانسیل ضدباکتریایی و اهمیت آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان بسیاری از بیماری‌های باکتریایی بر هیچکس پوشیده نیست، اما امروزه استفاده‌ی نادرست از آن‌ها موجب بروز مشکلاتی از جمله مقاومت دارویی در باکتری‌ها شده است که نیاز به یافتن جایگزین‌هایی با منشا طبیعی و اثرات جانبی کم را دو چندان می‌کند (۱۹، ۲۵).

گیاهان معطر و گیاهان دارویی از دیرباز به عنوان درمانی طبیعی جایگزین برای درمان بسیاری از بیماری‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفته اند. در سال های اخیر، گزارشات زیادی در مورد اثربخشی استفاده از گیاهان معطر مختلف برای معالجه بیماری‌های دامی منتشر شده است. خدائی (۱۹) اثر ضدباکتریایی اسانس سیر و رزماری (۱۰، ۳۰ و ۵۰ درصد) را بر روی پاتوژن‌های دامی استافیلوکوکوس آرئوس، اشرشیاکلي و استافیلوکوکوس آگالاکتیه مورد بررسی قرار داد. حداقل غلظت مهاري و کشندگي بین دو اسانس سیر و رزماري تفاوت چشمگیري نداشتند. همچنین محققین در مطالعه‌ای دیگر نشان دادند که استفاده از کنگر فرنگی مانع رشد باکتری‌هایی نظیر اشرشیاکلای و لیستریا مونوسیتوژنز موجود در گوشت گاو شده است. این محققین ادعا کردند که باکتری‌های گرم منفی نسبت به ترکیبات گیاهی که با آسیب‌رساندن به دیواره سلولی فعالیت می‌کنند، حساس‌تر هستند (۹). در مطالعه‌ی حاضر اسانس رزماری نسبت به کنگر فرنگی خاصیت ضدباکتریایی بیشتری را نشان داد که این می‌تواند به تفاوت در نوع و میزان ماده‌ی موثره این دو ترکیب با هم باشد.

استفاده از پپتیدهای ضدمیکروبی بعنوان یک گزینه مناسب برای جایگزینی با آنتی‌بیوتیک‌ها، علاوه بر خواص ضدباکتریایی، ضدقارچی و ضدویروسی می‌توانند علیه باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک نیز فعالیت ضدباکتریایی نشان دهند (۱۱). پپتید باکتریوسین انتروسین P به طور طبیعی توسط باکتری‌های لاکتیک اسید ترشح می‌شود اما مقدار آن معمولا ناچیز است. به همین دلیل امروزه استفاده از تکنیک‌های مولکولی این امکان را فراهم کرده که توالی ژنی مربوط به پپتیدها را درون میزبان‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی بصورت نوترکیب با مقادیر بالا بیان کرد (۲۶). در مطالعات گذشته تنهاییان و همکاران (۲۵) فعالیت ضدباکتریایی این پپتید را مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که این پپتید علاوه بر تاثیر بر روی برخی از باکتری‌ها، بر روی باکتری های مقاوم به آنتی‌بیوتیک نیز موثر است. علاوه بر این، پپتید باکتریوسین انتروسین P با توانایی مقاومت در برابر عوامل مختلفی همچون حرارت، غلظت بالای نمک، تغییرات pH و قابلیت لئوفلایز کردن، به‌عنوان گزینه‌ی مناسب جهت استفاده در صنعت داروسازی در نظر گرفته شده است. در این مطالعه نیز این پپتید خاصیت ضدباکتریایی علیه تمام نمونه‌های تست شده نشان داد. مطالعات نشان دادند که پپتیدهای ضدمیکروبی خواص ضدبیوفیلمی قوی را بر روی باکتری‌ها و همچنین جدایه های دایه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک نیز نشان می‌دهند. پپتیدهای ضدمیکروبی می‌توانند در مراحل اولیه شکل‌گیری بیوفیلم برای جلوگیری از چسبندگی اولیه باکتری‌ها تداخل ایجاد کنند که این امر در ایجاد بیماری‌زایی باکتری‌ها بسیار اهمیت دارد، همچنین می‌توانند بیوفیلم بالغ را از طریق جدا کردن باکتری‌ها یا کشتن آن‌ها از بین ببرند (۴).

مطالعات نشان دادند که باکتریوسین‌هایی نظیر lacticin Q ، Nisin A، nukacin و ISK-۱ می‌توانند موجب تخریب دیواره‌ی سلول‌های بهم چسبیده در بایوفیلم شده (نظیر استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین) و باعث آزادسازی ATP از این سلول‌ها می‌شود که موثرتر از درمان‌های آنتی‌بیوتیکی است (۲۳). همچنین از این پپتید بعنوان ترکیبی آنتی‌اکسیدانی در مطالعات مختلف استفاده شده است. تأثیر فعالیت پپتید بر روی باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی کمتر است و تنها در تعداد محدودی از باکتری‌های گرم مثبت این اثرات گزارش شده است (۸). در این مطالعه میزان MIC و MBC برای باکتری گرم مثبت استرپتوکوک آگالاکتیه نسبت به دو باکتری گرم منفی سودوموناس آئروژینوز و اشرشیاکلای کمتر بوده که هم‌راستا با نتایج محققین دیگر می‌باشد.

از جمله مزایای استفاده از پپتیدها نسبت به اسانس‌ها می‌توان به مقاومت نسبت به حرارت، اکسیداسیون و همچنین امکان دستورزی از طریق اتصال به سایر پپتیدها جهت افزایش فعالیت آن‌ها اشاره کرد. هم سو با نتایج این مطالعه، موسوی و همکاران (۲۱) نشان دادند که پپتیدهای باکتریوسین انتروسین P و تاناتین دارای اثرات ضدباکتریایی قوی‌تری در غلظت‌های کمتری نسبت به دو اسانس نعناع سبز و زیره سبز بر روی برخی باکتری‌های مولد ورم پستان در گاو مانند *Staphylococcus aureus*, *E.coli 0157 H7* و *E.coli* هستند.

در مورد اسانس‌ها مشکلی که وجود دارد اعمال غلظت‌های چند صد برابری یا حتی چند ده برابری با توجه به افزایش میزان کدورت در محیط کشت مقدور نیست؛ از این‌رو به فرض که اسانس‌ها و عصاره‌ها هیچ سمیتی نداشته باشند باز از حیث مهار عامل بیماری بسیار ضعیف‌تر از پپتید نوترکیب عمل می‌کنند. یک مشکل بالقوه در مورد پپتیدها این است که فعالیت خود را بر روی غشا کاملاً بصورت انتخابی عمل نمی‌کنند و ممکن است سمیت بالقوه‌ای را نیز برای سلول‌های یوکاریوتی ایجاد کنند (۵). مطالعات بیوفیزیکی دو عامل مهم در انتخاب غشا را توسط AMPها نشان می‌دهند: (الف) تعامل الکترواستاتیک بین پپتید کاتیونی و پروفایل غشای اسید چرب باکتری، که از سلول‌های پستانداران حدود ۲۵٪ لیپیدهای آنیونی بار منفی بیشتری دارد. (ب) وجود مقدار زیادی کلسترول در غشای یوکاریوتی، که باعث تقویت لایه لیپیدی شده و از ایجاد اختلال در غشای سلولی جلوگیری می‌کند (۱۴). لازم به ذکر است که مطالعات نشان می‌دهد که باکتریوسین‌ها می‌توانند به عنوان مواد نگهدارنده غذایی طبیعی و غیرسمی استفاده شوند که یک ویژگی مهم است (۷) که هم راستا با نتایج این مطالعه بود.

نتیجه‌گیری

آزمون ضدباکتریایی انجام شده در این مطالعه نشان داد که پپتیدهای باکتریوسین انتروسین P دارای اثرات ضدباکتری قوی‌تری در غلظت‌های کمتری نسبت به دو کنگر فرنگی و رزماری بر روی تمامی باکتری‌های مورد بررسی در این مطالعه می‌باشد. اسانس رزماری نسبت به کنگر فرنگی فعالیت ضدباکتریایی بیشتری را بر روی سه پاتوژن دامی نشان داد. بررسی اثر سمیت بر سلول نرمال در این مطالعه، نشان از غیرسمی بودن این پپتید در دوزهای مختلف داشت. پپتیدهای ضدمیکروبی می‌توانند در آینده به عنوان راه حلی برای غلبه بر مشکلات استفاده بی‌رویه از آنتی بیوتیک‌ها و اثرات جانبی آن‌ها بر دام و متعاقبا بر انسان باشند.

منابع مورد استفاده

1.Ahmadi, E., K. Mardani and A. Amiri. 2020. Molecular Detection and Antimicrobial Resistance Patterns of Shiga Toxigenic Escherichia coli Isolated from Bovine Subclinical Mastitis Milk Samples in Kurdistan, Iran. *Archives of Razi Institute*. 75: 169-177.

2.Andreason, M. 2000. Consequences of the ceased used of growth promoters presented at DVHS 2000, 4th and 5th May 2000.

3.Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., and Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils–a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475.

4.Batoni, G., Maisetta, G., and Esin, S. 2016. Antimicrobial peptides and their interaction with biofilms of medically relevant bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1858(5), 1044-1060.

5.Brender, J. R., McHenry, A. J., and Ramamoorthy, A. 2012. Does cholesterol play a role in the bacterial selectivity of antimicrobial peptides?. *Frontiers in immunology*, 3, 195.

6.Costa, D. C., Costa, H. S., Albuquerque, T. G., Ramos, F., Castilho, M. C., and Sanches-Silva, A. 2015. Advances in phenolic compounds analysis of aromatic plants and their potential applications. *Trends in Food Science and Technology*, 45(2), 336-354.

7.Drider, D., and Rebuffat, S. (Eds.). 2011. Prokaryotic antimicrobial peptides: from genes to applications. *Springer Science and Business Media*.

8.Drider, D., Fimland, G., Héchard, Y., McMullen, L. M., and Prévost, H. 2006. The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 70(2), 564-582.

9.Ergezer, H., Kaya, H. İ., and Şimşek, Ö. 2018. Antioxidant and antimicrobial potential of artichoke (Cynara scolymus L.) extract in beef patties. *Czech Journal of Food Sciences*, 36(2), 154-162.

10.Fehlbaum, P., Bulet, P., Chernysh, S., Briand, J. P., Roussel, J. P., Letellier, L., ... and Hoffmann, J. A. 1996. Structure-activity analysis of thanatin, a 21-residue inducible insect defense peptide with sequence homology to frog skin antimicrobial peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(3), 1221-1225.

11.Ferreira Cespedes, G., Nicolas Lorenzon, E., Festozo Vicente, E., Jose Soares Mendes-Giannini, M., Fontes, W., de Souza Castro, M., and Maffud Cilli, E. 2012. Mechanism of action and relationship between structure and biological activity of Ctx-Ha: a new ceratotoxin-like peptide from Hypsiboas albopunctatus. *Protein and peptide letters*, 19(6), 596-603.

12.Fu, Y., Zu, Y., Chen, L., Shi, X., Wang, Z., Sun, S., and Efferth, T. 2007. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. *Phytotherapy Research*, 21(10), 989-994.

13.Gaafar, A. A., and Salama, Z. A. 2013. Phenolic compounds from artichoke (Cynara scolymus L.) by-products and their antimicrobial activities. Journal of Biology, *Agriculture and Healthcare* , 3, 1-6.

14.Glukhov, E., Stark, M., Burrows, L. L., and Deber, C. M. 2005. Basis for selectivity of cationic antimicrobial peptides for bacterial versus mammalian membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 280(40), 33960-33967.

15.Gyawali, R., Hayek, S. A., and Ibrahim, S. A. 2015. Plant extracts as antimicrobials in food products: Mechanisms of action, extraction methods, and applications. *Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality*, 49-68.

16.Huang, H. W. 2006. Molecular mechanism of antimicrobial peptides: the origin of cooperativity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1758(9), 1292-1302.

17.Kazemi, S. A., Ahmadi, H., and Karimi Torshizi, M. A. 2019. Evaluating two multistrain probiotics on growth performance, intestinal morphology, lipid oxidation and ileal microflora in chickens. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 103(5), 1399-1407.

18.Keskin, D., Oskay, D., and Oskay, M. 2010. Antimicrobial activity of selected plant spices marketed in the West Anatolia. *International Journal of Agriculture and Biology*, 12(6), 916-920.

19.Khodaei, M. M. 2014. Antibacterial Effect of Allium sativum and Rosmarinus officinalis Essential Oil on Major Mastitis Pathogens in Dairy Cattle. 79-88.

20.Liu, T., She, R., Wang, K., Bao, H., Zhang, Y., Luo, D., ... and Peng, K. 2008. Effects of rabbit sacculus rotundus antimicrobial peptides on the intestinal mucosal immunity in chickens. *Poultry science*, 87(2), 250-254.

21.Mousavi, Z., Mohamadi, F., and Tanhaian, A. 2020. Antibacterial effect of essential oil and peptide on some bovine mastitis bacteria in vitro. *Veterinary Researches and Biological Products* .(In Persian)

22.Nccls (National Committee for Clinical Laboratory Stan-

dards), 2000.Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, Approved Standard.M7-A5.

23.Okuda, K. I., Zendo, T., Sugimoto, S., Iwase, T., Tajima, A., Yamada, S., ... and Mizunoe, Y. 2013. Effects of bacteriocins on methicillin-resistant Staphylococcus aureus biofilm. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(11), 5572-5579

24. Tafi, A. A., S. Meshkini, A. Tukmechi, M. Alishahi and F. Noori. 2020. Therapeutic and Histopathological Effect of Aloe vera and Salvia officinalis Hydroethanolic Extracts against Streptococcus iniae in Rainbow Trout. *Archives of Razi Institute*. 75: 275-287.

25.Tanhaeian, A., Damavandi, M. S., Mansury, D., and Ghaznini, K. 2019. Expression in eukaryotic cells and purification of synthetic gene encoding enterocin P: a bacteriocin with broad antimicrobial spectrum. *AMB Express*, 9(1), 6.

26.Walsh, G. 2010. Biopharmaceutical benchmarks 2010. Nature *biotechnology*, 28(9), 917-924.

27.Zhu, X., Zhang, H., and Lo, R. 2004. Phenolic compounds from the leaf extract of artichoke (Cynara scolymus L.) and their antimicrobial activities. Journal of *Agricultural and Food Chemistry*, 52(24), 7272-7278.