

## بررسی تاثیر نانوذره اکسید آهن سنتز شده از گیاه کاکوتی (*Ziziphora clinopodioides*) بر بیان ژن های پمپ افلاکس استافیلوکوکوس اورئوس

سید مصطفی سجادیان (M.Sc)، مریم تیموری\* (Ph.D)

گروه زیست‌شناسی، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، رودهن، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۵/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۸/۲۹

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱-۷۶۵۱۱۲۱۳ Teimourimaryam93@gmail.com

### چکیده

هدف: یکی از عوامل مهم ایجادکننده عفونت‌های بیمارستانی، سویه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به دارو است، وجود پمپ افلاکس (nor A) از توانایی‌های این باکتری در ایجاد مقاومت‌های دارویی است. آهن به شکل نانوذرات با فعالیت ضد میکروبی علیه باکتری‌ها مورد استفاده قرار گرفته است. هدف این مطالعه بررسی تاثیر نانوذره اکسید آهن سنتز شده از عصاره گیاه کاکوتی بر بیان ژن پمپ افلاکس استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از روش Real-time PCR می‌باشد.

مواد و روش‌ها: تشکیل نانوذرات آهن سبز با استفاده از عصاره اتانولی گیاه کاکوتی و محلول نمک آهن صورت گرفت و با استفاده از میکروسکوپ الکترونی SEM و TEM شناسایی شد. سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس از بیمارستان‌ها و آزمایشگاه‌های شهر تهران جمع‌آوری و جداسازی شد. خاصیت ضد میکروبی نانوذرات سبز علیه سویه‌ها بررسی شد. استخراج DNA، RNA و cDNA صورت گرفت و بیان نسبی ژن norA در ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس با روش Real Time PCR ارزیابی شد.

یافته‌ها: سویه‌های مختلف، تحت تاثیر نانوذره آهن، تغییر بیان مختلفی را نشان دادند که از نظر آماری تفاوت معناداری در مقایسه با بیان ژن gmK دارد ( $P < 0.05$ ). میزان بیان ژن norA در سویه‌های مختلف، کاهش معناداری نشان داد که بیان‌کننده فعالیت ضد پمپ افلاکسی عصاره گیاه مورد نظر است.

نتیجه‌گیری: نانوذرات اکسید آهن سنتز شده از عصاره گیاه کاکوتی به عنوان یک مهارکننده پمپ افلاکس در ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس عمل می‌کند و پتانسیل استفاده در صنایع دارویی و بیولوژیکی را دارد.

واژه‌های کلیدی: گیاه کاکوتی، استافیلوکوکوس اورئوس، پمپ افلاکس، Real-time PCR، عصاره های گیاهی

### مقدمه

نانوذرات آهن به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد و کاربردهای مختلف در زمینه‌های متنوع مورد توجه بسیاری از پژوهشگران واقع شده است [۱،۲]. اصلاح محیط زیست و کاهش آلودگی‌های مختلف، کاربرد در صنایع، استفاده در زمینه‌های زیست دارویی از قبیل دارورسانی، سنجش پادتن و گرمادهی توسط مگنتیت از جمله اثرات نانوذرات آهن می‌باشد [۱،۲]. استفاده از نانوذرات به عنوان مهارکننده‌های ژن‌های پمپ افلاکس (ژن پمپ افلاکس توانایی‌های این باکتری در ایجاد مقاومت‌های دارویی است) به بهبود اثر ضد باکتریایی آنتی‌بیوتیک‌های معمولی کمک می‌کند [۳].

روش‌های گوناگونی به منظور سنتز نانوذرات موجود است، اما روش سنتز نانوذرات با استفاده از عصاره گیاهان که سنتز سبز نامیده می‌شود، یک روش نوین، بسیار ساده، اقتصادی و

دوست‌دار محیط زیست می‌باشد [۴]. استفاده از گیاهان یا عصاره آن‌ها به منظور سنتز نانوذرات، که زیست سازگارتر هستند و سنتز در اندازه و شکل معین را امکان‌پذیر می‌کند، مسیر جدیدی را به نانوبیوتکنولوژی مدرن اضافه می‌کند [۵] و همچنین جایگزین سازگار و موثر برای روش‌های شیمیایی و فیزیکی متعارف می‌باشد و از نظر هزینه مناسب‌تر است [۶]. ترکیبات فیتوشیمیایی موجود در برگ، نقش اصلی را به عنوان عامل کاهش‌دهنده ایفا می‌کند که به سنتز نانوذرات اکسید آهن سازگار با محیط زیست کمک می‌کند [۷].

مانیکندن و ماده‌ها در سال ۲۰۱۷ به انجام سنتز سبز نانوذرات اکسید آهن با استفاده از عصاره گیاهی *Leucas aspera* و سپس مطالعاتی در ارتباط با ارزیابی خاصیت آنتی‌باکتریال و آنتی‌اکسیدانی پرداخته‌اند و نشان دادند که سنتز سبز با استفاده از عصاره برگ گیاه *Leucas aspera* می‌تواند

بیان داشتند که عصاره این گیاه دارای اثرات ضد پمپ افلاکسی می‌باشد و پیشنهاد کردند که عصاره این گیاه را می‌توان به عنوان یک ترکیب مهارکننده پمپ افلاکس و در نهایت به عنوان یک مکمل دارویی امیدبخش به مراکز دارویی ارائه داد.

تیموری در سال ۱۳۹۱ با بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره الکلی گیاه *Teucrium polium* روی چهار سویه مرجع استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سوبتیلیس، اشرشیاکولی و کلبسیلا پونومونیا بیان داشته است که غلظت‌های مشخصی از عصاره این گیاه دارای اثرات ضد میکروبی مفیدی روی باکتری‌ها می‌باشد و تاثیر عصاره‌ها با کم شدن غلظت آن‌ها کم می‌شود.

هم‌چنین میرزایی و همکارانش در سال ۱۳۹۶ با بررسی اثر مهاری عصاره گیاه درمنه از گونه *Artemisia quttensis* بر روی پمپ افلاکس *norA* در سویه‌های مقاوم به سیروفلوکساسین استافیلوکوکوس اورئوس بیان داشتند که تمامی سویه‌ها دارای پمپ افلاکس *norA* هستند و نتایج بیانگر آن است که عصاره گیاه *A. quttensis* بر روی تمامی سویه‌های مقاوم دارای پمپ افلاکس *norA* اثر مهاری دارد.

گیاه کاکوتی با نام علمی *Ziziphora clinopodioides* متعلق به جنس *Ziziphora* و تیره نعناعیان می‌باشد. از نقطه نظر طب سنتی، این گیاه به دلیل وجود ترکیبات ضد میکروبی کاربرد فراوانی دارد [۱۲]. مواد مؤثر تشکیل‌دهنده این گیاه شامل ژرمارکن، لیمونن، تیمول و کارواکرول، تاکاروفیلن، اسپاتولنول، سسکوئیتیرن، پولگون، پی‌متتا ۳، دینن، آلفا و بتاینن می‌باشد [۱۳].

أزترک و همکاران در سال ۲۰۰۶ به بررسی ترکیبات گیاه کاکوتی توسط دستگاه GC پرداختند و بیان داشتند که این گیاه دارای ۱۸ ترکیب می‌باشد و بالاترین مقدار مربوط به پولگون می‌باشد و نتایج نشان‌دهنده آن است که این گیاه دارای فعالیت ضد میکروبی بر روی باکتری گرم مثبت و گرم منفی می‌باشد.

در این پژوهش از روش سبز برای تولید نانوذرات آهن استفاده شده است که سلامت انسان و محیط زیست را به خطر نمی‌اندازد و یک روش با بازدهی بالا و بسیار ساده و ارزان است. تاکنون مطالعه‌ای در زمینه تاثیر نانوذره اکسید آهن سنتز شده از عصاره گیاه کاکوتی (*Ziziphora clinopodioides*) بر روی بیان ژن پمپ افلاکس *norA* در سویه‌های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس انجام نشده است. بنابراین، مطالعه حاضر با هدف سنتز و توسعه یک روش جدید جهت تهیه نانوذرات اکسید آهن با استفاده از عصاره‌ی اتانولی گیاه کاکوتی صورت گرفته است؛ هم‌چنین اثرات این نانوذرات بر بیان ژن‌های پمپ افلاکسی *norA* در سویه‌های بالینی

روش اقتصادی و موثری برای سنتز نانوذرات اکسید آهن باشد و هم‌چنین جایگزین سازگار و موثر برای روش‌های شیمیایی و فیزیکی متعارف می‌باشد و از نظر هزینه نیز مناسب‌تر است [۶].

در پژوهش کاناگا و کادیرولو در سال ۲۰۱۷ نیز سنتز سبز نانوذرات اکسید آهن با استفاده از گیاه *Lagenaria siceraria* صورت پذیرفته و سپس فعالیت ضد میکروبی آن را ارزیابی شده است. در این مطالعه تجربی خواص ضد میکروبی نانوذرات آهن سنتز شده در برابر استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی قرار گرفت. در نتایج پژوهش نشان داده شده است که نانوذرات اکسید آهن سنتز شده با گیاه *Lagenaria siceraria* می‌تواند در برنامه‌های مختلف بیولوژیکی مورد استفاده قرار گیرد [۷].

استافیلوکوکوس اورئوس، یک باکتری گرم مثبت بی‌هوازی اختیاری و از موفق‌ترین باکتری‌های بیماری‌زا می‌باشد [۸،۹]. استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها به طور بی‌رویه یکی از دلایل مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این باکتری بیان شده است [۹].

یکی از مکانیسم‌های مقاومت باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به آنتی‌بیوتیک‌ها و جلوگیری از تجمع دارو درون سلول، وجود پمپ‌های افلاکس می‌باشد که مواد سمی از جمله آنتی‌بیوتیک را به محیط خارج پمپ می‌کنند [۱۰،۹].

پمپ‌های افلاکس بر اساس توالی اسیدهای آمینه و منبع انرژی مورد نیاز به پنج گروه اصلی تقسیم‌بندی می‌شوند و از نظر بالینی به طور موثری مرتبط با گروه‌های RND (Resistant Nodulation Division یا Major Facilitator Super Family) می‌باشند، به نحوی که با آزادکردن انرژی نیرو محرکه‌ی پروتون، در خارج کردن آنتی‌بیوتیک نقش دارند [۱۱].

یکی از مهم‌ترین سیستم‌های افلاکس در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، سیستم افلاکس MFS می‌باشد که یکی از پمپ‌های مهم این خانواده، پمپ افلاکس *norA* است. با کاهش بیان ژن‌های پمپ افلاکس در باکتری‌ها می‌توان موجب بهبود فرآیند درمان شد. کاظمی و همکارانش در سال ۱۳۹۵ نشان دادند که بین پمپ افلاکس *norA* و مقاومت به سیروفلوکساسین در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس ارتباط وجود دارد، به طوری که کاهش بیان ژن *norA* در کنترل سویه‌های مقاوم به سیروفلوکساسین می‌تواند مفید واقع شود.

امروزه پژوهشگران در تلاش هستند از عصاره‌های گیاهی به منظور درمان عفونت‌های ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به آنتی‌بیوتیک و به‌خصوص مهار پمپ‌های افلاکس استفاده کنند. در زمینه بررسی اثرات ضد پمپ افلاکسی عصاره‌های گیاهی در سویه‌های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس، پژوهش‌های مختلفی صورت پذیرفته است. عزتی و همکارانش در سال ۱۳۹۷ با بررسی بر روی عصاره گیاه بابونه

استافیلوکوکوس اورئوس به منظور بررسی اثرات ضد باکتریایی آن‌ها ارزیابی می‌شود.

## مواد و روش‌ها

جمع‌آوری گیاه و عصاره‌گیری. این مطالعه تجربی از تیر تا آذرماه ۹۷ با حمایت دانشگاه آزاد اسلامی انجام شده است. گیاه *Z. cliniopodioides* از مرکز ذخایر زیستی ایران با شماره هر باریومی P۱۰۰۷۲۹۹ تهیه شد. مواد گیاهی جمع‌آوری شده پس از تمیز نمودن و خشک کردن، به وسیله آسیاب پودر شد و در شرایط مناسب نگهداری شد. برای تهیه عصاره اتانولی با استفاده از روش خیساندن، مقدار ۲۰ گرم از پودر خشک شده گیاه را به ۸۰ میلی‌لیتر از اتانول اضافه نموده و به مدت ۲۴ ساعت عمل هم زدن و عصاره‌گیری انجام گرفت. در نهایت محلول مورد نظر را در بشر ریخته و در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه به مدت ۴ روز قرار داده تا خشک شود [۱۴].

سنتز نانوذرات آهن. سنتز سبز نانوذرات اکسید آهن، با استفاده از عصاره گیاهی و محلول نمک آهن  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  با غلظت ۰/۰۱ مولار به محیط واکنش انجام می‌شود [۱۸]. ابتدا ۱ گرم از عصاره خشک شده در ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر سه بار تقطیر، حل شد. در یک ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری، مقدار ۲۰۰ میلی‌لیتر محلول (۰/۰۱M) نمک آهن تهیه شد. محلول عصاره آبی به محلول نمک آهن اضافه شد، واکنش در دمای اتاق انجام و تغییر رنگ حاصل گردید. سپس محلول تیره‌رنگ حاوی نانوذرات آهن، به مدت ۱ ساعت روی شیکر، در دمای اتاق قرار گرفت. از محلول تیره‌رنگ برای آنالیز TEM استفاده شد. سپس، محلول تیره‌رنگ حاوی نانوذرات آهن بعد از سانتریفیوژ به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۹۰۰۰ rpm و به‌دست آوردن رسوب نانوذرات آهن و چندین مرحله شست‌وشو از پودر خشک شده نانوذرات آهن برای آنالیز SEM استفاده شد [۱۵].

نمونه‌گیری، کشت و تشخیص ایزوله‌های باکتریایی استافیلوکوکوس اورئوس. در این مطالعه در فاصله حدوداً ۶ ماه تعداد ۱۰۰ نمونه بالینی مشکوک به استافیلوکوکوس اورئوس از بیمارستان‌های مختلف شهر تهران جمع‌آوری شد و در محیط کشت بلاد آگار به آزمایشگاه منتقل گردید. نمونه‌های مورد بررسی شامل نمونه‌های جمع‌آوری شده از خون، ادرار، زخم، تراشه و... بودند. این نمونه‌ها از بیمارانی که حداقل به مدت سه روز در بخش ICU و بخش سوختگی این بیمارستان بستری شده بودند، جمع‌آوری شد. ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از تست‌های رنگ‌آمیزی گرم، کاتالاز، کواگولاز، DNase، محیط کشت برد پارکر (Baird parker agar) و تخمیر مانیتول تشخیص قطعی داده شدند. در نهایت برای نگهداری

ایزوله‌ها به مدت طولانی، از تمامی ایزوله‌ها در محیط نوترینت برات حاوی ۱۸٪ گلیسرول کشت ذخیره تهیه و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد [۱۵].

استخراج DNA. به منظور استخراج DNA از روش فنل‌کلروفرم استفاده شد. به طور خلاصه، به رسوب باقی‌مانده از کشت باکتری‌ها به ترتیب ۶۰۰ میکرولیتر تامپون لیز (Tris-HCl, pH7.4; EDTA ۵۰mM، ۱۳ میکرولیتر سدیم دودسیل سولفات (SDS ۲۵٪)، ۳ میکرولیتر پروتیناز K (۲۰mg/ml) اضافه نموده و آن را در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت قرار می‌دهیم. در ادامه ۶۰۰ میکرولیتر محلول فنل‌کلروفرم ایزوآمیل الکل (به نسبت ۱:۲۴:۲۵ تهیه شده) می‌افزاییم تا یک فاز شیری رنگ یک‌نواخت تشکیل شود. سپس اپندورف‌ها را سانتریفیوژ (۵ دقیقه ۱۳۰۰۰ دور) کرده، فاز بالایی (فاز آبی) را به اپندورف‌های جدید منتقل می‌کنیم. این مرحله دو بار دیگر انجام می‌شود و به منظور رسوب DNA، هم حجم فاز آبی اتانول سرد و خالص به همراه ۰/۱ میکرولیتر استات سدیم (۱M) اضافه می‌کنیم و آن را به مدت ۱۰ دقیقه در یخچال قرار می‌دهیم. سپس لوله مورد نظر را سانتریفیوژ نموده و رسوب استخراج شده را پس از خشک و حل کردن در بافر به عنوان DNA استفاده می‌کنیم. در نهایت به منظور ارزیابی کیفی DNA استخراج شده، از الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ استفاده شده است [۹].

واکنش PCR برای ژن پمپ افلاکس *norA* و واکنش PCR به منظور وجود ژن پمپ افلاکس *norA* با برنامه دمایی دناتوراسیون اولیه (Initial denaturation) در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال (Annealing) در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله طویل شدن (Extention) در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و طویل شدن نهایی (Final extention) به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد در طی ۳۰ سیکل انجام شد. به منظور بررسی وجود ژن‌های تشکیل‌دهنده پمپ افلاکس از تکثیر ژن‌های *norA*، در دستگاه ترموسایکلر اپندورف بهره گرفته شد [۱۵].

تعیین حداقل غلظت مهار (MIC) برای عصاره. آزمایش استاندارد CLSI به روش رقیق‌سازی در میکروپلیت صورت پذیرفت. به منظور آماده‌سازی رقت‌های نانوذرات آهن، مقدار ۰/۰۳ گرم از پودر نانوذرات آهن در ۵ سی‌سی محیط مولر-هیستون برات رقیق شد و سپس در غلظت‌های مختلف به حجم اسی‌سی رسید. جهت بررسی خاصیت ضد میکروبی نانوذرات

Primer	Sequence (5-3)	Size (bp)
norA-F	ATGGTCAAGCCCAGACAGAG	۱۱۲
norA-R	CGTGTTTTCAACATTTAATGCAA	۱۱۲
gmk-F	TATCAGGACCATCTGGAGTAGG	۱۸۸
gmk-R	CATCAACTTCACCTTCACGC	۱۸۸

لازم به ذکر است که در تمامی مراحل انجام آزمایش‌ها از سویه استافیلوکوکوس اورئوس ATCC25923 به عنوان کنترل مثبت و از ژن gmk (گوانیلات کیناز) به عنوان کنترل داخلی استفاده شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها. محاسبه آماری این مطالعه با استفاده از نرم‌افزار REST 2009 و SPSS نسخه ۱۶ انجام گردید و نتایج با آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA) مورد بررسی قرار گرفت و تفاوت بیان ژن‌های هدف، با روش آماری Tukey's HSD post-hoc test محاسبه گردید و سطح معناداری  $P < 0.05$  در نظر گرفته شد.

آنالیز داده‌های Real time PCR بر اساس مقایسه چرخه آستانه انجام شد. این روش نیازی به رسم نمودار استاندارد ندارد. کلیه واکنش‌ها به صورت دو تکرار انجام شد. پس از انجام واکنش Ct به دست آمده با استفاده از روش از نرم‌افزار Rest2009،  $\Delta Ct$  هر کدام از نمونه‌ها محاسبه شد و سپس با نرم‌افزار SPSS 16 با استفاده از متد One way ANOVA میزان تغییر بیان هر یک از نمونه‌ها محاسبه شد.

### نتایج

نتایج حاصل از بیوسنتز نانوذرات آهن و تست‌های تاییدی آن. واکنش احیای محلول نمک آهن در دمای اتاق بعد از اضافه کردن عصاره خشک شده به محلول نمک آهن صورت گرفت و تغییر رنگ حاصل گردید که این تغییر رنگ نشان‌دهنده ساخت نانوذرات آهن بود. محلول تیره رنگ حاصل، مورد آنالیز TEM (Transmission Electron Microscope) قرار گرفت و بعد از سانتریفیوژ به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۹۰۰۰ rpm، رسوب نانوذرات آهن چندین مرحله شست و شو داده شد و از پودر خشک شده آن برای آنالیز SEM (Scanning Electron Microscope) استفاده شد.

نتایج حاصل از تست TEM نانوذرات آهن. این تست توسط دستگاه TEM مدل Zeiss-EM10C-100 KV کشور آلمان در شرکت دی پترونیک انجام شد. شناسایی نانوذرات آهن که با میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) انجام شده، در شکل ۱ نشان داده شده است. اندازه میانگین نانوذرات آهن سنتز شده ۲۳/۲۳ نانومتر بود.

آهن سنتز شده از روش رقیق‌سازی متوالی (Micro-dilution) به صورت ۳ بار تکرار استفاده شد. ابتدا از باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی شده کشت ۲۴ ساعته خالص در محیط کشت مایع لوریا بارتونی آگار (LB) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تهیه شد. ابتدا از کلنی‌های باکتری‌ها بر روی سطح محیط کشت برداشته شده و به صورت مجزا از تمامی باکتری‌ها با استفاده از نرمال سالین سوسپانسیون باکتریایی معادل نیم مک فارلند  $(1/5 \times 10^8 \text{ CFU/mL})$  تهیه گردید. به همه چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای مقدار ۵ میکرولیتر از کشت میکروبی سویه‌ها به همراه ۹۵ میکرولیتر محیط کشت مایع مولر هینتون برات اضافه شد و نانوذرات آهن در غلظت‌های  $100 \mu\text{g/mL}$  -  $3/125$  به تمامی چاهک‌ها اضافه گردید. مقدار MIC به عنوان کم‌ترین غلظت مهارکننده رشد باکتری محسوب می‌شود.

استخراج RNA، سنتز cDNA و آنالیز بیان ژن nor A توسط روش Real-Time-PCR. استخراج RNA با استفاده از کیت استخراج RNA شرکت سیناژن، بر طبق دستورالعمل صورت پذیرفت. در ادامه، سنتز cDNA، مطابق با کیت ساخت Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) انجام گرفت. جهت بررسی ارزیابی بیان ژن پمپ افلاکس norA از روش Real-Time-PCR با استفاده از مستر میکس حاوی سایبرگرین (Applied Biosystem)، انگلستان استفاده شد. در انتها، غلظت cDNA‌های حاصل از باکتری‌های تیمار شده از نانوذره، با استفاده از نانودراپ اندازه‌گیری شد. در این تحقیق از Master mix (Bioneer) و پرایمرهای ژن‌های gmk و norA به صورت duplicate استفاده شد. موارد مورد استفاده در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱ میکرولیتر از cDNA، ۱۲/۵ میکرولیتر از مستر میکس حاوی SYBR green، ۲ میکرولیتر از پرایمرهای رفت و برگشت و ۹/۵ میکرولیتر آب DEPC بود.

واکنش Real Time PCR با دستگاه Bioneer exicycler ۹۶ انجام شد. برنامه دمایی مورد استفاده در PCR شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه، ۴۰ ثانیه دمای ۶۱ درجه سانتی‌گراد بود که در ۴۰ سیکل صورت گرفت [۱۶].

پرایمرهای ژن‌های gmk و norA طبق جدول ۱ مورد استفاده قرار گرفت.

جدول ۱. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در PCR.

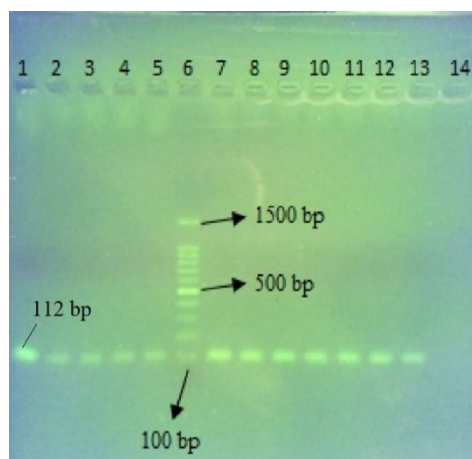


میکروبی رنگ آمیزی گرم، محیط مانیتول سالت آگار، محیط بردپارکر، تست کاتالاز، تست کوآگولاز، ۲۰ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی شد.

نتایج حاصل از تخلیص DNA پس از استخراج DNA ژنومی از باکتری، به منظور تعیین غلظت و اطمینان از حضور و کیفیت DNA تخلیص شده ۵ μl از DNA همراه با ۳ μl Loading buffer بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز گردید که اکثر نمونه‌ها غلظت و کیفیت مناسبی را در ژل نشان دادند. هم‌چنین با استفاده از اسپکتوفتومتری ماوراء بنفش، درجه خلوص (OD260/OD280=۱/۸-۲) و غلظت DNA موجود در نمونه‌ها تعیین گردید.

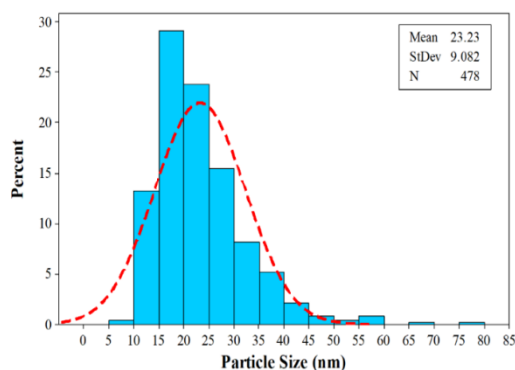
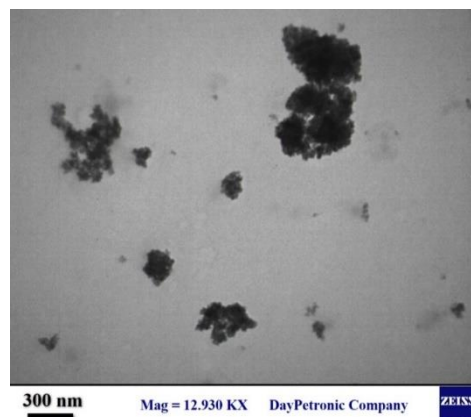
نتایج تکثیر ژن *norA* به منظور بررسی وجود ژن پمپ افلاکس *norA* در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی شده، از پرایمرهای اختصاصی این ژن استفاده شد (شکل ۳). ژن *norA* در تمامی ۲۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس دیده شد (۲۰ نمونه).

نتایج MIC نانوذرات آهن سنتز شده از عصاره گیاه کاکوتی. سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مثبت تحت تاثیر غلظت‌های ۱۰۰-۳/۱۲۵ μg/ml از نانوذره آهن سنتز شده از عصاره گیاه کاکوتی در مدت زمان ۲۴ ساعت قرار گرفتند. نتایج نشان داد که سویه‌های مختلف دارای محدوده‌ی ۱۲/۵ تا ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از MIC بودند.



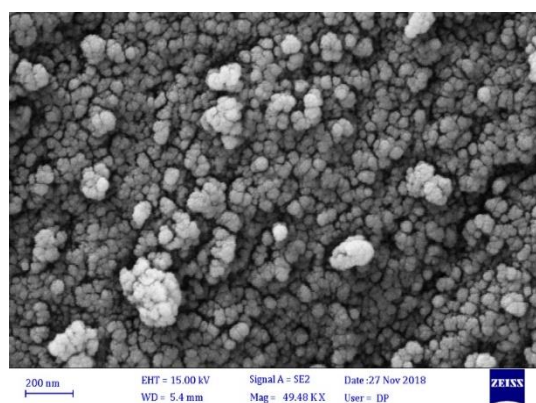
شکل ۳. نتایج تکثیر ژن *norA* شماره ۱ تا ۵ و ۷ تا ۱۲: نمونه‌های استافیلوکوکوس اورئوس، ۱۳: کنترل مثبت، ۱۴: کنترل منفی، ۶: مارکر DNA 100 bp+

نتایج حاصل از بیان ژن *norA* در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس در غلظت‌های *subMIC* از نانوذره بیان نسبی ژن *norA* در ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس توسط روش Real Time PCR مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج نشان داد که سویه‌های مختلف دارای MICهای



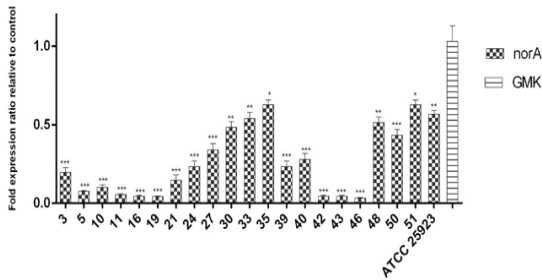
شکل ۱. شناسایی نانوذرات آهن با میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)

نتایج حاصل از تست SEM نانوذرات آهن. این تست توسط دستگاه SEM کشور آلمان در شرکت دی پترونیک انجام شد. نتایج حاصل از تست SEM در شکل ۲ ارائه شده است که بیانگر این می‌باشد که شکل ظاهری نانوذرات کروی می‌باشد.



شکل ۲. شناسایی نانوذرات آهن با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

نتایج حاصل از جداسازی و تشخیص سویه‌ها از نمونه‌های بالینی. در این مطالعه به منظور جداسازی و تشخیص سویه‌ها از نمونه‌های بالینی، تعداد ۱۰۰ نمونه از آزمایشگاه‌ها و بیمارستان‌های شهر تهران جمع‌آوری شد. نمونه‌ها از ادرار، خون، پوست و زخم جداسازی شدند. با استفاده از تست‌های



شکل ۶. نتایج بیان ژن *norA* در سویه‌های مختلف استافیلوکوکوس اورئوس که تحت تاثیر نانوذره آهن سنتز شده از عصاره گیاه کاکوتی قرار داشته است. اعداد محور عمودی میزان بیان ژن را نشان می‌دهند و اعداد محور افقی شماره سویه‌ها را نشان می‌دهد.

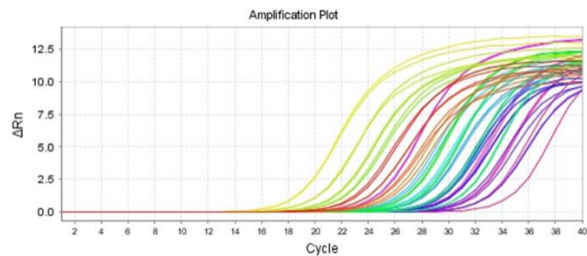
### بحث و نتیجه‌گیری

همان‌طور که بیان شد یکی از مهم‌ترین دلایل مقاومت آنتی‌بیوتیکی وجود پمپ افلاکس در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد، که یکی از پمپ‌های موثر در ایجاد این مقاومت پمپ افلاکس *norA* می‌باشد. با استفاده از ترکیبات مهاری می‌توان این پمپ‌ها را مهار کرد و یا موجب کاهش بیان آن‌ها شد. یکی از این ترکیبات، عصاره‌های گیاهی می‌باشند [۱۷].

در این مطالعه، از نانوذره اکسید آهن سنتز شده از عصاره گیاه کاکوتی (*Ziziphora clinopodioides*) به منظور کاهش بیان ژن پمپ افلاکس *norA* در سویه‌های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس به همراه روش Real Time PCR استفاده شده است. بنابراین، این مطالعه با هدف سنتز و توسعه روش جدید جهت تهیه نانوذرات اکسید آهن با استفاده از روش‌های زیست محیطی و ارزیابی اثرات ضد پمپ افلاکسی *norA* نانوذرات اکسید آهن سنتز شده از عصاره گیاه کاکوتی در سویه‌های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس است.

مطالعات مختلفی در زمینه بررسی اثرات ضد پمپ افلاکسی اسانس و عصاره ترکیبات گیاهی انجام گرفته است. چیت‌ساز و همکاران در سال ۱۳۸۶ با بررسی اسانس گیاه کاکوتی نشان دادند که این گیاه دارای فعالیت ضد باکتریایی بر روی باکتری گرم مثبت و منفی می‌باشد [۱۸]. عزتی و همکارانش در سال ۱۳۹۷ با بررسی بر روی عصاره گیاه بابونه بیان داشتند که عصاره این گیاه دارای اثرات ضد پمپ افلاکسی می‌باشد و پیشنهاد کردند که عصاره این گیاه را می‌توان به عنوان یک ترکیب مهارکننده پمپ افلاکس و در نهایت به عنوان یک مکمل دارویی امیدبخش به مراکز دارویی ارائه داد [۹]. تیموری در سال ۱۳۹۱ با بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره الکلی گیاه *Teucrium polium* روی چهار سویه مرجع استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سوبتیلیس، اشرشیاکولی و کلبسیلا پونومونیا

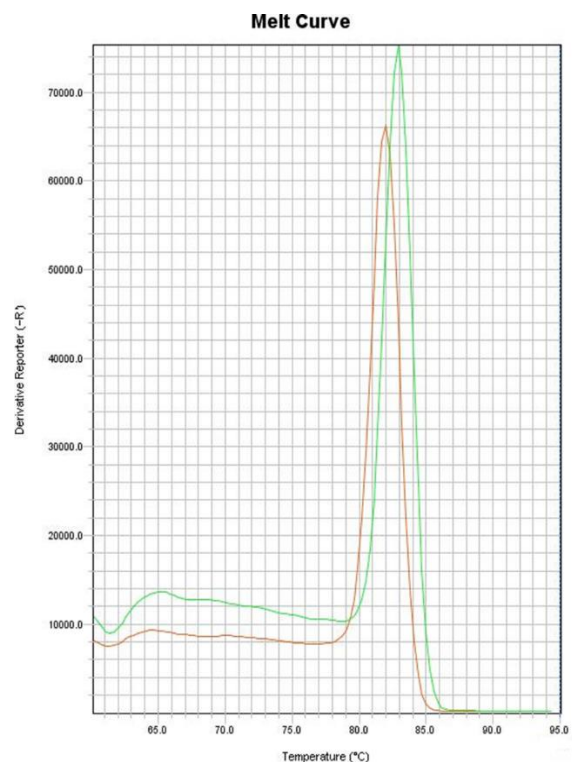
مختلف، تحت تاثیر نانوذره آهن سنتز شده از عصاره گیاه کاکوتی در غلظت subMIC خود تغییرات مختلفی از بیان ژن داشتند و از نظر آماری تفاوت معناداری در مقایسه با بیان ژن *norA* داشتند ( $P < 0.05$ ). نتایج حاصل از تکثیر ژن‌های *norA* و ژن *gmk* در سلول‌های باکتریایی تیمار شده با نانوذره آهن سنتز شده از عصاره گیاه کاکوتی در شکل ۴ آمده است.



شکل ۴. نمودار تکثیر ژن‌های *norA* و ژن *gmk* در سلول‌های باکتریایی تیمار شده با نانوذره آهن سنتز شده از عصاره گیاه کاکوتی.

به منظور تعیین اختصاصیت پرایمرهای طراحی شده، از منحنی ذوب حاصل از واکنش Real Time PCR استفاده شده است، که در شکل ۵ نشان داده شده است.

همچنین نتایج حاصل از تغییر بیان ژن *norA* در سویه‌های مختلف استافیلوکوکوس اورئوس در شکل شماره ۶ آمده است. همان‌طور که در شکل ۶ ملاحظه می‌شود میزان بیان ژن *norA* در سویه‌های مختلف کاهش معناداری پیدا کرده است.



شکل ۵. نمودار منحنی ذوب ژن‌های *norA* در دمای ۸۲/۹۱ و ژن *gmk* در دمای ۸۲/۳۳. محور عمودی، نشان دهنده مشتق فلورسنت به مشتق زمان و محور افقی، نشان دهنده درجه سانتی‌گراد است.

دارویی دارچین نشان دادند که دارچین دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا بوده و روغن موجود در آن دارای خواص آنتی‌باکتریایی می‌باشد [۲]. زارع و همکارانش در سال ۱۳۹۳ با انجام سنتز سبز نانوذرات اکسید آهن با استفاده از عصاره برگ گیاه رزماری نشان دادند که گیاهان یا عصاره آن‌ها یک مسیر سنتز بیولوژیکی که زیست سازگارتر هستند را ایجاد و امکان سنتز در اندازه و شکل معین را فراهم می‌کنند [۵].

در این پژوهش پس از تعیین تاثیر عصاره گیاه مورد نظر و بررسی اثرات ضد پمپ افلاکس، بیان نسبی ژن *norA* در ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس که تحت تاثیر نانوذره آهن سنتز شده از عصاره گیاه کاکوتی بودند توسط روش Real Time PCR مورد مطالعه قرار گرفت. میزان بیان ژن *norA* در مقایسه با ژن *gmk* در سویه‌های مختلف کاهش معناداری پیدا کرده است که این موضوع، نشان‌دهنده عمل ضدپمپ افلاکسی عصاره گیاه کاکوتی است. مطالعات مختلفی در جهت بررسی بیان ژن‌های پمپ افلاکس *norA* به انجام رسیده است.

حدادی و همکارانش در سال ۱۳۹۵ با بررسی تاثیر فراوانی ژن‌های پمپ افلاکس *norA* و *norB* در سویه‌های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس و بررسی تاثیر آن در ایجاد مقاومت به سیپروفلوکساسین نشان دادند که پمپ‌های افلاکس *norA* و *norB* در ایجاد مقاومت به سیپروفلوکساسین نقش مهمی دارند. نتایج این مطالعه نشان‌دهنده آن است میزان MIC اتیدیوم بروماید در حضور CCCP کاهش پیدا می‌کند که منطبق با نتایج سایر مطالعات انجام شده در گذشته می‌باشد و بیان می‌کند که پمپ افلاکس مسئول ایجاد مقاومت به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین است [۲]. کاظمی و همکارانش در سال ۱۳۹۵ نشان دادند که بین پمپ افلاکس *norA* و مقاومت به سیپروفلوکساسین در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس ارتباط وجود دارد، به طوری که کاهش بیان ژن *norA* در کنترل سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین می‌تواند مفید واقع شود [۸]. گودرزی و همکارانش در سال ۱۳۹۲ با بررسی بیان و عملکرد ژن پمپ‌های افلاکس در ایزوله‌های بالینی مقاوم به چند داروی غیرکلونال در اسپینتوباکتر بامانی به روش Real-time PCR و آزمایش تجمع اتیدیوم بروماید نشان دادند که عملکرد پمپ افلاکس در کاهش حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف نقش ویژه‌ای دارد [۲۱]. میرزایی و همکارانش در سال ۱۳۹۵ با بررسی وجود و بیان ژن پمپ افلاکس *norA* با استفاده از روش‌های PCR و Real-time PCR و همچنین با ارزیابی فعالیت آن در سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین استافیلوکوکوس اورئوس توسط روش کم‌ترین غلظت مهارکنندگی نشان دادند که تمامی سویه‌های مقاوم

نشان داد که غلظت‌های معینی از عصاره این گیاه دارای اثرات ضد میکروبی موثری روی باکتری‌ها می‌باشد [۱۴]. میرزایی و همکارانش در سال ۱۳۹۶ با تعیین اثر مهاری عصاره گیاه درمنه از گونه *Artemisia quttensis* بر روی پمپ افلاکس *norA* در سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین استافیلوکوکوس اورئوس نشان دادند که عصاره گیاه *A. quttensis* بر روی تمامی سویه‌های مقاوم دارای پمپ افلاکس *norA*، اثر مهاری دارد. در این پژوهش با توجه به اثر ضدپمپ افلاکسی عصاره گیاه درمنه، پیشنهاد شده است که این عصاره به عنوان گیاه بومی در کشور، در صنایع دارویی مورد استفاده قرار گیرد [۱۷].

در مطالعه حاضر و سایر مطالعات می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً ترکیبات تشکیل‌دهنده عصاره گیاهان می‌تواند موجب کاهش بیان ژن *norA* شود و در نهایت کارایی پمپ افلاکس *norA* در سویه‌های مختلف کاهش پیدا کند. مطالعاتی نیز در زمینه ترکیبات گیاه کاکوتی انجام شده است.

أزترک و همکاران در سال ۲۰۰۶ با بررسی ترکیبات گیاه کاکوتی توسط دستگاه GC نشان دادند که این گیاه دارای ۱۸ ترکیب می‌باشد و بالاترین مقدار مربوط به پولگون می‌باشد و نتایج نشان‌دهنده آن است که این گیاه دارای فعالیت ضد میکروبی بر روی باکتری گرم مثبت و گرم منفی می‌باشد [۱۹]. صالحی در سال ۲۰۰۵ با بررسی ترکیبات گیاه کاکوتی (*Ziziphora clinopodioides*) نشان داد که پولگون جز اصلی عصاره این گیاه می‌باشد و عصاره این گیاه دارای فعالیت آنتی‌باکتریایی بر روی باکتری‌های گرم مثبت و منفی می‌باشد [۲۰].

همچنین مطالعات مختلفی در زمینه سنتز نانوذرات اکسید آهن به وسیله عصاره گیاهان صورت پذیرفته است.

کاناگا و کادیرولو در سال ۲۰۱۷ با انجام سنتز سبز نانوذرات اکسید آهن با استفاده از گیاه *Lagenaria siceraria* و سپس ارزیابی فعالیت ضد میکروبی آن نشان دادند که نانوذرات اکسید آهن سنتز شده با گیاه *Lagenaria siceraria* می‌تواند در برنامه‌های مختلف بیولوژیکی مورد استفاده قرار گیرد [۷]. مانیکندن و مادهو در سال ۲۰۱۷ با انجام سنتز سبز نانوذرات اکسید آهن با استفاده از عصاره گیاهی لئوکس اسپرا و سپس مطالعاتی در ارتباط با ارزیابی خاصیت آنتی‌باکتریال و آنتی‌اکسیدانی نشان دادند که سنتز سبز با استفاده از عصاره برگ گیاه لئوکس اسپرا می‌تواند روش اقتصادی و موثری برای سنتز نانوذرات اکسید آهن باشد و همچنین جایگزین سازگار و موثر برای روش‌های شیمیایی و فیزیکی متعارف می‌باشد و از نظر هزینه مناسب‌تر است [۶]. حدادی و نجفی در سال ۱۳۹۶ نیز با بررسی تاثیر نانوذرات اکسید آهن سنتز شده با استفاده از گیاه

using leucas aspera leaf extract and evaluation of antibacterial and antioxidant studies. *Int J Agricul Innovat Res* 2017; 6: 242-250.

[7] Kanagasubbulakshmi S, Kadirvelu K. Green synthesis of Iron Oxide nanoparticles using *lagenaria siceraria* and evaluation of its antimicrobial activity. *Def Life Sci J* 2017; 2: 422-427.

[8] Kazemi SS, Nemati Mansoor F, Mirzaie A, Ashrafi F. Antibiotic resistance assessment, and genotypic and phenotypic detection of *norA* efflux pump in methicillin and ciprofloxacin resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *J Microbial World* 2017; 9: 286-296. (Persian).

[9] Ezati S, Mirzaie A, Zandi M. Evaluation of anti-efflux activity of *anthemis atropatana* extract against ciprofloxacin resistant *staphylococcus aureus* Isolates. *JMP* 2018; 2: 122-134. (Persian).

[10] Nejabat dust A. Effect of zinc oxide nanoparticles functionalized with carbazone thiosemia on *norA* gene expression pattern Hospital Pathogen *Staphylococcus aureus* Bacteria. [dissertation]. Rasht Islamic Azad Univ 2017. (Persian).

[11] Yoshida H, Bogaki M, Nakamura S, Ubukata K, Konno M. Nucleotide sequence and characterization of the *Staphylococcus aureus norA* gene, which confers resistance to quinolones. *J Bacteriol* 1990; 172: 6942-6949.

[12] Rajabian M, Bonyadian M, Abbasvali M, Khanjari A. Investigation on the antibacterial properties of *ziziphora cliniopodioides* and *thymus daenensis* essential oils against some food pathogenic bacteria. *J Appl Microbiol Food Indust* 2017; 3: 65. (Persian).

[13] Shafei M, Sharifan A, Aghazade Meshki M. Composition of essential oil of *ziziphora clinopodioides* and its antimicrobial activity on *kluveromyces marxianus*. *Food Technol Nutr* 2012; 9: 101-108. (Persian).

[14] Teimouri M. Antimicrobial effects of *Teucrium polium* L. alcoholic extract on Gram positive and negative bacteria. *J Biol Findings* 2011; 8: 1-6. (Persian).

[15] Mirzaie A, Noorbazargan H, Rahmati H, Zandi M. A study of gene expression and activity of *NorA* efflux pump in clinical isolates of ciprofloxacin resistant *staphylococcus aureus*. *JBUMS* 2016; 18: 63-70. (Persian).

[16] Haddadi Zahmatkesh M, Laripoor M, Mirzaie A & Ashrafi F. Prevalence of *norA* and *norB* efflux pump genes in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and their contribution in ciprofloxacin resistance. *Iran J Med Microbiol* 2016; 10: 20-30.

[17] Mirzaie A, Bagheri Kashtali AA, Noorbazargan H, Sadat Shandiz SA. The inhibitory effect of *artemisa quttensis* extract on *norA* efflux pump in ciprofloxacin resistant *staphylococcus aureus* strains using ethidium bromide and real-time PCR methods. *Qom Univ Med Sci J* 2017; 11: 51-63. (Persian).

[18] Chitsaz M, Pargar A, Naseri M, Kamalinejhad M, Bazargan M, Mansuri S, et al. Composition of essential oil and antibacterial effects of hydroalcoholic extract and essential oil of the plant *ziziphora clinopodioides*: LAM on Selected Bacteria. *Daneshvar Med* 2007; 14: 15-22. (Persian).

[19] Ozturk S, Ercisli S. Antibacterial activity and chemical constitutions of *Ziziphora cliniopodioides*. *Food Control* 2007; 18: 535-540.

[20] Salehi P, Sonboli A, Eftekhari F, Nejadebrahimi S, Yousefzadi M. Essential oil composition, antibacterial and antioxidant activity of the oil and various extracts of *Ziziphora cliniopodioides* subsp. *rigida* (BOISS.) RECH. f. from Iran. *Biol Pharm Bull* 2005; 28: 1892-1896. (Persian).

[21] Goudarzi H, Doraghi M, Dabiri H, Ghalavand Z. Functional analysis of multidrug efflux pumps genes of *Acinetobacter baumannii* strains. *Res Medicine* 2013; 37: 107-112. (Persian).

سیپروفلوکساسین دارای پمپ افلاکس فعال بودند و سویه‌های مختلف بیان متفاوتی از ژن *norA* دارند و همچنین سویه‌های مقاوم‌تر نیز دارای بیان بالاتری از ژن *norA* می‌باشند [۱۷].

نتایج این مطالعه نشان داد نانوذرات اکسید آهن سنتز شده از عصاره گیاه کاکوتی (*Ziziphora clinopodioides*) می‌تواند به عنوان یک مهارکننده پمپ افلاکس در ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس عمل کند. بنابراین، پیشنهاد می‌شود تحقیقات بیشتری در مورد خواص زیستی ترکیبات این گیاه صورت پذیرد تا خواص پزشکی این گیاه بیشتر مشخص گردد و به عنوان یک ترکیب مهارکننده پمپ افلاکس، پتانسیل استفاده در صنایع دارویی و برنامه‌های مختلف بیولوژیکی را داشته باشد و در نهایت به عنوان یک مکمل دارویی به صنایع دارویی معرفی گردد.

## تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد نویسنده اول می‌باشد که در دانشگاه آزاد اسلامی واحد رودهن به ثبت رسیده است. از همکاری معاونت پژوهشی دانشگاه که در اجرای این پژوهش ما را یاری نموده اند، تشکر و قدردانی می‌شود.

## منابع

[1] Parchagani F. Iron oxide nanoparticles: Synthesis, characterization and investigation of catalytic properties [dissertation]. Zanjan Univ 2012. (Persian).

[2] Hadadi T, Najafi M A. Green synthesis and characterization of iron oxide nanoparticles using Cinnamon medicinal herb. proceedings of the third international and the Sixth national conference of medicinal herbs and stable agriculture; Zabol, Iran. Hamedan Conf Paper 2017. (Persian).

[3] Gupta D, Singh A, U. Khan A. Nanoparticles as efflux pump and biofilm inhibitor to rejuvenate bactericidal effect of conventional antibiotics. *Nanoscale Res Lett* 2017; 12: 454.

[4] Fazlzadeh M, Tagizadeh A, Entezari A, Khosravi R. Green synthesis of ZnO nanoparticles and coating them on the activated carbon to investigate removal efficiency of hexavalent chromium. *Occup Environ Health* 2017; 3: 7-19. (Persian).

[5] Zare E, Pourseyedi Sh, Darezeshki E, Pardakhti A. Green synthesis of Iron oxide nanoparticles using rosemary plant leaf extract. proceedings of the first electronic conference on new findings in the environment and agricultural ecosystems; 2014 Nov 22; Kerman Shahid Bahonar university, Iran. Univ Tehran CIVILICA 2014. (Persian).

[6] Manikandan V, Madhu GC, Pavithra V, Jaianand K, Balaji P. Green synthesis, characterization of Iron oxide nanoparticles



## Effects of synthesized iron oxide nanoparticles from *Ziziphora clinopodioides* on expression of the efflux pump genes of *Staphylococcus aureus*

Seyed mostafa sajadian (M.Sc), Maryam Teimouri (Ph.D)\*  
Dept. of Biology, Roudehen Branch, Islamic Azad University, Roudehen, Iran

\* Corresponding author. +98 21 79511213 M.teimouri@riau.ac.ir

Received: 15 Aug 2019; Accepted: 20 Nov 2019

**Introduction:** One of the important factors causing nosocomial infections is drug-resistant *Staphylococcus aureus* strain, so correspondingly, having *norA* efflux pump is one of the bacterial's ability to generate drug resistance. Iron has been used as a nanoparticle with antimicrobial activity against bacteria. The aim of this study was to investigate the effect of iron oxide nanoparticles synthesized from *ziziphora* plant extract on *Staphylococcus aureus* efflux pump genes expression.

**Materials and Methods:** green iron nanoparticles were formed using ethanolic extract of *ziziphora* plant and iron salt solution and identified by SEM and TEM electron microscopy. The *Staphylococcus aureus* strains were collected and isolated from hospitals and laboratories in Tehran. Considerably, Antimicrobial activity of green nanoparticles against strains was investigated. DNA and RNA and cDNA were extracted and the relative expression of *norA* gene in *Staphylococcus aureus* isolates was evaluated by Real-time PCR method.

**Results:** Different strains, under the influence of iron nanoparticles, showed different expression changes That were statistically significant compared to *gmK* gene expression ( $P < 0.05$ ). The level of *norA* gene expression in different strains showed a significant decrease, which indicates the anti-pumping activity of efflux pump plant extract.

**Conclusion:** the iron oxide nanoparticles synthesized from *ziziphora* plant extract act as an inhibitor of efflux pump in *Staphylococcus aureus* isolates and have potential for use in pharmaceutical and biological industry.

**Keywords:** *Ziziphora clinopodioides*, *Staphylococcus aureus*, Efflux pump, Real-time PCR, Plant Extracts.