Eco-phytochemical
Journal of Medicinal Plants
Print ISSN: 2322-3235
Online ISSN: 2783-4697
Islamic Azad University Gorgan Branch
Iranian Society of Medical Plants

Phytochemical investigation and inhibitory effect of *Thymus eriocalyx* (Ronniger) Jalas essential oil on the growth of bacteria (*Enterococcus faecalis* and *Salmonella typhimurium)*

Somayeh Farhamand[1*], Farshid Rezaei[1], Sahar Kaousi[2]
[1] Department of Biology, Payame Noor University (PNU), Tehran, Iran, Email: s.farahmand@pnu.ac.ir
[2] Department of Biology, Borujerd Azad University, Lorestan, Iran

Article type:
Research article

Article history
Received: 15-7-2022
Revised: 21-8-2022
Accepted: 20-9-2022

Keywords
Antibacterial, Carvacrol
Enterococcus faecalis
Salmonella typhimurium
Thymus eriocalyx (Ronninger)

Abstract

Nowadays, due to the complications caused by the use of chemical drugs and the increase of antibiotic-resistant microbial strains, studies have been conducted to find antibacterial drugs from plant compounds. In this research, the aerial parts of *Thymus eriocalyx* were collected from the heights of Kermanshah in June 1400 (810 meters) in the flowering stage. The essential oil was extracted by distillation with water using a Cloninger machine. The antimicrobial activity of the essential oil of this plant in successive concentrations of 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62, 7.81, 3.9, 1.95, 0.97 and 0.48 mg/ml against two bacterial species *Enterococcus faecalis* and *Salmonella typhimurium* by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) in broth medium, minimum lethal concentration (MBC) in agar medium and disk diffusion were investigated. Ampicillin with a concentration of 10 mg/ml, ciprofloxacin 5 mg/ml, erythromycin 15 mg/ml and cefixime 5 mg/ml were used as positive controls. Mass gas chromatography method showed that this type of thyme has 42 effective substances. The most phenolic composition of the pasture ovia is carvacrol (66.96%). MBC for *Enterococcus faecalis* and *Salmonella typhimurium* bacteria was 15.67 and 62.5 mg/ml, respectively. 250 and 125 mg/mol discs were better than selected antibiotics in inhibiting both bacteria. The essential oil of pasture thyme plant contains antiseptic substances with antibacterial effects. The effect of essential oil in stopping the growth of Gram-positive bacteria was greater than that of Gram-negative bacteria. Considering that the essential oil of the plant had significant antibacterial effects compared to antibiotics in laboratory conditions, it is suggested to carry out more experiments to evaluate its effect in animal models.

Cite this article as: Farhamand, S., Rezaei, F., Kaousi, S. (2023). Phytochemical investigation and inhibitory effect of *Thymus eriocalyx* (Ronniger) Jalas essential oil on the growth of bacteria (*Enterococcus faecalis* and *Salmonella typhimurium*). *Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants.*, 11(3):67-78.

©The author(s)
Publisher: Islamic Azad University, Gorgan branch
Doi: 10.30495/ejmp.2022.1963334.1698 Dor: 20.1001.1.23223235.1402.11.3.5.0

اکوفیتوشیمی گیاهان دارویی
شاپا چاپی: ۲۳۲۲-۳۲۳۵
شاپا الکترونیکی: ۲۷۸۳-۴۶۹۷
دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان
انجمن گیاهان دارویی ایران ثبت ۱۸۹۶۳

بررسی فیتوشیمیایی و اثر مهارکنندگی اسانس گیاه دارویی (*Thymus eriocalyx* (Ronninger) Jalas) بر رشد باکتری‌ها (*انتروکوک فکالیس* و *سالمونلا تایفی موریوم*)

سمیه فرهمند[1*]، فرشید رضایی[1]، سحر کاوسی[2]

[1] گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران، رایانامه: s.farahmand@pnu.ac.ir
[2] گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی بروجرد، لرستان، ایران

نوع مقاله:
مقاله پژوهشی

تاریخ دریافت:۱۴۰۱/۰۴/۲۴
تاریخ بازنگری:۱۴۰۱/۰۵/۳۰
تاریخ پذیرش:۱۴۰۱/۰۶/۲۹

چکیده

امروزه به دلیل عوارض ناشی از مصرف داروهای شیمیایی و افزایش سویه های میکروبی مقاوم بـه آنتـی بیوتیک، مطالعات برای یافتن داروهای ضدباکتریایی از ترکیبات گیاهی انجام گرفته است. در این پـژوهش اندام‌های هوایی گیاه آویشن مرتعی با نام علمی *Thymus eriocalyx* در مرحله ی گلـدهی از ارتفاعـات کرمانشاه در خردادماه ۱۴۰۰ (۸۱۰ متری) جمع آوری گردید. اسانس به روش تقطیر با آب، بـا اسـتفاده از دستگاه کلونجر استخراج شد. فعالیت ضدمیکروبی اسانس این گیاه در غلظـت‌هـای متـوالی ۲۵۰ ، ۱۲۵ ، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵، ۱۵/۶۲، ۷/۸۱، ۳/۹، ۱/۹۵، ۰/۹۷ و ۰/۴۸ میلـی‌گـرم/ میلـی‌لیتـر علیـه دو گونـه باکتریـایی *انتروکوک‌فکالیس*[1] و *سالمونلا تایفی‌موریوم*[2] با تعیین حداقل غلظت بازدارندگی(MIC) در محـیط بـراث، حداقل غلظت کشندگی (MBC) در محیط آگار و دیسک‌دیفیوژن[3] بررسی شد. از آمپی‌سیلین با غلظت ۱۰ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر، سیپروفلوکساسین ۵ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر، اریترومایسین ۱۵ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر و سفکسیم ۵ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر به عنوان شاهد مثبت استفاده گردید. روش گازکروماتوگرافی جرمـی نشـان داد، ایـن گونه آویشن دارای ۴۲ ماده موثره است. بیشترین ترکیب فنلی اویشن مرتعی، کارواکرول (۶۶/۹۶ درصـد) می باشد. MBC برای باکتری‌های *انتروکوک‌فکالیس* و *سالمونلا تایفی موریوم* به‌ترتیب برابر ۶۷/۱۵ و ۶۲/۵ میلی‌گرم / میلی‌لیتـر بـود. دیسـک‌هـای ۲۵۰ و ۱۲۵ میلـی‌گـرم/ مـول در مهـار هـر دو بـاکتری، بهتـر از آنتی‌بیوتیک‌های انتخابی عمل کردند. اسانس گیاه آویشن مرتعی حاوی مواد آنتـی‌سـپتیک بـا اثـرات ضـد باکتریایی می باشد. اثر اسانس در توقف رشد باکتری گرم مثبت بیشتر از باکتری گرم منفی بود. با توجه به اینکه اسانس گیاه دارای اثرات ضدباکتریایی قابل‌توجهی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها در شرایط آزمایشـگاهی بود، لزوم انجام آزمایش‌های بیشتر برای ارزیابی اثر آن در مدل حیوانی پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی:
آویشن مرتعی
انتروکوک فکالیس
سالمونلا تایفی موریوم
ضد باکتریایی
کارواکرول

استناد: فرهمند، سمیه؛ رضایی، فرشید؛ کاوسی، سحر. (۱۴۰۲). بررسی فیتوشیمیایی و اثر مهارکننـدگی اسـانس گیـاه دارویـی (*Thymus eriocalyx* (Ronninger) Jalas) بر رشد باکتری‌ها (*انتروکوک فکالیس و سالمونلا تایفی موریوم*). *فصلنامه اکوفیتوشیمی گیاهان دارویی*، ۱۱ (۳)، ۷۸-۶۷.

Doi: 10.30495/ejmp.2022.1963334.1698
Dor: 20.1001.1.23223235.1402.11.3.5.0

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان
© نویسندگان.

[1] *Enterococcus faecalis*
[2] *Salmonella typhimurium*
[3] Disc diffusion

مقدمه

عوارض جانبی داروهای شیمیایی، استفاده نادرست و مداوم از آنتی بیوتیک‌ها در جهت کنترل و درمان بیماری‌های عفونی، باعث بروز پدیده مقاومت به آنتی‌بیوتیک و پیدایش سویه‌های مقاوم شده و گرایش تدریجی به سمت گیاه درمانی افزایش یافته است. امروزه بیش از یک‌سوم داروهای مورد استفاده دارای منشاء گیاهی هستند و این میزان نیز به شدت رو به افزایش است (Salehi et al., 2010, Farahmand et al., 2016).

با توجه به تنوع آب و هوایی و فلور گیاهی متنوع در ایران امکان شناسایی ترکیبات موثر گیاهی در گیاهان مختلف بومی و استخراج آنها به‌منظور تولید آنتی‌بیوتیک‌ها در سطح صنعتی و به مقدار زیاد وجود دارد. این کار اهمیت زیادی در مورد گیاهانی دارد که به‌صورت خودرو و بومی در ایران وجود دارند اما تا کنون کمتر مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند (Davarpanah et al., 2022).

آویشن متعلق به تیره نعناع Lamiaceae است که در نواحی زاگرس ایران یافت می‌شود (Yousefzadeh et al., 2022). اسانس آویشن با اثر گذاشتن روی زنجیره ی انتقال الکترون روی نفوذ پذیری غشاء میکروارگانیسم ها اثر گذاشته و باعث کاهش میزان پرتون، فسفات و پتاسیم داخلی سلول می‌شود (Mohseni et al., 2018). مطالعات فیتوشیمیایی نشان می‌دهد که قسمت اعظم اسانس انواع مختلف آویشن از فنل ها (۲۰ تا ۸۰ درصد) تشکیل شده است (Batani et al., 2015). به‌طورکلی کارواکرول از اجزای اصلی فنولی در انواع آویشن است. کارواکرول[1] کارواکرول[1] (۵- ایزوپروپیل-۲- متیل فنول) یک ترکیب فنولی مونوترپنیک با فرمول شیمیایی C10H14O است. این ترکیب دارای خواص مختلف دارویی و بیولوژیکی همچون ضدباکتری، ضدقارچی، آنتی‌اکسیدانی، ضدسرطان و ضدالتهاب می‌باشند (Kaeidi et al., 2020). لذا از نظر دارویی دارای اهمیت می‌باشند. کارواکرول می‌تواند به کاتیون‌های سطح غشای پاتوژن‌ها متصل شده و در نهایت باعث اختلال در عملکرد حیاتی آنها شوند (Kaeidi et al., 2020) همچنین می‌تواند با کاهش هیدرولیز بدون ایجاد تغییر در نفوذ پذیری غشاء، منجر به حذفATP داخل سلول باکتری می‌گردد (Mohseni et al., 2018).

انتروکوک‌ها کوکسی‌های کاتالاز منفی، گرم مثبت و بیهوازی اختیاری هستند که به‌طور طبیعی در دستگاه گوارش پستانداران، خاک و آب یافت می شوند و به عنوان پاتوژنهای مهم در عفونت‌های بیمارستانی شناخته شده اند (Alghamdi et al., 2020). انتروکوک فکالیس به عنوان پاتوژن فرصت طلب و عامل افزایش درصد عفونت‌های باکتریومی داخل شکمی و عفونتهای دستگاه ادراری شناخته شده است. همچنین در کانال ریشه‌ی دندان هایی که تحت معاینات و دستکاری های دندانپزشکی قرار گرفته‌اند و در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی نقش دارد (Alghamdi et al., 2020). این باکتری به تعداد زیادی از آنتی بیوتیکها مقاوم است که این مسئله تهدید بزرگی برای بهداشت عمومی به حساب می‌آید (Miller et al., 2020).

سالمونلا یک باکتری میله‌ای گرم منفی است و یکی از مهمترین بیماریهای با منشأ غذایی در دنیا است که می‌تواند اثرات بهداشتی مختلفی بر افراد جامعه بگذارد (Matera et al., 2022). سالمونلا دارای سروتیپ‌های مقاوم به چندین آنتی بیوتیک است. سالمونلا تایفی‌موریوم یکی از مهمترین و شایعترین سروتیپ‌های سالمونلا می‌باشد. محصولات گوشتی یکی از مهمترین محصولات غذایی است که در

1. Carvacrol

معرض آلودگی با این باکتری می‌باشند و زمانی که به انسان منتقل می‌شوند در انسان ایجاد التهاب روده، عفونت سیستمیک و تب روده ای می‌کنند (Ansari et al., 2017).

تاکنون از اثرات آنتی باکتریایی ترکیبات آویشن مرتعی گزارش کاملی ارائه نشده است؛ بنابراین در این پژوهش به بررسی اثر اسانس آویشن مرتعی بر دو نوع باکتری شایع گرم مثبت و منفی (*انتروکوک فکالیس* و *سالمونلا تایفی موریوم*) پرداخته شد و نسبت به داروهای شیمیایی مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه اسانس از گیاه: پس از وارد نمودن ۱۰۰ گرم از پودر بخش های هوایی گیاه به یک بالون یک لیتری، آب مقطر به آن اضافه شد. سپس بالن به دستگاه کلونجر متصل شد. استخراج اسانس با استفاده از دستگاه کلونجر طبق فارماکوپه بریتانیا به‌مدت ٤ساعت انجام شد. اسانس به‌دست آمده با استفاده از مقدار مناسب سولفات سدیم (۰,۱ وزن اسانس به‌دست آمده) خشک و در شیشه های تیره ودربسته در دمای ٤ درجه سانتی گراد در یخچال نگهداری شد (Mehran et al., 2016). برای تعیین ترکیبات موثره موجود در اسانس آویشن مرتعی، از دستگاه کروماتوگرافی گازی- طیف سنجی جرمی (Aglient، آمریکا) شامل ردیاب جرمی Agilent HP-5973 با منبع یونیزاسیون الکترونی (EI) با انرژی ۷۰ الکترون ولت کوپل شده با دستگاه کروماتوگرافی گازی Agilent HP-6890 دارای ستون cp-sil 8cb-ms با طول ۵۰m، قطر داخلی ۰/۲۵ mm و ضخامت فیلم ۰,۲۵ میکرومتر استفاده شد. برنامه ریزی حرارتی ستون از ٦۰ تا ۲۸۰ درجه سانتی گراد با سرعت افزایش دمای ۵ درجه سانتی‌گراد در دقیقه و توقف در این دما به‌مدت دو دقیقه انجام شد. دمای محل تزریق دستگاه کروماتوگرافی گازی روی ۲۳۰ درجه سانتیگراد و دمای آنالایزر (کوادروپل) روی ۲۳۰ درجه سانتیگراد با گستره ی جرمی m/z ٤۰- ٦۰۰ تنظیم گردید. گاز حامل هلیوم ۹۹/۹۹٪ و مقدار تزریق و سرعت جریان گاز ۱ml در دقیقه تنظیم شده بود. حجم ۱µl از اسانس گیاه به دستگاه GC-MS تزریق شد. در نهایت نتایج به دست آمده از دستگاه بر اساس اندیس کواتس و مراجعه به فرهنگ طبیعی ترکیبات طبیعی شناسایی شد. تفسیر طیفهای GC-MS با استفاده از دیتابیس های National Institute Standard and Technology (NIST) با بیش از ٦۲۰۰۰ الگو و کتابخانه طیفی جرمی ویلی (Wiley) انجام شد. نام، ساختار ترکیب و وزن مولکولی مواد جداسازی شده تایید شد.

تهیه سوسپانسیون باکتری: باکتری‌های *انتروکوک فکالیس* (ATTC25912) و *سالمونلا تایفی موریوم* (ATTC14028) از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. این باکتریها با استفاده از محیط نوترینت براث (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲٤ ساعت) احیا شدند. پس از کشت هر یک از باکتری‌ها در محیط نوترینت آگار، از روش‌های رنگ‌آمیزی و بررسی خصوصیات بیوشیمیایی جهت تایید باکتری ها استفاده شد.

در کنار شعله با آنس استریل از هر یک از ظروف حاوی باکتری، چند کلنی برداشته و در ۵ میلی‌لیتر محیط مایع استریل کشت داده شد. لوله‌های حاوی باکتری به منظور دستیابی به یک کدورت نسبی، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱٦ تا ۱۸ ساعت قرار گرفتند. سرانجام کدورت آنها با شماره ۰/۵ مک فارلند مورد سنجش قرار گرفت. به منظور دستیابی به کدورت مورد نظر، در صورتیکه کدورت سوسپانسیون باکتری بیشتر از لولهٔ شمارهٔ ۰,۵ مک فارلند (cfu/ml $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$) بود، آب مقطر استریل به سوسپانسیون

باکتری افزوده میشد و اگر کدورت کمتر بود، تعدادی کلنی به آن اضافه می گردید (Hasanloo et al., 2015).

روش‌های سنجش اثرات ضد میکروبی: جهت سنجش اثر ضد میکروبی از روش دیسک دیفیوژن آگار استفاده شد و میزان حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) اندازه‌گیری شد (Hasanloo et al., 2015). این پژوهش سه بار و با سه تکرار انجام شد.

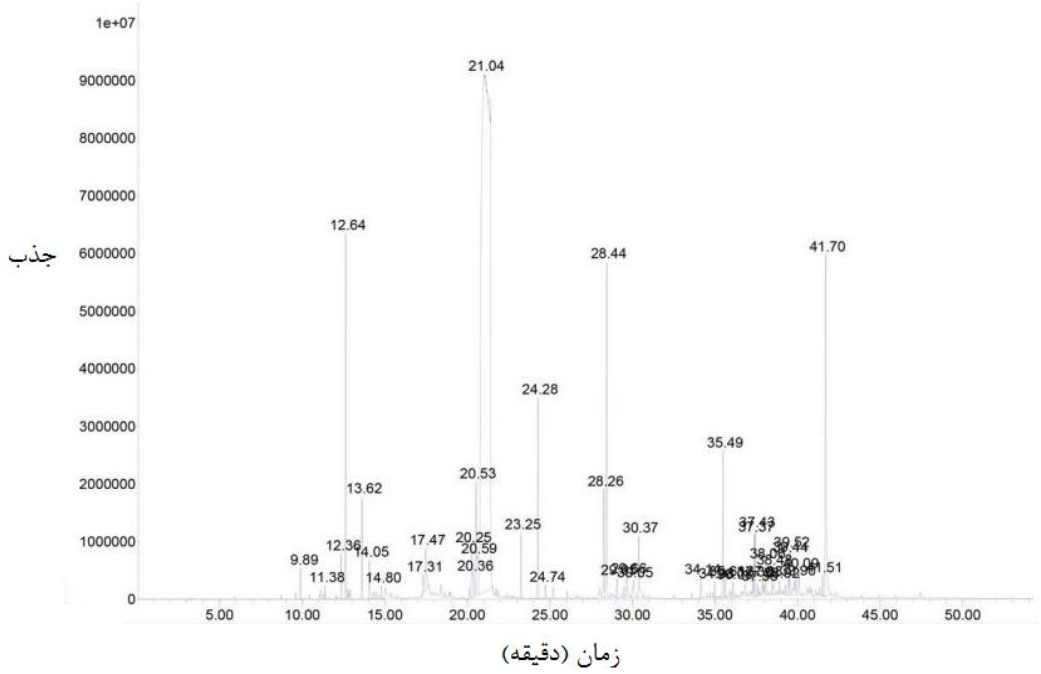
دیسک دیفیوژن آگار: ابتدا دو سوم پلیتها با استفاده از محیط کشت مولر هینتون آگار استریل، پر شدند. پس از سرد شدن محیط کشت ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیونهای باکتریایی مقایسه شده با ۰,۵ مک فارلند (در شرایط کاملا استریل)، توسط سواپ استریل در جهات مختلف روی محیط مولر هینتون آگار تلقیح و پخش گردید. سپس غلظت‌های مورد نظر از اسانس تهیه شد و به میزان ۳۰ میکرولیتر از آن توسط سمپلر روی دیسک بلانک های استریل (شرکت داروسازی پادتن طب با قطر ٤/٦ mm)، ریخته شد. دیسک های حاوی اسانس با رعایت فاصله مناسب از لبه پتری دیش و از یکدیگر بر روی محیط کشت قرار گرفتند. از دیسک های آنتی بیوتیک شرکت پادتن طب آمپی سیلین با غلظت ۱۰ میلی گرم/ میلی لیتر، سیپروفلوکساسین ۵ میلی گرم/ میلی‌لیتر، اریترومایسین ۱۵ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر و سفکسیم ۵ میلی گرم/ میلی لیتر به عنوان شاهد مثبت و از یک دیسک بلانک آغشته به ۳۰ میکرولیتر DMSO ۱۰۰ درصد به عنوان شاهد منفی استفاده شد. پلیتها به مدت ٢٤ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس داخل انکوباتور قرار داده شد. در نهایت هاله های عدم رشد در اطراف هر دیسک با خط کش اندازه گیری شدند (Hasanloo et al., 2015).

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC): در این روش حداقل غلظتی از اسانس آویشن مرتعی که باعث مهار رشد باکتری‌های مورد نظر شده بررسی می‌شود. بدین منظور از یک سری لوله های آزمایش ده تایی استفاده شد. برای تهیه غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر از اسانس گیاه، ابتدا ۰,۵ میلی‌لیتر از اسانس تغلیظ شده (معادل ۵۰۰ میلی‌گرم/میلی لیتر) به لوله اول آزمایش اضافه، سپس به آن یک‌ونیم میلی‌لیتر از محلول دی‌متیل‌سولفوکسید (DMSO) ۱۰۰درصد اضافه گردید، سپس به نسبت ۱ به ۲ از اسانس ها به سریال غلظت تهیه شد. از یک سری لوله‌های ده تایی آزمایش برای هر باکتری استفاده شد (۸ لوله برای غلظت های مختلف هر اسانس و یک لوله به عنوان کنترل مثبت و یک لوله به عنوان کنترل منفی). پس از آن به تمامی لوله ها، ۰/۵ میلی لیتر محیط کشت مولر هینتون براث اضافه گردید. سپس به مقدار مساوی و ۰,۵ میلی لیتر از سوسپانسیون میکروبی ۰,۵ مک فارلندی که قبلا تهیه شده بود، به لوله ها اضافه گردید (Hasanloo et al., 2015).

جهت محاسبه حداقل غلظت اسانس الکلی آویشن مرتعی که منجر به مرگ باکتری‌ها میشود، از نتایج آزمون حداقل غلظت مهارکنندگی استفاده شد. بنابراین برای تهیه MBC، ۱۰ میلی لیتر از غلظت MIC و غلظت‌های قبل از آن (کلیه غلظت های موجود در لوله‌ها) که کدورتی در آن‌ها مشاهده نشده بود، بر روی محیط نوترینت آگار کشت سطحی داده شدند. تمام پلیت های کشت شده به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. به منظور دستیابی به MBC، پس از بررسی پلیت‌ها، غلظت اولین کشت سطحی که هیچ رشدی را نشان نداد، در نظر گرفته شد (Hasanloo et al., 2015).

نتایج

بازده و ترکیبات شیمیایی اسانس آویشن مرتعی: کروماتوگرام گازی آویشن مرتعی در شکل ۱ ارائه شده است. جدول ۱، ترکیبات شناسایی شده در اسانس اندام‌های هوایی گیاه آویشن مرتعی مورد آزمایش را نشان می‌دهد. نتایج این بررسی، ۴۲ ترکیب مختلف را در اسانس اندام‌های هوایی گیاه نشان داد. پس از مقایسه طیف‌ها با داده‌های کتابخانه NIST و Wiley، ۹۹,۹۹ درصد از کل اسانس گیاه *Thymus eriocalyx* شناسایی شد. ترکیبات عمده موجود در اسانس شامل، کارواکرول (۶۶,۹۶ درصد)، 1Podocarp - 7 - en - 3.beta – ol (۵,۲۷ درصد)، کاریوفیلین اکساید (۴,۵۴ درصد)، پارا – سایمین (۳,۹۵ درصد)، کاریوفیلن (۱,۸۷ درصد)، بنزآلدئید (۱,۵۷ درصد)، وولگارول (۱,۰۴ درصد)، تریدکان (۱,۲۴ درصد)، اسپاتولنول (۱,۲۱درصد)، بایوزول (۱,۰۲ درصد) و تیمول (۱ درصد) می‌باشد (جدول ۱). به‌طور کلی ۸۹,۶۷ درصد از پروفایل اسانس اندامهای هوایی گیاه مربوط به این ترکیبات می باشد و ۳۱ ترکیب دیگر تنها ۱۰,۳۳ درصد از اسانس این گیاه را تشکیل می دهد. تحقیقات نشان داده است که این ترکیبات دارای خواص ضد میکربی می باشند. آویشن مرتعی، دارای درصد بالایی از مواد فنولی مخصوصاً کارواکرول است. کارواکرول مایع بی رنگ مایل به زرد، یک ترکیب فنلی و مشتق مونوترپن طبیعی از سایمن است که بیشترین مقدار از مواد تشکیل‌دهنده اسانس را تشکیل می‌دهد. این ترکیب ضدالتهاب و مهارکننده رشد باکتری و قارچ بوده و سرعت مرگ سلول‌های سرطانی را افزایش می‌دهد و به‌عنوان یک افزودنی غذایی استفاده می‌شود.



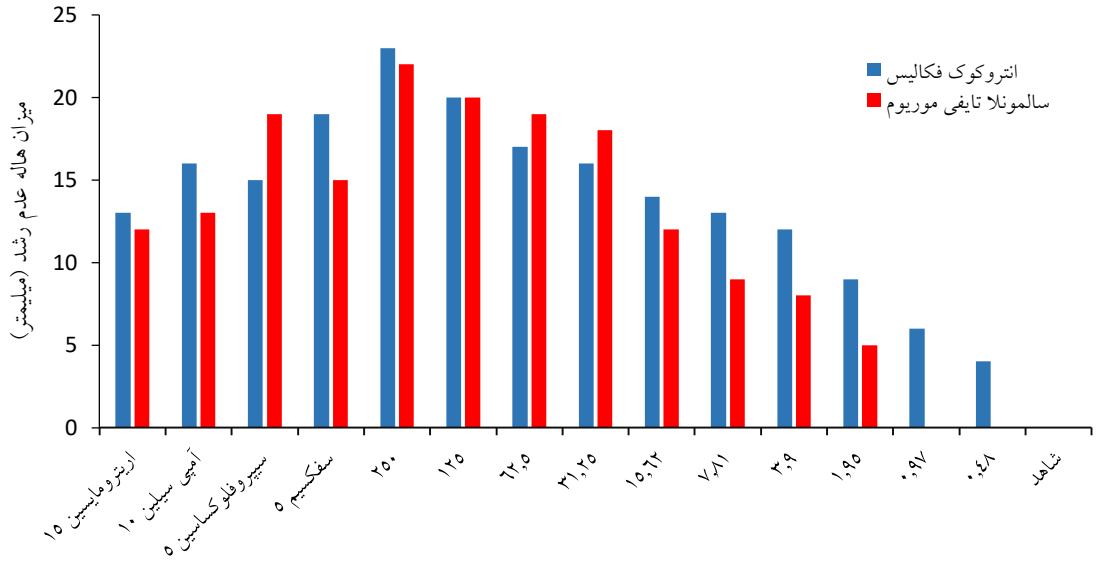
شکل ۱: کروماتوگرام اسانس گیاه آویشن مرتعی به دست آمده از دستگاه GC-MS

جدول ۱: آنالیز مواد موثره اسانس گیاه آویشن مرتعی

ردیف	نام ترکیب	زمان بازداری (دقیقه)	درصد ترکیب
۱	alpha- Pinene	۹,۸۹	۰,۲۵
۲	beta- Myrcene	۱۱,۳۸	۰,۱۰
۳	alpha- Terpinene	۱۲,۳۶	۰,۳۹
٤	Para - Cymene	۱۲,٦٤	۳,۹۵
۵	gamma- terpinene	۱۳,٦۲	۰,۸۵
٦	cis -beta –Terpineol,	۱٤,۰۵	۰,۵۳
۷	Linalool L	۱٤,۸۰	۰,۱٤
۸	Borneol	۱۷,۳۱	۰,۳۷
۹	4 – Terpineol	۱۷,٤۷	۰,۸۳
۱۰	Biosol	۲۰,۲۵	۱,۰۲
۱۱	Phenol	۲۰,۳٦	۰,۳۷
۱۲	Tridecane	۲۰,۵۳	۱,۲٤
۱۳	Thymol	۲۰,۵۹	۱,۰۰
۱٤	Carvacrol	۲۱,۰٤	٦٦,۹٦
۱۵	Tetradecane	۲۳,۲۵	۰,۵٤
۱٦	Caryophyllene	۲٤,۲۸	۱,۸۷
۱۷	(+) - Aromadendrene	۲٤,۷٤	۰,۱۷
۱۸	(+) Spathulenol	۲۸,۲٦	۱,۲۱
۱۹	Caryophyllene oxide	۲۸,٤٤	٤,۵٤
۲۰	Naphthalene	۲۹,۰۵	۰,۱۹
۲۱	Adamantane	۲۹,٦٦	۰,۳۸
۲۲	alpha-Farnesene	۳۰,۰۵	۰,٤۳
۲۳	Vulgarol	۳۰,۳۷	۱,۰٤
۲٤	Phthalic acid	۳٤,۱٤	۰,۲۰
۲۵	Cis-Cinerone	۳٤,۹۸	۰,۱۵
۲٦	Benzaldehyde	۳۵,٤۹	۱,۵۷
۲۷	3 - Benzylsulfonyl - 2 , 6,6 - trimethyl ...	۳۵,٦۱	۰,۱۸
۲۸	Dibutyl phthalate	۳٦,۰۸	۰,۲۰
۲۹	(+) –6-Oxocamphene	۳۷,۳۰	۰,۱٦
۳۰	Durenol	۳۷,۳۷	۰,۵۷
۳۱	Isopimaradiene	۳۷,٤۳	۰,٦۰
۳۲	4- vinl- 2 -methoxy-phenol	۳۷,۵۸	۰,۱۰
۳۳	Isodurol	۳۷,۸۸	۰,۱۷
۳٤	methylcarbamate	۳۸,۰٦	۰,۳۵

ردیف	نام ترکیب	زمان بازداری (دقیقه)	درصد ترکیب
۳۵	Benzene	۳۸,۴۸	۰,۱۹
۳۶	Indan	۳۸,۹۲	۰,۱۳
۳۷	1-Methoxyestrone	۳۹,۴۴	۰,۴۵
۳۸	Androst - 4 - ene - 3 , 6 , 17 - trione	۳۹,۵۲	۰,۴۷
۳۹	6 – Chiloro -4- Nitro - O – Cresol	۳۹,۹۰	۰,۲۶
۴۰	Quebrachamine	۴۰,۰۹	۰,۴۰
۴۱	benzo phenanthridin	۴۱,۵۱	۰,۲۰
۴۲	1 Podocarp - 7 - en - 3.beta - ol	۴۱,۷۰	۵,۲۷
Total			۹۹,۹۹

روش دیسک دیفیوژن آگار: اسانس گیاه آویشن مرتعی در تمامی غلظت‌ها اثر ضدباکتریایی مناسبی بر باکتری *انتروکوک فکالیس* داشت. غلظت‌های ۲۵۰ تا ۱,۹۵ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر اسانس آویشن مرتعی اثر مهاری بر باکتری *سالمونلا تایفی موریوم* داشت (شکل ۲، جدول ۲). بین افزایش غلظت و افزایش قطر هاله بازدارندگی از رشد هر دو باکتری مورد آزمایش رابطه مستقیم برقرار بود. *انتروکوک فکالیس* با قطر هاله ۲۳ میلی‌متری در غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر از اسانس آویشن مرتعی به عنوان حساسترین سویه باکتریایی مشاهده شد. اثر مهارکنندگی اسانس با غلظت‌های ۲۵۰ و ۱۲۵ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر روی باکتری‌ها از هر چهار آنتی‌بیوتیک انتخابی بیشتر بود. هاله عدم رشد در باکتری *انتروکوک فکالیس* در غلظت ۲۵۰ و ۱۲۵ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر، به‌ترتیب ۲۳ و ۲۰ میلی‌متر بود در حالی که بیشترین مقدار هاله عدم رشد در اطراف دیسک‌های آنتی‌بیوگرام، اطراف دیسک سفکسیم ۵ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر، به میزان ۱۹ میلی‌متر مشاهده شد. همچنین هاله عدم رشد در باکتری *سالمونلا تایفی موریوم* در غلظت ۲۵۰ و ۱۲۵ میلی‌گرم / میلی‌لیتر، به‌ترتیب ۲۲ و ۲۰ میلی‌متر بود در حالی که بیشترین مقدار هاله عدم رشد در اطراف دیسک‌های آنتی‌بیوگرام، حول سیپروفلوکساسین ۵ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر، به میزان ۱۹ میلی‌متر مشاهده گردید. بنابراین اسانس گیاه آویشن مرتعی در دو غظت ۲۵۰ و ۱۲۵ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر روی هر دو باکتری مورد مطالعه بیشتر از آنتی‌بیوتیک اثرگذار بوده است (شکل ۲، جدول ۲). همچنین اثر اسانس گیاه آویشن مرتعی در توقف رشد باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از باکتری‌های گرم منفی بود.



شکل ۲: میزان هاله عدم رشد اطراف هر دیسک (شاهد: DMSO ۱۰۰ درصد)

جدول ۲: مقایسه میزان هاله عدم رشد اطراف هر دیسک با آنتی بیوگرام

سالمونلا تایفی موریوم	*انتروکوک فکالیس*	اسانس (mg/ml)
۱۲	۱۳	اریترومایسین ۱۵
۱۳	۱۶	آمپی سیلین ۱۰
۱۹	۱۵	سیپروفلوکساسین ۵
۱۵	۱۹	سفکسیم ۵
۲۲	۲۳	۲۵۰
۲۰	۲۰	۱۲۵
۱۹	۱۷	۶۲,۵
۱۸	۱۶	۳۱,۲۵
۱۲	۱۴	۱۵,۶۲
۹	۱۳	۷,۸۱
۸	۱۲	۳,۹
۵	۹	۱,۹۵
۰	۶	۰,۹۷
۰	۴	۰,۴۸
۰	۰	شاهد

حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC): مقدار حداقل غلظت مهارکنندگی در هر دو باکتری ذکر شده کمتر از حداقل غلظت کشندگی بود. حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس آویشن مرتعی برای *انتروکوک فکالیس* و *سالمونلا تایفی موریوم* به‌ترتیب ۷,۸۱ و

۳۱,۲۵ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر بود. حداقل غلظت کشندگی اسانس آویشن مرتعی برای باکتری گرم منفی *سالمونلا تایفی موریوم* بیش از ۶۲,۵ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر و برای باکتری گرم مثبت *انتروکوک فکالیس* بیش از ۱۵,۶۲ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر بود (جدول ۳).

جدول ۳: نتایج مربوط به تعیین MIC و MBC از غلظت‌های متفاوت اسانس گیاه آویشن بر روی باکتری‌ها

نوع باکتری	اسانس گیاه (میلی‌گرم/ میلی‌لیتر)	
	MIC	MBC
انتروکوک فکالیس	۷,۸۱	۱۵,۶۲
سالمونلا تایفی موریوم	۳۱,۲۵	۶۲,۵

بحث

مطالعه حاضر اولین گزارش از بررسی ترکیبات فیتوشیمیایی و اثر مهارکنندگی بخش‌های هوایی گیاه آویشن مرتعی کرمانشاه، بر رشد باکتری‌ها در مقایسه با آنتی بیوتیک‌ها را نشان می‌دهد. در این پژوهش بازده استخراج اسانس آویشن مرتعی ۹۹,۹۹ درصد است (جدول ۱). ترکیب اصلی تشکیل دهنده اسانس آویشن مرتعی، کارواکرول (۶۶,۹۶ درصد) بود (شکل ۱، جدول ۱). این ترکیب دارای خواص مختلف دارویی و بیولوژیکی همچون ضد باکتری، ضد قارچی، آنتی‌اکسیدانی، ضدسرطان و ضدالتهاب می‌باشد. کارواکرول با غشای میکروارگانیسم‌ها واکنش می‌دهد و می‌تواند به کاتیون‌های سطح غشای پاتوژن ها متصل شده و در نهایت باعث اختلال در عملکرد حیاتی آنها شود و با ایجاد تغییراتی روی نفوذپذیری ترکیباتی مانند پتاسیم و هیدروژن اثرات ضد میکربی بر جای بگذارد. لذا از نظر دارویی دارای اهمیت می‌باشند (Kaeidi et al., 2020). اسانس آویشن مرتعی اثر ضدباکتریایی خوبی را بر علیه باکتری گرم مثبت در مقایسه با باکتری گرم منفی داشت. همچنین اسانس این گیاه در غلظت‌های ۲۵۰ و ۱۲۵ میلی‌گرم/ مول در مهار هر دو باکتری، بهتر از آنتی‌بیوتیک‌های انتخابی عمل کردند (شکل ۲، جدول ۲). در اطراف تمام دیسکها در پلیت‌های حاوی باکتری *انتروکوک فکالیس* هاله ی عدم رشد مشاهده شد. اما غلظت‌های کمتر از ۰/۹۷ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر از اسانس، در جلوگیری از رشد باکتری *سالمونلا تایفی موریوم* موثر نبوده است (شکل ۲، جدول۲). حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس الکلی آویشن مرتعی برای *انتروکوک فکالیس* و *سالمونلا تایفی موریوم* به‌ترتیب ۷,۸۱ و ۳۱,۲۵ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر و حداقل غلظت کشندگی اسانس الکلی آویشن مرتعی برای باکتری گرم منفی *سالمونلا تایفی موریوم* بیش از ۶۲,۵ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر و برای باکتری گرم مثبت *انتروکوک فکالیس* بیش از ۱۵,۶۲ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر بود (جدول ۳). بنابراین باکتری گرم مثبت حساسیت بیشتری نسبت به باکتری گرم منفی در برابر غلظت های مختلفی از اسانس نشان داده است.

اخوان و همکاران (۱۳۹۷) اثر مهارکنندگی اسانس آویشن شیرازی (*Zataria Multiflora*) را روی رشد باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی ارزیابی کردند. نتایج بیانگر این مطلب بود که اثر بازدارندگی اسانس آویشن شیرازی، با افزایش مقدار آنها به شکل معنی‌داری افزایش می‌یابد و قطر هاله عدم رشد افزایش می یابد. همچنین در مقایسه با آنتی بیوتیک‌ها، آویشن به طور قابل‌توجهی منجر به کاهش رشد باکتری‌ها شده است. آویشن تاثیر بیشتری روی مهار باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی

داشته است (Akhavan et al., 2020). نتایج حاصل از این مطالعه با پژوهش حاضر مطابقت دارد.

فلاحی و همکاران (۱۳۸۸) به بررسی اثر اسانس آویشن باغی، اُکالیپتوس و ... و همچنین اثر آنتی بیوتیک استرپتومایسین بر روی پنج باکتری سالمونلای جدا شده از تخم مرغ و دو نمونه استاندارد *سالمونلا تیفی موریوم* و *سالمونلا اینتریتیدیس* پرداختند. نتایج، بیانگر اثرات بازدارندگی معنی‌دار اسانس این گیاهان روی رشد باکتری سالمونلا بود. میانگین قطر هاله ممانعت از رشد باکتری برای اسانس آویشن باغی (۲۵/٦ میلی‌متر) و در اُکالیپتوس (۳/٤ میلی‌متر) مشاهده گردید. در این تحقیق بیشترین و کمترین قطر هاله عدم رشد بر روی *استرپتوکوک فکالیس* (۲۵۰ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر) و سالمونلا (۰/۹۷ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر) بود. همچنین تاثیر اسانس آویشن روی باکتری *سالمونلا تایفی موریوم* نسبت به آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین قابل‌توجه بود (Falahi et al., 2010). نتایج حاصل از این مطالعه با پژوهش حاضر مطابقت دارد. این مطالعه به صورت آزمایشگاهی انجام شده و برای استفاده های درمانی از نتایج این مطالعه نیاز به مطالعات بر روی موجودات زنده می باشد تا میزان زیست دستیابی (Bioavailability) آویشن مرتعی و نیز آثار جانبی احتمالی آن برای استفاده های انسانی مشخص گردد.

نتیجه‌گیری نهایی

بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه، اسانس بخش های هوایی گیاه آویشن مرتعی به دست آمده از ارتفاعات کرمانشاه، دارای درصد بالایی از ترکیبات فنولی، به خصوص کارواکرول می‌باشد و فعالیت ضد میکربی خوبی را نشان داده است. با توجه به اینکه غلظت‌های ۲۵۰ و ۱۲۵ میلی‌گرم/ مول از اسانس در مهار هر دو باکتری، بهتر از آنتی بیوتیک‌های انتخابی عمل کردند می‌توان آن را به عنوان جایگزینی برای آنتی بیوتیک‌ها معرفی نمود.

تشکر و قدردانی

این طرح با حمایت‌های مالی دانشگاه پیام نور (شماره مصوب ٤٠٣٧ص) انجام شده است. از کلیه همکارانی که در انجام این طرح ما را یاری نمودند، کمال تشکر و قدردانی را داریم.

References

Akhavan, F., Tahmuzi Didehban, S. and Hojjati, M. 2020. Antibacterial effects of thyme, savory, rosemary, mint and peppermint essential oils on five gram-positive bacteria in comparison with effects of three antibiotics on the bacteria. Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology, 15(3): 97-103.

Alghamdi, F. and Shakir, M. 2020. The influence of *Enterococcus faecalis* as a dental root canal pathogen on endodontic treatment: A systematic review. Cureus, 12(3): e7257- 7267.

Ansari, N., Yazdian-Robati, R., Shahdordizadeh, M., Wang, Z. and Ghazvini, K. 2017. Aptasensors for quantitative detection of *Salmonella Typhimurium*. Analytical biochemistry, 533 (1): 18-25.

Batani, A., Yousefi Jovan, I., Far Hangi, M. and Zare Moghadam, M. 2015. Introduction of thyme medicinal plant, its planting, growing and harvesting The first national conference of medicinal, aromatic and spice plants, 1-12 https://civilica.com/doc/958923.

Davarpanah, M., Bakhtiari, R., Karimi, M., Hosseini, S.F. and Esmaeili, A. 2022. Iranian native medicinal plants affecting *Staphylococcus aureus* as septic pathogens: an updated review. Egyptian Journal of Veterinary Sciences, 53(1): 1-8.

Falahi, J., Ebadi, M., Rezvani, M. P., Hedayai, M. and Tarighi, S. 2010. Evaluation of essential oil of six mediclinal plant on controlling of *Salmonella bacteria* in comparison with streptomycin. Scientific-Research Iranian Veterinary Journal, 6(1): 25-33.

Farahmand, S., Rasooli, A. and Saffarpour, M. 2016. Antifungal activities of methanolic extract of plants. Electronic Journal of Biology, *S*, (*1*): 42-44.

Hasanloo, T., Sepehrifar, R. and Farahmand, S. 2015. The effect of different doses of silymarin, extracted from the seeds of the *Silybum marianum* L. Gaertn on the growth of 6 bacterial species. Research in Medicine, 38(4): 193-199.

Kaeidi, A., Rahmani, M.R. and Hassanshahi, J. 2020. The protective effect of carvacrol and thymol as main polyphenolic compounds of thyme on some biologic systems in disease condition: A narrative review. Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences, 19(1): 81-96.

Matera, G., Altuvia, Y., Gerovac, M., El Mouali, Y., Margalit, H. and Vogel, J. 2022. Global RNA interactome of *Salmonella discovers* a 5′ UTR sponge for the MicF small RNA that connects membrane permeability to transport capacity. Molecular cell, 82(3): 629-644.

Mehran, M., Hosseini, H., Hatami, A. R., Taghizade, M. and Safaei, A. R. 2016. Investigation of seven species of essential oils of thyme and comparison their antioxidant properties. Journal of Medicinal Plants, 15(58): 134-140.

Miller, W.R., Murray, B.E., Rice, L.B. and Arias, C.A. 2020. Resistance in vancomycin-resistant enterococci. Infectious Disease Clinics, 34(4): 751-771.

Mohseni, N.M., Daraei Garmakhany, A. and Mohamadi Sani, A. 2018. Study of the effect of thyme essential oil on the reduction of peroxidase enzyme activity in the black Spanish radish and green bean. Journal of Food Science and Technology, 82(15): 63-71.

Salehi, M., Hasanloo, T., Mehrabian, S. and Farahmand, S. 2010. Effects of *Silybum marianum* (L.) Gaertn seeds extract on dermatophytes and saprophytes fungi in vitro compare to clotrimazol. Pharmaceutical Sciences, 16(4): 203-210.

Yousefzadeh, K., Houshmand, S., Shiran, B., Mousavi-Fard, S., Zeinali, H., Nikoloudakis, N., Gheisari, M.M. and Fanourakis, D. 2022. Joint effects of developmental stage and water deficit on essential oil traits (content, yield, composition) and related gene expression: A case study in two thymus species. Agronomy, 12(5): 1008-1027.