# مطالعه اثرات ضد میکروبی عصاره اتانولی آویشن باغی (*Thymus vulgaris*) بر باکتری های غذازاد در محیط مدل

**میثم علیمرادی[1]، مهرداد عطایی کچویی[1,2]*، فریبرز معطر[3,4]**

۱. گروه گیاهان دارویی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۲. مرکز تحقیقات فرآوری گیاهان دارویی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۳. گروه فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.
۴.تحقیق و توسعه شرکت گل دارو، آزمایشگاه فارماسیوتیک، ایران.

***نویسنده مسئول:** *Drataie@iaushk.ac.ir*

تاریخ دریافت:۱۳۹۹/۱۱/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۲/۱۳

**چکیده**

آویشن باغی گیاهی از خانواده نعنائیان است که دارای خصوصیات ضدمیکروبی بالا است. مطالعه حاضر به منظور ارزیابی اثرات ضدمیکروبی عصاره اتانولی آویشن باغی روی باکتری های غذازاد انجام پذیرفت. اندام هوایی آویشن باغی برای تهیه عصاره اتانولی استفاده شد. قطر هاله عدم رشد باکتری ها با استفاده از روش دیسک گذاری ارزیابی شد. حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره اتانولی آویشن باغی روی باکتری ها با استفاده از پلیت الایزا ارزیابی شد. قطر هاله عدم رشد باکتری ها در برابر عصاره اتانولی آویشن باغی رنجی معادل ۰/۶۱ ± ۷/۸۷ تا ۰/۳۷ ± ۱۶/۹۹ میلی متر داشت. استفاده از غلظت ۵۰ میلی گرم/میلی لیتر از عصاره اتانولی آویشن باغی سبب ایجاد بیشترین قطر هاله عدم رشد *سودوموناس آئروژینوزا* (۰/۴۳ ± ۱۱/۳۸ میلی متر)، *اشریشیا کلی* (۰/۳۵ ± ۱۲/۰۰ میلی متر)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (۰/۶۹ ± ۱۶/۳۳ میلی متر) و *لیستریا مونوسایتوژنز* (۰/۳۷ ± ۱۶/۹۹ میلی متر) شد. اثرات ضد میکروبی عصاره اتانولی آویشن باغی وابسته به دوز بود ($p< ۰/۰۵$). قطر هاله عدم رشد غلظت ۵۰ میلی گرم/میلی لیتر عصاره اتانولی آویشن باغی روی باکتری های *سودوموناس آئروژینوزا*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا مونوسایتوژنز* از همه آنتی بیوتیک ها بیشتر بود ($p< ۰/۰۵$). کمترین میزان MIC و MBC برای باکتری های *استافیلوکوکوس اورئوس* (به ترتیب ۴ و ۶ میلی گرم/میلی لیتر) و *لیستریا مونوسایتوژنز* (به ترتیب ۴ و ۶ میلی گرم/میلی لیتر) بدست آمد. عصاره اتانولی آویشن باغی می تواند به عنوان یک ترکیب با خصوصیات ضد میکروبی در مواد غذایی مورد استفاده قرار گیرد.

**کلمات کلیدی:** آویشن باغی، عصاره اتانولی، اثرات ضد میکروبی، باکتری های غذازاد.

## مقدمه

مصرف غذای سالم و بهداشتی همواره مورد توجه اکثر جوامع بشری بوده است. با این وجود، گزارشات متنوعی از بروز بیماری های غذازاد که عموما با علائم گوارشی مانند استفراغ، تهوع، اسهال، دل درد و دل پیچه، تب و علائم عمومی همراه بوده اند، در دسترس است (Dehkordi, F Safarpoor et al., 2014; Ranjbar, Farsani, et al., 2018; Ranjbar, Seyf, et al., 2019; Ranjbar, Yadollahi Farsani, et al., 2019). بر طبق گزارش مرکز کنترل و پیشگیری بیماری (CDC) (Dwey-Mattia et al., 2017)، در سال ۲۰۱۷ تعداد ۴۸۱ وقوع بیماری های غذازاد در آمریکا گزارش شده است که منجر به ۱۴۴۸۱ مورد بیماری، ۸۲۷ مورد بستری شدن و ۲۰ مورد مرگ و میر شده است. بنابراین سنجش کیفیت بهداشتی مواد غذایی یکی از مهم ترین اصول در پیشگیری از بروز بیماری های غذازاد در کشور های توسعه یافته و در حال توسعه می باشد. گزارشات نشان می دهند

باکتری های *اشریشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *لیستریا مونوسایتوژنز* در اکثر موارد بیماری های غذازاد حضور فعال دارند (Abebe et al., 2020). *اشریشیا کلی* یک باکتری گرم منفی و میله ای شکل است که جزء باکتری های روده ای طبقه بندی می شود و موجب عفونت های غذایی مهلک در انسان می گردد (Ranjbar et al., 2017). یکی از سویه های مهم این باکتری، *اشریشیا کلی* O157:H7 می باشد که جزء تیپ های تولید کننده شیگاتوکسین (STEC) بوده و معمولا به عنوان عامل ایجاد کننده بیماری های مهم و خطرناک کولیت خونریزی دهنده، اسهال خونی و غیرخونی، ترومبوسیتوپنی، آنمی همولیتیک، اختلالات کلیوی و سندرم همولیتیک اورمیک در انسان است (Hemmatinezhad et al., 2015). *استافیلوکوکوس اورئوس* یک باکتری گرم مثبت کوکسی شکل مقیم پوست و دستگاه تنفس انسان است که از شایع ترین عوامل عفونت های بیمارستانی و همچنین دلیل بروز اکثر مسمومیت های غذایی در جوامع محسوب می شود(Safarpoor Dehkordi et al., 2017). *استافیلوکوکوس اورئوس* عامل بروز مسمومیت غذایی با دوره کمون ۲ تا ۴ ساعته و علائم تهوع، استفراغ، دل پیچه و ضعف، می‌باشد (Madahi et al., 2014). *سودوموناس آئروژینوزا* یک باکتری گرم منفی میله ای شکل و پاتوژن فرصت طلب بیمارستانی است که مسئول ایجاد طیف وسیعی از عفونت‌های انسانی و با فراوانی کمتر عفونت های غذایی و گوارشی است (Raposo et al., 2017). *لیستریا مونوسایتوژنز* یک باکتری گرم مثبت و ملیه ای شکل است که عامل ایجاد مسمومیت های غذایی و بیماری لیستریوزیس در انسان محسوب می شود. اگرچه تعداد مسمومیت غذایی ناشی از لیستریا مونوسایتوژنز نسبت به مسمومیت با سایر باکتری های غذازاد، کمتر است اما از نظر نقش تهدیدکنندگی، لیستریوزیس منجر به مرگ و میر ۳۰ درصد از افراد مبتلا می شود. این باکتری منجر به بروز عوارض وخیمی مانند مننژیت، سقط جنین، عفونت کشنده خصوصاً در افراد خیلی جوان، سالمندان، زنان باردار یا افراد با ضعف سیستم ایمنی می شود (Dehkordi, Farhad Safarpoor et al., 2013; Mashak et al., 2021).

یکی از راهکار های درمانی برای موارد مسمومیت های غذایی، تجویز آنتی بیوتیک هاست. با این وجود، امروزه گزارشات فراوانی مبنی بر بروز مقاومت های شدید آنتی بیوتیکی باکتری های غذازاد نسبت به طیف وسیعی از آنتی بیوتیک ها در دسترس است (Momtaz et al., 2012; Ranjbar, Dehkordi, et al., 2018). بنابراین محققان در پی تولید مواد با خصوصیات ضد میکروبی از منابع طبیعی مانند اسانس ها و عصاره های گیاهی هستند (Dehkordi, Farhad Safarpoor, Tirgir, et al., 2017).

آویشن باغی (*Thymus vulgaris*) یکی از شناخته شده ترین گیاهان گلدار از خانواده نعناعیان (*Lamiaceae*) است که برای طعم دادن انواع محصولات غذایی، سس‌ها، گوشت‌ها، غذاهای کنسروی و تهیه برخی نوشیدنی‌ها استفاده می شود. قسمت‌های دارویی این گیاه، شامل سرشاخه‌ها و برگ خشک شده آن (اندام های هوایی) می‌باشد که حاوی مونوترپنوئیدهای فنلی و گلیکوزیده، الکل‌های آلفاتیک، تانن‌ها، ترکیبات بی‌فنل مونوترپنوئیدها، اوژنول، اسید کافئیک، اسید رزمارینیک، ساپونین‌ها، آپی‌ژنین، اسید اولئانولیک، اسید اورسولیک، اسید لابیاتیک، تری‌ترپن‌ها و فلاونوییدها می باشد (Prasanth Reddy et al., 2014). قسمت اعظم عصاره این گیاه را فنل‌ها ( مانند تیمول و کارواکرول، ۲۰ تا ۸۰ درصد) و هیدروکربن‌های مونوترپنی (مانند پارا-سیمن و گاما-ترپینن) تشکیل می‌دهد. از جمله خواص دارویی این گیاه می توان به اثرات ضدمیکروبی، آنتی اکسیدانی، ضد توموری و ضد التهابی، اشاره نمود (Fani et al., 2017). مطالعات نشان داده اند که فلاوونوئیدهایی مانند اپی‌ژنین،

نـارینژین، لوتئـولین و روغن‌هـای فـرار محتـوی تیمـول وکارواکرول ترکیبات ضد میکروبی اصلی موجود در آویشن باغی هستند (Borugă et al., 2014). این گیاه بـه وفـور در ایران یافت می شود و با در نظر گرفتن شرایط مناسـب برای رشد و پـرورش آن، انجـام تحقیقـات روی ایـن گیـاه مقرون به صرفه و اقتصادی است.

با توجه به نقش باکتری های غـذازاد در بـروز مسـمومیت های غذایی و نبود مطالعات مدون روی اثرات ضدمیکروبی آویشن باغی، مطالعه حاضر به منظور ارزیـابی اثـرات ضـد میکروبی عصاره اتانولی آویشـن بـاغی روی بـاکتری هـای *اشریشـیا کلـی*، *اسـتافیلوکوکوس اورئـوس*، *سـودوموناس آئروژینـوزا* و لیستریا مونوسایتوژنز انجام پذیرفت.

**مواد و روش ها**

جمع آوری گیاهان دارویی

اندام هوایی گیـاه آویشـن بـاغی کـه در مزرعـه تحقیقـاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، پرورش داده شده بود، در بهار سال ۱۳۹۹، جمـع آوری و بـه آزمایشـگاه منتقـل شد. ابتـدا گونـه گیـاه توسـط یکـی از مختصصـین گـروه گیاهان دارویی و معطر دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد تایید و نمونه هرباریوم آن در مرکـز تحقیقـات و آمـوزش کشاورزی و منابع طبیعـی اسـتان چهارمحـال و بختیـاری ثبت شد (شماره هرباریوم ۴۹۶).

تهیه عصاره اتانولی از آویشن باغی

ابتدا اندام هوایی گیاه آویشـن بـاغی در سـایه و در دمـای اتاق خشک شد. سپس قسمت های خشک شده با استفاده از آسیاب برقی (Best 350, Germany) پودر شـدند. بـه منظور عصاره گیـری، بـه ۱۰ گـرم از پـودر آسـیاب شـده آویشن بـاغی، ۱۰۰ سـی سـی اتـانول ۹۵ درصـد (مـرک، آلمان) به عنوان حلال با نسبت ۱:۱۰ اضافه شد و به مدت ۴۸ ساعت روی شیکر (فن آزما گستر، ایـران) بـا سـرعت ۱۴۰rpm قرار گرفت. در ادامه حلال و حل شونده توسـط قیف و کاغذ صافی واتمن شماره یک، از هم جـدا شـدند و عصاره داخل آون در دمای ۴۰ درجه سلسیوس به منظـور حلال زدایی قرار گرفت. پس از تبخیـر حـلال، عصـاره تـا رسیدن بـه وزن ثابـت در دسـیکاتور قـرار گرفـت. عصـاره خشک در فریزر و دمای ۲۰- درجه سلسـیوس نگهـداری شد (Mohsenipour et al., 2015).

باکتری ها و شرایط رشد

چهار گونه باکتریایی دخیل در همه گیری ها و مسمومیت هـای غـذایی شـامل *اشریشـیا کلـی* (ATCC 25922)، *اسـتافیلوکوکوس اورئـوس* (ATCC 9144)، *سـودوموناس آئروژینـوزا* (ATCC 25922) و *لیسـتریا مونوسـایتوژنز* (ATCC 19115) از مرکـز تحقیقـات میکـروب شناسـی مواد غذایی دانشـگاه آزاد اسـلامی واحـد شـهرکرد، تهیـه شدند. کشت خالص باکتری ها به منظـور احیـا مجـدد بـه صورت جداگانه در محـیط کشـت تریپتیـک سـوی بـراث (مرک، آلمان) کشت داده شدند و به مـدت ۲۴ سـاعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم خانه گذاری شدند.

ارزیابی قطر هاله عدم رشد باکتری ها

فعالیت ضدمیکروبی عصاره اتانولی آویشن باغی با اسـتفاده از روش انتشار دیسک بررسی شد. به طور خلاصـه بعـد از کشت یک شبه باکتری ها تـا رسـیدن بـه کـدورت $10^8$ × ۱/۵ کلنی در هر میلی لیتر، رقیق شد. سپس باکتری ها به صورت سطحی روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شدند. سپس دیسـک‌های بلانـک ۶ میلی‌متـری روی محیط کشت مـولر هینتـون آگـار قـرار گرفتنـد و میـزان ۱۰۰۰ میکرولیتر از عصاره اتانولی آویشن بـاغی بـا غلظـت های ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میلی گرم/میلی لیتر بـه آرامـی روی دیسک های بلانک ریخته شد. بـه منظـور مقایسـه اثـرات رشـد میکروبـی عصـاره، دسـک هـای آنتـی بیـوتیکی سفوتاکسـیم (۳۰ میکروگرم/دیسـک)، آمیکاسـین (۳۰ میکروگرم/دیسک)، پنی سیلین (۱۰ میکروگرم/دیسک)، و تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم/دیسـک) (Himedia, India) نیز با فاصله های معین روی پلیت های حاوی باکتری قرار گرفتند. سپس پلیـت هـای حـاوی بـاکتری بـه مـدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسـیوس گـرم خانـه گـذاری

شدند. دیسک حاوی اتانول به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. سپس قطر هاله عدم رشد دیسک‌ها به کمک خط‌کش میلی‌متری اندازه‌گیری شد (Khodaei et al., 2014). ارزیابی حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره ابتدا از کشت تازه باکتری ها در محیط تریپتیک سوی براث، کدورتی معادل ۰/۵ مک فارلند تهیه شد. سپس کدورت تهیه شده از هر باکتری به نسبت ۱ به ۱۰۰ رقیق شد تا غلظتی معادل$^{۶}$۱۰×۱ کلنی در هر میلی لیتر از محیط ایجاد شود. سپس از عصاره اتانولی آویشن باغی با استفاده از سرنگ استریل رقت های متوالی در محیط براث تهیه شد. سپس در پلیت ۹۶ خانه پلی استایرن ۱۰۰ میکرولیتر از رقت های مختلف عصاره (۴، ۶، ۸، ۱۰ و ۱۲ میلی گرم/میلی لیتر) که حاوی ۱۰۰ میکرو لیتر سوسپانسیون باکتری بود، ریخته شد. همچنین چاهک هایی حاوی ۲۰۰ میکرولیتر محیط براث به عنوان کنترل منفی و چاهک هایی حاوی محیط کشت و باکتری به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد .چاهک هایی نیز به عنوان شاهد کدورت حاوی ۱۰۰ میکرو لیتر محیط و ۱۰۰ میکرو لیتر از هر رقت در نظر گرفته شد. برای هر باکتری سه بار تکرار در نظر گرفته شد. سپس سطح پلیت ها پوشیده شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم خانه گذاری شدند. پس از اتمام گرم خانه گذاری، کدورت در طول موج ۶۳۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الایزا ریدر (Statfax 2100, USA) قرائت شد. کمترین غلظتی از مواد که باعث کاهش ۹۰ درصدی کدورت در مقایسه با گروه کنترل شده بود به عنوان MIC و کمترین غلظتی از مواد که باعث رفع کامل کدورت شده بود به عنوان MBC در نظر گرفته شد (Mahboubi et al., 2017).

تجزیه و تحلیل آماری

نتایج بدست آمده با استفاده از نرم افزار Mini Tab19 در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد بررسی قرار گرفت و مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون فیشر سطح احتمال پنج درصد صورت پذیرفت.

**نتایج**

مطالعه حاضر به منظور ارزیابی اثرات ضد میکروبی عصاره اتانولی آویشن باغی روی باکتری های *اشریشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *لیستریا مونوسایتوژنز* انجام پذیرفت. جدول ۱ قطر هاله عدم رشد باکتری های غذازاد در برابر غلظت های مختلف عصاره اتانولی آویشن باغی و دیسک های آنتی بیوتیکی را نشان می دهد. قطر هاله عدم رشد باکتری های مورد ارزیابی در برابر عصاره اتانولی آویشن باغی رنجی معادل ۰/۶۱ ± ۷/۸۷ تا ۰/۳۷ ± ۱۶/۹۹ میلی متر داشت. با افزاش غلظت عصاره اتانولی آویشن باغی از ۱۲/۵ به ۵۰ میلی گرم/میلی لیتر، قطر هاله عدم رشد باکتری ها به شکل معنی دار افزایش یافت ($p<$ ۰/۰۵). قطر هاله عدم رشد *سودوموناس آئروژینوزا*، *اشریشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا مونوسایتوژنز* در برابر غلظت ۵۰ میلی گرم/میلی لیتر از عصاره اتانولی آویشن باغی به ترتیب ۰/۴۳ ± ۱۱/۳۸ میلی متر، ۰/۳۵ ± ۱۲/۰۰ میلی متر، ۰/۶۹ ± ۱۶/۳۳ میلی متر و ۰/۳۷ ± ۱۶/۹۹ میلی متر بود. قطر هاله عدم رشد باکتری های مورد ارزیابی در برابر دیسک های آنتی بیوتیکی رنجی معادل ۰/۵۰ ± ۷/۲۵ تا ۰/۷۱ ± ۱۴/۹۰ میلی متر داشت. دیسک سفوتاکسیم بیشترین قطر هاله عدم رشد را برای تمام باکتری های غذازاد ایجاد نمود.

جدول ۲ میزان MIC و MBC باکتری های غذازاد در برابر عصاره اتانولی آویشن باغی را نشان می دهد. بر طبق نتایج، کمترین میزان MIC عصاره اتانولی آویشن باغی برای باکتری های *استافیلوکوکوس اورئوس* (چهار میلی گرم/میلی لیتر) و *لیستریا مونوسایتوژنز* (چهار میلی گرم/میلی لیتر) بدست آمد. کمترین میزان MBC عصاره اتانولی آویشن باغی برای باکتری های *استافیلوکوکوس اورئوس* (شش میلی گرم/میلی لیتر) و *لیستریا*

*مونوسایتوژنز* (شش میلی گرم/میلی لیتر) بدست آمد. کمترین میزان MBC عصاره اتانولی آویشن باغی برای باکتری های *استافیلوکوکوس اورئوس* (شش میلی گرم/میلی لیتر) و *لیستریا مونوسایتوژنز* (شش میلی گرم/میلی لیتر) بدست آمد. بیشترین میزان MIC و MBC به ترتیب برای باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* (۱۰ و ۱۲ میلی گرم/میلی لیتر) بدست آمد.

جدول ۱- قطر هاله عدم رشد باکتری های غذازاد در برابر غلظت های مختلف عصاره اتانولی آویشن باغی و دیسک های آنتی بیوتیکی

| تیمارها | | قطر هاله عدم رشد (میلی متر) | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | *سودوموناس آئروژینوزا* | *اشریشیا کلی* | *استافیلوکوکوس اورئوس* | *لیستریا مونوسایتوژنز* |
| عصاره اتانولی (میلی گرم/میلی لیتر) | ۵۰ | ۱۱/۳۸ ± ۰/۴۳$^{a}$ | ۱۲/۰۰ ± ۰/۳۵$^{a}$ | ۱۶/۳۳ ± ۰/۶۹$^{a}$ | ۱۶/۹۹ ± ۰/۳۷$^{a}$ |
| | ۲۵ | ۹/۲۲ ± ۰/۵۱$^{ab}$ | ۱۰/۰۷ ± ۰/۳۸$^{b}$ | ۱۴/۶۰ ± ۰/۸۱$^{b}$ | ۱۵/۲۰ ± ۰/۵۴$^{a}$ |
| | ۱۲/۵ | ۷/۸۷ ± ۰/۶۱$^{c}$ | ۸/۱۲ ± ۰/۴۱$^{c}$ | ۱۲/۷۳ ± ۰/۷۷$^{c}$ | ۱۳/۸۲ ± ۰/۳۶$^{b}$ |
| دیسک آنتی بیوتیک (میکروگرم/دیسک) | سفوتاکسیم (۳۰) | ۱۰/۷۳ ± ۰/۵۵$^{a}$ | ۱۲/۲۱ ± ۰/۳۴$^{a}$ | ۱۳/۸۴ ± ۰/۶۲$^{b}$ | ۱۴/۹۰ ± ۰/۷۱$^{ab}$ |
| | آمیکاسین (30) | ۸/۲۱ ± ۰/۵۲$^{b}$ | ۷/۶۲ ± ۰/۴۴$^{c}$ | ۸/۲۹ ± ۰/۲۲$^{d}$ | ۹/۴۳ ± ۰/۳۸$^{c}$ |
| | پنی سیلین (۱۰) | ۸/۵۹ ± ۰/۶۴$^{b}$ | ۸/۳۳ ± ۰/۷۵$^{c}$ | ۹/۹۶ ± ۰/۸۳$^{d}$ | ۹/۳۶ ± ۰/۵۸$^{c}$ |
| | تتراسایکلین (۳۰) | ۷/۲۵ ± ۰/۵۰$^{c}$ | ۷/۳۴ ± ۰/۲۶$^{c}$ | ۸/۱۲ ± ۰/۱۹$^{d}$ | ۸/۲۷ ± ۰/۴۹$^{c}$ |

*حروف کوچک غیریکسان در هر ستون نشان دهنده اختلاف آماری معنی دار در حد $p < ۰/۰۵$ می باشد.

کمترین میزان MBC عصاره اتانولی آویشن باغی برای باکتری های *استافیلوکوکوس اورئوس* (شش میلی گرم/میلی لیتر) و *لیستریا مونوسایتوژنز* (شش میلی گرم/میلی لیتر) بدست آمد. بیشترین میزان MIC و MBC به ترتیب برای باککتری *سودوموناس آئروژینوزا* (۱۰ و ۱۲ میلی گرم/میلی لیتر) بدست آمد.

جدول۲- میزان MIC و MBC (میلی گرم/میلی لیتر) باکتری های غذازاد در برابر عصاره اتانولی آویشن باغی.

| تیمار ها | *سودوموناس آئروژینوزا* | | *اشریشیا کلی* | | *استافیلوکوکوس اورئوس* | | *لیستریا مونوسایتوژنز* | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| عصاره متانولی | MIC | MBC | MIC | MBC | MIC | MBC | MIC | MBC |
| | ۱۰ | ۱۲ | ۸ | ۱۰ | ۴ | ۶ | ۴ | ۶ |

**بحث**

امروزه در خصوص اثرات بازدارندگی آنتی بیوتیک های طبیعی و اسانس های گیاهی مطالعات زیادی صورت می گیرد که نشان دهنده تلاش درخصوص حذف نگهدارنده های شیمیایی و به کارگیری نگهدارنده های طبیعی می باشد. آویشن باغی گیاهی موطن ایران است که دارای ترکیبات ضدمیکروبی مختلفی مانند فلاونوئیدها، ترپنوئیدها، کاروتنوئیدها، فیتواستروژن‌ها و خصوصا کارواکرول و تیمول می باشد (Mahboubi et al., 2017). امروزه جایگزینی نگهدارنده های طبیعی بجای نگهدارنده های شیمیایی در مواد غذایی و همچنین استفاده از گیاهان با اثرات ضدمیکروبی به عنوان چاشنی در مواد غذایی و همچنین منابع تولید مواد ضدمیکروبی،

بسیار مورد توجه و بررسی قرار گرفته است (Hlashwayo et al., 2020).

مطالعه حاضر به منظور ارزیابی اثرات ضدمیکروبی عصاره اتانولی آویشن باغی انجام پذیرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که عصاره اتانولی آویشن باغی در غلظت ۵۰ میلی گرم/میلی لیتر بیشترین قطر هاله عدم رشد را برای باکتری های ارزیابی شده داشت. همچنین قطر هاله عدم رشد عصاره اتانولی آویشن باغی در غلظت ۵۰ میلی گرم/میلی لیتر برای باکتری های *سودوموناس آئروژینوزا*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا مونوسایتوژنز* به شکل معنی داری از آنتی بیوتیک های ارزیابی شده، بیشتر بود ($p< ۰/۰۵$). نتایج ارزیابی MIC و MBC نیز نشان دهنده اثرات ضد میکروبی عصاره اتانولی آویشن باغی در غلظت های پایین بود. در کل نتایج نشان داد که عصاره اتانولی آویشن باغی اثرات ضدمیکروبی قابل توجهی برعلیه باکتری های غذازاد دارد.

مطالعات نشان داده اند که عصاره آویشن باغی عموما از دو ترکیب مهم تیمول و کارواکرول که اثرات ضدمیکروبی زیادی دارند، تشکیل شده است (Kowalczyk et al., 2020; Mahboubi et al., 2017). احتمالا دلیل اصلی اثرات ضدمیکروبی بالا در عصاره اتانولی آویشن باغی در مطالعه حاضر، حضور این دو ترکیب ضدمیکروبی می باشد. با توجه به اثرات ضد میکروبی و ماهیت خوراکی آویشن باغی، مطالعات متعددی استفاده از عصاره آویشن باغی را به عنوان یک چاشنی و همچنین نگهدارنده ی طبیعی در مواد غذایی پیشنهاد نموده اند (Anžlovar et al., 2014; Gonçalves et al., 2017). وجود ترکیبات دیگری مانند بنزن، گاماترپنین، آلفا-پینن، کامفن، بتا-میرسن، آلفا-ترپینن، پرا-سیمن، سینئول، لینالول، انیسول، جرماکرن، کاریوفیلن، ژرانیول، پولگون، منتون، ایزومنتول، پیپریتنون، آرومادندرن، اسپاتولنون، بیتا-آلمن و بورنئول، که اکثرا خصوصیات ضدمیکروبی دارند، می تواند دلیلی بر اثرات ضدمیکروبی بالقوه آویشن باغی باشد (Nemati et al., 2017; Nezhadali et al., 2012).

فیاد و همکاران (۲۰۱۳) (Fayad et al., 2013)، گزارش کردند که در غلظت های ۲۵، ۲۰، ۱۰ و ۵ میلی گرم/میلی لیتر عصاره اتانولی آویشن باغی قطر هاله های عدم رشد ۲۱، ۱۵، ۱۴، ۱۱ و ۹ میلی متر برای *استافیلوکوکوس اورئوس* و قطر هاله های عدم رشد ۱۹، ۱۴، ۱۳، ۱۰ و ۸ میلی متر برای *اشریشیا کلی* بدست آمد. خدایی مطلق و همکاران (۲۰۱۴) (Khodaei et al., 2014) نشان دادند که قطر هاله عدم رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* در برابر غلظت های ۱۰، ۳۰ و ۵۰ میلی گرم/میلی لیتر عصاره اتانولی آویشن به ترتیب ۱/۰۰ ± ۱۷/۸۳، ۳/۰۰ ± ۲۹/۰۰ و ۳/۷۲ ± ۳۷/۵۰ میلی متر بود. رسنووا و همکاران (۲۰۰۹) (Rusenova et al., 2009) قطر هاله عدم رشد باکتری های *لیستریا مونوسایتوژنز*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *اشریشیا کلی* در برابر اسانس آویشن باغی را به ترتیب ۲/۳۰ ± ۳۰/۷۰، ۰/۶۰ ± ۲۹/۷۰، ۲/۶۰ ± ۴۳/۰۰ و ۰/۶۰ ± ۳۱/۷۰ میلی متر گزارش نمودند. در مطالعه دیگری (Di Pasqua et al., 2005)، میزان حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد اسانس آویشن باغی برای باکتری های *سالمونلا تیفی موریوم*، *لیستریا مونوسایتوژنز*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب ۰/۰۳، ۰/۰۷، ۰/۱۵، ۰/۱، ۰/۱۷ و ۷۰/۷ میلی گرم/میلی لیتر بدست آمد. اثرات ضد میکروبی انواع عصاره های آویشن باغی برعلیه باکتری های گرم مثبت و گرم منفی در مطالعات انجام پذیرفته در کشور های ایران (Fani et al., 2017)، رومانی (Lengyel et al., 2019)، مراکش (Imelouane et al., 2009)، ترکیه (Gedikoğlu et al., 2019) و مجارستان (Gömöri et al., 2018) به اثبات رسیده است.

از نتایج تحقیق حاضر حساسیت بیشتر باکتری های گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا مونوسایتوژنز*) در مقایسه با باکتری های گرم منفی (*اشریشیا کلی* و

*سودوموناس آئروژینوزا*) در برابر عصاره اتانولی آویشن باغی می باشد. مطالعات نشان داده است که دیواره سلولی باکتری های گرم مثبت نسبت به باکتری های گرم منفی در مقابل بسیاری از آنتی بیوتیک ها، ترکیبات شیمیایی، عوامل ضدمیکروبی و حتی داروهای گیاهی حساسیت بیشتری دارد. این امر ممکن است به لیپوپلی ساکاریدها در غشای بیرونی و نیز فضای پری پلاسمیک باکتری های گرم منفی نسبت داده شود که آنها را ذاتاً به عوامل خارجی مقاوم می سازد (Masoumian et al., 2017). دلیل احتمالی وجود تفاوت در اثرات ضدمیکروبی آویشن باغی در مطالعات مختلف می تواند اختلاف در منطقه جغرافیایی، آب و هوا، پارامترهای دما، ارتفاع از سطح دریا، طول مدت زمان سایه، جنس خاک، استفاده از انواع کودها و در نهایت نوع عصاره یا اسانس استفاده شده، باشد. هرچند تمام مطالعات تایید کننده اثرات ضدمیکروبی آویشن باغی روی باکتری ها می باشند.

**نتیجه گیری**

نتایج این مطالعه نشان داد عصاره اتانولی آویشن باغی خصوصا در غلظت ۵۰ میلی گرم/میلی لیتر، اثرات ضدمیکروبی مناسبی برعلیه باکتری های *سودوموناس آئروژینوزا*، *اشریشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا مونوسایتوژنز* دارد. اثرات ضد میکروبی عصاره اتانولی آویشن باغی از تمام آنتی بیوتیک های مورد استفاده روی باکتری های *سودوموناس آئروژینوزا*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا مونوسایتوژنز* بیشتر بود. اثرات ضد میکروبی عصاره اتانولی آویشن باغی روی *اشریشیا کلی*، فقط از آنتی بیوتیک سفوتاکسیم کمتر بود. میزان MIC و MBC پایین عصاره اتانولی آویشن باغی می تواند نشان دهنده اثرات ضد میکروبی مشخص گیاه در غلظت های پایین باشد که استفاده از آن را به صرفه و اقتصادی می کند. با توجه به نتایج بدست آمده، پیشنهاد می شود از عصاره اتانولی آویشن باغی به عنوان یک ترکیب ضدمیکروبی خوراکی در مواد غذایی (به صورت فیلم خوراکی یا به عنوان چاشنی)، استفاده شود. هرچند، مطالعات تکمیلی دیگری نیز بایستی در این زمینه صورت پذیرد.

**تشکر و قدردانی**

نویسندگان این تحقیق کمال تشکر و قدردانی را از پرسنل مرکز تحقیقات گیاهان دارویی و معطر دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد و همچنین مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان چهارمحال و بختیاری، دارند.

**منابع**

1. Abebe E., Gugsa G, and Ahmed M. 2020. Review on major food-borne zoonotic bacterial pathogens. J. Trop. Med.
2. Anžlovar S., Baričevič D., Ambrožič Avguštin J, and Dolenc Koce J. 2014. Essential oil of common thyme as a natural antimicrobial food additive. Food. Technol. Biotechnol. 52: 263-268.
3. Borugă O., Jianu C., Mişcă C., Goleţ I., Gruia A, and Horhat F. 2014. Thymus vulgaris essential oil: chemical composition and antimicrobial activity. J. Medicine. Life. 7: 56.
4. Dehkordi F.S., Barati S., Momtaz H., Ahari S.N.H, and Dehkordi S.N. 2013. Comparison of shedding, and antibiotic resistance properties of Listeria monocytogenes isolated from milk, feces, urine, and vaginal secretion of bovine, ovine, caprine, buffalo, and camel species in Iran. Jundishapur. J. Microbiol. 6: 284.
5. Dehkordi F.S., Gandomi H., Basti A.A., Misaghi A., and Rahimi E. 2017. Phenotypic and genotypic characterization of antibiotic resistance of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated from hospital food. Antimicrob. Res. Infect. Control. 6: 104.
6. Dehkordi F.S., Tirgir F, and Valizadeh Y. (2017). Effects of Guajol® ointment synthesized from: medicinal smoke condensate of jennet feces on burn wound

healing on Wistar rat. Vet. Res. Forum. 8: 215-221.
7. Dehkordi F.S., Valizadeh Y., Birgani T, and Dehkordi K. 2014. Prevalence study of Brucella melitensis and Brucella abortus in cow's milk using dot enzyme linked immuno sorbent assay and duplex .polymerase chain reaction. J. Pure. Appl. Microbiol. 8: 1065-1069.
8. Di Pasqua R., De Feo V., Villani F, and Mauriello G. 2005. In vitro antimicrobial activity of essential oils from Mediterranean Apiaceae, Verbenaceae and Lamiaceae against foodborne pathogens and spoilage bacteria. Ann. Microbiol. 55: 139-143.
9. Dwey-Mattia D., Hannah K., Karunya M., Rachel S., Sanjana S., Preethi S., Hilary W, and Samuel C. 2017. Surveillance for foodborne disease outbreaks–United States. Annual report.
10. Fani M, and Kohanteb J. 2017. In vitro antimicrobial activity of Thymus vulgaris essential oil against major oral pathogens. J. Evidence-based Compl. Alt. Med. 22: 660-666.
11. Fayad N., Al-Obaidi O.H.S., Al-Noor T.H, and Ezzat, M.O. 2013. Water and alcohol extraction of Thyme plant (Thymus vulgaris) and activity study against bacteria, tumors and used as anti-oxidant in margarine manufacture. Innov. System. Design. Engin. 4: 41-51.
12. Gedikoğlu A., Sökmen M, and Çivit A. 2019. Evaluation of Thymus vulgaris and Thymbra spicata essential oils and plant extracts for chemical composition, antioxidant, and antimicrobial properties. Food. Sci. Nutr. 7: 1704-1714.
13. Gömöri C., Vidács A., Kerekes E.B., Nacsa-Farkas E., Böszörményi A., Vágvölgyi C., and Krisch J. 2018. Altered antimicrobial and anti-biofilm forming effect of thyme essential oil due to changes in composition. Nat. Prod. Comm. 13: 483-487.
14. Gonçalves N.D., de Lima Pena F., Sartoratto A., Derlamelina C., Duarte M.C.T., Antunes A.E.C, and Prata A.S. 2017. Encapsulated thyme (Thymus vulgaris) essential oil used as a natural preservative in bakery product. Food. Res. Int. 96: 154-160.
15. Hemmatinezhad B., Khamesipour F., Mohammadi M., Safarpoor Dehkordi F., and Mashak Z. 2015. Microbiological Investigation of O-Serogroups, Virulence Factors and Antimicrobial Resistance Properties of Shiga Toxin-Producing E scherichia Coli Isolated from Ostrich, Turkey and Quail Meats. J. Food. Safety. 35: 491-500.
16. Hlashwayo D.F., Barbosa F., Langa S., Sigaúque B, and Bila C.G. 2020. A Systematic Review of In Vitro Activity of Medicinal Plants from Sub-Saharan Africa against Campylobacter spp. Evidence-Based. Compl. Alt. Med: 1-13.
17. Imelouane B., Amhamdi H., Wathelet J.-P., Ankit M., Khedid K, and El Bachiri A. 2009. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of thyme (Thymus vulgaris) from Eastern Morocco. Int. J. Agric. Biol. 11: 205-208.
18. Khodaei M.M., Kazemi M., Khaltabadi F.A.H., Yahyaei M., Rezaei M., De Rensis F, and Taddei S. 2014. Antibacterial effect of medicinal plant essence (Thymus vulgaris) on major bacterial mastitis pathogen in vitro. Int. J. Adv. Biol. Biomed. Res. 2: 286-294.
19. Kowalczyk A., Przychodna M., Sopata S., Bodalska A., and Fecka I. 2020. Thymol and Thyme Essential Oil—New Insights into Selected Therapeutic Applications. Molecules. 25: 4125.
20. Lengyel E, and Panaitescu M. 2019. Chemical Compounds from Thymus Vulgaris and their Antimicrobial Activity. Management. Sustain. Dev. 11: 25-28.
21. Madahi H., Rostami F., Rahimi E., and Dehkordi F.S. 2014. Prevalence of

enterotoxigenic Staphylococcus aureus isolated from chicken nugget in Iran. Jundishapur. J. Microbiol. 7: e10237.
22. Mahboubi M., Heidarytabar R., Mahdizadeh E, and Hosseini H. 2017. Antimicrobial activity and chemical composition of Thymus species and Zataria multiflora essential oils. Agric. Nat. Resource. 51: 395-401.
23. Mashak Z., Banisharif F., Banisharif G., Reza Pourian M., Eskandari S., Seif A., Safarpoor Dehkordi F, and Alavi I. 2021. Prevalence of Listeria Species and Serotyping of Listeria monocytogenes Bacteria Isolated from Seafood Samples. Egyp. J. Vet. Sci. 52: 1-9.
24. Masoumian M, and Zandi M. 2017. Antimicrobial activity of some medicinal plant extracts against multidrug resistant bacteria. Zahedan. J. Res. Med. Sci. 19: 1-8.
25. Mohsenipour Z, and Hassanshahian M. 2015. The inhibitory effect of Thymus vulgaris extracts on the planktonic form and biofilm structures of six human pathogenic bacteria. Avicenna. J. Phytomed. 5: 309.
26. Momtaz H., Farzan R., Rahimi E., Safarpoor Dehkordi F, and Souod N. 2012. Molecular characterization of Shiga toxin-producing Escherichia coli isolated from ruminant and donkey raw milk samples and traditional dairy products in Iran. Scientific. World. J. 2012: 1-13.
27. Nemati Z., Barzegar R., Khosravinezhad M., Talebi E, and Safaei H.R. 2017. Chemical composition and antioxidant activity of Shirazi Thymus vulgaris essential oil. Adv. Herb. Med. 4: 26-32.
28. Nezhadali A., Nabavi M, and Rajabian M. 2012. Chemical composition of the essential oil of Thymus vulgaris L. from Iran. J. Essential. Oil. Bearing. Plants. 15: 368-372.
29. Prasanth Reddy V., Ravi Vital K., Varsha P, and Satyam S. 2014. Review on Thymus vulgaris traditional uses and pharmacological properties. Med. Aromat. Plants. 3: 1-3.
30. Ranjbar R., Dehkordi F.S., Shahreza M.H.S, and Rahimi E. 2018. Prevalence, identification of virulence factors, O-serogroups and antibiotic resistance properties of Shiga-toxin producing Escherichia coli strains isolated from raw milk and traditional dairy products. Antimicrob. Res. Infect. Control. 7: 53.
31. Ranjbar R., Farsani F.Y, and Dehkordi F.S. 2018. Phenotypic analysis of antibiotic resistance and genotypic study of the vacA, cagA, iceA, oipA and babA genotypes of the Helicobacter pylori strains isolated from raw milk. Antimicrob. Res. Infect. Control. 7: 115.
32. Ranjbar R., Masoudimanesh M., Dehkordi F.S., Jonaidi-Jafari N, and Rahimi E. 2017. Shiga (Vero)-toxin producing Escherichia coli isolated from the hospital foods; virulence factors, o-serogroups and antimicrobial resistance properties. Antimicrob. Res. Infect. Control. 6: 4.
33. Ranjbar R., Seyf A., Dehkordi F.S., Chen T., Tang W., Chen Y., Zhang J., Xie X., Etemadi A, and Moniri R. 2019. Prevalence of antibiotic resistance and distribution of virulence factors in the shiga toxigenic Escherichia coli recovered from hospital food. Jundishapur. J. Microbiol. 12: e82659.
34. Ranjbar R., Yadollahi Farsani F, and Safarpoor Dehkordi F. 2019. Antimicrobial resistance and genotyping of vacA, cagA, and iceA alleles of the Helicobacter pylori strains isolated from traditional dairy products. J. Food. Safety. 39: e12594.
35. Raposo A., Pérez E., de Faria C.T., Ferrús M.A, and Carrascosa C. 2017. Food spoilage by Pseudomonas spp.—An overview. Foodborne. Pathog. Antibiotic. Res. 3: 41-58.
36. Rusenova N, and Parvanov P. 2009. Antimicrobial activities of twelve essential oils against microorganisms of veterinary importance. Trakia. J. Sci. 7: 37-43.

# Study the antimicrobial effects of ethanolic extract of *Thymus vulgaris* on foodborne bacteria *in vitro*

**Alimoradi M[1], Ataie Kachoie M[1,2], Moattar F[3,4]**

1.Department of Medicinal Plants, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
2.Medicinal Plants Processing Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
3.Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
4. R & D Goldaru-co, Phramaceutical Labratory, Iran.

*Corresponding author:*Drataie@iaushk.ac.ir*

Received: 13 February 2021 Accepted: 03 May 2021

**Abstract**

*Thymus vulgaris* is a plant of family Lamiaceae that has high antimicrobial properties. The present study was performed to evaluate the antimicrobial effects of the ethanolic extract of *Thymus vulgaris* on food-borne bacteria. Aerial part of *Thymus vulgaris* was used to prepare methanolic extract. The diameter of the growth inhibition zone of bacteria was assessed using disk diffusion. Minimum inhibitory concentration (MIC) and Minimum Bacterial Concentration (MBC) of ethanolic extract of *Thymus vulgaris* were evaluated on the target bacteria using ELISA plate. The diameter of the growth inhibition zone of bacteria against the ethanolic extract of *Thymus vulgaris* ranged from 7.87±0.61 to 16.99±0.37 mm. Application of 50 mg/ml concentration of ethanolic extract of *Thymus vulgaris* caused the highest diameter of the growth inhibition zone of *Pseudomonas aeruginosa* (11.38±0.43 mm), *Escherichia coli* (12.00±0.35 mm), *Staphylococcus aureus* (16.33±0.69 mm) and *Listeria monocytogenes* (16.99±0.37 mm). The antimicrobial effects of ethanolic extract of *Thymus vulgaris* were dose-dependent ($p$ <0.05). The diameter of growth inhibition zone of 50 mg/ml of ethanolic extract of *Thymus vulgaris* on *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* was higher than all antibiotics ($p$ <0.05). The lowest MIC and MBC values were obtained for *Staphylococcus aureus* (4 and 6 mg/ml, respectively) and *Listeria monocytogenes* (4 and 6 mg/ml, respectively). *Thymus vulgaris* ethanolic extract can be used as a combination with antimicrobial properties in food.

**Keywords:** *Thymus vulgaris*, Ethanolic extract, Antimicrobial effects, Foodborne bacteria.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.
Copyright © 2022 Shahrekord Branch, Islamic Azad University