علمی پژوهشی

تاثیر توام اسانس‌های رازیانه و میخک بر *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، *باسیلوس سرئوس*، *سالمونلا تیفی* و *انتروباکتر ائروژنز* با استفاده از روش چکربورد (شاخص غلظت بازدارنده افتراقی)

بهروز علیزاده بهبهانی[1*]، محمد نوشاد[1]، فرشته فلاح[2]

۱- استادیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

۲- دانشجوی دکتری، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۹ /۰۲/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۹/۰٤/۲۸)

چکیده

میخک و رازیانه به صورت گسترده در طب سنتی جهت درمان بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. با توجه به وجود ترکیبات بیولوژیکی فعال موجود در این گیاهان، به نظر می‌رسد این گیاهان دارای اثر ضدباکتریایی قابل ملاحظه‌ای باشند. در این پژوهش آزمایشگاهی، برای بررسی و مقایسه اثر ضدباکتریایی اسانس‌های میخک و رازیانه، از روش کربی-بوئر، رقیق‌سازی در محیط مایع و حداقل غلظت کشندگی استفاده شد. برهمکنش با استفاده از غلظت بازدارنده افتراقی و براساس پروتکل کمیته اروپا برای حساسیت اسانس‌ها انجام شد. به منظور بررسی برهمکنش اسانس‌های میخک و رازیانه تعیین غلظت بازدارنده افتراقی با روش چکربورد استفاده گردید. روش چکربورد با استفاده از میکروپلیت ۹٦ خانه‌ای انجام شد. نتایج نشان داد که باکتری*استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* حساس‌ترین سویه نسبت به اسانس‌های میخک و رازیانه بود.در حالت ترکیبی (برهمکنش) اسانس‌های رازیانه و میخک با آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل برای تمامی باکتری‌ها حالت سینرژیستی مشاهده شد (به جز اثر اسانس رازیانه بر باکتری *باسیلوس سرئوس*). محاسبه غلظت بازدارنده افتراقی حاکی از عدم وجود برهمکنش میان اسانس‌های میخک و رازیانه علیه باکتری‌های *سالمونلا تیفی*، *انتروباکتر ائروژنز* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* بود. بر اساس داده‌های چکر بورد تنها برای یک باکتری (*باسیلوس سرئوس*) حالت هم‌افزایی مشاهده شد.*باسیلوس سرئوس* یکی از مهم‌ترین باکتری‌های عامل مسمومیت غذایی است، به نظر می‌رسد که بتوان از ترکیب اسانس‌های رازیانه و میخک به عنوان نگهدارنده طبیعی در صنایع غذایی بهره گرفت.

کلید واژگان: غلظت بازدارنده افتراقی، برهمکنش، نگهدارنده طبیعی، اسانس روغنی.

*مسئول مکاتبات: B.alizadeh@asnrukh.ac.ir

۱- مقدمه

امروزه به خوبی نقش و اهمیت استفاده از گیاهان جهت تأمین انواع مواد غذایی، افزودنی‌های غذایی، رنگ‌ها، انواع مواد معطر و دارویی کاربرد آن در طب سنتی جهت درمان بیماری‌های مختلف توسط بشر درک شده است. استفاده از منابع نامحدود و متنوع گیاهی توسط انسان در طول قرن‌های متمادی سابقه‌ای بس طولانی داشته و با توجه به شناخت و تجربه‌ای که در این سالیان، بشر از کاربرد گیاهان کسب کرده است به تدریج روش‌های نوینی را برای استفاده از گیاهان و ترکیبات آن‌ها توسعه داده است. در حال حاضر علاقمندی جهت استفاده از درمان طبیعی به وسیله گیاهان دارویی با کم‌ترین اثر جانبی در حال افزایش بوده که دلیل این امر را می‌توان تا حدیبه عدم کفایت طب جدید در درمان کامل برخی از بیماری‌ها و یا ایجاد عوارض جانبی در اثر مصرف داروهای شیمیایی و سنتزی دانست[۱].

بخش مهمی از عملکرد گیاهان همانند فعالیت ضدباکتریایی، ضدقارچی، ضدویروسی و آنتی‌اکسیدانی وابسته به ترکیبات بیولوژیکی و فعال موجود در ماتریکس گیاهان می‌باشد. استخراج صحیح و مناسب از گیاهان باعث مصرف و بهره‌وری هر چه بیشتر از این گیاهان در صنایع مختلفی همانند غذایی، دارویی و بهداشتی می‌گردد[۲].

از جمله گیاهان دارویی که به طور سنتی جهت درمان بیماری‌ها و همچنین عامل طعم کننده در مواد غذایی مصرف می‌شود می‌توان به رازیانه و میخک اشاره نمود. رازیانه یا بادیان سبز گیاهی است که تمام قسمت‌های آن معطر بوده و کاربرد فراوانی در صنایع غذایی دارد.میخک معمولاً به عنوان یک ادویه‌ی معطر در صنایع غذایی کاربرد دارد. از روغن میخک نیز در تولید عطرها، صابون‌ها و ... استفاده می‌شود[۳ و ٤].

عفونت و مسمومیت غذایی در انسان به دلیل مصرف مواد خوراکی حاوی مقادیر قابل قبول میکروارگانیسم‌ها زنده یا سموم تولیدی از آن‌ها ایجاد می‌شود که در این بینباکتری‌ها، نقش به سزایی در این امر دارند.محققین، کارخانه‌های تولید مواد غذایی و موسسه‌های کنترل کیفی و بهداشت همواره نگران رشد و افزایش تعداد موارد شیوع بیماری‌های ایجاد شده توسط میکروارگانیسم-های عامل عفونت و مسمومیت غذایی می‌باشند[۵].از جمله باکتری‌های مهم شاخص غذایی که باعث عفونت و مسمومیت غذایی می‌شود می‌توان به *باسیلوس سرئوس*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، *سالمونلا تیفی* و *انتروباکتر ائروژنز* اشاره کرد. جنس باسیلوس هوازی، گرم مثبت، میله‌ای و اسپورزا است. *باسیلوس سرئوس* یکی از مهم‌ترین گونه‌های این جنس می‌باشد. اسپور باکتری *باسیلوس سرئوس*نسبت به تغییرات محیطی، حرارت و برخی از مواد ضدعفونی کننده مقاوم است. به همین دلیل همواره یکی از نگرانی‌های تولیدکنندگان محصولات غذایی به شمار می‌رود. علاوه بر مسمومیت غذایی، *باسیلوس سرئوس* بیماری‌زای فرصت طلب محسوب شده و می‌تواند منتژیت، اندوکاردیت، ذات الریه، اوستئومیلیت، عفونت‌های چشمی و بیماری‌های روده ای حاد ایجاد نماید. سالمونلا باکتری گرم منفی، میله ای، غیراسپورزا، هوازی و بی هوازی اختیاری، اکسیداز منفی و کاتالاز مثبت است. سروتیپ *سالمونلا تیفی* نسبت به میزبان انسان شدیداً انطباق پیدا کرده و معمولاً بیماری خطرناکی ایجاد نموده که با سندرم عفونت خونی تب روده همراه است.باکتری *استافیلوکوکوس اپیدرمیس* کروی گرم مثبت و به لحاظ شکلی و کشت مشابه *استافیلوکوکوس اورئوس*است. این باکتری می‌توانند به عنوان باکتری بیماری‌زای فرصت طلب محسوب شود و عامل آندوکاردیت، عفونت جراحی، عفونت مجاری ادراری به ویژه در بیماران مبتلا به نقص ایمنی است. انتروباکتر باکتری گرم منفی از خانواده انتروباکتریاسه است که باعث بیماری‌های گوارشی می‌شوند.*انتروباکتر ائروژنز* یکی از مهم‌ترین گونه‌های این جنس به حساب می‌آید[٦-۹].

استفاده از اسانس و عصاره‌های گیاهی جهت جلوگیری از رشد و کنترل میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا همراه با محدودیت‌هایی همانند تاثیر بر خواص ارگانولیپتیکی همراه است[۱۰]. بنابراین استفاده از دوز پایین با کم‌ترین تاثیر (همراه با بازندارگی بالا و جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌های عامل عفونت و مسمومیت غذایی) بر ویژگی‌های حسی مواد غذایی همواره مورد توجه پژوهشگران و تولیدکنندگان صنایع غذایی می‌باشد. امروزه برهمکنش میان ترکیبات ضدمیکروبی می‌تواند کمک شایانی به این امر نماید. هدف از این پژوهش آزمایشگاهی تعیین فعالیت ضدمیکروبی اسانس‌های میخک و رازیانه به تنهایی و توام (با یکدیگر و آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل) بر *باسیلوس سرئوس*،

استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، *انتروباکتر ائروژنز* و *سالمونلا تیفی* بود.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- تهیه اسانس‌های روغنی رازیانه و میخک

برای تهیه اسانس‌های روغنی میخک و رازیانه، گیاه خشک شده به صورت پودر در دستگاه کلونجر و با روش تقطیر با آب به مدت ۳ ساعت اسانس‌گیری شد. پس از تهیه اسانس‌ها، هر یک از اسانس‌های میخک و رازیانه به طور جداگانه در ظروف تیره رنگ تمیز تا زمان انجام آزمون‌های ضدمیکروبی در شرایط سرد نگهداری شدند[۳ و ٤].

۲-۲- فعالیت ضدباکتریایی به روش کربی-بوئر

فعالیت ضدمیکروبی اسانس‌های میخک و رازیانه به روش کیفی کربی-بوئر و براساس استاندارد CLSI[1] بر *باسیلوس سرئوس*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، *انتروباکتر ائروژنز* و *سالمونلا تیفی* بررسی شد. در این آزمون ابتدا از سوسپانسیون استاندارد میکروبی معادل نیم مک فارلند بر سطح محیط کشت مولر هینتون آگار (مرک آلمان) به صورت چمنی کشت داده شد. میزان ۲۰ میکرولیتر از اسانس‌های استریل شده به آرامی و با دقت روی دیسک‌های کاغذی بلانک که روی سطح پتری‌دیش قرار گرفته بودند ریخته شد. پس از عمل پیش انتشار به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد، پتری‌دیش‌های کشت شده حاوی دیسک‌های آغشته به اسانس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲٤ ساعت گرمخانه گذاری شد. لازم به ذکر است از آنتی‌بیوتیک استاندارد کلرامفنیکل نیز به عنوان کنترل استفاده شد.قطر هاله عدم رشد به کمک خط‌کش به طور دقیق و براساس میلی‌متر ثبت گردید[۱۱ و ۱۲].

۲-۳- فعالیت ضدباکتریایی به روش رقیق‌سازی در مایع

برای تعیین فعالیت ضدمیکروبی اسانس‌های روغنی میخک و رازیانه به روش کمی از روش تعیین حداقل غلظت بازدارندگی به روش رقیق‌سازی در چاهک ۹٦ خانه‌ای استفاده شد. در این روش بعد از استریل کردن هر یک از اسانس‌ها، غلظت‌های متوالی از غلظت ۵۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. درون هر چاهک میزان ۱۰۰ میکرولیتر از اسانس و محیط کشت و ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون استاندارد میکروبی هر یک از سویه‌های بیماری‌زا ریخته شد. در نهایت عمل گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲٤ ساعت انجام شد. پس از ۲٤ ساعت ۱۰ میکرولیتر از معرف تری فنیل تترازویلیوم کلرید به هر چاهک اضافه شده و تغییر رنگ قرمز یا ارغوانی به صورت چشمی مورد بررسی قرار گرفت. در صورت عدم رشد میکروبی هیچ تغییر رنگ قرمز یا ارغوانی مشاهده نمی‌شود. کم‌ترین غلظتی که در آن باکتری رشد نکرده و تغییر رنگ مشاهده نشد به عنوان حداقل غلظت بازندازندگی اسانس میخک و رازیانه ثبت گردید [۱۳ و ۱٤].

۲-٤- بررسی برهمکنش اسانس‌های روغنی رازیانه و میخک با آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل

برای بررسی برهمکنش اسانس رازیانه و میخک با آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل مطابق با روش دانشمندی و همکاران (۱۳۸۹)، استفاده شد. در این روش به طور خلاصه از غلظت‌هایی که معادل نصف حداقل غلظت مهارکنندگی بود استفاده شد. بر محیط کشت مولرهینتون آگار حاوی اسانس‌ها به صورت چمنی کشت میکروبی استاندارد انجام گردد. در نهایت دیسک آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل به کمک پنس استریل به آرامی بر سطح محیط کشت قرار گرفت. در نهایت عمل گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲٤ ساعت انجام شد. قطر هاله عدم رشد به کمک خط‌کش به طور دقیق و براساس میلی‌متر ثبت گردید[۱۵].

۲-۵- بررسی برهمکنش اسانس‌های رازیانه و میخک (توام) به روش چکربورد

برای ارزیابی برهمکنش اسانس رازیانه و میخک براساس غلظت بازدارنده افتراقی یا شاخص FIC[2] و روش چکربورد استفاده شد. ارزیابی توام اثر ضدمیکروبی اسانس‌های رازیانه و میخک

1. Clinical and laboratory standards institute

2. Fractional Inhibitory Concentration

مطابق با معادلات ۱ تا ۳ انجام گردید.

معادله (۱) $FIC_A = (MIC_A \text{ combination}/MIC_A \text{ alone})$

معادله (۲) $FIC_B = (MIC_B \text{ combination}/MIC_B \text{ alone})$

معادله (۳) $FIC_{AB} = FIC_A + FIC_B$

در این معادلات MIC_A alone: حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس رازیانه به تنهایی، MIC_A combination: حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس رازیانه به صورت ترکیبی، MIC_B alone: حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس میخک به تنهایی، MIC_B combination: حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس میخک به صورت ترکیبی، FIC_A: غلظت بازدارنده افتراقی اسانس رازیانه و FIC_B: غلظت بازدارنده افتراقی اسانس میخک می‌باشد.براساس پروتکل EUCAST 2006، چنانچه ($FIC < 0.5$) حالت هم افزایی، ($0.5 \leq FIC \leq 1$) حالت افزایشی، ($1 < FIC \leq 4$) حالت عدم تاثیر و در نهایت ($FIC > 4$) حالت کاهش اثر می باشد[۱۶ و ۱۷].

۲-۶- تعیین حداقل غلظت کشندگی اسانس‌های روغنی رازیانه و میخک

حداقل غلظت کشندگی اسانس‌های رازیانه و میخک با استفاده از روش پورپلیت انجام شد. در این روش به طور خلاصه از خانه‌های که تغییر رنگ قرمز یا ارغوانی در روش تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی نداشتند بر محیط کشت مولر هینتون آگار کشت پورپلیت انجام گرفت. بعد از گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲٤ ساعت پتری دیش‌های کشت شده از نظر رشد کلنی مورد بررسی قرار گرفت. اولین پتری دیشی که در آن هیچ کلنی مشاهده نشد به عنوان حداقل غلظت کشندگی گزارش گردید[۱۸].

۲-۷- آنالیز آماری

تمامی آزمون‌ها در ۳ مرتبه تکرار گردید. داده‌های حاصل با استفاده از SPSS (Version18.0, SPSS Inc., Chicago, USA) مورد آنالیز قرار گرفت. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد استفاده شد.

۳- نتایج و بحث

نتایج حاصل از اثر اسانس‌های میخک و رازیانه بر سویه‌های بیماری‌زای مورد بررسی در این پژوهش در جدول ۱، آورده شده است. نتایج نشان داد که باکتری *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* حساس‌ترین سویه نسبت به اسانس‌های میخک و رازیانه بود. مقاوم‌ترین سویه میکروبی در برابر اسانس‌های میخک و رازیانه به ترتیب *سالمونلا تیفی* و *انتروباکتر ائروژنز* بود. به طور کلی سویه‌های گرم مثبت *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و *باسیلوس سرئوس* نسبت به سویه‌های گرم منفی *سالمونلا تیفی* و *انتروباکتر ائروژنز* حساس‌تر بودند. پژوهش‌های زیادی نیز دلیل این امر به تفاوت‌های ساختاری که در دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی وجود دارد نسبت دادند. دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی نسبت به باکتری‌های گرم مثبت پیچیده‌تر است [۱۹ و ۲۰]. نتایج حاصل از اثر آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل برای سویه‌های بیماری‌زا در جدول ۱، آورده شده است. نتایج نشان داد که آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل بر تمامی سویه‌های بیماری‌زا موثر بوده و توانست از رشد باکتری‌ها بر سطح محیط کشت جلوگیری نماید. نتایج برهمکنش میان اسانس‌های میخک و رازیانه با آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل در جدول ۱، آورده شده است. نتایج نشان داد که در حالت ترکیبی اسانس رازیانه با آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل حالت سینرژیستی برای سویه‌های *سالمونلا تیفی*، *انتروباکتر ائروژنز* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* مشاهده شد. اما برای سویه *باسیلوس سرئوس* قطر هاله عدم رشد کاهش یافت. هر چند میزان کاهش قطر هاله عدم رشد از نظر آماری در سطح ۵ درصد معنی‌دار نبود. نتایج برهمکنش اسانس میخک با آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل نشان داد که برای تمامی سویه‌های میکروبی حالت سینرژیستی مشاهده شد. نتایج آزمون آماری نشان داد که به طور کلی اثر ضدباکتریایی اسانس میخک نسبت به اسانس رازیانه به طور معنی‌درای در سطح ۵ درصد بیشتر است. نتایج برهمکنش اسانس میخک با آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل نشان داد که بیشترین حالت افزایشی برای باکتری گرم مثبت *باسیلوس سرئوس* مشاهده شد. نتایج برهمکنش اسانس رازیانه با آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل نشان داد که بیشترین حالت افزایشی برای باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* مشاهده شد.

علیزاده بهبهانی و همکاران (۱۳۹۸)، اثر ضدباکتریایی اسانس رازیانه را بر *اشرشیا کلی*،*استافیلوکوکوس اورئوس* و *کاندیدا آلبیکنس* به روش‌های دیسک دیفیوژن و چاهک آگار بررسی کردند. این پژوهشگران همچنین برهمکنش اسانس رازیانه را با آنتی‌بیوتیک کانامایسین مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که حساس‌ترین باکتری با بیشترین قطر هاله عدم رشد نسبت به سایر ریزاندامگان بیماری‌زا، *استافیلوکوکوس اورئوس* بود. همچنین برهمکنش اسانس رازیانه با آنتی‌بیوتیک کانامایسین برای باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیا کلی* به صورت اثر سینرژیستی مشاهده شد[۳]. در مطالعه ما نیز *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* حساس‌ترین سویه میکروبی بود. سورشجانی و همکاران (۱۳۹۷)، گزارش کردند که اسانس رازیانه بر باکتری‌های *اشرشیا کلی* و *کلستریدیوماسپوروژنز* اثر گذار بوده و از رشد آن‌ها در شرایط آزمایشگاهی جلوگیری کرد[۲۱]. علیزاده بهبهانی و همکاران (۲۰۱۹)، اثر ضدمیکروبی اسانس میخک را بر باکتری‌های عامل عفونت و مسمومیت غذایی در شرایط برون‌تنی مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که قطر هاله عدم رشد برای باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در روش‌های دیسک دیفیوژن و چاهک آگار به ترتیب ۲۹/۱۵ و ۳۵/۱۵ میلی‌متر بود[٤].در پژوهش حاضر نیز قطر هاله عدم رشد میکروبی برای باکتری *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* ۲۷/۱۰ میلی‌متر بود. نتایج این پژوهشگران با یافته‌های مطالعه حاضر همخوانی داشت.

Table 1 The mean inhibition zone diameters (mm) of Cloveand Fennel essential oils and the effects of its interaction with chloramphenicol antibiotic on some pathogenic microorganisms

Antimicrobial substance / Microorganism	CEO	FEO	Chl	In (Chl + CEO)	In (Chl+ FEO)
Enterobacter aerogenes	17.60 ±0.41^{a}	10.90 ±0.32^{c}	13.30 ±0.80^{b}	18.00 ±0.38^{a} (Syn)	14.30 ±0.47^{b} (Syn)
Salmonella typhi	13.80 ±0.48^{b}	11.50 ±0.68^{c}	12.10 ±0.33^{c}	16.80 ±0.30^{a} (Syn)	13.20 ±0.62^{b} (Syn)
Bacillus cereus	22.40 ±0.50^{b}	18.00 ±0.40^{c}	17.70 ±0.60^{c}	29.40 ±0.37^{a} (Syn)	17.30 ±0.57^{c} (Ant)
Staphylococcus epidermidis	27.10 ±0.65^{b}	20.50 ±0.53^{d}	19.90 ±0.71^{d}	31.10 ±0.64^{a} (Syn)	23.40 ±0.58^{c} (Syn)

-Values are expressed as mean ±standard deviations, $n = 3$; different letters (a, b, c and d) in each row show significant difference at $p \leq 0.05$.

-Cloveessential oil: CEO, Fennel essential oil: FEO, Chl: Chloramphenicol, In: Interaction, Syn: Synergy, Ant: Antagonism.

نتایج برهمکنش اسانس‌های رازیانه و میخک به روش چکربورد در جدول ۲، آورده شده است. نتایج نشان داد که در حالت ترکیبی اسانس‌های میخک و رازیانه تنها برای باکتری گرم مثبت *باسیلوس سرئوس* حالت هم‌افزایی مشاهده شد و برای سایر باکتری‌ها حالت عدم تاثیر مشاهده گردید. تاکنون پژوهش‌های بسیار کمی در زمینه برهمکنش اسانس‌های گیاهی با هم انجام شده است. حیدری سورشجانی و همکاران (۱۳۹۷)، برهمکنش اسانس‌های رازیانه و زنیان به روش چکربورد را برای باکتری‌های *اشرشیا کلی* و *کلستریدیوماسپوروژنز* انجام دادند. این پژوهشگران گزارش دادند که در حالت ترکیبی اسانس‌های رازیانه و زنیان برای هر دو سویه میکروبی حالت عدم تاثیر مشاهده شد. این محققین دلیل این امر را داشتن ماهیت یکسان جایگاه اثر گزارش کردند. هنگامی که از ۲ یا چند ماده ضدمیکروب (عصاره یا اسانس‌های گیاهی) به طور همزمان برای جلوگیری از رشد سلول‌های باکتریایی می‌توانند پاسخ‌های متفاوتی را بروز دهند[۲۱]. مطابق با مطالعه علیزاده بهبهانی و همکاران (۲۰۱۷)، هنگامی که دو ترکیب ضدمیکروبی درای جایگاه تاثیر مشابه‌ای در ساختار سلول باکتری باشند، اتصال یک ترکیب به جایگاه، مانع از اتصال ترکیب دیگر می‌شود که در این حالت، اثر آنتاگونیسمی ایجاد می‌شود. حال اگر اتصال یک ترکیب به جایگاه خود در ساختار باکتری سبب تسهیل اتصال ترکیب دیگر گردد در این حالت اثر سینرژیستی و هم‌افزایی مشاهده می‌شود[۱٦]. منصوری و همکاران (۱۳۹۸)، اثر ضدمیکروبی ۱۹ عصاره گیاهی را بر سویه‌های استاندارد و بالینی سودوموناس ائروژینوزا و همچنین برهمکنش آن‌ها با آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم در شرایط برون‌تنی مورد بررسی قرار دادند. از جمله

گیاهان دارویی که توسط این محققین مورد بررسی قرار گرفت رازیانه و میخک بود. این پژوهشگران موثرترین گیاهی که درای بیشترین فعالیت ضدمیکروبی بود را انتخاب کردند. نتیجه این پژوهشگران نشان داد که گیاه مازو دارای اثر سینرژیستی با آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم است[۲۲]. طبق بررسی‌های انجام شده تاکنون مطالعات بسیار اندکی در زمینه برهمکنش عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی انجام شده است و بیشتر پژوهش‌های انجام شده در زمینه برهمکنش عصاره یا اسانی با آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی است.

نتایج حداقل غلظت کشندگی اسانس‌های رازیانه و میخک بر سویه‌های بیماری‌زای مورد بررسی در پژوهش حاضر در جدول ۳، آورده شده است.

Table 2 The results of the interaction of antimicrobial activity of Cloveand Fennel essential oils

Microorganism	Interaction	FIC_A	FIC_B	FIC_{AB}
Enterobacter aerogenes	Ind	4	2	2
Salmonella typhi	Ind	3	1	2
Bacillus cereus	Add	1	0.5	0.5
Staphylococcus epidermidis	Ind	2	1	1

FIC_{AB} = (MIC_A combination / MIC_A alone) + (MIC_B combination / MIC_B alone), Syn-synergy, Add-addition, Ind-indifference, Ant-antagonism

Table 3 The minimum bactericidal concentration (mg/mL) on some pathogenic microorganisms

Microorganism	MBC (Clove essential oil)	MBC (Fennel essential oil)
Enterobacter aerogenes	64	128
Salmonella typhi	64	128
Bacillus cereus	32	16
Staphylococcus epidermidis	16	16

نتایج نشان داد که حداقل غلظت کشندگی اسانس رازیانه برای سویه‌های *باسیلوس سرئوس*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، *انتروباکتر ائروژنز* و *سالمونلا تیفی* به ترتیب ۱٦، ۱٦، ۱۲۸ و ۱۲۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. حداقل غلظت کشندگی اسانس میخک برای باکتری‌های *باسیلوس سرئوس*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، *انتروباکتر ائروژنز* و *سالمونلا تیفی* به ترتیب ۳۲، ۱٦، ٦٤ و ٦٤ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. به طور کلی حداقل غلظت کشندگی برای اسانس‌های میخک و رازیانه در مطالعه حاضر بزرگتر از حداقل غلظت مهارکنندگی بود.

٤- نتیجه‌گیری

براساس نتایج پژوهش حاضر می‌توان ذکر کرد که هر دو اسانس میخک و رازیانه به خوبی در شرایط آزمایشگاهی توانستند از رشد سویه‌های بیماری‌زا جلوگیری کنند. فعالیت ضدمیکروبی اسانس میخک به مراتب بیشتر از اسانس رازیانه بود. نتایج برهمکنش اسانس‌های رازیانه و میخک به روش چکربورد نشان داد که تنها برای باکتری گرم مثبت *باسیلوس سرئوس* حالت هم-افزایی مشاهده گردید و در سایر باکتری‌ها حالت عدم تاثیر مشاهده شد. از آنجایی که باکتری *باسیلوس سرئوس* یکی از مهم‌ترین باکتری‌های عامل مسمومیت غذایی است، به نظر می-توان از ترکیب اسانس‌های رازیانه و میخک به عنوان نگهدارنده طبیعی در صنایع غذایی بهره گرفت. پیشنهاد می‌شود پژوهش‌های

گسترده‌ای چه در شرایط آزمایشگاهی و چه در ماده غذایی انجام گیرد.

۵- تشکروقدردانی

مقاله حاضر مستخرج از طرح پژوهشی شماره ۹۷۱/٤۰ می‌باشد که توسط معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان حمایت گردیده است.

٦- منابع

[1] Vinatoru M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. Ultrasonics sonochemistry. 2001;8(3):303-13.

[2] Oliveira DA, Salvador AA, Smânia Jr A, Smânia EF, Maraschin M, Ferreira SR. Antimicrobial activity and composition profile of grape (Vitis vinifera) pomace extracts obtained by supercritical fluids. Journal of Biotechnology. 2013;164(3):423-32.

[3] Alizadeh behbahani B, Noshad M, Falah F. Investigation of antimicrobial activity of Fennel essential oil on some pathogenic microorganisms causing infection and food poisoning and its interaction with kanamycin antibiotic. Food Science and Technology. 2019; 16 (91) :233-41. [Full text in Persian].

[4] Alizadeh Behbahani B, Noshad M, Falah F. Study of chemical structure, antimicrobial, cytotoxic and mechanism of action of Syzygiumaromaticum essential oil on foodborne pathogens. Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences. 2019;13(1):875-83.

[5] Varnam, A. H., and Evans, M. G. Food poisoning: medical and microbiological overview; Bacillus. 1991. In *Foodborne Pathogens, an Illustrated Text*. Mosby year book, London, UK.

[6] Jay, J. M., M.Loessner, M., and A.Golden, D. 2000. *Modern Food Microbiology*. 6nd ed. Aspen. Maryland.

[7] Granum PE, Lindbäck T. Bacillus cereus. Food microbiology: American Society of Microbiology; 2013. 491-502.

[8] Roumagnac P, Weill F-X, Dolecek C, Baker S, Brisse S, Chinh NT, et al. Evolutionary history of Salmonella typhi. Science. 2006;314(5803):1301-4.

[9] Vuong C, Otto M. Staphylococcus epidermidis infections. Microbes and infection. 2002;4(4):481-9.

[10] Barzegar H, Behbahani BA, Mehrnia MA. Quality retention and shelf life extension of fresh beef using Lepidium sativum seed mucilage-based edible coating containing Heracleum lasiopetalum essential oil: an experimental and modeling study. Food Science and Biotechnology. 2020; 29:717-28.

[11] Alizadeh Behbahani B, Falah F, Lavi Arab F, Vasiee M, TabatabaeeYazdi F. Chemical composition and antioxidant, antimicrobial, and antiproliferative activities of *Cinnamomumzeylanicum* bark essential oil. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2020; 2020: 5190603.

[12] Kiarsi Z, Hojjati M, Behbahani BA, Noshad M. In vitro antimicrobial effects of Myristicafragrans essential oil on foodborne pathogens and its influence on beef quality during refrigerated storage. Journal of Food Safety. 2020:e12782.

[13] Yeganegi M, Yazdi FT, Mortazavi SA, Asili J, Behbahani BA, Beigbabaei A. Equisetum telmateia extracts: Chemical compositions, antioxidant activity and antimicrobial effect on the growth of some pathogenic strain causing poisoning and infection. Microbial pathogenesis. 2018;116:62-7.

[14] Alghooneh A, Behbahani BA, Noorbakhsh H, Yazdi FT. Application of intelligent modeling to predict the population dynamics of Pseudomonas aeruginosa in Frankfurter sausage containing Saturejabachtiarica extracts. Microbial pathogenesis. 2015;85:58-65.

[15] Daneshmandi, S., Soleimani, N., Pourfathollah, A. A., &Sattari, M. 2010. Evaluation of the drug synergistic and antibacterial effects of cuminumcyminum essential oil. Journal of Arak University of Medical Sciences. 13(2): 75-82.[Full text in Persian].

[16] Alizadeh Behbahani BA, Shahidi F, Yazdi FT, Mortazavi SA, Mohebbi M. Antioxidant activity and antimicrobial effect of tarragon (Artemisia dracunculus) extract and chemical composition of its essential oil. Journal of Food Measurement and Characterization.

2017;11(2):847-63.
[17] EUCAST, Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria toantimicrobial agents. Clinic. Microbiol. Infect. (2006). doi:10.1046/j.1469-0691.2000.00149.
[18] Sureshjani MH, Yazdi FT, Mortazavi SA, Behbahani BA, Shahidi F. Antimicrobial effects of Kelussiaodoratissima extracts against food borne and food spoilage bacteria" in vitro. Journal of Paramedical Sciences. 2014;5(2):115-20.
[19] Tabatabaei Yazdi F, Behbahani BA, Mortazavi A. Investigating the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of the Lavandula stoechas L. and Rosmarinus officinalis L. extracts on pathogen bacterias “in vitro”. Journal of Paramedical Sciences (JPS). 2014;5(2):91-101.
[20] Barzegar H, Mehrnia MA, Alizadeh Behbahani B. Determination of the chemical composition, antioxidant activity and the antimicrobial effect of *Heracleum Lasiopetalum* on infection and food poisoning microorganisms. Journalof Applied Microbiologyin Food Industry. 2018; 4(4): 15-28. [Full text in Persian].
[21] HeidariSoureshjani, M., Khomeiri, M., Maghsoudlou, Y., Yousefi, H., Rafieian, M., Kashiri, M. The combined effect of Carumcopticum (Ajwain) and Foeniculum vulgare (Fennel) essential oils on Escherichia coli and Clostridium sporogenes using checkerboard assay. Journal of Applied Microbiology in Food Industry.2018; 4(2): 44-56. [Full text in Persian].
[22] Mansouri S, Salary A, Hosseini Nave H. Determining Antibacterial Activity of 19 Medicinal Plant Extracts on Standard and Clinical Strains of Pseudomonas aeruginosa and Synergistic Activity of the Most Active Extract with Ceftazidime. Research in Medicine. 2019; 43 (2) :90-6. [Full text in Persian].

The combined effect of the combined Fennel and Clove essential oils on *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhi* and *Enterobacter aerogenes*using Checkerboard assay (fractional inhibitory concentration index)

Alizadeh Behbahani, B. [1*], Noshad, M. [1], Falah, F. [2]

1 Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran
2 PhD student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

(Received: 2020/05/16 Accepted: 2020/07/18)

Clove and Fennel have been widely used in traditional medicine for treatment of diseases. Regarding the existence of the active biological compounds in these plants, it seems that these plants have considerable antibacterial effects.In this experimental study, the Kirby–Bauer,the dilution method in the liquid medium and minimum bactericidal concentration (MBC) were used to evaluate and compare the antibacterial effects of the Clove and Fennel essential oils. The interactions were determined by calculating fractional inhibitory concentration (FIC), according to the European Committee for antimicrobial susceptibility testing protocol. The checkerboard method was performed using 96-well microtiter plates. The results showed that *Staphylococcus epidermidis* was the most sensitive strain to Clove and Fennel essential oils.The effects of interaction of Clove and Fennel essential oils with chloramphenicol antibiotic on all bacteria showed synergistic status (except for the fennel essential oil on *Bacillus cereus*).Calculation of fractional inhibitory concentration indicated that there was no interaction between the Clove and Fennel essential oils on *Salmonella typhi*, *Enterobacter aerogenes* and *Staphylococcus epidermidis*. Regarding the checkerboard data, one FICIs (>0.5 to 1) indicated the additive effect (*Bacillus cereus*). *Bacillus cereus* is one of the most important bacteria that causing food poisoning, it is possible to use a combination of Fennel and Clove essential oils as a natural preservative in the food industry.

Keywords: Fractional inhibitory concentration, Interaction, Natural preservative, Essential oil.

* Corresponding Author E-Mail Address: B.alizadeh@asnrukh.ac.ir