



ارزیابی ویژگی‌های شیمیایی و اثر ضد میکروبی اسانس آویشن تالشی بر تعدادی از باکتری‌های عامل عفونت و مسمومیت غذایی: یک مطالعه آزمایشگاهی

محمد نوشاد^{۱*}، بهروز علیزاده بهبهانی^۱

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

چکیده

اطلاعات مقاله

تاریخ‌های مقاله:

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۵/۲۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۷/۲۷

کلمات کلیدی:

اسانس آویشن تالشی،

باکتری‌های بیماری‌زا،

فعالیت ضد میکروبی،

اثر آنتی‌اکسیدانی،

ترکیبات فنولی.

DOI: 10.22034/FSCT.20.145. 99

* مسئول مکاتبات:

Noshad@asnrukh.ac.ir

ارزیابی ویژگی‌های شیمیایی و اثر ضد میکروبی اسانس آویشن تالشی بر تعدادی از باکتری‌های عامل عفونت و مسمومیت غذایی در این مطالعه صورت گرفت. برای این منظور، اسانس آویشن تالشی با کمک روش تقطیر با آب استخراج گردید و مقدار فنول کل آن بر پایه روش فولین سیوکالتو، فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن بر اساس روش‌های مهار رادیکال آزاد DPPH و ABTS و اثر ضد باکتریایی آن در برابر باکتری‌های *اشرشیا کلی*، *شیگلا دیسانتری*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس* بر پایه روش‌های دیسک دیفیوژن آگار، چاهک آگار، حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی بررسی گردید. نتایج نشان داد که اسانس آویشن تالشی حاوی ۶/۲۷ میلی گرم کاتچین در گرم فنول کل بود و فعالیت مهارکنندگی آن در برابر رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS به ترتیب برابر با ۱۲/۳۲ و ۱۰/۲۰ میلی گرم در میلی لیتر به دست آمد. نتایج فعالیت ضد باکتریایی اسانس نشان داد که باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیا کلی* به ترتیب حساس‌ترین و مقاوم‌ترین سویه‌های باکتریایی در برابر اسانس آویشن تالشی بودند. میانگین قطر هاله عدم رشد در روش‌های دیسک دیفیوژن آگار و چاهک آگار و حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی برای *استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب برابر با ۱۴/۶۰ میلی متر، ۱۶ میلی متر، ۱ میلی گرم در میلی لیتر و ۴ میلی گرم در میلی لیتر مشاهده گردید. مطابق یافته‌های این پژوهش، اسانس آویشن تالشی می‌تواند بعنوان ماده آنتی‌اکسیدان و ضد میکروب طبیعی جهت جلوگیری از واکنش‌های اکسایشی و فساد میکروبی در مواد غذایی مورد استفاده قرار گیرد.

۱- مقدمه

در سال‌های اخیر، بیماری‌ها و کاهش بهره‌وری ناشی از باکتری‌های بیماری‌زای مواد غذایی توجه قابل توجهی را به خود جلب کرده است. هزاران باکتری بیماری‌زای موجود در غذا بر سلامت و ایمنی جمعیت انسان‌ها، حیوانات و گیاهان در جهان تأثیر می‌گذارند. در میان این باکتری‌ها، کمپیلوباکتر، سالمونلا، لیستریا مونوسیتوزنز، اشرشیا کلی O157:H7، استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس، باکتری‌های پاتوژن اصلی غذا هستند که مسئول اکثر شیوع بیماری‌های ناشی از غذا می‌باشند [۱-۳]. حدود ۲۵۰ نوع بیماری منتقله از غذا که بیشتر آنها از طریق غذای آلوده منتقل می‌شوند، شناسایی شده‌اند. تخمین زده شده است که بیماری‌های غذایی سالانه ۷۶ میلیون نفر را در ایالات متحده تحت تأثیر قرار می‌دهند و مسئول ۵۰۰۰ مرگ در هر سال هستند [۴].

علاوه بر این، اکسیداسیون یکی از مهم‌ترین عوامل تخریب مواد غذایی است. این یک واکنش چند جانبه است که باعث تغییرات نامطلوب در ارزش غذایی، معیارهای ارگانولپتیک، کیفیت غذایی و ایجاد مولکول‌های بالقوه سمی می‌شود. مواد غذایی که تحت اکسیداسیون گسترده قرار گرفته‌اند دارای عیوب عمده بوده و مورد پذیرش مصرف کننده نمی‌باشند. اکسیداسیون در طول فراوری و/یا ذخیره‌سازی مواد غذایی ممکن است از طریق تغییر رنگ و ظهور بد طعمی آشکار شود [۵-۷].

افزودنی‌های مصنوعی و عوامل ضد میکروبی/آنتی‌اکسیدان در فراوری مواد غذایی برای کاهش رشد میکروارگانیسم‌ها و فرایند اکسیداسیون با هدف جلوگیری از آلودگی و طولانی‌تر کردن ماندگاری مواد غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند [۸، ۹]. با اینحال، افزودنی‌های شیمیایی مصنوعی اثرات سمی مشخصی دارند و نشان داده شده است که استفاده از نگهدارنده‌ها باعث ایجاد مشکلات تنفسی یا سایر

مشکلات سلامتی می‌شود. بطور مثال، بنزوات سدیم ممکن است باعث سمیت تجمعی و القای آسم شود و نیترات و نیتريت ممکن است مواد بلعیده شده را به سموم تبدیل کند [۱۰]. به طور جدی‌تر، مقاومت به پنی‌سیلین از زمان شروع استفاده از دارو شروع به ظهور کرد [۱۱]. در حال حاضر، ظهور مجدد سویه‌های مقاوم به چند دارو از پاتوژن‌های موجود در غذا، فراهم کردن یک منبع غذایی ایمن را دشوارتر می‌کند و میکروارگانیسم‌ها در برابر نگهدارنده‌های معمولی مقاوم‌تر هستند [۱۲]. در این راستا، توجه روزافزون مصرف‌کنندگان به غذاهای فرآوری شده و غذاهای طبیعی حاوی آنتی‌بیوتیک، تقاضای فزاینده‌ای برای استفاده از مهارکننده‌های طبیعی به‌عنوان جایگزینی برای عوامل ضد میکروبی مصنوعی وجود دارد [۳، ۹، ۱۳-۱۷].

اسانس‌ها مایعات فراری هستند که از قسمت‌های مختلف گیاهان معطر مانند پوست، دانه، گل، میوه، ریشه، برگ، چوب و گیاهان کامل استخراج می‌شوند و بسته به اینکه از کدام گیاه به دست می‌آیند نام‌گذاری می‌شوند. طبق تعریف سازمان بین‌المللی استاندارد، اسانس "محصولی است که از مواد خام طبیعی با منشأ گیاهی، با تقطیر با بخار آب، فرآورده‌های مکانیکی از اپی کارپ مرکبات، یا تقطیر خشک، پس از جداسازی آب در صورت وجود توسط فرآورده‌های فیزیکی به دست می‌آید" [۱۸].

در میان خانواده‌های مختلف گیاهی که به‌خاطر ارزش‌های دارویی خود شناخته شده‌اند، خانواده نعنائیان بسیار مهم است. جنس آویشن (*Thymus*) شامل حدود ۳۵۰ گونه است که در قاره اوراسیا، قسمت شمالی آفریقا و جنوب گرینلند پراکنده شده‌اند، اگرچه توسط انسان در سراسر جهان پخش شده است. در ایران ۱۴ گونه وجود دارد که از میان آنها ۴ گونه آویشن تالشی (*T. trautvetteri*)، آویشن کرمانی (*T. carmanicus*)، آویشن دنایی (*T. daenesis*) و آویشن ایرانی (*T. persicus*) انحصاری می‌باشند. اسانس آویشن به دلیل محتوای فنول بالا، خاصیت میکروب‌کشی و

محتوای فنول کل اسانس با استفاده از روش فولین-سیوکالتو تعیین گردید. به طور خلاصه، ۳۰۰ میکرولیتر از محلول اتانولی اسانس (۰/۱ میلی گرم در میلی لیتر) به لوله آزمایش اضافه شد و سپس ۲/۵ میلی لیتر معرف ۰/۲ نرمال فولین-سیوکالتو و ۲ میلی لیتر کربنات سدیم (۷/۵ درصد وزنی/حجمی) اضافه گردید. پس از همزدن، گرمخانه گذاری لوله آزمایش در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. میزان جذب در طول موج ۷۶۰ نانومتر اندازه گیری و نتایج به صورت معادل میلی گرم کاتچین در هر گرم اسانس بیان گردید [۲۲].

۲-۳- فعالیت آنتی اکسیدانی

۲-۳-۱- مهار رادیکال DPPH

قابلیت مهار رادیکال DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) اسانس مطابق با روش فلاح و همکاران (۲۰۲۱) بررسی گردید. برای این منظور، ۵۰ میکرولیتر از محلول اتانولی اسانس با غلظت مختلف (۰/۱ - ۵ میلی گرم در میلی لیتر) با ۱ میلی لیتر از محلول اتانولی DPPH (۰/۰۰۴ درصد) مخلوط گردید. محلول حاصل به مدت ۱ ساعت در تاریکی نگهداری شد و سپس جذب آن در طول موج ۵۱۷ نانومتر ثبت گردید. مقدار IC_{50} که به عنوان مقدار نمونه مورد نیاز برای کاهش جذب DPPH به میزان ۵۰ درصد بیان می شود، با ترسیم درصد مهار در برابر غلظت نمونه محاسبه شد. درصد مهار رادیکال DPPH با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد:

$$\%inhibition = [(AC-AS)/AC] * 100$$

که در آن AC جذب نمونه کنترل و AS جذب نمونه می باشند [۲۳].

۲-۳-۲- مهار رادیکال ABTS

آنالیز ABTS (2,20-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) بر اساس روش فلاح و همکاران (۲۰۲۱) با تغییرات جزئی انجام شد. رادیکال ABTS با مخلوط کردن محلول های ABTS و

ضد عفونی کنندگی دارد [۱۹]. در این راستا، اطلاعات بسیار محدودی در مورد ترکیب شیمیایی و فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی اسانس آویشن تالشی در منابع علمی وجود دارد. گزارش شده است که آویشن تالشی، گیاهی بوته ای یا بالشتکی کوچک با ساقه های منشعب و قاعده چوبی، کم و بیش خمیده، در تمام سطح کرکدار، برگ ها به طول ۵ تا ۸ و عرض ۲/۵ تا ۵ میلی متر، دم برگدار، رگبرگ ها دو به ندرت سه جفت، کاسه گل به طول ۳ تا ۵/۵ میلی متر و استکانی و باریک، جام گل به طول ۵ تا ۶ میلی متر، بنفش رنگ، زمان گلدهی اواسط بهار تا اواسط تابستان است. از ۴۹ ترکیب شناسایی شده تیمول، بورنئول، پاراسیمن، گاماترپینن، آلفاپینن و کارواکرول از عمده ترین ترکیب های موجود در اسانس گونه آویشن تالشی به شمار می روند [۲۰]. هدف از این مطالعه، استخراج اسانس آویشن تالشی و بررسی محتوای فنول، اثر آنتی اکسیدانی و فعالیت ضد میکروبی آن در برابر تعدادی از باکتری های عامل عفونت و مسمومیت غذایی از قبیل /شرشیا کلی، شیگلا دیسانتری، استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس بود.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- استخراج اسانس

استخراج اسانس آویشن تالشی مطابق روش شهنازی و همکاران (۱۳۸۶) انجام شد. برای این منظور، اندام های هوایی گیاه خشک گردید و توسط آسیاب برقی به پودر تبدیل شدند. در ادامه، ۱۰۰ گرم از پودر گیاه خشک شده در دستگاه کلونجر قرار داده شد و اسانس گیری به مدت ۴ ساعت انجام گردید. اسانس حاصله توسط سدیم سولفات بدون آب، آبگیری شد و سپس در ظرف در بسته تیره رنگ و بدون حضور نور در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد [۲۱].

۲-۲- محتوای فنول کل

هاله عدم رشد اطراف چاهک‌ها تعیین و بعنوان اثر ضد میکروبی اسانس بیان گردید [۲۵].

۲-۴-۳- حداقل غلظت مهارکنندگی رشد

حداقل غلظت مهارکنندگی بر اساس روش میکرودايلوشن براث (پلیت ۹۶ خانه‌ای و معرف تری‌فنیل‌تترازولیوم کلرید) تعیین شد. برای این منظور، غلظت نهایی اسانس آویشن تالشی در پلیت ۹۶ خانه‌ای از ۰/۵ تا ۲۵۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر متغیر بود. پلیت ۹۶ خانه‌ای حاوی ۲۰۰ میکرولیتر اسانس و ۲۰ میکرولیتر باکتری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شد. پس از افزودن ۲۰ میکرولیتر کلرید تری‌فنیل‌تترازولیوم کلرید ۵ درصد به چاهک‌ها، پلیت مجدداً به مدت ۳۰ دقیقه گرمخانه گذاری گردید. رشد میکروبی باعث ایجاد رنگ قرمز تیره در چاهک‌ها می‌شود. اولین غلظت اسانس که قادر به سرکوب رشد میکروبی و جلوگیری از تشکیل رنگ قرمز بود، بعنوان حداقل غلظت مهارکنندگی رشد در نظر گرفته شد [۲۶-۲۸].

۲-۴-۴- حداقل غلظت کشندگی

به منظور تعیین حداقل غلظت کشندگی، محتویات (۱۰۰ میکرولیتر) تمام چاهک‌های بدون کدورت به طور جداگانه بر روی محیط کشت مولر هیتون آگار کشت داده شدند. سپس محیط‌های حاوی باکتری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند. حداقل غلظت اسانس که سبب جلوگیری از تشکیل کلنی میکروبی گردید، به عنوان حداقل غلظت کشندگی گزارش شد [۲۶].

۲-۵- آنالیز آماری

تمام آزمون‌ها سه مرتبه تکرار شدند. از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۱۸)، آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون چند دامنه‌ای دانکن برای مقایسه بین گروهی استفاده شد ($p < 0.05$).

پرسولفات پتاسیم و نگهداری در دمای اتاق در تاریکی تهیه شد. محلول استوک رادیکال ABTS در بافر ۵۰ میلی‌مولار فسفات پتاسیم (pH 8.0) رقیق شد تا زمانی که جذب آن به ۰/۹ در ۷۳۴ نانومتر برسد و pH مخلوط نهایی روی ۷/۴ تنظیم شد. سپس، ۱۰۰ میکرولیتر محلول اتانولی اسانس با غلظت‌های متفاوت (۰/۱ - ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) با ۱ میلی‌لیتر ABTS مخلوط شد و جذب در ۷۳۴ نانومتر اندازه‌گیری شد. مقادیر IC₅₀ نمونه‌ها همانطور که در روش DPPH تعریف شد با استفاده از رابطه زیر تعیین شد.

$$\%inhibition = [(AC-AS)/AC] * 100$$

که در آن AC جذب نمونه کنترل و AS جذب نمونه می‌باشند [۲۴].

۲-۴-۴- فعالیت ضد میکروبی

اثر ضد میکروبی اسانس آویشن تالشی در برابر *اشرشیا کلی*، *شیگلا دیسانتری*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس* مطابق روش‌های زیر بررسی گردید.

۲-۴-۱- دیسک دیفیوژن آگار

در این روش ضد میکروبی، دیسک‌های بلانک در محلول اسانس آویشن تالشی به مدت ۱۵ دقیقه غوطه‌ور و سپس روی سطح محیط کشت مولر هیتون آگار حاوی سویه‌های میکروبی ثابت شدند. در ادامه، پتری دیش‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند. قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک‌ها تعیین و به عنوان اثر ضد میکروبی گزارش شد [۲۵].

۲-۴-۲- چاهک آگار

در این روش، چندین چاهک روی سطح محیط کشت مولر هیتون آگار از طریق یک پیت پاستور استریل شده ایجاد شد. پس از آن، ۲۰ میکرولیتر اسانس در چاهک منتقل گردید. در ادامه، پلیت‌هایی که قبلاً به گونه‌های باکتریایی آلوده شده بودند، بر اساس شرایط بیان شده برای روش دیسک دیفیوژن آگار گرمخانه گذاری شدند. در نهایت قطر

۳- نتایج و بحث

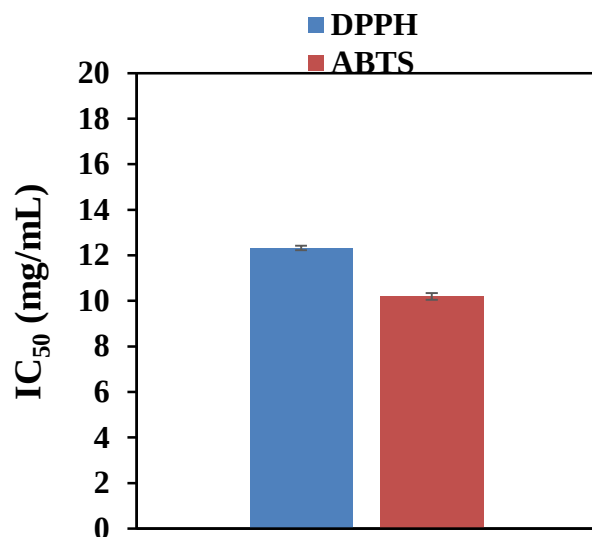


Figure 1. The antioxidant activity of *Thymus trautvetteri* essential oil based on DPPH and ABTS radical scavenging methods.

نتایج فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس آویشن تالشی در شکل ۱ گزارش شده است. مطابق نتایج، فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس در مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS (بر حسب IC_{50}) به ترتیب برابر با ۱۲/۳۲ و ۱۰/۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس آویشن تالشی تاکنون بررسی نشده است. موتلو-ینگوک و همکاران (۲۰۲۱) گزارش نمودند که محتوای فنول کل اسانس آویشن (*Thymus vulgaris*) برابر با ۱۹۳ میلی‌گرم گالیک اسید در لیتر بود و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن در برابر رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS به ترتیب ۴ و ۰/۰۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به دست آمد [۳۰]. بوزین و همکاران (۲۰۰۶) نشان داد که اسانس آویشن و پونه کوهی فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری (با مقادیر IC_{50} مشابه به ترتیب ۰/۱۹ و ۰/۱۷ میکروگرم در میلی‌لیتر) نسبت به اسانس ریحان یا آنتی‌اکسیدان مصنوعی BHT نشان دادند [۳۱]. همچنین در منابع علمی گزارش شده است که مقادیر IC_{50} به دست آمده با روش‌های مختلف ممکن است به طور قابل توجهی متفاوت باشد. به عنوان مثال، در مطالعه‌ای توسط بنداد و

گیاه آویشن و اسانس آن از دیرباز برای درمان عفونت‌های دستگاه تنفسی فوقانی، علائم برونشیت و عفونت‌های انگلی استفاده می‌شده است. امروزه عموماً به عنوان خلط‌آور در سرفه‌های همراه با سرماخوردگی و همچنین در دندانپزشکی به عنوان ضد عفونی کننده استفاده می‌شود. اثر ضد باکتریایی روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی دارد و دارای فعالیت ضد ویروسی، ضد قارچی، آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی است [۲۹].

محتوای فنول کل اسانس آویشن تالشی برابر با 0.19 ± 6.27 میلی‌گرم کاتچین در هر گرم اسانس به دست آمد. با بررسی منابع علمی مشخص گردید که تاکنون مطالعه‌ای در مورد میزان ترکیبات فنولی کل اسانس آویشن تالشی انجام نشده است. شهبازی و همکاران (۱۳۸۶) گزارش نمودند که اسانس آویشن تالشی حاوی ۲۴/۴۳ درصد تیمول، ۱۱/۳۶ درصد بورنتول، ۱۰/۰۹ درصد پاراسیمن، ۷/۷۸ درصد گاماترپینن، ۵/۲۹ درصد آلفاپینن و ۵/۰۷ درصد کارواکرول می‌باشد. علاوه بر این، مونوترپن‌های اکسیژن‌دار، مونوترپن‌های هیدروکربنی، سرکوئی ترپن‌های هیدروکربنی و سزکوئی ترپن‌های اکسیژن‌دار به ترتیب ۵۳/۴۱، ۳۶/۹۷، ۶/۷۷ و ۱/۹ درصد اسانس را تشکیل دادند [۲۱]. قندچی و جمزاد (۲۰۱۵) نشان دادند که عصاره‌های آبی، متانولی و کلروفرم آویشن تالشی به ترتیب حاوی ۱۴۱/۲۴، ۲۰۷/۶۴ و ۱۴۶/۸۴ میلی‌گرم در لیتر فلاونوئید کل می‌باشند [۱۹].

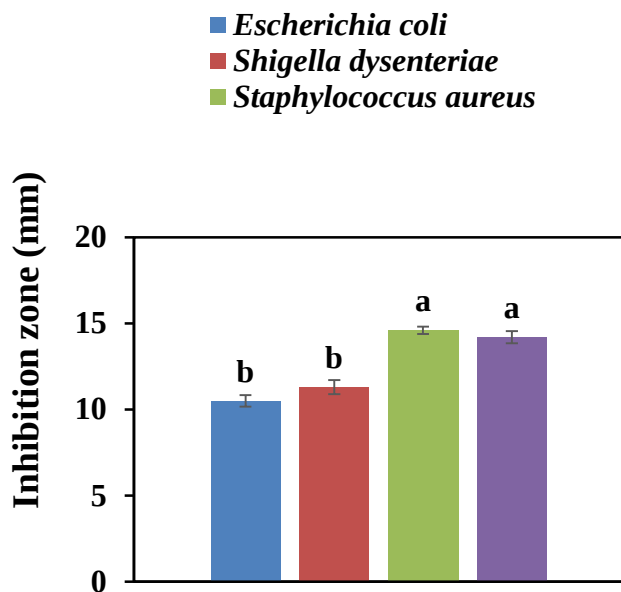


Figure 2. The antibacterial activity of *Thymus trautvetteri* essential oil based on disc diffusion agar method.

مطابق نتایج ضد میکروبی حاصل از روش چاهک آگار (شکل ۳)، قطر هاله عدم رشد برای سویه‌های باکتریایی در محدوده ۱۱/۳۰ تا ۱۶ میلی‌متر مشاهده شد و باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* (قطر هاله عدم رشد برابر با ۱۶ میلی‌متر) و *اشرشیا کلی* (قطر هاله عدم رشد برابر با ۱۱/۳۰ میلی‌متر) به ترتیب حساس‌ترین و مقاوم‌ترین سویه‌ها در برابر اسانس آویشن تالشی بودند. همچنین، حساسیت باکتری‌های گرم مثبت در برابر اسانس بالاتر از انواع گرم منفی بود. حساسیت کمتر باکتری‌های گرم منفی ممکن است به دلیل وجود یک غشای خارجی در ساختار آنها باشد که انتشار اجزای آبرگیز اسانس‌ها را در لایه لیپوپلی ساکاریدی محدود می‌سازد [۱۷، ۳۴]. علاوه بر این، میانگین قطر هاله عدم رشد در روش چاهک آگار بزرگ‌تر از روش دیسک دیفیوژن آگار مشاهده گردید. زیرا اسانس در این روش در تماس مستقیم با میکروارگانیسم‌ها است، درحالی‌که اسانس در روش دیسک دیفیوژن آگار بایستی از سطوح دیسک به محیط پخش شود تا اثر ضد میکروبی خود را نشان دهد [۲۸، ۳۵].

همکاران (۲۰۱۰)، مقدار IC_{50} تعیین شده با روش DPPH برای اسانس فلفل پروئی (*Schinus molle* L.) تقریباً ۱۴ برابر بیشتر از مقدار IC_{50} تعیین شده توسط روش ABTS بود. با توجه به مطالعه دسوزا و همکاران (۲۰۱۹)، ترکیبات فنولی، مانند تیمول، اوژنول و کارواکرول، عوامل آنتی‌اکسیدانی قوی در اسانس‌ها هستند زیرا می‌توانند اتم‌های هیدروژن را به رادیکال‌های آزاد منتقل کنند و آنها را به محصولات پایدارتر تبدیل سازند [۳۲]. اجزای دیگر مانند الکل‌های خاص، اترها، کتون‌ها، آلدئیدها و مونوترپن‌های لینالول، ۱-۸-سینئول، ژرانیال/نرال، سیترونال، ایزومنتون، منتون و برخی مونوترپن‌ها نیز نقش کلیدی در خواص آنتی‌اکسیدانی اسانس‌ها دارند [۳۳].

نتایج اثر ضد میکروبی اسانس آویشن تالشی در برابر سویه‌های باکتریایی بر پایه روش دیسک دیفیوژن آگار در شکل ۲ ارائه شده است. اثر ضد میکروبی اسانس وابسته به نوع باکتری بود و قطر هاله عدم رشد از ۱۰/۵۰ تا ۱۴/۶۰ میلی‌متر متفاوت بود. باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیا کلی* با قطر هاله عدم رشد ۱۴/۶۰ و ۱۰/۵۰ میلی‌متر به ترتیب حساس‌ترین و مقاوم‌ترین سویه‌های باکتریایی نسبت به اسانس آویشن تالشی بودند. علاوه بر این، باکتری‌های گرم منفی (*اشرشیا کلی* و *شیگلا دیسانتری*) نسبت به انواع گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس*) دارای مقاومت بیشتری در برابر اسانس بودند.

غلظت اسانس از ۰/۵ به ۲۵۶ میلی گرم در میلی لیتر سبب افزایش اثر ضد میکروبی آن گردید. تمام سویه های باکتریایی در حضور ۰/۵ میلی گرم در میلی لیتر اسانس قادر به رشد بودند. به استثناء سویه *استافیلوکوکوس اورئوس*، سویه های دیگر قادر به رشد در حضور غلظت ۱ میلی گرم در میلی لیتر اسانس بودند. با افزایش غلظت اسانس به ۲ میلی گرم در میلی لیتر و بالاتر از آن، رشد سویه های گرم مثبت متوقف گردید. باکتری های گرم منفی قادر به رشد در حضور غلظت ۲ میلی گرم در میلی لیتر اسانس بودند؛ اما غلظت بالاتر اسانس منجر به جلوگیری از رشد این سویه ها گردید. بطور کلی، حداقل غلظت مهارکنندگی برای باکتری های *اشرشیا کلی*، *شیگلا دیسانتری*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس* به ترتیب برابر با ۴، ۴، ۱ و ۲ میلی گرم در میلی لیتر به دست آمد.

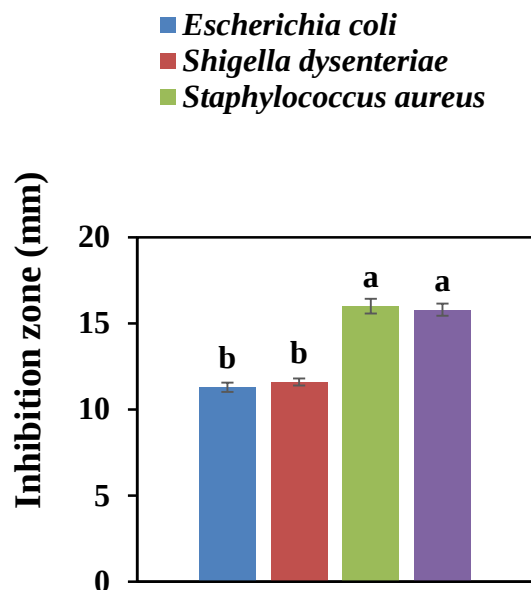


Figure 3. The antibacterial activity of *Thymus trautvetteri* essential oil based on well diffusion agar method.

نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی رشد اسانس آویشن تالشی در جدول ۱ نشان داده شده است. فعالیت ضد باکتریایی اسانس وابسته به غلظت آن و نوع باکتری بود. افزایش

Table 1. Minimum inhibitory concentration of *Thymus trautvetteri* essential oil

Microorganism	Essential oil concentration (mg/mL)										Negative control	Positive control
	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256		
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Shigella dysenteriae</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Bacillus cereus</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

+ grown; - not grown

دیسانتتری، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس* به ترتیب برابر با ۱۶، ۱۶، ۴ و ۴ میلی گرم در میلی لیتر مشاهده گردید.

جدول ۲، نتایج حداقل غلظت کشندگی اسانس آویشن تالشی در برابر باکتری های پاتوژن را نشان می دهد. بطور کلی، باکتری های گرم مثبت نسبت به انواع گرم منفی، حساسیت بیشتر در برابر اسانس نشان دادند. بطوریکه حداقل غلظت کشندگی برای سویه های *اشرشیا کلی*، *شیگلا*

Table 2. Minimum bactericidal concentration of *Thymus trautvetteri* essential oil.

Microorganism	Essential oil concentration (mg/mL)										Negative control	Positive control
	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256		
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>Shigella dysenteriae</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Bacillus cereus</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+

+ grown; - not grown

است. مطالعات بر روی مکانیسم فعالیت ضد باکتریایی تیمول نشان می‌دهد که توانایی آن برای ادغام در لایه لیپیدی غشاء سلولی باعث افزایش انحنا سطح می‌شود. بخش آبدوست مولکول با قسمت قطبی غشاء تعامل برقرار می‌کند، درحالی‌که حلقه بنزن آگریز و زنجیره‌های جانبی آلفاتیک در قسمت داخلی غشاء بیولوژیکی نفوذ می‌کنند. این امر با بی‌ثباتی لایه لیپیدی، کاهش خاصیت ارتجاعی و افزایش سیالیت باعث تغییرات زیادی در ساختار غشاء می‌شود. این فرآیند منجر به افزایش نفوذپذیری به یون‌های پتاسیم و هیدروژن می‌شود. همچنین بر فعالیت پروتئین‌های غشاء داخلی مانند آنزیم‌ها و گیرنده‌ها تأثیر می‌گذارد. تیمول پس از ادغام در غشای سلولی، از طریق مکانیسم‌های غیراختصاصی با پروتئین‌های تعبیه‌شده در سلول تعامل می‌کند که منجر به تغییر در ساختار و فعالیت پروتئین‌های داخلی و غشایی می‌شود. بنابراین، تنش و بی‌ثباتی غشاء سلولی را می‌توان با حضور تیمول القا کرد. کارواکرول روی غشاء باکتری به روشی مشابه تیمول عمل می‌کند [۲۹].

۴- نتیجه‌گیری نهایی

اسانس گونه‌های آویشن به دلیل ترکیب غنی از مولکول‌های غیرفرار دارای ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی زیادی هستند. اسانس آویشن تالشی دارای محتوای فنول قابل توجهی بود و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی آن در برابر رادیکال‌های

در راستای نتایج این پژوهش، شهنازی و همکاران (۱۳۸۶) گزارش نمودند که اثر ضد میکروبی اسانس آویشن تالشی وابسته به غلظت آن و نوع باکتری می‌باشد. بطوریکه افزایش غلظت اسانس سبب افزایش قطر هاله عدم رشد برای باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *استرپتوکوکوس پیورنز*، *سودوموناس اثرورزینوزا*، *سالمونلا تیغی*، *اشرشیا کلی*، *باسیلوس سوبتیلیس* و *پروتئوس میرابیلیس* گردید. نتایج نشان داد که باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* با حداقل غلظت مهارکنندگی ۱۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر حساس‌ترین سویه در برابر اسانس آویشن تالشی می‌باشد [۲۱]. در مطالعه‌ای دیگر، گزارش شده است که عصاره متانولی آویشن تالشی در مقایسه با انواع عصاره‌های آبی و کلروفرم دارای فعالیت ضد میکروبی بالاتری در برابر باکتری‌های گرم مثبت و منفی می‌باشد. بطوریکه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* با بالاترین میانگین قطر هاله عدم رشد، حساس‌ترین سویه نسبت به عصاره متانولی آویشن تالشی شناسایی گردید [۱۹].

فعالیت ضد میکروبی اسانس آویشن به درصد ترکیبات اصلی آن بستگی دارد. اسانس‌های با درصد مونوترپن فنولی بالاتر، در درجه اول تیمول، قوی‌ترین خواص ضد باکتریایی مرتبط با ساختار خود را دارند. ذرات کوچک و آگریز می‌توانند به راحتی بر موانع لیپیدی غلبه کنند. غشاء سلولی پاتوژن‌ها به دلیل ترکیب آگریز، هدف ترکیبات اسانس

۵- تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان به دلیل حمایت‌های مادی و معنوی صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

۶- منابع

- [1] Wang, Y., Ye, Z., & Ying, Y. (2012). New Trends in Impedimetric Biosensors for the Detection of Foodborne Pathogenic Bacteria. *Sensors*, 12(3), 3449-3471.
- [2] Bintsis, T. (2017). Foodborne pathogens. *AIMS Microbiol*, 3(3), 529-563.
- [3] Tabatabaei Yazdi, F., Alizadeh Behbahani, B., Vasiee, A., Mortazavi, S. A., & Yazdi, F. T. (2015). An investigation on the effect of alcoholic and aqueous extracts of *Dorema aucheri* (Bilhar) on some pathogenic bacteria in vitro. *Archives of Advances in Biosciences*, 6(1), 58-64.
- [4] Dong, S., Yang, X., Zhao, L., Zhang, F., Hou, Z., & Xue, P. (2020). Antibacterial activity and mechanism of action saponins from *Chenopodium quinoa* Willd. husks against foodborne pathogenic bacteria. *Industrial Crops and Products*, 149, 112350.
- [5] Falleh, H., Ben Jemaa, M., Saada, M., & Ksouri, R. (2020). Essential oils: A promising eco-friendly food preservative. *Food Chemistry*, 330, 127268.
- [6] Nooshkam, M., Varidi, M., & Verma, D. K. (2020). Functional and biological properties of Maillard conjugates and their potential application in medical and food: A review. *Food Research International*, 131, 109003.
- [7] Nooshkam, M., Varidi, M., & Bashash, M. (2019). The Maillard reaction products as food-born antioxidant and antibrowning agents in model and real food systems. *Food Chemistry*, 275, 644-660.
- [8] Barzegar, H., Alizadeh Behbahani, B., & Mehrnia, M. A. (2020). 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*, 29(5), 717-728.
- [9] Rahmati-Joneidabad, M., Alizadeh Behbahani, B., & Noshad, M. (2021). Antifungal effect of *Satureja khuzestanica* essential oil on *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, and *Rhizopus stolonifer* causing strawberry's rot and mold. *Journal of food science and technology (Iran)*, 18(115), 171-180.
- [10] Chen, Z., He, B., Zhou, J., He, D., Deng, J., & Zeng, R. (2016). Chemical compositions and antibacterial activities of essential oils extracted from *Alpinia guilinensis* against selected foodborne pathogens. *Industrial Crops and Products*, 83, 607-613.
- [11] Rajeshkumar, S., & Malarkodi, C. (2014). In Vitro Antibacterial Activity and Mechanism of Silver Nanoparticles against Foodborne Pathogens. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2014, 581890.
- [12] Economou, V., & Gousia, P. (2015). Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. *Infection and drug resistance*, 8, 49-61.
- [13] Alizadeh Behbahani, B., Tabatabaei Yazdi, F., Mortazavi, A., Gholian, M. M., Zendeboodi, F., & Vasiee, A. (2014). Antimicrobial effect of Carboxy Methyl Cellulose (CMC) containing aqueous and ethanolic *Eucalyptus camaldulensis* L.

- leaves extract against *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*. *Archives of Advances in Biosciences*, 5(2), 59-69.
- [14] Alizadeh Behbahani, B., Shahidi, F., Tabatabaei Yazdi, F., & Mohebbi, M. (2013). Antifungal effect of aqueous and ethanolic mangrove plant extract on pathogenic fungus "in vitro". *International Journal of Agronomy and Plant Production*, 4(7), 1652-1658.
- [15] Tabatabaei Yazdi, F., & Alizadeh Behbahani, B., (2013). Antimicrobial effect of the aqueous and ethanolic *Teucrium polium* L. extracts on gram positive and gram negative bacteria "in vitro". *Archives of Advances in Biosciences*, 4(4), 56-62.
- [16] Sureshjani, M. H., Tabatabaei Yazdi, F., Mortazavi, S. A., Alizadeh Behbahani, B., & Shahidi, F. (2014). Antimicrobial effects of *Kelussia odoratissima* extracts against food borne and food spoilage bacteria" in vitro. *Journal of Paramedical Sciences*, 5(2), 115-120.
- [17] Alizadeh Behbahani, B., Falah, F., Vasiee, A., & Tabatabaei Yazdi, F. (2021). Control of microbial growth and lipid oxidation in beef using a *Lepidium perfoliatum* seed mucilage edible coating incorporated with chicory essential oil. *Food science & nutrition*, 9(5), 2458-2467.
- [18] Sharma, S., Barkauskaite, S., Jaiswal, A. K., & Jaiswal, S. (2021). Essential oils as additives in active food packaging. *Food Chemistry*, 343, 128403.
- [19] Ghandchi, S., & Jamzad, M. (2015). Total flavonoids contents and anti bacterial activity of the extracts of two Labiateae species: *Nepeta menthoides* and *Thymus trautvetteri*. *Journal of Medicinal Plants and By-products*, 1, 77-82.
- [20] Asaadi, A. M. (2022). An investigation on ecological properties and range seeding of *Thymus trautvetteri* Klovov as a medicinal species (Case study: Rangeland of Godali Salakh area in Bojnourd). *Journal of Plant Ecophysiology*, 14(1), 47-61.
- [21] Shahnazi, S., Khalighi-Sigaroodi, F., Ajani, Y., Yazdani, D., Ahvazi, M., & Taghizad-Farid, R. (2007). Study on Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Thymus trautvetteri* Klovov & Desj. – Shost. *Journal of Medicinal Plants*, 6(23), 80-88.
- [22] Viuda-Martos, M., Ruiz Navajas, Y., Sánchez Zapata, E., Fernández-López, J., & Pérez-Álvarez, J. A. (2010). Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet. *Flavour and Fragrance journal*, 25(1), 13-19.
- [23] Falah, F., Zareie, Z., Vasiee, A., Tabatabaei Yazdi, F., Mortazavi, S. A., & Alizadeh Behbahani, B. (2021). Production of synbiotic ice-creams with *Lactobacillus brevis* PML1 and inulin: functional characteristics, probiotic viability, and sensory properties. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15(6), 5537-5546.
- [24] Falah, F., Vasiee, A., Yazdi, F. T., & Alizadeh Behbahani, B. (2021). Preparation and functional properties of synbiotic yogurt fermented with *Lactobacillus brevis* pml1 derived from a fermented cereal-dairy product. *BioMed research international*, 2021.
- [25] Alizadeh Behbahani, B., Noshad, M., & Falah, F. (2019). Cumin essential oil: Phytochemical analysis, antimicrobial activity and investigation of its mechanism of action through scanning electron microscopy. *Microbial pathogenesis*, 136, 103716.
- [26] Alizadeh Behbahani, B., Yazdi, F. T., Vasiee, A., & Mortazavi, S. A. (2018). *Oliveria decumbens* essential oil: Chemical compositions and antimicrobial activity against the growth of some clinical and standard strains causing infection. *Microbial pathogenesis*, 114, 449-452.
- [27] Nooshkam, M., Falah, F., Zareie, Z., Tabatabaei Yazdi, F., Shahidi, F., & Mortazavi, S. A. (2019). Antioxidant potential and antimicrobial activity of chitosan–inulin conjugates obtained through the Maillard reaction. *Food Science and Biotechnology*, 28(6), 1861-1869.
- [28] Falah, F., Vasiee, A., Alizadeh Behbahani, B., Tabatabaei Yazdi, F., & Mortazavi, S. A. (2021). Optimization of

- gamma-aminobutyric acid production by *Lactobacillus brevis* PML1 in dairy sludge-based culture medium through response surface methodology. *Food Science & Nutrition*, 9(6), 3317-3326.
- [29] Kowalczyk, A., Przychodna, M., Sopata, S., Bodalska, A., & Fecka, I. (2020). Thymol and thyme essential oil—new insights into selected therapeutic applications. *Molecules*, 25(18), 4125.
- [30] Mutlu-Ingok, A., Catalkaya, G., Capanoglu, E., & Karbancioglu-Guler, F. (2021). Antioxidant and antimicrobial activities of fennel, ginger, oregano and thyme essential oils. *Food Frontiers*, 2(4), 508-518.
- [31] Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Simin, N., & Anackov, G. (2006). Characterization of the Volatile Composition of Essential Oils of Some Lamiaceae Spices and the Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Entire Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(5), 1822-1828.
- [32] de Souza, W. F. M., Mariano, X. M., Isnard, J. L., de Souza, G. S., de Souza Gomes, A. L., de Carvalho, R. J. T., Rocha, C. B., Junior, C. L. S., & Moreira, R. F. A. (2019). Evaluation of the volatile composition, toxicological and antioxidant potentials of the essential oils and teas of commercial Chilean boldo samples. *Food Research International*, 124, 27-33.
- [33] Rodriguez-Garcia, I., Silva-Espinoza, B. A., Ortega-Ramirez, L. A., Leyva, J. M., Siddiqui, M. W., Cruz-Valenzuela, M. R., Gonzalez-Aguilar, G. A., & Ayala-Zavala, J. F. (2016). Oregano Essential Oil as an Antimicrobial and Antioxidant Additive in Food Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(10), 1717-1727.
- [34] Alizadeh Behbahani, B., Shahidi, F., Yazdi, F. T., Mortazavi, S. A., & Mohebbi, M. (2017). Use of *Plantago major* seed mucilage as a novel edible coating incorporated with *Anethum graveolens* essential oil on shelf life extension of beef in refrigerated storage. *International Journal of Biological Macromolecules*, 94, 515-526.
- [35] Tabatabaei Yazdi, F., Nooshkam, M., Shahidi, F., Asadi, F., & Alizadeh Behbahani, B. (2018). Evaluation of antimicrobial activity and antioxidant potential of chitosan Maillard-based conjugates in vitro. *Applied Microbiology In Food Industries*, 4(3), 1-15.

**Evaluation of chemical properties and antimicrobial effect of *Thymus trautvetteri* essential oil on a number of bacteria causing infection and food poisoning: a laboratory study**Mohammad Noshad^{*1}, Behrooz Alizadeh Behbahani¹

1- Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.

ABSTRACT

Chemical properties and antimicrobial effect of *Thymus trautvetteri* essential oil against some of the bacteria causing infection and food poisoning were evaluated in this study. For this purpose, *T. trautvetteri* essential oil was extracted with the help of hydrodistillation method and its total phenol content was based on Folin-Ciocalteu method, its antioxidant activity was based on DPPH and ABTS free radical inhibition methods and its antibacterial effect against *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* were investigated based on disc diffusion agar, well diffusion agar, minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration methods. The results showed that *T. trautvetteri* essential oil contained 6.27 mg of catechin/g total phenol and its inhibitory activity against DPPH and ABTS free radicals was obtained as 12.32 and 10.20 mg/ml, respectively. The results of the antibacterial activity of the essential oil showed that *S. aureus* and *E. coli* were the most sensitive and resistant bacterial strains against *T. trautvetteri* essential oil, respectively. The inhibition zone in the disc diffusion agar and well diffusion agar methods, and the minimum inhibitory and bactericidal concentrations for *S. aureus* were 14.60 mm, 16 mm, 1 mg/ml and 4 mg/ml, respectively. According to the findings of this research, *T. trautvetteri* essential oil can be used as a natural antioxidant and antimicrobial agent to prevent oxidative reactions and microbial spoilage in food.

ARTICLE INFO**Article History:**

Received: 2023/8/19

Accepted: 2023/10/19

Keywords:

Thymus trautvetteri essential oil,
Pathogenic bacteria,
Antimicrobial activity,
Antioxidant effect,
Phenolic compounds.

DOI: 10.22034/FSC.T.20.145.99

*Corresponding Author E-Mail:
Noshad@asnrukh.ac.ir