

ارزیابی اثرات ضد میکروبی اسانس چهار گیاه دارویی بر سالمونلاتیفی موریوم و مقایسه آنها با آنتی بیوتیک‌های رایج در دامپزشکی

محمد دخیلی^۱، تقی زهرایی صالحی^{۲*}، مجید ترابی گودرزی^۳، احمد خاوری^۴

- ۱- استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی قم
 - ۲- دانشیار، گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران
 - ۳- دامپزشک و کارشناس ارشد، گروه دامپزشکی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان قم
 - ۴- کارشناس میکروبیولوژی، گروه دامپزشکی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان قم
- * آدرس مکاتبه: تهران، خیابان آزادی، گروه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران
صندوق پستی: ۶۴۵۳ - ۱۴۱۵۵، تلفن: ۶۶۴۲۷۵۱۷ (۰۲۱)، نمابر: ۶۶۹۳۳۲۲۲ (۰۲۱)
پست الکترونیک: tsalehi@ut.ac.ir

تاریخ تصویب: ۸۵/۹/۴

تاریخ دریافت: ۸۳/۱۲/۲۳

چکیده

مقدمه: گیاهان آویش شیرازی *Zataria multiflora* Boiss خالواش *Mentha pulegium* L. مرز نجوش *Origanum vulgare* L. و رازیانه *Foeniculum vulgare* Miller از گیاهان دارویی در طب سنتی ایران بوده و مطالعه اثرات ضد میکروبی آنها ضروری و لازم به نظر می‌رسد.

هدف: هدف این بررسی ارزیابی اثر ضد میکروبی اسانس‌های این گیاهان بر باکتری سالمونلاتیفی موریوم و مقایسه فعالیت باکتری کشی آنها با آنتی بیوتیک‌های انروفلوکساسین، اریتروماسین، کلرامفنیکل، اکسی تتراسایکلین و فلومکویین بود.

روش بررسی: اسانس این گیاهان به روش تقطیر با بخار آب استخراج و ترکیب اسانس‌ها با دستگاه گاز کروماتوگرافی / طیف‌سنج جرمی GC/MS انجام شد. حداقل غلظت بازدارنده (MIC) و کشنده (MBC) با رقت‌های مختلف اسانس بر روی باکتری سالمونلاتیفی موریوم در آزمایشگاه بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد در میان اسانس‌های گیاهی اسانس آویشن، رازیانه + آویشن و مرزنجوش + آویشن نسبت به سایر گروه‌ها با اختلاف معنی‌داری قطر هاله بزرگتری نسبت به سایرین دارند ($p < 0/5$). کمترین غلظت اسانس ممانعت کننده از رشد (MIC) در مورد گیاه آویشن $156/50 \mu\text{g/ml}$ و کمترین غلظت باکتری کشی آن (MBC) $312/50 \mu\text{g/ml}$ بود.

نتیجه‌گیری: تاثیر اسانس آویش شیرازی بر سالمونلاتیفی موریوم در مقایسه با سه آنتی بیوتیک فلومکویین، اکسی تتراسایکلین و اریتروماسین بسیار بیشتر بود. فعالیت اسانس خالواش نیز از دو آنتی بیوتیک اکسی تتراسایکلین و اریتروماسین بیشتر بود. اسانس دو گیاه آویش شیرازی و مرزنجوش در سه ترکیب گاماترپین، تیمول، کارواکرول مشترک بود. ترکیب اصلی گیاه خالواش را پولگون، لیمونن و آلفاپینن تشکیل می‌داد و آلفاپینن بین دو گیاه آویشن و خالواش ترکیب مشترک بود.

کل واژگان: آویش شیرازی، خالواش، مرزنجوش، سالمونلاتیفی موریوم، اثر ضد میکروبی



مقدمه

سالمونلاتیفی موریوم یکی از سرووارهای مهم گونه اتریکا از جنس سالمونلا است و در بین سالمونلاها از شیوع میزبانی زیادی برخوردار است و به طور مکرر از انسان و گونه‌های حیوانی از جمله گاو و گوسفند، بز، طیور جدا می‌شود. همچنین این باکتری عامل اصلی مسمویت غذایی در انسان است. گاوهای نجات یافته از عفونت سالمونلاتیفی موریوم معمولاً به مدت چند هفته تا چند ماه آن را دفع می‌کنند و باعث آلودگی محیط و سایر دام‌ها می‌شود. مواد و فرآورده‌های دامی نظیر پودر استخوان، پودر گوشت و پودر خون در انتشار سالمونلاها نقش اساسی دارند و علی‌رغم همه اقدامات انجام شده و پیشرفت‌های بهداشتی، هنوز سالمونلوزمشکل اساسی در سلامت انسان و دام به ویژه صنعت طیور به شمار می‌آید [۱،۲]. وانگهی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سالمونلاها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های متداول در حال افزایش است، به طوری که مطالعات فرهودی (۱۳۶۸) نشان می‌دهد در کشور ما مقاومت نسبت به آمپی‌سیلین در سال ۱۳۶۸ برابر ۸۵ درصد و تحقیقات همین محقق در سال ۱۳۷۶، ۹۵ درصد بوده است [۲]. لذا یافتن ماده ضد میکروبی جدید به ویژه با منشاء گیاهی از اهمیت خاصی برخوردار است. خواص ضد میکروبی روغن‌های اسانسی و عصاره آنها بر روی میکروارگانیزم‌های مختلف از مناطق مختلف جهان گزارش شده است [۳،۴،۵،۶،۷]. آخوندزاده و همکاران (۲۰۰۳) خواص ضد میکروبی ترکیبات روغن‌های فرار را بر اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس ارتوس بررسی کرده‌اند [۸]. اوانس و همکاران (۲۰۰۲) خواص ضد میکروبی عصاره برگ، ریشه، ساقه و گل چند گیاه را بررسی کردند و ثابت کردند گیاه *Cassia eucalptus* اثر کشندگی بر روی سالمونلاتیفی را دارا است [۹]. نجفی مومن و همکاران (۱۳۸۲) خواص ضد میکروبی اسانس و عصاره چند گیاه دارویی را روی اشریشیاکلی بررسی کردند که نتایج نشان داد گیاه آویشن دارای بهترین اثر ضد میکروبی است [۱۰].

مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی تهدید جدی برای سلامتی انسان و دام به ویژه با ایمنی ضعیف بوده و لذا نیاز برای یافتن مواد ضد میکروبی ارزان و موثر ضروری است. به منظور ارزیابی

تأثیرات ضدباکتریایی اسانس و عصاره گیاهان آویشن، پونه، مرزنجوش، رازیانه که به طور سنتی در ایران استفاده می‌شوند و مقایسه اثر ترکیبی و اثر مفرد هر یک از آنها و همچنین مقایسه اثر ضد میکروبی این گیاهان با آنتی‌بیوتیک‌های رایج بر سالمونلاتیفی موریوم، تحقیق حاضر طراحی شد.

مواد و روش‌ها

گیاهان خالواش^۱، آویشن شیرازی^۲، مرزنجوش^۳ و رازیانه^۴ از استان‌های فارس و تهران در فصل تابستان تهیه و توسط هرباریوم موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع مورد شناسایی علمی قرار گرفت و سپس به وسیله آسیاب برقی پودر شد و جهت تهیه اسانس ۵۰ گرم از برگ‌های خشک و پودر شده گیاه را همراه با ۷۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر در یک بالن ریخته و به مدت ۳ ساعت در دستگاه کلونجر با سرعت تقطیر یک میلی‌لیتر در دقیقه اسانس‌گیری شد. شناسایی و آنالیز اسانس گیاهان توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی در موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع انجام شد و اثر ضد میکروبی آنها بر روی باکتری سالمونلاتیفی، *RITCC ۲۴۶۱* با روش انتشار^۵ و رقت‌سازی^۶ در محیط کشت مولر هینتون آگار^۷ و برات ساخت کارخانه مرک آلمان با استفاده از دیسک‌های کاغذی ۶ میلی‌متری بررسی شد. تعیین حساسیت میکروبی به روش Kirby Bauer و رقت یک دوم لوله شماره یک مک فارلند انتخاب و کدورت حاوی لوله کشت میکروب با آن مقایسه شد تا غلظت میکروبی^۸ معادل $10^8 \times 1/5$ حاصل گردد [۱۱]. پس از تهیه سوسپانسیون میکروبی در مدت ۵ دقیقه پلیت‌ها توسط سوآپ استریل آغشته به سوسپانسیون میکروبی تلقیح شد و دیسک‌گذاری توسط پنس استریل و در کنار شعله انجام شد. فاصله دیسک‌ها با دیواره پلیت حداقل ۵ میلی‌متر و از یکدیگر حداقل ۲۵ میلی‌متر تعیین شد. پلیت‌ها به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از سپری

¹ *Mentha pulegium* L.

² *Zataria multiflora* Boiss

³ *Origanum vulgare* L.

⁴ *Foeniculum vulgare* Miller

⁵ Diffusion test Disk

⁶ Dilution test

⁷ MHA

⁸ Cell density



که گذشت زمان ذکر شده تأثیری در قدرت ضد میکروبی اسانس ندارد. از میان اسانس‌های اثر داده شده بر سالمونلاتیفی موریوم اسانس آویشن و ترکیب اسانس‌های آویشن + رازیانه و آویشن + مرزنجوش بیشترین اثر را نشان دادند و از این لحاظ نسبت به سایر اسانس‌ها دارای اختلاف معنی‌داری بودند ($p < 0/001$). پس از این گروه‌ها مرزنجوش و آویشن + خالواش تأثیر قابل توجهی را نشان داد و میزان تأثیر آنها به طور معنی‌داری از اسانس‌های رازیانه و خالواش بیشتر بود ($p < 0/001$). مطابق نتایج آنتی‌بیوگرام (جدول شماره ۱) بیشترین حساسیت سالمونلاتیفی موریوم نسبت به دو آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل و انروفلوکساسین است ولی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های دیگر شدیداً مقاوم بود. همان‌گونه که در جدول شماره ۲ مشاهده می‌شود رازیانه دارای کمترین قطر هاله است و بیشترین قطر هاله مربوط به آویشن، رازیانه + آویشن، مرزنجوش + آویشن است که اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند ($p < 0/05$).

بحث

همان‌گونه که نتایج مطالعه نشان می‌دهد اسانس گیاهان آویشن، خالواش، مرزنجوش، رازیانه (به دلیل ضعیف بودن خاصیت ضد میکروبی از مطالعه MIC حذف گردید) دارای خاصیت ضد میکروبی بوده که این خصوصیت بسته به نوع گیاه متفاوت است. نتایج به دست آمده از آزمون‌های MIC و MBC اسانس این گیاهان نشانگر این است که اسانس گیاه آویشن دارای اثر ضد میکروبی به مراتب قوی‌تری نسبت به سایر اسانس‌ها است. به طوری که در غلظت ۰/۳ درصد از رشد سالمونلاتیفی موریوم ممانعت می‌کند. نتایج این پژوهش با نتایج مطالعه آخوندزاده بستی مطابقت دارد [۸]. همچنین مطالعه Hammer روی عصاره روغنی ۰/۰۳ درصد آویشن نیز از رشد باکتری سالمونلاها ممانعت به عمل آورد [۱۲]. براساس نتایج حاضر اسانس گیاه خالواش در غلظت ۰/۵ درصد از رشد سالمونلاتیفی موریوم ممانعت می‌کند. مطالعات بنیادین و همکاران نیز بیانگر این بود که غلظت ۵ ppm از اسانس خالواش از رشد *E. coli* جلوگیری می‌کند [۳].

شدن زمان لازم، قطر هاله‌های عدم رشد با کولیس اندازه‌گیری شد. این آزمایش به طور جداگانه برای آنتی‌بیوتیک‌ها و اسانس‌ها انجام شد. به منظور مقایسه آنتی‌بیوتیک‌های رایج بازار، از آنتی‌بیوتیک‌های معمولی شرکت‌های موجود مقداری به صورت پودر یا مایع تهیه شد و با تعیین میزان پودر مصرفی و حجم مایع رقیق‌کننده مورد نیاز محلول ذخیره آنتی‌بیوتیکی تهیه شد.

جهت تعیین MIC رقت‌های مختلفی از اسانس آویشن، پونه، مرزنجوش و رازیانه تهیه شد و از هر رقت ۵۰ میکرولیتر به لوله‌های استریل محتوی ۳ میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری و محیط کشت (معادل نیم مک فارلند که به نسبت ۱/۱۰۰ رقیق شده است) اضافه گردید و پس از مخلوط کردن به مدت ۲۴-۱۸ ساعت گرمخانه‌گذاری (۳۷ درجه سانتی‌گراد) شد. نتایج برحسب کدورت لوله‌ها مشخص و MIC تعیین و سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از لوله‌هایی که هیچ‌گونه کدورتی مشاهده نشده بود در محیط مولر هیتون کشت شد و MBC نمونه‌ها به دست آمد (کمترین عامل ضد میکروبی را که کمتر از یک دهم درصد تلقیح اولیه در آن باقی بماند به عنوان MBC در نظر گرفته شد) [۱۱].

نتایج

اسانس گیاهان آویشن شیرازی، خالواش، مرزنجوش و رازیانه استخراج و فعالیت ضد میکروبی آنها بر سالمونلاتیفی موریوم^۱ بررسی شد. چون برای تهیه رقت‌های مختلف اسانس‌ها استفاده از حلال لازم است، بنابراین نیاز است که تأثیر ضد میکروبی حلال‌های مورد استفاده مطالعه و از حلال‌هایی استفاده شود که خواص ضد میکروبی نداشته باشد. بنابراین از دو حلال اتانول و توین ۸۰ استفاده شد. جهت حصول اطمینان، تأثیر مهارکنندگی^۲ و کشندگی^۳ حلال‌های مذکور بررسی شد که در غلظت‌های انتخابی ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸، ۱ و ۲ درصد (حجم در حجم) تأثیری بر رشد میکروارگانیسم مورد بررسی (سالمونلاتیفی موریوم) نداشتند. تأثیر ضد میکروبی اسانس‌ها با روش دیسک پلیت در دو مرحله زمانی اسانس تازه و سه ماهه مطالعه شد که نتایج بیانگر آن بود

^۱ *S. typhimurum*

^۲ MIC

^۳ MBC



جدول شماره ۱ - میزان حساسیت سالمونلاتیفی موریوم استاندارد
RITCC۲۴۶۱ نسبت به آنتی بیوتیک‌ها مورد استفاده در این بررسی

دیسک‌های آنتی بیوتیکی				
T	SXT	NFX	E	C
S	R	S	R	S

I = مقاوم، R = حساس، S = نیمه حساس

C= Chloramphenicol (30 Mcg) E=Erythromycin (15 Mcg) NFX= Enrofloxacin (5 Mcg)
T= Tetracyclin (30 Mcg) SXT= Trimethoprim – sulfamethoxazole (1/25 Mcg)

جدول شماره ۲ - میانگین قطر هاله عدم رشد سالمونلاتیفی موریوم RITCC۲۴۶۱

به وسیله اسانس گیاهان دارویی مورد بررسی با مقدار ۱۰ میکرولیتر

میانگین قطر هاله	نوع اسانس
۱۷/۶ ± ۰/۶۷۸	b خالواش
۱۲/۶ ± ۰/۲۴۵	a رازیانه
۲۳/۴ ± ۱/۵۳	c مرزنجوش
۳۱/۲ ± ۰/۵۳۸	d آویشن
۱۷/۸ ± ۰/۸	b خالواش + رازیانه
۳۰/۸ ± ۱/۳۰۴	d رازیانه + آویشن
۲۹/۲ ± ۱/۹۲۴	d مرزنجوش + آویشن
۲۲/۲ ± ۱/۹۲۴	c آویشن + خالواش
۱۶/۲۵ ± ۱/۲۵	ab خالواش + مرزنجوش

a-d: اعدادی که با حروف غیر مشترک نشان داده شده است دارای اختلاف معنی داری هستند. $p < 0/05$ mean \pm SEM

آویشن شیرازی و خالواش مشترک بوده و بیشترین ترکیب گیاه خالواش را پولگون^۱، لیمونن^۲، آلفا - پینن تشکیل می‌دهد و آلفاپینین بین دو گیاه و خالواش ترکیب مشترک است. از میان ترکیبات ذکر شده تیمول با ۳۳ درصد در اسانس مرزنجوش و کارواکرول در اسانس آویشن با ۶۰ درصد بالاترین مقدار ترکیب مشترک هر کدام از اسانس‌های فوق را دارا بودند.

اندازه قطر هاله عدم رشد میکروبی دقیقاً نمی‌تواند بیانگر MIC و MBC باشد، به طوری که اسانس مرزنجوش با داشتن هاله بزرگ نسبت به خالواش دارای MIC و MBC پایین‌تری

نتایج این بررسی بیانگر این بود که اسانس مرزنجوش دارای اثر ضد میکروبی خوبی بر روی سالمونلاتیفی موریوم است به نحوی که غلظت ۱ درصد این اسانس از رشد باکتری ممانعت می‌کند. براساس مطالعات Hammer اسانس ۲ درصد گیاه مذکور از رشد سالمونلاتیفی موریوم ممانعت به عمل می‌آورد [۱۲].

اسانس دو گیاه آویشن شیرازی و مرزنجوش در سه ترکیب گاما ترپینن^۱، تیمول^۲ و کارواکرول^۳ مشترک بودند و بیشترین ترکیب این دو گیاه را تشکیل می‌دهند و ترکیب آلفاپینین^۴ بین

^۱ Pulegone

^۲ Limonene

^۱ γ - Terpinen
^۳ Carvacrol

^۲ Thymol
^۴ α - Pinene



جدول شماره ۳- مقایسه حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) گروه‌های تحت آزمایش بر سالمونلاتیفی موریوم ($10^9/ml$)

MBC ($\mu g/ml$)	MIC ($\mu g/ml$)	آنتی‌بیوتیک
۱۴/۵	۷/۲	انروفلوکسازین
۳۱۳/۵	۱۵۷	فلومکوئین
۲۴	۱۲	کلرامفنیکل
۹۳۰/۸	۴۷۰	اکسی‌تتراسیکلین
۱۳۵۰	۶۷۵	اریترومایسین
۳۱۲/۵	۱۵۶/۲۵	آویشن
۶۲۵	۳۱۲/۵	خالوآش
۱۲۵۰	۶۲۵	مرزنجوش

اختلاف معنی‌داری بودند.

با توجه به نتایج به دست آمده از این تحقیق و محدودیت‌های روز افزون استفاده از مواد شیمیایی ضد میکروبی نظیر عوارض جانبی و ایجاد مقاومت دارویی نیاز به جایگزینی این مواد با مواد طبیعی و اسانس‌های گیاهی احساس می‌شود که این مسأله می‌تواند زمینه‌ساز مطالعات برای جایگزینی مواد فوق در جهت حفظ مواد خوراکی و کنترل بیماری‌های انسانی و حیوانی باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان قم و همچنین موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع به خاطر همکاری‌هایشان در اجرای این تحقیق کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

بود (جدول شماره ۳). بنابراین برای تعیین میزان حساسیت هر میکروارگانیسم به ماده ضد میکروبی تعیین قطر هاله و MIC و MBC لازم است. نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد که فعالیت اسانس آویشن بر باکتری سالمونلاتیفی موریوم در مقایسه با دو آنتی‌بیوتیک فلوموکوئین و اکسی‌تتراسیکلین بسیار بیشتر است (جدول شماره ۳). همچنین فعالیت ضد میکروبی خالوآش نیز از آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسیکلین بسیار شدیدتر است در حالی که فعالیت ضد میکروبی مرزنجوش نسبت به ۴ آنتی‌بیوتیک انروفلوکسازین، فلوموکوئین، کلرامفنیکل و اکسی‌تتراسیکلین کمتر است. اثرات خوب باکتری‌کشی اسانس‌های فوق را می‌توان به ترکیبات تیمول و کارواکرول مربوط دانست که بیشترین درصد ترکیبات شیمیایی را به خود اختصاص می‌دادند. نتایج آنالیز آماری نشان داد که بیشترین اثر مربوط به آویشن، رازیانه + آویشن، مرزنجوش + آویشن بوده است که در سطح $p < 0/001$ نسبت به سایر گروه‌ها دارای

منابع

۱. زهرایی صالحی تقی. سالمونلا. چاپ اول. موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران. ۱۳۷۸، صفحات ۱۰۱ - ۱۸۸.
۲. دخیلی محمد. منشایی سالمونلاهای جدا شده از طیور با استفاده از روش پلاسمیدی در مرغداری‌های استان قم. پایان‌نامه
۳. بنیادیان مجتبی. تولید پنیر سفید معطر ایرانی با استفاده از عصاره برخی گیاهان سنتی و مطالعه تاثیر آنها بر چگونگی بقا
- کارشناسی ارشد میکروبی‌شناسی. ۱۳۷۷، دانشگاه آزاد اسلامی شماره ۵۵.



روی رشد سالمونلا تیفی موریوم در محیط آبگوشت قلب و مغز. فصلنامه گیاهان دارویی. ۱۳۸۳، شماره ۹، صفحات ۸۵-۹۳.

9. Evans E O. and Adeyemo samuel A. Efficacy of some nupe medical plant against salmonella typhi an invitro study. *Journal of Ethnopharmacology* 2002; 80 21-24.

۱۰. نجفی مومن رضا. بررسی اثرات ضد میکروبی چهار گیاه دارویی بر باکتری *E. coli* عامل کلی باسیلوز طیور. نشریه مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان قم. ۱۳۸۳، صفحات ۱۵ - ۱.

11. Baron EJ and Finedgold SM. Dignostic Microbiology. 8th ed. Mosby Company. Philadelphia. USA. 1990; pp: 171-84.

12. Hammer KA. Carson CF and RilleyTV. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology* 1999; 86: 985-99.

و رشد *E. coli* در این فرآورده. پایان نامه دکتری تخصصی بهداشت مواد غذایی. ۱۳۸۲، صفحات ۱۰-۲۰.

۴. رسولی ایرج، رضایی محمدباقر. ترکیب و تاثیر ضد میکروبی روغن های فرار پونه و گلپر بر *E. coli* و *S. aureus* مجله پژوهش و سازندگی. ۱۳۷۹، شماره ۴۹، صفحات ۶-۱۳۰.

۵. زرگری علی. گیاهان دارویی. چاپ پنجم. موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران. ۱۳۷۴، جلد چهارم، صفحات ۱۴ - ۵۹.

6. Ahmad I and Beg AZ. Antimicrobial and photochemical studies on 45 indian medical plant multi drug resistant human pathogens. *Journal of Ethnopharmacology* 2001; 74: 113 - 23.

7. Perez C and Anesini C. in vitro antibacterial activity of Argentin folk medicinal plants against *Salmonolla typhi*. *Journal of Ethnopharmacology* 1994; 44: 41-46.

۸. آخوندزاده بستی افشین، رضویلر ودود، مینا قی علی، رادمهر بهراد و خلیفی سیگارودی فرحناز. اثر اسانس آویشن شیرازی بر