Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 10, Number 2 (May-June)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Combination Effects of *Zataria multiflora*, *Laurus nobilis* and *Chamaemelum nobile* Essences on Pathogenic *E. coli* and Determination of Optimum Formulation Using Fraction and Factorial Statistical Method

Sara Ramezanpour[1], Fatemeh Ardestani [2], Mohammad Javad Asadollahzadeh[1]

1. Department of Chemical Engineering, Shahrood Branch, Islamic Azad University, Shahrood, Iran
2. Department of Chemical Engineering, Qaemshahr Branch, Islamic Azad University, Qaemshahr, Iran

Article Information

Article history:
Received: 2015/12/08
Accepted: 2016/02/20
Available online:2016/07/24

Article Subject:
Antimicrobial Substances

IJMM 2016; 10(2): 53-62

Corresponding author at:

Dr. Fatemeh Ardestani

Department of Chemical Engineering, Qaemshahr Branch, Islamic Azad University, Qaemshahr, Iran

Tel: 01142155027

Email:
f.ardestani@qaemshahriau.ac.ir

Abstract

Background and Aim: In this study, antibacterial combination effects of *Zataria multiflora*, *Laurus nobilis* and *Chamaemelum nobile* essences was examined and the optimum bactericide dosages of the combination was determined on *E. coli* PTCC1330.

Materials and Methods: Essence extraction was conducted using water distillation method from *Z. multiflora*, *L. nobilis* leafs and *C. nobile* capitals by Clevenger apparatus. The combination effects of the essences were studied on *E. coli* in different dosages using Qualitek-4 software and fraction of the full factorial statistical method. Essences interactions and the contribution of each essence were evaluated on inhibition of *E. coli* growth.

Results: MIC values was determined for *Z. multiflora*, *L. nobilis* and *C. nobile* essences as 0.01, 0.1 and 0.05 mg ml^{-1}, also MBC values was 0.1, 0.5 and 0.5 mg ml^{-1}, respectively. *Z. multiflora* essence dosages showed the highest percentage of antibacterial effect (64. 2%) on *E. coli*, while the antibacterial effect was evaluated 13.54% and 6.89% for *L. nobilis* and *C. nobile* essences, respectively. In optimum conditions, all three essences dosages should be equal to 1 mg. mL^{-1} and the percentage of bacterial growth inhibition was determined by 72.76% whereas it has 81.8% consistency with real results at optimum conditions (60%). The maximum interaction was observed between *Z. multiflora* and *C. nobile* essences dosages with 33.44% severity index.

Conclusions: *Z. multiflora* essence had a considerable antibacterial effect on *E. coli*, while antibacterial properties of *L. nobilis* and *C. nobile* essences were evaluated as a weak effect.

KeyWords: Antibacterial agents, *Escherichia coli*, Statistical analysis, *Z. multiflora*, *L. nobilis*, *C. nobile*

Copyright © 2016 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Ramezanpour S, Ardestani F, Asadollahzadeh M J. Combination Effects of Zataria multiflora, Laurus nobilis and Chamaemelum nobile Essences on Pathogenic E. coli and Determination of Optimum Formulation Using Fraction and Factorial Statistical Method. Iran J Med Microbiol. 2016; 10 (2) :53-62

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۰ – شماره ۲ – خرداد و تیر ۱۳۹۵

Journal homepage: www.ijmm.ir

اثر ترکیبی اسانس آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*)، برگ‌بو (*Laurus nobilis*) و بابونه (*Chamaemelum nobile*) بر باکتری *اشریشیاکلی* پاتوژن و تعیین فرمولاسیون بهینه آن با استفاده از روش آماری کسری از فاکتوریل کامل

سارا رمضانپور [۱]، فاطمه اردستانی [۲]، محمدجواد اسدالله‌زاده [۱]

۱. گروه مهندسی شیمی، واحد شاهرود، دانشگاه آزاد اسلامی، شاهرود، ایران

۲. گروه مهندسی شیمی، واحد قائم‌شهر، دانشگاه آزاد اسلامی، قائم‌شهر، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت:۱۳۹۴/۱۰/۲۹

پذیرش:۱۳۹۵/۰۱/۲۱

انتشار آنلاین:۱۳۹۵/۰۵/۰۳

موضوع:

مواد ضد میکروبی

IJMM 1395; 10(2): 53-62

نویسنده مسئول:

دکتر فاطمه اردستانی

گروه مهندسی شیمی، واحد قائم‌شهر، دانشگاه آزاد اسلامی، قائم‌شهر، ایران

تلفن: ۰۱۱۴۲۱۵۵۰۲۷

پست الکترونیک:

f.ardestani@qaemshahriau.ac.ir

چکیده

زمینه و اهداف: در این مطالعه خواص ضدباکتریایی اسانس‌های آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*)، برگ‌بو (*Laurus nobilis*) و بابونه (*Chamaemelum nobile*) بررسی و دوز بهینه باکتری‌کشی این اسانس‌ها بر روی باکتری *اشریشیاکلی* PTCC1330 تعیین گردید.

مواد و روش کار: استخراج اسانس از برگ‌های آویشن شیرازی و برگ‌بو و کاپیتول‌های بابونه به روش تقطیر با آب توسط دستگاه کلونجر انجام شد. بر اساس آزمایشات طراحی شده با نرم‌افزار Qualitek-4 و روش آماری کسری از فاکتوریل کامل، تاثیر ترکیبی سه اسانس در دوزهای مختلف بر باکتری *اشریشیاکلی* بررسی شد. اثرات متقابل اسانس‌ها بر یکدیگر و سهم هر اسانس در بازدارندگی رشد باکتری تعیین گردید.

یافته‌ها: حداقل غلظت بازدارندگی برای اسانس‌های آویشن شیرازی، برگ‌بو و بابونه به ترتیب برابر با ۰/۰۱، ۰/۱ و ۰/۰۵ و حداقل غلظت کشندگی نیز به ترتیب برابر با ۰/۱، ۰/۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تعیین گردید. اسانس آویشن شیرازی با ٦٤/۲٪ مشارکت دارای بیشترین اثر ضدباکتریایی بر باکتری *اشریشیاکلی* بود. سهم اثر ضدباکتریایی اسانس‌های برگ‌بو و بابونه به ترتیب ۱۳/٥٤٪ و ٦/۸۹٪ برآورد شد. در شرایط بهینه، دوز هر سه اسانس باید برابر با ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر باشد. درصد ممانعت از رشد باکتری *اشریشیاکلی* در این شرایط، ۷۲/۷٦٪ تعیین گردید که دارای ۸۱/۸٪ تطابق با نتایج واقعی در شرایط بهینه (نزدیک به ٦۰٪) بود. بیشترین اثرات متقابل مابین فاکتورهای دوز اسانس آویشن شیرازی و در اسانس بابونه با ۳۳/٤٤٪ شاخص شدت اثر متقابل برآورد شد.

نتیجه‌گیری: اسانس آویشن شیرازی دارای خاصیت ضدباکتریایی قابل توجهی بر باکتری *اشریشیاکلی* بوده در حالیکه خواص ضدباکتریایی اسانس‌های برگ‌بو و بابونه ضعیف می‌باشد.

کلمات کلیدی: *اشریشیاکلی*، آنالیز آماری، مواد ضد میکروبی، اویشن شیرازی، برگ بو، بابونه

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) یکی از گیاهان دو لپه از خانواده نعنائیان است که در مناطق مختلف ایران می‌روید (۱). از برگ‌های خوش‌عطر آن اغلب به عنوان ادویه یا دارو استفاده می‌شود. کارواکرول، تیمول، گاماترپینن و پاراسیمن ترکیبات موثره ضدمیکروبی موجود در اسانس‌های گیاهی هستند که البته مقدار آنها با توجه به منطقه کشت و واریته گیاه متفاوت می‌باشد (۲). در اسانس آویشن شیرازی ترکیبات شیمیایی متعددی وجود دارد که از مهم‌ترین آنها می‌توان به تیمول و کارواکرول اشاره نمود که خاصیت ضدباکتریایی دارند (۳، ۲). برگ‌بو (*Laurus nobilis*) گیاهی خوشبو و همیشه‌سبز است که

اصل آن از منطقه مدیترانه است و به عنوان عطر غذا از آن استفاده می‌شود. برگ‌بو به صورت درختچه همیشه سبز است. از جمله مواد موثره اصلی در اسانس برگ‌بو می‌توان ازسینامیک آلدهید و اوژنول نام برد که اثر قوی ضدمیکروبی دارند (۴). بابونه (*Chamaemelum nobile*) گیاهی است یک‌ساله، معطر و به ارتفاع ۲۰ تا ۴۰ سانتی‌متر که بصورت خودرو در مزارع و کنار جاده‌ها می‌روید. قسمت مورد استفاده این گیاه، کاپیتول‌های آن است. اسانس آن دارای سزکوئی‌ترپن‌های b و g و همچنین ماتریکارین می‌باشد. عصاره بابونه از ۱۲۰ نوع ترکیب شیمیایی شامل کامازولین‌ها، فلاونوییدها و کومارین‌ها، کامازولین، آپیجنین و بیزابولول تشکیل شده است. ترکیبات موجود در عصاره بابونه دارای اثرات ضد باکتریایی است (۵). نتایج تحقیقات انجام شده توسط Izadi و همکاران نشان داده که اسانس بابونه دارای اثرات بازدارندگی رشد بر روی باکتری *اشریشیاکلی* بوده است. اسانس بابونه آلمانی دارای ۳۶ ترکیب شیمیایی از جمله آلفابیزابولول اکسید (۴۴/۱۸٪)، آلفا بیزابولون اکسید آ (۲۲/۱۴٪) و کامازولن (۹/۹۶٪) بوده است (۶). اسانس بابونه کبیر نیز دارای ترکیباتی چون کامفور (۴۵/۰۱٪)، کریزانتنیل استات (۲۱/۵۴٪) و کامفن (۹/۶۶٪) است (۶).

اسانس گیاه زنیان نیز که دارای تیمول، کارواکرول، گاماترپینن و پاراسیمن بوده دارای اثرات باکتری‌کشی قابل‌توجهی بر روی باکتری *لیستریا منوسیتوژنز* می‌باشد (۷). فعالیت ضدمیکروبی برخی از اسیدهای چرب استخراج شده از گیاهان زردچوبه، زنجبیل و بذر کتان (۸)، اسانس گیاه گلپر بر باکتری *اشریشیاکلی* (۹)، عصاره متانولی بخش‌های هوایی گیاه شیرمال بر ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱ (۱۰)، عصاره الکلی سه گیاه ختمی، مرزه بختیاری و چویر بر باکتری *اشریشیاکلی* (۱۱)، ترکیبات استخراج شده از آویشن بر روی باکتری‌های مقاوم در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها (۱۲)، ترکیبات استخراج شده از گیاه چریش بر علیه باکتری *اشریشیاکلی* (۱۳)، ترکیبات استخراج شده از گیاه چای جنگلی بر باکتری *اشریشیاکلی* (۱۴)، اسانس نعناع فلفلی (۱۵)، اسانس آویشن شیرازی (۱۸-۱۶) بر باکتری *اشریشیاکلی* و اسانس‌های زیره سبز، کاکوتی و سیاه دانه بر *آسپرژیلوس فومیگاتوس* و *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* (۱۹) گزارش شده است.

اشریشیاکلی نوعی باسیل گرم منفی و هوازی اختیاری از خانواده انتروباکتریاسه است که بطور شایع در روده انسان و جانوران خونگرم وجود دارد. برخی از سروتیپ‌های این باکتری مانند O157:H7 موجب مسمومیت غذایی، اسهال، مسمومیت خونی گرم منفی، عفونت‌های مجاری ادراری، عفونت ریوی در افرادی که سیستم ایمنی بدن آنها متوقف گردیده و عفونت پرده مغز در نوزادان می‌شوند. این باکتری از طریق مسیر مدفوعی دهانی و همچنین از طریق آب و مواد غذایی آلوده به مدفوع انسان و یا فضولات سایر حیوانات از یک فرد به فرد دیگر منتقل می‌شود. رشد بهینه این باکتری مزوفیل در دمای ۳۷ درجه سلسیوس است، اما تا دمای ۴۹ درجه سلسیوس را نیز تحمل کرده و به رشد خود ادامه می‌دهد (۲۰).

در این تحقیق خواص ضدباکتریایی اسانس‌های سه گیاه آویشن شیرازی، برگ‌بو و بابونه بررسی و دوز بهینه باکتری‌کشی این اسانس‌ها بر روی باکتری *اشریشیاکلی* تعیین گردید.

مواد و روش‌ها

باکتری *اشریشیاکلی* PTCC1330 از بانک میکروارگانیسم‌های سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران خریداری شد. برگ‌های خشک‌شده آویشن شیرازی از یک عطاری معتبر در شهرستان قائم‌شهر تهیه گردید. برگ‌های گیاه برگ‌بو از درختان شهرستان محمود آباد به دست آمد. کاپیتول‌های (گل‌های) گیاه بابونه از کناره‌های جنگلی در منطقه آمل (جاده هراز) جمع‌آوری شد. برگ‌های گیاه برگ‌بو و کاپیتول‌های بابونه در آزمایشگاه در دمای ۳۰ درجه سلسیوس، در داخل کیسه‌های پارچه‌ای جداگانه و به دور از نور مستقیم خورشید خشک شدند. مواد شیمیایی و محیط های کشت میکروبی همگی از محصولات شرکت مرک تهیه شدند.

استخراج اسانس‌ها

برای تهیه اسانس، برگ‌ها یا گل‌های خشک با استفاده از آسیاب برقی به صورت پودر درآمدند. برای استحصال اسانس از کلونجر (ساخت سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران) استفاده شد. ۱۰۰ گرم پودر برگ گیاه با ۶۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر در بالن شیشه‌ای ریخته شده و اسانس‌گیری در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۲۰ دقیقه به روش تقطیر با آب انجام شد. اسانس‌ها توسط سولفات‌منیزیم آبگیری شده و در ظروف شیشه‌ای تیره با روپوش آلومینیومی و در دمای ۴ درجه سلسیوس در یخچال نگهداری شدند (۲۱).

کشت اولیه باکتری

ویال لیوفیلیزه باکتری در شرایط استریل و در زیر هود بیولوژیک با افزودن محتویات ویال به ۵ میلی لیتر آب مقطر استریل احیا شد. سوسپانسیون حاصل روی محیط کشت مک‌کانکی آگار کشت داده شد. پلیت‌های کشت داده شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه گردید تا کلنی‌های *اشریشیاکلی* ظاهر شدند. از این کلنی‌ها به عنوان مایع تلقیح برای آزمون‌های ارزیابی اثر ضدباکتریایی اسانس‌های گیاهی در مرحله بعدی استفاده شد. سوسپانسیون باکتری با انتقال کلنی‌ها به آب مقطر استریل در شرایط سترون و در کنار شعله به وسیله لوپ سترون در چندین مرحله تهیه گردید. تعداد سلول‌های باکتری در سوسپانسیون با استفاده از لام توما شمارش و در حدود ۵×۱۰^{۱۰} سلول در میلی‌لیتر تنظیم گردید (۲۲).

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC)

برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی رشد *اشریشیاکلی* طبق روش استاندارد، ۱۵ لوله آزمایش آماده شده و در هر کدام مقدار ۵ میلی‌لیتر از محیط کشت مولر هینتون براث ریخته شد. لوله‌ها پس از سترون‌سازی در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه، در محیط آزمایشگاه سرد شدند. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری به محتویات هریک از لوله‌ها اضافه شد. تعداد سلول‌های باکتری در هر لوله آزمایش در حدود ۵×۱۰^{۹} تنظیم گردید. سپس به هر لوله به ترتیب مقادیر ۰/۰۱، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از هریک از اسانس‌های آویشن شیرازی، برگ‌بو و بابونه به طور جداگانه اضافه شد. لوله‌ها در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سلسیوس برای مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. پس از ۲۴ ساعت، لوله‌ها بازرسی شده و کمترین غلظت اسانس که مانع از رشد باکتری و کدر شدن محیط کشت شده بود به عنوان حداقل غلظت بازدارنده رشد برای هر اسانس تعیین گردید. تمامی آزمایشات در سه تکرار انجام شد (۲۳).

تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC)

به منظور تعیین حداقل غلظت کشندگی، ۰/۱ میلی‌لیتر از محتویات لوله‌هایی که رشد باکتری و کدر شدن محیط کشت در آنها دیده نشده بود برداشته شده و هرکدام به طور جداگانه بر روی محیط کشت سترون مولر هینتون آگار، کشت داده شد. سپس پتری‌دیش‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. کمترین غلظت اسانس که منجر به عدم رشد و تکثیر باکتری شده بود (در این آزمایش، پتری‌دیش‌های با کمتر از تعداد ۱۰ کلنی) به عنوان حداقل غلظت کشندگی باکتری برای هر اسانس در نظر گرفته شد (۲۳).

کشت و شمارش باکتری در پتری‌دیش‌های نمونه و شاهد

تعداد ۵۱ پتری‌دیش آماده شد. ۳ عدد از پتری‌دیش‌ها مربوط به شاهد و ۴۸ پتری‌دیش دیگر مربوط به ۱۶ آزمایش طراحی شده توسط نرم‌افزار بودند که هر آزمایش در سه تکرار جداگانه انجام شد. در هر پتری‌دیش مقدار ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت مک‌کانکی‌آگار استریل شده ریخته شد. طبق طراحی آزمایشات انجام شده توسط نرم‌افزار در هر پتری‌دیش مقادیر معین از هریک از سه اسانس گیاهی قبل از بستن محیط کشت به وسیله میکروپیپت اضافه شد. در هر پتری‌دیش مقدار ۰/۲ میلی‌لیتر از سوسپانسیون رقیق‌شدهٔ باکتری تلقیح گردید. پتری‌دیش‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شدند تا کلنی‌های *اشریشیاکلی* ظاهر شدند. با شمارش تعداد کلنی‌های باکتری در هر پتری‌دیش و مقایسه با پتری‌دیش‌های شاهد درصد ممانعت از رشد باکتری *اشریشیاکلی* در هر نمونه محاسبه شد. این آزمایشات در یک دوره زمانی ۱ ماهه در مرکز تحقیقات سلولی مولکولی دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائم شهر انجام گردید.

نرم‌افزار و روش آماری مورد استفاده

در این تحقیق از نرم‌افزار Qualitek-4 به منظور طراحی آزمایشات بررسی اثر ترکیبی سه اسانس بر رشد باکتری *اشریشیاکلی* پاتوژن استفاده شده است. تجزیه و تحلیل نتایج آزمایشگاهی نیز با استفاده از همین نرم‌افزار و بر اساس روش آماری کسری از فاکتوریل کامل (روش تاگوچی) و شاخص آماری نسبت سیگنال به نویز انجام شده است.

جدول ۱: فاکتورها و سطوح هریک از آن‌ها در بررسی اثر ضدباکتریایی اسانس‌های آویشن شیرازی، برگ‌بو و بابونه بر باکتری *اشریشیاکلی*

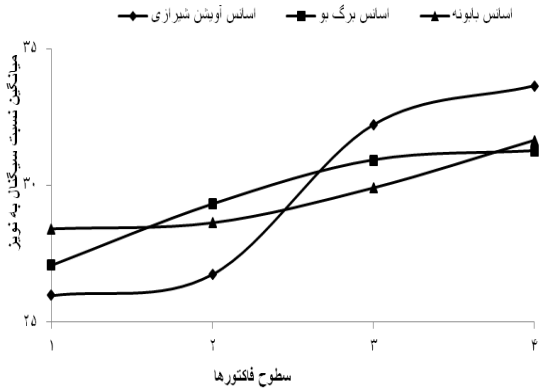
سطح فاکتور مورد بررسی	دوز اسانس آویشن شیرازی (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	دوز اسانس برگ‌بو (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	دوز اسانس بابونه (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)
۱	۰/۵	۰/۵	۰/۵
۲	۰/۷	۰/۷	۰/۷
۳	۰/۹	۰/۹	۰/۹
۴	۱	۱	۱

یافته‌ها

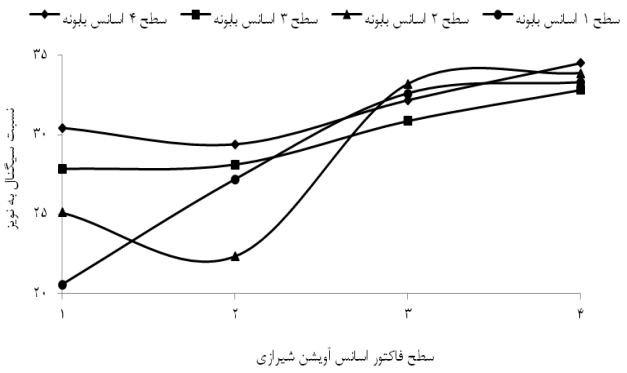
مقادیر حداقل غلظت بازدارندگی برای اسانس آویشن شیرازی برابر با ۰/۰۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و برای اسانس‌های برگ‌بو و بابونه به ترتیب برابر با ۰/۱ و ۰/۰۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تعیین گردید. همچنین حداقل غلظت کشندگی برای اسانس‌های آویشن شیرازی، برگ‌بو و بابونه به ترتیب برابر با ۰/۱، ۰/۵ و ۰/۵ به دست آمد. به منظور تعیین فرمولاسیون ضدباکتریایی ترکیبی بهینه، سه اسانس گیاهی آویشن شیرازی، برگ‌بو و بابونه هریک در چهار سطح با توجه به نتایج آزمون‌های تعیین حداقل غلظت کشندگی و حداقل غلظت بازدارندگی انتخاب شدند (جدول ۱). طراحی آزمایشات توسط نرم‌افزار Qualitek-4 به صورت یک آرایه متعامد شامل ۱۶ آزمایش مختلف در جدول ۲ ارایه شده است. نتایج اندازه گیری‌های آزمایشگاهی در سه تکرار برای هر آزمایش (جدول ۳)، توسط نرم‌افزار تجزیه و تحلیل شد. متوسط تعداد کلنی‌های ظاهر شده در پتری‌دیش‌های شاهد برابر با ۳۵ کلنی بوده است.

برای محاسبه اثر اصلی هر فاکتور، اثر تمام سطوح آن فاکتور در طراحی محاسبه شد و هر سطح که اثر آن بیشتر بود موثرتر در نظر گرفته شد. اثر هر سطح در هر یک از فاکتورها از میانگین سیگنال به نویز آزمایشاتی که آن سطح از فاکتور مورد نظر در آرایه طراحی دارد به دست آمد. میانگین سیگنال به نویز برای هریک از سه اسانس مورد بررسی در شکل ۱ نشان داده شده است. سهم فاکتور دوز اسانس آویشن شیرازی در ممانعت از رشد باکتری *اشریشیاکلی* برابر با ۶۴/۱۹۲٪، سهم فاکتور دوز اسانس برگ‌بو برابر با ۱۳/۵۴۱٪ درصد و سهم فاکتور دوز اسانس بابونه نیز ۶/۸۸۶٪ بوده است.

شرایط فرمولاسیون بهینه ترکیبی سه اسانس جهت دستیابی به بیشترین راندمان بازدارندگی رشد باکتری *اشریشیاکلی* تعیین گردید. در شرایط بهینه، دوز هر سه اسانس آویشن شیرازی، برگ‌بو و بابونه باید در سطح ۴ خود یعنی ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر باشد.



شکل ۱: میانگین مقادیر سیگنال به نویز برای سطوح مختلف اسانس‌های آویشن شیرازی، برگ‌بو و بابونه در بازدارندگی رشد باکتری *اشریشیاکلی*



شکل ۲: اثرات متقابل فاکتورهای اسانس آویشن شیرازی و اسانس بابونه در ممانعت از رشد باکتری *اشریشیاکلی*

بررسی اثرات متقابل هریک از فاکتورها نسبت به یک فاکتور دیگر نشان داده که بیشترین تاثیر متقابل مابین فاکتورهای دوز اسانس آویشن شیرازی و دوز اسانس بابونه وجود دارد (شکل ۲). برای این دو فاکتور شاخص شدت اثر متقابل برابر با ۳۳/۴۴٪ بوده است. همچنین فاکتورهای دوز اسانس برگ‌بو و دوز اسانس بابونه نیز به مقدار ۱۳/۹۲٪ بر همدیگر اثر متقابل داشته‌اند (شکل ۳). اما کمترین برهمکنش مابین فاکتورهای دوز اسانس آویشن شیرازی و دوز اسانس برگ‌بو مشاهده شده است که فقط در حد ۱/۱۱٪ بوده است (شکل ۴).

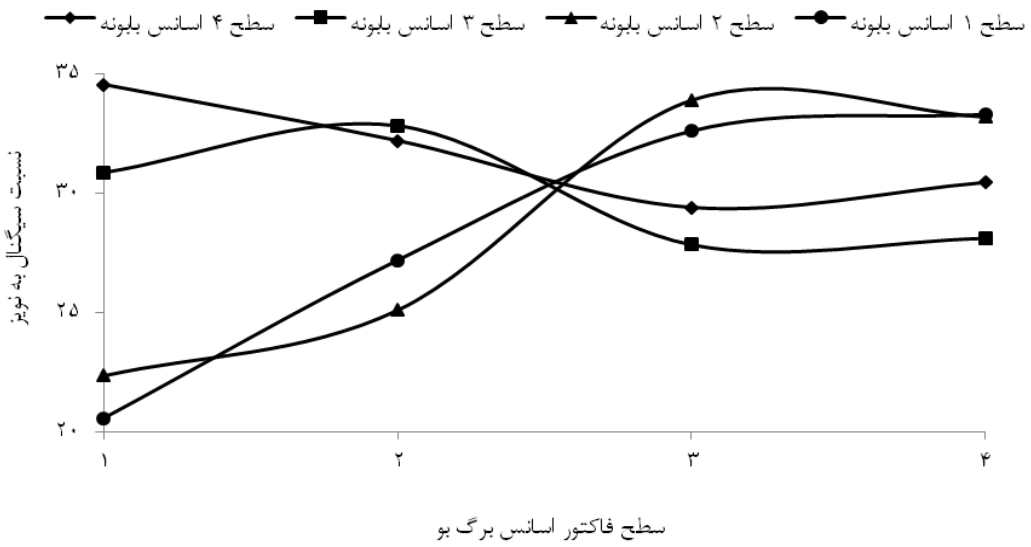
درصد ممانعت از رشد باکتری *اشریشیاکلی* در شرایط بهینه (مقدار تئوری درصد ممانعت از رشد باکتری در شرایط بهینه) توسط نرم‌افزار محاسبه شده و برابر با ۷۲/۷۶٪ بوده است. مجددا بررسی تاثیر بازدارندگی رشد باکتری *اشریشیاکلی* در اثر اسانس‌های گیاهی در شرایط بهینه انجام شد. تعداد کلنی‌های ظاهر شده در پتری‌دیش‌های کنترل در سه تکرار برابر با ۴۲، ۴۵ و ۴۰ کلنی بوده که متوسط آن برابر با ۴۲ کلنی در نظر گرفته شد. در حالی که تعداد کلنی‌های باکتری در پتری‌دیش‌های نمونه در سه تکرار برابر با ۲۰، ۱۷ و ۱۵ کلنی بوده که به طور متوسط برابر با ۱۷ کلنی در نظر گرفته شد. به عبارتی ۵۹/۵۲٪ بازدارندگی رشد باکتری در شرایط بهینه در آزمایشگاه به دست آمد. از مقایسه این درصد ممانعت با مقدار تئوری محاسبه شده توسط نرم افزار (۷۲/۷۶۱٪) مشخص می‌شود که مقدار تئوری و مقدار واقعی دارای ۸۱/۸٪ تطابق با هم بوده‌اند.

جدول ۲: سطوح هریک از فاکتورها در آزمایشات پیشنهادی نرم‌افزار برای بهینه‌سازی اثر ضدباکتریایی فرمولاسیون ترکیبی سه اسانس آویشن شیرازی، برگ‌بو و بابونه بر باکتری *اشریشیاکلی*

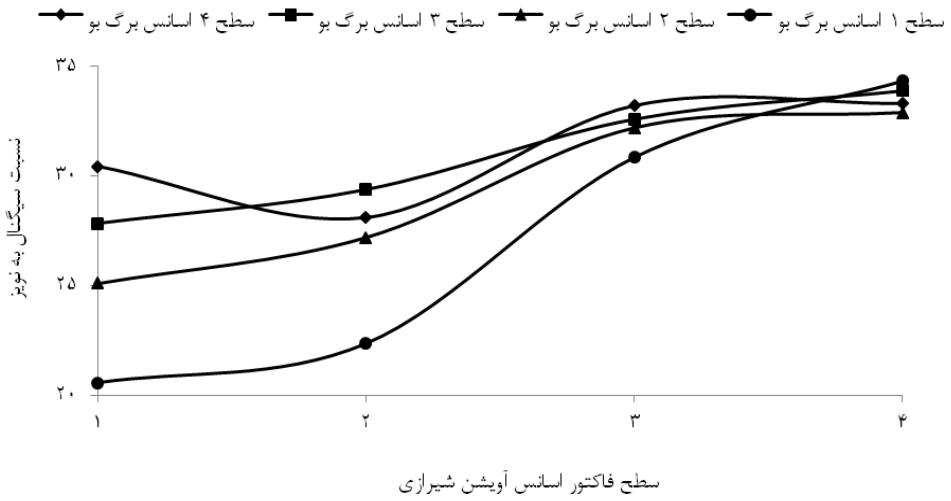
شماره آزمایش	سطح فاکتور شماره ۱ (دوز اسانس آویشن شیرازی)	سطح فاکتور شماره ۲ (دوز اسانس برگ‌بو)	سطح فاکتور شماره ۳ (دوز اسانس بابونه)
۱	۱	۱	۱
۲	۱	۲	۲
۳	۱	۳	۳
۴	۱	۴	۴
۵	۲	۱	۲
۶	۲	۲	۱
۷	۲	۳	۴
۸	۲	۴	۳
۹	۳	۱	۳
۱۰	۳	۲	۴
۱۱	۳	۳	۱
۱۲	۳	۴	۲
۱۳	۴	۱	۴
۱۴	۴	۲	۳
۱۵	۴	۳	۲
۱۶	۴	۴	۱

جدول ۳: تاثیر فرمولاسیون ترکیبی سه اسانس آویشن شیرازی، برگ‌بو و بابونه در ممانعت از رشد باکتری *اشریشیاکلی*

شماره آزمایش	تکرار اول		تکرار دوم		تکرار سوم		میانگین درصد ممانعت از رشد باکتری در سه تکرار
	تعداد کلنی	درصد بازدارندگی	تعداد کلنی	درصد بازدارندگی	تعداد کلنی	درصد بازدارندگی	
۱	۳۲	۸/۵۱	۳۰	۱۴/۲۸	۳۱	۱۱/۴۳	۱۱/۴۳
۲	۳۰	۱۴/۲۸	۲۸	۲۰	۲۷	۲۲/۸۵	۱۹/۰۵
۳	۲۶	۲۵/۷۱	۲۷	۲۲/۸۵	۲۶	۲۵/۷۱	۲۴/۷۶
۴	۲۴	۳۱/۴۳	۲۳	۳۴/۲۸	۲۳	۳۴/۲۸	۳۳/۳۳
۵	۳۰	۱۴/۲۸	۳۱	۱۱/۴۳	۳۰	۱۴/۲۸	۱۳/۳۳
۶	۲۷	۲۲/۸۵	۲۷	۲۲/۸۵	۲۷	۲۲/۸۵	۲۲/۸۵
۷	۲۵	۲۸/۵۷	۲۵	۲۸/۵۷	۲۴	۳۱/۴۳	۲۹/۵۲
۸	۲۶	۲۵/۷۱	۲۵	۲۸/۵۷	۲۷	۲۲/۸۵	۲۵/۷۱
۹	۲۲	۳۷/۱۴	۲۴	۳۱/۴۳	۲۲	۳۷/۱۴	۳۵/۲۴
۱۰	۲۰	۴۲/۸۵	۲۲	۳۷/۱۴	۲۰	۴۲/۸۵	۴۰/۹۵
۱۱	۲۰	۴۲/۸۵	۱۹	۴۵/۷۱	۲۱	۴۰	۴۲/۸۵
۱۲	۱۹	۴۵/۷۱	۱۹	۴۵/۷۱	۱۹	۴۵/۷۱	۴۵/۷۱
۱۳	۱۷	۵۱/۴۳	۱۶	۵۴/۲۸	۱۶	۵۴/۲۸	۵۳/۳۳
۱۴	۱۹	۴۵/۷۱	۲۰	۴۲/۸۵	۲۰	۴۲/۸۵	۴۳/۸۰
۱۵	۱۸	۴۸/۵۷	۱۷	۵۱/۴۳	۱۸	۴۸/۵۷	۴۹/۵۲
۱۶	۱۹	۴۵/۷۱	۱۷	۵۱/۴۳	۲۰	۴۲/۸۵	۴۶/۶۶



شکل ۳: اثرات متقابل فاکتورهای اسانس برگ‌بو و اسانس بابونه در ممانعت از رشد باکتری *اشریشیاکلی*



شکل ۴: اثرات متقابل فاکتورهای اسانس آویشن شیرازی و اسانس برگ‌بو در ممانعت از رشد باکتری *اشریشیاکلی*

بحث

بیشترین نقش را در ممانعت از رشد باکتری اشریشیاکلی، اسانس آویشن شیرازی داشته و در بین سه اسانس بررسی شده بیشترین تاثیر باکتری‌کشی را از خود نشان داده است. نتیجه این تحقیق با نتایج گزارش شده توسط Nascimento (2009) و بهنام و علی اکبرلو (۱۳۹۲) مطابقت دارد. نتایج تحقیق حاضر نیز مبین خاصیت ضدباکتریایی آویشن شیرازی بر روی باکتری *اشریشیاکلی* بوده است. در تحقیق Goudarzi و همکاران، عصاره آویشن شیرازی به تنهایی در غلظت ۰/۷۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر دارای اثر ضدباکتریایی خوبی بر روی *اشریشیاکلی* بوده است. ۰/۷۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از پودر خشک شده عصاره به عنوان مقادیر MIC و MBC بر اساس وزن خشک عصاره الکلی، تعیین گردید (**۲۴**). این در حالی است که نتایج تحقیق حاضر نشان داد که مقادیر بسیار کمتر از اسانس آویشن شیرازی قادر به بازدارندگی رشد و حتی کشتن *اشریشیاکلی* است. به عبارتی مقایسه نتایج تحقیق حاضر با تحقیق Goudarzi و همکاران نشان داد که اثرات ضدباکتریایی اسانس آویشن بیشتر از عصاره الکلی آن می‌باشد. این خاصیت به وجود مقادیر قابل توجهی از ترکیباتی مانند تیمول و کارواکرول در اسانس آویشن برمی‌گردد. در تحقیق حاضر بهترین درصد بازدارندگی رشد باکتری در شرایط بهینه نزدیک به ۶۰٪ بوده است. البته باید توجه داشت که غلظت استفاده شده از عصاره سیر در تحقیق ایشان ۱۰ برابر غلظت استفاده شده از اسانس‌های گیاهی در تحقیق حاضر بوده است. بنابراین این احتمال وجود دارد که با کاربرد غلظت‌های بالاتر از اسانس‌ها بتوان به نتایج بهتری نیز دست یافت. عصاره استخراج شده از گیاه نعناع فلفلی در غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر دارای اثر کشندگی بر روی باکتری *اشریشیاکلی* بوده که این غلظت با دوز موثر در تحقیق حاضر همخوانی دارد (**۱۵**).

سهم اسانس بابونه در جلوگیری از رشد باکتری *اشریشیاکلی* در حد ۷ درصد بوده است. تحقیقات نشان داده که اثر ضد قارچی اسانس بابونه بیشتر از اثرات ضدباکتریایی آن می‌باشد. همچنین باکتری‌های گرم منفی مانند *اشریشیاکلی* نسبت به این اسانس حساسیت کمتری دارند (**۲۵**، **۶**). در تحقیق حاضر نیز نتایج به دست آمده موید اثرات ضدباکتریایی نسبتا ضعیف این اسانس در ممانعت از رشد باکتری *اشریشیاکلی* بوده است. به طوریکه اثر بازدارندگی این اسانس بر رشد باکتری *اشریشیاکلی* کمتر از اثرات ضدباکتریایی اسانس‌های آویشن شیرازی و برگ‌بو بوده است.

سهم اسانس برگ‌بو در جلوگیری از رشد باکتری *اشریشیاکلی* در حد ۱۳ درصد بوده است. تاکنون مطالعه خاصی در مورد اثر اسانس برگ‌بو بر باکتری *اشریشیاکلی* گزارش نشده است. اثر بازدارندگی این اسانس بر رشد باکتری *اشریشیاکلی* کمتر از اسانس آویشن شیرازی و بیشتر از اسانس بابونه بوده است.

بیشترین تفاوت اثرات ضدباکتریایی مابین سطوح ۱ و ۲ مربوط به فاکتور دوز اسانس برگ‌بو بوده است. به گونه‌ای که میانگین سیگنال به نویز سطح ۲ این فاکتور نسبت به میانگین سیگنال به نویز سطح ۱ آن به اندازه ۲/۲۳۹ واحد بیشتر بوده

است. در مورد فاکتور دوز اسانس آویشن شیرازی، تفاوت قابل توجهی مابین اثرات ضدباکتریایی سطوح ۱ و ۲ وجود ندارد و تفاوت میانگین سیگنال به نویز سطح ۲ این فاکتور با میانگین سیگنال به نویز سطح ۱ آن فقط ۰/۷۷۲ بوده است. همچنین در مورد فاکتور دوز اسانس بابونه نیز، تفاوت مابین سطوح ۱ و ۲ حتی بسیار کمتر از مورد اسانس آویشن شیرازی بوده به گونه‌ای که تفاوت میانگین سیگنال به نویز سطح ۲ این فاکتور با میانگین سیگنال به نویز سطح ۱ آن فقط ۰/۲۱۶ بوده است.

درصد ممانعت از رشد باکتری *اشریشیاکلی* در شرایط بهینه برابر با ۷۲/۷۶٪ بوده است. از طرفی ۵۹/۵۲٪ بازدارندگی رشد باکتری در شرایط بهینه در آزمایشگاه به دست آمد. مقدار تئوری و مقدار واقعی دارای ۸۱/۸٪ تطابق با هم بوده‌اند. این نشان می‌دهد که روش آماری کسری از فاکتوریل کامل برای بهینه‌سازی فرمولاسیون ترکیبی این سه اسانس دارای کارایی قابل قبولی می‌باشد.

تاثیر باکتری‌کشی اسانس استخراج شده از گیاه آویشن شیرازی بر باکتری *اشریشیاکلی* قابل ملاحظه بوده است. می‌توان از این اسانس جهت تهیه محلول‌های طبیعی ضدعفونی‌کننده و باکتری‌کش در مقیاس تجاری استفاده نمود. اسانس‌های استخراج شده از برگ‌بو و بابونه تاثیر ضدباکتریایی نسبتا ضعیفی بر باکتری *اشریشیاکلی* داشتند. در شرایط بهینه با استفاده از ترکیب هر سه اسانس به مقدار ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر می‌توان تا ۶۰٪ از رشد باکتری *اشریشیاکلی* ممانعت نمود.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله از معاونت‌های محترم پژوهش و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحدهای قائم‌شهر و واحد شاهرود جهت حمایت‌های صورت گرفته در راستای اجرای این طرح پژوهشی کمال تشکر و سپاس را ابراز می‌دارند.

تعارض منافع:

بین نویسندگان و مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران هیچ گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

References

1. Hasani J, Nik Baher Z. Investigate the ecological needs of different species of (*Thymus* L.) in Lorestan province habitates. Eco-phytochem J Med Plants. 2013;1(3):22-34.
2. Zarezadeh A, Mirhossaini A, Arabzadeh M. Comparison on quality and quantityin essential oils of six species of *Thymus* L. in Yazd province. Eco-phytochem J Med Plants. 2013;1(2):39-49.
3. Najafpour Navaie M, Mirza M. Chemical composition of the essence extracted from the flowered shoot of *Zataria multiflora* Bioss. in four different provinces. Eco-phytochem J Med Plants. 2014;2(4):43-9.
4. Sharififar F, Mhafi MH, Mansouri SH. In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. J Food Control. 2007;18:800-805.
5. Tubaro A, Zilli C, Redaelli C, Della Loggia R. Evaluation of antiinflammatory activity of a chamomile extract topical application. Planta Medica. 1984;50(4):359.
6. Izadi Z, Modares sanavi AM, Sorooshzadeh A, Esna-Ashari M, Davoodi P. Antimicrobial activity of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) and feverfew (*Tanacetum parthenium* L.). Armaghane Danesh. 2013;18(1):31-43. [In Persian]
7. Rabiei S, Hosseini H, Rezaei M, Mousavi, T. Inhibitory effects of Ajowan essential oil on growth of *Listeria monocytogenes* in rutilus frissi kutum broth medium and fillet. Iran J Nutr Sci Food Technol. 2013;8(2):71-80. [In Persian]
8. Gonzalez MJ, Marioli M. Antibacterial activity of water extracts and essential oils of various aromatic plants against *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood. J Invertebr pathol. 2010;104(3):209-13.
9. Rezayan A, Ehsani A. Evaluation of the chemical compounds and antibacterial properties of the aerial parts of persian *Heracleum persicum* essence. J Babol Univ Med Sci. 2015;17(6):26-32. [In Persian]
10. Mohammadi-Kamalabadi M, Karimi A, Rafieian M, Amjad L. Phytochemical study and anti viral effect evaluation of methanolic extract with fractions of aerial parts of euphorbia spinidens. J Babol Univ Med Sci. 2014;16(5):25-34. [In Persian]

11. Zareii B, Seyfi T, Movahedi R, Cheraghi J, Ebrahimi S. Antibacterial effects of plant extracts of Alcea Digitata L., Satureja Bachtiarica L. and Ferulago Angulata L. J Babol Univ Med Sci. 2014;16(1):31-7.

12. Nascimento GGF, Locatelli J, Freitas PC, Silva GL. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic resistant bacteria. Braz J Microbiol. 2000;31:247-56.

13. Valarmathy K, Babu PA, Abhilash M. Antimicrobial activity of ethanolic extracts of various plant leaves against selected microbial species. Electron J Environ Food Chem. 2011;2(1):92-4.

14. Arun P, Purushotham KG, Jayarani J, Kumari V. Invitro antibacterial activity of oldenlandia umbellata an Indian medicinal plant. J Pharm Sci Technol. 2010;2(4):198-201.

15. Fadaei S, Aberoomand Azar P, Sharifan A, Larijani K. Comparison of antibacterial activity and chemical composition of essential oil extracted from *Mentha piperita* L. Herb by microwave and hydrodistillation methods. Food Technol Nutr. 2011;8(3):28-36.

16. Behnam B, Aliakbarlou J. Antioxidant effects of *Zataria multiflora* and *Mentha longifolia* essential oils on chicken meat stored at 4°C. J Food Res. 2013;23(4):533-43.

17. Mahboubi M, Feizabadi M. The Antimicrobial activity of Thyme, Sweet Marjoram, Savory and Eucalyptus oils on *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus*. J Med Plants. 2009;2(30):137-44.

18. Noori N, Rokni N, Akhondzade Basti A, Misaghi A, Dabbagh Moghaddam A, Yahyaraeyat R, Ghanbari Sagharloo N. The antimicrobial effect of *Zataria multiflora* Boiss essential oil against *E.coli* O157:H7 in minced beef during refrigerated storage as a replacement for chemical preservatives in order to maintain the consumers health. Annu Mil Health Sci Res. 2012;10(3):194-7.

19. Minooeian Haghighi MH, Khosravi AR. Inhibition and destruction effects of Cuminum cyminum, Ziziphora clinopodioides and Nigella sativa essences on Aspergillus cells. J Babol Univ Med Sci. 2013;15(6):25-35. [In Persian]

20. Ortazavi SA, Sadeghi MAR. Adams food microbiology, 3rd E Ferdowsi University of Mashhad. 2006. [In Persian]

21. Malekydozzadeh M, Khadiv-Parsi P, Rezazadeh Sh, Abolghasemi H, Salehi Z, Li Q. Application of multistage steam distillation column for extraction of essential oil of *Rosemarinuse officinialis L.* Iran J Chem Eng. 2012;9(4):54-64.

22. Samiee B. Milk and milk products – enumeration of presumptive *Escherichia coli*: most probable number technique. Iran Nat Standard Org. 2000;5234:3-9.

23. Valardo PE. Antimicrobial resistance and susceptibility testing: an evergreen topic. J Antimicrob Chemoth. 2002;50(1):1-4.

24. Goodarzi M, Satari M, Najar Piraye Sh, Goodarzi Gh, Bigdeli M. Investigate the effects of water and alcoholic extracts of *Zataria multiflora* Bioss. on *E.coli.* J Lorestan Univ Med Sci. 2006;8(29):63-9.

25. Izadi Z, AghaAlikhani M, Esna-Ashari M, Davoodi P. Determining chemical composition of feverfew (*Tanacetum parthenium* L.) essential oil and evaluation of it's antimicrobial activity on some microbial strains. Zahedan J Res Med Sci. 2000;16:20-25. [In Persian]