J TOLOO E BEHDASHT, School of Public Health, Yazd Shahid Sadoughi Univ Med Sci

ORIGINAL ARTICLE
Received:2025/05/13 *Accepted:2025/07/21*

Investigating the Antibacterial Effect of a Combination of Essential Oils of the Plants in Mertus, Artemisia and Green Tea Extract on Listeria Monocytogenes, Staphylococcus Aureus and Escherichia Coli Using the Checker Board Method

Behnam Vahedi (MS)[1], Vahid Ghasemzadeh-Mohammadi (Ph.D.)[2], Behnam Alizadeh Salmani(M.Sc.)[3], Masoumeh Arab (Ph.D.)[4], Babak Asghari (Ph.D.)[5], Atefeh Rezae (Ph.D.)[6]

1.Master's student, Department of Nutrition and Food Hygiene, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

2.Assistant professor, Department of Nutrition and Food Hygiene, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

3.Master's degree, Department of Food Sciences and Technology, School of Public Health, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

4.Corresponding author:Assistant professor, Department of Food Sciences and Technology, School of Public Health, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

Email: arab.sepideh@gmail.com Tel: 09112571419

5.Assistant professor, Department of Microbiology, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

6.Ph.D.student, Department of Microbiology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Introduction: Consumer awareness of the health hazards of synthetic preservatives in food has led to an increase in studies on natural preservatives. Essential oils of Artemisia(Artemisia absinthium L.) essential oil of Myrtus(Myrtus communis L.) and green tea extract are compounds that have the potential to be used in food as natural preservatives.

Methods: The antimicrobial and interaction effects of Artemisia and Myrtus essential oil and green tea extract were evaluated against three foodborne pathogens Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus and Escherichia colie. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by phenotypic method and the antimicrobial effect was determined by checkerboard assay. Tests were repeated three times.

Results: MIC assay of Artemisia essential oil showed values of 5/12 µg/mL for Listeria monocytogenes and Escherichia colie and 25 µg/mL for Staphylococcus aureus. The MIC of Myrtus essential oil was 25 µg/mL for Listeria monocytogenes and Staphylococcus aureus and 125/3 µg/mL for Escherichia coli. Also, the MIC of green tea extract was 50 µg/mL for Listeria monocytogenes and Escherichia colie. Furthermore, fractional antibacterial combination profile (FICP) showed antagonistic interaction (antagonistic effect) and synergistic effect (synergistic effect) between the three agents against Escherichia coli and Listeria monocytogenes, while no significant interaction (indifference) was observed for Staphylococcus aureus and Escherichia coli.

Conclusion: These findings demonstrate the different antimicrobial potential of extracts derived from these three plants with significant contrast when combined with Escherichia coli, indicating caution in formulating multicomponent natural preservatives for this pathogen. The lack of synergistic or additive effects against Staphylococcus aureus emphasizes the importance of targeted selection and compatibility testing of plant antimicrobials for effective food safety interventions.

Key words: Artemisia Absinthium, Myrtus Communis, Green Tea Extract, Staphylococcus Aureus, Listeria Monocytogenes, Escherichia Coli, Checker Board Method

Conflict of interest: The authors declared no conflict of interest.

CC BY

This Paper Should be Cited as:
Author: Behnam Vahedi, Vahid Ghasemzadeh-Mohammadi, Behnam Alizadeh Salmani, Masoumeh Arab, Babak Asghari, Atefeh Rezae. Investigating the Antibacterial Effect of ……Tolooebehdasht Journal. 2025;24(3)119-131.[Persian]

[Downloaded from tbj.ssu.ac.ir on 2026-05-16]

[DOI: 10.18502/tbj.v24i3.20771]

بررسی اثرآنتی باکتریال ترکیب اسانس گیاهان مورد، درمنه و عصاره چای سبز بر روی باکتری‌های لیستریا منوسیتوژنز، استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلی به روش checker board (شطرنجی)

نویسندگان: بهنام واحدی[۱]، وحید قاسم زاده محمدی[۲]، بهنام علیزاده سلمانی[۳]، معصومه عرب[۴]، بابک اصغری[۵]، عاطفه رضایی[۶]

۱.دانشجوی کارشناسی ارشد،گروه تغذیه و بهداشت مواد غذایی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

۲.استادیار گروه تغذیه و بهداشت مواد غذایی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

۳.کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی شهید صدوقی یزد، ایران

۴.نویسنده مسئول: استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی شهید صدوقی یزد، ایران شماره تماس: ۰۹۱۱۲۵۷۱۴۱۹ Email: arab.sepideh@gmail.com

۵.استادیارگروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

۶.دانشجوی دکتری میکروبیولوژی پزشکی، گروه میکروبیولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

طلوع بهداشت

دو ماهنامه علمی پژوهشی
دانشکده بهداشت یزد
سال بیست وچهارم
شماره سوم
مرداد و شهریور
شماره مسلسل:۱۱۱

تاریخ وصول:۱۴۰۴/۰۲/۲۳
تاریخ پذیرش:۱۴۰۴/۰۴/۳۰

چکیده

مقدمه: افزایش آگاهی مصرف‌کنندگان نسبت به مضرات نگهدارنده‌های سنتزی، توجه به نگهدارنده‌های طبیعی را افزایش داده است. اسانس درمنه (آرتمیسیا آبسینتیوم)، اسانس مورد (میرتوس کومونیس) و عصاره چای سبز، پتانسیل استفاده به عنوان نگهدارنده طبیعی در مواد غذایی را دارند.

روش بررسی: اثر ضد میکروبی و اثرات متقابل این سه ترکیب در برابر سه پاتوژن غذایی، لیستریا مونوسیتوژنز ، استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کلی ارزیابی شد. حداقل غلظت بازدارنده (MIC) با روش فنوتیپی و اثر ترکیبی با سنجش شطرنجی تعیین شد. آزمون‌ها سه بار تکرار شدند.

یافته‌ها: MIC اسانس درمنه برای لیستریا مونوسیتوژنز و اشریشیا کلی۵/۱۲ µg/mL و برای استافیلوکوکوس اورئوس ۲۵ µg/mL بود.MCIاسانس مورد برای لیستریا مونوسیتوژنز و استافیلوکوکوس اورئوس ۲۵ µg/mL و برای اشریشیا کلی ۱۲۵/۳ µg/mL گزارش شد.MIC عصاره چای سبز ۵۰µg/mL برای لیستریا مونوسیتوژنز و اشریشیا کلی بود. پروفایل ترکیبی (FICP) اثرات سینرژیستی و آنتاگونیستی بین سه عامل را در برابر لیستریا مونوسیتوژنز و اشریشیا کلی نشان داد، در حالی که برای استافیلوکوکوس اورئوس اثر متقابل قابل توجهی مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: این یافته‌ها پتانسیل ضد میکروبی متفاوت این سه گیاه را نشان می‌دهند و بر احتیاط در ترکیب نگهدارنده‌های طبیعی چندجزئی برای اشریشیا کلی تأکید دارند. همچنین، فقدان اثر هم‌افزایی علیه استافیلوکوکوس اورئوس اهمیت انتخاب هدفمند و ارزیابی سازگاری ضد میکروبی گیاهی برای ایمنی غذایی را برجسته می‌کند.

واژه های کلیدی: آرتمیسیا آبسینتیوم ، میرتوس کومونیس ، عصاره چای سبز، استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا مونوسیتوژنز، اشرشیا کلی، روش checker board

[Downloaded from tbj.ssu.ac.ir on 2026-05-16]

[DOI: 10.18502/tbj.v24i3.20771]

CC BY-NC 4.0

مقدمه

آلودگی میکروبی مواد غذایی یک چالش مهم برای سلامت عمومی و ایمنی مواد غذایی در سطح جهان است. این آلودگی حاصل از میکروارگانیسم‌های مختلف از جمله باکتری‌ها، ویروس‌ها و انگل‌ها است که منجر به بیماری های ناشی از غذا می‌شود. سازمان بهداشت جهانی(WHO) اعلام کرده است که تقریباً از هر ۱۰ نفر در سراسر جهان ۱ نفر پس از مصرف مواد غذایی آلوده بیمار می‌شود که منجر به مرگ ۴۲۰۰۰۰ نفر در سال می‌شود که این آسیبپذیری در کودکان زیر پنج سال بیشتر است(۱). لیستریا مونوسیتوژنز، استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلی سه میکروارگانیسم مهم در ایجاد بیماری‌های غذایی می‌باشند. لیستریا مونوسیتوژنز یک باکتری گرم مثبت، میله ای، بی هوازی اختیاری، اکسیداز منفی و غیر اسپورزا است. این باکتری کاتالاز مثبت بوده و قادر به تخمیر گلوکز و تولید اسید لاکتیک است(۲) و به دلیل توانایی زنده ماندن و رشد در طیف گسترده ای از شرایط محیطی مانند دمای سرد، pH پایین و غلظت نمک بالا در پایان فرآیند تولید به عنوان یک میکروارگانیسم نگران کننده در صنایع غذایی شناخته شده است(۳).استافیلوکوکوس اورئوس یک پاتوژن مهم بالینی است که باعث طیف وسیعی از عفونت‌های انسانی، از عفونت‌های پوستی خفیف گرفته تا عفونت شدید بافتی و سپسیس می‌شود. عفونت های استافیلوکوکوس اورئوس به طور کلی منجر به استفاده مکرر از آنتی بیوتیک‌های ضد استافیلوکوک شده و منجر به افزایش نرخ مقاومت شده است. استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به آنتی بیوتیک همچنان یک نگرانی عمده برای سلامتی است و توسعه استراتژی های درمانی جدید را ضروری می کند(۴). باکتری اشرشیا کلی یک باکتری گرم منفی میله‌ای شکل است که به‌طور معمول در دستگاه گوارش انسان و حیوانات خونگرم یافت می‌شود. این باکتری به دلیل سازگاری بالا و توانایی بقا در شرایط مختلف، تهدیدی جدی برای ایمنی مواد غذایی در سراسر جهان به شمار می‌رود(۵). آلودگی مواد غذایی با اشرشیا کلی می‌تواند از طریق مسیرهای متعددی رخ دهد. یکی از مهم‌ترین این مسیرها، آلودگی مدفوعی است که در اثر تماس مستقیم یا غیرمستقیم مواد غذایی با مدفوع حیوانات آلوده رخ می‌دهد. این آلودگی می‌تواند در مراحل مختلف زنجیره تولید غذا، از جمله تولید اولیه (مثلاً آلودگی آب آبیاری مزارع)، فرآوری، توزیع و آماده‌سازی رخ دهد(۶). محصولات کشاورزی خام، گوشت چرخ کرده، شیر غیر پاستوریزه و آب آلوده، از جمله منابع رایج آلودگی با به شمار می‌روند(۷).

کنترل فرایند تولید موادغذایی و رعایت اصول بهداشتی از جمله مهم‌ترین اقدامات برای کنترل بار میکروبی مواد غذایی می‌باشد. از دیگر روش های کنترل بار میکروبی می‌توان به استفاده از مواد افزودنی و نگهدارنده‌های مصنوعی و طبیعی در ماده غذایی اشاره کرد(۸). با این حال، استفاده از نگهدارنده مصنوعی ممکن است عوارض جانبی و نامطلوب بر سلامت انسان داشته باشد. نگرانی مصرف‌کنندگان در رابطه با استفاده بیش از حد از مواد افزودنی شیمیایی سنتیک و مشکلات مربوط به سلامتی برخی از مواد نگهدارنده باعث شده‌است که توجه محققان و تولیدکنندگان به سمت استفاده از افزودنی‌ها و نگهدارنده‌های طبیعی مانند عصاره و اساس‌های گیاهی معطوف شود(۹). اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی ترکیباتی طبیعی هستند که از

CC BY-NC 4.0
[Downloaded from tbj.ssu.ac.ir on 2026-05-16]
[DOI: 10.18502/tbj.v24i3.20771]

بخش‌های مختلف گیاهان مانند گل‌ها، برگ‌ها، پوست، دانه‌ها و ریشه‌ها استخراج می‌شوند. اسانس‌ها به عنوان روغن‌های فرار شناخته می‌شوند و ترکیبات پیچیده‌ای از هیدروکربن‌ها و مشتقات اکسیژنه هستند که از مسیرهای بیوسنتزی ایزوپرنوئیدی تولید می‌شوند(۱۰).

گیاه مورد (میرتوس کومونیس Myrtus communis) یک گیاه معطر وحشی از خانواده موردیان Myrtaceae است. این گونه دارویی بومی جنوب اروپا از مجمع الجزایر مادیرا و آزور(پرتغال) وشمال آفریقا تا غرب آسیا (ایران و افغانستان) است و دارای فعالیت آنتی اکسیدانی، ضد التهابی و ضد میکروبی است(۱۱). ترکیبات اصلی موجود در این گیاه شامل ۱،۸-سینئول و α-پینن می‌باشد. آزمایشات به دست آمده از تقطیر جزئی نشان داده است که ترکیبات α-ترپینول (۷/۵-۸/۶٪)، میرتنول (۳/۰۹-۳/۵۷٪) و ۸،۱-cineole (۱۲/۰۶-۳۶/۳۲ ٪) بهترین فعالیت های ضد میکروبی را دارند(۱۲).گیاه درمنه (Artemisia absinthium L) از خانواده کاسنیان(Asteraceae) یک گیاه چند ساله بومی مناطق معتدل اوراسیا و شمال آفریقا است که به دلیل خواص دارویی و کاربردهای سنتی خود، از دیرباز مورد توجه بوده است و ترکیبات زیست فعال این گیاه شامل فلاونوئید، سسکوی‌ترپنوئید، دی‌ترپنوئید و کومارین می‌باشد. این گیاه به عنوان عوامل ضد مالاریا، آنتی اکسیدان، سیتوتوکسیک، ضد اسپاسم، محافظت کننده عصبی، ضد التهابی و ضد میکروبی معرفی شده است(۱۳). در بین نگهدارنده‌های طبیعی می‌توان به عصاره حاصل از چای سبز نیز اشاره کرد. چای سبز که از برگ‌های Camellia sinensis (Theaceae sp) استخراج می‌شود، قرن‌هاست که به طور گسترده در کشورهای آسیایی مانند چین، ژاپن، کره و هند به‌عنوان یک نوشیدنی مصرف می‌شود، چای سبز به دلیل داشتن پلی‌فنول‌های تقویت‌کننده سلامتی که دارای فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، ضدسرطان‌زایی، ضدجهش‌زایی، ضدالتهابی و ضدمیکروبی هستند، در سراسر جهان مورد توجه قرار گرفته است(۱۴).

برای شناسایی اثرات ضد میکروبی اسانس و عصاره های گیاهی روش های مخلفی وجود دارد ولی یکی از معتبر ترین روش ها جهت تعیین این خاصیت در آزمایشگاه ، روش(شطرنجی) می باشد که مورد تایید بسیاری از جوامع علمی می باشد. روش checker board در بین روش های آزمایشگاهی، بیشترین استفاده را برای ارزیابی ترکیبات ضد میکروبی دارد و بنابراین به عنوان روش مرجع در نظر گرفته می شود. روش شطرنجی به منظور بررسی فعالیت باکتریواستاتیک عوامل ضد میکروبی تنظیم شده است و با استفاده از آن اثرات سینرژیستی، آنتاگونیستی و بی تفاوتی عوامل ضد میکروبی مشخص می‌شود(۲).

با توجه به آن که تا کنون پژوهشی در رابطه با بررسی اثر اثرآنتی باکتریال ترکیب اسانس گیاهان مورد و درمنه و عصاره چای سبز بر روی باکتری‌های لیستریا منوسیتوژنز و استافیلوکوکوس اورئوس انجام نشده است، در پژوهش حاضر اثرات ضد میکروبی این سه گیاه به صورت جداگانه و ترکیبی بر روی این سه میکروارگانیسم بالقوه در صنایع غذایی صورت گرفته و مقدار سمیت یا عدم سمیت ترکیبات این گیاهان بر روی سلول های زنده جهت ایمنی و اطمینان برای مصرف، مورد پژوهش و بررسی قرار گرفته است.

CC BY-NC 4.0
[Downloaded from tbj.ssu.ac.ir on 2026-05-16]
[DOI: 10.18502/tbj.v24i3.20771]

روش بررسی

در این مطالعه از سویه‌های استاندارد لیستریا منوسیتوژنز(ATCC 13932)، استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 25923) و اشریشیا کلی (ATCC 25922) تهیه شده از مرکز استانداردهای میکروبی ایران استفاده شد. هر سه سویه ابتدا بر روی محیط بلاد آگار (برای باکتری های لیستریا مونوسیتوژنز و استافیلوکوکوس اورئوس) و مک‌کانکی آگار(برای باکتری اشریشیا کلی) کشت داده شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت در شرایط هوازی انکوبه شدند.

از کلونی‌های تازه، سوسپانسیون باکتریایی در محیط مایع(Nutrient Broth) تهیه و پس از انکوباسیون ۱۸–۲۴ ساعته، غلظت آن‌ها با استفاده از استاندارد نیم مک‌فارلند (۱/۵ ×۱۰^۸CFU/mL≈۰/۵ McFarland) تنظیم گردید. سوسپانسیون‌ها برای نگهداری بلندمدت در محیط کشت Tryptic Soy Broth (TSB) حاوی ۱۵٪ گلیسرول در دمای ۲۰- یا ۸۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند(۱۵).

TPC عصاره چای سبز طبق روش تعریف شده توسط ISO ۱۴۵۰۲ ۱:۲۰۰۵ تعیین شد. به طور خلاصه، ۰/۱ میلی‌لیتر از نمونه استخراج شده رقیق شده (۱:۱۰۰) به لوله‌های حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر از رقت ۱/۱۰ معرف فولین-سیوکالتو در آب اضافه شد. سپس، ۰/۴ میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم (۷/۵٪ w/v) اضافه شد و به مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. جذب در یک سل کوارتز در طول موج ۷۶۵ نانومتر با هدف۷۲۰۰ CECIL اندازه‌گیری شد. TPC به صورت معادل میلی‌گرم گالیک اسید در گرم (DW) نمایش داده شد. به منظور شناسایی و استانداردسازی ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس گیاهان درمنه و مورد، نمونه‌های استخراج‌شده توسط برگه آنالیز تهیه شده توسط شرکت گیاه کالا مستند گردید. آنالیز این اسانس‌ها با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی (GC-MS) انجام شد. استاندارد سازی اسانس‌ها بر اساس درصد نسبی هر ترکیب صورت گرفت. این فرایند امکان ارزیابی کیفیت اسانس‌ها و تعیین ماده مؤثره غالب را فراهم ساخته و به‌عنوان معیاری جهت کنترل کیفی و تضمین کارایی درمانی فرآورده‌های گیاهی مورد استفاده قرار گرفت.

در این مطالعه، اسانس گیاه مورد(Myrtus communis)، اسانس درمنه(Artemisia spp.) و عصاره چای سبز به صورت آماده از شرکت گیاه‌کالا (ایران) تهیه گردید. کلیه ترکیبات دارای برچسب مشخصات، تاریخ تولید و انقضا، و شرایط نگهداری استاندارد بوده و تا زمان استفاده در ظروف شیشه‌ای دربسته، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و دور از نور نگهداری شدند. به منظور تعیین حداقل غلظت مهارکننده(MIC) اسانس گیاهان مورد، درمنه و عصاره چای سبز علیه باکتری‌های لیستریا منوسیتوژنز، استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلی از روش استاندارد رقیق‌سازی در محیط مایع در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای(broth microdilution assay) استفاده شد. در ابتدا به هر یک از چاهک‌های پلیت‌های میکروتیتر، ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت Mueller-Hinton Broth(MHB) تلقیح گردید. سپس رای هر ترکیب گیاهی(دو اسانس و یک عصاره)، رقت‌های دو برابری به‌صورت سریالی تهیه شد. به این منظور۱۰۰ میکرولیتر از ماده مورد نظر به چاهک نخست اضافه گردید و پس از اختلاط کامل، ۱۰۰ میکرولیتر از آن به چاهک دوم منتقل شد. این روند تا چاهک دهم ادامه یافت و در نهایت۱۰۰

CC BY-NC 4.0
[Downloaded from tbj.ssu.ac.ir on 2026-05-16]
[DOI: 10.18502/tbj.v24i3.20771]

میکرولیتر باقی‌مانده از چاهک دهم حذف گردید تا توالی غلظتی یکنواخت ایجاد شود. سوسپانسیون‌های باکتریایی با استفاده از روش نیم مک‌فارلند(McFarland Standard۰/۵ ؛ معادل تقریبی $۱/۵\times۱۰^{۸}$ CFU/mL) تهیه شده و با استفاده از سرم فیزیولوژی استریل(حاوی ۰/۹٪ NaCl) تا غلظت نهایی $۱۰^{۵}$CFU/mL رقیق شدند.سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی به هر چاهک حاوی اسانس/عصاره اضافه شد تا حجم نهایی هر چاهک به ۲۰۰ میکرولیتر برسد.

جهت کنترل کیفیت آزمایش، چاهک یازدهم به عنوان کنترل مثبت(حاوی باکتری و محیط کشت بدون ماده گیاهی) و چاهک دوازدهم به عنوان کنترل منفی(حاوی محیط کشت و ماده گیاهی بدون باکتری) در نظر گرفته شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از انکوباسیون، بررسی رشد باکتریایی از طریق مشاهده کدورت چشمی و همچنین کشت چاهک های مشکوک بروی محیط مولر هینتون آگار(MHA) انجام شد. پایین‌ترین غلظتی از ماده گیاهی که در آن رشد باکتریایی مشاهده نشد، به‌عنوان حداقل غلظت مهارکننده(MIC) ثبت گردید(۱۶).

برای بررسی اثرات سینرژیستی ترکیبات اسانسی و عصاره‌ای، از روش Checkerboard assay استفاده شد. در ابتدا حداقل غلظت مهارکنندگی(MIC) هر یک از اسانس‌ها و عصاره‌های منتخب با استفاده از روش استاندارد میکروتیتر تعیین گردید. سپس ترکیب دو ماده(اسانس و عصاره) از یک چاهک پیش از MIC هرکدام آغاز شد تا امکان بررسی اثرات ترکیبی آن‌ها فراهم گردد.

برای تهیه ترکیبات، ابتدا در یکی از چاهک‌های پلیت یادرون کرایو، مخلوطی از محیط کشت مولر هینتون براث (Mueller-Hinton Broth) و اسانس یا عصاره با غلظت برابر با MIC تهیه شد. سپس از این محلول اولیه، سه ترکیب متفاوت در چاهک اول به میزان کل ۳۰۰ میکرولیتر تهیه گردید. به منظور انجام رقت سریالی، ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک اول خارج و دور ریخته شد و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول باقی‌مانده به چاهک دوم حاوی محیط کشت منتقل گردید. این روند تا چاهک شماره ۱۰ ادامه یافت تا سری رقت‌ها به‌طور کامل انجام شود. در ادامه، سوسپانسیون باکتریایی مورد نظر(با غلظت معادل نیم مک‌فارلند، تهیه‌شده در سرم فیزیولوژیک ۰/۹٪) به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به هر یک از چاهک‌ها افزوده شد. دو چاهک کنترل نیز در نظر گرفته شد: کنترل مثبت شامل باکتری و محیط کشت بدون ترکیبات گیاهی و کنترل منفی شامل ترکیب اسانس و عصاره در محیط کشت بدون حضور باکتری. پس از انکوباسیون پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، چاهک‌های مشکوک به عدم رشد باکتری به‌وسیله لوپ استریل به محیط کشت عمومی منتقل شدند. این محیط‌ها مجدداً به مدت ۲۴ ساعت در همان شرایط انکوبه شدند و در پایان، رشد یا عدم رشد باکتری بر روی محیط کشت بررسی گردید(۱۷). اثر متقابل ضد میکروبی اسانس‌ها و عصاره‌ها بر طبق معادله FICI(fractional inhibitory concentration Index) به دست آمد(۲۵):

$$\text{شاخص غلظت بازدارنده کسری} = \frac{MIC\ A\ (combination)}{MIC\ A\ (alone)} + \frac{MIC\ B\ (combination)}{MIC\ B\ (alone)} + \frac{MIC\ C\ (combination)}{MIC\ C\ (alone)}$$

در این فرمول MIC A(Combination) = حداقل غلظت مهار کنندگی استانس مورد به صورت ترکیبی،MIC

CC BY-NC 4.0
[Downloaded from tbj.ssu.ac.ir on 2026-05-16]
[DOI: 10.18502/tbj.v24i3.20771]

A(Alone) = حداقل غلظت مهار کنندگی اسانس مورد به صورت تکی، MICB(Combination)= حداقل غلظت مهار کنندگی اسانس درمنه به صورت ترکیبی، MIC B(Alone) = حداقل غلظت مهار کنندگی اسانس درمنه به صورت تکی، MIC C(Combination)= حداقل غلظت مهار کنندگی عصاره چای سبز به صورت ترکیبی، MIC C(Alone) = حداقل غلظت مهار کنندگی عصاره چای سبز به صورت تکی است.

بر طبق این معادله FICI<۰/۸ نشان دهنده اثر سینرژیستی، ۰/۸<FICI<۴ نشان دهنده عدم اثر متقابل و ۴ ≤FICI نشان دهنده اثر آنتاگونیستی می باشد. در این مطالعه برای توصیف ویژگی‌های کمی از آمار توصیفی به کمک میانگین و انحراف معیار استفاده شد. به منظور حصول بیشترین صحت درنتایج آماری، آزمون‌های مربوطه در ۳ تکرار انجام شد. از آنالیز واریانس (ANOVA) برای ارزیابی تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای مختلف با معیار P=۰/۰۵ استفاده شد. نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel و SPSS ترسیم شدند.

یافته ها

یافته های حاصل از حداقل اثر بازدارنده ترکیبات گیاهی بر بر روی باکتری های لیستریا مونوسیتوژنز، اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس در جدول ۱ نشان داده شده است.

همان طور که در این جدول مشخص است، نتایج نشان داد که MIC عصاره چای سبز بر باکتری لیستریا مونوسیتوژنز و اشرشیاکلی بیشتر از سایر عصاره های مورد آزمون بوده و به ترتیب برابر با µg/ml ۰/۵ ± ۵۰ و ۰/۴۸± ۵۰ می‌باشد. MIC اسانس مورد بر باکتری‌های لیستریا مونوسیتوژنز، استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلی به ترتیب µg/ml ۰/۰۴۵ ± ۲۵، ۰/۳۲ ± ۲۵ و ۰/۲۶ ± ۳/۱۲۵ و MIC اسانس درمنه نیز µg/ml ۰/۰۵ ± ۱۲/۵، ۰/۰۵ ± ۲۵ و ۰/۱۹± ۱۲/۵ گزارش شد.

نتایج نشان دهنده اثر بازدارندگی بیشتر عصاره چای سبز و اسانس مورد در باکتری های گرم مثبت نسبت به باکتری های گرم منفی می باشد.شکل۱ MIC ترکیب سه گانه عصاره چای، اسانس مورد و درمنه را بر اساس روش Checkerboard نشان می‌دهد. MIC ترکیبی بر باکتری‌های لیستریا مونوسیتوژنز، استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلی به ترتیب µg/ml ۰/۰۲۵± ۶/۲۵، ۰/۰۳± ۲۵ و ۰/۲ ± ۱۲/۵ گزارش شدند.

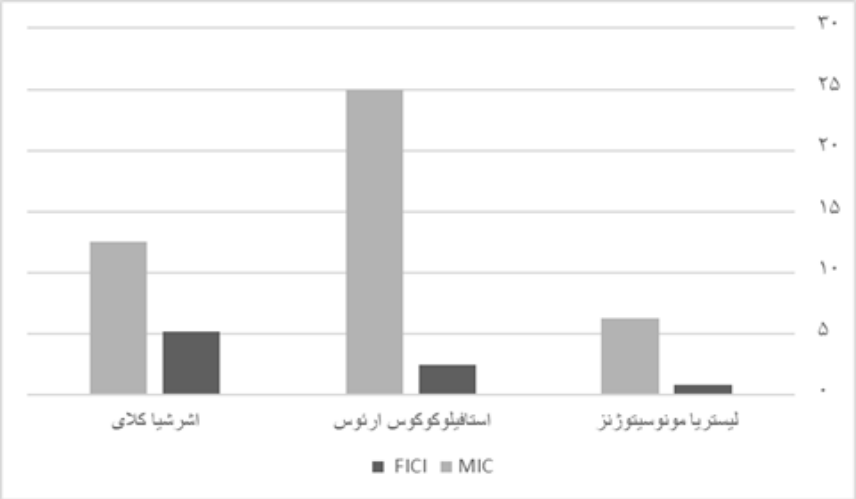
FICI ترکیبات نیز بر باکتری لیستریا مونوسیتوژنز ۰/۸۴ گزارش شد که نشان دهنده اثر هم‌افزایی بود از طرفی برای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ۲/۵ که نشان دهنده عدم اثر هم‌افزایی و تقابل و برای باکتری اشرشیا کلی۵/۲ که نشان دهنده اثر تقابل می‌باشد گزارش شد.

جدول ۱: MIC ترکیبات گیاهی روی باکتری های لیستریا مونوسیتوژنز، استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلی

ترکیب / باکتری	عصاره چای سبز (µg/ml)	اسانس مورد(µg/ml)	اسانس درمنه(µg/ml)
لیستریا مونوسیتوژنز	۵۰ ±۰/۰۵ [a]	۲۵±۰/۰۴۵[b]	۱۲/۵±۰/۰۵ [c]
استافیلوکوکوس اورئوس	*	۲۵±۰/۳۲ [a]	25 ±۰/۰۵ [a]
اشرشیا کلی	۵۰±۰/۴۸ [a]	۳/۱۲۵±۰/۲۶ [c]	۱۲/۵±۰/۱۹ [b]

(* = کاهش رشد، بدون مهار کامل)

CC BY-NC 4.0
[Downloaded from tbj.ssu.ac.ir on 2026-05-16]
[DOI: 10.18502/tbj.v24i3.20771]



شکل ۱:MIC ترکیب سه گانه بر اساس روش Checkerboard

بحث و نتیجه گیری

حداقل غلظت بازدارنده (MIC) به عنوان کمترین غلظت یک عامل ضد میکروبی تعریف می‌شود که قادر است رشد قابل مشاهده میکروارگانیسم را پس از ۱۸ تا ۲۴ ساعت انکوباسیون مهار نماید(۱۸). با توجه به مخلوط ۱:۱ با محیط کشت، غلظت اولیه در چاه اول نصف مقدار اولیه در لوله اصلی است. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که عصاره چای سبز توانست به طور مؤثری از رشد باکتری‌های لیستریا مونوسیتوژنز و اشرشیا کلی جلوگیری نماید، به گونه‌ای که مقدار MIC برای هر دو باکتری مذکور ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر(µg/ml) تعیین شد. اثرات ضد میکروبی عصاره چای سبز عمدتاً به حضور ترکیباتی نظیر پلی‌فنول‌ها، تانن‌ها و فلاونوئیدها نسبت داده می‌شود. این ترکیبات با مکانیسم‌های متعددی از جمله ایجاد اختلال در ساختار و عملکرد دیواره سلولی باکتری، مهار آنزیم‌های ضروری برای رشد و تکثیر میکروارگانیسم‌ها و همچنین جلوگیری از تشکیل بیوفیلم، موجب مهار رشد باکتری‌ها می‌شوند(۱۹).

عصاره چای سبز در غلظت کمتری نسبت به اسانس مورد و درمنه موجب جلوگیری از رشد میکروارگانیسم ها شد که می توان علت آن را حضور گسترده ترکیبات ضد میکروبی از جمله پلی فنول ها در عصاره نسبت به اسانس دانست(۲۰). در مطالعه‌ای دیگر، MIC عصاره چای سبز برای اشرشیا کلی و S.aureus به میزان ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد. همچنین نتایج این پژوهش نشان داد که عصاره چای سبز دارای اثرات باکتری‌کشی قوی‌تری در برابر باکتری‌های گرم مثبت بوده است، به طوری که حداقل غلظت باکتری‌کشی(MBC) آن در برابر برابر استافیلوکوکوس اورئوس برابر با ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود، در حالی که برای اشرشیاکلی هیچ MBCقابل تعیین نبود. این یافته‌ها نشان‌دهنده اثربخشی بیشتر عصاره چای سبز بر باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی می‌باشد(۲۱). تفاوت در حساسیت باکتری‌های گرم مثبت مانند لیستریا مونوسیتوژنز و گرم منفی مانند اشرشیا کلی به عصاره چای سبز را می‌توان به تفاوت‌های ساختاری دیواره سلولی آن‌ها نسبت داد؛ به‌ویژه ضخامت لایه پپتیدوگلیکان، اندازه منافذ و نفوذپذیری غشا نقش مهمی در این زمینه دارند(۲۲).

CC BY-NC 4.0
[Downloaded from tbj.ssu.ac.ir on 2026-05-16]
[DOI: 10.18502/tbj.v24i3.20771]

نتایج نشان داد که MIC اسانس مورد در برابر باکتری‌های لیستریا مونوسیتوژنز، استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلی به ترتیب(µg/ml) ۰/۰۴۵ ± ۲۵، ۰/۳۲ ± ۲۵ و ۰/۲۶± ۳/۱۲۵ گزارش شد. اسانس مورد حاوی ترپنوئیدهای فرار و هیدروکربن های مختلفی می‌باشد. از تقطیر برگ گیاه مورد میرتنیل استات(۱۵/۵ ٪)، β-لینالول(۳/ ۱۲٪) ۱،۸-cineole(۹/۹ ٪) و ژرانیل استات(۷/۴ ٪) به عنوان اجزای اصلی به دست می آیند. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که اثر بخشی اسانس گیاه مورد در برابر باکتری های گرم مثبت بیشتر از باکتری‌های گرم منفی است که علت آن ماهیت آبگریزی اسانس و در نتیجه محدودیت باکتری گرم منفی به دلیل لایه لیپوپلی ساکارید بیرونی می‌باشد(۲۳).

در مطالعه‌ای که توسط C.Saraiva و همکاران(۲۰۲۱) صورت گرفت، نشان داده شد که اسانس گیاه مورد خاصیت باکتریواستاتیکی فوق العاده‌ای دارد(۴). MCI اسانس درمنه در برابر باکتری‌های لیستریا مونوسیتوژنز، استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلی به ترتیب (µg/ml) ۰/۱۹± ۱۲/۵، ۰/۰۵±۲۵ و۰/۰۵± ۵ /۱۲ گزارش شد. تحقیقات مختلف نشان داده‌اند که اسانس درمنه غنی از سزکویی‌ترپن (sesquiterpenes) و مونوتروپن‌ها(monoterpenoids) می‌باشد.

از مهم ترین ترکیبات موجود در اسانس درمنه می‌توان به کافور(Camphor)، درمنه کتون(Artemisia Ketone)، ژرماکرین(Germacrene) و آلفا پینن(α-Pinene) اشاره کرد. ۱،۸-سینئول غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی را مختل می‌کند و نفوذپذیری را به سایر عوامل ضد میکروبی افزایش می‌دهد. هم افزایی بین کافور و اجزای جزئی مانند α-پینن ممکن است این اثر را تشدید کند کافور با سیالیت غشاء تداخل می‌کند، در حالی که کتون آرتمیزیا پمپ های خروجی را مهارکرده و MRSA را به آنتی بیوتیک های معمولی حساس می کند (۲۴).

نتایج حاصل از روش چکر بورد و محاسبه‌ی شاخص FICI(Fractional Inhibitory Concentration Index) نمایانگر اثر آنتاگونیستی در باکتری لیستریا مونوسیتوژنز (FICI=۰/۸۴) و فقدان اثر قابل توجه در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس (FICI =۲/۵) و اشرشیا کلای (FICI =۵/۲) بود. تبیین اثر سینرژیستی مشاهده‌شده در لیستریا مونوسیتوژنز می‌تواند به عوامل متعددی مرتبط باشد. بسیاری از ترکیبات موجود در اسانس‌ها، به‌ویژه ترپن‌های موجود در هر دو گیاه درمنه و مورد، می‌توانند به دلیل خواص لیپوفیلی خود، غشای سلولی باکتری‌ها را مختل کنند همچنین نشان داده شده است که این ترکیبات مختلف ممکن است در مسیرهای متابولیکی مختلف در لیستریا مونوسیتوژنز اختلال ایجاد کنند عصاره چای سبز مختل کننده آنزیم‌های موجود در لیستریا بوده و در مجموع عملکردهای سلولی متعددی را مهار کنند. ترکیب عصاره گیاهی چای سبز و اسانس درمنه و مورد ممکن است فراهمی زیستی و نفوذ ترکیبات فعال به سلول‌های باکتریایی را افزایش دهد(۲۵).

عدم مشاهده‌ی اثرگذاری بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس نیز می‌تواند ناشی از عوامل متعددی باشد. از جمله این عوامل، می‌توان به هدف قرار دادن سیستم‌های سلولی متمایز اشاره نمود. انحلال در غشای سیتوپلاسمی از جمله این سیستم‌ها است که توسط ترکیبات زیست‌فعال موجود در عصاره‌ی چای، اسانس

CC BY-NC 4.0
[Downloaded from tbj.ssu.ac.ir on 2026-05-16]
[DOI: 10.18502/tbj.v24i3.20771]

مورد و درمنه مورد هدف قرار می‌گیرد. اثر آنتاگونیستی اسانس مورد و درمنه به همراه چای سبز بر باکتری اشرشیا کلای بدون تعامل گزارش شد(FICI= ۵/۲). مطالعات اخیر نشان داد که اجزای محلول در چربی در گیاه درمنه(α-ترپینئول، لیمونن) و مورد(α-پینن، ۱،۸-سینئول) می‌توانند ساختارهای میسلی را در محیط‌های آبی تشکیل دهند و به طور مؤثر کاتچین‌های محلول در آب چای سبز مانند اپی‌گالوکاتچین گالاترا به دام بیندازند که در این صورت غلظت اپی گالوکاتچین آزاد برای تخریب غشا به سرعت کاهش و از طرفی دسترسی ترپن‌ها به پورین‌های غشا خارجی اشرشیا کلی کاهش می‌یابد(۲۶).

اسانس درمنه، اسانس مورد و عصاره‌ی چای سبز فعالیت‌های ضد میکروبی قابل توجهی را علیه باکتری های لیستریا مونوسیتوژنز، استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلی از خود نشان دادند. مقادیر MIC در میان عوامل مورد آزمایش و گونه‌های باکتریایی مختلف، متفاوت است؛ به طوری که عصاره‌ی چای سبز مقادیر MIC بیشتری در مقایسه با اسانس مورد و درمنه نشان داد. بررسی پروفایل ترکیبی آنتی‌باکتریال نشان داد که برهم‌کنش‌های متضاد بین اسانس درمنه، اسانس مورد و عصاره‌ی چای سبز منجر به اثر سینرژیستی بر رشد باکتری لیستریا مونوسیتوژنز می‌شود. در مقابل، هیچ اثر متقابل قابل توجهی در برابر استافیلوکوکوس اورئوس نداشته اما در مقابل باکتری اشرشیا کلی اثر آنتاگونیستی مشاهده شدکه این امر نشان‌دهنده‌ی تأثیرگذاری اسانس‌ها و عصاره‌ی ترکیب‌شده بر یکدیگر است.

پیشنهاد می‌شود که تحقیقات آتی بر روشن‌سازی مبانی مکانیکی این فعل و انفعالات و بهینه‌سازی ترکیبات عصاره و اسانس با هدف افزایش عملکرد ضد میکروبی برای کاربردهای ایمنی مواد غذایی، متمرکز گردد.

ملاحظات اخلاقی

طرح با کد اخلاق IR.UMSHA.REC.1403.545 در دانشگاه علوم پزشکی همدان تصویب شده است. پژوهش فاقد ملاحظات اخلاقی است.

سهم نویسندگان

وحید قاسم زاده محمدی و معصومه عرب و بابک اصغری طرح را طراحی و هدایت کرده اند. بهنام واحدی، عاطفه رضایی و بهنام علیزاده آزمون ها را انجام داده است. بهنام علیزاده و معصومه عرب پیش نویس مقاله را نوشته و به تایید سایر نویسندگان رسانده اند.

نویسندگان، نسخه نهایی را مطالعه و تایید نموده و مسئولیت پاسخگویی در قبال پژوهش را پذیرفته اند.

حمایت مالی

هیچ حمایت مالی از این طرح انجام نشده است.

تضاد منافع

نویسندگان اعلام می دارند هیچ گونه تضاد منافعی در این مقاله وجود ندارد.

تقدیر و تشکر

از دانشگاه علوم پزشکی همدان بابت حمایت از این طرح تشکر می شود.

References

1-Hashemi M, Salayani M, Afshari A & et al. The global burden of viral food-borne diseases: a systematic review. Current pharmaceutical biotechnology. 2023;24(13):1657-72.

CC BY-NC 4.0

[Downloaded from tbj.ssu.ac.ir on 2026-05-16]
[DOI: 10.18502/tbj.v24i3.20771]

2-Tariq S, Wani S, Rasool W & et al. A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. Microbial pathogenesis. 2019;134:103580.

3-Osek J, Lachtara B, Wieczorek K. Listeria monocytogenes–how this pathogen survives in food-production environments? Frontiers in microbiology. 2022;13:866462.

4-Saraiva C, Silva AC, García-Díez J & et al. Antimicrobial activity of Myrtus communis L. and Rosmarinus officinalis L. essential oils against Listeria monocytogenes in cheese. Foods. 2021;10(5):1106.

5-Barlaam A, Parisi A, Spinelli E & et al. Global emergence of colistin-resistant Escherichia coli in food chains and associated food safety implications: a review. Journal of food protection. 2019;82(8):1440-8.

6-Basavaraju M, Gunashree B. Escherichia coli: an overview of main characteristics. Escherichia coli-old and new insights. 2022:1-21.

7-Munekata PE, Pateiro M, Rodríguez-Lázaro D & et al. The role of essential oils against pathogenic Escherichia coli in food products. Microorganisms. 2020;8(6):924.

8-Elbehiry A, Marzouk E, Alzaben F & et al. Emerging Technologies and Integrated Strategies for Microbial Detection and Control in Fresh Produce. Microorganisms. 2025;13(7):1447.

9-Bisht D, Kumar D, Kumar D & et al. Phytochemistry and pharmacological activity of the genus artemisia. Archives of Pharmacal Research. 2021;44(5):439-74.

10-de Sousa DP, Damasceno ROS, Amorati R & et al. Essential oils: Chemistry and pharmacological activities. Biomolecules. 2023;13(7):1144.

11-Giampieri F, Cianciosi D, Forbes Hernández TY. Myrtle (Myrtus communis L.) berries, seeds, leaves, and essential oils: New undiscovered sources of natural compounds with promising health benefits. Food Frontiers. 2020;1(3):276-95.

12-György É, Laslo É, Csató E. Antibacterial activity of plant extracts against isolated from ready-to-eat salads. Acta Universitatis Sapientiae, Alimentaria. 2020;13(1):131-43.

13-Kim W-S, Choi WJ, Lee S & et al. Anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial effects of artemisinin extracts from Artemisia annua L. Korean Journal of Physiology & Pharmacology. 2015;19(1):21-7.

[Downloaded from tbj.ssu.ac.ir on 2026-05-16]

[DOI: 10.18502/tbj.v24i3.20771]

14-Kochman J, Jakubczyk K, Antoniewicz J & et al. Health benefits and chemical composition of matcha green tea: A review. Molecules. 2020;26(1):85.

15-Lencova S, Zdenkova K, Demnerova K & et al. Antibacterial and antibiofilm effect of natural substances and their mixtures over Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus and Escherichia coli. Lwt. 2022;154:112777.

16-Hennia A, Nemmiche S, Dandlen S & et al. Myrtus communis essential oils: insecticidal, antioxidant and antimicrobial activities: a review. Journal of Essential Oil Research. 2019;31(6):487-545.

17-Gan C, Langa E, Valenzuela A & et al. Synergistic activity of thymol with commercial antibiotics against critical and high WHO priority pathogenic bacteria. Plants. 2023;12(9):1868.

18-Franconi I, Lupetti A. In Vitro Susceptibility Tests in the Context of Antifungal Resistance: Beyond Minimum Inhibitory Concentration in Candida spp. Journal of fungi (Basel, Switzerland). 2023;9(12).

19-Sartini S, Djide MN, Amir MN & et al. Phenolic-rich green tea extract increases the antibacterial activity of amoxicillin against Staphylococcus aureus by in vitro and ex vivo studies. J Pharm Pharmacogn Res. 2020;8(6):491-500.

20-Răzvan PD, Cristinela ID, Rodica B. Comparative Quantitative Analysis of some Classes of Bioactive Compounds in six Green Tea Types Available on The Romanian Market. 2020.

21-Liu S, Zhang Q, Li H & et al. Comparative Assessment of the Antibacterial Efficacies and Mechanisms of Different Tea Extracts. Foods. 2022;11(4).

22-José da Costa G, dos Santos RM, Cerávolo IP & et al. Green Tea (Camellia sinensis) Extract is Effective against Biofilms of Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa, and Interferes on the Activity of Antimicrobial Drugs. Current Functional Foods. 2023;1(2):E190423216032.

23-Aleksic V, Knezevic P. Antimicrobial and antioxidative activity of extracts and essential oils of Myrtus communis L. Microbiological research. 2014;169(4):240-54.

24-Moo C-L, Osman MA, Yang S-K & et al. Antimicrobial activity and mode of action of 1,8-cineol against carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae. Scientific Reports. 2021;11(1):20824.

[Downloaded from tbj.ssu.ac.ir on 2026-05-16]

[DOI: 10.18502/tbj.v24i3.20771]

CC BY-NC 4.0

25-Ouedrhiri W, Mechchate H, Moja S & et al. Optimized antibacterial effects in a designed mixture of essential oils of Myrtus communis, Artemisia herba-alba and Thymus serpyllum for wide range of applications. Foods. 2022;11(1):132.

26-Barhouchi B, Menacer R, Bouchkioua S & et al. Compounds from myrtle flowers as antibacterial agents and SARS-CoV-2 inhibitors: In-vitro and molecular docking studies. Arabian journal of chemistry. 2023;16(8):104939.

[Downloaded from tbj.ssu.ac.ir on 2026-05-16]

[DOI: 10.18502/tbj.v24i3.20771]

CC BY-NC 4.0