

Research Paper

Assessment of the Antimicrobial Effects of the *Vulgaris Thymus* Ethanol Extract Against Human Pathogenic Bacteria

Ali Asghar Ghaderi¹, Baratali Fakheri², Nafise Mahdinezhad², *Saeede Saeedi³

1. MSc., Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran.
2. Assistant Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran.
3. MSc., Department of Plant Breeding and Biotechnology, Agricultural Biotechnology Institute, University of Zabol, Zabol, Iran.



Citation: Ghaderi AA, Fakheri B, Mahdinezhad N, Saeedi S. [Assessment of the Antimicrobial Effects of the *Vulgaris Thymus* Ethanol Extract Against Human Pathogenic Bacteria (Persian)]. *Journal of Sabzevar University of Medical Sciences*. 2016; 23(5):756-761. <http://dx.doi.org/10.21859/sums-2305756>

doi: <http://dx.doi.org/10.21859/sums-2305756>

Received: 12 Apr. 2016

Accepted: 05 Aug. 2016

ABSTRACT

Backgrounds The current study aimed at investigating the antimicrobial effects of *Vulgaris thymus* ethanol extract on the important human pathogens.

Methods & Materials The thymus alcoholic extract was provided based on a standard protocol. The following standard bacteria were also provided: *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *S. saprophyticus* ATCC15305, *Hafnia alvei* ATCC 51873, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Proteus mirabilis* ATCC 35659, *Serratia marcescens* ATCC 274, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

The minimum inhibitory concentration (MIC) of thymus ethanol extract on the bacteria was determined. The linear sensitivity of the bacteria against some antibiotics was also measured by the standard method of Kirby-Bauer disk diffusion.

Results The results showed that the thymus leaf alcoholic extract inhibited the bacterial growth in the evaluated concentrations. The MIC of 6/25 ppm was observed effective against *S. pneumoniae*, *H. alvei*, *P. mirabilis*, and *S. marcescens*.

Conclusion The results of the current study indicated the high effect of thymus alcoholic extract on the pathogenic bacteria. However, the medicinal application of plants requires further investigations.

Keywords:

Vulgaris thymus,
Antimicrobial Activ-
ity, Ethanol extract,
Human pathogenic
bacteria

* Corresponding Author:

Saeide Saeedi, MSc.

Address: Department of Plant Breeding and Biotechnology, Agricultural Biotechnology Institute, University of Zabol, Zabol, Iran.

Tel: +98 (901) 6364896

E-mail: s.saeedi12@yahoo.com

بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره اتانولی آویشن باغی در برابر باکتری‌های بیماری‌زای انسانی

علی اصغر قادری^۱، براتعلی فاخری^۲، نفیسه مهدی‌نژاد^۲، سعیده سعیدی^۳

۱- کارشناس ارشد، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

۲- استادیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

۳- کارشناس ارشد، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، پژوهشکده زیست‌فناوری کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

چکیده

تاریخ دریافت: ۲۴ فروردین ۱۳۹۵

تاریخ پذیرش: ۱۵ مرداد ۱۳۹۵

اهداف: هدف از این مطالعه بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره اتانولی آویشن باغی در برابر پاتوژن‌های مهم انسانی است.

مواد و روش‌ها: عصاره گیاهی آویشن با استفاده از دستگاه خلأ از مرکز (روتاری) انجام شد. باکتری به صورت استاندارد تهیه شد که شامل *Streptococcus pyogenes* ATCC® 19615™، *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619، *S. Saprophyticus* ATCC® 15305، *Hafnia alvei* ATCC 51873، *Acinetobacter. baumannii* ATCC 19606، *Enterococcus faecalis* ATCC 29212، *Proteus mirabilis* ATCC 35659، *Serratia marcescens* ATCC 274، *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923 است. حداقل غلظت بازدارندگی عصاره آویشن در غلظت‌های مختلف با روش رقت‌سازی در چاهک روی باکتری‌ها تعیین شد. حساسیت سویه‌ها به چند آنتی‌بیوتیک با روش استاندارد دیسک دیفیوژن کربی-بائر ارزیابی شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد عصاره برگ آویشن در همه غلظت‌ها باکتری‌ها را مهار می‌کند. کمترین غلظت مهارکنندگی در برابر *S. pneumoniae*، *H. alvei*، *P. mirabilis* و *S. marcescens* مشاهده شده است (۶/۲۵ ppm).

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان‌دهنده تأثیر زیاد عصاره الکلی روی باکتری‌های بیماری‌زا است. البته کاربرد بالینی این گیاهان نیازمند مطالعات بیشتر و وسیع‌تری است.

کلیدواژه‌ها:

آویشن باغی، فعالیت ضد میکروبی، عصاره اتانولی، باکتری بیماری‌زای انسانی

مواد و روش‌ها

گیاه آویشن باغی از مزرعه گیاهان دارویی در آباده شیراز تهیه شد و یک گیاه‌شناس دانشگاه ملی زابل آن را تأیید کرد. سپس این گیاه در سایه خشک و با آسیاب خرد شد. برای تهیه عصاره اتانولی ۱۰ گرم از گیاه در ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد قرار داده شد و به مدت یک روز روی شیکر قرار گرفت. بعد از فیلتر کردن با دستگاه روتاری عصاره‌گیری انجام شد.

سویه‌ها باکتری

باکتری به صورت استاندارد تهیه شد که شامل *Streptococcus pyogenes* ATCC® 19615، *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619، *S. Saprophyticus* ATCC® 15305، *Hafnia alvei* ATCC 51873، *Acinetobacter. baumannii* ATCC 19606، *Enterococcus faecalis* ATCC 29212، *Proteus mirabilis* ATCC 35659، *Serratia marcescens*

مقدمه

افزایش روزافزون باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها سبب شد تلاش مستمری برای یافتن داروهای جدید ضد میکروبی صورت گیرد. یکی از منابع یافتن این داروها گیاهانی هستند که در طب سنتی ایران به صورت تجربی از آن‌ها استفاده شده است [۱]. آویشن باغی با نام علمی *Thymus vulgaris* از خانواده نعنائیان و از گیاهان بومی ایران است. بافت رویشی آویشن باغی حاوی مواد مؤثر ضد میکروبی است. مهم‌ترین اجزای تشکیل‌دهنده اسانس این خانواده، تیمول و کاکرول است. این گیاه حاوی تانن، فلاونوئید، ساپونین و مواد تلخ است. از این گیاه برای درمان سرفه، گلودرد، برونشیت و آسم استفاده می‌شود [۲-۵]. هدف از این مطالعه بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره اتانولی آویشن باغی در برابر پاتوژن‌های مهم انسانی است.

* نویسنده مسئول:

سعیده سعیدی

نشانی: ایران، زابل، پژوهشکده زیست‌فناوری کشاورزی، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی.

تلفن: ۶۳۶۴۸۹۶ (۹۰۱) ۹۸+

پست الکترونیکی: s.saedi12@yahoo.com

باغی با استفاده از روش رقت‌سازی در چاهک بررسی شد. بدین منظور به هفت چاهک از پلیت‌های میکروتیتر میزان ۱۰۰ میکرولیتر از محیط مایع مغذی مولر هینتون براث (MHB) اضافه شد. به چاهک اول ۱۰۰ میلی‌لیتر از محلول رقیق شده عصاره (۵۰ ppm) اضافه شد و پس از مخلوط کردن، ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک اول برداشته به چاهک دوم اضافه شد. بدین ترتیب تا آخرین چاهک این کار انجام شد. از چاهک آخر ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت خارج و مقدار ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی حاوی ۱۰۸ واحد در میلی‌لیتر معادل ۰/۵ مک‌فارلند اضافه شد و در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. اولین لوله‌ای که از رشد باکتری پس از قراردادن در انکوباتور جلوگیری کرد به عنوان MIC در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

مطالعه شریف‌سلیح (۲۰۱۲) نشان داد ۳۰ نمونه جدا شده از سالمونلا تیفی‌موریوم ۱۰۰ درصد به آنتی‌بیوتیک‌های Amp، Tet، Gm، Chl، Cef، و Tri مقاوم بوده‌اند، به طوری که حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره اتانولی آویشن باغی در برابر سالمونلا تیفی‌موریوم غلظت ۲۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بوده است [۶]. در مطالعه نادى و راجید (۲۰۱۳) نتایج نشان داد قطر هاله‌های مهارى فلاتوئیدهای آویشن شامل 7 OR، Kaempferol 3 OR، OP، Luteolin 7 OR، Luteolin، Quercetin 3 OR، 7 OR، Chrysin 7 OR و Apigenin به ترتیب ۱۸±۰/۱۵، ۲۲±۰/۱۳، ۳۳±۰/۸، ۴±۰/۱۳، ۲۲±۰/۱۸، ۱۷±۰/۱۶ بوده است [۷].

در مطالعه دیگری، عصاره الکلی آویشن در غلظت‌های ۲۵، ۲۰، ۱۰ و ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر قطر هاله‌های مهارى ۲۱، ۱۵، ۱۴،

Staphylococcus aureus ATCC® 25923، ATCC 274 است. بعد از آماده‌سازی اولیه یک کلنی از باکتری در ۱۰ میلی‌لیتر محیط آبگوشتی تریپتیک سوی (TSB, Merck, Germany) کشت و به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تازه رشد کرده هر باکتری به محیط کشت منجمد آگار تریپتیک سوی انتقال داده شد و به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت.

تهیه سوسپانسیون میکروبی نیم مک‌فارلند

برای تهیه سوسپانسیون میکروبی یک روز قبل از انجام آزمایش، از کشت ذخیره مقداری از کلنی باکتری به محیط کشت شیب‌دار آگار مغذی (مرک آلمان) منتقل شد. پس از رشد سلول‌های باکتری روی سطح محیط کشت، سطح آن با محلول نرمال سالین شسته شد و سوسپانسیون غلیظ میکروبی به دست آمد. سپس مقداری از سوسپانسیون باکتریایی داخل لوله استریل دردار حاوی نرمال سالین ریخته و کدورت آن با اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و تا زمان برابری کدورت محلول با کدورت محلول ۰/۵ مک‌فارلند، با نرمال سالین رقیق شد. غلظت نهایی سوسپانسیون تولید شده به مقدار $10^8 \times 1/5$ تعیین شد. حساسیت سویه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سف‌تازیدیم (۳۰ µg)، تتراسیکلین (۳۰ µg)، اریترومایسین (۱۵ µg) و سفکسیم (۳۰ µg) (ساخت شرکت پادتن طب) با روش کربی‌بائر تعیین شد.

آزمون ضد میکروبی عصاره

حساسیت سویه‌های استاندارد باکتری نسبت به عصاره آویشن

جدول ۱. نتایج حاصل از اثرات ضد میکروبی عصاره برگ آویشن در برابر پاتوژن‌های انسانی.

الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی	حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC)	باکتری‌های استاندارد
E, CE, TE	۱۲/۵	S.aureus
-	۱۲/۵	S.pyogenes
E, CE, CF	۶/۲۵	S.pneumoniae
E, TE	۶/۲۵	H.alvei
E, CF, TE	۱۲/۵	S.saprophyticus
CE, TE	۱۲/۵	A.baumannii
E, CE	۱۲/۵	E.faecalis
E, TE	۶/۲۵	P.mirabilis
CE	۶/۲۵	S.marcescens

E=Erythromycin, CE=Cefixime, CF=Ceftazidime, TE=Tetracyclin

بیماری‌زا نشان داده است.

به هر حال کاربرد بالینی این گیاهان نیازمند مطالعات بیشتر و وسیع‌تر است و در صورت موفقیت‌آمیز بودن و استاندارد کردن نتایج تحقیقات، می‌توان از این گیاهان به عنوان جایگزین داروهای ضد میکروبی کم اثر فعلی استفاده کرد.

بحث

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد عصاره آویشن در غلظت‌های مختلف باکتری‌های گرم مثبت و منفی را مهار می‌کند. عصاره برگ آویشن در همه غلظت‌ها مهارکننده باکتری‌هاست. کمترین غلظت مهارکنندگی در برابر *S. pneumoniae*, *S. marcescens* و *H. alvei*, *P. mirabilis* (۶/۲۵ ppm) (جدول شماره ۱). باکتری‌های گرم منفی نسبت به عصاره آویشن حساس‌تر هستند.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه زابل انجام شده است. از سرکار خانم خواجه، کارشناس آزمایشگاه، به خاطر در اختیار گذاشتن امکانات و راهنمایی‌های ارزنده تقدیر و تشکر می‌شود. این مقاله حامی مالی ندارد.

۱۱ و ۹ در برابر استافیلوکوکوس اورئوس و قطر هاله‌های مهارتی ۱۹، ۱۴، ۱۳، ۱۰ و ۸ میلی‌متر در برابر اشرشیاکلی ایجاد کرده است [۸]. در مطالعه سادیکی و همکاران (۲۰۱۴) نتایج نشان داد در غلظت‌های ۰/۱۲۵، ۰/۰۶۲۵ و ۰/۰۳۱۲۵ (۷/۷) اسانس آویشن هیچ‌گونه رشدی از باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مشاهده نشده است [۹]. در مطالعه ون ورن و همکاران (۲۰۰۹) نتایج نشان داد حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس آویشن در برابر باکتری‌های *C. albicans*، *S. aureus* ATCC25923، *K. pneumoniae* ترتیب ۴/۴، ۳/۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است [۱۰].

در مطالعه خدایی‌مطلق و همکاران (۲۰۱۴) نتایج نشان داد قطر هاله مهارتی آویشن در غلظت‌های ۱۰، ۳۰ و ۵۰ در برابر استافیلوکوکوس اورئوس هاله‌های مهارتی $1 \pm 17/83$ ، 3 ± 29 و $37/5 \pm 37/72$ میلی‌متر بوده است [۱۱]. در مطالعه روسنوا و پروانو (۲۰۰۹) نتایج نشان داد قطر هاله مهارتی اسانس آویشن باغی در برابر باکتری‌های *S. aureus*، *L. monocytogenes*، *B. licheniformis*، *E. faecalis*، *E. coli*، *P. aeruginosa*، *S. enteritidis*، *Y. pseudotuberculosis*، *P. vulgaris*، *P. mirabilis*، *K. pneumoniae*، *E. aerogenes*، *C. albicans* و *M. pachydermatis* به ترتیب برابر $2/3 \pm 30/7$ ، $1/6 \pm 29/7$ ، $1/6 \pm 43/0$ ، $1/2 \pm 39/3$ ، $1/6 \pm 14/0$ ، $1/0 \pm 38/0$ ، $1/6 \pm 37/0$ ، $1/0 \pm 33/7$ ، $1/2 \pm 35/3$ میلی‌متر بوده است [۱۲].

در مطالعه دی‌پاسکوا و همکاران (۲۰۰۵) حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس آویشن باغی در برابر باکتری‌های *S. thymurium*، *S. aureus* و *E. coli*، *Pseudomonas*، *L. monocytogenes* ترتیب ۰/۰۳، ۰/۰۷، ۰/۱۵، ۰/۱ و ۷/۷ بوده است [۱۳].

در مطالعه دادگر و همکاران (۱۹۹۷) قطر هاله مهارتی در غلظت‌های ۱ و ۲ و ۴ میلی‌گرم از عصاره آویشن باغی در برابر استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین ۷/۵ و ۸/۲ و ۱۰/۵ میلی‌متر و در برابر استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متی‌سیلین ۶ و ۷/۵ و ۹ میلی‌متر بوده است [۱۴]. در مطالعه حقیقی و همکاران (۲۰۱۱) که اثر ضدقارچی اسانس‌های مختلف را روی کاندیدی آلبيکنس بررسی کردند نتایج نشان داد ۹۰ میکروگرم اسانس آویشن باغی برابر با ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۵۰ میکروگرم آویشن باغی برابر با ۱۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر است [۱۵].

در مطالعه ایملوان و همکاران (۲۰۰۹) با بررسی ترکیب شیمیایی اسانس آویشن روی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس و گونه‌های استرپتوکوکوس و اشرشیاکلی خواص ضدباکتریایی این عصاره به اثبات رسید [۴].

سوکوویک و همکاران (۲۰۰۸) اثر ضدقارچی اسانس آویشن باغی را بر درماتوفیتوزیس در مدل حیوان بررسی کردند [۵]. نتایج این مطالعه تأثیر زیاد عصاره الکلی را روی پاتوژن‌های

References

- [1] Shopsis B. Molecular Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerging Infectious Diseases*. 2001; 7(2):323-6. doi: 10.3201/eid0702.010236
- [2] Adwan K, Abu-Hasan N, Adwan G, Jarrar N, Abu-Shanab B, Abu-Zant A. Nosocomial infection caused by methicillin-resistant staphylococcus aureus in Palestine . *Microbial Drug Resistance*. 2005; 11(1):75-7. doi: 10.1089/mdr.2005.11.75
- [3] Zhang H, Chen F, Wang X, Yao HY. Evaluation of antioxidant activity of parsley (*Petroselinum crispum*) essential oil and identification of its antioxidant constituents. *Food Research International*. 2006; 39(8):833-9. doi: 10.1016/j.foodres.2006.03.007
- [4] Imelouane B, Amhamdi H, Wathelet JP, Ankit M, Khedid K, El Bachiri A. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of thyme (*thymus vulgaris*) from Eastern Morocco. *International Journal of Agriculture and Biology*. 2009; 11(2):205-8.
- [5] Soković M, Glamočlija J, Ćirić A, Kataranovski D, Marin PD, Vukojević J, et al. Antifungal Activity of the essential oil of *thymus vulgaris* L. and thymol on experimentally induced dermatomycoses. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2008; 34(12):1388-93. doi: 10.1080/03639040802130053
- [6] Sharif Salih S. The Antimicrobial activity of ethanol extract of *thymus vulgaris* on salmonella typhi in rabbits. *British Journal of Pharmacology and Toxicology*. 2012; 3(4):147-150.
- [7] Nadia Z, Rachid M. Antioxidant and antibacterial activities of *Thymus vulgaris* L. *Medicinal and Aromatic Plant Research Journal*. 2013; 1(1):5-11.
- [8] Fayad NK, Al-Obaidi OHS, Al-Noor TH, Oday Ezza M. Water and alcohol extraction of thyme plant (*thymus vulgaris*) and activity study against bacteria, tumors and used as anti-oxidant in margarine manufacture. *Innovative Systems Design and Engineering*. 2013; 4(1):41-51.
- [9] Sadiki M, Balouiri M, Barkal H, Maataoui H, Ibsoud Koraichi S, Elabed S. Synergistic antibacterial effect of *Myrtus communis* and *Thymus vulgaris* essential oils fractional inhibitory concentration index. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2014; 6(6):121-124.
- [10] van Vuuren SF, Suliman S, Viljoen AM. The antimicrobial activity of four commercial essential oils in combination with conventional antimicrobials. *Letters in Applied Microbiology*. 2009; 48(4):440-6. doi: 10.1111/j.1472-765x.2008.02548.x
- [11] Khodaei Motlagh M, Kazemi M, Ghasemi HA, Khaltabadi Farahani AH, Yahyaei M, Rezaei M, et al. Antibacterial effect of medicinal plant essence (*Thymus vulgaris*) on major bacterial mastitis pathogen in vitro. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*. 2014; 2(2):286-294.
- [12] Rusenova N, Parvanov P. Antimicrobial activity of twelve essential oils against microorganisms of Veterinary importance. *Trakia Journal of Sciences*. 2009; 7(1):37-43.
- [13] DI Pasqua R, DE feo V, Villani F, Mauriello G. Invitro antimicrobial activity of essential oils from Mediterranean apiaceae verbenaceae and Lamiaceae against food borne pathogens and spoilage bacteria. *Annals of Microbiology*. 2005; 55(2):139-143.
- [14] Dadgar T, Ghamy EA, Bazory M, Asmar M, Mazandarany M, Seyfi A, Bayat H. [The antibacterial effect of 20 species of medicinal plants against methicillin-resistant *Staphylococcus Aureus* and methicillin sensitive (Persian)]. *Journal of Gorgan University of Medical Sciences*. 1997; 9(1):55-62.
- [15] Haghghi F, Rodbar Mohammadi SH, Soleymani N, Satari M. [Evaluation of antifungal activity of essential oils of *Thymus vulgaris*, *Petroselinum Crispum*, *Cuminum Cyminum* and *Bunium persicum* on candida albicans in comparison with Fluconazole (Persian)]. *Pathobiology Research*. 2011; 14(1):29-35.

