University of Tehran Press

Journal of Veterinary Research

Homepage: jvr.ut.ac.ir

Online ISSN: 2251-6190

Original Article

J Vet Res, Volume 78, Number 1, 2023, 67-76

Evaluation of the Antibacterial Effect of Carvacrol Alone and in Combination with the Antibiotic Cefixime Against *Escherichia coli* O_{157}:H_7

Sepideh Asadi[1]✉, Bahar Nayeri Fasaei[2]✉, Taghi Zahraei Salehi[2]✉, Ramak Yahya Rayat[2]✉, Nemat Shams[3]✉

[1] *Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*
[2] *Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*
[3] *Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University, Khorramabad, Iran*

Received: *13 Febuary 2023****, Accepted:*** *19 April 2023*

10.22059/jvr.2022.333699.3207 20.1001.1.20082525.1402.78.1.7.9

Abstract

BACKGROUND: The use of plant compounds and their derivatives, such as extracts and essential oils, for combating infectious agents has attracted a great deal of scientific attention. One of the active antimicrobial compounds with plant origin is carvacrol.

OBJECTIVES: The present study aimed to evaluate the antibacterial activity of carvacrol alone and in combination with the antibiotic cefixime against *Escherichia coli* O_{157}:H_7.

METHODS: The antibacterial properties of carvacrol and cefexime were evaluated by determining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Bactericidal Concentration (MBC), and disk diffusion method. The checkerboard assay was used to evaluate the interaction between the carvacrol and cefexime and to determine the fractional inhibitory concentration.

RESULTS: The results showed that the MIC and MBC of carvacrol and cefexime against *E.coli* O_{157}:H_7 were 250, 250 µg/ml (MIC, MBC) and 128, 128 µg/ml (MIC, MBC), respectively. In the checkerboard test, carvacrol was found to have a synergistic interaction with antibiotic cefixime against *E. coli* O_{157}:H_7 (FIC index=0.5).

CONCLUSIONS: Due to the significant antibacterial activity of carvacrol, the present study introduced this agent as a new antibacterial drug with a natural origin. In addition, since carvacrol significantly increased the antibacterial potential of cefixime (synergistic properties), it could be considered as an effective compound for increasing the antibacterial power of cefixime antibiotic.

Keywords: Antibacterial, Carvacrol, Cefixime, Checkerboard, *Escherichia coli* O_{157}:H_7

Copyright © Veterinary Research: Open Access; Copying, distribution and publication are free for full use with attribution. ©The Author(s)
Publisher: University of Tehran

Corresponding author: Bahar Nayeri Fasaei, Tel/Fax: 021-61117050 / 021-66933222

How to cite this article:

Asadi, S., Nayeri Fasaei, B., Zahraei Salehi, T., Yahya Rayat, R., Shams, N. Evaluation of the Antibacterial Effect of Carvacrol Alone and in Combination with the Antibiotic Cefixime Against *Escherichia coli* O_{157}:H_7. J Vet Res, 2023; 78(1): 67-76. doi: 10.22059/jvr.2022.333699.3207

مجله تحقیقات دامپزشکی
Homepage: jvr.ut.ac.ir
شاپا الکترونیکی: ۶۱۹۰-۲۲۵۱
انتشارات دانشگاه تهران
مقاله پژوهشی

دوره ۷۸، شماره ۱، ۱۴۰۲، ۷۶-۶۷

ارزیابی تأثیر ضدباکتریایی کارواکرول به‌تنهایی و در ترکیب با آنتی‌بیوتیک سفکسیم در برابر باکتری *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$

سپیده اسدی[1]، بهار نیری‌فسایی[2]، تقی زهرایی‌صالحی[2]، رامک یحیی‌رعیت[2]، نعمت شمس[3]

[1] *دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران*
[2] *گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران*
[3] *گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران*

تاریخ دریافت: ۲۴ بهمن ۱۴۰۱، **تاریخ پذیرش:** ۳۰ فروردین ماه ۱۴۰۲

10.22059/jvr.2022.333699.3207 20.1001.1.20082525.1402.78.1.7.9

چکیده

زمینهٔ مطالعه: امروزه استفاده از ترکیبات گیاهی و مشتقات آن مانند عصاره‌ها و اسانس‌ها جهت مبارزه با عوامل عفونی بسیار مورد توجه محققین قرار گرفته است. یکی از ترکیبات فعال ضدمیکروبی با منشأ گیاهی کارواکرول می‌باشد.

هدف: ارزیابی اثر ضدباکتریایی کارواکرول به‌تنهایی و در ترکیب با آنتی‌بیوتیک سفکسیم در برابر *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$.

روش‌کار: خواص ضدباکتریایی کارواکرول و سفکسیم با تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی Minimum Inhibition Concentration (MIC)، حداقل غلظت کشندگی Minimum Bactericidal Concentration (MBC) و روش انتشار در آگار مورد ارزیابی قرار گرفت. به‌منظور برهمکنش کارواکرول و سفکسیم و تعیین غلظت بازدارنده افتراقی (FIC) شاخص) از روش چکربورد استفاده شد.

نتایج: حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی کارواکرول و سفکسیم علیه باکتری *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ به‌ترتیب برابر (MIC, MBC) ۲۵۰، ۲۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و (MBC, MIC) ۱۲۸، ۱۲۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. در روش چکربورد، در حالت ترکیب کارواکرول با آنتی‌بیوتیک سفکسیم در برابر *E. coli* $O_{157}:H_7$ اثر سینرژیستی مشاهده شد (FIC=۰/۵ شاخص).

نتیجه‌گیری نهایی: با توجه به‌فعالیت ضدباکتریایی قابل توجه کارواکرول، مطالعه حاضر این عامل را به عنوان یک داروی ضدباکتریایی با منشأ طبیعی معرفی می‌کند. همچنین از آن جایی که کارواکرول خواص ضدباکتریایی سفکسیم را به‌طور معنی‌داری افزایش داد (خواص سینرژیستی)، می‌توان کارواکرول را به‌عنوان یک ترکیب مؤثر جهت افزایش قدرت ضد باکتریایی آنتی‌بیوتیک سفکسیم معرفی نمود.

کلمات کلیدی: *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$، سفکسیم، چکربورد، ضدمیکروبی، کارواکرول

کپی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است، © نویسندگان.
ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

نویسنده مسئول: بهار نیری‌فسایی، گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

مقدمه

یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های دفاعی در برابر بیماری‌های عفونی، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد. با این‌حال، سوء استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در زمینه‌های مختلف پزشکی، دامپزشکی و صنعت منجر به‌ظهور سویه‌های مقاوم به دارو شده است. این امر نگرانی بهداشت عمومی را در سراسر جهان افزایش داده است (۱).

امروزه، گسترش روزافزون مقاومت‌های دارویی در میان باکتری‌ها در کنار سمیت و عوارض جانبی داروهای موجود سبب شده است تا توجه بیشتری به سمت داروهای مناسب‌تر با اثرات سمی و عوارض جانبی کمتر معطوف گردد و برای این منظور گیاهان دارویی نیز مورد توجه

خاصی قرار گرفته‌اند. از زمان‌های قدیم، گیاهان دارویی و ترکیبات آن‌ها مانند کارواکرول در طب سنتی برای اهداف مختلف در سراسر جهان استفاده شده است (۲، ۳).

کارواکرول یا سایموفنول (۵-ایزوپروپیل-۲-متیل فنول) یک ترکیب فنلی مونوترپنوئید است که از اسانس‌های خانواده لامیاسه (Lamiaceae) از جمله آویشن، پونه کوهی و مرزه به‌دست آمده است (۴).

کارواکرول دارای خواص بیولوژیکی مختلف از جمله خواصی نظیر آنتی‌اکسیدانی (۵)، ضدالتهاب (۶)، ضدسرطان (۷)، ضدتب (۸) و ضددرد می‌باشد (۹).

سویه *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ مهم‌ترین سویه پاتوتایپ انتروهموراژیک *اشریشیا کلی* (Enterohemorrhagic *E.coli*) و پاتوژن با منشأ غذایی مشترک بین انسان و دام در سراسر جهان شناخته شده است (۱۰، ۱۱). عفونت این سویه در انسان می‌تواند به‌صورت کولیت هموراژیک (HC)، سندروم همولیتیک اورمیک (HUS) و پورپورای ترومبوتیک ترمبوسیتوپنیک (TPP) به‌صورت کشنده نیز بروز نماید (۱۲). در بیماران مبتلا به همولیتیک اورمیک مصرف آنتی‌بیوتیک به‌طور کلی محدود است زیرا سلول‌های باکتریایی توسط آنتی‌بیوتیک لیز می‌شوند و مقدار زیادی توکسین مشابه شیگا (Shiga-like Toxin) را آزاد می‌کنند (۱۳).

بیماری‌های یاد شده می‌تواند با بروز ناگهانی، تمام گروه‌های سنی را درگیر کند. اما بیشتر قشرهای آسیب‌پذیر جامعه (کودکان یا سالمندان) در معرض بیشترین خطر ابتلا به عفونت حاد قرار دارند که آن را به یک موضوع مهم در سلامت جامعه و نیز در صنایع غذایی و کشاورزی تبدیل کرده است (۱۴). استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر جهت درمان و کنترل بیماری‌های ناشی از این سویه در انسان و حیوانات بهترین اقدام محسوب می‌گردد، اما با این‌حال مقاومت آنتی‌بیوتیکی در برابر *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ گزارش گردیده است (۱۵).

امروزه، با تمایل بشر به محصولات ارگانیک اهمیت شناخت علمی این مواد دوچندان شده است، فعالیت‌های ضدباکتریایی هم‌افزایی ترکیبات مختلف گیاهی در حضور آنتی‌بیوتیک‌ها توسط محققین گزارش شده است (۱۶، ۱۷).

مطالعات گذشته بیانگر اثر ضدباکتریایی و ضدبیوفیلمی کارواکرول می‌باشد (۱۸، ۱۹). همچنین گزارش شده است که کارواکرول حداقل سمیت را روی سلول‌های انسانی اعمال می‌کند (۲۰).

در گذشته بررسی‌هایی در مورد اثر ضدمیکروبی کارواکرول روی برخی باکتری‌های پاتوژن گزارش شده است (۲۱، ۲۲). با توجه به مطالب ذکر شده و به‌دلیل اهمیت بالای مسئله مقاومت آنتی‌بیوتیکی و مقابله با آن و خواص مثبت گزارش شده از ترکیبات مشتق شده از گیاهان، هدف از انجام مطالعه حاضر اثر هم‌افزایی کارواکرول و سفکسیم علیه باکتری *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ بود.

مواد و روش کار

سویه باکتریایی: باکتری مورد استفاده در مطالعه حاضر *اشریشیا کلی* انتروهموراژیک (ATCC ۳۵۲۱۸) بود.

تعیین خاصیت ضدباکتریایی کارواکرول و آنتی‌بیوتیک سفکسیم (انتشار در آگار به کمک دیسک): جهت تعیین حساسیت *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ از (روش کربی بائر و طبق دستورالعمل آزمایشگاهی و کلینیکی CLSI) استفاده شد. سویه مذکور پس از تعیین هویت نهایی توسط آزمایش‌های بیوشیمیایی به روش انتشار در آگار توسط دیسک‌های آنتی‌بیوتیک (پادتن طب، ایران) تعیین حساسیت دارویی گردید. دیسک‌های آنتی‌بیوتیک تجاری سفکسیم (۵ میکروگرم) بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) که قبلاً آماده شده، قرار داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری انجام گرفت. پس از ۲۴ ساعت هاله عدم رشد مشاهده گردید، قطر آن اندازه‌گیری و بر حسب میلی‌متر اعلام شد (CLSI۲۰۱۹).

برای ارزیابی خاصیت ضدمیکروبی مواد مؤثره کارواکرول (Sigma – Aldrich) از روش انتشار در آگار با استفاده از اندازه‌گیری هاله عدم رشد، استفاده شد. ابتدا سویه *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ در سوسپانسیون باکتریایی معادل نیم مک فارلند تهیه و سپس دیسک‌های بلانک استریل به ۲۰ میکرولیتر مواد مؤثره کارواکرول که حاوی محلول ۱ درصد دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) به‌عنوان حلال بود با رقت (۱۰۰۰،

۵۰۰، ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) آغشته گردید و پس از جذب آن توسط دیسک‌ها، با پنس استریل بر روی محیط‌های کشت شده که از قبل آماده شده بود، قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، قطر هاله عدم رشد ایجاد شده، که ناشی از ممانعت رشد باکتری توسط ماده آنتی‌باکتریال بود، اندازه‌گیری و بر حسب میلی‌متر اعلام گردید، تمام آزمون‌ها جهت تأیید آزمایش، به‌صورت سه بار تکرار انجام شد (۲۳).

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC): در مطالعه حاضر حداقل غلظت مهارکنندگی علیه *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ با استفاده از روش میکرودایلوشن براث با ۳ بار تکرار انجام شد. در این روش به هر کدام از چاهک‌های ردیف یک تا هشت پلیت ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت TSB (Tripticas soya Broth) (مرک، آلمان) اضافه گردید. سپس به اولین چاهک هر ردیف ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های متوالی از کارواکرول (۳/۹۰-۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) و آنتی‌بیوتیک سفکسیم (۱۰۲۴-۴ میکروگرم در میلی‌لیتر) تهیه شد و به محیط کشت TSB براث اضافه شد و سریال رقت تا آخرین چاهک تهیه شد. در چاهک شماره ۱۲ (کنترل مثبت) فقط محیط کشت باکتری اضافه گردید. در این مرحله ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه شده باکتری با غلظت نهایی معادل نیم مک فارلند به‌صورت جداگانه به تمام چاهک‌ها به‌جز چاهک شماره ۱۱ (کنترل منفی) هر ردیف اضافه گردید. در مرحله بعد پلیت‌ها روی شیکر اوربیتال قرار گرفت تا مخلوط یکنواخت گردد. در آخر میکروپلیت در انکوباتور شیکردار ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد و بعد از اتمام انکوباسیون کدورت یا عدم کدورت چاهک‌ها توسط جذب نوری توسط الایزا ریدر (Fax ۲۱۰۰Star، USA) در ساعت صفر و با طول موج ۴۹۰ نانومتر قرائت گردید. کمترین غلظتی که کدورتی مشاهده نشود بر حسب میلی‌گرم در میلی‌لیتر به‌عنوان (MIC) در نظر گرفته شد. به‌منظور اندازه‌گیری حداقل غلظت کشندگی (MBC)، از چاهک‌های فاقد کدورت (غلظت‌های MIC و بالاتر) که رشدی در آن صورت نگرفته بود، مقدار ۱۰ میکرولیتر در شرایط کاملاً استریل و زیر هود میکروبی برداشته و بر روی محیط ژلوز خوندار (مرک، آلمان) کشت داده شد، پس از گذشت ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، با مشاهده اولین غلظتی که در آن باکتری رشد نکرده بود حداقل غلظت کشندگی (MBC) آنتی‌باکتریال، نیز تعیین گردید (۲۴).

ارزیابی اثر هم‌افزایی کارواکرول و آنتی‌بیوتیک سفکسیم و تعیین شاخص غلظت مهارکنندگی سهمی (FICI): به‌منظور ارزیابی توأم اثر ضدمیکروبی کارواکرول در ترکیب با آنتی‌بیوتیک سفکسیم بر اساس غلظت مهارکنندگی سهمی و از روش مرسوم به تیتراسیون چکربورد استفاده شد. در واقع غلظت مهاری مشترک کسری از غلظت ماده مهارکننده در حال ترکیب، نسبت به وقتی که همان ماده به‌تنهایی استفاده می‌شود. در این روش به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای ۱۰۰ میکرولیتر از هر یک از ترکیبات ضدمیکروبی افزوده شد. در هر ردیف افقی، آنتی‌بیوتیک سفکسیم از غلظت‌های ۲۵۶ تا غلظت ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر و ردیف عمودی در هر ستون از بالا به پایین از غلظت‌های ۵۰۰ تا غلظت ۷/۸۱ میکروگرم در میلی‌لیتر اسانس کارواکرول اضافه شد. در نهایت در میکروپلیت مورد بررسی هر کدام از غلظت‌های کارواکرول در ترکیب با تمام غلظت‌های آنتی‌بیوتیک بود. در ادامه به هر چاهک ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی با غلظت نهایی معادل نیم مک فارلند افزوده شد. هر پلیت حاوی کنترل مثبت و منفی بود. چاهک کنترل مثبت حاوی سوسپانسیون باکتری و محیط کشت و چاهک کنترل منفی حاوی محیط کشت بدون باکتری بود. پس از آن‌که محتویات هر چاهک به‌خوبی مخلوط شد، مطابق بخش قبل میکروپلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور شیکردار قرار داده و گرم‌خانه‌گذاری شد. برای تعیین میزان غلظت مهاری کسری (FIC) برای ترکیب مواد بر اساس معادلات (۳-۱) استفاده شد.

معادله ۱ $FIC_{AB} = MIC_{AB}\ CoM/MIC_{AB}\ A$

معادله ۲ $FIC_{Eos} = MIC_{Eos}\ \ CoM/MIC\ A$

معادله ۳ $FIC_{index} = FIC_{AB} + FIC_{Eos}$

FIC_{AB} - غلظت مهاری کسری سفکسیم

$MIC_{AB}\ CoM$- حداقل غلظت مهارکنندگی ترکیبی سفکسیم

$MIC_{AB}\ A$- حداقل غلظت مهارکنندگی سفکسیم به‌تنهایی

FIC_{Eos} - غلظت مهاری کسری کارواکرول

MIC_{Eos} COM- حداقل غلظت مهارکنندگی ترکیبی کارواکرول

MIC_{Eos} A- حداقل غلظت مهارکنندگی کارواکرول به‌تنهایی

از مجموع FIC هر عامل ضدمیکروبی، شاخص غلظت مهارکننده سهمی (FICI) به دست آمد. پس از محاسبه FICI تفسیر نتایج با استفاده از دستورالعمل کمیته اروپایی آزمون سنجش حساسیت ضد میکروبی (EUCAST) صورت پذیرفت. بر این اساس چنانچه FICI کوچک‌تر یا مساوی با ۰/۵ باشد، برهمکنش از نوع هم‌افزایی، بزرگ‌تر از ۰/۵ تا ۱ از نوع افزایشی بزرگ‌تر از ۱ تا کوچک‌تر از ۲ از نوع عدم تأثیر و مساوی یا بزرگ‌تر از ۲ از نوع رقابتی می‌باشد (۲۵، ۲۶).

نتایج

انتشار در آگار به‌کمک دیسک: یافته‌های حاصل از تست آنتی‌بیوگرام سویه استاندارد *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ نسبت به آنتی‌بیوتیک سفکسیم با میانگین هاله مهار رشد ۲۳ میلی‌متر نشان دهنده حساست سویه مذکور بود.

همچنین بررسی خاصیت ضدباکتریایی کارواکرول نشان داد که سویه مذکور حساس بوده و هیچ‌گونه مقاومتی مشاهده نگردید. میانگین هاله عدم رشد در مجاورت رقت‌های کارواکرول (۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) به‌ترتیب برابر ۳۸، ۳۰ و ۱۸ میلی‌متر بود.

تعیین MIC و MBC: میزان حداقل مهارکنندگی از رشد (MIC) به‌دست آمده برای کارواکرول و سفکسیم به‌ترتیب برای *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$، ۲۵۰ و ۱۲۸ میکروگرم در میلی‌لیتر و حداقل اثر کشندگی (MBC) ۲۵۰ و ۱۲۸ میکروگرم در میلی‌لیتر گزارش شد.

اثر هم‌افزایی کارواکرول و آنتی‌بیوتیک سفکسیم و تعیین شاخص غلظت مهارکنندگی سهمی (FICI): نتایج برهمکنش کارواکرول و آنتی‌بیوتیک سفکسیم به روش چکربورد علیه ایزوله *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ نشان دهنده اثر هم‌افزایی این دو عامل ضدباکتریایی بود. کارواکرول و آنتی‌بیوتیک سفکسیم در نقطه سینرژیستی به‌ترتیب دارای MIC با غلظت‌های ۶۲/۵ و ۳۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر بودند و میزان FIC در ترکیب مذکور به‌ترتیب برای آنتی‌بیوتیک و کارواکرول ۰/۲۵ و ۰/۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر به‌دست آمد و مقدار FICI برابر با ۰/۵ محاسبه شد.

بحث

امروزه به‌خوبی نقش و اهمیت استفاده از گیاهان دارویی و ترکیبات آن‌ها جهت درمان بیماری‌های مختلف توسط بشر درک شده است. استفاده از منابع نامحدود و متنوع گیاهی توسط انسان در طول قرن‌های متمادی سابقه‌ای بس طولانی داشته و با توجه به شناخت و تجربه‌ای که در این سالیان بشر از کاربرد گیاهان کسب کرده است به‌تدریج روش‌های نوینی را برای استفاده از گیاهان و ترکیبات آن‌ها توسعه داده است. در حال حاضر علاقمندی جهت استفاده از درمان طبیعی به وسیله گیاهان دارویی با کمترین اثر جانبی در حال افزایش است (۲۷).

از سوی دیگر به‌دلیل افزایش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها و بار اقتصادی مقاومت باکتریایی، به‌علاوه کاهش فعالیت آنتی‌بیوتیک‌ها تحت تأثیر pH، غیرفعال‌سازی آنزیمی و حلالیت و ثبات ضعیف داروها، عوارض جانبی نامطلوب و عوامل دیگر همچون عدم توسعه و تولید داروهای ضدمیکروبی جدید نیاز حیاتی به‌طراحی جدید آنتی‌بیوتیک‌ها با مکانیسم‌های چندگانه وجود دارد (۲۸).

در گذشته، گیاهان دارویی و ترکیبات آن‌ها مانند کارواکرول در طب سنتی برای اهداف مختلفی در سراسر جهان مورد استفاده قرار گرفته است. علاوه بر این به دلیل خواص بیولوژیکی متفاوت به‌ویژه خواص ضد میکروبی آن‌ها، می‌توان از آن‌ها برای بهبود کیفیت غذا و افزایش ماندگاری آن‌ها استفاده کرد (۲۹، ۳۰).

کارواکرول یک مشتق فنولی مونوترپنوئید است که در برخی گیاهان از جمله پونه کوهی و آویشن یافت می‌شود. با توجه به خواص بیولوژیکی مختلف کارواکرول، مطالعات زیادی بر روی این ترکیب برای ارزیابی قابلیت استفاده آن در پزشکی انجام شده است (۳۱).

در مطالعه حاضر، اثرات ضدباکتریایی کارواکرول و سفکسیم را به‌صورت جداگانه و در ترکیب با هم در برابر عامل بیماریزا با منشأ غذایی و زئونوتیک *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ از طریق دیسک دیفیوژن، تعیین میزان MIC، MBC و FIC، FICI بررسی شد.

میزان حداقل مهارکنندگی از رشد (MIC) به‌دست آمده برای کارواکرول و سفکسیم به‌ترتیب برای *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$، ۲۵۰ و ۱۲۸ میکروگرم در میلی‌لیتر و حداقل اثر کشندگی (MBC) ۲۵۰ و ۱۲۸ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. همان‌طور که در مورد روش کیفی دیسک دیفیوژن نیز بیان شد، تأثیرگذاری کارواکرول علیه *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ بیشتر از سفکسیم دیده شد. میزان حداقل غلظت مهاری کسری (FIC) نیز برای تأیید اثر هم‌افزایی کارواکرول و سفکسیم علیه *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ به‌ترتیب ۰/۲۵ + ۰/۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر و FICI برابر با ۰/۵ دیده شد، کارواکرول و آنتی‌بیوتیک سفکسیم در نقطه سینرژیستی به‌ترتیب دارای MIC با غلظت‌های ۶۲/۵ و ۳۲ میکروگرم در میلی‌لیتر بودند. در این آزمون نیز اثر گذاری مواد آنتی‌باکتریال بر روی سویه مذکور به‌وضوح مشخص شد.

مقدار MIC و MBC کارواکرول در مطالعه حاضر در برابر *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. این نتیجه کاملاً با آن‌چه در مطالعه Magi و همکاران در سال ۲۰۱۵ در مورد خواص ضدباکتریایی کارواکرول در برابر استرپتوکوک‌های گروه A گزارش شده بود مطابقت دارد. MIC و MBC گزارش شده به ترتیب ۱۲۵و ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود (۳۲).

Sokovic و همکاران در سال ۲۰۱۰ اثر ضدباکتریایی اسانس‌ها از ده گیاه مختلف که شامل کارواکرول، تیمول و آلفاپینن بودند را در برابر باکتری‌های *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$، *باسیلوس سوبتلیس*، *سودوموناس*، *پروتئوس میرابلیس* با روش دیسک دیفیوژن و میکرودایلوشن براث بررسی کردند. در نتایج این مطالعه کارواکرول (MIC۰/۵، MBC۱/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) بالاترین فعالیت ضدباکتریایی را داشت و همچنین اسانس آویشن بسیار قوی‌تر از آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین در برابر سویه‌های ذکر شده گزارش گردید. تأثیر کارواکرول بر باکتری *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ مشاهده شد که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد (۳۳).

همچنین در مطالعات انجام شده توسط Ben Arfa و همکاران در سال ۲۰۰۶ خواص ضد باکتریایی دو نوع مولکول مشتق از کارواکرول (کارواکرول متیل اتر و کارواکریل استات) در برابر برخی از باکتری‌های گرم مثبت، گرم منفی و مخمر شامل *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus* و *Bacillus subtilis* گزارش شد (۳۴).

BURT و همکاران در سال ۲۰۰۵ افزایش فعالیت مواد مؤثره گیاهی شامل کارواکرول، تیمول، y- terpinene و P-Cymene در برابر *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ را مورد ارزیابی قرار دادند که از چهار اسانس گیاهی فقط کارواکرول و تیمول در برابر این سویه تأثیر گذار بودند، MIC تیمول و کارواکرول ۱/۲ میکرومول در لیتر گزارش شد (۲۵).

در مطالعه Helander و همکاران در سال ۱۹۹۸ که اثر اسانس گیاهان بر روی باکتری گرم منفی با استفاده از روش بیولومینسنس بود؛ کارواکرول و تیمول در برابر *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ اثر بازدارندگی نشان داد و باعث از بین رفتن لیپوپلی‌ساکارید و اختلال در غشاء خارجی این باکتری گردید (۲۶).

در مطالعه‌ای مشابه Niluni.M. Wijesundara و همکاران در سال ۲۰۲۱ اثر ضد میکروبی کارواکرول را به‌صورت تنها و همچنین به‌صورت ترکیب با چهار آنتی‌بیوتیک در برابر باکتری *استرپتوکوکوس پیوژنز* بررسی کردند، MIC و MBC گزارش شده به‌ترتیب ۱۲۵و ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود که با نتایج آزمایشگاهی حاصل از مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد و کارواکرول همچنین اثر هم‌افزایی با کلیندامایسین و پنی‌سیلین نشان داد و گزارش گردید که کارواکرول می‌تواند به‌عنوان یک اسانس گیاهی بی‌خطر و فوق العاده قوی با مکانیسم اثر بر غشاء سلولی معرفی گردد (۸).

نتایج مطالعات ذکر شده و همچنین مطالعه حاضر نشان داد که کارواکرول و مشتقات آن دارای خواص ضد میکروبی در برابر باکتری‌ها و قارچ‌های مختلف می‌باشند. مطالعات متعددی در مورد مکانیسم عمل این ترکیب وجود دارد که اکثر آن‌ها نشان می‌دهد هدف اصلی کارواکرول غشاء سیتوپلاسمی باکتری‌ها می‌باشد (۸، ۲۲). کارواکرول می‌تواند به ساختار غشاء سلولی نفوذ کرده و قادر به تجزیه غشاء خارجی سلول‌های میکروبی می‌باشد. این آسیب غشائی توسط کارواکرول می‌تواند بر هومئوستاز pH و تعادل یون‌های معدنی تأثیر بگذارد و متعاقباً منجر به القای

فعالیت ضدباکتریایی این ماده شود (۱۸). علاوه‌بر این، از آن‌جا که غشاء سیتوپلاسمی نقش حیاتی در زنده ماندن سلول‌های پروکاریوتی دارد این تخریب غشائی می‌تواند باعث مرگ سلولی شود (۱۶، ۲۷).

مطالعات گذشته ذکر شده نشان داد که ترکیبات فنلی هم‌چون کارواکرول و تیمول، مهم‌ترین ترکیبات ضدمیکروبی به‌شمار می‌روند. این اختلاف در میزان حداقل غلظت مهارکنندگی رشد مطالعات مختلف، می‌تواند تفاوت در میزان ترکیبات ضدباکتریایی و روش استخراج عصاره اسانس باشد. با توجه به نتایج مطالعه حاضر نیز می‌توان بیان کرد که کارواکرول اثر ضدمیکروبی علیه باکتری مورد آزمون را نشان داد.

مطالعات اخیر نشان داد که باکتری *اشریشیا کلی* در برابر آنتی‌بیوتیک‌های رایج مانند سفکسیم مقاوم است. در مطالعه‌ای که توسط Ayatollahi و همکاران در سال ۲۰۱۳ بر روی *اشریشیا کلی* جدا شده از کودکان در بیمارستان شهید صدوقی یزد انجام شد، میزان مقاومت بالایی برای سفکسیم (۵۷/۹ درصد) گزارش گردید (۲۸). در مطالعه دیگری در ایران که بر روی *اشریشیا کلی* جدا شده از عفونت‌های مجاری ادراری (UTI) توسط Pourakbari و همکاران در سال ۲۰۱۲ انجام شد، مقاومت به سفکسیم (۵۰ درصد) گزارش گردید (۲۹). با توجه به نتایج این مطالعات و سایر مطالعات مشابه (۱۳) می‌توان نتیجه گرفت که سویه‌های *اشریشیا کلی* به آنتی‌بیوتیک‌های رایج از جمله سفکسیم مقاوم می‌باشند.

با توجه به این‌که اثر هم‌افزایی کارواکرول و سفکسیم در برابر باکتری *اشریشیا کلی* O_{157} : H_7 هرگز مورد بررسی قرار نگرفته است، در قسمت دیگر مطالعه حاضر اثر هم‌افزایی کارواکرول و آنتی‌بیوتیک سفکسیم علیه *اشریشیا کلی* O_{157} : H_7 مورد بررسی قرار گرفت. در مطالعه حاضر کارواکرول در ترکیب با سفکسیم هم‌افزایی علیه *اشریشیا کلی* O_{157} : H_7 نشان داد.

تا کنون مقالات متعددی در زمینه فعالیت‌های ضدباکتریایی هم‌افزایی ترکیبات مختلف گیاهی در حضور آنتی‌بیوتیک‌ها توسط محققین گزارش شده است (۳۰-۳۲).

اثرات هم‌افزایی اسید سینامیک، سینامالدئید، اوژنول، تیمول با چندین آنتی‌بیوتیک قبلاً گزارش شده است (۸). ترکیب این مواد شیمیایی گیاهی با آنتی‌بیوتیک‌ها می‌تواند منجر به کاهش حداقل دوز مؤثر آنتی‌بیوتیک‌های مورد نیاز برای درمان و در نتیجه کاهش عوارض جانبی داروها شود (۳۳).

علاوه بر این، توانایی ترکیبات مشتق شده از گیاهان در تغییر یا مسدود کردن مکانیسم مقاومت می‌باشد، به‌طوری که باکتری به آنتی‌بیوتیک حساس می‌شود یا آنتی‌بیوتیک در صورت استفاده در غلظت‌های پایین فعال می‌شود (۳۰-۳۲).

اثر هم‌افزایی کارواکرول نه‌تنها همراه با آنتی‌بیوتیک‌ها بلکه همراه با سایر ترکیبات بیولوژیکی مانند تیمول، اوژنول، نیسین و اسیدهای آلی مانند اسید استیک، اسید لاکتیک و اسید سیتریک گزارش شده است (۸).

مطالعاتی در مورد اثرات هم‌افزایی کارواکرول با آنتی‌بیوتیک‌ها وجود دارد. مطالعه دیگری مشابه مطالعه حاضر نشان داد که کارواکرول به‌طور قابل توجهی MIC اریترومایسین را در برابر استرپتوکوک‌های گروه A مقاوم به اریترومایسین کاهش می‌دهد و همچنین کارواکرول اثر هم‌افزایی با اریترومایسین نشان داد. کارواکرول به‌تنهایی و همچنین در ترکیب با اریترومایسین می‌تواند علیه سویه‌های مقاوم اثر بخش باشد (۲۲).

در مطالعه‌ای که توسط Pol و همکاران در سال ۱۹۹۹ انجام شد ترکیب کارواکرول و نیسین در برابر دو باکتری گرم مثبت *Listeria monocytogenes* و *Bacillus cereus* مورد ارزیابی قرار گرفت. محققین بیان کردند که کارواکرول ممکن است با افزایش تعداد یا اندازه منافذ غشاء سیتوپلاسمی که توسط نیسین ایجاد شده و همچنین طول عمر منافذ باعث افزایش فعالیت ضدباکتری نیسین شود (۳۴).

در مطالعه Sharifi و همکاران در سال ۲۰۱۸ اثر مهارکنندگی رشد اسانس‌های گیاهی با آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین و نورفلوکساسین بررسی شد، نتایج فنوتیپی نشان داد که اسانس گیاهی آویشن، مرزه و پونه با ترکیبات مورد مطالعه کاملاً اثر سینرژیستی دارند و نشان داد که اسانس‌های گیاهی قادرند میزان MIC آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین و نورفلوکساسین علیه سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* را به‌صورت معنی‌داری کاهش دهند (۱۸).

در مطالعه حاضر اثر مهارکنندگی کارواکرول با آنتی‌بیوتیک سفکسیم علیه باکتری *E.coli* O_{157} : H_7 بررسی شد و بر اساس شاخص FIC مشخص گردید ترکیب کارواکرول و آنتی‌بیوتیک مورد مطالعه علیه سویه مذکور از نوع سینرژیستی می‌باشد. بنابراین کارواکرول را می‌توان به‌عنوان یک داروی ضد باکتریایی با منشأ طبیعی معرفی کرد. در این مطالعه هم‌افزایی کارواکرول با آنتی‌بیوتیک سفکسیم گزارش شد. اما برای یافتن این مکانیسم عمل به مطالعات بیشتری نیاز است.

نتیجه گیری نهایی: برای مطالعات آتی تأثیر گیاهان بومی ایران و ترکیبات تشکیل دهنده آن‌ها به‌صورت مجزا و توأم با دیگر ترکیبات ضدمیکروبی همچون اسانس‌ها، آنتی‌بیوتیک‌ها، نانوذرات و... علیه باکتری‌های پاتوژن و همچنین بررسی اثر گیاهان بومی ایران و اجزاء تشکیل‌دهنده آن‌ها روی تشکیل بیوفیلم *اشریشیا کلی* O_{157} :H_7 با استفاده از تکنیک‌های وابسته به کشت سلول، کشت بافت و همچنین مدل حیوان آزمایشگاهی توصیه می‌گردد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تهران برای تأمین اعتبار مورد نیاز مطالعه حاضر و همچنین از همکاری دکتر مهدی سلطانی، دکتر علیرضا خسروی و دکتر عقیل شریف‌زاده به پاس محبت و مساعدت‌های فراوانی که در انجام مراحل مختلف این مطالعه صورت گرفته است تشکر و قدردانی کنند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Mobarki N, Almerabi B, Hattan A. Antibiotic resistance crisis. Int J Med Dev Ctries. 2019;40(4):561-4. doi: 10.24911/IJMDC.51-1549060699

2. Lee JH, Kim YG, Lee J. Carvacrol-rich oregano oil and thymol-rich thyme red oil inhibit biofilm formation and the virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. J Appl Microbiol. 2017;123(6):1420-8. doi: 10.1111/jam.13602 PMID: 28980415

3. Swamy MK, Akhtar MS, Sinniah UR. Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: an updated review. Evid Based Complementary Altern Med. 2016; ID 3012462,21. doi: 10.1155/2016/3012462 PMID: 28090211

4. Vinciguerra V, Rojas F, Tedesco V, Giusiano G, Angiolella L. Chemical characterization and antifungal activity of *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris* essential oils and carvacrol against Malassezia furfur. Natural Product Res. 2019;33(22):3273-7. doi: 10.1080/14786419.2018.1468325 PMID: 29726703

5. Baranauskaite J, Kubiliene A, Marksa M, Petrikaite V, Vitkevičius K, Baranauskas A, Bernatoniene J. The influence of different oregano species on the antioxidant activity determined using HPLC postcolumn DPPH method and anticancer activity of carvacrol and rosmarinic acid. Biomed Res Int. 2017; ID1681392. doi: 10.1155/2017/1681392 PMID: 29181386

6. Barnwal P, Vafa A, Afzal S, Shahid A, Hasan S, Alpashree, Sultana S. Benzo (a) pyrene induces lung toxicity and inflammation in mice: Prevention by carvacrol. Hum Exp Toxicol. 2018;37(7):752-61. doi: 10.1177/0960327117735572 PMID: 29019276

7. Singh P, Prakash O, Chandra M, Patil AR, Pant A, Isidorov VA. Reinvestigation of essential oil of Rabdosia melissoides: Chemical composition, antioxidant, anti-inflammatory, analgesic, antipyretic, antifungal and antibacterial activities. J Essent Oil-Bear Plants. 2016;19(8):1859-72. doi: 10.1080/0972060X.2016.1231597

8. Wijesundara NM, Lee SF, Cheng Z, Davidson R, Rupasinghe HV. Carvacrol exhibits rapid bactericidal activity against *Streptococcus pyogenes* through cell membrane damage. Sci Rep. 2021;11(1):1-14. doi: 10.1038/s41598-020-79713-0 PMID: 33452275

9. Kim Y-G, Lee J-H, Gwon G, Kim S-I, Park JG, Lee J. Essential oils and eugenols inhibit biofilm formation and the virulence of *Escherichia coli* O_{157}: H_7. Sci Rep. 2016;6(1):1-11. doi: 10.1038/srep36377 PMID: 27808174

10. Oloketuyi SF, Khan F. Strategies for biofilm inhibition and virulence attenuation of foodborne pathogen-*Escherichia coli* O_{157}: H_7. Curr Microbiol. 2017;74(12):1477-89. doi: 10.1007/s00284-017-1314-y PMID: 28744570

11. Fathi J, Ebrahimi F, Nazarian S, Hajizade A, Malekzadegan Y, Abdi A. Production of egg yolk antibody (IgY) against shiga-like toxin (stx) and evaluation of its prophylaxis potency in mice. Microb Pathog. 2020;145(1):104199. doi: 10.1016/j.micpath.2020.104199 PMID: 32320733

12. Duffy G. Verocytoxigenic *Escherichia coli* in animal faeces, manures and slurries. J Appl Microbiol. 2003;94:94S-103S. doi: 10.1046/j.1365-2672.94.s1.11.x PMID: 12675941

13. Galland JC, Hyatt DR, Crupper SS, Acheson DW. Prevalence, antibiotic susceptibility, and diversity of *Escherichia coli* O_{157}: H_7 isolates from a longitudinal study of beef cattle feedlots. Appl Environ Microbiol. 2001;67(4):1619-27. doi: 10.1128/AEM.67.4.1619-1627.2001 PMID: 11282614

14. Silva DM, Costa PA, Ribon AO, Purgato GA, Gaspar D-M, Diaz MA. Plant extracts display synergism with different classes of antibiotics. *An Acad Bras Cienc.* 2019;91(2):e20180117. doi: 10.1590/0001-3765201920180117 PMID: 31090789

15. Trevisan DAC, Silva AFd, Negri M, Abreu BAd, Machinski M, Patussi EV, Campanerut- Sá PAZ, Mikcha JMG. Antibacterial and antibiofilm activity of carvacrol against *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Braz J Pharm Sci.* 2018;54(1):e17229. doi: 10.1590/s2175-97902018000117229

16. Khan I, Bahuguna A, Kumar P, Bajpai VK, Kang SC. Antimicrobial potential of carvacrol against uropathogenic *Escherichia coli* via membrane disruption, depolarization, and reactive oxygen species generation. Front Microbiol. 2017;8:2421. doi: 10.3389/fmicb.2017.02421 PMID: 29270161

17. Khampieng T, Wnek GE, Supaphol P. Electrospun DOXY-h loaded-poly (acrylic acid) nanofiber mats: in vitro drug release and antibacterial properties investigation. J Biomater Sci Polym Ed. 2014;25(12):1292-305. doi: 10.1080/09205063.2014.929431 PMID: 24945329

18. Sharifi A, Ahmadi A, Mohammadzadeh A. *Streptococcus pneumoniae* quorum sensing and biofilm formation are affected by *Thymus daenensis*, *Satureja hortensis*, and *Origanum vulgare* essential oils. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2018;65(3):345-59. doi: 10.1556/030.65.2018.013 PMID: 29471691

19. Azizi-Lalabadi M, Ehsani A, Divband B, Alizadeh-Sani M. Antimicrobial activity of Titanium dioxide and Zinc oxide nanoparticles supported in 4A zeolite and evaluation the morphological characteristic. Sci Rep. 2019;9(1):1-10. doi: 10.1038/s41598-019-54025-0 PMID: 31767932

20. Vinatoru M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. Ultrason Sonochem. 2001;8(3):303-13. doi: 10.1016/S1350-4177(01)00071-2 PMID: 11441615

21. Percival SL, Hill KE, Williams DW, Hooper SJ, Thomas DW, Costerton JW. A review of the scientific evidence for biofilms in wounds. *Wound Repair Regen.* 2012;20(5):647-57. doi: 10.1111/j.1524-475X.2012.00836.x PMID: 22985037

22. 1. Magi G, Marini E, Facinelli B. Antimicrobial activity of essential oils and carvacrol, and synergy of carvacrol and erythromycin, against clinical, erythromycin-resistant Group A *Streptococci*. Front Microbiol. 2015;6:165. doi: 10.3389/fmicb.2015.00165 PMID: 25784902

23. Soković M, Glamočlija J, Marin PD, Brkić D, Van Griensven LJ. Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an in vitro model. Molecules. 2010;15(11):7532-46. doi: 10.3390/molecules15117532 PMID: 21030907

24. Ben Arfa A, Combes S, Preziosi-Belloy L, Gontard N, Chalier P. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. Lett Appl Microbiol. 2006;43(2):149-54. doi: 10.1111/j.1472-765X.2006.01938.x PMID: 16869897

25. Burt SA, Vlielander R, Haagsman HP, Veldhuizen EJ. Increase in activity of essential oil components carvacrol and thymol against *Escherichia coli* O_{157}: H_7 by addition of food stabilizers. J Food Prot. 2005;68(5):919-26. doi: 10.4315/0362-028X-68.5.919 PMID: 15895722

26. Helander IM, Alakomi H-L, Latva-Kala K, Mattila-Sandholm T, Pol I, Smid EJ, Gorris LGM, Wright Av. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. J Agric Food Chem. 1998;46(9):3590-5. doi: 10.1021/jf980154m

27. Wang L-H, Wang M-S, Zeng X-A, Zhang Z-H, Gong D-M, Huang Y-B. Membrane destruction and DNA binding of *Staphylococcus aureus* cells induced by carvacrol and its combined effect with a pulsed electric field. J Agric Food Chem. 2016;64(32):6355-63. doi: 10.1021/acs.jafc.6b02507 PMID: 27420472

28. Ayatollahi J, Shahcheraghi S, Akhondi R, Soluti S. Antibiotic resistance patterns of *Escherichia coli* isolated from children in Shahid Sadoughi Hospital of Yazd. Iran J Pediatr Hematol. 2013;3(2):78. PMID: 24575257

29. Pourakbari B, Ferdosian F, Mahmoudi S, Teymuri M, Sabouni F, Heydari H, Haghi Ashtiani MT, Mamishi S. Increase resistant rates and ESBL production between *E. coli* isolates causing urinary tract infection in young patients from Iran. Braz J Microbiol. 2012;43:766-9. doi: 10.1590/S1517-83822012000200041 PMID: 24031888

30. Li S, Mou Q, Xu X, Qi S, Leung PH. Synergistic antibacterial activity between penicillenols and antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. R Soc Open Sci. 2018;5(5):172466. doi: 10.1098/rsos.172466 PMID: 29892433

31. Mgbeahuruike EE, Stålnacke M, Vuorela H, Holm Y. Antimicrobial and synergistic effects of commercial piperine and piperlongumine in combination with conventional antimicrobials. Antibiotics. 2019;8(2):55. doi: 10.3390/antibiotics8020055 PMID: 31060239

32. Sanhueza L, Melo R, Montero R, Maisey K, Mendoza L, Wilkens M. Synergistic interactions between phenolic compounds identified in grape pomace extract with antibiotics of different classes against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. PloS one. 2017;12(2):e0172273. doi: 10.1371/journal.pone.0172273 PMID: 28235054

33. Ceyssens P-J, Van Bambeke F, Mattheus W, Bertrand S, Fux F, Van Bossuyt E, Damée S, Nyssen HJ, Craeye SD, Verhaegen J. Molecular analysis of rising fluoroquinolone resistance in Belgian non-invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates (1995-2014). PloS one. 2016;11(5):e0154816. doi: 10.1371/journal.pone.0154816 PMID: 27227336

34. Pol I, Smid E. Combined action of nisin and carvacrol on *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. Lett Appl Microbiol. 1999;29(3):166-70. doi: 10.1046/j.1365-2672.1999.00606.x PMID: 10530038