نشریه تازه ها در میکروب‌شناسی دامپزشکی
وبگاه: nfvm.uoz.ac.ir
دو فصلنامه - شاپا چاپی: ۲۶۴۵-۴۴۹۱ شاپا الکترونیکی: ۲۶۷۶-۵۰۰۴
دوره ٦، شماره ۲، پائیز و زمستان ۱٤۰۲، صفحات ۱۰۷- ۹۸

ترکیبات شیمیایی و فعالیت ضد باکتریایی اسانس‌های ریحان (*Ocimum baslicum* L.)، رزماری (*Rosmarinus officinalis* L.) و زیره سبز (*Cuminum cyminum* L.) در مقایسه با نیسین

محمدعلی نجفی*[۱]، آرسام آیینه‌چی[۲]، ذبیح ا... بهمنی[۳]، سارا نجفی قاقلستانی[۴]

۱- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، مؤسسه آموزش عالی رودکی، تنکابن، ایران.
۳- استادیار، گروه فرآوری و بیوتکنولوژی آبزیان، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، بندرعباس، ایران.
۴- دانش‌آموخته دکتری زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، ایران.

دریافت مقاله: ۲۷ فروردین ۱۴۰۲، بازنگری: ۱۴ خرداد ۱۴۰۲، پذیرش نهایی: ۰۴ تیر ۱۴۰۲

10.22034/nfvm.2023.393370.1184 20.1001.1.26454491.1402.6.2.3.1

چکیده

ریحان، رزماری و زیره سبز از جمله گیاهان دارویی با کاربردهای غذایی فراوان هستند. هدف از مطالعه حاضر بررسی ترکیبات شیمیایی و خواص ضد باکتریایی اسانس این گیاهان در مقایسه با نیسین بر کنترل رشد مهم‌ترین باکتری‌های بیماری‌زا با منشأ غذایی است. نمونه‌های اسانس به روش تقطیر با آب به کمک دستگاه کلونجر تهیه و اجزاء آن به‌وسیله گاز کروماتوگرافی مجهز به طیف‌سنجی جرمی شناسایی گردید. در ادامه اثرات ضد باکتریایی اسانس‌ها در مقایسه با نیسین به روش انتشار در آگار و همچنین حداقل غلظت بازدارندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) به روش مایکرودایلوشن در برابر سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* PTCC 1337، *لیستریا مونوسیتوژنز* ATTC 19118، *باسیلوس سرئوس* PTCC 1857، *اشریشیاکلی* PTCC 1763، *پسودوموناس آئروژینوزا* PTCC 1074 و *سالمونلا تیفی‌موریوم* ATCC 14028 بررسی شد. نتایج نشان داد مهم‌ترین جزء در اسانس ریحان ترکیب لینالول (۵۲/۳۳ درصد)، در اسانس رزماری ترکیبات ۱،۸ -سینئول (۱۷/۸ درصد)، کامفور (۱۶/۶ درصد)، α-پینن (۱۳/۶۱ درصد)، و در اسانس زیره‌ی سبز اجزاء کومین‌آلدئید (۳۹/۶۷ درصد)، γ- ترپینن (۱۷/۳۵ درصد) و p- سیمن (۱۵/۹۶ درصد) بودند. تمامی اسانس‌ها و نیسین بر رشد باکتری‌های هدف اثر بازدارندگی داشتند. حساس‌ترین باکتری‌ها در برابر اسانس‌های ریحان، رزماری و زیره‌ی سبز به‌ترتیب *سالمونلا تیفی‌موریوم* (۱۲۵ µg/ml)، *پسودوموناس آئروژینوزا* (۳۱ µg/ml) و *لیستریا مونوسیتوژنز* (۱۲۵ µg/ml) بودند. نتایج به‌دست آمده نشان داد اثر ضد باکتریایی اسانس تحت تأثیر نوع اسانس و سویه باکتریایی هدف قرار دارد. احتمالاً اسانس‌های ریحان، رزماری و زیره سبز بتوانند به‌عنوان جایگزین مناسب نگهدارنده‌های شیمیایی در صنایع غذایی و دارویی مورد استفاده قرار گیرند.

واژگان کلیدی: *اسانس، بازدارندگی، رشد باکتری، میکرودایلوشن*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: m.najafi413@uoz.ac.ir

مقدمه

بخش مهمی از بیماری‌های انسانی ناشی از میکروب‌های بیماری‌زای غذایی می‌باشد که ضمن به خطر انداختن سلامت مصرف‌کنندگان ضررهای اقتصادی هنگفتی را تحمیل می‌نمایند. بر اساس آمار سازمان بهداشت جهانی سالانه از هر ۱۰ نفر یک نفر به بیماری با منشأ غذایی مبتلا شده که منجر به تلفات انسانی نزدیک به ۴۲۰۰۰۰ نفر می‌گردد (۳۱). از جمله مهم‌ترین باکتری‌های بیماری‌زا با منشأ غذایی می‌توان به *لیستریا مونوسیتوژنز*، *سالمونلا تیفی‌موریوم*، *اشریشیاکلی*، *پسودوموناس آئروژینوزا*، *لیستریا مونوسیتوژنز*، *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* اشاره نمود (۱۷، ۲۶، ۲۹). رایج‌ترین راهکار برای کنترل رشد باکتری‌های بیماری‌زا افزودن نگهدارنده شیمیایی است که به‌دلیل اثرات سوء آن بر سلامت انسان با محدودیت‌هایی مواجه شده است. به همین دلیل امروزه علاقه شدیدی به نگهدارنده‌های طبیعی مانند اسانس‌ها پدید آمده است (۱۸، ۲۵). اسانس‌ها متابولیت‌های ثانویه گیاهی هستند که علاوه بر زیست تخریب‌پذیری، و طعم منحصر به فرد دارای خواص ضد میکروبی نیز می‌باشند (۲۵). به همین دلیل علاقه بسیاری به کاربرد این ترکیبات در فارماکولوژی گیاهی، میکروبیولوژی پزشکی و بالینی، فیتوپاتولوژی و نگهداری مواد غذایی پدید آمده است (۱۱). از مهم‌ترین گیاهان دارویی-غذایی بومی ایران می‌توان به گیاهان ریحان، رزماری و زیره سبز اشاره نمود. ریحان با نام علمی *Ocimum basilicum* L. از گیاهان مهم خانواده نعناع است که اندام‌های هوایی آن به‌طور سنتی در پیشگیری و درمان اختلالات قلبی- عروقی، گرفتگی قاعدگی، دیابت، ضد اسپاسم، اختلالات گوارشی و عصبی، ضد درد و همچنین تب‌بر کاربرد دارد (۲۴). رزماری (*Rosmarinus officinalis* L) گیاهی چندساله است که به‌عنوان یک گیاه زینتی و معطر کشت می‌شود. برگ‌های رزماری کاربردهای گسترده‌ای به‌عنوان محرک، مسکن ملایم و همچنین در درمان بیماری‌های سردرد، گردش خون ضعیف و خستگی‌های جسمی دارد (۸، ۱۶). دانه زیره سبز (*Cuminum cyminum* L.) با اثرات ضد تشنج، ضد صرع، تقویت کننده معده، مدر، ضد نفخ، ضد سوء هاضمه، به‌عنوان محرک تعریق شناخته شده و مصرف آن برای بیماران دیابتی توصیه شده است (۲۱). گزارشات متعدد و متفاوتی از اثرات ضد میکروبی اسانس‌های گیاهی مختلف مانند، آویشن، دارچین، پونه کوهی، نعنا فلفلی، اکالیپتوس، علف لیمو، ریحان، رزماری و زیره سبز در دسترس است. نکته کلیدی تفاوت ترکیبات شیمیایی و تأثیرگذاری اختصاصی و محدود نگهدارنده‌های طبیعی برروی میکروب‌های بیماری‌زا است (۶، ۱۴).

نیسین آنتی‌بیوتیک کلاس I شامل ۳۴ اسید آمینه و پنج حلقه (متیل)-لانتیونین است. چندین اسید آمینه غیر معمول از جمله دهیدروآلانین (Dha)، دهیدروبوتیرین (Dhb)، اسید آمینوبوتیریک (Aba)، لانتیونین (Ala-S-Ala) و β-متیل لانتیونین (Aba-S-Ala) در نیسین شناسایی شده است. این پپتید توسط باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونه لاکتیس تولید شده و در پستانداران به راحتی توسط آنزیم‌های پروتئولیتیک تجزیه می‌شود. به همین دلیل به‌عنوان تنها باکتریوسین از سوی سازمان خواربار و کشاورزی سازمان ملل متحد (FAO) و سازمان بهداشت جهانی (WHO) مجوز استفاده در غذا و نوشیدنی‌ها را دریافت نموده است (۱، ۴).

هدف از انجام این پژوهش شناسایی اجزاء شیمیایی اسانس‌های ریحان، رزماری و زیره سبز منطقه سیستان با استفاده از کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی (GC-MS) و ارزیابی اثربخشی آنها به‌عنوان عوامل ضد میکروبی در برابر مهم‌ترین باکتری‌های مولد بیماری با منشأ غذایی بود تا موثرترین ترکیب ضد میکروب در مقایسه با ترکیب نیسین معرفی گردد.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد اولیه: نمونه‌های برگ رزماری، ریحان و زیره سبز از پژوهشگاه کشاورزی زابل (زابل، ایران)، نیسین از شرکت سیگما-آلدریچ (دورست، انگلستان) به‌صورت

بسته‌بندی و همچنین تمامی ترکیبات شیمیایی و محیط کشت‌های مورد استفاده از برند Merck (دارمشتات، آلمان) خریداری گردیدند. سویه‌های باکتریایی به‌صورت لیوفلیزه از کلکسیون کشت میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد.

استخراج اسانس و آنالیز GC-MS: برگ‌ها بدون ذرات خارجی پس از شستشو با آب، در دمای اتاق خشک و سپس توسط دستگاه خردکن (فلر، چین) پودر شدند. مقدار ۵۰ گرم پودر به دستگاه کلونجر منتقل و استخراج اسانس برای مدت ۳ ساعت به روش تقطیر با آب انجام شد. رطوبت اسانس توسط انیدرو سولفات سدیم خارج و تا زمان استفاده در ویال‌های شیشه‌ای دربسته و تیره درون یخچال نگهداری شد. ترکیبات اسانس با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی (Agilent 7890A -آمریکا) متصل به طیف‌سنج جرمی (Agilent 5975C) و ستون DB-5 (طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۲۵۰ میکرومتر) بررسی گردید. گاز هلیوم به‌عنوان ناقل، با سرعت ml/min ۱/۱- ۰/۹ به ستون با دمای متغیر ۳۰ تا ۲۵۰ °C (روند افزایشی ۲/۵ °C/min) تزریق گردید. انرژی یونیزاسیون طیف‌سنج جرمی ۷۰ الکترون ولت بود. ترکیبات اسانس با بررسی طیف نرمال آلکان‌های C7 - C22 و مقایسه آنها با طیف جرمی ترکیبات استاندارد و بهره‌گیری از فرهنگ ترکیبات طبیعی شناسایی شدند (۱۰).

تکثیر سویه‌های باکتریایی: اثر ضد باکتریایی اسانس و نیسین در برابر سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* PTCC 1337، *لیستریا مونوسیتوژنز* ATTC 19118، *باسیلوس سرئوس* PTCC 1857، *اشریشیاکلی* PTCC 1763، *پسودوموناس آئروژینوزا* PTCC 1074 و *سالمونلا تیفی‌موریوم* ATCC 14028 مورد بررسی قرار گرفت. بسته‌بندی شیشه‌ای حاوی نمونه‌های میکروبی در شرایط استریل شکسته و تمامی سویه‌ها به‌صورت جداگانه به محیط کشت مایع تریپتوسوی براث (TSB) تلقیح شدند. سوسپانسیون *حاوی باسیلوس سرئوس* در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و سایر سویه‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. کلنی‌های خالص با انجام کشت خطی برروی محیط کشت تریپتوسوی آگار (TSA) تهیه و با تلقیح مجدد به محیط کشت TSB تکثیر شدند. سوسپانسیون باکتریایی نیم مک‌فارلند ($1/5\times10^6$ CFU/ml - ۱) با استفاده از کشت تازه ۲۴ ساعته تهیه گردید (۲۳).

آزمون ضد میکروبی به روش سنجش انتشار در آگار: سوسپانسیون باکتریایی به حجم ۱ میلی‌لیتر به پلیت ۹ سانتی‌متر منتقل و مقدار ۱۵ میلی‌لیتر از محیط کشت نوترینت آگار ذوب‌شده به آن اضافه و در هر پلیت چاهک‌هایی به قطر ۵ میلی‌متر ایجاد گردید. به هر چاهک مقدار µl ۷۵ اسانس گیاه و نیسین با غلظت ۲۰ درصد اضافه و سپس با محیط کشت مذاب نوترینت آگار (w/v ۰/۷۵) پر شد. Tween 80 با غلظت v/v ۰/۵درصد به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. محلول آبی نیسین به کمک محلول دی‌متیل‌سولفوکسید (۱۰ درصد) تهیه و پس از فیلتراسیون (µm ۰/۲) آماده گردید. پلیت‌های تهیه شده مطابق شرایط ذکر شده گرمخانه‌گذاری و اثر ضد باکتریایی بر حسب میلی‌متر ناحیه بازداری (قطر چاله- قطر هاله) قابل مشاهده گزارش شد. تمامی آزمون‌ها در ۵ تکرار انجام گرفت (۴).

آزمون تعیین MIC و MBC به روش میکرودایلوشن: MIC و MBC نمونه‌های اسانس و نیسین در برابر سویه‌های هدف ($1/5\times10^6$ CFU/ml - ۱) به روش میکرودایلوشن و با استفاده از محیط کشت TSB و پلیت ۹۶ خانه انجام شد. رقت‌های سریالی از µg/ml ۴۰۰۰ – ۱۵/۶ تهیه گردید. محیط کشت حاوی میکروب هدف به‌عنوان کنترل مثبت و محیط کشت فاقد باکتری به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. پلیت‌ها برای مدت ۴۸ ساعت در دمای ذکرشده گرمخانه‌گذاری و به لحاظ کدورت سنجی در طول موج ۶۲۰ ηm توسط اسپکتروفتومتر (سسیل، انگلستان) بررسی گردیدند. کمترین غلظت فاقد رشد باکتری به‌عنوان MIC ثبت شد.

از خانه‌هایی که فاقد رشد میکروبی بودند، ۵۰ میکرولیتر به محیط کشت نوترینت آگار تلقیح و برای ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. کمترین غلظتی که قادر به مرگ ۹۹/۹ باکتری هدف بود به‌عنوان MBC ثبت گردید (۲۳).

تجزیه و تحلیل داده‌ها: تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۲ و مقایسه میانگین داده‌ها توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن و در سطح اطمینان ۵ درصد انجام شد.

نتایج

نتایج آنالیز GC-MS: نتایج آزمون GC-MS نمونه‌های اسانس ریحان، رزماری و زیره سبز در جدول ۱ آورده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود اجزاء اسانس‌های ریحان، رزماری و زیره سبز به‌ترتیب در سطوح ۹۸/۸۷، ۹۹/۳۱ و ۹۵/۸۵ درصد شناسایی شدند. ۲۹ ترکیب شیمیایی در اسانس ریحان تشخیص داده شد که لینالول (۵۲/۳۳ درصد)، α-تریپنول (۷/۳ درصد)، اجنول (۶/۵۳ درصد)، α-تریپنول (۴/۴۴ درصد) و مورول-۵- ان-۴- α-ال (۴/۱۸ درصد) به‌ترتیب بیشترین مقادیر (>۴ درصد) را به خود اختصاص دادند. از مجموع ۳۲ جزء شیمیایی تشخیص داده شده در اسانس رزماری، ترکیبات ۱، ۸ -سینئول (۱۷/۸ درصد)، کامفور (۱۶/۶ درصد)، α-پینن (۱۳/۶۱ درصد)، بورنئول (۸/۷۲ درصد)، α - تریپنئول (۷/۹۶ درصد) و p- سیمن (۴/۱۱ درصد) بیشترین مقادیر را دارا بودند. همچنین بررسی نتایج به‌دست آمده از شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس زیره سبز ۲۳ ترکیب مختلف را نشان می‌دهد که بیشترین به‌ترتیب به اجزاء کومین آلدئید (۳۹/۶۷ درصد)، γ-ترپینن (۱۷/۳۵ درصد)، p- سیمن (۱۵/۹۶ درصد)، β-پینن (۶/۸۶ درصد) و p-سیمن-۷-ال (۴/۴۲ درصد) اختصاص داشت.

فعالیت ضد باکتریایی نمونه‌های اسانس و نیسین به روش انتشار در آگار: نمونه‌های اسانس ریحان، رزماری، زیره سبز و نیسین به‌طور معناداری بر مهار رشد سویه‌های هدف (جدول ۲) مؤثر بودند ($p<0.05$). بیشترین شعاع بازدارندگی را *پسودوموناس آئروژینوزا* در برابر اسانس رزماری (۱۸/۱ mm) و کمترین مقدار از تأثیر اسانس زیره سبز بر *پسودوموناس آئروژینوزا* (۷/۱ mm) و اسانس ریحان بر *باسیلوس سرئوس* (۷/۲ mm) به‌دست آمد ($p<0.05$). بررسی اثر بازدارندگی نیسین بر مهار رشد باکتری‌ها به‌طور معنی‌داری متفاوت بود ($p<0.05$). حساس‌ترین سویه *لیستریا مونوسیتوژنز* با ناحیه بازدارندگی ۱۲/۱ mm و مقاوم‌ترین سویه‌ها *سالمونلا تیفی‌موریوم* و *اشریشیاکلی* به‌ترتیب با نواحی بازدارندگی ۸/۱ و ۸/۳ mm ثبت شد ($p<0.05$).

جدول ۱- ترکیبات شیمیایی اسانس‌های ریحان، رزماری و زیره سبز شناسایی شده با استفاده از GC-MS

	ریحان			رزماری			زیره سبز		
ردیف	ترکیب شیمیایی	RI	درصد	ترکیب شیمیایی	RI	درصد	ترکیب شیمیایی	RI	درصد
۱	α- Pinene	۹۳۶	۰/۳۵	Tricyclene	۱۰۵۹	۰/۸۱	α-Thujene	۹۲۸	۰/۵۳
۲	Camphene	۹۴۷	۰/۱۶	α- Pinene	۱۰۶۹	۱۳/۶۱	α- Pinene	۹۳۷	۱/۳۶
۳	Sabinene	۹۷۱	۰/۲۵	Fenchene	۱۰۸۸	۰/۱۵	Camphene	۹۴۷	۰/۰۸
۴	β-Pinene	۹۸۶	۰/۸۳	Camphene	۱۰۹۳	۶/۱۰	β-pinene	۹۶۷	۶/۸۶
۵	Myrcene	۹۹۷	۱/۵۶	Δ -Carene	۱۱۴۹	۰/۲۵	Myrcene	۹۸۱	۰/۴۳
۶	α-Phellandrene	۱۰۱۲	۰/۸۱	Myrcene	۱۱۶۱	۱/۱۵	α-Phellandrene	۹۹۸	۰/۵۷
۷	Limonene	۱۰۱۹	۰/۱۲	α-Terpinene	۱۱۸۹	۰/۹۶	δ-3 -Carene	۱۰۱۳	۰/۰۵
۸	β –Phellandrene	۱۰۲۹	۰/۱۷	Limonene	۱۲۰۵	۳/۳۷	α-Terpinene	۱۰۱۵	۰/۰۲
۹	1,8- Cineole	۱۰۳۲	۲/۶۹	1,8-Cineole	۱۲۱۱	۱۷/۸	p-Cymene	۱۰۲۱	۱۵/۹۶
۱۰	β-Ocimene	۱۰۴۱	۴/۱۷	γ-Terpinene	۱۲۴۴	۰/۶۹	β -Phellandrene	۱۰۲۵	۰/۹۲

۱۱	γ-Terpinene	۱۰۵۳	۰/۱۵	p-Cymene	۱۲۷۹	۴/۱۱	Limonene	۱۰۲۸	۰/۲۶
۱۲	Fenchone	۱۰۸۰	۰/۶۹	Styrene	۱۴۳۱	۰/۱۲	1,8-Cineole	۱۰۳۰	۰/۸۷
۱۳	Linalool	۱۰۸۶	۵۲/۳۳	1-Octen-3-ol	۱۴۶۱	۰/۲۸	γ-Terpinene	۱۰۵۶	۱۷/۳۵
۱۴	Camphor	۱۱۰۷	۰/۹۳	Camphor	۱۵۰۳	۱۶/۶	Pinocarveol	۱۱۳۹	۰/۰۳
۱۵	Borneol	۱۱۵۲	۱/۸۹	Linalool	۱۵۶۹	۱/۱۶	Terpinen-4-ol	۱۱۸۰	۰/۰۷
۱۶	Terpinene-4-ol	۱۱۷۳	۰/۱۵	Borneol	۱۵۹۱	۰/۲۲	1,3-Ciclohexadiene-1-methanol	۱۱۹۱	۰/۲۷
۱۷	α-Terpineol	۱۱۷۵	۴/۴۴	Fenchole	۱۵۹۹	۰/۲۱	o-Cumenol	۱۱۹۳	۰/۰۶
۱۸	Geraniol	۱۲۴۸	۰/۶۳	Caryophyllene	۱۶۱۱	۱/۶۹	Cumin-aldehde	۱۲۴۰	۳۹/۶۷
۱۹	Bornyl acetate	۱۲۶۹	۱/۸۲	Terpinen-4-ol	۱۶۲۲	۱/۸۹	α-Terpinen-7-al	۱۲۸۲	۱/۷۵
۲۰	Eugenol	۱۳۶۲	۶/۵۳	E-pinocarveol	۱۶۸۹	۰/۱۲	γ -Terpinen-7-al	۱۲۸۸	۳/۱۰
۲۱	α -Copaene	۱۳۶۹	۰/۴۳	α-Humulene	۱۶۹۳	۳/۴۴	p-Cymen-7-ol	۱۲۹۱	۴/۴۲
۲۲	β -Cubebene	۱۳۸۰	۰/۳۷	Isoborneol	۱۷۰۱	۲/۱۹	Thymol	۱۲۹۳	۰/۱۹
۲۳	α - Elemene	۱۳۸۳	۱/۶۳	γ-Muurolene	۱۷۰۸	۰/۱۳	p-Metha-1,4-diene-7-ol	۱۳۳۰	۰/۹۳
۲۴	β-Elemene	۱۳۹۱	۰/۹۱	α-Terpineol	۱۷۲۲	۷/۹۶	-	-	-
۲۵	Methyl eugenol	۱۴۰۱	۰/۷۲	Borneol	۱۷۳۵	۸/۷۲	-	-	-
۲۶	Spathulenol	۱۵۷۳	۱/۱۵	Δ-Cadinene	۱۷۶۱	۰/۶۶	-	-	-
۲۷	Caryophyllene oxide	۱۵۸۶	۱/۵۲	Citronellol	۱۷۹۶	۰/۰۴	-	-	-
۲۸	Muurol-5-en-4- α-ol	۱۶۳۶	۴/۱۸	Caryophyllene	۱۹۹۷	۰/۳۳	-	-	-
۲۹	α- Cadinol	۱۶۵۸	۷/۳۰	Eugenol methyl ether	۲۰۸۲	۱/۶۳	-	-	-
۳۰	-	-	-	Eugenol	۲۲۱۷	۰/۸۷	-	-	-
۳۱	-	-	-	Thymol	۲۳۱۹	۰/۱۳	-	-	-
۳۲	-	-	-	Carvacrol	۲۳۴۹	۰/۹۲	-	-	-
	گروه‌های شیمیایی								
	Monoterpene		۶۴/۳۳		۷۰/۵۲			۸۹/۲۷	
	Sesquiterpene		۱۸/۱۸		۱۶/۳۷			۰/۰۳	
	Phenylpropanoids		۱۶/۳۶		۱۲/۴۲			۵/۹۴	
	جمع کل		۹۸/۸۷		۹۹/۳۱			۹۵/۸۵	

RI: زمان بازدارندگی

مقادیر MIC و MBC نمونه‌های اسانس و نیسین:

بررسی MIC و MBC عوامل ضد میکروبی در برابر باکتری‌های هدف (جدول ۳) نشان می‌دهد کمترین مقدار MIC (۳۱ µg/ml) و MBC (۶۳ µg/ml) از تأثیرگذاری اسانس رزماری بر *پسودوموناس آئروژنز* به‌دست آمد.

همچنین بالاترین مقدار MIC (۱۰۰۰ µg/ml) از تأثیرگذاری اسانس ریحان بر *باسیلوس سرئوس*، رزماری بر *سالمونلا تیفی‌موریوم* و زیره سبز در برابر *پسودوموناس آئروژینوزا* دیده شد. بیشترین سطح MBC (۲۰۰۰ µg/ml) برای *پسودوموناس آئروژینوزا* تحت تأثیر اسانس زیره سبز ثبت گردید. مقادیر MIC و MBC نیسین در برابر سویه‌های مختلف متفاوت بود. سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس* و *پسودوموناس آئروژینوزا* کمترین مقدار MIC (۶۳ µg/ml) ، و *باسیلوس سرئوس* کمترین مقدار MBC (۶۳ µg/ml) را نشان دادند.

جدول ۲- اثر ضد باکتریایی اسانس‌های ریحان، رزماری، زیره سبز و نیسین (mm) بر روی باکتری‌های هدف به روش سنجش انتشار در آگار

	میکروارگانیسم	بازدارندگی اسانس (mm)			بازدارندگی نیسین (mm)	Tween 80
		ریحان	رزماری	زیره سبز		
گرم مثبت	*لیستریا مونوسیتوژنز*	۹/۳ ± ۰/۳ ^{E,d}	۱۷/۶ ± ۰/۲ ^{B,a}	۱۴/۶ ±۰/۲ ^{A,b}	۱۲/۱ ±۰/۲ ^{A,c}	NE
	استافیلوکوکوس اورئوس	۱۱/۱ ±۰/۲ ^{D,c}	۱۳/۳ ±۰/۱ ^{C,a}	۱۲/۹ ±۰/۳ ^{C,b}	۱۰/۸ ±۰/۳ ^{B,c}	NE
	باسیلوس سرئوس	۷/۲ ± ۰/۳ ^{F,d}	۱۰/۲ ± ۰/۶ ^{D,c}	۱۴/۱ ±۰/۳ ^{B,a}	۱۱/۲ ±۰/۱ ^{B,b}	NE
گرم منفی	*سالمونلا تیفی‌موریم*	۱۵/۳ ±۰/۳ ^{A,a}	۸/۶ ± ۰/۱ ^{F,c}	۱۰/۳ ±۰/۳ ^{D,b}	۸/۱ ±۰/۱ ^{D,d}	NE
	پسودوموناس آئروژینوزا	۱۱/۷ ± ۰/۱ ^{C,b}	۱۸/۱ ±۰/۷ ^{A,a}	۷/۱ ±۰/۲ ^{F,d}	۹/۵ ±۰/۳ ^{C,c}	NE
	اشریشیاکلی	۱۴/۴ ± ۰/۲ ^{B,a}	۱۰/۵ ± ۰/۲ ^{D,b}	۹/۷ ±۰/۱ ^{E,c}	۸/۳ ±۰/۲ ^{D,d}	NE

حروف متفاوت بزرگ و کوچک به‌ترتیب در هر ستون و ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد است. NE: ناحیه بازدارندگی شناسایی نشد.

دادها: میانگین ± انحراف معیار

جدول ۳- حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و کشندگی (MBC) اسانس‌های ریحان، رزماری، زیره سبز و نیسین (µg/ml) به روش میکرودایلوشن

	باکتری	غلظت	عامل ضد باکتریایی			
			اسانس (µg/ml)			نیسین (µg/ml)
			ریحان	رزماری	زیره سبز	
گرم مثبت	*لیستریا مونوسیتوژنز*	MIC	۲۵۰	۶۳	۱۲۵	۱۲۵
		MBC	۵۰۰	۶۳	۱۲۵	۲۵۰
	استافیلوکوکوس اورئوس	MIC	۱۲۵	۱۲۵	۲۵۰	۶۳
		MBC	۱۲۵	۲۵۰	۲۵۰	۱۲۵
	باسیلوس سرئوس	MIC	۱۰۰۰	۵۰۰	۲۵۰	۶۳
		MBC	۲۰۰۰	۱۰۰۰	۲۵۰	۶۳
گرم منفی	*سالمونلا تیفی‌موریوم*	MIC	۱۲۵	۱۰۰۰	۵۰۰	۱۲۵
		MBC	۱۲۵	۱۰۰۰	۱۰۰۰	۲۵۰
	پسودوموناس آئروژینوزا	MIC	۵۰۰	۳۱	۱۰۰۰	۶۳
		MBC	۱۰۰۰	۶۳	۲۰۰۰	۱۲۵
	اشریشیاکلی	MIC	۲۵۰	۵۰۰	۵۰۰	۱۲۵
		MBC	۲۵۰	۱۰۰۰	۵۰۰	۱۲۵

بحث و نتیجه‌گیری

در بسیاری از نقاط جهان طب سنتی گیاهی با هدف کنترل عوامل عفونی مختلف استفاده می‌شود (۱۰). اخیراً اسانس‌ها به‌دلیل اثرات ضد میکروبی، سازگاری با بدن و محیط زیست مورد توجه قرار گرفته‌اند (۱۱). اسانس‌ها ترکیبات پیچیده‌ای از مواد فعال زیستی با ساختارهای مونوسزکوئی و دی‌ترپن‌ها، ترکیبات فنلی، اجزاء گوگرددار و نیز مشتقات فنیل پروپانوئید هستند. ترپنوئیدها و فنیل پروپانوئیدها اجزای اصلی موجود در اسانس اکثر گیاهان هستند. در بسیاری از موارد مقدار ترپنوئیدها به حدود ۸۰ درصد می‌رسد (۵).

بررسی منابع علمی گذشته نتایج متفاوتی از نوع و مقادیر ترکیبات شیمیایی شناسایی شده اسانس‌های ریحان، رزماری و زیره سبز را نشان می‌دهد. آمور و همکاران در سال ۲۰۲۱ بیشترین اجزاء شیمیایی اسانس گیاه ریحان را ترکیبات لینالول (۴۱/۳ درصد) و ۱، ۸- سینول (۹/۶درصد) گزارش نمودند (۲). شاه و همکاران (۲۰۲۲) ترکیبات اسانس ریحان هندی را بررسی و بیان داشتند لینالول بالاترین درصد (۷۵/۱) را دارد (۲۸). ترکیبات شیمیایی اسانس رزماری توسط سارموم و

همکاران در سال ۲۰۱۹ بررسی و مهم‌ترین اجزاء شیمیایی اسانس α-پینن (۱۸/۲۲ درصد)، اکسید کاریوفیلن (۱۴/۴۳ درصد)، ۱، ۸- سینئول (۱۴/۱۵ درصد)، کامفن (۱۲/۱۶ درصد) و D- وربنون (۱۱/۲۱ درصد) گزارش گردید (۲۷). در پژوهشی بیشترین ترکیبات اسانس رزماری α-پینن (۲۴/۹ درصد)، وربنول (۸/۹ درصد)، وربنون (۸/۵ درصد)، ۸،۱ -سینئول (۸/۲ درصد) و ایزوبرنول (۸/۱ درصد) بیان شد (۸). در تحقیقی دیگر مهم‌ترین ترکیبات اسانس زیره سبز کومین آلدئید (۳۰/۸ درصد) و γ- تریپنن (۱۵/۴ درصد) بیان شده است (۲۲). نتایج به‌دست آمده از این گزارشات با تحقیق حاضر مشابهت دارند. اختلاف در مقادیر و وجود برخی ترکیبات را می‌توان ناشی از تأثیرگذاری عواملی چون نوع و سن گیاه، ژنتیک، همچنین عوامل محیطی مانند ناحیه جغرافیایی، ویژگی‌های خاک، شرایط آب و هوایی فصلی، نحوه کاشت و داشت و برداشت گیاه، همچنین روش استخراج اسانس و نوع تجهیزات شناسایی مورد استفاده بر اجزا اسانس دانست (۱۲، ۱۸).

اسانس‌های ریحان، رزماری و زیره سبز و نیز نیسین بر مهار رشد تمامی باکتری‌های مورد بررسی مؤثر بودند. گزارشات متعددی از مهار رشد باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیاکلی*، *پسودوموناس آئروژنز*، *لیستریا مونوسیتوژنز*، *باسیلوس سرئوس* و *سالمونلا تیفی‌موریوم* تحت تأثیر اسانس‌های ریحان (۲، ۱۵، ۲۳)، رزماری (۱۶، ۱۹) و زیره سبز (۲۱، ۳۰) در دسترس است که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. در همین رابطه گزارش شده ترکیبات ترپنی و فنلیک اسانس‌ها به‌دلیل خاصیت آب‌گریز خود می‌توانند از ساختار دیواره سلولی باکتری‌ها عبور و وارد سلول شوند. اما محتوای لیپوپلی‌ساکاریدی غشای خارجی باکتری‌های گرم‌منفی تا حدودی به‌عنوان مانعی در برابر ماکرومولکول‌ها و ترکیبات آبگریز عمل می‌کند که می‌تواند آنها را مقاوم‌تر سازد، با این‌حال ترکیبات کوچک‌مولکول و آب‌دوست از کانال‌های پروتئینی پورین عبور نموده و فعالیت‌های درون سلولی را مختل می‌نمایند (۷، ۱۲). از سویی دیگر با تخریب نظم مولکولی ترکیبات غشاء سیتوپلاسمی، نفوذپذیری افزایش می‌یابد که با از دست دادن ATP، تخلیه یون‌ها و کاهش پتانسیل غشاء همراه است (۲).

نیسین اثر بازدارندگی بیشتری بر باکتری‌های گرم‌مثبت در مقایسه با گرم‌منفی نشان داد، که با گزارشات منتشر شده تطبیق دارد (۳، ۱۳، ۲۰). تفاوت در ساختار دیواره سلولی، گونه و وضعیت فیزیولوژیکی میکروارگانیسم‌ها و همچنین غلظت نیسین مورد استفاده از جمله عوامل مؤثر بر قدرت مهارکنندگی رشد بیان شده است (۱۳). نیسین پس از نفوذ در دیواره سلولی میکروب با فسفولیپیدهای آنیونی غشاء سلولی به‌ویژه لیپید نوع II واکنش داده و منافذی را ایجاد می‌نماید. پدید آمدن روزنه‌ها موجب خروج ترکیبات حیاتی مانند اسیدهای آمینه، املاح پتاسیم و هیدروژن و ATP می‌شود. نتیجه چنین رخدادی برهم خوردن تعادل اسمتیک و مکانیسم تنظیم pH درون سلولی است که می‌تواند رشد سلولی را متوقف و حتی منجر به مرگ شود (۹).

نتایج به‌دست آمده از تجزیه و تحلیل داده‌های آزمون شعاع بازدارندگی و MIC، نشان می‌دهد بیشترین بازدارندگی اسانس ریحان، رزماری و زیره سبز به‌ترتیب در برابر *سالمونلا تیفی‌موریوم*، *پسودوموناس آئروژینوزا* و *باسیلوس سرئوس* به‌دست آمده است. این مطلب بیان کننده این نکته مهم است که اسانس‌ها اثر یکسانی بر سویه‌های میکروبی ندارند و در انتخاب نوع اسانس می‌بایست به سویه هدف نیز توجه داشت. با توجه به نتایج این پژوهش احتمالاً اسانس‌های ریحان، رزماری و زیره سبز بتوانند رشد باکتری‌های مولد فساد را در صنایع غذایی و دارویی کنترل نمایند. که این مهم مستلزم بررسی‌های دقیق، بالینی، اقتصادی در محیط واقعی غذایی است.

سپاسگزاری

این پژوهش با بهره‌گیری از گرنت شماره UOZ-GR-

9955 اجرا گردیده است. نویسندگان مقاله مراتب سپاسگزاری خود را از دست‌اندکاران آزمایشگاه علوم و صنایع غذایی دانشگاه زابل اعلام می‌دارند.

References

1- Alhaithloul H.A, Soliman M.H, Ameta K.L, El-Esawi M.A, Elkelish A. Changes in eco-physiology, osmolytes, and secondary metabolites of the medicinal plants of Mentha piperita and *Catharanthus roseus* subjected to drought and heat stress. *Biomolecules*. 2020; 10(1): 43-64.

2- Amor G, Sabbah M, Caputo L, Idbella M, De Feo V, Raffaele P, *et al*. Basil Essential Oil: Composition, Antimicrobial Properties, and Micro-encapsulation to Produce Active Chitosan Films for Food Packaging**.** *Foods*. 2021; 10(1): 1- 16.

3- Anumudu C, Hart A, Miri T, Onyeaka H. Review, Recent Advances in the Application of the Antimicrobial Peptide Nisin in the Inactivation of Spore-Forming Bacteria in Foods. *Molecules*. 2021; 26(18): 1-16.

4- Bennett S, Said L.B, Lacasse P, Malouin F, Fliss I. Susceptibility to Nisin, Bactofencin, Pediocin and Reuterin of Multidrug Resistant *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae* and *Streptococcus uberis* Causing Bovine Mastitis. *Antibiotics.* 2021; 10(11): 1-12.

5- Bolouri P, Salami R, Kouhi S, Kordi M, Asgari Lajayer B, Hadian J, *et al*. Applications of Essential Oils and Plant Extracts in Different Industries. *Molecules*. 2022; 27(24): 8999. [In Persian]

6- Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *J. Food Microbiol.* 2023; 24(3): 223-253.

7- Carvalho M, Albano H. Teixeira P. In Vitro Antimicrobial Activities of Various Essential Oils Against Pathogenic and Spoilage Microorganisms. *Food Qual Hazards Control*. 2018; 5(2): 41-48.

8- Caputo L, Trotta M, Romaniello A, De Feo V. Chemical Composition and Phytotoxic Activity of *Rosmarinus officinalis* Essential Oil. *Natural Product Communications*. 2018; 13(10): 1367-1370.

9- Duraisamy S, Balakrishnan E, Ranjith S, Husain F, Sathyan A, Peter A.S, *et al*. Bacteriocin-a potential antimicrobial peptide towards disruptingand preventing biofilm formation in the clinical and environmentallocales. *Environ Sci Pollut Res*. 2020; 27(36): 44922–44936

10- Etemadi R, Moghadam P, Yousefi F. Evaluation of chemical composition and antimicrobial activities of *Eucalyptus camaldulensis* essential oil on dental caries pathogens. *J Bas Res Med Sci*. 2020; 7(1): 43-49. [In Persian]

11- Firouzi A.F, Baghaeifar S, Taheri E, Farhoudi Sefidan Jadid M, Safi M, Seyyed Sani N, *et al*. Enhanced anticancer potency of doxorubicin in combination with curcumin in gastric adenocarcinoma. *J Biochem Mol Toxicol*. 2020; 34(6): e22486. [In Persian]

12- Fokou B.H.J, Dongmo M.J.P, Boyom F.F. Essential Oil's chemical composition and pharmacological properties. *Intech Open*. 2022; 86573.

13- Ghapanvari P, Taheri M, Jalilian F.A, Dehbashi S, Dezfuli A.A.Z, Arabestani M.R. The efect of nisin on the bioflm production, antimicrobial susceptibility and bioflm formation of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Med Res*. 2022; 27(173): 1-18. [In Persian]

14- Gurtler J.B, Garner C.M. A review of essential oils as antimicrobials in foods with special emphasis on fresh produce. *J. Food Prot.* 2022; 85(9): 1300-1319.

15- Ilic Z.S, Milenkovic L, Sunic L, Tmusic N, Mastilovic J, Kevresan Z, *et al*. Efficiency of Basil essential oil antimicrobial agents under different shading treatments and harvest times. *J Agron*. 2021; 11(8): 1-12.

16- Jedidi S, Alout F, Selmi H, Rtibi K, Sammari H, Sebai H. Antibacterial Capacity and Inhibitory Effect of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Essential Oils on Gastrointestinal Transit in Rats. *Act. Sci. Nutr. Health*. 2023; 7(1): 115-120.

17- Li X, Gu N, Huang T.Y, Zhong F, Peng G. *Pseudomonas aeruginosa*: A typical biofilm forming pathogen and an emerging but underestimated pathogen in food processing. *Front Microbiol*. 2023; 13: 1114199.

18- Li Z.H, Cai M, Liu Y.S, Sun P.L, Luo S.L. Antibacterial Activity and Mechanisms of Essential Oil from *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis*. *Molecules.* 2019; 24(8): 1-10.

19- Mendez P.O, Martinez A.C, Estrada E.S, Asorey L.G, Sanchez-Vega R, Monterrubio A.L.R, *et al*. Antioxidant and Antimicrobial Activity of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and Garlic (*Allium sativum*) Essential Oils and Chipotle Pepper Oleoresin (*Capsicum annum*) on Beef Hamburgers. *Foods*. 2022; 11(1): 1-18.

20- Moshtaghi H, Rashidimehr A, Shareghi B. Antimicrobial Activity of Nisin and Lysozyme on Foodborne Pathogens *Listeria Monocytogenes*, *Staphylococcus Aureus*, *Salmonella Typhimurium*, and *Escherichia Coli* at Different pH. *Food Nutr Res*. 2018; 3(4): 193-201. [In Persian]

21- Moradi A, Davati N, Emamifar A. Effects of *Cuminum cyminum* L. essential oil and its nanoemulsion on oxidative stability and microbial growth in mayonnaise during storage. *Food Sci Nutr*. 2023; 0:1–13. [In Persian]

22- Osanloo M, Eskandari Z, Zarenezhad E, Qasemi H, Nematollahi A. Studying the microbial, chemical, and sensory characteristics of shrimp coated with alginate sodium nanoparticles containing *Zataria multiflora* and *Cuminum cyminum* essential oils. *Food Sci. Nutr.* 2023; 0(0): 1-15. [In Persian]

23- Najafi ghaghlestani S, Najafi M.A. Antibacterial properties of basil essential oil (*Ocimum baslicum* L.) under salt stress. *NFVM*. 2023; 6(1): 40-51. [In Persian]

24- Purushothaman B, Prasanna Srinivasan R, Suganthi P, Ranganathan B, Gimbun J, Shanmugam K. A Comprehensive review on Ocimum basilicum. *Nat Med*. 2018; 18(3): 71-83.

25- Rahnama M, Noorijangi A, Alipour Eskandani M. The effect of Cuminum Cyminum essence in preventing the growth of *Listeria monocytogenes* in the minced meat of *Schizothorax Zarudnyi*. *Journal of Torbat Heydariyeh University of Medical Science*. 2018; 6(1): 27-36. [In Persian]

26- Rapp J.H.D, Dhawan S, Gupta S.K, Gupta T.B, Brightwell G. Molecular detection and characterization of foodborne bacteria: Recent progresses and remaining challenges. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2023; 22(3): 1463-2487.

27- Sarmoum R, Soumia H, Biche M, Djazouli Z, Zebib B, Merah O. Effect of Salinity and Water Stress on the Essential Oil Components of Rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*). *Agron*. 2019; 9(5): 1-10.

28- Shah R, Al Ismaili S.H, Al-Siaby S.S, Al Nasiri A.M, Al Maskari T.H, Jamal A, *et al*. Determination of chemical composition of essential oils extracted from conventional and organically grown Basil (*Ocimum Basilicum*) from different geographical regions. *Sarhad J. Agric.* 2022; 38(2): 532-539.

29- Shahbazi Y, Shavis N. Antimicrobial effects of Mentha spicata essential oil and methanolic carrot extract against Staphylococcus aureus and Listeria monocytogenesin fish soup. *Pharm Biomed Res*. 2019; 5(1): 32-38.

30- Walasek-Janusz M, Grzegorczyk A, Zalewski D, Malm A, Gajcy S, Gruszeck R. Variation in the Antimicrobial Activity of Essential Oils from Cultivars of *Lavandula angustifolia* and L. × intermedia. *Agron*. 2022; 12(12): 1-13.

31- World Health Organisition (WHO). Estimating the burden of foodborne diseases. 2022.

New Findings in Veterinary Medicine
Homepage: nfvm.uoz.ac.ir
Semiannual - Print ISSN: 2645-4491 Online ISSN: 2676-5004

Volume 6, Issue 2, Autumn & Winter 2023, pages: 98-107

Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of basil (*Ocimum baslicum* L.), rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and cumin (*Cuminum cyminum* L.) in comparison with nisin

Mohammad Ali Najafi[1*], Arsam Ayinechi[2], Zabih allah Bahmani[3], Sara Najafi Qhaghelestani[4]

1- Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Zabol University, Zabol, Iran.
2- Master's student, Department of Food Science and Technology, Rodaki Institute of Higher Education, Tonkabon, Iran.
3- Assistant Professor, Department of Aquatic Processing and Biotechnology, Fisheries Science Research Institute, Bandar Abbas, Iran.
4- PhD Graduate Student, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran.

Receive: April 16, 2023; Revise: June 4, 2023; Accept: June 25, 2023

10.22034/nfvm.2023.393370.1184 20.1001.1.26454491.1402.6.2.3.1

Summary

Basil, rosemary and cumin are medicinal plants with many food applications. The purpose of this study is to investigate the chemical composition and antibacterial properties of the essential oils of these plants in comparison with nisin on the growth control of the most important food-borne pathogenic bacteria. Essential oil samples were prepared by water distillation method with the help of Celevenger device and its components were identified by Gas chromatography–mass spectrometry. In the following, the antibacterial property of essential oils compared to nisin by the agar diffusion assay, as well as the minimum growth inhibitory concentration (MIC) and the minimum lethal concentration (MBC) by microdilution method against strains of the *Staphylococcus aureus* PTCC1337, *Listeria monocytogenes* ATTC19118, *Bacillus cereus* PTCC1857, *Escherichia coli* PTCC1763, *Pseudomonas aerogenes* PTCC1074, and *Salmonella typhimurium* ATCC14028 were investigated. The obtained results showed that the most important compounds in basil essential oil: linalool (52.33%), in rosemary essential oil: 1,8-cineole (17.8%), camphor (16.6%), α-pinene (13.61%), and in cumin essential oil: cumin-aldehyde (39.67%), γ - terpinen (17.35%) and p-simen (15.96%) were identified. All essential oils and nisin inhibited the growth of target bacteria. The most sensitive bacteria to essential oils of basil, rosemary and cumin were *Salmonella typhimurium* (125 µg/ml), *Pseudomonas aerogenes* (31 µg/ml) and *Listeria monocytogenes* (125 µg/ml), respectively. The antibacterial effect of the essential oil is affected by the type and the target bacterial strain. Basil, rosemary and cumin essential oils can probably be used as suitable substitutes for chemical preservatives in food and pharmaceutical industries.

Keywords: *Essential oil, Inhibition, Bacterial growth, Microdilution*