

بررسی و مقایسه‌ی اثر عصاره‌ی متانولی و آبی گیاه نعناع، رزماری و اسطوخودوس بر رشد اشرشیاکلی و باسیلوس سرئوس

بهاره صحرائیان¹، فریبا نقی پور^{1*}، فریده طباطبایی یزدی²

¹دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
²عضو هیات علمی گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: 1391/1/22 تاریخ پذیرش: 1391/5/13

چکیده

در این پژوهش، اثر عصاره‌ی متانولی و آبی گیاه نعناع (*Matricaria recutita L*)، رزماری (*Rosmarinus Officinalis L*) و اسطوخودوس (*Lavandula sp*) بر اشرشیاکلی (*Escherichia coli*) و باسیلوس سرئوس (*Bacillus cereus*) به ترتیب به عنوان باکتری شاخص گرم منفی و گرم مثبت در پنج سطح 0، 25، 50، 75 و 100 میکروگرم بر میلی لیتر پس از 24 ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج به دست آمده از این پژوهش، حاکی از آن بود که افزایش غلظت هر یک از عصاره‌ها سبب افزایش اثر ضدباکتریایی آن‌ها شد و بیش‌ترین اثر بازدارندگی مربوط به عصاره‌ی اسطوخودوس در غلظت 100 میکروگرم بر میلی لیتر بود ($p < 0.01$). هم‌چنین با مقایسه‌ی نتایج به دست آمده، استنباط گردید که اثر بازدارندگی عصاره‌های مورد استفاده در این پژوهش بر باسیلوس سرئوس بیش‌تر از اشرشیاکلی است و عصاره‌های متانولی نسبت به عصاره‌های آبی نقش ضدباکتریایی بیش‌تری دارند.

واژه‌های کلیدی: نعناع، رزماری، اسطوخودوس، عصاره‌ی متانولی و آبی، اشرشیاکلی، باسیلوس سرئوس.

1- مقدمه

اشرشیاکلی، شیگلا دیسنتری⁷، باسیلوس سرئوس⁸ و استافیلوکوکوس اورئوس⁹ در غلظت‌های 0/2 تا 10 میکرومول بر میلی‌لیتر پرداخت که نتایج این تحقیق حداقل غلظت ممانعت کنندگی¹⁰ علیه هر یک از باکتری‌ها را تعیین نمود. از طرفی این محقق، عنوان نمود که اثر ضد باکتریایی هر یک از این عصاره‌ها بر روی باکتری‌های گرم مثبت بیش تر از گرم منفی است و شرایط فیزیکی از جمله pH پائین، دما و سطح اکسیژن کم قادر به عملکرد بهتر هر یک از این عصاره‌ها بود (3). والرو و سالمرون (2003) به بررسی اثرات ضد میکروبی یازده عصاره گیاهی علیه باکتری باسیلوس سرئوس پرداختند که نتایج، نشان داد که به ترتیب عصاره نعناع فلفلی¹¹، مریم گلی¹² و آویشن در غلظت‌های 0/5، 0/35 و 0/25 میلی گرم بر میلی‌لیتر می‌تواند رشد باکتری باسیلوس سرئوس را مهار کند (9).

با توجه به فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌ها و کارایی آن‌ها علیه میکروارگانیسم‌ها، هدف از انجام این تحقیق، بررسی و مقایسه‌ی اثر ضد باکتریایی عصاره‌ی آبی و متانولی سه گونه‌ی گیاهی نعناع، رزماری¹³ و اسطوخودوس¹⁴ بر میزان رشد باکتری‌های اشرشیاکلی و باسیلوس سرئوس به عنوان باکتری‌های حائز اهمیت در ایمنی مواد غذایی بود.

2- مواد و روش‌ها

این مطالعه‌ی تجربی در سال 1389 در آزمایشگاه میکروبیولوژی صنعتی دانشکده‌ی کشاورزی، گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه فردوسی مشهد انجام گرفت.

گیاهان مورد استفاده نعناع، رزماری و اسطوخودوس بودند که از مزرعه‌ی دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد جمع آوری شدند. نمونه‌های گیاهی پس از انتقال به آزمایشگاه، برای مدتی دور از نور مستقیم خورشید قرار گرفتند تا خشک شوند. در ادامه، جهت عصاره‌گیری از این گیاهان خشک از روش ماسراسیون¹⁵ و حلال‌های مختلف شامل آب و متانول 80 درصد

عصاره‌های گیاهی تقریباً از قرن سیزدهم تولید و عرضه شده‌اند، ولی استفاده از آن‌ها تا قرن شانزدهم به صورت وسیع در نیامده بود زیرا با گسترش شاخه‌های مختلف علوم، استفاده از مواد شیمیایی در تولید دارو، توجه محققین را به خود معطوف کرد. پس از شناسایی پنی سیلین در دهه‌ی چهارم میلادی و گسترش استفاده از آن در درمان، هر روزه آنتی‌بیوتیک‌های جدیدی برای درمان عفونت‌ها ارائه گردید. استفاده‌ی بی‌رویه از این داروهای ضد میکروبی منجر به افزایش مقاومت‌های دارویی علیه آنتی‌بیوتیک‌های متفاوت در اکثر باکتری‌ها شده است. همین موضوع در محققین انگیزه‌ی استفاده از گیاهان دارویی به عنوان مواد طبیعی کم‌خطر در دسترس و ارزان قیمت را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سنتتیک در درمان عفونت‌های باکتریال ایجاد کرد (5، 8). بدین منظور، نخستین بار دلاکروس¹ در سال 1881 اولین اندازه‌گیری جهت تعیین خواص ضدباکتریایی عصاره‌ها را انجام داد. سرانجام در قرون 19 و 20 استفاده از خواص طعمی و بویی عصاره‌ها بر مصارف پزشکی آن‌ها ارجحیت یافت. بیش‌ترین استفاده از این مواد مربوط به کشورهای عضو اتحادیه اروپا می‌شد که این موارد شامل صنایع آرایشی، بهداشتی و عطرها، مصارف طبی و دارویی به عنوان ضد میکروب و ضد عفونی‌کننده و برای بهبود طعم داروها بود و اما امروزه با توجه به سوابق پیشین در زمینه‌ی استفاده از گیاهان دارویی، موج جدید مطالعات گسترده‌ی جهانی و معرفی اثرات ضدباکتری گیاهان مختلف بسیار مورد توجه قرار گرفته است (2، 3 و 7). در همین راستا، رضایی و رسولی (2000) اثر ضد باکتریایی عصاره‌ی آویشن² را بر باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس³ و اشرشیاکلی⁴ مورد بررسی قرار دادند که نتایج نشان داد که عصاره‌ی آویشن در رقت 1/16 از رشد اشرشیاکلی و در رقت 1/8 از رشد استافیلوکوکوس اورئوس جلوگیری می‌کند (6). سارا برت در سال 2004 به بررسی اثرات ضد باکتریایی برخی از عصاره‌های گیاهی علیه باکتری‌های لیستریا مونوسیتوژنز⁵، سالمونلا تیفی موریوم⁶،

7. *Shigella dysenteria*8. *Bacillus cereus*9. *Staphylococcus aureus*

10. Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

11. *Matricaria recutita* L.12. *Salvia Officinalis*13. *Rosmarinus Officinalis* L.14. *Lavandula* sp.

15. Maceration

1. Delacroix

2. *Thymus vulgaris*3. *Staphylococcus aureus*4. *Escherichia coli*5. *Listeria monocytogenes*6. *Salmonella typhimurium*

سپس، دیسک‌های حاوی عصاره با غلظت‌های متفاوت روی پلیت‌ها به فواصل مناسب قرار گرفت و از یک دیسک فاقد عصاره به عنوان نمونه‌ی کنترل به منظور مقایسه‌ی میزان رشد باکتری‌ها در حضور دیسک‌های حاوی عصاره، استفاده شد. (1). جهت تهیه‌ی دیسک‌های حاوی عصاره، دیسک‌های بلانک استریل را به تعداد مشخص در غلظت‌های تهیه شده از عصاره قرار داده و به مدت زمان 24 ساعت به محتویات داخل ظرف زمان داده شد تا عصاره‌ها کاملاً جذب دیسک‌های کاغذی شود. در نهایت، درب پلیت‌های دیسک گذاری شده را بسته و به مدت 24 ساعت در گرمخانه 37 درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفتند تا باکتری‌ها رشد کنند و میزان رشد هر یک از باکتری‌ها در حضور و عدم حضور (نمونه کنترل یا پلیت حاوی دیسک فاقد عصاره) عصاره‌ی گیاهان دارویی مورد آزمایش، مورد ارزیابی قرار گیرد. ارزیابی داده‌های جمع آوری شده از لگاریتم تعداد باکتری‌ها در حضور هر یک از عصاره‌های گیاهی و نمونه‌ی شاهد (نمونه‌ی کنترل یا پلیت حاوی دیسک فاقد عصاره) از طریق نرم افزار Mstat-c به صورت طرح کاملاً تصادفی و با استفاده از آزمون دانکن در سطح معناداری 99 درصد مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

3- نتایج و بحث

نتایج حاصل از آنالیز آماری داده‌ها نشان داد که عصاره‌ی متانولی و آبی حاصل از سه گیاه نعناع، رزماری و اسطوخودوس به طور معنی داری ($P < 0.01$) بر میزان رشد باکتری‌های اشرشیاکلی و باسیلوس سرئوس اثر داشتند و بیشترین اثر ضدباکتریایی مربوط به غلظت 100 میکروگرم بر میلی‌لیتر بود (شکل 1).

هم‌چنین در پژوهش حاضر، مشخص گردید که اثر عصاره‌ی اسطوخودوس بیشتر از رزماری و نعناع است (شکل‌های 1 تا 4). به طور مثال، تعداد باکتری‌های اشرشیاکلی در حضور 100 میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره‌ی متانولی اسطوخودوس، رزماری و نعناع به ترتیب به میزان $1/54$ ، $1/41$ و $1/17$ سیکل لگاریتمی کاهش یافت. این یافته با نتایج سارا برت (2004) که نشان داد اثر ضدباکتریایی عصاره‌ی اسطوخودوس از عصاره‌ی رزماری در کاهش جمعیت باکتریایی اشرشیاکلی بیش‌تر است، مطابقت دارد. به طور کلی، اثر ضدباکتریایی عصاره‌ها به ترکیبات موجود در آن‌ها از جمله ترکیبات فنولیک بستگی دارد. اثر ضدباکتریایی

استفاده گردید. بدین منظور، مقدار 300 گرم از گیاه خشک را با ترازو (با دقت 0/01)، درون ارلن 500 میلی‌لیتری توزین و به آن 300 میلی‌لیتر حلال (آب یا متانول 80 درصد) اضافه و سپس به مدت 48 ساعت در دمای درجه‌ی 25 سانتیگراد (بر روی شیکر) عمل عصاره‌گیری انجام شد. پس از این مدت، محلول را از کاغذ صافی واتمن عبور داده و مایع عبور کرده توسط دستگاه تقطیر تغلیظ گردید. عمل تغلیظ نهایی عصاره‌ی متانولی در دمای 70 درجه‌ی سانتیگراد و عصاره‌ی آبی در دمای 100 درجه‌ی بن ماری صورت پذیرفت. عصاره‌های تغلیظ شده تا حذف کامل حلال به پلیت‌های مخصوص انتقال یافتند. سپس، پنج غلظت 0 (شاهد)، 25، 50، 75 و 100 میکروگرم بر میلی‌لیتر هر یک از عصاره‌ها تهیه شد (1).

جهت ادامه‌ی پژوهش از سویه‌های خالص اشرشیاکلی و باسیلوس سرئوس که از قبل توسط یک گروه تخصصی در آزمایشگاه میکروبیولوژی صنعتی دانشکده‌ی کشاورزی، به ترتیب از محیط کشت ائوزین متیلن بلو (خریداری شده از شرکت مرک آلمان) و دمن روگوسا شارپ (خریداری شده از شرکت مرک آلمان) ایزوله و خالص سازی گردیده بود، استفاده شد. به منظور بررسی اثرات ضدباکتریایی عصاره‌ی هر یک از گیاهان (نعناع، رزماری و اسطوخودوس) از کلنی 24 ساعته اشرشیاکلی در محیط کشت ائوزین متیلن بلو¹ و باسیلوس سرئوس در محیط کشت دمن روگوسا شارپ² (به همراه زرده تخم مرغ) به کمک لوپ برداشته و در یک لوله آزمایش استریل حاوی 5 میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل کاملاً مخلوط کرده تا سوسپانسیون یکنواختی از باکتری موردنظر حاصل شد. این لوله به مدت 30 دقیقه در گرمخانه 37 درجه‌ی سانتیگراد قرار داده شد تا کدورتی مشابه لوله‌ی استاندارد نیم مک فارلند ($1/5 \times 10^8$ Cfu/ml) ایجاد نماید. سپس توسط سوآب استریل از لوله حاوی سوسپانسیون باکتری مقداری برداشت نموده و سوآب آغشته به میکروب را روی پلیت حاوی محیط کشت ائوزین متیلن بلو (در مورد باکتری اشرشیاکلی) و محیط کشت دمن روگوسا شارپ (در مورد باکتری باسیلوس سرئوس) به صورت خطوط موازی در سه جهت (عمودی، افقی، مورب) بر هم کشت داده به گونه‌ای که تمام سطح پلیت از یک لایه‌ی میکروبی یکنواخت پوشش یافت.

1. Eosin methylene blue

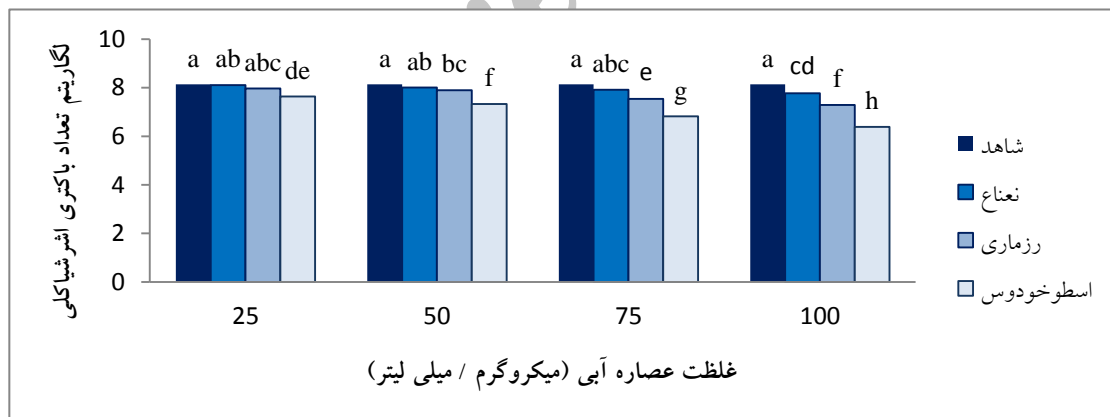
2. De Man Rogosa Sharp (MRS)

مقاومت بیش تر در برابر ترکیبات ضدباکتریایی موجود در هر یک از عصاره‌ها می‌گردد (4 و 10).

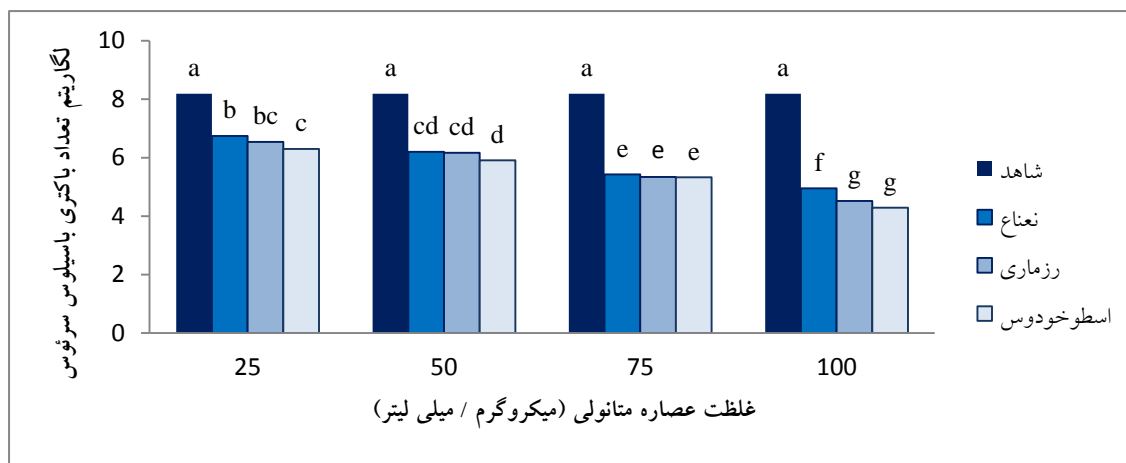
هم‌چنین با مقایسه‌ی شکل‌های 1 تا 4 مشخص گردید که اثر ضد باکتریایی عصاره‌ی متانولی این گیاهان نسبت به عصاره‌ی آبی آن‌ها بر روی هر دو باکتری، بیش تر است که با نتایج کمیلی زاده و همکاران (1385) که به بررسی اثر عصاره‌ی آلی و آبی گیاه گندم در چهار سطح 25، 50، 75 و 100 میکروگرم بر میلی‌لیتر بر روی باکتری گرم منفی و گرم مثبت پرداختند، مطابقت دارد. این پژوهشگران، عنوان نمودند عصاره‌ی آلی (اتری، متانولی و اتروپترولی) گندم دارای اثر ضدباکتریایی بیش تری نسبت به عصاره‌ی آبی آن بر روی برخی از باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت می‌باشد. علاوه بر این، در پژوهش آن‌ها معلوم گردید که با افزایش غلظت هر یک از عصاره‌ها از 25 تا 100 میکروگرم بر میلی‌لیتر اثر ضد باکتریایی افزایش می‌یابد که این اثر بر باکتری‌های گرم مثبت، بیش تر از باکتری‌های گرم منفی بوده است.

ترکیبات فنولیک به دلیل نفوذ پذیر نمودن غشای سلول باکتری است که می‌تواند با کاتیون‌های غشا کلاته شده و فعالیت حیاتی را مختل کنند (3 و 4).

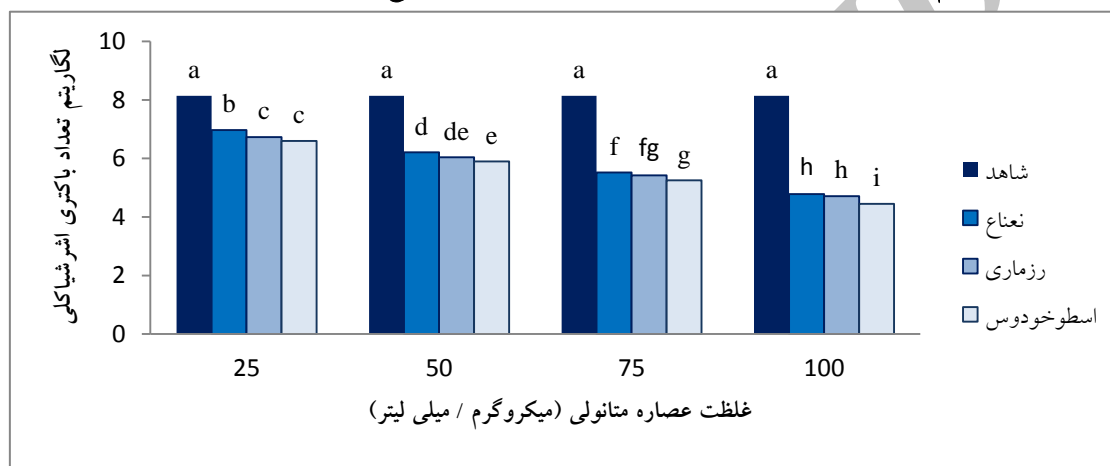
در ادامه‌ی پژوهش حاضر با مقایسه نتایج ارائه شده در شکل 1-4 استنباط گردید که اثر ضدباکتریایی عصاره‌های گیاهی استفاده شده در این پژوهش بر باکتری باسیلوس سرئوس (گرم مثبت) بیش تر از باکتری / شرشیاکلی (گرم منفی) بوده است به طوری که در اثر افزودن 50 میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره‌ی آبی نعناع، لگاریتم تعداد باکتری / شرشیاکلی و باسیلوس سرئوس به ترتیب به میزان 0/03 و 0/18 کاهش یافت. در این زمینه، سارا برت (2004) نیز طی پژوهشی گزارش کرد که تاثیر عصاره‌های گیاهی (اسطوخودوس، رزماری، دارچین، پونه‌ی کوهی و غیره) بر روی باکتری‌های گرم منفی کم تر از باکتری‌های گرم مثبت بوده است که این امر به دلیل وجود لایه‌ی لیپوپروتئین-لیپوپلی ساکاریدی موجود در پپتیدوگلیکان دیواره‌ی سلولی باکتری‌های گرم منفی نسبت به باکتری‌های گرم مثبت است که سبب ایجاد



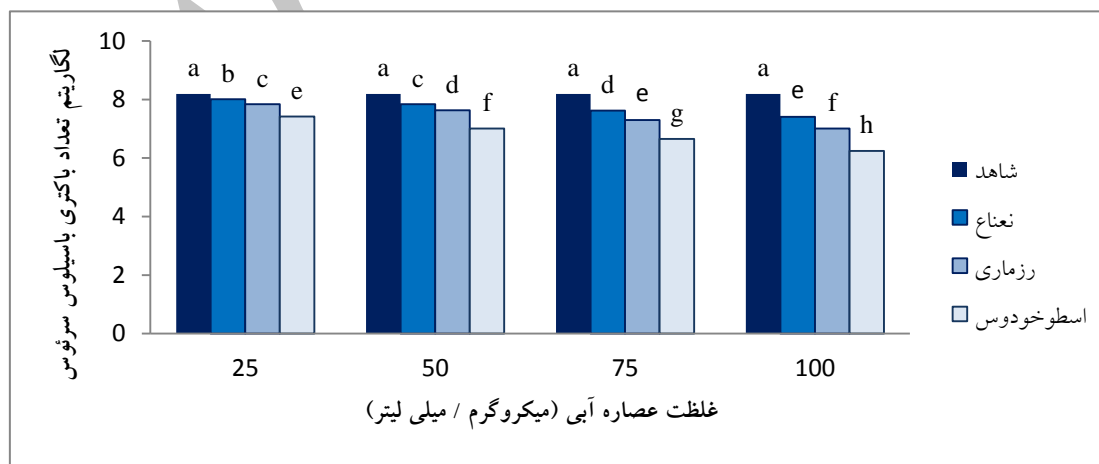
شکل 1- لگاریتم تعداد باکتری اشرشیاکلی متأثر از غلظت‌های عصاره‌ی آبی نعناع، رزماری و اسطوخودوس پس از 24 ساعت



شکل 2- لگاریتم تعداد باکتری باسیلوس سرئوس متأثر از غلظت‌های عصاره‌ی آبی نعناع، رزماری و اسطوخودوس پس از 24 ساعت



شکل 3- لگاریتم تعداد باکتری اشرشیاکلی متأثر از غلظت‌های عصاره‌ی متانولی نعناع، رزماری و اسطوخودوس پس از 24 ساعت



شکل 4- لگاریتم تعداد باکتری باسیلوس سرئوس متأثر از غلظت‌های عصاره‌ی متانولی نعناع، رزماری و اسطوخودوس پس از 24 ساعت

selected essential oil components on gram negative bacteria. *J. Agri. Food Chem.* 1998; 46:3590-5.

5. Misaghi, A., Akhondzadeh Basti, A. 2007. Effects of *Zataria multiflora* Boiss. Essential oil and nisin on *Bacillus cereus* ATCC 11778. *Food Control*; 8(9): 1043-9.

6. Rezai, M.B. and Rasooli, I. 2000. Chemical components and biological activity of essential oils of *Thymus ox-prolock* and *Mentha longifolia*. *Daneshvar* 8 (31): 1-8.

7. Shan, B., Cai, Y.Z., Brooks, J.D. and Corke, H. 2007. The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *Int J Food Microb*; 117: 112-19.

8. Shariat, H.S. 1998. Extraction of beneficial materials from medicine plants, identification methods and their evaluation. Mani press. pp: 6 - 20.

9. Valero, M., Salmeron, M.C. Antimicrobial Activity of 11 Essential oils Against *Bacillus cereus* in Tyndallized Carrot Broth. *International Journal of Food Microbiology* 2003; 85:73-81.

10. Vannini, L., Lanciotti, R., and Guerzoni, M.E. 2004. Interaction between high pressure homogenization and antimicrobial activity of lysozyme and lactoperoxidase. *International Journal of Food Microbiology*; 94: 123-35.

نتایج به دست آمده نشان داد که عصاره‌ی متانولی و آبی گیاهان نعناع، رزماری و اسطوخودوس در هر چهار سطح 25، 50، 75 و 100 میکروگرم بر میلی‌لیتر به طور معنی داری ($P < 0.01$) بر لگاریتم تعداد باکتری‌های /شرشیاکلی و باسیلوس سرئوس اثر داشتند که افزایش غلظت هریک از این عصاره‌ها سبب تشدید خاصیت ضدباکتریایی آنها شد و همچنین مشخص گردید که اثر عصاره‌ی متانولی و آبی اسطوخودوس بیش تر از رزماری و نعناع است. ذکر این امر، ضروری است که مقاومت باکتری گرم منفی /شرشیاکلی به دلیل وجود لایه‌ی لیپوپروتئین - لیپولی ساکاریدی موجود در پپتیدوگلیکان دیواره‌ی سلولی نسبت به باکتری گرم مثبت باسیلوس سرئوس در برابر خاصیت ضد باکتریایی عصاره‌ی هریک از گیاهان مورد آزمایش، بیش تر بود. همچنین، عصاره‌ی متانولی هریک از این گیاهان نسبت به عصاره‌ی آبی آنها اثر ضدباکتریایی بیش تری را داشت که این امر به احتمال زیاد به دلیل حضور ترکیبات فنولیک بیش تر در عصاره‌ی متانولی نسبت به عصاره‌ی آبی است. بنابراین، به کارگیری غلظت مناسب عصاره‌ی متانولی گیاهان طبیعی نظیر نعناع، رزماری و اسطوخودوس را در مواد غذایی مطابق با ذائقه‌ی مصرف کنندگان به دلیل ایجاد ایمنی مناسبی که در جلوگیری یا کاهش رشد باکتری‌های شاخص آلوده کننده مواد غذایی ایجاد می نماید، توصیه می گردد.

5- منابع

1. کمیلی زاده، ح.، حاکمی والا، م.، کمالی نژاد، م. و نشاط آشفته، س. 1386. بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره‌های آلی و آبی دانه‌های گیاه *Triticum sativum* Lam. بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی. فصلنامه‌ی گیاهان دارویی، سال هفتم، 28: 105-111.
2. موسوی، ح.، آخوند زاده بستی، ا.، میثاقی، ع.، جباری خامنه، ح.، کریم، گ. و زهرایی صالحی، ت. 1387. بررسی اثر اسانس گیاه آویشن شیرازی بر روی میزان رشد سالمونلا تیفی موریوم در سوپ جو تجارتي. فصلنامه‌ی گیاهان دارویی، سال نهم، 34: 109-116.
3. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential application in foods-a review. *Int. J. Food Microbiol.* 2004; 94: 223 -53.
4. Helander, I., Alakomi, K., Latva-Kala, T., Mattila-Sandholm, I., Pol, E., Smid, L.G., Gorris, M and Von Wright A. Characterization of the action of