Archive of SID

بررسی اثر ضد میکروبی ده اسانس گیاهی بر عوامل باکتریایی و مخمر ایجاد کننده فساد میوه خرما در مرحله رطب

سلاله نجفی مرغملکی[۱]، **سید محمد حسن مرتضوی**[۱*]، حسین معتمدی[۲]

[۱] گروه علوم باغبانی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

[۲] گروه زیست‌شناسی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۰۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۱/۱۵

چکیده

با توجه به اثرات سوء نگهدارنده‌های شیمیایی در مواد غذایی تازه، استفاده از ترکیبات ضد میکروبی بی‌خطر از جمله اسانس‌های گیاهی امری ضروری به نظر می‌رسد. مطالعه حاضر با هدف تعیین اثر ده اسانس گیاهی بر عوامل فساد باکتریایی و مخمر میوه خرما بود. به این منظور ابتدا اثر ضد میکروبی ده اسانس مختلف شامل لیموترش، اسطوخدوس، مرزه، میخک، نعناع‌فلفلی، زیره، آویشن، ترخون، رزماری و اکالیپتوس بر عوامل فساد جداسازی شده از میوه خرما شامل باکتری‌های *میکروکوکوس اس‌پ.* سویه N1[۱]، *باسیلوس اس‌پ.* سویه N2[۲]، *باسیلوس اس‌پ.* سویه N3[۳]، *باسیلوس سرئوس*[۴] و مخمر *زایگوساکارومایسس روکسی*[۵] با روش انتشار دیسک بررسی گردید. سپس پنج اسانس برتر برای تعیین کمترین غلظت بازدارندگی و کشندگی برای باکتری و کمترین غلظت بازدارندگی برای مخمر مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که اسانس آویشن بیشترین اثر ضد میکروبی را بر باکتری‌ها و مخمر داشت (به ترتیب قطر هاله عدم رشد برابر ۳۰-۴۹ mm و ۹۲ mm). سپس به ترتیب مرزه، میخک، نعناع فلفلی و زیره برای باکتری و مرزه، زیره، میخک و ترخون برای مخمر بیشترین اثر ضد میکروبی را نشان دادند. در این میان رزماری و اسطوخدوس کم‌اثرترین اسانس‌ها بودند. کمترین غلظت بازدارنده رشد در باکتری‌ها و مخمر متعلق به دو اسانس مرزه و آویشن بود. به طوریکه در باکتری‌ها با غلظت ۰/۱۲۵ µl/ml و در مخمر با غلظت ۰/۵ µl/ml سبب مهار رشد گردیدند. کمترین غلظت باکتری‌کشی نیز متعلق به دو اسانس مرزه و آویشن در غلظت ۰/۵ µl/ml در باکتری‌های *میکروکوکوس اس‌پ.* سویه N1 و *باسیلوس اس‌پ.* سویه N3 بود. اسانس آویشن در غلظت ۸ µl/ml در باکتری‌های *باسیلوس اس‌پ.* سویه N2 و *باسیلوس سرئوس* سبب مرگ سلول‌های باکتریایی شد.

واژگان کلیدی: اسانس، عوامل باکتریایی، فعالیت ضد میکروبی، مخمر، میوه خرما

* mortazavi_mh@scu.ac.ir

[1] *Micrococcus sp.* Strain N1
[2] *Bacillus sp.* Strain N2
[3] *Bacillus sp.* Strain N3
[4] *Bacillus cereus*
[5] *Zygosaccharomyces rouxii*

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

رقم برحی یکی از مهم‌ترین ارقام تجاری خرما در ایران می‌باشدکه میوه آن در هر سه مرحله پایانی نمو به ویژه مرحله رطب، طرفداران زیادی دارد. بافت میوه در مرحله رطب نرم بوده و به علت رطوبت و قند بالا، خیلی زود توسط میکروارگانیسم‌هایی مثل مخمرها و کپک‌ها آلوده شده و عمر نگهداری کوتاهی دارد (۱). آلودگی میکروبی از مهم‌ترین چالش‌های نگهداری محصول تازه رطب می‌باشد. به دلیل عدم امکان شستشوی میوه، دستیابی به روش‌های موثر و کم‌خطر جهت مقابله و حذف این عوامل میکروبی حائز اهمیت است. در این راستا استفاده از اسانس‌ها و سایر عصاره‌های بدست آمده از گیاهان به عنوان محصولات طبیعی مورد توجه قرار گرفته است؛ زیرا به دلیل تنوع بالا در مواد موثره ضد میکروبی، ایجاد مقاومت در گونه‌های مقاوم به کُندی رخ می‌دهد. از طرف دیگر در دهه‌های اخیر به دلیل علاقه روزافزون به سبز مصرف‌گرایی و نیاز به تکنیک‌های جایگزین برای اطمینان از کیفیت و ایمنی مواد غذایی، تحقیق روی اسانس‌ها در بخش‌های صنعتی و علمی مورد توجه بیشتری قرار گرفته است (۲ و ۳).

اسانس‌ها یا روغن‌های فرار، مواد روغنی آروماتیک بدست آمده از مواد گیاهی مانند گل‌ها، جوانه‌ها، بذرها، برگ‌ها، شاخه‌ها، میوه‌ها و ریشه‌ها هستند که بعضی از آن‌ها در درمان بیماری و بعضی به عنوان نگهدارنده‌های مواد غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۴). به طور کلی، اسانس‌ها به دلیل ماهیت چربی دوستی خود قادرند از طریق نفوذ در اسیدهای چرب سبب تخریب ساختار فسفولیپیدهای غشای دولایه سلول‌های باکتریایی، از دست رفتن یکپارچگی غشا و متلاشی شدن آن در این میکروارگانیسم‌ها شوند. تخریب غشای سلولی باکتری در نهایت منجر به افزایش تراوایی و نشت ترکیبات درون سلولی آن از جمله یون‌ها و سرانجام مرگ آن می‌گردد (۵-۶-۷). خواص ضد باکتریایی اسانس‌ها به ماهیت ترکیبات شیمیایی آن‌ها و آرایش گروه‌های عاملی این ترکیبات مربوط می‌باشد. اسانس‌هایی که از نظر ترکیبات با گروه‌های عاملی الکلی، فنولی و آلدهیدی (مانند کارواکرول، تیمول، متنول، سیترونلول و سیترونلال) غنی هستند خواص ضد باکتریایی قوی‌تری دارند (۸ و ۹). اسانس‌های موجود در گیاهان دارویی ممکن است از طریق ایجاد اختلال در تولید انرژی و سنتز ترکیبات ساختمانی از فعالیت سیستم‌های آنزیمی مخمرها جلوگیری نمایند. به طور کلی میزان بازدارندگی اسانس‌ها را می‌توان به حضور یک حلقه آروماتیک متصل به یک گروه قطبی نسبت داد. شاهد این ادعا استفاده گسترده از فنل‌ها، کلروفنل‌ها و ترکیبات وابسته به عنوان مواد ضدعفونی کننده می‌باشد (۱۰). اسانس‌های گیاهی به روش‌های مختلفی مانند اسپری، غوطه‌وری، در ترکیب با پوشش‌های خوراکی و بخاردهی قابل استفاده می‌باشند (۱۱). با وجود اینکه تعدادی از این ترکیبات جزء ترکیبات ایمن و مجاز از نظر سلامتی طبقه‌بندی شده‌اند، نکته قابل توجه در کاربرد اسانس‌ها برای کنترل عوامل میکروبی میوه‌ها و سبزی‌ها، امکان تأثیر منفی آن‌ها بر مزه محصول است، از این رو انتخاب غلظتی از اسانس که ضمن اثر ضد میکروبی سبب تغییر طعم محصول نگردد حائز اهمیت زیادی است (۱۲و۱۳).

روی سطح خرماهای تازه و انبار شده، در محیط کارخانه بسته‌بندی و بازار خرده‌فروشی، میکروارگانیسم‌هایی از قبیل باکتری‌ها و قارچ‌ها مشاهده شده است، به خصوص وقتی عملیات ضدعفونی به شکل مناسب اعمال نگردد (۱۴ و ۱۵). انواع آلودگی میکروبی جداسازی شده از میوه‌های خرما شامل مخمرها، کپک‌ها، باکتری‌های اسید لاکتیک و بعضی پاتوژن‌ها مثل *استافیلوکوکوس آرئوس*[1]، *اشرشیا کلی*[2] و *آسپرژیلوس فلاووس*[3] هستند (۱۶). در بین جنس‌های مخمر، جنس *زایگوساکارومایسس* نسبت به سایر جنس‌ها تحمل بیشتری به محتوای بالای قندی دارد. آلودگی‌هایی که ناشی از مخمرها هستند، باعث توسعه‌ی بوهای الکلی (ترش‌شدگی) در میوه‌ی خرما می‌گردد (۱۷). در آزمایشات

[1] *Staphylococcus aureus*
[2] *Escherichia coli*
[3] *Aspergillus flavus*

www.SID.ir

Archive of SID

منصوری، مخمرهای *ساکارومایسس سرویزیه*[1]، *ترولاسپورا فرمنتاتی*[2]، *ترولاسپورا روسی*[3] و *دباریومایسس کودرتی*[4] از نمونه‌های خرمای تازه فاسد شده رقم کبکاب جداسازی شد، و نیز اسپورهای باکتری‌های *کلستریدیوم*[5] و *باسیلوس* نیز در این خرماها مشاهده گردید (۱۸).

بر اساس نتایج یک تحقیق، پوشش‌دهی میوه‌های دو رقم خرمای ذقلول و سامانی با جلبک سبز و عصاره پروپوریس سبب کاهش قابل توجه آلودگی میکروبی آن گردید و جمعیت قارچ‌های مهم آلوده کننده میوه خرما در انبار مانند *بوتریتیس سینرآ*[6]، *پنسیلیوم اکسپانسوم*[7] و *رایزوپوس نیگریکانس*[8] کاهش یافت (۱۹). نشان داده شده است که کاربرد روغن‌های ضروری زیره و لمون‌گراس به تنهایی و یا در ترکیب با هم و با پوشش خوراکی صمغ عربی به طور معنی‌داری سبب کنترل آلودگی میکروبی و پوسیدگی میوه خرما رقم ذقلول گردید (۲۰).

در یک آزمایش، استفاده از اسانس‌های مختلف مرکبات در ترکیب با پوشش‌های خوراکی بر خرمای رقم دگلت‌نور در مرحله رطب سبب کاهش پوسیدگی میوه شد (۲۱).

این پژوهش با هدف بررسی خاصیت ضد میکروبی ده اسانس گیاهی و تعیین کمترین غلظت بازدارنده (MIC) و کمترین غلظت کشنده (MBC) بر چهار باکتری و نیز تعیین کمترین غلظت بازدارنده بر یک مخمر عامل فساد میوه خرما در شرایط درون شیشه‌ای انجام گردید.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در سال ۱۳۹۶ در گروه‌های علوم باغبانی و زیست‌شناسی دانشگاه شهید چمران اهواز به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با ۱۰ اسانس و ۵ عامل فساد (۴ باکتری و یک مخمر) و با سه تکرار انجام گردید. اسانس‌های مورد استفاده در این آزمایش شامل لیمو ترش، اسطوخدوس، مرزه، میخک، نعناع فلفلی، زیره، آویشن، ترخون، رزماری و اکالیپتوس تهیه شده از شرکت باریج اسانس بود (جدول ۱).

عوامل میکروبی مورد استفاده در این آزمایش شامل چهار باکتری و یک مخمر جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی شده (توسط محقق؛ اطلاعات منتشر نشده) از میوه فاسد شده خرما رقم برحی در مرحله رطب بود (تست چالشی برای اثبات ایجاد فساد انجام شد؛ داده‌ها نشان داده نشده است). جدایه‌های باکتری عامل فساد، گرم مثبت بودند.

تست تعیین حساسیت

حساسیت میکروارگانیسم‌ها به اسانس‌ها با روش استاندارد انتشار دیسک و طبق دستورالعمل CLSI با استفاده از روش انتشار آگار تعیین گردید (۲۲). به این منظور ابتدا کشت ۲۴ h باکتری و ۴۸ h مخمر به ترتیب روی محیط‌های نوترینت آگار[9] و پوتیتو دکستروز آگار[10] در دمای ۲۸°C تهیه شد. سپس با استفاده از سواپ استریل غلظت نیم مک‌فارلند (معادل با $۱/۵ \times ۱۰^۸$ CFU/ml) باکتری و مخمر در سرم فیزیولوژیکی استریل (کلرید سدیم ۰/۸۵ درصد) به ترتیب روی محیط کشت مولر هینتون آگار[11] و پوتیتو دکستروز آگار کشت داده شد (از هر کد سه تکرار). بلافاصله دیسک‌های ۶ mm در وسط هر پتری مستقر شده و ۱۰ µl اسانس به هر دیسک اضافه شد. سپس به انکوباتور با دمای ۲۸°C انتقال داده شد. قطر هاله مهار رشد برای باکتری‌ها پس از ۲۴ h و برای مخمرها پس از ۴۸ h با استفاده از کولیس بر حسب میلی‌متر ثبت گردید.

[1] *Saccharomyces cerevisiae*
[2] *Torulaspora fermentati*
[3] *Torulaspora rousey*
[4] *Debaryomyces coudertii*
[5] *Clostridium*
[6] *Botrytis cinerea*
[7] *Penicillium expansum*
[8] *Rhizopus nigricans*
[9] Nutient Agar
[10] Potato Dextrose Agar
[11] Mueller Hinton Agar

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱. جزئیات اسانس‌های مورد استفاده در این آزمایش

نام متداول فارسی	نام انگلیسی	نام علمی	ماده موثره	منبع
لیمو ترش	Lemon	*Citrus limon*	Limonene	شرکت باریج اسانس
اسطوخدوس	Lavender	*Lavandula spica*	Cineole	شرکت باریج اسانس
مرزه	Savory	*Satureja hortensis*	Carvacrol	شرکت باریج اسانس
میخک	Clove	*Syzygium aromaticum*	Eugenol	شرکت باریج اسانس
نعناع فلفلی	Peppermint	*Mentha piperita*	Menthone	شرکت باریج اسانس
زیره	Cumin	*Cuminum cyminum*	Cumin aldehyde	شرکت باریج اسانس
آویشن	Thyme	*Thymus vulgaris*	Thymol	شرکت باریج اسانس
ترخون	Tarragon	*Artemisia dracunculus*	Methyl Chavichol	شرکت باریج اسانس
رزماری	Rosemary	*Rosmarinus officinalis*	α-pinene	شرکت باریج اسانس
اکالیپتوس	Eucalyptus	*Eucalyptus obliqua*	1,8-Cineole	شرکت باریج اسانس

حداقل غلظت مهاری

به منظور تعیین حداقل غلظت مهاری از روش گریفین[1] و همکاران استفاده گردید (۲۳). به این منظور ابتدا از کشت ۲۴ h و ۴۸ h باکتری و مخمر (به ترتیب در محیط‌های نوترینت آگار و پوتیتو دکستروز آگار) کشت مایع ۲۴ h و ۴۸ h به ترتیب در محیط‌های نوترینت براث و تریپتیک سوی براث تهیه و سپس از این سوسپانسیون‌ها غلظت نیم مک‌فارلند تهیه گردید.

آماده‌سازی پلیت‌های حاوی اسانس با سری رقت

پس از اتوکلاو کردن محیط مولر هینتون آگار برای باکتری و پوتیتو دکستروز آگار برای مخمر، زمانی که دمای محیط‌ها به حدود ۴۵ درجه سانتی‌گراد رسید، طبق روش استاندارد آزمون ماکروبراث دلوشن[2] جهت تعیین مقادیر کمترین غلظت بازدارنده و کمترین غلظت کشنده، سری رقت‌های متوالی دوتایی تهیه شد. بنابراین ۱ µl اسانس خام به عنوان غلظت یک در نظر گرفته شد و مضرب‌های دو و یک‌دوم متوالی آن به عنوان سایر غلظت‌ها لحاظ گردید. به این صورت مقادیر ۱۶ تا ۰/۰۶۲۵ µl/ml در حلال دی متیل سولفوکساید[3] ۷ درصد تهیه و به محیط کشت اضافه شد. پس از ورتکس آرام، مخلوط محیط کشت و اسانس در شرایط استریل درون پتری‌دیش ریخته شد. دیسک‌های به قطر ۶ mm روی محیط کشت قرار داده شد و سپس ۱۰ µl از سوسپانسیون تهیه شده از باکتری در غلظت نیم مک‌فارلند به آن اضافه شد. به دلیل درشت بودن سلول‌های مخمر و عدم عبور از دیسک، ۵ µl از سوسپانسیون نیم مک‌فارلند مخمر مستقیماً روی محیط کشت حاوی اسانس قرار گرفت.

دو پتری‌دیش حاوی محیط کشت بدون اسانس، جهت کشت باکتری و مخمر به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. پتری‌دیش‌های حاوی دیسک‌های باکتری پس از ۲۴ h و پتری‌دیش‌های حاوی مخمر پس از ۴۸ h از نظر وجود یا عدم وجود هاله رشد روی محیط کشت مورد بررسی قرار گرفتند. کمترین غلظت اسانس که باعث عدم مشاهده رشد باکتری در اطراف دیسک و عدم مشاهده کلونی مخمر روی محیط کشت شد به عنوان کمترین غلظت موثر در مهار رشد در نظر گرفته شدند.

حداقل غلظت کشندگی باکتری

به منظور یافتن حداقل غلظت کشندگی، دیسک‌های باکتری که هیچ‌گونه رشدی از باکتری در اطراف آن‌ها مشاهده نشده بود روی محیط کشت نوترینت آگار بدون

[1] Griffin
[2] Macrobroth dilution assay
[3] Dimethyl sulfoxide

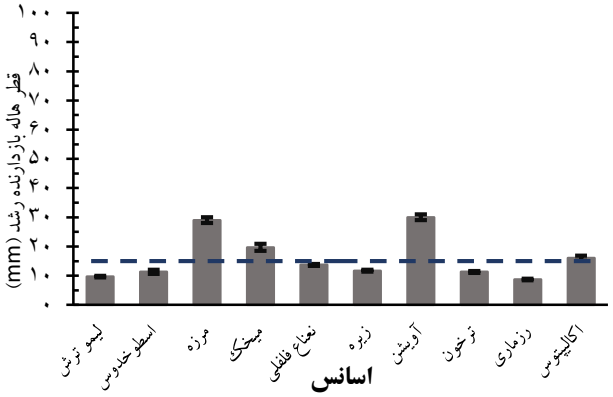
www.SID.ir

Archive of SID

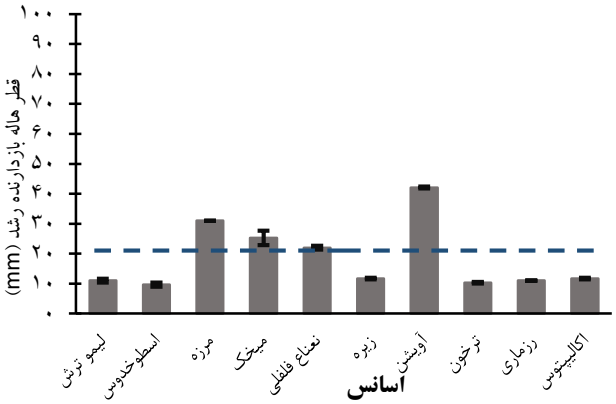
اسانس قرار گرفتند و پس از h ۲۴ از نظر رشد باکتری و تشکیل کلنی در اطراف دیسک بررسی شدند. کمترین غلظتی که در آن در اطراف دیسک رشد باکتری مشاهده نشد به عنوان کمترین غلظت کشندگی در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

در شکل‌های ۱ تا ۵، قطر هاله بازدارنده رشد اسانس‌های مختلف بر چهار باکتری گرم‌مثبت و مخمر جداسازی شده آمده است. همان‌طور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود، بیشترین قطر هاله مهار رشد در میان همه عوامل مربوط به اسانس آویشن در مخمر *زایگوساکارومایسس روکسی* بود که با اختلاف معنی‌داری نسبت به سایر اسانس‌ها از بیشترین فعالیت ضد میکروبی برخوردار بود (۹۲ mm). در شکل ۱ نیز کمترین قطر هاله مهار رشد نیز مربوط به اسانس رزماری در باکتری *میکروکوکوس اس‌پ*. سویه N1 مشاهده می‌شود (۸/۷ mm).



شکل ۱. فعالیت ضد میکروبی اسانس‌ها بر باکتری *میکروکوکوس اس‌پ*. سویه N1 با استفاده از روش انتشار آگار خط فرضی بیان‌گر میانگین حداکثر بازدارندگی است.



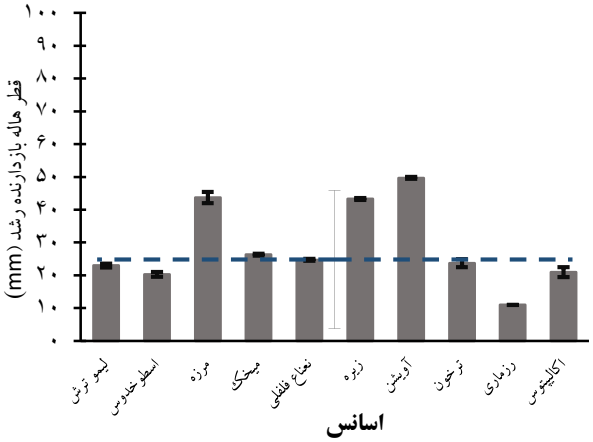
شکل ۲. فعالیت ضد میکروبی اسانس‌ها بر باکتری *باسیلوس اس‌پ*. سویه N2 با استفاده از روش انتشار آگار خط فرضی بیان‌گر میانگین حداکثر بازدارندگی است.

بررسی قطر هاله مهار رشد در هر ۵ عامل نشان داد رفتار عامل فساد به مواد موثره اسانس‌ها متفاوت است. با وجود اینکه دو اسانس مرزه و آویشن در همه عوامل بیشترین قطر هاله مهار رشد را در مقایسه با دیگر اسانس‌ها به خود اختصاص دادند، اما از نظر قطر هاله در عوامل مختلف فساد تفاوت معنی‌دار مشاهده شد. به طوری که در باکتری *میکروکوکوس اس‌پ*. سویه N1 کمترین قطر مهار هاله رشد (مرزه ۲۹ mm و آویشن ۳۰) و در مخمر *زایگوساکارومایسس روکسی* بیشترین قطر هاله مشاهده گردید (مرزه ۹۰ mm و آویشن ۹۲). در میان باکتری‌های مورد بررسی دو اسانس مرزه و آویشن بیشترین قطر هاله مهار رشد را در باکتری *باسیلوس اس‌پ*. سویه N3 داشتند (مرزه ۴۳/۳ mm و آویشن ۴۹/۷). در این میان اسانس رزماری در باکتری *میکروکوکوس اس‌پ*. سویه N1 با ۸/۷ mm و در باکتری *باسیلوس اس‌پ*. سویه N3 با ۱۱ mm و اسانس اسطوخدوس با ۹/۷ mm قطر هاله در باکتری *باسیلوس اس‌پ*. سویه N2 و *باسیلوس سرئوس* از کمترین قطر هاله مهار رشد برخوردار بودند. در همین راستا کمترین قطر هاله مهار رشد در مخمر *زایگوساکارومایسس روکسی* متعلق به اسانس اسطوخدوس (۱۱ mm) بود. در نهایت پنج اسانس برتر دارای خاصیت ضد باکتریایی آویشن، مرزه، میخک، نعناع فلفلی و زیره بودند که به منظور تعیین حداقل غلظت مهاری و کشندگی مورد بررسی قرار گرفتند. در مخمرها نیز ۵ اسانس آویشن، مرزه، زیره، میخک و ترخون به عنوان ۵ اسانس برتر موثر در مهار رشد به منظور تعیین حداقل غلظت مهاری انتخاب شدند.

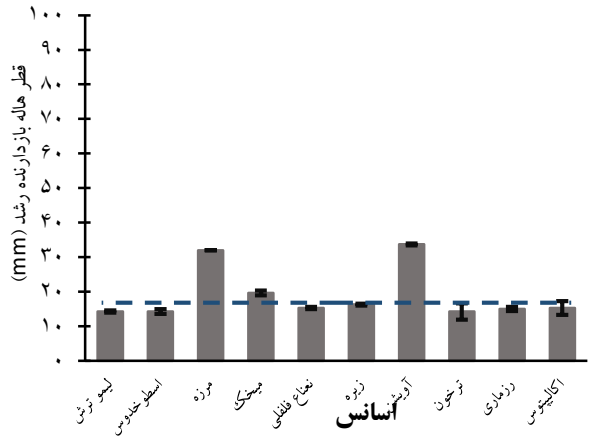
بررسی حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی پنج اسانس برتر منتخب از مرحله قبل بر باکتری‌های *میکروکوکوس اس‌پ*. سویه N1 و *باسیلوس اس‌پ*. سویه N3 در جدول ۲ مشاهده می‌شود. در هر دو باکتری کمترین

www.SID.ir

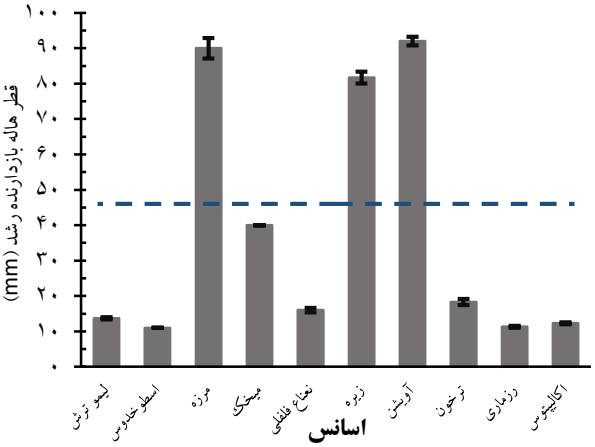
Archive of SID



شکل ۳. فعالیت ضد میکروبی اسانس‌ها بر باکتری *باسیلوس اس‌پ*. سویه N3 با استفاده از روش انتشار آگار خط فرضی بیان‌گر میانگین حداکثر بازدارندگی است.



شکل ۴. فعالیت ضد میکروبی اسانس‌ها بر باکتری *باسیلوس سرئوس* با استفاده از روش انتشار آگار خط فرضی بیان‌گر میانگین حداکثر بازدارندگی است.



شکل ۵. فعالیت ضد میکروبی اسانس‌ها بر مخمر *زایگوساکارومایسس روکسی* با استفاده از روش انتشار آگار خط فرضی بیان‌گر میانگین حداکثر بازدارندگی است.

غلظت بازدارندگی متعلق به دو اسانس مرزه و آویشن بود (۰/۱۲۵ µl/ml). بیشترین غلظت اسانس که باعث مهار رشد باکتری‌ها شده بود نیز مربوط به دو اسانس میخک و نعناع فلفلی در غلظت ۰/۵ µl/ml بود. دو اسانس مرزه و آویشن در غلظت ۰/۵ µl/ml در هر دوباکتری سبب کشندگی شده بود. با وجود اینکه از نظر خاصیت بازدارندگی رشد، در باکتری‌های *باسیلوس اس‌پ*. سویه N2 و *باسیلوس سرئوس*، دو اسانس مرزه و میخک اثر مشابه با باکتری های *میکروکوکوس اس‌پ*. سویه N1 و *باسیلوس اس‌پ*. سویه N3 نشان داد ند و دارای خاصیت بازدار ندگی در غلظت ۰/۱۲۵ µl/ml بودند، اما نتوانستند در غلظت کشندگی در باکتری‌های *میکروکوکوس اس‌پ*. سویه N1 و *باسیلوس اس‌پ*. سویه N3، سبب مرگ سلول‌های باکتریایی در *باسیلوس اس‌پ*. سویه N2 و *باسیلوس سرئوس* شوند. به طوری که کمترین غلظت کشندگی برای این دو باکتری (*با سیلوس اس‌پ*. سویه N2 و *با سیلوس سرئوس*) ۱۶ µl/ml مرزه و ۸ µl/ml آویشن بود (جدول ۲). رفتار اسانس‌های میخک، نعناع فلفلی و زیره در دو باکتری *باسیلوس اس‌پ*. سویه N2 و *باسیلوس سرئوس* متفاوت از میکروکوکوس *اس‌پ*. سویه N1 و *با سیلوس اس‌پ*. سویه N3 بود، به طوری که با وجود مهار رشد به ترتیب در غلظت‌های ۱ µl/ml، ۰/۵ و ۱ در کد *باسیلوس اس‌پ*. سویه N2، و ۰/۵ µl/ml در کد *باسیلوس سرئوس*، هیچکدام دارای اثر کشندگی در غلظت‌های بررسی شده نشان ندادند (جدول ۲).

در جدول ۲، بررسی حداقل غلظت بازدارندگی رشد پنج اسانس برتر انتخاب شده از آزمایش قبل بر مخمر *زایگوساکارومایسس روکسی* نشان داده شده است. به طور کلی حداقل غلظت بازدارندگی اسانس‌های مورد آزمایش در مورد باکتری‌ها کمتر از مخمر بود. با وجود اینکه اسانس‌های مرزه و آویشن بیشترین قطر هاله مهار رشد را در مخمر ایجاد کرده بودند (حدودا دو برابر قطر ایجاد شده برای باکتری‌ها)، اما در غلظت ۰/۵ µl/ml سبب بازدارندگی رشد شدند، در حالی که این غلظت برای باکتری‌ها ۰/۱۲۵ µl/ml بود. در میان اسانس‌های مورد بررسی، ترخون

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲. بررسی کمترین غلظت بازدارنده و کمترین غلظت کشنده پنج اسانس برتر منتخب از نتایج انتشار آگار در ۹ غلظت بر عوامل فساد میوه خرما (باکتری و مخمر)

	میکروکوکوس اس‌پ. سویه N1		*باسیلوس اس‌پ.* سویه *N2*		*باسیلوس اس‌پ.* سویه *N3*		*باسیلوس سرئوس*		*زایگوساکارومایسس روکسی*
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC
مرزه	۰/۱۲۵	۰/۵	۰/۱۲۵	۱۶	۰/۱۲۵	۰/۵	۰/۱۲۵	۱۶	۰/۵
میخک	۰/۵	۲	۱	*	۰/۵	۲	۰/۵	*	۱
نعناع فلفلی	۰/۵	۱	۰/۵	*	۱	۲	۰/۵	*	**
زیره	۰/۲۵	۱	۱	*	۰/۵	۱	۰/۵	*	۱
آویشن	۰/۱۲۵	۰/۵	۰/۱۲۵	۸	۰/۱۲۵	۰/۵	۰/۱۲۵	۸	۰/۵
ترخون	**	**	**	**	**	**	**	**	۲

* در هیچکدام از غلظت‌های تست شده کشندگی مشاهده نشده بود.

** اسانس تست نشده است

دارای کمترین اثر بازدارندگی بود به طوری که در غلظت ۲ µl/ml مخمر را از رشد بازداشته بود.

در این مطالعه نتایج حاصل از بررسی حداقل غلظت بازدارندگی، با قطر نواحی بازدارنده رشد مشاهده شده در روش انتشار دیسک منطبق بود. به طوری که دو اسانس آویشن و مرزه که بیشترین قطر هاله مهار رشد را بوجود آوردند، در میان اسانس‌های تست شده از کمترین غلظت بازدارندگی رشد برخوردار بودند.

نتایج آزمایشات روتا[1] و همکاران در بررسی اثر اسانس آویشن بر باکتری‌های *لیستریا*[2] *ای‌کولای* و *سالمونلا*[3] کارآمدی این اسانس را در مهار رشد باکتری نشان داد (۲۴). ترکیبات لیپوفیلیک اسانس‌ها با فسفولیپیدهای دولایه غشای سلولی پیوند تشکیل داده و به این ترتیب نفوذپذیری آن را افزایش داده و در نتیجه نشت محتوای درون سلولی و آسیب به سیستم آنزیمی سلول رخ می‌دهد (۲۵). دسوزا[4] و همکاران ذکر کردند که حتی تغییرات کوچک رخ داده در ساختار غشای سیتوپلاسمی می‌تواند برخی فعالیت‌های متابولیکی مانند سنتز ماکرومولکول‌ها را تحت تاثیر قرار دهد (۲۶). باکتری‌هایی که گرم مثبت هستند به دلیل ساختار ویژه دیواره سلولی می‌توانند عملکرد اسانس‌ها را تسهیل کنند، به عبارت دیگر پیوستگی زیاد مواد افزودنی به دیواره سلولی پدید می‌آید (۲۷). در یک مطالعه دورماند و دینز[5] با استفاده از آزمون‌های مشابه درون‌شیشه‌ای، اسانس‌های میخک، اورگانو و فلفل را به منظور ارزیابی فعالیت ضد میکروبی‌شان بر ۲۵ گونه از باکتری‌های گرم مثبت و منفی مورد بررسی قرار دادند. نتایج آن‌ها نشان دهنده اثر بیشتر اسانس‌ها بر باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی بود. اسانس آویشن اثر ضد باکتریایی قوی‌تری بر باکتری‌های گرم‌مثبت داشت، در حالی‌که باکتری‌های گرم‌منفی نسبت به این اسانس مقاومت نشان دادند (۲۸).

در مطالعه سفیر[6] و همکاران در بررسی اثر اسانس‌های آویشن، مرزه، نعناع فلفلی و رزماری بر باکتری گرم‌مثبت *استرپتوکوکوس پیوژنز*[7] آویشن و مرزه با ناحیه مهار رشد بین ۴۸-۳۵ mm فعال‌ترین واکنش ضد میکروبی را بر این باکتری نشان دادند. مقدار حساسیت باکتری به اسانس رزماری صفر بود. در مورد کم‌ترین غلظت کشندگی، در اکثر موارد حداقل غلظت کشندگی نزدیک به حداقل غلظت بازدارندگی بود، که دامنه تغییرات نسبت کمترین غلظت بازدارنده به کمترین غلظت کشنده در محدوده ۱/۰۲ تا ۱/۵۳،

[1] Rota
[2] *Listeria*
[3] *Salmonella*
[4] De Souza
[5] Dorman and Dean
[6] Sefir
[7] *Streptococcus pyogenes*

www.SID.ir

Archive of SID

نشان‌دهنده یک فعالیت ضدباکتری خوب در برابر این باکتری بود (۲۹). از نظر فعالیت ضد میکروبی قابل توجه در برابر پاتوژن‌ها و عوامل فساد باکتریایی، اسانس‌های حاوی ترکیبات فنولی معطر یا آلدهیدها در جایگاه اول و اسانس‌های حاوی الکل‌های ترپنی در جایگاه بعدی قرار دارند. اسانس‌های حاوی اتر، کتون یا اکسید ترپن فعالیت ضعیف‌تری داشتند. اثر اسانس‌ها بر عوامل مختلف میکروبی متفاوت است. به عنوان مثال اسانس گیاهان آویشن، دارچین، درخت چای، اسطوخدوس و میخک به عنوان عوامل فعال در برابر باکتری *استافیلوکوکوس*[1] شناخته شده‌اند (۳۰ و ۳۱). در حالی که اسانس اورگانو، ریحان، نعناع، رزماری و اسطوخدوس به عنوان مهارکننده رشد دیگر باکتری‌های گرم‌مثبت مثل *استافیلوکوکوس آرئوس* شناخته شده‌اند (۳۲).

در این آزمایش، اسانس‌های آویشن و مرزه که حاوی مواد فنولی معطر، کارواکرول و تیمول هستند بسیار موثر بودند. دیگر اسانس‌های حاوی مشتقات مواد فنولی (میخک حاوی اوژنول) اثر کمتری داشتند. نتایج می‌تواند به طور مستقیم با ساختارهای اصلی مشتقات مواد فنولی معطر مرتبط باشد. به نظر می‌رسد وجود فنول آزاد سبب افزایش فعالیت ضد میکروبی می‌شود. عدم ثبت فعالیت ضد میکروبی قوی برای اسانس میخک، تا حدودی دور از انتظار بود. مطالعات قبلی نشان دادند که فعالیت ضد باکتری میخک در برابر باکتری *استافیلوکوکوس* نزدیک به آویشن بود (۳۳). اختلاف بین نتایج این پژوهش و دیگر مطالعات می‌تواند به تفاوت در مقدار و غالبیت ترکیبات اسانس‌ها مربوط باشد. در واقع، آن عاملی که در نهایت تعیین‌کننده اثر یک اسانس است، ترکیب پیچیده‌ای از مواد آلی مختلف با تفاوت در کیفیت و کمیت است.

مطالعه فعالیت ضد میکروبی ۵ اسانس انتخاب شده با بررسی کمترین غلظت بازدارندگی و کمترین غلظت کشندگی ادامه یافت. در این مطالعه نتایج کمترین غلظت بازدارندگی با قطر نواحی بازدارنده مشاهده شده در روش انتشار دیسک معتبر بود. مقایسه فعالیت ضد باکتری و تغییرات ارگانولپتیک و مواد ضد میکروبی شیمیایی باید با احتیاط انجام شود. در واقع به علت پیچیدگی و تنوع ترکیبات شیمیایی اسانس‌ها، تحت تاثیر عوامل بسیاری مانند شرایط کشت یا کموتایپ، هنوز بسیار مشکل است مکانسیم‌های دقیق فعالیت ضد میکروبی آن‌ها و کنترل سمیت‌شان درک شود.

فابیو[2] و همکاران پس از غربال‌گری اسانس‌هایی که اثرات ضد باکتری نشان دادند، گزارش کردند که کمترین غلظت بازدارندگی اسانس‌هایی که فعالیت ضد باکتری نشان دادند بالاتر از غلظت‌های غیر سمی در سلول بود (۳۳). تحقیقات در مورد سمیت سلولی اسانس‌ها به ویژه در مورد احتمال مصرف بیش از حد و نیز تداخل با داروها باید انجام شود. در مطالعه سرابی جماب و همکاران مشخص شد که در صورت استفاده از اسانس آویشن تعداد باکتری *لاکتوباسیلوس*[3] به طور قابل توجهی کاهش می‌یابد (۳۴). رهنما و همکاران تاثیر اسانس آویشن را بر باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز*[4] مورد مطالعه قرار دادند، که نتایج نشان داد کمترین غلظت بازدارندگی ۹/۵ µL/mL بود (۳۵). در مطالعه دیگری موسوی و همکاران با بررسی تاثیر آویشن بر باکتری *سالمونلا*، نشان دادند که در غلظت‌های ۰/۰۱۵ درصد آویشن رشد باکتری دو لگاریتم کاهش یافت. در بررسی اثر اسانس آویشن بر باکتری *استرپتوکوکوس* توسط یزدی و همکاران مشخص شد که حداقل غلظت بازدارندگی ۱۶۳/۸۸ µl/ml بود (۳۶).

اسانس زیره در غلظت‌های ۰/۰۵ و ۰/۰۳ درصد، از رشد باکتری‌های *لاکتوباسیلوس* و *استافیلوکوکوس* در پنیر سفید جلوگیری کرد (۳۷). در مطالعه دیگری اسانس بذر زیره در غلظت ۴/۲ درصد اثر بازدارنده بر رشد باکتری‌های *سودوموناس*[5] *شیگلا*[6] *سالمونلا* و *ای‌کولای* نشان داد (۳۸).

[1] *Staphylococcus*
[2] Fabio
[3] *Lactobacillus*
[4] *Listeria monocytogenes*
[5] *Pseudomonas*
[6] *Shigella*

www.SID.ir

Archive of SID

فضل‌آرا و همکاران با مطالعه اثر اسانس زیره بر باکتری *لیستریا* مشاهده کردند، غلظت باکتری در پنیر حاوی ۰/۰۲ درصد اسانس پس از ۳۰ روز یک لگاریتم و در پنیر حاوی ۰/۰۴ درصد پس از ۱۵ روز یک لگاریتم کاهش یافت (۳۹). سفیدکن و همکاران در آزمایشی تاثیر اسانس سه گونه مرزه را بر باکتری *سالمونلا* مطالعه کردند، که در غلظت‌های ۲/۵ درصد اسانس، رشد باکتری کاهش یافت (۴۰). در مطالعه قاسمی پیربلوطی، رشد باکتری *لیستریا* در غلظت یک درصد اسانس‌های آویشن، نعناع و مرزه پس از ۷ و ۱۴ روز در ۴ درجه سانتی‌گراد مهار شد (۴۱). اسانس زیره سبز در غلظت‌های ppm ۳۰۰ و ۴۰۰ رشد باکتری *باسیلوس سرئوس* را کاهش داد (۴۲). در مطالعه دیگری توسط جعفرزاده خالدی و همکاران، اسانس نعناع فلفلی در غلظت ppm ۱۰۰۰ توانست رشد باکتری *ای‌کولای* و *باسیلوس سویتیلیس* را مهار کند (۴۳). احسانی و همکاران با بررسی اثر اسانس نعناع بر باکتری باسیلوس سرئوس نشان دادند که کمترین غلظت بازدارنده µL/ml ۱۰۰۰۰ بود (۴۴). در بررسی اثر آویشن بر باکتری *باسیلوس سرئوس* توسط طالعی و همکاران، مشخص گردید که رشد باکتری در غلظت µL/ml ۱۹۰۰ مهار گردید (۴۵). اسانس لیمو در غلظت‌های µL/ml ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ بر رشد *باسیلوس سرئوس* موثر بود (۴۶). مشاک و همکاران نیز غلظت µl/100 ml ۴۵ اسانس آویشن را کمترین غلظت موثر در مهار رشد باکتری *باسیلوس سرئوس* اعلام کردند (۴۷). هیون[1] و همکاران در آزمایشی اثر ضد میکروبی اسانس‌های لیمو، آویشن، رزماری و نعناع فلفلی را بر ۱۸ عامل پاتوژن و فساد مواد غذایی تازه از جمله *باسیلوس سرئوس* مورد بررسی قرار دادند. قطر هاله بازدارنده رشد برای اسانس‌های ذکر شده به ترتیب ۴۵<، ۴۵<، ۲۰ و mm ۲۵ گزارش گردید. که به جز در مورد لیمو تا حدودی با نتایج حاصل از این آزمایش مطابقت داشت (۴۸). اسانس گونه‌ای از مرزه در غلظت‌های µl/ml ۱۱۶/۶۷، ۶۰ و ۲۳ به ترتیب سبب مهار رشد باکتری‌های *استرپتوکوکوس پیوژنز*، *استرپتوکوکوس موتانس*[2] و *استرپتوکوکوس سانجیوس*[3] گردید (۴۹).

در یک مطالعه (۵۰) کمترین غلظت اسانس اسطوخدوس موثر بر رشد باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* را ppm ۱۲۰۰-۱۰۰۰ گزارش گردید. در آزمایش دیگری توسط رادیالی[4] و همکاران رشد باکتری *کلستریدیوم پرفرینژنز* در غلظت‌های mg/ml ۱۰ رزماری و نعناع فلفلی، و mg/ml ۱/۲۵ آویشن مهار گردید (۵۱). بسیاری از گونه‌های ترخون، معطر و غنی از اسانس هستند که ناشی از وجود مونوترپن‌ها و سزکوئی‌ترپن‌ها است. در یک بررسی میانگین قطر هاله عدم رشد در اثر استفاده از اسانس ترخون بر باکتری‌های گرم مثبت mm ۱۲/۷ برآورد گردید (۵۲).

زایگوساکارومایسس روکسی یکی از ده گونه مخمر است که بسیاری از محققان به عنوان مهم‌ترین عوامل پوسیدگی و فساد مواد غذایی تازه معرفی کرده‌اند (۵۳). بر اساس آزمایشات استیزسینسکا[5] در بررسی اثر اسانس‌های لیمو، نعناع فلفلی و آویشن بر مخمرهای *کاندیدا آلبیکانس*، *ساکارومایسس سرویزیه* و *زایگوساکارومایسس روکسی* مشخص گردید که اسانس لیمو اثر ضد میکروبی بر *زایگوساکارومایسس* نداشت، و کمترین غلظت موثر در مهار رشد برای *ساکارومایسس* µl/ml ۱۰ و برای *کاندیدا* بیشتر از µl/ml ۲۴ بود. مطابق با نتایج ما، اسانس آویشن موثرترین اسانس با کمترین غلظت موثر در مهار رشد *زایگوساکارومایسس* بود، و توانست با غلظت µl/ml ۰/۵ رشد این مخمر را مهار کند (۵۴).

اسانس آویشن به عنوان یکی از فعال‌ترین اسانس‌ها از نظر بیولوژیکی در برابر باکتری‌ها، مخمرها و کپک‌ها است. اثرات سینرژیستی تیمول و پی-سیمن به عنوان دو ترکیب اصلی آویشن می‌تواند فعالیت بالای ضد قارچی و مهار رشد قارچ را توجیه کند. به طور کلی تفاوت در نتایج فعالیت ضد

[1] Hyun
[2] *Streptococcus mutans*
[3] *Streptococcus sanguis*
[4] Radaelli
[5] Styczynska

www.SID.ir

Archive of SID

میکروبی اسانس‌ها در برابر عوامل میکروبی می‌تواند به علت اختلاف در مقدار انتشار اجزا خاصی از اسانس در محیط آگار، و یا بخار شدن تعدادی از اجزا اسانس در طول زمان انکوباسیون باشد. بر اساس نتایج حاصل از آزمایشات تسرندمید[1] و همکاران در بررسی اثر اسانس لیمو بر *ساکارومایسس سرویزیه* و *شیزوساکارومایسس*، فاز تاخیری رشد با افزایش غلظت اسانس افزایش یافت، و سرعت رشد نیز با افزایش غلظت اسانس از ۰/۰۶۲۵ µl/ml به ۱ به صفر رسید (۴۶). در بررسی فعالیت ضد میکروبی اسانس میخک بر *زایگوساکارومایسس بایلی* و *زایگوساکارومایسس روکسی* توسط گلیمو[2] و همکاران قطر هاله بازدارنده رشد به ترتیب ۲۳/۵ mm و ۲۰ گزارش گردید. در همین راستا کمترین غلظت بازدارنده رشد برای هر دو مخمر ۰/۰۴۵۳ g/۱۰۰g بود (۵۵).

سانلاید[3] و همکاران اثر ضد میکروبی اسانس میخک را بر مخمرهای *کاندیدا آلبیکانس*، *ساکارومایسس سرویزیه* و *زایگوساکارومایسس روکسی* مورد بررسی قرار دادند. قطر هاله مهار رشد برای مخمرهای ذکر شده به ترتیب ۱۲/۱۱، ۲۴/۸۴ و ۱۴/۴۴ mm بود. این اسانس در غلظت ۲۵ µl/ml رشد مخمر *زایگوساکارومایسس* را مهار کرد (۵۶).

نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان داد که همه اسانس‌های مورد آزمایش در این مطالعه دارای خاصیت ضد میکروبی بر عوامل فساد جداسازی شده از میوه خرما بودند. با این حال از نظر شدت اثر و نیز غلظت موثر هر اسانس در عوامل مختلف تفاوت قابل توجهی مشاهده گردید. در بررسی قطر هاله عدم رشد در باکتری‌ها، اسانس آویشن به عنوان موثرترین اسانس معرفی گردید، که بیشترین تاثیر خود را بر باکتری *باسیلوس اس‌پ.* سویه N3 نشان داد (۴۹/۷ mm قطر هاله عدم رشد)، و در باکتری *میکروکوکوس اس‌پ.* سویه N1 کمترین قطر هاله عدم رشد مشاهده گردید (۳۰ mm).

نتایج کمترین غلظت بازدارنده و کمترین غلظت کشنده باکتری‌های *میکروکوکوس اس‌پ.* سویه N1 و *باسیلوس اس‌پ.* سویه N3 مشابهت داشت. در مطالعه اثربخشی اسانس بر عامل آلودگی، هر چه مقادیر کمترین غلظت بازدارنده و کمترین غلظت کشنده به هم نزدیک‌تر باشد فعالیت ضد میکروبی آن اسانس بالاتر است. با بررسی مقادیر کمترین غلظت بازدارنده و کمترین غلظت کشنده مشخص گردید که باکتری‌های *میکروکوکوس اس‌پ.* سویه N1 و *باسیلوس اس‌پ.* سویه N3 پاسخ بهتری به اسانس‌ها دادند. به طوری که کمترین غلظت باکتری‌کشی یک یا دو غلظت از کمترین غلظت بازدارندگی بیشتر بود، و در مورد هر دو باکتری مرزه و آویشن بیشترین اثر را در کمترین غلظت در مهار رشد باکتری نشان دادند.

باکتری های *باسیلوس سرئوس* و *باسیلوس اس‌پ.* سویه N2 پاسخی متفاوت از دو باکتری دیگر به اسانس‌ها نشان دادند. به این صورت که اسانس‌های میخک، نعناع فلفلی و زیره با وجود مهار رشد، حتی در بالاترین غلظت آزمایش (۱۶ µl/ml) نتوانستند سبب کشتن سلول‌های باکتری شوند. دو اسانس آویشن و مرزه گرچه به ترتیب در غلظت‌های ۸ µl/ml و ۱۶ توانستند سبب مرگ سلولی شوند، ولی فاصله بین کمترین غلظت بازدارنده و کمترین غلظت کشنده زیاد بود (برای هر دو اسانس ۰/۱۲۵ µl/ml).

نتایج کمترین غلظت بازدارندگی رشد مخمر زایگوساکارومایسس روکسی با نتایج مربوط به قطر هاله عدم رشد مطابقت داشت. به نحوی که اسانس آویشن و مرزه با ایجاد بیشترین قطر هاله عدم رشد دارای کمترین غلظت بازدارندگی رشد بودند (۰/۵ µl/ml)، و اسانس ترخون با

[1] Tserennadmid
[2] Gliemmo
[3] Sanla-Ead

www.SID.ir

Archive of SID

ایجاد کمترین ناحیه عدم رشد (۱۸ mm)، در غلظت ۲ µl/ml توانست رشد سلول‌های مخمر را مهار کند.

با بررسی نتایج حاصل از ارزیابی خاصیت ضد میکروبی با روش انتشار دیسک، و نیز تعیین حداقل غلظت بازدارندگی رشد در مورد پنج عامل فساد میوه خرما، می‌توان اسانس‌های آویشن و مرزه را به عنوان کارآمدترین اسانس ها در این آزمایش در مهار عامل فساد در شرایط درون آزمایشگاهی معرفی کرد، که در واقع به علت پیچیدگی و تنوع ترکیبات شیمیایی اسانس‌ها، ایجاد تغییرات ارگانولپتیکی نامناسب، و برهمکنش اسانس‌ها با پوشش‌ها و مواد خوراکی و در نتیجه کاهش اثر آنها، طراحی آزمایشات دقیق *برون شیشه‌ای*[1] به منظور معرفی عوامل ضد میکروبی مناسب باید با احتیاط صورت گیرد.

منابع

۱. روشنی ف، مرتضوی س م ح، مستعان ا و صیاحی، ن. ارزیابی تأثیر روش ضدعفونی ونوع بسته بندی برشاخص های کیفی رطب رقم برحی. نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)، ۱۳۹۴. شماره مجله ۱؛ صفحه ۷۹ – ۸۶.

2. Pattnaik S, Subramanyam VR, Kole C. Antibacterial and antifungal activity of ten essential oils in vitro. Microbios. 1996;86(349):237-46.

3. Zhang X, Yanjun G, Guo L, Jiang H, Ji Q. In Vitro evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of *Melaleuka alternifolia* essential oil. BioMed Research International. 2018;1(1):1-8.

4. Prabuseenivasan S, Jayakumar M, Ignacimuthu S. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. BMC Complementary and Alternative Medicine. 2006;6(1):1-8.

5. Saad NY, Muller CD, Lobstein A. Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. Flavour and Fragrance Journal. 2013;28(5):269-279.

6. Raut, JS, Karuppayil SM. A status review on the medicinal properties of essential oils. Industrial Crops and Products. 2014;62(1):250-264.

7. Swamy MK, Akhtar MS, Sinniah UR. Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: an updated review. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2016; 2016:1-21.

8. Trombetta D, Castelli F, Sarpietro MG, Venuti V, Cristani M, Daniele C, Bisignano G. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2005;49(6):2474-2478.

9. Ultee A, Bennik MHJ, Moezelaar R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen Bacillus cereus. Applied and Environmental Microbiology. 2002;68(4):1561-1568.

۱۰. محمدی، س.، آرویی، ح.، تهرانی‌فر و جهانبخش،و. ۱۳۹۱. بررسی اثرات ضد قارچی اسانس تعدادی از گیاهان دارویی و ادویه‌ای در کنترل پوسیدگی‌های پس از برداشت توت‌فرنگی تحت شرایط Invivo و Invitro پایانامه کارشناسی ارشد. دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.

11. Sellamuthu PS, Mafune M, Sivakumar D, Soundy P. Thyme oil vapour and modified atmosphere packaging reduce anthracnose incidence and maintain fruit quality in avocado. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2013;93(12):3024-3031.

12. Thosar N, Basak S, Bahadure RN, Rajurkar M. Antimicrobial efficacy of five essential oils against oral pathogens: An in vitro study. European Journal of Dentistry. 2013;7(1):71-77.

۱۳. برومند ع، حامدی م، امام‌جمعه ز، رضوی س ه، گلمکانی م ت. بررسی خاصیت ضد میکروبی بذرهای شوید (*Anethum graveolens*) و گشنیز (*Coriangrum sativum*) بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیا کلی* O157:H7، *سالمونلا تیفی‌موریوم* با استفاده از آزمایش حساسیت رقت در محیط مایع. پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران. ۱۳۸۷؛ ۴ (۱): ۵۹–۶۸.

14. Al-Turki AI, Abdel Magid HM. Bacterial contamination of date fruit during post harvest handling. Pakistan Journal of Biological Science. 2004;7(4):611-614.

15. Hamad SH, Saleh FA, Al-Otaibi MM. Microbial contamination of date rutab collected from the markets of Al-Hofuf city in Saudi Arabia. The Scientific World Journal. 2012;1(1):1-5.

16. Umar ZD, Bilkisu A, Bashir A. Bacteriological analysis of date palm fruits sold in Katsina Metropolis. International Journal of Environment. 2014;3(2):83-86.

[1] *in vivo*

www.SID.ir

Archive of SID

17. Kader AA, Hussein AM. Harvesting and post harvest handling of dates. International Center for Agricultural Research in the Dry Areas. 2009;1-15.

۱۸. منصوری جاجایی ش. شناسایی و جداسازی مخمرها و باکتری‌های عامل فساد خرما. پایان‌نامه کارشناسی ارشد وزارت علوم، تحقیقات و فنآوری دانشگاه شیراز. ۱۳۷۶.

19. El- Naggar MAA, EL-Deeb HM. Safe methods to reduce the losses of postharvest wastage of some soft date fruits due to fungal infection during cold storage. Proceedings of the Fifth International Date Palm Conference. 2014;127-138.

20. Amin OA, El-Sharony TF, Abd-Allah ASE. The effectiveness of plant essential oils and Arabic gum on the postharvest treatments of Zaghloul dates fruit during cold storage. International Journal of ChemTech Research. 2015;8(4):1492-1501.

21. Aloui H, Khwaldia K, Licciardello F, Mazzaglia A, Muratore G, Hamdi M, Restuccia C. Efficacy of the combined application of chitosan and Locust Bean Gum with different citrus essential oils to control postharvest spoilage caused by *Aspergillus flavus* in dates. International Journal of Food Microbiology. 2014;170(1):21–28.

22. Patel JB. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-fourth informational supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI Document M100-S24, Wayne, PA 19087 USA, 2014;34(1).

23. Griffin SG, Markham JL, Leach DN. An Agar Dilution Method for the Determination of the Minimum Inhibitory Concentration of Essential Oils. Journal of Essential Oil Research. 2000; 12(2):249-255.

24. Rota MC, Herrera A, Martinez RM, Sotomayor JA, Jordan MJ. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. Food Control.2008;19(7):681–687.

25. Moreira MR, Ponce AG, del Valle CE, Roura SI. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. LWT-Food Science and Technology. 2005;38(5):565-570.

26. de Souza EL, de Barros JC, de Oliveira CEV, da Conceicao ML. Influence of *Origanum vulgare* L. essential oil on enterotoxin production, membrane permeability and surface characteristics of *Staphylococcus aureus*. International Journal of Food Microbiology. 2010;137(2-3):308-311.

27. Harpaz S, Glatman L, Drabkin V, Gelman A. 2 Effects of herbal essential oils used to extend the shelf life of freshwater-reared Asian Sea Bass fish (Lates calcarifer). Journal of Food Protection. 2003;66(3):410-417.

28. Dorman HJ, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. Journal Applied Microbiology. 2000;2(88):308-316.

29. Sfeir J, Lefrançois C, Baudoux D, Derbré S, Licznar P. In Vitro Antibacterial Activity of Essential Oils against *Streptococcus pyogenes*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2013;2013(1):1-9

30. Inouye S, Takizawa T, Yamaguchi H. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2001;47(5): 565–573

31. Mayaud L, Carricajo A, Zhiri A, Aubert G. Comparison of bacteriostatic and bactericidal activity of 13 essential oils against strains with varying sensitivity to antibiotics. Letters in Applied Microbiology. 2008;47(3):167–173.

32. Alexopoulos A, Kimbaris AC, Plessas S. Antibacterial activities of essential oils from eight Greek aromatic plants against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. Anaerobe. 2011;17(6):399–402.

33. Fabio A, Cermelli C, Fabio G, Nicoletti P, Quaglio P. Screening of the antibacterial effects of a variety of essential oils on microorganisms responsible for respiratory infections. Phytotherapy Research. 2007;21(4):374–377.

۳۴. سرابی‌جماب م، نیازمند ر، عابدی‌نیا ا. تاثیر اسانس آویشن بر فعالیت *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، باکتری آغازگر ماست پروبیوتیک. هجدهمین کنگره ملی علوم و صنایع غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی خراسان رضوی. ۱۳۸۷؛ ۲۵-۲۱

۳۵. رهنما م، رضوی روحانی س م، تاجیک ح، خلیقی سیگارودی ف، زادباری م ر. بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس گیاه آویشن شیرازی و نایسین به تنهایی و ترکیبی با یکدیگر بر علیه *لیستریا* مونوسیتوژن در آبگوشت قلب- مغز. فصلنامه گیاهان دارویی. ۱۳۸۸؛ ۴ (۲۲): ۱۳۱-۱۲۰.

۳۶. موسوی م ح، آخوندزاده بستی ا، میثاقی ع، زهرایی صالحی ت. اثرات اسانس آویشن شیرازی و نایسین بر روی رشد *سالمونلا تیفی‌موریوم* در سوپ جو تجارتی. هجدهمین کنگره ملی علوم و صنایع غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی مشهد. ۲۵-۲۱.

۳۷. صادقی ا، آخوندزاده بستی ا، میثاقی ع، زهرایی صالحی ت ف، بهلولی اسگویی س. ارزیابی آثار اسانس زیره سبز و پروبیوتیک *استایلوفیلوس* بر رشد *استافیلوکوک اورئوس* در پنیر سفید ایرانی. فصلنامه گیاهان دارویی. ۱۳۸۹؛ ۲ (۳۴): ۱۴۱-۱۳۱.

www.SID.ir

Archive of SID

۳۸. مقتدر م، ایرج منصوری ع، سالاری ح، فرهمند آ. شناسایی ترکیب‌های شیمیایی و بررسی اثر ضد میکروبی اسنس بذر زیره (*Bunium persicum Boiss*). مجله تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران. ۱۳۸۸؛ ۲۵ (۱): ۲۷-۲۰.

۳۹. فضل‌آرا ع، صادقی ا، رستمی سلیمانی پ. مطالعه تاثیر ضد باکتریایی اسانس گیاه زیره سبز بر باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* در پنیر سفید ایرانی. مجله علوم و صنایع غذایی. ۱۳۹۱؛ ۹ (۳۵): ۴۴- ۳۵.

۴۰. سفیدکن ف، عسگری ف، صادق‌زاده ل، اولیاء پ. بررسی تاثیر اسانس سه گونه مرزه بر *سالمونلا پاراتیفی*. مجله زیست‌شناسی ایران. ۱۳۸۸؛ ۲۲ (۲): ۲۵۸-۲۴۹.

41. Ghasemi Pirbalouti, A., Rahimi, E. and Moosavi, S. Antimicrobial activity of essential oils of three herbs against *listeria monocytogenes* on chicken frankfurters. Acta agriculturae Slovenica. 2010;95(3):223-219.

۴۲. مرادی ب، مشاک ز، آخوندزاده بستی ا، مرادی ب، برین ع. بررسی اثر اسانس زیره سبز بر روی رشد باکتری *باسیلوس سرئوس* در یک مدل غذایی. مجله گیاهان دارویی. ۱۳۹۰؛ ۱ (۸): ۱۰۲-۹۳.

۴۳. جعفرزاده خالدی ک، آقازاده مشگی م، شریفان ا، لاریجانی ک. بررسی اثر اسانس رزماری بر روی روند رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در سوپ آماده تجارتی. مجله بیوپاتولوژی مقایسه‌ای ایران. ۱۳۸۹؛ ۷ (۲): ۲۶۴-۲۵۵.

۴۴. احسانی ع، محمودی ر، زارع پ، حسنی ع. ترکیب شیمیایی و اثرات ضد میکروبی اسانس‌های روغنی گیاهان موسیر (*Allium ascalonicum*) و بادیان رومی (*Pimpinella anisum*) علیه لیستریا مونوسیتوژنز در پنیر سفید آب نمکی. مجله پژوهش‌های صنایع غذایی. ۱۳۹۰؛ ۲۱ (۳): ۳۲۸-۳۱۷.

۴۵. طالعی غ، مشکوه السادات م ه، موسوی س ز. اثر ضد باکتریایی عصاره‌های شاه‌تره، بن سرخ، شنگ، شمشاد اناری و دو گونه آویشن بومی لرستان. مجله علمی دانشکاه علوم پزشکی گرگان. ۱۳۸۷؛ ۱۰ (۱): ۳۵-۳۱.

46. Tserennadmid R, Tako M, Galgoczy L, Papp T, Pesti M, Vagvolgyi C, Almassy K, Krisch J. Anti yeast activities of some essential oils in growth medium, fruit juices and milk. International Journal of Food Microbiology. 2011;144(3):480–486

۴۷. مشاک ز، مرادی ب، مرادی ب. اثر ترکیبی اسانس دارچین و آویشن شیرازی بر رشد *Bacillus cereus* در یک مدل غذایی. فصلنامه گیاهان دارویی. ۱۳۹۱؛ ۲ (۴۲): ۷۳-۶۲.

48. Hyun JE, Bae YM, Yoon JH, Lee SY. Antibacterial Effect of Various Essential Oils against Pathogens and Spoilage Microorganisms in Fresh Produce: Antibacterial Effect of Essential Oils. Journal of Food Safety. 2014;35(2):206-219.

49. Nikolic M, Jovanovic KK, Markovic T, Markovic D, Gligorijevic N, Radulovic S, Sokovic M. Chemical composition, antimicrobial, and cytotoxic properties of five Lamiaceae essential oils. Industrial Crops and Products. 2014;61(11):225–232.

50. Martucci JF, Gende LB, Neira LM, Ruseckaite RA. Oregano and lavender essential oils as antioxidant and antimicrobialadditives of biogenic gelatin films. Industrial Crops and Products. 2015;71(9):205–213.

51. Radaelli M, da Silva BP, Weidlich L, Hoehne L, Flach A, Mendonc LA, da Costa A, Ethur EM. Antimicrobial activities of six essential oils commonly used as condiments in Brazil against *Clostridium perfringens*. Brazilian Journal of Microbiology. 2016; 47(2):424–430.

۵۲. علیزاده بهبهانی ب، طباطبایی یزدی ف، شهیدی ف، مرتضوی س ع، محبی م. بررسی ترکیبات شیمیایی و فعالیت ضدمیکروبی اسانس ترخون، بر برخی از باکتری های بیماری زا در شرایط برون تنی. مجله دانشگاه علوم پزشکی قم. ۱۳۹۶؛۱۱ (۹): ۴۲-۵۱

53. Wallis AA. Inhibition of Spoilage Yeasts using Spice Essential Oils and Their Components. A Thesis Presented for the Master of Science Degree the University of Tennessee, Knoxville. 2013. 72 pages.

54. Styczynska AK. Activity of essential oils against food - spoiling yeast. A review. Flavour and Fragrance Journal. 2011;26(5):326-328.

55. Gliemmo M, Montagnani MA, Schelegueda LI, Gonzalez M, Campos CA. Effect of xantham gum, steviosides, clove, and cinnamon essential oils on the sensory and microbiological quality of a low sugar tomato jam. Food Science and Technology International. 2015;22(2):122–131

56. Sanla-Ead N, Jangchud A, Chonhenchob V, Suppakul P. Antimicrobial activity of cinnamon, clove and galangal essential oils and their principal constituents, and possible application in active packaging. InThe Proceedings of 15th IAPRI World Conference on Packaging (WorldPak2006): Technical session 2006 Oct 2 (pp. 214-8)

www.SID.ir

Archive of SID

Antimicrobial Effect of Ten Essential Oils on Bacteria and Yeast Causing Date Fruit Spoilage in Rutab Stage

Solaleh Najafi Marghmaleki[1], **Seyed Mohammad Hassan Mortazavi[1*]**, Hossein Motamedi[2]

[1] Department of Horticultural Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
[2] Department of Biology, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Abstract

In this study, the chemical compositions, total phenolic content, antioxidant power and the antimicrobial effect of *Heracleum lasiopetalum* essential oil on *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua* and *Candida albicans* were determined. The essential oil was extracted by hydrodistillation. Its chemical composition was determined through gas chromatography-mass spectrometry in comparison with standard mass spectra. Total phenolic content and antioxidant activity were measured using the Folin-Ciocalteu and DPPH scavenging methods. The essential oil antimicrobial activity was quantified by disk diffusion, well diffusion agar, minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal/fungicidal concentration methods. Eucalyptol was the major constituent of the essential oil with a percentage of 30.75. The total phenolic content and antioxidant power of the essential oil were 35/44±0.95 mg GAE/g and 24.20±1.60 mg/ml respectively. The antimicrobial activity based on disk diffusion and agar well showed that *Candida albicans* was the most sensitive species to the essential oil. The minimum inhibitory concentration of the essential oil was equal to 16, 16, 4, 8 and 4 mg/ml for *Pseudomonas aeruginosa*, Enterobacter aerogenes, *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua and Candida albicans* respectively. The results of the bactericidal and fungicidal concentrations were totally equal to or higher than those of the minimum inhibitory concentration. The results revealed that *Heracleum Lasiopetalum* essential oil has appropriate antioxidant power and is able to control the growth of foodborne pathogens and can be utilized as a natural preservative in food industry.

Keywords: *HeracleumLasiopetalum*, Gram-positive and Gram-negative bacteria, Minimum inhibitory concentration, Minimum fungicidal/bactericidal concentration, Gas chromatography

* mortazavi_mh@scu.ac.ir

www.SID.ir