فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۲۶، شمارهٔ ۲، صفحهٔ ۱۴۶-۱۳۳ (۱۳۸۹)

بررسی اثر ضد باکتریایی و خاصیت سینرژیستی اسانس سه گیاه دارویی علیه برخی از پاتوژنهای مهم مواد غذایی به روش میکرودایلوشن

فاطمه عروجعلیان[۱]، روحا کسری کرمانشاهی[۲*]، مجید عزیزی[۳] و محمدرضا باسامی[۴]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان
۲*- نویسنده مسئول، استاد، گروه میکروبیولوژی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، پست الکترونیک: rkasra@yahoo.com
۳- دانشیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۴- استادیار، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد

تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۸۸ تاریخ اصلاح نهایی: شهریور ۱۳۸۸ تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۸۸

چکیده

اسانس سه گیاه دارویی شامل زنیان (*Carum copticum* (L.) C. B. Clarke)، زیره پارسی (*Bunium persicum* (Boiss.) B. Fedtsch.) و زیره سبز (*Cuminum cyminum* L.) به روش تقطیر با آب استخراج شد. اسانس‌های بدست آمده با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگراف (GC) و گاز کروماتوگراف متصل به طیف‌سنج جرمی (GC/MS) تجزیه شدند و ترکیب‌های تشکیل‌دهنده آنها براساس شاخص بازداری و طیف جرمی تعیین گردید. سپس با استفاده از تکنیک میکرودایلوشن (ریزرقت) و با استفاده از دستگاه خواننده الایزا خاصیت ضد باکتریایی اسانس‌های مورد نظر با تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) نیز علیه برخی از باکتریهای آلوده کننده مواد غذایی مانند *Staphylococcus aureus*، *Bacillus cereus*، *Listeria monocytogenes*، *Escherichia coli* O157H7 و *Salmonella enteritidis* بررسی شد. همچنین با توجه به کاربرد همزمان گیاهان دارویی در طب سنتی و با در نظر گرفتن تأثیر این اسانس‌ها بر خواص ارگانولپتیکی مواد غذایی و MIC اسانس زیره پارسی و زیره سبز واکنش متقابل این دو با استفاده از روش Modified checkboard و محاسبه شاخص بازدارندگی افتراقی (FIC_{index}) علیه باکتریها نیز بررسی گردید. نتایج نشان دادند که از نظر اجزای اسانس بین گونه‌های مورد بررسی اختلاف قابل‌توجهی وجود دارد. این در حالی بود که ترکیب‌هایی چون پارا-سیمن و گاما-ترپینن در هر سه اسانس به میزان متفاوتی تشخیص داده شد. مهمترین ترکیب‌های موجود در اسانس زنیان تیمول (۴۸/۴٪)، پارا-سیمن (۲۱/۸٪) و گاما-ترپینن (۲۱/۳٪) بودند. در اسانس زیره پارسی گاما-ترپینن (۴۴/۲٪)، کومین‌آلدئید (۱۶/۹٪)، گاما-ترپینن-۷-اُل (۱۰/۵٪) و پارا-سیمن (۸٪) از ترکیب‌های اصلی تشخیص داده شدند. ترکیب‌های اصلی در اسانس زیره سبز، کومین‌آلدئید (۳۰/۲٪)، گاما-ترپینن (۱۲/۸٪)، سافرانال (۹/۴٪) و پارا-سیمن (۱۴/۱٪) بودند. حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) اسانس‌ها به‌ترتیب برای زنیان در دامنه ۰/۰۳ تا ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، برای زیره پارسی ۰/۱۸ تا ۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و برای اسانس زیره سبز ۰/۳۷تا ۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بدست آمد. اسانس زنیان به‌طور مؤثرتری رشد تمام باکتریهای مورد آزمایش را کنترل نمود در حالی‌که بقیه اسانس‌ها به میزان کمتری مؤثر بودند. محاسبه (FIC_{index}) اسانس زیره پارسی و زیره سبز وجود فعالیت سینرژیستی علیه باکتریهای گرم مثبت و فعالیت افزایشی علیه باکتریهای گرم منفی را اثبات نمود. در مجموع نتایج این تحقیق نشان داد که اگرچه اثرهای بازدارندگی اسانس زیره پارسی و زیره سبز کمتر از اسانس زنیان است، ولی کاربرد همزمان این دو اسانس به‌ویژه علیه باکتریهای گرم مثبت

Archive of SID
www.SID.ir

دارای اثرهای بازدارنده قابل‌توجه بوده و می‌توان در راستای بهینه‌سازی استفاده از اسانس‌ها در کنترل مؤثر پاتوژنهای مواد غذایی به‌عنوان یک روش مکمل که در عین حال اثر نامطلوب کمتری بر خواص ارگانولپتیکی مواد غذایی داشته باشند، استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: زنیان (*Carum copticum* (L.) C. B. Clarke)، زیره پارسی (*Bunium persicum* (Boiss.) B. Fedtsch.)، زیره سبز (*Cuminum cyminum* L.)، خواص ضد باکتریایی، میکرودایلوشن، شاخص بازدارندگی افتراقی (FIC_{index}).

مقدمه

غذاهای آلوده به باکتریهای پاتوژن و یا انتروتوکسین‌های آنها منجر به بروز بیماریهایی می‌شوند که جزو شایع‌ترین بیماریها در جهان به حساب می‌آیند. انتروتوکسینهای تولید شده توسط *E. coli*، *Staphylococcus aureus* و گونه‌های *Salmonella*، *Yersinia* و *Clostridium* مسئول مسمومیت دستگاه گوارش و بروز علائم گوارشی ناشی از آن می‌شوند. علاوه بر این، میکروارگانیسمهای مولد فساد مواد غذایی باعث آسیب‌های اقتصادی نیز می‌شوند (D'Mello, 2003؛ Sandri *et al*., 2007). افزایش استفاده از آنتی‌بیوتیکها و استفاده نابجا و نامناسب مانند مصرف بیش از حد نیاز و یا عدم رعایت دوز توصیه شده توسط بیماران منجر به گسترش مقاومت باکتریایی به آنتی‌بیوتیکها شده است (Kotzé & Eloff, 2002). این امر منجر به افزایش تمایل به توسعه ترکیب‌های جدید ضد میکروبی مؤثرتر و بدون سمیت شده است (کرمانشاهی و همکاران، ۱۳۸۵). متابولیت‌های ثانویه گیاهی مانند اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی (Tepe *et al*., 2004) از نظر اثرهای ضد میکروبی مورد بررسی قرار گرفته‌اند و مشخص شده است که اغلب اسانس‌های گیاهی استخراج شده از گیاهان دارای خواص حشره‌کشی، ضد قارچی، ضد انگل، ضد باکتری، ضد ویروس، آنتی‌اکسیدانی و سیتوتوکسیک می‌باشند (Kordali *et al*., 2005). بنابراین اسانس‌های گیاهی در زمینه‌های فارماکولوژیکی، داروشناسی گیاهی، میکروبیولوژی پزشکی و کلینیکی، فیتوپاتولوژی و نگهداری مواد غذایی شدیداً غربالگری شده و مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Daferera *et al*., 2000). اسانس‌ها ترکیب‌های روغنی معطر هستند که از اندامهای مختلف گیاهان معطر بدست آمده و به‌طور گسترده‌ای به‌عنوان طعم‌دهنده غذا مورد استفاده قرار می‌گیرند. از این مواد علاوه بر جلوگیری از رشد باکتریها و کپکهای آلوده‌کننده مواد غذایی به منظور افزایش عمر نگهداری غذاهای فرایند شده در سیستم غذایی نیز استفاده می‌شود (Burt, 2004؛ Kalemba & Kunicka, 2003).

گیاهان خانواده کرفس حاوی ترکیب‌هایی هستند که فعالیتهای بیولوژیکی متعددی ازجمله محرک آپوپتوزیس، خاصیت ضد میکروبی، محافظ کبد، وازو ریلاکسانت، بازدارنده آنزیم سیکلو اکسیژناز و ضد سرطانی را از خود نشان می‌دهند (Ye *et al*., 2001؛ Pae *et al*., 2002؛ Gonzalez *et al*., 1995).

زنیان با نام علمی *Carum copticum*، یک گیاه معطر، علفی، یکساله، با گلهای سفید و میوه‌های کوچک قهوه‌ای رنگ است که در کشورهای ایران، هندوستان، پاکستان و مصر می‌روید (Rechinger, 1965-2001). در بررسیهای مختلف درصد اسانس موجود در این گیاه بین ۰/۵ تا ۹٪ حجمی/ وزنی گزارش شده است (Qadry & Atal, 1976). در طب سنتی ایران میوه این گیاه با نام زنیان به

Archive of SID

www.SID.ir

منظور اثرهای درمانی مختلف مانند مدر، ضد تهوع، ضد نفخ (زرگری، ۱۳۶۸) استفاده می‌شود. همچنین از دود این گیاه برای ضدعفونی رحم استفاده می‌شده است. عرقیات حاصل از جوشانده میوه این گیاه در آب به‌عنوان ضد نفخ و همچنین در درمان وبا استفاده می‌شده است. در برخی از مطالعات اثر محرک "بتا آدرنرژیک" و اثر ضد کولینرژیک (Boskabady & Shaikhi, 2000)، تنظیم‌کننده برونش و اثر شبه گزانتین دانه بوداده زنیان نیز گزارش شده است (Boskabady *et al*., 2003).

زیره پارسی با نام علمی *Bunium persicum*، یک گیاه معطر چندساله می‌باشد که از آسیای مرکزی تا شمال هندوستان رویش دارد. براساس منابع موجود میوه زیره پارسی تقریباً حاوی ۹٪ اسانس است (Azizi, 2005). از بذرهای این گیاه به‌طور وسیعی به‌عنوان ادویه و چاشنی استفاده می‌شود. در طب سنتی از بذرهای این گیاه به‌عنوان محرک و ضد نفخ استفاده شده و مشخص شده است که برای اسهال و سوءهاضمه مفید است (Baser *et al*., 1997). همچنین این گیاه در تهیه غذا و طعم دادن به غذا و نوشیدنی‌ها استفاده می‌شود (Pourmortazavi *et al*., 2005).

زیره سبز با نام علمی *Cuminum cyminum*، یک گیاه تک‌گونه‌ای از خانواده کرفس است و یک گیاه یکساله علفی است که یکی از مهمترین ادویه‌های استفاده شده در تمام کشورها می‌باشد. زیره سبز همچنین به‌عنوان جزئی از داروهای آیورودیک برای درمان بیماریهای گوارشی استفاده می‌شود (Atal & Kapour, 1982).

مطالعات قبلی در مورد خواص ضد میکروبی گیاهان خانواده کرفس نشان‌دهنده فعالیت ضد باکتریایی متوسط تا قوی این گیاهان است. Gachkar و همکاران (۲۰۰۷) گزارش دادند که اسانس زیره سبز علیه *E. coli*، *S. aureus* و *L. monocytogenes* مؤثرتر از اسانس اکلیل کوهی است. Iacobellis و همکاران (۲۰۰۵) خاصیت ضد باکتریایی متوسط زیره سبز را علیه برخی از باکتریهای پاتوژن گیاهی گزارش نمودند. Singh و همکاران (۲۰۰۲) خواص ضد باکتریایی اسانس ۷ گونه از خانواده کرفس را علیه *Corynebacterium diphtheriae*، *Staphylococcus aureus*، *Streptococcus haemolyticus*، *Escherichia coli*، *Klebsiella* spp. و *Proteus vulgaris* مورد آزمایش قرار دادند و گزارش نمودند که اسانس زنیان بسیار مؤثر است. Rani و Khullar (۲۰۰٤) نشان دادند که عصاره زنیان علیه *Salmonella typhi* بسیار مؤثرتر از زیره سبز است. مقتدر و همکاران (۱۳۸۸) ترکیب‌های شیمیایی و اثر ضد میکروبی اسانس زیره پارسی توده وحشی کرمان را علیه ۹ سوش باکتریایی به روش دیسک دیفیوژن بررسی کردند و اظهار نمودند که این گیاه اثر ضد باکتریایی داشته و می‌تواند برای مقابله با میکروبهای بیماری‌زای خاص مورد استفاده قرار گیرد.

اثر ضد باکتریایی اسانس‌ها به روشهای متفاوتی مورد بررسی قرار می‌گیرند. با توجه به تأثیر اسانس‌ها بر خواص ارگانولپتیکی مواد غذایی، تعیین دقیق MIC آنها و همچنین بررسی وجود خاصیت سینرژیستی بین اسانس‌ها با استفاده از تکنیک میکرودایلوشن به منظور به حداقل رساندن میزان مصرف این مواد در صنایع غذایی و همچنین غلبه بر مقاومت باکتریایی مورد توجه می‌باشد. بنابراین در این تحقیق اثر ضد باکتریایی اسانس سه گیاه دارویی فوق از خانواده کرفس علیه برخی باکتریهای آلوده‌کننده مواد غذایی رایج مانند *Staphylococcus aureus*، *Bacillus cereus*، *Listeria monocytogenes*،

Archive of SID

www.SID.ir

Escherichia coli O157H7 و *Salmonella enteritidis* مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

مواد گیاهی

بذرهای سه گیاه دارویی از خانواده کرفس به نامهای زنیان (*Carum copticum*)، زیره پارسی (*Bunium persicum*) و زیره سبز (*Cuminum cyminum*) از مزرعه تحقیقاتی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه گردید. نمونه‌های تهیه شده، در هرباریوم دانشگاه فردوسی مشهد تأیید شد و از هر گیاه یک نمونه تأیید شده (به‌ترتیب با شماره‌های ۳٦۲٦۷، ۲۸۵۰۲ و ۳۳۹۲۲) در هرباریوم نگهداری شد.

نژادهای باکتریهای مورد آزمایش

استافیلوکوکوس ارئوس (ATCC 25923)، باسیلوس سرئوس (ATCC 11778)، لیستریا منوسایتوژنز (ATCC 19112)، اشرشیا کولی O157H7 (ATTC 700728) و سالمونلا انتریتیدیس (RITCC 1624) که از استوک گلیسیرول ۱۵٪ در دمای ۸۵- درجه سانتی‌گراد خارج و در محیط مایع تریپتیکاز سویا (Merck, Darmstadt, Germany)، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد احیاء شدند. پس از آن باکتریها در محیط تریپتیکاز سویا آگار (Merck, Darmstadt, Germany) برای اثبات خلوص کلنی‌ها کشت شدند.

استخراج اسانس

از هر نمونه گیاهی ۱۰۰ گرم به‌طور دقیق وزن شد و در یک آسیاب کاملاً خرد گردید و براساس روش توصیه شده در فارماکوپه بریتانیا (British Pharmacopoeia, 1988) و به روش تقطیر با آب به مدت ٤ ساعت اسانس‌گیری انجام شد. سپس اسانس‌ها از آب جدا شده و پس از آبگیری تا زمان استفاده در شیشه‌های تیره و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

آنالیز اسانس با استفاده از GC و GC/MS

ترکیب‌های موجود در اسانس‌ها با استفاده از دستگاههای گاز کروماتوگراف (GC) و گاز کروماتوگراف متصل به طیف‌سنج جرمی (GC/MS) با مشخصات زیر شناسایی شدند.

گاز کروماتوگراف مدل شیمادزو مجهز به دتکتور FID و ستون BP5 با طول ۲۵ متر و قطر داخلی ۰/۲۲ ملی‌متر و ضخامت فیلم ۰/۲۵ میکرومتر بود. دمای آون ٦۰ تا ۲٦۰ درجه سانتی‌گراد با دامنه ۸ درجه در دقیقه، دمای تزریق ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد، نسبت اختلاط ۱ به ۱۰، گاز حامل ازت و دمای دتکتور ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد بود. کروماتوگراف متصل به طیف‌سنج جرمی مدل Varian مجهز به ستون موئینه DB5 با قطر داخلی ستون ۰/۲۵ میلی‌متر، ضخامت فیلم ۰/۲۵ میکرومتر و طول ستون ۳۰ متر بود. شرایط دستگاه شامل دمای آون از ٦۰ تا ۲٤۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۳ میلی‌متر در دقیقه، دمای تزریق ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد، نوع تزریق اسپلیت با گاز حامل هلیم با سرعت ۲ میلی‌لیتر در دقیقه بود. پتانسیل یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت، دمای منبع یون ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد، جریان یونیزاسیون ۱۰۰۰ میکرو آمپر با رزولوشن ۱۰۰۰ و دامنه جرمی ٤۰ تا ۳۰۰ بود.

تشخیص اجزاء اسانس

اجزای اسانس با کمک شاخص بازداری بدست آمده در مقایسه با تزریق یک سری از آلکانها (Sigma, UK) با ستون DB5، مقایسه با طیف‌های ترکیب‌های استاندارد،

Archive of SID

www.SID.ir

تشخیص طیف جرمی و الگوی شکست گزارش شده در منابع معتبر و مقایسه کامپیوتری اطلاعات جرمی به کمک بانک اطلاعاتی (Saturn-4) انجام شد (Adams, 2001). درصد نسبی هر یک از اجزاء تشکیل‌دهنده اسانس با استفاده از سطح زیر منحنی تعیین شد.

تعیین خاصیت ضد باکتریایی

سنجش میزان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) با استفاده از متد میکرودایلوشن

مقادیر حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) براساس روشهای منتشر شده (Demirci *et al*., 2008؛ Sandri *et al*., 2007) تعیین گردید. برای این منظور از نژادهای باکتریهای پاتوژن یاد شده یک کشت ۲۴–۱۸ ساعته (کشت شبانه) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در محیط مولر هینتون براث (MHB, Oxoid) تهیه شد. محلولهای استوک از اسانس‌ها و مواد استاندارد ضد میکروب که در این آزمایش آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل و اسید آلی آسکوربیک اسید بودند در DMSO (Dimethyle sulfoxide) تهیه شدند.

سریالهای رقت با استفاده از محیط کشت مولر هینتون براث از ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تا ۰/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تهیه شدند و ۷۰ میکرولیتر از آنها به پلیت‌های میکروتیتر ۹۶ خانه‌ای که قبلاً حاوی ۷۰ میکرولیتر محیط کشت MHB بودند اضافه گردید. بعد ۷۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی معادل استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند که حاوی 10^8 باکتری در هر میلی‌لیتر[1] بود، به پلیتهای میکروتیتر اضافه شد. در مجموع این آزمایش با حجم ۲۱۰ میکرولیتر در هر چاهک انجام شد. آزمایشهای مشابه برای کنترل مثبت (شامل MHB، DMSO و باکتری تحت تیمار) و کنترل استریلیتی یا کنترل منفی (شامل MHB، DMSO و اسانس مورد آزمایش) بود. نمونه‌ها به مدت ۲۴–۲۲ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در گرمخانه نگهداری شدند. اولین چاهک بدون کدورت به‌عنوان حداقل غلظت بازدارنده (MIC)، به صورت mg/ml گزارش شد.

تمام آزمایشها حداقل برای سه بار تکرار گردید و میانگین داده‌های بدست آمده، به‌عنوان نتایج MIC و MBC ارائه گردید (جدول ۲). نتایج MIC با استفاده از نرم‌افزار MSTATC مورد تجزیه آماری قرار گرفتند و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

سنجش میزان حداقل غلظت کشندگی (MBC)

حداقل غلظت کشندگی (MBC) اسانس‌ها با توجه به نتایج MIC تعیین شد. میزان ۵ میکرولیتر از چاهک‌هایی که رشد باکتری در آنها کاملاً متوقف شده بود، به پلیت‌های حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار منتقل شد و به مدت ۲۴–۲۲ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در گرمخانه نگهداری شدند. غلظت‌هایی که فاقد رشد باکتری بودند، به‌عنوان مقادیر MBC گزارش شدند (Celiktas *et al*., 2007).

برهم‌کنش اسانس‌های زیره پارسی و سبز در خاصیت ضد باکتریایی

با توجه به اینکه در طب سنتی ایران گیاهان دارویی به صورت مخلوط نیز مورد استفاده قرار می‌گیرند (زرگری، ۱۳۶۸)، فعالیت ضد باکتریایی مخلوط اسانس زیره پارسی و سبز به صورت ترکیب با یکدیگر نیز مورد ارزیابی

1 -10^8 colony forming units (cfu/ml) (according to Mc Farland turbidity standards)

Archive of SID
www.SID.ir

قرارگرفت. واکنش متقابل اسانس این دو گیاه با استفاده از رابطه زیر و براساس محاسبه شاخص FIC یا غلظت بازدارنده افتراقی با استفاده از روش Modified dilution checkboard انجام شد (Pillai *et al*., 2005).

$$\text{Sum FIC}_{BC} = \frac{\text{MIC}_B \text{ in combination}}{\text{MIC}_B \text{ alone}} + \frac{\text{MIC}_C \text{ in combination}}{\text{MIC}_C \text{ alone}}$$

B: زیره پارسی

C: زیره سبز

Sum FIC_{BC}: مجموع غلظت بازدارندگی افتراقی زیره پارسی و زیره سبز

MIC_B: حداقل غلظت بازدارندگی اسانس زیره پارسی

MIC_C: حداقل غلظت بازدارندگی اسانس زیره سبز

FIC_{Index} برای اسانس‌های زیره سبز و زیره پارسی محاسبه شدند. مقادیر کوچکتر از ۰/۹ نشان‌دهنده اثر سینرژیستی، مقادیر مابین ۰/۹ تا ۱/۱ مؤید اثر افزایشی و مقادیر بیشتر از ۱/۱ ناشی از وجود اثر آنتاگونیستی بین این دو اسانس در نظر گرفته شد (Santiesteban-López *et al.*, 2007).

نتایج

نتایج حاصل از بررسی اجزای اسانس

اجزای اسانس زنیان

نتایج حاصل از استخراج اسانس زنیان نشان داد که بذرهای این گیاه دارای ۵/۲٪ (حجمی به وزنی) اسانس بودند. بررسی اجزای اسانس زنیان در جدول ۱ آمده است. در اسانس این گیاه ۱۷ ترکیب تشخیص داده شد که ۹۹/۳٪ اسانس را شامل شد. اجزای مهم اسانس زنیان شامل تیمول (۴۸/۴٪)، پارا-سیمن (۲۱/۸٪)، گاما-ترپینن (۲۱/۳٪) و بتا-پینن (۲/۶٪) بودند. کارواکرول به میزان ۴٪ فقط در اسانس این گیاه تشخیص داده شد.

اجزای اسانس زیره پارسی

نتایج حاصل از استخراج اسانس زیره پارسی نشان داد که بذرهای این گیاه ۹/۱٪ (حجمی به وزنی) اسانس بودند که در میان گیاهان دیگر مورد آزمایش از این خانواده در بالاترین حد قرار داشت. در تجزیه و شناسایی ترکیب‌های اسانس زیره پارسی به روش GC/MS، ۳۵ ترکیب تشخیص داده شد که معادل ۹۵/۴٪ کل اسانس بود (جدول ۱). گاما-ترپینن یکی از منوترپن‌های هیدروکربنی مهم بود که به میزان ۴۴/۲٪ تشخیص داده شد. کومین‌آلدئید و پارا-سیمن به‌ترتیب ۱۶/۹٪ و ۸/۰٪ در اسانس زیره پارسی وجود داشت. ترکیب گاما-ترپینن-۷- اُل به میزان ۱۰/۵٪ و بورنیل استات به میزان ۲/۹٪ صرفاً در اسانس زیره پارسی وجود داشت. مقادیر پریل‌آلدئید بسیار کم (۰/۲٪) بود. مقادیر سزکویی‌ترپن‌های هیدروکربنی کمتر از ۱٪ بود، ولی هیچ سزکویی‌ترپن هیدروکربنی اکسیژنه در این گیاه تشخیص داده نشد.

اجزای اسانس زیره سبز

نمونه‌های زیره سبز دارای ۳/۵٪ اسانس بودند و ۲۰ ترکیب در آن شناسایی شد که ۸۳/۷٪ کل اسانس را تشکیل می‌داد. اجزای مهم آن شامل کومین‌آلدئید (۳۰/۲٪)، پارا-سیمن (۱۴/۱۳٪)، گاما-ترپینن (۱۲/۸٪) و بتا-پینن (۶/۴٪) بودند. سافرانال (۹/۴٪) فقط در اسانس این گیاه مشاهده شد (جدول ۱).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- ترکیب اسانس *Bunium persicum*، *Cuminum cyminum* و *Carum copticum*

ردیف	نام ترکیب	*B. persicum*	*C. cyminum*	*C. copticum*	شاخص کواتس
۱	*α*-thujene	۰/٤	۰/۲	۰/۷	۹۲۵
۲	*α*-pinene	۱	۰/٦	۰/۷	۹۳۲
۳	camphene	۰/۱	–	tr	۹٤٦
٤	sabinene	۱/۲	۱/۳	tr	۹۷۰
۵	*β*-pinene	۱/٦	٦/٤	۲/٦	۹۷۵
٦	myrcene	۱	۰/۵	۰/۹	۹۹۰
۷	meta-mentha-1(7),8-diene	–	–	tr	۹۹۹
۸	*δ*-2-carene	tr	۰/۸	–	۱۰۰۲
۹	isosylvestrene	۰/۳	–	–	۱۰۱۳
۱۰	*α*-terpinene	–	۰/۸	۰/٦	۱۰۱۳
۱۱	*p*-cymene	۸	۱٤/۱	۲۱/۸	۱۰۱۹
۱۲	limonene	۲	۰/٦	۰/٤	۱۰۲۵
۱۳	β-phellandrene	–	۰/۱	۰/٦	۱۰۲۸
۱٤	1,8-cineole	۲/۹	۰/٤	–	۱۰۳۲
۱۵	Z-*β*-ocimene	۰/۱	–	–	۱۰۳۷
۱٦	*γ*-terpinene	٤٤/۲	۱۲/۸	۲۱/۳	۱۰۵۵
۱۷	3-methylbenzaldehyde	tr	–	–	۱۰۵۹
۱۸	*cis*-sabinene hydrate	tr	–	۰/۳	۱۰٦۱
۱۹	terpinolene	۰/۷	–	۰/٤	۱۰۸۵
۲۰	linalool	۰/۱	tr	–	۱۰۹۳
۲۱	*trans*-sabinene hydrate	۰/۱	–	–	۱۰۹۵
۲۲	terpineol	–	۰/۵	۰/۲	۱۱۳۰
۲۳	borneol	۰/۱	–	–	۱۱٦۲
۲٤	terpinen-4-ol	۰/٤	–	–	۱۱۷۰
۲۵	*α*-terpineol	tr	–	–	۱۱۸۹
۲٦	*meta*-cuminol	tr	–	–	۱۲۱۷
۲۷	*p*-cuminaldehyde	۱٦/۹	۳۰/۲	–	۱۲۳۱
۲۸	*trans*-*p*-menth-2-en-7-ol	۰/۲	–	–	۱۲٦۱
۲۹	perillaldehyde	۰/۲	۰/۸	–	۱۲٦۵
۳۰	bornyl acetate	۲/۹	–	–	۱۲۸۰
۳۱	*α*-terpinen-7-al	۰/٤	–	–	۱۲۸۱
۳۲	*γ*-terpinen-7-al	۱۰/۵	–	–	۱۲۸۷

Archive of SID

www.SID.ir

ادامه جدول ۱- ترکیب اسانس *Bunium persicum*، *Cuminum cyminum* و *Carum copticum*

ردیف	نام ترکیب	*B. persicum*	*C. cyminum*	*C. copticum*	شاخص کواتس
۳۳	thymol	۰/۱	–	٤۸/٤	۱۲۸۹
۳٤	safranal	–	۹/٤	–	۱۲۹٤
۳۵	carvacrol	–	–	۰/٤	۱۲۹٤
۳٦	9-*epi*-*ß*-caryophyllene	tr	۳/۵	–	۱۳۰۲
۳۷	*Ar*-curcumene	tr	-	–	۱٤۱۱
۳۸	germacrene D	۰/۱	۰/۲	–	۱٤۷٤
۳۹	*α*-zingiberene	tr	–	–	۱٤۷٦
٤۰	E-α-Farnesene	tr	۰/۵	–	۱٤۹۰
٤۱	*ß*-sesquiphellandrene	۰/۱	–	–	۱۵۰۳
٤۲	ترکیب‌های شناخته شده	۹۵/٦	۸۳/۷	۹۹/۳	

شاخص بازداری براساس سری آلکانها با استفاده از ستون DB5 نشان داده شده‌اند.

tr: مقادیر بسیار کم (کمتر از ۰/۰۵٪)

خاصیت آنتی‌باکتریایی اسانس‌ها

در این تحقیق خاصیت آنتی‌باکتریایی اسانس گیاهان زیره پارسی، زیره سبز و زنیان در شرایط *in vitro* علیه چندین باکتری پاتوژن مواد غذایی یاد شده، با استفاده از تکنیک براث میکرودایلوشن مورد آزمایش قرار گرفت. خواص آنتی‌باکتریایی اسانس این گیاهان با تعیین مقادیر MIC و MBC گزارش شد (جدول ۲).

نتایج بدست آمده نشان داد که بین اسانس‌های مورد آزمایش اختلاف قابل‌توجهی از نظر خاصیت آنتی‌باکتریال وجود دارد. حداقل غلظت بازدارندگی علیه باکتریهای مورد بررسی برای اسانس زنیان بین ۰/۰۳ تا ۰/۵ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر، برای اسانس زیره پارسی بین ۰/۱۸ تا ۳ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر، برای اسانس زیره سبز بین ۰/۳۷ تا ۳ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر بدست آمد. این در حالی بود که حداقل غلظت کشندگی علیه باکتریهای مورد بررسی برای اسانس زنیان بین ۰/۰۳ تا ۱ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر، برای اسانس زیره پارسی ۰/۱۸ تا ۳ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر، برای اسانس زیره سبز ۰/۳۷ تا ۳ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر محاسبه شد. براساس نتایج فوق خاصیت آنتی‌باکتریال اسانس زنیان علیه تمام پاتوژنهای مورد بررسی مؤثرتر از بقیه اسانس‌ها بود. از میان پاتوژنهای مورد آزمایش، باکتریهای گرم منفی *E. coli* O157H7 و *S. enteritidis* مقاومتر از بقیه پاتوژنها بودند. در حالی‌که قویترین خاصیت آنتی‌باکتریال به‌ترتیب علیه *B. cereus* (با حداقل غلظت بازدارندگی ۰/۰۳ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر)، *S. aureus* (با حداقل غلظت بازدارندگی ۰/۰٦ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر) و *L. monocytogenes* (با حداقل غلظت بازدارندگی ۰/۲۵ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر) مشاهده شد.

با توجه به قدرت ضد باکتریایی پایین‌تر اسانس‌های زیره سبز و پارسی نسبت به زنیان و اینکه هر سه این گیاهان به یک خانواده گیاهی تعلق داشتند، پس از بررسی

Archive of SID

www.SID.ir

اجزاء اسانس اثر ترکیبی اسانس زیره سبز و پارسی با تعیین مقادیر غلظت بازدارندگی افتراقی (FIC) به روش Modified dilution checkboard مورد بررسی قرار گرفت. مقادیر FIC بدست آمده در جدول ۳ خلاصه شده است. این نتایج نشان می‌دهند که استفاده ترکیبی اسانس زیره سبز و زیره پارسی علیه اغلب پاتوژنها خاصیت آنتی باکتریال بیشتری نسبت به کاربرد انفرادی هر اسانس به تنهایی دارد. بررسی FIC نشان داد که در باکتریهای گرم مثبت *S. aureus*، *B. cereus* و *L. monocytogenes* بین این دو اسانس خاصیت سینرژیستی (FIC<0.9) و در باکتریهای گرم منفی *E. coli* O157H7 و *S. enteritidis* اثر افزایشی (0.9>FIC_I<1.1) وجود دارد. در این آزمایش حالت آنتاگونیستی (FIC_I>1.1) بین اسانس‌ها مشاهده نشد. این یافته‌ها همچنین نشان می‌دهند که ترکیب نمودن اسانس زیره سبز و زیره پارسی مؤثرتر از حالتی است که هر اسانس به تنهایی بکار رود.

جدول ۲- فعالیت ضد باکتریایی (MIC و MBC بر حسب mg/ml) اسانس زیره پارسی، زیره سبز و زنیان به روش میکرودایلوشن

پاتوژن	واکنش گرم	نژاد ATCC	زیره پارسی		زیره سبز		زنیان		کلرامفنیکل	اسیدآسکوربیک
			MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MIC
S. aureus	+	۲۵۹۲۳	۰/۷۵^{b}	۰/۷۵	۰/۷۵^{b}	۱/۵	۰/۰۶^{d}	۰/۰۶	۰/۰۹^{c}	۱^{a}
B. cereus	+	۱۱۷۷۸	۰/۱۸^{C}	۰/۱۸	۰/۳۷^{b}	۰/۳۷	۰/۰۳^{d}	۰/۰۳	۰/۰۲^{d}	۱^{a}
L. monocytogenes	+	۱۹۱۱۲	۰/۷۵^{C}	۰/۷۵	۱/۵^{a}	۱/۵	۰/۲۵^{d}	۰/۲۵	۰/۱۲^{e}	۱^{b}
***E. coli* O157:H7**	-	۷۰۰۷۲۸	۱/۵^{b}	۱/۵	۳^{a}	۳	۰/۲۵^{c}	۰/۵۰	۰/۱۸^{d}	۳^{a}
S. enteritidis	-	۱۹۲٤*	۳^{a}	۳	۳^{a}	۳	۰/۵۰^{b}	۱	۰/۱۸^{c}	۳^{a}

*RITCC: Razi Institute Type Culture Collection, Tehran, Iran

در هر ردیف میانگین‌های MIC که دارای حروف متفاوت هستند از نظر آماری با آزمون دانکن در سطح ۵ درصد دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند.

جدول ۳- برهم‌کنش اسانس زیره سبز و زیره پارسی

پاتوژن	واکنش گرم	نژاد	MIC ترکیبی (mg/ml)		FIC_{Bp} زیره پارسی	FIC_{Cc} زیره سبز	FIC_I*
			Bp	Cc			
S. aureus	+	ATCC 25923	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۳۳	۰/۳۳	* ۱ >۰/٦٦
B. cereus	+	ATCC 11778	۰/۱۰	۰/۰۷	۰/۵۵	۰/۱۸	* ۱>۰/۷۳
L. monocytogenes	+	ATCC 19112	۰/۳۷	۰/۳۷	۰/٤۹	۰/۲۵	* ۱>۰/۷٤
***E. coli* O157:H7**	-	ATCC 700728	۰/۷۵	۱/۵۰	۰/۵۰	۰/۵۰	۱
S. enteritidis	-	RITCC 1624 *	۱/۵۰	۱/۵۰	۰/۵۰	۰/۵۰	۱

Bp: *Bunium persicum*، Cc: *Cuminum cyminum*، FIC_I: FIC Index

*FIC کمتر از ۰/۹ نشان‌دهنده اثر سینرژیستی، FIC مابین ۱/۱ تا ۰/۹ نشان‌دهنده اثر افزایشی و FIC بیشتر از ۱/۱ نشان‌دهنده اثر آنتاگونیستی می‌باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

Srivastava و همکاران (۱۹۹۹) یازده ترکیب را در اسانس زنیان تشخیص دادند که کارواکرول (٤٥/۲٪) و پارا-سیمن (٤۱/۹٪) از ترکیب‌های مهم این گیاه بودند. Khajeh و همکاران (۲۰۰٤) نشان دادند که اسانس استخراج شده از این گیاه به روش تقطیر با آب حاوی ۸ ترکیب اصلی ازجمله تیمول (٤۹٪)، پارا-سیمن (۱٥/۷٪)، گاما-ترپینن (۳۰/۸٪) و بتا-پینن (۲/۱٪) بود، ولی اسانس استخراج شده این گیاه با دی‌اکسیدکربن به صورت حلال فوق بحرانی فقط حاوی ۳ ترکیب اصلی (تیمول، پارا-سیمن و گاما-ترپینن) بود و میزان هر ترکیب بستگی به شرایط استخراج با حلال فوق بحرانی داشت. Moghadamzadeh و همکاران (۲۰۰۷) نشان داد که زنیان دارای دو کموتایپ تیمول و کارواکرول است. بنابراین اسانس زنیان استفاده شده در آزمایشهای ضد میکروبی متعلق به کموتایپ تیمول بود (جدول ۱).

برخی منابع میزان و اجزای اسانس زیره پارسی را گزارش نموده‌اند. Tepe و همکاران (۲۰۰٤) میزان مشابهی از گاما-ترپینن (۲٥/٦ تا ٤۲/۹٪) و به‌طور معنی‌داری میزان زیادتری پارا-سیمن (۲٤ تا ۲۷/۸٪) و میزان کمتری آلدئید را در نمونه‌های طبیعی نسبت به نتایج این تحقیق گزارش نمودند. آنها در نمونه‌های کشت شده میزان بیشتری کومین‌آلدئید (۲۷/۳ تا ۳٤/۱٪) را گزارش نمودند. Sadykov و همکاران (۱۹۷۸) میزان اسانس زیره پارسی را ۲/٥٪ و پارا-سیمن (۱۹/۲٪) و کومین‌آلدئید (٤۰/۷٪) را به‌عنوان ترکیب‌های اصلی و آلفا-پینن، بتا-پینن، لیمونن، کامفور، اسید استیک، اسید پروپیونیک، اسید بوتیریک، اسید اولئیک و اسید بنزوئیک را به‌عنوان ترکیب‌های جزئی گزارش نمودند. براساس گزارش آنها ترکیب‌های اصلی پارا-سیمن (۸ تا ۹/٤٪) و کومین‌آلدئید (۱۱/۸ تا ۱٦/۹٪) به‌طور معنی‌داری بیشتر از نتایج تحقیق حاضر بودند. میزان اسانس زیره پارسی با منشأ پاکستان بین ۵/۳ تا ۷/۱٪ گزارش شده است (Karim *et al*., 1977). براساس گزارش آنها گاما-ترپینن (۱۷/۸ تا ۲۸/۹٪)، کومین‌آلدئید (۱٤/۸ تا ۲۲/٥٪) و پارا-سیمن (۱۲/٤ تا ۳۲/۸٪) ترکیب‌های اصلی نمونه‌های مورد بررسی بودند. در بین نمونه‌ها یک کموتایپ فاقد آلدئید ولی دارای ترکیب‌های پارا-سیمن (٤۱/۱٪)، گاما-ترپینن (۲٤٪)، لینالول (۱٦٪) و لیمونن (۳/٦٪) به‌عنوان اجزای اصلی بود. در تحقیقی دیگر اختلافات موجود در اجزای اسانس به کموتایپ‌های این گیاه نسبت داده شد (Azizi *et al*., 2009).

بررسی منابع نشان داد که گزارشهایی در مورد اجزای اسانس زیره سبز وجود دارد. Atta-ur-Rahman و همکاران (۱۹۹۹) تعداد ۲۰ ترکیب که نزدیک به ۹٥/۸٪ اسانس این گیاه را تشکیل می‌داد گزارش نمودند و کومین‌آلدئید (۳۷/٤٪)، پارا-سیمن (۱٦/٥٪)، بتا-پینن (۹/۸٪) و گاما-ترپینن(۸/۱٪) را به‌عنوان ترکیب‌های اصلی تشخیص دادند. ترکیب‌های اصلی زیره سبز چینی شامل کومین‌آلدئید، کومین‌الکل، گاما-ترپینن، پارا-سیمن و بتا-پینن گزارش شد که قبلاً در زیره سبز از ترکیه (Beis *et al*., 2000)، پاکستان (Karim *et al*., 1977)، هند (Kumar & Baslas, 1978)، آرژانتین (Bandoni *et al*., 1991)، مصر (El-Wakeil *et al*., 1986) و ایران (Eikani *et al*., 1999) گزارش شده بود.

براساس تحقیقات انجام شده باکتریهای گرم مثبت نسبت به اسانس‌ها حساستر از باکتریهای گرم منفی هستند. به دلیل وجود غشاءهای خارجی احاطه‌کننده دیواره سلولی در باکتریهای گرم منفی منطقی به نظر

Archive of SID

www.SID.ir

می‌رسد که این باکتریها در برابر اثر ضد باکتریایی اسانس‌ها حساسیت کمتری از خود نشان دهند. این غشاء خارجی انتشار مواد هیدروفوب از میان این لایه پوشاننده لیپوپلی‌ساکاریدی را محدود می‌کند. در باکتریهای گرم مثبت تماس مستقیم ترکیب‌های هیدروفوب اسانس‌ها با این فسفولیپید دو لایه‌ای صورت می‌گیرد. این محل جاییست که این ترکیب‌ها اثر خود را بر جای می‌گذارند. این اثر یا به صورت افزایش نفوذپذیری یونها و یا نشت ترکیب‌های حیاتی سلولی رخ می‌دهد و یا اینکه به‌صورت ناتوانی سیستم آنزیمی باکتریایی بروز می‌کند (Sandri *et al*., 2007). برخی از محققان ارتباط بین ساختارهای شیمیایی برخی از اجزاء غالب موجود در اسانس‌ها را با فعالیت ضد باکتریایی آنها گزارش نموده‌اند. اسانس‌ها دارای ترکیب‌های فنولی مانند تیمول، کارواکرول، گاما-ترپینن و پارا-سیمن هستند که خاصیت ضد باکتریایی شدید آنها گزارش شده است (Burt, 2004) که در این تحقیق نیز این موضوع اثبات گردید. فعالیت ضد باکتریایی شدید اسانس زنیان نسبت به بقیه گیاهان مورد آزمایش به دلیل زیاد بودن میزان تیمول و گاما-ترپینن آن است (جدول ۱). خاصیت ضد باکتریایی اسانس این گیاه قبلاً نیز گزارش شده است (Friedman *et al*., 2002).

اگرچه بروز فعالیت ضد باکتریایی اغلب بسیار واضح است، ولی مکانیزم عمل آن به‌طور کامل درک نشده است. شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد اسانس‌ها اثر ضد باکتریایی خود را از طریق تغییر ساختار و عمل غشاء سلولی اعمال می‌کنند. بررسیهای صورت گرفته در خصوص مکانیزم عمل اسانس‌ها اثبات نموده که این ترکیب‌ها نفوذپذیری غشاء را افزایش می‌دهند. اجزاء اسانس با نفوذ در غشاء منجر به متورم شدن غشاء گردیده و فعالیت آن را تحت تأثیر قرار می‌دهد (کاهش می‌دهد) و در نهایت منجر به مرگ سلول خواهد شد (Holly & Patel, 2005). اجزاء اسانس نیز اثر ضد باکتریایی متفاوتی دارند، Ulte و همکاران (۲۰۰۲) اظهار نمودند که گروه هیدروکسیل موجود در ملکول اجزاء اسانس مانند کارواکرول، تیمول، پارا-سیمن و منتول برای بروز خاصیت ضد باکتریایی آنها بسیار مهم است.

این تحقیق اثبات نمود که سه گونه مورد بررسی دارای فعالیت ضد باکتریایی قابل‌توجه بوده و قابلیت استفاده در صنایع غذایی را دارند. این مشاهده‌ها همچنین روشن نمود که اسانس زنیان در بین سه گونه مورد آزمایش قویترین خاصیت ضد باکتریایی را علیه باکتریهای مورد آزمایش دارد. بسیاری از داروهای گیاهی اثر سودمند خود را به صورت سینرژیستی یا افزایشی بر یک یا چند محل هدف نشان می‌دهند. این نتایج همچنین مبنای علمی اثر ضد باکتریایی گیاهان مورد استفاده در طب سنتی به خصوص استفاده همزمان دو یا چند گیاه را نشان داد. براساس این نتایج می‌توان ترکیب نمودن اسانس زیره پارسی و زیره سبز به صورت همزمان که علیه باکتریهای گرم مثبت خاصیت سینرژیستی دارند را توصیه نمود. اخیراً برای غلبه بر موانع و محدودیتهای استفاده از اسانس‌ها به‌عنوان مواد ضد میکروبی در صنایع غذایی مانند فرآیند اکسیداسیون، تبخیر شدن، مشکلات انحلال، واکنش دادن با مواد دیگر و تغییر رایحه و خواص ارگانولپتیکی مواد غذایی تکنیک انکپسولیشن اسانس‌ها مورد بررسی قرار گرفته است. بنابراین در تحقیقات آینده بررسی این موضوع پیشنهاد می‌گردد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از جناب آقای دکتر حسن‌زاده خیاط، استاد شیمی دارویی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی

Archive of SID
www.SID.ir

مشهد، به دلیل مساعدت در آنالیز اسانس تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع مورد استفاده

- زرگری، ع.، ۱۳٦۸. گیاهان دارویی. جلد چهارم، انتشارات دانشگاه تهران، ۱۳۰ صفحه.
- کرمانشاهی، ر.، معطر، ف. و سلیمانی منش، ع.، ۱۳۸۵. ارزیابی اثرهای ضد باکتریایی عصاره‌های آبی و الکلی گیاه گلرنگ بر روی تعدادی از باکتریها. مجله علوم دانشگاه شهید چمران، ۱۵: ۲۵-۱۸.
- مقتدر، م.، ایرج منصوری، ع.، سالاری، ح. و فرهمند، آ.، ۱۳۸۸. شناسایی ترکیبات شیمیایی و بررسی اثرهای ضد میکروبی اسانس بذر زیره سیاه. تحقیقات گیاهان دارویی و معطر، ۲۵(۱): ۲۸-۲۰.
- Adams, R.P., 2001. Identification of essential oil components by Gas Chromatography and Mass Spectrometry. Allured, USA, 750p.
- Atal, C.K. and Kapur, B.M., 1982. Cultivation and Utilization of Aromatic Plants.Regional Research Laboratory, Jammu-Tawi, 815p.
- Atta-ur-Rahman, M.I., Choudhary, I., Farooq, A., Ahmed, A., Iqbal, M.Z., Demirci, B. Demirci, F. and Baser, K.H.C., 1999. Antifungal activity and essential oils constituents of some spices from Pakistan. Third International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry, www/reprint.net/ecsco-3.htm.
- Azizi, M., 2005. *Bunium persicum* essential oils suppressed potato sprouting in storage. Proceedings of the 36th International Symposium on Essential oils, Budapest, Hungary, 4-7 September: 142.
- Azizi, M., Davarenejad, Gh., Bos, R., Woerdenbag, H.J. and Kayser, O., 2009. Essential oil content and constituents of Black Zira (*Bunium persicum* [Boiss.] B. Fedtsch.) from Iran during field cultivation (domestication). Journal of Essential Oil Research, 21: 78-82.
- Bandoni, A., Juarez, M.A. and Mizrahi, I., 1991. Studies on the essential oil of cumin (*Cuminum cyminum* L.). Essenze e Derivati Agrumari, 61: 32-49.
- Baser, K.H.C., Özek, T., Abduganiev, B.E., Abdullaev, U.A. and Aripov, K.N., 1997. Composition of the essential oil of *Bunium persicum* (Boiss.) B. Fedtsch. from Tajikistan. Journal of Essential Oil Research, 9: 597-598.
- Beis, SH., Azcan, N., Ozek, T., Kara, M. and Baser, K.H.C., 2000. Production of essential oil from cumin seeds. Chemistry of Natural Compounds, 36: 265-268.
- Boskabady, M.H., Ramazani, M. and Tabei, T., 2003. Relaxant effects of different fractions of essential oil from *Carum copticum* on guinea pig tracheal chains. Phytotherapy Research, 17: 1145-1149.
- Boskabady, M.H. and Shaikhi, J., 2000. Inhibitory effect of *Carum copticum* on histamine (H1) receptors of isolated guinea-pig tracheal chains. Journal of Ethnopharmacology, 69: 217-227.
- British pharmacopoeia., 1988. Vol. 2, London: HMSO, pp. 137-138.
- Burt, S., 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods- a review. International Journal of Food Microbiology, 94: 223-253.
- Celiktas, O.Y., Hames Kocabas, E.E., Bedir, E., Vardar Sukan, F., Ozek, T. and Baser, K.H.C., 2007. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. Food Chemistry, 100: 553-559.
- Daferera, D.J., Ziogas, B.N. and Polissiou, M.G., 2000. GC/MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. Journal of Agricultural Food Chemistry, 48: 2576-2581.
- Demirci, F., Guven, K., Demirci, B., Dadandi, M.Y. and Baser, K.H.C., 2008. Antibacterial activity of two *Phlomis* essential oils against food pathogens. Food Control, 19: 1159-1164.
- D'Mello, J.P.F., 2003. Food Safety: Contaminants and Toxins. Oxford, Cabi publisher, 476p.
- Eikani, M.H., Goodarznia, I. and Mirza, M., 1999. Supercritical carbon dioxide extraction of cumin seeds (*Cuminum cyminum* L.). Flavour and Fragrance Journal, 14: 29-31.
- El-Wakeil, F., Morsi, M. and Khairy, S., 1986. Effects of various storage conditions on the quality of some spice essential oils. Seifen Oele Fette Waches; 112: 350-353.
- Friedman, M., Henika, P.R. and Mandrell, R.E., 2002. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenese* and *Salmonella enterica*. Journal of Food Protection, 65(10): 1545-1560.
- Gachkar, L., Yadegari, D., Rezaei, M.B., Taghizadeh, M., Alipoor Astaneh, Sh. and Rasooli, I., 2007. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. Food Chemistry, 102: 898-904.
- Gonzalez, J.A., Estevez-Braun, A., Estevez-Reyes, R., Bazzocchi, I.L., Moujir, L., Jimenez, I. A., Ravelo,

Archive of SID

www.SID.ir

- Pourmortazavi, S.M., Ghandiri, M. and Hajimirsadeghi, S.S., 2005. Supercritical fluid extraction of volatile components from *Bunium persicum* Boiss. (Black cumin) and Mespilus germanica L. (medlar) seeds. Journal of Food Componds Analytica, 18: 439-446
- Qadry, S.M.J.S. and Atal, C.K., 1976. Pharamacognosy of the fruits of *Trachyspermum ammi*. Planta Medica, 15: 53-57.
- Rani, P. and Khullar, N., 2004. Antimicrobial evaluation of some medicinal plants for their anti-enteric potential against Multi-drug resistant *Salmonella typhi*. Phytotheraphy Research, 18: 670-673.
- Rechinger, K.H., 1965-2001. Flora Iranica, Akademische Druch-u, Verlagsanstat, Graz-Austria.
- Sadykov, Y.D., Kurbanov, M., Khavizov, K. and Regovatov, Y.M., 1978. Composition of the essential oil from fruits of *Bunium persicum* (Boiss.) B. Fedtsh. Doklady Akademii Nauk Tadzhikskoj SSR., 21(5): 33-36.
- Sandri, I.G., Zacaria, J., Fracaro, F., Delamare, A.P.L. and Echeverrigaray, S., 2007. Antimicrobial activity of the essential oils of Brazilian species of the genus *Culina* against foodborne pathogens and spoiling bacteria. Food Chemistry, 103: 823-828.
- Santiesteban-López, A., Palou, E. and López-Malo, A., 2007. Susceptibility of food-borne bacteria to binary combinations of antimicrobials at selected aw and pH. Journal of Applied Microbiology, 102: 486-497.
- Singh, G., Kapoor, I.P.S., Pandey, S.K., Singh, U.K. and Singh, R.K., 2002. Studies on essential oils: Part 10; Antibacterial activity of volatile oils from some species. Phytotherapy Research, 16: 680-682.
- Srivastava, M., Saxena, A. and Baby, P., 1999. GC/MS investigation and antimicrobial activity of the essential oil of *Carum copticum* Benth & Hook. Acta Alimentaria, 28: 291-295.
- Tepe, B., Donmez, E., Unlu, M., Candan, F., Daferera, D. and Vardar-Unlu, G., 2004. Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha* (montbret et aucher ex benth.) and *Salvia multicaulis* (vahl). Food Chemistry, 84: 519-525.
- Ulte, A., Bennik, M.H.J. and Moezelaar, R., 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food pathogen *Bacillus cereus*. Applied and Environmental Microbiology, 68: 1561-1568.
- Ye, Y.N., Liu, E.S.L., Li, Y., So, H.L., Cho, C.C.M., Sheng, H.P., Lee, S.S. and Cho, C.H., 2001. Protective effect of polysaccharides-enriched fraction from *Angelica sinensis* on hepatic injury. Life Science, 69: 637-646.

A.G. and Gonzalez, A.G., 1995. Biological activity of secondary metabolites from *Bupleurum salicifolium* (Umbelliferae). Experientia, 51: 35-39.
- Holly, R.A. and Patal, D., 2005. Improvement in shelf life and safetey of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials, Food Chemistry, 22: 273-292.
- Iacobellis, N.S., Cantore, P.L. Capasso, F. and Senatore, F., 2005. Antibacterial activity of *Cuminum cyminum* and *Carun carvi* essential oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53: 57-61.
- Kalemba, D. and Kunicka, A., 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Current Medicinal Chemistry, 10: 813-829.
- Karim, A., Pervez, M. and Bhatty, M.K., 1997. Studies on the essential oils of the Pakistani species of the familie Umbelliferae, part 10. *Bunium persicum* Boiss. (Sah Zira) seed oil. Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research, 20(2): 106-108.
- Khajeh, M., Yamini, Y., Sefidkon, F. and Bahramifar, N., 2004. Comparison of essential oil composition of *Carum copticum* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods. Food Chemistry, 86: 587-591.
- Kordali, S., Kotan, R., Mavi, A., Cakir, A., Ala, A. and Yildirim, A., 2005. Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculus* and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *A. dracunculus*, *Artemisia santonicum* and *Artemisia spicigera* essential oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53: 9452-9458.
- Kotzé, M. and Eloff, J.N., 2002. Extraction of antibacterial compound from *Combretum microphyllum* (Combretaceae). South African Journal of Botany, 68: 62-67.
- Kumar, P. and Baslas, R.K., 1978. Chemical examination of essential oil of the seeds of *Cuminum cyminum*. Indian Perfumer, 22: 164-165.
- Moghadamzadeh, A., Faridi, P. and Ghasemi, Y., 2007. *Carum copticum* Benth & Hook. essential oil chemotypes. Food Chemistry, 100: 1217-1219.
- Pae, H.O., Oh, H., Yun, Y.G., Oh, G.S., Jang, S.I., Hwang, K.M., Kwon, T.O., Lee, H.S. and Chung, H.T., 2002. Imperatorin, a furanocoumarin from *Angelica dahurica* (Umbelliferae), induces cytochrome c-dependent apoptosis in human promyelocytic leukaemia, HL-60 cells. Pharmacololgy Toxicology. 91: 40-48.
- Pillai, S.K., Moellering, C. and Elipoulos, G.M., 2005. Antimicrobial combinations. 365-373, In: V. Lorian, (ed.), Antibiotic in laboratory medicine, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 922p.

Archive of SID

www.SID.ir

Synergistic antibacterial activity of the essential oils from three medicinal plants against some important food-borne pathogens by microdilution method

F. Oroojalian[1], R. Kasra-Kermanshahi[2*], M. Azizi[3] and M.R. Bassami[4]

1- MSc Student, Microbiology Division, Biology Department, Faculty of Science, Isfahan University, Isfahan, Iran
2*- Corresponding author, Microbiology Division, Biology Department, Faculty of Science, Alzahra University, Tehran, Iran, E-mail: rkasra@yahoo.com
3- Department of Horticulture, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran
4- Biotechnology Division, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Iran

Received: June 2009 Revised: September 2009 Accepted: October 2009

Abstract

Essential oils of three medicinal plants species, including *Carum copticum* (L.) C. B. Clarke, *Bunium persicum* (Boiss.) B. Fedtsch. and *Cuminum cyminum* L., were obtained by hydrodistillation and their constituents were analyzed by GC and GC/MS using retention indices and fragmentation patterns. The antibacterial effects (MIC and MBC) of the essential oils were assessed on several food-borne pathogens, namely *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* by microdilution technique using ELISA reader. Because of the combinatory usage of *Bunium persicum* and *Cuminum cyminum* in folk medicine, the affect of essential oil on food organoleptic properties and MIC values of the plants, interaction of *Bunium persicum* and *Cuminum cyminum* essential oils were also studied by FIC_{index} determination using modified dilution checkboard method. The results showed that there are noticeable differences between the essential oils as their constituents as concerned, while ρ-cymen and γ-terpinene detected in all essential oils in different percentage. The main components of essential oils of *C. copticum* were thymol (48.4%), ρ-cymene (21.8%) and γ-terpinene (21.3%). The major constituents of *B. persicum* were γ-terpinene (44.2%), cuminaldehyde (16.9%), γ-terpinen-7-al (10.5%), and ρ-cymen (8%) while those of *C. cyminum* were cuminaldehyde (30.2%), ρ-cymene (14.1%), γ-terpinene (12.8%), and safranal (9.4%). The ranges of minimum inhibitory concentration of the oils were 0.03-0.5, 0.18-3.0, and 0.37-3.0 mg/ml, respectively, for *C. copticum*, *B. persicum* and *C. cyminum*. Moreover, the combination of *B. persicum* and *C. cyminum* essential oils confirmed synergistic and additive activities against the pathogens. In conclusion, although the MIC of *Bunium persicum* and *Cuminum cyminum* essential oils were lower than *C. copticum*, but combinatory usage of these essential oils especially against gram-positive bacteria produced promissing results. So application of these essential oils is recommended in combination as an efficients and complementary method for control of food borne pathogens with lower side effects on organolpetic properties of food.

Key words: *Carum copticum* (L.) C. B. Clarke, *Bunium persicum* (Boiss.) B. Fedtsch., *Cuminum cyminum* L., antibacterial activity, microdilution technique, food-borne pathogens.

Archive of SID

www.SID.ir