

مطالعه اثر ضد میکروبی عصاره کاکوتی کوهی (*Ziziphora clinopodioides*) بر باکتری‌های مولد فساد و بیماری‌زای مواد غذایی

معصومه مهربان سنگ آتش^{۱*}، رضا کاراژیان^۲ و شهرام بیرقی طوسی^۱

۱- کارشناسی ارشد، مربی پژوهشی، گروه پژوهشی صنایع غذایی، جهاددانشگاهی واحد مشهد

۲- کارشناسی ارشد، کارشناس آزمایشگاه صنایع غذایی، جهاددانشگاهی واحد مشهد

چکیده

در این پژوهش خواص ضد میکروبی عصاره کاکوتی کوهی (*Ziziphora clinopodioides*) بر باکتری‌های مولد فساد و بیماری‌زای مواد غذایی به روش رقت لوله‌ای مورد آزمایش قرار گرفت. عصاره کاکوتی کوهی بر باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت مورد آزمایش شامل *انتروباکتر آئروژنز*، *اشرشیاکلی*، *کلبسیلا نومونیا*، *سالمونلا انترتیدیس*، *شیگلا دیزنتری*، *باسیلوس سرئوس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا مونوسیتوژنز* دارای اثر مهارکنندگی و میکروبکشی بود ولی بر *سودوموناس آئروژینوزا* اثری نداشت. حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و میکروب کشی (MBC) عصاره کاکوتی کوهی برای باکتری‌های گرم منفی ۲۰۰۰-۱۰۰۰ $\mu\text{g/l}$ و برای باکتری‌های گرم مثبت ۴۰۰۰-۱۰۰۰ $\mu\text{g/l}$ بود. نتایج نشان داد عصاره کاکوتی کوهی می‌تواند از رشد باکتری‌های مولد فساد و بیماری‌زای مواد غذایی جلوگیری نماید. بنابراین می‌توان استفاده از آن را به عنوان یک ترکیب نگهدارنده و طعم دهنده طبیعی در فرآورده‌های غذایی پیشنهاد نمود.

کلید واژگان: عصاره کاکوتی کوهی، ضد میکروبی، باکتری‌های مولد فساد و بیماری‌زای مواد غذایی

۱- مقدمه

آسیا و آسیای مرکزی تا کوه‌های پامیر آلابی و هیمالیا (ایران، عراق و بخش‌های مرکزی و شرقی ترکیه) و آفریقا می‌باشد [۴،۳]. گیاهان تیره نعناع از زمان‌های گذشته در طب سنتی مورد استفاده بوده‌اند و معمولاً "در درمان عفونت‌های دستگاه گوارش یا دل درد استفاده می‌شده‌اند. امروزه از گیاهان تیره نعناع بصورت ادویه و چاشنی در رستوران‌ها و منازل همراه با غذا استفاده می‌شود [۵]. در بسیاری از

گیاه کاکوتی کوهی با نام علمی *Ziziphora L clinopodioides* متعلق به جنس *زیزیفورا* و تیره *نعناعیان*^۱ می‌باشد [۱]. در ایران ۴۹ جنس از تیره نعناع با چند صد گونه به طور پراکنده وجود دارد. از جنس‌های مهم این تیره می‌توان کاکوتی، نعناع^۲، آویشن^۳، مریم گلی^۴، اسطوخودوس^۵ و مرزنجوش را نام برد [۲]. پراکنش جغرافیایی گیاه کاکوتی کوهی در جهان در شبه جزیره بالکان شرقی، جنوب غربی

* مسئول مکاتبات: mehrcan@acecr.ac.ir

1. Labiatae or Lamiaceae
2. Mentha
3. Thymus
4. Salvia
5. Lavandula
6. Origanum

سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران (شرشیاکلی^۵، استفیلوکوکوس اورئوس^۶، انتروباکتر آئروژنز^۷، شینگلا دیزنتری^۸، سودوموناس آئروژینوزا^۹، لیستریا مونوسیترژنز^{۱۰}، سلول رویشی باسیلوس سرئوس^{۱۱} و کلبسیلا نومونیا^{۱۲}) و مؤسسه سرم‌سازی رازی (سالمونلا انتریتیدیسیس) خریداری گردید.

۲-۲- روش‌ها

- فعال سازی سویه‌های میکروبی: آمپول‌های لیوفیلیزه حاوی سویه‌های استاندارد میکروارگانیسم‌های مورد نیاز طبق دستورالعمل شرکت سازنده در شرایط کاملا استریل باز شد. کشت مادر^{۱۳} روی محیط کشت تریپتون سوی براث و آگار آماده شد. از کشت مادر، کشت ذخیره^{۱۴} تهیه شد و در مراحل بعدی استفاده گردید.

- تهیه سوسپانسیون میکروبی ۰/۵ مک فارلند: از کشت ذخیره به محیط کشت شیبدار آگار مغذی تلقیح گردید و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه‌گذاری شد. سپس کلنی‌های سطح محیط کشت با محلول نرمال سالین^{۱۵} شسته شد و سوسپانسیون میکروبی با محلول نرمال سالین رقیق گردید تا میزان جذب سوسپانسیون در طول موج ۵۳۰ نانومتر با میزان جذب محلول ۰/۵ مک فارلند برابر گردد. به عبارت دیگر سوسپانسیون تولیدی حاوی $10^8 \times 1/5$ cfu/ml باشد (۱۸،۱۷).

- بررسی اثر ضد میکروبی عصاره گیاه کاکوتی کوهی در شرایط *in vitro*: به منظور بررسی اثر ضد میکروبی عصاره کاکوتی کوهی و تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی و میکروب کشی آن از روش رقت لوله‌ای و محیط کشت مولر هینتون مایع^{۱۶} استفاده شد [۱۸].

مناطق ایران از گیاه کاکوتی کوهی به عنوان چاشنی به همراه ماست و سایر فرآورده‌های لبنی استفاده می‌شود [۶] و همچنین در معالجه امراض معده [۷] و به‌عنوان ضد عفونی‌کننده برای رفع سرماخوردگی بکار می‌رود [۸]. اجزاء کاکوتی کوهی فعالیت آنتی‌توموری دارد و رشد نوعی از تومورهای بدخیم^۱ را تا ۳۲/۶ درصد و غدد سرطانی^۲ را تا ۴۷/۵ درصد کاهش می‌دهد [۹]. محققین اثر آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی اسانس و عصاره گونه‌های مختلف کاکوتی را مورد مطالعه قرار داده‌اند و پولگون به عنوان ماده مؤثره اسانس آن‌ها گزارش شده است [۱۰،۱۱،۱۲،۱۳،۱۴،۱۵،۱۶]. در ایران با وجود استفاده زیاد از گیاهان خانواده نعناع به عنوان طعم دهنده تاکنون تحقیقات گسترده‌ای پیرامون اثر ضد میکروبی عصاره کاکوتی کوهی در مقابل باکتری‌های مولد فساد و بیماری‌زای مواد غذایی انجام نشده است. این پژوهش با هدف بررسی اثر ضد میکروبی عصاره گیاه کاکوتی کوهی در محیط کشت و تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و میکروب کشی (MBC)^۳ آن به منظور استفاده در مواد غذایی جهت کنترل رشد باکتری‌های مولد فساد و بیماری‌زا انجام شده است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

- عصاره کاکوتی کوهی: عصاره این گیاه به سفارش گروه پژوهشی صنایع غذایی در آزمایشگاه تحقیقاتی شرکت گل قطره توس تهیه گردید و تا موقع مصرف در ظروف شیشه‌ای تیره در دمای $4^{\circ}C$ نگهداری شد.

- سویه‌های میکروبی: در این مطالعه سویه‌های میکروبی مورد نظر بصورت آمپول‌های لیوفیلیزه از کلکسیون باکتری‌ها و قارچ‌ها،

5. Escherichia coli PTCC 1399
6. Staphylococcus aureus PTCC1431
7. Enterobacter aerogenes PTCC 1221
8. Shigella dysenteriae PTCC 1188
9. Pseudomonas aeruginosa PTCC 1430
10. Listeria monocytogenes PTCC 1294
11. Bacillus cereus PTCC 1247 (vegetative cell)
12. Klebsiella pneumoniae PTCC 1053
13. Master Culture
14. Sub-Master Culture
15. Normal saline
16. Muller Hinton Broth

1. Sarcoma
2. Carcinoma

۳- حداقل غلظت بازدارندگی از رشد میکروارگانیسم زنده یا کمترین غلظتی که در آن کاهش یا بقا یکسان در میزان زنده‌مانی تلقیح در مقایسه با میزان تلقیح اولیه مشاهده گردد (۲۱).

۴- حداقل غلظتی که هیچگونه رشدی بعد از کشت مجدد در محیط مایع دیده نشود یا غلظتی که ۹۹/۹٪ از حجم تلقیح اولیه کشته شوند (۲۱).

نتایج فوق با نتایج حاصل از مطالعات صالحی و همکاران (۲۰۰۵) روی اثر ضد میکروبی عصاره کاکوتی کوهی همخوانی دارد. مطالعات آنها نشان داد عصاره کاکوتی کوهی می‌تواند از رشد باکتری‌های گرم منفی *کلبسیلا نومونیا* و *اشرشیاکلی* ممانعت نماید. همچنین عدم فعالیت ضد میکروبی عصاره کاکوتی کوهی در مقابل *سودوموناس آنروژینوزا* در مطالعات آنها مشاهده شد [۱۶]. که با نتایج این پژوهش همسویی دارد. در بسیاری از مطالعات، *سودوموناس* و بویژه *سودوموناس آنروژینوزا* کمترین حساسیت را نسبت به ترکیبات ضد میکروبی گیاهان دارویی از خود نشان داده‌اند [۲۱]. بر خلاف نتایج این پژوهش، بهروان و همکاران (۲۰۰۲) نشان دادند عصاره کاکوتی کوهی بر *اشرشیاکلی* اثری ندارد [۲۳،۲۲]. نتایج این پژوهش نشان داد حساسترین باکتری گرم منفی در مقابل عصاره کاکوتی کوهی *شیگلا دیزنتری* می‌باشد.

حداقل غلظت مهارکنندگی و میکروب کشی عصاره کاکوتی کوهی برای باکتری‌های گرم مثبت مورد آزمایش نیز تعیین گردید. حداقل غلظت مهارکنندگی و میکروب کشی این عصاره برای *استافیلوکوکوس اورئوس* $2000 \mu\text{g/l}$ و برای *لیستریا مونوسیژنوزا* $1000 \mu\text{g/l}$ بدست آمد. حداقل غلظت مهارکنندگی و میکروب کشی عصاره کاکوتی کوهی برای *باسیلوس سرئوس* به ترتیب 2000 و $6000 \mu\text{g/l}$ بود. در مطالعات مهربیان و همکاران (۱۳۷۵) نیز اثر مهارکنندگی عصاره کاکوتی بر باکتری‌های گرم مثبت *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* مشاهده شد [۵]. نتایج حاصل از تحقیقات صالحی و همکاران (۲۰۰۵) نیز نشان داد عصاره کاکوتی کوهی می‌تواند رشد *باسیلوس سابلتیس* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* را مهار نماید [۱۶]. نتایج این مطالعه نشان داد از میان باکتری‌های گرم مثبت مورد آزمایش، *لیستریا مونوسیژنوزا* بیشترین و سلول رویشی *باسیلوس سرئوس* کمترین حساسیت را نسبت به عصاره کاکوتی دارد.

مطالعات اوزتورک و ارکیسلی (۲۰۰۶، ۲۰۰۷) نیز نشان داد عصاره کاکوتی کوهی (*Ziziphora clinopodioides*) و کاکوتی پرسیکا (*Ziziphora persica*) قادرند از رشد طیف وسیعی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی بیماری‌زا ممانعت نمایند [۱۲،۱۱].

محیط کشت مولر هیتون مایع با غلظت‌های ۰، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ میکروگرم بر لیتر از عصاره در لوله‌های دربیچ دار در سه تکرار آماده شد [۱۹،۱۸]. برای رسیدن غلظت نهایی میکروارگانیسم‌ها به $5 \times 10^8 \text{ cfu/ml}$ ، به هر لوله، از سوسپانسیون میکروبی ۰/۵ مک‌فارلند اضافه شد [۱۸]. لوله‌ها در دمای $37-35^\circ\text{C}$ به مدت ۲۴-۱۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. پایین‌ترین غلظتی که هیچ‌گونه کدورتی در آن مشاهده نشد به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) تعیین گردید. برای مشخص نمودن حداقل غلظت میکروب کشی (MBC) از رقت‌هایی که کدورتی در آنها مشاهده نشد در محیط نوترینت آگار کشت سطحی داده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای 37°C گرمخانه‌گذاری شد. غلظتی که شمارش تعداد کلونی‌ها در آن صفر بود به عنوان حداقل غلظت میکرو بکشی برای هر باکتری تعیین گردید [۲۰].

۳- نتایج و بحث

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد عصاره کاکوتی کوهی بر همه باکتری‌های مورد آزمایش بجز *سودوموناس آنروژینوزا* دارای اثر مهارکنندگی و میکروب‌کشی بود (جدول شماره ۱).

مشاهدات نشان داد که حداقل غلظت میکروب کشی عصاره کاکوتی کوهی برای باکتری‌های گرم منفی *انتروباکتر آنروژنوزا*، *اشرشیاکلی*، *کلبسیلا نومونیا* و *سالمونلا انترتیدیس* $2000 \mu\text{g/l}$ و برای *شیگلا دیزنتری* $1000 \mu\text{g/l}$ است. حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره کاکوتی کوهی برای باکتری‌های گرم منفی برابر حداقل غلظت میکروب کشی آن بود بجز در مورد *اشرشیاکلی* که حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره برای آن $1000 \mu\text{g/l}$ بدست آمد. مهربیان و همکارانش (۱۳۷۵) در مطالعه‌ای که روی فعالیت ضد میکروبی عصاره کاکوتی انجام دادند به نتایجی مشابه دست یافتند. نتایج بررسی آنها نشان داد عصاره کاکوتی می‌تواند از رشد باکتری‌های گرم منفی *انتروباکتر آنروژنوزا*، *اشرشیاکلی*، *کلبسیلا* اکسی توکا^۱، *سالمونلا تیفی*^۲، *سالمونلا پاراتیفی*^۳ و *شیگلا دیزنتری* جلوگیری نماید [۵].

1. Klebsiella oxytoca
2. Salmonella typhi
3. Salmonella paratyphi

با توجه به تأکید سازمان بهداشت جهانی بر استفاده از مواد نگهدارنده طبیعی در مواد غذایی [۲۱] و نتایج حاصل از این پژوهش می‌توان استفاده از عصاره کاکوتی کوهی را به عنوان یک ترکیب نگهدارنده و طعم دهنده طبیعی در فرآورده‌های غذایی پیشنهاد نمود.

اکثر مطالعات نشان می‌دهد که حساسیت باکتری‌های گرم منفی در مقابل ترکیبات ضد میکروبی در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت کمتر است که ممکن است به خاطر وجود غشای خارجی در ساختمان دیواره سلولی‌شان باشد. اما در برخی مطالعات به حساسیت بیشتر باکتری‌های گرم مثبت در مقابل اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی دست یافته‌اند [۲۱].

جدول ۱. میانگین تعداد کلنی‌های باکتری‌های مولد فساد و بیماری‌زای مواد غذایی (cfu/ml) در غلظت‌های مختلف عصاره کاکوتی کوهی

گونه باکتری	غلظت عصاره (µg/l)						
	۰	۱۲۵	۲۵۰	۵۰۰	۱۰۰۰	۲۰۰۰	۴۰۰۰
Enterobacter aerogenes	$5/2 \times 10^9$	$8/9 \times 10^8$	$4/16 \times 10^8$	3×10^8	4×10^6	*	.
Escherichia coil	$1/22 \times 10^{10}$	5×10^8	$4/31 \times 10^8$	$1/39 \times 10^8$	$2/17 \times 10^8$.	.
Klebsiella pneumoniae	$9/5 \times 10^9$	$8/1 \times 10^8$	$3/82 \times 10^8$	$3/73 \times 10^8$	$7/9 \times 10^7$	*	.
Pseudomonas aeruginosa	1×10^{10}	7×10^8	$3/76 \times 10^8$	$3/58 \times 10^8$	3×10^8	$2/44 \times 10^8$	$1/77 \times 10^8$
Salmonella enteritidis	5×10^9	$3/5 \times 10^8$	$1/3 \times 10^8$	3×10^7	$3/5 \times 10^6$	*	.
Shigella dysenteriae	$7/9 \times 10^9$	$9/9 \times 10^7$	$5/1 \times 10^7$	3×10^7	*	.	.
Bacillus cereus (vegetative cell)	$1/1 \times 10^{10}$	9×10^8	$7/4 \times 10^8$	4×10^8	3×10^7	$2/13 \times 10^3$.
Listeria monocytogenes	$1/14 \times 10^9$	$3/6 \times 10^8$	$5/7 \times 10^7$	3×10^6	*	.	.
Staphylococcus aureus	$4/1 \times 10^9$	$7/7 \times 10^8$	$2/3 \times 10^8$	3×10^8	3×10^7	*	.

* حداقل غلظت مهارکنندگی با حداقل غلظت میکروب کشتی برابر می‌باشد.

۴- منابع

[۶] سجادی س، قاسمی دهکردی ن، بلوچی م. بررسی مواد متشکله اسانس اندامهای هوایی گیاه کاکوتی کوهی. نشریه پژوهش و سازندگی. شماره ۸؛ ۱۳۸۲، صفحات: ۹-۱.

[۷] عزیزی ک. اثر تنش خشکی و شوری بر برخی خصوصیات کمی آویشن شیرازی، کاکوتی، آویشن باغی و کلپوره. پایان نامه کارشناسی ارشد زراعت، دانشگاه فردوسی مشهد. ۱۳۸۳.

[۸] باباخانلو م، میرزا م، سفیدکن ف، احمدی ل، برازنده م، عسگری ف. بررسی ترکیب‌های تشکیل دهنده اسانس کاکوتی کوهی (*Z. clinopodioides* L.). نشریه تحقیقات گیاهان دارویی. شماره ۲؛ ۱۳۷۲، صفحات: ۱۱۴-۱۰۳.

[9] Chachoyan AA, Oganesyanyan GB. Antitumor activity of some spices of the

[۱] مظفریان و. فرهنگ نامهای گیاهان ایران. انتشارات فرهنگ معاصر، تهران ۱۳۷۵.

[۲] زرگری ع. گیاهان دارویی. جلد چهارم، چاپ ششم. انتشارات دانشگاه تهران، تهران ۱۳۷۶.

[۳] جم زاد ز. آویشن. مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع جهاد سازندگی، چاپ پیک ایران ۱۳۷۳.

[4] Baser KHC, Sezik E, Tumen G. Composition of The Essential Oil of *Ziziphora clinopodioides* Lam. Journal of Essential Oil Research 1991; 3(4): 237-239.

[۵] مهربان ص، ملاباشی ز، مجد، ا. بررسی اثر ضد میکروبی سه گونه از گیاهان تیره نعناع (کاکوتی، مریم گلی و نعناع)، بر ۱۵ سویه باکتری بیماری‌زای روده‌ای و عامل مسمومیت غذایی. نشریه علوم. جلد هشتم. شماره ۱؛ ۱۳۷۵، صفحات: ۱۱-۱.

ضدمیکروبی آنها. پایان نامه دکتر. دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مشهد. ۱۳۸۲.

- [18] Mahon CR, Manuselis G. Diagnostic Microbiology. W. B. Saunders. Company, London 1995; PP: 58-96.
- [19] Inouya 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; 47:565-573.
- [۲۰] رضایی م ب، رسولی ا. فعالیت بیولوژیکی و ترکیبات شیمیایی اسانس آویشن (Thymus x-prolock) و پونه (Mentha longifolia). دو ماهنامه علمی - پژوهشی دانشگاه شاهد. سال هشتم. شماره ۳۱، ۱۳۷۹، صفحات: ۸-۱.
- [21] Burt S. Essential oils : Their antibacterial properties and potentia applications in foods, a review. Internationa Journal of Food Micorbiology 2004; 94:223-253.
- [22] Behravan J, Ramezani M, Ebadi S. Bioautographic detection of antibacterial of some Iranian plants. XXVIth International Horticultural Congress. Toronto, Canada 2002; August 11-17.
- [23] Behravan J, Ramezani M, Ebadi S. Evaluation of essential oils of Thymus vulgaris, Zataria multiflora, Carum copticum, and an extract of Ziziphora clinopodioides for antibacterial activity 2202; 50th Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research. Barcelona, Spain, Septemeber, 8-12.

family Lamiaceae. Rastitelnye Resursy 1996; 32(4):59-64.

- [۱۰] جعفری م. بررسی اثر ضدمیکروبی اسانس و عصاره کاکوتی کوهی روی هلیکوباکتر پیلوری. پایان نامه دکتر. دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مشهد. ۱۳۸۱.
- [11] Ozturk S, Ercisli S. Antibacterial activity and chemical constitutions of Ziziphora clinopodioides. Food Control 2007; 18(5): 535-540.
- [12] Ozturk S, Ercisli S. The chemical composition of essential oil and in vitro antibacterial activities of essential oil and methanol extract of Ziziphora persica bunge. Journal of Ethnopharmacology 2006; 106(3): 372-376.
- [13] Kivanc M, Akgul A. Antibacterial activities of essential oils from Turkish spices and citrus. Flavour and Fragrance 1986; 1:175-179.
- [14] Fazly Bazzaz BS, Haririzadeh G. Screening of Iranian plants for antimicrobial activity. International Journal of Pharmacognosy 2003; 41(8):578-583.
- [15] Meral GE, Konyalioglu S, Ozturk B. Essential oil composition and antioxidant activity of endemic Ziziphora taurica subsp. cleonioides. Fitoterapia 2002; 73(7-8):716-718.
- [16] Salehi P, Sonboli A, Eftekhari F, Nejad-Ebrahimi S, Yousefzadi M. Essential oil composition, antibacterial and antioxidant activity of the oil and various extracts of Ziziphora clinopodioides subsp. rigida (BOISS.) RECH. f. from Iran. Biol Pharm Bull 2005; 28(10):1892-6.
- [۱۷] یزدی نژاد ع. آنالیز اسانس های Artemisia khorasanica و Artemisia kopetdagh و بررسی اثرات