

ارزیابی فعالیت ضد میکروبی اسانس گیاه بادرنجبویه (*Melissa officinalis*) روی باکتری های غذازاد

سلمان حیدریان^۱، مهرداد عطایی کچویی^{۱،۲*}، صادق موسوی فرد^۳، فریبرز معطر^{۴،۵}

^۱گروه گیاهان دارویی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

^۲مرکز تحقیقات فرآوری گیاهان دارویی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

^۳گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران.

^۴گروه فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

^۵تحقیق و توسعه شرکت گل دارو، آزمایشگاه فارماسیوتیک، ایران.

*نویسنده مسئول: Drataie@iaushk.ac.ir.

چکیده

بادرنجبویه گیاهی طبی با خصوصیات ضد میکروبی است. مطالعه حاضر به منظور ارزیابی اثرات ضد میکروبی اسانس بادرنجبویه روی باکتری های غذازاد انجام پذیرفت. اندام هوایی بادرنجبویه تهیه و پس از تایید توسط کارشناسان برای تهیه اسانس استفاده شد. قطر هاله عدم رشد باکتری های لیستریا مونوسایتوژنز، سالمونلا تیفی موریوم، شریشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از روش دیسک گذاری ارزیابی و با آنتی بیوتیک ها مقایسه شد. حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) اسانس بادرنجبویه روی باکتری های مورد نظر ارزیابی شد. Citronellal (۱۴/۴ درصد) و Caryophyllene oxide (۱۱ درصد) مهم ترین ترکیبات شناسایی شده بودند. قطر هاله عدم رشد باکتری ها در برابر اسانس بادرنجبویه رنجی معادل 0.42 ± 3.93 تا 1.17 ± 15.23 میلی متر داشتند. استفاده از غلظت ۴ میلی گرم/میلی لیتر از اسانس بادرنجبویه سبب ایجاد بیشترین قطر هاله عدم رشد استافیلوکوکوس اورئوس (0.27 ± 14.70 میلی متر)، شریشیا کلی (0.29 ± 10.33 میلی متر) و سالمونلا تیفی موریوم (0.52 ± 10.18 میلی متر) شد. اثرات ضد میکروبی اسانس بادرنجبویه وابسته به دوز بود ($0.05 < P$). کمترین و بیشترین میزان MIC و MBC اسانس بادرنجبویه برای استافیلوکوکوس اورئوس (به ترتیب ۱/۲۵ و ۲/۵) و سالمونلا تیفی موریوم (به ترتیب ۱۰ و ۲۰) بدست آمد. قطر هاله عدم رشد باکتری های تیمار شده با اسانس بادرنجبویه در مقایسه با بسیاری از آنتی بیوتیک ها، بیشتر اما از ونکومايسين کمتر بود. اسانس بادرنجبویه می تواند به عنوان یک ماده با خصوصیات ضد میکروبی خصوصا در فیلم های خوراکی استفاده شود.

کلمات کلیدی: بادرنجبویه، اسانس، اثرات ضد میکروبی، باکتری های غذازاد.

مقدمه

باکتری های منتقله از طریق مواد غذایی که اغلب به عنوان عوامل بروز بیماری های غذازاد در نظر گرفته می شوند، در سال های اخیر منجر به بروز طیف وسیعی از همه گیری های منجر به مرگ و بستری شدن بیماران و خسارات اقتصادی فراوان شده اند (Pires et al., 2021). نگرانی دیگر از حضور این دسته از باکتری ها در مواد غذایی، امکان انتقال مقاومت های آنتی بیوتیکی از طریق غذا به حوامع بشری می باشد که موجب افزایش نگرانی ها در این ارتباط شده است (Hashempour-Baltork et al., 2019). از بین باکتری های عامل بروز مسمومیت ها و عفونت های غذایی، استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیا کلی، سالمونلا تیفی موریوم و لیستریا مونوسیائتوزنز، از اهمیت بیشتری برخوردار هستند (Abebe et al., 2020). احتمالا تولید زهرابه، حضور فاکتور های حدت آنتی ژنیک، مقاومت بالا نسبت به شرایط محیطی و مقاومت قابل توجه در برابر اغلب آنتی بیوتیک ها، دلایل عمده اهمیت بیشتر این باکتری ها هستند (Heredia and Garcia, 2018).

استافیلوکوکوس اورئوس، یک کوکسی گرم مثبت، هوازی بی هوازی اختیاری و کاتالاز مثبت است که به عنوان عامل اصلی در بروز عفونت های بیمارستانی و همچنین مسمومیت های غذایی با دوره کمون ۲ تا ۴ ساعت و علائم استفراغ، تهوع، ضعف و دل پیچه و بعضا اسهال، می باشد (Dehkordi et al., 2017). توانایی تولید انتروتوکسین اغلب منجر به افزایش اهمیت این باکتری در موارد مسمومیت های غذایی می شود (Momeni Shahraki et al., 2020). اشریشیا کلی یک باسیل گرم منفی و بی هوازی اختیاری از باکتری های روده ای است که عامل بروز مسمومیت های غذایی در انسان می باشد (Dehkordi et al., 2014). تولید سم شیگا

توسط برخی از سویه های این باکتری (سویه های شیگاتوکسینزیک) عامل اصلی بروز اسهال خونی و غیرخونی، کولیت خونریزی دهنده، آنمی همولیتیک، ترومبوسیتوپنی و اختلالات کلیوی پس از مصرف مواد غذایی آلوده به باکتری در انسان است (Momtaz et al., 2012). لیستریا مونوسیائتوزنز باسیل گرم مثبت، متحرک و بی هوازی اختیاری است که به عنوان عامل بالقوه بروز مننژیت، سپسیس و سقط جنین پس از مصرف مواد غذایی آلوده به باکتری در نظر گرفته می شود (Li et al., 2018). سالمونلا تیفی موریوم باسیل کوتاه گرم منفی و جز باکتری های روده ای است که عامل ایجاد مسمومیت غذایی مهلک با علائمی مانند گاستروانتریت، اسهال، کرامپ شکمی و تب های انتریک (تب حصبه) می باشد (Ehua et al., 2021).

از جمله راه های اصلی درمان برخی از موارد مسمومیت های غذایی، تجویز آنتی بیوتیک ها است. با این وجود، شیوع بالای مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری های غذازاد، درمان موارد ابتلا را با مشکل روبرو کرده است. لذا کارخانجات تولید کننده داروهای ضد میکروبی بدنال استفاده از ترکیبات گیاهی و سنتی به عنوان جایگزین برای دارو های ضد میکروبی هستند (Yu et al., 2020).

گیاه بادرنجبویه با نام علمی *Melissa officinalis* در رده دولپه ای ها، راسته لب گلی ها و خانواده نعنائیان (*Lamiaceae*) قرار دارد و بومی مناطق مدیترانه ای و غرب آسیا است (Zarei et al., 2015). اسانس بادرنجبویه از گل و شاخه های تازه یا خشک و برگ های آن، با تقطیر بخار آب یا استخراج شیمیایی تمیه می شود که بوی لیمو تازه و رنگ زرد کم رنگ دارد. بادرنجبویه در طب سنتی ایران به عنوان تسکین دهنده، تب بر، ضداسپاسم، ضد تشنج، معرق، خوشبوکننده و ضدنفخ کاربرد دارد. همچنین از این گیاه در

استخراج اسانس در آزمایشگاه به روش تقطیر با آب (فارماکوپه انگلستان) و با استفاده از دستگاه کلونجر انجام شد. برای این منظور، ۵۰ گرم از اندام هوایی خشک شده گیاه بادرنجبویه توزین و عملیات اسانس گیری به مدت ۳ ساعت انجام پذیرفت. به منظور آگیری از اسانس، از سولفات سدیم استفاده شد. اسانس نهایی تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه سانتی گراد و در شیشه های تیره رنگ، نگهداری شد.

آنالیز ترکیبات اسانس

اسانس های بدست آمده جهت تعیین نوع ترکیبات توسط دستگاه کاروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی (GC-MS) در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. شناسایی و بررسی ترکیبات اسانس توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی (HP-6890, Hewlett Packard, USA) با طیف سنج جرمی انجام شد. دستگاه استفاده شده در این پژوهش دارای ستونی به طول ۶۰ متر، ۰/۲ میلی متر قطر و ۰/۲۵ میکرون ضخامت و نوع ستون HP-IMS بود. دمای اولیه ۱۶۰ درجه سانتی گراد، دمای نهایی ۲۳۰ درجه سانتی گراد و گرادیان دمایی ۷ درجه سانتی گراد در هر دقیقه بود. دمای تزریق ۲۵۰ درجه سانتی گراد بود. از گکاز هلیوم با شدت جریان ۱ میلی متر در دقیقه به عنوان گاز حامی استفاده شد. دستگاه طیف سنج (HP-5970, Hewlett Packard, USA) مورد استفاده با انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت، دمای محفظه پوشش ۱۵۰ درجه سانتی گراد و نوع و دمای تجزیه گر جرمی آن کوادروپل و ۲۳۰ درجه سانتی گراد بود.

میکروارگانیزم ها و شرایط رشد

به منظور ارزیابی اثرات ضد میکروبی اسانس اندام هوایی گیاه بادرنجبویه از باکتری های لیستریا مونوسیتوزنز

درمان بی خوابی و اختلالات خواب، اضطراب، افسردگی، بیماری های عصبی، میگرن، حالت تموع، ناراحتی عصبی معده، کم اشتمایی، کولیک، سرفه، قاعدگی نامنظم، دندان درد و لرزش های عصبی استفاده می شود (Shakeri et al., 2016). مطالعات بسیاری نیز اثرات ضد میکروبی این گیاه را تایید نموده اند (Carvalho et al., 2021; Ehsani et al., 2017).

با توجه به نقش باکتری های غذازاد در بروز مسمومیت های غذایی و نبود مطالعات مدون روی اثرات ضد میکروبی اسانس اخذ شده از اندام هوایی گیاه بادرنجبویه، مطالعه حاضر به منظور ارزیابی اثرات ضد میکروبی اسانس بادرنجبویه روی باکتری های /شریشیا کلی، استفیلوکوکوس اورئوس، لیستریا مونوسیتوزنز و سالمونلا تیفی موریوم، انجام پذیرفت.

مواد و روش ها

نوع مطالعه

مطالعه حاضر از نوع تجربی، توصیفی و مقایسه ای می باشد.

جمع آوری گیاهان دارویی

اندام هوایی (گل) گیاه بادرنجبویه در مرحله گادهی در فصل تابستان سال ۱۳۹۹ از مزرعه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد جمع آوری و توسط بخش گیاه شناسی مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی استان چهارمحال و بختیاری، تایید شد. اندام هوایی گیاه در سایه و دمای محیط به صورت کامل خشک و به قطعات کوچک خرد و به مرکز تحقیقات گیاهان دارویی و معطر دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد منتقل شد.

تهیه اسانس

اسانس اندام هوایی گیاه بادرنجوبیه به میزان ۲۰ میکرولیتر روی دیسک های خالی ریخته شد. به منظور مقایسه اثرات ضد میکروبی اسانس، از دیسک های آنتی بیوتیکی سفنازیدیم (۳۰ میکروگرم/دیسک)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم/دیسک)، ونکومایسین (۳۰ میکروگرم/دیسک)، پنی سیلین (۱۰ میکروگرم/دیسک)، تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم/دیسک)، و آمپی سیلین (۱۰ میکروگرم/دیسک) (Himedia, India) نیز استفاده شد. سپس محیط ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد گرم خانه گذاری شدند. سپس هاله عدم رشد باکتری ها که در اطراف هر دیسک ایجاد شده بود با استفاده از کولیس اندازه گیری شد (Ehsani et al., 2017).

ارزیابی حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) اسانس

ابتدا از کشت تازه باکتری ها در محیط تریپتیک سوی براث، کدورتی معادل ۰/۵ مک فارلند تهیه شد. سپس کدورت تهیه شده از هر باکتری به نسبت ۱ به ۱۰۰ رقیق شد تا غلظتی معادل 1×10^6 کلنی در هر میلی لیتر از محیط ایجاد شود. بدین منظور از محیط کشت باکتری مقداری با لوپ استریل برداشته شده و درون لوله آزمایشی حاوی ۴-۵ میلی لیتر آب مقطر استریل ریخته و آنقدر باکتری اضافه شده تا کدورت محلول باکتری و لوله حاوی کدورتی معادل ۰/۵ مک فارلند یکسان شوند. سپس از اسانس اندام هوایی گیاه بادرنجوبیه با استفاده از سرنگ استریل رقت های متوالی در محیط براث تهیه شد. سپس در پلیت ۹۶ خانه پلی استایرن ۱۰۰ میکرولیتر از رقت های مختلف اسانس که حاوی ۱۰۰ میکرو لیتر سوسپانسیون باکتری بود، ریخته شد. رقت سازی اسانس با استفاده از آب مقطر استریل انجام شد (۰/۶۲۵، ۱/۲۵، ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی گرم/میلی

(PTCC 1298)، /شریشیا کلی (PTCC 1533)، سالمونلا تیفی موریوم (PTCC 1730) و /استافیلوکوکوس اورئوس (PTCC 1015)، استفاده شد. باکتری ها از گروه میکروب شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد تهیه شد. ابتدا یک گرانول از لوله های کرایو مورد نظر در شرایط سترون خارج و به ۱۰ میلی لیتر از محیط کشت BHI (مرک، آلمان) منتقل و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شد. سپس از هر یک از باکتری ها در محیط BHI آگار کشت داده و نگهداری شد.

ارزیابی قطر هاله عدم رشد باکتری ها در برابر اسانس

باکتری ها قبل از استفاده به شکل متوالی دوبار تجدید کشت یافتند. برای این منظور ۴ کلنی تیپیک از محیط کشت BHI آگار به ۱۰ میلی لیتر محیط BHI براث منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرم خانه گذاری شد. برای کشت دوم، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی به ۱۰ میلی لیتر محیط BHI براث منتقل و به مدت ۲۰ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرم خانه گذاری شد. سپس از کشت ۲۰ ساعته، رقت مورد نظر تهیه و تعداد باکتری با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر روی استاندارد نیم مک فارلند که معادل $10^8 \times 1/5$ عدد باکتری بود، تنظیم شد. سپس باکتری های بدست آمده دو بار در محیط کشت پپتون واتر ۱/ درصد (۱۱ میلی لیتر از باکتری و ۹ میلی لیتر از محیط پپتون واتر) رقیق شد تا تعداد باکتری به $10^6 \times 1/5$ عدد برسد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از باکتری های مورد نظر روی محیط کشت مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) به صورت متراکم کشت داده شد. سپس روی محیط ها، دیسک های کاغذی ۶ میلی متری در شرایط استریل و با فاصله مناسب قرار گرفت. سپس از غلظت های ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی گرم/میلی لیتر از

نتایج بدست آمده با استفاده از نرم افزار MiniTab19 در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد بررسی قرار گرفت و مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون Fisher برای داده‌های کیفی و تست ANOVA برای داده‌های کمی در سطح احتمال ۵ درصد صورت پذیرفت.

نتایج

جدول ۱ ترکیبات فیتوشیمیایی موجود در اسانس گیاه بادرنجبویه را نشان می‌دهد. بر طبق نتایج، تجزیه فیتوشیمیایی اسانس گیاه بادرنجبویه ۲۹ ترکیب معادل ۸۹/۳ درصد را نشان داد. از بین ترکیبات، Citronellal (۱۴/۴ درصد)، Caryophyllene oxide (۱۱ درصد)، Geraniol acetate (۱۰/۲ درصد)، Isogeraniol (۶/۴ درصد)، Nerol acetate (۵/۱ درصد) و cis-p-Meth-2 en-7-ol (۳/۸ درصد) فراوانترین ترکیبات شناسایی شده در اسانس گیاه بادرنجبویه بودند.

لیتر). همچنین چاهک‌هایی حاوی ۲۰۰ میکرولیتر محیط براث به عنوان کنترل منفی و چاهک‌هایی حاوی محیط کشت و باکتری به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. چاهک‌هایی نیز به عنوان شاهد کدورت حاوی ۱۰۰ میکرو لیتر محیط و ۱۰۰ میکرو لیتر از هر رقت در نظر گرفته شد. سپس سطح پلیت‌ها پوشیده شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرم خانه گذاری شدند. پس از اتمام گرم خانه گذاری، کدورت در طول موج ۶۳۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الیزا ریدر (Statfax 2100, USA) قرائت شد. کمترین غلظتی از اسانس که باعث کاهش ۹۰ درصدی کدورت در مقایسه با گروه کنترل شده بود به عنوان MIC و کمترین غلظتی از مواد که باعث رفع کامل کدورت شده بود به عنوان MBC در نظر گرفته شد (Etame et al., 2018).

تجزیه و تحلیل آماری

جدول ۱. ترکیبات فیتوشیمیایی موجود در اسانس گیاه بادرنجبویه.

ردیف	ترکیبات	RI	فراوانی (درصد)
۱	Camphene	۹۱۵	۱/۲
۲	a-pinen	۹۳۶	۰/۶
۳	cis-p-Meth-2 en-7-ol	۹۵۶	۳/۸
۴	2-pinene-4-one	۹۶۷	۱/۷۵
۵	Nerol acetate	۹۸۰	۵/۱
۶	Citronellal	۱۰۲۱	۱۴/۴
۷	Nerol	۱۰۳۶	۰/۶
۸	Patchoulene	۱۰۶۲	۱/۶
۹	1R-a-Pinene	۱۰۷۷	۱/۷

۱۰	Isogeraniol	۱۰۸۹	۶/۴
۱۱	Geraniol	۱۱۳۷	۱
۱۲	Verbenol	۱۱۳۶	۰/۹
۱۳	Carane	۱۱۴۹	۲/۳۲
۱۴	Geraniol acetate	۱۱۵۱	۱۰/۲
۱۵	Menthol	۱۱۷۲	۲/۲
۱۶	Cinerone	۱۲۰۶	۰/۷
۱۷	cis-Z-Bisabolene oxide	۱۲۳۵	۰/۶
۱۸	Verbenone	۱۲۵۹	۰/۶
۱۹	Aromadendrene oxide	۱۳۳۳	۱/۸
۲۰	Andropholide0	۱۳۶۵	۰/۶
۲۱	Caryophyllene oxide	۱۴۱۱	۱۱
۲۲	cis-Myrtanol	۱۴۴۶	۰/۶
۲۳	Germanicol	۱۴۸۹	۱/۲
۲۴	Longifolene	۱۴۴۹	۰/۷
۲۵	Himachalene	۱۵۱۵	۰/۷
۲۶	Cubenole	۱۵۶۵	۰/۶
۲۷	Pimara-7,15-dien-3-one	۱۵۸۶	۱/۸
۲۸	Cholest-5-en-7-ol	۱۶۳۲	۰/۹
۲۹	Lupan-3-ol acetate	۱۶۶۵	۰/۵
کل			۸۹/۳

جدول ۲ قطر هاله عدم رشد باکتری های غذازاد در برابر اسانس گیاه بادرنجبویه رنجی معادل 0.42 ± 3.93 تا 1.17 غلظت های مختلف اسانس اخذ شده از اندام هوایی گیاه بادرنجبویه و دیسک های آنتی بیوتیکی را نشان می دهد. قطر هاله عدم رشد باکتری های مورد ارزیابی در برابر

اسانس گیاه بادرنجبویه رنجی معادل 0.42 ± 3.93 تا 1.17 غلظت های مختلف اسانس اخذ شده از اندام هوایی گیاه بادرنجبویه و دیسک های آنتی بیوتیکی را نشان می دهد. قطر هاله عدم رشد باکتری های مورد ارزیابی در برابر

اسانس گیاه بادرنجبویه رنجی معادل 0.42 ± 3.93 تا 1.17 غلظت های مختلف اسانس اخذ شده از اندام هوایی گیاه بادرنجبویه و دیسک های آنتی بیوتیکی را نشان می دهد. قطر هاله عدم رشد باکتری های مورد ارزیابی در برابر

میکروبی آن برای تمام باکتری ها به شکل معنی دار کاهش یافت ($P < 0.05$). باکتری لیستریا مونوسایتوزنز هیچگونه رشد قابل تشخیصی در اطراف دیسک سفتازیدیم نداشت. همچنین باکتری های اشریشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا تیفی موریوم هیچگونه رشد قابل تشخیصی در اطراف دیسک ونکومایسین نداشتند.

استافیلوکوکوس اورئوس ($0.27 \pm 14/70$ میلی متر) و سالمونلا تیفی موریوم ($0.52 \pm 10/18$ میلی متر) به ترتیب در برابر ونکومایسین، اسانس بادرنجبویه ۴ میلی گرم/میلی لیتر، اسانس بادرنجبویه ۴ میلی گرم/میلی لیتر و اسانس بادرنجبویه ۴ میلی گرم/میلی لیتر، بدست آمد. اثرات ضد میکروبی اسانس گیاه بادرنجبویه وابسته به دوز بود و با کاهش دوز از ۴ به ۰/۵ میلی گرم/میلی لیتر اثرات ضد

جدول ۲. قطر هاله عدم رشد باکتری های غذازاد در برابر غلظت های مختلف اسانس گیاه بادرنجبویه و دیسک های آنتی بیوتیکی.

قطر هاله عدم رشد (میلی متر)				تیمارها	
سالمونلا تیفی موریوم	استافیلوکوکوس اورئوس	اشریشیا کلی	لیستریا مونوسایتوزنز		
$10/18 \pm 0.52^a$	$14/70 \pm 0.27^a$	$10/33 \pm 0.29^a$	$13/71 \pm 0.94^{b*}$	۴	اسانس بادرنجبویه (میلی گرم/میلی لیتر)
$8/09 \pm 0.43^b$	$11/30 \pm 0.66^b$	$7/71 \pm 0.24^b$	$11/25 \pm 0.15^c$	۲	
$6/14 \pm 0.21^c$	$10/24 \pm 0.15^b$	$6/30 \pm 0.28^c$	$8/41 \pm 0.40^d$	۱	
$3/93 \pm 0.42^d$	$8/01 \pm 0.37^c$	$4/58 \pm 0.30^d$	$6/34 \pm 0.22^e$	۰/۵	
$8/56 \pm 0.34^b$	$13/54 \pm 0.71^a$	$8/25 \pm 0.37^{ab}$	عدم رشد	سفتازیدیم (۳۰)	دیسک آنتی بیوتیک (میکروگرم/دیسک)
$10/15 \pm 0.32^a$	$11/70 \pm 1/0.4^b$	$10/08 \pm 0.29^a$	$11/18 \pm 0.55^c$	جنتامایسین (۱۰)	
عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	$15/23 \pm 1/17^a$	ونکومایسین (۳۰)	
$8/71 \pm 0.68^b$	$11/41 \pm 0.26^b$	$8/72 \pm 0.51^{ab}$	$11/12 \pm 0.53^c$	پنی سیلین (۱۰)	
$7/67 \pm 0.85^b$	$10/08 \pm 0.31^b$	$9/60 \pm 0.59^a$	$9/17 \pm 0.47^d$	تتراسایکلین (۳۰)	
$7/93 \pm 0.58^b$	$10/14 \pm 0.82^b$	$8/19 \pm 0.16^{ab}$	$9/88 \pm 0.93^{cd}$	آمپی سیلین (۱۰)	

*حروف انگلیسی کوچک غیریکسان در هر ستون نشان دهنده اختلاف آماری معنی دار در حد $P < 0.05$ می باشد.

جدول ۳ میزان MIC و MBC باکتری های غذازاد در برابر اسانس اندام هوایی گیاه بادرنجبویه را نشان می دهد. بر طبق نتایج، کمترین میزان MIC و MBC اسانس گیاه بادرنجبویه برای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس (به ترتیب ۱/۲۵ و ۲/۵) بدست آمد. بیشترین میزان MIC و MBC اسانس گیاه بادرنجبویه برای باکتری سالمونلا تیفی موریوم (به ترتیب ۱۰ و ۲۰) بدست آمد.

جدول ۳. میزان MIC و MBC باکتری های غذازاد در برابر اسانس گیاه بادرنجبویه.

تیمار ها		لیستریا مونوسایتوزنز		اشریشیا کلی		استافیلوکوکوس اورئوس		سالمونلا تیفی موریوم	
		MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC
اسانس		۵	۲/۵	۱۰	۵	۲/۵	۱/۲۵	۲۰	۱۰
بادرنجبویه		۵	۲/۵	۱۰	۵	۲/۵	۱/۲۵	۲۰	۱۰

بحث

امروزه اغلب باکتری های جدا شده از مواد غذایی، خصوصا مواد غذایی با منشا دامی، مقاومت بالایی نیست به اکثر آنتی بیوتیک ها دارند. شیوع مقاومت در بین این باکتری ها به حدی زیاد است که اغلب داروهای آنتی بیوتیکی معمول مورد استفاده در پزشکی و دامپزشکی، تاثیری روی آن ها ندارند (Van et al., 2007). لذا ضرورت انجام تحقیقات روی منابع طبیعی واجد ترکیبات ضد میکروبی بیش از پیش مورد توجه قرار می گیرد.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که اسانس اخذ شده از اندام هوایی گیاه بادرنجبویه از فعالیت ضد میکروبی قابل قبولی بر علیه باکتری های غذازاد، خصوصا استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا مونوسایتوزنز، برخوردار است. بیشترین اثرات ضد میکروبی اسانس بادرنجبویه در غلظت ۴ میلی گرم/میلی لیتر دیده شد. میانگین قطر هاله عدم رشد لیستریا مونوسایتوزنز، اشریشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا تیفی موریوم تیمار شده با غلظت ۴ میلی گرم/میلی تیر از اسانس بادرنجبویه به ترتیب $0.94 \pm$ ، $1.37 \pm$ ، $1.03 \pm$ و $1.47 \pm$ و $0.52 \pm$ و $1.18 \pm$ میلی متر بود. در مقابل میانگین قطر هاله عدم رشد لیستریا مونوسایتوزنز، اشریشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا تیفی موریوم تیمار شده با غلظت ۰/۵ میلی گرم/میلی تیر از اسانس بادرنجبویه به ترتیب $0.22 \pm$ ، $0.34 \pm$ ، $0.37 \pm$ و $0.42 \pm$ و $0.93 \pm$ میلی متر

بود. بنابراین اثرات ضد میکروبی اسانس گیاه بادرنجبویه وابسته به دوز بود ($P < 0.05$). در بین آنتی بیوتیک های مورد استفاده، بیشترین قطر هاله عدم رشد مربوط به ونکومايسين بود که هیچ رشدی برای باکتری های اشریشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا تیفی موریوم در مقابل آن گزارش نشد و قطر هاله عدم رشد برای باکتری لیستریا مونوسایتوزنز، 1.17 ± 15.23 میلی متر بود. همچنین هیچ گونه رشدی برای باکتری لیستریا مونوسایتوزنز تیمار شده با سفتازیدیم دیده نشد. بیشترین قطر هاله عدم رشد (که نشان دهنده بیشترین اثرات ضد میکروبی آنتی بیوتیک ها است) باکتری های لیستریا مونوسایتوزنز، اشریشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا تیفی موریوم به ترتیب در مقابل آنتی بیوتیک های ونکومايسين (1.17 ± 15.23 میلی متر)، جنتامایسین (0.29 ± 10.08 میلی متر)، سفتازیدیم (0.71 ± 13.54 میلی متر) و جنتامایسین (0.32 ± 10.15 میلی متر) گزارش شد. اثرات ضد میکروبی اسانس گیاه بادرنجبویه از بسیاری از آنتی بیوتیک ها به شکل معنی دار بیشتر اما در مقایسه با آنتی بیوتیک های ونکومايسين (برای لیستریا مونوسایتوزنز به شکل معنی دار) و جنتامایسین (برای سالمونلا تیفی موریوم به شکل غیر معنی دار)، کمتر بود. بر طبق نتایج، Citronellal و Caryophyllene oxide اصلی ترین ترکیبات شناسایی شده در اسانس بادرنجبویه بودند. اثرات ضد میکروبی Citronellal و Caryophyllene oxide در اسانس گیاه بادرنجبویه توسط سیار محققان از کشور های مراکش

همکاران (۲۰۱۵) (Ehsani et al., 2015) قطر هاله عدم رشد *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا مونوسیگنوزا* و *شریشیا کلی* تیمار شده با اسانس گیاه بادرنجبویه (۱۵ میلی گرم/میلی لیتر) را به ترتیب 0.16 ± 0.22 ، 0.15 ± 0.10 و 0.14 ± 0.11 میلی متر گزارش نمودند که با نتایج مطالعه حاضر از نظر مقاومت بالاتر باکتری *شریشیا کلی* مشابهت دارد. نام بردگان بیشترین و کمترین میزان MIC را به ترتیب برای باکتری های *شریشیا کلی* (۲۰ میلی گرم/میلی لیتر) و *استافیلوکوکوس اورئوس* (۱/۲۵ میلی گرم/میلی لیتر) گزارش نمودند. مطالعه Arzhang و همکاران (۲۰۱۵) (Arzhang et al., 2015) نیز نشان داد که اسانس گیاه بادرنجبویه در غلظت ۲۲ میکروگرم بر میلی لیتر، اثر مهارکنندگی بر *استافیلوکوکوس اورئوس*، *شریشیا کلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* داشت، ولی روی *کاندیدا آلبیکنز* مؤثر نبود. نتایج مشابه مبنی بر اثرات ضد میکروبی گیاه بادرنجبویه از سایر نقاط جهان شامل لهستان (Klūga et al., 2017)، پرتقال (Pedrosa et al., 2020)، صربستان (Mimica-Dukic et al., 2004)، ایران (Rabbani et al., 2016)، مالزی (Swamy et al., 2016) و مصر (Abdel-Naime et al., 2019)، گزارش شده است. دلیل احتمالی وجود تفاوت در اثرات ضد میکروبی گیاه بادرنجبویه در مطالعات مختلف می تواند اختلاف در منطقه جغرافیایی، آب و هوا، پارامترهای دما، ارتفاع از سطح دریا، طول مدت زمان سایه، جنس خاک، استفاده از انواع کودها و در نهایت نوع عصاره یا اسانس استفاده شده، باشد. هرچند تمام مطالعات تایید کننده اثرات ضد میکروبی گیاه بادرنجبویه روی باکتری ها می باشند.

از جمله محدودیت های این تحقیق می توان به عدم استفاده از آنتی بیوتیک ها به صورت پودری به منظور اعمال

(Jalal et al., 2015)، ایران (Ehsani et al., 2017)، الجزایر (Abdellatif et al., 2014)، و پرتقال (Carvalho et al., 2021) گزارش شده است.

اثرات ضد میکروبی اسانس گیاه بادرنجبویه روی باکتری های *شریشیا کلی* و *سالمونلا تیفی* موریوم به مراتب کمتر بود. دلیل این یافته احتمالاً وجود لایه لیپوپلی ساکاریدی در غشای بیرونی و نیز فضای پری پلاسمیک باکتری های گرم منفی است که منجر به مقاومت بالای آن ها در برابر ترکیبات ضد میکروبی می شود (Masoumian and Zandi, 2017). هرچند نتایج این تحقیق نشان دهنده وجود اثرات ضد میکروبی اسانس اخذ شده از اندام هوایی گیاه بادرنجبویه روی باکتری های گرم منفی نیز بود که دارای اثرات معنی دار ($P < 0.05$) در مقایسه با آنتی بیوتیک های پنی سیلین، تتراسایکلین و آمپی سیلین بود. دلیل این یافته وجود ترکیباتی همچون کاریوفیلین اکسید، لینالول، تیمول، کامفور، سیترونلا، نرول، دکانال، بتا-بوربونن، آلفا-کوپائن، بتا-پینن و ... در اسانس گیاه بادرنجبویه است که همگی جز ترکیبات فعال با خصوصیات ضد میکروبی قوی می باشند (Alizadeh Behbahani and Shahidi, 2019). در این ارتباط، ترکیبات ضد میکروبی موجود در عصاره ها و اسانس های گیاهی معمولاً از طریق هدفگیری مناطق خاصی از میکروبها، اثرات ضد میکروبی خود را اعمال می کنند. از جمله مهم ترین مکانیسم های عمل ترکیبات ضد میکروبی می توان به مهار سنتز پروتئین، تداخل با سنتز دیواره سلولی، مهار مسیرهای متابولیکی واسطه، تداخل با سنتز اسید نوکلئیک، و اختلال در غشای سیتوپلاسمی سلول، اشاره نمود (Maurya et al., 2021).

با وجود اثرات ضد میکروبی قابل توجه گیاه بادرنجبویه، مطالعات اندکی روی آن انجام پذیرفته است. Ehsani و

اسانس گیاه بادرنجبویه می تواند نشان دهنده اثرات ضد میکروبی مشخص گیاه در غلظت های پایین خصوصا روی *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا مونوسایتوژنز* باشد که استفاده از آن را به صرفه و اقتصادی می کند. با توجه به نتایج بدست آمده و در نظر گرفتن ماهیت خوراکی و سنتی گیاه بادرنجبویه، پیشنهاد می شود از اسانس گیاه بادرنجبویه به عنوان یک ترکیب ضد میکروبی خوراکی در مواد غذایی (به صورت فیلم خوراکی یا به عنوان چاشنی)، استفاده شود. هرچند، مطالعات تکمیلی دیگری نیز بایستی در این زمینه صورت پذیرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این تحقیق کمال تشکر و قدردانی را از پرسنل مرکز تحقیقات گیاهان دارویی و معطر دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد و همچنین مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان چهارمحال و بختیاری، دارند.

غلظت بندی دقیق و عدم بررسی تاثیرات ضد میکروبی اسانس استحصال شده از سایر قسمت های گیاه بادرنجبویه و اسانس آن روی باکتری های مورد نظر، اشاره نمود. همچنین عدم ارزیابی اثرات ضد میکروبی اسانس بادرنجبویه روی سایر انواع باکتری های غذازاد از جمله گونه های کمپیلوباکتر و کلوستریدیوم ها، می تواند محدودیت دیگر این تحقیق باشد.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد اسانس اخذ شده از اندام هوایی گیاه بادرنجبویه خصوصا در غلظت ۴ میلی گرم/میلی لیتر، اثرات ضد میکروبی مناسبی بر علیه باکتری های *لیستریا مونوسایتوژنز*، *سالمونلا تیفی موریوم*، *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* دارد. هرچند اسانس گیاه بادرنجبویه اثرات ضد میکروبی کمتری نسبت به برخی از انواع دیسک های آنتی بیوتیکی داشت اما قطر هاله عدم رشد باکتری های تیمار شده با این گیاه از بسیاری از دیسک های آنتی بیوتیکی، بیشتر بود. میزان MIC و MBC پایین

منابع

- Abdellatif, F., Boudjella, H., Zitouni, A., and Hassani, A. 2014. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from leaves of Algerian *Melissa officinalis* L. *Excli. J.* 13: 772.
- Abebe, E., Gugsu, G., and Ahmed, M. 2020. Review on major food-borne zoonotic bacterial pathogens. *J. Trop. Med.* 2020: 4674235.
- Carvalho, F., Duarte, A.P., and Ferreira, S., 2021. Antimicrobial activity of *Melissa officinalis* and its potential use in food preservation. *Food. Biosci.* 44: 101437.
- Dehkordi, F.S., Gandomi, H., Basti, A.A., Misaghi, A., and Rahimi, E. 2017. Phenotypic and genotypic characterization of antibiotic resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from hospital food. *Antimicrob. Res. Infect. Control.* 6: 1-11.
- Dehkordi, F.S., Yazdani, F., Mozafari, J., and Valizadeh, Y. 2014. Virulence factors, serogroups and antimicrobial resistance properties of *Escherichia coli* strains in fermented dairy products. *BMC. Res. Note.* 7: 1-8.
- Ehsani, A., Alizadeh, O., Hashemi, M., Afshari, A., and Aminzare, M. 2017. Phytochemical, antioxidant and antibacterial properties of *Melissa officinalis* and *Dracocephalum moldavica* essential oils. *Vet. Res. Forum.* 8: 223.
- Ehuwa, O., Jaiswal, A.K., and Jaiswal, S. 2021. *Salmonella*, Food Safety and Food Handling Practices. *Foods*, 10: 907.
- Eteme, R.E., Mouokeu, R.S., Pouaha, C.L.C., Kenfack, I.V., Tchientcheu, R., Assam, J.P.A., Poundeu, F.S.M., Tiabou, A.T., Etoa, F.X., and Kuiate, J.R. 2018. Effect of Fractioning on Antibacterial Activity of *Enantia chlorantha* Oliver (Annonaceae) Methanol Extract and Mode of Action. *Evid-Based Compl. Altern. Med.* 2018: 1-13.
- Hashempour-Baltork, F., Hosseini, H., Shojae-Aliabadi, S., Torbati, M., Alizadeh, A.M., and Alizadeh, M. 2019. Drug resistance and the prevention strategies in food borne bacteria: An update review. *Adv. Pharm. Bull.* 9: 335.
- Heredia, N., and García, S. 2018. Animals as sources of food-borne pathogens: A review. *Anim Nutr.* 4: 250-255.
- Jalal, Z., El Atki, Y., Lyoussi, B., and Abdellaoui, A. 2015. Phytochemistry of the essential oil of *Melissa officinalis* L. growing wild in Morocco: Preventive approach against nosocomial infections. *Asian. Pacific. J. Trop. Biomed.* 5(6): 458-61.
- Li, W., Bai, L., Fu, P., Han, H., Liu, J., and Guo, Y. 2018. The epidemiology of *Listeria monocytogenes* in China. *Foodbone. Pathog. Dis.* 15: 459-466.
- Momeni Shahraki, M., Shakerian, A., Rahimi, E., and Safarpour Dehkordi, F. 2020. Study the frequency of enterotoxin encoding genes and antibiotic resistance pattern of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from vegetable and salad samples in Chaharmahal Va Bakhtiari province. *J. Food. Microbiol.* 7: 55-69.
- Momtaz, H., Farzan, R., Rahimi, E., Safarpour Dehkordi, F., and Souod, N. 2012. Molecular characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from ruminant and donkey raw milk samples and traditional dairy products in Iran. *Sci. World. J.* 2012: 231342.

- Pires, S.M., Desta, B.N., Mughini-Gras, L., Mmbaga, B.T., Fayemi, O.E., Salvador, E.M., Gobena, T., Majowicz, S.E., Hald, T., Hoejskov, P.S., and Minato, Y. 2021. Burden of foodborne diseases: think global, act local. *Curr. Opin. Food. Sci.* 39: 152-9.
- Shakeri, A., Sahebkar, A., and Javadi, B. 2016. *Melissa officinalis* L.—A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *J. Ethnopharmacol.* 188: 204-228.
- Yu, Z., Tang, J., Khare, T., and Kumar, V. 2020. The alarming antimicrobial resistance in ESKAPEE pathogens: Can essential oils come to the rescue?. *Fitoterapia.* 140: 104433.
- Zarei, A., Changizi-Ashtiyani, S., Taheri, S., and Hosseini, N. 2015. A brief overview of the effects of *Melissa officinalis* L. extract on the function of various body organs. *Zahedan. J. Res. Med. Sci.* 17: e1007.
- Van, T.T.H., Moutafis, G., Tran, L.T., and Coloe, P.J. 2007. Antibiotic resistance in food-borne bacterial contaminants in Vietnam. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 7906-11.
- Alizadeh Behbahani, B., and Shahidi, F. 2019. *Melissa officinalis* essential oil: Chemical compositions, antioxidant potential, total phenolic content and antimicrobial activity. *Nutr. Food. Sci. Res.* 6: 17-25.
- Masoumian, M., and Zandi, M. 2017. Antimicrobial activity of some medicinal plant extracts against multidrug resistant bacteria. *Zahedan. J. Res. Med. Sci.* 19: 1-8.
- Maurya, A., Prasad, J., Das, S., and Dwivedy, A.K. 2021. Essential oils and their application in food safety. *Front. Sustain. Food. Systems.* 5: 133.
- Ehsani, A., Alizade, O., Hashemi, M., Mohamadi, S., and Khalili, S. 2015. Comparative antibacterial effects of essential oils of *Melissa officinalis* and *Deracocephalum moldavica* L. against some pathogenic bacteria in food in vitro. *J. Shahrekord. Univ. Med. Sci.* 17: 80-87.
- Arzhang, M., Dakhili, M., and Farahani, F. 2015. Investigation of chemical compounds and anti-microbial activity of essential oil of *Melissa officinalis* L. *Qom. Univ. Med. Sci. J.* 9: 7-13.
- Klūga, A., Terentjeva, M., Kántor, A., Kluz, M., Puchalski, C., and Kačániová, M. 2017. Antibacterial activity of *Melissa officinalis* L., *Mentha piperita* L., *Origanum vulgare* L. and *Malva mauritiana* against bacterial microflora isolated from fish. *Adv. Res. Life. Sci.* 1: 75-80.
- Pedrosa, M.C., Ueda, J.M., Heleno, S., Melgar, B., Ivanov, M., Soković, M., Caroch, M., Ferreira, I.C., and Barros, L. 2020. Antimicrobial Activity of Aqueous Plant Extracts as Potential Natural Additives. *Proceedings.* 70: 79.
- Mimica-Dukic, N., Bozin, B., Sokovic, M., and Simin, N. 2004. Antimicrobial and antioxidant activities of *Melissa officinalis* L.(Lamiaceae) essential oil. *J. Agric. Food. Chem.* 52: 2485-2489.
- Rabbani, M., Etemadifar, Z., Karamifard, F., and Borhani, M.S. 2016. Assessment of the antimicrobial activity of *Melissa officinalis* and *Lawsonia inermis* extracts against some bacterial pathogens. *Comp. Clin. Pathol.* 25: 59-65.
- Swamy, M.K., Akhtar, M.S., and Sinniah, U.R. 2016. Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: an updated review. *Evid-Based. Compl. Alt. Med.* 2016: 3012462.

Abdel-Naime, W.A., Fahim, J.R., Fouad, M.A.,
and Kamel, M.S. 2019. Antibacterial, antifungal,

and GC-MS studies of *Melissa*
officinalis. South. Afr. J. Botany. 124: 228-234.

Evaluation of the antimicrobial activity of *Melissa officinalis* essential oil on foodborne bacteria

Salman Heidarian¹, Mehrdad Ataie Kachoei^{1,2}, Sadegh Mousavi-Fard³, Fariborz Moattar^{4,5}

¹Department of Medicinal Plants, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

²Medicinal Plants Processing Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

³Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, P.O. Box 465, Iran.

⁴Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

⁵R & D Goldaru-co, Pharmaceutical Laboratory, Iran.

*Corresponding author: Drataie@iaushk.ac.ir.

Abstract

Melissa officinalis is a medicinal plant with high antimicrobial properties. The present study was performed to evaluate the antimicrobial effects of *Melissa officinalis* essential oil on food-borne bacteria. *Melissa officinalis* aerial parts were prepared and after approval by experts used to prepare essential oils. The diameter of the growth inhibition zone of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* was assessed using disk diffusion and compared with antibiotics. The minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bacterial concentration (MBC) of *Melissa officinalis* essential oil were evaluated on the target bacteria. Citronellal (14.4%) and Caryophyllene oxide (11%) were the most important compounds identified in *Melissa officinalis* essential oil. The diameter of the growth inhibition zone of the bacteria against *Melissa officinalis* essential oil ranged from 3.93±0.42 to 15.23±1.17 mm. Application of 4 mg/ml concentration of *Melissa officinalis* essential oil caused the largest diameter of the growth inhibition zone of *Staphylococcus aureus* (14.70±0.27 mm), *Escherichia coli* (10.33±0.29 mm) and *Salmonella typhimurium* (10.18±0.52 mm). The antimicrobial effects of *Melissa officinalis* essential oil were dose-dependent ($P < 0.05$). The lowest and highest levels of MIC and MBC of *Melissa officinalis* essential oil were obtained for *Staphylococcus aureus* (1.25 and 2.5, respectively) and *Salmonella typhimurium* (10 and 20, respectively). The diameter of the growth inhibition zone of bacteria treated with *Melissa officinalis* essential oil was higher than that of many antibiotics, but lower than that of vancomycin. *Melissa officinalis* essential oil can be used as a substance with antimicrobial properties, especially in food films.

Keywords: *Melissa officinalis*, Essential oils, Antimicrobial effects, Food-borne bacteria.