بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس گیاهان نعناع فلفلی، پونه کوهی و زیره سیاه بر برخی باکتری‌های جدا شده از مواد غذایی

مهرداد عطایی کچویی

گروه گیاهان دارویی، دانشکده غذا و دارو، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.

نویسنده مسئول: *Mehrad.ataie@gmail.com*

تاریخ دریافت: ۱۳۹٤/۰۹/۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹٤/۱۰/۳۰

چکیده

نیاز به جایگزینی نگهدارنده‌های سنتتیک با یک منبع طبیعی سبب شده تا کارخانجات تولید مواد غذایی از گیاهان دارویی به عنوان نگهدارنده استفاده کند. مطالعه حاضر به منظور ارزیابی اثرات ضد میکروبی اسانس استخراج شده از پونه کوهی، نعناع فلفلی و زیره سیاه روی باکتری‌های *اشریشیاکلای*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا تیفی موریوم* جدا شده از مواد غذایی انجام شد. پس از تهیه گیاهان دارویی، اسانس‌گیری با استفاده از دستگاه کلونجر انجام و اثرات ضد میکروبی اسانس‌ها بر روی سوش‌های *اشریشیا کلای*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا تیفی موریوم* جداسازی شده از شیر خام و گوشت، ارزیابی شد. قطر هاله عدم رشد هر یک از اسانس‌ها با استفاده از روش انتشار دیسکی ساده در محیط مولر هینتون آگار تعیین شد. سوش‌های باکتریایی جدا شده از گوشت مقاومت آنتی بیوتیکی بیشتری نسبت به اسانس‌های تست شده داشتند اما الگوی اثر بخشی اسانس‌ها روی سوش‌های جدا شده از هر دو منبع یکسان بود. اسانس استخراج شده از گیاه پونه کوهی بیشترین اثر ضد میکروبی را روی *استافیلوکوکوس اورئوس* و کمترین را روی *اشریشیاکلای*، نعناع فلفلی بیشترین اثر ضد میکروبی را روی *اشریشیاکلای* و کمترین را روی *استافیلوکوکوس اورئوس* و زیره سیاه بیشترین اثرات ضد میکروبی خود را روی *استافیلوکوکوس اورئوس* و کمترین را روی *سالمونلا تیفی موریوم* داشت. با توجه به اثرات ضد باکتریایی اسانس‌های ذکر شده، امکان کاربرد آنها به عنوان نگهدارنده ضد میکروبی در گوشت و فراورده‌های آن و همچنین فراورده‌های لبنی وجود دارد.

واژگان کلیدی: پونه کوهی، نعناع فلفلی، زیره سیاه، اثرات ضد میکروبی، باکتری‌های غذازاد.

مقدمه

استفاده از گیاهان دارویی و معطر در درمان بیماری‌ها در سال‌های اخیر افزایش چشمگیری پیدا کرده است. وجود سابقه تاریخی غنی در ایران در رابطه با گیاهان دارویی و طب سنتی سبب گرایش اکثریت آحاد جامعه به استفاده از گیاهان دارویی شده است (Daferera and Cowan, 2001). از طرفی تجویز بی‌رویه آنتی بیوتیک‌ها برای درمان بیماری‌های انسانی و دامی سبب بروز مقاومت در اکثر سویه های باکتریایی شده است. علاوه بر این، روند استفاده از نگهدارنده‌ها در مواد غذایی و آگاهی مردم از اثرات سوء این ترکیبات سبب شده است تا کارخانجات تولید و بسته بندی مواد غذایی گرایش جدی به استفاده از گیاهان دارویی و معطر برای افزایش مدت زمان نگهداری مواد غذایی کنند (Daferera and Cowan, 2001; Omidbaigi, 2007; Tepe et al., 2004).

پونه کوهی[1]، نعناع فلفلی[2] و زیره سیاه[3] از جمه مهم ترین و فراوان‌ترین گیاهان دارویی بومی ایران هستند. پونه کوهی گیاهی پایا و همیشه سبز است که علاوه بر دارا بودن اثرات درمانی خاص، به عنوان ادویه طعم دهنده نیز کاربرد دارد. ترکیب اصلی اسانس این گیاه شامل فنل‌هایی مانند کارواکرول و تیمول است که اثرات ضد میکروبی بسیار بارزی را از خود بروز می‌دهند (Fournomiti et al., 2015). برگ، گل و ساقه گونه‌های پونه در چای‌های گیاهی یا بعنوان

1- *Origanum vulgare*
2- *Mentha piperita*
3- *Carum carvi*

افزودنی در مخلوط‌های ادویه‌های تجارتی برای طعم دادن به غذاها استفاده می‌شود. این گیاه در طب سنتی برای درمان تهوع، التهاب مجاری تنفسی، نفخ و بی‌اشتهایی بکار گرفته می شود (Grondona et al., 2014; Fournomiti et al., 2015). نعناع فلفلی گیاهی چند ساله و علفی با کرک‌های پراکنده و ریشه کوتاه است. ساقه این گیاه چهارگوش به رنگ قرمز مایل به بنفش که برگ‌های بیضوی شکلی به صورت متقابل روی آن قرار می‌گیرند. گل‌های آن به رنگ بنفش هستند و میوه‌اش کپسولی به رنگ قرمز است که دارای بذرهایی بدون توان رویشی می‌باشد. از هزاران سال قبل تا کنون از گونه‌های مختلف نعناع به عنوان ادویه و دارو استفاده می‌شود. نعناع فلفلی حاوی مانتول و تانن است که ترکیباتی آنتی اکسیدان و بعضا ضد میکروبی هستند (Mikaili et al., 2013; Mimica-Dukić et al., 2003). نعناع فلفلی برای تقویت معده، روده و دستگاه گوارش مفید است و اثرات ضد نفخ، یرقان و ضد سنگ صفراوی دارد (Mikaili et al., 2013; Mimica-Dukić et al., 2003). همچنین استنشاق بوی نعناع فلفلی، برای رفع سرماخوردگی و عفونت‌های گلو بسیار مفید است (Mikaili et al., 2013; Mimica-Dukić et al., 2003). زیره سیاه یا زیره کوهی گیاهی دارویی با ساقه‌هایی صاف و میان تهی و ارتفاع ۶۰ سانتی متر است که برگ‌هایش تقسیم شانه‌ای و زاویه بدون دمبرگ دارند. از زیره سیاه در طب سنتی در موارد گرفتگی عضلات، باد شکن، اشتها آور، افزاینده ترشح شیر، خلط آور، طعم دهنده در صنایع غذایی و تقویت کننده معده استفاده می‌شود (Johri, 2011; Iacobellis et al., 2005). ترکیبات موثره موجود در این گیاه مانند لیمونین، فلاوونوئیدها، کومین آلدئید و ... آنتی اکسیدان، ضد سرطان، ضد میکروب و ضد التهاب هستند (Johri, 2011; Iacobellis et al., 2005). با توجه به اثرات ضد میکروبی بالای گیاهان زیره سیاه، پونه کوهی و نعناع فلفلی، خوراکی بودن آنها و افزایش شیوع سوش‌های مقاوم باکتری‌های *اشریشیاکلای*، *سالمونلا تیفی‌موریوم* و *استافیلوکوکوس اورئوس* خصوصا در مواد غذایی با منشا دامی (Kluytmans, 2010; McLaughlin et al., 2006; Momtaz et al., 2013)، مطالعه حاضر به منظور بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس استخراج شده از گیاهان زیره سیاه، پونه کوهی و نعناع فلفلی بر روی باکتری‌های بیماری‌زای *اشریشیاکلای*، *سالمونلا تیفی موریوم* و *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از گوشت و شیر انجام شد.

مواد و روش کار

تهیه گیاهان و اسانس‌گیری

مطالعه توصیفی-مقطعی حاضر در طول تابستان سال ۱۳۹۴ در مرکز تحقیقات بهداشت مواد غذایی دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد انجام شد. گیاهان پونه کوهی، زیره سیاه و نعناع فلفی از عطاری‌های موجود در شهر اصفهان تهیه، در سایه خشک و آماده اسانس‌گیری شدند. عمل اسانس‌گیری با استفاده از روش تقطیر با آب و به کارگیری دستگاه کلونجر به مدت ۳ ساعت انجام شد. اسانس‌های بدست آمده با استفاده از سولفات سدیم خشک و وزن آنها اندازه‌گیری شد (Bernath, 2000).

جمع‌آوری نمونه و جداسازی باکتری

نمونه‌های مواد غذایی مطالعه شده در بررسی حاضر شامل گوشت و شیر خام بودند. نمونه‌ها از مراکز فروش و سوپر مارکت‌های موجود در سطح شهر اصفهان خریداری و در اسرع وقت در دمای ۴ درجه سانتیگراد به آزمایشگاه انتقال داده شد. نمونه‌های مواد غذایی جمع‌آوری شده از نظر ظاهری و خواص ارگانولپتیکی طبیعی بودند. به منظور جداسازی باکتری‌های *اشریشیاکلای*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا تیفی موریوم* از روش کشت میکروبی استفده شد. به منظور جداسازی *اشریشیاکلای* ابتدا از نمونه‌ها برای کشت در محیط نوترینت براس (مرک، آلمان)، استفاده

شد. نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری شدند. سپس با استفاده از آنس استریل از کلنی‌های رشد کرده در محیط نوترینت براس برداشت کرده و به محیط مک‌کانکی‌آگار (مرک، آلمان) انتقال داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری شد. سپس از کلنی‌های تیپیک رشد کرده در محیط مک‌کانکی‌آگار که دارای خصوصیات ظاهری *اشریشیاکلای* بودند (کلنی‌های لاکتوز مثبت صورتی رنگ)، با آنس استریل برداشت کرده و به محیط EMB agar (مرک، آلمان) انتقال داده شد. کلنی‌های سبز متالیک رشد کرده در محیط EMB agar به عنوان باکتری *اشریشیاکلای* تیپیک مورد پذیرش قرار گرفتند و با تست‌های بیوشیمیایی IMViC، TSI و تولید سولفید هیدروژن مورد ارزیابی قرار گرفتند (Dehkordi et al., 2014). به منظور جداسازی *استافیلوکوکوس اورئوس*، ابتدا نمونه‌ها در محیط کشت Tryptic Soy Broth (مرک، آلمان) غنی شده با ۱۰ درصد نمک کشت داده و به مدت ۱۸ ساعت در گرم خانه ۳۷ درجه سلسیوس گرم-خانه‌گذاری شد. سپس کلنی‌های رشد یافته در محیط Tryptic Soy Broth به محیط بردپارکر آگار (مرک، آلمان) غنی شده با امولسیون تلوریت-زرده تخم مرغ انتقال داده و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شد. کلنی‌های سیاه رنگ با هاله رسوبی در اطراف، به عنوان کلنی‌های تیپیک برای *استافیلوکوکوس اورئوس* در نظر گرفته شد و با تست-های بیوشیمیایی کاتالاز، کوواگولاز، اکسیداز، اوره آز، فسفاتاز و تخمیز مانیتول مورد ارزیابی قرار گرفت (Di Giannatale et al., 2011). به منظور جداسازی *سالمونلا تیفی موریوم*، نمونه‌ها به محیط پیش غنی کننده لاکتوز براث (مرک، آلمان) انتقال داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری گردید. سپس کلنی‌های رشد کرده به محیط سلنیت سیستئین (مرک، آلمان) انتقال داده و در دمای ۴۳ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شدند. متعاقبا کلنی‌های باکتریایی به شکل خطی در محیط سالمونلا-شیگلا آگار (مرک، آلمان) کشت داده شدند و پس از ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، پرگنه‌های بی‌رنگ با مرکز سیاه به عنوان مشکوک به سالمونلا در نظر گرفته و با تست های بیوشیمیایی مورد ارزیابی قرار گرفتند. به موازات کشت کلنی‌ها در محیط سالمونلا-شیگلا آگار، کلنی‌ها همچنین در محیط بریلیانت گرین آگار (مرک، آلمان) نیز کشت و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شدند و پرگنه‌های زرد با مرکز سیاه برای انجام تست‌های تکمیلی مورد استفاده قرار گرفتند. تمامی پرگنه‌های انتخاب شده با استفاده از تست‌های IMViC، TSI، LIA و اوره‌آز مورد ارزیابی قرار گرفتند. در نهایت سوسپانسیون باکتریایی در محیط مولر هینتون براث (مرک، آلمان) تهیه و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری شد. گرم-خانه‌گذاری تا زمانی ادامه یافت که کدورت ایجاد شده در اثر رشد باکتری‌ها با استاندارد ۰/۵ مک فارلند مشابه گردد (Davis, 1990).

ارزیابی اثرات ضد میکروبی اسانس‌ها

به منظور ارزیابی اثرات ضد میکروبی هر یک از اسانس-های پونه کوهی، نعناع فلفلی و زیره سیاه بر روی باکتری‌های *اشریشیاکلای*، *سالمونلا تیفی موریوم* و *استافیلوکوکوس اورئوس*، از روش انتشار دیسکی ساده استفاده شد. قطر هاله عدم رشد اطراف هر یک از باکتری‌ها با کولیس (بر حسب میلی‌متر) اندازه‌گیری و نتایج آن ثبت گردید. ابتدا هر یک از باکتری‌های جداسازی شده بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) کشت داده شدند (با استفاده از غلظت ۰/۵ مک فارلند آنها) و در هر پلیت باکتریولوژیک از محیط مولر هینتون آگار، ۴ دیسک آنتی بیوتیکی خام که قبلا به دی متیل سولفوکساید (مرک، آلمان) آغشته شده بودند، گذاشته شد. سپس بر روی هر یک از

دیسک‌های خام آنتی‌بیوتیکی، ۵۰ میکرولیتر از اسانس گیاهان دارویی مورد مطالعه (عمل ریختن اسانس بر روی دیسک‌های خام آنتی‌بیوتیکی را ۳ مرتبه تکرار کردیم) ریخته و پلیت‌ها به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری شدند. سپس قطر هاله عدم رشد با استفاده از پروتوکول ارائه شده توسط انستیتو استاندارد آزمایشگاهی و بالینی (CLSI, 2012) اندازه‌گیری و ارزیابی شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

تمامی آزمایشات در ۳ تکرار انجام پذیرفت. نتایج حاصل از فعالیت ضد میکروبی اسانس‌های استخراج شده با استفاده از نرم افزار SPSS شماره ۱۸ و تست آنالیز واریانس مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. در نهایت $P<0.05$ به عنوان حد معناداری در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میزان شیوع سوش‌های *اشریشیا کلای*، *سالمونلا تیفی موریوم* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه های شیر و گوشت خام به ترتیب ۱۱ و ۸/۵ درصد، ۵ و ۲ درصد و ۱۶ و ۱۰ درصد بود. قطر هاله عدم رشد هر یک از سوش‌ها با توجه به منبع جداسازی به شکل جداگانه بررسی شد. جدول ۱ و ۲ به ترتیب نتایج مربوط به قطر هاله عدم رشد باکتری‌های جدا شده از گوشت و شیر را برای هر یک از اسانس‌های گیاهان دارویی نمایش می‌دهد. بر اساس نتایج بدست آمده از این تحقیق سوش‌های باکتریایی جدا شده از گوشت مقاومت بیشتری نسبت به تمام اسانس‌های تست شده داشتند اما الگوی اثر بخشی اسانس‌ها بر روی سوش‌های جدا شده از هر دو منبع یکسان بود. نتایج نشان داد که اسانس استخراج شده از گیاه پونه کوهی بیشترین اثر ضد میکروبی خود را روی *استافیلوکوکوس اورئوس* و کمترین اثر ضد میکروبی خود را روی *اشریشیا کلای* داشت که رنج ۷/۶ تا ۱۲/۳ میلی متر را در گوشت و ۶/۲ تا ۱۰/۱ میلی متر را در شیر به خود اختصاص داد. در رابطه با نعناع فلفلی، اسانس استخراج شده از این گیاه بیشترین خاصیت ضد میکروبی خود را روی *اشریشیاکلای* و کمترین خاصیت ضد میکروبی را روی *استافیلوکوکوس اورئوس* داشت که رنج ۱/۸ تا ۸/۲ میلی متر را برای گوشت و ۱/۱ تا ۶/۸ میلی متر را برای شیر به خود اختصاص داد. در نهایت اسانس استخراج شده از زیره سیاه بیشترین اثرات ضد میکروبی خود را روی *استافیلوکوکوس اورئوس* و کمترین اثرات را روی *سالمونلا تیفی موریوم* داشت که رنج ۸/۲ تا ۱۴/۹ میلی متر را برای گوشت و ۷/۷ تا ۱۲/۲ میلی متر را برای شیر به خود اختصاص داد.

جدول ۱- قطر هاله عدم رشد اسانس‌های پونه کوهی، نعناع فلفلی و زیره سیاه بر روی باکتری‌های *اشریشیاکلای*، *سالمونلا تیفی موریوم* و *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی شده از گوشت

سوش‌های باکتریایی	قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر)		
	پونه کوهی	نعناع فلفلی	زیره سیاه
اشریشیا کلای	۷/۰±۶/۸۲^{a}	۸/۰±۲/۹۱^{a}	۱۰/۱±۱/۲۴ ^{a}
سالمونلا تیفی‌موریوم	۱۰/۱±۰/۱۴^{b}	۷/۰±۵/۸۴^{a}	۸/۰±۲/۹۱^{a}
استافیلوکوکوس اورئوس	۱۲/۱±۳/۴۵^{b}	۱/۰±۸/۲۲^{b}	۱۴/۱±۹/۵۶^{b}

حروف غیر مشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنادار آماری در حد $P<0.05$ می‌باشند.

جدول ۲- قطر هاله عدم رشد اسانس‌های پونه کوهی، نعناع فلفلی و زیره سیاه بر روی باکتری‌های *اشریشیاکلای*، *سالمونلا تیفی موریوم* و *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی شده از شیر

سوش‌های باکتریایی	قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر)		
	پونه کوهی	نعناع فلفلی	زیره سیاه
اشریشیا کلای	۶/۰±۲/۷۱^{a}	۶/۰±۸/۸۶^{a}	۸/۰±۴/۹۷ ^{a}
سالمونلا تیفی‌موریوم	۸/۰±۷/۹۳^{b}	۶/۰±۱/۷۷^{a}	۷/۰±۷/۸۳^{a}
استافیلوکوکوس اورئوس	۱۰/۱±۱/۲۸^{c}	۱/۰±۱/۱۶^{b}	۱۲/۱±۲/۳۱^{b}

حروف غیر مشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنادار آماری در حد $P<0.05$ می‌باشند.

بحث

نتایج بررسی حاضر نشان داد که گیاهان پونه کوهی، زیره سیاه و نعناع فلفلی از ظرفیت ضد میکروبی خوبی علیه باکتری‌های *اشریشیاکلای*، *سالمونلا تیفی موریوم* و *استافیلوکوکوس اورئوس* برخوردار هستند. نتایج برگرفته از هاله عدم رشد باکتریایی نشان داد که سوش‌های باکتریایی جدا شده از شیر مقاومت بیشتری نسبت به سوش‌های باکتریایی جدا شده از گوشت داشتند. دلیل بروز مقاومت آنتی بیوتیکی در سوش‌های *اشریشیاکلای*، *سالمونلا تیفی موریوم* و *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از شیر خام و گوشت احتمالا تجویز بی‌رویه آنتی بیوتیک‌ها در عرصه دامپزشکی است. از طرفی امکان انتقال سوش‌های مقاوم به آنتی بیوتیک باکتری‌های *اشریشیاکلای*، *سالمونلا تیفی موریوم* و *استافیلوکوکوس اورئوس* از افراد آلوده‌ای که به‌نحوی با گوشت و شیر در تماس هستند (در کشتارگاه‌ها، قصابی‌ها، در زمان معاینه و بازرسی گوشت و حتی حمل و نقل و توزیع آن و همچنین در سالن‌های شیر دوشی) به این دو منبع غذایی وجود دارد (Marshal et al., 2011). بنابراین تجویز بی‌رویه و خودسرانه آنتی‌بیوتیک‌ها در انسان نیز می‌تواند سبب ایجاد سوش‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک و در اثر عدم توجه صحیح به اصول بهداشت فردی، انتقال آنها به گوشت و شیر گردد. دلیل بالاتر بودن میزان مقاومت سوش‌های *اشریشیاکلای*، *سالمونلا تیفی موریوم* و *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از شیر نسبت به گوشت احتمالا آسان‌تر بودن دفع آنتی‌بیوتیک‌ها در شیر نسبت به گوشت است (Aliali et al., 2004). از طرفی عدم رعایت اصول بهداشتی در سالن‌ها ی شیردوشی، استفاده از ظروف غیر بهداشتی و آلوده برای انتقال شیر و عدم رعایت بهداشت فردی توسط کارکنان سالن‌های شیر دوشی دلایل دیگری برای انتقال سوش‌های مقاوم به آنتی بیوتیک باکتری‌ها به شیر و افزایش میزان مقاومت سوش‌های جدا شده از آن در برابر اسانس‌های پونه کوهی، زیره سیاه و نعناع فلفلی بود. در سال‌های اخیر توجه زیادی به تأثیر عصاره‌های معطر و اسانس-های گیاهی و یا مواد مؤثره این اسانس‌ها روی پاتوژن‌ها و میکروارگانیسم‌های عامل فساد مواد غذایی شده است. امروزه در خصوص اثرات بازدارندگی آنتی بیوتیک‌های طبیعی و اسانس‌های گیاهی مطالعات زیادی صورت می‌گیرد که نشان‌دهنده تلاش در خصوص حذف نگهدارنده‌های شیمیایی و به‌کارگیری نگهدارنده‌های طبیعی است (Daferera and Cowan, 2001; Omidbaigi, 2007; Tepe et al., 2004). بر طبق نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر، نعناع فلفلی کمترین اثرات ضد میکروبی و زیره سیاه بیشترین اثرات ضد میکروبی را از خود نشان دادند. اثرات ضد میکروبی پونه کوهی نسبت به دو گونه دیگر حد واسط بود. بیشترین اثرات ضد میکروبی را برای *استافیلوکوکوس اورئوس* زیره سیاه، *سالمونلا تیفی موریوم* پونه کوهی و *اشریشیاکلای* زیره سیاه داشتند. مطالعات کم و بیش

پراکنده‌ای در این زمینه انجام پذیرفته است. نتایج مطالعه‌ای که بر روی عصاره متانولی و روغن پونه کوهی انجام گرفت، حاکی از آن بود که عصاره متانولی بر روی تعدادی از باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت اثرات ممانعت‌کنندگی رشد دارد که با نتایج ما همخوانی دارد (Chitsaz, 2006). نتـایج حاصـل از مطالعه پیشین نشان داد که فعالیت ضد میکروبی اسانس پونه کوهی مانع از رشد فرم رویشی باکتری‌های *باسیلوس سرئوس* و *باسیلوس سوبتیلیس* در سوپ جو تجارتی می شود (پژوهی المونی و همکاران، ۱۳۹۱). با این وجود، مطالعه مشکی باف و همکاران (۱۳۸۹) (مشکی باف و همکاران، ۱۳۸۹) نشان داد که عصاره هیدروالکلی پونه کوهی هیچ گونه اثرات ضد باکتریایی بر روی *اشریشیا-کلای* و *استافیلوکوکوس اورئوس* از خود نشان نداد که با نتایج ما مغایرت داشت. دلیل اختلاف در نتایج بدست آمده از مطالعه ما و بررسی‌های سایر محققان را می‌توان ناشی از وجود اختلاف در گیاهان هر منطقه دانست، زیرا یک گیاه در مناطق مختلف می تواند ترکیبات و خواص متفاوتی را از خود به نمایش بگذارد. همچنین نوع و نحوه تهیه عصاره نقش حائز اهمیتی در نتایج بدست آمده در مطالعات مختلف دارد. همچنین فاکتورهایی نظیر دما، pH، غلظت نمک، نوع ارگانیسم و میزان ارگانیسم تلقیح شده، فعالیت ضد میکروبی اسانس را تحت تأثیر قرار می‌دهند. اثرات ضد میکروبی بالای اسانس گیاه نعناع فلفلی در مطالعات مختلف بر روی *اشریشیاکلای* (Dorman and Deans, 2000)، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس اینترمدیس* (Tassou et al., 2000)، *اشریشیاکلای* O157:H7 (Moreira et al., 2005) و *سالمونلا تیفی* (Tassou et al., 2000) به اثبات رسیده است. Sivropoulou و همکاران در سال ۱۹۹۵ (Sivropoulou et al., 1995) و همچنین Iscan و همکاران در سال ۲۰۰۰ (Iscan et al., 2000) نشان دادند که اسانس نعناع تاثیر ضد میکروبی بیشتری روی باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی دارد. به نظر می‌رسد که خاصیت آنتی‌باکتریال اجزاء اصلی اسانس‌ها به خاصیت هیدروفوبیک آنها و دیواره غشاء پلاسمایی میکروب بستگی دارد. افزایش مقدار برخی یون‌های ویژه بر روی یا داخل غشاء پلاسمایی تاثیر وسیعی روی نیروی محرکه پروتون‌ها، میزان ATP داخل سلولی و فعالیت کلی سلول‌های میکروبی (شامل کنترل فشار تورم سلول‌های زنده، انتقال مواد حل شونده و تنظیم متابولیسم) دارد. در مطالعه الوندی و همکاران (۱۳۸۹) (الوندی و همکاران، ۱۳۸۹) که به منظور ارزیابی خواص ضد میکروبی نعناع فلفلی انجام پذیرفت، نتایج نشان داد که اسانس گیاه نعناع فلفلی تا غلظت ۳۰۰ قسمت در میلیون روی *اشریشیاکلای*، تا غلظت ۱۵۰ قسمت در میلیون روی *استافیلوکوکوس اورئوس* و تا غلظت ۲۵۰ قسمت در میلیون روی *سالمونلا تیفی* اثر بازدارندگی داشت. به عبارت دیگر غلظت‌های کمتر از موارد یاد شده روی باکتری‌های ذکر شده، موثر نبود. مطالعات کم و بیش پراکنده‌ای نیز بر روی اثرات ضد میکروبی زیره سیاه انجام شده است. در مطالعه‌ای که توسط سلیمانی و همکاران (۱۳۸۹) (سلیمانی و همکاران، ۱۳۸۹) انجام پذیرفت، نتایج نشان داد که بیشترین میزان هاله عدم رشد باکتری‌ها مربوط به *باسیلوس سرئوس* با قطر ۴۵ میلی متر، *باسیلوس سوبتیلیس* ۲۱ میلی متر، *استافیلوکوکوس اورئوس* ۲۰ میلی متر، *شیگلا فلکسنری* ۱۸ میلی متر، اشریشیا کلی ۱۶ میلی متر و *سالمونلا تیفی موریوم* ۸ میلی متر، بود. نام بردگان نشان دادند که دلیل اصلی خواص ضد باکتریایی اسانس زیره، حضور کومین آلدئید در آن است. به نظر می‌رسد که کومین آلدئید، آلفا پینن و سابینن از جمله ترکیبات با خاصیت ضد باکتریایی در اسانس زیره سیاه هستند (Iacobellis et al., 2005). اثرات ضد باکتریایی قابل توجه اسانس زیره سیاه روی *اشریشیاکلای* (Bonyadian and Karim, 2003; Mekawey et al., 2009)، *سالمونلا تیفی موریوم*

(Mekawey et al., 2009)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (Bonyadian and Karim, 2003) و *هلیکوباکتر پیلوری* (Ranjbaran et al., 2005) نیز به اثبات رسیده است. در مطالعه ای دیگر (Momtaz et al., 2013) اثرت ضد باکتریایی زیره سیاه بر روی سوش‌های استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیاکلای*، *سالمونلا تیفی* و *شیگلا دیسانتریه* به اثبات رسید. نام بردگان حضور کومین آلدئید، آلفا پینن و سابینن را دلیل اصلی اثرات ضد میکروبی اسانس زیره سیاه دانستند.

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان داد که سوش‌های *اشریشیا-کلای*، *سالمونلا تیفی موریوم* و *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از گوشت و شیر خام دارای مقاومت ضد میکروبی کمی نسبت به اسانس ۳ گیاه پونه کوهی، نعناع فلفلی و زیره سیاه بودند. پونه کوهی بیشترین اثرات ضد باکتریایی را روی *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا تیفی موریوم*، نعناع فلفلی روی *اشریشیاکلای* و در نهایت زیره سیاه روی *استافیلوکوکوس اورئوس*، داشتند. اگرچه امکان کاربرد آنها به عنوان نگهدارنده ضد میکروبی در گوشت و فراورده‌های آن و همچنین در فراورده‌های لبنی نیاز بررسی بیشتری دارد. افزایش بهداشت عمومی و فردی، دقت در تجویز آنتی بیوتیک-ها، توجه به اصول HACCP و مکانیزه کردن روند شیردوشی و کشتار دام‌ها می تواند از میزان آلودگی شیر و گوشت به سوش‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک *اشریشیا کلای*، *سالمونلا تیفی موریوم* و *استافیلوکوکوس اورئوس* بکاهد.

تشکر و قدردانی

نویسنده مطالعه حاضر از زحمات آقایان دکتر فرهاد صفرپور دهکردی، مهندس منوچهر مومنی و پرسنل زحمتکش مرکز تحقیقات گیاهان دارویی و معطر دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد کمال تشکر و قدردانی را دارند.

منابع

۱ پژوهی المونی، محمد رضا.، تاجیک، حسین.، آخوندزاده، افشین.، گندمی نصر آبادی، حسن و احسانی، علی. (۱۳۹۱). مطالعه ترکیب شیمیایی و فعالیت ضد میکروبی اسانس‌های پونه کوهی (*Mentha longifolia* L.) و زیره سبز (*Cuminum cyminum* L.) در سوپ. فصلنامه علوم و صنایع غذایی. ۳۶ (۹): ۴۵-۳۳.

۲. مشکی باف، محمد حسن.، عبداللهی، عباس.، فصیحی رامندی، مهدی.، عدنانی ساداتی، سید جعفر.، مروج، علی وحاتمی، شیوا. (۱۳۸۹). اثرات ضد باکتریایی عصاره هیدروالکی پونه کوهی، مروه تلخ، زرشک وحشی، چای کوهی. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی سمنان. ۱۱(۴): ۲۴۵-۲۴۰.

۳. الوندی، رضا.، شریفان، انوشه و آقازادمشگی، مه زاد. (۱۳۸۹). بررسی ترکیب شیمیایی و اثر ضد میکروبی اسانس گیاه نعناع فلفلی (*Mentha piperita*). پاتوبیولوژی مقایسه ای. ۴(۷): ۳۶۴-۳۵۵.

۴. سلیمانی، ندا.، ستاری، مرتضی.، سپهری سرشت، سعید.، دانشمندی، سعید و درخشان، صفورا. (۱۳۸۹). ارزیابی اثرات متقابل داروئی و فعالیت ضد باکتریایی اسانس زیره سیاه (Bunium persicum) بر ضد تعدادی از باکتری‌های گرم مثبت وگرم منفی. مجله میکروب شناسی پزشکی ایران. ۴(۱ و ۲): ۳۴-۲۶.

5. Alali, W.Q., Sargeant, J.M., Nagaraja, T.G., and DeBey, B.M. 2004. Effect of antibiotics in milk replacer on fecal shedding of Escherichia coli O157:H7 in calves. J Anim Sci. 82: 2148-2152.
6. Bernath, J. 2000. Medicinal and aromatic plants. Flav Frag J. 4: 85-89.
7. Bonyadian, M., and Karim, G. 2003. Study of the effects of some volatile oil of herbs Pennyroyal, Peppermint, Tarragon, Caraway seed and Thyme against E. coli and S. aureus in broth media. J Vet Med Tehran Uni. 57: 81- 83.

8. Chitsaz, M. 2006. Invitro Evaluation of Antibacterial Effect of Stachys schtschegleevii. Med Daneshvar. 67: 12-19.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2012. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-second informational supplement M100-S21, Wayne Pa.
10. Davis, B.I., 1990. The importance of the geometric mean MIC. J Antimicrob Chemothar. 25: 471-472.
11. Daferera, D., and Cowan, M.M. 2001. Plant products as antimicrobial agents. J Ethnopharmacol. 74: 221-226.
12. 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 Notes. 7: 1-8.
13. Di Giannatale E, Prencipe V, Tonelli A, Marfoglia C, and Migliorati G. 2011. Characterisation of Staphylococcus aureus strains isolated from food for human consumption. Vet Ital. 47: 165-173.
14. Dorman, H.J., and Deans, S.G. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activities of plant volatile oils. J Appl Microbiol. 88: 308-316.
15. Fournomiti, M., Kimbaris, A., Mantzourani, I., Plessas, S., Theodoridou, I., Papaemmanouil, V., Kapsiotis, I., Panopoulou, M., Stavropoulou, E., Bezirtzoglou, E.E., and Alexopoulos, A. 2015. Antimicrobial activity of essential oils of cultivated oregano (Origanum vulgare), sage (Salvia officinalis), and thyme (Thymus vulgaris) against clinical isolates of Escherichia coli, Klebsiella oxytoca, and Klebsiella pneumoniae. Microb Ecol Health Dis. 26: 23289.
16. Grondona, E., Gatti, G., López, A.G., Sánchez, L.R., Rivero, V., Pessah, O., Zunino, M.P., and Ponce, A.A. 2014. Bio-efficacy of the essential oil of oregano (Origanum vulgare Lamiaceae. Ssp. Hirtum). Plant Foods Hum Nutr. 69: 351-357.
17. Iacobellis, N.S., Lo Cantore, P., Capasso, F., and Senatore, F. 2005. Antibacterial activity of Cuminum cyminum L. and Carum carvi L. essential oils. J Agric Food Chem. 53: 57-61.
18. Iscan, G., Kirimer, N., Kurkcouglu, M., Husnu Canbaser, K., and Demirci, F. 2002. Antimicrobial screening of Mentha piperita essential oils. J Agric Food Chem. 50: 3943-3946.
19. Johri, R.K. 2011. Cuminum cyminum and Carum carvi: An update. Pharmacogn Rev. 5: 63-72.
20. Kluytmans, J.A. 2010. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in food products: cause for concern or case for complacency. Clin Microbiol Infect. 16: 11-15.
21. Marshall, B.M., and Levy, S.B. 2011. Food animals and antimicrobials: impacts on human health. Clin Microbiol Rev. 24: 718-733.
22. McLaughlin, J.B., Castrodale, L.J., Gardner, M.J., Ahmed, R., and Gessner, B.D. 2006. Outbreak of multidrug-resistant Salmonella typhimurium associated with ground beef served at a school potluck. J Food Prot. 69: 666-670.
23. Mekawey, A.A.I., Mokhtar, M.M., and Farrag, R.M. 2009. Antitumor and antibacterial activities of [1-(2- Ethyl, 6-Heptyl) Phenol] from Cuminum Cyminum seeds. J App Scienc Res. 5: 1881-1888.
24. Mikaili, P., Mojaverrostami, S., Moloudizargari, M., and Aghajanshakeri, S. 2013. Pharmacological and therapeutic effects of Mentha Longifolia L. and its main constituent, menthol. Anc Sci Life. 33: 131-128.
25. Mimica-Dukić, N., Bozin, B., Soković, M., Mihajlović, B., and Matavulj, M. 2003. Antimicrobial and antioxidant activities of three Mentha species essential oils. Planta Med. 69: 413-419.
26. Momtaz, H., Safarpoor Dehkordi, F., Rahimi, E., Ezadi, H., and Arab, R. 2013. Incidence of Shiga toxin-producing Escherichia coli serogroups in ruminant's meat. Meat Sci. 95: 381-388.

27. Moreira, M.R., Ponce, A.G., Dell vella, C.E., and Roura, S.I. 2005. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. LWT Food Sci Tech. 38: 565-570.
28. Omidbaigi, R. 2007. Production and Processing of Medicinal Plants. Mashhad.
29. Ranjbaran, P., Sadeghian, S., Shirazi, M.H., Sarraf-Nejad, A., Fazeli, M.R., Amin, G.H. 2005. Antibacterial effects of Cinnamon verum, Bunium persicum, Foeniculum vulgare and Anethum graveolens extracts on Helicobacter pylori via disk diffusion and flow cytometry. J Hamedan Univ Medl Sci. 33: 42- 47.
30. Sivropoulou, A., Kokkini, S., Lanaras, T., Arsenakis, M., Papaniko laou, E., and Nikolaou, C. 1996. Antimicrobial and cytotixic activities of Origanum essential oil concentration. J Agric Food Chem. 44: l202-1205.
31. Syed, M., and Hanif, M. 1985. Antimicrobial activity of the essential oil of the umbelliferae family part 1. Cuminum cyminum, Coriandrum sativum, Foeniculum vulgar and Bunium persicum oils. Pak J Scient Indust Res. 55: 116-120.
32. Tassou, C., Koutsoumaris, K., Nychas, G.J.E. 2000. Inhibition of Salmonella enteritidis and Staphylococcus Aureus in nutrient broth by mint essential oil. Food Res Int. 33: 273-280.
33. Tepe, B., Donmaz, E., Unlu, M., Candan, F., and Vadar-Unlu, G. 2004. Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of Salvia cryptantha and Salvia multicaulis. Food Chem. 84:519-525.

Study the antimicrobial effects of the essential oils of *Origanum vulgare, Mentha piperita and Carum carvi on the bacteria isolates from food stuffs*

Mehrdad Ataie Kachouei

Department of Medicinal Plants, College of Food and Drug, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran.

Corresponding author: *Mehrad.ataie@gmail.com*.

Received: 2015.11.23 Accepted: 2016.01.20

Abstract

The need to replace synthetic preservatives with a natural resource has caused the food manufacturers to use from the medicinal plants as a reservoir. The present study was carried out to evaluate the antimicrobial effects of essential oils extracted from *Origanum vulgare, Mentha piperita and Carum carvi* on the *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhimurium* isolated from food products. After preparation of medicinal plants, essence extraction was done using the Clevenger device and antimicrobial effects of essences were evaluated on *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhimurium* isolated from raw milk and meat. Diameter of inhibition zone each essence was determined using the simple disk diffusion method on Mueller-Hinton agar. Bacterial isolates of meat were more resistant to all tested essences but the pattern of the effectiveness of essential oils on isolated strains was similar in both sources. Essential oil extracted from *Origanum vulgare* had the highest antimicrobial effect on *S. aureus* and the lowest on *E. coli, Mentha piperita* had the highest antimicrobial effect on *E. coli* and the lowest on *S. aureus* and *Carum carvi* had the highest antimicrobial effect on *S. aureus* and the lowest on *S. typhimurium*. According to the antibacterial effects of the mentioned essential oils, the possibility of their application as an antimicrobial preservative in meat and its products and also dairy products dairy is existing.

Keywords: *Origanum vulgare, Mentha piperita, Carum carvi,* Antimicrobial effects, Foodborne bacteria.