بررسی و مقایسه‌ی اثر عصاره‌ی متانولی و آبی گیاه نعناع، رزماری و اسطوخودوس بر رشد *اشرشیاکلی* و *باسیلوس سرئوس*

بهاره صحرائیان[1]، فریبا نقی پور[1*]، فریده طباطبایی یزدی[2]

[1]دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
[2] عضو هیات علمی گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۵/۱۳

چکیده

در این پژوهش، اثر عصاره‌ی متانولی و آبی گیاه نعناع (*Matricaria recutita L*)، رزماری (*Rosmarinus Officinalis L*) و اسطوخودوس (*Lavandula sp*) بر *اشرشیاکلی* (*Escherichia. coli*) و *باسیلوس سرئوس* (*Bacillus cereus*) به ترتیب به عنوان باکتری شاخص گرم منفی و گرم مثبت در پنج سطح ۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پس از ۲۴ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج به دست آمده از این پژوهش، حاکی از آن بود که افزایش غلظت هر یک از عصاره‌ها سبب افزایش اثر ضدباکتریایی آن‌ها شد و بیش‌ترین اثر بازدارندگی مربوط به عصاره‌ی اسطوخودوس در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود ($p<0.01$). هم‌چنین با مقایسه‌ی نتایج به دست آمده، استنباط گردید که اثر بازدارندگی عصاره‌های مورد استفاده در این پژوهش بر *باسیلوس سرئوس* بیش‌تر از *اشرشیاکلی* است و عصاره‌های متانولی نسبت به عصاره‌های آبی نقش ضدباکتریایی بیش‌تری دارند.

واژه‌های کلیدی: نعناع، رزماری، اسطوخودوس، عصاره‌ی متانولی و آبی، *اشرشیاکلی*، *باسیلوس سرئوس*.

* مسوول مکاتبه: naghipoor_f @yahoo.com

۱- مقدمه

عصاره‌های گیاهی تقریباً از قرن سیزدهم تولید و عرضه شده اند، ولی استفاده از آن‌ها تا قرن شانزدهم به صورت وسیع درنیامده بود زیرا با گسترش شاخه‌های مختلف علوم، استفاده از مواد شیمیایی در تولید دارو، توجه محققین را به خود معطوف کرد. پس از شناسایی پنی سیلین در دهه‌ی چهل میلادی و گسترش استفاده از آن در درمان، هر روزه آنتی‌بیوتیک‌های جدیدی برای درمان عفونت‌ها ارائه گردید. استفاده‌ی بی رویه از این داروهای ضدمیکروبی منجر به افزایش مقاومت‌های دارویی علیه آنتی بیوتیک‌های متفاوت در اکثر باکتری‌ها شده است. همین موضوع در محققین انگیزه‌ی استفاده از گیاهان دارویی به عنوان مواد طبیعی کم خطر در دسترس و ارزان قیمت را نسبت به آنتی بیوتیک‌های سنتتیک در درمان عفونت‌های باکتریال ایجاد کرد (۸،۵). بدین منظور، نخستین بار دلاکروکس[1] در سال ۱۸۸۱ اولین اندازه‌گیری جهت تعیین خواص ضدباکتریایی عصاره‌ها را انجام داد. سرانجام در قرون ۱۹ و ۲۰ استفاده از خواص طعمی و بویی عصاره‌ها بر مصارف پزشکی آن‌ها ارجحیت یافت. بیش‌ترین استفاده از این مواد مربوط به کشورهای عضو اتحادیه اروپا می شد که این موارد شامل صنایع آرایشی، بهداشتی و عطرها، مصارف طبی و دارویی به عنوان ضد میکروب و ضد عفونی کننده و برای بهبود طعم داروها بود و اما امروزه با توجه به سوابق پیشین در زمینه‌ی استفاده از گیاهان دارویی، موج جدید مطالعات گسترده‌ی جهانی و معرفی اثرات ضدباکتری گیاهان مختلف بسیار مورد توجه قرار گرفته است(۲، ۳ و ۷). در همین راستا، رضایی و رسولی (۲۰۰۰) اثر ضد باکتریایی عصاره‌ی آویشن[2] را بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*[3] و *اشرشیاکلی*[4] مورد بررسی قرار دادند که نتایج نشان داد که عصاره‌ی آویشن در رقت ۱/۱۶ از رشد *اشرشیاکلی* و در رقت ۱/۸ از رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* جلوگیری می کند(۶). سارا برت در سال ۲۰۰۴ به بررسی اثرات ضد باکتریایی برخی از عصاره‌های گیاهی علیه باکتری‌های *لیستریا مونوسیتوژنز*[5]، *سالمونلا تیفی موریوم*[6]، *اشرشیاکلی*، *شیگلا دیسنتری*[7]، *باسیلوس سرئوس*[8] و *استافیلوکوکوس اورئوس*[9] در غلظت‌های ۰/۲ تا ۱۰ میکرومول بر میلی‌لیتر پرداخت که نتایج این تحقیق حداقل غلظت ممانعت کنندگی[10] علیه هریک از باکتری‌ها را تعیین نمود.از طرفی این محقق، عنوان نمود که اثر ضد باکتریایی هریک از این عصاره‌ها بر روی باکتری‌های گرم مثبت بیش تر از گرم منفی است و شرایط فیزیکی از جمله pH پائین، دما و سطح اکسیژن کم قادر به عملکرد بهتر هریک از این عصاره‌ها بود(۳). والرو و سالمرون (۲۰۰۳) به بررسی اثرات ضد میکروبی یازده عصاره‌ی گیاهی علیه باکتری *باسیلوس سرئوس* پرداختند که نتایج، نشان داد که به ترتیب عصاره‌ی نعناع فلفلی[11]، مریم گلی[12] و آویشن در غلظت‌های ۰/۵، ۰/۳۵ و ۰/۲۵ میلی گرم بر میلی‌لیتر می تواند رشد باکتری *باسیلوس سرئوس* را مهار کنند(۹).

با توجه به فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌ها و کارایی آن‌ها علیه میکروارگانیسم‌ها، هدف از انجام این تحقیق، بررسی و مقایسه‌ی اثر ضد باکتریایی عصاره‌ی آبی و متانولی سه گونه‌ی گیاهی نعناع، رزماری[13] و اسطوخودوس[14] بر میزان رشد باکتری‌های *اشرشیاکلی* و *باسیلوس سرئوس* به عنوان باکتری‌های حائز اهمیت در ایمنی مواد غذایی بود.

۲- مواد و روش‌ها

این مطالعه‌ی تجربی در سال ۱۳۸۹ در آزمایشگاه میکروبیولوژی صنعتی دانشکده‌ی کشاورزی، گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه فردوسی مشهد انجام گرفت.

گیاهان مورد استفاده نعناع، رزماری و اسطوخودوس بودند که از مزرعه‌ی دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد جمع آوری شدند. نمونه‌های گیاهی پس از انتقال به آزمایشگاه، برای مدتی دور از نور مستقیم خورشید قرار گرفتند تا خشک شوند. در ادامه، جهت عصاره گیری از این گیاهان خشک از روش ماسراسیون[15] و حلال‌های مختلف شامل آب و متانول ۸۰ درصد

1 . Delacroix
2 . *Thymus valgaris*
3 . *Staphylococcus aureus*
4 . *Escherichia coli*
5 . *Listeria monocytogenes*
6 . *Salmonella typhimurium*
7 . *Shigella dysenteria*
8. *Bacillus cereus*
9 .*Staphylococcus aureus*
10 . Minimum Inhibitory Concentration (MIC)
11 . *Matricaria recutita L.*
12 . *Salvia Officinalis*
13 . *Rosmarinus Officinalis L.*
14 . *Lavandula sp.*
15 . Maceration

استفاده گردید. بدین منظور، مقدار ۳۰۰ گرم از گیاه خشک را با ترازو (با دقت ۰/۰۱)، درون ارلن ۵۰۰ میلی‌لیتری توزین و به آن ۳۰۰ میلی‌لیتر حلال (آب یا متانول ۸۰ درصد) اضافه و سپس به مدت ۴۸ ساعت در دمای درجه‌ی۲۵ سانتیگراد (بر روی شیکر) عمل عصاره گیری انجام شد. پس از این مدت، محلول را از کاغذ صافی واتمن عبور داده و مایع عبور کرده توسط دستگاه تقطیر تغلیظ گردید. عمل تغلیظ نهایی عصاره‌ی متانولی در دمای ۷۰ درجه‌ی سانتیگراد و عصاره‌ی آبی در دمای ۱۰۰ درجه‌ی بن ماری صورت پذیرفت. عصاره‌های تغلیظ شده تا حذف کامل حلال به پلیت‌های مخصوص انتقال یافتند. سپس، پنج غلظت ۰ (شاهد)، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر هریک از عصاره‌ها تهیه شد (۱).

جهت ادامه‌ی پژوهش از سویه‌های خالص *اشرشیاکلی* و *باسیلوس سرئوس* که از قبل توسط یک گروه تخصصی در آزمایشگاه میکروبیولوژی صنعتی دانشکده‌ی کشاورزی، به ترتیب از محیط کشت ائوزین متیلن بلو (خریداری شده از شرکت مرک آلمان) و دمن روگوسا شارپ (خریداری شده از شرکت مرک آلمان) ایزوله و خالص سازی گردیده بود، استفاده شد. به منظور بررسی اثرات ضدباکتریایی عصاره‌ی هریک از گیاهان (نعناع، رزماری و اسطوخودوس) از کلنی ۲۴ ساعته *اشرشیاکلی* در محیط کشت ائوزین متیلن بلو[1] و *باسیلوس سرئوس* در محیط کشت دمن روگوسا شارپ[2] (به همراه زرده تخم مرغ) به کمک لوپ برداشته و در یک لوله آزمایش استریل حاوی ۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل کاملاً مخلوط کرده تا سوسپانسیون یکنواختی از باکتری موردنظر حاصل شد. این لوله به مدت ۳۰ دقیقه در گرمخانه ۳۷ درجه‌ی سانتیگراد قرار داده شد تا کدورتی مشابه لوله‌ی استاندارد نیم مک فارلند ($1/5 \times 10^{-8}$ Cfu/ml) ایجاد نماید. سپس T توسط سوآب استریل از لوله حاوی سوسپانسیون باکتری مقداری برداشت نموده و سوآب آغشته به میکروب را روی پلیت حاوی محیط کشت ائوزین متیلن بلو (در مورد باکتری *اشرشیاکلی*) و محیط کشت دمن روگوسا شارپ (در مورد باکتری *باسیلوس سرئوس*) به صورت خطوط موازی در سه جهت (عمودی، افقی، مورب) بر هم کشت داده به گونه ای که تمام سطح پلیت از یک لایه‌ی میکروبی یکنواخت پوشش یافت. سپس، دیسک‌های حاوی عصاره با غلظت‌های متفاوت روی پلیت‌ها به فواصل مناسب قرار گرفت و از یک دیسک فاقد عصاره به عنوان نمونه‌ی کنترل به منظور مقایسه‌ی میزان رشد باکتری‌ها در حضور دیسک‌های حاوی عصاره، استفاده شد.(۱). جهت تهیه‌ی دیسک‌های حاوی عصاره، دیسک‌های بلانک استریل را به تعداد مشخص در غلظت‌های تهیه شده از عصاره قرار داده و به مدت زمان ۲۴ ساعت به محتویات داخل ظرف زمان داده شد تا عصاره‌ها کاملاً جذب دیسک‌های کاغذی شود. در نهایت، درب پلیت‌های دیسک‌گذاری شده را بسته و به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفتند تا باکتری‌ها رشد کنند و میزان رشد هریک از باکتری‌ها در حضور و عدم حضور (نمونه کنترل یا پلیت حاوی دیسک فاقد عصاره) عصاره‌ی گیاهان دارویی مورد آزمایش، مورد ارزیابی قرار گیرد.

ارزیابی داده‌های جمع آوری شده از لگاریتم تعداد باکتری‌ها در حضور هر یک از عصاره‌های گیاهی و نمونه‌ی شاهد (نمونه‌ی کنترل یا پلیت حاوی دیسک فاقد عصاره) از طریق نرم افزار Mstat-c به صورت طرح کاملاً تصادفی و با استفاده از آزمون دانکن در سطح معناداری ۹۹ درصد مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

۳- نتایج و بحث

نتایج حاصل از آنالیز آماری داده‌ها نشان داد که عصاره‌ی متانولی و آبی حاصل از سه گیاه نعناع، رزماری و اسطوخودوس به طور معنی داری ($P<0.01$) بر میزان رشد باکتری‌های *اشرشیاکلی* و *باسیلوس سرئوس* اثر داشتند و بیش‌ترین اثر ضدباکتریایی مربوط به غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود (شکل ۱).

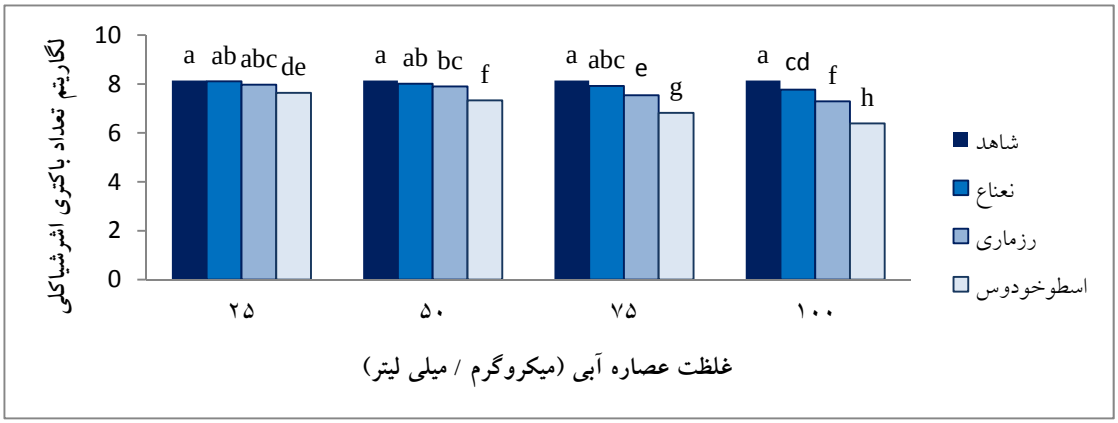
هم‌چنین در پژوهش حاضر، مشخص گردید که اثر عصاره‌ی اسطوخودوس بیشتر از رزماری و نعناع است (شکل های ۱تا۴). به طور مثال، تعداد باکتری‌های *اشرشیاکلی* در حضور ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره‌ی متانولی اسطوخودوس، رزماری و نعناع به ترتیب به میزان ۱/۵۴، ۱/۴۱ و ۱/۱۷ سیکل لگاریتمی کاهش یافت. این یافته با نتایج سارا برت (۲۰۰۴) که نشان داد اثر ضدباکتریایی عصاره‌ی اسطوخودوس از عصاره‌ی رزماری در کاهش جمعیت باکتریایی اشرشیا کلی بیش‌تر است، مطابقت دارد. به طور کلی، اثر ضدباکتریایی عصاره‌ها به ترکیبات موجود در آن‌ها از جمله ترکیبات فنولیک بستگی دارد. اثر ضدباکتریایی

1 . Eosin methylene blue
2 . De Man Rogosa Sharp (MRS)

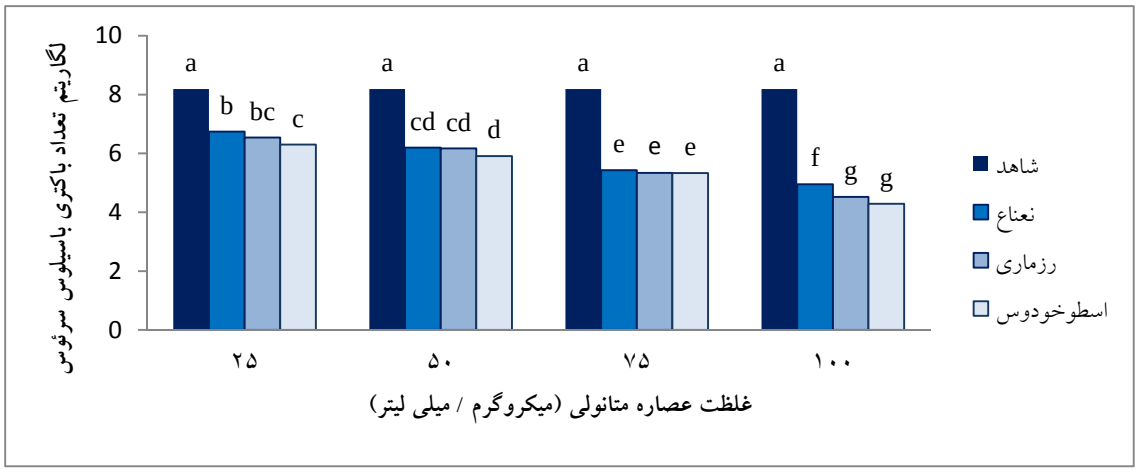
ترکیبات فنولیک به دلیل نفوذ پذیر نمودن غشای سلول باکتری است که می توانند با کاتیون‌های غشا کلاته شده و فعالیت حیاتی را مختل کنند(۳و۴).

در ادامه‌ی پژوهش حاضر با مقایسه نتایج ارائه شده در شکل ۴-۱ استنباط گردید که اثر ضدباکتریایی عصاره‌های گیاهی استفاده شده در این پژوهش بر باکتری *باسیلوس سرئوس* (گرم مثبت) بیش‌تر از باکتری *اشرشیاکلی* (گرم منفی) بوده است به طوری که در اثر افزودن ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره‌ی آبی نعناع، لگاریتم تعداد باکتری *اشرشیاکلی* و *باسیلوس سرئوس* به ترتیب به میزان ۰/۰۳ و ۰/۱۸ کاهش یافت. در این زمینه، سارا برت (۲۰۰۴) نیز طی پژوهشی گزارش کرد که تاثیر عصاره‌های گیاهی (اسطوخودوس، رزماری، دارچین، پونه‌ی کوهی و غیره) بر روی باکتری‌های گرم منفی کم‌تر از باکتری‌های گرم مثبت بوده است که این امر به دلیل وجود لایه‌ی لیپوپروتئین- لیپوپلی ساکاریدی موجود در پپتیدوگلیکان دیواره‌ی سلولی باکتری‌های گرم منفی نسبت به باکتری‌های گرم مثبت است که سبب ایجاد مقاومت بیش تر در برابر ترکیبات ضدباکتریایی موجود در هریک از عصاره‌ها می گردد(۴و۱۰).

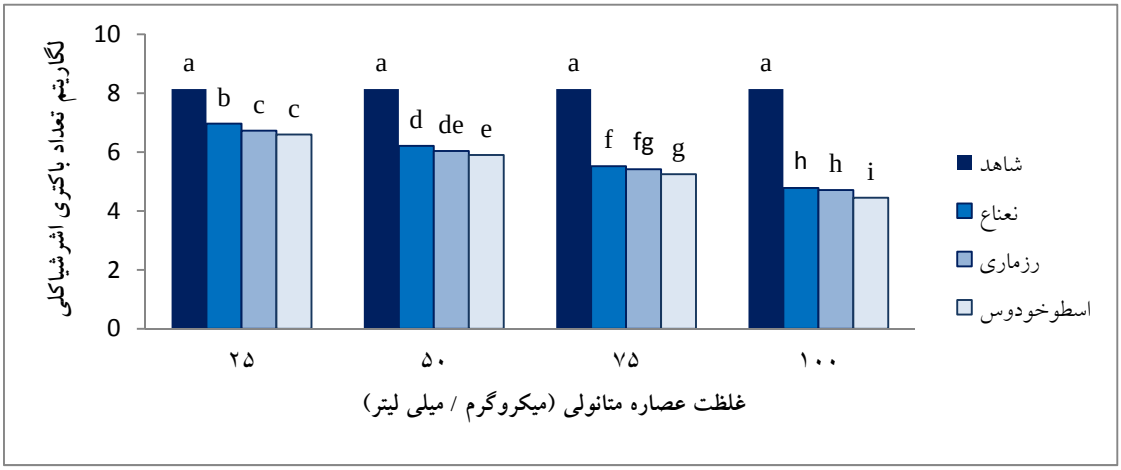
هم‌چنین با مقایسه‌ی شکل های ۱تا۴ مشخص گردید که اثر ضد باکتریایی عصاره‌ی متانولی این گیاهان نسبت به عصاره‌ی آبی آن‌ها بر روی هر دو باکتری، بیش‌تر است که با نتایج کمیلی زاده و همکاران (۱۳۸۵) که به بررسی اثر عصاره‌ی آلی و آبی گیاه گندم در چهار سطح ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر روی باکتری گرم منفی و گرم مثبت پرداختند، مطابقت دارد. این پژوهشگران، عنوان نمودند عصاره‌ی آلی (اتری، متانولی و اتردوپترولی) گندم دارای اثر ضدباکتریایی بیش تری نسبت عصاره‌ی آبی آن بر روی برخی از باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت می‌باشد. علاوه بر این، در پژوهش آن‌ها معلوم گردید که با افزایش غلظت هریک از عصاره‌ها از ۲۵ تا ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اثر ضد باکتریایی افزایش می یابد که این اثر بر باکتری‌های گرم مثبت، بیش تر از باکتری‌های گرم منفی بوده است.



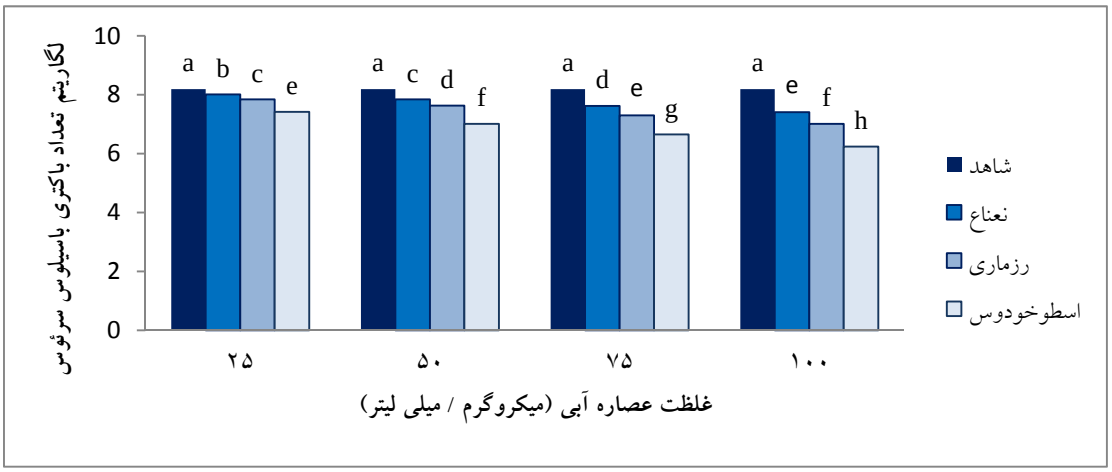
شکل ۱- لگاریتم تعداد باکتری اشرشیاکلی متأثر از غلظت‌های عصاره‌ی آبی نعناع، رزماری و اسطوخودوس پس از ۲٤ ساعت



شکل۲- لگاریتم تعداد باکتری باسیلوس سرئوس متأثر از غلظت‌های عصاره‌ی آبی نعناع، رزماری و اسطوخودوس پس از ۲٤ ساعت



شکل۳- لگاریتم تعداد باکتری اشرشیاکلی متأثر از غلظت‌های عصاره‌ی متانولی نعناع، رزماری و اسطوخودوس پس از ۲٤ ساعت



شکل٤- لگاریتم تعداد باکتری باسیلوس سرئوس متأثر از غلظت‌های عصاره‌ی متانولی نعناع، رزماری و اسطوخودوس پس از ۲٤ ساعت

٤- نتیجه گیری

نتایج به دست آمده نشان داد که عصاره‌ی متانولی و آبی گیاهان نعناع، رزماری و اسطوخودوس در هر چهار سطح ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به طور معنی داری ($P<0.01$) بر لگاریتم تعداد باکتری‌های *اشرشیاکلی* و *باسیلوس سرئوس* اثر داشتند که افزایش غلظت هریک از این عصاره‌ها سبب تشدید خاصیت ضدباکتریایی آن‌ها شد و همچنین مشخص گردید که اثر عصاره‌ی متانولی و آبی اسطوخودوس بیش تر از رزماری و نعناع است. ذکر این امر، ضروری است که مقاومت باکتری گرم منفی *اشرشیاکلی* به دلیل وجود لایه‌ی لیپوپروتئین- لیپوپلی ساکاریدی موجود در پپتیدوگلیکان دیواره‌ی سلولی نسبت به باکتری گرم مثبت *باسیلوس سرئوس* در برابر خاصیت ضد باکتریایی عصاره‌ی هریک از گیاهان مورد آزمایش، بیش تر بود. همچنین، عصاره‌ی متانولی هریک از این گیاهان نسبت به عصاره‌ی آبی آن‌ها اثر ضدباکتریایی بیش تری را داشت که این امر به احتمال زیاد به دلیل حضور ترکیبات فنولیک بیش تر در عصاره‌ی متانولی نسبت به عصاره‌ی آبی است. بنابراین، به کارگیری غلظت مناسب عصاره‌ی متانولی گیاهان طبیعی نظیر نعناع، رزماری و اسطوخودوس را در مواد غذایی مطابق با ذائقه‌ی مصرف کنندگان به دلیل ایجاد ایمنی مناسبی که در جلوگیری یا کاهش رشد باکتری‌های شاخص آلوده کننده مواد غذایی ایجاد می نماید، توصیه می گردد.

٥- منابع

۱. کمیلی زاده، ح.، حاکمی والا، م.، کمالی نژاد، م. و نشاط آشفته، س. ۱۳۸۶. بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره‌های آلی و آبی دانه‌های گیاه *Triticum sativum Lam.* بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی. فصلنامه‌ی گیاهان دارویی، سال هفتم، ۲۸: ۱۱۱-۱۰۵.

۲. موسوی، ح.، آخوند زاده بستی، ا.، میثاقی، ع.، جباری خامنه، ح.، کریم، گ. و زهرایی صالحی، ت. ۱۳۸۷. بررسی اثر اسانس گیاه آویشن شیرازی بر روی میزان رشد *سالمونلا تیفی موریوم* در سوپ جو تجارتی. فصلنامه‌ی گیاهان دارویی، سال نهم، ۳۴: ۱۱۶-۱۰۹.

3.Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential application in foods-a review. *Int. J. Food Microbiol*. 2004; 94: 223 -53.

4.Helander, I., Alakomi, K., Latva-Kala, T., Mattila-Sandholm, I., Pol, E., Smid, LG., Gorris, M and Von Wright A. Characterization of the action of selected essential oil components on gram negative bacteria. *J. Agri. Food Chem*. 1998; 46:3590-5.

5.Misaghi, A., Akhondzadeh Basti, A. 2007. Effects of Zataria multiflora Boiss. Essential oil and nisin on Bacillus cereus ATCC 11778. *Food Control*; 8(9): 1043-9.

6.Rezai, M.B. and Rasooli, I. 2000. Chemical components and biological activity of essential oils of *Thymus0x-prolock and Mentha longifolia. Daneshvar* 8 (31): 1-8.

7. Shan, B., Cai, Y.Z., Brooks, J.D. and Corke, H. 2007. The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *Int J Food Microb*; 117: 112-19.

8.Shariat, H.S. 1998. Extraction of beneficial materials from medicine plants, identification methods and their evaluation. Mani press. pp: 6 - 20.

9.Valero, M., Salmeron, M.C. Antimicrobial Activity of 11 Essential oils Against *Bacillus cereus* in Tyndallized Carrot Broth. *International Journal of Food Microbilogy* 2003; 85:73-81.

10. Vannini, L., Lanciotti, R., and Guerzoni, M.E. 2004. Interaction between high pressure homogenization and antimicrobial activity of lysozyme and lactoperoxidase. International *Journal of Food Microbiology*; 94: 123-35.