

بررسی ترکیبات شیمیایی و فعالیت ضدباکتریایی اسانس‌های پونه، نعنا و آویشن

ندا عزیزی تبریززاد^۱، سید مهدی سیدین اردبیلی^{۲*}، محمد حجتی^۳

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

۲- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

۳- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۶/۰۵/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۲/۱۵)

چکیده

امروزه با توجه به اثبات اثرات نامطلوب مواد ضد میکروبی شیمیایی بر سلامتی انسان و نیز به دلیل تمایل روزافزون مصرف‌کنندگان به مصرف ترکیبات طبیعی، تلاش برای جایگزینی نگره‌دارنده‌های سنتزی با انواع طبیعی رو به افزایش است. با توجه به این واقعیت که یکی از بهترین منابع ترکیبات ضد میکروبی، ترکیبات موجود در گیاهان است، در تحقیق حاضر ضمن شناسایی ترکیبات موثره سه اسانس پونه، نعنا و آویشن خواص ضد میکروبی آن‌ها نیز بررسی شد. جهت تجزیه و شناسایی اسانس‌ها از دستگاه گاز کروماتوگرافی طیف سنجی جرمی (GC/MS) استفاده شد. خواص ضد باکتریایی اسانس‌های مذکور بر تعدادی از باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت در مقایسه با آنتی بیوتیک‌های رایج نظیر کلرامفنیکل و تتراسایکلین به روش انتشار دیسک مورد بررسی قرار گرفت. در این بررسی، ۴۰ ترکیب فرار در اسانس آویشن شناسایی گردید که تیمول (۳۰/۶۱٪)، کارواکرول (۲۲/۱۸٪)، پاراسیمن (۷/۳۴٪)، گاماترپینن (۶/۶۶٪) و لینالول (۵/۲۶٪) عمده ترکیبات موجود در اسانس آویشن بودند، ۳۱ ترکیب شیمیایی در اسانس پونه شناسایی شد که پیریتون (۳۲/۱۶٪)، پیریتون (۲۹/۶۲٪) و آلفاترپینول (۶/۴۰٪) عمده ترکیبات موجود در اسانس پونه بودند. همچنین ۲۷ ترکیب در اسانس نعنا شناسایی گردید که کارون (۵۱/۰۳٪) و لیمونن (۲۱/۱۲٪) عمده ترکیبات موجود در اسانس نعنا بودند. نتایج این پژوهش نشان داد باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های منفی حساسیت بیشتری به اسانس‌های مورد مطالعه داشتند. همچنین اسانس گیاه آویشن اثر بازدارندگی بیشتری نسبت به پونه و نعنا دارد، که این امر احتمالاً به دلیل وجود مقادیر بیشتر تیمول و کارواکرول در برگ‌های این گیاه می‌باشد. نتایج نشان داد که اسانس آویشن می‌تواند به‌عنوان یک نگهدارنده طبیعی در مواد غذایی به‌کار گرفته شود.

کلید واژگان: پاتوزن، اسانس، نعنائیان، گازکروماتوگرافی متصل به طیف‌سنج جرمی

* مسئول مکاتبات: mahdi_sayedain@yahoo.com

۱- مقدمه

آنتی‌بیوتیک مقاومت از خود نشان می‌دهند و قابلیت این را دارد که به طور همزمان در برابر چندین آنتی‌بیوتیک از خود مقاومت نشان دهد. این ویژگی‌ها باعث شده تا روش‌ها و ترکیبات جدیدی برای درمان آن‌ها مورد مطالعه قرار گیرد. ترکیباتی که علاوه بر اثر میکروب‌کشی مناسب، روند تولید سویه‌های مقاوم در آن کاهش یابد و اثرات جانبی کمتری را دارا باشد [۱۰ و ۱۱]. در میان گیاهان دارویی پونه (*pennyroyal*)، نعنا (*mint*) و آویشن (*thyme*) از پرمصرف‌ترین گیاهانی هستند که از گذشته تاکنون به عنوان گیاه دارویی با ارزش مصرف شده و در تمام فارماکوپه‌های معتبر ثبت شده‌اند. اسانس گیاهان پونه، نعنا و آویشن علاوه بر دارا بودن اثرات ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی گسترده، دارای مصارف خوراکی نیز هستند که نشان‌دهنده کم بودن اثرات جانبی مصرف آنها نسبت به سایر ترکیبات است. هدف از انجام این مطالعه، استخراج اسانس این گیاهان و شناسایی ترکیبات فرار موجود در آن‌ها و از آنجا که باکتری‌ها در عفونت‌ها و مسمومیت‌های غذایی اهمیت دارند، بررسی اثرات ضدباکتریایی اسانس‌های استخراج شده بر چند باکتری پاتوژن غذایی می‌باشد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- استخراج اسانس

گیاهان آویشن (*Thymus vulgaris*)، نعنا (*Mentha spicata*) و پونه (*Mentha pulegium*) که به خانواده نعنائیان تعلق از منطقه ملاثانی و از مزرعه تحقیقاتی و زمین‌های دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان واقع در کیلومتر ۳۰ جاده اهواز-مسجدسلیمان جمع‌آوری گردیدند. شناسایی جنس و گونه گیاهان توسط دکتر علی‌رضا ابدالی مشهدی در دانشکده کشاورزی انجام پذیرفت. استخراج اسانس گیاهان جمع‌آوری شده به روش تقطیر آبی انجام پذیرفت و بدین منظور ابتدا گیاهان تهیه شده جهت رفع گردوغبار موجود اندکی با آب شستشو شده و سپس در محیط آزمایشگاه و به مدت یک هفته خشک شدند. مقدار ۳۰۰ گرم از نمونه گیاه خشک‌شده به درون بالن دستگاه کلونجر منتقل و با ۱ لیتر آب به مدت ۳ ساعت تقطیر گردید. اسانس جمع‌آوری شده با سدیم سولفات بی‌آب، خشک و تا زمان آزمایش در یخچال نگهداری شد.

طب سنتی از هزاران سال پیش جهت اهداف درمانی استفاده شده است که در این میان استفاده از اسانس و عصاره‌های گیاهان دارویی جایگاه قابل ملاحظه‌ای را به خود اختصاص داده است. اخیراً استفاده از ترکیباتی که به طور کلی بی‌ضرر تلقی می‌شوند و به ¹GRAS معروفند، توجه زیادی را به خود معطوف کرده‌اند. ترکیبات طبیعی فعال بیولوژیکی مشتق از گیاهان از جمله مهم‌ترین ترکیبات GRAS می‌باشند زیرا مواد حاصل از اسانس و عصاره‌های گیاهان را می‌توان جهت حفظ و نگهداری مواد غذایی و در داروسازی به عنوان عوامل درمانی جدید علیه بیماری‌ها و عفونت‌های میکروبی به کار برد [۲ و ۱]. با این وجود در حال حاضر حدود ۲۵-۵۰ درصد از داروهای رایج با منشأ گیاهی در دنیا مصرف می‌شوند. از آنجایی که روز به روز بر تعداد باکتری‌های بیماری‌زای مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های رایج افزوده می‌شود، لذا جهت کنترل و از بین بردن عفونت‌های میکروبی مقاوم خصوصاً عفونت‌های بیمارستانی، کشف عوامل درمانی جدید یک نیاز ضروری می‌باشد [۳]. ترکیبات ضد میکروبی به دست آمده از گیاهان با مکانیسم‌های متفاوت از آنتی‌بیوتیک‌ها بر باکتری‌ها اثر می‌کنند که این مسئله در درمان عفونت‌های ناشی از سویه‌های مقاوم میکروبی از نظر بالینی حائز اهمیت است [۴]. اسانس‌های گیاهی ترکیباتی فرار و معطر هستند که در اندام‌های مختلف گیاه وجود دارند و یکی از نقش‌هایی که در گیاهان به عهده دارند، محافظت از گیاه در برابر عوامل مختلف فساد می‌باشد [۵]. این ترکیبات دارای اجزاء مختلفی در ترکیب خود می‌باشند که باعث می‌شود مقاومت باکتری‌ها در برابر اسانس‌های گیاهی کاهش یابد. اسانس‌های گیاهی به‌طور همزمان به بخش‌های مختلفی از باکتری‌ها اثر کرده که این امر باعث اهمیت آن‌ها در درمان و عدم بروز مقاومت‌های زیاد و چشم‌گیر در آن‌ها گشته است [۶ و ۷]. اسانس‌های پونه، نعنا و آویشن حاوی ترکیبات تریپنی مانند تیمول و کارواکرول هستند که خواص ضد میکروبی اسانس کامل بیشتر از هر یک از ترکیبات آن‌هاست که نشان‌دهنده اثر سینرژیستی هر کدام از ترکیبات درون اسانس با یکدیگر می‌باشد [۸-۹]. باکتری‌ها از طریق بیماری‌های عفونی و همچنین ایجاد مسمومیت‌های غذایی سلامت افراد را تهدید می‌کنند. از طرف دیگر به سرعت در برابر

2. Hydrodistillation

1. Generally regarded as safe

۲-۲- شناسایی ترکیبات اسانس

شناسایی ترکیبات اسانس استخراج شده با تزریق ۰/۵ میکرو لیتر اسانس رقیق شده با سیکلو هگزان به دستگاه گاز کروماتوگرافی مدل Agilent 6890A حاوی ستون HP-5 (طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۲۵۰ میکرومتر و ضخامت فاز ثابت ۰/۲۵ میکرومتر) متصل به طیف سنج جرمی مدل Agilent 5975 انجام پذیرفت. برنامه دمایی ستون به این طریق تنظیم گردید: دمای ابتدایی آن ۴۰ درجه سانتی گراد بود و دما با سرعت ۵ درجه در دقیقه تا رسیدن به دمای ۲۰۰ درجه سانتی گراد افزایش یافت و در این دما یک دقیقه باقی ماند و سپس دما با سرعت ۱۰ درجه در دقیقه تا رسیدن به دمای ۲۵۰ درجه افزایش یافت و پس از ۵ دقیقه توقف در این دما در نهایت با سرعت ۲۵ درجه در دقیقه به دمای ۳۰۰ درجه سانتی گراد بود رسانده شد. گاز هلیوم با سرعت جریان ۱ میلی لیتر در دقیقه به عنوان گاز حامل به کار گرفته شد و دمای محفظه تزریق ۲۴۰ درجه سانتی گراد تنظیم گردید. طیف سنج جرمی با ولتاژ یونیسیسیون ۷۰ الکترون ولت به کار گرفته شد. شناسایی نوع ترکیبات اسانس با کمک طیف نرمال آلکانها (C8-C24) و به دست آوردن شاخص بازداری آنها (شاخص کوآتز) و مقایسه با شاخص کوآتز (KI) گزارش شده ترکیبات در نرم افزار NIST05 و مقایسه طیف جرمی هر یک از اجزای ترکیبات اسانس با طیف جرمی موجود در کتابخانه wiley7n.1 موجود در دستگاه GC/MS صورت پذیرفت. همچنین میزان درصد ترکیبات موجود در اسانس مورد بررسی با استفاده از دستگاه گاز

کروماتوگرافی مدل Agilent 6890A مجهز به آشکارساز FID با شرایط فوق و با استفاده از سطح زیر منحنی پیکها محاسبه گردید.

۲-۳- آزمون سنجش فعالیت ضد میکروبی اسانس

در این تحقیق باکتری های گرم منفی و گرم مثبت به صورت لیوفیلز از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران و شرکت تهران داروش طب تهیه شدند. نام و مشخصات باکتری های مورد نظر در جدول ۱ آورده شده است. کیت های حاوی دیسک های شاهد با قطر ۶/۴ میلی متر و ویال های استریل حاوی دیسک های آنتی بیوتیک کلرامفنیکل و تتراسایکلین از شرکت پادتن طب خریداری شدند. محیط کشت مولر هیتون آگار، تربیتیکاز سویا آگار، برین هارت اینفوژن آگار و برین هارت اینفوژن براث از شرکت مرک آلمان تهیه شدند. برای این تحقیق از روش آنتی بیوگرام جهت بررسی خواص ضد باکتریایی اسانس ها استفاده شد. این روش با عنوان روش " آنتی بیوگرام " معروف بوده و روش اجرایی این پژوهش بر مبنای روش دیسک دیفیوژن بود. خارج نمودن سوش های لیوفیلز خریداری شده از حالت فریزری، پاساژ دادن سوش های مورد نظر، مقایسه با مایع ۰/۵ مک فارلند، بررسی خواص آنتی باکتریایی اسانس ها در مقادیر ۱۰، ۵ و ۲۰ میکرو لیتر در مقایسه با آنتی بیوتیک، اندازه گیری قطر هاله های عدم رشد [۱۰] مراحل انجام این آزمون بودند.

Table 1 Characteristics of investigated gram positive and negative bacteria

Bacteria name	standard number	Gram	Standard type	Place of delivery
<i>Bacillus cereus</i>	1154	Positive	P.T.C.C	ISIRO*
<i>Enterococcus faecium</i>	10541	Positive	A.T.C.C	ISIRO
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212	Positive	A.T.C.C	Tehran Darush Medical Co.
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	Positive	A.T.C.C	Tehran Darush Medical Co.
<i>Listeria monocytogenes</i>	11115	Positive	A.T.C.C	Tehran Darush Medical Co.
<i>Salmonella typhi</i>	1609	Negative	P.T.C.C	ISIRO
<i>Escherichia coli</i>	25922	Negative	A.T.C.C	ISIRO
<i>Shigella dysenteria</i>	1188	Negative	P.T.C.C	ISIRO

* Iranian Scientific and Industrial Research Organization

۲-۴- تجزیه و تحلیل آماری

این تحقیق در قالب یک طرح کامل تصادفی انجام پذیرفت و تجزیه و تحلیل آماری داده ها با نرم افزار آماری SPSS نسخه ۱۹ صورت پذیرفت. کلیه آزمون ها با سه تکرار انجام پذیرفت.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- نتایج حاصل از تجزیه و شناسایی ترکیبات

شیمیایی موجود در اسانس ها

نتایج حاصل از تجزیه و شناسایی ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس گیاه آویشن در جدول ۲ نشان داده شده است.

Table 2 Volatile compounds detected from thyme essential oil by GC/MS*

Peak	Compound	RT (min)	KI _{exp}	%
1	alpha thujene	5.245	927	0.65
2	alpha pinene	5.423	934	3.32
3	Camphene	5.734	947	0.25
4	beta pinene	6.367	972	0.66
5	beta myrcene	6.656	984	1.74
6	3- octanol	6.80	993	0.19
7	alpha phellandrene	7.0	997	0.24
8	delta 3 carne	7.145	1005	0.07
9	alpha terpinene	7.311	1011	2.28
10	para-cymene	7.567	1019	7.34
11	Limonene	7.634	1022	0.83
12	1,8 cineole	7.767	1026	0.68
13	beta ocimene	8.078	1037	0.07
14	gamma terpinene	8.445	1050	6.66
15	(z) sabinene hydrate	8.689	1058	0.21
16	cis linalool oxide	8.845	1072	0.10
17	alpha terpinolene	9.156	1081	0.25
18	trans linalool oxide	9.267	1088	0.08
19	Linalool	9.578	1090	5.26
20	Hotrienol	9.825	1098	0.18
21	Borneol	11.333	1168	0.25
22	terpinene 4 ol	11.633	1176	1.13
23	alpha terpineol	12.289	1184	1.01
24	cis dihydrocarvone	12.555	1200	0.07
25	thymyl methyl ether	13.111	1224	1.27
26	carvacrol methyl ether	13.377	1227	1.88
27	Thymol	14.888	1279	30.61
28	Carvacrol	15.233	1300	22.18
29	thymol acetate	16.377	1324	1.23
30	carvacryl acetate	16.844	1380	1.13
31	caryophyllene	18.066	1420	2.56
32	beta Gurjenene	18.232	1432	0.07
33	aromadendrene	18.521	1449	1.17
34	alpha Humulene	18.777	1481	0.17
35	alloaromadendrene	19.054	1490	0.11
36	Ledene	19.888	1500	0.83
37	spathulenol	21.899	1570	1.03
38	caryophyllene oxide	22.054	1579	1.06
39	isospathulenol	23.243	1640	0.14
40	bisabolene epoxide	23.965	1699	0.14
Total				99.15

RT: Retarding time, KI_{exp} : Kovats index of test, %: amount of chemical composition based on the area under curve

در این تحقیق ۴۰ ترکیب فرار در اسانس آویشن شناسایی گردید که حدود ۹۹/۵۱ درصد از ترکیبات اسانس را شامل می‌گردد. همان‌طور که جدول نشان می‌دهد تیمول (۳۰/۶۱٪)، کارواکرول (۲۲/۱۸٪)، پاراسیمن (۷/۳۴٪)، گاماترپینن (۶/۶۶٪) و لینالول (۵/۲۶٪) عمده ترکیبات موجود در اسانس آویشن می‌باشند.

ترکیبات فرار شناسایی شده در اسانس گیاه پونه در جدول ۳ نشان داده شده است. در این تحقیق ۳۱ ترکیب شیمیایی در اسانس پونه که در مجموع ۹۵/۷۹ درصد از کل ترکیبات را تشکیل می‌داد شناسایی گردید. همان‌گونه که مشاهده می‌گردد پیپریتون (۳۲/۱۶٪)، پیپریتون (۲۹/۶۲٪) و آلفاترپینول (۶/۴۰٪) عمده ترکیبات موجود در اسانس پونه می‌باشند.

Table 3 Volatile compounds detected from pennyroyal essential oil by GC/MS*

Peak	Compound	RT (min)	KI_{exp}	%
1	alpha pinene	5.398	934	0.09
2	sabinene	6.264	968	0.03
3	beta pinene	6.353	972	0.12
4	p cymene	7.497	1019	0.12
5	limonene	7.597	1021	0.54
6	1,8 cineole	7.764	1025	4.37
7	gamma terpinene	8.364	1049	0.04
8	linalool	9.475	1090	0.26
9	p mentha 2, 8 diene 1 ol	10.597	1120	0.10
10	camphor	10.986	1144	0.07
11	L-menthone	11.13	1154	3.75
12	Borneol	11.375	1168	4.77
13	terpinene 4 ol	11.641	1176	0.79
14	alpha terpineol	12.064	1184	6.40
15	beta citronellol	13.186	1218	0.34
16	pulegone	13.386	1231	2.83
17	Carvone	13.486	1242	0.98
18	piperitone	14.097	1256	32.16
19	bornyl acetate	14.608	1270	1.20
20	carvacrol	15.452	1300	0.12
21	piperitenone	16.407	1339	29.62
22	neryl acetate	16.63	1357	0.21
23	piperitenone oxide	16.83	1363	4.74
24	geranyl acetate	17.074	1381	0.25
25	beta bourbonene	17.163	1400	0.14
26	(E)caryophyllene	18.029	1420	0.20
27	alpha Humulene	18.463	1481	0.10
28	alpha amorphene	20.318	1516	0.03
29	caryophyllene oxide	22.051	1579	1.14
30	geranyl pentanoate	22.34	1592	0.20
31	alpha cadinol	23.284	1636	0.08
Total				95.79

RT: Retarding time, KI_{exp} : Kovats index of test, %: amount of chemical composition based on the area under curve

نتایج حاصل از شناسایی ترکیبات فرار موجود در اسانس نعنا در جدول ۴ نشان داده شده است. همان گونه که مشاهده می شود ۲۷ ترکیب از مواد موجود در اسانس نعنا که تشکیل دهنده ۹۸/۳۵ درصد ترکیبات موجود در آن می باشند شناسایی گردیدند. کارون

نتایج حاصل از شناسایی ترکیبات فرار موجود در اسانس نعنا در جدول ۴ نشان داده شده است. همان گونه که مشاهده می شود ۲۷ ترکیب از مواد موجود در اسانس نعنا که تشکیل دهنده ۹۸/۳۵ درصد ترکیبات موجود در آن می باشند شناسایی گردیدند. کارون

Table 4 Volatile Compounds detected from mint essential oil byGC/MS *

Peak	Compound	RT (min)	KI _{exp}	%
1	alpha pinene	5.409	934	1.63
2	sabinene	6.287	968	0.71
3	beta pinene	6.375	972	1.73
4	beta myrcene	6.653	984	1.05
5	3- octanol	6.809	993	1.42
6	limonene	7.731	1022	21.12
7	1,8 cineole	7.831	1026	2.90
8	(z)-sabinene hydrate	8.675	1058	0.37
9	alpha terpinolene	9.153	1081	0.26
10	linalool	9.486	1090	0.20
11	L-menthone	10.997	1154	0.53
12	isomenthone	11.308	1164	0.52
13	L- menthol	11.508	1166	1.71
14	terpinene 4 ol	11.641	1176	1.03
15	cis dihydrocarvone	12.208	1191	3.23
16	trans dihydrocarvone	12.408	1200	0.48
17	carveol	13.086	1217	0.83
18	carvone	13.797	1242	51.03
19	piperitone	13.963	1256	0.45
20	dihydrocarvyl acetate	15.663	1305	0.22
21	piperitenone	16.108	1339	0.16
22	alpha copaene	16.885	1377	0.22
23	carvyl acetate	16.552	1380	0.28
24	beta bourbonene	17.152	1400	2.37
25	caryophyllene	18.029	1420	2.36
26	germacrene D	18.629	1479	0.46
27	caryophyllene oxide	22.029	1579	0.63
total				98.35

*RT: Retarding time, KI_{exp}: Kovats index of test, %: amount of chemical composition based on the area under curve
مقایسه ترکیب های اصلی اسانس های مورد آزمایش با تحقیق های قبلی نشان می دهد، میزان آن ها در نمونه های مختلف متفاوت است. صادق زاده و همکاران (۱۳۸۵) گزارش کردند، ترکیب های عمده تشکیل دهنده اسانس آویشن شیرازی: تیمول (۵۲/۴ درصد)، گاماترپنین (۱۷/۶ درصد)، پاراسیمن (۱۳/۲ درصد) و کارواکرول (۶/۱ درصد) است [۱۲]. شریفی فر و همکاران (۲۰۰۷) ترکیب های عمده اسانس آویشن شیرازی را تیمول (۳۷/۵۹ درصد)، کارواکرول (۳۳/۶۵ درصد)، پاراسیمن (۷/۷۲ درصد) و گاماترپنین (۳/۰۸۸ درصد) گزارش کردند [۱۳]. هم چنین

۲-۳- نتایج آزمون های فعالیت ضد میکروبی اسانس ها

نتایج آزمون های میکروبی سه اسانس پونه، آویشن و نعنا بر سه باکتری گرم منفی و چهار باکتری گرم مثبت در مقایسه با دو

آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل و تتراسایکلین در جدول‌های ۱۰-۵ ارائه شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود میانگین قطر هاله عدم رشد اسانس آویشن بر باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت در مقایسه با اسانس‌های نعنا و پونه بیشتر است که نشان‌دهنده فعالیت میکروبی بالا این اسانس در مقایسه با دو اسانس دیگر هست.

Table 5 The mean diameter of the inhibition zone (mm) obtained from the effect of Pennyroyal essential oil on Gram-Negative bacteria compared to chloramphenicol and tetracycline antibiotics

Bacteria	Antibiotics		Essential oil amount (μl)		
	Chloramphenicol	Tetracycline	10	15	20
<i>Salmonella typhi</i>	12.27±0.45aB	21.06±1.05cB	12.71±0.5aB	13.05±1.22aA	16.15±2.04Bb
<i>Escherichia coli</i>	13.48±2.14bC	21.17±0.76cB	11.65±0.01aA	13.9±1.02bA	14.3±0.01Ba
<i>Shigella dysenteria</i>	11.75±0.2aA	16.9±3.05dA	12.1±2.04bA	13.43±0.93cA	16.8±0.2Db

Different small and capital letters at each row and column show significant difference in 95% of confidence level, respectively

Table 6 The mean diameter of the inhibition zone (mm) obtained from the effect of thyme essential oil on Gram-Negative bacteria compared to chloramphenicol and tetracycline antibiotics

Bacteria	Antibiotics		Essential oil amount (μl)		
	Chloramphenicol	Tetracycline	10	15	20
<i>Salmonella typhi</i>	17.42±2.02aB	25.44±3.44bB	22.46±1.45bA	23.89±3.44bA	46.01±1.01Ca
<i>Escherichia coli</i>	18.16±2.3aB	26.93±3.11bC	32.65±1.45cB	44.87±3.03dC	48.44±1.45Db
<i>Shigella dysenteria</i>	13.29±1.1aA	22.67±1.19bA	22.03±3.03bA	40.23±4.12cB	46.87±0.91Da

Different small and capital letters at each row and column show significant difference in 95% of confidence level, respectively

Table 7 The mean diameter of the inhibition zone (mm) obtained from the effect of mint essential oil on Gram-Negative bacteria compared to chloramphenicol and tetracycline antibiotics

Bacteria	Antibiotics		Essential oil amount (μl)		
	Chloramphenicol	Tetracycline	10	15	20
<i>Salmonella typhi</i>	16.33±0.56Bc	24.01±0.67dB	14.45±0.45Aa	19.02±1.71cB	20.43±0.98cA
<i>Escherichia coli</i>	14.98±0.89Ab	19.02±0.93bA	14.41±1.02Aa	15.12±1.34abA	18.76±1.54bA
<i>Shigella dysenteria</i>	11.98±.71Aa	22.62±1.03cB	14.01±0.88Ba	14.69±1.88bA	21.22±1.45cA

Different small and capital letters at each row and column show significant difference in 95% of confidence level, respectively

Table 8. Mean diameter of the inhibition zone (mm) obtained from the effect of Pennyroyal essential oil on Gram-Positive bacteria compared to chloramphenicol and tetracycline antibiotics

Bacteria	Antibiotics		Essential oil amount (μl)		
	Chloramphenicol	Tetracycline	10	10	20
<i>Staphylococcus aureus</i>	23.35±0.09cC	20.67±0.22 bC	18.1±0.43 aC	38.11±0.12 dD	23.16±0.01 Ca
<i>Enterococcus faecalis</i>	12.65±0.075bA	11.85±0.02bA	6.52±0.21A	15.15±0.01cA	25.16±0.01Db
<i>Enterococcus faecium</i>	19.165±0.49cB	17.34±0.76 bB	14.23±1.01 aB	29.01±1.0 2eC	23.33±0.76 Da
<i>Listeria monocytogenes</i>	27.35±0.47bD	26.11±0.94 bD	22.5±0.04aD	38.65±0.29dD	33.66±0.29Cd
<i>Bacillus cereus</i>	22.17±0.13 dC	19.5±0.47cC	17.65±0.08bC	23.33±0.56 dB	28.83±0.01 Ec

Different small and capital letters at each row and column show significant difference in 95% of confidence level, respectively

Table 9. The mean diameter of the inhibition zone (mm) obtained from the effect of thyme essential oil on Gram-Positive bacteria compared to chloramphenicol and tetracycline antibiotics

Bacteria	Antibiotics		Essential oil amount (μl)		
	Chloramphenicol	Tetracycline	10	10	20
<i>Staphylococcus aureus</i>	38.76±0.66 bD	23.44±0.35 aA	69.34±1.33dC	62.11±1.16 dC	48.12±0.67Cc
<i>Enterococcus faecalis</i>	15.33±0.15 aA	25.33±0.98 bB	46.83±0.67eA	40.01±0.44 dA	28.5±0.32Ca
<i>Enterococcus faecium</i>	28.02±0.92 bC	24.03±1.04aA	74.5±0.67 eD	59.12±0.27dC	51.31±1.01cD
<i>Listeria monocytogenes</i>	38.12±0.32Bd	33.77±0.47aD	70.35±0.15eC	61.21±1.26 dC	54.01±0.78 cD
<i>Bacillus cereus</i>	22.93±1.11 Bb	28.01±0.15 cC	57.5±0.17 fB	45.44±0.07 eB	35.30±0.23 dB

Different small and capital letters at each row and column show significant difference in 95% of confidence level, respectively

Table 10. The mean diameter of the inhibition zone (mm) obtained from the effect of mint essential oil on Gram-Positive bacteria compared to chloramphenicol and tetracycline antibiotics

Bacteria	Antibiotics		Essential oil amount (μl)		
	Chloramphenicol	Tetracycline	10	10	20
<i>Staphylococcus aureus</i>	14.89±1.14Ca	10.23±1.54bA	6.76±0.54aA	38.23±1.54eD	23.25±0.34Da
<i>Enterococcus faecalis</i>	18.65±0.87Cb	14.76±0.98 bB	10.11±1.23 aB	14.94±0.85 bA	24.87±1.03 dB
<i>Enterococcus faecium</i>	20.89±0.94Cc	13.67±1.28bB	9.13±0.16aB	28.34±1.12 fC	23.45±1.23Da
<i>Listeria monocytogenes</i>	20.25±1.36Cc	17.81±1.12 bC	12.65±1.78aC	38.22±1.22eD	33.76±0.43Dd
<i>Bacillus cereus</i>	25.05±1.32Cd	23.25±1.66 cD	18.23±1.07aD	22.94±1.46bB	29.03±0.56Dc

Different small and capital letters at each row and column show significant difference in 95% of confidence level, respectively

لایه پتیدوگلیکانی در غشای باکتری‌های گرم منفی می‌تواند عاملی در تاثیر کم‌تر اسانس‌ها بر این دسته از باکتری‌ها باشد [۱۶]. نتایج نشان داد که با افزایش مقدار اسانس، قطر هاله عدم رشد باکتری‌ها افزایش یافت که با نتایج سایر محققین هم منطبق بود [۵ و ۸]. از آنجائی‌که تیمول و کارواکرول جزء اصلی ترکیبات موثره آویشن بوده و این ترکیبات دارای خواص ضدباکتریایی مناسبی هستند که نتایج این تحقیق با سایرین مبنی بر تاثیر اسانس آویشن بر باکتری‌های گرم مثبت و منفی مطابقت دارد [۹ و ۱۷-۱۸]. نتایج بررسی خواص ضدباکتریایی اسانس‌های پونه و نعنا بر باکتری‌های گرم منفی و مثبت در این تحقیق تائید کننده گزارش سایر محققین است [۱۴ و ۱۹].

۴- نتیجه گیری کلی

طی تحقیق حاضر ترکیبات شیمیایی اسانس‌های گیاهان پونه، نعنا و آویشن بررسی و اثرات آن‌ها بر باکتری‌های پاتوژن گرم مثبت و گرم منفی در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های رایج مورد مطالعه قرار

چنانچه مشاهده می‌شود میانگین قطر هاله عدم رشد اسانس آویشن بر باکتری‌های گرم منفی (سالمونلا، اشرشیاکلی و شیگلا) در غلظت ۲۰ میکرولیتر حدود ۴۷ میلی‌متر و در مورد اسانس نعنا ۲۰ میلی‌متر و برای اسانس پونه ۱۶ میلی‌متر است. میانگین قطر هاله عدم رشد اسانس آویشن بر باکتری‌های گرم مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس، انتروکوکوس فکالیس، انتروکوکوس فاسیوم، لیستریامونوسیتوزنز و باسیلوس سرئوس) در غلظت ۲۰ میکرولیتر حدود ۴۵ میلی‌متر و در مورد اسانس نعنا ۲۷ میلی‌متر و برای اسانس پونه ۲۶ میلی‌متر است. در مجموع میانگین قطر هاله عدم رشد اسانس آویشن بر باکتری‌های گرم مثبت و منفی در مقایسه با اسانس‌های نعنا و پونه بیشتر است که نشان‌دهنده فعالیت میکروبی بالاتر این اسانس در مقایسه با دو اسانس دیگر هست. نتایج نشان داد که همه اسانس‌های مورد مطالعه در همه مقادیر بر رشد باکتری‌های گرم منفی و مثبت مورد بررسی در این تحقیق اثر بازدارنده داشتند ولی تاثیر اسانس‌ها بر رشد باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از باکتری‌های گرم منفی بود. وجود یک

- and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*, 15:639-652.
- [8] Bagamboula C.F, Uyttendaele M, and Debevere J. 2004. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estrol, linalool and p-Cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiology*, 21:33-42.
- [9] Aghel N, Moghimipour E, and Ameri A. 2007. Characterization of an antidermatophyte cream from *Zataria multiflora* boiss. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 3:77-84.
- [10] Normanno G., La Salandra G., Dambrosio A., Quaglia N.C., Corrente M., Parisi A., Santagada G., Firinu A., Crisetti E. and Celano G.V., 2007. Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 115(3): 290-296.
- [11] Alzoreky, N.S. and Nakahara, K. 2003. Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. *International Journal of Food Microbiology*, 80:223-230.
- [12] Sadeghzadeh L., Whitening F. and Olia P. 2006. Antimicrobial composition and antimicrobial properties of essential oil of *Zataria multiflora*. *Pajouhesh and Sazandegi*, 71:56-52.
- [13] Sharififar, F., Moshafi, M.H., Mansouri, S.H., Khodashenas, M. and Khoshnoodi, M. 2007. In vitro evaluation of antioxidant activities of the oil and methanol extract of endemic *Zataria Boiss*. *Food Control*, 18: 800-805.
- [14] Teixeira B., Marques A., Ramos C., Batista I., Serrano C., Matos O., Neng N.R., Nogueira J.M., Saraiva J.A. and Nunes M.L.. 2012. European pennyroyal (*Mentha pulegium*) from Portugal: Chemical composition of essential oil and antioxidant and antimicrobial properties of extracts and essential oil. *Industrial Crops and Products*, 36:(1): 81-87.
- [15] Silva N., Alves S., Gonçalves A., Amaral J.S. and Poeta P., 2013. Antimicrobial activity of essential oils from Mediterranean aromatic plants against several foodborne and spoilage bacteria. *Food Science and Technology International*, 19(6):503-510.
- گرفت. نتایج نشان داد که تیمول، کارواکرول، پاراسیمن، گاماتریپین و لینالول عمده ترکیبات موجود در اسانس آویشن بودند و پیپریتون، پیپریتون و آلفاتریپینول عمده ترکیبات موجود در اسانس پونه و کارون و لیمونن عمده ترکیبات موجود در اسانس نعنا بودند. نتایج این پژوهش نشان داد که همه اسانس‌ها بر باکتری‌های مورد مطالعه اثر بازدارندگی داشتند ولی باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های منفی حساسیت بیشتری به اسانس‌ها نشان دادند. همچنین اسانس گیاه آویشن اثر بازدارندگی بیشتری نسبت به پونه و نعنا بر همه باکتری‌ها داشت که این امر احتمالاً به دلیل وجود مقادیر بیشتر تیمول و کارواکرول در برگ‌های این گیاه می‌باشد. با توجه به یافته‌های این تحقیق، اسانس آویشن را می‌توان به‌عنوان یک نگهدارنده طبیعی در مواد غذایی پیشنهاد داد.

۵- منابع

- [1] Jobling J. 2000. Essential oils: A new idea for postharvest disease control. *Good Fruit and Vegetables Magazine*, 11(3):50-54
- [2] Benli M, Guney K, Bingol U, Geven F, and Yigit N. 2007. Antimicrobial activity of some endemic plant species from Turkey. *African Journal of Biotechnology*, 6(15):1774-1778.
- [3] Duarte M.T, Leme E.E, Delarmelina C, Soares A.A, Figueira G.M, and Sartoratto A. 2007. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. *Journal of Ethnopharmacology*, 111:197-201.
- [4] Eloff J.N. 1999. It is possible to use herbarium specimens to screen for antibacterial components in some plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 67(3):355-360.
- [5] Hojjati M., and Barzegar H. 2017. Chemical composition and biological activities of lemon (*Citrus limon*) leaf essential oil. *Nutrition and Food Sciences Research*, 4(4), 15-24.
- [6] Hammer K.A, Carson C.F, and Riley T.V. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86:985-990.
- [7] Hemaiswarya S, Kruthiventi A.K, and Doble M. 2008. Synergism between natural products

- [18] Sangclic O. 2003. Sensitivity of four pathogenic bacteria to Turkish thyme and oregano, *LWT-Food Science and Technology*, 36(5):467-473.
- [19] Erhan M.K., Bölükbaşı Ş.C. and Ürüşan H. 2012. Biological activities of pennyroyal (*Mentha pulegium* L.) in broilers. *Livestock Science*, 146(2-3):189-192.
- [16] Azhdarzadeh F., and Hojjati M. 2016. Chemical composition and antimicrobial activity of leaf, ripe and unripe peel of bitter orange (*Citrus aurantium*) essential oils. *Nutrition and Food Sciences Research*, 3(1): 43-50.
- [17] Dorman H., and Deans S.G. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88:308-314.

Investigation of chemical compounds and antibacterial activity of pennyroyal, mint and thyme essential oils

Azizi Tabrizad, N. ¹, Seyedin Ardebili, S. M. ^{2*}, Hojjati, M. ³

1. MSc Graduated, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran
2. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran
3. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Iran

(Received: 2018/01/31 Accepted:2018/09/04)

Nowadays, considering the undesirable effects of chemical antimicrobials on human health and the growing willingness of consumers to consume natural ingredients, efforts to replace synthetic preservatives with naturally occurring forms are increasing. Because one of the best sources of antimicrobial compounds is the plant compounds, in the present study, the three essential oils of pennyroyal, mint and thyme were identified as an effective antimicrobial compound. GC / MS was used for the analysis and identification of essential oils of pennyroyal, mint and thyme. The antibacterial properties of these essential oils were investigated on some Gram-Negative and Gram-Positive bacteria compared with the common antibiotics. Such as chloramphenicol and tetracycline using disc diffusion method. In this study, 40 compounds were identified in thyme essential oil which thymol (30.61%), carvacrol (22.18%), *p*-cymene (37.34%), gamma-terpinene (66.6%), and linalool (5.26%) were the major components. 31 chemical compounds were identified in pennyroyal essential oil that piperitone (32.16%), piperitenone (29.62%) and alpha-terpineol (6.40%) were the main constituents. In addition, 27 compounds were identified in the mint essential oil that carvon (51.03%) and limonene (21.12%) were the major oil compounds. The results of this study showed that Gram-Positive bacteria were more susceptible to the essential oils than Gram-Negative bacteria. In addition, thyme essential oil has a more inhibitory effect compared to pennyroyal and mint oil, which is probably due to the presence of more thymol and carvacrol in leaves of this plant. The results of this study revealed that thyme essential oil could be used as natural preservative in foods.

Keywords: Pathogen, Essential oil, Lamiaceae, GC/MS

* Corresponding Author E-Mail Address: mahdi_seyedain@yahoo.com