مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

بررسی فعالیت مهارکنندگی و کشندگی عصاره زوفا بر تعدادی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی: مطالعه در شرایط برون‌تنی

بهروز علیزاده بهبهانی[1*]، محمد نوشاد[1]

۱- استادیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۹۹ /۰۳/۲۱

تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۶/۰۱

کلمات کلیدی:

زوفا،

اثر ضدمیکروبی،

هاله عدم رشد،

آنتی بیوتیک.

DOI: 10.29252/fsct.18.01.01

* مسئول مکاتبات:

B.alizadeh@asnrukh.ac.ir

چکیده

گیاه زوفا (*Hyssopus officinalis* L)، متعلق به خانواده Lamiaceae است که به طور وسیعی در ایران رشد می‌کند. هدف از این پژوهش آزمایشگاهی، ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی عصاره گیاه زوفا به ٤ روش دیسک دیفیوژن، چاهک آگار، حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی بر تعدادی از سویه‌های بیماری‌زا در شرایط آزمایشگاهی بود. نتایج نشان داد با افزایش غلظت عصاره زوفا قطر هاله عدم رشد افزایش یافت. بیشترین هاله بازدارندگی با قطر ۱۹/۷۰ میلی‌متر در غلظت ۸۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* مشاهده شد. در غلظت ۸۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره اتانولی زوفا کم‌ترین هاله عدم رشد با قطر ۱۳/۳۰ برای باکتری *اشرشیا کلی* مشاهده شد. نتایج نشان داد که حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره گیاه زوفابرای باکتری‌های *سودوموناس ائروژینوزا*، *اشرشیاکلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا اینوکوا* به ترتیب ٦٤، ٦٤، ٨ و ١٦ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. نتایج حداقل غلظت کشندگی عصاره زوفانیز به ترتیب ۱۲۸، ۱۲۸، ۳۲ و ٦٤ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. داده‌های به دست آمده در این مطالعه تایید می‌کنند که عصاره زوفا مانع از رشد تعدادی از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در شرایط برون‌تنی شد.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-12]

۱- مقدمه

امروزه از روش‌های گوناگونی، جهت از بین بردن میکروب‌های بیماری‌زای عامل عفونت و مسمومیت غذایی استفاده می‌شود. شایان ذکر می‌باشد که روش‌های متعدد به کار گرفته شده جهت غیرفعال‌سازی میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در مواردی ممکن است باعث ایجاد اثرات تغذیه‌ای و کیفی نامطلوب در ماده غذایی شود. ایمنی و سلامت مواد غذایی از مهم‌ترین مواردی است که همواره ذهن پژوهشگران در صنعت غذا را به خود معطوف کرده است. افزایش محدودیت‌های قانونی که در سال‌های اخیر توسط سازمان‌های استاندارد و کنترل کیفی تصویب شده است و از سویی دیگر پاسخ منفی مصرف‌کنندگان به ترکیبات شیمیایی و استفاده از آنتی بیوتیک‌های رایج در محصولات کشاورزی به اهرمی جهت وارد شدن فشار برای توسعه ترکیبات طبیعی و روش‌های جایگزین جهت استفاده از آن‌ها به عنوان مواد ضدمیکروبی کمک شایانی کرده است [۱ و ۲].

آلودگی میکروبی و عوارضی جانبی که در اثر استفاده از ترکیبات سنتزی و شیمیایی ایجاد می‌شود دو دغدغه عمده و اصلی درصنعت غذا و علوم پزشکیاست. گرایش فزاینده مصرف کنندگان برای جایگزین نمودن ترکیبات سنتزی و شیمیایی با نوع طبیعی از یک طرف و افزایش مقاومت میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای عامل عفونت و مسمومیت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی از سوی دیگر پژوهشگران را به سمت استفاده از گیاهان دارویی برای استفاده از ویژگی‌های ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی آن‌ها ترغیب کرده است. اگرچه از زمان‌های قدیم، بشر از گیاهان دارویی برای درمان و جلوگیری از بیماری‌های مختلف استفاده نموده است. گیاهان دارویی به عنوان مخازنی از ترکیبات زیست‌فعال در نظر گرفته می‌شود [۳ و ٤].

خوشبختانه سرزمین ایران به دلیل شرایط آب و هوایی مختلف دارای طیف وسیعی از گیاهان دارویی می‌باشد و ایرانیان از دیرباز علاقمند به استفاده از ترکیبات طبیعی دارویی بوده‌اند. تعیین زمان دقیق استفاده بشر از گیاهان به عنوان ترکیبات دارویی جهت درمان بیماری‌ها امری بسیار دشوار است. شواهد به جا مانده نشان می‌دهد که گیاهان به عنوان دارو تقریبا ٦۰۰۰ سال قبل کشت شده‌اند. نسخه‌ها و کتب قدیمی به یادگار مانده از پیشینیان درباره تاریخ استفاده از گیاهان دارویی قدمت استفاده از آن‌ها را تقریبا به ۵۰۰۰ سال قبل در هند، چین و مصر و حدود ۲۵۰۰ سال در یونان و آسیای مرکزی نشان می‌دهد. تاریخ استفاده از گیاهان دارویی در کشور ایران به زمان تمدن آریایی که حدود ٦۵۰۰ تا ۷۰۰۰ سال قبل از میلاد مسیح است برمی‌گردد، زمانی که زرتشت به ویژگی‌های گیاهان دارویی اشاره نموده است. ایرانیان از زمان‌های قدیم و حتی قبل از سایر تمدن‌های دیگر در زمینه شناخت گیاهان دارویی و کاربرد درمانی آن‌ها از دانش پیشرفته‌ای برخوردار بوده‌اند و کتاب باستانی اوستا مهر تاییدی بر گواه راستین این ادعا می‌باشد[۵].

زوفا با نام علمی *Hyssopus officinalis* L گیاهی چندساله از خانواده Lamiaceae است. گیاه زوفا شامل ۱۰ تا ۱۲ گونه بوده و بومی شمال غربی ایران، قفقاز، ترکیهو جنوب آناتولی است. گونه‌های مختلف گیاه زوفا در حال حاضر به طور گسترده در کشورهای ایران، فرانسه، روسیه، اسپانیا و ایتالیا وجود دارد [٦]. از نظر گیاه‌شناسی طول گیاه زوفا به ۲۰ تا ۲۵ سانتی‌متر می‌رسد و برگ‌های آن براق و به رنگ سبز تیره با لبه‌ها و دارای نوک تیز می‌باشند. طول برگ‌های گیاه زوفا ۲ تا ٤ سانتی‌متر بوده و عرض آن حدود ۰/۵ تا ۱ سانتی‌متر است [۷]. در طب سنتی از عصاره و اسانس گیاه زوفا در درمان عفونت‌های ویروسی و همچنین سرماخوردگی، سرفه، گلودرد، برونشیت و آسم استفاده می‌شود. مطالعات گذشته فعالیت ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی گیاه زوفا را به اثبات رسانیده است[۸].

هدف از این مطالعه آزمایشگاهی، ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی عصاره اتانولی گیاه زوفا به روش‌های دیسک دیفیوژن آگار، چاهک آگار، حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی بر سویه‌های استاندارد *اشرشیا کلی*، *سودوموناس ائروژینوزا*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا اینوکوا* در شرایط برون‌تنی بود.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-12]

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- جمع آوری گیاه زوفا و عصاره‌گیری

بعد از جمع آوری گیاه زوفا و تایید نام علمی گیاه توسط گیاه-شناسان و متخصصان، گیاه زوفا با آب سرد شست و شو سطحی شده و سپس به مدت ٤ روز در سایه خشک گردید. گیاه خشک شده توسط آسیاب آزمایشگاهی پودر شد. گیاه پودر شده با استفاده از حلال اتانول به نسبت ۵ به ۱ مخلوط شده و به مدت ۷۲ ساعت بر دستگاه شیکر در دمای اتاق (۲۵ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شد. عمل تکاندن دادن به دلیل تاثیر بهتر حلال بر گیاه جهت استحصال هر چه بهتر ترکیبات گیاه بود. بعد از ۷۲ ساعت، ابتدا مخلوط حلال و گیاه از پارچه تمیز توری عبور داده شده و بقایای گیاه پس از چند مرحله فشردن و اطمینان از استخراج کامل دور ریخته شد. مخلوط عصاره و حلال از کاغذ صافی عبور داده شده و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد. جهت حذف حلال اتانول مخلوط به دستگاه روتاری منتقل شده و در نهایت در دمای ٤۵ درجه سانتی‌گراد در آون خشک گردید[۹].

۲-۲-تهیه سویه‌های میکروبی استاندارد و سوسپانسیون میکروبی

سویه‌های میکروبی استاندارد به صورت آمپول لیوفیلیزه خریداری شدند. سویه‌های میکروبی شامل ۲ باکتری گرم منفی (*اشرشیا کلی* و *سودوموناس ائروژینوزا*) و ۲ باکتری گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا اینوکوا*) بود. جهت فعال سازی سویه‌های میکروبی و استاندارد کردن آن‌ها جهت ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی عصاره زوفا بر آن‌ها، مطابق با استاندارد نیم مک‌فارلند اقدام شد. در این استاندارد از کشت تازه و ٢٤ ساعت از سویه‌های میکروبی استفاده شد. تک کلنی خالص از هر سویه میکروبی با دقت برداشته و در محلول رینگر ریخته شد و تا برابری جذب آن با محلول نیم‌مک‌فارلند عمل رقیق‌سازی انجام گردید. جذب در طول موج ٦٢۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. در این حالت میزان هر سویه میکروبی برابر با $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ colonyforming unit/mL است[۱۰].

۲-۳- روش دیسک دیفیوژن آگار

اولین روش ضدمیکروبی برای ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی عصاره اتانولی زوفا شامل روش دیسک دیفیوژن آگار بود. در این روش از۵ دیسک کاغذی (ساخت پادتن طب) در اطراف و یک دیسک در مرکز پلیت به عنوان شاهد منفی استفاده شد. میزان ۲۰ میکرولیتر از غلظت‌های ۲۰، ٤۰، ٦۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره اتانولی زوفا به آرامی بر سطح دیسک‌های قرار گرفته در سطح محیط کشت حاوی هر یک از سویه‌های استاندارد بیماری‌زا ریخته شد. پس از آن پتری دیش‌های کشت شده به مدت ۱۵ دقیقه در دمای یخچال قرار گرفتند. در نهایت پتری دیش‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ٢٤ ساعت درون انکوباتور قرار گرفتند. پس از اتمام زمان انکوباسیون پتری دیش‌های میکروبی از انکوباتور خارج شده و منطقه بازدارندگی یا عدم رشد[1] در محیط اطراف دیسک‌ها با در نظر گرفتن قطر دیسک (٦ میلی‌متر) توسط خط‌کش اندازه‌گیری و به صورت میلی‌متر گزارش شد[۱۱]. قابل ذکر است که اثر ضدمیکروبی عصاره اتانولی زوفا بر هر سویه در سه تکرار انجام گردید.

۲-٤- روش چاهک آگار

روش چاهک آگار دومین روش به کار گرفته شده برای اندازه-گیری عصاره اتانولی زوفا بر سویه‌های استاندارد عامل عفونت و مسمومیت غذایی بود. در این روش به طور خلاصه تعداد ۵ عدد چاهک به قطر ٦ میلی‌متر که شامل ٤ عدد چاهک در اطراف پتری دیش و یک عدد چاهک به عنوان کنترل منفی توسط پی‌پت پاستور در سطح محیط کشت مولر هینتون آگار تعبیه شد. لازم به ذکر است که از پتری دیش ۸ سانتی‌متری که حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت مولر هینتون آگار بود استفاده شد. میزان ۲۰ میکرولیتر از غلظت‌های ۲۰، ٤۰، ٦۰ و ۸۰ میلی-گرم بر میلی‌لیتر عصاره اتانولی زوفا توسط سمپلر به آرامی درون ٤ چاهک ریخته شد. پس از آن پتری دیش‌های کشت شده به مدت ۱۵ دقیقه در دمای یخچال قرار گرفتند. در نهایت پتری دیش‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ٢٤ ساعت درون انکوباتور قرار گرفتند. پس از اتمام زمان انکوباسیون پتری دیش‌های میکروبی از انکوباتور خارج شده و منطقه

1. Inhibition zone

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-12]

بازدارندگی یا عدم رشد در اطراف هر یک از چاهک توسط خط‌کش به طور دقیق اندازه‌گیری و به صورت میلی‌متر گزارش گردید[۱۲]. قابل ذکر است که اثر ضدمیکروبی عصاره اتانولی زوفا بر هر سویه در سه تکرار انجام شد.

۲-۵- تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی

یکی از روش‌های مهم کمی برای تعیین فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی است. برای انجام این آزمون مطابق با روش به کار گرفته شده در مطالعه نوشاد و همکاران (۲۰۱۸)، استفاده شد[۱۳]. در این روش به طور خلاصه ابتدا غلظت‌های مختلفی از عصاره اتانولی زوفا شامل ۰/۵، ۱، ۲، ٤، ۸، ۱٦، ۳۲، ٦٤، ۱۲۸ و ۲٥٦ تهیه شد. میزان ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلفعصاره اتانولی زوفا درون خانه‌های میکروپلیت ۹٦ خانه‌ای ریخته شد. ۱۰ میکرولیتر از هر یک از سوسپانسیون میکروبی استانداردنیز به هر خانه اضافه شد. لازم به ذکر است جهت تهیه غلظت‌های مختلف عصاره زوفا میزان ۲/٥٦ گرم از عصاره اتانولی زوفا با ۹/۵ میلی‌لیتر محیط کشت مولر هینتون براث و ۰/۵ میلی‌لیتر دی‌متیل سولفواکسید مخلوط شده و غلظت ۲٥٦ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ساخته شد. برای تهیه سایر غلظت‌ها با نصف کردن غلظت مادر رقت‌های بعدی عصاره اتانولی زوفا ساخته شد. در نهایت میکروپلیت ۹٦ خانه‌ای درون انکوباتور به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از گذشت ۲٤ ساعت، میکروپلیت ۹٦ خانه‌ای از انکوباتور خارج شد و میزان ۲۰ میکرولیتر از معرف تری فنیل تترازویلیوم کلرید به هر یک از چاهک‌ها اضافه شده و مجددا عمل انکوبه گذاری به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. در اثر واکنش بین معرف رنگی تری فنیل تترازویلیوم کلرید با سویه‌های میکروبی (در صورت رشد) رنگ قرمز یا ارغوانی مشاهده می‌شود. اولین چاهکی که در آن تغییر رنگ قرمز و ارغوانی مشاهده نشد غلظت آن خانه به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی برای سویه بیماری‌زا گزارش و ثبت شد[۱۳].

۲-٦- تعیین حداقل غلظت کشندگی

برای تعیین حداقل غلظت کشندگی عصاره اتانولی زوفا، از غلظت حداقل غلظت مهارکنندگی به سمت غلظت‌های بیشتر به روش پورپلیت میزان ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌ها بر محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد. پس از کشت غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی زوفا، پتری دیش‌های کشت شده درون انکوباتور دردمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲٤ ساعت قرار گرفت. پس از گذشت ۲٤ ساعت پتری دیش‌ها به صورت چشمی مورد ارزیابی قرار گرفت. اولین پتری دیشی که در آن کلنی باکتری قابل مشاهده پیدا نشد، غلظت آن به عنوان حداقل غلظت کشندگی در نظر گرفته شد[۱٤].

۲-۷- آنالیز آماری

برای ارزیابی داده‌های به دست آمده از فعالیت ضدمیکروبی عصاره اتانولی زوفا، از آزمون چند دامنه‌ای دانکن و نرم افزار SPSS[2] استفاده شد. سطح معنی‌داری ۵ درصد در نظر گرفته شد. حداقل تکرار برای هر یک از آزمون‌های ضدمیکروبی ۳ یا بیشتر بود.

۳- نتایج و بحث

نتایج ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی عصاره اتانولی زوفا به روش دیسک دیفیوژن آگار بر سویه‌های بیماری‌زا در جدول ۱، آورده شده است. نتایج نشان داد که قطر هاله بازدارندگی با افزایش غلظت عصاره بیشتر شد، به طوری که قطر هاله مشاهده شده در غلظت ۸۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای تمامی سویه‌ها میکروبی بیشترین بود. نتایج نشان داد که قطر هاله عدم رشد میکروبی برای سویه‌های گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا اینوکوا* نسبت به سویه‌های گرم منفی *اشرشیا کلی* و *سودوموناس ائروژینوزا* بیشتر بود. بیشترین هاله بازدارندگی با قطر ۱۹/۷۰ میلی‌متر در غلظت ۸۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* مشاهده شد. در غلظت ۸۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره اتانولی زوفا کم‌ترین هاله عدم رشد مشاهده شده با قطر ۱۳/۳۰ برای باکتری *اشرشیا کلی* مشاهده شد. نتایج آزمون آماری نشان داد که مقایسه دوتایی میان غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی برای تمامی غلظت‌ها (۲۰، ٤۰، ٦۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به غیر از غلظت ٤۰ با ٦۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای سویه *اشرشیا کلی* و غلظت ۲۰ با ٤۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای سویه گرم منفی

2. Statistical package for the social sciences

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-12]

سودوموناس ائروژینوزا در سایر غلظت‌ها اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد مشاهده شد. در روش دیسک دیفیوژن ماده ضدمیکروبی به طور غیرمستقیم از دیسک به محیط کشت منتقل شده و از رشد باکتری جلوگیری می‌کند.

Table 1 Mean inhibition zone diameter (mm) of *Hyssopus officinalis* extract on some microorganism pathogen (disk diffusion agar)

Concentration / Microorganism	20 mg/ml	40 mg/ml	60 mg/ml	80 mg/ml
Pseudomonas aeruginosa	9.20 ±0.79^{c}	10.10 ±0.57^{c}	12.20 ±0.39^{b}	14.00 ±0.43^{a}
Escherichia coli	8.80 ±0.62^{c}	10.00 ±0.38^{b}	11.10 ±0.42^{b}	13.30 ±0.58^{a}
Staphylococcus aureus	11.00 ±0.32^{d}	14.40 ±0.35^{c}	17.20 ±0.20^{b}	19.70 ±0.63^{a}
Listeria innocua	11.00 ±0.20^{d}	13.90 ±0.53^{c}	17.00 ±0.50^{b}	18.90 ±0.59^{a}

Values are expressed as mean ±standard deviations, $n = 3$; different letters (a, b, c and d) in each row show significant difference at $p \leq 0.05$

نتایج فعالیت ضدباکتریایی عصاره اتانولی زوفا به روش چاهک آگار در جدول ۲، آورده شده است. نتایج نشان داد در روش چاهک آگار با افزایش غلظت عصاره اتانولی از ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ۸۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر قطر هاله عدم رشد به طور معنی‌داری در سطح آماری ۵ درصد افزایش یافت، به طوری که آنالیز آماری برای مقایسه دوتایی هر یک از غلظت‌های استفاده شده از عصاره اتانولی زوفا برای تمامی سویه‌های میکروبی دارای اختلاف معنی‌داری بود. بیشترین قطر هاله عدم رشد در غلظت ۸۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای سویه‌ی گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* با قطر هاله ۲۳/۴۰ میلی‌متر مشاهده شد. در غلظت ۸۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کم‌ترین قطر هاله عدم رشد متعلق به باکتری گرم منفی *سودوموناس ائروژینوزا* با قطر ۱۴/۲۰ میلی‌متر بود. به طور کلی باکتری‌های گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا اینوکوا* نسبت به باکتری‌های گرم منفی *اشرشیا کلی* و *سودوموناس ائروژینوزا* دارای قطر هاله عدم رشد بزرگتری بودند. مقایسه نتایج فعالیت ضدمیکروبی عصاره اتانولی زوفا در روش‌های انتشار دیسک و چاهک آگار نشان می‌دهد که قطر هاله عدم رشد در روش چاهک آگار نسبت به دیسک دیفیوژن آگار بیشتر است. علت این امر را می‌توان به تماس مستقیم ماده ضدمیکروب (عصاره اتانولی زوفا) با سویه میکروبی ذکر کرد. پژوهشگران زیادی نیز دلیل این اختلاف را این پدیده ذکر کرده‌اند[۱۵ و ۱۶].

Table 2 Mean inhibition zone diameter (mm) of *Hyssopus officinalis* extract on some microorganism pathogen (well diffusion agar)

Concentration / Microorganism	20 mg/ml	40 mg/ml	60 mg/ml	80 mg/ml
Pseudomonas aeruginosa	9.30 ±0.19^{d}	10.60 ±0.23^{c}	12.30 ±0.29^{b}	14.20 ±0.43^{a}
Escherichia coli	8.90 ±0.62^{d}	10.50 ±0.33^{c}	12.50 ±0.46^{b}	14.90 ±0.19^{a}
Staphylococcus aureus	14.90 ±0.87^{d}	17.60 ±0.68^{c}	21.10 ±0.50^{b}	23.40 ±0.28^{a}
Listeria innocua	14.40 ±0.60^{d}	17.50 ±0.56^{c}	20.70 ±0.41^{b}	22.60 ±0.69^{a}

Values are expressed as mean ±standard deviations, $n = 3$; different letters (a, b, c and d) in each row show significant difference at $p \leq 0.05$.

بسیاری از پژوهش‌های انجام شده در گذشته اثرعصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی را بر میکروارگانیسم‌های عامل عفونت و مسمومیت غذایی مورد بررسی قرار داده‌اند و ذکر کرده‌اند که اثر عصاره‌ها و اسانس‌ها بر باکتری‌های گرم مثبت (همانند *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا اینوکوا*(در پژوهش حاضر) قدری بیشتر از تاثیر آن‌ها روی باکتری‌های گرم منفی همانند *اشرشیا کلی* و *سودوموناس ائروژینوزا*(در پژوهش حاضر) است [۱۷]. شاید علت حساسیت کمتر باکتری‌های گرم منفی‌ها به فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی به دلیل غشا خارجی اطراف دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی باشد که سبب محدود کردن انتشار ترکیبات ضدمیکروبی به لایه لیپوپلی ساکاریدی می‌شود[۱۷]. طی پژوهش‌های متعدد ثابت شده است که هر جز از اجزای اسانس‌ها درجات متفاوتی از فعالیت را بر باکتری‌های گرم مثبت یا باکتری‌های گرم منفی نشان می‌دهد. همچنین ترکیبات شیمیایی عصاره‌های به دست آمده از یک گونه گیاهی با توجه به مناطق مختلف جغرافیایی،

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-12]

شرایط آب و هوایی، خاک و یا مراحل مختلف برداشت به دست آمده باشند، می‌تواند متفاوت باشد. شاید علت تفاوت اثر ضدمیکروبی عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی بر باکتری‌های گرم مثبت و باکتری‌های گرم منفی، تغییرات در اجزای سازنده عصاره‌ها و اسانس‌ها باشد[۱۵ و ۱۷].

نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره اتانولی زوفا بر باکتری‌های بیماری‌زا در جدول ۳، آورده شده است.

Table 3 The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of *Hyssopus officinalis* extract on some microorganism pathogen

Microorganism	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)
Pseudomonas aeruginosa	64	128
Escherichia coli	64	128
Staphylococcus aureus	8	32
Listeria innocua	16	64

نتایج نشان داد که حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره اتانولی زوفا برای سویه‌های *سودوموناس ائروژینوزا*، *اشرشیا کلی*، *استافیلوکوکوساورئوس* و *لیستریا اینوکوا* به ترتیب ٦٤، ٦٤، ٨ و ١٦ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. در این آزمون نیز همانند آزمون‌های دیسک دیفیوژن و چاهک آگار حساسیت باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از باکتری‌های گرم منفی بود. به طور کلی نتایج پژوهش‌های صورت گرفته نشان می‌دهد، باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با انواع گرم منفی در برابر عصاره‌های گیاهی مقاومت کمتری نشان می‌دهند که این مسئله احتمالا به دلیل ساختار غشای باکتری‌های گرم مثبت است. به نظر می‌رسد که علت مقاومت بیشتر باکتری‌های گرم منفی به عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی احتمالا پیچیدگی بیشتر غشای مضاعف سلولی این میکروارگانیسم‌ها در مقایسه با غشای ساده گلیکوپروتئینی/ تیکوئیک اسید[3] باکتری‌های گرم مثبت است [۱۵ و ۱۷]. نتایج حداقل غلظت کشندگی عصاره اتانولی گیاه زوفا در جدول ۳، ذکر شده است. نتایج نشان داد که حداقل غلظت کشندگی عصاره اتانولی زوفا برای سویه‌های *سودوموناس ائروژینوزا*، *اشرشیا کلی*، *استافیلوکوکوساورئوس* و *لیستریا اینوکوا* به ترتیب ۱۲۸، ۱۲۸، ۳۲ و ٦٤ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. به طور کلی نتایج حداقل غلظت کشندگی نشان داد که برای کشندگی سویه‌های میکروبی باید از غلظت‌های بالاتری نسبت به مهار رشد آن استفاده کرد. در پژوهش حاضر نتایج حداقل غلظت کشندگی برای تمامی سویه‌های بیماری‌زا بزرگتر از حداقل غلظت مهارکنندگی بود. نصیرپور و همکاران (١٣٩٤)، در پژوهشی اثر ضدباکتریایی عصاره‌های تعدادی از گیاهان داروی از جمله گیاه زوفا را بر تعدادی از میکروارگانیسم عامل عفونت و مسمومیت غذایی مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که حساس‌ترین باکتری در برابر عصاره‌ها *لیستریا مونوسیتوژنز* و مقاوم‌ترین باکتری*اشرشیاکلی* بود[۱۸]. مقایسه نتایج این پژوهشگران با یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که باکتری *اشرشیا کلی* نیز مقاوم‌ترین سویه میکروبی بود. بنابراین می‌توان بیان کرد که نتایج این پژوهشگران با یافته‌های مطالعه ما مطابق بود.احمدی و همکاران (۱۳۹۵)، فعالیت ضدمیکروبی تعداداز عصاره‌های گیاهان دارویی از جمله زوفا را بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیا کلی* با روش دیسک دیفیوژن و چاهک آگار مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که در دو روش دیسک دیفیوژن و چاهک آگار برای باکتری *اشرشیا کلی* هاله عدم رشد مشاهده نشد هر چند برای باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در روش‌های دیسک و چاهک به ترتیب قطر هاله بازدارندگی ۱۳ و ۱۵ میلی‌متر بود[۱۹]. در این پژوهش نیز همانند مطالعه ما قطر هاله عدم رشد در روش چاهک برای باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشتر از روش دیسک دیفیوژن بود.حسن شادیان و همکاران (۲۰۱۹)، فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌های متانولی و اتانولی گیاه زوفا را بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس*، *سودوموناس ائروژینوزا*، *اشرشیا کلی* و *کلبسیلا پنومونیه*را با روش‌های دیسک دیفیوژن و حداقل غلظت مهارکنندگی در شرایط برون تنی مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که قطر هاله عدم رشد برای هر دو عصاره اتانولی و متانولی برای باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* با قطر ۱۸ و ۲۰ میلی‌متر بیشترین بود. کم‌ترین قطر هاله عدم

3. Teichoic acid

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-12]

رشد نیز برای باکتری گرم منفی *سودوموناس ائروژینوزا* مشاهده شد. در مطالعه ما نیز بیشترین حساسیت مربوط به باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* بود و باکتری *سودوموناس ائروژینوزا* نیز یکی از سویه‌های مقاوم به عصاره اتانولی زوفا بود. نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره اتانولی زوفا برای *استافیلوکوکوس اورئوس* نیز ۶/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود[۲۰].

٤- نتیجه‌گیری

به طور کلی نتایج این پژوهش نشان داد که با افزایش غلظت عصاره اتانولی زوفا قطر هاله عدم رشد برای سویه‌های میکروبی بیماری‌زا افزایش پیدا می‌کند. باکتری‌های گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا اینوکوا* نسبت به باکتری‌های گرم منفی *سودوموناس ائروژینوزا* و *اشرشیا کلی* حساس‌تر بودند. در ادامه پیشنهاد می‌شود پژوهش‌های بیشتری بر سایر میکروب‌های بیماری زا در شرایط برون‌تنی انجام گیرد و حداقل غلظت ماده موثر گیاه نیز تعیین شود تا بتوان از پتانسیل این گیاه به عنوان نگهدارنده طبیعی در صنعت غذایی بهره گرفت.

٥- تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان به دلیل حمایت‌های مادی و معنوی صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

٦- منابع

[1] Hintz, T., Matthews, K. K., & Di, R. (2015). The use of plant antimicrobial compounds for food preservation. *BioMed Research International,* 2015, 1-12.

[2] Alizadeh Behbahani, B., Falah, F., Lavi Arab, F., Vasiee, M., &TabatabaeeYazdi, F. (2020). Chemical composition and antioxidant, antimicrobial, and antiproliferative activities of Cinnamomum zeylanicum bark essential oil. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine,* 2020, 1-8.

[3] Singh, M., Pandey, N., Agnihotri, V., Singh, K., & Pandey, A. (2017). Antioxidant, antimicrobial activity and bioactive compounds of Bergenia ciliataSternb.: A valuable medicinal herb of Sikkim Himalaya. *Journal of Traditional and Complementary Medicine,* 7(2), 152-157.

[4] Alizadeh Behbahani, B., & Imani Fooladi, A. A. (2018). Development of a novel edible coating made by Balangu seed mucilage and Feverfew essential oil and investigation of its effect on the shelf life of beef slices during refrigerated storage through intelligent modeling. *Journal of Food Safety,* 38(3), e12443.

[5] Jamshidi-Kia, F., Lorigooini, Z., &Amini-Khoei, H. (2018). Medicinal plants: Past history and future perspective. *Journal of herbmed pharmacology,* 7(1), 1-7.

[6] Kazazi, H., Rezaei, K., Ghotb-Sharif, S. J., Emam-Djomeh, Z., & Yamini, Y. (2007). Supercriticial fluid extraction of flavors and fragrances from Hyssopus officinalis L. cultivated in Iran. *Food Chemistry,* 105(2), 805-811.

[7] Fathiazad, F., &Hamedeyazdan, S. (2011). A review on Hyssopus officinalis L.: Composition and biological activities. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 5(17), 1959-1966.

[8] Najafpour-navayi, M., & Mirza, M. (2003). Comparision of chemical components of Hyssopus officinalis L. esentialo oil in vitro and in natural habitat. *Iranian Journal of Medical and Aromatic Plants,* 18, 41-53.

[9] Tabatabaei Yazdi, F., AlizadeBehbahani, B., HeidariSureshjani, M. (2014). The comparison of antimicrobial effects of Chevil (Ferulagoangulata) extract with a variety of common therapeutic antibiotics in vitro. Journal of Arak University Medical Sciences, 17 (3), 35-46. [Full text in Persian].

[10] Tabatabaei Yazdi, F., AlizadeBehbahani, B., & Mortazavi, A. (2014). Investigating the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of the Lavandula stoechas L. and Rosmarinus officinalis L. extracts on pathogen bacterias "in vitro". *Journal of Paramedical Sciences (JPS),* 5(2), 91-101.

[11] Portillo, A., Vila, R., Freixa, B., Adzet, T., &Cañigueral, S. (2001). Antifungal activity of Paraguayan plants used in traditional

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-12]

medicine. *Journal of Ethnopharmacology,* 76(1), 93-98.

[12] Barzegar, H., Mehrnia, M.A., Alizadeh Behbahani, B. (2018). Determination of the chemical composition, antioxidant activity and the antimicrobial effect of *Heracleum Lasiopetalum* on infection and food poisoning microorganisms. Journal of Applied Microbiology in Food Industry, 4(4), 15-28. [Full text in Persian].

[13] Noshad, M., Hojjati, M., &Alizadeh Behbahani, B. (2018). Black Zira essential oil: Chemical compositions and antimicrobial activity against the growth of some pathogenic strain causing infection. *Microbial Pathogenesis,* 116, 153-157.

[14] Barzegar, H., Alizadeh Behbahani, B., Mehrnia, M.A. (2020). Quality retention and shelf life extension of fresh beef using Lepidium sativum seed mucilage-based edible coating containing Heracleum lasiopetalum essential oil: an experimental and modeling study. Food Science and Biotechnology, 29,717-728.

[15] Alizadeh Behbahani, B., Shahidi, F., Yazdi, F. T., Mortazavi, S. A., &Mohebbi, M. (2017). Antioxidant activity and antimicrobial effect of tarragon (Artemisia dracunculus) extract and chemical composition of its essential oil. *Journal of Food Measurement and Characterization,* 11(2), 847-863.

[16] Alizadeh behbahani, B., Noshad, M., Falah, F. (2019). Investigation of antimicrobial activity of Fennel essential oil on some pathogenic microorganisms causing infection and food poisoning and its interaction with kanamycin antibiotic. Food Science and Technology, 16 (91), 233-241. [Full text in Persian].

[17] Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology,* 94(3), 223-253.

[18] Nasirpour, M., Yavarmanesh, M., Mohamadi Sani, A., Mohamdzade Moghadam. M. (2014). Antibacterial effect of aqueous extract of Artemisia aucheri, Artemisia sieberi and Hyssopus officinalis L. on the food borne pathogenic bacteria. Journal of Food Science and Technology, 12(46), 73-84.

[19] Ahmadi, E., Abdollahi, A., Najafipour, S., Meshkibaf, M. H., FasihiRamandi, M., Namdar, N. (2016). Surveying the effect of the phenol compounds on antibacterial activity of herbal extracts: in vitro assessment of herbal extracts in Fasa-Fars province. Journal of Fasa University of Medical Sciences, 6 (2), 210-220. [Full text in Persian].

[20] Hassanshahian, M., Saadatfar, A., &Masoumi, F. (2019). Antimicrobial properties of Hyssopus officinalis extract against antibiotic-resistant bacteria in planktonic and biofilm form. *Biological Journal of Microorganism,* 7(28), 91-101.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-12]

Iranian Journal of Food Science and Technology

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Evaluation of the minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of *Hyssopus officinalis* extract on a number of Gram-positive and Gram-negative bacteria: A study "*in vitro*"

Alizadeh Behbahani, B.[1*], Noshad, M.[1]

1. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran

ARTICIE INFO

Article History:

Received 10 June 2020
Accepted 22 August 2020

Keywords:

Hyssopus officinalis,
Antimicrobial effect,
Inhibition zone,
Antibiotic.

DOI: 10.29252/fsct.18.01.01

*Corresponding Author E-Mail:
B.alizadeh@asnrukh.ac.ir

ABSTRACT

Hyssopus officinalis is a belongs to *Lamiaceae*family and a herb widely growing in Iran .The aim of this experimental study was to evaluate the antimicrobial effect of *Hyssopus officinalis*extract in 4 ways: disc diffusion agar, well diffusion agar, minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) on some microorganism pathogen "*in vitro*".The results showed that with increasing the concentration of *Hyssopus officinalis*extract, the inhibition zone diameter increased. The highest inhibition zone with a diameter of 19.70 mm was observed at a concentration of 80 mg/ml for Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus*. At a concentration of 80 mg/ml, the ethanolic extract of *Hyssopus officinalis*showed the lowest inhibition zone observed with a diameter of 13.30 for *Escherichia coli*.The results showed that the MIC of *Hyssopus officinalis* extract for *Pseudomonas aeruginosa*,*Escherichia coliStaphylococcus aureus* and *Listeria innocua* was 64, 64, 8 and 16mg/ml respectively. The MBC for 128, 128, 32 and 64 mg/ml respectively. The data obtained in this study confirmed that *Hyssopus officinalis* extract inhibit growth some microorganism pathogen "*in vitro*".

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-12]