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 نگه‌دارنده‌های 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 نرکیبات موثره سه اسانس پونه، نعنا و آویشن خواص ضد میکروبی آن ها نیز بررسی شد. جهت تجزیه و شناسایی اسانس‌ها از دستگاه گاز کروماتوگرافی طیف سنجی جرمی(GC/MS)استفاده شد. خواص ضد باکتریایی اسانس های مذکور بر تعدادی از باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت در مقایسه با آنتی بیوتیک‌های رایج نظیرکلرامفنیکل و تتراسایکلین به روش انتشار دیسک مورد بررسی قرار گرفت. در این بررسی، ٤٠ ترکیب فرار در اسانس آویشن شناسایی گردید که تیمول (٣٠/٦١ ٪)، کارواکرول (٢٢/١٨ ٪)، پاراسیمن (٧/٣٤ ٪)، گاماترپینن (٦/٦٦ ٪) و لینالول (٥/٢٦ ٪) عمده ترکیبات موجود در اسانس آویشن بودند، ٣١ ترکیب شیمیایی در اسانس پونه شناسایی شد که پیپریتون (٣٢/١٦ ٪)، پیپریتنون (٢٩/٦٢ ٪) و آلفاترپینئول (٦/٤٠ ٪) عمده ترکیبات موجود در اسانس پونه بودند. همچنین٢٧ ترکیب در اسانس نعنا شناسایی گردید که کارون (٥١/٠٣ ٪) و لیمونن (٢١/١٢ ٪) 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 احتمالا به دلیل وجود مقادیر بیشتر تیمول و کارواکرول در برگ های این گیاه می باشد. نتایج نشان داد که اسانس آویشن می‌تواند به‌عنوان یک نگهدارنده طبیعی در مواد غذای به‌کار گرفته شود.

کلید واژگان: پاتوژن، اسانس، نعنایان، گازکروماتوگرافی متصل به طیف‌سنج جرمی

* مسئول مکاتبات: mahdi_seyedain@yahoo.com

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-07-16]

۱- مقدمه

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 ملاحضه‌ای را به خود اختصاص داده است. اخیرا استفاده ار ترکیباتی که به طور کلی بی ضرر تلقی می‌شوند و به GRAS[1] معروفند، توجه زیادی را به خود معطوف کرده‌اند. ترکیبات طبیعی فعال بیولوژیکی مشتق از گیاهان از جمله مهم ترین ترکیبات GRAS می باشند زیرا مواد حاصل از اسانس و عصاره های 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 [۱و۲]. با این وجود در حال حاضر حدود ۲۵-۵۰ درصد از داروهای رایج با منشا گیاهی در دنیا مصرف می‌شوند. از آنجایی که روز به روز بر تعداد باکتری‌های بیماری‌زای مقاوم به آنتی بیوتیک‌های رایج افزوده می‌شود، لذا جهت کنترل و از بین بردن عفونت‌های میکروبی مقاوم خصوصا عفونت‌های بیمارستانی، کشف عوامل درمانی جدید یک نیاز ضروری می باشد[۳]. ترکیبات ضد میکروبی به دست آمده از گیاهان با مکانیسم‌های متفاوت از آنتی-بیوتیک‌ها بر باکتری‌ها اثر می‌کنند که این مسئله در درمان عفونت‌های ناشی از سویه‌های مقاوم میکروبی از نظر بالینی حائز اهمیت است[٤]. اسانس‌های گیاهی ترکیباتی فرار و معطر هستند که در اندام های مختلف گیاه وجود دارند و یکی از نقش‌هایی که در گیاهان به عهده دارند، محافظت از گیاه در برابر عوامل مختلف فساد می باشد[۵]. این ترکیبات دارای اجزاء مختلفی در ترکیب خود می باشند 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 [٦و۷]. اسانس‌های پونه، نعنا و آویشن حاوی ترکیبات ترپنی مانند تیمول وکارواکرول هستند که خواص ضد میکروبی اسانس کامل بیشتر از هریک از ترکیبات آن‌هاست که نشان دهنده اثر سینرژیستی هر کدام از ترکیبات درون اسانس با یکدیگر می باشد[٦و۹-۸]. باکتری‌ها از طریق بیماری‌های عفونی و همچنین ایجاد مسمومیت‌های غذایی سلامت افراد را تهدید می‌کنند. از طرف دیگر به سرعت در برابر آنتی بیوتیک مقاومت از خود نشان می دهند و قابلیت این را دارد که به طور همزمان در برابر چندین آنتی بیوتیک 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 میکروب کشی مناسب، روند تولید سویه‌های مقاوم در آن کاهش یابد و اثرات جانبی کمتری را دارا باشد [۱۰و۱۱].

در میان گیاهان دارویی پونه (pennyroyal)، نعنا (mint) و آویشن (thyme) از پرمصرف ترین گیاهانی هستند که از گذشته تاکنون به عنوان گیاه دارویی با ارزش مصرف شده و در تمام فارماکوپه های 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 نشان دهنده 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 روش ها

۲-۱-استخراج اسانس

گیاهان آویشن (*Thymus vulgaris*)، نعنا (*Mentha spicata*) و پونه (*Mentha pulegium*) که به خانواده نعنایان 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 جمع‌آوری‌شده به روش تقطیر آبی[2] انجام پذیرفت و بدین منظور ابتدا گیاهان تهیه‌شده 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 منتقل‌و با ۱ لیتر آب به مدت ۳ ساعت تقطیر گردید. اسانس جمع‌آوری‌شده با سدیم سولفات بی‌آب، خشک و تا زمان آزمایش در یخچال نگهداری شد.

1. Grenerally regarded as safe

2. Hydrodistillation

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-07-16]

۲-۲-شناسایی ترکیبات اسانس

شناسایی ترکیبات اسانس استخراج‌شده با تزریق ۰/۵ میکرو لیتر اسانس رقیق‌شده با سیکلوهگزان 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 طیف‌سنج جرمی مدل Agilent 5975 انجام پذیرفت. برنامه دمایی ستون به این طریق تنظیم گردید: دمای ابتدایی آن ٤۰ درجه سانتی‌گراد بود و دما با سرعت ۵ درجه در دقیقه تا رسیدن به دمای ۲۰۰ درجه سانتی‌گراد 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 درنهایت با سرعت ۲۵ درجه در دقیقه به دمای ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد بود رسانده شد. گاز هلیوم با سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه به‌عنوان گاز حامل به کار گرفته شد و دمای محفظه تزریق ۲٤۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم گردید. طیف‌سنج جرمی با ولتاژ یونیزاسیون 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 کواتز) و مقایسه با شاخص کواتز (KI) گزارش‌شده ترکیبات در نرم‌افزار 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 موردبررسی 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 باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت به‌صورت لیوفیلیزه از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران و شرکت تهران داروش طب تهیه شدند. نام و مشخصات باکتری‌های موردنظر در جدول ۱ آورده شده است. کیت‌های حاوی دیسک‌های شاهد با قطر ٦/٤ میلی‌متر و ویال های استریل حاوی دیسک‌های آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل و تتراسایکلین از شرکت پادتن طب خریداری شدند.محیط کشت مولر هینتون آگار، تریپتیکاز 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 اسانس‌ها 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 لیوفیلیزه خریداری‌شده از حالت فریزری، پاساژ دادن سوش های موردنظر، مقایسه با مایع ۰/۵ مک فارلند، بررسی خواص آنتی باکتریایی اسانس‌ها در مقادیر۱۰، ۱۵و ۲۰ میکرو لیتر در مقایسه با آنتی‌بیوتیک، اندازه‌گیری قطر هاله‌های 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
Bacillus cereus	1154	Positive	P.T.C.C	ISIRO*
Entrococcus faecium	10541	Positive	A.T.C.C	ISIRO
Entrococcus faecalis	29212	Positive	A.T.C.C	Tehran Darush Medical Co.
Staphylococcus aureus	25923	Positive	A.T.C.C	Tehran Darush Medical Co.
Listeria monocytogenes	11115	Positive	A.T.C.C	Tehran Darush Medical Co.
Salmonella typhi	1609	Negative	P.T.C.C	ISIRO
Escherichia coli	25922	Negative	A.T.C.C	ISIRO
Shigella dysenteria	1188	Negative	P.T.C.C	ISIRO

* Iranian Scientific and Industrial Research Organization

۲-٤-تجزیه وتحلیل آماری

این تحقیق در قالب یک طرح کامل تصادفی انجام پذیرفت و تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۹ صورت پذیرفت. کلیه آزمون‌ها با سه تکرار انجام پذیرفت.

۳- نتایج و بحث

۳-۱-نتایج حاصل از تجزیه و شناسایی ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس‌ها

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

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-07-16]

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**

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-07-16]

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

در این تحقیق ٤٠ ترکیب فرار در اسانس آویشن شناسایی گردید که حدود ۹۹/۵۱ درصد از ترکیبات اسانس را شامل می‌گردد. همان‌طور که جدول نشان می‌دهد تیمول (۳۰/٦۱ ٪)، کارواکرول (۲۲/۱۸ ٪)، پاراسیمن (۷/۳٤ ٪)، گاماترپینن (٦/٦٦ ٪) و لینالول (۵/۲٦ ٪) عمده ترکیبات موجود در اسانس آویشن می‌باشند.

ترکیبات فرار شناسایی‌شده در اسانس گیاه پونه در جدول ۳ نشان داده‌شده است. در این تحقیق ۳۱ ترکیب شیمیایی در اسانس پونه که درمجموع ۹۵/۷۹ درصد از کل ترکیبات را تشکیل می‌داد شناسایی گردید. همان‌گونه که مشاهده می‌گردد پیپریتون (۳۲/۱٦ ٪)، پیپریتنون (۲۹/٦۲ ٪) و آلفاترپینئول (٦/٤۰ ٪) 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

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-07-16]

نتایج حاصل از شناسایی ترکیبات فرار موجود در اسانس نعنا در جدول ٤ نشان داده‌شده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود ۲۷ ترکیب از مواد موجود در اسانس نعنا که تشکیل‌دهنده ۹۸/۳۵ درصد ترکیبات موجود در آن می‌باشند شناسایی گردیدند. کارون (۵۱/۰۳ ٪) و لیمونن (۲۱/۱۲ ٪) عمده ترکیبات موجود در اسانس نعنا بودند که درمجموع بیش از ۷۲ درصد از ترکیبات فرار موجود در اسانس را فقط این دو ماده تشکیل می‌دادند.

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 ترکیب‌های اصلی اسانس‌های مورد آزمایش با تحقیق‌های قبلی نشان می‌دهد، میزان آن‌ها در نمونه‌ای مختلف متفاوت است. صادق زاده و همکاران (۱۳۸۵) گزارش کردند، ترکیب‌های عمده تشکیل‌دهنده اسانس آویشن شیرازی: تیمول (٥٢/٤ درصد)، گاماترپنین (١٧/٦ درصد)، پاراسیمن (١٣/٢ درصد) و کارواکرول (٦/١ درصد) است [١٢]. شریفی فر و همکاران (٢٠٠٧) ترکیب‌های عمده اسانس آویشن شیرازی را تیمول (٣٧/٥٩ درصد)، کارواکرول (٣٣/٦٥ درصد)، پاراسیمن (٧/٧٢ درصد) و گاماترپینن (٣/٠٨٨ درصد) گزارش کردند [١٣]. هم‌چنین ترکیبات فرار شناسایی شده از اسانس پونه و نعنا در این تحقیق با گزارش سایر محققین منطبق بود، اگرچه در برخی ترکیبات دارای اندکی تغییر بودند که با توجه به جایگاه برداشت گیاهان امری طبیعی است [١٤و ١٥].

۳-۲- نتایج آزمون‌های فعالیت ضد میکروبی اسانس‌ها

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

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-07-16]

آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل و تتراسایکلین در جدول‌های ۱۰-۵ ارائه‌شده 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
Salmonella typhi	12.27±0.45aB	21.06±1.05cB	12.71±0.5aB	13.05±1.22aA	16.15±2.04Bb
Escherichia coli	13.48±2.14bC	21.17±0.76cB	11.65±0.01aA	13.9±1.02bA	14.3±0.01Ba
Shigella dysenteria	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
Salmonella typhi	17.42±2.02aB	25.44±3.44bB	22.46±1.45bA	23.89±3.44bA	46.01±1.01Ca
Escherichia coli	18.16±2.3aB	26.93±3.11bC	32.65±1.45cB	44.87±3.03dC	48.44±1.45Db
Shigella dysenteria	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
Salmonella typhi	16.33±0.56Bc	24.01±0.67dB	14.45±0.45Aa	19.02±1.71cB	20.43±0.98cA
Escherichia coli	14.98±0.89Ab	19.02±0.93bA	14.41±1.02Aa	15.12±1.34abA	18.76±1.54bA
Shigella dysenteria	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
Staphylococcus aureus	23.35±0.09cC	20.67±0.22 bC	18.1±0.43 aC	38.11±0.12 dD	23.16±0.01 Ca
Enterococcus faecalis	12.65±0.075bA	11.85±0.02bA	6.52±0.21A	15.15±0.01cA	25.16±0.01Db
Enterococcus faecium	19.165±0.49cB	17.34±0.76 bB	14.23±1.01 aB	29.01±1.0 2eC	23.33±0.76 Da
Listeria monocytogenes	27.35±0.47bD	26.11±0.94 bD	22.5±0.04aD	38.65±0.29dD	33.66±0.29Cd
Bacillus cereus	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

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-07-16]

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
Staphylococcus aureus	38.76±0.66 bD	23.44±0.35 aA	69.34±1.33dC	62.11±1.16 dC	48.12±0.67Cc
Enterococcus faecalis	15.33±0.15 aA	25.33±0.98 bB	46.83±0.67eA	40.01±0.44 dA	28.5±0.32Ca
Enterococcus faecium	28.02±0.92 bC	24.03±1.04aA	74.5±0.67 eD	59.12±0.27dC	51.31±1.01cD
Listeria monocytogenes	38.12±0.32Bd	33.77±0.47aD	70.35±0.15eC	61.21±1.26 dC	54.01±0.78 cD
Bacillus cereus	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
Staphylococcus aureus	14.89±1.14Ca	10.23±1.54bA	6.76±0.54aA	38.23±1.54eD	23.25±0.34Da
Enterococcus faecalis	18.65±0.87Cb	14.76±0.98 bB	10.11±1.23 aB	14.94±0.85 bA	24.87±1.03 dB
Enterococcus faecium	20.89±0.94Cc	13.67±1.28bB	9.13±0.16aB	28.34±1.12 fC	23.45±1.23Da
Listeria monocytogenes	20.25±1.36Cc	17.81±1.12 bC	12.65±1.78aC	38.22±1.22eD	33.76±0.43Dd
Bacillus cereus	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

چنانچه مشاهده می شود میانگین قطر هاله عدم رشد اسانس آویشن بر باکتری‌های گرم منفی (سالمونلا، اشرشیاکلی و شیگلا) در غلظت ۲۰ میکرولیتر حدود ٤٧ میلیمتر و در مورد اسانس نعنا ۲۰ میلیمتر و برای اسانس پونه ١٦ میلی‌متر است. میانگین قطر هاله عدم رشد اسانس آویشن بر باکتری‌های گرم مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس، انتروکوکوس فکالیس، انتروکوکوس فاسیوم، لیستریامونوسیتوژنز و باسیلوس سرئوس) در غلظت ۲۰ میکرولیتر حدود ٤٥ میلیمتر و در مورد اسانس نعنا ۲۷ میلیمتر و برای اسانس پونه ٢٦ 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 لایه پپتیدوگلیکانی در غشای باکتری‌های گرم منفی می‌تواند عاملی در تاثیر کم‌تر اسانس‌ها بر این دسته از باکتری‌ها باشد [١٦]. نتایج نشان داد که با افزایش مقدار اسانس، قطر هاله عدم رشد باکتری‌ها افزایش یافت که با نتایج سایر محققین هم منطبق بود [٥ و٨]. 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 باکتری های گرم مثبت و منفی مطابقت دارد [٩ و ١٨-١٧]. نتایج بررسی خواص ضدباکتریایی اسانس-های پونه و نعنا بر باکتری‌های گرم منفی و مثبت در این تحقیق تائید کننده گزارش سایر محققین است [١٤ و١٩].

٤-نتیجه‌گیری 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

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-07-16]

گرفت. نتایج نشان داد که تیمول، کارواکرول، پاراسیمن، گاماترپینن و لینالول عمده ترکیبات موجود در اسانس آویشن بودند و پیپریتون، پیپریتنون و آلفاترپینئول 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 باکتری-های 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 احتمالا به دلیل وجود مقادیر بیشتر تیمول و کارواکرول در برگ-های این گیاه می باشد. 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 Ethnophaemacology*, 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 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 sovvei* 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.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-07-16]

[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.

[18] Sangclic O. 2003. Sensitivity of four pathogenic bacteria to Turkish thyme and oregano, *LWT-Food Science and Technolog*y, 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.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-07-16]

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

Azizi Tabrizzad, 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%), gama-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 constitutes. 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

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-07-16]