

## کاربرد اسانس روغنی آرتیمسیا افسنطین در کنترل رشد باکتری‌های بیماری‌زا روی کاهوی تازه

نفیسه دعوتی<sup>1\*</sup>، سمیه علی میرزائی<sup>2</sup>

1- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

2- کارشناس آزمایشگاه، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

(تاریخ دریافت: 98 /07/28 تاریخ پذیرش: 98/09/20)

### چکیده

امروزه به دلیل اثرات جانبی نگهدارنده‌های شیمیایی، مصرف نگهدارنده‌های طبیعی نظیر اسانس‌های روغنی پیشنهاد می‌شود. سال‌های زیادی است که فعالیت ضد میکروبی اسانس‌های روغنی به خوبی شناخته شده است. در این مطالعه، بعد از تهیه اسانس روغنی آرتیمسیا افسنطین، ترکیبات آن توسط کروماتوگرافی گازی-طیف سنج جرمی (GC-MS) شناسایی شد. سپس فعالیت ضد میکروبی اسانس روغنی علیه استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلی، سالمونلا تایفی و باسیلوس سرئوس توسط روش‌های انتشار دیسک در آگار، MIC و MBC ارزیابی گردید. براساس نتایج MIC، غلظت‌های اسانس روغنی (16  $\mu\text{l/ml}$ ، 32 و 64 جهت ارزیابی کارایی آن در غیرفعال سازی رشد باکتری‌های بیماری‌زا روی کاهوی تازه انتخاب گردید. کاهو با استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلی، سالمونلا تایفی و باسیلوس سرئوس تلقیح گردید و تعداد باکتری‌ها در فواصل زمانی (0، 3، 24 و 72 ساعت) شمارش گردید. غلظت زد-بتا-اوسیمین اکساید به عنوان ترکیب اصلی اسانس روغنی  $76,53 \pm 2,36\%$  بود. نتایج مقادیر MIC، MBC و انتشار دیسک در آگار نشان داد که حساس‌ترین و مقاوم‌ترین باکتری‌ها به ترتیب استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی می‌باشند. در مقایسه با کنترل (آب)، کاهوی تیمار شده با اسانس روغنی 64  $\mu\text{l/ml}$  بعد از 72 ساعت تیمار نشان داد که باعث کاهش 3,36، 2,27، 3,23 و 3,47 لگاریتمی به ترتیب در تعداد استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلی، سالمونلا تایفی و باسیلوس سرئوس در هر گرم کاهو می‌شود. این تحقیق نشان داد که اسانس روغنی آرتیمسیا افسنطین می‌تواند یک عامل ضد میکروبی موثر جهت کنترل رشد باکتری‌های پاتوژنیک روی کاهوی تازه باشد.

کلید واژگان: ضد میکروبی - آرتیمسیا افسنطین - کاهو.

\*مسئول مکاتبات: n.davati@basu.ac.ir

**1- مقدمه**

جنس آرتیمیسیا یکی از بزرگترین جنس‌های خانواده Asteraceae است و حاوی بیش از 800 گونه می باشد. بسیاری از گونه‌های این جنس، خواص درمانی بسیاری نظیر فعالیت ضد مالاریا، ضد ویروس و ضد تومور دارند [1]. در این مطالعه گونه *Artemisia absinthium* از کوه‌های زاگرس ایران به منظور ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی اسانس روغنی حاصل از آن جمع‌آوری گردید. ترپین‌ها، هیدروکربن‌های تولید شده از ترکیب چندین واحد ایزوترپن بوده و از ترکیبات اصلی این گیاه می‌باشند. این ترکیب ساختار هیدروکربنی داشته، توسط آنزیم سیکلاز به ساختار حلقه‌ای تبدیل می‌شود و در سیتوپلاسم سلول‌های گیاهی از طریق مسیر بیوستتزی اسیدهای موالونیک تولید می‌شود. ترپین‌های اصلی شامل مولکول‌های مونوترپنی ( $C_{10}H_{16}$ ) و چند ترپنی ( $C_{15}H_{24}$ ) هستند. نمونه‌ای از ترپین‌ها شامل پی - سایمن<sup>1</sup>، لیمون<sup>2</sup>، ترپین<sup>3</sup>، سابین<sup>4</sup> و پین<sup>5</sup> هستند [2]. یکی از ترکیبات اصلی در نگهدارنده‌های طبیعی ترپین‌ها بوده و می‌تواند جایگزین خوبی برای نگهدارنده‌های شیمیایی مواد غذایی باشند. مصرف نگهدارنده‌های شیمیایی در مواد غذایی عوارض جانبی زیادی نظیر افزایش حساسیت، آلرژی، آسم، بیش‌فعالی، آسیب‌های عصبی و سرطان ایجاد می‌کنند. اما تحقیقات ثابت کرده است که اکثر نگهدارنده‌های طبیعی نظیر اسانس‌های روغنی فاقد عوارض جانبی هستند. این اسانس‌ها حاوی خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی، ضد قارچی، ضد ویروسی و ضد آنزیمی می‌باشند [3]. نقش نگهدارنده‌ها افزایش طول عمر نگهداری مواد غذایی و جلوگیری از مسمومیت و عفونت‌های غذایی است. در اثر مسمومیت در دنیا هر ساله 220 میلیون کودک دچار اسهال شده و 96000 نفر می‌میرند [4] که عامل مسمومیت‌های غذایی باکتری‌های بیماری‌زا می‌باشند. کاهو یکی از مواد غذایی است که به صورت خام مصرف شده و می‌تواند حامل باکتری‌های بیماری‌زای غذایی نظیر سالمونلا و اشرشیاکلی باشد. بطوریکه در آمریکا از سال 1995 تا 2006 حدود 22 شیوع

1. P-cymene
2. Limonene
3. Terpinene
4. Sabinene
5. Pinene

آلودگی ثبت شد که نیمی از آن به علت مصرف سبزیجات آلوده‌ای نظیر اسفناج و کاهو بود [۵،۶،۷]. از عوامل افزایش آلودگی کاهو عدم رعایت موازین بهداشتی در حمل و نقل، توزیع و آماده‌سازی، همچنین استفاده از فاضلاب جهت آبیاری و کودهای نارس حیوانی و انسانی است [۸،۹]. هدف از این مطالعه استخراج اسانس روغنی از گیاه *Artemisia absinthium* بررسی فعالیت ضد باکتریایی آن علیه باکتری‌های بیماری‌زای غذایی بخصوص کنترل رشد آن‌ها در کاهو می‌باشد.

**2- مواد و روشها****2-1- تهیه نمونه**

بخش‌های هوایی گیاه افسنظین از کوه‌های همدان جمع‌آوری شد. این گیاه توسط مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی استان همدان مورد تایید قرار گرفت. نمونه‌های خشک شده و پودر شده (الک با مش 1 میلی متر) به میزان 50 گرم در هر مرحله به مدت 3 ساعت با استفاده از کلونجر اسانس‌گیری شد. از سولفات سدیم بی‌آب جهت حذف آب از اسانس روغنی استفاده گردید. سپس اسانس در ظرف شیشه‌ای محکم و تیره در دمای 4 درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

**2-2- آنالیز ترکیبات اسانس توسط GC-MS**

ترکیبات گیاه افسنظین توسط GC-MS مورد آنالیز قرار گرفت. نمونه‌های اسانس توسط پژوهشکده گیاهان دارویی دانشگاه شهید بهشتی آنالیز شد. شناسایی ترکیبات موجود در اسانس به‌وسیله دستگاه‌های کروماتوگرافی گازی و کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی انجام گرفت. دستگاه GC از نوع Trace GC شرکت سازنده ThermoQuesst-Finnigan با طول ستون 30 متر، قطر داخلی 0/25 میلی متر و ضخامت لایه 0/25 میکرومتر بود. حجم تزریق 0/20 میکرولیتر، دمای تزریق گر 250 درجه سانتیگراد و نوع گاز حامل نیتروژن بود. دستگاه GC/MS از نوع Trace GC کشور سازنده آمریکا، شرکت سازنده ThermoQuesst-Finnigan، با طول ستون 30 متر، قطر داخلی 0/25 میلی متر و ضخامت لایه 0/25 میکرومتر، نوع گاز

حامل هلیوم با جریان 1/10 میلی لیتر بر دقیقه، انرژی یونیزاسیون 70 eV و زمان روبش 0/47 S بود.

### 2-3- تهیه و کشت سویه‌های میکروبی

سویه های میکروبی زیر از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد و روی آگار مغذی کشت گردید.

استافیلوکوکوس اورئوس زیرگونه اورئوس<sup>1</sup> ATCC 25923، اشرشیاکلی<sup>2</sup> ATCC 25922، سالمونلا تایفی<sup>3</sup> PTCC1609 و باسیلوس سرئوس<sup>4</sup> ATCC 10876

سویه‌های فعال شده توسط لوب از آگار مغذی (مرک، آلمان) به لوله حاوی 5 میلی‌لیتر مولر هیتون برات (مرک، آلمان) منتقل گردید و تا رسیدن به فاز لگاریتمی رشد در 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 10 ساعت کشت گردید [۸،۱۰]. سپس کدورت سلولی تا استاندارد 0,5 مک فارلند و توسط جذب اسپکتروفتومتری در 600 نانومتر تنظیم گردید [11].

### 2-4- ارزیابی فعالیت ضد میکروبی اسانس

#### روغنی افسنتین توسط سنجش انتشار دیسک در آگار<sup>5</sup>

خواص ضد میکروبی اسانس روغنی علیه چهار سویه میکروبی توسط روش انتشار دیسک در آگار بررسی گردید. دیسک‌های استریل با قطر 6 میلی‌متر حاوی 10 میکرولیتر اسانس روغنی بدون رقیق‌سازی و همچنین اسانس روغنی رقیق شده در استن با سه غلظت 10، 100 و 1000 بر روی سطح محیط کشت مولر هیتون آگار (مرک، آلمان) که از قبل توسط 200 میکرولیتر سوسپانسیون سلولی از سویه‌های میکروبی با کدورت 0,5 مک فارلند تلقیح شده بود قرار گرفت و پلیت‌ها در 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 24 ساعت گرمخانه‌گذاری گردید [12]. تست‌های انتشار از دیسک در 3 تکرار انجام گردید. فعالیت ضد

میکروبی اسانس‌ها به صورت قطر هاله ممانعت از رشد باکتری اطراف دیسک‌ها و بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد.

### 2-5- ارزیابی فعالیت ضد میکروبی اسانس

#### روغنی افسنتین توسط روش حداقل غلظت ممانعت از رشد<sup>6</sup> MIC

MIC کمترین غلظتی از اسانس روغنی است که از رشد باکتری‌های پاتوژن ممانعت می‌کند [13]. فعالیت ضد میکروبی اسانس افسنتین به روش MIC علیه چهار باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلی، سالمونلا تایفی و باسیلوس سرئوس انجام گردید. اسانس روغنی با غلظت 128 میکرولیتر بر میلی‌لیتر در مولر هیتون برات به طور سریالی در پلیت 96 خانه رقیق‌سازی گردید. سوسپانسیون میکروبی در مولر هیتون برات به میزان 50 میکرولیتر به چاهک‌ها اضافه گردید تا غلظت نهایی باکتری به  $5 \times 10^5$  CFU/ml برسد. غلظت نهایی اسانس در چاهک به صورت 0، 2، 4، 8، 16، 32، 64 میکرولیتر بر میلی‌لیتر تهیه گردید. پلیت‌ها در 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 24 ساعت گرمخانه‌گذاری شدند و رشد باکتری‌ها بعد از 24 ساعت اندازه‌گیری شد. کنترل مثبت حاوی مولر هیتون برات و سوسپانسیون باکتریایی بود و کنترل منفی فقط شامل مولر هیتون برات بود [14، 15، 16].

### 2-6- ارزیابی فعالیت ضد میکروبی اسانس

#### روغنی افسنتین توسط روش حداقل غلظت با

#### خاصیت کشندگی<sup>7</sup> MBC

MBC به عنوان حداقل غلظت اسانس با خاصیت کشندگی به شرح زیر ارزیابی شد. 100 میکرولیتر از چاهک‌هایی که در مرحله ارزیابی MIC در آن هیچ رشدی مشاهده نشده است بر روی محیط مولر هیتون آگار گسترده شده و در 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 24 ساعت گرمخانه‌گذاری می‌گردد. MBC غلظتی از

1. *Staphylococcus aureus subsp. aureus*

2. *Escherichia coli*

3. *Salmonella typhi*

4. *Bacillus cereus*

5. Agar disk diffusion assay

6. Minimum Inhibitory Concentrations

7. Minimum bactericidal concentrations

مختلف توسط آنالیز واریانس دو طرفه با SPSS 16 مورد مقایسه قرار گرفت. معنی‌داری آماری مقدار  $p$ -value کمتر از 0,05 در نظر گرفته شد.

### 3- نتایج

ترکیبات شیمیایی اسانس روغنی افسنتین در آنالیز توسط GC و GC-MS در جدول 1 نشان داده شده است. حدود 40 ترکیب در اسانس روغنی شناسایی شدند که 90,79 درصد از کل ترکیبات را شامل می‌شوند. ترکیب زد-بتا-اوسیمین اکساید<sup>1</sup> به میزان  $2,36 \pm 76,53\%$  ترکیب غالب در این اسانس شناخته شد و سایر ترکیبات اصلی این اسانس به ترتیب ای-بتا-اوسیمین اکساید<sup>2</sup>، سابینن و بتا-مایرسن<sup>3</sup> می‌باشند (جدول 1).

فعالیت ضد میکروبی اسانس روغنی افسنتین علیه 4 باکتری بیماری‌زا به صورت حضور یا عدم حضور نواحی ممانعت از رشد باکتری در شکل 1 و قطر هاله ممانعت از رشد به همراه نتایج دو روش MIC و MBC در جدول 2 نشان داده می‌شود. براساس مطالعات قبلی دانشمندان، فعالیت ضد میکروبی اسانس‌های روغنی در 3 سطح تقسیم می‌شود:

فعالیت قوی (قطر هاله بیشتر از 12 میلی متر)، فعالیت متوسط و فعالیت ضعیف (قطر هاله کمتر از 12 میلی متر) [19]. بر اساس نتایج (جدول 2) نشان داده شد که اسانس افسنتین فعالیت ضد میکروبی علیه باکتری‌های بیماری‌زا دارد. بیشترین فعالیت ضد میکروبی (بیشترین قطر هاله ممانعت از رشد) این اسانس به صورت رقیق نشده علیه استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا تایفی و اشرشیاکلی نشان داده شد و کمترین فعالیت ضد میکروبی اسانس به صورت رقیق نشده علیه باسیلوس سرئوس بود. MIC این اسانس برای باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، سالمونلا تایفی و اشرشیاکلی  $16$ ،  $32$ ،  $64$  و  $64$  و MBC برای باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، سالمونلا تایفی و اشرشیاکلی به ترتیب  $(\mu\text{l/ml})$  32، 32، 64 و 64 بود.

اسانس معرفی می‌شود که در تلقیح بر روی مولر هیتون آگار بیش از 99,9 درصد کاهش در تعداد سلول‌های زنده مشاهده شود [17].

### 2-7- کنترل رشد باکتری‌های بیماری‌زا در

#### کاهوی تازه توسط اسانس روغنی افسنتین

کاهو از بازار همدان تهیه شد. باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلی، سالمونلا تایفی و باسیلوس سرئوس در مولر هیتون برات در 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 18 ساعت کشت گردیدند. سپس سانتریفوژ شده و دوبار با بافر فسفات شسته شدند. برگ‌های کاهو با آب استریل جهت حذف فلور میکروبی طبیعی و مواد زائد روی آن شسته گردید. برگ‌های خارجی دور ریخته شده و برگ‌های درونی به میزان 100 گرم وزن گردید و به قطعات  $2 \times 6$  سانتی متری توسط چاقوی استریل برش داده شد. یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون هریک از باکتری‌های پاتوژن در بافر فسفات ( $10^9$  CFU/ml) به 100 گرم کاهو اضافه گردید، سپس به خوبی مخلوط شدند. جهت اتصال باکتری به کاهو، نمونه روی فویل آلومینیومی تحت شرایط استریل به مدت 15 دقیقه خشک گردید. کاهو در 200 میلی‌لیتر اسانس با غلظت  $(\mu\text{l/ml})$  16، 32، 64 به مدت 1 دقیقه غوطه‌ور و به مدت 30 دقیقه خشک گردید. سپس در کیسه‌های زیپ‌دار استریل نگهداری شد. از آب مقطر استریل به عنوان کنترل استفاده گردید. در این آزمون، غلظت‌های اسانس براساس نتایج MIC تعیین گردید. نمونه‌ها 3، 24 و 72 ساعت بعد از تیمار کاهو با اسانس جهت ارزیابی میکروبی کشت گردیدند. به اینصورت که 10 گرم از برگ کاهوی تیمار یافته در 90 میلی‌لیتر بافر فسفات 1% به مدت 2 دقیقه مخلوط گردید. سپس نمونه‌ها به صورت سریالی رقیق سازی شد و در محیط کشت مولر هیتون آگار کشت گردید [18].

### 2-8- تجزیه و تحلیل آماری

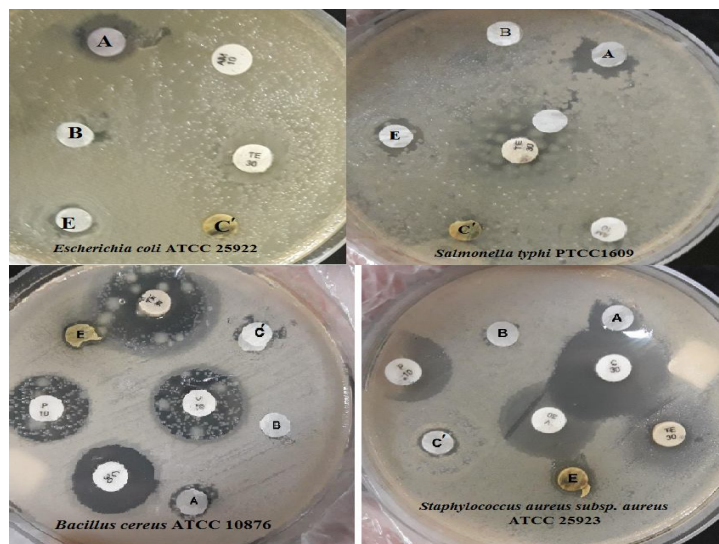
همه آزمون‌ها در 3 تکرار انجام گردید. بقاء باکتری‌ها در گروه‌های

1. (Z)- $\beta$ -Ocimene oxide  
2. (E)- $\beta$ -Ocimene oxide  
3.  $\beta$ -Myrcene

**Table 1** The main components of the essential oil of *Artemisia absinthium*

NO.	Compounds	RI <sup>a</sup>	GC area (%) <sup>b</sup>	NO.	Compounds	RI <sup>a</sup>	GC area (%) <sup>b</sup>
1	Sabinene	973.5	1.64±0.05	27	NI	1402.5	Tr
2	β-Myrcene	990.0	1.19±0.10	28	trans-Caryophyllene	1423.8	0.44±0.11
3	P-Cymene	1024.2	0.06±0.00	29	Neryl propanoate	1455.3	0.04±0.02
4	E-β-Ocimene	1028.8	0.11±0.02	30	Germacrene D	1485.2	0.10±0.06
5	Z-β-Ocimene	1035.6	0.54±0.03	31	Neryl isobutanoate	1491.4	0.16±0.05
6	γ-Terpinene	1058.4	0.03±0.00	32	Lavandulyl isovalerate	1511.2	0.24±0.01
7	Epoxymyrcene<6,7->	1092.7	0.50±0.02	33	Gerayl isobutanoate	1515.0	0.09±0.03
8	Myrtanal	1098.2	0.16±0.06	34	Nerolidol<E->	1566.5	0.07±0.02
9	Linalool	1102.0	0.15±0.05	35	NI	1579.0	0.52±0.11
10	trans-Thujone	1115.6	0.29±0.01	36	Neryl isovalerate	1585.8	0.30±0.04
11	(Z)-β-Ocimene oxide	1137.3	76.53±2.36	37	Gerayl -2-methylbutanoate	1604.5	0.35±0.01
12	(E)-β-Ocimene oxide	1143.9	2.72±0.06	38	Geranyl isovalerate	1610.3	0.28±0.01
13	Hexyl isobutyrate	1148.4	0.20±0.03	39	isoelemicin	1648.9	0.25±0.09
14	Lavandulol	1170.5	0.09±0.03	40	Intermedeol	1665.9	0.39±0.03
15	Rosefuran epoxide	1177.0	0.88±0.08	41	Chamazulene	1737.6	0.45±0.07
16	4-Terpineol	1181.1	0.16±0.06	42	n-Nonadecane	1898.5	0.07±0.04
17	NI	1189.3	0.78±0.04	43	NI	1956.7	0.39±0.12
18	Hexyl 3-methylbutyrate	1233.1	0.24±0.01	44	NI	1958.8	0.71±0.03
19	Hexyl 2-methylbutyrate	1237.3	0.13±0.09	45	Bergamotol<(Z)-alpha-trans->	1977.3	0.09±0.01
20	Perilla aldehyde	1277.3	0.21±0.06	46	n-Eicosane	1999.5	0.21±0.10
21	NI	1303.6	2.72±0.56	47	NI	2007.3	Tr
22	Carvacrol	1307.1	0.83±0.03	48	NI	2010.6	2.79±0.10
23	NI	1319.0	0.15±0.07	49	NI	2015.6	0.39±0.03
24	Neryl acetate	1365.5	0.02±0.00	50	NI	2017.9	0.76±0.03
25	Benzyl 2-methylbutyrate	1389.3	0.16±0.06	51	Geranyl linalool(E,E)	2038.0	0.16±0.02
26	Elemene<beta->	1394.8	0.02±0.01		Total		99.76

<sup>a</sup> RI, retention indices relative to C<sub>8</sub>-C<sub>24</sub> n-alkanes.<sup>b</sup> Relative proportions as percent of the total peak area, and results are presented as mean± standard deviation from the experiments in triplicate.



**Fig 1** Antibacterial activity (zones of inhibition) of *Artemisia absinthium* essential oil Concentrated essential oil (A); Diluted Essential Oil (B: 10 ppm, C': 100 ppm, E: 1000 ppm); Tetracyclines (TE); Vancomycin (V); Chloramphenicol (C); Penicillin (P); Amoxicillin (Am)

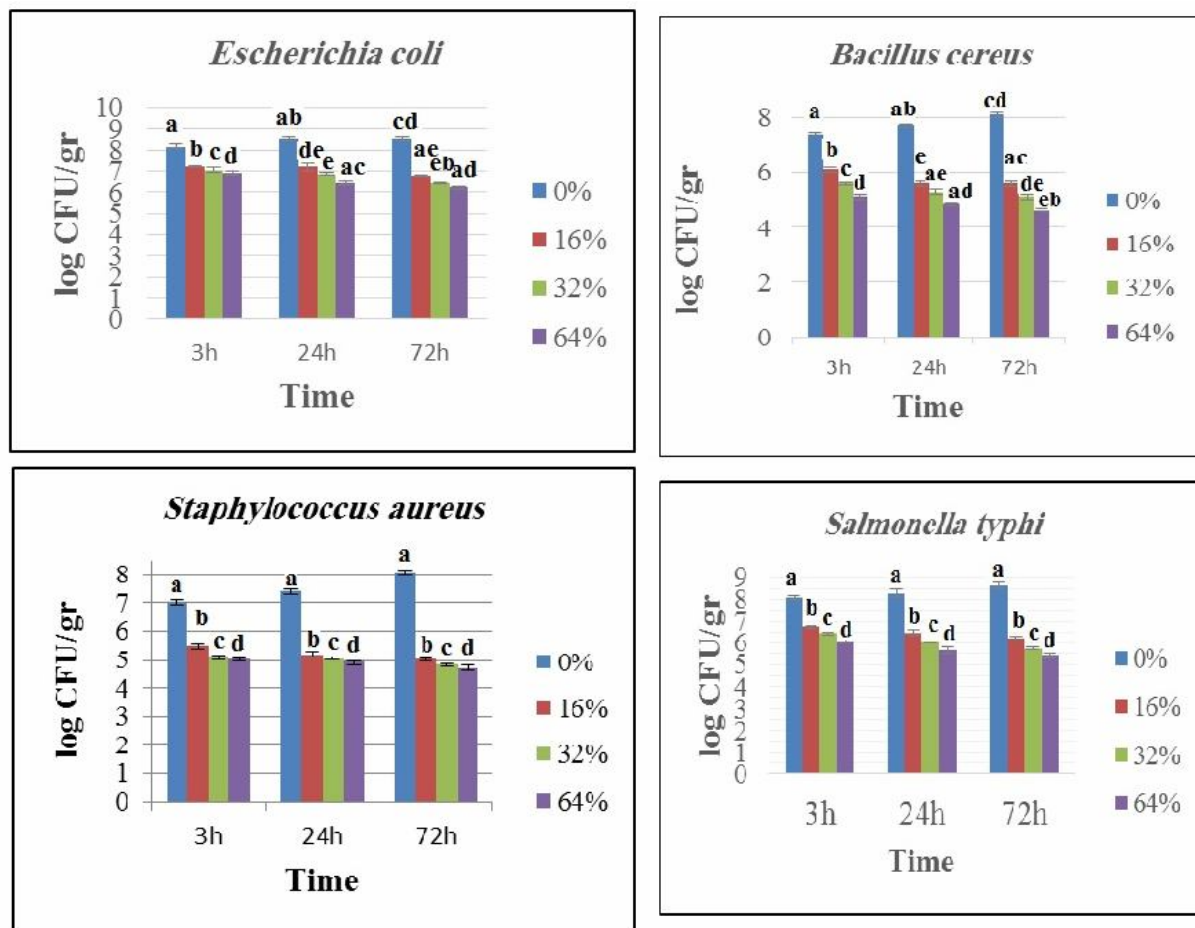
**Table 2** Antimicrobial activity (Inhibition zone diameter, MIC and MBC values) of the essential oil and antibiotic discs against the tested bacteria

Microorganism	Essential oil ( $\mu\text{l/ml}$ )		Inhibition zone diameter <sup>a</sup> (mm)							
	MIC	MBC	Essential oil (PPM)			Tetracycline (30 $\mu\text{g}/\text{disc}$ )	Ampicillin (10 $\mu\text{g}/\text{disc}$ )	Chloramphenicol (30 $\mu\text{g}/\text{disc}$ )	Penicillin (10 $\mu\text{g}/\text{disc}$ )	Vancomycin (10 $\mu\text{g}/\text{disc}$ )
			10	100	1000					
<i>Staphylococcus aureus</i>	16 $\pm$ 0.32	32 $\pm$ 0.75	-	7	8	9 $\pm$ 0.57	20	24	18	19
<i>Bacillus cereus</i>	32 $\pm$ 0.26	32 $\pm$ 0.45	-	7	7	8 $\pm$ 0.43	29	15	15	16
<i>Salmonella typhi</i>	64 $\pm$ 0.54	64 $\pm$ 0.52	-	-	8	9 $\pm$ 0.55	23	9		
<i>Escherichia coli</i>	64 $\pm$ 0.55	64 $\pm$ 0.42	-	-	7	9 $\pm$ 0.45		10		

<sup>a</sup> Results are presented as mean  $\pm$  standard deviation from the experiments in triplicate. The diameter of the disc was 6 mm.

معنی داری ( $p\text{-value} \leq 0,05$ ) بر رشد این دو باکتری داشته است. همانطور که در شکل 2 نشان داده می شود در مقایسه با کنترل (آب)، کاهوی تیمار شده با اسانس روغنی  $64 \mu\text{l/ml}$  بعد از 72 ساعت تیمار نشان داد که باعث کاهش 3,23، 2,27، 3,36 و 3,47 لگاریتمی به ترتیب در تعداد استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلی، سالمونلا تایفی و باسیلوس سرئوس در هر گرم کاهو می شود. بنابراین این اسانس بر روی گرم مثبت ها اثر ضد میکروبی بیشتری نسبت به گرم منفی ها داشته است.

به منظور بررسی اثر زمان تیمار کاهو با اسانس روغنی افسنتین، غلظت این اسانس و اثر همزمان این دو متغیر بر روی رشد باکتری های بیماری زای تلقیح شده به کاهو از آزمون آنالیز واریانس دوطرفه استفاده گردید. نتایج آنالیز نشان داد که زمان، غلظت و اثر همزمان دو متغیر زمان و غلظت تاثیر معنی داری بر رشد باسیلوس سرئوس و اشرشیاکلی ( $p\text{-value} \leq 0,05$ ) دارد. همچنین براساس نتایج، زمان تاثیر معنی داری بر رشد استافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا تایفی نداشته ( $p \geq 0,05$ ) value) اما غلظت اسانس و اثر همزمان غلظت و زمان تاثیر



**Fig 2** Effect of *Artemisia absinthium* oil concentrations and time on the reduction of *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* at 3 h, 24 h, and 72 h after the treatment. Error bars represent standard error of the mean. Columns having common letters are not significantly different ( $p > 0.05$ ).

در مطالعات گذشته که بر روی فعالیت ضد میکروبی اسانس‌های روغنی پونه کوهی، ریحان و ترنج انجام شد ثابت شد که این اسانس‌ها به دلیل دارا بودن ترپن‌ها، فنل‌ها و آلدوکتون‌ها می‌توانند نقش مهمی در فعالیت ضد باکتریایی ایفاء کنند [21، 25، 24]. اما ترپن‌ها به تنهایی به عنوان عامل ضد میکروبی نمی‌توانند عمل کنند. در این مطالعه آنالیز شیمیایی روغنی افسنتین نشان داد که مونوترپن‌ها از ترکیبات عمده و اصلی این اسانس روغنی می‌باشند و ترکیب اصلی آن زد- بتا- اوسیمن اکساید می‌باشد. این ترکیب دارای هیدروکربن‌های ایزومریک متعدد است و در طیف وسیعی از میوه‌ها و گیاهان وجود دارد. بتا- اوسیمن به عنوان یک مولکول سیگنال دهنده در ارتباط بین گیاهان نقش دارد و به دو شکل

#### 4- تفسیر و تحلیل

اسانس‌های روغنی حاوی گروهی از ترکیبات با فعالیت ضد میکروبی می‌باشند. این ترکیبات شامل ترپن‌ها، ترپنوئیدها، فنیل پروپن‌ها، کارواکرول و تیمول می‌باشند. فعالیت ضد میکروبی اسانس‌ها می‌تواند به عملکرد ترکیبات هیدروفوبیکی (آبگریز) آن‌ها علیه غشاء سلولی میکروارگانیسم‌ها نسبت داده شود [21، 20، 2].

تجمع ترکیبات هیدروفوبیک در غشاء سلولی باعث تخریب ساختار غشایی سلول، افزایش نفوذ پذیری، نشت اجزاء درون سلولی، نقص عملکرد آنزیم‌ها و سرانجام مرگ سلول‌ها می‌شود [23، 22، 17].

پیتیدوگلیکانی همراه با افزایش پیوندهای عرضی در فاز سکون عامل مقاومت سلول‌های باکتریایی به فاکتورهای تنش‌زای خارجی است. بنابراین در مطالعه ما به منظور افزایش اثر ضد باکتریایی اسانس افسنطین، باکتری در فاز لگاریتمی رشد مورد مطالعه قرار گرفت. در مطالعه حاضر اثر شش‌یاکلی دارای مقاومت بالایی نسبت به ترکیب اسانس‌های روغنی افسنطین بود. در حقیقت غشاء خارجی غنی از چربی باکتری‌های گرم منفی به عنوان یک مانع در نفوذ پذیری ترکیبات اسانس عمل می‌کند و کانال‌های پورینی باریک، نفوذ مولکول‌های هیدروفیل نظیر اسانس‌های روغنی را محدود می‌کند [36]. چنین پدیده‌ای در مطالعه ما نیز قابل توجه است، نتایج بررسی مقاومت باکتری‌ها به اسانس افسنطین توسط MIC و MBC و بررسی قطر هاله ممانعت نشان می‌دهد که اسانس افسنطین علیه گرم مثبت‌ها نسبت به گرم منفی‌ها موثرتر است و باکتری‌های اثرشش‌یاکلی و استفیلوکوکوس اورئوس به ترتیب مقاومترین و حساس‌ترین باکتری‌های مورد مطالعه ما به اسانس روغنی افسنطین بودند.

مسلمی و همکاران (2012) نیز در بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره افسنطین در زخم‌های عفونی شده طی عمل جراحی با استفیلوکوکوس اورئوس در مدل موش آزمایشگاهی نشان دادند که این عصاره قادر به فعالیت ضد میکروبی معنی داری علیه استفیلوکوکوس اورئوس می‌باشد [37].

بر اساس مطالعات انجام شده در دنیا استفاده از اسانس‌های روغنی گیاهان در کنترل بار میکروبی سبزیجات و مواد غذایی می‌تواند قابل رقابت با محلول‌های ضد عفونی کننده شیمیایی و نگهدارنده‌ها باشد. در مطالعه ما تاثیر غلظت بالای اسانس افسنطین در کاهش بار میکروبی تلقیح شده به کاهو قابل توجه بود. مشابه نتایج ما، بهارگاو و همکاران در سال 2015 در مطالعه خود بر روی تاثیر نانومولسیون روغنی پونه کوهی در کاهش بار میکروبی کاهو نشان دادند که این نانومولسیون در غلظت 0,1% در مقایسه با آب باعث کاهش 3,57، 3,26 و 3,35 لگاریتمی در تعداد واحد تشکیل دهنده کلنی در هر گرم نمونه به ترتیب در لستریا مونوسیژنوز، سالمونلا تایفی موریوم و اثرشش‌یاکلی گردید [38] که فعالیت ضد میکروبی این اسانس بر گرم مثبت‌ها بیشتر از گرم منفی‌ها گزارش شده است. در سال 2012 یوسا و همکاران مطالعه‌ای در ارتباط با بررسی فعالیت ضد میکروبی محلول حاوی

استروایزومریک<sup>1</sup> سیس و ترانس وجود دارد [26]. اوسیمین‌ها معمولاً در آب نامحلول و در سایر حلال‌های آلی محلول هستند برای همین از استن به عنوان حلال اسانس استفاده گردید. مطالعات گذشته ثابت کرده است که این ترکیب دارای فعالیت ضد قارچی می‌باشد [27]. نتایج آنالیز شیمیایی اسانس افسنطین با GC-MS حضور ترکیباتی دیگری نظیر پی - سایمن، سایبن، لیمونن، تربینن و پینن نیز را در افسنطین نمایان کرد. محققین پیشین فعالیت ضد میکروبی پی - سایمن را ثابت کرده‌اند. این ماده به عنوان ترکیب اصلی آویشن با فعالیت ضد میکروبی علیه باکتری‌های پاتوژن گرم منفی شناخته شده است [19]. اما دورمان و دینس (2000) گزارش کردند که ترکیباتی نظیر (+) - سایبن،  $\delta$  -3-کارن<sup>2</sup>،  $\alpha$  - تربینن،  $\beta$  - پینن، لیمونن و  $\alpha$  - پینن هیچ فعالیت ضد میکروبی علیه 25 باکتری بیماری‌زای گیاهی، حیوانی و عفونت‌زای غذایی نشان ندادند [28]. کوتسوداکی و همکاران (2005) نیز گزارش کردند ترکیبات  $\beta$  - پینن،  $\alpha$  - پینن، لیمونن، پی - سایمن،  $\gamma$  - تربینن،  $\beta$  - مایرسن،  $\beta$  - کاریوفیلین<sup>3</sup> علیه اثرشش‌یاکلی، استفیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس فعالیت ضد میکروبی آشکاری نشان ندادند [29] و رائو و همکاران (2010) نشان دادند که پی - سایمن و  $\gamma$  - تربینن به عنوان ضد قارچ علیه ساکارومایسز سرویسیه فعالیت غیر موثری دارد [30]. در مطالعه ما نیز ثابت شد که اسانس افسنطین دارای فعالیت ضد باکتریایی متوسط و نه چندان قوی می‌باشد و با توجه به مطالعات گذشته که به آن اشاره گردید چنین نتیجه‌ای دور از انتظار نیست. فعالیت ضد میکروبی اسانس‌های روغنی در فاز لگاریتمی رشد سلول‌ها بسیار موثر است و باکتری‌ها در فاز سکون رشد به فاکتورهای تنش‌زای خارجی نظیر اسانس‌های روغنی مقاوم هستند [31]. مطالعات نشان داده است که پیتیدوگلیکان دیواره سلول‌های گرم منفی نظیر اثرشش‌یاکلی در طی عبور از فاز لگاریتمی به فاز سکون تغییر می‌کند. سلول‌های اثرشش‌یاکلی خود را با تغییرات فیزیولوژیکی تطابق می‌دهند و ساختار دینامیکی دیواره سلولی خود را اصلاح می‌کنند. این تغییرات بیشتر مربوط به افزایش پیوندهای عرضی پیتیدوگلیکان می‌باشد [۳۲، ۳۳، ۳۴، ۳۵]. محققان ثابت کرده‌اند که افزایش ضخامت لایه

1. Stereoisomeric
2.  $\delta$ -3-carene
3.  $\beta$ - Caryophyllene



- of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. *International journal of food microbiology*, 123(1-2), pp.121-129.
- [2] Aguilar-Uscanga, B. and Francois, J.M., 2003. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Letters in applied microbiology*, 37(3), pp.268-274.
- [3] Allende, A., McEvoy, J., Tao, Y. and Luo, Y., 2009. Antimicrobial effect of acidified sodium chlorite, sodium chlorite, sodium hypochlorite, and citric acid on *Escherichia coli* O157: H7 and natural microflora of fresh-cut cilantro. *Food Control*, 20(3), pp.230-234.
- [4] Anand, S.P. and Sati, N., 2013. Artificial preservatives and their harmful effects: looking toward nature for safer alternatives. *International journal of pharmaceutical sciences and research*, 4(7), p.2496.
- [5] Bagamboula, C.F., Uyttendaele, M. and Debevere, J., 2004. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food microbiology*, 21(1), pp.33-42.
- [6] Beuchat, L.R., 1992. Surface disinfection of raw produce. *Dairy, Food and Environmental Sanitation*, 12(1), pp.6-9.
- [7] Beuchat, L.R., 1996. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. *Journal of food protection*, 59(2), pp.204-216.
- [8] Bhargava, K., Conti, D.S., da Rocha, S.R. and Zhang, Y., 2015. Application of an oregano oil nanoemulsion to the control of foodborne bacteria on fresh lettuce. *Food microbiology*, 47, pp.69-73.
- [9] Food and Drug Administration, 2006. The FDA: Fresh Leafy Greens Grown in the United States Are Safe. *FDA Consum*, 40(11).
- [10] Gündüz, G.T., Gönül, Ş.A. and Karapınar, M., 2010. Efficacy of oregano oil in the inactivation of *Salmonella typhimurium* on lettuce. *Food Control*, 21(4), pp.513-517.
- [11] Carson, C.F., Mee, B.J. and Riley, T.V., 2002. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage,

کلرین آزاد (5 ppm)، سینام آلدئید (800-1000 ppm) به تنهایی و همراه با اسید استیک (200ppm) علیه *اشرشیاکلی* و سالمونلا انجام دادند. آن‌ها نشان دادند اسانس روغنی (سینام آلدئید) در فعالیت ضد میکروبی قابل رقابت با محلول کلرین است [39]. همچنین داسیلوا و همکاران (2012) در تحقیقی فعالیت ضد میکروبی اسانس روغنی پونه کوهی (غنی از کارواکرول، پی - سایمن،  $\gamma$ -ترپنین) 0.2% (v/v) را بر سالمونلا اینترتیدیس در سس مایونز در دو دمای 8 و 30 درجه سانتی‌گراد بررسی کرده و نشان دادند که در دمای پایین‌تر این اسانس قوی‌تر عمل می‌کند. [40].

## 5- نتیجه‌گیری

در مطالعه ما اثر ضد میکروبی اسانس افسنتین در کاهش بار میکروبی کاهو (محیط غذایی) قابل توجه بود و می‌توان آن را جایگزین خوبی برای ضد عفونی کننده‌های شیمیایی سبزیجات دانست البته به دلیل ماهیت هیدروفوبی اسانس افسنتین بهتر است جهت تقویت فعالیت ضد باکتریایی این اسانس در کاهش بار میکروبی سبزیجاتی نظیر کاهو آن را به شکل نانوامولسیون بررسی کرد. البته بر اساس نتایج ما در بررسی فعالیت ضد میکروبی اسانس افسنتین در محیط کشت (محیط غیر غذایی) و مطالعات سایر محققین نباید انتظار داشت اسانس افسنتین دارای فعالیت ضد باکتریایی قوی باشد و چون ترکیب اصلی و غالب این اسانس بتا-اسیمن اکساید می‌باشد که در گذشته فعالیت ضد قارچی ترکیبات مشابه آن ثابت شده است، بهتر است در مطالعات بعدی به بررسی فعالیت ضد قارچی اسانس این گیاه پرداخته شود. علت اثر بخشی ضعیف فعالیت ضد میکروبی اسانس افسنتین در محیط کشت آزمایشگاهی نسبت به کاهو می‌توان به تقویت رشد باکتری‌ها در محیط مغذی محیط کشت نسبت به سبزیجات با ارزش غذایی پایین دانست که همین حضور مواد مغذی، باکتری را نسبت به تنش‌های محیطی نظیر اسانس مقاوم می‌کند.

## 6- منابع

- [1] Abadias, M., Usall, J., Anguera, M., Solsona, C. and Viñas, I., 2008. Microbiological quality

- minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of applied microbiology*, 91(3), pp.453-462.
- [23] Leduc, M., Fréhel, C., Siegel, E. and Van Heijenoort, J., 1989. Multilayered distribution of peptidoglycan in the periplasmic space of *Escherichia coli*. *Microbiology*, 135(5), pp.1243-1254.
- [24] Liu, C., Ruan, Y. and Guan, C., 2004. The model of defense gene expression induced by signaling molecule  $\beta$ -ocimene. *Chinese Science Bulletin*, 49(24), pp.2643-2644.
- [25] Lv, F., Liang, H., Yuan, Q. and Li, C., 2011. In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. *Food Research International*, 44(9), pp.3057-3064.
- [26] Morato, J., Mir, J. and Codony, F., 2003. Microbial response to disinfectants in Handbook of Water and Wastewater Microbiology (Mara D, Horan N, eds.).
- [27] Moreira, M.R., Ponce, A.G., Del Valle, C.E. and Roura, S.I., 2005. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT-Food Science and Technology*, 38(5), pp.565-570.
- [28] Moslemi, H.R., Hoseinzadeh, H., Badouei, M.A., Kafshdouzan, K. and Fard, R.M.N., 2012. Antimicrobial activity of *Artemisia absinthium* against surgical wounds infected by *Staphylococcus aureus* in a rat model. *Indian journal of microbiology*, 52(4), pp.601-604.
- [29] National Committee for Clinical Laboratory Standards (US), 2006. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard*. National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- [30] Nguyen the, C. and Carlin, F., 1994. The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 34(4), pp.371-401.
- [31] Panizzi, L., Flamini, G., Cioni, P.L. and Morelli, I., 1993. Composition and antimicrobial properties of essential oils of four Mediterranean Lamiaceae. *Journal of ethnopharmacology*, 39(3), pp.167-170.
- [32] Pisabarro, A.G., de Pedro, M.A. and Vázquez, D.A.V.I.D., 1985. Structural and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(6), pp.1914-1920.
- [12] Ceylan, E. and Fung, D.Y., 2004. Antimicrobial activity of spices 1. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology*, 12(1), pp.1-55.
- [13] Da Silva, J.P.L. and FRANCO, B.D.M., 2012. Application of oregano essential oil against *Salmonella enteritidis* in mayonnaise salad. *Embrapa Agroindústria de Alimentos-Artigo em periódico indexado (ALICE)*.
- [14] Dorman, H.J.D. and Deans, S.G., 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of applied microbiology*, 88(2), pp.308-316.
- [15] Firuzi, O., Asadollahi, M., Gholami, M. and Javidnia, K., 2010. Composition and biological activities of essential oils from four *Heracleum* species. *Food Chemistry*, 122(1), pp.117-122.
- [16] Friday, K.B., Beyond Aroma: Terpenes in Cannabis.
- [17] Geciova, J., Bury, D. and Jelen, P., 2002. Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry—a review. *International Dairy Journal*, 12(6), pp.541-553.
- [18] Gilles, M., Zhao, J., An, M. and Agboola, S., 2010. Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian *Eucalyptus* species. *Food Chemistry*, 119(2), pp.731-737.
- [19] Hyldgaard, M., Mygind, T. and Meyer, R.L., 2012. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in microbiology*, 3, p.12.
- [20] Ivanova, E., Atanasova-Pancevska, N. and Kungulovski, D., 2013. Antimicrobial activities of laboratory produced essential oil solutions against five selected fungal strains. *Matica Srpska Journal for Natural Sciences*, (124), pp.171-183.
- [21] Koutsoudaki, C., Krsek, M. and Rodger, A., 2005. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil and the gum of *Pistacia lentiscus* Var. chia. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(20), pp.7681-7685.
- [22] Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P.J. and Nychas, G.J., 2001. A study of the

- Safety*, 31(4), pp.462-471.
- [36] Rota, C., Carraminana, J.J., Burillo, J. and Herrera, A., 2004. In vitro antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants against selected foodborne pathogens. *Journal of food protection*, 67(6), pp.1252-1256.
- [37] Sikkema, J., de Bont, J.A. and Poolman, B., 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 59(2), pp.201-222.
- [38] Tan, R.X., Zheng, W.F. and Tang, H.Q., 1998. Biologically active substances from the genus *Artemisia*. *Planta medica*, 64(04), pp.295-302.
- [39] WHO, 2017. Food safety. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>
- [40] Yossa, N., Patel, J., Millner, P., Ravishankar, S. and Lo, Y.M., 2013. Antimicrobial activity of plant essential oils against *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella* on lettuce. *Foodborne pathogens and disease*, 10(1), pp.87-96.
- modifications in the peptidoglycan of *Escherichia coli* associated with changes in the state of growth of the culture. *Journal of bacteriology*, 161(1), pp.238-242.
- [33] Rao, A., Zhang, Y., Muend, S. and Rao, R., 2010. Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the TOR pathway. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(12), pp.5062-5069.
- [34] Rashid, S., Rather, M.A., Shah, W.A. and Bhat, B.A., 2013. Chemical composition, antimicrobial, cytotoxic and antioxidant activities of the essential oil of *Artemisia indica* Willd. *Food chemistry*, 138(1), pp.693-700.
- [35] Ravichandran, M., Hettiarachchy, N.S., Ganesh, V., Ricke, S.C. and Singh, S., 2011. Enhancement of antimicrobial activities of naturally occurring phenolic compounds by nanoscale delivery against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella* Typhimurium in broth and chicken meat system. *Journal of Food*

## Application of *Artemisia absinthium* essential oil to the control of pathogenic bacteria growth on fresh lettuce

Davati, N. <sup>1\*</sup>, Ali Mirzaei, S. <sup>2</sup>

1. Assistant professor, Department of Food Sciences and Technology, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
2. Laboratory technician, Department of Food Sciences and Technology, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

(Received: 2019/10/20 Accepted:2019/19/11)

Today, because of the side effects of chemical preservatives, it is suggested to use natural antimicrobial compounds such as essential oils. The antimicrobial activities of essential oils are well recognized for many years. In this study, after preparation of *Artemisia absinthium* essential oil, its components were identified by Gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS). Then antibacterial activity of the essential oil was evaluated against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* and *Bacillus cereus* by agar disk-diffusion, MIC and MBC methods. Based on MIC results, essential oil concentrations of 16, 32 and 64 (µl/ml) were selected to evaluate its efficacy in inactivating the growth of pathogenic bacteria on fresh lettuce. Lettuce was inoculated with *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* and *Bacillus cereus* and the bacterial count were enumerated at time intervals (0, 3, 24, and 72 h). The concentration of (Z)-β-Ocimene oxide as the major component of the essential oil was 76.53±2.36%. The results of MIC, MBC values and agar disk-diffusion showed that the most sensitive and the most resistant bacteria were *Staphylococcus aureus* and *Escherichia*, respectively. Compared to control (water), lettuce treated with 64 µl/ml essential oil at 72 h after treatment showed an up to 3.36, 2.27, 3.23 and 3.47 log CFU/g reductions in *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* and *Bacillus cereus*, respectively. This research showed that *Artemisia absinthium* essential oil may be an effective antimicrobial agent to the control of pathogenic bacteria growth on fresh lettuce.

**Key words:** Antimicrobial- *Artemisia absinthium*- Lettuce.

---

\*Corresponding Author E-Mail Address: n.davati@basu.ac.ir