مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

بررسی حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی اسانس *اکالیپتوس گلوبولوس*بر باکتری‌های بیماری‌زا و عامل فساد مواد غذایی

بهروز علیزاده بهبهانی[1*]، محمد نوشاد[1]، بهاره صحرائیان[2]

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

۲- دکتری، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۹۹ /۰۳/۰۱

تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۶/۰۱

کلمات کلیدی:

اکالیپتوس گلوبولوس،

مقاومت دارویی،

نگهدارنده غذایی، فعالیت ضدمیکروبی.

DOI: 10.29252/fsct.18.01.05

* مسئول مکاتبات:

B.alizadeh@asnrukh.ac.ir

چکیده

اکالیپتوس یکی از این گیاهان است که فعالیت ضدمیکروبی آن در بسیاری از مناطق جهان برای درمان سرماخوردگی و آنفولانزا مورد استفاده قرار می گیرد. هدف از این پژوهش تجربی، ارزیابی فعالیت ضدباکتری اسانس اکالیپتوس گلوبولوس به ٤ روش دیسک دیفیوژن، چاهک آگار، میکرودایلوشن براث و تعیین حداقل غلظت کشندگی بر تعدادی از سویه¬های بیماری زا و عامل فساد مواد غذایی در شرایط برون تنی بود. به طور کلی نمای حساسیتی میکروب های بیماری زا در برابر اسانس اکالیپتوس گلوبولوس (دیسک دیفیوژن) از مقاوم ترین به حساس ترین سویه به ترتیب شامل سالمونلا تیفی>اشرشیا کلی>سودوموناس ائروژینوزا >باسیلوس سوبتلیس>استرپتوکوکوس پیوژنز>استافیلوکوکوس اورئوس بود. میانگین قطر هاله عدم رشد به روش چاهک آگار برای باکتری های گرم مثبت ۱۸/٦۰ میلی متر بود. میانگین قطر هاله عدم رشد برای باکتری های گرم منفی۱۱/۹۳ میلی متر بود. نتایج نشان داد که حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس اکالیپتوس گلوبولوس برای باکتری های سالمونلا تیفی، سودوموناس ائروژینوزا، اشرشیا کلی، باسیلوس سوبتلیس، استرپتوکوکوس پیوژنز و استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب ۱۲۸، ٦٤، ٦٤، ۳۲، ۱٦ و ۸ میلی گرم بر میلی لیتر بود. نتایج حداقل غلظت کشندگی اسانس اکالیپتوس گلوبولوس نیز به ترتیب ۵۱۲، ۲۵٦، ۱۲۸، ۱۲۸، ۳۲ و ۱٦ میلی گرم بر میلی لیتر بود.پیشنهاد می شود آزمون های تکمیلی جهت استفاده از اسانس اکالیپتوس گلوبولوس جهت استفاده به عنوان نگهدارنده طبیعی در صنعت غذا و مصارف دارویی انجام گیرد.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-08-12]

۱- مقدمه

امروزه، به کارگیری و اهمیت استفاده از گیاهان دارویی در درمان بیماری‌ها، جلوگیری و ممانعت از رشد باکتری‌های عامل عفونت و مسمومیت غذایی و همچنین کنترل رشد میکروارگانیسم‌های شاخص فساد و زوال مواد غذایی به خوبی شناخته شده است.به همین دلیل در حال حاضر چه درایران و چه در سطح دنیا پژوهش‌های گسترده‌ای جهت شناسایی و اهمیت به کارگیری از گیاهان دارویی در حال انجام است [۱].در سالیان اخیر استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی جهت درمان بیماری‌ها به دلیل مقاومت باکتریایی به یک مشکل اساسی و تهدید کننده‌ای در کل جهان تبدیل شده است.

ایمن بودن مواد غذایی از میکروارگانیسم‌های عامل فساد، عفونت و مسمومیت مورد توجه بسیاری از پژوهشگران و تولیدکنندگان، سازمان‌های استاندارد و نظارتی مواد غذایی است. با وجود روش‌های مختلف نگهداری مواد غذایی همچنان بیماری‌های ناشی از عفونت و مسمومیت غذایی در سطح جهان از آمار بالایی برخوردار است. از سویی دیگر تمایل مصرف‌کنندگان محصولات غذایی به مواد غذایی طبیعی و فاقد نگهدارنده‌های شیمیایی به دلیل اطلاع یافتن از عوارض جانبی این ترکیبات محققان حوزه امنیت و سلامت غذایی را ترغیب به یافتن عوامل ضدمیکروبی با منشأ گیاهی نموده است [۲ و ۳]. داروهای شیمیایی با تمام کارایی مفید، دارای آثار جانبی نامطلوب فراوانی هستند و شاید کمتر ماده خالصی وجود دارد که دارای اثر سوء نباشد. در سالیان اخیر به دلیل پذیرش طب سنتی و علاقمندی مردمبه‌عنوان یک روش جایگزین برای خدمات درمانی، پژوهشگران به بررسی فعالیت ضدمیکروبی گیاهان پرداختند [٤]. اسانس‌های روغنی به دست آمدهاز گیاهان دارویی دارایترکیبات زیست فعال هستند و قابلیت استفاده به عنوان منبع مواد ضدمیکروبی طبیعی (جایگزین با آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی) در مقابل طیف گسترده‌ای از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زارا دارا می‌باشند. با در نظرگرفتن فعالیت ضدباکتریایی، ضدقارچی و ضدویروسی اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهان دارویی در پژوهش‌های انجام شده در سرتاسر جهان به نظر می‌رسد این ترکیبات می‌توانند به عنوان جایگزین موادشیمیایی ضدمیکروبی درصنایع غذایی به کار برده شوند[۳].

اجزای تشکیل دهنده گیاهان دارویی همانند فنل‌ها، فلاونوئیدها، فلاون‌ها و ... به عنوان ترکیبات ضدمیکروبی گیاهان دارویی منابعی مفید و ارزشمند، در صنایع مختلفی همچون دارویی، پزشکی، آرایشی و بهداشتی و مواد غذایی به حساب می‌آیند. با توجهبه شیوع و گسترش بیماری‌های عفونی و مقاومت میکروارگانیسم های بیماری‌زا نسبت به داروهای سنتزی و شیمیایی، شناسایی هرچه بیشترگیاهان طبیعی با قابلیت درمانی اهمیت فراوانی دارد.

یکی از گیاهان دارویی که می‌توان به دلیل دسترس بودن و ارزان بودن آن در صنایع پزشکی و غذایی از آن بهره گرفت اکالیپتوس است. اکالیپتوس‌ها درختانی دارای رشد سریع بوده و منشأاصلی آن‌ها استرالیا می‌باشد. تاکنون بیش از ۹۰۰ گونه از اکالیپتوس در دنیا شناسایی شده است. *اکالیپتوس گلوبولوس*با نام علمی*Eucalyptus globulus* از خانواده میرتاسه[1] است. اسانس این گیاه دارای ترکیبات مختلفی از جمله فنول، کتون، ترپن، آلدهید و ... می‌باشد. در طب سنتی از روغن اکالیپتوس به عنوان ضدالتهاب، ضدقارچ و ضدباکتری استفاده می‌شود[۵-۸].

هدف از این پژوهش، ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی اسانس *اکالیپتوس گلوبولوس* با روش‌های دیسک دیفیوژن آگار، چاهک آگار، تعیین حداقل غلظت ممانعت از رشد و حداقل غلظت کشندگی بر ٦ سویه باکتری‌های بیماری‌زا و عامل فساد مواد غذاییشامل ۳ سویه گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سوبتلیس* و *استرپتوکوکوس پیوژنز*) و ۳ سویه گرم منفی (*سالمونلا تیفی*، *سودوموناس ائروژینوزا* و *اشرشیا کلی*) در شرایط آزمایشگاهی بود.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- تهیه اسانس *اکالیپتوس گلوبولوس*

اسانس روغنی *اکالیپتوس گلوبولوس* به صورت آماده از شرکت خریداری شد. اسانس *اکالیپتوس گلوبولوس*با استفاده از فیلتر سرسرنگی ۰/۲۲ میکرونی استریل شد و در ظرف شیشه‌ای آزمایشگاهی استریل تیره رنگ در یخچال تا انجام آزمون‌های ضدمیکروبی نگهداری شد.

1. Myrtaceae

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-08-12]

۲-۲- تهیه سویه‌های میکروبی و سوسپانسیون میکروبی استاندارد

سویه‌های میکروبی استاندارد شامل *اشرشیا کلی* (ATCC 35218)، سالمونلا تیفی (ATCC 14028)، *سودوموناس آئروژینوزا* (ATCC 27853)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 25923)، *باسیلوسسوبتیلیس* (ATCC 6633) و *استرپتوکوکوس پیوژنز* (ATCC 19615) بود. سویه‌های میکروبی از کلکسیون میکروبی آزمایشگاه میکروبیولوژی صنعتی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شد. جهت تهیه سوسپانسیون میکروبی استاندارد از روش حیدری سورشجانی و همکاران (۲۰۱٤)، مطابق با استاندارد مک فارلند استفاده شد. در این روش به طور خلاصه از کلنی خالص هر یک از سویه‌های استاندارد میکروبی به صورت خطی بر سطح محیط کشت مولرهینتون آگار کشت داده شد. محیط کشت هر یک از سویه‌های میکروبی به گرمخانه منتقل شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲٤ ساعت انکوبه شد. پس از ۲٤ ساعت از رشد میکروبی مقداری از کلنی خالص رشد یافته و تازه به وسیله لوپ حلقوی در لوله آزمایش حاوی محلول رینگر ریخته شد و به وسیله دستگاه شیکر تکان داده شد. کدورت سوسپانسیون میکروبی با محلول استاندارد میکروبی نیم مک فارلند (میزان جذب ۰/۰۸ تا ۰/۱۳ در طول موج ٦۲۵ نانومتر) با افزودون کلنی یا محلول رینگر برابر شد[۹].

۲-۳- ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی اسانس *اکالیپتوس گلوبولوس*

جهت ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی اسانس *اکالیپتوس گلوبولوس* استریل شده به روش‌های دیسک دیفیوژن آگار، چاهک آگار، حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی استفاده شد. در زیر روش‌های ضدمیکروبی به صورت خلاصه آورده شده است.

۲-۳-۱- دیسک دیفیوژن آگار (کربی-بوئر)

روش دیسک دیفیوژن مطابق با روش انجام شده در مطالعه کیارسی و همکاران (۲۰۲۰)، انجام شد. به طور خلاصه ۲۰ میکرولیتر از اسانس خالص استریل شده به دیسک‌های کاغذی استریل با قطر ٦ میلی‌متر به آرامی اضافه شد. دیسک‌های کاغذی در پتری دیش ۸ سانتی در ٤ طرف به فواصل منظم و دقیق قرار گرفته شده به نحوی که از لبه‌ها و از یکدیگر دارای فاصله مناسب جهت جلوگیری از تداخل هاله ضدمیکروبی بود. یک دیسک کاغذی بلانک فاقد اسانس نیز به عنوان نمونه کنترل در مرکز پتری دیش قرار گرفته شد. لازم به ذکر است از سوسپانسیون میکروبی هر سویه بیماری‌زا استاندارد به میزان ۱۰۰ میکرولیتر بر سطح محیط کشت توسط سمپلر ریخته و با میله ال شکل استریل به طور کامل پخش گردید. پس از آن پتری دیش‌های کشت شده در دمای ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد به مدت ۲٤ ساعت قرار گرفت. پس از ۲٤ ساعت، پتری‌دیش‌ها از گرمخانه خارج شدند و قطر هاله عدم رشد میکروبی مشاهده شده در اطراف دیسک‌ها به صورت میلی‌متر اندازه‌گیری و ثبت گردید[۱۰].

۲-۳-۲- روش چاهک آگار

روش چاهک آگار مطابق با روش انجام شده در مطالعه برزگر و همکاران (۱۳۹۷)، انجام شد. در این روش به طور خلاصه پس از ایجاد چاهک‌هایی با قطر ٦ میلی‌متر در سطح پتری دیش‌های ۸ سانتی‌متری حاوی ۲۰ میلی‌لیتر از محیط کشت مولر هینتون آگار، میزان ۱۰۰ میکرولیتر از سویه میکروبی استاندارد به وسیله میله ال شکل به طور کامل و دقیق پخش گردید. میزان ۲۰ میکرولیتر از اسانس خالص استریل *اکالیپتوس گلوبولوس* توسط سمپلر به درون ٤ چاهک تعبیه شده در سطح پتری دیش ریخته شد. یک عدد چاهک در وسط پتری دیش فاقد اسانس نیز به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. پس از ۲٤ ساعت گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، میزان قطر هاله عدم رشد میکروبی به وسیله خط‌کش اندازه‌گیری شد و بر حسب میلی‌متر ثبت گردید[۱۱].

۲-۳-۳- تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی

برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی از رشد اسانس *اکالیپتوس گلوبولوس* بر سویه‌های میکروبی *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سوبتلیس*، *استرپتوکوکوس پیوژنز*، *سالمونلا تیفی*، *سودوموناس ائروژینوزا* و *اشرشیا کلی* مطابق با مطالعه نوشاد و همکاران (۱۳۹۷)، انجام شد. به طور خلاصه در این روش از پتری دیش ۹٦ خانه‌ای استریل که دارای ۱۲ خانه افقی و ۸ خانه

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-08-12]

عمودی بود استفاده گردید. خانه‌های افقی میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای برای غلظت‌های مختلف اسانس *اکالیپتوس گلوبولوس* استفاده شد. غلظت‌های *اکالیپتوس گلوبولوس* با حل کردن اسانس خالص استریل در محیط کشت مولر هینتون براث و مقداری از دی‌متیل سولفواکسیدبه دست آمد. غلظت‌های ۵۱۲، ۲۵۶، ۱۲۸، ٦٤، ۳۲، ۱٦، ۸، ٤، ۲ و ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اسانس *اکالیپتوس گلوبولوس*تهیه شد. این غلظت‌ها در ۱۰ خانه حاوی سوسپانسیون میکروبی ریخته شد. خانه یازدهم و دوازدهم نیز به عنوان کنترل منفی و کنترل مثبت در نظر گرفته شد. هر میکروپلیت ۹٦ خانه‌ای برای ۲ سویه میکروبی در نظر گرفته شد. در نهایت میکروپلیت ۹٦ خانه‌ای به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از ۲٤ ساعت میکروپلیت‌های ۹٦ خانه‌ای هم به صورت چشمی و هم با استفاده از معرف TTC[1] بررسی گردید. کم‌ترین غلظتی که در آن رشد میکروبی و کدورت مشاهده نگردید و همچنین فاقد رنگ قرمز یا ارغوانی بود به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی در نظر گرفته شد[۱۲].

۲-۳-٤- تعیین حداقل غلظت کشندگی

آخرین آزمون ضدمیکروبی انجام شده در پژوهش حاضر تعیین حداقل غلظت کشندگی بود. آزمون تعیین حداقل غلظت کشندگی اسانس *اکالیپتوس گلوبولوس* مطابق با مطالعه طباطبایی یزدی و همکاران (۲۰۱٤)، انجام شد. در این روش به طور خلاصه از خانه‌های فاقد رشد میکروبی به میزان ۱۰۰ میکرولیتر بر سطح محیط کشت مولر هینتون آگار کشت انجام شد. پتری دیش‌های کشت شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲٤ ساعت گرمخانه گذاری شدند. پس از ۲٤ ساعت پتری دیش‌ها به صورت چشمی بررسی شد. اولین پتری دیشی که در آن کلنی مشاهده نشد مشخص گردید و غلظت آن به عنوان حداقل غلظت کشندگی اسانس *اکالیپتوس گلوبولوس* در نظر گرفته شد[۱۳].

۲-٤- آنالیز آماری

تمامی آزمون‌های ضدمیکروبی در این پژوهش در ۳ مرتبه یا بیشتر تکرار گردید. داده‌های به دست آمده به صورت میانگین گزارش شد. از نرم افزار SPSS[2] جهت تجزیه و تحلیل آماری استفاده شد. معنی‌داری بودن داده‌ها توسط آزمون دانکن در سطح ۵ درصد بررسی شد.

۳- نتایج و بحث

نتایج اثر ضدمیکروبی اسانس *اکالیپتوس گلوبولوس* به روش دیسک دیفیوژن آگار (کربی-بوئر) در جدول ۱، آورده شده است. نتایج نشان داد که میزان قطر هاله عدم رشد در باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس*با هاله عدم رشد ۱۸/۹۰ میلی‌متر بیشترین بود. مقاوم‌ترین سویه در برابر اسانس *اکالیپتوس گلوبولوس* مربوط به باکتری گرم منفی *سالمونلا تیفی* با قطر هاله عدم رشد ۹/۱۰ میلی‌متر بود. به طور کلی نمای حساسیتی میکروب‌های بیماری‌زا در روش دیسک دیفیوژن در برابر اسانس *اکالیپتوس گلوبولوس* از مقاوم‌ترین به حساس‌ترین به ترتیب شامل *سالمونلا تیفی*>*اشرشیا کلی*>*سودوموناس ائروژینوزا* > *باسیلوس سوبتلیس*>*استرپتوکوکوس پیوژنز*>*استافیلوکوکوس اورئوس* بود.نتایج پژوهش حاضر نشان داد که میانگین قطر هاله عدم رشد به روش دیسک دیفیوژن برای باکتری‌های گرم مثبت (*باسیلوس سوبتلیس*، *استرپتوکوکوس پیوژنز* و *استافیلوکوکوس اورئوس*) ۱٦/۸۰ میلی‌متر بود. در حالی که میانگین قطر هاله عدم رشد برای باکتری‌های گرم منفی (*سالمونلا تیفی*، *سودوموناس ائروژینوزا* و *اشرشیا کلی*) ۱۰/۱٦ میلی‌متر بود. نتایج اثر ضدمیکروبی اسانس *اکالیپتوس گلوبولوس* به روش چاهک آگار در جدول ۱، آورده شده است. نتایج نشان داد کهنمای حساسیتی در این روش اندکی با روش دیسک دیفیوژن متفاوت بود. بیشترین و کم‌ترین هاله عدم رشد در روش چاهک آگار به ترتیب با قطر هاله ۲۱/۲۰ و ۱۱/۳۰ میلی‌متر مربوط به باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا تیفی* بود. نمای حساسیت میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در روش چاهک آگار از مقاوم‌ترین به حساس‌ترین به ترتیب شامل *سالمونلا تیفی*>*سودوموناس ائروژینوزا* >*اشرشیا کلی*>*باسیلوس سوبتلیس*>*استرپتوکوکوس پیوژنز*>*استافیلوکوکوس اورئوس* بود. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که میانگین قطر هاله عدم رشد به روش چاهک آگار برای باکتری‌های گرم مثبت (*باسیلوس*

1. Triphenyl-tetrazolium chloride
2. Statistical package for the social sciences

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-08-12]

سوبتلیس، *استرپتوکوکوس پیوژنز* و *استافیلوکوکوس اورئوس*) ۱۸/۶۰ میلی‌متر بود. در حالی که میانگین قطر هاله عدم رشد برای باکتری‌های گرم منفی (*سالمونلا تیفی*، *سودوموناس ائروژینوزا* و *اشرشیا کلی*) ۱۱/۹۳ میلی‌متر بود. آزمون‌های دیسک دیفیوژن و چاهک آگار روش‌های مقدماتی هستند که برای تعیین هاله عدم رشد به کار گرفته می‌شوند. مقایسه میان هاله بازدارندگی روش‌های چاهک آگار و دیسک دیفیوژن نشان داد اسانس *اکالیپتوس گلوبولوس* بر باکتری‌های بیماری زا گرم مثبت در روش چاهک آگار ۱/۸ میلی‌متر بزرگتر از روش دیسک دیفیوژن بود. همچنین نتایج نشان داد که هاله بازدارندگی روش‌های چاهک آگار و دیسک دیفیوژن نشان داد اسانس *اکالیپتوس گلوبولوس* بر باکتری‌های بیماری زا گرم منفی در روش چاهک آگار ۱/۷۷ میلی‌متر بزرگتر از روش دیسک دیفیوژن بود.

Table 1 The disk diffusion agar (DDA) and well diffusion agar (WDA) of the *Eucalyptus globulus* essential oil(EGEO) on some pathogenic bacteria

Microorganism	DDA (mm)	WDA (mm)
Bacillus subtilis	14.70 ±0.59	16.00 ±0.29
Staphylococcus aureus	18.90 ±0.36	21.20 ±0.44
Streptococcus pyogenes	16.80 ±0.46	18.60 ±0.61
Escherichia coli	10.10 ±0.71	12.40 ±0.50
Salmonella typhi	9.10 ±0.39	11.30 ±0.30
Pseudomonas aeruginosa	11.30 ±0.56	12.10 ±0.60

Values are expressed as mean ±standard deviations, $n = 3$.

برای درک صحیح نتایج آزمون‌های میکروبی انجام تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی ماده ضدمیکروب ضروری است. لذا در این پژوهش حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس *اکالیپتوس گلوبولوس* به روش میکرودایلوشن براث تعیین شد. نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس *اکالیپتوس گلوبولوس* در جدول ۲، آورده شده است. نتایج نشان داد که حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس *اکالیپتوس گلوبولوس* برای باکتری‌های *سالمونلا تیفی*، *سودوموناس ائروژینوزا*، *اشرشیا کلی*، *باسیلوس سوبتلیس*، *استرپتوکوکوس پیوژنز* و *استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب ۱۲۸، ٦٤، ٦٤، ۳۲، ۱٦ و ۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. نتایج حداقل غلظت کشندگی اسانس *اکالیپتوس گلوبولوس* برای باکتری‌های *سالمونلا تیفی*، *سودوموناس ائروژینوزا*، *اشرشیا کلی*، *باسیلوس سوبتلیس*، *استرپتوکوکوس پیوژنز* و *استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب ۵۱۲، ۲۵٦، ۱۲۸، ۱۲۸، ۳۲ و ۱٦ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. نتایج این پژوهش نشان داد که حداقل غلظت کشندگی اسانس *اکالیپتوس گلوبولوس* برای تمامی سویه‌های عامل عفونت و مسمومیت بزرگتر از حداقل غلظت مهارکنندگی بود.

Table 2 The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of the *Eucalyptus globulus* essential oil(EGEO) on some pathogenic bacteria

Microorganism	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)
Bacillus subtilis	32	128
Staphylococcus aureus	8	16
Streptococcus pyogenes	16	32
Escherichia coli	64	128
Salmonella typhi	128	512
Pseudomonas aeruginosa	64	256

مروری بر پژوهش‌های مشابه انجام شده نشان می‌دهد که در اکثر پژوهش‌های پیشین میانگین قطر هاله عدم رشد در روش چاهک آگار بزرگتر از دیسک دیفیوژن آگار است. دلیل این امر را به تفاوت مکانیسم اثر اسانس در این دو روش ذکر کرده‌اند[۱٤ و ۱۵]. در روش دیسک دیفیوژن اسانس به طور غیر مستقیم با سطح محیط کشت در ارتباط است و در واقع دیسک کاغذی

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-08-12]

آغشته به اسانس است که لازم است از دیسک به محیط کشت (غیر مستقیم) منتقل شود. در روش چاهک آگار اسانس به طور مستقیم با محیط کشت در ارتباط بوده لذا انتظار این است که در این روش به دلیل حذف دیسک (عامل واسطه بین ماده ضدمیکروب و باکتری کشت داده شده بر سطح محیط کشت) قطر هاله عدم رشد بزرگتر باشد. علیزاده بهبهانی و همکاران (۲۰۲۰)[۱٦]، علیزاده بهبهانی و همکاران (۲۰۱۹) [۱۷]، نوشاد و همکاران (۲۰۱۸) [۱۸]، طباطبایی یزدی و همکاران (۱۳۹۸)[۱۹] و نوشاد و همکاران (۱۳۹۸) [۲۰] نیز به نتایج مشابه دست یافتند. محبوبی و همکاران (۱۳۸٦)، اثر ضدمیکروبی اسانس اکالیپتوس را بر *باسیلوس سوبتلیس*، *باسیلوس سرئوس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سالمونلا تیفی*، *اشرشیا کلی*، *ویبریو کلرا*، *سودوموناس ائروژینوزا*، *سرشیا مارسسنس*، *کلبسیلا پنومونیه*، *آسپرژیلوس نایجر*، *آسپرژیلوس فلاووس* و *کاندیدا آلبیکنس* به روش‌های دیسک دیفیوژن، ماکرودایلوشن براث و حداقل غلظت کشندگی مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که قطر هاله عدم رشد برای *ویبریو کلرا*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *آسپرژیلوس فلاووس* به ترتیب ۱٤/۷، ۱٤/۲ و ۱۲/۵ میلی‌متر بود. همچنین این پژوهشگران گزارش کردند هاله عدم رشدی برای باکتری‌های *باسیلوس سرئوس*، *اشرشیا کلی* و *سودوموناس ائروژینوزا* مشاهده نشد. در پژوهش ما نیز باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا تیفی* به ترتیب حساس‌ترین و مقاوم‌ترین سویه میکروبی بود. مقایسه پژوهش حاضر با این پژوهشگران نشان داد اثر اسانس اکالیپتوس بر باکتری‌های گرم منفی متفاوت بود اما در مورد باکتری‌های گرم مثبت تا حدود زیادی مشابه بود. هر چند لازم به ذکر است که در پژوهش محبوبی و همکارن (۱۳۸٦)، گونه اکالیپتوس مشخص نشده بود[۲۱]. شاید بتوان بخشی از تفاوت میان نتایج به دست آمده را مرتبط به نوع گیاه، روش خشک کردن گیاه، استحصال اسانس روغنی، تفاوت نوع سویه میکروبی و ... ذکر کرد. سرینیواسان و همکاران (۲۰۰۱)، اثر ضدمیکروبی گونه‌ای از اکالیپتوس را بر باکتری‌های شیگلا *دیسانتری*، *سالمونلا پاراتیفی*، *اشرشیا کلی*، *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* و همچنین مخمر *کاندیدا آلبیکنس* را در شرایط برون تنی مورد بررسی قرار دادند. این پژوهشگران اثر ضدباکتریایی و ضدقارچی اکالیپتوس را تایید کردند[۲۲]. علیزاده بهبهانی و همکاران (۲۰۱۳)،فعالیت ضدمیکروبی گونه‌ای از اکالیپتوس را بر تعدادی از میکروارگانیسم‌های شاخص عفونت و مسمومیت غذایی را در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران فعالیت ضدمیکروبی اکالیپتوس را بر باکتری‌های بیماری‌زا تایید کرد[۲۳]. مهدوی و همکاران (۱۳۹۵)، اثر ضدمیکروبی اکالیپتوس را بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیا کلی*، *سالمونلا انتریکا*، *سالمونلا پولوروم* و *سالمونلا گالیناروم* را به روش میکرودایلوشن براث و حداقل غلظت کشندگی مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که رنج حداقل غلظت مهارکنندگی برای سویه‌های مورد بررسی ۳/۱۲۵ تا ۲۵ درصد بود[۲٤]. آزادبخت و همکاران (۱۳۹٦)، فعالیت ضدمیکروبی فیلم زیست فعال کیتوزان حاوی اسانس *اکالیپتوس گلوبولوس* را بر تعدادی از باکتری‌های بیماری‌زای گرم مثبت و گرم منفی مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که حداقل غلظت بازدارندگی اسانس *اکالیپتوس گلوبولوس* در محدوده ۱۲۵/۳ تا ٥٦۲/۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. همچنین میزان قطر هاله عدم رشد در باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی بیشتر بود[۸]. در پژوهش ما نیز قطر هاله عدم رشد در هر دو روش دیسک دیفیوژن و چاهک آگار برای باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از باکتری‌های گرم منفی بود. علیزاده بهبهانی و همکاران (۲۰۱٤)، اثر ضدباکتریایی فیلم کربوکسی متیل سلولز حاوی عصاره‌های آبی و اتانولی اکالیپتوس را بر باکتری‌های *استرپتوکوکوس پیوژنز*، *سودوموناس ائروژینوزا* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* به روش‌های دیسک دیفیوژن و ماکرودایلوشن براث مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان دادکه عصاره اکالیپتوس بر باکتری‌های بیماری‌زا موثر بوده و از رشد آن‌ها بر سطح محیط کشت جلوگیری کرد[۲۵].

٤- نتیجه‌گیری

در یک نتیجه‌گیری کرد می‌توان بیان کرد که اسانس *اکالیپتوس گلوبولوس* اثر ضدمیکروبی مناسبی بر تمامی سویه‌های بیماری‌زا داشت. اثر ضدمیکروبی اسانس بر باکتری‌های گرم مثبت

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-08-12]

(استافیلوکوکوس اورئوس، استرپتوکوکوس پیوژنز و باسیلوس سوبتلیس) بیشتر از باکتری‌های گرم منفی *(اشرشیا کلی، سودوموناس ائروژینوزا و سالمونلا تیفی)* بود. پیشنهاد می‌شود آزمون‌های تکمیلی جهت استفاده از اسانس *اکالیپتوس گلوبولوس* جهت استفاده به عنوان نگهدارنده طبیعی در صنعت غذا و مصارف دارویی انجام گیرد.

۵- 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] Igbinosa O, Igbinosa E, Aiyegoro O. Antimicrobial activity and phytochemical screening of stem bark extracts from Jatropha curcas (Linn). African Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2009;3(2):058-62.

[2] Lattanzio V, Kroon PA, Linsalata V, Cardinali A. Globe artichoke: a functional food and source of nutraceutical ingredients. Journal of Functional Foods. 2009;1(2):131-44.

[3] Negi PS. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. International Journal of Food Microbiology. 2012;156(1):7-17.

[4] Nostro A, Germano M, D'angelo V, Marino A, Cannatelli M. Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. Letters in Applied Microbiology. 2000;30(5):379-84.

[5] Brooker I, Kleinig D. Field Guide to Eucalypts: Northern Australia: Volume Three: Bloomings Books; 2004.

[6] Cimanga K, Kambu K, Tona L, Apers S, De Bruyne T, Hermans N, et al. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. Journal of Ethnopharmacology. 2002;79(2):213-20.

[7] Soliman KM, Badeaa R. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. Food and Chemical Toxicology. 2002;40(11):1669-75.

[8] Azadbakht E, Maghsoudlou Y, Khomeiri M, &KashiriM. Evaluation of antibacterial activity of chitosan bioactive film containing *Eucalyptus globulus* essential oil. Iranian Food Science and Technology Research Journal.2017; 13(5): 784-97. [Full text in Persian].

[9]Sureshjani MH, Yazdi FT, Mortazavi SA, Behbahani BA, Shahidi F. Antimicrobial effects of Kelussiaodoratissima extracts against food borne and food spoilage bacteria" in vitro. Journal of Paramedical Sciences. 2014;5(2):115-20.

[10] Kiarsi Z, Hojjati M, Behbahani BA, Noshad M. In vitro antimicrobial effects of Myristica fragrans essential oil on foodborne pathogens and its influence on beef quality during refrigerated storage. Journal of Food Safety. 2020: e12782.

[11] Barzegar H, Mehrnia MA, Alizadeh Behbahani B. 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. 2018; 4(4): 15-28. [Full text in Persian].

[12] Noshad M, Alizadeh behbahani B. Investigation of phytochemical compounds, antioxidant potential and the antimicrobial effect of Bergamot essential oil on some pathogenic strains causing infection in vitro. Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2019; 26 (6) :122-32. [Full text in Persian].

[13] Tabatabaei Yazdi F, Behbahani BA, Mortazavi A. Investigating the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of the *Lavandula stoechas* L. and *Rosmarinus officinalis* L. extracts on pathogen bacteria "in vitro". Journal of Paramedical Sciences (JPS). 2014;5(2):91-101.

[14] Alizadeh Behbahani BA, Shahidi F, Yazdi FT, Mortazavi SA, Mohebbi M. Antioxidant activity and antimicrobial effect of tarragon (Artemisia dracunculus) extract and chemical

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-08-12]

composition of its essential oil. Journal of Food Measurement and Characterization. 2017;11(2):847-63.

[15] Alizadeh Behbahani, B., & Shahidi, F.Melissa officinalis essential oil: Chemical compositions, antioxidant potential, total phenolic content and antimicrobial activity. Nutrition and Food Sciences Research. 2019;6(1): 17-25.

[16] Alizadeh Behbahani B, Falah F, Lavi Arab F, Vasiee M, TabatabaeeYazdi F. Chemical Composition and Antioxidant, Antimicrobial, and Antiproliferative Activities of *Cinnamomum zeylanicum* Bark Essential Oil. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2020;2020: 1-8.

[17] Alizadeh Behbahani B, Noshad M, Falah F. Cumin essential oil: Phytochemical analysis, antimicrobial activity and investigation of its mechanism of action through scanning electron microscopy. Microbial pathogenesis. 2019; 136:103716.

[18] Noshad M, Hojjati M, Behbahani BA. Black Zira essential oil: Chemical compositions and antimicrobial activity against the growth of some pathogenic strain causing infection. Microbial Pathogenesis. 2018;116:153-7.

[19] TabatabaiYazdi F, Falah F, Alizadeh Behbahani B, Vasiee A, Mortazavi SA. Identification of chemical compounds, antioxidant potential, phenolic content and evaluation of inhibitory and bactericidal/fungicidal effects of Ginger essential oil on some pathogenic microorganisms in vitro. Qom University of Medical Sciences Journal. 2019;13(3):50-62.

[20] Noshad M, Alizadeh Behbahani B. Identification of chemical compounds, antioxidant activity, and antimicrobial effect of *Elettaria cardamomum*essential oil on a number of pathogenic microorganisms in vitro. Qom University of Medical Sciences Journal. 2019;13(2):57-69.[Full text in Persian].

[21] Mahboubi M, Akbari M, Haghi G, Kazempour N. Comparison of antimicrobial activity of Respitol-B withmentofin containing menthol, Eucalyptus oil. Iranian Journal of Medical Microbiology. 2007;1(1):39-45. [Full text in Persian].

[22] Srinivasan D, Nathan S, Suresh T, Perumalsamy PL. Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. Journal of Ethnopharmacology. 2001;74(3):217-20.

[23] Alizadeh Behbahani B, Yazdi FT, Mortazavi A, Zendeboodi F, Gholian MM, Vasiee A. Effect of aqueous and ethanolic extract of Eucalyptus camaldulensis L. on food infection and intoxication microorganisms “in vitro”. Journal of Paramedical Sciences (JPS). 2013;4(3):89-99.

[24] Mahdavi S, Haj-Azimian S, Isa-Zadeh A.R, Babash-pour M, Shishehgar R. Study of the antioxidant and antimicrobial effects of the ethanolic extract of Eucalyptus camaldulensis Dehnh against infectious bacteria isolated from clinical and animal sources. journal of Comparative Pathology. 2016; 13(4):2063-70.[Full text in Persian].

[25] Alizadeh Behbahani B, Yazdi FT, Mortazavi A, Gholian MM, Zendeboodi F, Vasiee A. Antimicrobial effect of carboxy methyl cellulose (CMC) containing aqueous and ethanolic Eucalyptus camaldulensis L. leaves extract against Streptococcus pyogenes, Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus epidermidis. Journal of Paramedical Sciences (JPS). 2014;5(2):59-69.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-08-12]

Iranian Journal of Food Science and Technology

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Investigation of the minimum inhibitory concentration and the minimum bactericidal concentration of *Eucalyptus globulus* essential oil on pathogenic and food-born bacteria

Alizadeh Behbahani, B. [1]*, Noshad, M. [1], Sahraiyan, B. [2]

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
2. PhD, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

ARTICIE INFO

Article History:

Received 21 May 2020
Accepted 22 August 2020

Keywords:

Eucalyptus globulus,
Drug resistance,
Food preservative,
Antimicrobial effect.

DOI: 10.29252/fsct.18.01.05

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

ABSTRACT

Eucalyptus is one of these plants which the antimicrobial effects has long been used to treat a cold and influenza in most parts of the world. The aim of this experimental study was to evaluate the antibacterial activity of *Eucalyptus globulus* essential oil (EGEO) in 4 ways: disc diffusion agar, well diffusion agar, microdilution broth and minimum bactericidal concentrationon a number of strains pathogens and the cause of food spoilage in vitro. The sensitivity profile of microorganisms against the EGEO (disc diffusion agar) is as follows form the most resistant to the most sensitive: *Salmonella typhi>Escherichiacoli>Pseudomonas aeruginosa>Bacillus subtilis>Streptococcus pyogenes>Staphylococcus aureus*. The mean inhibition zone in well diffusion agar was equal to 18.62 mm against Gram-positive bacteria. The mean inhibition zone in well diffusion agar was equal to 11.93 mm against Gram-negative bacteria.The results showed that the minimum inhibitory concentration of EGEO for *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*,*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pyogenes* and *Staphylococcus aureus* was 128, 64, 64, 32, 16 and 8 mg/ml respectively. The minimum bactericidal concentration for microorganisms was 512, 256, 128, 128, 32 and 16 mg/ml respectively. It is recommended that additional tests be performed to use EGEO for use as a natural preservative in the food and pharmaceutical industry.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-08-12]