

# کاربرد اسانس روغنی آرتیمیسیا افسنطین در کنترل رشد باکتری‌های بیماری‌زا روی کاهوی قازه

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

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

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

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

## چکیده

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

**کلید واژگان:** ضدمیکروبی - آرتیمیسیا افسنطین - کاهو.

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* و بررسی فعالیت ضد باکتریایی آن علیه باکتری‌های بیماری‌زای غذایی بخصوص کنترل رشد آن‌ها در کاهو می‌باشد.

## 2- مواد و روشها

### 2-1-2- تهیه نمونه

بخش‌های هوایی گیاه افسنطین از کوه‌های همدان جمع آوری 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 اسانس گیری 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 سانتی گراد نگهداری شد.

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

ترکیبات گیاه افسنطین توسط GC-MS مورد آنالیز قرار گرفت. نمونه‌های اسانس توسط پژوهشکده گیاهان دارویی دانشگاه شهید بهشتی آنالیز شد. شناسایی ترکیبات موجود در اسانس به وسیله دستگاه‌های کروماتوگرافی گازی و کروماتوگرافی گازی متصل به Trace GC از نوع ThermoQuesst-Finnigan شرکت سازنده با طول ستون 30 متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی متر و ضخامت لایه ۰/۲۵ میکرومتر بود. حجم تزریق ۰/۲۰ میکرولیتر، دمای تزریق گر ۲۵۰ 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 ۰/۲۵ میلی متر و ضخامت لایه ۰/۲۵ میکرومتر، نوع گاز

## 1- مقدمه

جنس آرتیمیسیا یکی از بزرگترین جنس‌های خانواده Asteraceae است و حاوی بیش از 800 گونه می‌باشد. بسیاری از گونه‌های این جنس، خواص درمانی بسیاری نظری فعالیت ضد مalaria، ضد ویروس و ضد تومور دارند [۱]. در این مطالعه گونه *Artemisia absinthium* از کوه‌های زاگرس ایران به منظور ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی اسانس روغنی حاصل از آن جمع آوری گردید. ترپن‌ها، هیدروکربن‌های تولید شده از ترکیب چندین واحد ایزوترپن بوده و از ترکیبات اصلی این گیاه می‌باشد. این ترکیب ساختار هیدروکربنی داشته، توسط آنزیم سیکلاز به ساختار حلقه‌ای تبدیل می‌شود و در سیتوپلاسم سلول‌های گیاهی از طریق مسیر بیوستزی اسیدهای مولوپنک تولید می‌شود. ترپن‌های اصلی شامل مولکول‌های مونوترپنی ( $C_{10}H_{16}$ ) و چند ترپنی ( $C_{15}H_{24}$ ) هستند. نمونه‌ای از ترپن‌ها شامل پی-سایمن<sup>1</sup>، لیمون<sup>2</sup>، ترپین<sup>3</sup>، سایبن<sup>4</sup> و پین<sup>5</sup> هستند [۲]. یکی از ترکیبات اصلی در نگهدارنده‌های طبیعی ترپن‌ها بوده و می‌توانند جایگزین خوبی برای نگهدارنده‌های شیمیایی مواد غذایی باشند. مصرف نگهدارنده‌های شیمیایی در مواد غذایی عوارض جانبی زیادی نظیر افزایش حساسیت، آرژی، آسم، بیش فعالی، 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 [۳]. 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 ۹۶۰۰۰ نفر می‌میرند [۴] که عامل مسمومیت‌های غذایی باکتری‌های بیماری‌زا می‌باشد. کاهو یکی از مواد غذایی است که به صورت خام مصرف شده و می‌تواند حامل باکتری‌های بیماری‌زا 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

میکروبی اسانس‌ها به صورت قطره‌های ممانعت از رشد باکتری اطراف دیسک‌ها و بر حسب میلی‌متر اندازه گیری شد.

## 5-2- ارزیابی فعالیت ضد میکروبی اسانس روغنی افسنطین توسط روش حداقل غلظت MIC<sup>6</sup>

MIC کمترین غلظتی از اسانس روغنی است که از رشد باکتری‌های پاتوژن ممانعت می‌کند [13]. فعالیت ضد میکروبی اسانس افسنطین 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 براث به طور سریالی در پلیت 96 خانه رقیق سازی گردید. سوسپانسیون میکروبی در مولر هیتون براث به میزان 50 میکرولیتر به چاهک‌ها اضافه گردید تا غلظت نهایی باکتری به صورت  $5 \times 10^5$  CFU/ml برسد. غلظت نهایی اسانس در چاهک به صورت 0, 4, 8, 16, 32, 64 میکرولیتر بر میلی‌لیتر تهیه گردید. پلیت‌ها در 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 24 ساعت گرمخانه گذاری شدند و رشد باکتری‌ها بعد از 24 ساعت اندازه گیری شد. کنترل مثبت حاوی مولر هیتون براث و سوسپانسیون باکتریایی بود و کنترل منفی فقط شامل مولر هیتون براث بود [16,15,14].

## 6- ارزیابی فعالیت ضد میکروبی اسانس روغنی افسنطین توسط روش حداقل غلظت با خاصیت کشندگی MBC<sup>7</sup>

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 گرمخانه گذاری می‌گردد. MBC غلظتی از

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

## 3-2- تهیه و کشت سویه‌های میکروبی

سویه‌های 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 25922<sup>2</sup>، ATCC 1609، سالمونلا تایفی<sup>3</sup> و PTCC1609 باسیلوس سرئوس<sup>4</sup> ATCC 10876

سویه‌های فعال شده توسط لوب از آگار مغذی (مرک، آلمان) به لوله حاوی 5 میلی‌لیتر مولر هیتون براث (مرک، آلمان) منتقل گردید و تا رسیدن به فاز لگاریتمی رشد در 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 10 ساعت کشت گردید [8,10]. سپس کدورت سلولی تا استاندارد 0,5 مک‌فارلن德 و توسط جذب اسپکتروفوتومتری در 600 نانومتر تنظیم گردید [11].

## 4-2- ارزیابی فعالیت ضد میکروبی اسانس روغنی افسنطین توسط سنجش انتشار دیسک در آگار

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 رقیق سازی 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 مک‌فارلن德 تلقیح شده بود قرار گرفت و پلیت‌ها در 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 24 ساعت گرمخانه گذاری گردید [12]. تست‌های انتشار از دیسک در 3 تکرار انجام گردید. فعالیت ضد

1. *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*

2. *Escherichia coli*

3. *Salmonella typhi*

4. *Bacillus cereus*

5. Agar disk diffusion assay

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

### 3- نتایج

ترکیبات شیمیایی اسانس روغنی افسنطین 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 می شوند. ترکیب زد- بتا- اوسمین اکساید<sup>1</sup> به میزان 2,36 ± 76,53 % ترکیب غالب در این اسانس شناخته شد و سایر ترکیبات اصلی این اسانس به ترتیب ای- بتا- اوسمین اکساید<sup>2</sup>، سایین و بنا-مایرسن<sup>3</sup> می باشند (جدول 1).

فعالیت ضد میکروبی اسانس روغنی افسنطین 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 می شود. براساس مطالعات قبلی دانشمندان، فعالیت ضد میکروبی اسانس‌های روغنی در 3 سطح تقسیم می شود:

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 افسنطین فعالیت ضد میکروبی علیه باکتری‌های بیماری‌زا دارد. بیشترین فعالیت ضد میکروبی (بیشترین قطر هاله علیه استافافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا تایفی و اشرشیاکلی نشان داده شد و کمترین فعالیت ضد میکروبی MIC اسانس به صورت رقیق نشده علیه باسیلوس سرئوس بود. این اسانس برای باکتری‌های استافافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، سالمونلا تایفی و اشرشیاکلی به ترتیب (μl/ml) 16, 32, 64 و 64 و MBC برای باکتری‌های استافافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، سالمونلا تایفی و اشرشیاکلی به ترتیب (μl/ml) 32, 32, 64 و 64 بود.

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

### 7-2- کترل رشد باکتری‌های بیماری‌زا در کاهوی تازه توسط اسانس روغنی افسنطین

کاهو از بازار همدان تهیه شد. باکتری‌های استافافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلی، سالمونلا تایفی و باسیلوس سرئوس در مولر هیتتون براث در 37 درجه سانتی گراد به مدت 18 ساعت کشت گردیدند. سپس سانتریفیوژ 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 6×2 سانتی متری توسط چاقوی استریل برش داده شد. یک میلی لیتر از سوسپانسیون هریک از باکتری‌های پاتوژن در بافر فسفات (10<sup>9</sup> 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 میلی لیتر اسانس با غلاظت 30 (μl/ml) 64, 32, 16 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 کترول استفاده گردید. در این آزمون، غلاظت‌های 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 میلی لیتر بافر فسفات 1% به مدت 2 دقیقه مخلوط گردید. سپس نمونه‌ها به صورت سریالی رقیق سازی شد و در محیط کشت مولر هیتتون آگار کشت گردید [18].

### 8-2- تجزیه و تحلیل آماری

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

1. (Z)-β-Ocimene oxide

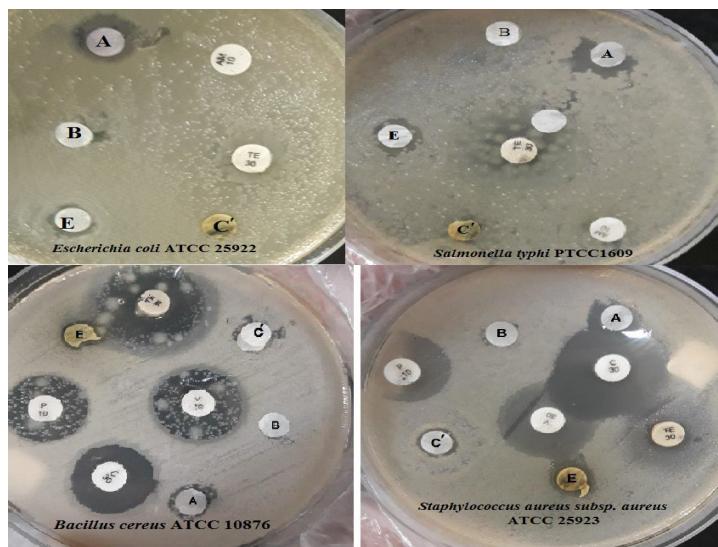
2. (E)-β-Ocimene oxide

3. β-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	Geranyl 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	Geranyl -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)

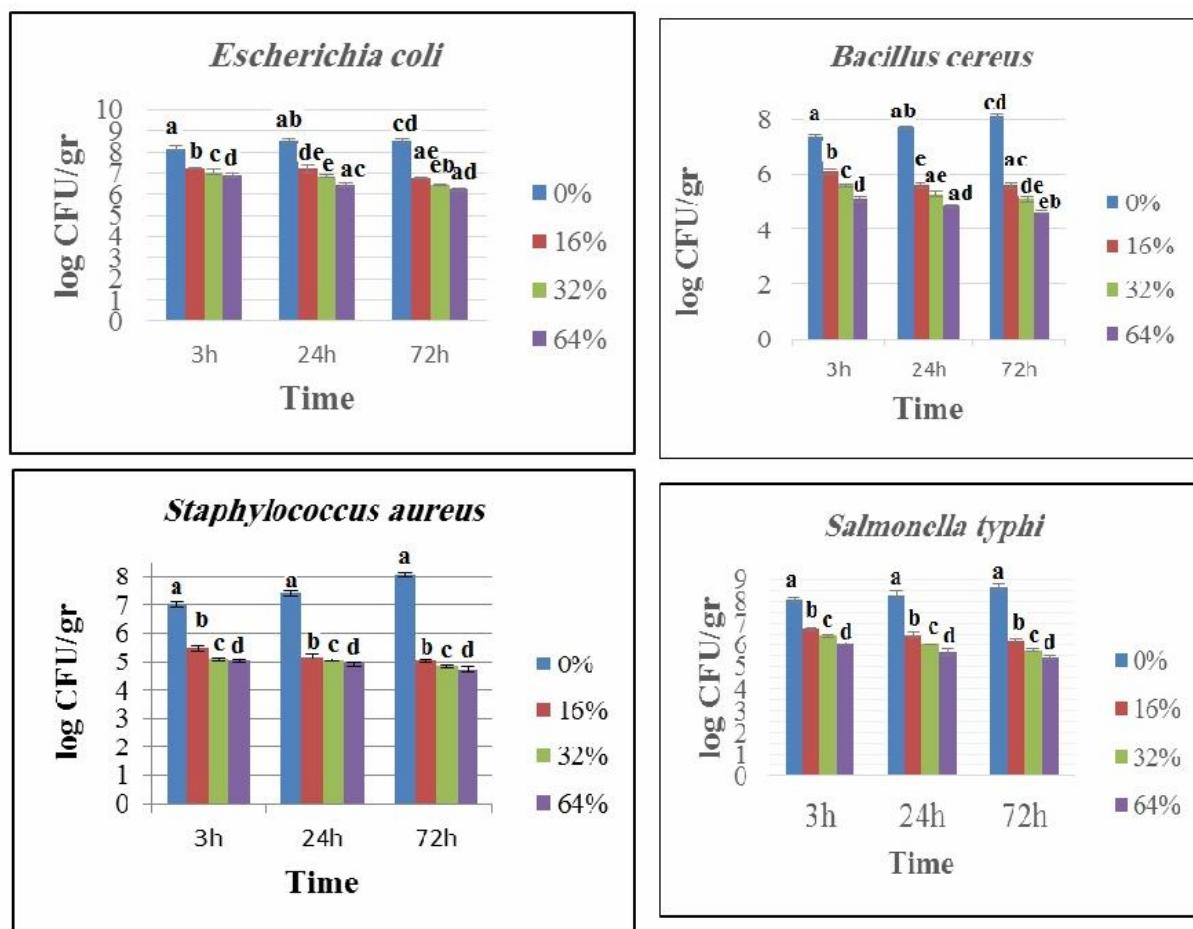
**Table 2** Antimicrobial activity (Inhibition zone diameter, MIC and MBC values) of the essential oil and antibiotic discs against the tested bacteria

Microorganism	Essential oil ( $\mu\text{l/ml}$ )			Inhibition zone diameter <sup>a</sup> (mm)							
				Essential oil (PPM)							
	MIC	MBC		10	100	1000	EO without dilution				
Tetracycline (30 $\mu\text{g}/\text{disc}$ )											
<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			
Ampicillin (10 $\mu\text{g}/\text{disc}$ )											
Chloramphenicol (30 $\mu\text{g}/\text{disc}$ )											
Penicillin (10 $\mu\text{g}/\text{disc}$ )											
Vancomycin (10 $\mu\text{g}/\text{disc}$ )											

<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 انسانس 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 انسانس بر روی گرم مثبت ها اثر ضد میکروبی بیشتری نسبت به گرم منفی ها داشته است.

به منظور بررسی اثر زمان تیمار کاهو با انسانس روغنی افسنتین، غلظت این انسانس 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 استافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا تایفی نداشته ( $p \geq 0,05$ ) اما غلظت انسانس 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 انسان‌های روغنی پونه کوهی، ریحان و ترنج انجام شد ثابت شد که این انسان‌ها به دلیل دارا بودن ترپن‌ها، فلز‌ها و آلدوکتون‌ها می‌توانند نقش مهمی در فعالیت ضد باکتریایی ایفاء کنند [۲۴، ۲۵، ۲۱]. اما ترپن‌ها به تنهایی به عنوان عامل ضد میکروبی نمی‌توانند عمل کنند. در این مطالعه آنالیز شمایی روغنی افسطینین نشان داد که مونوترپن‌ها از ترکیبات عمده و اصلی این انسان روغنی می‌باشند و ترکیب اصلی آن زد- بتا- اوسمیمن اکساید می‌باشد. این ترکیب دارای هیدروکربن‌های ایزومریک متعدد است و در طیف وسیعی از میوه‌ها و گیاهان وجود دارد. بتا- اوسمیمن به عنوان یک مولکول سیگناال دهنده در ارتباط بین گیاهان نقش دارد و به دو شکل

#### 4- تفسیر و تحلیل

انسان‌های روغنی حاوی گروهی از ترکیبات با فعالیت ضد میکروبی می‌باشند. این ترکیبات شامل ترپن‌ها، ترپنوتیدها، فنیل پروپن‌ها، کارواکرول و تیمول می‌باشند. فعالیت ضد میکروبی انسان‌ها می‌تواند به عملکرد ترکیبات هیدروفوبیکی (آنگریز) آن‌ها علیه غشاء سلولی میکرووارگانیسم‌ها نسبت داده شود [۲۰، ۲۱].

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 [۱۷، ۲۲، ۲۳].

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 افستانین، باکتری در فاز لگاریتمی رشد مورد مطالعه قرار گرفت. در مطالعه حاضر اشرشیاکلی دارای مقاومت بالایی نسبت به ترکیب اسانس‌های روغنی افستانین 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 هیدرووفیل نظری اسانس‌های روغنی را محدود می‌کند [36] چنین پدیدهای در مطالعه ما نیز قابل توجه است، نتایج بررسی مقاومت باکتری‌ها به اسانس افستانین توسط MIC و MBC و بررسی قطر هاله ممانت نشان می‌دهد که اسانس افستانین علیه گرم مثبت‌ها نسبت به گرم منفی‌ها موثرter است و باکتری‌های اشرشیاکلی و استافیلوقوکوس اورئوس به ترتیب مقاومت‌رین و حساس‌ترین باکتری‌های مورد مطالعه ما به اسانس روغنی افستانین بودند.

باکتری‌های مورد مطالعه اسانس روغنی افستانین می‌باشد [37].

براساس مطالعات انجام شده در دنیا استفاده از اسانس‌های روغنی گیاهان در کنترل بار میکروبی سبزیجات و مواد غذایی می‌تواند قابل رقابت با محلول‌های ضدعفونی کننده شیمیایی و نگهدارنده‌ها باشد. در مطالعه ما تاثیر غاظت بالای اسانس افستانین در کاهش بار میکروبی تلقیح شده به کاهش قابل توجه بود. مشابه نتایج ما، بهارگاوا 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 ۰,۱٪ در مقایسه با آب باعث کاهش ۳,۵۷، ۳,۲۶ و ۳,۳۵ لگاریتمی در تعداد واحد تشکیل دهنده کلنی در هر گرم نمونه به ترتیب در لستریا مونوستیوژن، سالمونلا تایفی موریوم و اشرشیاکلی گردید [38] که فعالیت ضدمیکروبی این اسانس بر گرم مثبت‌ها بیشتر از گرم منفی‌ها گزارش شده است. در سال 2012 یوسا و همکاران مطالعه‌ای در ارتباط با بررسی فعالیت ضدمیکروبی محلول حاوی

استروایزومریک<sup>1</sup> سیس و ترانس وجود دارد [26]. اوسمین‌ها 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 افستانین با GC-MS حضور ترکیباتی دیگری نظری پی - سایمن، سایبن، لیمون، ترپین و پین نیز را در افستانین 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 نظری (+)- سایبن، δ-3-کارن<sup>2</sup>، α-ترپین، β-پین، لیمون و α-پین هیچ فعالیت ضد میکروبی علیه 25 باکتری بیماری‌زای گیاهی، حیوانی و عفونیت‌زای غذایی نشان ندادند [28]. کوتسوداکی و همکاران (2005) نیز گزارش کردند ترکیبات β-پین، α-پین، لیمون، پی - سایمن، γ-ترپین، β-مایرسن، β-کاریوفیلن<sup>3</sup> علیه اشرشیاکلی، استافیلوقوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس فعالیت ضد میکروبی آشکاری نشان ندادند [29] و رائو و همکاران (2010) نشان دادند که پی - سایمن و γ-ترپین به عنوان ضد قارچ علیه ساکارومایسیز سرویسیه فعالیت غیر موثری دارد [30]. در مطالعه ما نیز ثابت شد که اسانس افستانین 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 نظری اسانس‌های روغنی مقاوم هستند [31]. مطالعات نشان داده است که پیتیدوگلیکان دیواره سلول‌های گرم منفی نظری اشرشیاکلی در طی عبور از فاز لگاریتمی به فاز سکون تغییر می‌کند. سلول‌های اشرشیاکلی 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. δ-3-carene

3. β- 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 chloride, 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 (1000- 800ppm) به تهایی و همراه با اسید استیک (200ppm) علیه اشرشیاکلی و سالمونلا انجام دادند. آن‌ها نشان دادند اسانس روغنی (سینام آلدئید) در فعالیت ضدبیکروبی قابل رقابت با محلول کلرین است [39]. همچنین داسیلووا و همکاران (2012) در تحقیقی فعالیت ضدبیکروبی اسانس روغنی پونه کوهی (عنی از کارواکرول، پی- سایمن، ۷- ترپین) (v/v) ۰,۲% را بر سالمونلا /ایتریلیس در میکرونز در دو دمای 8 و 30 درجه سانتی گراد بررسی کرد و نشان دادند که در دمای پایین تر این اسانس قوی‌تر عمل می‌کند [40].

## 5- نتیجه‌گیری

در مطالعه ما اثر ضدبیکروبی اسانس افسنطین در کاهش بار میکروبی کاهو (محیط غذایی) قابل توجه بود و می‌توان آن را جایگزین خوبی برای ضدغوفونی کننده‌های شیمیایی سبزیجات دانست البته به دلیل ماهیت هیدروفوبی اسانس افسنطین بهتر است جهت تقویت فعالیت ضد باکتریایی این اسانس در کاهش بارمیکروبی سبزیجاتی نظیر کاهو آن را به شکل نانومولسیون بررسی کرد. البته بر اساس نتایج ما در بررسی فعالیت ضدبیکروبی اسانس افسنطین در محیط کشت (محیط غیر غذایی) و مطالعات سایر محققین نباید انتظار داشت اسانس افسنطین دارای فعالیت ضد باکتریایی قوی باشد و چون ترکیب اصلی و غالب این اسانس بتا- اسیمین 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 ضدبیکروبی اسانس افسنطین 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 ( $\mu$ l/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)- $\beta$ -Ocimene oxide as the major component of the essential oil was  $76.53\pm2.36\%$ . 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  $\mu$ l/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