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

نفیسه دعوتی [1*]، سمیه علی میرزائی [2]

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 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*، *سالمونلا تایفی* و *باسیلوس سرئوس* توسط روش‌های انتشار دیسک در آگار، MIC و MBC ارزیابی گردید. براساس نتایج MIC، غلظت‌های اسانس روغنی (µl/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*، *سالمونلا تایفی* و *باسیلوس سرئوس* تلقیح گردید و تعداد باکتری‌ها در فواصل زمانی (0، 3، 24 و 72 ساعت) شمارش گردید. غلظت زد- بتا- اوسیمن اکساید به عنوان ترکیب اصلی اسانس روغنی 2,36± 76,53 % 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 µl/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 *آرتیمیسیا افسنطین* می‌تواند یک عامل ضدمیکروبی موثر جهت کنترل رشد باکتری‌های پاتوژنیک روی کاهوی تازه باشد.

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

*مسئول مکاتبات: n.davati@basu.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-01-02]

[DOI: 10.29252/fsct.17.01.08]

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. ترپن‌ها، 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 بیوسنتزی اسیدهای موالونیک 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[1]، لیمونن[2]، ترپینن[3]، سابینن[4] و پینن[5] هستند [2]. 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، آلرژی، 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 [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 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.

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

2- مواد و روشها

2-1- 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 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 افسنطین 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

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-01-02]

[DOI: 10.29252/fsct.17.01.08]

حامل هلیوم با جریان 1/10 میلی لیتر بر دقیقه، انرژی یونیزاسیون 70 ev و زمان روبش S 47 /0 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[1] ATCC 25923 ، *اشرشیاکلی*[2] ATCC 25922، *سالمونلا تایفی*[3] PTCC1609 و *باسیلوس سرئوس*[4] ATCC 10876

سویه‌های فعال شده توسط لوپ از آگار مغذی (مرک، آلمان) به لوله حاوی 5 میلی‌لیتر مولر هینتون براث (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 0,5مک فارلند و توسط جذب اسپکتروفتومتری در 600 نانومتر تنظیم گردید [11].

2-4- ارزیابی فعالیت ضد میکروبی اسانس روغنی افسنطین توسط سنجش انتشار دیسک در آگار[5]

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 ppm، 100 و 1000 بر روی سطح محیط کشت مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) که از قبل توسط 200 میکرولیتر سوسپانسیون سلولی از سویه‌های میکروبی با کدورت 0,5مک فارلند تلقیح شده بود قرار گرفت و پلیت ها در 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 24 ساعت گرمخانه گذاری 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 اندازه گیری شد.

2-5- ارزیابی فعالیت ضد میکروبی اسانس روغنی افسنطین توسط روش حداقل غلظت ممانعت از رشد[6] MIC

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 هینتون براث به طور سریالی در پلیت 96 خانه رقیق سازی گردید. سوسپانسیون میکروبی در مولر هینتون براث به میزان 50 میکرولیتر به چاهک‌ها اضافه گردید تا غلظت نهایی باکتری به 5×10^5 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 گرمخانه گذاری شدند و رشد باکتری ها بعد از 24 ساعت اندازه گیری شد. کنترل مثبت حاوی مولر هینتون براث و سوسپانسیون باکتریایی بود و کنترل منفی فقط شامل مولر هینتون براث بود [16،15،14].

2-6- ارزیابی فعالیت ضد میکروبی اسانس روغنی افسنطین توسط روش حداقل غلظت با خاصیت کشندگی[7] 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 هینتون آگار گسترده شده و در 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 24 ساعت گرمخانه گذاری 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

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-01-02]

[DOI: 10.29252/fsct.17.01.08]

اسانس معرفی می‌شود که در تلقیح بر روی مولر هینتون 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 افسنطین

کاهو از بازار همدان تهیه شد. باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلی، سالمونلا تایفی و باسیلوس سرئوس* در مولر هینتون براث 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 2×6 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 (µl/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 که10 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 هینتون آگار کشت گردید [18].

2-8- تجزیه و تحلیل آماری

همه آزمون‌ها در 3 تکرار انجام گردید. بقاء باکتری‌ها در گروه‌های 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 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 می‌شوند. ترکیب زد- بتا- اوسیمن اکساید[1] به میزان 2,36 ± 76,53 % ترکیب غالب در این اسانس شناخته شد و سایر ترکیبات اصلی این اسانس به ترتیب ای- بتا- اوسیمن اکساید[2]، سابینن و بتا-مایرسن[3] می‌باشند (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 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 میلی‌متر) [19]. بر اساس نتایج (جدول2) نشان داده شد که اسانس افسنطین 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* به ترتیب (µl/ml) 16، 32، 64 و 64 و MBC برای باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، سالمونلا تایفی و اشرشیاکلی* به ترتیب (µl/ml) 32، 32، 64 و 64 بود.

1. (Z)-β-Ocimene oxide
2. (E)-β-Ocimene oxide
3. β-Myrcene

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-01-02]

[DOI: 10.29252/fsct.17.01.08]

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

NO.	Compounds	RI[a]	GC area (%)[b]	NO.	Compounds	RI[a]	GC area (%)[b]
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 isovalorate	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

[a] RI, retention indices relative to C_8-C_{24} n-alkanes.

[b] Relative proportions as percent of the total peak area, and results are presented as mean± standard deviation from the experiments in triplicate.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-01-02]

[DOI: 10.29252/fsct.17.01.08]

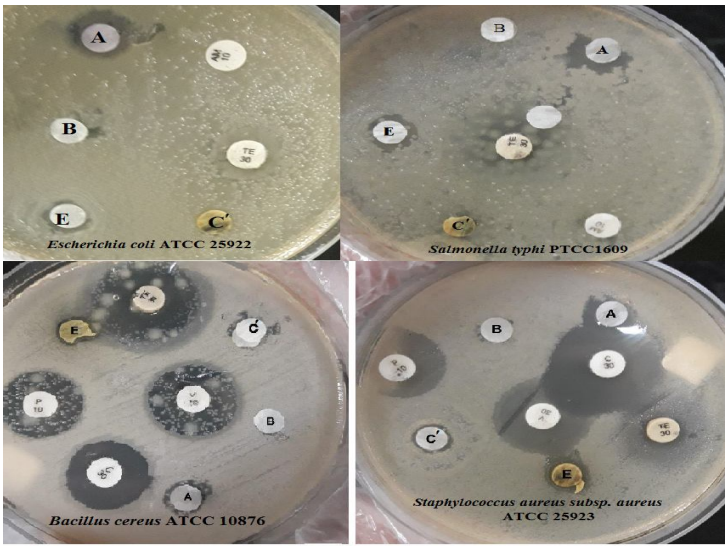

Fig 1 Antibacterial activity (zones of inhibition) of Artemisia absinthium essential oil
Concentrated essential oil (A); Diluted Essential Oil (B: 10 ppm, C': 100 ppm, E: 1000 ppm); Tetracyclines (TE); Vancomycin (V); Chloramphenicol (C); Penicillin (P); Amoxicillin (Am)

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 (µl/ml)		Inhibition zone diameter [a] (mm)								
	MIC	MBC	Essential oil (PPM)				Tetracycline (30 µg/disc)	Ampicillin (10µg/disc)	Chloramphenicol (30 µg/disc)	Penicillin (10 µg/disc)	Vancomycin (10 µg/disc)
			10	100	1000	EO without dilution					
Staphylococcus aureus	16±0.32	32±0.75	-	7	8	9 ±0.57	20		24	18	19
Bacillus cereus	32±0.26	32±0.45	-	7	7	8±0.43	29		15	15	16
Salmonella typhi	64±0.54	64±0.52	-	-	8	9±0.55	23	9			
Escherichia coli	64±0.55	64±0.42	-	-	7	9±0.45			10		

[a] Results are presented as mean ±standard deviation from the experiments in triplicate. The diameter of the disc was 6 mm.

به منظور بررسی اثر زمان تیمار کاهو با اسانس روغنی افسنطین، غلظت این اسانس و اثر همزمان این دو متغیر بر روی رشد باکتری‌های بیماری‌زای 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 معنی‌داری بر رشد *باسیلوس سرئوس* و *اشرشیاکلی* ($p\text{-value} \leq 0,05$) دارد. همچنین براساس نتایج، زمان تاثیر معنی‌داری بر رشد *استافیلوکوس اورئوس* و *سالمونلا تایفی* نداشته ($p\text{-value} \geq 0,05$) اما غلظت اسانس و اثر همزمان غلظت و زمان تاثیر معنی‌داری ($p\text{-value} \leq 0,05$) بر رشد این دو باکتری داشته است. همانطور که در شکل 2 نشان داده می‌شود در مقایسه با کنترل (آب)، کاهوی تیمار شده با اسانس روغنی 64 µl/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. بنابراین این اسانس بر روی گرم مثبت‌ها اثر ضدمیکروبی بیشتری نسبت به گرم منفی‌ها داشته است.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-01-02]
[DOI: 10.29252/fsct.17.01.08]

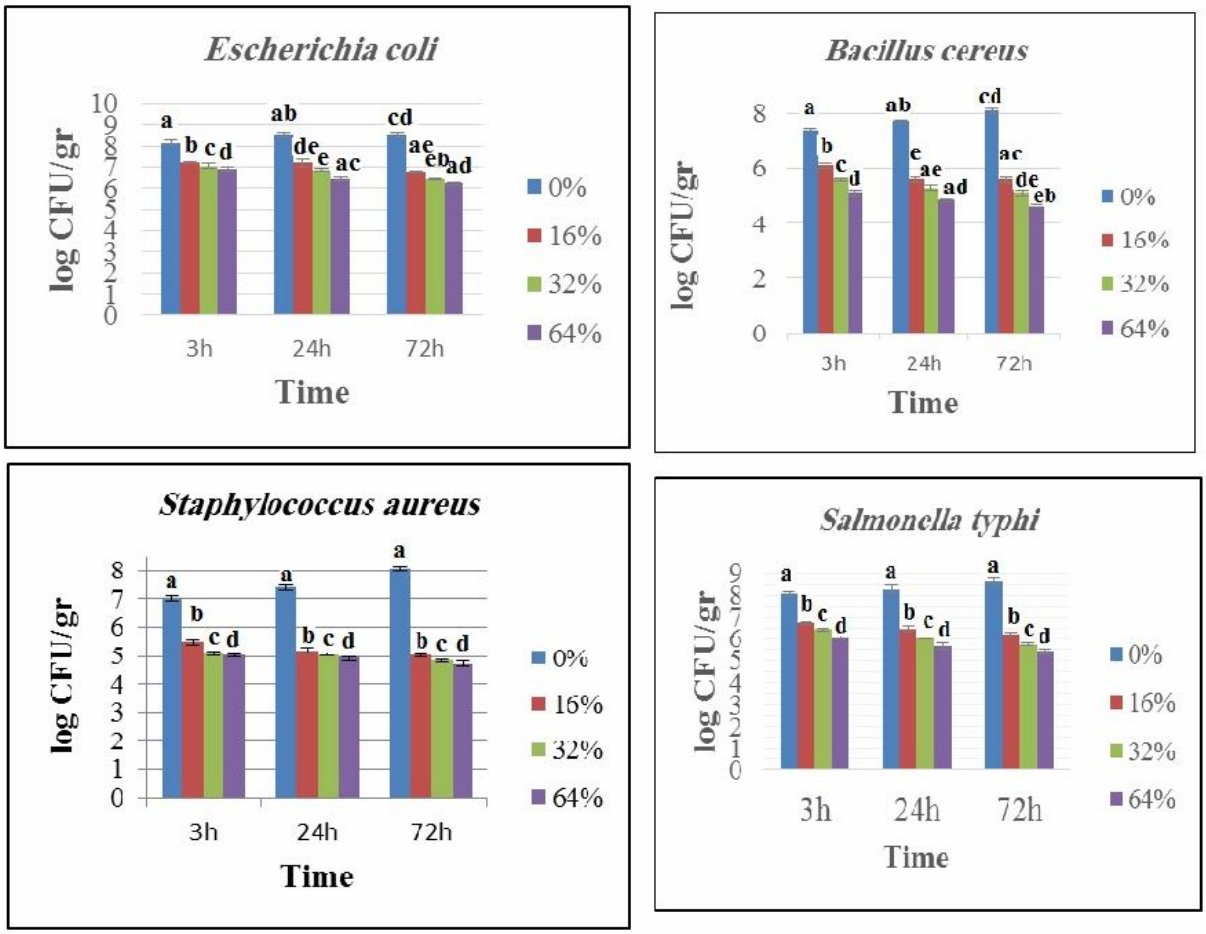

Fig 2 Effect of Artemisia absinthium oil concentrations ant time on the reduction of *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* at 3 h, 24 h, and 72 h after the treatment. Error bars represent standard error of the mean. Columns having common letters are not significantly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

4- تفسیر و تحلیل

اسانس‌های روغنی حاوی گروهی از ترکیبات با فعالیت ضد میکروبی می باشند. این ترکیبات شامل ترپن‌ها، ترپنوئیدها، فنیل پروپن‌ها، کارواکرول و تیمول می باشند. فعالیت ضد میکروبی اسانس‌ها می‌تواند به عملکرد ترکیبات هیدروفوبیکی (آبگریز) آن‌ها علیه غشاء سلولی میکروارگانیسم ها نسبت داده شود [۲،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].

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،۲۵،۲۴]. اما ترپن ها به تنهایی به عنوان عامل ضد میکروبی نمی‌توانند عمل کنند. در این مطالعه آنالیز شمیایی روغنی افسنطین 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

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-01-02]
[DOI: 10.29252/fsct.17.01.08]

استروایزومریک[1] 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، سابینن، لیمونن، ترپینن 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(+)- سابینن، δ -3-کارن[2]، α -ترپینن، β- پینن، لیمونن و α -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 β- پینن، α- پینن، لیمونن، پی- سایمن، γ- ترپینن، β- مایرسن، β- کاریوفیلن[3] علیه *اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس* فعالیت ضد میکروبی آشکاری نشان ندادند [29] و رائو و همکاران (2010) نشان دادند که پی- سایمن و γ- ترپینن 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 پپتیدوگلیکان دیواره سلول‌های گرم منفی نظیر *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 پپتیدوگلیکان می‌باشد [۳۲،۳۳،۳٤،۳۵]. محققان ثابت کرده‌اند که افزایش ضخامت لایه پپتیدوگلیکانی 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 *اشرشیاکلی* دارای مقاومت بالایی نسبت به ترکیب اسانس های 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 *اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب مقاومترین و حساس‌ترین باکتری‌های مورد مطالعه ما به اسانس روغنی افسنطین بودند.

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

براساس مطالعات انجام شده دردنیا 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 غلظت بالای اسانس افسنطین در کاهش بار میکروبی تلقیح شده به کاهو قابل توجه بود. مشابه نتایج ما، بهارگاوا و همکاران در سال 2015 در مطالعه خود بر روی تاثیر نانوامولسیون روغنی پونه کوهی در کاهش بار میکروبی کاهو نشان دادند که این نانوامولسیون 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 مونوسیتوژنز، 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

1. Steroisomeric
2. δ-3-carene
3. β- caryophyllene

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-01-02]

[DOI: 10.29252/fsct.17.01.08]

کلـرین آزاد (5 ppm)، سـینام آلدئیـد (800ppm -1000) بـه تنهایی و همراه با اسید اسـتیک (200ppm) علیـه *اشرشـیاکلی* و سالمونلا انجام دادند. آن‌ها نـشان دادنـد اسـانس روغنـی (سـینام آلدئید) در فعالیت ضدمیکروبی قابل رقابت با محلول کلرین است [39]. همچنین داسیلوا و همکـاران (2012) در تحقیقـی فعالیـت ضدمیکروبی اسانس روغنـی پونـه کـوهی (غنـی از کـارواکرول، پی- سایمن، γ- ترپینن) (v/v) 0,2% 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 ضـدمیکروبی اسـانس افـسنطین در کـاهش بـار میکروبی کاهو (محیط غذایی) قابل توجـه بـود و مـی‌تـوان آن را جایگزین خوبی برای ضدعفونی کننده‌هـای شـیمیایی سـبزیجات دانست البته به دلیل ماهیت هیدروفوبی اسانس افسنطین بهتر است جهت تقویـت فعالیـت ضـد باکتریـایی ایـن اسـانس در کـاهش بارمیکروبی سبزیجاتی نظیر کـاهو آن را بـه شـکل نانوامولـسیون بررسـی کـرد. البتـه بـر اسـاس نتـایج مـا در بررسـی فعالیـت ضدمیکروبی اسانس افسنطین در محیط کشت (محیط غیر غذایی) و مطالعات سایر محققین نبایـد انتظـار داشـت اسـانس افـسنطین دارای فعالیت ضد باکتریایی قوی باشد و چـون ترکیـب اصـلی و غالب این اسانس بتا- اسـیمن اکـساید مـی‌باشـد کـه در گذشـته 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 ضدمیکروبی اسانس افسنطین در محیط کشت آزمایشگاهی نسبت به کاهو می‌توان بـه تقویت رشد باکتری‌ها در محیط مغذی محـیط کـشت نـسبت بـه سبزیجات با ارزش غذایی پایین دانست که همـین حـضور مـواد مغذی، باکتری را نسبت به تنش‌های محیطی نظیر اسـانس مقـاوم می‌کند.

6- منابع

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

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-01-02]

[DOI: 10.29252/fsct.17.01.08]

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 β-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

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-01-02]

[DOI: 10.29252/fsct.17.01.08]

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*

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-01-02]

[DOI: 10.29252/fsct.17.01.08]

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

Davati, N. [1*], Ali Mirzaei, S. [2]

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.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-01-02]

[DOI: 10.29252/fsct.17.01.08]

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