

مطالعه تأثیر روغنهای فرار برخی گیاهان (پونه، نعناع، ترخان، زیره و آویشن) بر روی باکتریهای *E. coli* و *S. aureus* در محیط کشت مایع

دکتر مجتبی بنیادیان^۱ دکتر گیتی کریم^۱

Study of the effects of some volatile oils of herbs (pennyroyal, peppermint, tarragon, caraway seed and Thyme) against *E. coli* and *S. aureus* in broth media

Bonyadian, M.,^۱ Karim, G.^۱

^۱Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran - Iran.

Objective: To evaluate the effectiveness of some plant essential oils on *E. coli* and *S. aureus*.

Design: Interventional study and obtain the effective concentration of each essential oils.

Materials: Essential oils of Pennyroyal (*Mentha pullegium*), Peppermint (*Mentha piperita*), Tarragon (*Artemisia dracunculus*), Caraway seed (*Carum carvi*) and Thyme (*Thymus vulgaris*). *E. coli* k12: Department of microbiology university of Bristol. *S. aureus* RTcc 1907: Razi Institute.

Procedure: 1- Induce the various concentration of each essential oils in broth medium. 2- In tradition of 106 bacterial of medium. 3- Incubate over night at 37°C. 4- Check the tubes for growth of bacteria. 5- Subculture in agar medium and incubate over night at 37°C. 6- Check the plate for bacterial colonies.

Results: The results showed that the volatile oils of the thyme was the most effective oil, thus the MIC and MBC of this oil on *E. coli* were 0.1%, 0.15% and on *S. aureus* were 0.05%, 0.1% respectively. The oils of peppermint, pennyroyal and caraway seed had moderate effect while the volatile oils of Tarragon had the minimum effect on tested-bacteria.

Implication: As the results showed, all of the essential oils have antimicrobial activity, thus it is possible that use these oils as a natural flavouring and preservative in foods. *J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran. 57, 4: 81-83, 2002.*

Key words: Volatile oils, Thyme, Peppermint, Pennyroyal, Caraway seed, Tarragon, *E. coli*, *S. aureus*.

هدف: تعیین حداقل غلظت مهار کننده و حداقل غلظت کشنده روغنهای فرار گیاهان مورد استفاده برای باکتریهای *E. coli* و *S. aureus*.
طرح: مطالعه مداخله‌ای و به دست آوردن غلظتهای مؤثر روغنهای فرار گیاهان.

مواد: روغنهای فرار گیاهان پونه (*Mentha pullegium*) نعناع (*Mentha piperita*) ترخان (*Artemisia dracunculus*) زیره سیاه (*Carum carvi*) و آویشن (*Thymus vulgaris*). باکتری *E. coli* k12 (تهیه شده از دپارتمان میکروبیولوژی دانشگاه بریستول - انگلستان). باکتری *S. aureus* (تهیه شده از مؤسسه رازی RTcc 1907) محیط کشت آبگوشت مغذی و آگار مغذی ساخت مرک.

روش: ۱- ایجاد غلظتهای مختلف روغنهای فرار گیاهان در محیط آبگوشت مغذی. ۲- تلقیح ۱۰^۶ باکتری در هر میلی لیتر محیط. ۳- گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد برای مدت ۲۴ ساعت. ۴- مشاهده لوله‌های محیط کشت از نظر رشد باکتری. ۵- کشت از لوله‌ها بر روی محیط آگار مغذی. ۶- بررسی پلیت‌ها پس از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه از نظر کلنی باکتری.

نتایج: نتایج این مطالعه نشانگر این بود که بیشترین تأثیر را روغنهای فرار آویشن بر روی این دو باکتری داراست به طوری که حداقل غلظت مهار کننده عصاره این گیاه برای باکتریهای *E. coli*, *S. aureus* به ترتیب برابر ۰/۱ و ۰/۰۵ درصد بود. همچنین حداقل غلظت کشنده روغن فرار آویشن بر روی دو باکتری *E. coli*, *S. aureus* به ترتیب برابر ۰/۱۵ و ۰/۱ درصد می‌باشد. کمترین اثر در ارتباط با گیاه ترخان مشاهده شد به نحوی که حداقل غلظت مهار کننده روغن فرار این گیاه بر روی دو باکتری *E. coli*, *S. aureus* به ترتیب برابر ۴ و ۵ درصد بود. روغنهای فرار گیاهان نعناع، پونه و زیره تأثیر متوسطی بر روی باکتریهای مورد مطالعه از خود نشان دادند.

نتیجه گیری: براساس نتایج به دست آمده روغنهای فرار گیاهان مورد استفاده اثر ضد میکروبی قابل قبولی از خود نشان دادند بنابراین امکان اینکه بتوان از آنها به عنوان یک نگهدارنده و یک طعم دهنده طبیعی در مواد غذایی استفاده کرد وجود خواهد داشت. *مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، (۱۳۸۱)، دوره ۵۷، شماره ۴، ۸۳-۸۱.*

واژه‌های کلیدی: روغنهای فرار، پونه، نعناع، آویشن، ترخان، زیره، اشریشیا کلی، استافیلوکوک آرتوس.

پژوهشهای متعدد اثرات مضر مواد نگهدارنده شیمیایی از قبیل نیتريت، نترات و را به اثبات رسانیده‌اند (۷) و امروز در بسیاری از کشورها تمایل به استفاده از مواد غذایی که فاقد ترکیبات شیمیایی نگهدارنده می‌باشند به طور چشمگیری افزایش یافته است.

مطالعات متعدد خاصیت ضد میکروبی برخی از گیاهان از قبیل سیر، مریم گلی، زنجبیل، اکلیل کوهی و فلفل شیرین را به اثبات رسانیده است (۱۰، ۶).

در مطالعه حاضر از روغنهای فرار گیاهانی استفاده شده است که مردم ایران به طور سنتی از آنها در مواد غذایی بخصوص فرآورده‌های شیر استفاده می‌کرده‌اند و ذائقه مردم به خوبی با این گیاهان سازگار می‌باشند.

بنابراین در صورتی که این گیاهان از خواص ضد میکروبی مناسبی برخوردار باشند می‌توان از روغنهای فرار آنها هم برای ایجاد طعم

مناسب و هم به عنوان یک ماده نگهدارنده طبیعی در مواد غذایی استفاده کرد و به میزان زیادی از بروز عوارض ناشی از مصرف غذاهای حاوی مواد نگهدارنده شیمیایی جلوگیری نمود.

مواد و روش کار

۱- روغنهای فرار گیاهان مورد مطالعه: در این مطالعه از روغنهای فرار گیاهان پونه، نعناع، ترخان، آویشن و زیره استفاده شد. این روغنها، توسط پژوهشکده گیاهان دارویی وابسته به جهاد دانشگاهی به روش تقطیر با بخار به مدت ۴۸ ساعت تهیه و مورد استفاده قرار گرفت. این روغنها فاقد هرگونه آلودگی میکروبی بوده و تا زمان انجام آزمونها در دمای صفر تا ۴ درجه سانتیگراد و دور از نور نگهداری شدند.

۲- باکتریهای مورد مطالعه: به منظور بررسی اثر ضد میکروبی روغنهای گیاهان مورد استفاده دو باکتری *E. coli* و *S. aureus*

(۱) گروه آموزشی بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.



جدول ۲- تأثیر روغنهای فرار گیاهان بر روی باکتری *S. aureus* (10^6 / ml).

عصاره	اثر	میانگین MIC%	میانگین MBC%
نعناع		۰/۳	۰/۴
پونه		۰/۱	۰/۳
زیره		۰/۱	۰/۲
آویشن		۰/۰۵	۰/۱
ترخان		۵	۷

نوبت تکرار گردید.

نتایج

انجام آزمونها در سه تکرار برای هر یک از روغنهای فرار نتایج یکسانی را به همراه داشت، به طوری که حداقل غلظت ممانعت کننده بر روی باکتری *E. coli* برای روغنهای فرار گیاهان نعناع ۰/۳ درصد، پونه ۰/۴ درصد، زیره ۰/۱ درصد، آویشن ۰/۱ درصد و گیاه ترخان ۴ درصد بود (جدول ۱).

حداقل غلظت کشنده برای باکتری *E. coli* برای روغنهای فرار گیاهان نعناع ۰/۵ درصد، پونه ۰/۵ درصد، زیره ۰/۵ درصد، آویشن ۰/۱۵ درصد و گیاه ترخان ۵ درصد بود (جدول ۱).

انجام آزمونها بر روی باکتری *S. aureus* برای تعیین حداقل غلظت مهار کننده و حداقل غلظت کشنده باکتریایی روغنهای فرار گیاهان نشانگر این بود که در مجموع حساسیت این باکتری به روغنهای فرار گیاهان بیشتر از باکتری *E. coli* می باشد، به طوری که حداقل غلظت مهار کننده این باکتری برای روغنهای فرار گیاهان نعناع ۰/۳ درصد، پونه ۰/۱ درصد، زیره ۰/۱ درصد، آویشن ۰/۰۵ درصد و برای گیاه ترخان ۵ درصد بود (جدول ۲).

حداقل غلظت کشنده باکتری *S. aureus* برای روغنهای فرار گیاهان نعناع ۰/۴ درصد، پونه ۰/۳ درصد، زیره ۰/۲ درصد، آویشن ۰/۱ درصد و گیاه ترخان ۷ درصد بود (جدول ۲).

همان گونه که نتایج آزمون نشان می دهد مؤثرترین روغن فرار مربوط به گیاه آویشن و کمترین اثر مربوط به گیاه ترخان است. در مجموع حساسیت باکتری *S. aureus* نسبت به باکتری *E. coli* به روغنهای فرار گیاهان مورد مطالعه بیشتر می باشد.

بحث

نتایج این مطالعه نشانگر تأثیر روغنهای فرار گیاهان پونه، نعناع، زیره، آویشن و ترخان، می باشد، ولی این اثر بسته به نوع گیاه متفاوت است. به طوری که در این مطالعه بیشترین اثر را عصاره گیاه آویشن از خود نشان داد، در مطالعه ای که توسط Farag در سال ۱۹۸۹ انجام شد (۴)، بیشترین اثر را عصاره گیاه آویشن بر روی باکتریهای *پسود* و *موناس*، *سراتیا*، *اشریشیاکلی*، *سارسینا*، *استافیلوکوک آرسوس*، *باسیلوس سوبتیلیس* نشان داد، و گیاهان *مریم گلی*، *اکلیل کوهی* اثر کمتری از خود نشان دادند. این مطالعه نیز نشانگر این نکته بود که روغنهای فرار این گیاهان بر روی باکتریهای گرم مثبت تأثیر بیشتری نسبت به باکتریهای گرم منفی دارا می باشند.

در مطالعه دیگری که توسط Farag در سال ۱۹۸۸ انجام شد از روغنهای فرار گیاه آویشن به عنوان ماده نگهدارنده طبیعی در کره استفاده شد، این مطالعه نشانگر این بود که ۲۰۰ ppm از عصاره این گیاه می تواند از بروز فساد میکروبی و شیمیایی در این فرآورده جلوگیری نماید (۵).

جدول ۱- تأثیر روغنهای فرار بر روی باکتری *E. coli* (10^6 / ml).

عصاره	اثر	میانگین MIC%	میانگین MBC%
نعناع		۰/۳	۰/۵
پونه		۰/۴	۰/۵
زیره		۰/۴	۰/۵
آویشن		۰/۱	۰/۱۵
ترخان		۴	۵

انتخاب گردید این باکتریها جزء عوامل شایع عفونتها و مسمومیت های غذایی محسوب می شوند (۹، ۱) و به همین دلیل مطالعه بر روی این دو باکتری صورت گرفت. موارد متعددی از بروز عفونتها و مسمومیت های غذایی توسط این دو باکتری در غذاهای فرآوری شده از قبیل فرآورده های شیر، گوشت و حتی سبزیجات کنسرو شده گزارش گردیده است (۹، ۷). به منظور انجام آزمون تعداد 10^6 باکتری در هر میلی لیتر از باکتریهای فوق مورد استفاده قرار گرفت. جهت تعیین این تعداد باکتری، ابتدا هر کدام از باکتریها را دو نوبت متوالی به فواصل ۲۴ و ۲۰ ساعت در محیط آبگوشت مغذی و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد کشت داده و سپس از کشت ۲۰ ساعته به روش کشت بر روی پلیت تعداد باکتری را در هر میلی لیتر محیط محاسبه نموده و سپس با تهیه رقت از کشت ۲۰ ساعته هر کدام از باکتریها مقدار مورد نیاز باکتری (10^6 / ml) را به دست آورده و مورد استفاده قرار گرفت.

لازم به ذکر است که در هر نوبت آزمون تعداد باکتری در کشت ۲۰ ساعته به روش کشت روی محیط پلیت مورد شمارش قرار می گرفت.

۳- تعیین ("MIC" Minimum Inhibitory Concentration)، ("MBC" Minimum Bacteriocidal Concentration) روغنهای فرار بر روی باکتریهای مورد مطالعه: برای تعیین حداقل غلظت مهار کننده و حداقل غلظت کشنده هر یک از روغنهای فرار گیاهان از روش کشت در لوله حاوی محیط آبگوشت مغذی (۲) استفاده شد، بدین ترتیب که در تعدادی لوله حاوی یک میلی لیتر آبگوشت مغذی استریل رفتهای مختلف روغن فرار به ترتیب از ۰/۰۵ درصد تا ۲۰ درصد، با استفاده از پیپت سمپلر به دست آمده سپس از رقت تهیه شده از باکتریهای کشت داده شده بر روی آبگوشت مغذی که تعداد باکتری در هر یک میلی لیتر آن تعیین شده به لولهها اضافه کرده تا در یک میلی لیتر از محیط لوله 10^6 باکتری وجود داشته باشد. لازم به ذکر است که یک لوله نیز به عنوان شاهد در هر نوبت منظور گردید که فاقد عصاره بوده و به همان تعداد باکتری (10^6 در هر میلی لیتر) در آن تلقیح شد، لولهها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شده و سپس مورد مشاهده قرار گرفته و از سمت لوله شاهد کدورت لولهها مورد بررسی قرار گرفته و غلظت اولین لوله ای که فاقد کدورت بود به عنوان حداقل غلظت ممانعت کننده منظور گردید.

برای تعیین حداقل غلظت کشنده روغنها از اولین لوله فاقد کدورت به بعد ۰/۱ میلی لیتر برداشت کرده و به روش سطحی بر روی محیط آگار مغذی کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری شده و سپس از نظر رشد باکتری مورد بررسی قرار گرفت، مقدار عصاره اولین پلتي که باکتری بر روی آن رشد نکرده بود به عنوان حداقل غلظت کشنده باکتریایی عصاره منظور گردید. آزمایشات برای هر یک از روغنهای فرار در سه



References

۱. رضویلی، و. (۱۳۷۸): میکروبهای بیماریزا در مواد غذایی. انتشارات دانشگاه تهران.
 2. Baron, E.J (1990): Diagnostic Microbiology, 8th ed., 176-178. Mosby Company
 3. Beuchat, L.R (1976): Sensitivity of *Vibrio parahemolyticus* to spice and organic acids. Journal of Food Science, Vol 41, 899-902.
 4. Farag, R.S. (1989): Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. Journal of Food Protection, Vol 52, 665-668.
 5. Farag, R.S. and Ali, M.N. (1988): Use of some essential oils as natural preservative for butter. Grasas-Y-Aceites, 39, 1: 28-31.
 6. Shelef, L.A., Naglin, O.A. and Bogen, D.W. (1980): Sensitivity of some common Food borne bacteria to the spices sage, Rosmary and Allspice. Journal of Food Science, Vol 45, 737-741.
 7. Shibamoto, T. (1998): Introduction to Food toxicology. 2th ed., 203-4. Sanders.
 8. Sunen, E. (1998): Minimum inhibitory concentration of smoke wood extract against spoilage and pathogenic microorganisms associated with foods. The Society for Applied Microbiology, 27: 45-48.
 9. Varnam, A.H. (1991): Food Borne Pathogen. 101-4 Wolf publishing Ltd.
 10. Won-Dae-Ji, Min-Seon-Jeon (1997): Antimicrobial activity and distilled components of Garlic and Ginger. Agricultural Chemistry and Biotechnology, 40, 6: 514-518.
- Sunen در سال ۱۹۹۸ نیز در مطالعه‌ای حداقل غلظت ممانعت کننده عصاره برخی از گیاهان مصرفی در غذاهای اسپانیایی را بر روی باکتری‌هایی از قبیل *S. typhimurium*, *B. cereus*, *S. aureus* و *Y. enterocolitica*. *V. vulnificus* مورد بررسی قرار داد، نتایج این مطالعه نشانگر این بود که غلظت بین ۰/۲ تا ۰/۸ درصد این عصاره‌ها از رشد باکتری‌ها جلوگیری می‌کند (۸).
- در مطالعه حاضر به استثنای روغنهای فرار گیاه ترخان سایر روغنهای فرار در غلظت بین ۰/۱ تا ۰/۴ درصد قادر بودند از رشد باکتری‌های مورد مطالعه جلوگیری نمایند.
- نتایج تأثیر عصاره پونه نیز در مطالعه‌ای که توسط Beuchat در سال ۱۹۷۶ بر روی باکتری *V. parahemolyticus* صورت گرفت نشان داد که این عصاره در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر قادر است از رشد باکتری جلوگیری نماید (۳). در سایر کشورها مطالعات زیادی بر روی گیاهانی مانند سیر، زنجبیل، مریم گلی، اکلیل کوهی و آویشن که با ذائقه مردم کشورشان مطابقت دارد صورت گرفته است، اما تاکنون در کشور ایران مطالعه جامع بر روی گیاهان بومی که با ذائقه مردم ایران سازگار باشد صورت نگرفته است، گیاهانی مانند، زیره، ترخان، پونه، نعناع و آویشن از جمله این گیاهان می‌باشند که مردم ایران از زمانهای قدیم در انواع مواد غذایی بخصوص فرآورده‌های شیر مورد استفاده قرار داده‌اند، بنابراین با توجه به اینکه روغنهای فرار این گیاهان خاصیت ضد میکروبی داشته و علاوه بر این باعث ایجاد طعم مناسب در فرآورده‌های غذایی می‌شوند شاید بتوان از آنها برای تولید انواع مواد غذایی معطر استفاده کرد و علاوه بر این مدت زمان ماندگاری ماده غذایی را افزایش داد و از طرف دیگر خطر انتقال اجرام بیماریزا را به افراد مصرف کننده به حداقل رساند، بدون اینکه هیچ‌گونه مخاطره‌ای در مقایسه با مواد نگهدارنده شیمیایی افراد مصرف کننده را تهدید نماید.



