بررسی خواص ضدمیکروبی اسانس زنیان (*Carum copticum*) علیه تعدادی از باکتری های بیماری زای با منشاء غذایی

زهرا ینـاهی[1]، محمد محسن زاده[2]، رویا رضائیان دلویی[3]

1- گروه بهداشت مواد غذایی و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد ایران
2- دانشیار، گروه بهداشت مواد غذایی و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
3- استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

خلاصه

گیاه زنیان با نام علمی *Trachyspermum ammi* گیاهی علفی و از خانواده چتریان می باشد که به نام *Carum copticum* هم معروف است. این گیاه منبع غنی از مونوترپن ها مثل تیمول است که دارای خاصیت ضدباکتریایی خوبی می باشد. به همین دلیل امروزه در صنایع غذایی از اسانس های گیاهی از جمله زنیان بعنوان نگهدارنده های طبیعی استفاده می کنند. این مطالعه باهدف ارزیابی خاصیت ضدمیکروبی اسانس زنیان علیه تعدادی از باکتری های بیماریزای با منشأ غذایی صورت گرفت. خاصیت ضدمیکروبی اسانس زنیان در غلظت های 0/16 -40 mg/ml علیه دونوع باکتری گرم مثبت و چهارنوع باکتری گرم منفی با استفاده از روش میکروبراث دایلوشن بررسی گردید. نتایج حاصل از آنالیز اسانس نشان دادکه بیشترین ترکیب تشکیل دهنده اسانس تیمول (57%/18) می باشد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که اسانس زنیان دارای بیشترین اثر بازدارندگی بر روی باکتریهای گرم مثبت شامل *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس* به ترتیب 1/25mg/ml و 2/5 mg/ml می باشد. بنابراین می توان نتیجه گرفت که می توان از این اسانس بعنوان نگهدارنده طبیعی، جایگزین نگهدارنده های شیمیایی پرخطر استفاده کرد.

کلمات کلیدي: حداقل غلظت بازدارندگی، حداقل غلظت کشندگی، خاصیت ضد میکروبی، گیاه زنیان

1. مقدمه

ماده غذایی می تواند از طریق واکنشهاي شیمیایی، میکروبیولوژیکی و آسیب هاي فیزیکی فاسد شود. با این وجود، علت اصلی فساد غذا رشد و متابولیسم میکروبی است که منجر به تشکیل ترکیباتی با بوي نا مطلوب و نا

Corresponding author:
* Email: mohsenzadeh@um.ac.ir

خوشایند می شود. بیماري ناشی از مصرف غذاهاي آلوده شده با باکتریهاي پاتوژن موجب نگرانی مهم در سلامت عمومی شده است. به نظر می رسد جهت کاهش موارد تهدید کننده سلامتی استفاده ازفرآورده هاي طبیعی مثل ترکیبهاي ضد میکروبی گیاهی راه مناسبی براي کنترل باکتري هاي پاتوژن و توسعه زمان ماندگاري غذاهاي فرآوري شده باشد[1]. از طرفی گروهی از مصرف کنندگان خواهان استفاده از غذاهاي طبیعی، بدون افزودنیهاي شیمیایی، به لحاظ میکروبی سالم و نیز بسته بندي شده در مواد مناسب به لحاظ زیست محیطی می باشند. براي برآورده کردن این خواسته یکی از چالش هاي بزرگ در صنایع غذایی کاهش افزودنی هاي شیمیایی رایج و استفاده از ترکیب هاي طبیعی در فرمولاسیون غذا است[2]. اسانس هاي گیاهی ازجمله ترکیب هاي طبیعی هستند که خواص ضد میکروبی آنها توسط محققین مختلف به اثبات رسیده است[4,3]. آن ها می توانند به عنوان یک منبع خوب از عوامل ضد میکروبی در برابر پاتوژن هاي غذا به کار گرفته شوند. اسانس هاي گیاهی و ترکیب هاي موثر آن ها در برابر انواع گسترده اي از میکروارگانیسم ها شامل باکتري هاي گرم منفی و گرم مثبت فعال شناخته شده اند.

زنیان با نام علمی *Trachyspermum ammi* گیاهی علفی، یکساله و متعلق به خانواده چتریان می باشد. این گیاه بطور خودرو در نواحی شرقی هند، ایران و مصر می روید و به نام *Carum copticum* هم معروف است. عصاره میوه این گیاه بصورت پماد در التیام درد به کار مي رود[5]. میوه (بذر) گیاه زنیان داراي اسانس است. بیشترین میزان اسانس گیاه در بذر آن وجود دارد و مقدار آن با توجه به خصوصیات ژنتیکي و محیطي بین 2% تا 5 %متغیر است. اهمیت گیاه زنیان به علت اسانس و ترکیب های موجود در اسانس آن است. از ترکیب هاي عمده اسانس این گیاه، تیمول، ترپینن، فلاندرن، گروه پینن، گروه سیمن و میرسن هستند که عمدتاً ازمنوترپن هاي اکسیژنه مي باشند[6].

امروزه یکی از معضلات بهداشتی افزایش بیماری هایی است که در اثر مصرف آب و غذای آلوده به باکتری های پاتوژن و یا توکسین های آنها ایجاد می شوند. عمده باکتری هایی که از طریق مواد غذایی منتقل می شوند شامل: *سالمونلا، لیستریا، اشریشیا کلی، سودوموناس، استاف و باسیلوس ها* هستند. *سالمونلا تایفی موریوم* یک باسیل گرم منفی بوده و باعث بروز سالمونلای غیر حصبه ای یا همان مسمومیت غذایی می شود. این باکتری توانایی زنده ماندن در مواد غذایی بمدت طولانی را دارد و متداول ترین باکتری جداشده از مواد غذایی می باشد[7]. *استافیلوکوکوس اورئوس* یک کوکسی گرم مثبت است و باعث طیف وسیعی از بیماری ها در انسان و حیوان می شود. مسمومیت غذایی استافیلوکوکی از مهمترین مسمومیت های غذایی بشمار می رود که در اثر خوردن غذای حاوی انتروتوکسین این باکتری ایجاد می گردد[8]. *باسیلوس سرئوس* باکتری گرم مثبت و اسپورزا است که تولید انتروتوکسین کرده و ایجاد دونوع مسمومیت تهوع آور و اسهال آور می کند و با داشتن فعالیت پروتئولیتیکی، لیپولیتیک و آمیلولیتیک یکی از عوامل ایجاد فساد مواد غذایی نیز به شمار می رود[9]. *سودوموناس آئروجینوزا* باکتری گرم منفی و از شایع ترین عوامل بیماریزای انسانی در بین گونه های *سودوموناس* است. راه اصلی انتقال این باکتری به انسان از طریق مصرف غذاهای آلوده است[10].

با توجه به مطالب بیان شده و حضور باکتری های بیماریزا در مواد غذایی و ایجاد عفونت و مسمویت های غذایی در انسان و همچنین مضرات و خطرات استفاده از نگهدارنده های شیمایی، این تحقیق به منظور بررسی اثر ضد میکروبی اسانس زنیان علیه باکتری های پاتوژن غذایی و استفاده از آن بعنوان یک ترکیب ضدمیکروبی طبیعی در مواد غذایی صورت گرفته است.

2.پیشینه پژوهش

تحقيقات زيادي براي جايگزيني افزودني هاي شيميايي با تركيبات ضد ميكروبي طبيعي صورت گرفته شده است.اغلب اين مطالعات در محيط كشت آزمايشگاهي انجام گرفته شده است و تعداد محدودي در مدل غذايي واقعي صورت پذيرفته است. اغلب تركيبات طبيعي كه براي ايجاد يک طعم مناسب، به غذا اضافه مي شوند، داراي اثرات كنترلي بر روي رشد ميكروبي مي باشند. يک دسته مهم از تركيبات طبيعي، عصاره، اسانس، هيدروسل و ساير تركيبات گياهي خوراكي و پزشكي است. امروزه نشان داده شده كه عصاره و اسانس هاي گياهان، داراي اثرات مهاري عليه طيف وسيعي از ميكروارگانيسم ها مي باشند[11]. تركيبات ضد ميكروبي گياهي و مكانيسم عمل آنها به طور وسيعي مورد بررسی قرار گرفته است. ولی با توجه به اینکه این ترکیبات دارای مواد شیمیایی مختلفی هستند، لذا بیان یک مکانیسم مشخص و واحد براي عمل ضد ميكروبي اين تركيبات امكان پذير نمي باشد [12].

گودرزی و همکاران (2010) فعالیت ضدیکروبی ترکیبات شیمایی اسانس زنیان را با استفاده از روش رقیق سازی در براث و انتشار در آگار بررسی کردند که نتایج بیانگر این بود که این اسانس می تواند به عنوان یک ماده ضدمیکروبی طبیعی در صنایع غذایی و دارویی مورد استفاده قرار بگیرد[13].

شهابی و همکاران (1387) بررسی اثر کشندگی عصاره و اسانس گیاه زنیان را بر روی کیست *ژیاردیا لامبلیا* انجام دادند، نتیجه بررسی نشان داد اسانس زنیان در محیط آزمایشگاه دارای اثرکشندگی بر روی کیست *ژیاردیا لامبلیا* بود[14].

شفقت و همکاران (1393) اثر ضدباکتریایی عصاره زنیان را در برابر دوباکتری گرم منفی *کلبسیلا* و *اشریشیاکلی* و دو باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* و *پنوموک* بررسی کردند که نتایج نشان داد اسانس زنیان دارای عوامل ضدباکتریایی موثری برروی باکتری های ذکر شده می باشد[15]

ربیعی و همکاران(1392) اثر بازدارندگی زنیان را بررشد *لیستریا مونوسیتوژنز* در محیط عصاره و گوشت ماهی سفید دریای خزر بررسی کردند ک نتایج حاکی از آن بود که این اسانس بطور معناداری از رشد باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* جلوگیری می کند و این تأثیر در محیط عصاره ی ماهی سفید در مقایسه با گوشت ماهی سفید چشمگیرتر بود[16].

3. روش پژوهش

اسانس زنیان از شرکت جوهره طعم شرق مشهد تهیه گردید. به منظور شناسایی ترکیبات تشکیل دهنده اسانس از دستگاه گاز کروکاتوگرافی متصل به طیف سنج جرمی (GC-MS) استفاده گردید.
باکتری های *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 25923)، *اشریشیاکولی* (ATCC 25922)، *باسیلوس سرئوس* (ATCC 10876)، *سالمونلا تایفی موریوم* (ATCC 14028)، *سودوموناس ائروجینوز* (NCTC 9027) از کلکسیون میکروبی گروه بهداشت مواد غذایی و آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شدند. سویه های مورد نظر روی ظروف پتری حاوی آگار مغذی کشت داده شد و به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری گردید. سپس از پرگنه های تازه رشد کرده سوسپانسیونی معادل نیم مک فارلند ($1/5\times10^8$ CFU/ml)، تهیه شد.
از روش میکروبراث دایلوشن برای تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده رشد (MIC) استفاده گردید. ابتدا غلظتی معادل استاندارد نیم مک فارلند ($1/5\times10^8$ CFU/ml)، از باکتری تهیه و سپس تا غلظت 10^6 CFU/ml رقیق گردید. از میکروپلیت های 96 خانه ای الایزا استفاده گردید. اسانس زنیان در غلظت های 0/16 -40 mg/ml با استفاده از دی متیل سولفوکساید تهیه شد. داخل هر چاهک میکروپلیت 160 میکرولیتر از BHI براث، 20 میکرولیتر از اسانس و 20 میکرولیتر از باکتری (جمعاً 200 میکرولیتر) اضافه گردید. کلیه آزمایشات در 3 تکرار انجام شد. برای هر تکرار یک چاهک به عنوان کنترل منفی (بدون افزودن باکتری) و یکی دیگر به عنوان کنترل مثبت (بدون افزودن اسانس) در نظر گرفته شد بعد از گرمخانه گذاری پلیت ها به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سلسیوس، حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) به روش چشمی و مشاهده کدورت و با کمک معرف تترازولیوم کلراید (2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride) تعیین گردید. برای تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC) از چاهک هایی که در آنها کدورت قابل مشاهده دیده نشد بر روی محیط کشت BHI آگار کشت داده شد. پلیت ها به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سلسیوس گرمخانه گذاری گردید. کمترین غلظتی که هیچ رشدی از باکتری در آن مشاهده نشد بعنوان حداقل غلظت کشندگی (MBC) در نظر گرفته شد[17].

4. تجزیه و تحلیل داده ها

ترکیبات اسانس زنیان توسط دستگاه گاز کروکاتوگرافی متصل به طیف سنج جرمی (GC-MS) آنالیز گردید . اجزای اصلی اسانس زنیان تیمول، پاراسایمن و گاماترپاینن می باشد.
نتایج حاصل از بررسی خواص ضدباکتریایی اسانس زنیان جهت تعیین MIC و MBC روی پنج باکتری مورد مطالعه در جدول شماره 2 آمده است.

جدول شماره 2. میزانMIC و MBC اسانس چویل برروی باکتری های مورد بررسی

میکروارگانیسم	MIC(mg/ml)	MBC(mg/ml)
اشریشیاکولی	2/5	5

سودوموناس ائروجینوزا	2/5	5
سالمونلا تایفی موریوم	2/5	5
باسلیوس سرئوس	1/25	2/5
استافیلوکوکوس اورئوس	1/25	2/5

5. بحث

امروزه بدلیل عوارض و خطرات استفاده از نگهدارنده های شیمیایی، استفاده از ترکیبات ضدمیکروبی از قبیل عصاره ها و اسانس های گیاهی امری ضروری تلقی می گردد. عمدتاً اجزای اصلی خواص بیولوژیکی اسانس را تعیین می کنند. اسانس ها عمدتا لیپوفیل هستند و براحتی از دیواره سلولی و غشای سیتوپلاسمی عبور می کنند و ساختار لایه های مختلف پلی ساکاریدی ، اسیدهای چرب و فسفولیپیدی باکتری هارا بهم می ریزند و موجب تخلیه ماکرومولکول ها و سرانجام مرگ سلول می شوند[18]. تحقیقات روی اسانس ها نشان داده است که اکثر اسانس ها دارای خاصیت ضدمیکروبی قوی تری روی باکتری های گرم مثبت هستند و دلیل آن را وجود دیواره لیپوپلی ساکاریدی باکتری های گرم منفی می دانند[10]. البته در برخی بررسی ها باکتری های گرم مثبت نیز مقاومت خوبی نشان داده اند. طبق تحقیق انجام شده اسانس زنیان دارای اثر ضدمیکروبی خوبی علیه هردو گروه باکتری گرم مثبت و گرم منفی است. عروج علیان و همکاران (2010) ترکیبات فیتوشیمیایی اسانسهای *Bunium persicum*،*Cuminum cyminum* ،*Carum copticum* و اثر ضد باکتریایی آنها بر روی باکتریهای *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس* و *اشرشیاکلی O157:H7* و *سالمونلا اینتریتیدیس* و *لیستریا مونوسیتوژنز* را مورد مطالعه قرار دادند. نتیجه تحقیق نشان داد که زنیان دارای بیشترین اثر بازدارندگی بر روی باکتریهای یاد شده می باشد[19]. کاووسی و همکاران (2013) اثر آنتی اکسیدانی و ضدمیکروبی اسانس های *Carum copticum* و *Ferula assafoetida latex* را بررسی کردند که نتایج نشان داد اسانس های مذکور نقش آنتی اکسیدانی و آنتی باکتریال ایفا می کنند[20]. در مطالعه ای که ربیعی و همکاران (2013) برروی اثر بازدارندگی اسانس زنیان بر رشد باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* در مدل عصاره و گوشت ماهی سفید دریای خزر انجام دادند، نتایج حاکی از آن بود که اسانس زنیان بطور معنی داری از رشد باکتری لیستریا مونوستوژنز جلوگیری کرد[21]. نتایج مطالعات انجام شده با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد و نشان دهنده خاصیت ضدمیکروبی بالای اسانس زنیان علیه پاتوژن های مواد غذایی می باشد. لذا استفاده از این اسانس به منظور ترکیب ضد باکتریایی و نگهدارنده مواد غذایی در صنایع غذایی توصیه می شود.

12. نتیجه‌گیری

طبق مطالعه حاضر اسانس گیاه زنیان دارای اثرات ضدمیکروبی خوبی علیه هردو گروه باکتری گرم مثبت و گرم منفی است به همین دلیل می توان از اسانس این گیاه بعنوان یک ماده ضدمیکروبی طبیعی در پوشش ها و فیلم های خوراکی به منظور افزایش مدت زمان نگهداری مواد غذایی استفاده کرد و همچنین توصیه می گردد در مدل های غذایی تحقیقات بیشتری روی این اسانس انجام گیرد.

12. مراجع

1. Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., Lacroix, M. (2007). Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: E. coli O157: H7, Salmonella typhimurium, Staphylococcus aureus and Listeria monocytogenes. *Food control*, *18*(5), 414-420.
2. Singh, A., Singh, R.K., Bhunia, A.K. and Singh, N., (2003). Efficacy of plant essential oils as antimicrobial agents against Listeria monocytogenes in hotdogs. *LWT-Food Science and Technology*, *36*(8), pp.787-794.
3. Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, *12*(4), 564-582.
4. Thuille, N., Fille, M., & Nagl, M. (2003). Bactericidal activity of herbal extracts. *International journal of hygiene and environmental health*, *206*(3), 217-221.
5. Lawrence BM, (2000). Ajowan oil compositional and bibligaphilical data. Perfume Flavourist, 19(13),20.
6. Balbba S.I, Hilal S.H, Hoggag MY. (1973A).ctiveconstituents of Ammi majus fruits at different stages.Plant Mdica, 23(4), 312-20.
7. Su, L. and Chiu, C., (2007). Salmonella: clinical importance and evolution of nomenclature. *Chang Gung medical journal*, *30*(3), p.210.
8. Ertas, N., Gonulalan, Z., Yildirim, Y. and Kum, E., (2010). Detection of Staphylococcus aureus enterotoxins in sheep cheese and dairy desserts by multiplex PCR technique. *International journal of food microbiology*, *142*(1-2), pp.74-77.
9. Roy, A., Moktan, B. and Sarkar, P.K., (2007). Characteristics of Bacillus cereus isolates from legume-based Indian fermented foods. *Food control*, *18*(12), pp.1555-1564.
10. Hosseini, S.V., Niknahad, H., Fakhar, N., Rezaianzadeh, A. and Mehrabani, D., (2011). The healing effect of mixture of honey, putty, vitriol and olive oil in Pseudomonas aeroginosa infected burns in experimental rat model. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, *6*(6), pp.572-9.
11. Burt, S., (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, *94*(3), pp.223-253.
12. Tajkarimi, M.M., Ibrahim, S.A. and Cliver, D.O., (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food control*, *21*(9), pp.1199-1218.

13. Goudarzi, G.R., Saharkhiz, M.J., Sattari, M. and Zomorodian, K., (2010). Antibacterial activity and chemical composition of Ajowan (Carum copticum Benth. & Hook) essential oil. *Journal of Agricultural Science and Technology*, *13*, pp.203-208.

14. شهابی, س, ایازی روزبهانی, ف، کمالی‌نژاد،م، ابدی,ع، (1387). "بررسی اثر کشندگی عصاره و اسانس گیاه زنیان بر روی کیست ژیاردیا لامبلیا". مجله پزشکی،دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی شهید بهشتی. 32 (4) 307-303.

15. شفقت، م، شریفی مود، ب، متانت، م، سعیدی، س، سپهری راد، ن. (1393). :"اثر ضدباکتریال عصاره زنیان" فصلنامه بیماری های عفونی و گرمسیری. 19 (67) 40-37.

16. ربیعی, ث, حسینی, ه, رضایی, م،موسوی ط، (1392). "بررسی اثر بازدارندگی اسانس زنیان بر رشد باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در محیط عصاره و گوشت ماهی سفید دریای خزر". *مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران*, *8* (2) , 80-71.

17. Mack, D., Rohde, H., Dobinsky, S., Riedewald, J., Nedelmann, M., Knobloch, J.K.M., Elsner, H.A. and Feucht, H.H., (2000). Identification of three essential regulatory gene loci governing expression of Staphylococcus epidermidis polysaccharide intercellular adhesin and biofilm formation. *Infection and immunity*, *68*(7), pp.3799-3807.

18. Sandri, I.G., Zacaria, J., Fracaro, F., Delamare, A.P.L. and Echeverrigaray, S.,(2007). Antimicrobial activity of the essential oils of Brazilian species of the genus Cunila against foodborne pathogens and spoiling bacteria. *Food Chemistry*, *103*(3), pp.823-828.

19. Oroojalian, F., Kasra-Kermanshahi, R., Azizi, M. and Bassami, M.R., (2010). Phytochemical composition of the essential oils from three Apiaceae species and their antibacterial effects on food-borne pathogens. *Food chemistry*, *120*(3), pp.765-770.

20. Kavoosi, G., Tafsiry, A., Ebdam, A.A. and Rowshan, V., (2013). Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of essential oils from Carum copticum seed and Ferula assafoetida latex. *Journal of food science*, *78*(2).

21. Rabiei, S., Hosseini, H., Rezaei, M. and Mousavi, T., (2013). Inhibitory effects of Ajowan essential oil on growth of Listeria monocytogenes in Rutilus frissi kutum broth medium and fillet. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, *8*(2), pp.71-80.