ترکیب شیمیایی و اثرات ضدباکتریایی اسانس خارمشک (Echinophora platyloba) علیه تعدادی از پاتوژن‌های با منشاء غذایی

زهرا بختیاری [۱]، محمد محسن زاده [۲*]، عاطفه صرافان صادقی [۳]

۱. دانشجوی دکترای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
۲*. دانشیار گروه بهداشت مواد غذایی و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
۳. – استادیار گروه تغذیه مرکز آموزش عالی علوم پزشکی وارستگان، مشهد، ایران

آدرس ایمیل مسئول مکاتبات:
* Email: mohsenzadeh@um.ac.ir

چکیده

به کار بردن ترکیبات طبیعی مانند اسانس‌های گیاهی روش مناسبی برای جلوگیری از رشد باکتری ها در مواد غذایی می باشد. در این مطالعه به بررسی ترکیب شیمیایی و اثرات ضد باکتریایی اسانس گیاه خارمشک علیه باکتری های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس*، *لیستریا مونوسایتوژنز*، *سالمونلا تیفی موریوم* و *اشرشیا کلی* O157:H7 پرداخته شده است. پس از شناسایی ترکیب شیمیایی به کمک GC-MS اثر غلظت‌های مختلف اسانس خارمشک جهت تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) باکتریایی تعیین گردید. نتایج نشان داد مهم ترین ترکیبات تشکیل دهنده اسانس به ترتیب اسیمن، ۲ و ۳ دی متیل سیکلو هگزا، ۱و۳ دی ان و گاما دودکانولاکتون می باشد. همچنین مشاهده شد که اسانس خارمشک بیشترین اثر مهارکنندگی و کشندگی را علیه باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، لیستریا مونوسایتوژنز دارد. اسانس خارمشک خاصیت ضد باکتریایی خوبی علیه سه گونه از باکتری های بیماری زا مورد مطالعه نشان داد، لذا می توان از آن به عنوان جایگزین ترکیبات ضد میکروبی سنتزی استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: *اثر ضدمیکروبی، اسانس، خارمشک، ترکیب شیمیایی*

مقدمه

رشد و متابولیسم میکروبی یکی از علل اصلی فساد موادغذایی می‌باشد و ابتلا به بیماری‌های غذازاد نیز سبب نگرانی‌های بسیاری در مصرف‌کنندگان شده است(کورول و همکاران، ۲۰۱۱). همچنین با افزایش سطح آگاهی مصرف‌کنندگان از عوارض نگهدارنده‌های شیمیایی، استقبال به استفاده از غذاهای فاقد افزودنی‌های شیمیایی با بسته‌بندی مناسب به لحاظ زیست محیطی افزایش یافته است(ونگ و همکاران، ۲۰۰۷). بدین منظور یکی ازچالش‌های بزرگ در صنایع غذایی کاهش افزودنی‌های شیمیایی رایج و استفاده از ترکیبات طبیعی در فرمولاسیون غذا می باشد(سانچز–گنزالز، ۲۰۱۱). اسانس‌های گیاهی ترکیبات طبیعی هستند که به عنوان مواد طعم‌دهنده خواص ضدمیکروبی آنها اثبات شده و می‌توانند در مهار پاتوژن‌های غذایی نقش ایفا کنند(بورت وهمکاران،۲۰۰۴.مژلهلم، ۲۰۰۲. اوسلا و همکاران، ۲۰۰۷). ساختار شیمیایی و گروه‌های عاملی اسانس‌ها نقش مهمی در فعالیت ضد میکروبی آن‌هـا ایفا می‌کند(حسینی و همکاران، ۲۰۱۲). خارمشک با نام علمی اکینوفورا (Echinophora) متشکل از ۱۰گونه، از منطقه مدیترانه تا ایران و افغانستان توزیع شده است. گیاه خارمشک گیاهی پایا، به رنگ سبز مات

متمایل به زرد، محکم و خاردار با ساقه‌ی منفرد و از پایین منشعب، دارای شاخه‌های شیاردار ضخیم و درهم شده می‌باشد. ارتفاع این گیاه به ۳۰ سانتی متر تا ۱۰۰ سانتی متر می‌رسد. این گیاه دارای گل‌های کوچک سفید یکپارچه، که از ماه ژوئن تا جولای دوره گلدهی آن بطول می‌انجامد. اسانس حاصل از خارمشک دارای ترکیباتی ازجمله: روغن‌های فرار، فلاونوئید، ساپونین وآلکالوئید می‌باشد. خارمشک در گذشته به شکل سنتی در نوشیدنی‌های لبنی به عنوان طعم‌دهنده مورد استفاده قرار می‌گرفته است. همچنین در ترشیجات جهت جلوگیری از کپک زدگی کاربرد دارد. فعالیت ضدمیکروبی اسانس گونه‌های مختلف اکینوفورا، در برابر میکروارگانیسم‌های مختلف ازجمله باکتری‌های پاتوژن غذازاد نیز گزارش شده است(فرزانه‌نیا و همکاران، ۱۳۹۵).

هدف از این مطالعه بررسی ترکیب شیمیایی و تعیین اثر ضد باکتریایی اسانس استخراج شده از این گیاه علیه تعدادی از باکتری های بیماری زا با منشاء غذایی و مولد فساد می باشد.

روش

جمع آوری گیاه و استخراج اسانس

در این مطالعه گیاه خارمشک از ناحیه تربت‌حیدریه واقع در استان خراسان رضوی جمع آوری شد. در مرحله بعد مقدار مشخصی از گیاه را پس از خشک و خرد کردن، به روش تقطیر با آب و بادستگاه کلونجر[1] اسانس گیری شد. سپس اسانس با استفاده از سولفات‌سدیم بی‌آب خشک گردید و تا زمان استفاده در ظروف تیره در دمای ۴ درجه سیلسیوس نگهداری شد.

شناسایی ترکیبات شیمیایی

اسانس خارمشک با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگراف کوپل شده با طیف‌سنج جرمی(GC-MS) آنالیز شد.

تهیه باکتری‌های مورد مطالعه

در این مطالعه از سه گونه باکتریایی گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس(ATCC25923)، باسیلوس سرئوس(ATCC10876) و لیستریا مونوسایتوژنز (ATCC7644) و دو گونه باکتریایی گرم منفی سالمونلا تیفی موریوم(ATCC14028)، اشرشیا کلی O157:H7(NTCC12900) استفاده گردید. سویه‌ها روی ظروف پتری حاوی آگار مغذی کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سیلسیوس گرمخانه گذاری شد. درمرحله بعد از پرگنه‌های تازه رشد کرده برداشته و سوسپانسیون معادل نیم مک فارلند (۱/۵ × ۱۰۸CFU/mL) با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر تهیه گردید.

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی Minimum inhibitory concentration (MIC)

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس به روش رقت سازی در چاهک۲ در میکروپلیت های ۹۶ خانه انجام شد. ابتدا غلظتی معادل نیم مک فارلند از باکتری تهیه کرده و سپس آن را تا غلظت 10^6 CFU/mL رقیق می‌کنیم. درمرحله بعد به هر یک از چاهک های پلیت به میزان ۲۰ میکرولیتر اسانس، ۲۰ میکرولیتر سوسپانسیون تهیه شده‌ی باکتری ها و ۱۶۰ میکرولیتر از محیط کشت آبگوشت قلب و مغز انتقال داده شد. برای هر باکتری در هر غلظت دوتکرار گذاشته شد. چاهک حاوی محیط کشت و سوسپانسیون باکتری به عنوان کنترل مثبت و چاهک حاوی محیط کشت و اسانس به عنوان کنترل منفی در نظرگرفته شد. سپس پلیت ها به مدت ۳۰ ثانیه در دستگاه روتاتور۳ مخلوط شده و به مدت ۲۴

[1] Clevenger
[2] Microbroth dilution
[3] Rotator

ساعت در دمای ۳۷ درجه سیلسیوس گرم خانه گذاری گردید. پس از طی زمان گرم خانه گذاری، پلیت ها را از نظر کدورت ناشی از رشد باکتری های تلقیح شده به روش چشمی بررسی شدند و کمترین غلظتی که در آن هیچگونه رشدی مشاهده نگردید، به عنوان MIC تعیین شد.

تعیین حداقل غلظت باکتری کشی Minimum bactericidal concentration (MBC)

جهت تعیین حداقل غلظت باکتری کشی از تمام چاهک هایی که به عنوان MIC تعیین شده بود، ۱۰ میکرولیتر برداشته و در محیط کشت آبگوشت قلب و مغز آگار به روش کشت آمیخته[4]، کشت داده شد. یک میلی لیتر از هر لوله و ۲۰ میلی لیتر از محیط کشت آبگوشت قلب و مغز آگار را در پتری دیش ریخته و پس از مخلوط کردن و بسته شدن آگار به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سیلسیوس انکوبه شدند. سپس پلیت ها را از نظر وجود رشد میکروبی کنترل کرده و لوله ای که حاوی کمترین غلظت اسانس بوده و در پلیت مربوطه هیچ رشدی مشاهده نگردید به عنوان MBC آن اسانس در نظر گرفته شد. برای هر اسانس بصورت جداگانه این مقادیر تعیین گردید(صمدی و محسن‌زاده، ۱۳۹۷)

نتایج

براساس نتایج بدست آمده ۱۰ ماده فرار شیمیایی که ترکیب اسانس خارمشک را تشکیل می‌دهند، شناسایی گردید. طبق این نتایج، ترکیبات عمده‌ی موجود در اسانس گیاه خارمشک به ترتیب عبارت بودند از: 2(3H)-Furanone، (-)-Carvone، Linalool،Thymol

نتایج آزمایش حداقل غلظت مهارکنندگی(MIC) وحداقل غلظت کشندگی (MBC) اسانس خارمشک

نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی اسانس خارمشک در مقابل ۶ نوع پاتوژن (*اشرشیا کلی O157:H7، سالمونلا تیفوموریوم، استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس* **و** *لیستریا مونوسایتوژنز*) در جدول زیر نشان داده شده است.

جدول ۱. اثرات ضدباکتریایی اسانس خارمشک

باکتری	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)
Salmonella typhimurium	۲۰	۴۰
Escherichia coli O157:H7	۲۰	۴۰
Listeria monocytogenes	۱۰	۲۰
Bacillus cereus	۱۰	۲۰
Staphylococcus aureus	۱۰	۲۰

بحث و نتیجه‌گیری

ترکیب شیمیایی اسانس

نتایج آنالیز اسانس گیاه خارمشک توسط دستگاه GC/MS نشان داد بیشترین ترکیبات تشکیل دهنده آن را 2(3H)-Furanone، (-)-Carvone، Linalool،Thymol تشکیل می‌دهد.

[4] Pour plate method

در مطالعه ای که اردغان و همکاران(۲۰۰۲) به بررسی فعالیت ضدمیکروبی و تعیین ترکیب شیمیایی تعدادی اسانس گیاهی پرداخته است؛ به ترتیب آلفافلاندرن(۴۵/۹٪)، ام اوژینول(۲۹/۵٪)، پیسیمن(۲۴/۴٪) بیشترین مقدار *Echinophora tenuifolia*رابه خود اختصاص داده است (آندوگان و همکاران،۲۰۰۲).

اصغری و همکاران(۲۰۰۳)در شناسایی ترکیب شیمیایی اسانس *E.platyloba*نشان دادند که ترکیب عمده این گیاه شامل ترانس بتااسیمن(۶۷/۹٪)، ۲فورانون(۶/۲٪)، میرسن(۶٪)،لینالول(۳/۱٪)، سیس بتااسیمن(۲/۳٪) می‌باشد(اصغری و همکاران،۲۰۰۳).

درمطالعه رحیمی نصرآبادی(۲۰۱۰)که به شناسایی ترکیب شیمیایی *E.platyloba*پرداخته است؛به ترتیب بی‌اسیمن(۲۶/۷۱٪)،دی-۳-کارن(۱۶/۱۶٪)،لیمونن(۶/۵۹٪) بیشترین فراوانی رابه خوداختصاص دادند(رحیمی نصرآبادی و همکاران،۲۰۱۰).

ساعی دهکردی و همکاران(۲۰۱۲)در مطالعه شناسایی ترکیب شیمیایی وفعالیت آنتی اکسیدانی وضد باکتریایی اسانس *E.platyloba* نشان دادند؛ تیمول ، ترانس اسیمن ، کارواکرول و ای‌سسکوئی لاواندولول ترکیبات اصلی اسانس راتشکیل می دهند(ساعی دهکردی و همکاران،۲۰۱۲).

درمطالعه هاشمی و همکاران(۲۰۱۳) ترکیب عمده خارمشک اسیمن(۲۶/۵۱)،۲و۳دی متیل-سیکلوهگزا-۱و۳دی ان(۹/۸۷)آلفاپی ان(۶۹/۷)و گاما-دودکانولاکتون(۵/۶۶) گزارش شده است(هاشمی و همکاران، ۲۰۱۳).

گاکبولوت وهمکاران(۲۰۱۳)که به ارزیابی ترکیب شیمیایی،فعالیت ضد میکروبی وخاصیت آنتی اکسیدانی *E.tenuifolia*پرداخته است؛ نشان داد که اسانس مورد بررسی عمدتاً از ترپن ها از جمله δ-3-کرین ، آلفافلاندرن و پیسیمن تشکیل شده است(گاکبولوت وهمکاران، ۲۰۱۳).

زارعلی و همکاران(۲۰۱۶)درنتیجه مطالعه ای که به منظور ارزیابی ترکیبات شیمیایی وفعالیت ضد باکتریایی اسانس گیاهان خوشاریزه*E.cenerea* وچای کوهی انجام شد؛ نشان داد به ترتیب آلفافلاندرن، پیسیمن ، کارواکرول، آلفاپینن، بتا فلاندرن وپولگون ترکیب عمده گیاه خوشاریزه راتشکیل داده است(زارعلی و همکاران، ۲۰۱۶).

فاتحی مقدم و همکاران(۲۰۲۰)دربررسی ترکیبات شیمیایی و خواص آنتی اکسیدانی و اثرات ضد میکروبی *Satureja bachtiarica Bunge* و DC *Echinophora platyloba* علیه لیستریا مونوسایتوژنزنشان دادند؛ اوسیمن (۴۴,۱۵٪) ، α-فلاندرن (۱۶,۸۰٪)، گاماترپینن(۸/۵۲٪) بیشترین ترکیب شیمیایی شناسایی شده در *E. platyloba* می‌باشد(فاتحی مقدم و همکاران،۲۰۲۰).

وجودتفاوت در ترکیب شیمیایی اسانس گیاه خارمشک به مواردی چون فصل،منطقه جغرافیایی، ژنتیک، دوره برداشت گیاه می توان نسبت داد.

ارزیابی حداقل غلظت مهارکنندگی رشد(MIC)و حداقل غلظت باکتری کشی (MBC)

نتایج درمطالعه حاضر نشان داد؛ اثر ضدباکتریایی اسانس خارمشک به ترتیب در رتبه اول بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس‌سرئوس، لیستریامونوسایتوژنز و در رتبه دوم بر اشریشیاکلی O157:H7* ، سالمونلاتیفوموریوم می‌باشد.

ساعی دهکردی و همکاران(۲۰۱۲)در مطالعه شناسایی ترکیب شیمیایی وفعالیت آنتی اکسیدانی وضدباکتریایی اسانس *E.platyloba* نشان دادند(ساعی دهکردی و همکاران،۲۰۱۲).

درمطالعه هاشمی و همکاران(۲۰۱۳) که به بررسی ترکیب شیمیایی وخاصیت ضد باکتریایی اسانس روغنی وعصاره متانولی*E.platyloba* پرداختند؛ حساس ترین باکتری‌ها نسبت به اسانس و عصاره گیاه*E.platyloba* *لیستریامونوسایتوژنز* و *استافیلوکوکوس اورئوس* بودند. مقادیر حداقل غلظت مهاری (MIC) اسانس در برابر *لیستریامونوسایتوژنز* و*استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب ۶۲۵۰ و ۱۲۵۰۰ ppm بود(هاشمی و همکاران، ۲۰۱۳).

مهدیان و همکاران(۲۰۱۷)در پژوهش شناسایی ترکیب شیمیایی وارزیابی فعالیت ضدباکتریایی وآنتی اکسیدانی نشان داند باکتری‌های حساس به اسانس E. platyloba، *استافیلوکوکوس اورئوس* بامقادیر MIC و MBC به ترتیب ۰/۵و ۱/۲۵ میکرولیتر در میلی لیتر و پس از آن *Salmonella. enterica* بامقادیر MIC و MBC به ترتیب ۱ و ۲/۵میکرولیتر در میلی لیتر می‌باشد. باکتری *Helicobacter pylori* با مقادیر MIC و MBC به ترتیب۱/۱ و ۵ میکرولیتر در میلی لیتر کم ترین حساسیت را نسبت به اسانس E. *platyloba* نشان دادند(مهدیان و همکاران، ۲۰۱۷)

فاتحی مقدم و همکاران(۲۰۲۰)دربررسی ترکیبات شیمیایی و خواص آنتی‌اکسیدانی و اثرات ضد میکروبی *Satureja bachtiarica Bunge* و *Echinophora platyloba DC* علیه لیستریا مونوسایتوژنز نشان دادند؛MIC وMBC اسانس *platyloba* .E علیه *لیستریا مونوسایتوژنز* به ترتیب۱۰ و۴۰ میلی گرم در میلی لیتر می‌باشد(فاتحی مقدم و همکاران،۲۰۲۰).

فصل وشرایط جغرافیایی،دوره برداشت گیاه، جنس وگونه باکتری موردآزمایش وشرایط انجام آزمایش می توانند سبب تفاوت درمقادیر MIC و MBC اسانس خارمشک درمطالعه حاضر و مطالعات پیشین بشوند.

براساس نتایج حاصل از اثرات ضدباکتریایی اسانس خارمشک، می‌توان ازاین اسانس درصنعت غذا به عنوان جایگزین موادنگهدارنده سنتزی استفاده کرد.

منابع

صمدی، ن. محسن زاده، م. (۱۳۹۷). اثر ضد باکتریایی اسانس رازیانه (Foeniculum vulgare) ، در برابر چندین عامل بیماری زای ناشی از مواد غذایی. *دومین کنگره بین المللی و بیست و پنجمین کنگره ایرانی علوم و فناوری غذایی.*

فرزانه‌نیا، ع. قجربیگی، پ. محمودی، ر. (۱۳۹۵). *تعیین اثر ضدباکتریایی اسانس گیاه خارمشک(Echinophora orientalis) بر استافیلوکوکوس‌اورئوس در محیط کشت آزمایشگاهی و مدل غذایی.* پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد چاپ نشده، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی قزوین.

Andoğan, B. C., Baydar, H., Kaya, S., Demirci, M., Özbaşar, D., & Mumcu, E. (2002). Antimicrobial activity and chemical composition of some essential oils. *Archives of pharmacal research*, 25(6), 860-864.

Asghari, G. R., Sajjadi, S. E., Sadraei, H., & Yaghobi, K. H. (2010). Essential oil constituents of Echinophora platyloba DC. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, (3), 185-186.

Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, *94*(3), 223-253.

Fathimoghaddam, E., Shakerian, A., Sharafati Chaleshtori, R., & Rahimi, E. (2020). Chemical Composition and Antioxidant Properties and Antimicrobial Effects of Satureja bachtiarica Bunge and Echinophora platyloba DC. Essential Oils Against Listeria monocytogenes. *Journal of Medicinal plants and By-product*, 9(Special), 47-58.

Gokbulut, I., Bilenler, T., & Karabulut, I. (2013). Determination of chemical composition, total phenolic, antimicrobial, and antioxidant activities of Echinophora tenuifolia essential oil. International *Journal of Food Properties*, 16(7), 1442-1451.

Hashemi, M., Ehsani, A., Jazani, N. H., Aliakbarlu, J., & Mahmoudi, R. (2013). Chemical composition and in vitro antibacterial activity of essential oil and methanol extract of Echinophora platyloba DC against some of food-borne pathogenic bacteria. In Veterinary Research Forum (Vol. 4, No. 2, p. 123). Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.

Hosseini, N., Akbari, M., Ghafarzadegan, R., Changizi Ashtiyani, S., & Shahmohammadi, R. (2012). Total phenol, antioxidant and antibacterial activity of the essential oil and extracts of Ferulago angulata ssp. angulata. *Journal of Medicinal Plants*, 3(43), 80-89.

Kuorwel, K. K., Cran, M. J., Sonneveld, K., Miltz, J., & Bigger, S. W. (2011). Antimicrobial activity of biodegradable polysaccharide and protein-based films containing active agents. *Journal of Food Science*, *76*(3), R90-R102.

Mahdian, F., Mahboubi, M., Rahimi, E., & Shad, M. M. (2017). Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of Echinophora platyloba essential oil. Infectio, 21(3), 176-181.

Mejlholm, O., & Dalgaard, P. (2002). Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro-organism Photobacterium phosphoreum in liquid media and fish products. *Letters in applied microbiology*, *34*(1), 27-31.

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.

Rahimi, N. M., Gholivand, M. B., Niasari, M., & Vatanara, A. (2010). Chemical composition of the essential oil from aerial parts of Echinophora platyloba DC. from Iran.

Saei Dehkordi, S. S., Fallah, A. A., Saei- Dehkordi, S. S., & Kousha, S. (2012). Chemical Composition and Antioxidative Activity of Echinophora platyloba DC. Essential oil, and its interaction with natural antimicrobials against food borne pathogens and spoilage organisms. *Journal of food science*, 77(11), M631-M637.

Sánchez-González, L., Vargas, M., González-Martínez, C., Chiralt, A., & Chafer, M. (2011). Use of essential oils in bioactive edible coatings: a review. *Food Engineering Reviews*, *3*(1), 1-16.

Wang, L. Z., Liu, L., Holmes, J., Kerry, J. F., & Kerry, J. P. (2007). Assessment of film-forming potential and properties of protein and polysaccharide-based biopolymer films. *International journal of food science & technology*, *42*(9), 1128-1138.

Zarali, M., & Hojati, M. (2016). Dideh Ban TS, Jooyandeh H. Evaluation of chemical constituents and antibacterial activity of essential oils Echinophora cinerea Bioss and Stachys lavandulifolia Vahl essential oils in vitro. *Journal of Food Science and Technology*, 13(52), 1-12.