



بررسی خاصیت ضد میکروبی امولسیون اسانس بولاغ اوتی وحشی (*Nasturtium officinale L.*) علیه تعدادی از باکتری های پاتوژن با منشأ غذایی

فاطمه حق شناس مجاوری

دانشجوکارشناسی ارشد، گروه بهداشت مواد غذایی و آبزیان، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران

fatemeh.haghshenas1999@gmail.com

محمد محسن زاده*

استاد گروه بهداشت مواد غذایی و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران.

mohsenzadeh@um.ac.ir

محمد مالکی

پژوهشگر پسا دکتری تخصصی بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران

Ayask0946@gmail.com

چکیده

افزایش آگاهی مردم از مضرات مواد شیمیایی نگهدارنده و بروز مقاومت های باکتریایی باعث شده مصرف کنندگان تمایل بیشتری به استفاده از نگهدارنده های طبیعی در مواد غذایی پیدا کند. مواد نگهدارنده طبیعی یا اسانس های گیاهان امروزه به طور گسترده در صنایع غذایی به عنوان جایگزین برای نگهدارنده های مصنوعی استفاده می شود. مطالعه حاضر با هدف ارزیابی خواص ضد میکروبی اسانس گیاه بولاغ اوتی وحشی علیه تعدادی از باکتری های بیماریزا با منشأ غذایی صورت گرفت. بدین منظور اسانس گیاه بولاغ اوتی وحشی توسط دستگاه کلونجر تهیه شد. حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) اسانس در غلظت های مختلف علیه باکتری های گرم مثبت و گرم منفی به روش میکروبراث دایلوژن بررسی شد. در رابطه با حداقل غلظت ممانعت کنندگی این اسانس، حساس ترین باکتری در برابر اثر ضد باکتریایی اسانس بولاغ اوتی وحشی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا مونوسیتوزنز بودند. طبق این مطالعه اسانس گیاه بولاغ اوتی وحشی به عنوان یک ماده ضد میکروبی گیاهی، جایگزین مناسبی برای ترکیبات شیمیایی ضد میکروبی بوده و خاصیت ضد میکروبی خوبی را علیه باکتری های مورد مطالعه دارا می باشد.

واژگان کلیدی: گیاه بولاغ اوتی وحشی، اسانس های گیاهی، حداقل غلظت مهارکنندگی، حداقل غلظت کشندگی



مقدمه و هدف

در حال حاضر حفظ ایمنی ماده غذایی و کیفیت آن، انقدر مهم می باشد که کم توجهی یا بی توجهی به آن می تواند صدمات جبران ناپذیری را به جامعه وارد کند. امروزه مسمومیت ها و بیماری های منتقل شونده از طریق مواد غذایی یکی از مشکلات مهم جوامع به حساب می آید. بیش از ۲۰۰۰ نوع بیماری از طریق مصرف مواد غذایی آلوده به انواع میکروارگانیسم ها به انسان منتقل می شود که آلودگی مواد غذایی به این ارگانیسم ها در هر مرحله از تولید، نگهداری و ذخیره سازی و در مرحله پخت غذا ممکن است اتفاق افتد. علیرغم وجود تکنیک های زیادی درباره نگهداری مواد غذایی از جمله: سرد کردن، انجماد، تخمیر، پاستوریزاسیون و استفاده از ترکیبات ضد میکروبی شیمیایی، اما هنوز پاتوژن های غذا زاد به عنوان مشکلی بزرگ تلقی شده و مورد توجه تولیدکننده های مواد غذایی قرار گرفته است (Abad et al, 2007). دلایل مختلفی موجب انجام تحقیقات گسترده درباره ماهیت ترکیبات طبیعی، اثربخشی آن ها در مواد غذایی و همینطور اثرات ضد میکروبی آن ها شده است. این دلایل شامل: افزایش مقاومت دارویی میکروارگانیسم ها، نا کارآمدی داروهای شیمیایی معمول برای درمان بیماری های عفونی، تمایل تولید کننده های مواد غذایی جهت افزایش ماندگاری مواد غذایی، بالا رفتن سطح آگاهی مردم و آشنایی آنها با مضرات نگه دارنده های شیمیایی و ترجیح آنها به استفاده از مواد طبیعی. از جمله ترکیباتی که می توانند به عنوان نگهدارنده طبیعی در مواد غذایی بکار روند، اسانس های گیاهی هستند. اسانس های حاصل از گیاهان دارویی به دلیل عدم ایجاد عوارض در مصرف کننده، به عنوان نگهدارنده های سالم و طبیعی در مواد غذایی مطرح هستند. اسانس های گیاهی که دسته مهمی از ترکیبات ضد میکروبی هستند، جهت استفاده در انواع مختلف مواد غذایی برای مقابله با میکروارگانیسم های بیماریزا و فاسد کننده، مناسب می باشند. اثرات ضد میکروبی اسانس ها علیه طیف وسیعی از میکروارگانیسم ها به خصوص باکتری های پاتوژن به اثبات رسیده است (Burt et al, 2004). اسانس ها ترکیبات فرار و معطری هستند که از قسمت های مختلف یک گیاه به دست می آیند. این مواد دارای خاصیت ضد باکتریایی، ضد قارچی، ضد اکسایشی و ضد سرطانی بوده و باعث می شوند رشد پاتوژن ها و تولید توکسین توسط آنها کاهش یابد. در بسیاری از مطالعات، اثرات ضد میکروبی اسانس های گیاهی علیه باکتری های گرم مثبت و گرم منفی را، در ارتباط با حضور اجزای فعال مونوترپن ها می دانند. از ویژگی های مهم اسانس ها و اجزای آن، خاصیت آبریزی است که باعث می شود این ترکیبات به لپیدهای غشای سلول و میتوکندری ها نفوذ کند و موجب افزایش نفوذ پذیری و اختلال در ساختار غشا گردد. این نفوذ پذیری موجب خروج و نشت یون ها و سایر محتویات سلول شده که در نهایت باعث مرگ سلول خواهد شد. گیاهان دارویی از زمانهای بسیار قدیم در پزشکی، تهیه مواد معطر آرایشی، کنترل میکروارگانیسم های فسادزا و بیماری زا در مواد غذایی و همچنین بهبود طعم غذاها مورد استفاده قرار گرفته اند. متابولیت های ثانویه ی گیاهی مانند اسانسهای روغنی، ترکیبات آروماتیک و ترکیبات فرار نیز کاربردهای گستردهای در طب سنتی، طعم دهنده ها و نگهدارنده های مواد غذایی دارند. اسانسهای روغنی گیاهان مختلف و ترکیبات شیمیایی آنها از زمانهای بسیار قدیم شناخته شده اند. این مواد اثرات ضد باکتری، ضد قارچ، ضد ویروس و ضد انگل از خود نشان داده اند. اثرات بیولوژیکی گیاهان دارویی و اسانسهای روغنی یا عصاره آنها بیشتر به واسطه ی ترکیبات شیمیایی به ویژه ترکیبات فنلی موجود در آنها است (Aali et al, 2017; Dhakad et al, 2018) ترکیب شیمیایی اسانس گیاهان مختلف ممکن است تحت تأثیر عوامل ژنتیکی و محیطی مانند شرایط جغرافیایی، تغییرات آب و هوایی و فصلی و مرحله ی رشد گیاه متغیر باشند.

گیاه دارویی بولاغ اوتی گیاهی از تیره شببوها به ارتفاع ۱۰ تا ۶۰ سانتی متر است. این گیاه دارای تعداد زیادی شاخه های خزیده و ساقه، برگ های عمودی و به شکل پر می باشد؛ قسمت فوقانی آن ۳ تا ۷ بالچه دارد و قسمت پایین آن دارای ۳ بخش به صورت بریدگی است. دارای برگ های کوچک به رنگ سبز تیره و گل های خوشه ای کوچک سفید و ساقه های خزنده است که از نقاط مختلف آن ریشه های کوچک و سفید خارج می شود و معمولاً در کنار جوی ها و باتلاق ها می روید. بولاغ اوتی به صورت وحشی در

بسیاری از نقاط آسیا و اروپا می‌روید. انسان‌ها از دوران باستان با آن آشنا بوده و خاصیت‌های درمانی گوناگونی را به آن نسبت می‌دادند. کاربردهای دارویی بولاغ اوتی به علت داشتن ید، ضد غمباد و به علت داشتن منیزیم، ضد سرطان است. در اطراف خانواده بولاغ اوتی، مخصوصاً تره تیزک، از طرف غذاشناسان و دانشمندان، چه در قدیم و چه در عصر حاضر، عقاید و نظرات ضد و نقیض زیاد گفته شده است. عده‌ای از غذا شناسان عصر جدید آن را ضد غمباد «گواتر» و دسته‌ای باعث این بیماری می‌دانند. همچنین منبع غنی از ترکیبات با ارزش مانند گلوکوزینولات‌ها، ایزوتیوسیانات‌ها، پلی فنول‌ها، ویتامین‌های B₃، B₂، B₁ می‌باشد (Klimek et al, 2018). در اروپا، این گونه توسط اتحادیه بین المللی حفاظت از طبیعت (IUCN) در فهرست قرمز گونه‌های در معرض خطر طبقه بندی شده است که در هر کشور اروپایی متفاوت است. به عنوان مثال، در استونی یک گیاه منقرض شده یا احتمالاً منقرض شده، اتریش در خطر انقراض و در لهستان در معرض خطر انقراض قرار گرفته است (Omidi et al, 2018). این مطالعه با هدف بررسی خاصیت ضد میکروبی امولسیون اسانس بولاغ اوتی وحشی (*Nasturtium officinale L.*) علیه تعدادی از پاتوژن‌های با منشأ غذایی انجام گردید.

روش کار

تهیه ی اسانس بولاغ اوتی وحشی

۲۰۰ گرم گیاه بولاغ اوتی در شرایط مناسب خشک شده سپس در بالن ۱۰۰ mL ریخته و تا نیمه از آب مقطر پرمی شود. اسانس گیاه بولاغ اوتی با استفاده از روش تقطیر با آب توسط دستگاه کلونجر به مدت ۳ ساعت بدست آمد.

آماده سازی اسانس بولاغ اوتی وحشی

جهت تهیه امولسیون اسانس بولاغ اوتی وحشی غلظت‌های متفاوت اسانس با DMSO و تویین ۸۰ مخلوط شدند. سپس مخلوط حاصل به مدت ۵ دقیقه با استیرر هم زده شد.

آماده سازی محیط کشت آبگوشت قلب-مغز BHI

برای تعیین MIC و MBC محیط کشت BHI برات و BHI آگار تهیه شد. محیط‌های کشت طبق روش آماده سازی، در ارلن ۲۵۸ mL توزیع و به حجم رسانده شدند. برای تهیه ی محیط کشت BHI آگار، محتویات ارلن به مدت ۲ دقیقه (تا زمان جوشیدن) حرارت داده شدند. سپس هر دو محیط در اتوکالو در دمای ۱۲۱ °C به مدت ۵۰ دقیقه استریل شدند.

تهیه ی باکتری

باکتری‌های اشرشیاشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریامونوسایتوزنز و سالمونلاتیفی موریوم از کلکسیون میکروبی گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شدند. در ابتدا از سویه ی باکتری نگهداری شده در آزمایشگاه در محیط کشت BHI آگار کشت داده شد و در دمای ۲۷ °C به مدت ۴۸ ساعت در جار بی هوازی انکوبه شدند.

تهیه ی سوسپانسیون میکروبی

از هر یک از باکتری‌های مورد مطالعه با استفاده دستگاه اسپکتروفوتومتر غلظت معادل نیم مک فارلند تهیه گردید. بدین منظور در لوله ی آزمایش مقداری آب مقطر ریخته شد. سپس توسط لوپ استریل و در کنار شعله، چند کلنی در آب مقطر حل شد و با دستگاه ورتکس یکنواخت شد. سپس میزان جذب نوری در ۰/۸-۰/۱ و طول موج ۸۸۰ نانومتر تعیین گردید. در این جذب نوری

سوسپانسیون میکروبی معادل $10^7 \times 10^6$ mL/CFU می باشد. جهت آماده سازی غلظت مناسب برای تلقیح، سوسپانسیون باکتریایی با تعداد باکتری در هر میلی لیتر تهیه شد.

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) به روش میکرودايلوشن براث

برای تعیین MIC اسانس بولاغ اوتی وحشی، از روش میکروبراث دایلویشن در محیط کشت BHI براث در میکروپلیت ۹۶ خانه ای با چاهک ته گرد استفاده شد. غلظتهای مختلف اسانس از $8 \mu\text{g}/\text{mg}$ تا $500 \mu\text{g}/\text{mg}$ تهیه گردید. برای هر باکتری کنترل مثبت و منفی در نظر گرفته شد. پلیت در انکوباتور با دمای 27°C و به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. پس از طی زمان انکوباسیون، جهت بررسی رشد و عدم رشد باکتری در مقایسه با گروه های کنترل، به پلیت ها $28 \mu\text{g}$ میکرولیتر معرف تری فنیل تترازولیوم (TTC) افزوده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای 27°C انکوبه گردید. کمترین غلظتی که در آن هیچ گونه رشد باکتری مشاهده نشد، به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) در نظر گرفته شد.

تعیین حداقل غلظت کشندگی MBC

از غلظت های بالاتر MIC که در آنها هیچگونه رشد باکتری مشاهده نگردید، بر روی پلیتهای حاوی محیط کشت BHI آگار به روش خطی کشت داده و در دمای 27°C به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. پس از زمان انکوباسیون، کمترین غلظت اسانس که در آن باکتری رشد نداشته، به عنوان MBC در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از بررسی حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) اسانس بولاغ اوتی وحشی بر روی باکتریهای مورد مطالعه در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱- حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) اسانس بولاغ اوتی

MBC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	میکروارگانیزم ها
۱۰۰۰	۱۰۰۰	سالمونلا تایفی موریوم
۱۰۰۰	۱۰۰۰	اشرشیا کلی
۵۰۰	۵۰۰	استافیلوکوکوس اورئوس
۵۰۰	۵۰۰	لیستریا مونوسیتوژنز

در سال های اخیر، تقاضای مصرف کنندگان برای بهره مندی از محصولات طبیعی به منظور کنترل فساد در مواد غذایی بسیار افزایش یافته است. برخی ترکیبات همانند اسانسها دارای خواص ضد میکروبی مطلوبی می باشند که در مقایسه با ترکیبات شیمیایی دارای مزایایی چون ایمن بودن برای مصرف کننده می باشند که اهمیت این ترکیبات را افزایش میدهد از گیاه بولاغ اوتی به خصوص در شمال ایران به طور گستردهای برای طعم بخشیدن به غذاها و نوشیدنیها استفاده میشود. بازدهی اسانس آن بسیار بالا و حدود $5/2$ درصد میباشد. بنابراین، اسانس این گیاه میتواند به یک نگهدارنده ی گیاهی خوب تبدیل شود بر طبق این پژوهش، میزان حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی حاصل از این گیاه با پژوهشهای قبلی در این حوزه، نتایج مشابهی داشته است که سبب مهار رشد باکتریها می شود.

در این پژوهش حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی اسانس بولاغ اوتی وحشی به روش به روش میکروداپلوشن برات برای باکتری های گرم منفی و گرم مثبت بررسی شد. نتایج نشان داد که حداقل غلظت مهارکنندگی برای باکتری های سالمونلا، اشرشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا مونوسیتوژنز به ترتیب ۱۰۰۰، ۵۰۰ و ۵۰۰ $\mu\text{g/ml}$ بود و نیز حداقل غلظت کشندگی برای باکتری های سالمونلا، اشرشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا مونوسیتوژنز به ترتیب ۱۰۰۰، ۱۰۰۰، ۵۰۰ و ۵۰۰ $\mu\text{g/ml}$ بود که با نتایج فرشباف و همکاران (۱۳۹۶) برای اسانس بولاغ اوتس مشابهت داشت (فرشباف و همکاران ۱۳۹۶). نتایج نشان داد که اثرات مهارکنندگی اسانس بر باکتری های گرم مثبت بیشتر از باکتری های گرم منفی بود که علت این امر به دلیل تفاوت در ساختار دیواره این دو گروه از باکتری های می باشد. باکتری های گرم منفی دارای دیواره غشای خارجی هستند که به مانند سدی از عبور مولکول های بزرگ و آب گریز جلوگیری می کند و از آنجایی که اکثر ترکیبات موجود در اسانس بولاغ اوتی آب گریز می باشد در نتیجه این ترکیبات امکان ورود به سلول باکتری و دسترسی به نقاط فعال درون باکتری های گرم منفی را ندارند و در نتیجه مقاوت بیشتری نسبت به باکتری های گرم مثبت دارند (Osuli Zadeh Noubari et al, 2022).

نتایج این پژوهش نشان داد که می توان از اسانس بولاغ اوتی وحشی به عنوان یک نگهدارنده طبیعی برای کاربرد در صنایع غذایی استفاده کرد که علاوه بر جلوگیری از رشد باکتری های غذازاد باعث بهبود خصوصیات حسی مواد غذایی می شود.

منابع

فرشباف درهمی سعید، قیامی راد مهدی، محمودی رزاق، & اسدی ناداری محمدرضا. (۱۳۹۶) بررسی مقایسه ای اثرات ضد باکتریایی عصاره های الکلی گشنیز و بولاغ اوتی علیه برخی باکتری های پاتوژن غذازاد.

Osuli Zadeh Noubari, M. S., Yousefi, S., & Weisany, W. (2022). Influence of microencapsulated wild watercress (*Nasturtium officinale* L.) and dill (*Anethum graveolens* L.) essential oils on the physicochemical, microbial, rheological and sensory properties of probiotic Doogh. *Journal of food science and technology (Iran)*, 19(124), 113-126.

Klimek-Szczykutowicz, M., Szopa, A., & Ekiert, H. (2018). Chemical composition, traditional and professional use in medicine, application in environmental protection, position in food and cosmetics industries, and biotechnological studies of *Nasturtium officinale* (watercress)—a review. *Fitoterapia*, 129, 283-292.

Omidi, A., & Sharifi, A. (2018). Effect of methanolic extract of *Nasturtium officinale* on growth and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Gorgan University of Medical Sciences*, 20(2), 102-108.

Abad, M. J., Ansuategui, M., & Bermejo, P. (2007). Active antifungal substances from natural sources. *Arkivoc*, 7(11), 6-145.

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

Aali, E., Mahmoudi, R., Kazemina, M., Hazrati, R., & Azarpey, F. (2017). Essential oils as natural medicinal substances. *Tehran University of Medical Sciences Journal*, 75(7), 480-489.

Dhakad, A. K., Pandey, V. V., Beg, S., Rawat, J. M., & Singh, A. (2018). Biological, medicinal and toxicological significance of *Eucalyptus* leaf essential oil: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(3), 833-848.



Investigating the antimicrobial properties of wild *Nasturtium officinale* (*Nasturtium officinale* L.) essential oil emulsion against a number of pathogenic bacteria of food origin

Fatemeh haghshenas mojaveri¹

1- Department of Food Hygiene and Aquaculture, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad (FUM), POBox: 9177948974, Mashhad, Iran

fatemeh.haghshenas1999@gmail.com

Mohammad Mohsenzadeh^{2*}

2- Department of Food Hygiene and Aquaculture, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad (FUM), POBox: 9177948974, Mashhad, Iran

mohsenzadeh@um.ac.ir

Mohammad Maleki³

3- Department of Food Hygiene and Aquaculture, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad (FUM), POBox: 9177948974, Mashhad, Iran

Ayask0946@gmail.com

Abstract

Increasing people's awareness of the harmful effects of chemical preservatives and the emergence of bacterial resistance has made consumers more willing to use natural preservatives in food. Natural preservatives or plant essential oils are widely used in the food industry today as an alternative to synthetic preservatives. The present study was conducted with the aim of evaluating the antimicrobial properties of wild *Nasturtium officinale* plant essential oil against a number of pathogenic bacteria of food origin. For this purpose, the essential oil of the wild *Nasturtium officinale* plant was prepared by the Cloninger machine. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum lethal concentration (MBC) of the essential oil in different concentrations against Gram-positive and Gram-negative bacteria were investigated by microbroth dilution method. In relation to the minimum inhibitory concentration of this essential oil, the most sensitive bacteria against the antibacterial effect of wild *Nasturtium officinale* essential oil were *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. According to this study, the essential oil of the wild *Nasturtium officinale* plant as a plant antimicrobial substance is a suitable alternative to antimicrobial chemical compounds and has good antimicrobial properties against the studied bacteria.

Keywords: wild *Nasturtium officinale*, essential oil, MIC, MBC