

تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی و باکتری کشی اسانس برازمبل در شرایط آزمایشگاهی

سیدمحمدجواد موسوی^۱، محمد محسنزاده^{۲*}، کنایون احمدی^۲

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، رشته بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۲- گروه بهداشت مواد غذایی و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

mohsenzadeh@um.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: طبق تحقیقات انجام شده در سال‌های اخیر، به جهت پیشگیری از آسیب‌های ترکیبات شیمیایی می‌توان از اسانس‌های گیاهی به عنوان ترکیبات ضد میکروبی طبیعی استفاده کرد؛ که علاوه بر این دارای خواص منحصر به فرد دیگری نیز می‌باشند. هدف از این پژوهش، بررسی و ارزیابی ترکیبات شیمیایی اسانس برازمبل با نام علمی *Perovskia abrotanoides* Karel و خاصیت ضد میکروبی امولسیون این اسانس، علیه چند باکتری مهم در صنعت غذا می‌باشد.

مواد و روش‌ها: پس از تهیه اسانس از گل گیاه برازمبل، ترکیبات تشکیل دهنده ی آن با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف سنج جرمی (GC-MS)، مورد شناسایی قرار گرفت. سپس حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت باکتری کشی (MBC) امولسیون اسانس برازمبل بر باکتری‌های *آئروموناس هیدروفیلا*، *باسیلوس سرئوس*، *اشرشیا کلی*، *لیستریا مونوسایتوژنز*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *سالمونلا تایفی موریوم*، *استایلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیا کلی O157:H7* به روش میکروداپلوشن براث تعیین گردید.

یافته‌ها: در بین ترکیبات شیمیایی شناسایی شده در اسانس گل گیاه برازمبل، اوکالیپتول با ۲۴/۵۱ درصد، کامفور با ۲۲/۰۲ درصد و آلفا-پینن با ۱۷/۳۵ درصد، عمده‌ترین ترکیبات مؤثره ی این گیاه بودند. بر طبق یافته‌ها باکتری *باسیلوس سرئوس* نسبت به امولسیون اسانس برازمبل به روش میکروداپلوشن براث بیشترین حساسیت را نشان داد.

نتیجه گیری: امولسیون اسانس برازمبل با توجه به خاصیت ضد میکروبی خوبی که از خود نشان داد، می‌تواند به عنوان نگهدارنده‌ای طبیعی در محصولات مختلف مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: اسانس برازمبل، ضد میکروبی، میکروداپلوشن براث، باکتری کشی.

مقدمه

اسانس‌های گیاهی را می‌توان محصولات ثانویه گیاهان تعریف کرد که دارای ترکیبات پیچیده‌ای هستند. اکثر این ترکیبات در دمای محیط به شکل مایع بوده و ترکیباتی بی‌رنگ و حاوی عطر و طعم می‌باشند. اسانس‌ها ترکیباتی بسیار فرار هستند و استقامت دمایی بالایی نداشته و معمولاً در دماهای کمتر از نقطه جوش آب، تبخیر می‌شوند. این ترکیبات را می‌توان از طریق استخراج با حلال، تقطیر با آب و سایر روش‌ها از بخش‌های مختلف گیاهان مانند ریشه، ساقه، برگ، گل و ... بدست آورد (Sousa et al., 2022). در سال‌های اخیر تقاضا برای استفاده از ترکیبات طبیعی به جای ترکیبات شیمیایی و سنتزی، به عنوان ترکیبات کاربردی در صنایع مختلف در بین مصرف‌کنندگان افزایش یافته است. استفاده از اسانس‌ها به دلایلی از جمله افزایش تقاضا، پذیرش بالاتر آن‌ها توسط مصرف‌کنندگان و مشخص شدن قابلیت‌های ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی آن‌ها، در سال‌های اخیر رو به افزایش است (Sacchetti et al., 2005).

گیاه برازمیل با نام علمی *Perovskia abrotanoides* Karel سرده کوچکی از خانواده نعناعیان است (Mohammadhosseini et al., 2021). برازمیل گیاهی بوته‌ای و معطر است که در مناطقی مانند شرق ایران، پاکستان، افغانستان و ترکمنستان یافت می‌شود (mozaffarian, 2012). پراکندگی این گیاه در ایران در نواحی کوهستانی و بیابانی استان‌های گرگان، اصفهان، سیستان و بلوچستان و شمال خراسان است (mozaffarian, 2012). در طب سنتی ایران، از این گیاه برای درمان لیشمانیوز و همچنین برای تسکین دردهای روماتیسمی و به عنوان خنک‌کننده برای درمان تب استفاده می‌کردند (Mohebbi A, 2011). خاصیت ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی اسانس گیاه برازمیل نیز مورد بررسی قرار گرفته است. اسانس این گیاه در برابر باکتری‌های گرم مثبت مانند *استافیلوکوکوس اورئوس*، تاثیر بیشتری نسبت به باکتری‌های گرم منفی مانند *اشریشیا کلای* دارد (Mohebbi A, 2011).

امولسیون مخلوطی از دو یا چند مایع غیر قابل امتزاج در یکدیگر می‌باشد که از ۲ فاز تشکیل شده است. به یک فاز آن فاز داخلی یا پخش شونده و به فاز دیگر آن، فاز خارجی یا پیوسته می‌گویند (Ahmadi, 2022). اندازه ذرات در امولسیون‌ها به مرور زمان افزایش پیدا می‌کند؛ لذا امولسیون‌ها از نظر ترمودینامیکی ناپایدار هستند (Kale & Deore, 2016).

روش تحقیق

تهیه اسانس برازمیل

در این پژوهش از گل گیاه برازمیل استفاده شد؛ که پس از تهیه آن، در دمای محیط خشک شد و با استفاده از روش تقطیر آبی، اسانس گیری انجام شد و اسانس بدست آمده از آن، درون شیشه‌های تیره رنگ و دور از نور و در دمای یخچالی تا انجام آزمون‌های بعدی نگهداری شد. برای شناسایی اجزای تشکیل‌دهنده ی اسانس بدست آمده، از دستگاه کروماتوگرافی گازی مدل Agilent 6890 متصل به طیف سنج جرمی از نوع Agilent 5973 (GC/MS) استفاده شد (Ahmadi, 2022).

باکتری‌های مورد مطالعه

اثرشیاکلی (ATCC ۲۵۹۲۲)، *لیستریا* (ATCC ۷۹۶۶)، *باسیلوس سرئوس* (ATCC ۱۰۸۷۶)، *اشریشیاکلی* (ATCC ۲۵۹۲۲)، *لیستریا* (ATCC ۷۹۶۴۴)، *سودوموناس آئروژینوزا* (ATCC ۱۰۷۴۴)، *سالمونلا تایفی* (ATCC ۱۴۰۲۸)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC ۲۵۹۲۳) و *اشریشیاکلی* O₁₅₇:H₇ (ATCC ۱۲۹۰۰).

تهیه سوسپانسیون باکتری

باکتری‌ها از کلکسیون میکروارگانیزم‌های گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شدند. در ابتدا از سویه‌های مختلف، در محیط کشت BHI آگار کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه ی سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت انکوباتور گذاری شدند. باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* در جار بی‌هوازی انکوبه شد. برای تهیه ی سوسپانسیون میکروبی با غلظت نیم مک فارلند از دستگاه اسپکتروفوتومتر استفاده گردید. میزان جذب نوری در ۰.۱۲-۰.۰۸ با طول موج ۶۰۰ نانومتر تعیین گردید. سپس از سوسپانسیون تهیه شده به وسیله رقت سازی، غلظت معادل 10^6 CFU/mL تهیه شد.

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) امولسیون اسانس برازمبل

برای تعیین MIC، از روش میکرودايلوشن براث در محیط کشت BHI براث در میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای با چاهک ته گرد استفاده شد. غلظت‌های مختلف از نانوامولسیون اسانس تهیه گردید. در هر ردیف به ستون‌های ۸-۱، ۱۶۰ میکرولیتر از محیط کشت و ۲۰ میکرولیتر باکتری با تعداد 10^6 CFU/mL و ۲۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف اسانس افزوده گردید. ستون‌های شماره ۱۱ و ۱۲ نیز به ترتیب به عنوان کنترل منفی و مثبت در نظر گرفته شدند. برای باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* در جار با شمع سپس انکوباتور با دمای ۲۵ درجه ی سلسیوس به مدت ۲۴-۴۸ ساعت و سایر باکتری‌ها نیز در شرایط هوازی در دمای ۳۷ درجه ی سلسیوس به مدت ۲۴-۴۸ ساعت انکوبه شدند. پس از طی زمان انکوباسیون، جهت بررسی رشد و عدم رشد باکتری در مقایسه با گروه‌های کنترل، معرف تری فنیل تترازولیوم^۱ تهیه شد و میزان ۲۰ میکرولیتر از آن به پلیت‌ها افزوده شد و مجدداً به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه ی سلسیوس اتوکلاو گذاری شد. کمترین غلظتی که در آن هیچ گونه رشد باکتری (عدم نمایان شدن رنگ قرمز) مشاهده نشد، به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) در نظر گرفته شد.

تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC)

برای این منظور، از غلظت‌های بالاتر MIC که در آن‌ها رشد باکتری کنترل شده بود، به پلیت‌های حاوی محیط کشت BHI آگار منتقل و به روش خطی کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه ی سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت انکوباتور گذاری شد. پس از زمان انکوباسیون، کمترین غلظت اسانس که در آن باکتری رشد نداشت (کمتر از پنج پرگنه)، به عنوان MBC در نظر گرفته شد.

نتایج

اسانس برازمبل پس از استخراج با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف سنج جرمی (GC-MS)، مورد آنالیز قرار گرفت و بر طبق این بررسی، ۲۱ ترکیب شیمیایی از این اسانس جداسازی شد. در بین ترکیبات شناسایی شده، اوکالیپتول (Eucalyptol) با ۲۴/۵۱ درصد، کامفور (Camphor) با ۲۲/۰۲ درصد، آلفا پینن (α -Pinene) با ۱۷/۳۵ و ۳-کارن (Carene) با ۱۱/۰۵ درصد عمده ترین ترکیبات مؤثره ی این گیاه شناخته شدند.

نتایج حاصل از بررسی حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) امولسیون اسانس برازمبل در جدول ۱ آمده است. *سالمونلا تایفی موریوم* و *اشرشیا کلی O157:H7* بیشترین مقاومت و *باسیلوس سرئوس* بیشترین حساسیت را نسبت به این اسانس داشته‌اند.

¹ Triphenyltetrazolium (TTC)

جدول ۱- MIC و MBC تعیین شده ی نانوامولسیون اسانس برازمبل

نوع میکروارگانیسم	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)
<i>Salmonella typhimurium</i>	16	32
<i>Escherichia coli</i> O ₁₅₇ :H ₇	16	32
<i>Listeria monocytogenes</i>	4	8
<i>Bacillus cereus</i>	0.5	1
<i>Aeromonas hydrophila</i>	4	8
<i>Escherichia coli</i>	4	8
<i>Staphylococcus aureus</i>	4	8

بحث و نتیجه گیری

در مطالعه‌ای توسط مرتضی سمنانی، (۲۰۰۴)، ۲۱ نوع جزء از اسانس برازمبل جداسازی شد و کامفور با ۳۴/۱ درصد، ۸.۱- سینئول با ۱۸ درصد، β -کاریوفیلین با ۸/۲ درصد و α -هومولن با ۶/۵ درصد، مهم ترین این ترکیبات بودند (Morteza-Semnani, 2004). اختلاف بین مطالعات انجام شده در خصوص نوع و میزان ترکیبات شیمیایی اسانس برازمبل را می‌توان به عواملی مانند ژنتیک، آب و هوا، محل رویش گیاه، روش اسانس‌گیری، اسانس‌های بخش‌های مختلف گیاه و عوامل دیگر مرتبط دانست (Pourhosseini, S. H et al, 2018).

در پژوهشی توسط احمدی و محسن زاده، (۱۴۰۰)، فعالیت بیولوژیکی اسانس برازمبل علیه باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* بررسی شد که بر طبق یافته‌ها، حداقل غلظت بازدارندگی (MIC)، ۴ mg/ml و حداقل غلظت کشندگی (MBC)، ۸ mg/ml گزارش شد که مشخص شد اسانس برازمبل خاصیت ضد میکروبی مطلوبی دارد (احمدی و محسن زاده، ۱۴۰۰). این نتایج با یافته‌های مطالعه ی حاضر مطابقت دارد.

طبق پژوهش‌های مختلف در زمینه ی اسانس‌های گیاهی، مشخص شده است این ترکیبات دارای خواص ضد میکروبی بوده و همچنین برای مصرف کننده ایمن هستند. نتایج این پژوهش و میزان تعیین شده برای حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) امولسیون اسانس برازمبل بر چند نوع باکتری حائز اهمیت در صنعت غذا، نشان دهنده ی حساسیت نسبتا بالای این باکتری‌ها در مقابل اسانس برازمبل و خاصیت ضد میکروبی بالای این اسانس است. بنابراین برازمبل می‌تواند نگهدارنده ی طبیعی موفق و مطلوبی در صنعت غذا و کنترل کننده رشد باکتری‌های پاتوژن غذایی و عفونت باکتریایی حاصل از آن‌ها باشد؛ که سبب ارزش اقتصادی این ترکیب در صنایع مختلفی است.

منابع

احمدی، کتایون و محسن زاده، محمد، ۱۴۰۰، بررسی خصوصیات ضد میکروبی اسانس گیاه برازمبل علیه باکتری بیماری‌زای *آئروموناس هیدروفیلا* به روش میکرودايلوشن براث، دومین همایش ملی صنعت و تجاری سازی کشاورزی، اهواز، <https://civilica.com/doc/1218206>

Ahmadi K, Mohsenzadeh M, Panahi Z, Rezaeian-Doloei R. Investigation of chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of *Perovskia abrotanoides* Kar. essential oil nanoemulsion against important food pathogens. *J Neyshabur Univ Med Sci* 2022;10(1)105-119.

Kale, S. N., & Deore, S. L. (2016). Emulsion micro emulsion and nano emulsion: A review. In *Systematic Reviews in Pharmacy* (Vol. 8, Issue 1). <https://doi.org/10.5530/srp.2017.1.8>



- Mohammadhosseini, M., Venditti, A., & Akbarzadeh, A. (2021). The genus *Perovskia* Kar.: ethnobotany, chemotaxonomy and phytochemistry: a review. In *Toxin Reviews* (Vol. 40, Issue 4). <https://doi.org/10.1080/15569543.2019.1691013>
- Mohebbi A, B. Z. A. H. M. A. (2011). *Investigation on the Effect of Anti - bacterial of the Plant Extract of Perovskia abrotanoides Karel on Number Pathogenic Bacteria and Fungi.*
- Morteza-Semnani, K. (2004). The essential oil composition of *Perovskia abrotanoides* from Iran. *Pharmaceutical Biology*, 42(3), 214–216. <https://doi.org/10.1080/13880200490514078>
- mozaffarian, valiollah. (2012). *Knowing the medicinal and aromatic plants of Iran.* فرهنگ معاصر.
- Pourhosseini, S. H., Mirjalili, M. H., Nejad Ebrahimi, S., & Sonboli, A. (2018). Essential oil quantity and quality of different plant organs from *Perovskia abrotanoides* Karel in natural habitat of North Khorasan province. *Journal of Plant Productions (Agronomy, Breeding and Horticulture)*, 40(4), 53-62.
- Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M., & Bruni, R. (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*, 91(4), 621–632. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.06.031>
- Sousa, V. I., Parente, J. F., Marques, J. F., Forte, M. A., & Tavares, C. J. (2022). Microencapsulation of Essential Oils: A Review. In *Polymers* (Vol. 14, Issue 9). MDPI. <https://doi.org/10.3390/polym14091730>



Determining the minimum inhibitory and bactericidal concentration of *Perovskia abrotanoides* Karel essential oil invitro

Seyed Mohammadjavad Mousavi¹, Mohammad Mohsenzadeh^{2*}, Katayoun Ahmadi²

¹ MSc. Student, Department of Food Hygiene and Aquaculture, Faculty of Veterinary medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

² Department of Food Hygiene and Aquaculture, Faculty of Veterinary medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

mohsenzadeh@um.ac.ir

Abstract

Purpose: According to research conducted in recent years, plant essential oils can be used as natural antimicrobial compounds to prevent the damage of chemical compounds; which in addition have other unique properties. The purpose of this research is to investigate and evaluate the chemical composition of Brazamble essential oil (BEO) with the scientific name *Perovskia abrotanoides* Karel and the antimicrobial property of this essential oil emulsion against some important bacteria in the food industry.

Materials and methods: After preparing the essential oil from the flower of *Perovskia abrotanoides* Karel plant, its constituent compounds were identified using a gas chromatography device connected to a mass spectrometer (GC-MS). Then, the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of BEO emulsion on bacteria *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 by microdilution broth method was determined

Results: among the chemical compounds identified in the essential oil of *Perovskia abrotanoides* Karel flower, Eucalyptol with 24.51%, camphor with 22.02% and alpha-pinene with 17.35% were the most effective compounds of this plant. According to the findings, *Bacillus cereus* bacteria showed the highest sensitivity to BEO emulsion by broth microdilution method.

Conclusion: Due to its good antimicrobial properties, BEO emulsion can be used as a natural preservative in various products.

Key words: *Perovskia abrotanoides* Karel essential oil, antimicrobial, microdilution broth, bactericidal.