جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۱۶، شماره۵، آذر و دی ۱۳۹۰(شماره پی در پی ۶۵)

تعیین ترکیبات شیمیایی و اثرات ضد میکروبی اسانس پونه کوهی علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس

رزاق محمودی[۱]، حسین تاجیک[۲*]، امیر عباس فرشید[۳]، علی احسانی[۲]، پیمان زارع[۴]، مهران مرادی[۵]

[۱] دانشگاه تبریز، دانشکده دامپزشکی، گروه بهداشت مواد غذایی و آبزیان، [۲] دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، [۳] دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، گروه پاتوبیولوژی، [۴] دانشگاه تبریز، دانشکده دامپزشکی، گروه پاتوبیولوژی، [۶] دانشگاه تبریز، دانشکده کشاورزی اهر، گروه علوم و صنایع غذایی

تاریخ دریافت:۱۳۹۰/۲/۲ تاریخ پذیرش:۹۰/۵/۱۸

چکیده

زمینه و هدف: با توجه به افزایش مقاومت دارویی میکروارگانیسم‌ها و تمایل به استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی، هدف از این مطالعه تعیین ترکیبات شیمیایی و اثرات ضد میکروبی اسانس پونه کوهی علیه استافیلوکوکوس اورئوس بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی ترکیب‌های شیمیایی اسانس پونه کوهی با استفاده از روش گازکروماتوگرافی متصل به طیف نگار جرمی، فعالیت ضد باکتریایی آن (تعیین حداقل غلظت ممانعت از رشد) علیه استافیلوکوکوس اورئوس به روش میکرودایلوشن و تغییرات مورفولوژی و ساختمان غشاء سلولی این باکتری با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره ارزیابی شدند. داده‌ها با آزمون آماری آنالیز واریانس تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: آنالیز شیمیایی اسانس پونه کوهی منجر به شناسایی ۲۲ ترکیب با مجموع ۹۵/۳ درصد در آن شد. پولگون(۳۱/۵٤درصد)، ۱ـ۸ سینئول(۱۵/۸۹ درصد)، منتوفوران (۱۱/۸ درصد) و سیس ایزو پولگون (۹/۷٤ درصد) ترکیب‌های عمده اسانس را تشکیل می‌دادند. حداقل غلظت ممانعت از رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در محدوده ۷۵ تا ۱۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر قرار داشت.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد اسانس پونه کوهی از توان ضد میکروبی بسیار بالایی برخوردار است، بنابراین می‌توان از آن در ترکیب با سایر نگهدارنده‌ها جهت محافظت مواد غذایی در مقابل میکروارگانیسم‌های عامل عفونت و مسمومیت بهره جست.

واژه های کلیدی: پونه کوهی، اسانس، استافیلوکوکوس اوروئوس

[*] **نویسنده مسئول: حسین تاجیک**، ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی
Email: **h.tajik@urmia.ac.ir**

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

افزایش مقاومت دارویی میکروارگانیسم‌ها و عدم کفایت داروهای شیمیایی معمول مورد استفاده در درمان بیماری های عفونی از یک سو و افزایش آگاهی و توجه هر چه بیشتر مصرف کنندگان و متولیان بهداشتی به اثرات مضر نگهدارنده‌های غذایی شیمیایی و سنتتیک از سوی دیگر، موجب انجام تحقیق‌های گسترده جهت دستیابی به ترکیب‌های طبیعی با دامنه وسیع فعالیت‌های بیولوژی مشتق از منابع گیاهی، حیوانی و میکروبی شده است، تا علاوه بر افزایش ماندگاری غذا از اثرات مضر نگهدارنده‌های شیمیایی مصون باشند(۲ و ۱). اثرات ضد میکروبی اسانس‌های گیاهی علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی در بسیاری از مطالعه‌ها تأیید شده و در بسیاری از موارد این خصوصیات را در ارتباط با حضور اجزای فعال مونوترپن‌ها گزارش نموده‌اند(٤و٣).

مکانیسم عملکردی اسانس‌ها در ارتباط با ترکیب شیمیایی و فعالیت ضد میکروبی آنها بوده، ولی در تمامی‌موارد از مکانیسم مشابهی برخوردار نیستند، با وجود این در اغلب موارد تأثیر اسانس‌های گیاهی بر ساختار دیواره سلولی تأیید شده است(۵). ویژگی آب‌گریزی اسانس‌ها سبب نفوذ آنها در لیپید غشاء سلولی و افزایش نفوذپذیری آن می‌گردد، که این امر سبب اختلال در کلیه فعالیت‌های حیاتی وابسته به غشای سلولی، خروج یون‌ها، ترکیب‌های حیاتی و در نهایت مرگ سلول خواهد شد (۶ و۵). اثرات سمی روی ساختار و عملکرد غشاء به طور کلی توجیه کننده عملکرد ضد میکروبی اسانس‌های گیاهی و ترکیب‌های مونوترپنیدهای آنها می‌باشد(۴).

مسمومیت غذایی استافیلوکوکی از مهم‌ترین مسمومیت‌های غذایی به شمار می‌آید، به طوری که از مجموع حدود ٢٤ میلیون مورد کل مسمومیت‌های غذایی گزارش شده در کشور ایالات متحده امریکا ۸/۹ میلیون مورد آن مربوط به استافیلوکوکوس اورئوس بوده که بیش از یک سوم موارد کل مسمومیت‌های غذایی در این کشور است(۸ و۷). به طور کلی، گزارش‌های اخیر حاکی از آن است که این میکروارگانیسم از مهم‌ترین باکتری‌های بیماری‌زا در ارتباط با صنایع فرآورده‌های شیر و گوشت و بسیاری از مواد غذایی دیگر می‌باشد(۹). از آنجا که استافیلوکوکوس اورئوس توزیع بسیار گسترده‌ای داشته و حذف کامل آن در بعضی غذاها غیر ممکن است، کنترل رشد آن در غذا ضروری است. بنابراین تلاش برای یافتن نگهدارنده مناسب جهت جلوگیری از رشد این باکتری خواهد بود(۱۰).

گیاه پونه کوهی[1] از اعضای خانواده لامیناسه[2] بوده و به صورت یک گیاه چند ساله می‌باشد. این جنس شامل بیش از ۲۵ گونه است و به صورت وحشی در مناطق مرطوب نواحی مرکزی و جنوب اروپا، جنوب غربی آسیا و شمال آفریقا می‌روید(۱۱). از قسمت‌های مختلف این گیاه در ترکیب ادویه جات تجاری به عنوان طعم دهنده در غذا استفاده می‌شود(۱۲). خصوصیات

1-Mentha longifolia L.
2-Laminacea

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

درمانی گیاه پونه کوهی در برطرف کردن اختلالات گوارشی، استفراغ، بی اشتهایی، کولیت اولسراتیو و اختلالات کبدی به اثبات رسیده است(۱۴و۱۳). امروزه خصوصیت ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی اسانس و عصاره بسیاری از گونه‌های گیاه پونه کوهی شامل؛ منتا پیپریتا، منتا روتوندیفولیا، منتا پولگیوم و منتا لونگیفولیا ثابت شده است(۱۶و۱۵).

اغلب تحقیقات در زمینه اثرات ضد میکروبی اسانس‌ها ابتدا در محیط آزمایشگاهی انجام گرفته و سپس خصوصیات کاربردی آنها در مدل های غذایی ارزیابی شده است. لزوم به کارگیری غلظت‌های بالاتر اسانس در غذا در مقایسه با شرایط آزمایشگاهی نشان دهنده پیچیده بودن شرایط رشد در غذا است که می‌تواند اثرات محافظتی روی سلول‌های میکروبی در مقابل ترکیب‌های ضد میکروبی داشته باشد، این امر از یک طرف به دلیل تأثیرات نامطلوب ارگانولپتیکی در غذا و از سوی دیگر به علت اقتصادی نبودن استفاده از یک نگه دارنده به تنهایی در مقایر زیاد، موجب محدود شدن کاربرد اسانس‌های گیاهی به تنهایی در مواد غذایی شده است(۱۸و۱۷). در جهت تأیید فواید کاربرد محافظت کننده‌ها و ترکیب‌های ضد میکروبی طبیعی، بایستی این ترکیب‌ها به تنهایی یا به صورت توأم با سایر فاکتورهای محافظتی مواد غذایی، برای ایجاد اثرات سینرژیستی مورد بررسی قرار گیرند(۱۹).

با توجه به موارد فوق، در صورت استفاده مواد نگهدارنده در یک سیستم ترکیبی می‌توان از ابعاد صرفه اقتصادی تولید محصولات غذایی و نیز از بهداشت و سلامت آن اطمینان حاصل نمود.

هدف از این مطالعه تعیین ترکیب‌های شیمیایی و اثرات ضد میکروبی اسانس پونه کوهی علیه استافیلوکوکوس اورئوس بود.

روش بررسی

این مطالعه تجربی از آبان ماه سال۱۳۸۹ به صورت مشترک در دانشگاه ارومیه و تبریزآغاز شد، گیاه پونه کوهی پس از جمع‌آوری به وسیله گروه گیاه‌شناسی پژوهشکده گیاهان دارویی تهران وابسته به جهاد دانشگاهی دانشگاه علوم پزشکی تهران از نظر صحت نام علمی تأیید شد. به منظور استخراج اسانس گیاه پونه کوهی، بخش‌های گیاه خشک شده کاملاً آسیاب گردید و با استفاده از یک دستگاه کلونجر به مدت ۳ ساعت روغن آن به روش تقطیر با آب، استخراج شد. پس از آب‌گیری به وسیله سولفات سدیم خشک، تا هنگام تعیین خواص ضد باکتریایی آن و همچنین تشخیص و تعیین ترکیب‌های تشکیل دهنده، اسانس در ظروف شیشه‌ای تیره و در دمای یخچال نگهداری گردید.

نمونه‌های آماده شده به دستگاه کروماتوگرافی گازی تزریق شد و مناسب‌ترین برنامه‌ریزی دمایی ستون برای جداسازی کامل ترکیب‌های اسانس به دست آمد. همچنین درصد ترکیب‌های تشکیل دهنده اسانس و شاخص بازداری هر ترکیب محاسبه گردید. سپس اسانس به دستگاه

گاز کروماتوگرافی متصل به طیف نگار جرمی نیز تزریق شده و طیف جرمی ترکیب‌ها به دست آمد. شناسایی ترکیب‌های اسانس با استفاده از شاخص بازداری و بررسی طیف های جرمی‌هر یک از اجزای اسانس و مقایسه آنها با طیف های مرجع انجام شد. در این مطالعه دستگاه گازکروماتوگراف از نوع Agilent 6890 با ستون مویینه به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه داخلی۰/۲۵ میکرومتر از نوع HP-5MS با برنامه دمایی ستون در ابتدا به صورت ۵۰ درجه سانتی‌گراد با توقف ۵ دقیقه در این دما و سپس افزایش دما تا ۲٤۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۵ درجه در هر دقیقه، و افزایش دمای ستون تا ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه استفاده شد. دمای اتاقک تزریق ۲۹۰ درجه سانتی‌گراد بود و از گاز هلیوم به عنوان گاز حامل با سرعت جریان ۰/۸ میلی لیتر در دقیقه استفاده شد. طیف نگار جرمی مورد استفاده مدل Agilent 5973 با انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت و شناساگر EI و دمای منبع یونیزاسیون ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد بود.

ارزیابی حداقل غلظت ممانعت کننده رشد[1] این اسانس تحت تأثیر فاکتورهای ذکر شده بر روی استافیلوکوکوس اورئوس بر اساس روش توصیف شده گولوس وهمکاران[2](۲۰۰۷) انجام شد(۱۷). ابتدا کشت باکتریایی در محیط آبگوشت قلب و مغز[3] به مدت ۱۲ ساعت انجام شد، سپس سوسپانسیون باکتریایی با استاندارد ۰/۵ مک فارلند تنظیم گردید. اسانس گیاه مذکور در محلول دی متیل سولفوکساید ۱۰ درصد در بالاترین غلظت مورد استفاده در این تحقیق(۴۸۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) حل گردید، سپس ۶ رقت متوالی از این اسانس به صورت رقت های سریالی در محدوده ۴۸۰۰ــ ۷۵ میکروگرم در میلی لیتر در لوله‌های آزمایش استریل حاوی ۱۰ میلی‌لیتر براث تهیه شد.

حداقل غلظت‌های ممانعت کننده اسانس پونه کوهی بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بر اساس روش میکرو ول دایلوشن[4] تعیین شد(۱۷). در هر چاهک میکروپلیت مقدار ۹۵ میکروگرم نوترینت براث و۵ میکروگرم از کشت باکتری استاندارد شده با ۰/۵ مک فارلند اضافه شد. در ادامه ۱۰۰ میکروگرم از محلول‌های استوک آماده شده اسانس با غلظت‌های مورد مطالعه به ترتیب از بالاترین غلظت در هر چاهک اضافه شد. لازم به ذکر است که در هر سری آزمایش در هر کدام از فازهای یاد شده، کنترل مثبت و کنترل منفی در نظر گرفته شد. برای تنظیم pH محیط کشت از اسید استیک ۱ نرمال استفاده شد. در ادامه میکروپلیت‌ها به مدت ۲۰ ثانیه با دور ۳۰۰ دور در دقیقه شیک شده و در دماهای ۸، ۱۵ و۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شدند. سپس در پایان زمان انکوباسیون(۲٤ ساعت) مقادیر حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد و حداقل غلظت کشنده باکتری بر حسب میکروگرم به ازای میلی‌لیتر

1-Minimum Inhibitory Concentration (MIC)
2-Gulluce et al
3-Brain Heart Infusion Broth (BHI)
4-Micro-Well Dilution Assay

محاسبه شدند. رشد میکروبی از طریق بررسی میزان جذب نوری در طول ۶۰۰ نانومتر ارزیابی شد. جهت تأیید میزان ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر از محتویات چاهک‌های شفاف روی محیط نوترینت آگار کشت داده شد.

برای ارزیابی تغییرات مورفولوژی و ساختمان غشای سلولی، باکتری استافیلوکوکوس اورئوس با میکروسکوپ الکترونی گذاره [1]، ابتدا باکتری به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در محیط آبگوشت مغز و قلب گرم‌خانه‌گذاری شد، سپس سوسپانسیون باکتریایی رشد نموده با استاندارد ۰/۵ مک فارلند تنظیم شد. میزان ۱ میلی‌لیتر از این سوسپانسیون به لوله حاوی ٤ میلی‌لیتر محیط نوترینت براث منتقل و به مدت ۲٤ ساعت تحت تأثیر غلظت ۳۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر این اسانس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شیکر انکوباتور گرم‌خانه‌گذاری گردید. سپس نمونه باکتریایی پس از برداشت از محیط کشت، به وسیله محلول گلوترآلدهید ۲/۵ درصد به مدت ۲ ساعت در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد فیکس اولیه شد. نمونه با محلول بافر فسفات ۰/۱ (pH=۷/۲) ۳ بار شتشو داده شد و پلت‌های باکتریایی به کمک سانتریفیوژ با دور پایین (۳۰۰۰ دور در دقیقه) به مدت ۱۰ دقیقه تهیه شدند. به منظور فیکساسیون ثانویه، نمونه به مدت یک ساعت در محلول تتروکساید اوسمیوم یک درصد قرار داده شد. در ادامه نمونه ۳ بار به وسیله محلول بافر فسفات شتشو شده و پس از آب‌گیری در غلظت‌های الکل (استون) در رزین TAAB embedding قالب‌گیری و سپس در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت حداقل ۴۸ ساعت پلیمیریزه شد. مقاطع با ضخامت ۵۰ نانومتر به وسیله دستگاه اولتراتوم مدل LKB 4801A تهیه شد و دو بار با محلول ۲۰ درصد استات اورانیل در متانول خالص و محلول رینولد (سیترات سدیم و نیترات نقره) به مدت ٤۵ دقیقه رنگ‌آمیزی گردید. در نهایت نمونه به وسیله میکروسکوپ الکترونی گذاره (PHILIPS BIOTWIN 100) در ۷۵ کیلو ولت مورد مشاهده قرار گرفت و الکترون میکروگراف ها تهیه شد.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS [2] و آزمون آماری آنالیز واریانس [3] تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

بر اساس نتایج حاصله ۲۲ ترکیب از اسانس استخراج شده به وسیله تقطیر با آب شناسایی شدند که ۹۵/۳ درصد اسانس را شامل شد. از بین آنها پولگون (۳۱/٥٤ درصد)، ۱-۸ سینئول (۱۵/۸۹ درصد)، منتوفوران (۱۱/۸ درصد) و سیس ایزو پولگون (۹/۷٤ درصد) ترکیب‌های عمده موجود در اسانس گیاه را تشکیل دادند (جدول۱).

1-Transmission Electron Microscope (TEM)
2-Statistical Package for Social Sciences
3-Analysis of Variance(ANOVA)

حداقل غلظت مهارکننده رشد در تیمارهای مختلف ذکر شده در این مطالعه (شرایط مختلف دمایی و pH) در محدوه ۱۲۰۰- ۷۵ میکروگرم در میلی‌لیتر قرار داشت. بیشترین میزان ممانعت از رشد استافیلوکوکوس اورئوس در تیمار دمایی ۸ درجه سانتی‌گراد و pH=۶ به میزان ۷۵ میکروگرم در میلی‌لیتر غلظت اسانس مشاهده شد. با کاهش مقایر pH و دما تأثیر ضد میکروبی اسانس افزایش یافت. با بالا رفتن دما و pH افزایش هم‌سو در هر دو مورد حداقل غلظت‌های ممانعت از رشد و کشندگی اسانس کاملاً مشهود بود، به گونه‌ای که در تیمار دمایی ۳۵ درجه سانتی‌گراد و pH= ۷/۳ میزان حداقل غلظت ممانعت از رشد ۱۲۰۰میکروگرم در میلی‌لیتر بود(جدول۲).

در گروه کنترل سلول‌های استافیلوکوکوس اورئوس دارای ساختار مشخص یک باکتری گرم مثبت و به شکل کوکوسی با سطح دیواره سلولی بودند (تصویر۱). الکترون میکروگراف‌های سلول‌های استافیلوکوکوس اورئوس تیمار شده با اسانس آسیب‌های شدید مورفولوژی و نیز غشاءهای سلولی تخریب شده با نفوذپذیری بالا نسبت به رنگ و هم‌چنین تهی شدن محتویات سلولی و بی‌نظم شدن آن را تأیید نمود(تصاویر۲ و۳). هم‌چنین در سلول‌های استافیلوکوکوس اورئوس تیمار شده با اسانس برخی از دیواره‌های سلولی به طور کامل از بین رفته و از سلول باکتری جدا شده‌اند(تصویر۴). نقص و فقدان در بخش‌هایی از دیواره سلولی به همراه تخریب و گسیختگی آن در بسیاری از سلول‌های باکتری تیمار شده با اسانس مشهود بود.

بحث

پائین بودن دوز عفونت‌زایی بسیاری از پاتوژن‌های غذا زاد، نیازمند تحقیقات گسترده در زمینه ترکیب‌های دارویی جدید با توان باکتری کشی بالا بوده که در جهت نیل به این هدف استفاده از ترکیب‌های روغنی حاصل از گیاهان و ادویه جات جهت تأمین سلامت و بهداشت غذا بسیار حایز اهمیت می‌باشد، در این راستا آگاهی و شناخت مکانیسم‌های عملکردی این ترکیب‌ها، می‌تواند در تشخیص میکروارگانیسم‌های حساس و افزایش کارایی این ترکیب‌ها در سیستم‌های غذایی بسیار مفید و تأثیر گذار باشد(۲۰). هدف از این مطالعه تعیین ترکیب‌های شیمیایی و اثرات ضد میکروبی اسانس پونه کوهی علیه استافیلوکوکوس اورئوس بود.

بالاترین ترکیب موجود در اسانس پونه کوهی به کار رفته در این مطالعه پولگون بود که اثرات ضد میکروبی آن در مطالعه‌های مختلف گزارش شده است(۲۳-۲۱). در مطالعه صورت گرفته بر روی خصوصیات اسانس گیاه منتا پیپریتا، ترکیب منتول موجود در اسانس نقش بسیار مهمی در فعالیت ضد میکروبی آن داشت(۱۷). در مطالعه حاضر نیز این ترکیب با میزان ۷ درصد در اسانس حضور داشت.

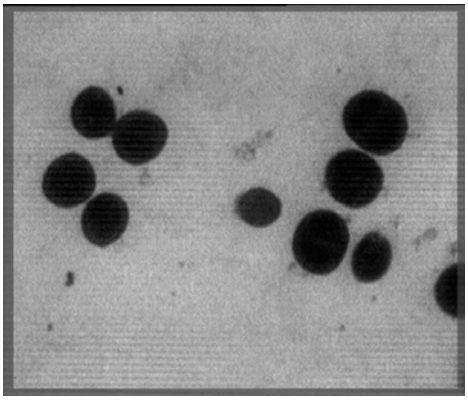
جدول ۱: ترکیب‌های شیمیایی اسانس پونه کوهی، زمان بازداری و شاخص بازداری آنها با استفاده از دستگاه کروماتوگراف گازی متصل به طیف نگار جرمی

نام ترکیب	درصد	زمان بازداری(دقیقه)	شاخص بازداری
آلفاپینن	۱/۸۶	۱۰/۸۶	۹۳۹
کامفن	۰/۵۷	۱۱/۵۲	۹۵۳
سابینن	۰/۵۲	۱۲/۸۱	۹۷۶
۲-بتاپینن	۳/۰۷	۱۲/۹۵	۹۸۰
بتامیرسن	۰/۵۰	۱۳/۷٤	۹۹۱
۳-اکتانول	۰/٦۰	۱۳/۹٦	۹۹۳
۱و۸ سینئول	۱۵/۸۹	۱۵/۸۱	۱۰۳۱
پارامنتا-۳ و۸-دیئن	۰/۵٤	۱۷/۷۰	۱۰٦۸
ایزوپنتیل-۲-منتیل بوتانوات	۰/۹۱	۱۹/۲۹	۱۰۹۹
پارامنت-۳-ان-۸-ال	۷	۲۱/٦۵	۱۱٤۹
منتوفوران	۱۱/۱۸	۲۲/٤۳	۱۱٦۳
سیس ایزو پولگون	۹/۷٤	۲۳/۰۱	۱۱۷۵
بورنئول	۱/۰۱	۲۳/۷٦	۱۱۹۰
نئو ایزو دی هیدروکاروئول	۱/۷۸	۲۵/۱۸	۱۲۲۰
پولگون	۳۱/۵٤	۲٦/۳۳	۱۲٤۵
۲-سیکلوهگزان-۱-وان	۳/۸۰	۳۰/۷۷	۱۳٤۲
۱-دسن	۱/۵۸	۳۱/۱۳	۱۳۵۰
پیپریتونون اکساید	۰/۳٤	۳۱/۷٤	۱۳٦٤
سیس جاسمون	۰/٤۰	۳۳/۱۱	۱۳۹۵
۱و٤-بنزن دی آمین	۰/۳۵	۳۷/۰۲	۱٤۸۹
اسپاتولنول	۰/۵۲	٤۰/٤۵	۱۵۷۵
کاریوفیلن اکساید	۱/٦۰	٤۰/٦۷	۱۵۸۰

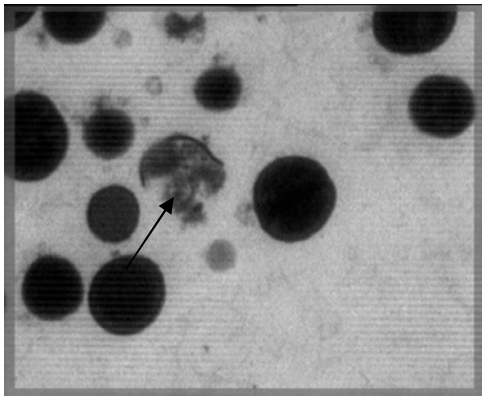
جدول ۲: مقایسه نتایج ضد میکروبی اسانس پونه کوهی بر استافیلوکوکوس اورئوس تحت شرایط مختلف دمایی و pH

pH	دما (سانتی‌گراد)	حداقل غلظت ممانعت کننده (میکروگرم بر میلی لیتر)	حداقل غلظت کشنده باکتری (میکروگرم بر میلی لیتر)
٦؛	۳۵	٦۰۰	۲٤۰۰
	۱۵	۱۵۰	٦۰۰
	۸	۷۵	۱۵۰
۷/۳؛	۳۵	۱۲۰۰	-*
	۱۵	٦۰۰	۲٤۰۰
	۸	۳۰۰	٦۰۰

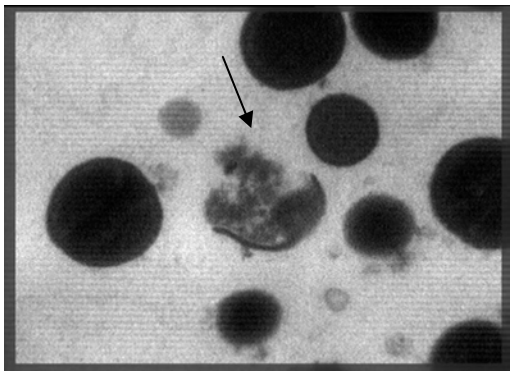
*ممانعت از رشد در حداکثر غلظت به کار رفته اسانس مشاهده نشد.



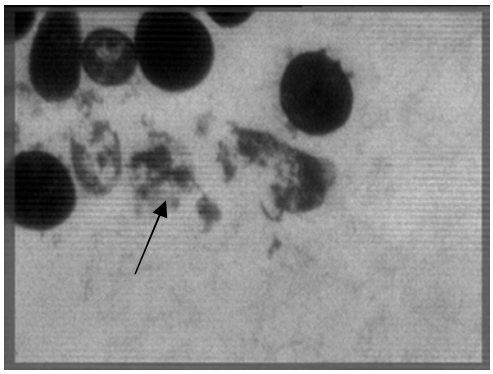
تصویر ۱: گروه کنترل، استافیلوکوکوس اورئوس با شکل طبیعی (کوکسی مانند) با دیواره سالم و سطح یکنواخت(میکروسکوپ الکترونی، بزرگنمایی ۵۸۰۰)



تصویر ۲: گروه تیمار، تغییر شکل طبیعی سلول باکتری، تخریب دیواره سلولی و خروج محتویات آن(میکروسکوپ الکترونی، بزرگنمایی ۵۸۰۰)



تصویر ۳: گروه تیمار، از بین رفتن بخشی از دیواره سلولی، تغییر در دانسیته محتویات سیتوپلاسم سلول باکتری(میکروسکوپ الکترونی، بزرگنمایی ۵۸۰۰)



تصویر ۴: گروه تیمار، از بین رفتن شکل طبیعی سلول، تخریب کامل ساختار دیواره سلولی و انعقاد محتویات سیتوپلاسمی(میکروسکوپ الکترونی، بزرگنمایی ۵۸۰۰)

بررسی اثرات باکتری کشی اسانس منتا لونگیفولیا علیه میکروارگانیسم‌های اشرشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس و کاندیدا آلبیکانس نشان داد که نقش ترکیب ۸ و ۱ سینئول در این زمینه بسیار مهم و حایز اهمیت می‌باشد(۲۴). در مطالعه حاضر نیز بر اساس نتایج حاصل ترکیب ۱ـ۸ سینئول با ۱۵/۸۹ درصد یکی از ترکیب‌های عمده موجود در اسانس بوده که می‌تواند در زمینه فعالیت ضد میکروبی آن نقش بسیار مهمی را ایفا نماید. توان بالای ضد میکروبی اسانس گیاه پونه کوهی علیه طیف وسیعی از باکتری‌ها از جمله؛ گونه‌های مختلف استافیلوکوکوس، پسودوموناس، باسیلوس و اشرشیا کلی و نیز برخی از گونه‌هایی قارچی از قبیل؛ آسپرژیلوس، فوزاریوم و پنی سیلیوم مشخص شده است(۱۷).

با توجه به نتایج به دست آمده به وسیله بستی و همکاران[1](۲۰۰۷) در ارزیابی تأثیر اسانس

1- Basti et al

آویشن شیرازی، pH و دما روی سالمونلا تیفی موریوم و استافیلوکوکوس اورئوس مشخص شد که فعالیت مهاری اسانس با کاهش pH در تیمارهای مختلف دمایی افزایش می‌یابد، یافته‌های این مطالعه نشان داد که اثرات ضد میکروبی اسانس در pH های مختلف به کار رفته به هنگام کاهش دمای گرم‌خانه گذاری به ترتیب از ۳۵ به ۲۵ و ۱۵ افزایش می‌یابد. بیشترین خاصیت مهار رشد در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد به صورت ترکیبی در تیمارهای مختلف pH و غلظت‌های اسانس مشاهده شد(۲۵). در این تحقیق نیز با کاهش pH و دما قدرت ضد میکروبی اسانس علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس افزایش یافت که این امر می‌تواند در ارتباط با تأثیر مستقیم pH پایین روی حلالیت بهتر اسانس روغنی در فاز چربی غشای سلولی باکتری باشد(۲۶).

فعالیت ضد میکروبی اسانس گیاه پونه کوهی علیه برخی میکروارگانیسم‌های پاتوژن و نیز بررسی مورفولوژی ساختاری این ارگانیسم ها تحت تأثیر اسانس به طریق میکروسکوب نیروی اتمی[1] به وسیله هافده و همکاران[2](۲۰۱۰) ارزیابی گردید. در بررسی‌های صورت گرفته بر روی مورفولوژی و دیواره سلولی باکتری‌های پاتوژن تحت تأثیر غلظت‌های حداقل غلظت ممانعت از رشد این اسانس، صدمات و آسیب‌های شدید مشاهده شد که این خود دلیلی بر توان بالای ضد میکروبی اسانس می‌باشد، صدمات شدید و بزرگی در سلول‌های باکتریایی اشرشیاکلی و سالمونلا تیفی موریوم در مقایسه با صدمات کمتر و خفیف در استافیلوکوکوس اورئوس و میکروکوکوس لوتئوس ۲۴ ساعت بعد از تیمار با اسانس مشاهده گردید(۲۷). اثرات اسانس آویشن شیرازی و نیسین علیه باکتری‌های سالمونلاتیفی موریوم و استافیلوکوکوس اورئوس در یک مدل سیستم غذایی به همراه تأثیرات آنها بر مورفولوژی و ساختمان دیواره سلولی باکتری‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی مطالعه شده است. بر اساس نتایج به دست آمده این اسانس از فعالیت ضد میکروبی مناسبی علیه هر دو باکتری برخوردار بوده، به گونه‌ای که در بررسی تصاویر میکروسکوپی الکترونی نیز تخریب دیواره سلولی، خروج محتویات سیتوپلاسمی و حتی انعقاد بخشی از آن مشاهده شده است، که این یافته‌ها مؤید فعالیت ضدمیکروبی اسانس آویشن شیرازی می‌باشد(۲۸).

در مطالعه انجام شده به وسیله رسولی و همکاران (۲۰۰۶) خصوصیات ضد قارچی اسانس برخی گونه های آویشن بر روی آسپرژیلوس نیجر از طریق تعیین حداقل غلظت ممانعت از رشد و بررسی تغییرات مورفولوژی و ساختار سلولی به وسیله میکروسکوپ الکترونی ارزیابی شد، نتایج نشان دهنده تغییرات بسیار شدید و گسترده هیف‌ها، دیواره سلولی، غشای سیتوپلاسمی و محتویات این قارچ بود که مؤید توان بالای ضد میکروبی این اسانس می‌باشد(۲۹).

1-Atomic Force Microscope(AFM)
2-Hafedh et al

در مورد نحوه عمل اسانس‌ها در مرگ باکتری‌های بیماری‌زا چنین اظهار شده است که یکی از ویژگی‌های مهم این مواد و ترکیب‌های آن خاصیت آب گریزی است که سبب می‌شود در بخش‌های لیپیدی دیواره سلولی و میتوکندریایی باکتری توزیع شده و موجب تغییر و تخریب ساختمان و نفوذپذیری بیشتر آنها گردد(۳۰). به دنبال آن بخش زیادی از یون‌ها و دیگر محتویات حیاتی سلول به بیرون تراوش می‌نماید که در نهایت منجر به مرگ باکتری می‌شود(۳۱). هم‌چنین این ترکیب‌ها قادر به ایجاد اختلال در عملکرد آنزیم‌های متصل به غشاء سلولی بوده که نهایتاً منجر به ایجاد نقص در سنتز بسیاری از ترکیب‌های پلی ساکاریدی دیواره سلولی و ممانعت از رشد سلول و مورفوژنز آن خواهد شد(۳۲).

در مطالعه حاضر بر اساس نتایج به دست آمده از بررسی‌های میکروسکوب الکترونی گذاره تغییر حالت طبیعی مورفولوژی و ساختار دیواره سلولی باکتری کاملاً مشهود بود. در حالی که در نمونه کنترل دیواره سلولی ظاهری طبیعی داشت. تغییر در ضخامت دیواره سلولی، گسیختگی و ایجاد حالت حفره در بخش‌هایی از آن وجود داشت. این نتایج در بسیاری از تحقیقات صورت گرفته بر روی خصوصیات ضد میکروبی اسانس‌ها و نیز بررسی‌های میکروسکوپی مورفولوژی و ساختمان دیواره سلولی گزارش شده است. تغییرات مشاهده شده در مورفولوژی و ساختمان سلولی این باکتری در حالت‌های قبل و بعد از تیمار با اسانس پونه کوهی از طریق بررسی‌های میکروسکوب الکترونی گذاره آسیب ها و صدمات بسیار شدید را تأیید کرده و هم‌چنین نشان می‌دهند که احتمالاً اگزوپلی ساکاریدهای موجود در غشای خارجی سلول حل گردیده و به بیرون ترشح شده و یا غشای سیتوپلاسمیک و پپتیدوگلیکان تغییر یافته و از حالت طبیعی خارج شده است(۲۹ و ۲۷).

نتیجه‌گیری

نتایج به دست آمده در بخش تعیین حداقل غلظت ممانعت از رشد و نیز تغییرات مشاهده شده در بررسی‌های مورفولوژی و ساختمان دیواره سلولی با استفاده از میکروسکوب الکترونی گذاره نشان دهنده توان بالای ضد میکروبی اسانس پونه کوهی علیه استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد. بنابراین با توجه به نتایج حاصل از پژوهش حاضر استفاده از اسانس این گیاه می‌تواند در جهت محافظت از غذا و کنترل میکروارگانیسم‌های عامل فساد و پاتوژن، به جای نگهدارنده‌های شیمیایی و مصنوعی و نیز کنترل بیماری‌های میکروبی انسان و گیاهان در ترکیب با سایر نگهدارنده‌های طبیعی مورد توجه و بررسی بیشتری قرار گیرد.

تقدیر و تشکر

این مطالعه با همکاری مشترک دانشکده‌های دامپزشکی دانشگاه ارومیه و تبریز انجام شد.

REFERENCES:

1.Abad MJ, Ansuategui M, Bermejo P. Active antifungal substances from natural sources. Archivoc 2007;7: 116-145.
2.Hausner M, Wuertz S. High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative in situ analysis. Appl Environ Microbiol 1999; 65: 3710-13.
3.Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- a review. Int J Food Microbiol 2004; 94: 223-53.
4.Morris JA, Khettry A, Seitz EW. Antimicrobial activity of aroma chemicals and essential oils. J Am Chem Soc 1979; 56: 595-603.
5.Knobloch K, Pauli A, Iberl B. Antibacterial activity and antifungal properties of essential oil components. J Essent Oils Res 1988; 1: 119-28.
6.Palmer AS, Steward J, Fyfe L. The potential application of plant essential oils as natural preservatives in soft cheese. Food Microbiology 2001; 18: 463-70.
7.Gill AO, Holley RA, Disruption *E. Coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. Int J Food Microbiol 2006; 108: 1-9.
8.Ultee A, Kets EPW, Alberda M. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. Arch Microbiol 2000; 174(4): 233-8.
9.Ultee A, Bennik HJ, Moezelaar R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus.* Applied And Environmental Microbiology 2002; 68: 1561-8.
10.Lambert RJW, Skandamis PN, Coote P. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. J Appl Microbiol 2001; 91: 453-62.
11.Jay MJ. Modern Food Microbiology. 7th ed. An Aspen Publication:Texas; 2005; 323,441-6.
12.Normanno G. Coagulase-positive Staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. International Journal of Food Microbiology 2005; 98: 73-9.
13.Nunez M, Rodriguez JL, Garcia E, Gaya P, Medina M. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by enterocin 4 during the manufacture and ripening of Manchego cheese. Journal of Applied Microbiology 1997; 83: 671-7.
14.Blackburn CW, Peter JM. Foodborne Pathogens, Hazard, risk analyses and control, food protection 2002; 8: 385-90.
15.Lange BM, Croteau, R. Genetic engineering of essential oil production in mint. Current Opinion in Plant Biotechnology 1999; 2: 139-44.
16.Moreno L, Bello R, Primo-Yufera E, Esplugues J. Pharmacological properties of the methanol extract from Mentha suaveolens Ehrh. Phytotherapy Research 2002; 16: 10-13.
17.Gulluce M, Sahin F, Sokmen M, Ozer H, Daferera D, Sokmen A, et al. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *mentha longifolia* L ssp. *longifolia* Food Chem 2007; 103: 1449-56.
18.Codd LE. The genus *Mentha*. Flora of Southern Africa 1985; 28(4): 107-11.
19.Daferera DJ, Ziogas BN, Polissiou MG. The effectiveness of plant essential oils on the growth of Botrytis cinerea, Fusarium sp. and Clavibacter michiganensis subsp. Michiganensis Crop Protection 2003; 22, 39–44.
20.Kaur C, Kapoor, HC. Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. International Journal of Food Science and Technology 2002; 37(2): 153-61.
21.Arques JL, Rodriquez E, Gaya P, Medina M, Nunez M. Effect of combinations of high pressure Treatment and bacteriocin producing lactic acid bacteria on survival of *listeria monocytogenes* in raw milk cheese. International Dairy Journal 2005; 15: 898-900.
22.Zhang CY, Yam KL, Chikindas ML. Effective control of Listeria monocytogenes by combination of nisin formulated and slowly released in to a broth system. International Journal of Food Microbiology 2004; 90: 22-5.
23.LopezMalo A, Alzamora SM, Argaiza A. Vanillin and Ph synergistic effect on mold growth. J Food Sci 1998; 63: 143-6.
24.Gill AO, Holley RA. Disruption of *E coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. Int J Food Microbiol 2006; 108: 1-9.
25.Basti AA, Misaghi A, Khaschabi D. Growth response and modelling of the effects of Zataria multiflora Boiss. essential oil, pH and temperature on *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. LWT- Food Science and Tecnology 2007; 40(6): 973-81.

26.Karaman I, Sahin F, Gulluce M, Ogutcu H, Sengul M, Adiguzel A. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of Juniperus oxycedrus L. Journal of Ethnopharmacology 2003; 85, 231–5.
27.Hafedh H, Fethi BN, Emira N, Mejdi S, Emira N, Amina B. Effect of *Mentha longifolia* L. ssp *longifolia* essential oil on the morphology of four pathogenic bacteria visualized by atomic force microscopy. African Journal of Microbiology Research 2010; 4 (11):1122-7.
28.Moosavi MH, Basti AA, Misaghi A, Salehi TZ, Abbasifar R, Mousavi H, et al. Effect of Zataria multiflora Bioss. Essential oil and nisin on salmonella typhimorium and staphylococcus aureus in a food model system and on the bacterial cell membranes. Food Research International 2008; 41(2008): 1050-7.
29.Rasooli I, Rezaei MB, Allameh A. Growth inhibition and morphological alterations of Aspergillus niger by essential oils from Thymus eriocalyx and Thymus x-porlock. Food Control 2006 17; 359–64.
30.Sikkema J, De Bont JAM, Poolman B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. Microbiol Rev 1995; 59: 201-22.
31.Carson CF, Mee BJ. Riley TV. Mechanism of action of *melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2002; 46(6): 1914-20.
32.Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antifungal effects of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil and its components on candida albicans, candida glabrata and saccharomyces cerevisiae. J Antimicrob Chemother 2004; 53, 1081–5.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

Phytochemical Properties of *Mentha longifolia* L. Essential Oil and its Antimicrobial Effects on *Staphylococcus Aureus*

Mahmodi R[1], Tajik H[2*],Farshid AA[3],Ehsani A[2], Zaree P[4], Moradi M[5]

[1]Department of Food Hygiene & Aquatics, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran, [2]Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran, [3]Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran, [4]Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran, [5]Department of Food Science & Technology, Faculty of Agriculture, Tabriz University, Tabriz, Iran

Received: 22 March 2011 Accepted: 21 Sep 2011

Abstract

Background & Aim: Due to the side effects of chemical and synthetic preservatives, consumers have recently become more eager to use foods containing natural preservatives from plants, animals and microbial sources. In the present study, biochemical composition and antibacterial effects (MIC) of *Mentha longifolia* L. essential oil against *Staphylococcus aureus* have been evaluated.

Methods: In this experimental study, the biochemical composition and antibacterial prosperities of this essential oil was determined by the Gas chromatography/ mass spectrophotometer (GC/MS) and micro dilution method respectively. The morphological and membrane changes of the bacterial cell under the effect of this essential oil were evaluated by transmission electron microscopy. The collected data was analyzed by the SPSS software using ANOVA.

Results: The chemical analysis of the essential oil by Gas chromatography/ mass spectrophotometer (GC/MS) revealed the presence of 22 substances (95.30%), mainly including Pulegon (31.54%), 1,8 Cineol (15.89%), Menthoforan (11.8%) and Cis- Isopulegon (9.74%). Minimum inhibitory concentration of the essential oil determined under different temperature and pH values showed to be in the range of 75-1200 µg/ ml.

Conclusion: The MIC results and membrane cell damage observed in the electron microscopy evaluation indicated that this essential oil have a high antibacterial activity. Therefore, this essential oil can be combined with other agents for the preservation of foods against pathogenic and toxigenic microorganisms.

Key words: *Mentha longifolia L.*, Essential oil, *Staphylococcus aureus*, Electron microscopy.

***Corresponding Author: Tajik H**, Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
Email: **h.tajik@urmia.ac.ir**