DOI:10.22034/vj.2017.109368.1265
شماره ۱۱۷ زمستان ۱۳۹۶
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

بررسی ترکیب شیمیایی و فعالیت ضدمیکروبی اسانس پونه کوهی *(Mentha pulegium)* منطقه ماکو و اثر مهاری آن بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* در سوسیس

• **پیمان غلامی پورناکی**
گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، واحد ماکو، دانشگاه آزاد اسلامي، ماکو، ایران.
• **معصومه آقازاده (نویسنده مسئول)**
گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، واحد ماکو، دانشگاه آزاد اسلامي، ماکو، ایران.
• **محمدرضا صادقی**
گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، واحد ماکو، دانشگاه آزاد اسلامي، ماکو، ایران.
تاریخ دریافت: ۱۰-۱۱-۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: ۰۷-۰۱-۱۳۹۶
Email: aghazadehchemist@gmail.com

چکیده

استفاده از ترکیبات طبیعی دارای اثرات ضدباکتریایی می‌تواند مصرف مواد شیمیایی و سنتزی را که به منظور مهار رشد عوامل بیماری‌زا در مواد غذایی استفاده می‌شوند به حداقل برساند. در این راستا گیاهان دارویی توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات ضدباکتریایی اسانس گیاه پونه ماکو علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در مخلوط خمیر سوسیس می‌باشد. برای این منظور ابتدا گیاه تازه پونه ماکو از کوه‌های مشرف به شهر ماکو در شمال استان آذربایجان غربی جمع‌آوری و پس از شناسایی در زیر سایه خشک و اسانس آن با استفاده از کلونجر به دست آمد. بیشترین ماده موجود در ترکیب اسانس پولگون (۵۱/۴ درصد) بوده و کمترین ماده موجود در آن کامفن (۰/۲۹ درصد) می‌باشد. اثرات ضدباکتریایی اسانس علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به روش میکرودایلوشن در سه سطح ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ درصد در مخلوط خمیر سوسیس برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی اسانس علیه استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب ۳۱/۲۶ و ۱۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر می‌باشد و افزودن ۱ درصد اسانس به مخلوط سوسیس می‌تواند به طور معنی‌داری از رشد استافیلوکوکوس اورئوس جلوگیری می‌نماید. بر اساس نتایج بدست آمده می‌توان نتیجه گرفت که افزودن اسانس گیاه پونه ماکویی به مخلوط خمیر سوسیس آلوده به استافیلوکوکوس اورئوس سبب مهار رشد باکتری و کاهش تراکم آن تا ۱۵ روز نگهداری در شرایط یخچال می‌گردد.

کلمات کلیدی: اسانس، استافیلوکوکوس اورئوس، اثرات ضد باکتریایی، گیاه پونه ماکویی، سوسیس

Veterinary Researches & Biological Products No 117 pp: 69-77

Evaluation of chemical composition and in-vitro antibacterial activity of oregano *(Mentha pulegium)* growing wild in maku and its inhibitory effect on *Staphylococcus aureus* in sausage

By: Gholami Pornaki P., Department of Food Science, Maku Branch, Islamic Azad University, Maku, Iran. Aghazadeh M., (Corresponding Author) Department of Food Science, Maku Branch, Islamic Azad University, Maku, Iran. and Sadeghi, M.R., Department of Food Science, Maku Branch, Islamic Azad University, Maku, Iran.

Received: 2017-01-29 Accepted: 2017-03-27

Email: aghazadehchemist@gmail.com

The use of natural substances that have antibacterial activity could reduce the consumption of chemical and synthetic agents in food industry for inhibition of the growth pathogens. Based on plants attract the main concentration on this topic. Oregano plant that grows in different parts of Iran has antibacterial and antioxidant effects, which due to its flavor can be used in the food industry. The aim of this study was to evaluate the antibacterial effect of *Mentha pulegium* essence on the growth of *Staphylococcus aureus* in sausage dough. For this purpose, fresh *Mentha pulegium* harvested from Maku Mountains and dried at dark and cool place, finally the essence were prepared by using the Clevenger apparatus. The higher compound in *Mentha pulegium* essence was Pulegone (51/4 %) and the lower substance was Camphene (0.29 %). The antibacterial property of *Mentha pulegium* was determined by microbroth dilution method in three different levels of essence (0.25, 0.5 and 1 percentage) for measuring the minimal inhibition concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) at laboratory scale. Results showed that the MIC and MBC amount for this essence against *Staphylococcus aureus* were obtained 31.26 and 125µg in mL respectively. Also, results documented that the addition of 1 percent *Mentha pulegium* essence in contaminated sausage dough matrix could statistically inhibit the growth of *Staphylococcus aureus*. It should be concluded that the addition of *Mentha pulegium* essence into the contaminated matrix of Sausage dough with *Staphylococcus aureus* resulted in the inhibition of bacterium and its number until 15 days storage at refrigerator.

Key words: Antibacterial activity, essence, Maku, *Mentha pulegium*, *Staphylococcus aureus*, Sausage

مقدمه

با وجود پیشرفت‌های نوین در روش‌های تهیه و تولید مواد غذایی، سلامت و ایمنی مصرف‌کننده به طور روز افزون در بهداشت عمومی اهمیت می‌یابد. لذا نیاز به کاهش یا حذف میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا با منشا مواد غذایی با استفاده از روش‌های مختلف احساس می‌شود (۶). بیماری‌ها و مسمومیت‌های با منشا مواد غذایی همواره از مشکلات عمده جهانی بوده و گزارش‌های اخیر حاکی از آن است که باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در زمره عوامل بیماری‌زای حائز اهمیت در صنایع غذایی می‌باشد. از آنجائی‌که استافیلوکوکوس اورئوس توزیع بسیار گسترده‌ای دارد و حذف کامل آن در بعضی از غذاها غیرممکن است، کنترل رشد آن ضروری می باشد. بنابراین تلاش برای یافتن نگهدارنده مناسب جهت جلوگیری از رشد این باکتری دارای اهمیت است (۴). استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان دومین و یا گاهی سومین علت مهم بیماری های منتقله از راه غذا محسوب می‌شود، این باکتری نقش برجسته‌ای در ایجاد شایع‌ترین نوع مسمومیت‌های غذایی را دارد که در اثر مصرف انتروتوکسین تولید شده در مواد غذایی به وجود می‌آید (۲). گوشت و فراورده‌های آن می‌تواند یک محیط مناسبی برای رشد و تزاید میکروارگانیسم‌های عامل فساد و پاتوژن‌های منتقله از طریق غذا را فراهم می‌کند (۳و۸). امروزه مصرف‌کنندگان با توجه به اثرات مضر نگهدارنده‌های شیمیایی و سنتتیک خواهان استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی مشتق از منابع گیاهی، حیوانی و میکروبی هستند تا علاوه بر افزایش زمان ماندگاری غذا از اثرات مضر نگهدارنده‌های شیمیایی مصون باشند (۲۰). خصوصیات ضد باکتریایی اسانس‌های گیاهی علیه طیف وسیعی از میکروب‌ها شامل باکتری‌ها، مخمرها و کپک‌ها به اثبات رسیده است (۲۱). خانواده Labiatae یا Lamiaceae شامل ۲۲۰ جنس و ۳۳۰۰ گونه است که مصارف گوناگونی دارند. *Mentha pulegium* یا پونه یکی از گونه‌های Mentha و از اعضاء خانواده Labiatae بوده و به صورت یک گیاه چند ساله می‌باشد. روغن‌های ضروری پونه دارای ویژگی‌های منحصربه فردی هستند به طوری که حاوی خواص آنتي‌اکسیدان و ضدمیکروبی بوده و بنابراین می‌تواند در درمان بسیاري از بیماری‌ها، جلوگیري از فساد و افزایش زمان ماندگاري مواد غذایی مفید باشد. در کنار این خاصیت، این گیاه دارای ویژگی‌های عطری بوده که

سبب مصرف آن به عنوان طعم‌دهنده در مواد غذایی می‌شود. خاصیت ضدمیکروبی روغن‌های ضروری را می‌توان به دلیل وجود گروه‌های پولگون، منتون و نئومنتون دانست؛ زیرا می‌توانند با تغییر نفوذپذیری غشاء سلولی و تخریب دیواره باکتریایی سبب درهم گسیختن ساختار لایه‌های مختلف پلی‌ساکارید، اسیدهای چرب و فسفولیپیدهای غشای باکتری شوند (۲۳). البته گزارش‌ها در این خصوص نشان می‌دهند که این مکانیسم می‌تواند با اثر نمونه‌های بر باکتری‌های هم‌زیست (Symbiotic bacteria) دستگاه گوارش سبب کاهش کارایی دستگاه گوارش مصرف‌کننده شود. تحقیقات انجام شده در خصوص پونه نشان می‌دهند از آنجائی‌که روغن‌های ضروری پونه تاثیر به سزایی در جلوگیری از رشد، تکثیر و گسترش چندین گونه باکتری عامل فساد و بیماری‌زا دارند؛ این گیاه می‌تواند به عنوان گندزدا، ضد اسپاسم و ضد التهاب مورد استفاده قرار بگیرد (۱۸)، به طوری‌که روغن‌های ضروری این گیاه در طب سنتی بسیاری از کشورها کاربرد دارد. روغن‌های ضروری ترکیبات فرار و مرکبی هستند که بوی تند داشته و به عنوان مواد متابولیسمی ثانویه از گیاهان معطر به وجود می‌آیند. این روغن‌ها از طریق روش تقطیر با مایعات یا تقطیر از ماده خشک گیاه به دست می‌آیند. روغن‌های ضروری به طور عمده به عنوان آنتی‌اکسیدان عمل کرده و فعالیت ضدباکتریایی نیز نشان می‌دهند (۱۲). تحقیقات نشان می‌دهد که روغن‌های ضروری گیاه پونه از نوع سیکلوهگزان‌ها و معطر بوده و پولگون ترکیب اصلی این روغن‌ها دارای عطر معین در محدوده نعنایی شدید تا تند و سرکه‌ای است. با توجه به گرایش جدید به سمت گیاه درمانی و خواص درمانی آن‌ها، نحوه آماده سازی و اسانس‌گیری گیاهان، اطلاعات بومی و دانش سنتی می‌تواند نقش بسیار مهمی را در پایه‌ریزی تحقیقات علمی بعدی فراهم کند. در حالی‌که گزارش‌های متعدد حاکی از اطلاعاتی در زمینه طیف اثر ضد باکتریایی اسانس‌ها در محیط آبگوشت و شرایط آزمایشگاهی می‌باشد ولی مطالعاتی که اثر این ترکیبات را به باکتری در سیستم مواد غذایی نشان دهد، محدود می‌باشد. در مطالعه حاضر اسانس گیاه پونه دارای اثرات ضد باکتریایی در مخلوط خمیر سوسیس آلوده به استافیلوکوکوس اورئوس بود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری گیاه

در این مطالعه ابتدا گیاه تازه پونه از کوه‌های مشرف به شهرستان ماکو در شمال غربی ایران (استان آذربایجان غربی) جمع‌آوری گردید. در مرحله بعد، گیاه به کمک کارشناسان مرکز تحقیقات کشاورزی استان آذربایجان غربی شناسایی شد. سپس اجازه داده شد تا بخش هوایی گیاه در زیر سایه و دمای اتاق به دور از هر گونه جریان باد خشک گردد.

استخراج اسانس

عمل اسانس‌گیری به روش تقطیر با آب و با استفاده از دستگاه کلونجر انجام گرفت. اسانس پونه کوهی ماکو بی رنگ بوده و درصد اسانس استخراجی۱/۵۱ درصد وزنی- وزنی می‌باشد. اسانس به دست آمده تا زمان تزریق به دستگاه کروماتوگرافی گازی/ طیف‌سنجی جرمی (GC-Mass) داخل یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

مشخصات دستگاه کروماتوگرافی گازی/ طیف‌سنجی جرمی

در این مطالعه برای تعیین ترکیب شیمیایی اسانس گیاه پونه از کروماتوگرافی گازی (ترموفینیگان، آمریکا) مجهز به طیف نگار جرمی استفاده شد. در این دستگاه ستون موئینه بکار رفته از جنس سیلیکای گداخته به قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و طول ۳۰ سانتی‌متر بود. برنامه حرارتی ستون شامل دمای اولیه ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد، دمای نهایی ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد و سرعت افزایش دما ۲۰ درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه تنظیم گردید. دمای محفظه تزریق و ترانسفر لاین به ترتیب ۲۶۰ و ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد بود. همچنین از گاز هلیوم با سرعت یک میلی‌لیتر در دقیقه و حجم تزریق یک میلی‌لیتر به عنوان حامل استفاده شد. سیستم تله یونی مورد استفاده در طیف‌سنج دارای انرژی یونیزاسیون ۸۰ الکترون ولت بود. شاخص بازداری هر پیک (ترکیب) با زمان بازداری هیدروکربن‌های نرمال (۴۰-۸ درجه سانتی‌گراد) تزریق شده در شرایط یکسان با تزریق اسانس گیاه پونه ماکویی، مقایسه و محاسبه شد. در نهایت همه ترکیبات بر اساس مقایسه طیف MS و شاخص بازداری آن‌ها نسبت به مقادیری که در منابع مختلف منتشر شده است (مانند NIST، Wiley و طیف‌های جرمی استاندارد) شناسایی شدند. همچنین محاسبه کمی ترکیبات موجود در اسانس گیاه پونه ماکویی (تعیین درصد هر ترکیب) به کمک داده پرداز Xcalibur (ترموفینیگان، آمریکا) به روش نرمال کردن سطح و نادیده گرفتن ضرایب پاسخ مربوط به طیف‌ها انجام شد (۱).

تهیه باکتری و کشت آن

باکتری مورد استفاده در این بررسی استافیلوکوکوس اورئوس بود که به صورت ویال لیوفیلیزه از پژوهشکده بیوتکنولوژی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران (PTCC۶۵۳۷) تهیه گردید. ابتدا در زیر هود و در شرایط کاملا استریل پودر ویال لیوفیلیزه باکتری در ۲۰ میلی لیتر محیط کشت آبگوشت تریپتیک سوی براث (TSB) کشت داده شده و در شرایط هوازی، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری گردید. پس از رشد باکتری ابتدا کشت بر روی محیط برد پارکر انجام و با همان شرایط قبلی باکتری گرم‌خانه‌گذاری شد. در مرحله بعد هویت باکتری به کمک آزمون‌های بیوشیمیایی ذوب ژلاتین، اکسیداز، کاتالاز، حرکت، شیر تورنسل‌دار، احیای نیترات و مورفولوژی مورد تائید قرار گرفت. در مرحله بعد باکتری‌های رشد یافته در محیط آبگوشت TSB در حضور ۵ درصد گلیسیرین استریل تا زمان استفاده در فریزر ۸۰- نگهداری گردید.

سنجش حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) بر اساس روش میکرودایلوشن

MIC به معنای کمترین غلظتی از ماده مورد بررسی است که سبب مهار رشد قابل مشاهده با چشم غیر مسلح می‌گردد. به کمک روش میکروبراث دایلوشن میزان حداقل غلظت مهاری (MIC) اسانس گیاه پونه ماکو علیه سویه باکتری تهیه شده از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی در شرایط آزمایشگاهی تعیین گردید. به طور خلاصه، رقت‌های متوالی

بر مبنای دو از اسانس گیاه پونه ماکویی (وزنی- حجمی) در میکروپیلیت ۹۶ خانه‌ای ته گرد (از ۱:۲ تا ۱:۸۱۹۲) حاوی محیط آبگوشت مولر هینتون بدون کاتیون (مرک، آلمان) تهیه شد. به طور مشابه رقت‌هایی نیز از تتراسایکین در محیط کشت آبگوشت مولر هینتون بدون کاتیون به عنوان شاهد آنتی‌بیوتیکی تهیه شد. لازم به ذکر است تا این مرحله حجم نهایی گوده‌ها برابر ۱۸۰ میکرولیتر تنظیم شد. در مرحله آخر ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری معادل نیم استاندارد مک فارلند (۲×۱۰۸ CFU/ml-۱) به همه گودها افزوده شد، همچنین در هر ردیف یک گوده برای کنترل محیط کشت و یک گوده نیز برای کنترل رشد باکتری اختصاص داده شد. پس از افزودن باکتری میکروپلیت در دمای ۳۷ به مدت ۲۴ ساعت و شرایط هوازی انکوبه شد. جهت آماده‌سازی سوسپانسیون باکتریایی ۲۴ ساعت قبل از تهیه رقت‌های مذکور کشت استافیلوکوکوس اورئوس در محیط کشت آبگوشت اینفوزیون مغز و قلب (BHI) با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شرایط هوازی به مدت ۲۴ ساعت انجام گرفت. پس از این مدت کشت فوق با ۲۵۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ و رسوب حاصل دو مرتبه در سرم فیزیولوژی استریل شستشو و در نهایت سوسپانسیون شده و تراکم آن جهت افزودن به گوده‌ها معادل نیم استاندارد مک‌فارلند تنظیم شد (مقدار نهایی باکتری که به هر گوده تلقیح شد برابر با CFU/Well ۱۰۵ بود). طبق تعریف حداقل غلظت مهارکنندگی (بازدارندگی) رشد عبارتست از آخرین گوده‌ای که از رشد باکتری ممانعت کرده باشد (۲۴).

سنجش حداقل غلظت کشندگی (MBC) بر اساس روش میکرودایلوشن

حداقل غلظت‌کشندگی اسانس پونه ماکو بر اساس نتایج بدست آمده از حداقل غلظت بازدارندگی از رشد تعیین شد. برای این منظور ۵ میکرولیتر از چاهک‌هایی که رشد باکتری در آن‌ها به طور کامل متوقف شده بود، به پلیت‌های حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار منتقل شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شرایط هوازی گرم‌خانه‌گذاری شدند. حداقل غلظت‌کشندگی عبارتست از کمترین غلظتی از نمونه که سبب کاهش ۹۹/۹ درصد از باکتری‌های تلقیح شده به گوده‌ها گردد (۱۷).

تهیه مخلوط خمیر سوسیس

برای تهیه مخلوط سوسیس از کارخانه گوشتناک ارومیه کمک گرفته شد. در این کارخانه جهت تهیه مخلوط خمیرسوسیس از موادی که در جدول۱ اشاره شده است استفاده می‌گردد. لازم به ذکر است در کارخانه از یکسری ترکیبات ضدباکتریایی نظیر نیترات سدیم و غیره استفاده می‌شود. بنابراین در مطالعه حاضر به منظور پرهیز از اثرات بازدارندگی نیترات سدیم و ترکیبات مشابه، آن‌ها از فرمولاسیون تهیه مخلوط خمیر سوسیس حذف شده و به جای مقادیر آن‌ها بر مقدار آب و یخ افزوده شد.

بررسی خاصیت ضدباکتریایی اسانس علیه استافیلوکوکوس اورئوس در مخلوط سوسیس

پس از تهیه مخلوط خمیر سوسیس جهت کنترل آلودگی ابتدا کشت باکتریایی از آن‌ها به طور جداگانه بر روی محیط کشت برد پارکر با سوسپانسیون زرده تخم‌مرغ انجام شد. سپس بلافاصله مقدار ۱۲۰۰ گرم از هر نمونه با ۴ میلی‌لیتر سوسپانسیون (۵×۱۰۵ CFU/ml) استافیلوکوکوس اورئوس مخلوط شد. ابتدا از مخلوط آلوده فوق به منظور کنترل تراکم استافیلوکوکوس اورئوس در محیط‌های فوق کشت به عمل آمد. در مرحله بعد تحت شرایط استریل، ۱۰ نمونه ۲۰ گرمی از مخلوط حاصل درون ظروف پلاستیکی استریل توزین شده و به عنوان شاهد انتخاب شد.

جدول ۱- ترکیبات و مقادیر اجزاء تشکیل دهنده مخلوط خمیر سوسیس مورد استفاده در بررسی حاضر برای ۱۰۰۰ گرم.

ردیف	ترکیبات	مقدار (گرم)
۱	گوشت قرمز	۴۰۰
۲	روغن مایع	۱۳۰
۳	آرد	۸
۴	سویا	۴
۵	ادویه جات	۱۳
۶	نمک تصفیه شده خوراکی	۱۲
۷	سیر	۰/۵
۸	آب و یخ	۴۳۲/۵ میلی لیتر

جدول۲- تیمارهای مختلف جهت بررسی اثر ضدباکتریایی غلظتهای مختلف اسانس پونه بر روی استافیلوکوکوس اورئوس **در سوسیس و علائم اختصاری آن‌ها.**

علامت اختصاری	نوع تیمار
C	مخلوط سوسیس آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس* بدون اسانس
T۱	مخلوط سوسیس آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس*+ ۰/۲۵٪ اسانس
T۲	مخلوط سوسیس آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس*+ ۰/۵٪ اسانس
T۳	مخلوط سوسیس آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس*+ ۱٪ اسانس

جدول ۳- آنالیز ترکیبات تشکیل دهنده اسانس پونه ماکویی با روش کروماتوگرافی گازی مجهز به طیف‌سنج جرمی.

ردیف	ترکیب شیمیایی	درصد
۱	آلفا پینن (Alpha-pinene)	۰/۴۳
۲	کامفن (Camphene)	۰/۲۹
۳	بتا پینن(Beta-pinene)	۰/۶۹
۴	میرسن (Myrcene)	۰/۸۱
۵	۳-اکتانول (Octanol-۳)	۱/۴۲
۶	منتون (Menthone)	۲/۲۱
۷	ایزومنتون (Isomenthone)	۶/۶۴
۸	ایزوپولگون (Isopulegone)	۰/۸۳
۹	منتول (Menthol)	۰/۴۶
۱۰	نئوایزومنتول (Neo-isomenthol)	۱/۴۴
۱۱	ترپینول (A-Terpinol)	۲/۶۷
۱۲	پولگون (Pulegone)	۵۱/۴
۱۳	پی پریتنون (Piperitenone)	۱/۸۶
۱۴	کاریوفیلن (Caryophyllen)	۰/۸۷
۱۵	هومولن (A-Humullene)	۲/۴۲
۱۶	اکسید کاریوفیلن (caryophyllen oxide)	۱/۹۳

سپس ۲۴۰ گرم از مخلوط آماده سوسیس آلوده شده با استافیلوکوکوس اورئوس توزین و به آن‌ها به طور جداگانه ۶۰۰ میلی‌گرم از اسانس گیاه پونه ماکویی اضافه شد (۰/۲۵ درصد) و به طور کامل مخلوط گردید، سپس۱۲ نمونه ۲۰ گرمی از هر مخلوط به طور جداگانه توزین و در شرایط استریل در ظروف پلاستیکی استریل یکبار مصرف با گنجایش ۴۰ میلی‌لیتر انتقال و به یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. سایر تیمارها نیز به همین ترتیب با افزودن به ترتیب ۱۲۰۰ میلی گرم (۰/۵ درصد) و ۲۴۰۰ میلی گرم (۱ درصد) از اسانس گیاه پونه ماکویی به مخلوط آلوده سوسیس آماده شده و پس از توزین در اندازه نمونه‌های ۲۰ گرمی، در ظروف پلاستیکی مورد نظر پر و به همان یخچال انتقال داده شدند.

در دوره‌های زمانی صفر (روز اول انجام کار و پس از تلقیح)، ۷ و ۱۴ روز از هر تیمار دو نمونه اخذ شده و به منظور اندازه‌گیری رشد استافیلوکوکوس اورئوس و شمارش کلی، در محیط‌های برد پارکر و پلیت کانت آگار به ترتیب کشت سطحی و مخلوط انجام گردید و سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شدند. به منظور شمارش و شناسایی میکروارگانیسم‌ها از دستگاه کلنی شمار کمک گرفته شد. تیمارهای مختلف با علائم شرح داده شده طبق جدول ۲ مشخص گردیده‌اند.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA؛ نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹) و آزمون توکی (آزمون اختلاف حقیقی که به طور مخفف HSD نامیده می‌شود) استفاده گردید. قبل از مقایسه میانگین تیمارها نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف- اسمیرنوف بررسی شد. داده‌های به دست آمده به صورت انحراف معیار ± میانگین بیان شدند. در تمام بررسی‌ها سطح معنی‌دار آزمون‌ها P<۰/۰۵ در نظر گرفته شد، همچنین ترسیم نمودار در فضای نرم‌افزار Excel (نسخه۲۰۱۰) انجام گرفت.

نتایج

نتایج استخراج و ترکیب بیوشیمیایی اسانس پونه ماکویی: بررسی‌ها نشان داد که از هر ۱۰۰ گرم وزن خشک گیاه ۱/۵۱ گرم اسانس خالص بی‌رنگی استحصال می‌گردد. همچنین آنالیز شیمیایی اسانس که با روش کروماتوگرافی گازی مجهز به طیف‌سنج جرمی انجام گرفت به طور تقریبی ۱۶ ترکیب مختلف را در اسانس گیاه پونه ماکویی نشان داد (جدول ۳). بر اساس یافته‌های بدست آمده از آنالیز شیمیایی اسانس پولگون بیشترین ماده تشکیل دهنده اسانس گیاه پونه ماکویی بوده که ۵۱/۴ درصد آن را به خود اختصاص می‌دهد. همچنین ایزومنتون دومین ماده تشکیل دهنده اسانس گیاه پونه ماکویی با ۶/۶۴ درصد و کامفن با ۰/۲۹ درصد کمترین ماده تشکیل دهنده این اسانس می‌باشد.

بر اساس نتایج بدست آمده حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس گیاه پونه ماکویی علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس برابر با ۳۱/۲۶ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. همچنین حداقل غلظت‌کشندگی اسانس گیاه پونه علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس برابر با ۱۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر تعیین گردید. لازم به ذکر است که از داروی تتراسیکلین به عنوان استاندارد استفاده شد که MIC و MBC آن علیه استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب برابر با ۲ و ۴ میکروگرم در میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد.

نتایج نشان داد که تا پایان هفته اول مطالعه، تعداد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در نمونه شاهد افزایش و پس از آن تا هفته دوم کاهش داشت (نمودار ۱). مقایسه تیمارهای ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ درصد از اسانس گیاه پونه ماکویی با شاهد نشان داد که تعداد اولیه و نهایی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس فقط در تیمار ۱ درصد اختلاف معنی‌داری

جدول ٤- تغییرات در میزان شمارش باکتری استافیلوکوکوس اورئوس **تحت تاثیر غلظتهای مختلف اسانس پونه در مدت ۱۵ روز بر حسب** (log cfu/g)

تیمار	شمارش کلی			استافیلوکوکوس اورئوس		
	روز			روز		
	۱۴	۷	۰	۱۴	۷	۰
C	۷/۱۰ ± ۰/۲۲ c	۶/۴۵ ± ۰/۱۱ a	۶/۳۱ ± ۰/۱۹ a	۶/۱۱ ± ۰/۱۷ c	۶/۷۶ ± ۰/۲۱ b	۵/۷۲ ± ۰/۱۱ a
T۱	۶/۸۱ ± ۰/۱۴ bc	۶/۴۲ ± ۰/۱۲ a	۶/۳۱ ± ۰/۱۹ a	۵/۷۳ ± ۰/۲ bc	۵/۸۱ ± ۰/۱۳ a	۵/۷۲ ± ۰/۱۱ a
T۲	۶/۷۴ ± ۰/۱۱ b	۶/۳۹ ± ۰/۱۵ a	۶/۳۱ ± ۰/۱۹ a	۵/۴۲ ± ۰/۱۴ ab	۵/۶۲ ± ۰/۱۹ a	۵/۷۲ ± ۰/۱۱ a
T۳	۶/۱۲ ± ۰/۱۷ a	۶/۲۲ ± ۰/۱۲ a	۶/۳۱ ± ۰/۱۹ a	۵/۱۱ ± ۰/۱۵ a	۵/۵۴ ± ۰/۲۱ a	۵/۷۲ ± ۰/۱۱ a

اعداد به صورت انحراف معیار± میانگین آورده شده است. حروف یکسان در هر ستون نشان دهنده عدم وجود اختلاف آماری معنی دار در سطح (P<۰/۰۵) می‌باشد.

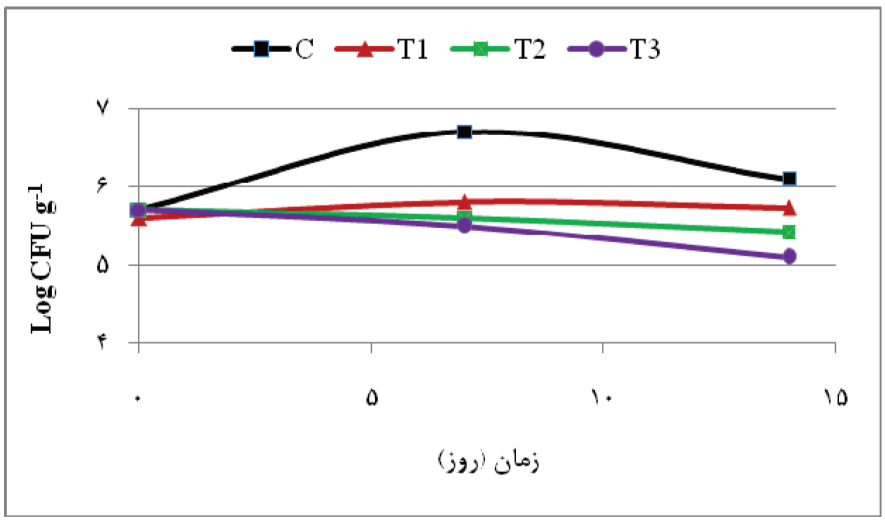
(P<۰/۰۵) داشت. به این معنی که در تیمارهای ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد از اسانس رشد استافیلوکوکوس اورئوس در طی ۱۵ روز مشاهده نشد و تعداد آن تقریبا ثابت ماند، درحالی‌که در بالاترین غلظت اسانس یعنی ۱ درصد رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس کاهش پیدا کرد. همانطور که نمودار ۱ نشان می‌دهد کمترین و بیشترین تاثیر اسانس بر رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب مربوط به ۰/۲۵ و ۱ درصد اسانس می‌باشد.

بحث

امروزه بیشتر مطالعات در جهت جداسازی و شناخت ترکیبات شیمیایی اسانس‌ها و بررسی خاصیت ضدمیکروبی آن‌ها در مواد غذایی بدون تاثیر نامطلوب در خصوصیات حسی و ارزش تغذیه‌ای مواد غذایی می‌باشد (۲۶و۵). تجزیه شیمیایی اسانس گیاه پونه ماکو مورد مطالعه نشان داد که بیشترین ترکیبات تشکیل دهنده آن پولگون (۵۱/۴ درصد) و ایزومنتون (۶/۶۴ درصد) می‌باشند. در مطالعه‌ای که توسط پژوهی‌الموتی و همکاران (۱۹) و گولوس و همکاران (۱۰) بر روی اسانس گیاه پونه انجام گرفت به ترتیب بیشترین ترکیبات اسانس را پولگون (۳۱/۵۴ درصد) و سیس پیپریتون اپوکسید (۱۸/۴ درصد) گزارش نمودند. اختلاف در ترکیب شیمیایی و فعالیت ضد باکتریایی اسانس‌ها در بین نتایج و گزارش‌های منتشر شده می‌تواند ناشی از تفاوت در فصل برداشت گیاه، شرایط آب و هوایی، منطقه جغرافیایی رویش، قسمت‌های مختلف گیاه، روش و مدت زمان استخراج اسانس و گونه باکتریایی مورد مطالعه باشد (۶). با توجه به تعداد ترکیبات ترکیبات شیمیایی در اسانس گیاهان، نمی‌توان مکانیسم واحدی برای اثرات ضدباکتریایی آن‌ها در نظر گرفت بلکه آن‌ها هدف‌های متعددی را در سلول خواهند داشت. از ویژگی‌های مهم اسانس‌ها و اجزاء تشکیل‌دهنده آن‌ها خاصیت آبگریزی آن‌ها می‌باشد که موجب نفوذ این مواد به لیپیدهای غشاء سلول باکتری و میتوکندری می‌شود و سبب اختلال در ساختمان‌های آن‌ها و ایجاد نفوذپذیری بیشتر می‌شود. این مسئله موجب خروج و نشت یون‌ها و دیگر محتویات سلول می‌شود. اگرچه خروج مقادیر محدود این مواد برای باکتری قابل تحمل است ولی در قابلیت زیستی آن تاثیر گذاشته و خروج مقادیر وسیع محتویات سلولی یا خروج یون‌ها و مولکول‌های حیاتی موجب مرگ سلول خواهد شد (۱۳). اغلب مطالعات انجام شده در خصوص اثر اسانس‌های روغنی بر باکتری‌ها عامل فساد و عوامل بیماری‌زای منتقله از راه غذا نشان می‌دهند که اثر اسانس‌های گیاهی بر باکتری‌های گرم مثبت قدری بیشتر از تاثیر آن‌ها بر باکتری‌های گرم منفی است. به عبارت دیگر گرم مثبت نسبت به اثر ضدباکتریایی اسانس‌ها حساس‌تر هستند. علت حساسیت کمتر باکتری‌های گرم منفی شاید به خاطر وجود پرده بیرونی در باکتری‌های گرم منفی باشد که سبب محدود شدن انتشار اجزاء هیدروفوبیک اسانس به لایه لیپوپلی ساکاریدی می‌شود (۲۲).

محمودي و همکاران (۱۳۸۹) اثر ضد باکتریایی اسانس پونه کوهی و لاکتوباسیلوس کازئی بر استافیلوکوکوس اورئوس در پنیر سفید ایرانی را مورد بررسی قراردادند. نتایج نشان داد که اسانس مذکور در دو غلظت ۰/۰۱۵ و ۰/۰۳ درصد در تیمار توام با پروبیوتیک از بالاترین تاثیر بر رشد استافیلوکوکوس اورئوس بر خوردار بود. همچنین بهترین غلظت اسانس از نظر ممانعت رشد استافیلوکوکوس اورئوس و نیز از نظر تولید پنیر با خواص طعمی مطلوب غلظت ۰/۰۱۵ درصد در تیمار توام با باکتري پروبیوتیک بود. بالاترین ترکیب موجود در این اسانس پولگون می‌باشد که مشابه اسانس مورد تحقیق ما بوده و دارای اثرات ضدباکتریایی است. در صورت استفاده توام اسانس با پروبیوتیک می‌توان از غلظت‌های پایین تري از اسانس برای اثر مهارکنندگی مشهود، استفاده کرد (۱۴).

پژوهی‌الموتی و همکاران (۵) مطالعه ترکیب شیمیایی و فعالیت



نمودار ۱- لگاریتم رشد استافیلوکوکوس اورئوس در تیمارهای مختلف طی ۱۵ روز.

ضدمیکروبی اسانس‌های پونه‌کوهی (*Mentha longifolia* L.) و زیره سبز (*Cuminum cyminum* L.) را بر فرم رویشي باکتری‌های باسیلوس سرئوس و باسیلوس سابتیلیس در سوپ مورد بررسی قرار دادند. نتـایج نشان داد که پولگون با ۳۱/۵۴ درصد و کومین آلدهید با ۲۹/۰۲ درصد به ترتیب بیشترین ترکیبات اسانس پونه کوهی و زیـره سـبز را تـشکیل مـی‌دهند. اسانس‌های مورد مطالعه در دمای ۸ درجه سانتي‌گراد اثر معنی‌داری در کاهش لگاریتم تعداد باکتری‌های مورد مطالعه داشتند. مشابه تحقیق حاضر با افزایش غلظت اسانس اثر مهارکنندگی افزایش می‌یابد. اسانس زیره سبز نسبت به اسانس پونه‌کوهی در غلظت های مشابه فعالیت ضدمیکروبی بیشتري بر روی باکتری‌های مورد مطالعه داشت

محمودي و همکاران (۱۵) ترکیبات شیمیایی و اثرات ضدباکتریایی اسانس پونه‌کوهی علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه پولگون ترکیب عمده اسانس را تشکیل می‌داد ولی نسبت به پونه مورد مطالعه تحقیق حاضر از درصد پایین‌تری برخوردار بود. حداقل غلظت ممانعت از رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در محدوده ۷۵ تا ۱۲۰۰ میکروگرم در میلي‌لیتر قرار داشت که بالاتر از مقدار به دست آمده برای این تحقیق بود.

تاکنون مطالعات بیشماری در زمینه اثر ضد باکتریایی تعدادی از گیاهان بر باکتری‌های منتقله از مواد غذایی انجام شده است. در بررسی حاضر نتایج به دست آمده نشان‌دهنده اثر کشندگی اسانس گیاه پونه ماکو بر استافیلوکوکوس اورئوس در شرایط آزمایشگاهی بود. این یافته با نتایج سایر محققان مطابقت دارد (۱۶). رشد و بقای باکتری‌ها در مواد غذایی به عوامل متعدد بیرونی مانند فلور باکتریایی، درجه حرارت، افزودنی‌هایی که در طی مراحل تهیه مواد غذایی استفاده می‌شوند و نیز عوامل داخلی ترکیبات مواد غذایی، بستگی دارد (۹). همچنین ثابت شده است که برخی از اجزاء غذا می‌توانند بر ترکیبات ضد باکتریایی اسانس‌ها اثرات بازدارنده داشته باشند، مثل کارواکرول (۹و۱۱و۲۷) همچنین اثر منفی نمک طعام بر فعالیت ضد باکتریایی اسانس‌ها نشان داده شده است (۲۵).

بر اساس یافته‌های بدست آمده از این بررسی می‌توان نتیجه گرفت که اسانس گیاه پونه ماکو با دارا بودن ترکیبات متنوع، دارای اثرات باکتری‌کشی علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد. لذا در قالب یک نگهدارنده طبیعی، مطمئن و قوی مواد غذایی بویژه گوشت و فراورده‌های آن در رژیم‌های غذایی می‌توان از آن بهره برد.

منابع مورد استفاده

1. Assareh M.H., K. Jaimand. 2004. Introduction of two species of Eucalyptus *(E. torquata* and *E. leucoxylon*) as a rich sources of 1,8-cineole. *Pajouhesh and Sazandegi Journal,* 68: 22-6.

2. Baeza R., C.E. Rossler, D.M. Mielnicki, M.C. Zamora, J. Chirife. 2007. Simplified prediction of *Staphylococcus aureus* growth in a cooked meat product exposed to changing environmental temperatures in warm climates. *Revista Argentina de Microbiologia,* 39: 237-242.

3. Barati B., M. Saadati, M.K. Bahmani. 2006. Isolation and detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* type A by multiplex PCR. *Journal of Military Medicine*, 8: 119-128.

4. Blackburn C.W., J.M. Peter. 2002. Foodborne Pathogens, Hazard, risk analyses and control, CRC, Press, pp: 385-390.

5. Bowles B.L., V.K. Juneja. 1998. Inhibition of food-borne bacterial pathogens by naturally occurring food additives. *Journal of Food Safety,* 18: 101-112.

6. Burt S. 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods-A review. *International Journal of Food Microbiology,* 94, 223-253.

7. Erikson J.P., J.W. Stamer, M. Hayes, D.N. McKenna, L.A. Van Alstin. 1995. An assessment of Escherichia coli O157:H7 contamination risks in commercial mayonnaise from pasteurized eggs and environmental sources, and behavior in low-pH dressings. *Journal of Food Protection,* 58: 1054-1064.

8. Eshraghi S., Z. Sale*hipO*ur, M.R. Purmand, A. Rahimi Forooshani, M.T. Zahraie Salehi, S. Agha Amiri, R. Bakhtiari. 2013. Distribution of tst genes with entA, entC and entA /C genes in *Staphylococcus aureus* isolates from food. University of Medical Sciences, Tehran University of Medical Sciences, 67: 476-470. (In Persian).

9. Firoozi R., S.H. Shekar forosh, M. Malekzadeh. 2011. Effect of oregano and nutmeg Hindi on the growth and survival of *Staphylococcus aureus* in chicken ready for cooking. *Journal of Food Science,* 8: 41-35. (In Persian).

10. Gulluce M., F. Sahin, M. Sokmen, H. Ozer, D. Daferera, A. Sokme, M. Polissiou, A. Adiguzel, H. Ozkan. 2007. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. longifolia. Food Chemistry, 103: 1449-1456.

11. Juven B.J., J. Kanner, F. Schved, H. Weisslowicz. 1994. Factors that interact with antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Applied Bacteriology*, 76: 626-631.

12. Kamkar A., A.J. Javan, F. Asadi, M. Kamalinejad. 2010. The antioxidative effect of Iranian *Mentha pulegium* extracts and essential oil in sunflower oil. *Food and Chemical Toxicology,* 48(7): 1796-1800.

13. Lambert R.J.W., P.N. Skandamis, P.J. Coote, G.J.E. Nychas. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91: 453-62.

14. Mahmoudi R., A. Ehsani, H. Tajik, A. Akhoondzadeh, A. Khosroshahi. 2010. Oregano essential oil and *Lactobacillus casei* antimicrobial effect against S. aureus in Feta Cheese. *Journal of*

Food preceding studies, 3: 161-147. (In Persian).
15. Mahmoudi R., H. Tajik, A.A. Farshid, A. Ehsani, P. Zare, M. Moradi. 2011. Determination the chemical composition and antimicrobial activity of Oregano against *Staphylococcus aureus*. *Bring knowledge,* 16: 412-400. (In Persian).
16. Marino M.A., C.A. Bersani, G.I. Comi. 2001. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from lamiaceae and compositae. *International Journal of Food Microbiology,* 67: 187-195.
17. Orujian F., R. Kadra Kermanshah. 2010. Phytochemical and antibacterial properties of *Achillea eriophora* DC. essential oil by Microdilution method. *Journal of Horticultural Science (Agricultural Science and Technology)*, 24: 115-109. (In Persian).
18. Oueslati S., N. Karray-Bouraoui, H. Attia, M. Rabhi, R. Ksouri, M. Lachaal. 2010. Physiological and antioxidant responses of *Mentha pulegium* (Pennyroyal) to salt stress. *Acta Physiol Plant*, 32: 289-296.
19. Pazhohi Alamouti M.R., H. Tajik, A. Akhoondzadeh, H. Gandomi Nasr Abadi, A. Ehsani. 2012. Study the chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of oregano (*Mentha longifolia* L.) and Cumin (*Cuminum cyminum* L.) in the soup. Journal of Food Science, 9: 45-33. (In Persian).
20. Roler S. 1995. The quest for natural antimicrobials as novel means of food preservation: status reports on a european research Project. *Int. Biodeterioration and Biodegradation,* 333- 345.
21. Smith-palmer A., J. Stewart, L. Fyfe. 2001. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *Food Microbiolog*, 18: 463-470.
22. Soliman Badeaa R. 2002. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food and Chemical Toxicology,* 40: 1669-1675.
23. Teixeira B., A. Marques, C. Ramos, I. Batista, C. Serrano, O. Matos. 2012. European pennyroyal (*Mentha pulegium*) from Portugal: Chemical composition of essential oil and antioxidant and antimicrobial properties of extracts and essential oil. *Ind Crop Prod,* 36: 81-87.
24. Treagan, L., L. Palliam. 1982. Medicinal microbiology laboratory procedures. W.B. Saunders Company. Toronto, Canada. pp 234-236.
25. Ultee A., R.A. Slump, G. Steging, E.J. Smid. 2000. Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. *Journal of Food Protection* 65(5): 640-647.
26. Valero M., M.C. Salmeron. 2003. Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tantalized carrot broth. *International Journal of Food Microbiology*, 85: 73-81.
27. Vol V., A. Holck, Y. Wasteson, H. Nissen. 2000. A high level of background flora inhibits growth of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. *International journal of Food Microbiology*, 56: 219-225.