دوفصلنامه علمی ترویجی علوم و فنون زنبورعسل
جلد ۱۱، شماره ۲۰، سال ۱۳۹۹، (۳۳-٤٤)

# بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره آبی رازیانه و بره موم بر میکروارگانیسم های مواد غذایی

**حمیدرضا مرادی[1]، محسن فرشادفر[2]، هومن شیروانی[3]، محیا سلطانی[4]، مهرانوش قلی پور[5]**

۱-گروه گیاهان دارویی موسسه آموزش عالی غیرانتفاعی جهاد دانشگاهی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.
۲-دانشیار گروه کشاورزی دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.
۳-مدرس گروه کشاورزی دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
۴-دانشجوی گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم تغذیه ای و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران
۵-مربی گروه کشاورزی دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

**تاریخ دریافت**: فروردین ماه ۹۹ / **تاریخ پذیرش**: مهر ماه ۹۹
**شناسه دیجیتال** (DOI): 10.22092/hbsj.2020.342586.1087
**رایانامه**: Farshadfarmohsen@yahoo.com

**چکیده:**

افزودن مواد نگهدارنده غذایی برای حفظ تازگی و جلوگیری از رشد باکتری ها استفاده می شود، اما مضرات استفاده بیش از حد مجاز از نگهدارنده‌های شیمیایی گرایش به سمت نگهدارنده‌های طبیعی مواد غذایی ایجاد کرده است. در این پژوهش عصاره آبی رازیانه و بره موم به عنوان نگهدارنده های طبیعی تهیه گردیده و اثرات ضد باکتریایی، حداقل غلظت مهارکننده رشد باکتری بدون بازدارندگی عصاره ها به‌عنوان حداقل رقت ممانعت کننده MIC[1] در نظر گرفته شد و برای تعیین حداقل غلظت کشنده MBC[2] از ۴ رقت متفاوت بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار استفاده گردید. سپس از روش انتشار دیسک برای ارزیابی میزان هاله حاصل از عصاره استفاده شد. نتایج نشان داد باکتری های گرم منفی و گرم

1- Minimum inhibitory concentration
2- Minimum bactericidal concentration

مثبت مورد بررسی در این تحقیق دارای حساسیت به عصاره رازیانه و بره موم می باشند و بیشترین اثر ضد باکتریایی در رقت ۱۲۸ میلی گرم بر میلی لیتر دیده شد به طوریکه عصاره رازیانه بیشترین خاصیت ضد باکتریایی را علیه *Escherichia coli* (گرم منفی) و *Staphylococcus aureus* (گرم مثبت) داشت و عصاره بره موم بیشترین اثر کشندگی را علیه Pseudomonas aeruginosa (گرم منفی) و *Staphylococcus aureus* (گرم مثبت) نشان داد.

**واژه های کلیدی**: رازیانه، بره موم، باکتری، حداقل رقت ممانعت کننده، حداقل غلظت کشنده

## مقدمه

فساد مواد غذایی ناشی از میکرواورگانیسم ها هنوز هم از مهم ترین موضوعاتی است که صنعت غذا و مصرف‌کنندگان با آن روبرو هستند (Sokmen *et al*., 2004). مواد نگهدارنده شیمیایی مانند نیترات و نیتریت سدیم، بنزوات سدیم، پارابن، پروپیونات، پروپیل گالات، سوربات، سولفات و گلوتامات به منظور افزایش ماندگاری و حفظ کیفیت و ایمنی غذا و با هدف مهار آلودگی های میکروبی، اسیدی شدن و کمک به تخمیر مواد غذایی اضافه می گردد. نگهدارنده های شیمیایی در میزان مجاز بی خطر تلقی می گردند اما تعدادی از آن ها دارای عوارض جانبی از جمله: سرطان، آلزایمر، پارکینسون، دیابت نوع ۲، سردرد، قرمزی پوست، حالت تهوع، علایم آسم و آلرژی شدیدو آسیب عصبی و... می گردند. بنابراین مواد طبیعی یا عصاره به دست آمده از گیاهان، حیوانات و مواد معدنی می توانند به عنوان گزینه مفید مورد استفاده قرار گیرند (Anand & Sati, 2013). نگرانی در رابطه با ایمنی غذاهای حاوی نگهدارنده‌های شیمیایی باعث توجه به سمت مواد نگهدارنده طبیعی شده است و به دلیل عملکرد فیزیولوژیکی و ضد میکروبی عصاره گیاهان طبیعی از آن ها به‌عنوان دارو در طب سنتی و نگهدارنده مواد غذایی استفاده می گردد که ازجمله آن ها می توان به گیاه رازیانه و بره موم به عنوان ترکیبی طبیعی اشاره نمود (Alzoreky & Nakahara, 2003؛ Bajpai *et al*., 2012). رازیانه (Foeniculum) گیاهی دو تا چند ساله است که در مناطق مرکزی اروپا و مدیترانه به‌طور گسترده کشت می گردد (Díaz-Maroto *et al*., 2005؛ Rather *et al*., 2016). این گیاه به عنوان طعم دهنده در مواد غذایی مختلفی مانند: نان، ترشی، شیرینی و پنیر و حتی مواد آرایشی و بهداشتی استفاده می شود (Telci *et al*., 2009). ترکیبات آن بسته به مناطق جغرافیایی و روش استخراج متفاوت است و کاربرد آن در مناطق معتدل و گرمسیری جهان به دلیل عطر و طعم در آشپزی می باشد (Díaz-Maroto *et al*., 2006؛ Díaz-Maroto Hidalgo *et al*., 2005). گزارش هایی در رابطه با فعالیت آنتی اکسیدانی، ضدالتهابی، ضد دیابت و ضد تومور عنوان گردیده است و همچنین فعالیت ضد قارچی فراوانی دارد که خاصیت آن به دلیل وجود ترکیباتی ازجمله فلاوونوئید، کاروتنوئید، کومارین و کورکومین است (Choi & Hwang, 2004; Özbek *et al*., 2003; Pradhan *et al*., 2008; Ruberto *et al*., 2000; Singh *et al*., 2006; Tognolini *et al*., 2007). در سال های اخیر ترکیبات و خواص ضد میکروبی رازیانه مورد مطالعه قرارگرفته است اما این اطلاعات هنوز محدود است حتی می توان ترکیب عصاره این گیاه با دیگر مواد طبیعی مانند بره موم[3] مورد مطالعه قرار گیرد. بره موم ترکیبی است که توسط زنبورعسل کارگر تولید شده و حاوی ترکیبات رزینی گونه های مختلف گیاهی ازجمله: کاج، توسکا، صنوبر، راش و گل های بهاری است که توسط زنبورعسل برای بستن فضاهای باز، ترک های کندو و ضدعفونی کندو به‌کاربرده می شود (Ahmed *et al*., 2017; Banskota *et al*., 2002; Banskota *et al*., 2000; Harfouch *et al*., 2016; Zheng *et al*., 2017). در طب سنتی به اثر بره موم به عنوان ضدالتهاب، ضدویروس، آنتی اکسیدان، ضد تومور و سرطان اشاره گردیده و دارای بیش از ۱۸۰ ترکیب مختلف مانند ۵۰٪ رزین، ۱۰٪ اسانس معطر، کافئین، ترکیبات فرار، هیدروکربن، استروئید و ویتامین B، E و C تشکیل‌شده است (Rajpara *et al*., 2009; Seeley & Morse, 1976; Sforcin *et al*., 2017). بره موم به عنوان یک ترکیب طبیعی و یک مکمل غذایی در بسیاری از کشورها به صورت گسترده مورد پذیرش قرار گرفته است. باکتری *Staphylococcus aureus* به عنوان یکی از مهم ترین باکتری های ناشی از مواد غذایی می باشد که عامل مسمومیت غذایی بوده و به عنوان ۵ پاتوژن مهم و اصلی مسئول بیماری های ناشی از غذا در سطح جهان محسوب می گردد. *Staphylococcus aureus* با مقاومت در برابر آنتی بیوتیک هایی مانند متی سیلین مورد استفاده در دام ها مسئول عفونت های متعدد حیوانی و بیماری هایی است که باعث آلوده شدن حیوانات و گیاهان با منشاء غذایی می گردد و به عنوان یک پاتوژن پیش رو و مهم شناخته می شود. در کنار آن *Pseudomonas aeruginosa* به دلیل سازگاری و توانایی

3- propolis

تولید زیاد و نیاز کم برای رشد یکی از میکرواورگانیسم های وسیع الطیف در مواد غذایی می باشد که به طور گسترده در محیط توزیع شده، باعث ایجاد مشکلات بهداشتی در ارتباط با ایمنی غذایی و آلودگی محصولات مختلف غذایی از جمله محصولات لبنی، گوشت و غذاهای با منشاء گیاهی می گردد. همچنین گونه های گسترده *Escherichia coli* شامل طیف گسترده ای از انواع مختلف اعم از سویه های بسیار بیماری زا می باشد که از مواد غذایی به غذاهای مختلف راه یافته و باعث شیوع بیماری های شدید جهانی می گردد (Kuhnert *et al*., 2000; Xu *et al*., 2019). بر اساس گزارش Kaur و همکاران (۲۰۰۹) اثر آنتی باکتریال عصاره گیاه رازیانه بر باکتری های *Staphylococcus aureus*، *Pseudomonas aeruginosa* و *Escherichia coli* بیشترین تاثیر ضد میکروبی بر باکتری *Pseudomonas aeruginosa* مشاهده شد. اما مشابه مطالعه حاضر اثر آنتی باکتریال بر باکتری های *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* وجود داشت (Kaur & Arora, 2009). در اثر عصاره اتانولی رازیانه بر ۴ میکرواورگانیسم انجام گرفت و بیشترین اثر بازدارندگی بر باکتری *Escherichia coli* مشاهده گردید (سعیدی و همکاران، ۱۳۸۹). در مطالعه انزابی و شقاقی (۱۳۹۴) اثر ضد باکتریایی عصاره بره موم بر باکتری ها بیانگر اثر ضد باکتریایی بر باکتری های *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* می باشد. گفتنی است که میزان تفاوت کم و بیش نتایج موجود در مقالات می تواند به علت تفاوت گونه گیاهی مذکور و استفاده از حلال های متفاوت جهت استخراج و همچنین روش ها و شرایط متفاوت استخراج عصاره باشد (انزابی و شقاقی، ۱۳۹۴). بنابراین هدف از مطالعه حاضر، بررسی فعالیت ضد باکتریایی عصاره رازیانه و بره موم به صورت مجزا و ترکیبی بر روی چند پاتوژن موجود در مواد غذایی (*Bacillus subtilis*، *Staphylococcus aureus*، *Pseudomonas aeruginosa* و *Escherichia coli*) می باشد. این تحقیق همچنین به‌منظور معرفی ترکیبی طبیعی در نگهداری مواد غذایی، اصلاح طعم و همچنین برداشتن گامی در جهت ایمنی مواد غذایی و معرفی ترکیبات طبیعی به‌عنوان نگه‌دارنده و جایگزین مواد نگهدارنده شیمیایی انجام شد.

## مواد و روش ها

### تهیه عصاره و تعیین خلوص باکتری ها

این آزمایش در سال ۱۳۹۸ در آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه پیام نور مرکز کرمانشاه انجام گرفت. بذر گیاه رازیانه از بانک ژن موسسه تحقیقات جنگل ها و مراتع کشور تهیه و بره موم از بازار محلی کرمانشاه تهیه شد. سپس ۱۰۰ گرم از آنها به‌صورت کامل پودر گردید و جهت تهیه عصاره به مدت ۲۴ ساعت در ۴۵۰ میلی لیتر آب خیسانده شد، از کاغذ صافی عبور داده شده و با استفاده از روتاری ناخالصی ها حذف گردید (Xu *et al*., 2010). در ادامه فعالیت ۴ سوش استاندارد باکتری تهیه شده از اسنتیتو پاستور ایران شامل: *Escherichia coli* (O157:H7 ATCC No. 25922)، *Bacillus subtilis* (ATCC No. 6633)، *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC No. 27853) و *Staphylococcus aureus* (ATCC No. 25923) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۴ ساعت به‌منظور تست ضد باکتریایی با استفاده از محیط کشت مولار هینتون آگار بررسی گردید.

### انتشار دیسک

بدین منظور ۷ رقت و ۴ تکرار عصاره های تهیه شد و در قالب طرح کاملاً تصادفی آزمایش انجام گرفت. با یک لوپ از سوش باکتریایی بر روی محیط کشت داده شد. سپس دیسک های کاغذی به عصاره آغشته گردید و با استفاده از پنس روی محیط کشت قرار داده شد. در ادامه گرمخانه‌گذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انجام گرفت و قطر هاله اندازه‌گیری شد. همچنین از DMSO[4] و آنتی‌بیوتیک به ترتیب جهت کنترل منفی و مثبت استفاده گردید (Guanlin *et al*., 2006).

### روش سنتز حداقل رقت ممانعت کننده (MIC[5]) و حداقل غلظت کشنده (MBC[6])

برای تعیین MIC، ۵۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی رقیق‌شده به لوله های آزمایش حاوی رقت دو برابری از عصاره اضافه شد و از یک لوله بدون عصاره (کنترل منفی) و یک لوله بدون محیط کشت (کنترل مثبت) به عنوان کنترل استفاده گردید. پس از گذشت ۲۴ ساعت و انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد عدم وجود کدورت در لوله ها به‌عنوان عدم رشد در نظر گرفته شد و اولین رقتی که در آن رشد باکتری مشاهده نگردید بیانگر حداقل رقت ممانعت کننده (MIC) بود. درنهایت به‌منظور تعیین MBC از لوله حاوی کمترین غلظت

4- Dimethyl sulfoxide
5- Minimum inhibitory concentration
6- Minimum bactericidal concentration

ممانعت‌کننده استفاده شد و ۲ لوله با رقت پایین تر از آن در محیط مولار هینتون آگار به مدت ۲۴ ساعت و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد و مشخص شد پلیتی که در آن رشد صورت نگرفته است نشان‌دهنده حداقل غلظت کشندگی است (Lo Cantore *et al*., 2004).

**● ابزار تجزیه‌وتحلیل آماری:**

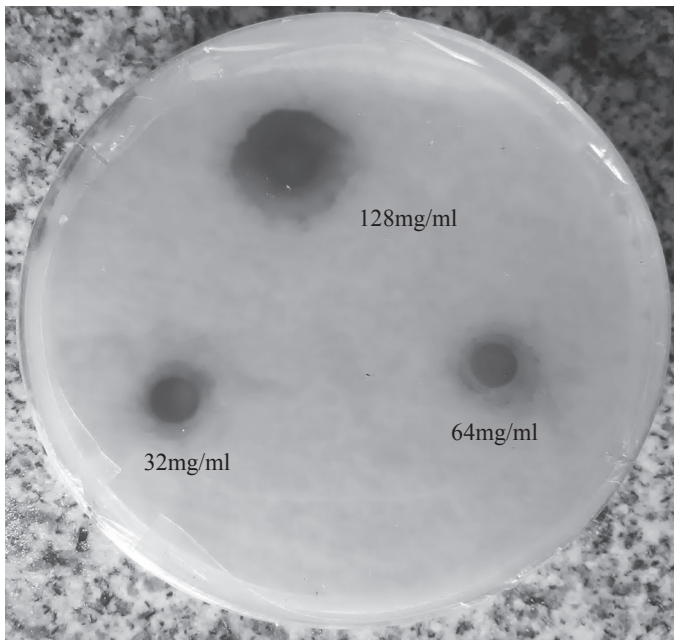
با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون کولموگرو-اسمرینوف نرمال بودن مشخص گردید و از آنالیز واریانس یک طرفه و مقایسه میانگین داده ها استفاده شد ($p\leq0.01$) معنی‌دار در نظر گرفته شد.

## یافته ها

**● اثر عصاره رازیانه بر باکتری های گرم منفی و گرم مثبت مورد بررسی**

باکتری های گرم منفی مورد بررسی در این تحقیق دارای حساسیت به عصاره رازیانه می باشند اما تفاوت معنی داری از نظر آماری در غلظت های مختلف عصاره رازیانه دیده نشد ($p\leq0.01$) همچنین میزان کشندگی، کمتر از آنتی بیوتیک های استاندارد (جنتامایسین[7]) بود (جدول ۱). نتایج نشان داد که با افزایش غلظت عصاره، خاصیت ضد باکتریایی افزایش‌یافته است و بیشترین اثر ضد باکتریایی در رقت ۱۲۸ میلی گرم بر میلی لیتر دیده شد (جدول ۱). عصاره رازیانه در دامنه غلظت های ۸ و ۴ میلی گرم بر میلی لیتر به ترتیب از رشد باکتری های گرم منفی (*Pseudomonas aeruginosa*) و (*Escherichia coli*) جلوگیری کرد و به ترتیب در رقت های ۱۶ و ۸ میلی گرم بر میلی لیتر آن ها را از بین برد. همچنین عصاره مذکور بیشترین خاصیت ضد باکتریایی را علیه باکتری Escherichia coli نشان داد.

باکتری های گرم مثبت مورد بررسی در این تحقیق نیز دارای حساسیت به عصاره رازیانه بودند اما تفاوت معنی داری در عصاره رازیانه و آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد (کلروتتراسایکلین[8]) دیده نشد. نتایج بیانگر این است که با افزایش غلظت عصاره، خاصیت ضد باکتریایی افزایش یافت و بیشترین اثر ضد باکتریایی در رقت ۱۲۸ میلی‌گرم بر میلی لیتر دیده شد (جدول ۱). عصاره رازیانه در دامنه غلظت های ۸ و ۴ میلی گرم بر میلی لیتر به ترتیب از رشد باکتری های گرم مثبت (*Bacillus subtilis*) و (*Staphylococcus aureus*) جلوگیری کرد و به ترتیب در رقت های ۱۶ و ۸ میلی گرم بر میلی لیتر آن ها را از بین برد. عصاره مذکور بیشترین خاصیت ضد باکتریایی را علیه باکتری *Staphylococcus aureus* نشان داد (شکل ۱).




**شکل ۱) هاله عدم رشد عصاره رازیانه باکتری *Staphylococcus aureus* به‌عنوان یک باکتری گرم مثبت**

7- Gentamicin

8- Chlortetracycline

**جدول ۱) هاله عدم رشد عصاره رازیانه بر باکتری‌های گرم مثبت و منفی**

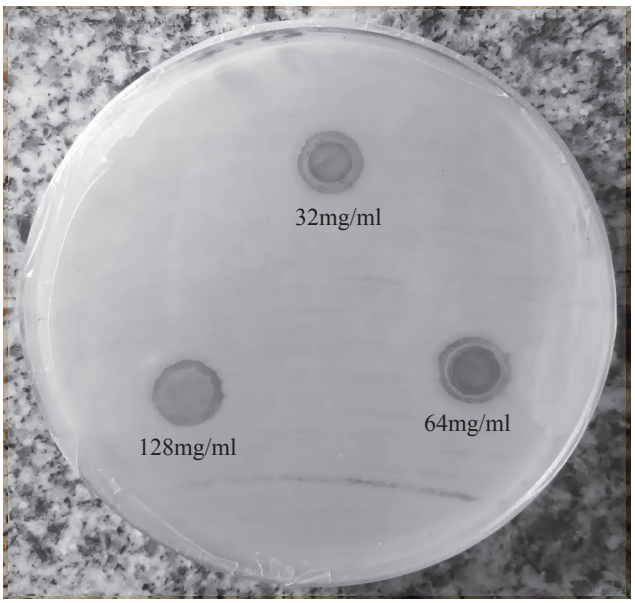
| رازیانه *(mg/mL)* | *Staphylococcus aureus(mm)* | *Bacillus subtilis(mm)* | *Escherichia coli(mm)* | *Pseudomonas aeruginosa(mm)* |
|---|---|---|---|---|
| 32 | 9 | 9 | 12 | 10 |
| 64 | 10 | 10 | 13 | 12 |
| 128 | 14 | 10 | 14 | 13 |
| Gentamicin (10mcg- perDisc) | - | - | 24 | 21 |
| Chlortetracycline (30mcg-per Disc) | 22 | 20 | - | - |
| ms | 10/657$^{ns}$ | | 10/667$^{ns}$ | |

$^{ns}$ غیر معنی‌دار - عدم استفاده از آنتی بیوتیک استاندارد

**اثر عصاره بره موم بر باکتری های گرم منفی و مثبت**

نتایج این بررسی نشان داد که باکتری های گرم منفی حساسیت بسیار کمی به عصاره آبی بره موم دارند (شکل ۲). به نحوی‌که با افزایش غلظت عصاره نیز تا ۱۲۸ میلی گرم بر میلی لیتر، خاصیت ضد باکتریایی قوی وجود نداشت و بیشترین اثر ضد باکتریایی در رقت ۱۲۸ میلی گرم بر میلی لیتر که فاقد اختلاف معنی‌داری با سایر غلظت ها بود دیده شد (جدول ۲). عصاره بره موم در غلظت ۱۶ میلی گرم بر میلی لیتر از رشد باکتری های گرم منفی (*Escherichia coli*) و (*Pseudomonas aeruginosa*) جلوگیری کرد و به ترتیب در رقت های ۱۶ و ۳۲ میلی گرم بر میلی لیتر آن‌ها را از بین برد. همچنین عصاره مذکور بیشترین خاصیت ضد باکتریایی را علیه باکتری *Pseudomonas aeruginosa* نشان داد.

عصاره آبی بره موم بر روی باکتری‌های گرم مثبت دارای حساسیت بود اما تفاوت معنی داری در اثر ضد باکتریایی عصاره آبی بره موم و آنتی بیوتیک های استاندارد (کلروتتراسایکلین) دیده نشد ($p\leq0.01$). با افزایش غلظت عصاره نیز، خاصیت ضد باکتریایی افزایش نیافت و بیشترین اثر ضد باکتریایی در رقت های بالاتر از ۳۲ میلی گرم بر میلی لیتر دیده شد (جدول ۲). عصاره آبی بره موم در دامنه غلظت های ۱۶ و ۸ میلی گرم بر میلی لیتر به ترتیب از رشد باکتری های گرم مثبت (*Bacillus subtilis*) و (*Staphylococcus aureus*) جلوگیری کرد و در رقت‌های ۳۲ و ۱۶ میلی گرم بر میلی لیتر به ترتیب آنها را از بین برد. همچنین عصاره مذکور بیشترین خاصیت ضد باکتریایی را علیه باکتری *Staphylococcus aureus* نشان داد.




**شکل ۲) هاله عدم رشد عصاره بره موم باکتری *Pseudomonas aeruginosa* به‌عنوان یک باکتری گرم منفی**

**جدول ۲) هاله عدم رشد عصاره بره موم باکتری‌های گرم مثبت و منفی**

| بره موم *(mg/mL)* | *Staphylococcus aureus(mm)* | *Bacillus subtilis(mm)* | *Escherichia coli(mm)* | *Pseudomonas aeruginosa(mm)* |
|---|---|---|---|---|
| 32 | 8 | 7 | 7 | 9 |
| 64 | 8 | 7 | 7 | 9 |
| 128 | 9 | 8 | 9 | 10 |
| Gentamicin (10mcg- perDisc) | - | - | 24 | 21 |
| Chlortetracycline (30mcg-per Disc) | 22 | 20 | - | - |
| ms | 0/10ns | | 10/667ns | |

ns غیر معنی‌دار

- عدم استفاده از آنتی بیوتیک استاندارد در باکتری ها

## اثـر برهمکنـش عصـاره رازیانه و بـره موم بـر باکتری های گـرم منفـی و مثبت

نتایج این آزمایش (جدول ۳) نشان داد که اثر بر همکنش عصاره های رازیانه و بره موم بر باکتری های گرم منفی دارای حساسیت کم می باشند و تنها در غلظت ۱۲۸ میلی گرم بر میلی لیتر از هر دو عصاره کشندگی در باکتری های گرم منفی مشاهده گردید. اما اثر برهمکنش در خصوص باکتری‌های گرم مثبت بیانگر بر همکش مثبت بوده و دارای حساسیت به عصاره بودند. با افزایش غلظت عصاره، خاصیت ضد باکتریایی افزایش یافت و بیشترین اثر ضد باکتریایی در رقت ۱۲۸ میلی گرم بر میلی لیتر دیده شد. عصاره ترکیبی رازیانه و بره موم در دامنه غلظت های ۸-۴ میلی گرم بر میلی لیتر از رشد باکتری های گرم مثبت جلوگیری کرد و در رقت های ۱۶-۸ میلی گرم بر میلی لیتر آن ها را از بین برد. عصاره مذکور بیشترین خاصیت ضد باکتریایی را علیه باکتری *Staphylococcus aureus* نشان داد و میزان کشندگی این ترکیب از حالت تکی عصاره ها بیشتر بود.

**جدول ۳) هاله عدم رشد برهمکنش عصاره‌های رازیانه و بره موم بر باکتری های گرم مثبت و منفی**

| ترکیب عصاره ها *(mm)* | *Staphylococcus aureus(mm)* | *Bacillus subtilis(mm)* | *Escherichia coli(mm)* | *Pseudomonas aeruginosa(mm)* |
|---|---|---|---|---|
| 32 | 10 | 10 | 12 | 10 |
| 64 | 11 | 11 | 12 | 11 |
| 128 | 12 | 12 | 14 | 12 |
| Gentamicin (10mcg- perDisc) | - | - | 24 | 21 |
| Chlortetracycline (30mcg-per Disc) | 20 | 20 | - | - |
| ms | 0/10ns | | 10/667ns | |

ns غیر معنی‌دار

- عدم استفاده از آنتی بیوتیک استاندارد در باکتری ها

## بحث و نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد باکتری های گرم منفی و مثبت مورد بررسی در این تحقیق دارای حساسیت به عصاره رازیانه بودند و بیشترین اثر ضد باکتریایی در رقت ۱۲۸ میلی گرم بر میلی لیتر دیده شد. همچنین عصاره رازیانه بیشترین خاصیت ضد باکتریایی را علیه باکتری *Escherichia coli* (گرم منفی) و *Staphylococcus aureus* (گرم مثبت) داشت. با توجه به عطر و طعم فوق العاده گیاه رازیانه این گیاه منحصر به فرد خود به عنوان ادویه در فرآورده های گوشتی مورد استفاده قرار گرفته و از دیرباز در صنعت لبنیات کشور و ایجاد عطر و طعم در محصولات لبنی مانند پنیر و دوغ به کار می رفته است. بنابراین استفاده از آن در این صنایع بلامانع بوده و باعث افزایش بازار پسندی می گردد. با توجه به ویژگی های کاربردی گیاه رازیانه در صنعت غذایی و دارویی، نائینی و همکاران اثرات ضد کاندیدایی اسانس و عصاره گیاه رازیانه را با استفاده از دیسک گذاری مورد آزمایش قراردادند. نتایج حاصل بیانگر اثر ضد کاندیدایی قوی اسانس و عصاره این گیاه بود و هاله اندازه‌گیری شده حاصل از عصاره دارای ارتباط معنی داری در مقایسه با نمونه شاهد بود که لزوم تحقیقات بیشتر در این رابطه مورد تأکید قرار گرفت (نایینی و همکاران، ۱۳۸۸). در پژوهشی توسط تهامی و همکاران اثر عصاره گیاه رازیانه بر پایداری روغن آفتابگردان مورد بررسی قرار گرفت. در این پژوهش عصاره‌گیری با استفاده از دستگاه کلونجر و با استفاده از حلال اتانول و آب انجام شد و از ۶ سطح مختلف عصاره و ترکیب با عصاره های سنتزی BHA[9] و BHT[10] برای انجام آزمایش مورداستفاده قرار گرفت. نتایج نشان داد که فعالیت آنتی اکسیدانی گیاه رازیانه وابسته به غلظت است و در بعضی غلظت ها دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتر از BHA و BHT بود که می تواند به‌عنوان جایگزین آنتی اکسیدان های سنتزی استفاده گردد (تهامی و همکاران، ۱۳۹۱). سعیدی و همکاران (۱۳۸۹) بررسی اثر عصاره اتانولی گیاه رازیانه بر ۴ باکتری *Bacillus subtilis*، *Escherichia coli*، *Staphylococcus aureus* و *Salmonella* بررسی گردید. این مطالعه از طریق عصاره‌گیری و انتشار دیسک برای تعیین MIC و MBC انجام گرفت و نتایج بیانگر بیشترین اثر بر باکتری *Escherichia coli* و کم ترین اثر بر باکتری *Bacillus subtilis* بود (سعیدی و همکاران، ۱۳۸۹).

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که برخی از باکتری های گرم منفی و مثبت حساسیت بسیار کمی به عصاره آبی بره موم دارند. و با افزایش غلظت عصاره نیز، خاصیت ضد باکتریایی قوی وجود نداشت و فاقد اختلاف معنی‌داری با سایر غلظت ها بود. عصاره بره موم بیشترین اثر کشندگی را علیه *Pseudomonas aeruginosa* (گرم منفی) و *Staphylococcus aureus* (گرم مثبت) نشان داد. در بررسی اشراقی و همکاران اثر ضد میکروبی عصاره بره موم بر ۱۲ سوش باکتریایی انتخابی از جمله *Staphylococcus aureus*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Escherichia coli* به‌صورت انتشار در آگار و استفاده از دیسک مطالعه گردید و نشان داده شد که عصاره بره موم دارای اثری کم و بیش بر انواع باکتری ها بوده است (اشراقی واللافر، ۱۳۸۲). به منظور مطالعه قدرت نگهداری عصاره بره موم به همراه اتمسفر تغییر داده شده بر گونه ای از رقم اسفناج پارامترهای رنگ، مواد جامد محلول، pH، اسید، اسیداسکوربیک، درصد کاهش وزن و ویژگی های ظاهری بررسی گردید که نتایج بیانگر تغییر فراوان بر این پارامترها و کاهش قابل محسوس آلودگی ها بود (رامی و همکاران، ۱۳۹۵). در تحقیقی که توسط سعیدی و همکاران انجام گرفت اسانس گیاه بابونه، بادرنجبویه و رازیانه با استفاده از دستگاه کلونجر استخراج گردید و با استفاده از دستگاه GC مشخص گردید که مهم ترین ترکیب موجود در گیاه رازیانه ترانس آنتول[11] است (سعیدی و همکاران، ۱۳۹۴). در مطالعه گرمنی و همکاران خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد باکتریایی بره موم زنبورعسل استان گلستان با استفاده از روش انتشار در آگار و چاهک بررسی گردید و میزان MIC و MBC تعیین گردید. نتایج بیانگر قدرت مهارکنندگی ۰/۰۴۸ و ۰/۱۹ به ترتیب برای *Bacillus cereus* و *Staphylococcus aureus* و میزان ۱۲/۳ برای *Shigella desanteria* و *Escherichia coli* گزارش گردید (گرمنی و همکاران، ۱۳۹۷).

برهمکنش در خصوص باکتری‌های گرم مثبت بیانگر اثر مثبت بوده و دارای حساسیت به عصاره بودند. با افزایش غلظت عصاره، خاصیت ضد باکتریایی افزایش یافت و میزان کشندگی این ترکیب از حالت تکی عصاره ها در باکتری های گرم مثبت بیشتر بود. روشهایی نگهداری گوشت، میوه و سبزیجات و دیگر فراورده های لبنی و غذایی یک موضوع مهم بهداشت عمومی محسوب میشود و هدف از مطالعه

9- Butylated hydroxyanisole
10- Butylated hydroxytoluene
11- Trans-Anethole

حاضر ارائه ترکیبی طبیعی به عنوان جایگزین نگهدارنده های شیمیایی می باشد. به این صورت که همچون اسانس و دیگر عصاره های گیاهی ارائه شده در صنعت مواد غذایی می توان از عصاره ترکیبی گیاه رازیانه به همراه بره موم یا استفاده از هرکدام به صورت انفرادی در صنعت غذا استفاده نمود. به عنوان مثال می توان از عصاره مذکور به عنوان فیلم خوراکی بسته بندی با خواص آنتی باکتریال به عنوان افزایش دهنده مدت زمان ماندگاری فرآورده های گوشتی همچون گوشت گاو، ماهی، سبزیجات مختلف استفاده نمود. همچنین این ترکیب می تواند از طریق اضافه شدن عصاره خشک شده و پودر شده به عنوان جایگزین بخشی از نگهدارنده های شیمیایی صنعت غذا به ویژه فرآورده های گوشتی از جمله سوسیس و همبرگر به دلیل نبودن فرآیند حرارتی در آن و احتمال وجود بیشتر باکتری *Staphylococcus aureus* وجود دارد استفاده شود. (Bellés *et al*., 2017;Baek *et al*., 2019; Bellés *et al*., 2017; Miceli *et al*., 2014; Šojić *et al*., 2019). اثر ضد باکتریایی ۵ گیاه رازیانه، بومادران، دارچین، مرزه و آرتمیزیا بر *Saprolegnia parasitica* از آب خروجی از سالن پرورش ماهی با روش میکرودایلوشن براث[12] و مقایسه با فرمالین انجام شد که به‌استثنای گیاه درمنه (*Artemisia*) سایر گیاهان هیچ گونه اثری بر آن نشان نداد (فیروزبخش و همکاران، ۱۳۹۳). در پژوهشی تأثیر ضد میکروبی عصاره اتانولی پونه گوهی و بره موم بر فیلم زیست تخریب‌پذیر پلی اسیدلاکتیک و علیه باکتری های *V. parahaemolyticus*، *Staphylococcus aureus*، *Escherichia coli* و *Listeria monocytogenes* به‌صورت انتشار مورد تحقیق قرار گرفت و نتایج نشان داد که هیچ یک از فیلم های حاوی عصاره بره موم اثر ضد میکروبی به‌جا نگذاشتند اما تمامی فیلم های حاوی درصد بالای عصاره پونه کوهی علیه تمامی باکتری های نام‌برده مؤثر بودند. همچنین عصاره بره موم تنها در صورت اضافه شدن به ترکیب عصاره پونه کوهی باعث افزایش خواص ضد میکروبی شد در حالی که به‌تنهایی خواص ضد میکروبی نشان نداد (میثاقی و همکاران، ۱۳۹۷). همچنین در مطالعه بررسی اثر عصاره بره موم بر ویژگی میکروبیولوژیکی فیله ماهی قزل‌آلا مشخص گردید که عصاره می تواند زمان ماندگاری در یخچال را به مدت ۸ روز بهبود بخشد (عدنانی و همکاران، ۱۳۹۵). کاربرد این عصاره ها دارای سابقه تاریخی بس طولانی است، ولی در عین حال امروزه در صنایع غذایی رویکرد جدیدی است که در بسیاری از جوامع مورد توجه جدی قرار گرفته است و علم نوین در حال ارائه و معرفی ترکیبات جدید در جهت افزایش سلامتی افراد جامعه و کاربرد ترکیبات طبیعی می باشد. در همین راستا با توجه به زیر کشت بودن گیاهان دارویی و ادویه های مختلف و وجود زنبور داری در نقاط مختلف کشورمان و تولید بره موم می توان از این ترکیبات هرچند در میزان کمتر نسبت به نگهدارنده های دیگر و در جهت تولید محصولات به عنوان جایگزین بخشی از نگهدارنده ها برای افراد حساس ودارای آلرژی استفاده نمود.

12- Broth dilution

## منبع ها:

اشراقی,س.، واالفر، ش. ۱۳۸۲. بررسی اثرات ضدباکتریایی بره موم (Propolis)کندوی عسل برگونه های بیماریزای نوکاردیا. مجله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد، دوره ۱۱، شماره ۲، صفحه ۴۲-۴۸.

تهامی، ف. س.، بصیری,ع.، غیاثی طرزی،ب.، مهستی، پ. ۱۳۹۱. بررسی اثر آنتی اکسیدانی عصاره دانه رازیانه (*Foeniculum vulgare*) بر پایداری روغن آفتابگردان. علوم غذایی و تغذیه، دوره ۱۰، شماره ۱، صفحه ۷۱-۷۸.

رامی، آ.، شیخلوئی، ح.، یوسفی، ع. (۱۳۹۵). اثر بسته بندی با اتمسفر تغییر داده شده (MAP) و بره موم (پروپولیس) بر برخی خصوصیات اسفناج رقم "ورامین ۸۸" در طی نگهداری. مجله علوم و صنایع غذایی، دوره ۱۳، شماره ۶۱، صفحه ۱۵-۱۱.

سعیدی، ک. ا.، سیدی,ف. ا.، کیانی، م. (۱۳۹۴). ارزیابی کمی و کیفی اسانس برخی ارقام اصلاح شده بابونه، بادرشبی و رازیانه در شرایط اقلیمی شهرکرد. به زراعی کشاورزی (مجله کشاورزی پردیس ابوریحان)، دوره ۱۷، شماره ۴، صفحه ۱۱۰۹-۱۱۰۱.

سعیدی، م.، ابراهیم زاده، م.، مرتضی سمنانی، ک.، اخی، ع.، ربیعی,خ. (۱۳۸۹). بررسی اثر ضد باکتری عصاره اتانولی دانه گیاه رازیانه. مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران (نامه دانشگاه)، دوره ۲۰، شماره ۷۷، صفحه ۹۱-۸۸.

۱. عدنانی، ا.، درویشی، ش.، محمدی، خ. ۱۳۹۵. بررسی اثر عصاره بره موم (Propolis)کردستان بر ویژگی های بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی فیله ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله علمی شیلات ایران (فارسی)، دوره ۲۵،شماره ۴، صفحه ۵۲-۴۱.

۲. فیروزبخش، ف.، افسریان، س.، هوشنگی، س.، بدلی، ح. ۱۳۹۳. بررسی اثرات ضد قارچی رازیانه، بومادران، مرزه، دارچین و آرتیمیزیا بر علیه ساپرولگنیا پارازیتیکا در شرایط آزمایشگاهی. مجله دانشگاه علوم پزشکی اراك (ره آورد دانش)، دوره ۱۷، شماره ۵ ، صفحه ۶۹-۶۰.

۳. گرمنی، م.، کوهساری، ه.، سیدالنگی، س. ز. ۱۳۹۷. فعالیت ضدباکتریایی وآنتی اکسیدانی چند نوع بره موم زنبور عسل جمع آوری شده از مناطق جغرافیایی مختلف استان گلستان. میکروبیولوژی دامپزشکی (پژوهشنامه دامپزشکی گرمسار)، دوره ۱۴، شماره ۲، صفحه ۳۵-۲۵.

۴. ۱۳۱.

۵. میثاقی، ع.، سعیدی، م.، نوری، ن.، رضایی گلستانی، م. ۱۳۹۷. مطالعه تاثیر اسانس پونه کوهی و عصاره اتانولی بره موم بر ویژگی های ضد باکتریایی و برخی ویژگی های فیزیکی فیلم های زیست تخریب پذیر پلی لاکتیک اسید. سلامت و محیط زیست، دوره ۱۱، شماره ۱، صفحه ۱۲۲-۱۱۱.

۶. نایینی,ع.، خسروی,ع.، تاج بخش، ح.، غضنفری، ط. ۱۳۸۸. بررسی اثرات ضدکاندیدایی و ایمونومدولاتوری اسانس و عصاره های گیاه رازیانه (*Foeniculum Vulgare Mill*) در شرایط آزمایشگاهی (*In Vitro*). دانشور پزشکی، دوره ۱۶، شماره ۸۲، صفحه ۲۰-۲۷.

۷. انزابی، ی. و شقاقی،ص. ۱۳۹۴. ارزیابی خواص ضدباکتریائی عصاره الکلی بره موم بر جدایه های ورم پستان گاوی در شرایط آزمایشگاهی. آسیب شناسی درمانگاهی دامپزشکی تبریز، دوره ۹، شماره ۳۴، صفحه ۱۲۹-۱۱۷ .

۸. سعیدی، م.، ابراهیم زاده،م.، مرتضی سمنانی،ک.، اخی، ع. و ربیعی، خ. ۱۳۸۹. بررسی اثر ضدباکتری عصاره اتانولی دانه گیاه رازیانه. مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دوره ۲۰، شماره ۷۷، صفحه ۹۱-۸۸.

9. Ahmed, R., Tanvir, E., Hossen, M., Afroz, R., Ahmmed, I., Rumpa, N.-E., . . . Khalil, M. 2017. Antioxidant properties and cardioprotective mechanism of Malaysian propolis in rats. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2017.

10. Alzoreky, N., &Nakahara, K. 2003. Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. International journal of food microbiology, 80(3): 223-230.

11. Bajpai, V. K., Baek, K.-H., & Kang, S. C. 2012. Control of Salmonella in foods by using essential oils: A review. Food Research International, 45(2): 722-734.

12. Banskota, A. H., Nagaoka, T., Sumioka, L. Y., Tezuka, Y., Awale, S., Midorikawa, K., . . . Kadota, S. 2002. Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines. Journal of ethnopharmacology, 80(1): 67-73.

13. Banskota, A. H., Tezuka, Y., Adnyana, I. K., Midorikawa, K., Matsushige, K., Message, D., . . . Kadota, S. 2000. Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. Journal of ethnopharmacology, 72(1-2): 239-246.

14. Choi, E.-M., & Hwang, J.-K. 2004. Antiinflammatory, analgesic and antioxidant activities of the fruit of Foeniculum vulgare. Fitoterapia, 575565.

15. Díaz-Maroto, M. C., Díaz-Maroto Hidalgo, I. J., Sánchez-Palomo, E., & Pérez-Coello, M. S. 2005. Volatile components and key odorants of Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) and Thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil extracts obtained by simultaneous distillation− extraction and supercritical fluid extraction. Journal of agricultural and food chemistry, 53(13): 5385-5389.

16. Díaz-Maroto, M. C., Pérez-Coello, M. S., Esteban, J., & Sanz, J. 2006. Comparison of the volatile composition of wild fennel samples (*Foeniculum vulgare* Mill.) from Central Spain. Journal of agricultural and food chemistry, 54(18): 6814-6818.

17. Harfouch, R. M., Mohammad, R., & Suliman, H. 2016. Antibacterial activity of syrian propolis extract against several strains of bacteria *in vitro*. World J. Pharm. Pharmaceuti. Sci, 6, 42-46.

18. Özbek, H., Uğraş, S., Dülger, H., Bayram, I., Tuncer, I., Öztürk, G., & Öztürk, A. 2003. Hepatoprotective effect of Foeniculum vulgare essential oil. Fitoterapia, 74(3): 317-319.

19. Pradhan, M., Sribhuwaneswari, S., Karthikeyan, D., Minz, S., Sure, P., Chandu, A. N., . . . Sivakumar, T. 2008. In-vitro cytoprotection activity of Foeniculum vulgare and Helicteres isora in cultured human blood lymphocytes and antitumour activity against B16F10 melanoma cell line. Research Journal of Pharmacy and Technology, 1(4): 450-452.

20. Rajpara, S., Wilkinson, M. S., King, C. M., Gawkrodger, D. J., English, J. S., Statham, B. N., . . . Horne, H. L. 2009. The importance of propolis in patch testing–a multicentresurvey. Contact Dermatitis, 61(5): 287-290.

21. Rather, M. A., Dar, B. A., Sofi, S. N., Bhat, B. A., & Qurishi, M. A. 2016. Foeniculum vulgare: A comprehensive review of its traditional use, phytochemistry, pharmacology, and safety. Arabian Journal of Chemistry, 9, S1574-S1583.

22. Ruberto, G., Baratta, M. T., Deans, S. G., & Dorman, H. D. 2000. Antioxidant and antimicrobial activity of Foeniculum vulgare and Crithmum maritimum essential oils. Planta medica, 66(08): 687-693.

23. Seeley, T., & Morse, R. 1976. The nest of the honey bee (*Apis mellifera* L.). Insectes Sociaux, 23(4): 495-512.

24. Sforcin, J. M., Bankova, V., & Kuropatnicki, A. K. 2017. Medical benefits of honeybee products. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2017.

25. Singh, G., Maurya, S., De Lampasona, M., & Catalan, C. 2006. Chemical constituents, antifungal and antioxidative potential of Foeniculum vulgare volatile oil and its acetone extract. Food control, 17(9): 745-752.

26. Sokmen, A., Gulluce, M., Akpulat, H. A., Daferera, D., Tepe, B., Polissiou, M., . . . Sahin, F. 2004. The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic Thymus spathulifolius. Food control, 15(8): 627-634.

27. Telci, I., Demirtas, I., & Sahin, A. 2009.Variation in plant properties and essential oil composition of sweet fennel *(Foeniculum vulgare* Mill.) fruits during stages of maturity. Industrial Crops and Products, 30(1): 126-130.

28. Tognolini, M., Ballabeni, V., Bertoni, S., Bruni, R., Impicciatore, M., & Barocelli, E. 2007. Protective effect of Foeniculum vulgare essential oil and anethole in an experimental model of thrombosis. Pharmacological

research, 56(3): 254-260.

29. Zheng, Y.-Z., Deng, G., Liang, Q., Chen, D.-F., Guo, R., & Lai, R.-C. 2017. Antioxidant activity of quercetin and its glucosides from propolis: A theoretical study. Scientific reports, 7(1): 1-11.

30. Guanlin, W., Jinhua, T., & Dan, J. 2006. Bacteriostatic action and mechanism of Sophora flavescens Ait on Escherichia coli 01 C84010. Scientia Agricultura Sinica.

31. Lo Cantore, P., Iacobellis, N. S., De Marco, A., Capasso, F., & Senatore, F. 2004. Antibacterial activity of Coriandrum sativum L. and Foeniculum vulgare Miller var. vulgare (Miller) essential oils. Journal of agricultural and food chemistry, 52(26): 7862-7866.

32. Xu, J.-g., Hu, Q.-p., Wang, X.-d., Luo, J.-y., Liu, Y., & Tian, C.-r. 2010. Changes in the main nutrients, phytochemicals, and antioxidant activity in yellow corn grain during maturation. Journal of agricultural and food chemistry, 58(9): 5751-5756.

33. Anand, S., & Sati, N. 2013. Artificial preservatives and their harmful effects: looking toward nature for safer alternatives. International journal of pharmaceutical sciences and research, 4(7): 2496.

34. Baek, S.-K., Kim, S., & Song, K. B. 2019. Cowpea starch films containing maqui berry extract and their application in salmon packaging. Food Packaging and Shelf Life, 22, 100394.

35. Bellés, M., Alonso, V., Roncalés, P., & Beltrán, J. 2017. Effect of borage and green tea aqueous extracts on the quality of lamb leg chops displayed under retail conditions. Meat science, 129, 153-160.

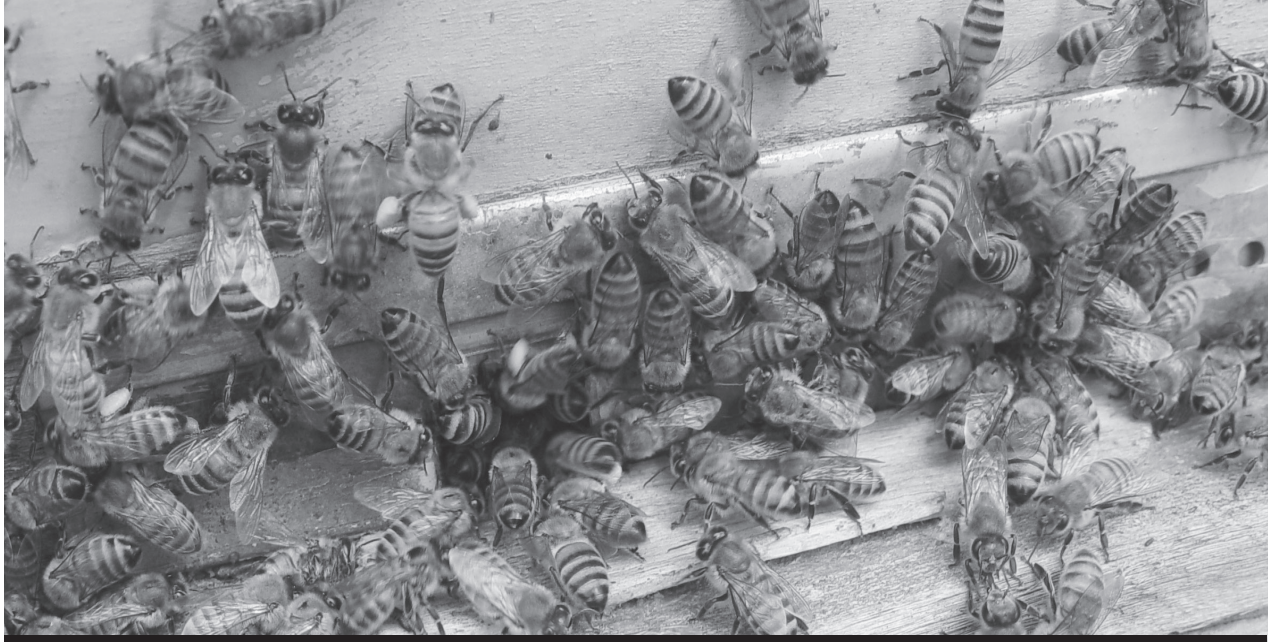
36. Miceli, A., Aleo, A., Corona, O., Sardina, M. T., Mammina, C., & Settanni, L. 2014. Antibacterial activity of *Borago officinalis* and *Brassica juncea aqueous* extracts evaluated *in vitro* and in situ using different food model systems. Food control, 40, 157-164.

37. Šojić, B., Pavlić, B., Ikonić, P., Tomović, V., Ikonić, B., Zeković, Z., . . . Ivić, M. 2019. Coriander essential oil as natural food additive improves quality and safety of cooked pork sausages with different nitrite levels. Meat science, 157, 107879.

38. Kuhnert, P., Boerlin, P., & Frey, J. 2000. Target genes for virulence assessment of Escherichia coli isolates from water, food and the environment. FEMS microbiology reviews, 24 (1): 107-117.

39. Xu, Z., Xie, J., Soteyome, T., Peters, B. M., Shirtliff, M. E., Liu, J., & Harro, J. M. 2019. Polymicrobial interaction and biofilms between Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa: an underestimated concern in food safety. Current opinion in food science.

40. Kaur, G. J., & Arora, D. S. 2009. Antibacterial and phytochemical screening of Anethum graveolens, Foeniculum vulgare and Trachyspermum ammi. BMC complementary and alternative medicine, 9(1): 30.



# Investigation of the antibacterial effect of fennel and propolis extract on food microorganisms

**M. Farshadfar[1], H. Moradi[2], Hooman shirvani[3], Mahya soltani[4], Mehranoosh Gholipour**

1-Department of Medicinal Plants, Kermanshah ACECR Institute of Higher Education, Kermanshah, Iran.

2- Associate Prof., Department of Agriculture, Payame Noor University,Tehran, Iran

3- Department of Agriculture, Payame Noor University,Tehran, Iran

4-Student Research Committee, Department of Food Science and Technology, School of Nutritional Sciences and Food Technology, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

5-Department of Agriculture, Payame Noor University,Tehran, Iran

DOI: 10.22092/hbsj.2020.341275.1081

**Abstract**

The addition of food preservatives is used to maintain freshness and prevent the growth of bacteria, but the disadvantages of overuse of chemical preservatives have led to a tendency toward natural food preservatives. In this study, fennel extract and propolis extract were prepared as natural preservatives and antibacterial effects, minimum concentration inhibiting bacterial growth without inhibition of extracts were considered as the minimum dilution of MIC inhibitor and to determine the minimum lethal concentration of MBC from 4 different dilutions. It was used on the culture medium of Molar Hinton Agar. The disc release method was then used to evaluate the amount of halo from the extract. The results showed that the gram-positive and gram-positive bacteria studied in this study were sensitive to fennel extract and propolis and the highest antibacterial effect was seen in dilution of 128 mg/ml, so that fennel extract had the highest antibacterial properties. Against the bacteria *Escherichia coli* (gram-negative) and *Staphylococcus aureus* (gram-positive), and propolis extract had the most lethal effect against *Pseudomonas aeruginosa* (gram-negative) and *Staphylococcus aureus* (gram-positive).

**Key words:** Foeniculum vulgare, Propolis, Bacteria, Minimum inhibitory concentration, Minimum bactericidal concentration

**Corresponding Author:** M. Farshadfar

**Email:** Farshadfarmohsen@yahoo.com