نشریه علمی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران | شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijmapr.2021.352505.2894
جلد ۳۷، شماره ۲، صفحه ۳۶۳-۳۵۰ (۱۴۰۰) | شناسه دیجیتال (DOR): 98.1000/1735-0905.1400.37.350.106.2.1605.1587

مطالعه ترکیب‌های شیمیایی و فعالیت ضدباکتریایی اسانس شوید (*Anethum graveolens* L.) به‌عنوان نگهدارنده و طعم‌دهنده طبیعی در آب کرفس

الهام کیانی‌فر[۱] و ساغر کتابچی[۲*]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

۲*- نویسنده مسئول، استادیار، گروه بیماری‌شناسی گیاهی و گیاه‌پزشکی، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

پست الکترونیک: ketabchis@gmail.com

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۹ | تاریخ اصلاح نهایی: فروردین ۱۴۰۰ | تاریخ پذیرش: فروردین ۱۴۰۰

چکیده

امروزه با توجه به اثرات جانبی نگهدارنده‌های شیمیایی و توجه تولیدکنندگان مواد غذایی به نگهدارنده‌های طبیعی، ارزیابی اثرات ضدمیکروبی نگهدارنده‌های طبیعی در مدل‌های آزمایشگاهی و غذایی ضروری به نظر می‌رسد. در این تحقیق اسانس‌گیری از ساقه و برگ گیاه شوید (*Anethum graveolens* L.) با روش تقطیر و شناسایی ترکیب‌های آن با استفاده از GC-MS انجام شد. آب کرفس تازه به‌مدت ۷ روز در دمای اتاق نگهداری شد تا فاسد گردید سپس از آن رقّت‌سازی سریالی تهیه شد و کشت باکتریایی به روش پورپلیت (pour plate) انجام گردید. جدایه‌های مختلف باکتری خالص‌سازی شدند و اثر ضدباکتریایی غلظت‌های مختلف اسانس به روش انتشار دیسک روی باکتری‌های غالب بررسی شد. باکتری‌های حساس به اسانس شوید با روش‌های استاندارد میکروبیولوژی و روش تکثیر ژن 16S rRNA مورد شناسایی قرار گرفتند. سپس از غلظت مؤثر به آب کرفس اضافه و اثر اسانس بر جمعیت باکتری‌های کل و غالب بررسی شد. پذیرش حسی غلظت‌های مختلف اسانس مورد مطالعه نیز در بین گروه‌های مردمی توسط پرسشنامه هدونیک پنج نقطه‌ای بررسی گردید. این تحقیق در غالب طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار انجام شد. براساس نتایج حاصل از GC-MS، دیلاپیول (۲۱/۲٪)، آلفا-فلاندرن (۳۷/۲٪) و بتا-فلاندرن (۹/۲٪) مهم‌ترین ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس شوید بودند. نتایج حاصل از بلاست توالی‌ها نشان داد که دو باکتری *Bacillus cereus* و *Acetobacter fabarum* غالب‌ترین باکتری‌های فاسدکننده آب کرفس بودند. براساس نتایج حاصل در بین پنج گروه غلظت از لحاظ قطر هاله در باکتری‌ها اختلاف معنی‌داری وجود داشت. بیشترین قطر هاله در هر دو باکتری در غلظت ۱۰۰۰ بدست آمد. به‌طور کلی نتایج مطالعه حاضر نشان داد که اسانس شوید براساس نتایج ارزیابی حسی و از نظر کنترل باکتری‌های فاسدکننده، افزودنی مناسبی برای آب کرفس می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: *Bacillus cereus*، *Acetobacter fabarum*، *Anethum graveolens* L.، روش انگشت‌نگاری 16S rRNA، آلفا-فلاندرن.

مقدمه

توجه و علاقه روزافزون مبنی بر استفاده کمتر از نگهدارنده‌های سنتزی منجر به انجام تحقیقات در زمینه یافتن و استفاده از مشتقات طبیعی دارای خاصیت ضدمیکروبی شده است. در سال‌های اخیر با توجه به نگرانی‌های موجود در مورد استفاده از نگهدارنده‌های شیمیایی و اثرهای مضر احتمالی آنها گرایش به استفاده از اسانس‌های گیاهی افزایش یافته است (Jafarzadeh khaledi *et al*., 2010). اسانس‌های گیاهی و ترکیب‌های آنها از زمان‌های قدیم به‌عنوان مواد طعم‌دهنده مورد استفاده قرار می‌گیرند و هم اکنون ثابت شده است که این مواد دارای طیف وسیعی از فعالیت‌های ضدمیکروبی می‌باشند. امروزه با افزایش آگاهی تولیدکنندگان در بکارگیری مواد طبیعی به‌ویژه در مواد غذایی، آرایشی و بهداشتی و دارویی اسانس‌ها محبوبیت بیشتری پیدا کرده‌اند (Papari Mghadam fard & Ketabchi, 2018). اسانس‌ها فعالیت‌های ضدمیکروبی گسترده‌ای دارند و در بسیاری از موارد سبب از بین بردن باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌ها می‌شوند، بدون اینکه اثرهای نامطلوبی بر سلامت مصرف‌کننده داشته باشند. اسانس‌ها فعالیت‌های بیولوژیکی و فارماکولوژیکی بالقوه‌ای دارند، بنابراین دارای کاربردهای فراوانی در حوزه داروسازی و صنایع غذایی می‌باشند (Ali *et al*., 2017).

شوید (*Anethum graveolens*) گیاهی یک‌ساله، معطر با خواص دارویی متعلق به خانواده چتریان است که منشأ این گیاه نواحی شرقی مدیترانه در پاکستان، هندوستان، خاورمیانه، روسیه، ایران و مصر می‌باشد. شوید ضمن کاربرد وسیع در صنایع غذایی، دارای خواص دارویی مانند کاهش تنگی‌نفس، قند و چربی خون است. همچنین امراض بلغمی، سکسکه، یرقان، ضعف معده و کبد و طحال را برطرف و به‌عنوان ضددرد، باد شکم، ادرارآور و تقویت معده بکار می‌رود. برای کسانی که اشتهای زیادی به غذا ندارند و لاغر هستند تخم شوید بهترین دارو است، زیرا اشتها را زیاد کرده و معده را نیرو می‌بخشد و انرژی به بدن می‌دهد (Ghalandari *et al*., 2016). شوید یک منبع بسیار خوب از کلسیم، فیبر و املاحی مانند منیزیم، آهن و منگنز می‌باشد. فعالیت روغن‌های فرّار موجود در شوید انواع خاصی از مواد سرطان‌زا مانند بنزوپیرن را که در دود سیگار، دود زغال چوب و دود ناشی از سوختن آشغال‌ها وجود دارد، خنثی می‌کند (Shahriari & Davari, 2015).

کرفس (*Apium graveolent*) گیاهیست که اولین بار در مناطق باتلاقی و شوره‌زار اروپای شمالی یافت شد. برگ‌های کرفس غنی از ویتامین A است، در حالی‌که ساقه منبعی عالی از ویتامین‌های B1، B2، B6، C و نیز مقادیر زیادی پتاسیم، اسیدفولیک، کلسیم، منیزیم، آهن، فسفر، سدیم و اسیدهای‌آمینه ضروری می‌باشد (Everard *et al*., 1994)

کرفس، یک گیاه دوساله با ارتفاع ۱۰۰ سانتی‌متر است و بوی قوی و ساقه گوشتی دارد. این گیاه جزو خانواده چتریان است. میوه این گیاه به‌صورت بیضی شکل بوده و عرض آن ۱/۵ تا ۲ میلی‌متر می‌باشد. رنگ میوه کرفس، قهوه‌ای بوده و در آن رگه‌های سیاه مشاهده می‌شود (Bellaloui & Brown, 1998).

گزارش‌های کمی در مورد استفاده از اسانس‌ها در شرایط طبیعی به‌منظور کاهش جمعیت میکروارگانیسم‌های عامل فساد بوده است و بیشتر تحقیقات بر روی اثر آنها بر باکتری‌های شاخص بیماری بوده است. در تحقیقی اثر ضدباکتریایی اسانس سه گیاه گشنیز، بومادران و شوید در شرایط آزمایشگاهی بر روی باکتری‌های گرم مثبت و منفی تحت تأثیر قرار داده شد. نتایج نشان داد که اسانس هر سه گیاه گشنیز، بومادران و شوید اثر ضدمیکروبی قابل توجهی روی باکتری‌های مورد مطالعه دارد و ممکن است بتوان از آنها به‌ویژه از شوید در درمان عفونت‌ها استفاده کرد (Ghaderi *et al*., 2012). همچنین در تحقیق دیگری خاصیت ضدمیکروبی اسانس بذرهای شوید و گشنیز بر روی باکتری‌های *Staphylococcus aureus*، *Escherichia coli* و *Salmonella typhimurium* بررسی گردید. نتایج نشان داد که باکتری *S. aureus* حساس‌ترین و باکتری *S. typhimurium* مقاوم‌ترین باکتری به هر دو اسانس بودند (Bromand *et al*., 2012).

در مطالعه دیگری فعالیت ضدباکتریایی عصاره گیاه

شوید علیه سوش‌های خالص *Staphylococcus aureus*، *Escherchia coli*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Salmonella typhimurium*، *Shigella flexneri* بررسی شد. نتایج نشان داد که عصاره این گیاه فعالیت ضدمیکروبی مناسبی روی تمام باکتری‌های مورد بررسی داشت (Sofia *et al*., 2007). همچنین محققان ثابت کردند که اسانس گیاه شوید اثر بازدارندگی بالایی علیه باکتری‌های *S. aureus* و *Vibrio cholerae* دارد (Derakhshan *et al*., 2017).

در این تحقیق ضمن بررسی ترکیب‌های اسانس شوید و شناسایی باکتری‌های غالب عامل فساد آب کرفس طبیعی، تأثیر غلظت‌های مؤثر اسانس روی باکتری‌های غالب عامل فساد در شرایط آزمایشگاهی و طبیعی بررسی و اثر اسانس از نظر ارزیابی حسی به‌عنوان افزودنی طبیعی مطالعه شد.

مواد و روش‌ها

اسانس‌گیری گیاه شوید

گیاه شوید در فصل بهار ۱۳۹۷ از مزارع کاشت اطراف شیراز تهیه و پس از سایه خشک و به‌مدت ۷ روز توسط آسیاب برقی خرد گردید. پس از توزین مقدار ۱۰۰ گرم از برگ و ساقه نمونه به داخل بالون متصل به کلونجر منتقل گردید و مقدار ۷۰۰ میلی‌لیتر آب‌مقطر به آن اضافه شد. اسانس‌گیری به‌مدت ۳ ساعت انجام شد. اسانس بدست‌آمده توسط سولفات‌سدیم آب‌گیری گردید و در داخل شیشه‌های کوچک ویژه اسانس (ویال) جمع‌آوری شد. اسانس بدست‌آمده تا قبل از استفاده در ظروف مخصوص در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد درون یخچال نگهداری شدند (Purnavab *et al*., 2015).

آنالیز ترکیب‌های موجود در اسانس به‌وسیله دستگاه طیف‌نگار جرمی-گازی (GC-MS)

برای این منظور اسانس گیاه مذکور را به دستگاه GC/MS (Gas chromatography mass spectrophotometer) مدل Agilent Technologies-5975C-MS, 7890A با ولتاژ یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت مجهز به ستون HP-5MS به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۲۵ میلی‌متر و ضخامت ۲۵ میکرون با برنامه‌ریزی دمای اولیه ستون ۶۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت سه دقیقه و دمای نهایی ۲۴۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت پنج دقیقه با سرعت افزایش دمای سه درجه سیلسیوس در دقیقه و دمای محفظه تزریق ۲۴۰ درجه سیلسیوس و دمای محفظه آشکارساز ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد تزریق شد و ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس تعیین گردید (Munda *et al*., 2019؛ Papari moghadam Fard *et al*., 2020).

تهیه آب کرفس فاسد، شمارش کلی (Total count) و خالص‌سازی باکتری غالب

کرفس تازه تهیه شد. بعد از شستشو و خشک کردن به‌وسیله آب‌میوه‌گیری برقی آب‌گیری شد. سپس آب میوه به‌مدت ۷ روز در دمای اتاق نگهداری شد تا فاسد شود. برای شمارش باکتری‌ها ابتدا رقّت‌سازی به‌وسیله رقّت سریالی تا 10^{-7} انجام شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از رقّت‌های تهیه شده به روش کشت پور پلیت (Pour plate) در محیط کشت پلیت کانت‌آگار (Plate count agar) (PCA) کشت داده شدند.

سپس نمونه‌ها در انکوباتور ۳۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. در نهایت پلیت‌هایی که جمعیت کلنی آنها بین ۳۰ تا ۳۰۰ عدد بود شمارش کلی شد. به‌دنبال آن برای جداسازی باکتری‌های غالب، باکتری‌هایی که بیشترین جمعیت را داشتند روی محیط کشت آگار مغذی (Nutrition agar: NA) کشت‌خطی داده شد و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس تک کلنی‌های خالص به لوله‌های آزمایش حاوی آگار مغذی منتقل گردید تا برای شناسایی باکتری‌ها مورد آزمایش‌های بعدی قرار گیرند (Sepahvand *et al*., 2007).

تهیه غلظت‌های مختلف از اسانس و بررسی اثر ضدباکتریایی غلظت‌های مختلف اسانس در شرایط آزمایشگاه

برای تهیه رقّت‌های مناسب از اسانس‌ها از حلال DMSO استفاده گردید و رقّت‌های ۱۰۰۰، ۸۰۰، ۶۰۰، ۴۰۰ و ۲۰۰ µg/mL در شرایط کاملاً استریل تهیه گردید (Walter *et al.*, 2011). برای بررسی اثر ضدباکتریایی از روش انتشار دیسک (Disc diffusion) استفاده شد. بدین صورت باکتری‌های مورد آزمایش به‌صورتslim layer در کف محیط کشت آگار مغذی کشت داده شدند. دیسک‌های کاغذی از کاغذ واتمن تهیه و پس از اتوکلاو به غلظت‌های مختلف اسانس آغشته گردید، به‌طوری که دیسک‌ها کاملاً خیس شدند ولی رطوبت اضافی نداشتند. سپس با پنس استریل دیسک‌ها روی سطح پلیت‌های کشت داده شده قرار داده شدند. پلیت‌ها به‌مدت ۲۴–۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. قطر هاله‌های ایجاد شده با خط‌کش دقیق اندازه‌گیری شد. از DMSO به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد (Garrity *et al.*, 2004). باکتری‌هایی که به اسانس شوید حساسیت نشان دادند مورد شناسایی قرار گرفتند.

شناسایی باکتری‌ها

شناسایی بیولوژیک

برای شناسایی بیولوژیک از کتاب برگیس استفاده شد. پس از بررسی شکل کلنی آزمون‌های رنگ‌آمیزی گرم، آزمایش اسپور، آزمایش اکسیداسیون و احیاء، آزمون کاتالاز، آزمون SIM به دلیل بررسی (H_2S، ایندول و حرکت) و آزمایش تخمیر کربوهیدرات مورد بررسی قرار گرفت (Heath Farris *et al.*, 2011).

شناسایی مولکولی جدایه‌های باکتریایی با روش تکثیرژن 16S rRNA

استخراج DNA و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

برای استخراج DNA باکتری‌ها، ابتدا نمونه‌های باکتریایی بر روی محیط‌کشت MRS Broth کشت و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شدند. پس از رشد باکتری‌ها، ۱mL از کشت باکتری درون میکروتیوب ریخته و به‌مدت ۲ دقیقه با سرعت بالا (۱۴۰۰۰g) سانتریفوژ گردید. سپس مایع رویی به‌طور کامل دور ریخته شد. به‌منظور حذف محیط کشت و جمع‌آوری پلیت باکتریایی، عمل سانتریفوژ با دور ۱۴۰۰۰ در مدت زمان ۲ دقیقه دوبار تکرار شد. به رسوب حاصل ۲۰۰ میکرولیتر محلول لیزوزیم اضافه و میکروتیوب حاوی مخلوط به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. به‌دنبال آن ۲۰ میکرولیتر محلول پروتئاز k به نمونه اضافه شد، سپس ۲۰۰ میکرولیتر بافر TG2 به نمونه اضافه گردید. بعد از مخلوط کردن به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد و پس از آن به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت. تیوب‌ها اسپین شدند. پس از آن ۲۰۰ میکرولیتر اتانول ۱۰۰–۹۶٪ به نمونه‌ها اضافه گردید. دوباره تیوب‌ها اسپین شدند. ستون TG در تیوب جمع‌آوری تیوب ۲CC قرار داده شد و مخلوط به ستون TG انتقال داده شد. سپس به‌مدت ۱ دقیقه با دور ۸۰۰۰ سانتریفوژ گردید. پس از آن ستون TG از تیوب جمع‌آوری خارج گردید و به یک تیوب جمع‌آوری جدید انتقال داده شد. ستون TG با ۵۰۰ میکرولیتر بافر W1 از طریق سانتریفوژ به‌مدت ۱ دقیقه با دور ۱۴۰۰۰ شستشو داده شد. سپس محلول درون تیوب جمع‌آوری دور ریخته شد. پس از آن ستون TG با ۷۵۰ میکرولیتر بافر شستشو از طریق سانتریفوژ به‌مدت ۱ دقیقه با دور ۱۴۰۰۰ شستشو گردید. سپس محلول درون تیوب جمع‌آوری دور ریخته شد. برای خشک کردن ستون، به‌مدت ۳ دقیقه با دور ۱۴۰۰۰ شستشو گردید. سپس ستون TG در تیوب شستشو قرار داده شد. ۱۰۰ تا ۲۰۰ میکرولیتر بافر شستشو یا آب دوبار تقطیر به ستون اضافه گردید و به‌مدت ۳ دقیقه به‌صورت ایستاده قرار داده شد. سپس به‌مدت ۲ دقیقه با دور ۱۴۰۰۰ سانتریفوژ شد. محلول حاصل در دمای یخچال یا فریزر قرار داده شد. این محلول حاوی DNA می‌باشد (Pandid *et al.*, 2005؛ Khadivi & Dehnad,

2009). مخلوط واکنش PCR حاوی ۵ میکرولیتر از استخراج DNA، ۱ میکرولیتر از هر یک از دو آغازگر TACGGTTACCTTGTTACGACTT F: R:AGAGTTTGATCCTGGCTCA ۰/۳ میکرولیتر از Taq پلیمراز با خلوص بالا، ۵ میکرولیتر از بافر 10X PCR، ۲/۵ میکرولیتر از $MgCL_2$، ۰/۵ میکرولیتر از dNTP و ۳۴/۷ میکرولیتر از آب‌مقطر بود. دوره‌های تکثیری PCR در دستگاه ترموسایکلر انجام شد که شامل ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد و بعد ۳۰ دوره به‌صورت ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، ۵۸ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت ۴ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. کنترل منفی آب گذاشته شد (Capriotti *et al*., 2011).

الکتروفورز

محصول PCR

به‌منظور انجام الکتروفورز روی نمونه‌های مورد مطالعه، ژل آگارز ۲٪ در بافر TBE تهیه گردید. پس از انجام الکتروفورز، ژل حاوی محصول ژن مورد نظر با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شد. ژل رنگ‌آمیزی شده زیر دستگاه ژل‌داک اسکن عکس‌برداری شد (Shafquat *et al*., 2014).

توالی‌یابی ژن

۲۰ میکرولیتر از محصول PCR همراه آغازگر فوروارد برای تعیین توالی ژن 16S rRNA به شرکت ماکروژن کره‌جنوبی ارسال شد.

تأثیر اسانس بر بار میکروبی آب‌میوه‌ها

برای ارزیابی خاصیت ضدمیکروبی اسانس گیاه شوید بر جمعیت میکروبی آب کرفس، اسانس این گیاه براساس نتایج بدست‌آمده از آزمون بررسی خاصیت ضدمیکروبی اسانس شوید در شرایط آزمایشگاه، حداقل غلظت‌های مؤثر که باکتری‌های شناسایی شده در آن تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند انتخاب شده و به آب کرفس اضافه و در دمای اتاق به مدت ۷ روز قرار داده شدند. پس از طی این مدت، با انجام رقّت‌سازی برای هر نمونه، کشت میکروبی به روش پور پلیت انجام شد و در نهایت شمارش میکروبی انجام گردید (Walter *et al*., 2011).

ارزیابی حسی آب‌میوه کرفس

برای ارزیابی حسی آب‌میوه‌ها ۵۰ نفر به‌صورت اتفاقی انتخاب شدند. ارزیابان شامل ۳۶ زن و ۱۴ مرد با دامنه سنی بین ۲۲ تا ۵۶ سال بودند. دو نوع مختلف از آب‌میوه شامل آب کرفس بدون اسانس وآب کرفس با اسانس شوید با غلظت مؤثر بدست آمده از نتایج، به آنها برای ارزیابی داده شد. در فاصله امتحان کردن تیمارها آب در اختیار آنها قرار داده شد تا دهان خود را شستشو داده، در نتیجه ارزیابی دقیق‌تری داشته باشند. پرسشنامه‌ای تهیه و نظر آنها در مورد عطر، طعم، رنگ و غلظت آب کرفس حاوی اسانس و مقایسه آن با آب کرفس بدون اسانس شوید ثبت شد (Jozdaemi *et al*., 2009). آزمون حسی مطابق روش هدونیک [۱]۵ نقطه‌ای به‌ترتیب غیرقابل قبول، نسبتاً رضایت‌بخش، خوب، بسیار خوب و عالی انجام شد و صفات عطر، طعم، رنگ و غلظت توسط داوران مورد بررسی قرار گرفتند. سپس داده‌های کیفی (غیرپارامتریک) به داده‌های کمّی (پارامتریک) تبدیل گردید، به این ترتیب که به عبارت‌های غیرقابل قبول تا عالی، به‌ترتیب امتیاز ۱ تا ۵ داده شد (Krasaekoopt & Watcharapoka, 2014).

تجزیه‌وتحلیل آماری

در بررسی اثر بازدارندگی اسانس بر باکتری‌ها از طرح کاملاً تصادفی استفاده شد. داده‌ها با آنالیز واریانس یک‌طرفه ANOVA بررسی و مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد. هر آزمون با سه تکرار انجام گردید. داده‌ها با نرم‌افزار SAS تجزیه‌وتحلیل شدند. سپس از آزمون T جفتی برای شمارش مطالعه جمعیت باکتری‌ها استفاده شد.

جدول ۱- ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس شوید

ردیف	نام ترکیب	درصد	RI	ردیف	نام ترکیب	درصد	RI
۱	E-2-hexenal	۷/۳	۸۴۹	۳۰	cumin aldehyde	۰/۱	۱۲۳۹
۲	α-thujene	۰/۲	۹۲۵	۳۱	carvone	۰/۱	۱۲۴۳
۳	α-pinene	۱/۲	۹۳۲	۳۲	carvotan acetone	۰/۱	۱۲۴۷
۴	camphene	۱/۰	۹۴۷	۳۳	thymol	۱/۳	۱۲۹۰
۵	benzaldehyde	۱/۰	۹۶۰	۳۴	p-cymen-7-ol	۰/۲	۱۲۹۳
۶	sabinene	۰/۱	۹۷۲	۳۵	carvacrol	۳/۰	۱۲۹۸
۷	β-pinene	۰/۲	۹۷۶	۳۶	α-copaene	۰/۱	۱۳۷۵
۸	6-methyl-5-hepten-2-one	۱/۰	۹۸۶	۳۷	E-β-damascenone	۱/۰	۱۳۸۴
۹	myrcene	۰/۷	۹۹۰	۳۸	β-cubebene	۰/۶	۱۳۸۸
۱۰	α-phellandrene	۳۷/۲	۱۰۰۴	۳۹	β-elemene	۰/۲	۱۳۹۱
۱۱	α-terpinene	۰/۳	۱۰۱۷	۴۰	α-cedrene	۰/۲	۱۴۱۵
۱۲	p-cymene	۷/۰	۱۰۲۴	۴۱	E-caryophyllene	۰/۱	۱۴۱۸
۱۳	limonene	۱/۴	۱۰۲۸	۴۲	β-copaene	۱/۰	۱۴۲۸
۱۴	β-phellandrene	۹/۲	۱۰۲۹	۴۳	geranyl acetone	۰/۱	۱۴۵۳
۱۵	Z-β-ocimene	۱/۰	۱۰۳۶	۴۴	γ-muurolene	۰/۲	۱۴۷۶
۱۶	E-β-ocimene	۱/۰	۱۰۴۶	۴۵	germacrene D	۲/۱	۱۴۸۰
۱۷	γ-terpinene	۱/۰	۱۰۵۷	۴۶	E-β-ionone	۰/۶	۱۴۸۵
۱۸	terpinolene	۰/۴	۱۰۸۸	۴۷	δ-selinene	۰/۲	۱۴۹۴
۱۹	n-undecane	۰/۲	۱۰۹۹	۴۸	γ-cadinene	۰/۱	۱۵۱۳
۲۰	n-nonanal	۰/۱	۱۱۰۴	۴۹	myristicin	۱/۱	۱۵۲۱
۲۱	1,3,8-p-menthatriene	۱/۰	۱۱۱۱	۵۰	α-cadinene	۱/۰	۱۵۳۷
۲۲	cis-p-menth-2-en-1-ol	۰/۱	۱۱۲۱	۵۱	α-calacorene	۱/۰	۱۵۴۲
۲۳	trans-p-menth-2-en-1-ol	۱/۰	۱۱۳۸	۵۲	spathulenol	۱/۰	۱۵۷۶
۲۴	borneol	۰/۲	۱۱۶۸	۵۳	caryophyllene oxide	۱/۰	۱۵۸۱
۲۵	terpinen-4-ol	۱/۰	۱۱۷۶	۵۴	dill apiole	۲۱/۲	۱۶۲۱
۲۶	dill ether	۴/۴	۱۱۸۵	۵۵	selin-11-en-4-a-ol	۰/۶	۱۶۵۷
۲۷	n-decanal	۱/۰	۱۲۰۵	۵۶	apiole	۱/۰	۱۶۷۸
۲۸	trans-piperitol	۱/۰	۱۲۰۷	۵۷	6,10,14-trimethyl-2-pentadecanone	۰/۲	۱۸۴۵
۲۹	trans-carveol	۰/۱	۱۲۲۰				

نتایج

ترکیب‌های جداسازی شده از اسانس گیاه شوید

براساس نتایج بدست آمده از تجزیه اسانس شوید، ۵۷ ترکیب شناسایی گردید که در مجموع ۹۹/۹٪ از کل اسانس را شامل می‌شد. دیل آپیول با ۲۱/۲٪، بتا–فلاندرن با ۹/۲٪ و آلفا–فلاندرن با ۳۷/۲٪ بیشترین درصد را نشان دادند (جدول ۱).

نتایج شمارش و جداسازی میکروارگانیسم‌ها در آب‌میوه فاسد شده

براساس نتایج حاصل پلیت‌هایی که باکتری مشابه داشتند کنار گذاشته شدند که در نهایت ۲۵ جدایه از پلیت‌ها استحصال گردید که این ۲۵ جدایه برای بررسی اثر بازدارندگی اسانس مورد بررسی قرار گرفتند.

جدول ۲– نتایج واکنش جدایه‌ها به آزمون‌های کلیدی فنوتیپی

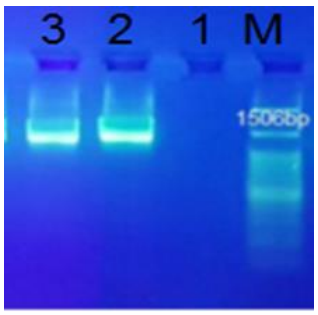
نام جدایه		HN2 (کد جدایه)	HN3 (کد جدایه)
رنگ‌آمیزی گرم		+	–
SIM	تحرک	+	+
	ایندول	–	–
	H2S	–	–
تخمیر قندی	گالاکتوز	+	–
	آرابینوز	+	–
	سوربیتول	+	–
	گلوکوز	+	–
کاتالاز		+	+
اسپور		+	
O/F		+	

نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی

براساس نتیجه‌ای که در آزمون اثر بازدارندگی اسانس روی جدایه‌ها بدست آمد، ۲ جدایه نسبت به اسانس واکنش نشان دادند که در حد جنس مورد آزمایش‌های بیوشیمیایی قرار گرفتند. نتیجه حاصل از آزمایش‌های بیوشیمیایی نشان داد که جدایه HN2 باکتری گرم مثبت و جدایه HN3 باکتری گرم منفی می‌باشد (جدول ۲).

نتایج حاصل از آزمایش‌های مولکولی

از بین جدایه‌های حاصل از آب‌میوه کرفس ۲ جدایه با استفاده از آزمون مولکولی PCR مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصل از الکتروفورز ژل محصول PCR در کنار مارکر ۱۰۰ bp باندهایی با اندازه ۱۵۰۰ bp نشان داد (شکل ۱) که پس از تعیین توالی قطعات تکثیر شده توسط شرکت مایکروژن کره‌جنوبی، ترادف جدایه‌ها با استفاده از نرم‌افزار Chromas ویرایش و در پایگاه NCBI بلاست شدند. نتیجه حاصل از توالی‌یابی ژن 16S Rrna جدایه HN2 که از آب‌میوه کرفس جداسازی شده بود نشان داد که این ایزوله ۹۹٪ شباهت به باکتری *Bacillus cereus* دارد. همچنین نتیجه توالی‌یابی ژن 16S rRNA جدایه HN3 با ۱۰۰٪ شباهت به‌نام *Acetobacter fabarum* شناسایی شد.



شکل ۱– الکتروفورز محصول PCR باکتری‌های مورد شناسایی با ژن 16S rRNA

چاهک M، مارکر مولکولی استاندارد؛ چاهک ۱، کنترل منفی و چاهک‌های ۲ و ۳ باکتری‌های مورد آزمایش هستند.

نتایج بدست آمده از تأثیر اسانس شوید بر انواع باکتری‌های موجود در آب کرفس

براساس نتایج بدست آمده در بین پنج گروه غلظت از لحاظ قطر هاله در باکتری‌ها اختلاف معنی‌داری وجود داشت. در ادامه در ارتباط متقابل غلظت × اسانس می‌توان نتیجه گرفت که مقدار قطر هاله در باکتری‌ها معنی‌دار می‌باشد (جدول‌های ۳ و ۴). به دلیل بررسی اینکه کدام نوع پنج غلظت از لحاظ قطر هاله در باکتری‌های *Acetobacter fabarum* و *Bacillus cereus* تفاوت معنی‌داری دارند، از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده گردید. براساس نتایج حاصل با میانگین‌های محاسبه شده برای قطر هاله در هر دو باکتری، در غلظت ۲۰۰µg/mL تفاوت معنی‌داری در قطر هاله بازدارنده در دو باکتری دیده شد و اسانس شوید تنها بر روی باکتری *Bacillus cereus* اثر بازدارنده داشت ولی دیگر غلظت‌ها بر هر دو باکتری مؤثر بوده و تفاوت معنی‌داری دیده نشد. حداقل غلظت بازدارنده مشترک ۴۰۰µg/mL و بیشترین غلظت ۱۰۰۰µg/mL بوده است (جدول ۵).

جدول ۳- جدول واریانس چند طرفه (طرح بلوک تصادفی) تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس در *Acetobacter fabarum*

منبع تغییرات	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	مقدار F	سطح معنی‌داری
غلظت	۶۱۵/۲۰۰	۴	۱۵۳/۸۰۰	۳۹/۴۳۶	۰/۰۱
اسانس	۲۲/۵۳۳	۱	۲۲/۵۳۳	۵/۷۷۸	۰/۰۵
غلظت × اسانس	۲۲/۴۶۷	۴	۶/۸۶۷	۱/۷۶۱	۰/۱۷۶*
خطا	۷۸/۰۰۰	۲۰	۳/۹۰۰		
مجموع	۴۷۸۰/۰۰۰	۳۰			

*: معنی‌دار در سطح ۵٪

جدول ۴- جدول واریانس چند طرفه (طرح بلوک تصادفی) تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس در *Bacillus cereus*

منبع تغییرات	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	مقدار F	سطح معنی‌داری
غلظت	۲۰۰/۸۰۰	۴	۵۰/۲۰۰	۲۲/۴۷۸	۰/۰۱*
اسانس	۳۶۷/۵۰۰	۱	۳۶۷/۵۰۰	۱۶/۵۵۲	۰/۰۱
غلظت × اسانس	۹۲/۰۰۰	۴	۲۳/۰۰۰	۱۰/۲۹۹	۰/۰۰۱**
خطا	۴۴/۶۶۷	۲۰	۲/۲۳۳		
مجموع	۳۱۵۳/۰۰۰	۳۰			

**:: معنی‌دار در سطح ۱٪

جدول ۵- مقایسه میانگین اثر متقابل انواع باکتری و غلظت‌های مختلف اسانس شوید بر قطر هاله عدم رشد

	قطر هاله عدم رشد				
انواع باکتری در اسانس شوید/غلظت‌های مختلف	۲۰۰µg/mL	۴۰۰µg/mL	۶۰۰µg/mL	۸۰۰µg/mL	۱۰۰۰µg/mL
Bacillus cereus در آب کرفس با اسانس شوید	۶/۶۷±۰/۳۳h	۱۰/۰±۰/۰e-g	۰/۱۲/۰±۱d-f	۱۴/۶۷±۰/۸۸b-d	۱۹/۳۳±۲/۰a
Acetobacter fabarum در آب کرفس با اسانس شوید	۰/۰±۰/۰i	۹/۰±۰/۵۷f-g	۱۱/۶۷±۰/۳۳d-f	۶/۱۶/۳۳±۱b	۲۰/۳۳±۰/۳۳a

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون و ردیف در سطح ۱٪ تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

جمعیت باکتری‌ها در آب‌میوه فاسد کرفس تحت تیمار اسانس شوید

نتایج حاصل از شمارش باکتری‌ها در آب‌میوه کرفس قبل و بعد از افزودن اسانس شوید در غلظت‌های ۴۰۰ و ۸۰۰ µg/mL در جدول ۷ ارائه شده است. همچنین برای وجود رابطه معنی‌دار بین اختلاف میانگین میزان باکتری در آب‌میوه کرفس در غلظت‌های ۴۰۰ و ۸۰۰ µg/mL قبل و بعد از اضافه کردن اسانس شوید براساس آزمون T جفتی در جدول ۶ ارائه گردیده است. طبق جدول ۵ مقدار سطح معنی‌داری برای هر دو غلظت ۴۰۰ و ۸۰۰ µg/mL بیشتر از ۰/۰۵ می‌باشد، ازاین‌رو در غلظت ۴۰۰ و ۸۰۰ µg/mL قبل و بعد از اضافه کردن اسانس شوید تفاوت معنی‌داری در جمعیت کل باکتری‌ها مشاهده نشد.

جدول ۶- آزمون T جفتی Pair t-test برای معنی‌دار بودن تأثیر اضافه کردن اسانس شوید

		آماره t	درجه آزادی	سطح معنی‌داری
غلظت ۴۰۰	قبل از اضافه کردن اسانس بعد از اضافه کردن اسانس	۱/۷۷۱	۲	۰/۲۱۹ ns
غلظت ۸۰۰	قبل از اضافه کردن اسانس بعداز اضافه کردن اسانس	۱/۴۸۵	۲	۰/۲۷۶ ns

ns: معنی‌دار نبود

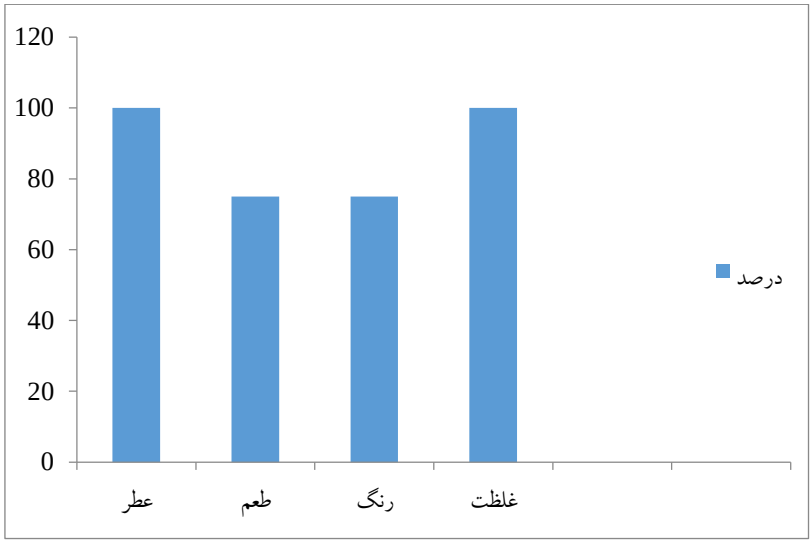
جدول ۷- جمعیت کل باکتری‌ها در آب‌میوه کرفس ۷ روز مانده قبل و بعد از افزودن اسانس شوید

		میانگین
غلظت ۴۰۰	قبل از اضافه کردن اسانس	$۲۱\times۱۰^{۳}a$
	بعد از اضافه کردن اسانس	$۱۶\times۱۰^{۳}a$
غلظت ۸۰۰	قبل از اضافه کردن اسانس	$۲۱\times۱۰^{۳}a$
	بعد از اضافه کردن اسانس	$۱۳\times۱۰^{۳}a$

حروف آماری مشترک بیانگر عدم وجود تفاوت معنی‌دار می باشد.

نتایج بررسی طعم آب‌میوه‌های حاوی اسانس توسط مصرف‌کنندگان

پس از بررسی نظرسنجی پذیرش حسی آب کرفس حاوی اسانس شوید با غلظت ۸۰۰µg/mL، به کمترین تغییرات ایجاد شده در کیفیت آب کرفس از نظر عطر، طعم، رنگ و غلظت نسبت به آب کرفس طبیعی بیشترین امتیاز در نظر گرفته شد. بررسی‌ها نشان داد که درصد قابل قبولی در حدود ۷۵٪ از طعم و رنگ آن رضایت داشته و تفاوتی در غلظت و عطر با آب کرفس طبیعی احساس نشد و نزدیک به ۱۰۰٪ رضایت داشته‌اند (شکل ۲).



شکل ۲- درصد کیفیت آب‌میوه کرفس بعد از اضافه کردن اسانس گیاه شوید با غلظت ۸۰۰µg/mL

بحث

صنایع نوشیدنی با گردش مالی فراوان در دنیا قسمت مهمی از صنعت مواد غذایی را تشکیل می‌دهند، ازجمله چالش‌هایی که این صنعت با آن روبه‌رو است، فراهم نمودن محصولی سالم با ماندگاری زیاد و سالم می‌باشد (Askari *et al.*, 2016). یکی از راهکارهای مهم در این راستا، جایگزینی نگهدارنده‌ها و افزودنی‌های شیمیایی با ترکیب‌های طبیعی است. برخی از گیاهان دارویی خاصیت آنتی‌میکروبی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی دارند و به‌عنوان جایگزینی برای نگهدارنده‌های شیمیایی در صنعت نوشیدنی مطرح هستند. تحقیقات گذشته حکایت از این دارد که گیاه شوید به دلیل داشتن صفات و اختصاصات مهم دارویی و غذایی توجهات زیادی را به خود جلب کرده است، این گیاه دارای ترکیب‌های بسیار مهم دارویی می‌باشد (Ivanović *et al.*, 2018). براساس نتایج حاصل از این تحقیق ۵۷ ترکیب از اسانس گیاه شوید جداسازی گردید که در کل ۹۹/۹٪ از کل اسانس را شامل شد. ترکیب‌های آلفا-فلاندرن ۳۷/۲٪، دیل آپیول ۲۱/۲٪ و بتا-فلاندرن ۹/۲٪ بیشترین ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس گیاه شوید را شامل می‌شدند. همچنین به مقدار کمتر دارای تیمول و کارواکرول بود. در تحقیقی مهمترین ترکیب‌های موجود در اسانس این گیاه را آلفا-فلاندرن ۲۹/۳۴٪، لیمونن ۲۶/۳۴٪ و دیل اتر ۱۵/۲۳٪ گزارش نمودند (Kazemi & Abdossi, 2015). در تحقیقی دیگر مهمترین ترکیب‌های موجود در گیاه شوید آلفا-فلاندرن ۱۲/۲۹٪، دیل اتر ۳۴/۲۶٪، آلفا-پینن ۲۹/۳۴٪ و ان- تتراکوزان ۲٪ شناسایی گردیده است (Arora & Kaur, 2007). در این تحقیق ضمن شناسایی ترکیب‌ها، درصد مقادیر ترکیب‌های جداشده نیز اختلاف دارد که این تفاوت موجود در میزان و نوع ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس این پژوهش با تحقیقات دیگر مربوط به خصوصیات جغرافیایی، محل رویش گیاه، شرایط محیطی و یا زمان برداشت گیاه می‌باشد (Alizadeh & Shaabani, 2012). در اسانس شوید غالب ترکیب‌ها جزو ترپن‌های دسته مونوترپن‌ها می‌باشند. تیمول و کارواکرول خواص ضدمیکروبی آنها اثبات شده و حتی در ترکیب‌های ضدعفونی‌کننده سطوح از آنها استفاده شده است. دیگر ترکیب‌ها مانند دیل اتر، لیمونن، فلاندرن و پینن از ترکیب‌های مونوترپنی تشکیل‌دهنده اسانس شوید بودند که ضمن تأمین رایحه‌ای خوش برای این گیاه با توجه به ساختار شیمیایی آنها در خاصیت ضدمیکروارگانیسمی آن مؤثر می‌باشد (Papari Moghadam Fard & Ketabchi, 2017).

در این تحقیق دو باکتری *Bacillus cereus* و *Acetobacter fabarum* از آب‌میوه طبیعی کرفس جداسازی شد. که براساس نتایج حاصل غلظت‌های ۶۰۰، ۴۰۰، ۲۰۰ و ۸۰۰ µg/mL از اسانس گیاه شوید قادر به کنترل باکتری *Bacillus cereus* در شرایط آزمایشگاه بودند. همین‌طور از غلظت ۴۰۰ به بالا اسانس این گیاه قادر به کنترل باکتری *Acetobacter fabarum* بود. اگرچه استفاده از این غلظت‌ها علیه باکتری‌های عامل فاسد بر روی آب‌میوه طبیعی اثر بازدارندگی نشان نداد. بنابراین در شرایط طبیعی باید از غلظت‌های بالاتر این اسانس مانند ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ µg/mL استفاده شود. باکتری *Bacillus cereus* باکتری شاخص آلودگی‌های مواد غذایی می‌باشد. ازاین‌رو مهار این باکتری در مواد غذایی یک امر ضروری می‌باشد. گزارش‌های مختلفی مبنی بر استفاده از اسانس گیاه شوید علیه باکتری‌های بیماری‌زا ارائه شده است. هر چند این تحقیق اولین بار است که از اسانس این گیاه علیه دو باکتری مذکور استفاده می‌کند.

به‌عنوان مثال در تحقیقی فعالیت ضدباکتریایی عصاره آبی شوید علیه سوش‌های خالص *Staphylococcus aureus*، *Escherchia coli*، *Pseudomonas aueruginosa*، *Salmonella typhimurium*، *Shigella flexneri* بررسی شد. نتایج نشان داد که عصاره این گیاه دارای فعالیت ضدمیکروبی بالایی بر روی تمام سویه‌های باکتریایی مورد بررسی می‌باشد (Arorera *et al*., 2007). همچنین در گزارش دیگری نتایج نشان داد که اسانس شوید دارای اثر مهاری قابل ملاحظه‌ای در سطح آزمایشگاهی بر روی *Candida albicans* و *Bacillus cereus* است. به عقیده این محققان فلاندرن موجود در اسانس شوید علاوه‌بر داشتن تأثیر بازدارندگی بر دو میکروارگانیسم ذکرشده دارای اثر مهاری بر *Aspergillus niger* نیز می‌باشد (Aljančić *et al*., 1999). همینطور در تحقیق دیگری ثابت شده است که اسانس گیاه شوید دارای اثر بازدارندگی و کشندگی بالایی علیه باکتری‌های *Staphylococcus aureus* و *Escherchia coli* است (Peerakam *et al*., 2014).

اگرچه اکثریت اسانس‌ها به‌عنوان افزودنی‌های بی‌خطر طبقه‌بندی می‌شوند اما غلظت‌های مؤثر آنها از مقادیر پذیرش حسی در مواد غذایی تجاوز می‌کند. به همین دلیل کاربردشان در مواد غذایی به‌عنوان محافظت‌کننده به‌دلیل تأثیرات نامطلوب در خصوصیات حسی غذا محدود می‌باشد. به‌طور کلی اسانس‌هایی که دارای مقادیر بالایی از ترکیب‌های فنولی مانند کارواکرول، اوژنول و تیمول هستند، دارای خواص ضدباکتریایی بالایی در برابر پاتوژن‌های خوراکی می‌باشند (Lambert *et al*., 2001). براساس نتایج حاصل از ارزیابی حسی آب‌میوه کرفس، شوید گیاه مناسبی به‌عنوان افزودنی در آب کرفس می‌باشد. همچنین در طی این پژوهش پس از اضافه کردن اسانس به آب‌میوه هیچ گونه تغییر رنگی در آب‌میوه ایجاد نگردید که این امر یک مزیت بزرگ برای استفاده از این اسانس به‌عنوان نگهدارنده در آب‌میوه‌ها محسوب می‌گردد. به‌طور کلی گزارش‌های زیادی در مورد تأثیر عصاره‌های گیاهی در غیرفعال و یا مهار کردن میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در آب‌میوه‌ها گزارش نشده است و گزارش‌های اندکی که وجود دارد حکایت از این دارد که تأثیرپذیری تحت تأثیر برخی پارامترهای مهم شامل pH آب‌میوه، میکروارگانیسم‌های موجود در آب‌میوه، غلظت و نوع عصاره و اسانس می‌باشد.

به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی باید گفت که نتایج بدست‌آمده از این پژوهش نشان داده که غلظت‌های مورد استفاده از اسانس گیاه شوید علیه باکتری‌های فاسدکننده آب‌میوه کرفس در شرایط آزمایشگاه اثرگذار می‌باشند. اگرچه در شرایط طبیعی باید از غلظت‌های بالاتر اسانس مانند ۱۰۰۰ یا ۲۰۰۰ µg/mL استفاده شود. همچنین براساس نتایج بدست‌آمده از ارزیابی حسی ۷۵٪ از تست‌کنندگان از طعم آب‌میوه کرفس بعد از افزودن اسانس اعلام رضایت کرده‌اند. بنابراین با توجه به اثر ضدباکتریایی اسانس شوید در غلظت‌های پایین بر باکتری‌های فاسدکننده آب کرفس و همچنین پذیرش حسی قابل قبول توسط گروه هدف، می‌توان اسانس این گیاه را به‌عنوان یک افزودنی و نگهدارنده طبیعی در نظر گرفت.

سپاسگزاری

نویسندگان نهایت تشکر خود را از مسئولان محترم دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز به‌دلیل حمایت از انجام این تحقیق اعلام می‌نمایند.

منابع مورد استفاده

- Aljančić, I., Vajs, V., Menković, N., Karadžić, I., Juranić, N., Milosavljević, S. and Macura, S., 1999. Flavones and sesquiterpene lactones from *Achillea atrata* subsp. *multifida*: antimicrobial Activity. Journal of Natural Product, 62: 909-911.
- Arora, D.S. and Kaur, G.J., 2007. Antibacterial activity of some Indian medicinal plants. Journal of Natural Medicin; 61: 313-317.
- Alizadeh, A. and Shaabani, M., 2012. Essential oil composition, phenolic content, antioxidant and antimicrobial activity in *Salvia officinalis* L. cultivated in Iran. Advance in Environmental Biology, 6: 221-226.
- Askari, M., Nazari, H., Rahimizadeh, S.H., Sadeghimansorkhani, H. and neshpayeh, N.A., 2016. The Effect of the hydroalcoholic extract of dill (*Anethum graveolens*) seed on lipid profile in diabetic male rats TT. Armaghan Danesh, 21: 446-454.
- Ali, E., Mahmoodi, R., Kazeminia, M., Hazrati, R. and Azarpey, F., 2017. Herbal essential oils as natural medicinal compounds. Journal of the Faculty of Medicin, Tehran Univercity of Medical Science, 75(7): 480-489.
- Bellaloui, N. and Brown, P.H., 1998. Cultivar differences in boron uptake and distribution in celery (*Apium graveolens*), tomato (*Lycopersicon esculentum*) and wheat (*Triticum aestivum*). Plant and Soil. 198: 153-158.
- Bromand, A., Hamedi, M., Emam jome, Z., Razavi, H. and Golmakani, M., 2012. Investigate the Antimicrobial properties of seed essential oil of *Anethum graveolens* and *Coriangrum sativum* on *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* using a dilution sensitivity test in a liquid environment. Iranian Food Science and Technology Research, 4(1): 59-68.
- Capriotti, A.L., Cavaliere, C., Foglia, P., Samperi, R. and Laganà, A., 2011. Intact protein separation by chromatographic and/or electrophoretic techniques for top-down proteomics. Journal of Chromatography, 1218: 8760-8787.
- Derakhshan, S., Navidinia, M. and Ahmad, A., 2017. Antibacterial activity of dill (*Anethum graveolens*) essential oil and antibiofilm activity of Cumin (*Cuminum cyminum*) alcoholic extract. Infection Epidemiology and Microbiology, 3(4): 122-126.
- Everard, J.D., Gucci R., Kann, S.C., Flore, J.A. and Loescher, WH., 1994. Gas exchange and carbon partitioning in the leaves of celery (*Apium graveolens* L.) at various levels of root zone salinity. Plant Physiology, 106: 281-292.
- Garrity, G., Boone, M. and David, R., 2004. Bergy`s Manual of Systematic Bacteriology. Springer publication, Mishigan United State University, 964p.
- Ghaderi, S., Falahati hosein abad, A. and Sarayelo, M., 2012. Evaluation of the antibacterial effect of essential oils of three plants: coriander, yarrow and dill in laboratory conditions. Journal of Shahrekord Univercity of Medical Science, 12(3): 13-90.
- Ghalandari, S., Kariman, N., Sheikhan, Z., Shahrahmani, H. and Asadi, N., 2016. Systematic review on variety of effective treatment methods for postpartum hemorrhage in Iran and world. The Iranian Journal of Obstetrics, Gynecology and Infertility. 19: 16-38.
- Heath Farris, M., Duffy, C., Findlay, R.H. and Olson, J.B., 2011. Streptomyces scopuliridis sp. nov., a bacteriocin-producing soil streptomycete. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 61(9): 2112-2116.
- Ivanović, M., Alañón, M.E., Arráez-Román, D. and Segura-Carretero, A., 2018. Enhanced and green extraction of bioactive compounds from *Lippia citriodora* by tailor-made natural deep eutectic solvents. Food Research International, 111: 67-76.
- Jozdaemi, F., GHorbani, M., Sadeghi Mahonaki, A. and Hagh Nazari, S., 2009. Investigating the sensory and physicochemical properties of fruit drinks made from yogurt water. Journal of Food Processing and Preservation, 1(4): 63-78.
- Jafarzadeh Khaledi, K., Aghazadeh Meshgi, M., Sharian, A. and Larijani, K., 2010. Investigation of the effect of Rosemary essential oil on the growth process of *Staphylococcus aureus* bacteria in commercially prepared soup. Comparative Biopathology of Iran, 7(2): 255-262.
- Kazemi, M. and Abdossi, V., 2015. Chemical composition of the essential oils of *Anethum graveolens* L. Bangladesh Journal Botany, 44(1): 159-161.
- Khadivi, F. and Dehnad, A.R., 2009. Potential of gold nanoparticles obtained by Actinomistalls Maku soil and hot springs of Ardabil (above 40◦C) [Dissertation]. Zanjan Branch, Zanjan: Islamic Azad Univercity, Zanjan, Iran.
- Krasaekoopt, W. and Watcharapoka, S., 2014. Effect of addition of inulin and galactooligosaccharide on the survival of microencapsulated probiotics in alginate beads coated with chitosan in simulated

- Papari Moghadam Fard, M. and Ketabchi, S., 2018. Identification of rolatile campounds of *Haplophllum* bakhteganicum. Second International Conference on Medical Plants, Organic Agriculture, Natural Resources and Pharmceutical, Mashhad, Iran, 13 March.
- Papari Moghadam Fard, M., Ketabchi, S., Farjam, M.H., 2020. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant potential of essential oil of *Ziziphus spina-christi* var *aucheri* grown wild in Iran. Journal of Medicinal Plants and By-products 1: 67-71.
- Sepahvand, A., Kord bache, B., Delphan, F., Zeini, S., Hashemi, J. and Mahmoodi, M., 2007. Anti-fungal effects of essential oil of *Satureja khuzestanika* plant in Lorestan region by method. Journal of Lorestan University of Medical Science; 2: 37-43.
- Sofia, P.K., Prasad, R., Vijay, V.K. and Srivastava, A.K., 2007. Evaluation of antibacterial activity of Indian spices against common foodborne pathogens. International Journal of Food Science & Technology, 42: 910-915.
- Shafquat, A., Joice, R., Simmons, S.L. and Huttenhower, C., 2014. Functional and phylogenetic assembly of microbial communities in the human microbiome. Trends Microbiology, 22: 261-266.
- Shahriari, A. and Davari, A., 2015.The effect of drought and salinity stresses on seed germination of Alyssum hamalocarpum in Iran's arid lands. International Journal of Agriculture. Technology, 11: 1625-1639.
- Walter, C., Shinwari, Z., Afzal, I. and Malik, R., 2011. Antibacterial activity in herbal products used in Pakistan. Pakistan Journal of Botany, 43: 155-162.
digestive system, yogurt and fruit juice. LWT-Food Science and Technology, 57: 761-766.
- Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P. and Nychas, G.J.E., 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. Journal of Applied Microbiology, 91: 453-462.
- Munda, S., Dutta, S., Pandey, S.K., Sarma, N. and Lal, M., 2019. Antimicrobial activity of essential oils of medicinal and aromatic plants of the North East India. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 22: 105-119.
- Pandid, L., Kumar, S., Karunasagar, I. and Karanasagar, I.D., 2005. Diagnosis of partially treated culturenegative bacterial meningitis using 16S rRNAuniversal primers and restriction endonucleasedigestion. Journal of Medical Microbiology, 54: 539-542.
- Peerakam, N., Wattanathorn, J., Punjaisee, S., Buamongkol, S., Sirisa-ard, P. and Chansakaow, S., 2014. Chemical profiling of essential oil composition and biological evaluation of *Anethum graveolens* L. (Seed) Grown in Thailand. Journal of Natural Science Research, 4(16): 34-41.
- Purnavab, S., Ketabchi, S. and Rowshan, V., 2015. Chemical composition and antibacterial activity of methanolic extract and essential oil of Iranian *Teucrium polium* against some of phytobacteria. Natural Product Research, 29(14): 1376-1379.
- Papari Moghadam Fard, M. and Ketabchi, S., 2017. Natural Ingredients of Native Plants of Iran: Along with the Introduction of identification Devices and Methods. Takht Jamshid Publication, Shiraz, Iran, 128p.

Study on chemical compounds and antibacterial activity of *Anethum graveolens* L. essential oil as a natural preservative and flavoring in celery juice

E. Kianifar[1] and S. Ketabchi[2*]

1- M.Sc. student, Department of Microbiology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran
2*- Corresponding author, Department of Plant Pathology and Plant Protection, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran
E-mail: ketabchis@gmail.com

Received: November 2020 Revised: April 2021 Accepted: April 2021

Abstract

Nowadays, considering the side effects of chemical preservatives and the attention of food manufacturers to the natural preservatives, it seems necessary to evaluate the antimicrobial effects of natural preservatives in the laboratory and food models. In this study, the stems and leaves essential oil of *Anethum graveolens* L. was extracted by Clevenger apparatus and its compounds were identified using GC-MS. The fresh celery juice was stored for 7 days at the room temperature until it was rotten, then the serial dilution was prepared and the bacterial culture was performed using pour plate method. The different bacterial isolates were purified and the antibacterial effect of different essential oil concentrations was investigated by disk diffusion method on the dominant bacteria. The sensitive bacteria to the dill essential oil were identified by the standard microbiological methods and 16S rRNA gene amplification method. Then the effective concentration was added to the celery juice and the effect of essential oil on the population of total and dominant bacteria was investigated. The sensory acceptance of different essential oil concentrations among the population groups was assessed by a five-point hedonic questionnaire. This research was conducted in a completely randomized design with three replications. Based on the GC-MS results, dillapiole (21.2%), *α*-phellandrene (37.2%), and *β*-phellandrene (9.2%) were the most important constituents of dill essential oil. The results of sequence blasting showed that *Bacillus cereus* and *Acetobacter fabarum* were the most dominant putrefactive bacteria in the celery juice. Based on the results, there was a significant difference between the five concentration groups in terms of halo diameter in the bacteria. The highest halo diameter in both bacteria was obtained at the concentration of 1000. In general, the results of the present study showed that dill essential oil is a suitable additive for the celery juice based on the results of sensory evaluation and in terms of controlling the putrefactive bacteria.

Keywords: *Bacillus Cereus*, *Acetobacter fabarum*, *Anethum graveolens* L., 16S rRNA, fingerprinting method, α-Phellandrene.