اثر اسانس آویشن شیرازی، اسید استیک، دما و زمان نگهداری بر احتمال رشد *کلستریدیوم بوتولینوم* تایپ A در محیط براث BHI

سعید خانزادی[۱]، ودود رضویلر[۲]، افشین آخوندزاده بستی[۳]، عبداله جمشیدی[٤]

چکیده

گیاهان معطر غنی از اسانس‌های گیاهی هستند که خواص ضد میکروبی قابل توجهی دارند. لذا از این مواد می‌توان جهت به تاخیر انداختن یا ممانعت از رشد میکروارگانیسم‌های بیماریزا و یا عامل فساد استفاده کرد. در این مطالعه لگاریتم درصد احتمال[5] رشد باکتری *کلستریدیوم بوتولینوم* تایپ A در محیط براث[6] BHI متاثر از غلظت های مختلف (صفر، ۰/۰۳ و ۰/۰۶ درصد) اسانس آویشن شیرازی و سطوح pH (۷/۴ و ۶/۵) طی ۳۰ روز نگهداری در دو دمای ۳۵ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت. لگاریتم درصد احتمال رشد باکتری و حداقل تعداد باکتری مورد نیاز جهت شروع رشد[7] (CN) به طور معنی داری ($P < ۰/۰۵$، آنالیز واریانس) تحت تاثیر غلظت‌های مختلف اسانس، سطوح pH و دمای نگهداری قرار گرفت. بطوریکه در غلظت صفر، ۰/۰۳ و ۰/۰۶ درصد اسانس، pH ۷/۴ و دمای ۳۵درجه سانتیگراد، لگاریتم درصد احتمال رشد باکتری و حداقل تعداد باکتری مورد نیاز جهت شروع رشد به ترتیب ۱/۷۴ $(CN = ۱/۸۲)$ ، ۱/۲۶- $(CN = ۱۸۵۱)$ و ۳/۲۶- $(CN = ۱۷۹۸۸۸)$ و در ۲۵درجه سانتیگراد، ۱/۰۴ $(CN = ۹)$ ، ۲/۲۶- $(CN = ۱۸۲۸۱)$ و ۳/۲۶- $(CN = ۱۷۹۸۸۸)$ بود و در غلظت صفر، ۰/۰۳ و ۰/۰۶ درصد اسانس، pH معادل ۶/۵ و دمای۳۵درجه سانتیگراد به ترتیب ۱/۰۴(CN=۹)، ۲/۲۶- $(CN = ۱۸۲۱)$، ۲/۹۲- $(CN = ۸۲۴۱۹)$ و در۲۵درجه سانتیگراد به ترتیب ۰/۷۳ $(CN = ۱۸)$، ۲/۹۲- $(CN = ۸۲۴۱۹)$ و ۳/۲۶- $(CN = ۱۷۹۸۸۸)$ بود. طبق نتایج بدست آمده لگاریتم درصد احتمال رشد *کلستریدیوم بوتولینوم* تایپ A با افزایش غلظت اسانس، کاهش pH و کاهش دمای نگهداری کاهش پیدا می‌کند.

واژه‌های کلیدی: اسانس آویشن شیرازی، *کلستریدیوم بوتولینوم* تایپ A، لگاریتم درصد احتمال رشد

۱- استادیار گروه بهداشت مواد غذائی و آبزیان، دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد khanzadi@Ferdowsi.um.ac.ir

۲- استاد سابق گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران

۳- دانشیار گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران

٤- استادیار گروه بهداشت مواد غذائی و آبزیان، دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد

[5] - Log Probability Percentage (Log P %)
[6] - Brain Heart Infusion Broth
[7] - Cell needed

مقدمه

با توجه به اینکه گزارشات مربوط به عفونتهای با منشاء غذائی رو به افزایش می‌باشد مسئله سلامت مواد غذایی نگرانی عمده‌ای را هم برای مصرف‌کنندگان و هم برای صنایع غذایی ایجاد کرده است (۱۰). افزایش میزان بروز بیماریهای حاصل از غذا همراه با مشکلات اجتماعی و اقتصادی ناشی از آن لزوم تولید مواد غذایی سالمتر و نیز استفاده از ترکیبات ضد میکروبی جدید را مطرح نموده است. نگرانی در خصوص استفاده از برخی نگهدارنده‌های شیمیایی و واکنش منفی مصرف‌کنندگان به استفاده از این مواد موجب افزایش توجه به نگهدارنده‌های طبیعی به عنوان جایگزین نگهدارنده‌های شیمیایی شده است. در این میان توجه تولید کنندگان و مصرف‌کنندگان به استفاده از اسانس های گیاهی معطوف شده است. خواص ضد میکروبی این مواد بر علیه طیف وسیعی از باکتریها، مخمرها و قارچها به اثبات رسیده است. اکثر مطالعات انجام شده دراین موارد در محیط های آزمایشگاهی بوده است، لذا اطلاعات کمتری در مورد اثرات آنها در مواد غذایی موجود می‌باشد (۱،۵،۶،۸،۱۰،۱۵،۱۶).

عوامل طبیعی ضد میکروبی بدست آمده از گیاهان، حیوانات و میکروب‌ها مورد ارزیابی قرار گرفته و فعالیت این مواد در محیط های آزمایشگاهی، سیستم های مدل و برخی مواد غذایی بررسی شده‌اند. حدود ۳۰۰۰ نوع اسانس گیاهی شناسایی شده است که ۳۰۰ نوع از آنها از نظر تجارتی دارای اهمیت می‌باشند و عمدتا به منظور ایجاد عطر و طعم مورد استفاده قرار می‌گیرند. در بین روشهای تهیه اسانس‌های گیاهی یکی از بهترین روش ها، روش تقطیر است. این روش برای تولید اسانس‌های گیاهی اولین بار در ۲۰۰۰ سال قبل توسط ایرانیان، مصریان و هندیان استفاده شده است (۵،۱۲).

تحقیقات و بررسی های زیادی بر روی خواص اسانس‌های گیاهی از جمله خواص ضد میکروبی اسانس های بدست آمده از گیاهان خانواده لامیاسه انجام شده است (۱،۳،۵،۶،۸،۱۰،۱۲،۱۳،۱۴). در این خانواده بالغ بر ۴۰۰۰ گونه وجود دارد که سابقه انتشار آنها در منطقه مدیترانه است. گیاهان معروفی چون نعناء، اسطوخودوس، بادرنجبویه، پونه، مریم گلی، آویشن، مرزه، ریحان، مرزنجوش و آویشن شیرازی در این خانواده قرار دارند(۲).

آویشن شیرازی *(Zataria multiflora Boiss.)* از گیاهان بومی ایران، پاکستان و افغانستان است (۱،۲،۳،۱۳). گیاهی است بوته مانند، دارای ساقه‌های متعدد، نازک و سخت و بسیار منشعب، گلهای آن کاسه غشائی با دندانه‌های مثلث شکل و بحالت مجتمع با ظاهر مدور در کنار برگها قرار دارد. جام گل آن سفید است. برای این گیاه اسامی مختلفی از جمله آفشن، آبشن شیرازی، آویشم و آویشن آورده شده است. اعضاء جنس زاتاریا *(zataria)* به طور وسیع در ایران پراکنده‌اند. زاتاریا مولتی فلورا *(Zataria multiflora Boiss.)* از اعضاء معطر جنس زاتاریا است که به عنوان طعم دهنده، ضد عفونی کننده، محرک و ضد درد استفاده می‌شود (۳،۷).

در این مطالعه لگاریتم درصد احتمال رشد *کلستریدیوم بوتولینوم* تایپ A در محیط براث قلب و مغز (BHI) متاثر از غلظت های مختلف اسانس آویشن شیرازی (صفر،۰/۰۳، ۰/۰۶ درصد)، دو سطح pH (۷/۴، ۶/۵)، طی ۳۰ روز نگهداری در دمای ۳۵ و ۲۵ درجه سانتیگراد بررسی شد.

مواد و روش‌ها

تهیه اسانس و آنالیز آن:

گیاه آویشن شیرازی درفصل تابستان از استان فارس جمع آوری و توسط پژوهشکده گیاهان دارویی دانشگاه تهران تایید نام علمی گردید. پس از تهیه اسانس از سر

شاخه‌های هوایی گیاه به روش تقطیر با بخار[1]، آنالیز اسانس توسط دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف نگار جرمی[2] (GC/MS) انجام شد. دستگاه GC/MS از نوع Thermoquest finnigan با ستون مویینه به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۲۵۰ میکرومتر و ضخامت لایه داخلی ۰/۲۵ میکرومتر با برنامه دمایی ۵۰ تا ۲۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه استفاده شد. دمای اتاقک تزریق ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد و گاز حامل هلیم با سرعت ۱/۵ میلی لیتر دردقیقه بود. شناساگر EI با انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت و دمای منبع یونیزاسیون ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد بود.

میکروارگانیسم مورد مطالعه و آماده سازی آن جهت تلقیح

باکتری مورد استفاده در این مطالعه *کلستریدیوم بوتولینوم* تایپ A (RS5) دپارتمان اپیدمیولوژی و طب پیشگیری دانشکده دامپزشکی دیویس دانشگاه کالیفرنیا) تهیه شده از گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران بود. سوسپانسیون اسپور *کلستریدیوم بوتولینوم* تهیه شده حاوی $۵/۲\times۱۰^{۷}$ اسپور در میلی لیتر بود. جهت تایید تعداد اسپورها ابتدا به صورت استریل به میزان کافی از مخزن اسپور برداشت می‌شد و پس از رقت سازی بر روی محیط آگار زرده تخم مرغ[3] (EYA) کشت سطح انجام می‌شد. پلیت های کشت داده شده در جار بی هوازی قرار داده شده و در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری می‌شدند. در مرحله بعد با شمارش کلنی‌های رشد کرده بر روی سطح پلیت ها و تعیین میانگین تعداد آنها و اعمال ضرایب لازم، تعداد اسپور در مخزن اسپور قبل از هر بار تلقیح باکتری تعیین می‌شد.

تهیه محیط BHI با غلظت‌های مورد نظر اسانس و تنظیم pH توسط اسید استیک

در این مطالعه جهت بررسی اثر اسانس آویشن شیرازی و pH بر روی لگاریتم درصد احتمال رشد (Log P%) اسپورهای *کلستریدیوم بوتولینوم* از یک طرح بررسی اثرات ترکیبی چند فاکتوری شامل سه غلظت اسانس آویشن شیرازی ، دو سطح pH و دو دمای نگهداری در محیط براث BHI استفاده شد. وضعیت رشد طی ۱۰ مرحله در روزهای ۳۰، ۲۴، ۱۸، ۱۲، ۹، ۶، ۳، ۲، ۱، ۰ در طول ۳۰ روز مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس فاکتورهای ذکر شده جمعا ۱۲ حالت محیط کشت مورد نیاز بود. برای هر حالت، ۱۰۰ میلی لیتر محیط براث پایه تهیه شد. بدین ترتیب که ۳/۷ گرم پودر BHI را در ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر با حرارت ملایم حل کرده و سپس غلظت های مورد نظر اسانس ، ۵ درصد دی متیل سولفو کساید (DMSO) به عنوان امولسیفایر و ۰/۰۵ درصد آگار آگار به عنوان تثبیت کننده به آن اضافه کردیم. سپس حجم محیط را بوسیله آب مقطر به ۱۰۰ میلی‌لیتر رساندیم.

در مرحله بعد محیط آماده شده را در لوله های در پیچ دار (در هر یک به میزان ۹ میلی متر) تقسیم کرده و در اتو کلاو (۱۲۱ درجه سانتی گراد، ۱۵ دقیقه) استریل می‌شدند. درمجموع برای هر حالت نیاز به ۷ لوله در پیچ دار حاوی ۹ میلی لیتر محیط کشت بود. جهت تنظیم pH مورد نظر برای هر حالت قبل از استریل کردن محیط‌ها، pH آنها توسط دستگاه pH متر الکتریکی تعیین و سپس در صورت نیاز توسط اسید استیک و سود نرمال تا سطح مورد نظر تنظیم می‌شد. لازم به ذکر است که تعیین و تنظیم pH پس از استریل شدن محیط ها نیز جهت حصول اطمینان از صحیح بودن سطح pH مورد نظر تکرار می‌شد (۱،۴).

1- Steam distillation
2- Gas chromatography/ Mass spectrometry
3- Egg yolk agar

تلقیح باکتری و گرمخانه گذاری

پس از استریل کردن محیط BHI حاوی غلظت مورد نظر اسانس و تنظیم مجدد pH، تلقیح باکتری انجام می‌شد. برای این منظور رقتهای ۱۰ تایی از 10^{4} تا 10^{-2} اسپور در هر میلی لیتر (۷رقت) در لوله های حاوی ۹ میلی لیتر براث BHI حاوی غلظت مورد نظر اسانس و pH مورد نظر تهیه می‌شد. در این مطالعه از روش ۲۱ لوله ای شمارش بیشترین تعداد احتمالی[1] (MPN) برای تعیین لگاریتم درصد رشد باکتری استفاده شد. لذا محتویات (۹میلی لیتری) هر یک از لوله های درپیچ دار به طور استریل در قسمت های مساوی ۳ میلی لیتری در داخل ۳ لوله در پوش دار (Becton Dikson ۱۶×۱۰۰mm) استریل ریخته و بدین ترتیب برای هر حالت ۲۱ = ۷ × ۳ لوله آماده می‌شد. به منظور ایجاد حالت بی هوازی بر روی محیط های موجود در لوله های استریل در پوش دار، در هر لوله به میزان ۱ میلی لیتر پارافین استریل ریخته می‌شد. هر مجموعه ۲۱ لوله ای که یک حالت آزمایش را تشکیل می‌دادند در دماهای مورد نظر یعنی ۳۵ و۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ روز گرمخانه گذاری می‌شدند و طی این مدت ۱۰ مرتبه در روزهای ذکر شده تمام لوله ها جهت بررسی کدورت ناشی از رشد باکتری مورد مطالعه قرارمی گرفتند.

محاسبه لگاریتم درصد احتمال رشد

لگاریتم درصد احتمال رشد از روی تعداد لوله های مثبت (کدورت قابل رویت ناشی از رشد باکتری) طی ۳۰ روز نگهداری با استفاده از فرمول ذیل محاسبه شد (۴،۱۱).

$$\text{Log P\%} = 2 - (\text{Log } I_{10} - \text{Log } G_{10})$$

I: تعداد سلولهای تلقیح شده در بالاترین غلظت

G: عبارت است از MPN سلولها در همان لوله (لوله حاوی بالاترین غلظت باکتری)

[1] - Most probable number

آنالیز آماری

اثر غلظت های مختلف اسانس و سطوح مختلف pH بر روی LogP% با استفاده از آنالیز واریانس و با کمک نرم افزار آماری (SPSS 10.0 for windows, SPSS Inc) ارزیابی شد.

نتایج و بحث

نتیجه آنالیز ترکیبات اسانس آویشن شیرازی مورد استفاده در این مطالعه با استفاده از روش GC/MS در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. بیشترین ترکیب تشکیل دهنده اسانس، کارواکرول Carvacrol (۷۱/۱۲درصد) بود. نتایج حداکثر LogP% *کلستریدیوم بوتولینوم* در محیط براث BHI متاثر از غلظت های اسانس و سطوح pH طی ۳۰ روز نگهداری در دمای۲۵ و ۳۵ درجه سانتیگراد در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. دراین جدول D روز رسیدن به حداکثر LogP% و CN تعداد سلولهای مورد نیاز برای رشد و ایجاد کدورت قابل مشاهده است.

جدول شماره ۱- نتایج آنالیز اسانس آویشن شیرازی مورد مطالعه با استفاده از GC/MS

نام ترکیب	اندیس بازداری	درصد
Thujene	۹۳۰	۰/۱۹
Alpha-Pinene	۹۳۷	۴/۲۶
Beta-Pinene	۹۷۶	۰/۴۳
Beta-myrcene	۹۸۵	۰/۸۵
Eucaliptol	۱۰۲۴	۳/۳۷
Gama-Terprinene	۱۰۵۵	۷/۳۴
Linalool	۱۰۹۰	۰/۶۸
Thymol methyl ether	۱۲۳۶	۰/۴۷
Carvacrol methyl ether	۱۲۴۳	۰/۴۶
Carvacrol	۱۲۹۹	۷۱/۱۲
Trans-Caryophllen	۱۴۱۸	۰/۴۱
Globulol	۱۵۸۲	۲/۳۲
جمع	—	۹۱/۹۰

جدول شماره ۲- حداکثر لگاریتم درصد احتمال رشد *کلستریدیوم بوتولینوم* تایپ A در براث BHI متاثر از غلظت های مختلف اسانس آویشن شیرازی ، سطوح pH ، دمای نگهداری طی ۳۰ روز و روز رسیدن به حداکثر Log P% (D) و CN (تعداد سلول باکتری مورد نیاز برای رشد و ایجاد کدورت).

درجه حرارت	PH	غلظت اسانس آویشن شیرازی (درصد)	حداکثر LogP%	CN (تعداد)	D
۳۵	۷/۴	۰	۱/۷۴	۱/۸۲	۲
		۰/۰۳	-۱/۲۶	۱۸۵۱	۶
		۰/۰۶	-۳/۲۶	۱۷۹۸۸۸	۶
۲۵	۷/۴	۰	۱/۰۴	۹	۳
		۰/۰۳	-۲/۶۲	۱۸۲۸۱	۶
		۰/۰۶	-۳/۲۶	۱۷۹۸۸۸	۹
۳۵	۶/۵	۰	۱/۰۴	۹	۲
		۰/۰۳	-۲/۶۲	۱۸۲۸۱	۶
		۰/۰۶	-۲/۹۲	۸۲۴۱۹	۱۲
۲۵	۶/۵	۰	۰/۷۳	۱۸	۶
		۰/۰۳	-۲/۹۲	۸۲۴۱۹	۱۲
		۰/۰۶	-۳/۲۶	۱۷۹۸۸۸	۱۲

اسانس‌ها ترکیبات روغنی آروماتیکی هستند که از مواد گیاهی (گل، جوانه، دانه، برگ، شاخه‌های کوچک، پوست، علف، چوب، میوه و ریشه‌ها) به دست می‌آیند. این مواد را می‌توان بوسیله فشار، تخمیر و عصاره گیری بدست آورد. اما روش تقطیر بابخار معمولترین روش تجاری مورد استفاده برای تهیه اسانس ها می‌باشد(۵). کیفیت و کمیت اسانس درگیاه به میزان قابل توجهی متاثر از عوامل مختلفی چون جغرافیای منطقه، عملیات کشاورزی، زمان برداشت ونحوه خشک کردن گیاه می‌باشد(۹). در حال حاضر خواص ضد باکتریایی اسانس های گیاهی به صور گوناگون و متنوعی نظیر استفاده به عنوان نگهدارنده‌های غذایی، مواد پر کننده ریشه دندان، آنتی سپتیک‌ها و مکمل های غذایی برای حیوانات مورد استفاده قرار می‌گیرد(۵).

مطالعات آزمایشگاهی بسیاری جهت بررسی اثرات ضد باکتریایی اسانس‌های گیاهی بر علیه طیف وسیعی از باکتریها نظیر *لیستریا مونوسایتوژنز*، *سالمونلا تیفی موریوم*، *استافیلو کوکوس اورئوس*، *اشریشیا کولای*، *شیگلا*، *باسیلوس سرئوس*، *کلستریدیوم بوتولینوم* و بسیاری از باکتری‌های دیگرانجام شده است (۱،۵،۶،۸،۱۰،۱۵،۱۶). بررسی های انجام شده در مورداثر ضد باکتریایی اسانس های گیاهی در مواد غذایی نشان می‌دهد که برای رسیدن به اثری مشابه اثر اسانس در محیط آزمایشگاهی نیاز به استفاده از مقادیر بالاتری اسانس در مواد غذائی می‌باشد (۵).

در این مطالعه از روش ۲۱ لوله ای شمارش MPN بر اساس شمارش لوله‌های دارای کدورت قابل رویت (ناشی از رشد باکتری تلقیح شده به محیط براث BHI) جهت تعیین یکی از فاکتورهای رشد باکتریایی یعنی LogP% استفاده شد (۱،۴،۱۱). بر اساس نتایج بدست آمده اسانس آویشن شیرازی و pH متاثر ازاسید استیک اثر معنی داری $(p<۰/۰۵)$ بر روی LogP% *کلستریدیوم بوتولینوم* طی ۳۰ روز نگهداری در دماهای ۳۵ و ۲۵ درجه سانتیگراد نشان دادند. به نحویکه در ۳۵ درجه سانتی‌گراد حداکثر LogP% باکتری در غلظت صفر درصد اسانس در pH معادل ۷/۴ برابر ۱/۷۴ بود، ولی این میزان در همین شرایط در غلظت های ۰/۰۳ و ۰/۰۶ درصد بترتیب معادل ۱/۲۶- و ۳/۲۶- بودند که بطور قابل توجهی کاهش نشان می‌دهند. همچنین در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد حداکثر LogP% در غلظت های صفر، ۰/۰۳ و ۰/۰۶ درصد اسانس در pH معادل ۷/۴ بترتیب برابر ۱/۰۴، ۲/۶۲- و ۳/۲۶- بودند که کاهش LogP% بطور چشمگیری اتفاق افتاده است. این مسئله نشانگر تاثیر بازدارندگی غلظت های بالا رونده اسانس بر روی رشد باکتری مورد مطالعه است. حداکثر میزان LogP% در ۳۵ درجه سانتیگراد و در pH معادل ۶/۵ بترتیب ۱/۰۴، ۲/۲۶- و ۲/۹۲- و در ۲۵ درجه سانتیگراد بترتیب ۰/۷۳، ۲/۹۲- و ۳/۲۶- بودند که کاهش قابل توجه LogP% در این سطح pH نیز مشاهده می‌شود. ضمن آنکه تاثیر توام غلظت های بالا رونده اسانس در pH معادل ۶/۵ نشانگر

کاهش بیشتر LogP% نسبت به pH معادل ۷/۴ می‌باشد. همچنین با توجه به روز رسیدن به حداکثر LogP% (D) تاخیر در رشد در pH معادل ۶/۵ نسبت به pH معادل ۷/۴ کاملا مشهود می‌باشد . علاوه بر این با توجه به جدول شماره ۲ فاکتور CN نشانگر تاثیر قابل توجه اثر دما، اسانس و pH بر روی رشد باکتری می‌باشد. CN متاثر از LogP% است بطوریکه با کاهش LogP% تعداد سلولهای باکتری مورد نیاز برای رشد و ایجاد کدورت افزایش می‌یابد و این بدان معنی است که با سخت شدن شرایط رشد باکتری یعنی با افزایش غلظت اسانس، کاهش pH و کاهش دما مقدار CN و تعداد سلولهای لازم برای رشد باکتری افزایش می‌یابد. حال آنکه در شرایط رشد آسان نظیر محیط براث با غلظت صفر درصد اسانس، pH معادل ۷/۴ و دمای ۳۵ درجه سانتیگراد میزان CN بسیار پایین است و با کمتر از ۲ عدد باکتری قادر به رشد و ایجاد کدورت است، ولی در شرایط سخت نظیر غلظت های بالاتر اسانس، pH پایین و دمای پایین میزان CN به ۱۷۹۸۸۸ افزایش یافته است. این مسئله نشان می‌دهد که در شرایط سخت تعداد باکتری مورد نیاز برای رشد و ایجاد کدورت بسیار بیشتر است.

مطالعات مختلفی در خصوص اثرات ضد باکتریایی اسانس های گیاهی خانواده لامیاسه و برخی ترکیبات مهم این اسانس ها نظیر کارواکرول و تیمول انجام شده است. در مورد حساسیت میکرو ارگانیسم های گرم مثبت و گرم منفی نسبت به اسانس‌های گیاهی، مطالعات انجام شده نشان می‌دهند که اثر این اسانس ها بر روی باکتریهای گرم مثبت قدری بیشتر از اثر آنها بر روی باکتریهای گرم منفی می‌باشد گرچه همه مطالعات این موضوع را تایید نمی کنند. برای مثال *آئرومونـاس هیـدروفیلا* علیرغم گرم منفی بودن از حساسترین گونه ها نسبت به اسانس‌های گیاهی است (۵).

Palmer و همکاران در سال ۲۰۰۱ اثر چهار اسانس گیاهی از جمله اسانس Thyme به عنوان نگهدارنده طبیعی را بر روی *لیستریا مونو سایتوژنز* و *سالمونلا انتریتیدیس* در پنیر نرم مورد بررسی قرار دادند و اعلام کردند که همه این اسانس ها قادرند در غلظت معادل ۱٪ تعداد *لیستر یا مونوسایتوژنز* را به مقدار قابل توجهی کاهش دهند(۱۰).

در مطالعه Marino و همکاران در سال ۲۰۰۱ طیف گسترده ای از اسانس های گیاهی خانواده لامیاسه وکامپوزیته از جمله مریم گلی، نعناء، پونه و مرزنجوش جهت بررسی اثر ضد میکروبی آنها بر روی ۹ سویه باکتری گرم مثبت و ۶ سویه باکتری گرم منفی مورد استفاده قرار گرفت. اطلاعات بدست آمده نشان داد که اسانس های مریم گلی، نعناء و بابونه عموما خاصیت باکتریو استاتیکی دارند ولی اسانس مرزنجوش در غلظت بالای ppm ۴۰۰ اثر باکتریسیدی دارد(۸).

در مطالعه Tassou و همکاران در سال ۲۰۰۰ اثر ممانعت کنندگی اسانس نعناء (*Mnetha Piperita*) بر روی رشد و بقاء *سالمونلا انتریتیدیس و استافیلوکوکوس اورئوس* در محیط براث مغذی با استفاده از روش‌های اندازه گیری هدایت الکتریکی[1] و شمارش باکتریهای زنده مورد ارزیابی قرار گرفت و نشان داده شد که غلظت ۱٪ اسانس سبب کاهش Log ۷-۶ در تعداد *استافیلوکوکوس اورئوس* و کاهش حدود Log ۳ در تعداد *سالمونلاانتریتیدیس* می‌شود. همچنین نشان داده شد که اثر ممانعت کنندگی اسانس بوسیله دمای نگهداری (انکوباسیون) و نیز غلظت اسانس تحت تاثیر قرار می‌گیرد(۱۵). در تحقیق دیگری اثر اسانس ماستیک Mastic essential oil بر روی رشد *کلستریدیوم بوتولینوم* پروتئولیتیک تایپ A و B توسط Difas و همکاران در سال ۲۰۰۴ بررسی شد. نتایج نشان دادند که غلظت ۳٪ اسانس مذکور برای ممانعت کامل از رشد *کلستریدیوم بوتولینوم* های پروتئولیتیک کافی است. این

1 - Impedance measurement

مطالعه همچنین اشاره می‌کند که تایپ A نسبت به تایپ B بسیار به اسانس حساستر است(۶).

از اجزاء مهم اسانس های خانواده لامیاسه تیمول و کارواکرول است. در نمونه اسانس آویشن شیرازی مورد استفاده در این مطالعه نیز ترکیب اصلی و بیشترین جزء تشکیل دهنده را کارواکرول (۷۱/۱۲ درصد) تشکیل می‌داد. مطالعات متعددی اثرات ضد باکتریایی برخی اسانس های گیاهی را به تیمول و کارواکرول که عملکرد مشابهی نیز دارند نسبت می‌دهند(۱،۶،۸،۱۵). لذا به نظر می‌رسد که اثر ممانعت از رشد اسانس آویشن شیرازی در مطالعه حاضر نیز مربوط به میزان بالای کارواکرول آن باشد.

تاثیر ممانعت کنندگی اسانس مذکور بر روی باکتری *کلستریدیوم بوتولینوم* که عامل خطرناکترین مسمومیت غذایی در انسان یعنی مسمومیت بوتولیسم می‌باشد می‌تواند نوید بخش این امر باشد که روزی می‌توان بطور موثر و متداول از اسانس‌های گیاهی به عنوان نگهدارنده‌های طبیعی جهت کنترل باکتریهای عامل عفونت و مسمویت غذایی استفاده نمود.

تشکر و قدر دانی

بدینوسیله از حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه تهران در اجرای این طرح قدردانی می‌شود.

فهرست منابع

۱- آخوندزاده بستی الف، و رضویلر ،ع میثاقی ، ر عباسی فر ، ب رادمهر و ف خلیفی سیگارودی، ۱۳۸۲. اثر اسانس آویشن شیرازی بر روی احتمال رشد *سالمونلاتیفی موریوم* در محیط آبگوشت قلب و مغز. فصلنامه گیاهان داروئی ، شماره ۹ ، صفحات ۹۳-۸۵.

۲- زرگری ع،۱۳۷۶، گیاهان داروئی ، چاپ ششم، موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران،جلد چهارم، صفحات ۱۵۴-۱.

3- Ali MS, Saleem M, Ali Zand Ahmad VU. 2000. Chemistry of Zataria Multiflora (Lamiaceae). Phytochemistry 55: 933-936.

4- Basti AA and Razavilar V. 2004. Growth response and modeling of the effects of selected factors on the time – to – detection and probability of growth initiation of *Salmonella typhimurium*. Food Microbiol. 21: 431-438.

5- Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. Int. J. Food Microbiol. 94: 223-253

6- Difas Dp, Smith JP, Blanchfield BB, Sanders G, Austin JW and Koukoutisis J. 2004. Effects of mastic resin and its essential oil on the growth of proteolytic *clostridium botulinum*. Int. J. Food Microbiol .94: 313-322.

7- Hosseinzade H, Ramezani M and Salmani G. 2000. Antinociceptive, anti-inflammatory and acute toxicity effects of Zataria multiflora Boiss extracts in mice and rats. J. Ethnopharmacology. 73: 379 - 385.

8- Marino M, Bersani C and Comi G. 2001. Impedance measurements to the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. Int. J. Food Microbiol. 67: 187 - 195.

9- Naghdi Badi H, yazdani D, Ali MS and Nazari F. 2004. Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme, Thymus vulgaris L. An. Int. J. Industrial crops and products. 19: 231-236.

10-Palmer AS, Steward J and Fyfe L 2001. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. Food Microbiol. 18: 463-470.

11-Razavilar V and Genigeorgis C. 1998. Prediction of *Listeria* spp. Growth as affected by various levels of chemicals, pH, temperature and storage time in a model broth. Int. J. Food Microbiol. 40: 149-157.

12-Roller S and Lusengo J. 1997. Developments in natural food preservatives. Agro. Food Industry. Hi. Tech. 42- 50.

13-Saleem M, Nazli R, Afza N, Sami A and Ali MS. 2004. Biological Significance of essential oil of Zataria multiflora Boiss. Nat. Prod. Res. 18 (6): 493- 497.

14-Sardari S, Amin G, Micetich RG and Daneshtalab M. 1998. Anti fungal activity of selected Iranian and Canadian plants pharmaceutical. Biol. 36 (3): 180- 188.

15-Tassou C, Koutsoumanis K and Nychas G-J. E. 2000. Inhibition of *Salmonella enteritidis* and *staphylococcus aureus* in nutrient broth by mint essential oil. Food Res. Int. 33: 273- 280.

16-Valero M and Salmeron MC. 2003. Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. Int. J. Food Microbiol. 85: 73- 81.

Effects of *Zataria multiflora Boiss*. essential oil, acetic acid, temperature and storage time on probability of growth initiation of *Clostridium botulinum* type A in Brain Heart Infusion broth

S. Khanzadi[1*], V. Razavilar[2], AA. Basti[3] and A. Jamshidi[4]

Abstract

The aromatic plants are rich in essential oils characterized by a notable antimicrobial activity. For this reason, these substances can be used to delay or inhibit the growth of pathogenic or spoilage microorganisms. In this study, Log Probability percentage (Log P%) of growth of the *Clostridium botulinum* type A spores in Brain Heart Infusion (BHI) broth as affected by various levels of Zataria multiflora boiss essential oil (0.0 , 0.03 and 0.06%), pH (7.4 , 6.5) and temperatures (35 , 25°C) during 30 days of storage was evaluated. The Log P% of *C. botulinum* in BHI broth with 0 , 0.03 and 0.06% essential oil , pH 7.4 at 35°C was 1.74 (CN = 1.82), -1.26 (CN = 1851) and – 3.26 (CN=179888) and at 25°C was 1.04 (CN = 9) , -2.62 (CN = 18281) and -3.26 (CN = 179888) respectively and with 0, 0.03 and 0.06% essential oil, pH 6.5 at 35°C was 1.04 (CN = 9), -2.26 (CN = 18281) and -2.92 (CN = 82419) and at 25°C was 0.73 (CN = 18), -2.92 (CN = 82419) and -3.26 (CN = 179888) respectively. Based on these results, the Log P% of growth of *C.botulinum* was decreased by increasing the concentration of essential oil, decreasing the pH level and temperature.

Keywords: Zataria multiflora Boiss. essential oil, *Clostridium botulinum* type A, Log probability percentage of growth.

[1] - Assistant professor, Dept. Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. khanzadi@Ferdowsi.um.ac.ir
[2] - Professor, Dept. Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran, Iran.
[3] - Associated professor, Dept. Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran, Iran.
[4] - Assistant professor, Dept. Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.