

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

سعید خانزادی ، ودود رضویلر ، افشین آخوندزاده بستی ، عبدالله جمشیدی

## 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<sup>۵</sup> رشد باکتری کلستریدیوم بوتولینوم تایپ A در محیط برات<sup>۶</sup> BHI متاثر از غلظت‌های مختلف (صفر، ۰/۰۳ و ۰/۰۶ درصد) اسانس آویشن شیرازی و سطوح pH (۶/۵ و ۷/۴) 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<sup>۷</sup> (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 ۳۵ درجه سانتیگراد، لگاریتم درصد احتمال رشد باکتری و حداقل تعداد باکتری مورد نیاز جهت شروع رشد به ترتیب  $(CN = ۱/۸۲)$  ،  $(CN = ۱۸۵۱)$  -۳/۲۶ و  $(CN = ۱۷۹۸۸۸)$  و در ۲۵ درجه سانتیگراد، ۰/۰۳ و ۰/۰۶ درصد اسانس، pH معادل ۶/۵ و دمای ۳۵ درجه سانتیگراد به ترتیب  $(CN = ۱۷۹۸۸۸)$  -۳/۲۶ بود و در غلظت صفر، ۰/۰۳ و ۰/۰۶ درصد اسانس، pH معادل ۶/۵ و دمای ۳۵ درجه سانتیگراد به ترتیب  $(CN = ۱۸۲۱)$  -۲/۲۶ ،  $(CN = ۱۸۲۴۱۹)$  -۲/۹۲ و در ۲۵ درجه سانتیگراد به ترتیب  $(CN = ۱۸)$  ،  $(CN = ۱۸۲۴۱۹)$  -۲/۲۶ و  $(CN = ۱۷۹۸۸۸)$  -۳/۲۶ 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

[khanzadi@Ferdowsi.um.ac.ir](mailto:khanzadi@Ferdowsi.um.ac.ir)

- استادیار گروه بهداشت مواد غذایی و آبریان، دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد
- استاد سابق گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران
- دانشیار گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران
- استادیار گروه بهداشت مواد غذایی و آبریان، دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد

<sup>5</sup> - Log Probability Percentage (Log P %)

<sup>6</sup> - Brain Heart Infusion Broth

<sup>7</sup> - Cell needed

## مقدمه

با توجه به اینکه گزارشات مربوط به عفونت‌های با منشأ غذایی 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 تولیدکنندگان و مصرف‌کنندگان به استفاده از اسانس‌های 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 در این موارد در محیط‌های آزمایشگاهی بوده است، لذا اطلاعات کمتری در مورد اثرات آنها در مواد غذایی موجود می‌باشد (۱۶، ۱۵، ۱۰، ۸، ۶، ۵، ۱).

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

تحقیقات و بررسی‌های زیادی بر روی خواص اسانس‌های گیاهی از جمله خواص ضد میکروبی اسانس‌های بدست آمده از گیاهان خانواده لایاسه انجام شده است (۱۴، ۱۳، ۱۲، ۱۰، ۸، ۶، ۵، ۳، ۱). در این خانواده بالغ بر ۴۰۰۰ گونه وجود دارد که سابقه انتشار آنها در منطقه مدیترانه است. گیاهان معروفی چون نعنا، اسطوخودوس، بادرنجبویه، پونه، مریم‌گلی، 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 (۱۳، ۳، ۲، ۱). گیاهی است بوته‌مانند، دارای ساقه‌های متعدد، نازک و سخت و بسیار منشعب، گل‌های آن کاسه‌گشائی با دندان‌های 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 (۷، ۳).

در این مطالعه لگاریتم درصد احتمال رشد کلستریدیوم بوتولینوم تایپ A در محیط براث قلب و مغز (BHI) متاثر از غلظت‌های 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 در فصل تابستان از استان فارس جمع‌آوری و توسط پژوهشکده گیاهان دارویی دانشگاه تهران تایید نام علمی گردید. پس از تهیه اسانس از سر

## 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 برات 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 برات پایه تهیه شد. بدین ترتیب که ۳/۷ گرم پودر BHI را در ۹۰ میلی لیتر آب مقطر با حرارت ملایم حل کرده و سپس غلظت‌های 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 میلی لیتر 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 می شدند. در مجموع 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 می شد. لازم به ذکر است که تعیین و تنظیم pH پس از استریل شدن محیط‌ها نیز جهت حصول اطمینان از صحیح بودن سطح pH مورد نظر تکرار می شد (۱،۴).

شاخه‌های هوایی گیاه به روش تقطیر با بخار<sup>۱</sup>، آنالیز اسانس توسط دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف نگار جرمی<sup>۲</sup> (GC/MS) انجام شد. دستگاه GC/MS از نوع Thermoquest finnigan با ستون موئینه به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میکرومتر و ضخامت لایه داخلی ۰/۲۵ میکرومتر با برنامه دمایی ۵۰ تا ۲۶۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه استفاده شد. دمای اتاقک تزریق ۲۵۰ درجه سانتی گراد و گاز حامل هلیم با سرعت ۱/۵ میلی لیتر در دقیقه بود. شناساگر EI با انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت و دمای منبع یونیزاسیون ۲۵۰ درجه سانتی گراد بود.

## میکروارگانسیم 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  $10^7 \times 5/2$  اسپور در میلی لیتر بود. جهت تایید تعداد اسپورها ابتدا به صورت استریل به میزان کافی از مخزن اسپور برداشت می شد و پس از رقت سازی بر روی محیط آگار زرده تخم مرغ<sup>۳</sup> (EYA) کشت سطح انجام می شد. پلیت های کشت داده شده در جار بی هوازی قرار داده شده و در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری می شدند. در مرحله بعد با شمارش کلنی های 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 می شد.

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 رفتهای ۱۰ تا ۱۰<sup>-۲</sup> اسپور در هر میلی لیتر (۷رقت) در لوله های حاوی ۹ میلی لیتر برات BHI حاوی غلظت مورد نظر اسانس و pH مورد نظر تهیه می‌شد. در این مطالعه از روش ۲۱ لوله ای شمارش بیشترین تعداد احتمالی<sup>۱</sup> (MPN) برای تعیین لگاریتم درصد رشد باکتری استفاده شد. لذا محتویات (۹ میلی لیتری) هر یک از لوله های در پیچ 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 = ۳×۷ 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 و ۲۵ 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 قرار می‌گرفتند.

### 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)

## 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 (۷۱/۱۲ درصد) بود. نتایج حداکثر LogP% کلستریدیوم بوتولینوم در محیط برات BHI متأثر از غلظت های اسانس و سطوح pH طی ۳۰ روز نگهداری در دمای ۲۵ و ۳۵ درجه سانتیگراد در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. در این 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	۱۲۲۶	۰/۴۷
Carvacrol methyl ether	۱۲۴۳	۰/۴۶
Carvacrol	۱۲۹۹	۷۱/۱۲
Trans-Caryophyllen	۱۴۱۸	۰/۴۱
Globulol	۱۵۸۲	۲/۳۲
جمع	—	۹۱/۹۰

<sup>1</sup> - Most probable number

استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیا کولای، شیگلا، باسیلوس سرئوس، کلستریدیوم بوتولینوم و بسیاری از باکتری‌های دیگر انجام شده است (۱۶، ۱۵، ۱۰، ۸، ۶، ۵، ۱). بررسی‌های انجام شده در مورد اثر ضد باکتریایی اسانس‌های 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 غذایی می‌باشد (۵).

در این مطالعه از روش ۲۱ لوله‌ای شمارش MPN بر اساس شمارش لوله‌های دارای کدورت قابل رویت (ناشی از رشد باکتری تلقیح شده به محیط برات BHI) جهت تعیین یکی از فاکتورهای رشد باکتریایی یعنی  $\text{LogP\%}$  استفاده شد (۱۱، ۴، ۱). بر اساس نتایج بدست آمده اسانس آویشن شیرازی و pH متاثر از اسید استیک اثر معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) بر روی  $\text{LogP\%}$  کلستریدیوم بوتولینوم طی ۳۰ روز نگهداری در دماهای ۳۵ و ۲۵ درجه سانتیگراد نشان دادند. به نحویکه در ۳۵ درجه سانتی‌گراد حداکثر  $\text{LogP\%}$  باکتری در غلظت صفر درصد اسانس در pH معادل ۷/۴ برابر ۱/۷۴ بود، ولی این میزان در همین شرایط در غلظت‌های 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  $\text{LogP\%}$  در غلظت‌های 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  $\text{LogP\%}$  بطور چشمگیری اتفاق افتاده است. این مسئله نشانگر تاثیر بازدارندگی غلظت‌های بالا رونده اسانس بر روی رشد باکتری مورد مطالعه است. حداکثر میزان  $\text{LogP\%}$  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  $\text{LogP\%}$  در این سطح pH نیز مشاهده می‌شود. ضمن آنکه تاثیر توأم غلظت‌های بالا رونده اسانس در pH معادل ۶/۵ نشانگر

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

درجه حرارت	PH	غلظت اسانس آویشن شیرازی (درصد)	حداکثر $\text{LogP\%}$	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 عصاره‌گیری بدست آورد. اما روش تقطیر بابخار معمولترین روش تجاری مورد استفاده برای تهیه اسانس‌ها می‌باشد (۵). کیفیت و کمیت اسانس در گیاه به میزان قابل توجهی متاثر از عوامل مختلفی چون جغرافیای منطقه، عملیات کشاورزی، زمان برداشت و نحوه خشک کردن گیاه می‌باشد (۹). در حال حاضر خواص ضد باکتریایی اسانس‌های گیاهی به صورت گوناگون و متنوعی نظیر استفاده به عنوان نگهدارنده‌های غذایی، مواد پرکننده ریشه دندان، آنتی‌سپتیک‌ها و مکمل‌های 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 مونوسیتوژنز، سالمونلا تیپسی موریوم،

را بر روی لیستریا مونوسیتوژنز و سالمونلا اتریتیدیس در پنیر نرم مورد بررسی قرار دادند و اعلام کردند که همه این اسانس‌ها قادرند در غلظت معادل ۱٪ تعداد لیستریا مونوسیتوژنز را به مقدار قابل توجهی کاهش دهند (۱۰).

در مطالعه Marino و همکاران در سال ۲۰۰۱ طیف گسترده‌ای از اسانس‌های گیاهی خانواده لایمیاسه و کامپوزیته از جمله مریم‌گلی، نعنا، 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 اسانس‌های مریم‌گلی، نعنا و بابونه عموماً خاصیت باکتریواستاتیکی دارند ولی اسانس مرزنجوش در غلظت بالای ۴۰۰ ppm اثر باکتریسیدی دارد (۸).

در مطالعه Tassou و همکاران در سال ۲۰۰۰ اثر ممانعت کنندگی اسانس نعنا (*Mnetha Piperita*) بر روی رشد و بقای سالمونلا اتریتیدیس و استافیلوکوکوس اورئوس در محیط برات مغذی با استفاده از روش‌های اندازه‌گیری هدایت الکتریکی<sup>۱</sup> و شمارش باکتریهای زنده مورد ارزیابی قرار گرفت و نشان داده شد که غلظت ۱٪ اسانس سبب کاهش  $\text{Log } 7-6$  در تعداد استافیلوکوکوس اورئوس و کاهش حدود  $\text{Log } 3$  در تعداد سالمونلا اتریتیدیس 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 بوتولینوم‌های پروتئولیتیک کافی است. این

کاهش بیشتر  $\text{LogP\%}$  نسبت به pH معادل ۷/۴ می‌باشد. همچنین با توجه به روز رسیدن به حداکثر  $\text{LogP\%}$  (D) تاخیر در رشد در pH معادل ۶/۵ نسبت به pH معادل ۷/۴ کاملاً 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 متأثر از  $\text{LogP\%}$  است بطوریکه با کاهش  $\text{LogP\%}$  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 برات 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 غلظت‌های 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 اسانس‌های گیاهی خانواده لایمیاسه و برخی ترکیبات مهم این اسانس‌ها نظیر کارواکرول و تیمول انجام شده است. در مورد حساسیت میکروارگانیسم‌های گرم مثبت و گرم منفی نسبت به اسانس‌های گیاهی، مطالعات انجام شده نشان می‌دهند که اثر این اسانس‌ها بر روی باکتریهای گرم مثبت قدری بیشتر از اثر آنها بر روی باکتریهای گرم منفی می‌باشد گرچه همه مطالعات این موضوع را تایید نمی‌کنند. برای مثال آتروموناس هیدروفیلا علی‌رغم گرم منفی بودن از حساسترین گونه‌ها نسبت به اسانس‌های گیاهی است (۵).

Palmer و همکاران در سال ۲۰۰۱ اثر چهار اسانس گیاهی از جمله اسانس Thyme به عنوان نگهدارنده طبیعی

1 - Impedance measurement

تاثیر ممانعت کنندگی اسانس مذکور بر روی باکتری کلستریدیوم بوتولینوم که عامل خطرناکترین مسمومیت غذایی در انسان یعنی مسمومیت بوتولیسم می باشد می تواند نوید بخش این امر باشد که روزی می توان بطور موثر و متداول از اسانس های گیاهی به عنوان نگهدارنده های طبیعی جهت کنترل باکتریهای عامل عفونت و مسمومیت غذایی استفاده نمود.

### تشکر و قدر دانی

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

مطالعه همچنین اشاره می کند 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 می داد. مطالعات متعددی اثرات ضد باکتریایی برخی اسانس های گیاهی را به تیمول و کارواکرول که عملکرد مشابهی نیز دارند نسبت می دهند (۱، ۶، ۸، ۱۵). لذا به نظر می رسد که اثر ممانعت از رشد اسانس آویشن شیرازی در مطالعه حاضر نیز مربوط به میزان بالای کارواکرول آن باشد.

### 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 موربیوم در محیط آبگوشت قلب و مغز. فصلنامه گیاهان داروئی، شماره ۹، صفحات ۸۵-۹۳.
- ۲- زرگری ع، ۱۳۷۶، گیاهان داروئی، چاپ ششم، موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران، جلد چهارم، صفحات ۱-۱۵۴.
- 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.

Archive of SID



## 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<sup>1\*</sup>, V. Razavilar<sup>2</sup>, AA. Basti<sup>3</sup> and A. Jamshidi<sup>4</sup>

### 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.

<sup>1</sup> - Assistant professor, Dept. Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. [khanzadi@ferdowsi.um.ac.ir](mailto:khanzadi@ferdowsi.um.ac.ir)

<sup>2</sup> - Professor, Dept. Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran, Iran.

<sup>3</sup> - Associated professor, Dept. Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran, Iran.

<sup>4</sup> - Assistant professor, Dept. Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.