اثر روغن فرار آویشن شیرازی بر روی احتمال رشد باسیلوس سرئوس در محیط آبگوشت قلب و مغز

افشین آخوندزاده‌بستی[1]*، علی میثاقی[2]، سیامک غیبی[3]

۱- دانشیار، گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی تهران

۲- استادیار، گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی تهران

۳- دستیار بهداشت مواد غذایی، گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی تهران

* آدرس مکاتبه: دانشگاه تهران، دانشکده دامپزشکی، صندوق‌پستی: ٦٤٥٣- ١٤١٥٥

تلفن: ٦٦٤٣٨١٤١ (٠٢١)، نمابر: ٦٦٩٣٣٢٢ (٠٢١)

پست الکترونیک: aakhond@ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ٨٣/٢/١٦ **تاریخ تصویب:** ٨٤/٥/٣٠

چکیده

مقدمه: توجه و علاقه فزاینده به جایگزینی نگهدارنده‌های شیمیایی (ضدمیکربی و ضداکسیداسیون) با انواع طبیعی، موجب مطالعات زیادی در مورد منابع گیاهی و جستجوی انواع عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی شده است، تا بتوان جایگزینی مناسب و طبیعی برای نگهدارنده‌های شیمیایی پیدا نمود. برای اثبات کاربرد اثرات نگهدارندگی (ضد میکروبی) انواع اسانس‌های گیاهی، مطالعه اثرات آنها بر روی عوامل میکربی بیماری‌زا و فساد مواد غذایی، ابتدا در مدل‌های آزمایشگاهی و سپس در مدل‌های غذایی لازم و ضروری می‌باشد.

هدف: در این مطالعه، اثرات اسانس آویشن شیرازی بر روی لگاریتم درصد احتمال رشد[1] باسیلوس سرئوس[2] در یک محیط آبگوشت قلب و مغز[3] متأثر از غلظت‌های مختلف (صفر، ٠/٠٠٥، ٠/٠١٥، ٠/٠٣ و ٠/٠٤٥درصد) اسانس آویشن شیرازی[4] در طی ٤٣ روز نگهداری در درجات حرارت نگهداری، ٣٠، ٢٠ و١٠ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی: توصیفی

نتایج: لگاریتم درصد احتمال رشد باسیلوس سرئوس به طور معنی‌داری (p <٠/٠٥، آنالیز واریانس) تحت تاثیر غلظت‌های مختلف اسانس، درجه حرارت نگهداری و اثرات تداخلی آنها قرار گرفت. به طوری‌که حداکثر لگاریتم درصد احتمال رشد (و روز رسیدن به این حداکثر رشد) در غلظت صفر درصد اسانس در درجات حرارت ٣٠، ٢٠ و١٠ درجه سانتی‌گراد به ترتیب (١) ١/٤٦، (٣) ١/٤٦ و (٢٨) ٠/١٥ بود. در حالیکه در غلظت ٠/٠٠٥، ٠/٠١٥، ٠/٠٣ و ٠/٠٤٥ درصد اسانس در سه درجه مورد مطالعه به ترتیب (١) ١/٤٦، (٣) ١/٤٦ و (٢٢) ٣/٥٤- ؛ (١) ١/٤٦، (١٠) ١/٤٦ و (٢٥) ٣/٨٥-؛ (١٦) ١/٤٦، (١٦) ١/٤٦ و (٤٣<) ٤/٥٤- و (١٣) ٠/١٥، (٧) ١/٨٥- و (٤٣<) ٤/٥٤- بود.

نتیجه‌گیری: بر طبق نتایج به دست آمده، لگاریتم درصد احتمال رشد باسیلوس سرئوس با اندک افزایش غلظت اسانس کاهش پیدا کرد و اسانس مورد نظر در غلظت‌های اندک مورد مطالعه، دارای اثر جلوگیری از رشد معنی‌داری (p <٠/٠٥) بود که این اثر با کاهش درجه حرارت نگهداری به طور معنی‌داری (p<٠/٠٥) نیز افزایش پیدا کرد به طوری‌که توقف کامل رشد (لگاریتم درصد احتمال رشد برابر ٤/٥٤-) در طی ٤٣ روز مطالعه در غلظت ٠/٠٣ و ٠/٠٤٥ درصد اسانس در ١٠ سانتی‌گراد به دست آمد.

گل‌واژگان: اسانس آویشن شیرازی، باسیلوس سرئوس، لگاریتم درصد احتمال رشد

[1] Log probability percentage of growth [2] *Bacillus cereus* [3] Brain & Heart Infusion Broth [4] *Zataria multiflora* Boiss.

مقدمه

در سال‌های اخیر، تولیدکنندگان مواد غذایی توجه زیادی به استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی (از جمله گیاهی) به جای شیمیایی در محصولات خود نموده‌اند. این امر از یک‌طرف به علت اثرات سوء شناخته شده نگهدارنده‌های شیمیایی و در نتیجه توجه هر چه بیشتر متولیان بهداشتی به این موضوع و از طرف دیگر تمایل زیاد مصرف‌کنندگان به استفاده از مواد غذایی فرآوری شده بدون نگهدارنده و یا حدالمقدور با نگهدارنده‌های طبیعی می‌باشد [٤،١٩،٢٠،٢١]. اسانس‌های به دست آمده از گونه‌های گیاهان معطر دارای مصارف زیادی در صنایع صابون‌سازی، عطر سازی، صنایع غذایی و غیره می‌باشند [٣]. تحقیقات زیادی در مورد اثرات ضدباکتریایی و نگهدارندگی اسانس‌های گیاهی از جمله اسانس‌های به دست آمده از گیاهان خانواده Lamiaceae انجام شده است [٦،١٢،١٧،١٩،٢٠،٢١]. آویشن شیرازی[1] یکی از گیاهان این خانواده می‌باشد که بومی ایران، افغانستان و پاکستان است. این گیاه بوته‌ای، دارای ساقه‌های متعدد، نازک، سخت و بسیار منشعب، به ارتفاع ٤٠ تا ٨٠ سانتی‌متر، گر دینه پوش، سبز متمایل به سفید و معطر است. برگ آن کوتاه، دارای دمبرگ کوتاه، مدور یا بیضی شکل، در قاعده مقطع تقریباً قلبی شکل و در انتها مدور و نوکچه‌دار است. گل‌های آن سفید و کوچک گویچه‌ای بسیار متراکم و واقع در گل آذین‌های باریک تسبیح مانند، ساده و براکته‌های پهن دراز است. کاسه گل غشایی کوتاه به طول ٢ میلی‌متر، پنج پهلو و در زاویه‌ها مژکدار، دارای دندانه‌های مثلثی کوتاه می‌باشد. پرچم‌ها چهار عدد و دو به دو مساوی است. جام گل سفید و اندکی طویل تر از کاسه گل می‌باشد [٢٢]. از این گیاه در طب سنتی به عنوان آنتی‌سپتیک یاد شده است و به عنوان طعم‌دهنده مواد غذایی استفاده می‌شود [٥].

به منظور پاسخگویی هر چه بهتر به علاقه فزاینده مصرف‌کنندگان مواد غذایی به جایگزینی نگهدارنده‌های شیمیایی (ضدمیکروبی) با انواع طبیعی مانند اسانس‌های گیاهی در فرآورده‌های غذایی و اثبات کاربرد اثرات نگهدارندگی (ضدمیکروبی) آنها، مطالعه اثرات آنها به تنهایی و یا توام با فاکتورهای دیگر موثر در رشد (مانند درجه حرارت نگهداری و غیره) ابتدا در مدل‌های آزمایشگاهی و سپس در مدل‌های غذایی بر روی فاکتورهای رشدی مختلف (مانند لگاریتم درصد احتمال رشد و غیره) پاتوژن‌های غذایی و میکروب‌های عامل فساد مواد غذایی لازم و ضروری می‌باشد [٢،٩،١٠].

باسیلوس سرئوس[1] یک باکتری هوازی بی‌هوازی اختیاری و دارای اشکال اسپوری می‌باشد. این باکتری در گوشت خام و فراوری شده، سبزیجات، برنج و فراورده‌های شیر خام دیده می‌شود و از جمله عوامل ایجاد کننده مسمومیت غذایی به حساب می‌آید [١٤،١٦].

در این مطالعه، اثرات اسانس آویشن شیرازی و درجه حرارت نگهداری بر روی لگاریتم درصد احتمال رشد[2] باسیلوس سرئوس در یک محیط آبگوشت قلب و مغز[3] متأثر از غلظت‌های مختلف (صفر، ٠/٠٠٥، ٠/٠١٥، ٠/٠٣ و ٠/٠٦ درصد) اسانس آویشن شیرازی در طی ٤٣ روز نگهداری در درجات حرارت ١٠، ٢٠ و٣٠ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

طرح آزمایش

بررسی اسانس آویشن شیرازی بر روی یکی از فاکتورهای رشدی یعنی Log P% باسیلوس سرئوس در محیط آبگوشت BHI متاثر از غلظت‌های مختلف (صفر، ٠/٠٠٥، ٠/٠١٥، ٠/٠٣ و ٠/٠٤٥ درصد) آویشن شیرازی در pH = ٧/٤ در درجات حرارت (١٠، ٢٠ و٣٠) درجه سانتی‌گراد در طی ٤٣ روز بود.

تهیه اسانس و آنالیز آن

گیاه آویش شیرازی از استان فارس در فصل تابستان جمع‌آوری شد و توسط گیاه‌شناس پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی تایید نام علمی گردید. پس از تهیه اسانس گیاه

[1] *Zataria multiflora* Boiss.

[1] *Bacillus cereus*
[2] Log probability percentage of growth, Log P%
[3] Brain Heart Infusion Broth, BHI

به روش تقطیر با بخار داغ[1] از سرشاخه‌های هوایی گیاه، آنالیز اسانس توسط دستگاه گاز کروماتوگراف متصل به طیف نگار جرمی (GC/MS) انجام شد. برای این منظور، 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 با افزایش تدریجی ۲/۵ در هر دقیقه و نگهداری ستون در ۲۶۵ به مدت ۳۰ دقیقه استفاده شد. دمای اتاقک تزریق ۲۵۰ و گاز حاصل از هلیم با سرعت ۱/۵ میلی‌متر در دقیقه بود. شناساگر EI با انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون‌ولت و دمای منبع یونیزاسیون ۲۵۰ بود.

ارگانیسم مورد مطالعه

باکتری مورد مطالعه باسیلوس سرئوس ATCC 11778 بود که کشت لیوفیلیزه آن توسط دکتر خاشابی (از انستیتو تحقیقات بهداشت عمومی و سلامت غذای اتریش) به گروه اهدا شد. در ابتدا این کشت لیوفلیزه در محیط آبگوشت BHI در ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت، دو مرتبه به طور متوالی تجدید کشت داده شد. سپس کشت دوم به میزان پنج به یک با گلیسرین استریل مخلوط شد و در قسمت‌های مساوی در لوله‌های میکروسانتریفیوژ اپندرف استریل در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

تهیه میزان تلقیح باکتریایی

تهیه میزان تلقیح باکتری مورد آزمایش، با انتقال باکتری از لوله میکروسانتریفیوژ اپندرف به محیط آبگوشت BHI و نگهداری به مدت ۱۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. مجدداً کشت دومی از این کشت ۱۸ ساعته اول، در آبگوشت BHI دیگر (به مدت ۱۸ ساعت، ۳۷ درجه سانتی‌گراد) تهیه شد. سپس لوله‌های cuvett حاوی ۵ میلی‌لیتر آبگوشت BHI استریل تهیه شد. سپس، مقادیر مختلفی از کشت آبگوشت BHI ۱۸ ساعته دوم بر روی لوله‌های cuvett مختلف مذکور برده شد. با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Milton Roy company, USA) در طول موج ۶۰۰ نانومتر، جذب نوری لوله‌های مذکور خوانده شد. از محتویات این لوله‌های cuvett، شمارش باکتریایی به روش pour plate انجام شد و در آخر، لوله cuvett حاوی تقریبا ۲×۱۰^{۷} باکتری در هر میلی‌لیتر مشخص شد. بدین ترتیب در هر بار انجام آزمایش (تعیین لگاریتم درصد احتمال رشد)، با مشخص شدن جذب نوری که معادل تقریباً ۲×۱۰^{۷} باکتری در هر میلی‌لیتر بود (که بعد با کشت pour plate نیز تایید می‌شد)، لوله cuvett حاوی تقریباً ۲×۱۰^{۷} باکتری در هر میلی‌لیتر مشخص گردید. سپس از این لوله، سریال‌های رقت ۱۰ تایی از $۱۰^{۵}$ تا $۱۰^{-۲}$ (۸ رقت) با استفاده از لوله‌های رقت حاوی ۹ میلی‌لیتر آبگوشت BHI حاوی غلظت‌های موردنظر (صفر، ۰/۰۰۵، ۰/۰۱۵، ۰/۰۳ و ۰/۰۴۵ درصد) اسانس که نحوه تهیه آن در ذیل آمده، تهیه شد [۲،۱۸].

تهیه محیط آبگوشت BHI با غلظت‌های موردنظر اسانس آویشن شیرازی

ابتدا جهت تهیه ۱۰۰ میلی‌لیتر آبگوشت پایه تقریباً مورد نیاز برای یک حالت، ۳/۷ گرم پودر محیط کشت BHI را در ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر در یک ارلن با حرارت ملایم حل نمودیم و سپس غلظت‌های مورد نظر (صفر، ۰/۰۰۵، ۰/۰۱۵، ۰/۰۳ و ۰/۰۴۵ درصد) اسانس، ۵ درصد DMSO (به عنوان امولسیون‌کننده برای تمام حالت‌ها) و ۰/۰۵ درصد آگار آگار (به عنوان تثبیت کننده برای تمام حالت‌ها) را اضافه کردیم [۴،۱۱]. در نهایت با استفاده از آب مقطر به حجم مورد نظر (۱۰۰ میلی‌لیتر) رسیدیم. سپس محتویات تهیه شده در ارلن را در لوله‌های (رقت) در پیچ دار (هر یک به میزان ۹ میلی‌لیتر) پخش کردیم و در اتوکلاو (۱۲۱ درجه سانتی‌گراد ۱۵ دقیقه) استریل نمودیم. قابل توضیح است، از آنجایی‌که پنج غلظت اسانس برای ۳ درجه حرارت در این آزمایش در نظر گرفته شد، بنابراین در مجموع پانزده حالت داشتیم. برای هر حالت نیز، دقیقاً ۷۲ میلی‌لیتر آبگوشت (با غلظت مورد تظر اسانس) برای تهیه ۸ رقت هر کدام ۹ میلی‌لیتری، مورد نیاز بود [۲،۱۸].

تلقیح آبگوشت BHI و گرمخانه‌گذاری

همان‌گونه که گفته شد از لوله cuvett با جذب نوری که مشخص‌کننده ۲×۱۰^{۷} باکتری در هر میلی‌لیتر بود، سریال‌های

[1] Steam distillation

رقت ۱۰ تایی از 10^{5} تا 10^{-2} (۸ رقت) با استفاده از لوله‌های رقت حاوی ۹ میلی‌لیتر آبگوشت BHI حاوی غلظت‌های مورد نظر (صفر، ۰/۰۰۵، ۰/۰۱۵، ۰/۰۳ و ۰/۰۴۵ درصد) اسانس تهیه شد. از آنجایی‌که از روش ۲۴ لوله‌ای شمارش بیشترین تعداد احتمالی (Most Probable Number, MPN) برای تعیین لگاریتم درصد احتمال رشد باکتری استفاده شد، لذا محتویات (۹ میلی‌لیتری) هر یک از لوله‌های در پیچ دار، به طور استریل در قسمت‌های مساوی ۳ میلی‌لیتری در داخل ۳ لوله سرپوش دار (Becton Dickson ۱۶×۱۰۰ mm) استریل ریخته و بدین‌ترتیب مجموع ۲۴ لوله برای هر حالت به دست آمد [۲،۱۸]. هر مجموعه ۲۴ لوله‌ای در هر یک از حرارت‌های مورد نظر در مطالعه یعنی ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۳ روز نگهداری شدند. در طی این مدت ۱۸ دفعه (روزهای ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۱۰، ۱۳، ۱۶، ۱۹، ۲۲، ۲۵، ۲۸، ۳۱، ۳۴، ۳۷ و ۴۳) تمام لوله‌ها جهت مشاهده کدورت رشدی قابل رؤیت مورد بررسی قرار گرفتند [۲،۱۸].

محاسبه لگاریتم درصد احتمال رشد (Log P%)

Log P% از روی تعداد لوله‌های مثبت (کدورت قابل رؤیت حاصل از رشد باکتری) در طی ۴۳ روز نگهداری، با استفاده از فرمول Log P% = 2-(log I/3- log MPN/3) محاسبه شد [۱۸، ۲].

log I/3 = لگاریتم میزان دوز تلقیح در یک میلی‌لیتر

log MPN/3 = لگاریتم تعداد احتمالی باکتری‌ها در یک میلی‌لیتر

آنالیز آماری

اثر غلظت‌های مختلف اسانس بر روی Log P% با استفاده از آنالیز واریانس و با کمک نرم افزار (SPSS 10.0 for Windows, SPSS Inc.) ارزیابی شد.

نتایج

نتیجه آنالیز ترکیبات اسانس آویشن شیرازی مورد استفاده در این مطالعه با استفاده از GC/MS در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. همان‌گونه که در جدول آمده، بیشترین ترکیب تشکیل دهنده اسانس، کارواکرول[1] و به میزان ۷۱/۱۲ درصد است.

نتایج حداکثر Log P% باسیلوس سرئوس مورد مطالعه در آبگوشت BHI متأثر از غلظت‌های مختلف (صفر، ۰/۰۰۵، ۰/۰۱۵، ۰/۰۳ و ۰/۰۴۵ درصد) اسانس مذکور در طی ۴۳ روز نگهداری در درجات حرارت ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. D در این جدول، روز رسیدن به حداکثر Log P% است.

تاثیر معنی‌دار ($p < 0/05$) غلظت‌های مختلف اسانس، درجه حرارت نگهداری و اثرات تداخلی آنها بر روی Log P% با استفاده از آنالیز واریانس نشان داده شد.

بحث

اسانس‌های گیاهی یکی از منابع بالقوه واجد ترکیبات ضدباکتریایی می‌باشند و برای این منظور بسیار موثر و مفید هستند [۱]. مقایسه نتایج گزارش شده در مورد خواص ضدباکتریایی اسانس‌های مختلف بسیار مشکل می‌باشد. از دلایل آن می‌توان به تفاوت در روش‌های مختلف بررسی خواص ضدباکتریایی اسانس‌ها، منابع تهیه آنها و سویه‌های باکتریایی به کار برده شده نام برد [۱۹، ۱۷، ۱،۱۲]. به طور کلی، ترکیبات اسانس‌های گیاهی بر حسب منطقه جغرافیایی رویش این گیاهان، واریته گیاهی، سن گیاه در هنگام تهیه اسانس، روش خشک کردن و استخراج اسانس متفاوت می‌باشد [۱]. مدل‌های مختلفی در مطالعات مختلف به منظور بررسی اثرات ضدباکتریایی و نگهدارندگی اسانس‌های گیاهی استفاده شده است. در برخی از این روش‌ها از مدل‌های آزمایشگاهی مثل محیط کشت و در برخی دیگر از مدل‌های غذایی برای بررسی اثرات ضدباکتریایی اسانس‌ها استفاده شده است [۲۱، ۲۰، ۱۳، ۱۰، ۸]. بنابراین با توجه به مطالب گفته شده نتایج به دست آمده در مطالعات مختلف بعضاً متفاوت می‌باشد.

در مطالعه حاضر، از روش ۲۴ لوله‌ای شمارش MPN، بر اساس شمارش لوله‌ها با کدورت قابل رؤیت (به علت رشد باکتری باسیلوس سرئوس تلقیح شده در محیط BHI با غلظت‌های مختلف اسانس در طی ۴۳ روز نگهداری در درجات حرارت ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد) برای تعیین

[1] Carvacrol

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

نام ترکیب	اندیس بازدارنده	درصد
Thujene	۹۳۰	۰/۱۹
Alpha-Pinene	۹۳۷	٤/۲٦
Beta-Pinene	۹۷٦	۰/٤۳
Beta-myrcene	۹۸۵	۰/۸۵
Eucaliptol	۱۰۲٤	۳/۳۷
Gama-Terpinene	۱۰۵۵	۷/۳٤
Linalool	۱۰۹۰	۰/٦۸
Thymol methyl ether	۱۲۳٦	۰/٤۷
Carvacrol methyl ether	۱۲٤۳	۰/٤٦
Carvacrol	۱۲۹۹	۷۱/۱۲
Trans-Caryophyllene	۱٤۱۸	۰/٤۱
Globulol	۱۵۸۲	۲/۳۲
جمع		۹۱/۹۰

جدول شماره ۲- حداکثر لگاریتم درصد احتمال رشد (Log P%) باسیلوس سرئوس در آبگوشت BHI متأثر از غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی در طی ٤۳ روز نگهداری دردرجات حرارت مختلف و روز رسیدن به حداکثر Log P% (D)

درجه حرارت بر حسب سانتی‌گراد	غلظت اسانس آویشن شیرازی (درصد)	Lag	D
۳۰	۰/۰۰	۱/٤٦	۱
	۰/۰۰۵	۱/٤٦	۱
	۰/۰۱۵	۱/٤٦	۱
	۰/۰۳	۱/٤٦	۱٦
	۰/۰٤۵	۰/۱۵	۱۳
۲۰	۰/۰۰	۱/٤٦	۳
	۰/۰۰۵	۱/٤٦	۳
	۰/۰۱۵	۱/٤٦	۱۰
	۰/۰۳	۱/٤٦	۱٦
	۰/۰٤۵	-۱/۸۵	۷
۱۰	۰/۰۰	۰/۱۵	۲۸
	۰/۰۰۵	-۳/۵٤	۲۲
	۰/۰۱۵	-۳/۸۵	۲۵
	۰/۰۳	-٤/۵٤	>٤۳
	۰/۰٤۵	-٤/۵٤	>٤۳

یکی از فاکتورهای رشدی باکتریایی یعنی Log P% استفاده شد [۱۸، ۲]. در این بررسی همان‌گونه که گفته شد، به منظور ایجاد و حفظ (تثبیت) حالت امولسیون اسانس مذکور در محیط BHI در طی مطالعه به ترتیب از DMSO و آگار آگار استفاده شد [۱۱،٤]. در ضمن برای در نظر گرفتن اثرات احتمالی (حتی ناچیز) ضدباکتریایی این دو ترکیب، کلیه

محیط‌های BHI تهیه شده، حتی محیط‌های (حالت‌های) بدون اسانس نیز حاوی مقادیر در نظر گرفته شده DMSO و آگار آگار بودند. بر طبق نتایج به دست آمده، اسانس آویشن شیرازی مورد مطالعه، اثر معنی‌داری (p <۰/۰۵) را در غلظت‌های مورد استفاده (۰/۰۰۵، ۰/۰۱۵، ۰/۰۳ و ۰/۰۴۵ درصد)، بر روی کاهش Log P% باسیلوس سرئوس در طی ۴۳ روز نگهداری در درجات حرارتی مختلف مورد مطالعه نشان داد. به طوری‌که در ۳۰ درجه سانتی‌گراد در طی ۴۳ روز نگهداری، حداکثر Log P% باکتری (و روز رسیدن به این حداکثر رشد)، در غلظت صفر درصد اسانس ۱/۴۶ بود (که در روز اول مطالعه به دست آمد). این حداکثر Log P% معادل ۱/۴۶ در غلظت ۰/۰۳ درصد اسانس (در ۳۰ درجه سانتی‌گراد) در روز ۱۶ مطالعه به دست آمد و در غلظت ۰/۰۴۵ درصد اسانس هم به میزان قابل توجهی کاهش پیدا کرد که ۰/۱۵ و در روز ۱۳ مطالعه بود. همان‌گونه که در جدول شماره ۲ نشان داده شد، این اثر ممانعت از رشد با کاهش دما افزایش پیدا کرد به طوری‌که در ۲۰ درجه سانتی‌گراد در طی ۴۳ روز نگهداری، حداکثر Log P% (و روز رسیدن به این حداکثر رشد) در حضور ۰/۰۴۵ درصد اسانس ۱/۸۵- (روز ۷) بود. با کاهش دما به ۱۰ درجه سانتی‌گراد در غلظت‌های ۰/۰۰۵، ۰/۰۱۵، ۰/۰۳ و ۰/۰۴۵ درصد، حداکثر Log P% (و روز رسیدن به این حداکثر رشد) به ترتیب ۳/۵۴- (روز ۲۲)، ۳/۸۵- (روز ۲۵)،۴/۵۴- (روز ۴۳< و توقف کامل رشد در طی مطالعه)،۴/۵۴- (روز ۴۳< و توقف کامل رشد در طی مطالعه) بود، که به میزان قابل توجهی نیز کاهش پیدا کرد.

مطالعات مختلفی در مورد اثرات ضدباکتریایی اسانس‌های گیاهی خانواده Lamiaceae (که گیاه آویشن شیرازی مورد مطالعه ما هم در این خانواده قرار دارد) و برخی از ترکیبات شناخته شده مهم در اسانس‌های این خانواده از جمله تیمول[1] و کارواکرول انجام شده است.

در مطالعه انجام شده توسط Kim و همکاران در سال ۱۹۹۵، اثرات ضدباکتریایی و محاسبه MIC[2] و MBC[3] کارواکرول بر روی سالمونلا تیفی موریم و سویه مقام به ریفامپیسین آن در محیط Triptic Soy agar (با استفاده از دیسک‌های کاغذی آغشته به غلظت‌های مورد نظر کارواکرول و تعیین منطقه جلوگیری از رشد) و در محیط Triptic Soy broth (از روی اندازه‌گیری کدورت رشد با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۴۰ نانومتر و سپس کشت بر روی agar Triptic Soy) مورد بررسی قرار گرفت. آنها نشان دادند که کارواکرول اثرات ضدباکتری قوی بر هر دو سویه مورد مطالعه با MIC ۲۵۰ ماکروگرم در میلی‌لیتر داشت. در همین تحقیق، کارواکرول با غلظت ۳ درصد در Tween 20 یک درصد، اثر کشندگی قوی را بر سویه‌های مقاوم به ریفامپیسین در یک نمونه غذای ماهی (fish cube) نشان داد [۷].

در مطالعه دیگری، Karaman و همکاران، اثرات باکتریو استاتیکی قوی اسانس *Thymus revolatus* را بر روی باکتری‌های گرم مثبت از قبیل استافیلوکوک طلایی[1] و گرم منفی از قبیل اشرشیا کلی[2] نشان دادند. آنها علت احتمالی این اثرات را میزان بالای کارواکرول موجود در اسانس بیان نمودند. مطالعه مشابه، توسط رسولی و همکاران در سال ۲۰۰۲ بر روی اثرات باکتریوسیدی اسانس *Thymus pubescus* (با میزان بالای کارواکرول) بر روی باکتری‌های گرم مثبت، استافیلوکوک طلایی و گرم منفی، اشرشیا کلی (با استفاده از روش disk diffusion) انجام شد و همانند مطالعه قبلی، احتمال اثر باکتری‌کشی قوی اسانس مورد مطالعه، میزان بالای کارواکرول موجود در اسانس بیان شد [۶]. نتایج مشابه دیگری توسط Baganboula و همکاران در سال ۲۰۰۴ بر روی اثرات اسانس Thyme و ترکیبات کارواکرول و تیمول بر روی باکتری شیگلا سونئی[3] و شیگلا فلکسنری[4] به دست آمد [۱].

در مورد باسیلوس سرئوس، در مطالعه انجام شده توسط Valero و Salmeron، اثرات ضدباکتریایی اسانس Thyme (یکی دیگر از گیاهان خانواده Lamiaceae) بر روی فاکتور زمان رشد تاخیری[5] این باکتری (سویهINRA L204) در

---

[1] thymol [2] Minimum Inhibitory Concentration
[3] Minimum bacteriocidal Concentration

[1] *Staphylococcus aureus* [2] *Escherichia coli*
[3] *Shigella sonnei* [4] *Shigella flexneri*
[5] Lag phase

محیط آبگوشت هویج در درجه حرارت نگهداری ۱۶ سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت. زمان رشد تاخیری در غلظت صفر درصد اسانس برابر ۸/۸ ساعت بود در حالی‌که در غلظت ۰/۰۲۵ و ۰/۰۳۵ درصد اسانس مذکور به ترتیب تا ۴۳/۸ و ۵۶۳/۳ ساعت افزایش پیدا کرد [۲۱].

در بررسی دیگر انجام شده توسط Rajkovic و همکاران بر روی اثرات (MIC) کارواکرول بر روی سویه‌های مختلف باسیلوس سرئوس در محیط BHI در درجات حرارت مختلف، چنین بیان شد که میزان اثر بازدارندگی از رشد کارواکرول وابسته به سویه باکتری بوده و با کاهش درجه حرارت افزایش می‌یابد به طوری که در مورد یکی از سویه‌های مورد مطالعه در تحقیق مذکور (*Bacillus cereus* 1.9)، میزان MIC کارواکرول در ۲۲ درجه و ۱۰ سانتی‌گراد به ترتیب ۰/۰۱۵و ۰/۰۰۷ درصد و در مورد سویه *Bacillus cereus* 4.9 به ترتیب ۰/۰۱۵و ۰/۰۱۱ درصد بود [۱۶]. نتایج مشابه توسط Pol و Smid در سال ۱۹۹۹ و Periago و Moezelaar در سال ۲۰۰۱ به دست آمد [۱۴،۱۵].

از آنجایی‌که کارواکرول در اسانس استخراج شده از آویشن شیرازی مورد مطالعه ما، ترکیب اصلی و بیشترین جزء تشکیل‌دهنده (۷۱/۱۲ درصد) می‌باشد، چنین بیان می‌شود که احتمال اثر جلوگیری از رشد اسانس مذکور در غلظت‌های مورد مطالعه ما نیز همین میزان بالای کارواکرول موجود در اسانس باشد که این اثر با کاهش درجه حرارت همانند سایر مطالعات ذکر شده در بالا افزایش پیدا کرد.

با توجه به نتایج به دست آمده در تحقیق، اسانس مورد نظر در غلظت‌های اندک (۰/۰۰۵، ۰/۰۱۵ ۰/۰۳ و ۰/۰۴۵ درصد)، دارای اثر جلوگیری از رشد معنی‌داری ($p < ۰/۰۵$) بود. لذا چنین نتیجه گیری می شود که این اسانس احتمالاً می‌تواند به عنوان یک نگهدارنده و ضدباکتری مناسب لااقل علیه برخی از باکتری‌های گرم مثبت از جمله باکتری مورد مطالعه، در برخی از مواد غذایی مورد استفاده قرار گیرد. البته لزوم مطالعات بیشتر به ویژه بر روی مواد غذایی لازم و ضروری می‌باشد.

تشکر و قدردانی

با تشکر و قدردانی از معاونت پژوهشی محترم دانشگاه تهران و معاونت پژوهشی محترم دانشکده دامپزشکی تهران به منظور تامین هزینه انجام این تحقیق و زحمات سرکار خانم دکتر سیگارودی و آقایان دکتر جمشیدی، دکتر رضازاده و مهندس داراب یزدانی در پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی.

منابع

1. Bagamboula CF, Uyttendaele M and Debevere J. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and *p*-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiol*. 2004; 21: 33-42.

2. Basti AA and Razavilar V. 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*. 2004; 21: 431-438.

3. Cimanga K, Kambu K, Tona L, Apers S, De Bruyne T, Hermans N, Totte J, Pieters L and Vlietinck AJ. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in Democratic Republic of Congo. *J. Ethnopharmacol*. 2002; 79: 213-220.

4. Delaquis PJ, Stanich K, Girard B and Mazza G. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *Int. J. Food Microbiol*. 2002; 74: 101-109.

5. Hosseinzadeh H, Ramezani M and Salmani G. Antinociceptive, anti-inflammatory and acute toxicity effects of *Zataria multiflora* Boiss extracts in mice and rats. *J. Ethnopharmacol*. 2000; 73: 379-385.

6. Karaman S, Digrak M, Ravid U and Ilcim A. Antibacterial and antifungal activity of essential oils of *Thymus revolutus* Celak from Turkey. *J. Ethnopharmacol*. 2001; 76: 183-186.

7. Kim JM, Marshall MR, Cornell JA, Preston III JF and Wel CI. Antibacterial activity of carvacrol, citral and Geraniol against *Salmonella typhimurium* in culture medium and fish cube. *J. Food Sci*. 1995; 60: 1364-1368.

8. Koutsoumanis K, Lambropoulou K and Nyhas G-JE. A predictive model for the non-thermal inactivation of *Salmonella entritidis* in a food model system supplemented with a natural antimicrobial. Int. J. Food Microbiol. 1999; 49: 63-74.

9. Koutsoumanis K, Tassou C, Taoukis PS and Nychas GJE. Modelling the effectiveness of a natural antimicrobial on *Salmonella entritidis* as a function of concentration, temperature and pH, using conductance measurements. J. Applied Microbiol. 1998; 84: 981-987.

10. Lemay M-J, Choquette J, Delaquis PJ, Gariepy C, Rodrigue N and Saucier L. Antimicrobial effect of natural preservatives in a cooked and acidified chicken meat model. Int. J. Food Microbiol. 2002; 78: 217-226.

11. Mann CM and Marham. A new method for determining inhibitory concentration of essential oils. J. Applied Microbiol. 1998; 84: 538-544.

12. Marilena M, Bersani C and Comi G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiaceae* and *Composita*. Int. J. Food Microbiol. 2001; 67: 187-195.

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

14. Periago PM and Mooezelaar, R. Combined effect of nissin and carvacrol at different pH and temperature levels on the viability of different strains of Bacillus cereus. Int. J. Food Microbiol. 68, 141-148.

15. Pol IE and Smid EJ. Combined action of nisin and carvacrol on *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*

16. Rajkovic A, Uyttendaele M, Courtens T and Debevere J.Antimicrobial effect of nisin and carvacrol and competition between *Bacillus cereus* and *Bacillus circulans* in vacuum-packed potato puree. Food Mirobiol. 2005; 22, 189-197.

17. Rasooli I and Mirmostafa SA. Antibacterial properties of *Thymus pubescens* and *thymus sepyllum* essential oils. Fitoterapia. 2002; 73: 244-250.

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

19. Tassou C, Koutsoumanis K and Nychas G-JE. Inhibition of *Salmmonella entritidis* and *Staphylococcus aureus* in nurient broth by mint essential oil. Food Research Int. 2000; 33: 273-280.

20. Tassou C and Nychas G-JE. Antimicrobial activity of essential oil of mastic gum (*Pistacia lentiscus* var. *chia*) on gram positive and gram negative bacteria in broth and in model food system. Int. Biodeterioration and Biodegradation. 1995; 411-420.

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

۲۲. کمیته تدوین فارماکوپه گیاهی ایران، فارماکوپه ایران، چاپ اول، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی (معاونت غذا و دارو)، ۱۳۸۱، جلد اول، صفحه ۵۱.