بررسی تاثیرات سینرژیستی اسانس های آویشن (*Thymus vulgaris*)، نعناع (*Mentha spp.*) و کاکوتی (*Ziziphora tenuir*) در جلوگیری از رشد اشرشیاکلی O157:H7 در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM)

سحر نایبندی آتشی[1*]، سید علی مرتضوی[2]، فریده طباطبایی یزدی[2]، آرش کوچکی[2]

[1]دانش آموخته ی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، سبزوار، ایران

[2]گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: 1391/3/13 تاریخ پذیرش: 1392/10/22

چکیده

در این تحقیق اثر ضد میکروبی اسانس گیاهان تیره نعناع (آویشن، نعناع و کاکوتی) بر جلوگیری از رشد باکتری پاتوژن (*Escherichia coli O157:H7*) در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور 3 سطح غلظت از هر اسانس (v/v %0/2، 0/1، 0) انتخاب گردید. بقاء و یا کاهش جمعیت باکتری مذکور در 20 نمونه (در 3 تکرار) تهیه شده از محیط کشت اختصاصی ائوزین متیلن بلو (EMB) با اندازه گیری میزان رشد پس از گذشت 24 ساعت و 14 روز با استفاده از طرح رویه پاسخ بررسی شد. نتایج نشان دهنده کاهش جمعیت باکتری اشرشیاکلی بوده و بهینه محیط کشت برای کاهش یا کینتیک مرگ باکتری پاتوژن با غلظت اسانس آویشن (v/v)0/15%، اسانس نعناع (v/v)0 %و اسانس کاکوتی (v/v) 0/15% میزان تلقیح بدست آمده است، که در این شرایط بیشترین میزان کاهش جمعیت اشرشیاکلی در 24 ساعت 3/39 عدد لگاریتمی، در 14 روز 0/51 عدد لگاریتمی می باشد.

واژه های کلیدی: اثرات ضد میکروبی، *Escherichia coli O157:H7* ، گیاهان تیره نعناع (آویشن، نعناع و کاکوتی).

* مسوول مکاتبات: sahar_naybandi@yahoo.com

1- مقدمه

شواهد نشان می دهد که استفاده از گیاهان برای درمان بیماری ها با تاریخ بشر همزمان بوده است (14)، اولین اسانس های روغنی به وسیله ی یک دانشمند اسپانیایی به نام آرنولد ویلانو[1] در اواخر قرن سیزدهم تهیه شد (11). اولین آزمایشات اندازه گیری خصوصیات ضد باکتریایی اسانس های روغنی به وسیله ی دلاکرویکس[2] در سال 1881 انجام گرفت (11). علی رغم پیشرفت های مدرن در بهداشت و تکنیک های تولید غذا هنوز هم سلامت غذا اهمیت فزاینده ای در سلامت عمومی ایفا می کند (11). سلامت و ایمنی مواد غذایی از نگرانی های اساسی تولید و مصرف کنندگان صنایع غذایی می باشد بویژه که آمار عفونت های ناشی از غذا روند رو به افزایشی را نشان می دهد (21). طبق آمار WHO تخمین زده شد در سال 2002 حدود 30 درصد مردم در کشور های صنعتی از یک بیماری مسمومیت غذایی در هر سال رنج می برند و در سال 2000 حداقل دو میلیون نفر در اثر بیماری اسهال در دنیا از بین رفته اند. بنابراین هنوز نیاز به روش های جدید کاهش یا از بین بردن پاتوژن های مسموم کننده غذا بخصوص روش های ترکیبی که شامل استفاده همزمان از چندین عامل نگهدارنده است احساس می شود (11 و 15). این روش ها عموماً با موفقیت در کنترل باکتری های بیماری زا و حفظ کیفیت غذاها طی انبارداری همراه بوده و ایمنی ماده غذایی را نیز حفظ نموده است. از آنجا که سازمان بهداشت جهانی برای کم کردن امراض قلبی توجه خاصی به کاهش مصرف نمک در سراسر دنیا نشان داده است با کاهش میزان مصرف نمک در غذاهای فرآیند شده موضوع استفاده از سایر افزودنی ها جهت نگهداری غذا ها به وجود می آید که این مساله نقطه عطفی برای روش های جدید ایمن سازی غذا به وسیله راههای طبیعی یا (سبز) می باشد که یکی از آنها استفاده از اسانس های گیاهی به عنوان افزودنی های ضد باکتریایی است (11). در سالهای اخیر تحقیقات زیادی برای ارزیابی آثار ضد میکروبی انواع اسانس ها صورت گرفته است که حاکی از قدرت و توانایی این ترکیبات در ممانعت از رشد دامنه وسیعی از میکروارگانیزم های بیماری زا و عامل فساد در مواد غذایی می باشد. از آنجا که این ترکیبات کاملاً طبیعی هستند، زیان آنها برای سلامت انسان و محیط زیست بسیار کمتر از مواد نگهدارنده شیمیایی می باشد (3 و9). گیاهان تیره نعناع از زمانهای گذشته در طب سنتی مورد استفاده بوده اند و بطور معمول در درمان عفونت های دستگاه گوارش یا دل درد کاربرد داشته اند. امروزه از گیاهان تیره نعناع بصورت ادویه و چاشنی در رستوران ها و منازل همراه با غذا استفاده می شود (5).

Escherichia coli O157:H7 یکی از باکتری های مهم پاتوژن می باشد که با تولید توکسین می تواند عامل بیماری های گوارشی و دستگاه ادراری همچون کولیت هموراژیک[3] و نیز سندروم اورمیک همولیتیک[4] محسوب شود. این باکتری به عنوان یکی از مهم ترین عوامل بیماری زا با منشاء غذایی مطرح است و می تواند از طریق مواد غذایی به انسان منتقل شود. در آمریکا سالیانه حدود 63000 نفر با این باکتری آلوده شده و مرگ و میر ناشی از آن 61 نفر می باشد (4).

هدف از انجام این پژوهش بررسی خاصیت ضد میکروبی اسانس های آویشن، نعناع، کاکوتی که گونه ای از گیاهان تیره نعناع می باشند در جلوگیری از اشرشیاکلی در محیط کشت بوده است.

2- مواد و روش ها

2-1- مواد

اسانس های آویشن، نعناع و کاکوتی با درجه خلوص 60 درصد از (مجتمع و شرکت کشاورزی سبز ایران) خریداری شد.

سوش میکروبی اشرشیاکلی O157:H7 (PTCC 3220.8) به صورت آمپول لیوفیلیزه از مرکز کلکسیون قارچ ها و باکتری های صنعتی و عفونی سازمان علمی پژوهشی و صنعتی ایران بخش بیوتکنولوژی تهیه گردید.

1- Arnoldde villanova
2- Dela croix
3- Colitis hemorrhagic
4- Syndrom hemolytic uremic

جهت انجام آزمایشات از محیط کشت نوترینت آگار[1]، نوترینت براث[2] ساخت شرکت مرک آلمان استفاده شد.

جهت تهیه کشت تازه و فعال سازی سویه میکروبی از محیط کشت ائوزین متیلن بلو (ساخت شرکت مرک آلمان) برای *Escherichia coli O157:H7* استفاده گردید.

2-2- روش ها

2-2-1- تهیه کشت تازه (در فاز لگاریتمی) از میکروارگانیسم

از باکتری (Escherichia coli O157:H7) بر روی محیط کشت های مذکور کشت سطحی داده شد، تا میکروارگانیسم پس از 24 ساعت اینکوباسیون در هنگام تهیه سوسپانسیون میکروبی در فاز لگاریتمی قرار داشته باشد.

2-2-2- تهیه امولسیونی آبی اسانس ها

غلظت های مختلف اسانس ها (0/2 %v/v، 0/1، 0) براساس نتایج بدست آمده از گزارشات و تحقیقات انجام شده (6، 11، 12، 16، 17 و20) به صورت امولسیون کردن مقدار معین هر یک از آنها با آب و به کمک توئین 80 (از شرکت مرک آلمان) به میزان 30 درصد وزن اسانس با استفاده از یک میکسر هموژنایزر(IKA-T25-digital ultra turax) به مدت یک دقیقه در پانزده هزار دور در دقیقه تهیه شد.

2-2-3- تهیه سوسپانسیون 0/5 مک فارلند

سوسپانسیون استاندارد 0/5 مک فارلند با استفاده از اضافه کردن 99/5 میلی لیتر اسید سولفوریک 1% و 0/5 میلی لیتر کلرید باریم 1/175% به طور آهسته با هم زنی مداوم تهیه گردید.

کدورت ایجاد شده توسط این سوسپانسیون دانسیته سلولی تقریباً معادل $1/5\times10^8$ cfu/ml ایجاد می کند. سپس کدورت آن با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (SIGMA-3-30K) در طول موج 625 nm اندازه گیری شد.

2-2-4- تهیه سوسپانسیون میکروبی

یک لوپ از سوش میکروبی تحت شرایط استریل (بین دو شعله وجود) به 500cc محیط کشت N.B جهت تهیه سوسپانسیون غلیظ میکروبی اضافه گردید، سپس محیط کشت به اینکوباتور 18-22ċ منتقل شد. جهت تهیه کشت مادر[3]، محیط کشت های N.A و E.M.B به روش شیب دار[4]، در لوله های در پیچ داری که قبلاً استریل شده بودند تهیه شد و از محیط N.B (بعد از ایجاد کدورت) کشت سطحی به شکل زیکزاک داده شد.محیط کشت ها به مدت 24 ساعت در اینکوباتور 37ċ قرار گرفته، سپس لوله ها با پارافین استریل شده و در یخچال نگه داری شدند.

2-2-5- ارزیابی فعالیت ضد میکروبی اسانس ها با استفاده از طرح مرکب مرکزی در 3 فاکتور در 3 سطح

3 سطح غلظت از هر اسانس (0/2%v/v، 0/1، 0) براساس نتایج بدست آمده از گزارشات و تحقیقات انجام شده (6، 11، 12، 16، 17 و20) تهیه شد. برای انجام آزمایش ها از طرح مرکب مرکزی در 3 فاکتور در 3 سطح تهیه گردید. 2-1% از اشرشیاکلی O157:H7 با غلظت استاندارد شده به روش مک فارلند (1×10^5) که روش تهیه آن در بخش قبل ذکر شد به 20 لوله آزمایش درب دار حاوی رقت های مشخص تهیه شده از اسانس های گیاهی اضافه گردید (جدول1).

یک لوله آزمایش فاقد ماده ضد میکروبی نیز به عنوان کنترل رشد (کنترل مثبت) در نظر گرفته شد، افزودن سوسپانسیون میکروبی به رقت های اسانس های گیاهی باعث رقیق شدن سوسپانسیون میکروبی و غلظت ماده ضد میکروبی خواهد شد، که این موارد طی آماده سازی نمونه ها در نظر گرفته شده است. پس از انجام این مراحل از لوله فاقد ماده ضد میکروبی (کنترل) 0/1cc از این

1- Nutrient Agar
2- Nutrient Broth
3- Master culture
4 - Slant

مخلوط با استفاده از یک اتوسمپلر فوراً روی سطح پلیت حاوی محیط آگار کشت سطحی داده شد تا پس از یک شب گرمخانه گذاری تعداد کلونی های رشد کرده شمارش شوند (7)، سپس لوله فاقد ماده ضد میکروبی به مدت 14 روز در یخچال در دمای 6-8ċ (دمای یخچال های صنعتی) نگهداری گردید و تعداد کلونی های رشد کرده مطابق روش ذکر شده بررسی گردید. این عملیات برای هر نمونه در سه تکرار به طور جداگانه انجام شد.

پس از یک شب گرمخانه گذاری در 37ċ از هر یک از لوله های آزمایش کشت سطحی بر روی محیط کشت آگار انجام گرفت و پلیت ها جهت مشاهده رشد یا عدم رشد میکروارگانیسم ها یک شب گرمخانه گذاری شدند (7). سپس لوله های آزمایش حاوی محیط کشت و اسانس های گیاهی به مدت 14 روز در یخچال در دمای 6-8ċ (دمای یخچال های صنعتی) نگهداری گردید و تعداد کلونی های رشد کرده مطابق روش ذکر شده بررسی گردید.

3-2- طراحی آزمایشات

در این تحقیق از طرح مرکب مرکزی[1] جهت طراحی آزمایشات استفاده شده است. هدف این تحقیق بهینه سازی اثرات اسانس های طبیعی جهت کاهش کینتیک رشد باکتری پاتوژن در شرایط آزمایشگاهی می باشد. سه پارامتر مورد بررسی شامل غلظت های اسانس آویشن، اسانس نعناع و اسانس کاکوتی می باشند. لذا جهت بهینه سازی اثرات اسانس های طبیعی سه پارامتر مذکور را با توجه به روش استفاده شده برای طراحی آزمایشات به عنوان متغیرهای مورد نظر و با سه سطح در مقادیر کد شده (1+، 0 و 1-) و مقادیر واقعی، مطابق جدول 1 در نظر گرفته شد.

جدول 1- مقادیر کد شده و واقعی متغیرهای مستقل در سطوح مختلف

متغیر های مستقل	علائم	مقادیر کد شده واقعی		
		-1	0	+1
غلظت اسانس آویشن (%v/v)	A	0	0/1	0/2
غلظت اسانس نعناع (%v/v)	B	0	0/1	0/2
غلظت اسانس کاکوتی (%v/v)	C	0	0/1	0/2

با استفاده از روش CCD و با کمک نرم افزار Design Expert (Version 6.0.2) و سطوح غلظت در نظر گرفته شده برای هر یک از متغیرها آزمایشات را طراحی کرده و چیدمان آنها را مطابق جدول 2 مشخص نمودیم. جدول 2 آرایش روش CCD را با 6 تکرار در نقطه مرکزی نشان می دهد. میانگین درصد مقادیر بدست آمده از سه مرتبه تکرار هر آزمایش به عنوان متغیر وابسته یا پاسخ (Y) در نظر گرفته می شود، در روش RSM برای هر متغیر وابسته مدلی تعریف می شود که آثار اصلی و همزمان فاکتورها را بر روی هر متغیر جداگانه بیان می نماید، مدل چند متغیره به صورت زیر می باشد

$$Y= \beta_0+ \beta_1 x_1+ \beta_2 x_2+ \beta_3 x_{3+} \beta_1 \beta_1 x_1^2+ \beta_2 \beta_2 x_2^2+ \beta_3 \beta_3 x_3^2 + \beta_1 \beta_2 x_1 x_2+ \beta_1 \beta_3 x_1x_3+ \beta_2 \beta_3 x_2x_3$$

در معادله ذکر شده Y پاسخ پیش بینی شده، β_0 ضریب ثابت، $\beta_3\beta_2\beta_1$ اثرات خطی، $\beta_1\beta_1$ $\beta_2\beta_2$ $\beta_3\beta_3$ اثر مربعات و $\beta_2\beta_3$,$\beta_1\beta_3$,$\beta_1\beta_2$ اثرات همزمان بوده و جهت برازش و محاسبه ضرایب معادله لازم است که داده های تجربی بدست آمده با استفاده از رگرسیون و آنالیز واریانس (ANOVA) تحلیل شود. بدین منظور رگرسیون و تحلیل واریانس با استفاده از نرم افزار Design Expert (Version 6.0.2) انجام گرفت.

1- Central composite design

جدول 2-چیدمان روش CCD برای سه متغیر مستقل

پس از 14 روز (Log/ml)	پس از24 ساعت (Log/ml)	کاکوتی (%v/v)	نعناع (%v/v)	آویشن (%v/v)
4/254	4/659	0	0	0
1/5	3/71	0	0	0/20
1/626	3/701	0	0/20	0
1/419	3/518	0	0/20	0/20
2/1	3/665	0/20	0	0
0/445	3/152	0/20	0	0/20
1/656	3/701	0/20	0/20	0
1/937	3/368	0/20	0/20	0/20
2/34	3/678	0/10	0/10	0
1/277	3/263	0/10	0/10	0/20
1/125	3/68	0/10	0	0/10
0/8	3/552	0/10	0/20	0/10
1/899	3/589	0	0/10	0/10
1/328	3/27	0/20	0/10	0/10
1/38	3/452	0/10	0/10	0/10
1/389	3/514	0/10	0/10	0/10
1/378	3/441	0/10	0/10	0/10
1/302	3/495	0/10	0/10	0/10
1/409	3/389	0/10	0/10	0/10
1/254	3/522	0/10	0/10	0/10

با توجه به شرایط تعیین شده، 20 فرمولاسیون نهایی ترکیبات بازدارنده تهیه شد. به کمک ضرایب رگرسیون اثر سطوح مختلف آویشن، نعناع و کاکوتی بر روی متغیر های وابسته محاسبه شد.

3- نتایج و بحث

3-1- تحلیل آزمایشات و مدل سازی پارامتر های موثر بر کاهش جمعیت اشرشیاکلی

مطابق آنچه در قسمت مواد و روش ها، همچنین قسمت طراحی آزمایشات گفته شد، آزمایشات را طبق جدول طراحی شده روش CCD، با در نظر گرفتن سه متغیر اسانس آویشن، اسانس نعناع و اسانس کاکوتی برابر با 20 آزمایش همراه با 6 تکرار در نقطه مرکزی، برای کاهش خطا انجام می دهیم. جدول آزمایشات طراحی شده با توجه به متغیرهای فرض شده و نتایج بدست آمده برای کاهش جمعیت اشرشیاکلی Log/ml مطابق جدول (2) آورده شده است. با توجه به نتایج بدست آمده به دنبال ارائه مدلی مناسب براساس مدل اولیه (معادله 1) برای کاهش جمعیت اشرشیاکلی با توجه به سه متغیر فرض شده اسانس آویشن، اسانس نعناع و اسانس کاکوتی می باشیم. مدل اولیه به صورت Full quadratic در نظر گرفته شد، به عبارت دیگر فرض اولیه و پیشنهادی، موکد بر موثر بودن تمامی ترم ها (متغیرها با توان اول، دوم و اثر متقابل متغیرها) و در نظر گرفتن آنها در مدل بود. ولی در عمل برخی از ترم های در نظر گرفته شده در مدل اضافی بوده و باید حذف شوند لذا احتیاج به یک تحلیل آماری جهت مشخص نمودن ترم های موثر از غیر موثر داریم. این تحلیل با استفاده از آزمون فرض و پارامتر p-value انجام می شود. محاسبات مربوطه توسط نرم افزار Design Expert 6.0.2 انجام شد و پس از حذف ترم های غیر موثر به جدول تحلیل آماری (3) می رسیم.

در جدول (3)، DF[1]: به معنای درجه آزادی، SS[2]: به معنای مجموع مربعات و P-Valve مقادیر عددی تعیین کننده در پذیرش یا رد فرض آماری مورد نظر می باشند. مهم ترین قسمت در جدول تحلیل آماری در بخش آنالیز واریانس، پارامتری به نام آزمون ضعف برازش[3] می باشد. این پارامتر نشان دهنده مناسب بودن یا نا مناسب بودن مدل می باشد. مقدار P پارامتر ضعف برازش برای کاهش جمعیت باکتری پاتوژن در زمان های 24 ساعت و 14 روز به ترتیب P_{24h} =0/0627، P_{14D} =0/0834 بدست آمده است، که بیانگر این است که آزمون ضعف برازش مربوط به مدل برازش یافته (چند جمله ای درجه دوم) بر پاسخ معنی دار نبود. بنابراین، مدل توانسته به خوبی بر داده های مورد بررسی برازش شود.

1- DF: Degrees of freedom
2- SS: Sum of square
3- Lack of fit

جدول 3- نتایج آنالیز واریانس (ANOVA) مدل سطح پاسخ برای تغییرات جمعیت اشرشیاکلی ***O157:H7*** در محیط کشت.(A: آویشن، B: نعناع و C:کاکوتی)

Source		DF	Essential oils 24h		Essential oils14 days	
			SS	P-Value	SS	P-Value
Model		9	1.68	0.0001	10.77	0.0001
Linear	A	1	0.57	0.0001	2.91	0.0001
	B	1	0.11	0.0033	0.39	0.0001
	C	1	0.41	0.0001	1.05	0.0001
Quadratic	A^2	1	0.0044	0.4495	0.76	0.0001
	B^2	1	0.095	0.0046	0.28	0.0002
	C^2	1	0.00001	0.9904	0.30	0.0002
Interaction	AB	1	0.11	0.0027	2.51	0.0001
	AC	1	0.010	0.2589	0.31	0.0001
	BC	1	0.25	0.0002	1.76	0.0001
Residual		10	0.072		0.087	
Lack of fit		5	0.059	0.0627	0.069	0.0834
Pure error		5	0.013		0.018	
Total		19	1.75		10.86	

نتایج آنالیز آماری در جدول (3) نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می گردد، عبارت هایی از مدل که در آزمون اسانس بعد از 24 ساعت معنی دار بودند شامل عبارات درجه اول آویشن، کاکوتی (p<0/0001) و نعناع (p<0/01) و عبارت درجه دوم نعناع(p<0/01) و همچنین اثر همزمان آویشن، نعناع (p<0/01) و نعناع و کاکوتی (p<0/001) می باشند. روابط درجه دوم آویشن، کاکوتی و برهم کنش آویشن، کاکوتی معنی دار نبوده و از مدل حذف شدند. به عبارت دیگر فقط میان آویشن، کاکوتی بر هم کنش متغیر های مستقل وجود نداشت. همچنین براساس Sum of square بیشترین تأثیر مربوط به اسانس آویشن می باشد.

همچنین عبارت هایی از مدل که در آزمون اسانس بعد از 14 روز معنی دار بودند شامل تمامی عبارات درجه اول (p<0/0001) و عبارات درجه دوم نعناع، کاکوتی(p<0/001) و آویشن (p<0/0001) و تمامی عبارات اثر متقابل (p<0/0001) معنی دار می باشند. همچنین براساس Sum of square بیشترین تأثیر مربوط به اسانس آویشن می باشد.

برای اینکه مدل توانایی خوبی برای برازش اطلاعات داشته باشد لازم است که R^2 adjusted دارای بالاترین مقدار باشد؛ ضریب تبیین (R^2) به عنوان نسبت تغییرات توصیف شده توسط مدل به تغییرات کل بیان می شود که معیاری از درجه ی تناسب برازش می باشد. بنابراین هر چه مقدار R^2 به یک نزدیک تر شود، قدرت مدل برازش یافته در توصیف تغییرات پاسخ به عنوان تابعی از متغیرات مستقل بیشتر می باشد. بتریز و همکاران چنین عنوان کردند که برای یک مدل با برازش خوب، مقدار R^2 بایستی حداقل 0/8 باشد (8)، همچنین ضریب تغییرات (C.V) نیز بیانگر خطاها در انجام آزمایشات است و هر چه این عدد پایین تر باشد دقت آزمایش را نشان می دهد.

جدول 4- پارامترهای آماری بدست آمده برای کاهش جمعیت اشرشیاکلی

پارامترهای آماری	Essential oils 24h	Essential oils 14 days
R^2	0/9590	0/9920
Adj-R^2	0/9222	0/9847
CV	2/37	5/87

با به کارگیری روش آماری سطح پاسخ، معادله ی زیر نشان دهنده ی ارتباط مقادیر ضرایب واقعی حاصل از آزمایش با متغیرهای آزمایش آورده شده است :

$$Y_{(2)}= +4.55182-4.73664X_1-7.66980X_2-4.11619X_3+18.56340x_2^2+11.81628x_1x_2+17.50780x_2x_3$$

معادله (2) نشان دهنده ارتباط مقادیر ضریب واقعی حاصل از آزمایش بعد از گذشت 24 ساعت.

$$Y_{(3)}= +4.14739-23.47653X_1-5.85339X_2-16.49747X_3 + 52.44744x_1^2-32.16786 x_2^2+32.91803 x_3^2+56.04877x_1x_2+19.84251 x_2x_3+46.96055 x_2x_3$$

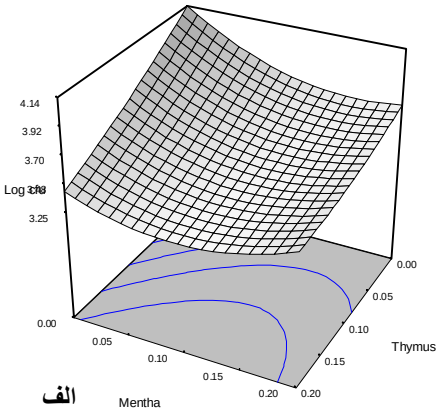
معادله (3) نشان دهنده ارتباط مقادیر ضریب واقعی حاصل از آزمایش بعد از گذشت 14 روز.

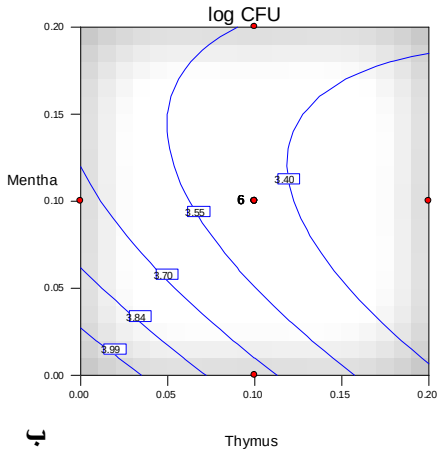
2-3- نمودار های سه بعدی[1] و مسطح[2]

این نمودار ها میزان کاهش جمعیت اشرشیاکلی را در برابر متغیرها به صورت سه بعدی و مسطح نشان می دهد. این اشکال فضایی با استفاده از نقاط آزمایش شده و همچنین درون یابی سایر نقاط با استفاده از مدل محاسباتی صورت می گیرد. در شکل (1و4) نمودار سه بعدی و مسطح اثر همزمان دو متغیر آویشن- نعناع، و شکل (2و5) اثر همزمان آویشن- کاکوتی و شکل (3و6) اثر همزمان نعناع، کاکوتی بر تغییرات جمعیت اشرشیاکلی در محیط کشت اختصاصی حاوی اسانس بعد از 24 ساعت و 14 روز نشان داده شده است.

بر این اساس در شکل (1) قابل ملاحظه است که در تمامی غلظت های اسانس نعناع، با افزایش غلظت اسانس آویشن جمعیت اشرشیاکلی به صورت خطی کاهش یافت. با توجه به معنی داری اثر خطی آویشن ($p<0/0001$) می توان روند کاهش خطی را در شکل مشاهده کرد.

در شکل (2) نمودار سه بعدی بیان گر این مطلب بود که در تمامی غلظت های اسانس آویشن با افزایش غلظت اسانس کاکوتی یک روند کاهشی خطی داشتیم. با توجه به معنی داری اثر خطی کاکوتی ($p<0/0001$) می توان این روند در شکل مشاهده کرد.



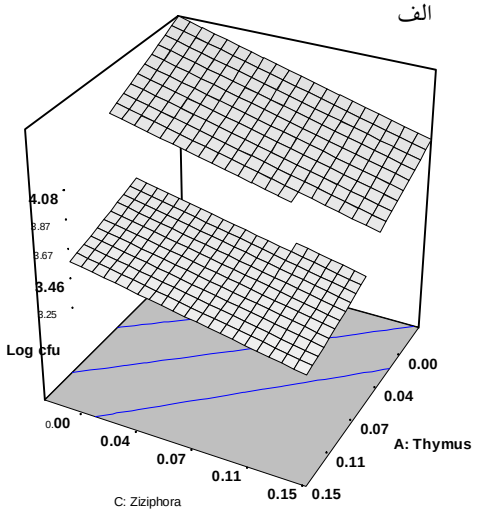


شکل 1- نمایش نمودار سه بعدی (الف) و نمودار کنتور (ب)؛ اثر همزمان دو متغیر آویشن- نعناع بر تغییرات جمعیت اشرشیاکلی در محیط کشت اختصاصی حاوی اسانس بعد از گذشت 24 ساعت.

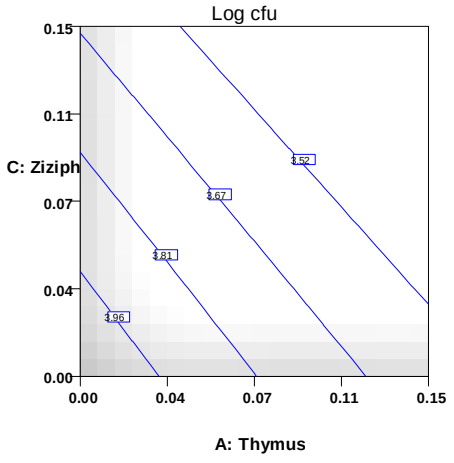
همچنین، اثر همزمان نعناع- کاکوتی در شکل (3) نشان داده شده است. با توجه به شکل در پی افزودن اسانس نعناع در غلظت های پایین اسانس کاکوتی جمعیت اشرشیاکلی به صورت نمایی کاهش یافت و با توجه به معنی داری اثر نمایی نعناع ($p<0/01$) می توان روند کاهش نمایی را در شکل مشاهده کرد.

1 . 3D- Surface
2 . Contour

الف



ب

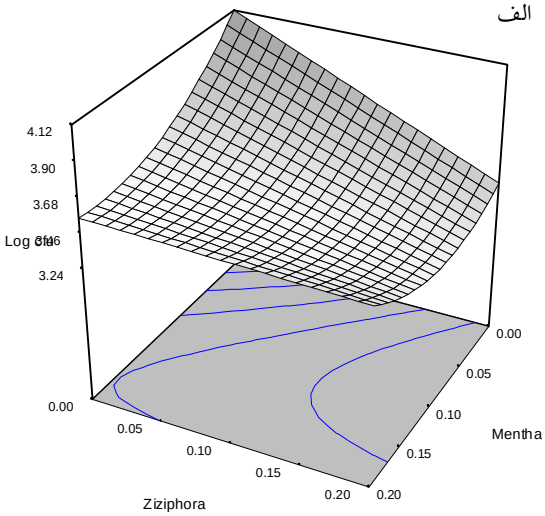


شکل 2-نمایش نمودار سه بعدی (الف) و نمودار کنتور (ب)؛ اثر همزمان دو متغیر آویشن - کاکوتی بر تغییرات جمعیت اشرشیاکلی در محیط کشت اختصاصی حاوی اسانس بعد از گذشت 24 ساعت

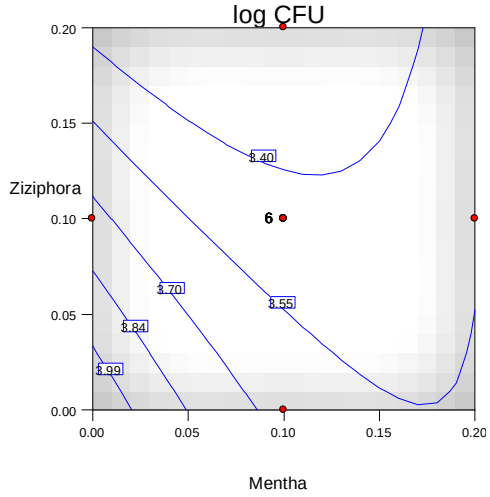
در شکل (4) قابل ملاحظه است که در تمامی غلظت های اسانس نعناع، با افزایش غلظت اسانس آویشن جمعیت اشرشیاکلی به صورت نمایی کاهش یافت. با توجه به معنی داری اثر نمایی آویشن (p<0/0001) می توان روند کاهش نمایی را در شکل مشاهده کرد.

اثر همزمان آویشن - کاکوتی در شکل (5) نشان داده شده است. با توجه به شکل در پی افزودن اسانس کاکوتی در تمامی غلظت های نعناع جمعیت اشرشیاکلی به صورت نمایی پایین می رود و با توجه به معنی داری اثر نمایی کاکوتی (p<0/0001) می توان روند کاهش نمایی را در شکل مشاهده کرد.

الف



ب



شکل 3- نمایش نمودار سه بعدی (الف) و نمودار کنتور (ب)؛ اثر همزمان دو متغیر نعناع - کاکوتی بر تغییرات جمعیت اشرشیاکلی در محیط کشت اختصاصی حاوی اسانس بعد از گذشت 24 ساعت.

از میان شرایطی که بر روی کاهش اشرشیاکلی در محیط کشت حاوی اسانس بعد از 24 ساعت موثر بود، مشخص شد که کاهش اشرشیاکلی، از اسانس های آویشن، نعناع و کاکوتی تأثیر می پذیرد، به طوری که سطح اسانس آویشن به میزان بیشتری از اسانس کاکوتی بر کاهش اشرشیاکلی تأثیر داشت و اسانس نعناع نسبت به دو فاکتور دیگر تأثیر کمتری بر کاهش جمعیت اشرشیاکلی داشت.

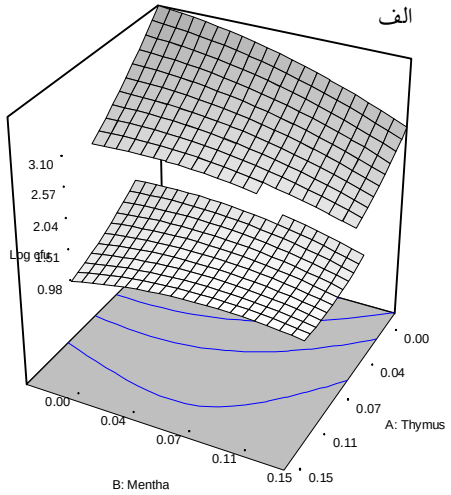
از میان شرایطی که بر روی کاهش اشرشیاکلی در محیط کشت حاوی اسانس بعد از 14 روز موثر بود، مشخص شد که کاهش اشرشیاکلی، از اسانس های آویشن، نعناع و کاکوتی تأثیر می پذیرد، به طوری که سطح اسانس آویشن به میزان بیشتری از اسانس کاکوتی بر کاهش اشرشیاکلی تأثیر داشت و اسانس نعناع نسبت به دو فاکتور دیگر تأثیر کمتری بر کاهش جمعیت اشرشیاکلی داشت.

پس از بررسی نتایج اثر ضد میکروبی ترکیبات بازدارنده طبیعی در محیط کشت مشخص گردید با گذشت زمان تاثیر اسانس های گیاهی بر کاهش جمعیت اشرشیاکلی افزایش می یابد.

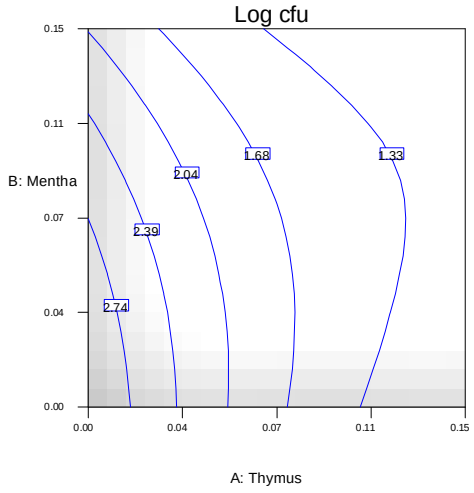
مهرابیان و همکاران (1996) اثر اسانس های سه گونه از گیاهان تیره نعناع (کاکوتی، مریم گلی و نعناع) را بر باکتری های مولد فساد و بیماری زای مواد غذایی شامل باسیلوس سرئوس، انتروباکتر آئروژینز، اشرشیاکلی O127:B8 ، اشرشیاکلی O125:B15 ، اشرشیاکلی O111:B4 ، سالمونلا پاراتیفی نوع A ، سالمونلا پاراتیفی نوع B ، سالمونلا تیفی ، شیگلا دیزنتری ، شگیلا سونئی ، شگیلا فلکسنری ، استافیلوکوکوس اورئوس ، کلبسیلا نومونیا و پرتئوس میرابیلیس بررسی کردند. نتایج نشان دادند که اسانس های مزبور دارای خاصیت ضد میکروبی هستند. اسانس مریم گلی و کاکوتی در مقایسه با اسانس نعناع اثر ضد میکروبی بیشتری داشتند. (5).

شافعی و همکارانش (1999) ترکیبات فرار و فعالیت ضد میکروبی گیاه آویشن شیرازی را مورد بررسی قرار دادند. اسانس این گیاه با روش کروماتوگرافی گازی و کروماتوگرافی گاز-مایع تجزیه و بررسی شد. اصلی ترین ترکیبات آن کارواکرول، تیمول بودند. اثرات ضد باکتری و ضد کپکی این اسانس بر استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سوبتلیس[1]، کلبسیلا پونومونیا[2]، اشریشیاکلی، کاندیدا آلبیکانس[3] و آسپرژیلوس نیجر[4] مورد مطالعه قرار گرفت. اسانس هایی که دارای مقادیر بالایی از تیمول و کارواکرول بودند دارای فعالیت ضد میکروبی بیشتری بودند(19).

الف



ب

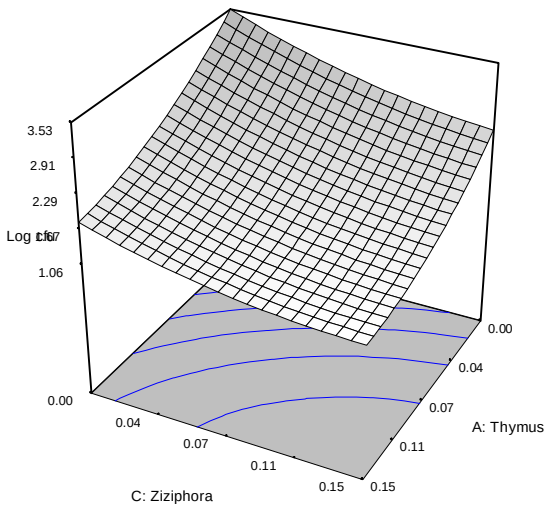


شکل 4- نمایش نمودار سه بعدی (الف) و نمودار کنتور (ب)؛ اثر همزمان دو متغیر آویشن-نعناع بر تغییرات جمعیت اشرشیاکلی در محیط کشت اختصاصی حاوی اسانس بعد از گذشت 14 روز

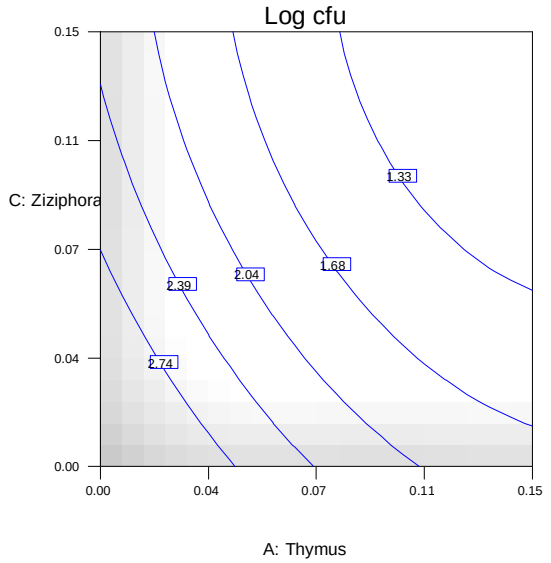
1-B.subtilis

2- Klebsiella.penomoniae
3- Candida.albicans
4- Aspergillus.niger

الف

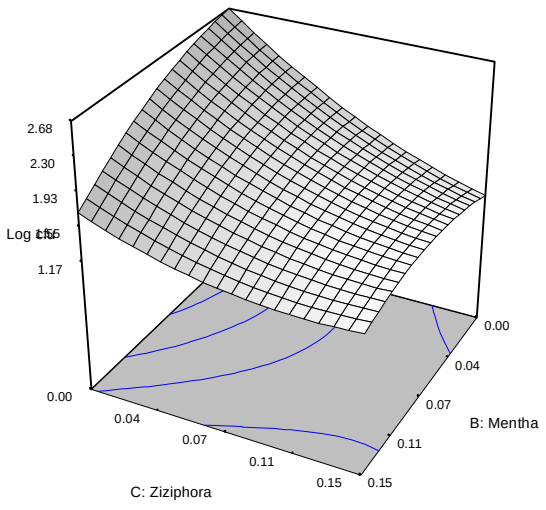


ب

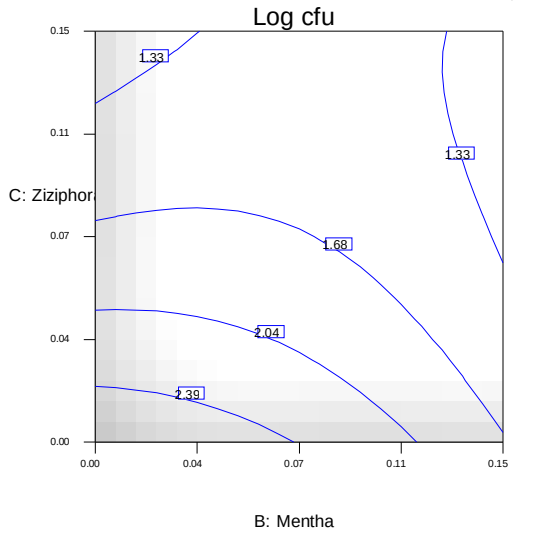


شکل 5-نمایش نمودار سه بعدی (الف) و نمودار کنتور (ب)؛ اثر همزمان دو متغیر آویشن-کاکوتی بر تغییرات جمعیت اشرشیاکلی در محیط کشت اختصاصی حاوی اسانس بعد از گذشت 14 روز

الف



ب



شکل 6- نمایش نمودار سه بعدی (الف) و نمودار کنتور (ب)؛ اثر همزمان دو متغیر نعناع-کاکوتی بر تغییرات جمعیت اشرشیاکلی در محیط کشت اختصاصی حاوی اسانس بعد از گذشت 14 روز

آخوند زاده و همکارانش (2007) اثرات متقابل آویشن، pH و دما بر رشد استافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا تیفی موریوم را مورد بررسی قرار دادند. از مقادیر متفاوت آویشن (0، 0/018، 0/03و 0/06 درصد)، pH (7/3 و 6) و دمای متفاوت نگهداری (15، 25 و 35) استفاده شد. نتایج مشاهده شده در این مطالعه، اثرات معنی داری از ترکیب اسانس روغنی، pH و دما بر عدم رشد سالمونلا تیفی موریوم و استافیلوکوکوس اورئوس نشان داد (1). برومند و همکارانش (1387) بررسی خاصیت ضد میکروبی اسانس بذرهای شوید و گشنیز بر روی استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلی O157:H7، سالمونلا تیفی موریوم با استفاده از آزمایش حساسیت رقت در محیط مایع مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این بررسی نشان داد که استافیلوکوکوس اورئوس حساس ترین و سالمونلا تیفی موریوم مقاوم ترین باکتری به هر دو اسانس بودند (2).

4- نتیجه گیری

پس از بررسی نتایج اثر اسانس های طبیعی در محیط کشت مشخص شد که اسانس های گیاهان تیره نعناع بر کاهش جمعیت اشرشیاکلی تأثیر داشتند. فرمول بهینه اسانس ها برای کاهش باکتری پاتوژن با غلظت اسانس آویشن (v/v)0/15%، اسانس نعناع (v/v)0% و اسانس کاکوتی (v/v) 0/15% می باشد. در این غلظت ها بیشترین میزان کاهش جمعیت اشرشیاکلی در 24 ساعت 3/39 Log/ml و در 14 روز 0/51 Log/ml می باشد. اثر خوب باکتری کشی اسانس ها را می توان به ترکیبات آروماتیک اگینول، کارواکرول و سینوموآلدهید مربوط دانست، این ترکیبات در طبیعت به صورت فنولیک هستند مطالعات بر روی مکانیسم فنولیک نشان داد که این ترکیبات بر روی غشاء سلولی تأثیر می گذارند و نفوذ پذیری را مختل می کنند، سپس منجر به اختلال فعالیت غشاء سلولی در پذیرش انتقال الکترونی، برداشت مواد مغذی، سنتز اسید نوکلئیک و ATPase می شوند. این نتیجه مشابه نتایج محققین دیگر می باشد (13، 18و22).

5- منابع

1. آخوندزاده بستی، ا.، میثاقی، ع.، موسوی، م. ح.، زهرایی صالحی، ت. و کریم، گ. 1386. اثر اسانس گیاه آویشن شیرازی بر رشد استافیلوکوکوس اورئوس در سوپ تجارتی، *فصلنامه گیاهان دارویی*، شماره 22، ص ص 98-91.

2. برومند، ع.، حامدی، م.، امام جمعه، ز.، رضوی، ه. و گلمکانی، ت. 1387. بررسی خاصیت ضد میکروبی اسانس بذرهای شوید و گشنیز بر روی استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلی O157:H7، سالمونلا تیفی موریوم با استفاده از آزمایش حساسیت رقت در محیط مایع، *فصلنامه پژوهش های علوم و صنایع غذایی ایران*، جلد4 شماره 1، ص ص69-59.

3. راد. س. 1378. افزایش عمر انباری محصولات باغی با استفاده از اثرات ضد قارچی اسانس های گیاهی. پایان نامه کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد.

4. مرتضوی، س.ع. زیرجانی، ل. و طباطبایی یزدی، ف. 1388. میکروبیولوژی غذایی کاربردی و آزمایشگاهی. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد.

5. مهرابیان، ص.، ملاباشی، ز. و مجد، ا. 1375. بررسی اثر ضد میکروبی سه گونه از گیاهان تیره نعناع (کاکوتی، مریم گلی و نعناع)، بر 15 سویه باکتری بیماریزای روده ای و عامل مسمومیت غذایی. *نشریه علوم*. جلد هشتم. شماره 1. صفحات: 11-1.

6. Bayoumi, S .1992. Bacteriostatic Effect of Some Spices and Their Utilization in The Manufacture of Youghurt. Chemie – Microbiologie- *Technology- der-LebenSmittel*. 14 (1/2): 21-26.

7. Barnon, E.J., Fineg Old, S.M. 1990. Method fir Testing Antimicrobial Effectiveness. In: Diagnostic Microbiology, 8 th ed. The Mosby Company. pp, 172-184.

8. Beatriz, H. Benrnal, Jario Calle, Elcy Q. Duarte, Roberto Pinzon, Mario Velasa/quez. 2005.

Inulin from tubers of Dahlia imperialis Roetz *Rev. Col. Cienc. Quim. Farm*. 34(2): 122-125.

9. Beuchat, L. R. 2001. Control of foodborne Pathogens and Spoilage Microoganisms by Naturally Occurring Antimicrobials. *Microbial Food Contamination*. CRC Press, London.

10. Bullerman, L. B., Lieu, Y. and Seier, S. A .1977. Inhibition of Growth and Aflatoxin Production by Cinnamon and Clove oils, Cinnamic Aldehyd and Eugenol. *Journal of Food Science*. 42(4): 1107-1116.

11. Burt, S. 2004 .Essential oils :Their Antibacterial Properties and Potentiona Applications in foods, a Review. *International Journal of food Microbiology*. 94:223-253

12. Chachoyan, A. A. and Oganesyan, G. B. 1996. Antitumor Activity of Some Spices of The Family Lamiaceae. *Rastitelnye Resursy*. 32(4):59-64.

13. Denyer, S.P., & Hugo, W. B. 1991. Biocide induced damage to the bacterial cytoplasmic membrane. In S.P. Denyer & W.B. Hugo, Mechanisms of action of chemical biocides; their study and exploitation (pp. 171-188). The Society for Applied Bacteriology, technical Series No 27. Oxford Blackwell Scientific Publication.

14. Hill, A. F. 1989. Economic Botany. THM Edition, New Delhi, pp. 560.

15. Holley . R. A and Patel, D. 2005. Improvement in Shelf-Life and Safety of Perishable Foods by Plant Essential Oils and Smoke Antimicrobials. *Food Microbilogy*. 22:273-292.

16. Marino, M., Barsani, C. and Comi, G .2001.Impedence Measurments of Study the Antimicrobial Activity of Essential Oil from Lamiaceae and Compositae. *International Journal of Food Microbiology*. 67:187-195

17. Negueruela, A. V. and Mata, R.M .1986. The Volatile Oil of *Ziziphora hispanica*, *L. Flavour and Fragnance Journal*. 1(3): 111-113.

18. Nychas, G.J. E. 1995. Natural antimicrobials from plants. In G. W. Gould, New methods of food preservation (pp. 58-89). London: Blackie Academic Professional.

19. Shaffiee, A., Javidnia, K. and Tabatabai, M .1999. volatile Constituents and Antimicrobial Activity of Zataria Multiflora, Population Iran. *J. Chem & Chem. Eng*. 18(1) : 1-5.

20. Simonetti, G. 1991. The MacDonald Encyclopedia of Herbs and Spices. Macdonald and Co. (Pub). Ltd. London, pp.255.

21. Smith-Palmer, A., Stewart, J. and Fufe, L .1998. Antimicrobial Properties of Plant Essential oils and Essences Against Five Important Foodborne pathogens. *Letters in Applied Microbiology*. 26(2):112-118.

22. Tranter, H. S., Tassou, C.C., & Nychas, G.J. 1993. The effect of the olive phenolic compounds, oleuropein, on growth and enterotoxin B production by *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Bacteriology*, 74, 253-260.