بررسی ویژگی ضدباکتریایی عصاره آناتو (نوربیکسین) در برابر برخی از باکتری‌های بیماریزا

محمدعلی سحری[۱]*، سهیلا زرین‌قلمی[۲]، مرتضی ستاری[۳]

۱- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

۲- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان

۳- دانشیار گروه باکتری‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

(تاریخ دریافت: ۸۸/۲/۱۲ تاریخ پذیرش: ۸۸/۸/۲۳)

چکیده

اثر بازدارندگی عصاره آناتو (نوربیکسین ۱ درصد) بر توانایی رشد و جوانه‌زنی اسپور برخی از باکتری‌های بیماریزا (*استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس*، *کلستریدیوم پرفرانجنز* و *اشرشیاکلی*)، با استفاده از روش‌های چاهک و رقت لوله‌ای مورد مطالعه قرار گرفت. مطابق نتایج به‌دست آمده از بررسی قطر هاله در روش چاهک، عصاره‌ی آناتو بر رشد باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس* و *کلستریدیوم پرفرانجنز* (به‌ترتیب با قطر هاله عدم رشد ۱۳، ۱۲ و ۱۰ میلی متر) اثر بازدارندگی داشته اما بر *اشرشیاکلی* بی اثر است. ارزیابی نتایج روش رقت لوله‌ای مشخص کرد که کمترین غلظت‌های بازدارنده از رشد برای باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس* در تعداد 10^6، 10^4 و 10^2 سلول در میلی‌لیتر، به‌ترتیب ۱/۲، ۰/۶ و ۰/۳گرم در لیتر از عصاره آناتو بوده و در میزان سلول مشابه برای *کلستریدیوم پرفرانجنز*، این غلظت‌ها به ۲/۴، ۱/۲ و ۰/۶گرم در لیتر می‌رسد. به‌علاوه عصاره آناتو در غلظت‌های ذکر شده می‌تواند از جوانه‌زنی اسپورهای *باسیلوس سرئوس* و *کلستریدیوم پرفرانجنز* نیز پیشگیری نماید. بنابراین عصاره آناتو می‌تواند به‌عنوان یک افزودنی غذایی طبیعی ضد باکتریایی، در بیشتر فرآورده‌های غذایی استفاده شود.

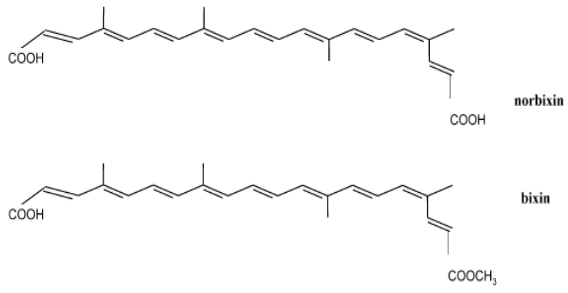
کلید واژگان: آناتو، نوربیکسین، باکتریهای بیماریزا، افزودنی، نگهدارنده

* مسئول مکاتبات: sahari@modares.ac.ir

۱- مقدمه

افزودنی‌های طبیعی و سنتزی غذایی، شامل مواد گوناگونی هستند که برای ایمنی و بهبود ظاهر، عطر و طعم مواد خوراکی در دوران نگهداری استفاده می‌شوند. استفاده از افزودنی‌ها طی سال‌های متمادی برای پاسخ به تقاضای مصرف‌کنندگان در رابطه با مصرف آسان و نگهداری ایمن مواد غذایی، در صنعت غذا رایج بوده است. اما در سال‌های اخیر علاوه بر این که مصرف‌کنندگان همچنان خواهان مواد غذایی سالم و باکیفیت بالا هستند، محصولاتی با حداقل مواد افزودنی مضر برای سلامتی را مطالبه می‌کنند. بنابراین استفاده از افزودنی‌های طبیعی به‌جای انواع سنتزی روز به روز در حال گسترش است [۱، ۲].

عصارهٔ آناتو یک رنگدانهٔ طبیعی کاروتنوئیدی استخراج شده از پریکارپ دانه‌های *درخت بیکسا اورلانا* (*Bixa orellana* L.) است. جزء رنگی مهم در عصارهٔ استخراج شده که محلول در روغن است، '۹- سیس- بیکسین[۱]، و جزء رنگی اصلی در عصارهٔ استخراج شده با محلول قلیایی '۹- سیس- نوربیکسین[۲]، محلول در آب است. عصارهٔ قسمت‌های مختلف گیاه آناتو در طب سنتی برای درمان دیابت، عفونت‌های میکروبی، مارگزیدگی، اسهال خونی، بیماری‌های کلیوی، تب مالاریا و یرقان کاربرد داشته است. امروزه علاوه بر کاربردهای درمانی گذشته، از این عصاره برای درمان تومر و سرطان‌های مختلف نیز استفاده می‌شود [۳، ۴، ۵، ۶].



شکل ۱ ساختمان شیمیایی بیکسین و نوربیکسین

آناتو، محدودهٔ رنگی زرد- نارنجی و قرمز را ایجاد می‌کند و به‌عنوان رنگدانهٔ طبیعی و سالم، در فرآورده‌های غذایی مختلف از جمله پنیر، کره، مارگارین، شورتنینگ‌ها، فرآورده‌های قنادی، نانوایی، گوشت و فرآورده‌های گوشتی، پوشش سوسیس و کالباس، ماهی، برنج، نوشیدنی‌های مختلف، اسنک‌ها، انواع مرباها و در بهبود رنگ سایر فرآورده‌های تهیه شده از میوه ها و سبزی‌ها در طی مدت زمان نگهداری این فرآورده‌ها، کاربرد دارد. مطالعه‌های مختلف نشان می‌دهد که در شرایط فرآوری و مدت زمان نگهداری مواد غذایی، آناتو (به‌ویژه نوربیکسین)، پایداری خوبی داشته و عطر و طعم نامطلوب تولید نمی‌کند [۷، ۸، ۹].

به‌دلیل استفاده فراوان از آناتو در صنعت غذا، مطالعه‌های بسیاری برای بررسی ایمن بودن آناتو صورت گرفته است. نتایج این بررسی‌ها، هیچ گونه اثر منفی بر سلامتی در ارتباط با مصرف آناتو نشان نداده است [۱۰، ۱۱، ۱۲].

نتایج مطالعه‌های مختلفی که درباره بررسی اثر ضد میکروبی آناتو صورت گرفته، بیانگر این است که عصاره این گیاه (نوربیکسین) بر بسیاری از باکتری‌های عامل فساد و بیماریزای گرم مثبت از جمله *باسیلوس سرئوس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *کلستریدیوم پرفرانجنز* و *کلستریدیوم* بوتولینوم اثر بازدارنده و کشنده دارد اما بر باکتریهای گرم منفی مثل *اشرشیاکلی* بی‌اثر است [۱۳،۱۴]. همچنین مشخص شده که عصاره الکلی برگهای این گیاه بر باکتری های گرم مثبت از جمله *باسیلوس سوبتیلیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استرپتوکوکوس فکالیس*، اثر بازدارنده داشته، اما بر باکتریهای گرم منفی مثل *اشرشیا کلی*، *سراشیا مارسسنس*، *آسپرژیلوس نایجر* و *کاندیدا یوتیلیس* اثر جزئی دارد [۳].

با توجه به فواید ذکر شده درباره آناتو، هدف از این تحقیق بررسی اثر ضدباکتریایی آناتو بر برخی از باکتری‌های بیماریزای موجود در انواع مختلف غذاها بوده است. پاتوژن‌های غذایی مورد آزمون، از باکتری‌هایی هستند که به‌طور وسیعی درطبیعت وجود دارند و عمدتا باعث آلودگی و فساد مواد غذایی شده و مسمومیت غذایی ایجاد می‌کنند [۱۵].

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 25923)، *باسیلوس سرئوس* (RITCC 1039) و *اشرشیاکلی* (ATCC 25922) از آزمایشگاه گروه باکتری شناسی دانشگاه تربیت مدرس و *کلستریدیوم پرفرانجنز* از موسسه‌ی سرم سازی رازی

تهیه شد. محیط‌های کشت نوترینت آگار[1] و مولر هینتون آگار[2]، مولر براث[3]، تیوگلیکولات براث[4]، محصول شرکت مرک آلمان و محیط‌های کشت مخصوص تهیه اسپور[5] به‌صورت دست‌ساز در آزمایشگاه تهیه شد. از لام نئوبار، صافی ۰/۲۲ میکرون، و گازپک نوع A و جار بی‌هوازی به‌ترتیب برای شمارش اسپورها، استریل کردن محلول آناتو و رشد باکتری‌های بی‌هوازی استفاده شد. پودر نوربیکسین ۱ درصد از نمایندگی شرکت آلمانی سن ساینت[6] تهیه شد.

۲-۲- آزمایش اولیه برای تشخیص اثر ضد میکروبی آناتو

برای این منظور از روش چاهک (well diffusion method) استفاده شد [۱۵، ۱۶، ۱۷، ۱۸]. به‌این ترتیب که ابتدا سوسپانسیونی از سلول‌های رویشی باکتری‌ها، معادل با نیم‌مک فارلند[7] (در هر ۱ سی‌سی معادل نیم مک‌فارلند $10^8 \times 1/5$ سلول باکتری وجود دارد) تهیه شد [۱۹]. سپس توسط پی‌پت پاستور استریل از باکتری‌های مورد نظر روی محیط‌های جامد کشت داده شد. بعد از کشت میکروبی، با استفاده از پی‌پت پاستور استریل و خلأ، چاهک‌هایی در محیط‌های کشت ایجاد شد. سپس هر چاهک با غلظت‌های مورد نظر از نوربیکسین (۰/۳، ۰/۶ و ۱/۲ گرم در لیتر) استریل شده توسط صافی، پر شد. پتری‌دیش‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه‌گذاری شد و بعد از ۲۴ ساعت تشکیل یا عدم تشکیل هاله دور چاهک‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

۲-۳- تهیهٔ اسپور

برای تولید اسپور کلستریدیوم پرفرانجنز و باسیلوس سرئوس از محیط‌های کشت مخصوص اسپورسازی استفاده شد. بعد از کشت دادن باکتری‌ها در محیط‌های مورد نظر، محیط‌های کشت در گرمخانهٔ ۳۷ درجه سانتیگراد به‌مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. سپس از سویه‌های رشد کرده، سوسپانسیون تهیه و به‌مدت ۱۵ دقیقه در بن ماری در دمای ۸۰ درجه قرار داده شد تا اگر سلول رویشی وجود دارد از بین برود. برای اطمینان از تشکیل اسپور، از سویه‌های رشد کرده لام مرطوب تهیه و زیر میکروسکوپ با عدسی ۴۰ بررسی شد. همچنین رنگ آمیزی گرم و رنگ آمیزی مخصوص اسپور انجام گرفت. در رنگ آمیزی گرم، اسپورها شفاف و در رنگ آمیزی مخصوص، اسپورها به رنگ سبز هستند [۱۹، ۲۰].

۲-۳-۱- شمارش اسپورها با لام نئوبار[8]

برای شمارش از لام نئوبار استفاده شد. تعداد اسپورهای شمارش شده در هر قسمت ازخانه های ۴×۴، با هم جمع و بر ۴ تقسیم شد (میانگین گرفته شد). سپس عدد به‌دست آمده درعدد ۱۰ ضرب گردید (لام و لامل طوری طراحی شده است که وقتی لامل روی لام قرار می‌گیرد دقیقاً فاصلهٔ لام تا لامل ۰/۱ میلی متر می‌شود). برای به‌دست آوردن تعداد مورد نظر اسپورها، رقت تهیه شد.

۲-۴- تعیین کمترین غلظت بازدارنده از رشد

برای این منظور از روش رقت لوله‌ای (Macrodilution technique) استفاده شد [۱۶، ۱۷]. غلظت‌های ۰/۳، ۰/۶، ۱/۲، ۲/۴ و ۴/۸ از نوربیکسین ۱ درصد در محیط کشت مایع در لوله آزمایش (محیط مورد استفاده برای کلستریدیوم، تیوگلیکولات و برای سایر باکتری‌ها، نوترینت براث یا مولر هینتون براث) آماده شد. سپس از هر باکتری یا اسپور تعداد 10^8، 10^6، 10^4 و 10^2 به هر لوله آزمایش حاوی محیط کشت اضافه شد. یک لوله آزمایش حاوی محیط کشت و یک لوله آزمایش حاوی محیط کشت و باکتری مورد نظر به‌ترتیب به‌عنوان شاهد منفی (بیانگر عدم وجود

1. Nutrient agar
2. Muller hinton agar
3. Muller hinton broth
4. Thioglycolate broth
5. Duncan and sporulation medium for *Clostridium* (Proteose peptone: 15g, Yeast extract: 4g, Sodium thioglycollate: 1g, $Na_2HPO_4{\cdot}7H_2O$: 10g, Raffinose: 4g, Distilled water: 1 Liter Dissolve ingredients and sterilize by autoclaving for 15 min at 121°C. Adjust to pH 7.8 ± 0.1, using filter-sterilized 0.66 M sodium carbonate), Casein hydrolysate and yeast containing medium, CCY, *Bacillus* (Casein acid hydrolysate: 30g, Yeast extract: 4g, Dipotassium phosphate: 0.5 g, Dextrose: 2g, Suspend 36.5 grams in 1000 ml distilled water. Heat if necessary to ensure complete solution. Dispense and sterilize by autoclaving at 15 lbs pressure (121°C) for 15 minutes).
6. Sensient
7. Mac Farland
8. Neubauer

آلودگی) و مثبت (بیانگر قدرت رشد باکتری) نیز تهیه شد. محیط‌های کشت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به‌مدت ۲۴ ساعت (برای کلستریدیوم از جار بی‌هوازی و گازپک نوع A استفاده شد) گرمخانه‌گذاری شدند. سپس لوله‌های آزمایش از نظر رشد یا عدم رشد باکتری‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. به این ترتیب که اولین لوله‌ی آزمایش شفاف، بیانگر عدم رشد باکتری بود.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- نتایج حاصل از آزمایش اولیه تشخیص اثر ضد باکتریابی

نتایج بررسی تشکیل هاله عدم رشد نشان داد که در پتری‌دیش‌های حاوی باکتری اشرشیاکلی، در اطراف چاهک‌ها هاله‌ای مشاهده نمی‌شود. در حالیکه در مورد *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس* و *کلستریدیوم پرفرانجنز* این هاله‌ها به‌ترتیب با قطر ۱۳، ۱۲ و ۱۰ میلی مترکاملا مشخص است. این امر بیانگر این است که عصاره آناتو بر باکتری اشرشیاکلی (گرم منفی) بر خلاف سه باکتری دیگر (گرم مثبت) اثر بازدارنده ندارد. نتیجه به‌دست آمده با نتایج حاصل از آزمایش Galindo-Cuspinera و همکاران در سال ۲۰۰۳، که بیانگر اثر بازدارندگی عصاره آناتو (۲/۸ درصد نوربیکسین) بر باکتری های گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس* و *کلستریدیوم پرفرانجنز* به‌ترتیب با قطر هاله ۱۵-۱۶، ۹-۱۰ و ۱۲-۱۳ است مطابقت دارد [۱۴]. بر خلاف نتایج به‌دست آمده توسط Irobi و همکاران در سال ۱۹۹۶ در رابطه با اثر جزیی عصاره برگ‌های آناتو بر باکتریهای گرم منفی، عصاره آناتو مورد استفاده در این تحقیق، بر باکتریهای گرم منفی بی اثر است [۱۳].

۳-۲- نتایج حاصل از تعیین کمترین غلظت بازدارندگی (MIC)

با توجه به نتایج جدول ۱، در تعداد 10^8 از باکتری‌های مورد آزمایش، در حضور غلظت‌های مورد استفاده از آناتو تمام باکتری‌های مورد آزمایش رشد کردند. در نتیجه در حضور این تعداد باکتری، هیچ غلظتی به‌عنوان MIC شناخته نشد. در نتیجه سوسپانسیون باکتری‌ها به نسبت ۱ به ۱۰۰ رقیق شد تا به تعداد 10^6 باکتری در میلی‌لیتر رسید. در این میزان از تعداد باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس*، غلظت های ۰/۳ و ۰/۶ گرم در لیتر، آناتو قادر به پیشگیری از رشد نبوده و در نتیجه اولین لوله شفاف (عدم رشد)، یعنی غلظت ۱/۲ گرم در لیتر به‌عنوان MIC انتخاب شد. با کاهش تعداد باکتری‌ها به 10^4، غلظت ۰/۶ گرم در لیتر بازدارنده از رشد می‌شود (MIC) و در نهایت با رساندن تعداد باکتری‌ها به 10^2، غلظت ۰/۳ گرم در لیتر نیز خاصیت بازدارندگی را نشان می‌دهد. اما در مورد کلستریدیوم، در تعداد 10^6، 10^4 و 10^2 باکتری در میلی‌لیتر، به ترتیب غلظت‌های ۴/۸، ۱/۲ و ۰/۶ گرم در لیتر، به عنوان MIC شناخته شدند. با توجه به نتایج به دست آمده مشخص است که آلودگی اولیه از اهمیت خاصی برخوردار است. اگر میزان اولیه باکتریها بسیار بالا باشد مواد نگهدارنده و روش‌های نگهداری مؤثر واقع نمی‌شوند. در سال ۱۹۷۳ Christiansen و همکاران و نیز Labbe و Duncan در سال ۱۹۷۰ در آزمایش‌های خود به این نکته اشاره کرده‌اند [۲۱، ۲۲]. امروزه با اجرای طرح HACCP در بعضی از کارخانه‌های مواد غذایی این مشکل به‌مقدار زیادی حل شده‌است.

جدول ۱ کمترین غلظت بازدارنده از عصاره‌ی آناتو (نوربیکسین ۱ ٪) در تعداد مختلف باکتری‌های مورد مطالعه

نوع باکتری	میزان تلقیح (تعداد در میلی‌لیتر)	کمترین غلظت بازدارنده (گرم در لیتر)
استافیلوکوکوس اورئوس	10^8	–
	10^6	۱/۲
	10^4	۰/۶
	10^2	۰/۳
باسیلوس سرئوس	10^8	–
	10^6	۱/۲
	10^4	۰/۶
	10^2	۰/۳
کلستریدیوم پرفرانجنز	10^8	–
	10^6	۲/۴
	10^4	۱/۲
	10^2	۰/۶

همچنین نتایج جدول ۱، نشان می‌دهد که غلظت‌هایی از آناتو که بر باکتری‌های *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوس اورئوس* موثرند، بر *کلستریدیوم پرفرانجنز* تأثیر ندارند که این امر بیانگر مقاومت بیشتر این باکتری نسبت به باکتری‌های ذکر شده است. اما نتایج به دست آمده توسط Galindo-Cuspinera و همکاران در سال ۲۰۰۳، بیانگر مقاومت بیشتر باکتری *استافیلوکوس اورئوس* با MIC ۰/۱۶ درصد حجمی-حجمی نسبت به *باسیلوس سرئوس* و *کلستریدیوم پرفرانجنز* به‌ترتیب با MIC ۰/۸ و ۰/۳۱ درصد می‌باشد [۱۴].

۴- نتیجه‌گیری کلی

با توجه به مضرات افزودنی‌های سنتزی و افزایش درخواست استفاده از انواع طبیعی افزودنی‌ها و با در نظر گرفتن این نکته که آناتو به‌عنوان یک رنگدانه طبیعی در بیشتر فرآورده‌های غذایی کاربرد دارد، و علاوه بر ایجاد رنگ مطلوب دارای خواص ضد باکتریایی در مقابل بسیاری از باکتری‌های گرم مثبت موجود در غذاها می‌باشد، استفاده از آن به‌جای انواع سنتزی با کاربرد مشابه می‌تواند تا حدودی سلامت فرد و جامعه را تضمین نماید.

۵- منابع

[1] Sahari, M.A. and Shariatmadari, F. 2002. Anti-Nutrient Components Associated with Foods, Andishmand Press. pp: 208.

[2] Lamea, H. 1989. Technology of Food Additives. Azad University Center for Academic Publications. pp: 321.

[3] Irobi, O.N., Moo-Yong, M. and Anderson, W.A. 1996. Antimicrobial activity of annatto (*Bixa orellana*) extract. International Journal of Farmacognosy, 34, 87–90.

[4] Prabhakara Rao, P.G., Satyanarayana, A. and Rao, D.G. 2002. Effect of storage on the stability of water soluble annatto dye formulation in a simulated orange-RTS beverage model system. Lebensm. Wiss. U. Technol, 35, 617–621.

[5] Duke, J.A., Bogenschutz-Godwin, M.J. and du Cellier, J. 2003. CRC hand book of medicinal spices. Florida:CRC press, USA, pp. 44.

[6] Giuliano, G., Rosati, C. and Bramley, P.M. 2003. To dye or not to dye: biochemistry of annatto unveiled. Trends in Biotechnology, 21, 513–516.

[7] Satyarayana, A., Prabhakara Rao., P.G. and Rao, D.G. 2003. Chemistry, processing and toxicology of annatto (*Bixa orellana* L.). Journal of Food Science, 40(2), 131–141.

[8] Bautista, A.R.P.L., Moreira, E.L.T., Batista, M.S., Miranda, M.S. And Gomes, I.C.S. 2004. Sabacute toxicity assessment of annatto in rat. Food and Chemical Toxicology, 42, 625–629.

[9] Satyanarayana, A., Prabhakara Rao, P., Balaswamy, K., Velu, V. and Govardhana Rao, D. 2006. Application of annatto dye formulations in different fruit and vegetable products. Foodservice Research International, 17, 1.

[10] Paumgartten, F.J.R., De-Carvalho, R.R., Araujo, I.B., Pinto, F.M., Borges, O.O., Souza, C.A.M. and Kuriyama, S.N. 2002. Evaluation of the developmental toxicity of annatto in the rat. Food and Chemical Toxicology, 40, 1595–1601.

[11] Hagiwara, A., Imai, N., Ichihara, T., Sano, M., Tamano, S., Aoki, H., Yasuhara, K., Koda, T., Nakamura, M. and Shirai, T. 2003. A thirteen-week oral toxicity of annatto extract (norbixin), a natural food color extracted from the seed coat of annatto (*Bixa orellana* L.), in Sprague-Dawley rats. Food and Chemical Toxicology, 41, 1157–1164.

[12] Alves de Lima, R.O., Azevedo, L., Ribeiro, L.R. and Salvadori, D.M.F. 2003. Study on the mutagenicity and antimutagenicity of a natural food colour (annatto) in mouse bone marrow cells. Food and Chemical Toxicology, 41, 189–192.

[13] Huhtanen, C.N. 1980. Inhibition of *clostridium botulinum* by spice extracts and aliphatic alchols. Journal of Food Protection, 43(3), 195–196.

[14] Galindo-Cuspinera, V., Westhoff, D.C. and Rankin, S.A. 2003. Antimicrobial properties of commertial annatto extract against selected pathogenic lactic acid and spoilage microorganisms. Journal of Food Protection, 66, 1074–1078.

[15] Kohsari, H., Ghaemi, A. Sadegh Sheshpali, M., Fadavi, A., Dadgar, T., Kiaei, V. and Sadegh, A. 2008. Investigation of effect of

black pepper and cinnamon against nine species of food pathogenic bacteria. *18th National Congress of Food Technology,* Mashhad- Iran.

[16] Abere, T.A., Onyekweli, A.O. and Ukoh, G.C. 2007. *In vitro* Antimicrobial Activity of the Extract of *Mitracarpus scaber* Leaves Formulated as Syrup. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 6, 679–682.

[17] Igbinosa, O.O., Igbinosa, E. O. and Aiyegoro, O. A. 2009. Antimicrobial activity and phytochemical screening of stem bark extracts from *Jatropha curcas* (Linn). African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 3(2), 058–062.

[18] Vijaya Baskara Sethubathi, G.and Ashok Prabu, V. 2010. Antibacterial activity of cyanobacterial species from adirampattinam coast, southeast coast of palk bay. Current Research Journal of Biological Sciences, 2(1), 24-26.

[19] Baron, E.J. and Finegold, S. M. 1990. Diagnostic microbiology. Eighth edition, pp. 859.

[20] Zarringhalami, S., Sahari, M.A. and Sattari, M. 2008. Antimicrobial and preservative activities of commercial annatto extract (norbixin) in chemical defined medium and sausage, Green Farming, 1(9), 18–20.

[21] Christiansen, L.N., Johnston, R.W., Kautter, D.A., Howard, Y.W. and Aunan, W.J. 1973. Effect of nitrite and nitrate on toxin production by *clostridium botulinum* and on nitrosamine formation in perishable canned commintuted cured meat. Applied Microbiology, 25(3), 357–362.

[22] Labbe, R.G. and Duncan, C.L. 1970. Growth from spore of *Clostridium perfringens* in the presence of sodium nitrite. Applied Microbiology, 19, 353–359.

Evaluation of antibacterial effect of annatto (norbixin) against several pathogenic bacteria

Sahari, M. A. [1 *], Zarringhalami, S. [2], Sattari, M. [3]

1-Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University
2- Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Zanjan University
3- Department of Bacteriology, Faculty of Medical Science, Tarbiat Modares University
(Received: 88/2/12 Accepted: 88/8/23)

Using well method and Macrodilution technique, the effect of annatto extract (norbixin 1%) on growth ability and spore germination of several pathogenic bacteria (*Staphylococcus aureus, Bacillus sereus, Clostridium perfringens and Escherchia coli*) was investigated. According to the results emerged from inhibition zone diameter evaluation, the annatto extract showed inhibitory effect on *S. aureus, B. sereus* and *C. perfringens* (with 13, 12 and 10 mm inhibition zone diameter, respectively), but it was inactive against *Ecoli.* The outcome of Macrodilution technique indicated that the minimum inhibitory concentrations in 10^6, 10^4 and 10^2 cfu/ml of *S. aureus* and *B. sereus* are 1.2, 0.6 and 0.3 g/l of the annatto extract. The concentration values, however, are 2.4, 1.2 and 0.6 g/l at the same cfu/ml of *C. perfringens*. In addition, the abovementioned concentration values of annatto were capable of inhibiting spore germination of *B. sereus* and *C. perfringens*. As an overall result, annatto can be used as a natural antibacterial food additive in many food products.

Key words: Annatto, Norbixin, Pathogenic bacteria, Additive, Preservative

* Corresponding Author E-Mail address: sahari@modares.ac.ir