



تأثیر اسانس گیاه آویشن شیرازی در فیله ماهی سوف به منظور مهار رشد باکتری *آئروموناس هیدروفیلا*

مهران مقیاسی^۱، احمد قره خانی^{۲*}، امیر توکمه‌چی^۳

۱- کارشناسی ارشد صنایع غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد ماکو، دانشگاه آزاد اسلامی، ماکو، ایران

۲- دکترای تخصصی بهداشت و بیماری‌های آبزیان، استادیار، گروه دامپزشکی، واحد ماکو، دانشگاه آزاد اسلامی، ماکو، ایران

۳- دکترای تخصصی میکروبیولوژی، دانشیار، گروه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

تاریخ‌های مقاله:

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۶/۰۵

تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۷/۲۰

کلمات کلیدی:

گیاه آویشن شیرازی،

آئروموناس هیدروفیلا،

اثرات ضد باکتریایی،

اسانس،

فیله ماهی سوف.

DOI: 10.29252/fsct.18.01.06

* مسئول مکاتبات:

a.gharekhani@yahoo.com

استفاده از ترکیبات طبیعی با اثرات ضد باکتریایی می‌تواند مصرف مواد شیمیایی را به منظور مهار رشد عوامل بیماری‌زا به حداقل برساند. هدف از مطالعه حاضر بررسی تأثیر ضد باکتریایی اسانس آویشن شیرازی علیه باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* در شرایط آزمایشگاهی و استفاده از آن به عنوان پوشش خوراکی در فیله ماهی سوف به منظور افزایش زمان ماندگاری در یخچال بود. پس از جمع آوری و تهیه اسانس گیاه آویشن شیرازی با روش کلونجر ابتدا در شرایط آزمایشگاهی اثرات ضد باکتریایی اسانس علیه *آئروموناس هیدروفیلا* به روش میکروبراث دایلوژن برای تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی و حداقل غلظت کشندگی بررسی شد. در نهایت، پس از تعیین ترکیبات شیمیایی اسانس با روش کروماتوگرافی گازی مجهز به طیف سنج اثرات پوششی و حسی اسانس در پنج سطح ۰/۰۱، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵ و ۱ درصد در فیله ماهی سوف مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که حداقل غلظت مهار کنندگی و حداقل غلظت کشندگی اسانس آویشن شیرازی علیه *آئروموناس هیدروفیلا* به ترتیب ۲۵۰ و ۱۲۵ میکروگرم در میلی لیتر می‌باشد. همچنین نتایج نشان داد که استفاده از دو سطح ۰/۱ و ۰/۵ درصد از اسانس می‌تواند به طور معنی داری سبب افزایش زمان ماندگاری فیله ماهی سوف شود. همچنین ویژگی‌های حسی فیله در سطح ۰/۵ به طور مناسبی به دست می‌آید. بر اساس نتایج بدست آمده می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از اسانس گیاه آویشن شیرازی به عنوان پوشش در فیله ماهی سوف از طریق مهار رشد باکتری‌های مولد فساد سبب افزایش ماندگاری و کاهش تراکم باکتری طی نگهداری در شرایط یخچال می‌گردد.

۱- مقدمه

در حال حاضر خواص درمانی عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی در برابر بیماری‌های عفونی [۱ و ۲] و غیر عفونی [۳ و ۴] از زمان‌های قدیم شناخته شده است و مطالعات زیادی در زمینه گونه‌های مختلف گیاهی و تاثیر اسانس یا عصاره‌های آن‌ها بر میکروارگانیسم‌ها انجام شده است. خواص ضد باکتریایی اسانس‌های گیاهان مختلف نیز ثابت شده است [۵]. تاثیر کشندگی یا بازدارندگی اسانس‌ها بیشتر در باکتری‌ها و مخمرها گزارش شده است. البته قارچ‌ها نیز از اثرات ضد میکروبی اسانس‌های گیاهی مصون نمانده‌اند [۶].

گیاه آویشن گیاهی است علفی، دارای شاخه‌های زیاد و چوبی تا ارتفاع ۳۰ سانتی متر که در نواحی کوهستانی در بین تخته سنگ و به ویژه در کشورهای اروپایی می‌روید. ساقه‌های آویشن پوشیده از کرک و برگ‌های کوچک زیادی است. برگ‌های آن کوچک، لوزی شکل، نوک تیز و به صورت متقابل، بر روی ساقه قرار دارند. این گیاه از جنس *Zataria* از خانواده نعنائیان (*Lamiceae*) است و در ایران با یک گونه درختچه‌ای به نام آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) شناخته می‌شود. همچنین گیاهی است کوهستانی با گل‌های آبی خوش رنگ که در مناطق مرتفع کوهستانی می‌روید و دارای عطر بسیار خوبی است. بررسی‌های متعدد به اثرات این گیاه به عنوان ضد کاندیدا، ضد درد و التهاب، درمان و کنترل کننده آفت‌های عود کننده دهانی، اثرات آنتی اکسیدان و اثر بر اختلالات گوارشی و قلبی آن اشاره کرده‌اند. همچنین پژوهش‌های انجام یافته نشان می‌دهد که این گیاه دارای اثرات ضد باکتری، ضد ویروس و ضد انگل است [۷]. *Rahnama* و همکاران (۲۰۰۹) اثرات ضد میکروبی اسانس آویشن شیرازی و ناپسین را به‌تنهایی و ترکیبی با یکدیگر بر علیه لیستریا منوسایتوزنز در آبگوشت قلب و مغز بررسی کردند و نشان دادند که اسانس این گیاه دارای اثرات بازندرجی بر این باکتری است و این اثرات به وضوح در همراهی با ناپسین افزایش یافته است [۸]. *Sharififar* و همکاران (۲۰۰۷) نیز گزارش کردند که اسانس و عصاره متانولی آویشن شیرازی دارای خاصیت آنتی اکسیدانی و فعالیت ضد باکتریایی است [۹].

باکتری‌های خانواده *آئروموناس* باسیل‌های گرم منفی آب شیرین بوده که اشکال متحرک آن‌ها می‌توانند میکروفلور

جانوران آبی باشند و در جانوران خونسرد، خونگرم و حتی انسان ایجاد بیماری بکنند [۱۰]. سوش‌های مولد سم این باکتری، یک پلی پپتید با وزن مولکولی ۵۲ کیلو دالتون تولید می‌کنند که دارای فعالیت آنتروتوکسیک، سیتوتوکسیک و همولیتیک می‌باشد. گونه‌های بیماری‌زا تولید توکسین و همولیزین‌های متعدد می‌کنند که در بیماری‌زایی انسان نقش دارند. از جمله سمومی که تولید می‌کنند می‌توان به آنتروتوکسین مشابه *Liabile Toxine* و سیتوتوکسین مشابه توکسین شیگلا در شیگلا دیسانتریه اشاره کرد. دو همولیزین آلفا و بتا نیز تولید می‌کنند که برای حیوانات آزمایشگاهی کشنده هستند. یکی از فاکتورهای بیماری‌زای شناخته شده ژن آئرولیزین بوده و پروتئینی کد می‌کند که دارای خاصیت سیتوتوکسیستی، قابلیت ایجاد آپوپتوز در سلول، ایجاد لیز گلبول قرمز و قابلیت ایجاد منافذی به اندازه ۰/۷ نانومتر می‌باشد [۱۱].

هدف از مطالعه حاضر مهار رشد باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* با استفاده از اسانس گیاه آویشن شیرازی در شرایط آزمایشگاهی، به تاخیر انداختن فساد گوشت ماهی سوف نگهداری شده در دمای ۴ درجه سانتی گراد با استفاده از اسانس این گیاه و ایجاد طعم و بوی مطلوب در فیله ماهی سوف بود.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- تهیه اسانس آویشن شیرازی و تعیین

ترکیب شیمیایی آن

در این مطالعه ابتدا گیاه تازه آویشن شیرازی از کوه‌های مشرف به شهر ارومیه (توسط عطاری بومی) جمع‌آوری گردید. سپس اجازه داده شد تا بخش هوایی گیاه در زیر سایه و دمای اتاق به دور از هر گونه جریان باد خشک گردد. در نهایت با استفاده از دستگاه کلونجر اسانس گیری مطابق زیر انجام گرفت:

به طور خلاصه، ۱۰۰ گرم از پودر خشک شده بخش هوایی گیاه آویشن شیرازی در دستگاه کلونجر قرار داده شد. پس از گذشت زمان شش ساعت اسانس جدا شده و توسط نرمال-هگزان اسانس را از آب جدا کرده و با استفاده از سولفات سدیم آبگیری شد. سپس اسانس آب گیری شده تا زمان استفاده در ظرف سربسته و دمای ۴ درجه سانتی گراد

۲-۳- بررسی خاصیت ضد باکتریایی اسانس

آویشن شیرازی علیه *آئروموناس هیدروفیلا*

به کمک روش میکروبراث دایلوژن میزان حداقل غلظت مهاری (MIC) اسانس گیاه آویشن شیرازی علیه باکتری تعیین گردید. به طور خلاصه، رقت‌های متوالی بر مبنای دو از اسانس گیاه آویشن شیرازی (وزنی-حجمی) در میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ته گرد (از ۳۱/۲۵ تا ۳۲۰۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر) حاوی محیط آبگوشت مولر هیتون بدون کاتیون (مرک، آلمان) تهیه شد. به طور مشابه رقت‌هایی نیز از تتراسیکین در محیط کشت آبگوشت مولر هیتون بدون کاتیون به عنوان شاهد آنتی‌بیوتیکی تهیه شد. لازم به ذکر است تا این مرحله حجم نهایی گوده‌ها برابر ۱۸۰ میکرولیتر تنظیم شد. در مرحله‌ی آخر ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری معادل نیم استاندارد مک فارلند ($10^8 \times 2 - 1$ CFU/ml) به همدی گوده‌ها افزوده شد، همچنین در هر ریف یک گوده برای کنترل محیط کشت و یک گوده نیز برای کنترل رشد باکتری اختصاص داده شد. پس از افزودن باکتری میکروپلیت در دمای ۳۷ به مدت ۲۴ ساعت و شرایط هوازی انکوبه شد. جهت آماده سازی سوسپانسیون باکتریایی ۲۴ ساعت قبل از تهیه رقت‌های مذکور کشت *آئروموناس هیدروفیلا* در محیط آبگوشت TSA با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و شرایط هوازی به مدت ۲۴ ساعت انجام گرفت. پس از این مدت کشت فوق با ۲۵۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ و رسوب حاصل دو مرتبه در سرم فیزیولوژی استریل شستشو و در نهایت سوسپانسیون شده و تراکم آن جهت افزودن به گوده‌ها معادل نیم استاندارد مک فارلند تنظیم شد (مقدار نهایی باکتری که به هر گوده تلقیح شد برابر با 10^8 CFU/Well بود). طبق تعریف حداقل غلظت مهارکنندگی (بازدارندگی) رشد عبارتست از آخرین گوده‌ای که از رشد باکتری ممانعت کرده باشد.

حداقل غلظت کشندگی اسانس آویشن شیرازی بر اساس نتایج بدست آمده از حداقل غلظت بازدارندگی از رشد تعیین شد. برای این منظور ۵ میکرولیتر از چاهک‌هایی که رشد باکتری در آن‌ها به طور کامل متوقف شده بود، به پلیت‌های حاوی محیط کشت مولر هیتون آگار منتقل شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و شرایط هوازی

نگهداری شد. لازم به ذکر است در پایان کار با دانستن وزن ماده خشک گیاه و وزن اسانس، از طریق تناسب بازده اسانس به صورت درصد مشخص گردید.

برای تعیین ترکیب شیمیایی اسانس گیاه آویشن شیرازی از کروماتوگرافی گازی (ترموفینیکان، آمریکا) مجهز به طیف نگار جرمی (GC-Mass) استفاده شد. در این دستگاه ستون موئینه بکار رفته از جنس سیلیکای گداخته به قطر داخلی ۰/۲۵ میلی متر و طول ۳۰ سانتی متر بود. برنامه حرارتی ستون شامل دمای اولیه ۱۰۰ درجه سانتی گراد، دمای نهایی ۲۸۰ درجه سانتی گراد و سرعت افزایش دما ۲۰ درجه سانتی گراد در هر دقیقه تنظیم گردید. دمای محفظه تزریق و ترانسفر لاین به ترتیب ۲۶۰ و ۲۵۰ درجه سانتی گراد بود. همچنین از گاز هلیوم با سرعت یک میلی لیتر در دقیقه و حجم تزریق یک میلی لیتر به عنوان حامل استفاده شد.

سیستم تله یونی مورد استفاده در طیف سنج دارای انرژی یونیزاسیون ۸۰ الکترون ولت بود. شاخص بازدارندگی هر پیک (ترکیب) با زمان بازدارندگی هیدروکربن‌های نرمال (C_۸-C_{۴۰}) تزریق شده در شرایط یکسان با تزریق اسانس گیاه آویشن شیرازی، مقایسه و محاسبه شد. در نهایت همه ترکیبات بر اساس مقایسه طیف MS و شاخص بازدارندگی آن‌ها نسبت به مقادیری که در منابع مختلف منتشر شده است (مانند NIST، Wiley و طیف‌های جرمی استاندارد) شناسایی شدند. همچنین محاسبه کمی ترکیبات موجود در اسانس گیاه آویشن شیرازی (تعیین درصد هر ترکیب) به کمک داده پرداز Xcalibur (ترموفینیکان، آمریکا) به روش نرمال کردن سطح و نادیده گرفتن ضرایب پاسخ مربوط به طیف‌ها انجام شد [۱۲].

۲-۲- تهیه باکتری و کشت آن

باکتری مورد استفاده در این بررسی *آئروموناس هیدروفیلا* بود که به صورت ویال لیوفیلیزه از پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه، دانشگاه ارومیه (ATCC¹ 7966) تهیه گردید. ابتدا در زیر هود و در شرایط کاملاً استریل پودر ویال لیوفیلیزه باکتری در ۲۰ میلی لیتر محیط کشت آبگوشت TSB کشت داده شده و در شرایط هوازی، دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری گردید.

1. American Type Culture Collection

۲-۶- ارزیابی حسی

جهت انجام ارزیابی حسی فیله‌های ماهی سوف در طول دوره نگهداری از روش قاضی زاده و رزاقی [۱۷] استفاده شد. بدین منظور از یک گروه پنل ۷ نفره استفاده گردید. ارزیابی حسی در مورد رنگ، طعم، سفتی و پذیرش کلی انجام شد. نمونه‌های فیله تازه ماهی در ۲۰- ذخیره و در زمان انجام ارزیابی حسی به عنوان معیار بالاترین امتیاز در نظر گرفته شد. ارزیابی حسی تحت شرایط مشابه نور و دمایی انجام گرفت. جهت امتیازدهی از یک مقیاس ۰ تا ۱۰ استفاده شد به نحوی که ۱۰ بیشترین امتیاز و ۰ کمترین امتیاز را داشت محصول با امتیاز کمتر از ۶ به عنوان محصول غیرقابل پذیرش تعریف گردید.

۲-۷- تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یک-طرفه^۱ (ANOVA؛ نرم افزار SPSS نسخه ۱۹) و آزمون توکی^۲ (آزمون اختلاف حقیقی که به طور مخفف HSD نامیده می‌شود) استفاده گردید. قبل از مقایسه میانگین تیمارها نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف بررسی شد. داده‌های به دست آمده به صورت $\text{Mean} \pm \text{SD}$ بیان شدند. در تمام بررسی‌ها سطح معنی‌دار آزمون‌ها $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- نتایج آنالیز شیمیایی اسانس آویشن

شیرازی

محاسبه انجام گرفته نشان داد که بازده اسانس نسبت به وزن خشک با میانگین سه مرتبه اسانس گیری برابر با ۱/۸۴ درصد بود. همچنین آنالیز شیمیایی اسانس که با روش کروماتوگرافی گازی مجهز به طیف سنج انجام گرفت به طور تقریبی ۲۱ ترکیب مختلف را در اسانس گیاه آویشن شیرازی نشان داد (جدول ۱). بر اساس یافته‌های بدست آمده از آنالیز شیمیایی اسانس گیاه آویشن شیرازی تیمول بیشترین ماده تشکیل دهنده اسانس گیاه آویشن شیرازی بوده که ۴۰/۲۲ درصد آن را به خود اختصاص می‌دهد.

گرمخانه گذاری شدند. حداقل غلظت کشندگی عبارتست از کمترین غلظتی از نمونه که سبب کاهش ۹۹/۹ درصد از باکتری‌های تلقیح شده به گوده‌ها گردد [۱۳ و ۱۴].

۲-۴- پوشش دادن فیله ماهی سوف با اسانس

آویشن شیرازی

ماهی مورد نیاز به صورت تازه از دریاچه سد ارس تهیه شده و بلافاصله همراه یخ به محل آزمایشگاه فرآوری شیلات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی منتقل گردید. پس از وزن کردن ماهی سر و باله‌ها جدا و شکم ماهی خالی و ماهی‌ها به شکل پروانه ای فیله شد. به منظور افزودن اسانس به فیله، ابتدا اسانس با غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵ و ۱ درصد (وزن اسانس به وزن فیله) به آب مقطر استریل افزوده شده و در نهایت فیله‌های مورد نظر در آن غوطه ور شدند. برای بسته بندی در خلأ، فیله‌های اسانس گذاری شده در کیسه‌های پلاستیکی مخصوص وکیوم قرار داده شده و سپس با استفاده از دستگاه بسته بندی وکیوم (هنکلمن، هلند)، بسته بندی شدند. پس از اتمام اسانس گذاری و بسته بندی در خلأ فیله‌ها، همه نمونه‌ها شامل اسانس گذاری شده و بدون اسانس به عنوان شاهد) به یخچال با دمای ۴ درجه سانتی گراد منتقل شدند [۱۵].

۲-۵- تعیین بار میکروبی

تعیین بار میکروبی بر طبق روش بواری (۲۰۰۸) صورت گرفت [۱۶] بدین منظور ۱۰ گرم نمونه با ۹۰ میلی لیتر آب مقطر به کیسه استریل استومیکر منتقل شده و توسط دستگاه استومیکر (استومیکر ۴۰۰ ساخت شرکت Seward انگلیس) به صورت هموژن درآمده سپس نمونه تا رقت 10^{-5} گرم در میلی لیتر رقیق شدند. ۱ میلی لیتر از هر رقت در پلیت قرار داده شده و ۱۵ میلی لیتر از محیط کشت TSA (Tryptic Soy Agar) به آن افزوده شده و هر پلیت به منظور توزیع همگن نمونه به دقت تکان داده شد. بعد از چند دقیقه همه پلیت ها وارونه شده و در انکوباتور به مدت ۴۸ ساعت با دمای ۴ درجه قرار داده شدند. بعد از ۴۸ تا ۹۶ ساعت کلنی‌های ظاهر شده شمارش شدند.

1. One-Way Analysis of Variance

2. Tukey's test

همکاران [۱۶] از گونه، *Thymus lancifolious* برای تهیه اسانس استفاده شد در حالیکه در مطالعه حاضر از گونه *Zataria multiflora* برای تهیه اسانس استفاده گردید. دلیل دوم وجود اختلاف می‌تواند به عوامل دیگری از قبیل فصل برداشت، شرایط آب و هوایی، منطقه جغرافیایی رویش، قسمت‌های مختلف گیاه، روش و مدت زمان استخراج اسانس مربوط باشد.

صرف نظر از نوع و میزان اجزاء تشکیل دهنده اسانس نتایج این تحقیق ثابت نمود که اسانس آویشن شیرازی قادر است رشد باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* را در شرایط آزمایشگاهی مهار نماید. یافته‌ها ثابت نمودند که حداقل غلظت مهاری اسانس آویشن شیرازی علیه باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* برابر با ۲۵۰ میکروگرم در میلی لیتر بوده و حداقل غلظت کشندگی آن نیز برابر با ۱۲۵ میکروگرم در میلی لیتر می‌باشد. در مطالعه‌ای که توسط Alishahi و همکاران [۱۸] انجام گرفت حداقل غلظت مهاری و حداقل غلظت کشندگی اسانس آویشن شیرازی علیه *آئروموناس هیدروفیلا* ۲۵۰ میکروگرم در میلی لیتر گزارش شد که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد. بررسی منابع علمی نشان می‌دهد که از نظر مولکولی تیمول و کارواکول سبب اختلال در عملکرد غشاء سیتوپلاسمی باکتری‌ها شده و متعاقب آن ترکیبات سیتوپلاسمی از سلول خارج و مقدمات مرگ باکتری را مهیا می‌سازند.

۲-۳- نتایج حداقل غلظت مهار کنندگی و

حداقل غلظت کشندگی آویشن شیرازی

جهت محاسبه MIC و MBC اسانس گیاه آویشن شیرازی از روش میکروبراث دایلوژن استفاده شد. بر اساس نتایج بدست آمده حداقل غلظت مهار کنندگی اسانس گیاه آویشن شیرازی علیه باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* برابر با ۲۵۰ میکروگرم در میلی لیتر بود. همچنین حداقل غلظت کشندگی اسانس گیاه آویشن شیرازی علیه باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* برابر با ۱۲۵ میکروگرم در میلی لیتر تعیین گردید. لازم به ذکر است که از داروی تتراسیکلین به عنوان استاندارد استفاده شد که MIC و MBC آن علیه *آئروموناس هیدروفیلا* به ترتیب برابر با ۶۲/۵ و ۳۱/۲۵ میکروگرم در میلی لیتر اندازه گیری شد (جدول ۲).

اسانس حاصل از گیاه آویشن شیرازی دارای فعالیت ضد میکروبی علیه طیف وسیعی از باکتری‌ها و قارچ‌ها در مقایسه با داروهای استاندارد می‌باشد. اثر ضد میکروبی برخی از اجزای

Table 1 Chemical composition of *Zataria multiflora* essential oil eith GC⁴ mass spectrophotometry.

	Chemical composition	percentage
1	Thymol	40.22
2	Carvacrol	37.65
3	Para Cymene	8.9
4	Carvacrol Methylether	2.04
5	Linalool	1.76
6	Beta-Caryophyllene	1.59
78	Caryophyllene Oxide	1.22
9	Alpha-Pinene	1.06
10	3-Octanone	0.96
11	1,8-Cineole	0.82
12	Terpinen-4-ol	0.79
13	Alpha-Terpineol	0.72
14	Thymol Methylether	0.64
15	Thymol Acetate	0.6
16	Carvacrol Acetate	0.58
17	Aromadendrene	0.46
18	Ledene	0.33
19	Dodecanoic Acid	0.21
20	Myrcene	0.09
21	3-Octanol	0.05
22	Alpha-Humulene	0.03

تجزیه شیمیایی اسانس گیاه آویشن شیرازی مورد مطالعه با روش کروماتوگرافی گازی مجهز به طیف نگار جرمی نشان داد که بیشترین ترکیبات تشکیل دهنده آن شامل تیمول (۴۰/۲۲ درصد) و کارواکول (۳۷/۶۵) می‌باشد. در مطالعه‌ای که توسط کرمی و همکاران [۱۶] بر روی اسانس گیاه آویشن شیرازی انجام گرفت به ترتیب بیشترین ترکیبات اسانس را تیمول (۱۶/۴۳ درصد) و کارواکول (۵۲/۳۴ درصد) گزارش نمودند. اگرچه نتایج این محققان با مطالعه حاضر از نظر وجود تیمول و کارواکول به عنوان بالاترین اجزاء تشکیل دهنده اسانس همخوانی دارد، اما درصدهای این دو ترکیب در مطالعه حاضر با مطالعه قبلی اختلاف دارد. در توجیه این مسئله لازم است به چند نکته اشاره نمود، اول اینکه در مطالعه Karami و

4. Gas chromatography

مورد استفاده در این مطالعه تیمول بوده که اثرات ضد میکروبی آن در مطالعات زیادی گزارش شده است [۱۹ و ۲۰].

اسانس آویشن شیرازی در مطالعات مختلف گزارش شده است. بالاترین ترکیب موجود در اسانس گیاه آویشن شیرازی

Table 2 Minimal inhibition concentration (MIC) and minimal bacteriocidal concentration (MBC) of *Zataria multiflora* essential oil against *Aeromonas hydrophila*.

Concentration (microgram/ml)											substance
31.25	62.5	125	250	500	1000	2000	4000	8000	16000	32000	Esence
+	+	MIC	MBC	-	-	-	-	-	-	-	Tetracyclin
MIC	MBC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

+ bacterial grwth

- no bacterial

ولی در پایان روز دهم کلنی‌های قابل شمارش از فیله هر دو تیمار گزارش گردید که به طور معنی داری نسبت به تیمار شاهد در پایان روز دهم کم بودند. در تیمار ۱ درصد نیز به طور معنی داری در سطح $P < 0.05$ تا پایان مطالعه هیچگونه باکتری از فیله ماهی سوف جدا نشد. همانطور که نمودار ۱ نشان می‌دهد کمترین و بیشترین تاثیر اسانس بر شمارش باکتری‌های قابل رشد فیله ماهی سوف ترتیب مربوط به تیمار شاهد و ۱ درصد اسانس گیاه آویشن شیرازی می‌باشد.

در بررسی حاضر نتایج به دست آمده نشان داد که اسانس گیاه آویشن شیرازی زمانی که به صورت پوشش در فیله ماهی سوف بکار رود میزان ماندگاری آن را افزایش می‌دهد. مقایسه فیله ماهی سوف بدون پوشش (شاهد) با تیمارهایی که توسط غلظتهای مختلف اسانس گیاه آویشن شیرازی پوشش دار شده بودند مشخص گردید که آهنگ رشد باکتری‌های عامل فساد در فیله ماهی سوف (پوشش داده شده) کند شده و در برخی از تیمارهای مانند تیمار ۱ درصد در پایان مطالعه هیچ گونه باکتری از فیله ماهی سوف جدا نشد (جدول ۳). به طور مشخص با افزایش غلظت‌های اسانس گیاه آویشن شیرازی میزان بقاء فیله ماهی سوف افزایش یافته که دلیل آن در ارتباط با اثرات ضد باکتریایی ترکیبات اسانس می‌باشد. البته لازم به ذکر است گاهی اوقات اسانس‌های گیاهی قادر به مهار رشد عوامل فساد در مواد غذایی نیستند. به طور کلی رشد و بقای باکتری‌ها در مواد غذایی به عوامل متعدد بیرونی مانند فلور باکتریایی، درجه حرارت، افزودنی‌هایی که در طی مراحل تهیه مواد غذایی استفاده می‌شوند و نیز عوامل داخلی ترکیبات مواد غذایی، بستگی دارد [۲۱]. همچنین ثابت شده است که برخی از اجزاء غذا می‌توانند بر ترکیبات ضد باکتریایی اسانس‌ها اثرات بازدارنده داشته باشند، مثل تیمول و کارواکرول [۲۲، ۲۳ و ۲۴].

۳-۳- نتایج اثرات ضد باکتریایی اسانس آویشن شیرازی

یافته‌های مربوط به بررسی اثرات ضد باکتریایی اسانس گیاه آویشن شیرازی در جدول ۳ و نمودار ۱ آورده شده است. نتایج نشان داد که با گذشت زمان مطالعه به تدریج بر تعداد کل باکتری‌های فیله ماهی سوف در نمونه شاهد افزوده شده اما در پایان روز هفتم و پس از آن تا روز دهم کاهش نشان داد (شکل ۱).

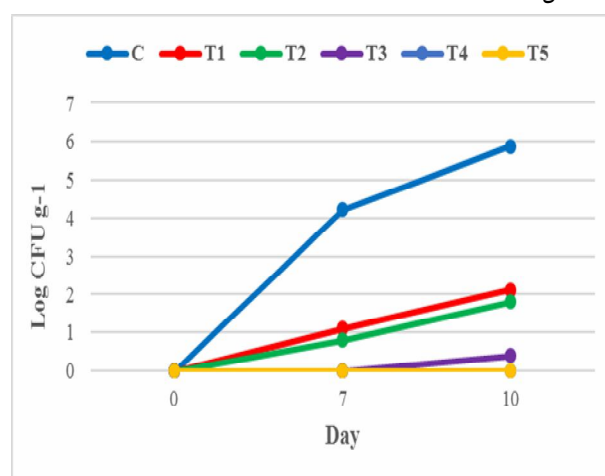


Fig 1 Bacterial count changes between diferent groups during 10 days.

مقایسه تیمارهای ۰/۰۱، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵ و ۱ درصد از اسانس گیاه آویشن شیرازی نشان داد که در پایان روز هفتم به آرامی بر تعداد باکتری‌های کل تیمارهای ۰/۰ و ۰/۰۵ درصد افزوده شده و این روند افزایشی تا پایان روز دهم ادامه داشت اما به میزان باکتری‌های کل تیمار شاهد نرسید اگرچه با آن اختلاف آماری معنی دار در سطح $P < 0.05$ نداشت. بر عکس در تیمارهای ۰/۱ و ۰/۵ در پایان روز هفتم هیچگونه باکتری قابل شمارشی از فیله ماهی سوف بر روی محیط کشت رشد نکرد

درصد از شاهد بیشتر بود ولی اختلاف آماری معنی داری مشخص نشد (شکل ۳).

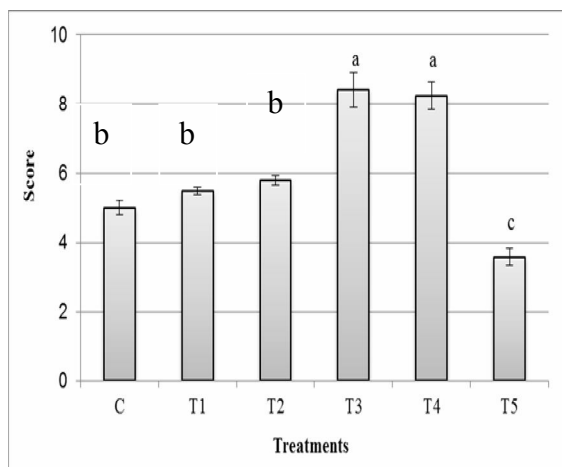


Fig 3 Effects of perca fillet coating with different concentrations of *Zataria multiflora* essential oil on taste. Different letters indicate significant differences between columns.

ارزیابی حسی انجام گرفته در مورد سفتی نشان داد که تفاوت آماری معنی داری بین غلظت‌های مختلف اسانس گیاه آویشن با شاهد وجود ندارد (شکل ۴). در مورد پذیرش کلی نیز نتایج ثابت کرد که از دیدگاه گروه پنل دو تیمار ۰/۱ و ۰/۵ درصد از اسانس آویشن شیرازی دارای بیشترین امتیاز بوده و با تیمار شاهد تفاوت آماری معنی داری دارند (شکل ۵).

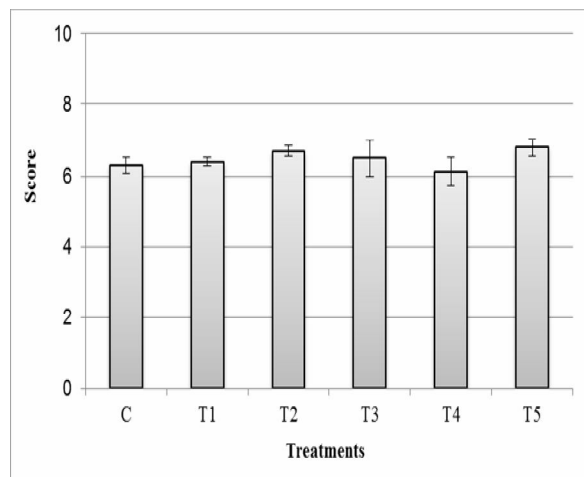


Fig 4 Effects of perca fillet coating with different concentrations of *Zataria multiflora* essential oil on hardness.

بر این اساس نتایج تحقیق حاضر نشان داد که پوشش دار نمودن فیله ماهی سوف با غلظت‌های مختلف اسانس گیاه آویشن شیرازی به طور معنی داری سبب بهبود طعم و پذیرش کلی از دیدگاه ارزیاب‌ها می‌شود. بررسی‌های علمی نشان می‌دهد که برخی از ترکیبات غذا نظیر نشاسته مواد معطر را در

Table 3 Comparison of groups mean whit tukey's test.

Treatment	Total Bacterial Count (CFU/gr)		
	Day		
	0	7	10
C	nd	4.23 ± 0.17^b	5.88 ± 0.2^c
T1	nd	$>50^*$	0.32 ± 0.1^c
T2	nd	>20	0.12 ± 0.13^c
T3	nd	nd	Nd
T4	nd	nd	Nd
T5	nd	nd	Nd

Data were showed based on $X \pm SD$.

* Coloni numbers are less than 50 and showed without log calculation.

Different letters in columns indicate significant differences at the level of $p < 0.05$.

nd: no bacterial growth were seen.

۳-۴- نتایج ارزیابی حسی فیله ماهی سوف

ارزیابی حسی فیله ماهی سوف پوشش داده شده با اسانس گیاه آویشن شیرازی در مورد رنگ، طعم، سفتی و پذیرش کلی با گروه پنل هفت نفره آموزش ندیده انجام شد. از نظر رنگ همه تیمارها امتیاز بالایی داشتند و تفاوت معنی داری با گروه شاهد نشان ندادند (شکل ۲).

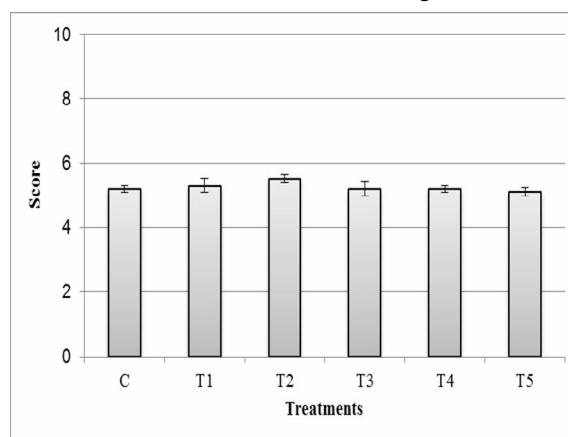


Fig 2 Effects of perca fillet coating with different concentrations of *Zataria multiflora* essential oil on color.

استفاده از اسانس گیاه آویشن شیرازی برای پوشش دهی فیله ماهی سوف همراه است با تغییر ویژگی‌های حسی، بر این اساس استفاده از طعم دهنده‌ها برای بهبود طعم در محصولات شیلاتی توصیه می‌شود. در تحقیق حاضر بیشترین امتیاز ویژگی حسی طعم مربوط بود به دو تیمار ۰/۱ و ۰/۵ درصد که با شاهد تفاوت معنی داری داشتند. کمترین امتیاز طعم نیز مربوط به تیمار ۱ درصد بود که با سایر تیمارها تفاوت معنی داری داشت. لازم به توضیح است که امتیاز دو تیمار ۰/۱ و ۰/۵

۵- منابع

- [1] Ciani, M., Menghini, L., Mariani, F., Paggiotti, R., Menghini, A., Faticenti, F. 2000. Antimicrobial properties of essential oil of *Satureja montana* L. on pathogenic and spoilage yeasts. *Biotechnology*, 3(2), 149-155.
- [2] Arrieta, J., Reyes, B., Calzada, F., Cedillo-Rivera, R., Navarrete, A. 2001. Amoebicidal and giardicidal compounds from the leaves of *Zanthoxylum liebmannianum*. *Fitoterapia*, 72(3) 295-297.
- [3] Ngo, B.E., Schmutz, M., Meyer, C., Rakotonirina, A., Bopelet, M., Portet, C., Jeker, A., Rakotonirina, S.V., Olpe, H.R., Herrling, P. 2001. Anticonvulsant properties of the methanolic extract of *Cyperus articulatus* (Cyperaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 76(2), 145-150.
- [4] Vikrant, V., Grover, J.K., Tandon, N., Rathi, S.S., Gupta, N. 2001. Treatment with extracts of *Momordica charantia* and *Eugenia jambolana* prevents hyperglycemia and hyperinsulinemia in fructose fed rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 76(2), 139-143.
- [5] Khan, M.R., Kihara, M., Omoloso, A.D. 2001. Antimicrobial activity of *Harpullia ramiflora*. *Fitoterapia*, 72(3), 298-300.
- [6] Hassan, A., Ullah, H. 2019. Antibacterial and Antifungal Activities of the Medicinal Plant *Veronica biloba*. *Journal of Chemistry*, 1(1), 1-7.
- [7] Zare Bidaki, M., Arab, M., Khazaei, M., Afkar, E., Zardast, M. 2015. Anti-Bacterial Effect of *Zataria multiflora* Boiss. Essential Oil on Eight Gastrointestinal Pathogenic Species. *Quarterly of the Horizon of Medical Sciences*, 21(3), 155-161. (in persian).
- [8] Rahnama, M., Razavi Rohani, S.M., Tajik, H., Khaleghi Sagarudi, F. and Rezazad Bari, M. 2009. Effects of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil and nisin, alone and in combination against *listeria monocytogenes* in BHI broth. *Journal Med Plant*. 4(32):120-31. (in persian)
- [9] Sharififar, F., Moshafi, M.H., Mansouri, S.H., Khodashenas, M. and Khoshnoodi, M. 2007. In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. *Food Control*. 18(7):800-805.

خود نگه داشته و از این طریق سبب بهبود طعم در آن ماده غذایی می‌شوند.

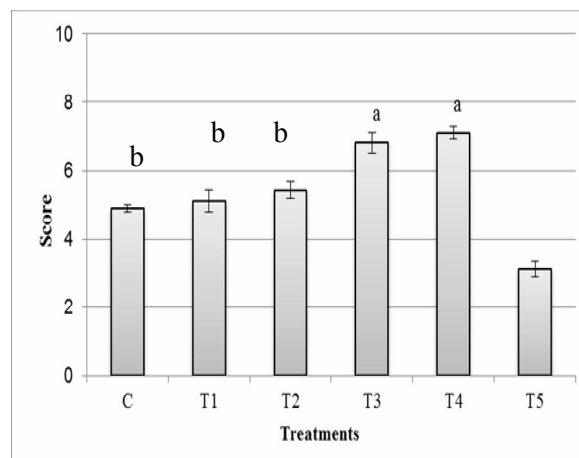


Fig 5 Effects of perca fillet coating with different concentrations of *Zataria multiflora* essential oil on general acceptance. Different letters indicate significant differences between columns.

در تحقیق حاضر پوشش دار نمودن فیله ماهی سوف با مقادیر ۰/۱ و ۰/۵ درصد از اسانس آویشن شیرازی به طور معنی داری سبب بهبود ویژگی حسی طعم می‌شوند، همچنین از دیدگاه ارزیاب‌ها زمانیکه فیله ماهی سوف با غلظت ۱ درصد از اسانس گیاه آویشن شیرازی پوشش داده شود به طور معنی داری طعم آن در مقایسه با گروه شاهد افت می‌کند، به نظر می‌رسد، دلیل این امر تند شدن مزه فیله باشد.

۴- نتیجه گیری کلی

بر اساس یافته‌های بدست آمده از این بررسی می‌توان نتیجه گرفت که اسانس گیاه آویشن شیرازی از ترکیبات متنوعی تشکیل شده است. همچنین یافته‌های بررسی حاضر نشان داد که اسانس آویشن شیرازی دارای اثرات باکتری کشی علیه باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد. نتایج ثابت نمود که اسانس آویشن شیرازی از طریق مهار رشد باکتری‌های مولد فساد ماندگاری فیله ماهی سوف را افزایش دهد. همچنین یافته‌های بدست آمده ثابت کردند که پوشش دار نمودن فیله ماهی سوف با اسانس آویشن شیرازی بر ویژگی‌های حسی موثر بوده و به طور معنی داری طعم آن را بهبود می‌بخشند.

- [17] Ghazizadeh, M., Razaghi, A.R. 1999. Basic Sensory methods for food evaluation. Shaheed Beheshti, Tehran, 149-158.
- [18] Alishahi, M., Ghorbanpoor, M., Najafzadeh, H., Pashmfroosh, M. 2010. Antibacterial effects of some medical plant extracts on *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia ruckeri* and *Streptococcus iniae*. Scientific Research Iranian Veterinary Journal. 2(27), 21-30. (in persian).
- [19] Ramezani, S., Ardestani, F., Asadollahzadeh, M.J. 2016. Combination Effects of *Zataria multiflora*, *Laurus nobilis* and *Chamaemelum nobile* Essences on Pathogenic *E. coli* and Determination of Optimum Formulation Using Fraction and Factorial Statistical Method. Iranian Journal of Medical Microbiology, 10 (2), 53-62. (in persian).
- [20] Karami, K., Heidari, Jamshidi, A.I., Ariapour, A. 2013. Investigation of antibacterial properties and chemical essential oil components of *Thymus Lancifolious Zagheh* area (Lorestan province). Plant Echophysiology, 5(13), 64-80. (in persian).
- [21] Ehsan, A., Mahmoudi, R., Kazeminia, M., Hazrati, R., Azarpey, F. 2017. Essential oils as natural medicinal substances: review articl. Tehran University of Medical Journal (TUMJ), 75(7), 480-489. (in persian).
- [22] Islam, M.T., Khalipha, A.B.R., Bagchi, R. 2019. Anticancer activity of thymol: A literature-based review and docking study with Emphasis on its anticancer mechanisms. IUBMB Life, 71(1), 9-19.
- [23] Vol, V., Holck, A., Wasteson, Y., Nissen, H. 2000. High levels of background flora inhibits growth of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. International journal of Food Microbiology, 56, 219-225.
- [24] Al-Kandari, F., Al-Temaimi, R., van Vliet, A.H.M. 2019. Thymol tolerance in *Escherichia coli* induces morphological, metabolic and genetic changes. BMC Microbiology, 19, 294-299.
- [10] Jayavignesh, V, SendeshKannan, K, Bhat, A.D. 2011. Biochemical characterization and cytotoxicity of the *Aeromonas hydrophila* isolated from Catfish. Scholars Research Library, 3(3), 85-93.
- [11] Cressiot, B., Ouldali, H., Pastoriza-Gallego, M., Bacri, L., Van der Goot, F.G., Pelta, J. 2019. Aerolysin, a Powerful Protein Sensor for Fundamental Studies and Development of Upcoming Applications. ACS Sens, 4(3), 530-548.
- [12] Ali, M., Mujib A., Gulzar, B. 2019. Essential oil yield estimation by Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) after Methyl jasmonate (MeJA) elicitation in in vitro cultivated tissues of *Coriandrum sativum*. Biotechnology, 9, 414-422.
- [13] Orojalian, F., Kasra Kermanshahi, R. 2010. A survey of phytochemical and antibacterial of *Achila eriophora* DC with micro broth dilution method. Journal of Horticultural Science, 24(1), 109-115. (in persian)
- [14] Shahnian, M., Khaksar, R. 2013. Antimicrobial effects and determination of minimum inhibitory concentration (MIC) methods of essential oils against pathogenic bacteria. Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology, 7(5), 949-955. (in persian).
- [15] Esmaeli, F., Tajik, H., Mehdizadeh, T., Mayeli M. 2019. Effect of combined application of *Pimpinella affinis* essential oil and extract in zein edible coating on vacuum packaged rainbow trout fillet quality. Veterinary Research Forum, 10 (2), 109 – 117.
- [16] Boari, C.A., Pereira, G.A., Valeriano, C., Silva, B.C., de Moraes, V.M., Figueiredo, H.C.P., Piccoli, R.H. 2008. Bacterial ecology of tilapia fresh fillets and some factors that can influence their microbial quality. Food Science and Technology, 28(4), 863-867.



Effect of *Zataria multiflora* essential oil in perch fillet to growth inhibition of *Aeromonas hydrophila*

Meghyasi, M.¹, Gharekhani, A.^{2*}, Tukmechi, A.³

1. MSc in Food Science, Department of Food science and technology, Maku Branch, Islamic Azad University, Maku, Iran
2. PhD in Aquatic Health and Disease, Asistant Professor, Department of Veterinary Medicine, Maku Branch, Islamic Azad University, Maku, Iran
3. DVSc in Microbiology, Associated Professor, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Article History: Received 27 August 2018 Accepted 11 October 2020 Keywords: <i>Aeromonas hydrophila</i>, antibacterial activity, essence, <i>Zataria multiflora</i>, perca filet DOI: 10.29252/fsct.18.01.06 *Corresponding Author E-Mail: a.gharekhani@yahoo.com	The use of natural substances could reduce consumption of synthetic agents in food industry for inhibition the growth of pathogens. Plants attract the main concentration on this topic, on the other hand Iran with special conditions has a good potential for growing the plants that have medical application. <i>Zataria multiflora</i> is growing in different part of Iran has antibacterial and antioxidant activity that could be used in food. The aim of this study was to evaluate the antibacterial effect of <i>Zataria multiflora</i> on <i>Aeromonas hydrophila</i> and the use of essence as a coat to improve the shelf life of perca filet. Fresh <i>Zataria multiflora</i> harvested essence was prepared by using the Clevenger apparatus. Then antibacterial property of <i>Zataria multiflora</i> was determined by mirobroth dilution method for measuring the minimal inhibition concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) at laboratory scale. Finally, chemical composition of essence was assayed by Gas chromatography mass spectrometry (GC-mass), also five different levels of essence (0.01, 0.05, 0.1, 0.5 and 1 percentage) were used as a food coat in perca filet. Results showed that MIC and MBC were 250 and 125 µg/ml against <i>Aeromonas hydrophila</i>, respectively. Also results showed that the efficacy of essence extraction was 1.84 percent, and the higher compound in <i>Zataria multiflora</i> essence was thymol (40.5 %) and the lower substance was alfa-humolen (0.03 %). Also, results documented that the use of two level of essence (0.1 and 0.5 percent) of essence in perca filet could statistically increase the shelf life than the control, as well as improve the organoleptic properties. It's should be concluded that the use of <i>Zataria multiflora</i> essence as food coat by inhibition the bacteria increase shelf life of perca filet at refrigerator storage.