بررسی اثر ضدمیکروبی فیلم خوراکی کازئینی حاوی اسانس آویشن شیرازی بر سه میکروارگانیسم بیماریزای غذائی

عاطفه برومند[۱]، منوچهر حامدی[۲]، زهرا امام جمعه[۲*]، سید هادی رضوی[۳]

۱- دانشجوی دکتری گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی دانشگاه تهران

۲- استاد گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی دانشگاه تهران

۳- دانشیار گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی دانشگاه تهران

(تاریخ دریافت: ۸۸/۴/۲۰ تاریخ پذیرش: ۸۸/۷/۹)

چکیده

اثر ضد میکروبی فیلم حاوی اسانس *آویشن شیرازی* بر روی سه میکروارگانیسم مهم بیماریزای مواد غذایی *سالمونلا تیفی موریوم (ATCC 14028)*، *اشرشیاکلی O157:H7 (ATCC 35218)* و *استافیلوکوکوس اورئوس (PTCC 1431)* مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این کار ابتدا کمترین غلظت بازدارنده(MIC) و کمترین غلظت کشنده(MBC) اسانس آویشن شیرازی در ۶ سطح غلظتی ppm۴۰۰۰،۲۰۰۰،۱۰۰۰،۵۰۰،۲۵۰،۱۲۵ با استفاده از روش آزمایش رقت در محیط مایع برای هر یک از میکروارگانیسم های ذکر شده تعین گردید. نتایج به دست آمده نشان داد که اسانس آویشن شیرازی اگر چه بر هر سه باکتری موثر است، ولی بیشترین تاثیر آن *براستافیلوکوکوس اورئوس* با MIC و MBC برابر با ppm ۲۵۰ بود. میزان MIC و MBC برای دو میکروارگانیسم دیگر ppm ۵۰۰ به دست آمد. ارزیابی خاصیت ضد میکروبی فیلم با کمک روش دیسک های انتشاری انجام گرفت. در این آزمون نیز نشترین قطر هاله بازدارندگی مربوط به *استافیلوکوکوس اورئوس* با متوسط قطر هاله برابر با ۱۷/ ۲۵ میلی متربود. متوسط قطر هاله برای *سالمونلا تیفی موریوم و اشریشیاکلی O157:H7* برابر با ۱۵/۰۲ و ۱۷/۶۲میلی متراندازه گیری شد.

کلید واژگان: فیلم ضدمیکروبی، اسانس *آویشن شیرازی*، *سالمونلا تیفی موریوم*، *اشریشیاکلی O157:H7*، استافیلوکوکوس

*مسئول مکاتبات: emamj@ut.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-04-28]

۱- مقدمه

نسل جدید بسته بندی ها با نام بسته بندی فعال، مدتی است که به بازار مواد غذایی معرفی و در جهت ایمنی وکیفیت ماده غذایی به کار برده می شود. بسته بندی های ضدمیکروبی شکلی از بسته بندی های فعال هستند که حاوی موادی با خاصیت ضد میکروبی می باشند [۱]. بسته بندی های ضد میکروبی همچنین ممکن است در جهت کاهش، جلوگیری و به تعویق انداختن رشد میکروارگانیسم هایی که در ماده غذایی بسته بندی شده یا خود ماده بسته بندی حضور داشته باشد عمل کنند و بدین ترتیب علاوه بر افزایش زمان ماندگاری سبب کاهش خطرات ناشی از حضور میکروارگانیسم های بیماریزا شوند. فیلم ها و پوشش های خوراکی دارای استعداد بالقوه در کنترل انتقال جرم بین غذا و محیط و همچنین بین اجزای مختلف فرآورده های غذایی هستند بنابراین در طی فرآوری، انبارداری حمل و نقل و توزیع، نه تنها فسادهای زیان آور غذا را به تأخیر می اندازد بلکه همچنین ممکن است کیفیت ماده غذایی را بهبود بخشند [۲،۳] .فیلم های خوراکی با قرارگرفتن بر سطح ماده غذایی و محدود کردن مهاجرت رطوبت، لیپید، طعم، آروما و رنگ سبب حفظ کیفیت ماده غذایی می شوند[۵-۱، ۳]. یکی از موادی که می تواند به عنوان ماده فعال در ساختار فیلم های خوراکی ضدمیکروبی به کار رود اسانس ها روغنی[1] گیاهی هستند که به صورت طبیعی دارای خواص ضدمیکروبی قابل ملاحظه می باشند. تعداد زیادی از محققین بر روی خواص ضد میکروبی این ترکیبات مطالعات گسترده ای داشته اند[۱۵-۶]. این مواد به طور گسترده در فرمولاسیون فیلم های ضد میکروبی به کار می روند و کاربرد آنها نتایج خوبی نیز به همراه داشته است.

زاتاریا مولتی فلورا[2] یکی از گیاهان متعلق به خانواده ی لامیناسه[3] است که از لحاظ جغرافیایی تنها در ایران، پاکستان و افغانستان رشد می کند. اسم محلی این گیاه در ایران *آویشن شیرازی* است و به صورت سنتی به عنوان ضد عفونی کننده و شل کننده ی عضلات استفاده می شود. این گیاه همچنین یکی از مواد مهم ایجاد طعم در بسیاری از غذاهای ایرانیست[۱۶]. مهمترین اجزای تشکیل دهنده ی اسانس آویشن شیرازی ترکیبات فنولیک به ویژه کارواکرول و تیمول می باشند [۱۷، ۱۸]. لازم به ذکر است که این دو ترکیب در بین ترکیبات فنلی دارای بیشترین خاصیت ضد میکروبی هستند و به همین دلیل به عنوان ماده ی ضد میکروبی طبیعی در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفت. از میان تحقیقاتی که در این زمینه انجام گرفته می توان به موارد زیر اشاره کرد:

پراناتو[4] و همکاران (2004) قدرت ضدمیکروبی فیلم کیتوزان حاوی روغن سیر را با فیلم های حاوی سوربات پتاسیم و نیسین بعنوان دو نگهدارنده متداول مورد استفاده در مواد غذایی، مقایسه نمودند. در این تحقیق برای ارزیابی قدرت ضدمیکروبی فیلم ها از روش انتشار در سطح آگار[5] استفاده گردید و سپس قطر ناحیه بازدارندگی اندازه گیری شد. بیشترین ناحیه بازدارندگی برای فیلم کیتوزان حاوی روغن سیر مرتبط با باکتریهای استافیلوکوکوس اورئوس، *لستریامونوسیتوژنز* و *باسیلوس سرئوس* بود، همچنین کاهش رشد میکروبی در مورد *اشیرشیاکلی* و *سالمونلاتیفی موریوم* مشاهده گردید و ناحیه بازدارندگی با افزایش مقدار روغن سیر افزایش پیدا می کرد [۱۹].

این محققین همچنین در سال۲۰۰۵ خواص ضدمیکروبی فیلم آلژنیات حاوی v/v ۰/۴ روغن سیر[6] را بر روی چهار باکتری پاتوژن غذایی *اشرشیاکلی*، *سالمونلاتیفی موریوم*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس* مورد مطالعه قرار دادند. برای ارزیابی خواص ضدمیکروبی بار دیگر از روش انتشار در سطح آگار استفاده کردند، فیلم تولید شده در مقابل *استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس* فعالیت ضدمیکروبی قابل قبولی از خود نشان داد و در کل این نتایج آشکار می کرد که روغن سیر دارای شرایط خوبی برای مخلوط شدن با آلژینات و تولید فیلم و یا پوشش خوراکی مناسب در انواع کاربردهای غذایی می باشد [۲۰].

سیدیم و ساریکوز[7] (۲۰۰۶) فعالیت ضد میکروبی فیلم های حاصل از پروتئین های آب پنیر حاوی سه روغن اساسی

1. essential oils
2. *Zataria multiflora Bioss*
3. Laminanceae

4. Pranato et al.
5. disk diffusion method
6. garlic oil
7. Seydim and Sarikus

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-04-28]

اورگانو[1]، رزماری[2] و سیر را مورد بررسی قرار دادند. این محققان اثر ضد میکروبی فیلم های حاوی W/V٪۰/۴-۱/۰ از اسانس های روغنی نام برده را در مقابل ۵ باکتری *اشریشیاکلی O157:H7* (ATCC35218)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC43300)، *سالمونلا* ینتریتیدیس (ATCC13076)، لیستریا مونوسیتوژنز (NCTC2167) و لاکتوباسیلوس پلانتاروم(DSM20174) آزمایش کردند. نتایج به دست آمده با کمک روش دیسک های انتشاری[3] نشان داد که فیلم های ضد میکروبی حاوی اسانس روغنی اورگانو در غلظت ۲٪ نسبت به انواع فیلم های حاوی روغن های سیر و رزماری بر علیه میکروارگانیسم های مورد آزمون موثرترین بودند($p<0.05$) [۲۱].

در حال حاضر فیلم های خوراکی تهیه شده از پروتئین های شیر به لحاظ ارزش غذایی، ویژگی های قابل قبول مکانیکی و همچنین خواص بسیار خوب حسی مورد توجه قرار گرفته اند [۲۵-۲۲]. به همین دلیل ما در این پژوهش از کازئنات سدیم جهت تهیه فیلم ضد میکروبی استفاده کردیم. در ضمن چون از اسانس آویشن شیرازی تا کنون به عنوان ماده ضد میکروبی در تهیه فیلم به کار برده نشده بود از این ماده در فیلم مذکور استفاده گردید و تاثیر آن بر سه باکتری بیماریزای غذایی مطالعه گردید.

هدف از این پژوهش تولید فیلم ضدمیکروبی حاوی اسانس آویشن شیرازی و بررسی تاثیر خواص ضد میکروبی آن بر سه میکروارگانیسم *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سالمونلا تیفی موریوم* و *اشریشیاکلی O157:H7* بود.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- مواد اولیه

پودر کازئینات سدیم درجه غذایی از بازار تهیه گردید. و اسانس آویشن شیرازی با روش تقطیر با بخار آب از گیاه مذکور رد گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه تهران تهیه [۲۷]. امولسیون کننده ها و اسپان ساخت شرکت مرک آلمان بودند.

1. oregano
2. rosemary
3. disk diffusion method

سویه ها ی میکروبی و محیط کشت ها

سویه های میکروبی *سالمونلا تیفی موریوم (ATCC 14028)* و *اشرشیاکلی O157:H7 (ATCC 35218)* از دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران و *استافیلوکوکوس اورئوس (PTCC 1431)* از سازمان پژوهش های علمی صنعتی ایران تهیه شدند. جهت انجام آزمایش ها از محیط های مولر هینتون آگار[4] و مولر هینتون براث[5] (ساخت شرکت MAST انگلستان) و مک کانگی آگار ، برین هارت آگار (BHA) و نوترینت آگار(ساخت شرکت مرک آلمان) استفاده شد.

۲-۲- روش ها

۲-۲-۱-تهیه کشت تازه (در فاز لگاریتمی) از میکروارگانیسم ها

هر یک از سویه های باکتریایی روز قبل از انجام آزمون MIC و MBC و نیز پیش از ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی فیلم های ساخته شده، بر روی محیط کشت‌های مربوطه کشت سطحی داده شدند. تا این که میکروارگانیسم ها پس از یک شب گرمخانه گذاری در هنگام تهیه سوسپانسیون میکروبی در فاز لگاریتمی قرار داشته باشند [۲۸].

۲-۲-۲- روش تهیه فیلم ترکیبی کازئینات سدیم دارای اسیدهای چرب اولئیک و استئاریک

جهت تهیه فیلم، 5gr کازئینات سدیم(حاوی ٪۸۳/۳پروتئین ٪۱/۲ چربی و ٪۱/۸ خاکستر) به۱۰۰ gr آب مقطر حاوی 1/5gr گلیسرول(نسبت گلیسرول به کازئینات سدیم۱/۵: یا ۰/۳۶ =Gly/pro) در دمای۵۰ ±۶ و با هم زدن ۵۵۰ rpm اضافزوده شد، پس از اینکه کازئینات سدیم به طور کامل حل شد،دما تا C ° ۵± ۸۰ افزایش داده شد. مخلوط به مدت۱h در این دما و شرایط هم زدن مذکور نگهداری شد. در یک بشر مقدار معین از اسیدهای چرب اولئیک و استئاریک (نسبت ۱/۰۵ =pro/lipid, ٪۱۷اسید استئاریک و ٪۸۳اسید اولئیک)توزین گردید. به میزان 40% وزن روغن از دو امولسیفایر اسپان ۸۰ و اسپان ۸۵ با نسبت معین (٪ ۸اسپان ۸۰و ٪ ۹۲ اسپان ۸۵) برای بدست آوردن HLB مناسب به مخلوط افزوده شد. به علت اینکه اسید استئاریک در دمای محیط جامد است پیش از افزودن امولسیون

4. Mueller- Hinton Agar
5. Mueller- Hinton Broth

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-04-28]

کننده ها دمای ظرف حاوی اسیدهای چرب تا $5^{\circ}C$ ±۴۵افزایش داده شد. سپس مخلوط امولسیون کننده ها به آمیزه ی اسیدهای چرب اضافه گردید و هم زدن ملایم صورت گرفت(فیلم شاهد از این مخلوط قالب گیری شد)، اسانس گیاهی مورد نظر نیز در همین مرحله به میزان تعیین شده به فرمولاسیون افزوده شد. محلول کازیئنات در دمای $50^{o}C$ به مخلوط امولسیفایرها و اسیدهای چرب اضافه گردید و (IKA®RCT basic ساخت آلمان) با دور ۵۵۰ rpm به مدت۵ دقیقه انجام گرفت. مخلوط تهیه شده سپس به مدت ۳ دقیقه دیگر در 20.000rpm توسط مخلوط کن همگون ساز (IKA T25-digital ultra turax) همگون گردید. میزان استفاده از اسانس گیاهی از طریق آزمون اندازه گیری خاصیت ضد میکروبی تعیین شد. در مرحله ی بعد مخلوط همگون شده برای خروج حباب های هوا، با استفاده از یک دسیکاتور و پمپ خلاء هواگیری شد. آنگاه مقدار معینی از امولسیون (۳۵ml) در قالب های سیلیکونی ریخته۲۳×) و در یک آون در $42\pm5^{\circ}C$ (جهت جلوگیری از جدا شدن اسید استئاریک و شکستن امولسیون)به مدت 13.5h ساعت خشک گردید.

۲-۲-۳-تهیه امولسیون آبی اسانس ها امولسیون هایی با غلظت هایppm ۴۰۰۰، ۲۰۰۰، ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰ و۱۲۵ اسانس آویشن شیرازی تهیه شد.

۲-۲-۴-تهیه سوسپانسیون۰/۵ و۱ مک فارلند[1]

سوسپانسیون های استاندارد ۰/۵ و ۱ مک فارلند با استفاده از از محلول های آبی کلرید باریم سولفوریک تهیه گردید. کدورت ایجاد شده توسط سوسپانسیون های 0.5 و1MF به ترتیب دانسیته سلولی تقریباً معادل با $1/5\times10^{8}$ و 3×10^{8} سلول در میلی‌لیتر ایجاد می کند. سپس کدورت آن با استفاده از دستگاه اسپکترو فتومتر (CECIL 2502-Instruments) (Cambridge England Serial No. 125-624) در طول موج ۶۲۵ nm اندازه گیری شد.

۲-۲-۵-تهیه سوسپانسیون میکروبی

به منظور تهیه ی سوسپانسیون میکروبی مورد استفاده در آزمون MIC و MBC، یک لوپ پر از هر سویه‌ی میکروبی تحت شرایط استریل (بین دو شعله) به ۲۵ میلی لیتر محیط کشت مولرهینتون براث جهت تهیه سوسپانسیون غلیظ میکروبی اضافه گردید. سپس تا هنگام برابر شدن دانسیته نوری (OD)[2] آن با محلول ۱ مک فارلند توسط محیط کشت (MHB) رقیق شد. برای بدست آوردن مقدار 1×10^{6} میگروارگانیسم در میلی‌لیتر تحت شرایط استریل به نسبت ۵۰۰ : ۱ با محیط کشت MHB مخلوط شد. جهت تهیه سوسپانسیون ۰/۵ مک فارلند برای استفاده در تعیین خواص ضد میکروبی فیلم نیز به روش بالا عمل شد [۲۸].

۲-۲-۶- ارزیابی فعالیت ضد میکروبی اسانس ها با استفاده از روش آزمایش رقت در محیط مایع[3]

به منظور تعیین MIC و MBC شش سطح غلظت از اسانس (ppm۴۰۰۰،۲۰۰۰،۱۰۰۰،۵۰۰،۲۵۰،۱۲۵)تهیه شد. از روش آزمون حساسیت رقت مایع استفاده گردید [۲۸].

۲-۲-۷- بررسی خاصیت ضد میکروبی فیلم ها با استفاده از روش دیسک های انتشاری[4]

برای بررسی خصوصیات ضد میکروبی فیلم از روش دیسک های انتشاری[5] استفاده شد. به این منظور دیسک های به قطر تقریباً mm ۶ از فیلم ضد میکروبی به وسیله یک پانچ استریل تهیه شد. این دیسک ها سپس روی سطح پلیت های حاوی محیط کشت مولرهینتون آگار که قبلاً با سوسپانسیون میکروبی معادلMF ۰/۵ تلقیح شده بودند به صورت ۴ دیسک در هر پلیت قرار داده شدند. و سپس به مدت ۱۸h در $37^{o}C$ گرمخانه گذاری شد و قطر ناحیه بازدارندگی[6] پیرامون دیسک ها اندازه گیری شد [۲۸]. برای کنترل مثبت از دیسک های بون اسانس استفاده شد.

۲- ۳- آنالیز آماری

آزمایش های اندازه گیری خاصیت ضد میکروبی فیلم در ۳ تکرار انجام شد و داده های به دست آمده با کمک نرم افزار SAS و با استفاده از آزمون های دانکن و LSD آنالیز گردید.

1. MC Farland

2. Optical Density (OD)
3. Broth Dilution Susceptibility test
4. disk diffiusion method
5. Disk Diffusion Method
6. inhibitory zone

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-04-28]

۳- نتایج وبحث

۳-۱- ارزیابی ویژگی های ضدمیکروبی اسانس آویشن شیرازی

MIC کمترین غلظت از ماده ضد میکروبی است که دارای اثر بازدارندگی بر یک میکروارگانیسم خاص باشد، تحت این شرایط میکروارگانیسم دیگر قادر به رشد نخواهد بود، MBC کمترین غلظتی از ماده ضد میکروبی است که سبب مرگ میکروارگانیسم می شود به این ترتیب هیچ میکروارگانیسم زنده ای نباید تحت این شرایط در محیط حاوی غلظت MBC حضور داشته باشد.

نتایج حاصل از تعیین MIC وMBC اسانس *آویشن شیرازی* با استفاده از روش آزمایش رقت در محیط مایع در مقابل هر دو نوع میکروارگانیسم گرم مثبت و گرم منفی بیماریزای غذایی در جدول ۱ نشان داده شده است. جدول مذکور نشان می دهد که از میان میکروارگانیسم های مورد استفاده حساس ترین به این اسانس، *استافیلوکوکوس اورئوس* با MIC و MBC برابر با ۲۵۰ppm است. مقادیر ذکر شده برای *اشریشیاکلی O157:H7* و *سالمونلا تیفی موریوم* برابر با ۵۰۰ppm است. نتایج به دست آمده با نتایج حاصل از پژوهش انجام گرفته توسط فاضلی و همکاران(۲۰۰۶) بر روی عصاره الکلی(v/v ٪ ۸۰) تهیه شده از روش دیسک های انتشاری همخوانی دارد. طی این آزمون نیز مشخص شد که باکتری های گرم مثبت از جمله *استافیلوکوکوس اورئوس* حساسیت بیشتری به عصاره الکلی *آویشن شیرازی* نشان می دهند [۲۹]. آخوندزاده بستی و همکاران(۲۰۰۷) نیز نشان دادند در غلظت های مختلف اسانس آویشن شیرازی استافیلوکوکوس اورئوس به این اسانس حساسیت بیشتری دارد. در این پژوهش اثرات توام دما، pH و غلظت اسانس آویشن شیرازی را بر دو میکروارگانیسم *سالمونلا تیفی موریوم* و *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد بررسی قرار گرفته شد و نتایج نشان داد با افزایش غلظت اسانس در صورت ثابت بودن دو فاکتور دیگر اثر ضد میکروبی افزایش می یابد[۳۰]. به طور کلی نتایج تحقیقات صورت گرفته نشان می دهد، باکتری های گرم مثبت در مقایسه با انواع گرم منفی در برابر اسانس های گیاهی مقاومت کمتری نشان می دهند که این مسئله احتمالا به دلیل ساختار غشا باکتری های گرم مثبت است. به نظر می رسد که علت مقاومت بیشتر باکتری های گرم منفی به روغن های اساسی گیاهی احتمالاً پیچیدگی بیشتر غشای مضاعف سلولی این ارگانیسم ها در مقایسه با غشای یگانه گلیکوپروتئینی/ تکوئیک[1] اسید باکتریهای گرم مثبت است. همچنین به نظر می رسد مقاومت سلول های میکروبی به سرعت و میزان حل پذیری مواد ضد میکروبی در بخش لیپیدی غشای سلولی بستگی دارد. اگرچه این مسئله نمی تواند توضیح کاملی برای شرح اختلاف در حساسیت باکتریهای گرم مثبت و منفی باشد به همین علت اختلاف در آبگریزی سطح غشای سلول نیز بعنوان یک عامل موثر پیشنهاد شده است [۱۳].

لازم به ذکر است که در این مطالعه با توجه به روش آزمون و انتخاب سطح غلظت های انتخاب شده اثر بازدارندگی و کشندگی اسانس *آویشن شیرازی* بر روی سه میکروارگانیسم بر هم منطبق شده است این نشان می دهد که به احتمال زیاد MIC و MBC این اسانس ها بر روی آنها نزدیک به هم است به این معنی که به حتمال زیاد این اسانس در غلظت های کمی بالاتر MIC دارای اثر کشندگی است. از آن جائی که وجود اسانس در فیلم های خوراکی بر طعم آنها موثر است. بنابراین تعیین کمترین غلظت که بتواند میکروارگانیسم های مورد نظر را غیرفعال کند ضروری به نظر می رسد.

جدول ۱ نتایج اثر ضد میکروبی اسانس آویشن شیرازی بر روی میکروارگانیسم های آزمون

	رقت های اسانس آویشن شیرازی بر حسب ppm					
نوع میکروارگانیسم	۱۲۵	۲۵۰	۵۰۰	۱۰۰۰	۲۰۰۰	۴۰۰۰
استافیلوکوکوس اورئوس	++	-	-	-	-	-
اشرشیاکلی O157:H7	++	+	-	-	-	-
سالمونلاتیفی موریوم	++	+	-	-	-	-

++ نشان دهنده رشد زیاد میکروارگانیسم،+ نشان دهنده رشد کم میکروارگانیسم،- نشاندهنده عدم رشد می باشد. نتایج عنوان شده حاصل سه تکرار است.

1. techoeic acid

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-04-28]

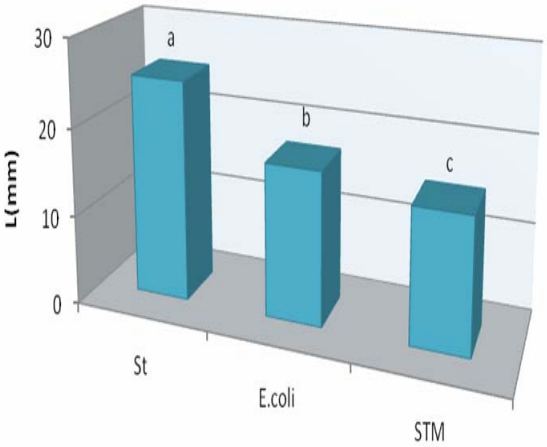
۳-۲- فیلم ضد میکروبی

فیلم ضد میکروبی تولید شده به علت وجود اسانس از لحاظ ظاهری دارای ظاهری مات تر از فیلم شاهد بود که به نظر می رسد ناشی از افزایش پراکنش نور به علت تاثیر گذاری اسانس است(شکل ۱).

شکل۱ مقایسه ی شکل ظاهری فیلم های شاهد(فیلمB) و ضدمیکروبی(فیلمC)

۳-۳- ارزیابی خواص ضد میکروبی فیلم

.نتایج حاصل از ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی فیلم حاوی اسانس آویشن شیرازی در شکل۲ به صورت نمودار ارائه شده است. فعالیت بازدارندگی بر پایه اندازه گیری قطر ناحیه شفاف اطراف دیسک های بریده شده از فیلم ها تهیه شده ارزیابی گردید. اگر هیچ ناحیه ی شفافی در اطراف دیسک ها وجود نداشته باشد به این معنی است که هیچ اثر ضد میکروبی وجود ندارد. در واقع در داخل ناحیه شفاف، ما هیچ گونه رشد میکروبی نداریم. در دیسک های حاصل از فیلم شاهد هیچ اثر بازدارندگی در مقابل رشد میکروارگانیسم های مورد آزمون مشاهده نشد. در حالیکه فیلم دارای اسانس *آویشن شیرازی* هاله ی به قطر متوسط mm ۲۵/۱۷ در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* شد. در واقع *استافیلوکوکوس اورئوس* به عنوان یک باکتری گرم مثبت حساس ترین میکروارگانیسم به فیلم ضد میکروبی بود. ناحیه بازدارندگی برای اشریشیاکلیO157:H7 و *سالمونلا تیفی موریوم* کوچکتر از ناحیه ایجاد شده برای *استافیلوکوکوس اورئوس* بود که این نشان می دهد این دو میکروارگانیسم مقاومت بیشتری به اسانس به کار برده شده دارند. متوسط قطر هاله اندازه گیری شده برای *اشریشیاکلی O157:H7* و *سالمونلاتیفی موریوم* به ترتیب ۱۷/۶۲mm و۱۶/۲۰ mmبود. با اینکه تفاوت در اندازه قطر ناحیه بازدارندگی مربوط به *اشریشیاکلیO157:H7* و *سالمونلا تیفی موریوم* زیاد نیست اما این تفاوت معنی دار است($p\leq ۰,۰۱$)(شکل۲).



شکل۲ مقایسه ی اثر و قطر هاله های ایجاد شده بر روی سه میکروارگانیسمهای مورد آزمون

St: *استافیلو کوکوس اورئوس*، STM: *سالمونلا تیفی موریوم*، E. coli: *اشریشیاکلی*. بر طبق نتایج بدست آمده اختلاف بین سه گروه با احتمال ۹۹,۹۹ معنی دار است.

بنابراین می توان نتیجه گرفت که *سالمونلاتیفی موریوم* مقاوم ترین میکروارگانیسم در میان سه میکرو ارگانیسم دیگر می باشد. با توجه به نتایج به دست آمده از آزمون های MIC ، MBC و دیسک های انتشاری مشاهده می شود که مواد ضد میکروبی به طور آشکاری (با توجه به MBC و قطر هاله ی به دست آمده) در برابر باکتری های گرم مثبت موثرتر از باکتری های گرم منفی هستند.

در پژوهشی دیگر (پراناتو و همکاران،۲۰۰۴) از اسانس روغنی سیر به عنوان ماده ضد میکروبی در تهیه فیلم ضد میکروبی کیتوزان در ۴ سطح غلظتی استفاده شد بیشترین اثر ضدمیکروبی بر باکتری های گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس* مشاهده گردید در حالی که *اشرشیاکلی و سالمونلاتیفی موریوم* کاملا به چهار سطح غلظتی مورد استفاده مقاومت نشان

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-04-28]

دادند که نتایج ما را تائید می کند[۱۹]. همین پژوهش گران نتایج مشابهی را با فیلم ضد میکروبی آلژینات حاوی اسانس روغنی سیر به دست آوردند[۳۱].

در مقابل سیدیم و ساریکوز(۲۰۰۶) اثر ضد میکروبی فیلم های حاصل از پروتئین های آب پنیر جداسازی شده را در ترکیب با روغن های اساسی اورگانو، سیر و رزماری در برابر ۵ میکروارگانیسم برابر *اشریشیاکلی*O157:H7، استافیلوکوکوس اورئوس، *لیستریا مونوسیتوژنز*، *سالمونلا اینتریتیدیس*[1] و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*[2] در چهار سطح غلظتی مورد مطالعه قرار دادند. در این پژوهش سه میکرواگانیسم *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا مونوسیتوژنز* و *سالمونلا اینتریتیدیس* واکنش مشابهی داشته و در برابر اسانس های سیر و اورگانو حساسیت بیشتری از بقیه نشان دادند، در حالی که *اشریشیاکلی O157:H7* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* مقاومت بیشتری داشتند و سطح بازدارندگی کمتری نشان دادند که در این میان *لاکتو باسیلوس* پلانتاروم به عنوان یک باکتری گرم مثبت با داشتن کمترین سطح بازدارندگی بیشترین مقاومت را از خود نشان داد. لازم به ذکر است که فیلم حاوی اسانس رزماری هیچ گونه اثر ضد میکروبی بر ۵ میکروارگانیسم ذکر شده نداشت [۲۱].

۴- نتیجه گیری کلی

نتایج آزمایش های انجام شده با اسانس *آویشن شیرازی* نشان داد که بیشترین اثر ضد میکروبیMIC و MBC برابر برای *استافیلوکوکوس اورئوس* معاذل با ppm۲۵۰ داشته است و برای دو میکروارگانیسم دیگر ppm ۵۰۰بود. در مورد خاصیت ضد میکروبی فیلم حاوی اسانس نیز بیشترین قطر هاله های بازدارندگی فیلم دارای خاصیت ضدمیکروبی برای *استافیلوکوکوس اورئوس*، بر *اشریشیاکلی O157:H7* و *سالمونلا تیفی موریوم* به ترتیب۲۵/۱۷، ۱۵/۲۰ و ۱۷/۶۲ میلی متر بود. به این معنی که بیشترین اثر ضدمیکروبی بر *استافیلوکوکوس اورئوس* و کمترین آن بر *سالمونلا تیفی موریوم* بود.

1. Salmonella enteritidis
2. Lactobacillus plantarum

۵- تشکر و قدردانی

نویسندگان از آقای دکتر رضایی و آقای مهندس گکمکانی برای در اختیار قرار دادن اسانس آویشن شیرازی کمال تشکر را دارند.

۶- منابع

[1] Appendini, P. and Hotchkiss, J. H. (2002). Review of antimicrobial food packaging. *Innov. Food Sci. Emerg.* 3, 113-126.

[2] Rojas-Graü, M. A., Avena-Bustilos, R. J., Olsen, C., Friedman, M., Henika, P. R., Martí Belloso, O., Pan, Z., Mchugh, T. H. (2007). Effect of plant essential oils and compounds on mechanical, barrier and antimicrobial properties of alginate-apple purees edible films. Journal of Food Engineering, 81: 634-641.

[3] Quintavalla, S. and Vicini, L. (2002). Antimicrobial food packaging in meat industry. J. Meat science, 62:373-380.

[4] Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L. and Lacroix, M. (2007). Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli 0157:H7, Salmonella typhimurium, Staphylococcus aurous* and *Listeria monocytogenes. Food Cont.* 18, 414-420.

[5] Cha, D. S. and Chinnan, M. S. (2004). Biopolymer- Based Antimicrobial Packaging: A Review. J. Food Science and Nutrition, 44:223-237.

[6] Kim, J., Marshall, M. R. and Wei, C. I. (1995). Antibacterial activity of some essential oil components against five food borne pathogens. J. agric. Food Chem. 43, 2839-2845.

[7] Tassou, C., Koutsoumanis, K. and Nychas, G. J. E. (2000). Inhabitation of salmonella entritidis and staphylococcuse aurous in nutrient broth by mint essential oil. *Food Res. Int.* 33, 27-280.

[8] Lambert, R. J. W., Skandimis, P. N., Coot, P. and Nychas, G. J. E. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol, J. Appl. Microbiolo. 91, 453-462.

[9] Delaquuis, p. j., Stanich, K., Girard, B. and Mazza, G. (2002). Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. Int *J. Food microbiolo. 74, 101-109.*

[10] Rasooli, I. and Mirmostafa, S. A. (2002). Antibacterial properties of Thymus pubescens

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-04-28]

and Thymus septlum essential oils. J. Fitoterapia. 73, 244-250.

[11] Burt, S. A. and Reinders, R.D. (2003). Antibacterial activity of selected plant essential oil against *Escherichia coli O175:H7*. *Lette. appl. Microbial.* 36, 162-167.

[12] Lanciotti, M. R., Gardini, A., Patrigani, F., Belletti, N., Guerzoni, M. E. and gardini, F. (2004). Use of natural aroma compounds to improve shelf- life and safety of minimally processed fruits. Trends in Food Sci. Technol. 15, 201-208.

[13] Holley, R. A. and Pate, D. (2005). Improvement in shelf life and safely of perishables food by plant essential oils and smoke antimicrobials. Food Microbial. 22, 273-292.

[14] Lee, M. L., Kwon, H. A., Kwon, D. Y., Park, H., Sohn, D. H., Kim, Y. C., Eo, S.K., Kang, H. Y., Kim, S. W. and Lee, J. H. (2006). Antibacterial activity of medicinal herb extracts against salmonella. Food Microbiol. 111, 270-275.

[15] Oussallah, M., Caillet, S., Salmieri, S., Saucier, L., & Lacroix, M. (2004). Antimicrobial and antioxidant effects of milk protein based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 52, 5598–5605.

[16] Misaghi A. and Akhondzade Basti, A. (2007). Effect of Zataria multiflora Boiss essential oil and nisin on Bacillus cereus ATCC 11778. Food Cont. 18, 1043-1049.

[17] Shafiee, a. and Javidnia, K. (1997). Composition of essential oil of Zataria multiflora. *Plan. Medici.* 65, 371-372.

[18] Ali, M. S., Saleem, M., Ali, Z. and Ahmad, V. U. (2000). Chemistry of *Zataria multiflora* (Lamiaceae). *Phyt. Chem.* 55:933-936.

[19] Pranato, Y., Rakshit, S. K. and Salokhe, V.M. (2004). Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic ail, potassium sorbet and misin. J. LWT, 38:859-865.

[20] Pranato, Y., Salokhe, V.M., and Rakshit, S. K. (2005). Physical and antibacterial properties of alginate-based edible film incorporated with garlic oil. J. Food research international, 38: 267-272.

[21] Seydim, A.C. and Sarikus, G. 2006. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. *Food Res. Int.* 39, 639–644.

[22] Chen, H. (1995). Functional properties and applications of edible films made of milk proteins. J. Dairy Sci, 78:2563-2585.

[23] Chen, H. (2002). Formation and Properties of Casein Film and Eoating, ch7. In: Protein based edible film & coating, Gennadios, A., (ed). CRC Press.

[24] Chick, J. and Hernandez, R. J. (2002). Physical, thermal, and barrier characterization of casein- wax- based edible films. Journal of food science, 67:1073-1079.

[25] Khwaldia, K., Perez, C., Banon, S., Desobry, S., and Hardy, J. (2004). Milk proteins for edible film and coatings. J. Food Science and Nutrition, 44:239-251

[26] Longares, A., Monahan, F. J., O'Sullivan, M. (2004). Physical properties and sensory evaluation of WPI films of varying thickness. J. LWT, 37:545-550

[27] Golmakani M. T. and Rezaei, K. (2008). Microwave-assisted hydrodistillation of essential oil from Zataria multiflora Boiss. Eur. J. Lipid Sci. Technol., 110, 448-454.

[28] Barnon, E.J. and Fineg old, S.M. (1990). Method for testing antimicrobial effectiveness. In: Diagnostic Microbiology, 8th Ed. The Moby Company. pp. 172-184.

[29] Akhondzade Basti, A., Misaghi, D. and Khaschabi, D. (2007). Growth response and modeling of the effects of Zataria multiflora Boiss. Essential oil, pH and temperature on Salmonella thyphimrium and Staphylococcus aureus. *LWT*, 40, 973-981.

[30] Fazeli, M. R., Amin, GH., Amadian Attari, M. M., Ashtiani, H., Jamlifar, H. and Samadi, N. (2007). Antimicrobial activities o Iranian sumac and avishan-e shirazi (Zataria multiflora) against some food borne bacteria. Food Control, 18,646-649.

[31] Pranato, Y., Salokhe, V.M., and Rakshit, S. K. (2005). Physical and antibacterial properties of alginate- based edible film incorporated with garlic oil. J. Food research international, 38: 267-272.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-04-28]

Investigation on the antimicrobial effect of caseinate edible film containing the essential oil of Zataria multiflora

Boroumand, A. [1*], Hamedi, M. [2], Emamjome, Z. [3], Razavi, S. H.[3]

1. MSc Graduate in Food science & Engineering, Faculty of Biosystem Engineering the University of Tehran
2. Professor, Department Food science & Engineering, Faculty of Biosystem Engineering the University of Tehran
3. Associate Professor, Department Food science & Engineering, Faculty of Biosystem Engineering the University of Tehran

(Received:88/4/20 Accepted: 88/7/9)

Antimicrobial effect of caseinat edible film containing the essential oil of *Zataria multiflora Bioss* was investigated against tow gram-negative bacteria named *Salmonella typhymurium (ATCC14028), Escherichia coli O157:H7 (ATCC35218)* and a gram-positive bacteria *Staphylococcous aureus (PTCC1431)*. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of the tested essential oil were determinate by using a broth dilution susceptibility test at 6 different concentrations (125, 250, 500, 1000, 2000 and 4000 ppm). The essential oil from *Avishan Shirazi(Zataria multiflora Bioss*) was most effective against *S. aureus*, the MIC and MBC values in the presence of *E. coli O157:H7* and *S. typhymurium* were 500 for both of them. The antimicrobial effect of caseinate film was studing using disk diffusion method. Our result showed that the larger inhibitory diameter was belonged to *S. aureus* (mean=25.17mm) mean diameters of inhibitory effect for *S. typhymurium* and *E. coli O157:H7* were 15.20 and 17.62 mm respectively.

Key words: *Antimicrobial film, Essential oil of Zataria multiflora Bioss, Salmonella typhymuriu, Escherichia coli O157:H7 and Staphylococcous aureus*

* Corresponding Author E-Mail address: emamj@ut.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-04-28]