

## Antibacterial effects of essential oil of Bene tree fruit on *Clostridium perfringens* in laboratory environment and on meat product

Soltan Dallal MM., PhD<sup>1</sup>, Faraji M., MSc<sup>2</sup>, Mirahmadi F., MSc<sup>3</sup>

1. Professor, Food Microbiology Research Center/ Division of Microbiology, Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran., Tel: 021- 88992971, Email: msoltandallal@gmail.com

2. Student in Food Microbiology, Division of Food Microbiology, Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

3. instructor the department of Food industrial, Azad University, Branch of Sanandaj, Sanandaj, Iran.

### ABSTRACT

**Background and Aim:** essential oil of *P.atlanticaSubsp. Kurdica* fruit or wild pistachios have been recognized as an anti- microbial compound against most of microorganisms. The purpose of this study was to determine the anti-microbial activity of the essential oil of *P.atlanticaSubsp. Kurdica* fruit on *Clostridium perfringens* in laboratory environment and meat products.

**Material and Method:** The anti-microbial effects of the essential oil of *P.atlanticaSubsp. Kurdica* fruit on *Clostridium perfringens* was evaluated by determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). Then MBC of the essential oil was added to the processed foods (hot dog and kielbasa) in order to reduce anaerobic microbes especially *Clostridium*. Using SAS software, data were analyzed by chi-square test.  $p < 0/05$  was considered significant.

**Results:** The results showed that MIC for *Clostridium* bacteria was 250 milligrams per liter. MBC of *P.atlanticaSubsp. Kurdica* essential oil for *Clostridium* bacteria was 500 milligrams per liter. Use of 500 milligrams per liter of *P.atlanticaSubsp. Kurdica* essential oil in the food products such as hot dogs had bactericidal effect on *Clostridium* bacteria.

**Conclusions:** The essential oil of *P.atlanticaSubsp. Kurdica* in the food product such as hot dogs had inhibitory and anti-bacterial effects on *Clostridium*. This essential oil had no positive effect on the taste of food product. This problem can be solved by purification and decolorization. It can be used as a drug or remedy for the treatment of *Clostridium* infection or poisoning.

**Keywords:** *P.atlanticaSubsp. Kurdica* fruit essential oil , *Clostridium perfringens*, Minimum inhibitory concentration (MIC), Hot dogs and sausages, Organoleptic properties

Received: Sep 17, 2018

Accepted: Feb 20, 2019

## بررسی اثرات ضدباکتریایی اسانس میوه درخت بنه بر روی باکتری کلستریدیوم پرفرنجنس در محیط آزمایشگاهی و سوسیس

محمد مهدی سلطان دلال<sup>۱</sup>، محمد فرجی<sup>۲</sup>، فردین میر احمدی<sup>۳</sup>

۱. استاد مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی / بخش میکروب شناسی غذایی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران، تلفن ثابت: ۰۲۱-۸۸۹۹۲۹۷۱

Email: msoltandallal@gmail.com

۲. دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب شناسی مواد غذایی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۳. مربی گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج، سنندج، ایران

### چکیده

**زمینه و هدف:** اسانس میوه درخت بنه یا پسته وحشی به عنوان ترکیب ضد میکروبی در مقابل اکثر میکروارگانیسم ها شناخته شده است. هدف از این تحقیق تعیین فعالیت ضد میکروبی اسانس میوه درخت بنه بر روی باکتری کلستریدیوم پرفرنجنس در محیط آزمایشگاهی و فراورده های گوشتی میباشد.

**روش بررسی:** در این تحقیق اثرات ضد میکروبی اسانس میوه درخت بنه بر روی کلستریدیوم پرفرنجنس، به روش تعیین غلظت ممانعت کنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) مورد ارزیابی قرار گرفت. در مرحله بعد بررسی استفاده از حداقل غلظت کشنده از اسانس به عنوان ترکیب ضد باکتری به فرآورده غذایی (سوسیس) برای کاهش میکروب های بی هوازی به خصوص کلستریدیوم انجام شد. برای تجزیه و تحلیل داده ها از آزمون کای اسکوئر و نرم افزار SPSS استفاده شده و موارد  $p < 0/05$  معنی دار در نظر گرفته شد.

**یافته ها:** نتایج نشان داد که حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) برای باکتری کلستریدیوم برابر ۲۵۰ میلی گرم بر لیتر است. حداقل غلظت کشندگی (MBC) در اسانس بنه برای باکتری کلستریدیوم برابر ۵۰۰ میلی گرم در لیتر بود. در غلظت ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر اسانس میوه بنه بر روی باکتری کلستریدیوم پرفرنجنس در نمونه های سوسیس تولیدی اثر کشندگی داشت.

**نتیجه گیری:** اسانس میوه درخت بنه بر روی باکتری کلستریدیوم پرفرنجنس دارای خاصیت باز دارندگی در محیط آزمایشگاهی و در سوسیس های تولیدی داشته، ولی بر روی طعم آن اثر مثبتی نداشته که این مسئله را می توان با خالص سازی و رنگ بری حل کرد، و یا از آن می توان به عنوان دارو و درمان عفونت یا مسمومیت ناشی از این باکتری استفاده کرد.

**واژگان کلیدی:** اسانس میوه درخت بنه، کلستریدیوم پرفرنجنس، حداقل غلظت بازدارندگی (MIC)، سوسیس، خصوصیات ارگانولپتیک

وصول مقاله: ۹۷/۶/۲۶ اصلاحیه نهایی: ۹۷/۹/۲۶ پذیرش: ۹۷/۱۲/۱

## مقدمه

گیاهان دارویی<sup>۱</sup> به گیاهانی گفته می‌شود که دارای مواد مؤثره<sup>۲</sup> مشخصی باشند و در درمان بیماری یا پیشگیری از بروز آن در انسان یا دام مورد استفاده قرار گیرند و همچنین نام آن‌ها در یکی از فارماکوپه‌های<sup>۳</sup> معتبر بین المللی ذکر شده باشند (۱).

از زمانهای قدیم تاکنون گیاهان دارویی به دلیل داشتن اسانس، نقش مهمی در سلامتی انسان داشته اند. گیاهان دارویی از منابع مهمی هستند که از گذشته‌های دور مورد توجه انسان بوده‌اند و با افزایش آگاهی‌ها و پیشرفت علوم، اطلاعات پیرامون گیاهان دارویی افزایش یافته است. تحقیقات امروزی نشان داده است که ترکیبات مختلف با اثرات متفاوتی در گیاهان وجود دارد و در اکثر موارد اثرات درمانی گیاه مربوط به این ترکیبات می‌باشد (۲). تجربه چند دهه اخیر نشان داده است که مواد صناعی با تمام کارایی‌های مورد توجه، اثرات نامطلوب و ناخواسته بسیاری به همراه دارند و به همین دلیل توجه محققان به تحقیقات و آزمایشات بر روی گیاهان برای جایگزین کردن آنها معطوف گشته است. گیاهان دارویی به علت وجود مواد مؤثره طبیعی و همراه بودن این مواد مؤثره با مواد دیگر تعادل بیولوژیک ایجاد کرده و از انباشته شدن مواد دارویی در بدن جلوگیری می‌کنند. عوارض جانبی کم و یا فقدان عوارض جانبی داروهای با منشأ گیاهی در دهه‌های اخیر، توجه جهانیان و محققان به این داروها را به خود جلب کرده است (۳).

درخت بنه به عنوان منبع تولید رزین (صمغ) یکی از گونه‌های رستنی در سلسله جبال زاگرس و بویژه استان

کردستان مطرح می‌باشد (۴). نتایج بررسی‌ها نشان می‌دهد که رزین گونه‌های پیستاسیا<sup>۴</sup> بر روی باکتری‌های مختلفی از گرم مثبت و منفی حتی کپک و مخمر اثر کشندگی دارد (۵).

اگر چه داروهای شیمیایی به‌طور سریع اثر بخشند، ولی اکثر آنها عوارض جانبی نامطلوبی بر بدن انسان بر جای می‌گذارند. در حالی که مواد دارویی حاصل از گیاهان با آن که به تدریج تأثیرگذار می‌باشند، دارای اثرات مفیدی بوده و چندان اثرات جانبی ندارد. مواد مؤثره گیاهان، به-خصوص عطریات و اسانس‌ها، موارد استفاده متعدد و متفاوتی در صنایع لوازم آرایش، صنایع مواد شیمیایی خانگی دارند، به‌طوری که بدون حضور مواد مؤثره مذکور، ساخت و تهیه بسیاری از محصولات امکان‌پذیر نخواهد بود (۶).

در حال حاضر در ایران بیش از پنج هزار واحد عطاری فعالیت دارند و حدود صد تا دویست گونه گیاهی موجود در ایران نیز به عنوان داروی گیاهی برجسته شناخته شده و توسط وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی برای تهیه و تولید گیاهان دارویی معرفی شده است (۷).

مدل‌های مختلفی در مطالعات گوناگون به منظور بررسی اثرات ضد باکتریایی و نگهدارندگی اسانس‌های گیاهی استفاده شده است. در برخی از این روش‌ها از مدل‌های آزمایشگاهی مثل محیط کشت و در برخی دیگر از مدل‌های غذایی برای بررسی اثرات ضد باکتریایی اسانس‌ها استفاده شده است (۸-۱۱).

در واقع قرن‌ها است که مواد مؤثره استخراج شده از گیاهان و ادویه‌ها توسط مصریان باستان و کشورهای آسیایی مانند چین و هند استفاده می‌شوند، اما در طول سال‌های اخیر کاربردهای دارویی این ترکیبات نسبت به ایجاد طعم و بو

<sup>1</sup> Medicinal plants

<sup>2</sup> Active substances

<sup>3</sup> Pharmacopoeia

<sup>4</sup> Pistacia

محیط کشت رین فورست کلستریدیوم براث<sup>۷</sup> (RCB) ۳٫۸ گرم از پودر این محیط کشت را در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل گردید و سپس ظرف به خوبی تکان داده شد تا زمانی که پودر به طور کامل حل گردید. سپس سرارلن را با پنبه و فویل الومینیومی پوشانده و روی حرارت گذارده تا بجوشد و کاملاً یک نواخت شود. سپس محلول اتوکلاو شد.

فعال سازی سوش باکتری:

سوش باکتری کلستریدیوم پرفرنجنس با کد PTCC 1765 و ATCC 13124 و با تاریخ تولید ۹۴/۸/۲۵ از مرکز منطقه ای کلکسیون فارچ ها و باکتری های صنعتی ایران خریداری شد و با توجه به دستورالعمل ارسالی توسط خود سازمان تامین کننده سوش باکتری در محیط کشت تعیین شده توسط سازمان (RCB) ۵۷ فعال و کشت داده شد. بدین صورت که ابتدا آمپول حاوی میکروارگانیسم مورد نظر با احتیاط کامل در شرایط استریل و در زیر هود لامینار فلو شکسته شد. سپس با استفاده از سمپلر حدود نیم میلی لیتر از محیط کشت مایع استریل مناسب (رین فورست کلستریدیوم براث) به آن اضافه شد تا سوسپانسیون باکتری حاصل شود. سپس بخش اعظم سوسپانسیون حاصل شده از باکتری، به محیط کشت رین فورست کلستریدیوم براث منتقل گردید و مقدار کمی از سوسپانسیون نیز به محیط رین فورست کلستریدیوم آگار که توسط سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران در مورد این سویه پیشنهاد شده بود، منتقل شد. سپس به جاری هوازی همراه با گاز پیک مرطوب در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس به مدت ۴۸ ساعت گرم خانه گذاری شد.

از کلنی های تشکیل شده با روش های کشت خطی و با بکار گیری محیط کشت اختصاصی کشت تهیه گردید و سپس جهت اطمینان بیشتر از باکتری رنگ آمیزی گرم

توسط آنها در درجه دوم اهمیت قرار گرفته است، با این وجود در حال حاضر همچنان در هند برخی از ادویه ها مانند میخک، دارچین، خردل، سیر، زنجبیل و نعنا به عنوان نسخه های سلامتی استفاده می شوند (۱۲). با توجه به عدم مطالعه اسانس شیره بنه بر روی کلستریدیوم پرفرنجنس در محصولات گوشتی، این مطالعه با هدف بررسی اثرات ضدباکتریایی اسانس میوه درخت بنه بر روی باکتری کلستریدیوم پرفرنجنس<sup>۵</sup> در محیط آزمایشگاهی و سوسیس انجام شده است.

### روش بررسی

این مطالعه از نوع تجربی و آزمایشگاهی و برای تعیین خاصیت ضد باکتریایی اسانس میوه درخت بنه از روش filter paper disc diffusion Method برای تعیین قطر هاله رشد و برای تعیین فاکتور MIC و MBC از روش Liquid broth culture استفاده گردید.

جمع آوری و خشک کردن گیاه:

ابتدا میوه درخت از ارتفاعات کردستان در ماه اردیبهشت جمع آوری و به هرباریوم مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان کردستان انتقال داده شدند، تا از نظر گیاه شناسی تایید شوند. سپس نمونه های به روش خشک کردن طبیعی به مدت ۲ - ۳ هفته در سایه و هوای آزاد خشک شدند.

اسانس گیری:

اسانس گیری با استفاده از روش تقطیر با آب<sup>۶</sup> با استفاده از دستگاه کلونجر (British Pharmacopea) انجام شد.

محیط های کشت

آماده سازی محیط کشت بر طبق دستورالعمل تجاری نوشته شده بر روی بسته صورت گرفت. به عنوان مثال جهت تهیه

<sup>5</sup> Clostridium perfringens

<sup>6</sup> Hydrodistillation

<sup>7</sup> Reinforced Clostridial Broth(RCB)

کیلوگرم ادویه و مقداری یخ نیز به گوشت اضافه کرده و پس از مخلوط شدن در کاتر، ۱۵ کیلوگرم آرد و ۴ کیلوگرم گلوتن همراه مقدار دیگری یخ به مخلوط درون کاتر اضافه شد. پس از اینکه خمیر درون کاتر به خوبی مخلوط و یکدست شد، ۲۰ گرم پودر اسید آسکوربیک را در مقداری کمی آب حل کرده و به امولسیون تشکیل شده در کاتر اضافه شد. امولسیون حاصل خمیری یک دست و روان بوده و دمای آن در پایان کار حداکثر ۱۲ درجه سلسیوس بود. مخلوط فارش سوسیس در کارخانه بیستون کرمانشاه تهیه و به آزمایشگاه انتقال یافت. از فارش سوسیس بدون نیترات مقدار ۳۰۰ گرم با ۳۰ میلی لیتر سوسپانسیون حاوی کلستریدیوم پرفرنجنس باکتری مخلوط و بر روی محیط پلیت کانت آگار کشت داده شد. از مخلوط آلوده فوق نیز به منظور کنترل غلظت کلستریدیوم پرفرنجنس در محیط کشت سولفیت پلی میکسین سولفادiazین آگار<sup>۱۰</sup> (SPS agar) کشت به عمل آمد. در مرحله بعد تحت شرایط استریل، ۹۰ گرم از مخلوط فارش آلوده، تزریق و به آن 80PPM نیترات سدیم به عنوان شاهد اضافه و به طور کامل مخلوط شد. سپس ۹۰ گرم از مخلوط فارش آلوده توزین و به آن ۹ گرم پودر اسانس بنه اضافه و به طور کامل مخلوط شد. تمامی نمونه ها در اندازه های ۱۰ گرمی در ظروف مورد نظر پر و به یخچال ۶ درجه سلسیوس انتقال داده شدند. در در دوره های زمانی صفر (روز اول انجام کار و پس از تلقیح) ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، از هر تیمار ۳ نمونه گرفته شده و به منظور اندازه گیری رشد کلستریدیوم پرفرنجنس و شمارش کلی، محیط کشت سولفیت پلی میکسین سولفادiazین آگار و محیط پلیت کانت آگار کشت مخلوط انجام شد، و سپس به مدت ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۳۰ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شدند. به منظور شمارش و شناسایی میکروارگانیسم از کلنی کانترا مدل FunkeGerbe استفاده شد.

صورت گرفت و در زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت محیط کشت های مادر و ذخیره به منظور استفاده های بعدی در یخچال نگهداری شدند.

تعیین حداقل غلظت مهاري (MIC)<sup>۸</sup> و حداقل غلظت کشندگی (MBC)<sup>۹</sup>

جهت انجام آزمایشات کمی برای تعیین MIC و MBC از اسانس ها رقت های مورد استفاده در روش ۱۳ لوله ای که دارای سه لوله کنترل و ۱۰ لوله رقت اسانس در محیط مولر هیتون برات و یا محیط برات پیشنهادی توسط مرکز کلکسیون فارچ و باکتری که سوش خالص از آنها خریداری شده بود، تهیه گردید. سپس به هر کدام از رقتها به ازای هر میلی لیتر محیط مایع،  $1 \times 10^6$  CFU/ml باکتری فعال اضافه گردید. در کنار لوله ها از کنترل مثبت (محیط کشت حاوی باکتری بدون اسانس) و کنترل منفی (محیط کشت بدون باکتری) استفاده گردید. در نهایت لوله ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه و سپس نتایج قرائت گردید. برای هر کدام از اسانس ها آخرین رقتی که در آن هیچگونه کدورتی مشاهده نگردید (نشان دهنده عدم رشد) به عنوان MIC در نظر گرفته شد و از تمام لوله های بدون کدورت بر روی محیط مولر- هیتون آگار کشت داده شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتیگراد آخرین رقتی از اسانس ها که قادر به مرگ ۹۹٪ در صد از باکتریهای زنده اولیه بود به عنوان MBC در نظر گرفته شد (۹).

روش تهیه فارش سوسیس

برای تهیه یک فارش ۱۰۰ کیلو گرمی ۴۰ کیلو گرم گوشت قرمز چرخ کرده و ۱۰ گرم نیتريت سدیم که در مقدار کمی آب حل شده بود در کاتر مخلوط شد. پس از آن مقداری یخ پولکی به مخلوط درون کاتر اضافه و در مرحله بعد ۱ کیلو نمک طعام را با ۴۰ گرم پودر پری فسفات سدیم مخلوط کرده و به گوشت اضافه شد. سپس ۱

<sup>10</sup> Sulfite Polymyxin Sulfadiazine Agar (SPS agar)

<sup>8</sup> Minimal Inhibitory Concentration

<sup>9</sup> Minimal Bactericidal Concentration

روش تجزیه و تحلیل اطلاعات: بر روی همه نمونه ها در چهار زمان نگهداری آزمون های میکروبی انجام شد (علاوه بر روز صفر) ۵، ۱۵، ۱۰ و ۲۰ روز. برای تجزیه و تحلیل داده ها از آزمون کای اسکوتر و نرم افزار SPSS استفاده شده و موارد  $p < 0/05$  معنی دار در نظر گرفته شد.

**یافته ها**

این مطالعه در سه مرحله انجام گرفت در مرحله اول اسانس گیری از میوه گیاه بنه به منظور تعیین کارایی ضد میکروبی به خصوص ضد کلستریدیوم پرفرنجنس انجام گرفت. در مرحله دوم تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشنده (MBC) بود. در مرحله بعد افزودن اسانس ها در غلظت حداقل غلظت کشنده به نمونه های سوسیس حاوی میکروارگانسیم کلستریدیوم پرفرنجنس در غلظت نیم مک فارلند بدست آمده با روش

OD<sub>600</sub> قدرت کشندگی در شرایط فرآیند در طول دوران نگهداری مورد ارزیابی قرار گرفت. در نهایت سوسیس های تولیدی در اختیار گروه پانلیست برای بررسی خواص حسی قرارداد شد.

نتایج ارزیابی فعالیت ضد میکروبی اسانس بنه بر باکتری کلستریدیوم پرفرنجنس

حداقل غلظت مهارکننده رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)

نتایج بررسی حداقل غلظت بازدارنده اسانس بنه بر روی باکتری کلستریدیوم پرفرنجنس مورد مطالعه نشان داد که حداقل غلظت بازدارنده باکتری کلستریدیوم پرفرنجنس ۲۵۰ میلی گرم بر لیتر و حداقل غلظت کشندگی، ۵۰۰ میلی-گرم بر لیتر بود (جدول ۱). این نتایج نشان می دهد که اسانس استخراج شده از این گیاه دارای خاصیت ضد میکروبی روی باکتری نام برده بوده و توانایی استفاده به صورت تجاری و دارویی را دارا می باشد

جدول ۱: تعیین میزان MIC و MBC باکتری کلستریدیوم پرفرنجنس در حضور اسانس گیاه بنه (نتایج برگرفته از سه تکرار می باشد)

Tube	میلی گرم بر لیتر	MIC	MBC
۱	2000	-	-
۲	1000	-	-
۳	۵۰۰	-	-
۴	۲۵۰	-	+
۵	۱۲۵	±*	+
۶	۶۲٫۵	+	+
۷	۳۱٫۲۵	+	+
۸	۱۵٫۶۲۵	+	+
۹	۷٫۸۱۲۵	+	+
۱۰	۳٫۹۰۶۳	+	+
کنترل میکروب		+	+
کنترل محیط کشت		-	-
کنترل اسانس میکروبی		-	-

\* نشان دهنده مشاهده ممانعت میکروبی در حد کمتر از ۵۰ درصد (یک تکرار از سه تکرار) می باشد ( $P > 0.05$ ).

اثر متقابل تیمارهای اصلی انواع نمونه و مدت زمان نگهداری از لحاظ ویژگی لگاریتم تعداد کلستریدیوم پرفرنجنس باقی مانده معنی دار نمی باشد و بین تیمار اصلی مدت زمان نگهداری از لحاظ ویژگی لگاریتم تعداد کلستریدیوم پرفرنجنس باقی مانده در سطح ۱ درصد ( $P < 0.01$ ) اختلاف معنی دار وجود دارد.

برای تولید سوسیس ها به همه نمونه ها بر اساس OD $600$  بدست آمده به میزان نیم مک فارلند به سوسیس ها میکروارگانیزم کلستریدیوم پرفرنجنس افزوده شد. نتایج بدست آمده نشان می دهند که مدل انتخابی و تیمار اصلی انواع نمونه برای تحلیل داده های بدست آمده از لحاظ ویژگی تعداد کلستریدیوم پرفرنجنس باقی مانده مورد بررسی در سطح ۵ درصد ( $P < 0.05$ ) معنی دار می باشند و

جدول ۲: مقایسه میانگین تیمار مدت زمان نگهداری از لحاظ ویژگی های تحت بررسی در سوسیس های تولیدی

نوع تیمار سوسیس	میانگین ویژگی های تحت بررسی
تعداد کلستریدیوم پرفرنجنس باقی مانده	
روز صفر	۵۴۳,۳۳۳±۲۴۸,۴۰۷ <sup>C</sup>
روز پنجم	۶۰۶,۶۶۷±۸۹,۷۶۶ <sup>BC</sup>
روز دهم	۶۹۳,۳۳۳±۶۰,۷۱۱ <sup>BC</sup>
روز پانزدهم	۷۳۹,۱۶۷±۹۸,۷۱۷ <sup>AB</sup>
روز بیستم	۸۶۰,۸۳۳±۱۱۹,۰۶۷ <sup>A</sup>

آزمایشگاهی ۱۰ نفر پانلیست سوسیس های تولیدی به همراه نمونه شاهد مصرف نمودند. لازم به ذکر است که امتیازات طوری داده شد که مطلوبت ترین امتیاز ۵ در یک سیستم ۵ نقطه ای و بدترین امتیاز ۱ را اخذ کرد.

نتایج جدول ۲ نشان می دهد که بین روزهای مختلف نگهداری از لحاظ کلیه ویژگی های تحت بررسی اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد ( $P < 0.05$ ) وجود دارد. برای بررسی خواص حسی انواع سوسیس های فرموله شده با اسانس میوه درخت بنه و انطباق این نتایج با نتایج

جدول ۳: مقایسه مجموع امتیازات داده شده خصوصیات حسی سوسیس های تحت تیمار

انواع سوسیس فرموله تولیدی	رنگ	بو	طعم	برش پذیری
شاهد (نمونه رایج)	۱۶,۵	۱۶,۵	۱۸,۵	۱۶
حاوی اسانس بدون نیتريت	۱۳,۵	۱۳,۵	۱۱,۵	۱۴

و نمونه سوسیس حاوی اسانس بدون نیتريت از نوع بدترین میباشد. پس این عدم مطلوبیت طعمی نسبت به نمونه رایج با توجه با خواص مطلوب ضد میکروبی بایستی با خالص سازی و رنگ بری بر طرف گردد.

نتایج موجود در جدول ۳ نشان می دهد که بین نمونه های سوسیس تولیدی از لحاظ خواص حسی تحت بررسی رنگ و بو و برش پذیری دارای اختلاف معنی دار نمی باشد ولی از لحاظ طعم کاملاً تفاوت معنی دار وجود دارد ( $P < 0.05$ ). نمونه سوسیس شاهد بهترین نمونه از لحاظ تمامی فاکتورها

فرجی و همکاران در تحقیقی نشان دادند که با افزایش مدت زمان نگهداری کشک میزان pH کاهش قابل توجهی داشته است. همچنین جمعیت استافیلوکوکوس اورئوس در مقایسه با کلستریدیوم بوتولینوم با سرعت بیشتری از بین می‌رود، در پایان روز بیست و یکم نگهداری، جمعیت استافیلوکوکوس اورئوس به صفر رسیده است. در نتیجه عصاره حاوی یک درصد موسیر هم به لحاظ کاهش رشد میکروبی و هم به لحاظ خصوصیات حسی و رنگ به عنوان مناسبترین نمونه انتخاب شد (۱۴).

بر اساس نتایج حنفی و همکاران، فعالیت ضد میکروبی، قطر هاله عدم رشد میکروارگانیسم های استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیاکلی (در غلظت ۵۰ mg/ml) و کلستریدیوم اسپروژنس در غلظت ۱۲۰ mg/ml به ترتیب  $0.4 \pm 1.3$ ،  $0.4 \pm 1.1$  و  $0.3 \pm 0.8$  تعیین شد، که استافیلوکوکوس اورئوس، بیشترین حساسیت و کلستریدیوم اسپروژنس بیشترین مقاومت را به اسانس شیره بنه نشان داد (۱۵).

همیشه از گیاهان و خواص درمانی آن‌ها برای در مان بیماری‌ها و یا به نوعی غلبه بر میکروب‌ها استفاده شده است. در تحقیقات متعددی که توسط دانشمندان مختلف انجام شده است این امر با بکارگیری گیاهان گوناگون برای نابودی میکروارگانیسم‌های مختلف به اثبات رسیده است. با توجه به تحقیقات انجام شده می‌توان از مواد ضد میکروبی که در گیاهان به خصوص در گیاهان معطر وجود دارد بر علیه باکتری‌ها در مواد غذایی استفاده کرد. از آنجایی که گیاه بنه دارای قسمت‌های مختلفی مانند برگ، ریشه، ساقه و میوه است تحقیقات جداگانه‌ای بر روی هر یک از اجزای و نیز خواص ضد میکروبی هر یک از آنها انجام شده است. بر همین اساس در تحقیق پیش رو از اسانس میوه بنه برای اثر بر روی کلستریدیوم پرفرنژنس استفاده شد که کل گیاه بنه مانند سایر قسمت‌های آن اثر ضد میکروبی داشت و باعث کنترل رشد میکروب مورد نظر و سایر میکروارگانیسم‌های باکتریایی شد.

## بحث

نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که حداقل غلظت بازدارندگی اسانس بنه بر باکتری کلستریدیوم پرفرنژنس مورد مطالعه برابر با ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر می‌باشد. جوان جبلی و همکاران (۱۳۹۳) در تحقیق خود به این نتیجه رسیدند حداقل غلظت بازدارندگی برای باکتری‌های گرم مثبت کمتر از باکتری‌های گرم منفی است. به عبارت دیگر گرم مثبت‌ها نسبت به عمل آنتی‌باکتریال اسانس‌ها حساس‌ترند. علت حساسیت کمتر گرم منفی‌ها احتمالاً به علت وجود غشا خارجی در باکتری‌های گرم منفی است که سبب محدود شدن انتشار اجزا هیدروفوبیک اسانس به لایه لیپو پلی‌ساکاریدی می‌شود (۱۳).

در مطالعه دیگری والرو و همکارانش اثر ۱۱ اسانس گیاهی را بر روی باکتری اسپوردار باسیلوس سرئوس در کاروت برات در دمای زیر ۱۶ درجه سانتی‌گراد بررسی کردند و در مورد اثرات دارچین بیان شده است که اضافه کردن ۵ میکرولیتر از اسانس برای هر صد میلی‌لیتر کاروت برات در دمای کمتر از ۸ درجه سانتی‌گراد شرایطی را ایجاد می‌کند که به مدت ۶۰ روز باکتری قادر به رشد نمی‌باشد (۱۱).

بررسی اثر اسانس‌های گیاهی این مواد بر روی پاتوژنهای مهم منتقله از راه مواد غذایی نظیر سالمونلا اترتیدیس، اشریشیاکلی، گونه‌های شیگلا، باسیلوس سرئوس، استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا مونو سیتوژنز نشان دهنده تلاش محققان برای جایگزین کردن نگهدارنده‌های طبیعی مشتق از منابع گیاهی، حیوانی و میکروبی به جای نگهدارنده‌های شیمیایی می‌باشد (۵، ۹، ۱۱).  
حداقل غلظت کشندگی (MBC) در اسانس بنه برای باکتری کلستریدیوم برابر ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر بود. اگرچه بروز فعالیت ضد میکروبی بسیار روشن است، ولی مکانیسم عملاً به طور کامل درک نشده است.

### نتیجه گیری

با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق اسانس بنه به عنوان نگهدارنده طبیعی که دارای اثر بازدارندگی مناسبی بر روی باکتری کلوستریدیوم پرفرجنس در شرایط آزمایشگاهی و فرآورده های گوشتی می باشند، ولی بر روی طعم آن اثر مثبتی نداشته که این مسئله را می توان با خالص سازی و رنگ بری حل کرد. این نتایج نشان می دهد که اسانس استخراج شده از این گیاه دارای خاصیت ضد میکروبی روی باکتری نام برده بوده و توانایی استفاده به صورت تجاری و دارویی را دارا می باشد. با توجه به نتایج فوق می توان این اسانس را به عنوان یک ترکیب طبیعی ضد میکروب در محصولات غذایی و دارویی استفاده نمود

### تشکر و قدردانی

این مقاله نتیجه بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب مرکز تحقیقات میکروب شناسی مواد غذایی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران به شماره قرارداد ۳۱۶۴۹د می باشد. بدینوسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران که حامی مالی این طرح تحقیقاتی می باشند، کمال سپاسگذاری و تشکر را داریم.

این تحقیقات نشان داد این اسانس می تواند از رشد میکروارگانیزم های فوق ممانعت کنند. با توجه به تحقیق بالا بی اثر بودن عصاره ای در این تحقیق تا حدودی قابل توجه است که عصاره آبی فاقد ترکیبات موثر ضد باکتری می باشد. در واقع از گیاه بنه و گیاهان مشابه می توان برای تهیه غذاهای ارگانیک سود برد و به این وسیله از مواد نگه دارنده شیمیایی و مواد آنتی باکتریال که اثر سو بر سلامت دارند کمتر استفاده کرد. سوسیس یکی از انواع غذاها فرآورده های گوشتی هست که اگر به جای نیتريت از عصاره گیاهان استفاده شود، می تواند به عنوان غذاهای ارگانیک به بازار عرضه شوند، و یا به عنوان یک نگهدارنده طبیعی در مواد غذایی و یا به عنوان یک ترکیب ضد میکروبی برای عفونت های ناشی از این باکتری استفاده شود.

در این تحقیق ماده غذایی سوسیس بوده که حاوی روغن و ادویه های مختلف بوده است و در واقع محیط مورد استفاده چرب بوده است، در نتیجه عصاره که ترکیب روغنی می باشد به راحتی در آن حل شده و در کل بسته بندی به طور یکنواخت پخش شده، همچنین سوسیس در درجه حرارت یخچال ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد.

### References

1. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J Appl Microbiol* 1999;86:985-990.
2. Gutierrez J, Barry-Ryan C, Bourke P. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components. *Food Microbiol* 2009;26:142-150.
3. Alvarez R, Encina A, Pe ´rez Hidalgo N. Pistacia Terebinthus L. leaflets: an anatomical study. *Plant Systematics and Evolution* 2008; 272:107-118.
4. Del Campo J, Amiot MJ, Nguyen C. Antibacterial effect of rosemary extracts. *J Food Prot* 2000;63:1359-1368.
5. Ravanshad SH, Basiri E, Dastgheib B. Shirazi thyme essential oil concentration on antimicrobial activity of different bacteria, *Enterococcus faecalis*. *Shiraz Univ Dent J* 2007;8:28-36.
6. Amiri Aghdaei SF, Zareh Zardini H. Investigating the Factors Affecting the Improvement and Development of Medicinal Plants in Iran (Case Study: Esfahan City). *J New Market Res.* 2012;1(12):195-214.
7. Chamber of Commerce: Status of medicinal plants in the pharmaceutical industry. A Chamber of Commerce: 1376, Issue 12, pp :32-31.

8. Kout Soumanis K, Lambropoulon K, Nychas G JE. A predictive model for the nonthermal inactivation of *Salmonella enteritidis* in a food model system supplemented with a natural antimicrobial. *Int J Food Microbiol* 1999;49:63-74.
9. Soltan Dallal M M, Bayat M, Yazdi M H, Aghaamiri S, Ghorbanzadeh Meshkani M, Abedi Mohtasab T P et al . Antimicrobial effect of *Zataria multiflora* on antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from food. *SJKU*. 2012; 17 (2) :21-29.
10. Tassou C , Nychas G-JE. Antimicrobial activity of essential oil of mastic gum (*Pistacia lentiscus* var. *Chia*) on gram positive and gram negative bacteria in broth and in model food system. *Int Biodet Biodeg* 1995;36:411-420.
11. Valero M , Salmeron Mc. Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. *Int J Food Microbiol* 2003;85:73-81.
12. Serajoldini MF. Plant protection and medicine in ancient Iran. *Medical History*: 2010; 2 (2): 11 - 33.
13. Javan Jebelli A, M, Hamedani Ahmadi A, Bayan M, Keykhosravy K, Abdollahi Z, Kanani M. Antioxidant and antimicrobial effect of different mints ,the most widely used in Caspian sea areas, Iran. *J Vet Res Lab*.2014;6:93-102.
14. Farajii M , Roozbeh Nasiraie L , Farhoodi M. Antibacterial Effect of Ethanolic Extract Shallot (*Allium Hirtifolium*) on the *Clostridium botulinum* & *Staphylococcus aureus* and Organooleptic Propertise of Liquid Curd. *Iranian J Nutri Sci Food Tech* 2018; 82: 73-82.
15. Hanafi Q.M, Darvishi Sh, Dervishi N, Sayedin Ardebili S.M, Mirahamdi f. Antibacterial Properties of Embryonic Salt Essences on *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*. *SJKU* 2011;17: 1-11.