مجله تحقیقات دامپزشکی
دوره ۷۶، شماره۲، ۱۴۰۰، ۱۹۱-۱۷۹
مقاله پژوهشی

بررسی اثرات ضدمیکروبی اسانس‌های گیاهی دارچین، زنیان، آویشن باغی و فرمالدهید بر باکتری *سالمونلا انتریتیدیس*

آرش یارمحمدی[۱]، محسن فرخوی[۱]، علی میثاقی[۲]، سیدمحمد کیائی[۱]، ندا نفریه[۱]، عباس برین[۳]

[۱] گروه بهداشت و تغذیه دام و طیور، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
[۲] گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
[۳] گروه پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۶. اسفند ماه ۱۳۹۹، **تاریخ پذیرش:** ۲۵ اردیبهشت ۱۴۰۰
https://dorl.net/dor/20.1001.1.20082525.1400.76.2.5.5
10.22059/jvr.2020.286511.2954

چکیده

زمینهٔ مطالعه: امروزه یافتن بی‌خطرترین نگهدارنده برای حفظ خوراک طیور از آلودگی به سالمونلا حائز اهمیت بهداشتی و اقتصادی فراوانی است. *سالمونلا انتریکا* تحت گونه *انتریکا* سرووار *انتریتیدیس* عامل بیماری مشترک سالمونلوز در طیور می‌باشد که از طریق خوراک به پرنده منتقل می‌شود.

هدف: این مطالعه بررسی اثر ضد میکروبی اسانس دارچین، زنیان و آویشن باغی علیه باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* و مقایسه آن با فرمالدهید بود.

روش‌کار: در مطالعه حاضر حداقل غلظت مهار کننده رشد (Minimum inhibition concentration (MIC و حداقل غلظت کشنده باکتری (MBC) Minimum bactericidal concentration اسانس‌های دارچین، زنیان و آویشن باغی بر باکتری *سالمونلا آنتریتیدیس* و نیز تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس‌ها بر منحنی رشد باکتری مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: در مطالعه حاضر، MIC اسانس‌های زنیان، آویشن، دارچین و فرمالدهید برای باکتری *سالمونلا انتریتیدیس*، به ترتیب ۵۰۰، ۷۰۰، ۵۰۰ و ۷۰ میکرولیتر در لیتر و MBC آن‌ها برابر ۷۰۰، ۹۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰ میکرولیتر در لیتر بدست آمد. بررسی منحنی‌های رشد نیز نشان داد که همه تیمارها فاز تأخیری رشد را افزایش دادند. روند افزایشی تعداد باکتری نیز در غلظت‌های مختلف زنیان کندتر از گروه کنترل بود. اما این اختلاف در سایر تیمارها فقط در غلظت‌های ۱ و ۲ MIC مشاهده شد ($P<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری نهایی: نتایج نشان دادند که اسانس‌های زنیان با غلظت کمتر و آویشن باغی و دارچین با غلظت‌های بیشتر می‌توانند به عنوان جایگزین بخشی از فرمالین و یا تکمیل‌کننده اثر آن در ضدعفونی خوراک استفاده شوند.

کلمات کلیدی: اسانس گیاهی، *سالمونلا انتریتیدیس*، MIC، MBC، اثر ضدمیکروبی

کپی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است.

نویسنده مسئول: محسن فرخوی، گروه بهداشت و تغذیه دام و طیور، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
پست الکترونیکی: mfarkhoy@ut.ac.ir

مقدمه

در قرن حاضر، حفظ ایمنی ماده غذایی و کیفیت آن امری است که نه تنها توجه متخصصان صنعت غذا بلکه مسئولان سلامت کشورها را نیز به خود جلب کرده و بی‌توجهی یا کم‌توجهی به آن می‌تواند صدمات جبران‌ناپذیری را به جامعه وارد کند. چنانچه، بیماری‌های ناشی از مصرف غذاهای آلوده در همه جای دنیا حتی در کشورهای پیشرفته‌ای چون آمریکا هم یک مشکل اساسی به شمار می‌رود. طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی (WHO) بیماری‌های ناشی از مصرف غذا و آب آلوده، سالانه

جان ۲/۲ میلیون نفر را در جهان می‌گیرد که ۱/۹ میلیون نفر آن‌ها را کودکان تشکیل می‌دهند (۷). یکی از مهم‌ترین بیماری‌های ناشی از مصرف غذاهای فاسد، سالمونلوز می‌باشد که ۴۰ درصد از کل مسمومیت‌های غذایی را شامل می‌شود (۱۰). به گزارش سازمان بهداشت جهانی، در کشورهای در حال توسعه هر ساله از هر ۱۰۰۰ نفر، ۵ نفر به سالمونلوز مبتلا می‌شوند (۱۰) و در سال ۲۰۰۰، حداقل ۲ میلیون نفر در اثر اسهال ناشی از سالمونلوز جان خود را از دست داده‌اند (۴). در ایران، گوشت مرغ و تخم‌مرغ عمده‌ترین مواد غذایی انتقال‌دهنده این بیماری به انسان می‌باشند. سالمونلا از طریق خوراک آلوده به پرنده و در نهایت به مصرف کننده منتقل می‌شود. لذا، برای حفظ بهداشت خوراک از نگهدارنده‌های مختلفی استفاده می‌شود که یکی از رایج‌ترین آن‌ها فرمالین است که آن را به میزان ۰/۱ درصد به خوراک اضافه می‌نمایند (۸). Baron Ellen و همکاران در سال ۱۹۹۰ بخار فرمالدهید در دستگاه جوجه‌کشی، سبب کاهش ضریب تبدیل غذایی در جوجه‌های گوشتی می‌شود (۴). همچنین، در مطالعه دیگری تأثیر فرمالین روی کاهش تعداد باکتری‌های گرم منفی ایلئوم و نیز کاهش ضریب تبدیل غذایی در مرغ تخم‌گذار گزارش شده است (۲۲). به هر حال، این ترکیب مضراتی هم دارد. فرمالین علاوه بر مشکلاتی که برای سلامت کارکنان مزرعه به وجود می‌آورد و خطر ابتلا به سرطان را افزایش می‌دهد، موجب کاهش دسترسی پرنده به پروتئین جیره نیز می‌شود. زیرا، با اسید آمینه مهم و محدودکننده لیزین واکنش نشان داده و ارزش غذایی پروتئین جیره را کاهش می‌دهد و در نتیجه موجب کاهش عملکرد پرنده می‌شود (۶). در مطالعه‌ای استفاده از فرمالین به میزان ۱۰ کیلوگرم در تن یعنی بیش از ۱ درصد در خوراک جوجه‌های گوشتی سبب کاهش غذای مصرفی و در نهایت کاهش وزن بدن شد. امروزه به دلیل برخی آثار زیان‌بار فرمالینی که از طریق خوراک یا تنفس وارد بدن پرنده و انسان می‌گردد، در برخی کشورها از جمله کشورهای عضو اتحادیه اروپا، ژاپن و نیوزیلند، استفاده از فرمالین و ترکیبات آن در خوراک طیور ممنوع شده است (۳). گذشته از این، با توسعه دانش بشری، مصرف‌کنندگان دیگر به ایمنی مواد غذایی حاوی نگهدارنده‌های شیمیایی، اطمینان ندارند و به مصرف مواد غذایی طبیعی که در آن‌ها از نگهدارنده‌های طبیعی استفاده شده است، گرایش پیدا کرده‌اند (۳). از جمله ترکیبات طبیعی که می‌توانند به‌عنوان نگهدارنده در خوراک طیور مورد استفاده قرار گیرند، اسانس‌های گیاهی می‌باشند (۷). اسانس‌های گیاهی ترکیبات معطر، آب‌گریز، تغلیظ‌شده و فراری هستند که در سلول‌ها و کرک‌های ترشحی منفرد یا مجتمع، غده‌های ترشحی و مجاری ترشحی قسمت‌های سطحی و درونی اندام‌های مختلف از جمله: برگ، گل، میوه، جوانه و شاخه‌های گیاهان وجود دارند. آن‌ها مخلوطی از ترکیبات فرار تولید شده توسط ارگانیسم‌های زنده می‌باشند که توسط روش‌های فیزیکی چون عصاره‌گیری و تقطیر کل گیاه، یا بخش‌های خاصی از آن به دست می‌آیند (۲۹). دلیل اصلی تشکیل اسانس‌ها به‌خوبی مشخص نیست. اما، این ترکیبات به‌طورکلی بازمانده‌های ناشی از فرایندهای اصلی متابولیسم گیاهان می‌باشند که عمدتاً تحت تأثیر تنش‌ها به وجود آمده‌اند و از نظر شیمیایی همگن نبوده و به صورت‌های مختلف اغلب با منشأ ترپنی مشاهده می‌شوند (۳). عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی به‌دست آمده از گیاهان معطر دارای خاصیت ضدباکتریایی، ضدقارچی، ضداکسایشی و ضدسرطانی بوده و قادر هستند رشد پاتوژن‌ها و تولید سم را در خوراک کنترل نمایند (۳۵). امروزه، با تمایل بشر برای تولید محصولات ارگانیک اهمیت شناخت علمی این مواد دو چندان شده است (۷) و مطالعات مختلفی در رابطه با اثر میکروبی اسانس‌های مختلف از جمله زنیان، مرزنجوش، آویشن، مرزه و دارچین روی برخی از باکتری‌های مهم مواد غذایی صورت گرفته است. Khosravipour و Rezaeian-Doloei در سال ۲۰۱۶ اثر فعالیت ضد باکتریایی اسانس زنیان را بر باکتری *ای‌کولای* تأیید نمودند (۱۳). در مطالعه‌ای که توسط Mahboubi و Feizabadi در سال ۲۰۰۹ انجام شد اثر ضدمیکروبی اسانس‌های مرزنجوش، آویشن و مرزه اثبات گردید (۱۶). مطالعه‌ای که توسط Jebelli Javan در سال ۲۰۱۶ درباره اثر اسانس‌های زنیان و آویشن شیرازی به‌تنهایی و یا ترکیبی بر برخی باکتری‌های آلوده‌کننده مواد غذایی صورت پذیرفت اثر مثبت آن‌ها ثابت و میزان MIC اسانس زنیان در برابر باکتری‌های *اشرشیاکلی*، *سالمونلا تیفی‌موریوم*، *لیستریا مونوسیتوژنز*، *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس*

تعیین گردید (۱۱). همچنین نشان داده شد که دارچین و آویشن می‌توانند مانع رشد باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* در مواد غذایی شوند (۳۳).

اما، با توجه به اینکه فرمالین هنوز به‌عنوان ضدعفونی‌کننده خوراک طیور صنعتی در ایران مورد استفاده قرار می‌گیرد و در بررسی منابع انجام شده توسط نگارنده، مطالعه‌ای در خصوص مقایسه اثر این ترکیب شیمیایی با اسانس‌های گیاهی آویشن باغی، زنیان و دارچین یافت نگردید، در مطالعه حاضر، اثر غلظت‌های مختلف اسانس‌های آویشن باغی (*Thymus vulgaris*)، زنیان (*Trachyspermum copticum*) و دارچین (*Cinnamomum zeylanicum*) در مقابل فرمالین بر حداقل غلظت کشندگی و بازدارندگی باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* و میزان MIC و MBC آن‌ها در این رابطه مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌کار

اسانس‌های آویشن باغی، زنیان و دارچین از شرکت پارس ایمن دارو تهیه و قبل از انجام آزمایش میزان مواد مؤثره آن‌ها به روش GC/MS در آزمایشگاه جهاد تعیین گردید. برای این منظور از دستگاه مدل Agilent HP-6890 با ستون HP-5MS به ارتفاع ۳۰ متر و قطر داخلی ۲۵۰ میکرون استفاده شد. ابتدا دما به مدت ۵ دقیقه بر روی ۵۰ درجه سانتی‌گراد ثابت نگه داشته شد. سپس، با سرعت افزایشی ۳ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه به ۲۴۰ درجه سانتی‌گراد رسید. در مرحله آخر، دما با سرعت ۱۵ درجه سانتی‌گراد در دقیقه به ۲۹۰ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت و مجدداً برای مدت ۳ دقیقه ثابت ماند. گاز هلیم با سرعت عبور ۰/۸ میلی‌لیتر در دقیقه به‌عنوان حامل مورد استفاده قرار گرفت و نمونه‌ها به‌صورت دستی به میزان ۱ میکرو لیتر به دستگاه تزریق شدند. درصد نسبی هر ترکیب با استانداردسازی سطح زیر منحنی آن در کروماتوگرام حاصل از کروماتوگرافی گازی به دست آمد (۱).

باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* (ATCC۱۳۰۷۶) مورد استفاده در این مطالعه از آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه گردید. این باکتری در محیط آبگوشت BHI (Brain heart infusion) کشت داده شد و سپس به نسبت ۱ به ۵ با گلیسرول مخلوط و در حجم‌های ۵۰۰ میکرولیتری در میکروتیوب‌های اپندورف در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. جهت آماده‌سازی، باکتری‌ها به مدت ۱۸ ساعت در لوله آزمایش حاوی محیط کشت آبگوشت BHI براث در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. قبل از انجام آزمایش نیز، برای تهیه محلول کار تازه، باکتری‌ها برای مدت ۲۴ ساعت دیگر در محیط کشت آبگوشت BHI براث در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردیدند (۴).

برای تعیین دز تلقیح باکتری، سوسپانسیون استاندارد ۰/۵ مک فارلند حاوی باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* که دارای جذب نوری معادل ۰/۱- ۰/۰۸ در طول موج ۶۰۰ نانومتر می‌باشد (معادل استاندارد ۰/۵ مک فارلند)، تهیه گردید. بدین منظور، دستگاه اسپکتروفتومتر روی طول موج ۶۰۰ نانومتر تنظیم و جذب نوری آن با آبگوشت BHI استریل به‌عنوان شاهد کالیبره گردید. با تغییر غلظت محلول کار حاوی باکتری تا زمانی که میزان جذب نوری دستگاه به ۰/۱ رسانده شود، محلول معادل استاندارد ۰/۵ مک فارلند به دست آمد و تعداد باکتری‌های آن به روش کشت تعیین گردیدند. بدین منظور، از آن توسط آب پپتونه ۰/۱ درصد رقت‌های مختلف تهیه و در محیط کشت آگار BHI کشت سطحی داده شد و شمارش کلونی‌ها در پلیت‌هایی که دارای ۳۰ تا ۳۰۰ کلونی بودند، صورت پذیرفت. این کار ۳ بار تکرار و میانگین تعداد باکتری‌ها محاسبه گردید (۱۷).

برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC)، از روش ماکرودایلوشن استفاده شد (۲). بدین‌منظور، غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰، ۶۰۰، ۷۰۰، ۸۰۰، ۹۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میکرولیتر در لیتر از اسانس‌های آویشن، زنیان، دارچین و غلظت‌های ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰ و ۱۰۰ میکرولیتر در لیتر از فرمالین در لوله‌های حاوی محیط کشت آبگوشت BHI به‌صورت دو تکرار تهیه شد و رقتی از سوسپانسیون باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* به لوله‌ها اضافه شد تا غلظت نهایی 1×10^{5} CFU/ml به‌دست آید. لوله‌های کنترل منفی که حاوی

محیط کشت محتوی اسانس یا فرمالین و فاقد تلقیح باکتریایی بود نیز در نظر گرفته شد. لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. سپس، رشد میکروب و کدورت لوله‌های حاوی باکتری با لوله‌های کنترل به روش چشمی مقایسه گردید. لوله‌های واجد کدورت از لحاظ رشد، مثبت تلقی شدند. کمترین غلظتی از اسانس و فرمالین که از رشد باکتری جلوگیری نموده بودند (اولین لوله شفاف) به‌عنوان MIC آن تیمار در نظر گرفته شد. برای مشخص نمودن حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC) از رقت‌هایی که کدورتی در آن‌ها مشاهده نشده بود، در محیط کشت آگار BHI کشت سطحی داده شد و پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه گرمخانه‌گذاری گردیدند. اولین پلیت فاقد کلونی به‌عنوان حداقل غلظت کشندگی تعیین شد. کل آزمایش دو بار تکرار شد (۲).

جهت تعیین منحنی رشد باکتری سالمونلا، به ترتیب غلظت‌های مساوی ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۲۰۰ درصد حداقل غلظت بازدارندگی اسانس‌ها و فرمالین تهیه و رقتی از سوسپانسیون *سالمونلا آنترتیدیس* تلقیح گردیدکه غلظت نهایی که حاوی 10^5 بدست آید و CFU/ml داخل گرمخانه دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. سپس، به ترتیب در زمان‌های ۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲ و ۲۴ ساعت از گرمخانه‌گذاری در پلیت‌های حاوی محیط کشت آگار BHI کشت داده شدند و بعد از گذشت ۲۴ ساعت از گرمخانه‌گذاری (دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد) باکتری‌ها شمارش و در نهایت منحنی‌های رشد ترسیم گردیدند.

با استفاده از نرم‌افزار Graphpad prism 8.0.2 نمودارهای مربوط به منحنی رشد ترسیم گردید و شیب منحنی‌ها اندازه‌گیری با هم مقایسه شد. داده‌های مربوط به تعداد باکتری‌ها نیز با استفاده از نرم‌افزار MINITAB ۱۷,۳,۱ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند و میانگین‌ها با استفاده از آزمون Tukey مقایسه و معنی‌داری آن‌ها در سطح ۵ درصد تعیین شد.

نتایج

درصد اجزای تشکیل‌دهنده اسانس زنیان که با استفاده از روش کروماتوگرافی گازی به‌دست آمد به‌طور خلاصه در جدول ۱ نشان داده شده است.

در مطالعه حاضر، ۹ ترکیب مختلف در زنیان شناسایی شد. عمده‌ترین ترکیب آن تیمول به میزان ۳۹/۵۵ درصد و سایر ترکیبات مهم شامل ترپینن به میزان ۳۷/۶۹ درصد و سایمن به میزان ۱۹/۱۷ درصد بود.

در مورد دارچین ۲۱ نوع ترکیب مختلف شناسایی شدند (جدول ۲). عمده‌ترین ترکیب موجود در دارچین، سینمالدهید به میزان ۶۲/۰۶ درصد و سایر ترکیبات مهم آن اوژنول به میزان ۷/۴۹ درصد و لینالول به میزان ۴/۸۴ درصد بود. درصد اجزای تشکیل‌دهنده اسانس آویشن باغی (۱۴ نوع ترکیب) نیز در جدول ۳ نمایش داده شده است که بیشترین آن به تیمول به میزان ۵۳/۹۶ درصد مربوط شد. سایر ترکیبات اسانس آویشن گاما ترپینن به میزان ۲۰/۴۵ درصد و پرنیتن به میزان ۱۸/۶۲ درصد بود.

حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) هر یک از اسانس‌های دارچین، آویشن و زنیان و فرمالین در جدول ۴ نشان داده شده است.

حداقل غلظت بازدارندگی اسانس دارچین برای باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* ۵۰۰ میکرولیتر در لیتر بود که با زنیان مشابهت داشت. آویشن باغی توانست در غلظت ۷۰۰ میکرولیتر در لیتر رشد باکتری را مهار کند و این در حالی است که فرمالین توانست در غلظت ۷۰ میکرولیتر در لیتر از رشد باکتری جلوگیری نماید. حداقل غلظت کشندگی اسانس زنیان بر باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* ۷۰۰ میکرولیتر در لیتر بود. پس از آن آویشن باغی با غلظت ۹۰۰ میکرولیتر در لیتر و در آخر دارچین با غلظت ۱۰۰۰ میکرولیتر در لیتر قرار داشتند و کمترین میزان MBC به فرمالدهید (۲۰۰ میکرولیتر در لیتر) مربوط بود.

جدول ۱. ترکیب شیمیایی اسانس زنیان.

اجزای تشکیل‌دهنده	غلظت (درصد)	زمان بازداری (دقیقه)
Thymol	۳۹/۵۵	۲۲/۶۶۳
gamma-Terpinene	۳۷/۶۹	۱۱/۲۳۷
Cymene	۱۷/۱۹	۹/۶۴۰
trans-beta-Ocimene	۱/۲	۱۰/۵۷۹
Alfa-Terpinolene	۰/۵۷	۱۲/۲۵۳
Ethyltetramethylcyclopentadiene	۰/۳	۲۳/۳۷۶
Trans-Anethole	۰/۳	۲۱/۶۵۱
beta-phellandrene	۰/۲۶	۹/۷۲۷
alpha-Terpinene	۰/۱۷	۹/۱۸۸
مجموع	۹۶/۵	

جدول ۲. ترکیب شیمیایی اسانس دارچین.

اجزای تشکیل‌دهنده	غلظت (درصد)	زمان بازداری (دقیقه)
Cinnamahdehyde	۶۲/۰۶	۱۹/۴۴۳
Cinnamaldehyde Dimethyl Acetal	۸/۱۴	۲۶/۷۹۱
Eugenol	۷/۴۹	۲۵/۲۵۶
Linallol L	۴/۸۴	۱۳/۰۲۴
Trans-Cinnamyl Acetate	۴/۰۷	۱۷/۰۲۴
Alpha Terpenol	۳/۲۲	۳/۲۲
1,8-Cineole	۱/۱	۹/۷۵۲
(1S,2R,4R,8R) -1,2:8,9-diepoxy-p-menthane	۰/۸۸	۰/۸۸۰
(E)-Cinnamahdehyde	۰/۷۶	۱۸/۱۹۰
Isoterpinolene	۰/۴۸	۱۷/۲۵۰
Limonene Dioxide	۰/۴۸	۲۲/۶۷۳
1-Methyl-2-cyano-3-ethyl-1-piperideine	۰/۳۹	۱۸/۷۷۵
cis-Ocimenone	۰/۳۵	۲۲/۹۹۶
Delta 3-Carene	۰/۳۲	۸/۹۰۵
trans-caryophyllene	۰/۳۲	۲۷/۲۳۸
Aceteugenol	۰/۲۷	۳۱/۱۱۵
Benzene,1-methyl-4-(1-methylethyl)	۰/۲۵	۹/۵۱۱
Propanal,2-methyl-3-phenyl	۰/۲۳	۱۹/۲۱۲
Carvone	۰/۱۶	۱۹/۴۴۳
gamma-Terpinene	۰/۱۳	۶/۱۵۸
Isoborneol	۰/۱۲	۱۵/۷۰۴
مجموع	۹۶/۰۲	

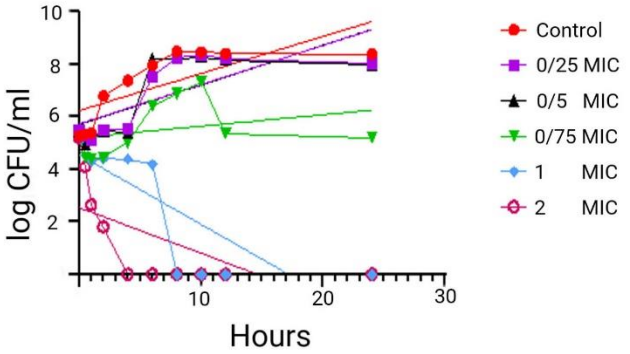
جدول ۳. ترکیب شیمیایی اسانس آویشن باغی.

اجزای تشکیل‌دهنده	غلظت (درصد)	زمان بازداری (دقیقه)
Thymol	۵۳/۹۶	۲۲/۵۶۵
gamma-Terpinene	۲۰/۴۵	۱۱/۰۵۲
Prehnitene	۱۸/۶۲	۹/۵۶۸
Carvacrol	۲/۲۴	۱۴/۲۳۸
2-Beta-Pinene	۱/۱۶	۷/۵۹۶
Alpha-pinene	۰/۶۸	۶/۱۲۷
beta-Myrcene	۰/۵۸	۸/۱۵۵
beta-phellandrene	۰/۵۸	۹/۶۶۵
alpha-Terpinene	۰/۵۴	۹/۱۴۱
alpha-thujene	۰/۳۷	۵/۹۱۱
Benzene,methyl(1-methylethenyl)	۰/۳۴	۱۲/۲۳۸
p-Menth-1-en-4-ol	۰/۲	۱۶/۱۸۲
3-Carene	۰/۰۷	۸/۸۶۹
camphene	۰/۰۵	۶/۶۰۵
مجموع	۹۹/۷۸	

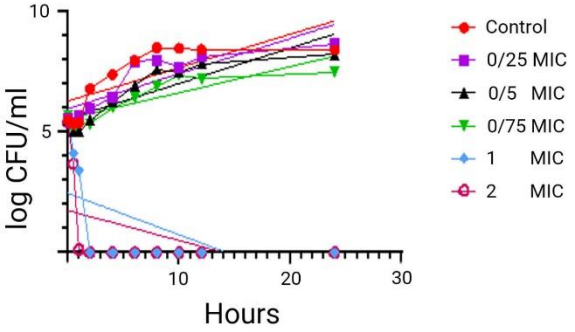
جدول ۴. حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی اسانس‌های دارچین، زنیان، آویشن باغی و فرمالین در حضور باکتری *سالمونلا انتریتیدیس*.

اسانس	حداقل غلظت مهار کننده رشد (میکرولیتر در لیتر)	حداقل غلظت کشنده باکتری (میکرولیتر در لیتر)
دارچین	۵۰۰	۱۰۰۰
زنیان	۵۰۰	۷۰۰
آویشن باغی	۷۰۰	۹۰۰
فرمالین	۷۰	۲۰۰

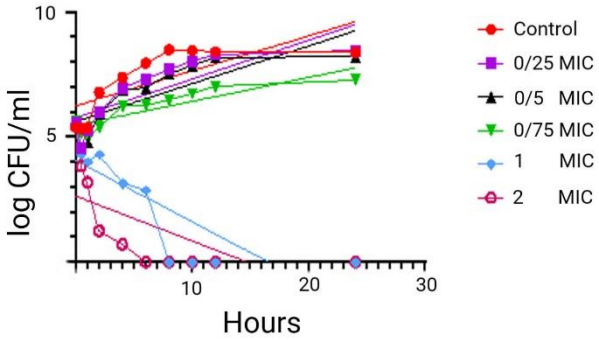
در نمودار ۱، ۲، ۳ و ۴ منحنی‌های رشد باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* در حضور غلظت‌های مختلف اسانس زنیان، آویشن، دارچین و فرمالدهید و همچنین شیب خطی (روند افزایشی) منحنی‌های رشد نشان داده شده است. مقایسه و تحلیل آماری لگاریتم تعداد باکتری‌ها در هر گروه و بررسی افزایش معنی‌دار تعداد باکتری‌ها نشان داد که در زنیان فاز تأخیری تا غلظت ۱ MIC برابر ۶ ساعت و در گروه کنترل ۲ ساعت می‌باشد. در غلظت ۲ MIC رشد فعال باکتری مشاهده نشد. قبل از گرمخانه‌گذاری و در ساعت‌های ۰/۵ و ۱ پس از گرمخانه‌گذاری بین تعداد باکتری در غلظت‌های مختلف زنیان و گروه کنترل اختلافی وجود نداشت. در ساعت ۲ پس از گرمخانه‌گذاری، تعداد باکتری‌های سالمونلا از غلظت ۰/۷۵ MIC به بعد کمتر از گروه کنترل شد ($P<۰/۰۵$). در این زمان، تعداد باکتری‌ها در غلظت ۲ MIC کمتر از غلظت‌های ۰/۷۵ و ۱ MIC بود ($P<۰/۰۵$). اما، بین تعداد باکتری در سایر گروه‌ها اختلافی مشاهده نشد. در ساعت ۴، زنیان از غلظت ۰/۲۵ MIC به بالا توانست تعداد باکتری‌های سالمونلا را نسبت به گروه کنترل به‌طور معنی‌داری کاهش دهد. در این ساعت تعداد باکتری‌ها در غلظت ۲ MIC از سایر گروه‌ها کمتر ($P<۰/۰۵$) و تعداد باکتری در سایر گروه‌ها با هم برابر بود. از ساعت ۶ به بعد تعداد باکتری از غلظت ۰/۷۵ به بالا به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل و غلظت‌های پایین‌تر کاهش یافت ($P<۰/۰۵$). زنیان در غلظت ۲ MIC از ساعت ۴ به بعد و در غلظت ۱ MIC از ساعت ۸ به بعد توانست رشد سالمونلا را مهار نماید. مقایسه شیب خطی منحنی‌های رشد باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* در حضور غلظت‌های مختلف زنیان نشان داد که بین روند افزایشی تعداد باکتری در غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵، ۱ و ۲ MIC با شیب‌های به ترتیب (۰/۱۵±۰/۰۲۶)، (۰/۰±۱۵/۰۳۰)، (۰/۰±۰۴/۰۲۷)، (-۰/۰±۲۶/۰۳۸) و (-۰/۰±۱۷/۰۴۰) اختلافی وجود نداشت. اما، روند افزایشی تعداد باکتری در غلظت‌های مختلف زنیان به‌طور معنی‌داری کندتر از گروه کنترل با شیب (۰/۱۴±۰/۰۲۶) بود ($P<۰/۰۵$).



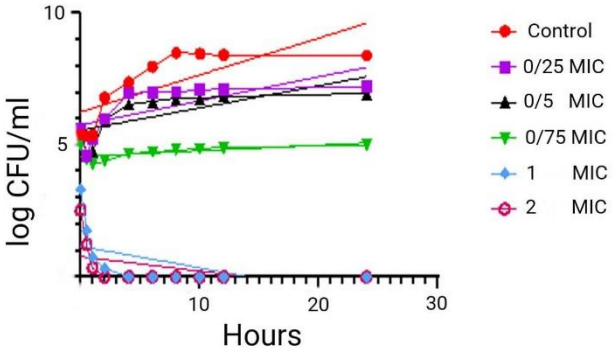
نمودار ۱. نمودار منحنی رشد باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* در حضور زنیان با غلظت‌های مختلف.



نمودار ۲. نمودار منحنی رشد باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* در حضور آویشن باغی با غلظت‌های مختلف.



نمودار ۳. نمودار منحنی رشد باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* در حضور دارچین با غلظت‌های مختلف.



نمودار ۴. نمودار منحنی رشد باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* در حضور فرمالدهید با غلظت‌های مختلف.

در تیمارهای آویشن باغی، فاز تأخیری رشد سالمونلا در غلظت‌های ۰/۲۵ و ۰/۵ MIC برابر ۴ ساعت و در گروه کنترل ۲ ساعت بود. در غلظت‌های ۰/۷۵، ۱ و ۲ رشد فعال باکتری مشاهده نشد. در ساعت‌های ۰/۵ و ۱، آویشن در غلظت‌های ۱ و ۲ MIC، در ساعت ۲ از غلظت‌های ۰/۷۵ MIC به بالا و در ساعت ۴ از غلظت ۰/۵ MIC به بالا موجب کاهش تعداد سالمونلا نسبت به گروه کنترل شد ($P<۰/۰۵$). در ساعت ۶، ۱۰ و ۲۴ در غلظت ۱ و ۲ MIC و در ساعات ۸ و ۱۲ تعداد باکتری در غلظت ۰/۷۵ MIC نسبت به گروه کنترل کاهش یافت ($P<۰/۰۵$). از ساعت ۲ به بعد در غلظت‌های ۱ و ۲ MIC تعداد باکتری به صفر رسید. مقایسه شیب خطی منحنی‌های رشد باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* در حضور غلظت‌های مختلف آویشن نشان داد که بین روند افزایشی تعداد باکتری در غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ MIC و گروه کنترل با شیب‌های به ترتیب (۰/۱۵±۰/۰۲۶)، (۰/۱۵±۰/۰۳۰)، (۰/۰±۱۱/۰۱۹) و (۰/۱۴±۰/۰۲۶) اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. اما، به‌طور معنی‌داری سریع‌تر از روند افزایشی تعداد باکتری در غلظت‌های ۱ و ۲ MIC با شیب‌های (۰/۱۷±۰/۰۴۶-) و (۰/۰±۱۲/۰۴۵-) بود.

در تیمارهای دارچین، فاز تأخیری رشد سالمونلا در غلظت‌های ۰/۲۵ و ۰/۵ MIC برابر ۶ ساعت، در غلظت ۰/۷۵ برابر ۱۲ ساعت و در گروه کنترل ۲ ساعت بود. در سطح ۱ و ۲ رشد فعال باکتری مشاهده نشد. در ساعت ۰/۵ پس از گرمخانه‌گذاری، در هیچ یک از غلظت‌های دارچین تغییری در تعداد باکتری دیده نشد. در ساعت ۱، تعداد باکتری در غلظت ۲ MIC از گروه کنترل و تمام تیمارها به‌غیر از غلظت ۱ MIC کمتر بود. در ساعت ۲، تعداد باکتری سالمونلا در غلظت ۱

MIC کمتر از گروه کنترل، غلظت ۰/۲۵ و ۰/۵ MIC و غلظت ۲ MIC کمتر از همه تیمارها بود. در ساعت ۴ و ۶، کمترین تعداد باکتری به غلظت ۲ MIC تعلق داشت و پس از آن غلظت ۱ MIC قرار داشت. بین تعداد باکتری در سایر گروه‌ها اختلافی مشاهده نشد. تعداد باکتری در غلظت ۲ MIC از ساعت ۶ به بعد و در غلظت ۱ MIC از ساعت ۸ به بعد به صفر رسید. در ساعت ۸ و ۱۰، تعداد باکتری در غلظت ۰/۷۵ MIC کمتر از گروه کنترل و ۰/۲۵ MIC و در غلظت ۱ و ۲ MIC کمتر از همه گروه‌ها بود و بین تعداد باکتری در سایر گروه‌ها اختلافی وجود نداشت. در ساعت ۱۲ و ۲۴ فقط تعداد باکتری در غلظت‌های ۱ و ۲ MIC کمتر از سایر گروه‌ها بود و تعداد باکتری در سایر گروه‌ها برابر بود. همانند آویشن، بین روند افزایشی تعداد باکتری در غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و گروه کنترل با شیب‌های به‌ترتیب (۰/۲۶±۰/۱۵)، (۰/۲۶±۰/۱۵)، (۰/۱۹±۰/۰۱) و (۰/۲۷±۰/۱۴) اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید. اما، میزان آن به‌طور معنی‌داری سریع‌تر از روند افزایشی تعداد باکتری در غلظت‌های ۱ و ۲ MIC با شیب‌های (۰/۰±۲۵/۰۳۴-) و (۰/۴۰±۰/۱۸-) بود.

قبل از گرمخانه‌گذاری تعداد باکتری در غلظت‌های مختلف اسانس زنیان، آویشن و دارچین برابر بود. اما، در فرمالدهید تعداد باکتری در غلظت ۱ و ۲ MIC از ۵/۴ log CFU/ml در گروه کنترل به ۳/۴ log CFU/ml و ۲/۵ log CFU/ml کاهش یافت. در تیمار فرمالین، در ساعت ۰/۵ پس از گرمخانه‌گذاری، تعداد باکتری در غلظت ۱ و ۲ MIC کمتر از سایر غلظت‌ها و گروه کنترل بود اما بین سطح ۱ و ۲ MIC و سایر گروه‌ها اختلافی مشاهده نشد. در ساعت ۲ و ۴، تعداد باکتری در غلظت ۰/۷۵، ۱ و ۲ MIC نسبت به گروه کنترل و غلظت‌های پایین‌تر از خودشان کمتر بود. اگرچه در ساعت ۴، تعداد باکتری در غلظت ۲ MIC برابر صفر بود، اما با تعداد باکتری در غلظت ۱ MIC اختلاف معنی‌داری نداشت. از ساعت ۴ به بعد تعداد باکتری در غلظت‌های ۱ و ۲ MIC صفر بود. در ساعت ۶، تعداد باکتری از غلظت ۰/۵ MIC کاهش معنی‌داری پیدا کرد. اما، بین تعداد باکتری در گروه کنترل و غلظت ۰/۲۵ و نیز غلظت ۱ و ۲ MIC اختلاف آماری مشاهده نشد. در ساعت ۸ و ۱۰، تعداد باکتری در غلظت‌های ۰/۲۵ و ۰/۵ MIC از گروه کنترل کمتر بود. پس از آن غلظت ۰/۷۵، ۱ و ۲ MIC قرار داشتند. در ساعت ۱۲، کاهش معنی‌دار تعداد باکتری از غلظت ۰/۵ MIC و در ساعت ۲۴ از غلظت ۰/۲۵ MIC آغاز شد. بین روند افزایشی تعداد باکتری در غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ MIC با شیب‌های به ترتیب (۰/۰۲۲±۰/۰۹)، (۰/۰۲۰±۰/۰۸)، (۰/۰۰۱±۰/۰) و گروه کنترل با شیب (۰/۰۲۰±۰/۱۴) اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید ولی روند افزایشی تعداد باکتری در گروه کنترل و غلظت‌های ۰/۲۵ و ۰/۵MIC به‌طور معنی‌داری سریع‌تر از غلظت‌های ۱ و ۲MIC با شیب‌های (۰/۰۲۵±۰/۰۸-) و (۰/۰۲۰±۰/۰۶-) بود.

بحث

اسانس‌های گیاهی به دلیل آب‌گریز بودن قادرند از دیواره سلولی و میتوکندریایی باکتری‌ها عبور کرده و با خروج یون‌ها و مولکول‌های حیاتی از دیواره سلولی موجب مرگ میکروارگانیسم شوند (۷). در اسانس زنیان، ترکیبات فنولی مانند تیمول، گاما ترپینن و سایمن که حدود ۹۴ تا ۹۶ درصد کل ترکیبات آن را تشکیل می‌دهند (۳۴)، دارای فعالیت ضد باکتریایی وسیع می‌باشند. در مطالعه حاضر بیشترین ترکیب شیمیایی اسانس زنیان مربوط به تیمول بود (۳۹/۵۵ درصد). پس از آن گاما ترپینن و سایمن با ۳۷/۶۹ و ۱۹/۱۷ درصد قرار داشتند. در مطالعه Shakeri و همکاران که در سال ۲۰۱۷ روی زنیان انجام شد، میزان تیمول ۵۷/۱۸، میزان سایمن ۲۲/۵۵ و میزان ترپینن ۱۳/۰۷ درصد مشخص گردید (۳۰). در مطالعه‌ای که توسط Oroojalian و همکاران درسال ۲۰۱۰ صورت گرفت، نشان داده شد که زنیان به‌عنوان گیاه بومی ایران دارای اثرات ضد میکروبی مشخص می‌باشد و اسانس حاصل از آن دارای تیمول به میزان ۳۵/۲۸ درصد، گاما ترپینن به میزان ۳۲/۱۹ درصد و پاراسایمن به میزان ۲۳/۵۱ درصد می‌باشد (۲۶). در مطالعه دیگر که توسط Khosravipour و Rezaeian-Doloei در سال ۲۰۱۶ انجام شد، بیشترین میزان ترکیب شیمیایی در زنیان مربوط به تیمول به میزان ۵۴/۴۵ درصد و سایمن به میزان ۲۲/۱۵ درصد بود (۱۳).

مهم‌ترین ترکیبات ضد باکتریایی موجود در آویشن باغی تیمول (۶۴-۱۰ درصد)، گاما ترپینن (۳۱-۲ درصد)، کارواکرول (۱۱-۲ درصد) می‌باشند (۷). در مطالعه حاضر، ترکیبات ضد باکتریایی آویشن باغی شامل تیمول (۵۳/۹۶ درصد)، گاما ترپینن (۲۰/۴۵ درصد)، کارواکرول (۲/۲۴ درصد) بود. Miladi و همکاران در سال ۲۰۱۳ میزان تیمول، سایمن و گاما ترپن موجود در آویشن باغی را به ترتیب ۴۱/۳۳، ۱۸/۰۸ و ۱۳/۱۲ درصد گزارش کردند (۲۰). میزان تیمول در مطالعه Rota و همکاران در سال ۲۰۰۸، برابر ۵۷/۷ درصد و سایر ترکیبات ضد باکتریایی شامل کارواکرول و گاما ترپینن به ترتیب برابر ۲/۸ و ۱/۹ درصد تعیین شد (۲۸). به‌طورکلی، در مطالعات انجام‌شده، گذشته از مکان و شرایط کشت، بیشترین میزان ترکیب ضد باکتری در آویشن باغی به تیمول مربوط می‌شد (۱۱،۲۹).

مهم‌ترین ترکیبات ضد باکتری اسانس دارچین سینمالدهید و اوژنول می‌باشند که به ترتیب ۵۵ تا ۷۶ درصد و ۵ تا ۱۸ درصد کل ترکیبات آن را تشکیل می‌دهند. سایر ترکیبات مانند کاریوپیلن، سینامیل استات به میزان کمتر در دارچین وجود دارند (۵). Shan و همکاران در سال ۲۰۰۷ در اسانس دارچین میزان سینمالدهید را ۸۳/۶ درصد اندازه‌گیری کردند. اما، نتوانستند اوژنول را ردیابی کنند (۳۱). میزان سینمالدهید و اوژنول به‌دست آمده در مطالعه Ojagh و همکاران در سال ۲۰۱۲ به ترتیب برابر ۶۰/۴۱ و ۳/۱۹ درصد گزارش شد (۲۴). در مطالعه حاضر میزان سینمالدهید حدود ۶۲ درصد و میزان اوژنول ۷/۴۹ درصد به دست آمد که از میزان آن در برخی مطالعات بیشتر و نسبت به برخی کمتر بود. علت اختلاف در پروفایل اسانس‌ها می‌تواند به دلیل تفاوت در شرایط رشد مانند محل و زمان کشت و نیز روش استخراج اسانس باشد (۲۱،۲۸،۳۰،۳۲). روش چشمی تعیین MIC یک روش ارزان و ساده برای ارزیابی اثر ضد میکربی اسانس‌ها می‌باشد (۱۴). در مطالعه حاضر میزان MIC زنیان برای باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* ۵۰۰ میکرولیتر در لیتر بود که با نتایج به‌دست آمده توسط Oroojalian و همکاران درسال ۲۰۱۰ همخوانی داشت (۲۵). بر اساس نتایج به‌دست آمده توسط Oroojalian و همکاران در سال ۲۰۱۰ میزان MIC زنیان با تیمول، سایمن و گاما ترپینن حدود ۴۸/۴، ۲۱/۸ و ۲۱/۳ درصد برای باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرولیتر در لیتر بود (۲۵). در مطالعه دیگری میزان MIC اسانس زنیان برای باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* برای سه روش استخراج اسانس کلروفرم، اتیل استات و متانول به ترتیب ۴۲۵، ۴۰۰ و ۳۷۵ میکروگرم در میلی لیتر بود (۲۶). Zomorodian و همکاران درسال ۲۰۱۱، میزان MIC دو اکوتیپ مختلف زنیان با میزان‌های متفاوت تیمول حدود ۲ و ۱۷ درصد را به ترتیب ۱ و ۸ و میزان MBC آن‌ها را ۱۰۰۰ و ۶۴۰۰ میکرولیتر در میلی لیتر به دست آوردند (۳۶). در یک مطالعه میزان MIC اسانس دارچین برای باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* ۳۰۰۰ میکرولیتر در لیتر بود (۲۷). در مطالعه Raybaudi و همکاران درسال ۲۰۰۶ ، میزان MIC و MBC اسانس دارچین برای باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* در محیط تریپتون سوی براث ۱۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر تعیین شد (۲۷). در مطالعه Nanasombat و Lohasupthawee در سال ۲۰۰۵، میزان MIC عصاره دارچین استخراج‌شده توسط اتانول برای *سالمونلا انتریتیدیس* ۱۶۶۷ میکرولیتر در لیتر بود (۲۳). در مطالعه Mayaud و همکاران در سال ۲۰۰۸، میزان MIC اسانس زنیان، آویشن و دارچین برای *سالمونلا انتریتیدیس* ۳۱۰، ۳۹۰ و ۸۰ میکرولیتر در لیتر بود (۱۸). در مطالعه Mazzarrino وهمکاران درسال ۲۰۱۵، میزان MIC اسانس دارچین و آویشن باغی برای باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* ۲۵۰۰ و ۵۰۰۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر بود (۱۹). این اختلاف در مطالعات مختلف می‌تواند به دلیل تفاوت در میزان ترکیبات ضد باکتریایی و روش استخراج عصاره اسانس باشد.

به‌طورکلی اثر ضد میکربی اسانس‌ها بر اساس نوع پاسخ به سه دسته تقسیم می‌شوند: ۱- افزایش فاز تأخیر که در آن باکتری‌ها آسیب دیده و نیاز به ترمیم دارند. به علاوه تعداد زیادی از آن‌ها از بین می‌روند و در نهایت تعدادی زنده مانده و قادر به رشد هستند. ۲- کاهش روند افزایشی رشد باکتری. اسانس‌ها موجب کاهش سرعت رشد شده و شیب منحنی رشد را در هر لحظه کاهش می‌دهند. ۳- کاهش تعداد نهایی باکتری در محیط کشت. اسانس‌ها با از بین بردن حساس‌ترین باکتری‌ها موجب کاهش جمعیت نهایی میکروارگانیسم‌ها در محیط کشت می‌شوند (۱۴).

در مطالعه حاضر مدت زمان فاز تأخیری و رشد لگاریتمی باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* در گروه کنترل به ترتیب حدود ۲ و ۸ ساعت بود که با مطالعه Koutsoumanis و همکاران درسال ۱۹۹۸ همخوانی داشت (۱۴). اسانس‌ها و فرمالین باعث افزایش فاز تأخیری رشد باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* شدند و با افزایش غلظت اسانس میزان فاز تأخیری طولانی‌تر شد. Mazzarrino و همکاران درسال ۲۰۱۵ نیز همین نتیجه را به دست آوردند. در این مطالعه فاز تأخیر رشد باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* در استفاده از دارچین با غلظت‌های ۶۰۰ و ۱۲۰۰ میکرولیتر در لیتر به ترتیب ۵/۵ و ۸/۸ ساعت بود (۱۹). بررسی اثر اسانس‌ها در غلظت‌های مختلف بر رشد باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* نشان داد که اسانس‌ها با غلظتMIC ۰/۲۵ و ۰/۵ نتوانستند تعداد باکتری را کاهش دهند و فقط تا چند ساعت قادر بودند که از افزایش آن جلوگیری نمایند. در غلظت ۰/۷۵ MIC موجب کاهش موقتی تعداد باکتری شدند اما در غلظت‌های ۱ و ۲ MIC باعث کاهش فزاینده آن تا صفر گردیدند. این نتیجه با مطالعه Li و همکاران درسال ۲۰۱۴، روی اسانس دارچین علیه باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* همخوانی داشت. بررسی منحنی رشد باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* در حضور اسانس دارچین توسط Li و همکاران درسال ۲۰۱۴ مشخص نمود که در غلظت ۱ MIC در مدت ۸ ساعت و در غلظت ۲ MIC در مدت ۴ ساعت جمعیت باکتری به صفر می‌رسد (۱۵).

زنیان از زمان گرمخانه‌گذاری تا ساعت ۴ به‌خوبی توانست از رشد باکتری جلوگیری نماید به‌طوری‌که در ساعت ۴ از غلظت ۰/۲۵ به بالا تعداد باکتری‌های سالمونلا در کنترل به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه‌های تیمار کمتر بود. اما، از این ساعت به بعد این اختلاف کمتر شد. زیرا قدرت زنیان در غلظت‌های ۰/۲۵ و ۰/۵ MIC برای مهار باکتری از بعد از ساعت ۴ کافی نبود و همگام با گروه کنترل رشد باکتری در گروه تیمار نیز افزایش یافت. به همین دلیل اختلاف تعداد باکتری بین دو گروه کمتر شد و در ساعت ۶ از غلظت ۰/۷۵ MIC به بعد بین تعداد باکتری در گروه تیمار و گروه کنترل اختلاف معنی‌دار مشاهده گردید.

روند تغییر تعداد باکتری در آویشن همانند زنیان بود. با بالا رفتن میزان اسانس آویشن در محیط کشت، مدت زمان کمتری برای کاهش تعداد باکتری نسبت به گروه کنترل لازم بود. به‌طوری که، برای غلظت ۰/۵ MIC چهار ساعت، برای غلظت ۰/۷۵ MIC دو ساعت و برای غلظت ۱ و ۲ MIC نیم ساعت طول کشید تا تعداد باکتری‌ها کاهش یابد. اما پس از ساعت ۶ و رشد فزاینده باکتری در گروه‌های تیمار به علت عدم کفایت اسانس آویشن، این اختلاف فقط در غلظت‌های ۱ و ۲ MIC و بعضاً ۰/۷۵ MIC حفظ شد.

دارچین به شکل ضعیف‌تری موجب کاهش تعداد باکتری گردید. به گونه‌ای که در ساعت ۱ فقط در غلظت ۲ MIC، و سایر ساعات به استثنای ساعت‌های ۸ و ۱۰ که در غلظت ۰/۷۵ MIC توانست موجب کاهش تعداد باکتری نسبت به گروه کنترل گردد، در غلظت‌های ۱ و ۲ MIC توانست از رشد آن‌ها جلوگیری کند.

برخلاف اسانس‌ها که تعداد باکتری قبل از گرمخانه‌گذاری در غلظت‌های مختلف و گروه کنترل برابر بود، افزودن فرمالین در غلظت‌های ۱ و ۲ MIC توانست بلافاصله تعداد باکتری‌ها را حدود log ۲ کاهش دهد و از ساعت ۸ گرمخانه‌گذاری به بعد تعداد باکتری به‌طور معنی‌داری در غلظت ۰/۲۵ MIC کاهش یافت که نشان‌دهنده سرعت اثر و قدرت آن نسبت به سایر تیمارها بود و علت آن را می‌توان اثر قوی فرمالدهید و از بین رفتن تعداد بیشتری باکتری دانست که جبران آن برای جمعیت باکتریایی را مشکل می‌کرد. در بین تیمارهای مختلف دارچین در مدت زمان و غلظت بالاتر و فرمالدهید در غلظت و مدت زمان پایین‌تری موجب مهار کامل رشد باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* شدند.

به‌طورکلی، از ساعت ۲ گرمخانه‌گذاری به بعد که فاز تأخیری در گروه کنترل می‌باشد، همواره سرعت رشد و تعداد باکتری در گروه کنترل بیشتر از گروه‌های تیمار بود. بااین‌حال به‌استثنای زنیان در سایر اسانس‌ها روند رشد افزایشی در غلظت‌های مختلف به‌غیر از غلظت ۱ و ۲ MIC تفاوت چندانی با گروه کنترل نداشت که این بیانگر قدرت بیشتر اسانس زنیان در کاهش تعداد باکتری نسبت به سایر اسانس‌ها می‌باشد.

به‌طورکلی، نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که حداقل غلظت بازدارندگی اسانس زنیان و دارچین کمتر از آویشن باغی می‌باشد. همچنین از نظر قدرت کشندگی ابتدا اسانس زنیان، سپس آویشن باغی و در نهایت دارچین قرار دارند. بالا بودن قدرت کشندگی زنیان نسبت به سایر اسانس‌ها می‌توانست به علت بالاتر بودن میزان ترکیبات ضدباکتریایی (گاماترپینن، سایمن و تیمول) باشد. اما فرمالدهید حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی بسیار کمتری نسبت به هر سه اسانس زنیان، دارچین و آویشن باغی داشت. در مطالعه حاضر اسانس‌ها توانستند فاز تأخیر رشد باکتری سالمونلا را نسبت به گروه کنترل طولانی‌تر کرده و در غلظت‌های بالا پس از چند ساعت از رشد باکتری جلوگیری نمایند. اما، فرمالدهید در غلظت کمتر و با سرعت بیشتری از تکثیر باکتری جلوگیری کرد که نشان دهنده شدت اثر فرمالدهید نسبت به اسانس‌های گیاهی می‌باشد.

سپاسگزاری

هزینه و امکانات مورد استفاده در مطالعه حاضر از محل اعتبارات شرکت پارس ایمن دارو تأمین شده است که بدین وسیله نگارندگان مراتب قدردانی خود را ابراز می‌دارند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Adams Robert, P. (1995). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. (4th ed.) Allured Publishing Corporation. Carol Stream, USA. https://doi.org/10.1016/S1044-0305(97)00026-3
2. Akhondzadeh basti, A., Mashak, Z., Khanjari, A., Rezaei, MA., Mohammadkhan, F., Taheri Mirghaed, A., Faghih Fard, P., Tayyar Hashtjin N. (2014). The study on the effects of garlic Essential oil on growth curve and TDH toxin production of Vibrio parahaemolyticus. J Med Plants, 13(50), 156-162.
3. Ashurst, P. (1995). Food Flavorings. (2nd ed.) Blackie Academic and Professional, Bishopbriggs. Glasgow, Scotland, UK.
4. Baron Ellen, J.o., Peterson Lance, R., Finegold, Sydney M. (1990). Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. (9th ed.) Mosby. Toronto, Canada.
5. Boughendjioua, H., Djeddi, S. (2018). Study of The Organoleptic and Physicochemical Properties of Cinnamon Essential Oil (*Cinnamomum zeylanicum*). Am J Life Sci Res, 6(3), 123-130.
6. Broderick, G.A., Lane, G.T. (1978). Lactational, in vitro, and chemical evaluation of untreated and formaldehyde-treated casein supplements. J Dairy Sci, 61(7), 932-939. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(78)83670-4
7. Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods — A review. Int J Food Microbiol, 94(3), 223-253. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022
8. Duncan, M.S., Adams, A.W. (1972). Effects of a Chemical Additive and of Formaldehyde-gas Fumigation on *Salmonella* in Poultry Feeds. Poult Sci, 51(3), 797–802. https://doi.org/10.3382/ps.0510797
9. Faleiro, M., Miguel, MG., Ladeiro, F., Venancio, F., Tavares, R., Brito, J., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G., (2003). Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of Thymus. J Appl Microbiol, 36(1), 35-40. https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01259.x
10. Hosseinpour, M., Sabokbar A., Bakhtiari A., Parsa S. (2013). Comparison of bacterial culture, ELISA and PCR techniques for detection of Salmonella in poultry meat samples collected from Tehran. World J Microbiol, 6(1), 62-72. PMID:14633109
11. Jebelli Javan, A. (2016). Combinational effects of Trachyspermum ammi and Zataria multiflora Boiss essential oils on some pathogenic food-borne bacteria. Koomesh, 17(2), 374-83.
12. Kazemi, M., Mokhtariniya, S. (2016). Essential oil composition of bark of *Cinnamomum zeylanicum*. J Essent Oil Bear Pl, 19(3), 786-789. https://doi.org/10.1080/0972060X.2016.1165151
13. Khosravipour, S., Rezaeian-Doloei, R. (2016). Antibacterial activity of Carum copticum essential oil against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and *Escherichia coli* in nutrient broth medium. J Syst Manag, 3(2), 43-56.
14. Koutsoumanis, K., Tassou, C., Taoukis, P., Nychas, G. (1998). Modelling the effectiveness of a natural antimicrobial on *Salmonella Enteritidis* as a function of concentration, temperature and pH, using conductance measurements. J Appl Microbiol, 84(6), 981-987. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00433.x
15. Li, L., Zheng-Wen, L., Zhong-Qiong, Y., Qin, W., Ren-Yong, J., Li-Jun, Z., Jiao X., Xu, S., Yi, Z., Yong-Hua, Du., Lian-Ci, P., Shuai, K., Wang, Y. (2014). Antibacterial activity of leaf essential oil and its constituents from *Cinnamomum longepaniculatum*. Exp Med, 7(7), 1721. PMID:25126170
16. Mahboubi, M., Feizabadi, MM. (2009). The Antimicrobial Activity of Thyme, Sweet Marjoram,

Savory and Eucalyptus oils on *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus*. J Med Plants, 2(30), 137-144.
17. Mashak, Z., Moradi, B., Moradi, B. (2012). The Combined Effect of *Zataria multiflora Boiss* and *Cinnamomum zeylanicum Nees*. Essential Oil on the Growth of *Bacillus cereus* in a Food Model System. J Med Plants. 2(42), 62-73.
18. Mayaud, L., Carricajo, A., Zhiri, A., Aubert, G. (2008). Comparison of bacteriostatic and bactericidal activity of 13 essential oils against strains with varying sensitivity to antibiotics. J Appl Microbiol, 47(3), 167-173. https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02406.x.
19. Mazzarrino, G., Paparella, A., Chaves-López, C., Faberi, A., Sergi, M., Sigismondi, C., Compagnone, D., Serio, A. (2015). *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* inactivation dynamics after treatment with selected essential oils. Food Control, 50, 794–803. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.10.029
20. Miladi, H., Slama, RB., Mili, D., Zouari, S., Bakhrouf, A., Ammar, E. (2013). Essential oil of *Thymus vulgaris L*. and *Rosmarinus officinalis L*.: Gas chromatography-mass spectrometry analysis, cytotoxicity and antioxidant properties and antibacterial activities against foodborne pathogens. Nat Sci, 5(6), 729-739. https://doi.org/10.4236/ns.2013.56090
21. Naghdi Badi, H., Yazdani, D., Nazari, F., Mohammad Ali, S. (2003). Seasonal Variation in Oil Yield and Composition from *Thymus vulgaris L*. under different Dense Cultivation. J Med Plants, 5, 51-56.
22. Naghizadeh, F., Karimi Tarshizi, M.A., Rahimi, Sh. (2011). Comparison of Nanosilver and in-Feed Disinfectants on Layer Performance and Intestinal Microflora and Yolk Cholesterol. Anim Prod Sci, 13(1), 49-58.
23. Nanasombat, S., Lohasupthawee, P. (2005). Antibacterial activity of crude ethanolic extracts and essential oils of spices against *Salmonellae* and other enterobacteria. Kitl Sci Tech J, 5(3), 527-538. https://doi.org/10.1.1.504.2891
24. Ojagh, S.M., Rezaei, M., Razavi, SA, Hosseini, M.H. (2012). Antibacterial study of *Cinnamomum zeylanicum* essential oil under laboratory conditions against five bacteria causing corrosivity. J Food Sci Technol, 35(9), 67-76.
25. Oroojalian, F., Kasra-Kermanshahi, R., Azizi, M., Bassami, MR. (2010). Phytochemical composition of the essential oils from three Apiaceae species and their antibacterial effects on food-borne pathogens. *Food* Chem, 120(3), 765-70.
26. Paul, S., Dubey, R., Maheswari, D., Kang, SC. (2011). Trachyspermum ammi (L.) fruit essential oil influencing on membrane permeability and surface characteristics in inhibiting food-borne pathogens. Food Control, 22(5), 725-31. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.11.003
27. Raybaudi-Massilia, RM., Mosqueda-Melgar, J., Martin-Belloso, O. (2006). Antimicrobial activity of essential oils on *Salmonella Enteritidis*, *Escherichia coli*, and *Listeria innocua* in fruit juices. J *Food* Prot. 69(7), 1579-1586. PMID:16865889
28. Rota, MC., Herrera, A., Martínez, RM., Sotomayor, JA., Jordán, MJ. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. Food Control, 19(7), 681-687. PMID: 25870697
29. Shahnia, M., Khaksar, R. (2013). Antimicrobial effects and determination of minimum inhibitory concentration (MIC) methods of essential oils against pathogenic bacteria. Iran J Nutr Sci Food Technol, 7(5), 949-955.
30. Shakeri, G., Jamshidi, A., Khanzadi, S., Azizzadeh, M. (2017). Modeling of *Salmonella typhimurium* growth under the effects of Carum copticum essential oil, temperature, pH and inoculum size. Vet Res Forum, 8(1), 59-65. PMID: 28473899
31. Shan, B., Cai, Y-Z., Brooks, JD., Corke, H. (2007). Antibacterial properties and major bioactive components of cinnamon stick (Cinnamomum burmannii): activity against foodborne pathogenic bacteria. J Agric Food Chem, 55(14), 5484-5490. https://doi.org/10.1021/jf070424d
32. Sharifan, A., Parviz Abrvand, A., Motaghianpour, Z. (2010). Effect of extraction method on chemical composition and antimicrobial activity of Carum copticum. Crit Rev Food Sci Nutr, 7(2), 10-18.
33. Sheeladevi, A., Ramanathan, N. (2012). Antibacterial activity of plant essential oils against food borne bacteria. IJPBA, 3, 1106-1109. http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.5(11).4876-79
34. Soltani Howyzeh, M., Sadat Noori, SA., Shariati, V. (2018). Essential oil profiling of Ajowan (*Trachyspermum ammi*) industrial medicinal plant. IND Crop Prod, 119, 255-259. http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.04.022
35. Tajkarimi, M.M., Ibrahim, S.A., Cliver, D.O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. Food Control, 21(9), 1199-1218. http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.04.022
36. Zomorodian, K., Moein, M.R., Rahimi, M.J., Pakshir, K., Ghasemi, Y., Sharbatfar, S. (2011). Possible application and chemical compositions of Carum copticum essential oils against food borne and nosocomial pathogens. Middle East J Sci Res, 9(2), 239-245.
37. Zulkifli, I., Fauziah, O., Omar, A.R., Shaipullizan, S., Siti Selina, A.H. (1999). Respiratory epithelium, production performance and behaviour of formaldehyde-exposed broiler chicks. Vet Res Commun, 23(2), 91-99. https://doi.org/10.1023/A:1006202418092

Journal of Veterinary Research
J Vet Res, Volume 76, Number 2, 2021
Original Article

Antimicrobial Activity of *Trachyspermum Copticum, Thymus Vulgaris*, and *Cinnamomum Zeylanicum against Salmonella Enteritidis*

Arash Yarmohammadi[1], Mohsen Farkhoy[1], Ali Misaghi[2], Seyed Mohammad Kiaie[1], Neda Nafarieh[1], Abas Barin[3]

[1] *Department of Animal Health and Nutrition, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*
[2] *Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*
[3] *Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*

10.22059/jvr.2020.286511.2954

Received: *24 Febuary 2021*, ***Accepted:*** *15 May 2021*

Abstract

BACKGROUND: It is fundamental to find the safest food preservatives in order to acheive the maximum health and economic benefits. *Salmonella enteritidis* is the cause of Salmonellosis, one of the most important foodborn zoonoses in poultry.

OBJECTIVES: The present study was conducted to comparatively evaluate the antimicrobial effects of *Trachyspermum copticum*, *Thymus vulgaris*, and *Cinnamomum zeylanicum* essential oils and Formaldehyde against *Salmonella Enteritidis*.

METHODS: In this study minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of *Cinnamomum zeylanicum*, *Trachyspermum copticum*, and *Thymus vulgaris* essential oils against *Salmonella enteritidis* were determined using broth macro-dilution. The effects of essential oils on growth curve of *Salmonella Enteritidis* were also evaluated.

RESULTS: In this study, MIC for the minimum inhibitory concentration level of *Trachyspermum copticum*, *Thymus vulgaris*, *Cinnamomum zeylanicum* and formaldehyde for *Salmonella Enteritidis* was determined as 500, 700, 500, and 70 ppm while MBC was calculated as 700, 900, 1000, and 200ppm, respectively.

This study revealed that all the treatments increased lag phase. Bacterial growth speed was slower for *Trachyspermum copticum* of all the concentrations, yet a significant difference was observed only in 1 and 2 MIC of other treatments ($P<0.05$).

CONCLUSIONS: In conclusion, *Trachyspermum copticum* (with less concentration), *Thymus vulgaris*, and *Cinnamomum zeylanicum* (with higher concentration) could be employed as a substitution of a proporation of formaldehyde to prevent bacterial development in food.

Keywords: Essential oil, Antimicrobial effect, *Salmonella Entertidis*, MIC, MBC

Copyright © 2020. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution- 4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

Corresponding author's email: fallahiroozbeh@gmail.com Tel/Fax: 026-34570038/026-34552194

How to cite this article:

Yarmohammadi, A., Farkhoy, M., Misaghi, A., Kiaie, S., Nafarieh, N., Barin, A. (2021). Antimicrobial Activity of *Trachyspermum Copticum*, *Thymus Vulgaris*, and *Cinnamomum Zeylanicum against Salmonella Enteritidis*. J Vet Res, 76(2), 179-191. https://doi.org/10.22059/jvr.2020.286511.2954

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Chemical compounds of *Trachyspermum copticum* essential oil.
Table 2. Chemical compounds of *Cinnamomum zeylanicum* essential oil.
Table 3. Chemical compounds of *Thymus vulgaris* essential oil.
Table 4. Minimal inhibitory concentration and minimum lethal concentration of *Cinnamomum zeylanicum*, *Trachyspermum copticum*, and *Thymus vulgaris* and formalin essential oils in the presence of *Salmonella enteritidis*.
Diagram 1. Growth curve *of Salmonella enteritidis* in the presence of *Trachyspermum copticum* with different concentrations.
Diagram 2. Growth curve of *Salmonella enteritidis* in the presence of *Thymus vulgaris* with different concentrations.
Diagram 3. Growth curve of *Salmonella enteritidis* in the presence of *Cinnamomum zeylanicum* with different concentrations.
Diagram 4. Growth curve of *Salmonella enteritidis* in the presence of formaldehyde at different concentrations.