

بررسی و مقایسه اثر ترکیبات بازدارنده طبیعی در جلوگیری از رشد استافیلوکوکوس اورئوس در نمونه های دوغ صنعتی با استفاده از روش سطح پاسخ

فریده طباطبایی یزدی^{۱*}، سید علی مرتضوی^۲، آرش کوچکی^۳، شهناز افشاریان^۴

۱- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

* نویسنده مسئول (farideh_tabatabaee@yahoo.com, tabatabai@ferdowsi.um.ac.ir)

۲- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۳- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۴- کارشناس آزمایشگاه میکروبیولوژی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

چکیده

امروزه استفاده از ترکیبات ضد میکروبی طبیعی از جمله عصاره ها و پودر ها در نگهداری مواد غذایی از رشد چشمگیری برخوردار است. در این تحقیق اثرات ضد میکروبی عصاره و پودر گیاهان تیره نعناع (آویشن، نعناع و کاکوتی) در جلوگیری از رشد استافیلوکوکوس اورئوس در نمونه های دوغ صنعتی بررسی شد. برای این منظور ۳ غلظت از هر عصاره (۰، ۰/۰۷۵ و ۰/۱۵) و ۷/۷٪ از هر پودر (۰، ۰/۰۷۵ و ۰/۱۵) تهیه گردید. مرگ و یا کاهش جمعیت باکتری مذکور در ۴۰ نمونه (در ۳ تکرار) دوغ استریل حاوی سوسپانسیون مشخصی از سوش خالص استافیلوکوکوس در طی ۲۴ ساعت با استفاده از طرح رویه پاسخ بررسی شد. پس از بررسی و مقایسه نتایج اثرات عصاره و پودر ترکیبات بازدارنده طبیعی در جلوگیری از رشد استافیلوکوکوس در نمونه های دوغ نتایج نشان داد که پودر گیاهان تیره نعناع به میزان بیشتری از عصاره گیاهان تیره نعناع بر کاهش جمعیت استافیلوکوکوس تأثیر دارد، فرمول بهینه پودرها برای کاهش یا مرگ باکتری پاتوژن با غلظت پودر آویشن (۷/۷) ۰/۰۹، نعناع (۷/۷) ۰/۰۶ و کاکوتی (۷/۷) ۰/۱۴ میزان تلقیح بدست آمد که در این شرایط بیشترین میزان کاهش جمعیت استافیلوکوکوس بعد از گذشت ۲۴ ساعت معادل عدد لگاریتمی ۱/۹۸ بود.

واژه های کلیدی

آویشن
استافیلوکوکوس اورئوس
دوغ های صنعتی
کاکوتی
نعناع

مقدمه

نام لاسی تهیه نمودند. امروزه در برخی از کشورها از جمله ایران و ترکیه از این نوشیدنی استفاده می شود. دوغ را از مخلوط کردن ماست، آب، نمک و دیگر مواد افزودنی از جمله عصاره و پودر گیاهان طبیعی تهیه می کنند. این محصول نوشیدنی سالم و مفیدی است

شیر و فرآورده های آن دارای نقش بزرگی در تغذیه و سلامت انسان در تمام مراحل زندگی می باشند (Webb, 2007). دوغ نوعی نوشیدنی سنتی لبنی است که از ماست تهیه شده و اولین بار هندی ها آنرا تحت

مواد و روش ها

مواد

عصاره ها و پودرهای آویشن، نعناع و کاکوتی از مجتمع و شرکت کشاورزی سبز ایران خریداری شد. دوغ از کارخانجات لبنی شهرک صنعتی مشهد تهیه گردید.

سوش میکروبی *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC1113) به صورت آمپول لیوفیلیزه از مرکز کلکسیون قارچ ها و باکتری های صنعتی و عفونی سازمان علمی پژوهشی و صنعتی ایران بخش بیوتکنولوژی تهیه گردید.

جهت انجام آزمایشات از محیط کشت نوترینت آگار^۲ و نوترینت برات^۳ ساخت شرکت مرک آلمان استفاده شد.

جهت تهیه کشت تازه و فعال سازی سویه های میکروبی از محیط کشت مانیتول سالت آگار^۴ (ساخت شرکت مرک آلمان) برای *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده گردید.

روش ها

تهیه کشت تازه (در فاز لگاریتمی) از میکروارگانیسم

جهت تهیه کشت تازه و فعال سازی سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* از محیط کشت نوترینت برات و مانیتول سالت آگار مطابق دستور العمل کشت سطحی داده شد، تا میکروارگانیسم پس از ۲۴ ساعت اینکوباسیون در هنگام تهیه سوسپانسیون میکروبی در فاز لگاریتمی قرار داشته باشد.

تهیه نمونه های دوغ جهت تیمار با عصاره ها و پودرها

نمونه های دوغ تهیه شده جهت انجام آزمایشات میکروبیولوژی به آزمایشگاه انتقال یافتند. بعد از استریل کردن دوغ ها (دمای ۹۰-۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه) نمونه های استریل دوغ درون ۴۰ لوله ۵۰ میلی لیتری ریخته شد و سپس غلظت های مختلف عصاره (۰، ۰/۰۷۵ و ۰/۱۵) و پودر (۰، ۰/۰۷۵ و ۰/۱۵) آویشن، نعناع و کاکوتی

که تأمین کننده یک چهارم نیاز روزانه به کلسیم و حاوی ویتامین های B₂, B₆, B₁₂ است (Wikipedia, 2008).

استافیلوکوکوس اورئوس^۱ عامل اصلی مسمومیت غذایی *استافیلوکوکوس* و عفونت های خارج روده ای می باشد. انتروتوکسین این میکروارگانیسم مقاوم به حرارت است و در صورت وجود در ماده غذایی در اثر حرارت از بین نمی رود. مسمومیت غذایی استافیلوکوکی به وسیله دوره کمون کوتاه، معمولاً بین ۲ تا ۴ ساعت مشخص می گردد. تهوع، استفراغ، دل پیچه، ضعف و نهایتاً اسهال علائم آن هستند. دوره کمون کوتاه در نتیجه خوردن سم از قبل تولید شده در مواد غذایی ایجاد می شود. رشد *استافیلوکوکوس* در مواد غذایی هیچگونه تغییری در ظاهر، بو یا طعم ایجاد نمی کند بلکه توکسین آن در مواد غذایی ایجاد مسمومیت می نماید (Mortazavi et al., 2008).

آویشن، نعناع و کاکوتی گیاهانی متعلق به تیره نعناعیان می باشند. خصوصیات ضد عفونی کنندگی این گیاهان از دیرباز شناخته شده است. در حقیقت این گیاهان به علت داشتن مقادیر زیادی از ترکیبات فرار آروماتیک که برخی از آنها از عوامل مهم ایجاد کننده طعم در غذا به شمار می روند مورد توجه هستند. این ترکیبات فرار دارای خاصیت ضد اکسایشی و ضد میکروبی ذاتی بوده و نقش مهمی در سیستم دفاعی گیاهان در مقابل بیماری های حاصل از میکروارگانیسم ها ایفا می کنند. بنابراین، این ترکیبات می توانند به صورت یک جزء عملگر، یک طعم دهنده و نیز به عنوان نگهدارنده در ماده غذایی عمل نمایند (Delaquis & Mazza, 1995; Han, 2000; Holley & Patel, 2005; Nychas, 1995; Tranter & et al., 1993).

هدف از انجام این پژوهش بررسی و مقایسه اثرات ضد میکروبی عصاره و پودر آویشن، نعناع و کاکوتی که گونه ای از گیاهان تیره نعناع می باشند در جلوگیری از رشد جمعیت *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه های دوغ استریل بوده است.

2- Nutrient Agar(N.A)

3- Nutrient Broth(N.B)

4- Mannitol salt agar

1- *Staphylococcus aureus*

ارزیابی فعالیت ضد میکروبی عصاره ها و پودرها با استفاده از طرح مرکب مرکزی در ۳ فاکتور در ۳ سطح

برای انجام آزمایش ها از طرح مرکب مرکزی در ۳ فاکتور در ۳ سطح استفاده گردید. از استاتیلوکوکوس اورئوس با غلظت استاندارد شده به روش مک فارلند (1×10^5) به ۴۰ لوله آزمایش درب دار حاوی نمونه های دوغ استریل و رقت های مشخص تهیه شده از عصاره ها و پودرهای گیاهی اضافه گردید (۱-۲٪) (جدول ۱).

افزودن سوسپانسیون میکروبی به رقت های عصاره ها و پودرهای گیاهی باعث رقیق شدن سوسپانسیون میکروبی و غلظت ماده ضد میکروبی خواهد شد که این موارد طی آماده سازی نمونه ها در نظر گرفته شد. پس از انجام این مراحل از لوله فاقد ماده ضد میکروبی (کنترل) ۰/۱cc با استفاده از یک اتوسمپلر بر روی سطح پلیت حاوی محیط آگار کشت سطحی داده شد تا پس از یک شب گرمخانه گذاری تعداد کلونی های رشد کرده شمارش شوند (Barnon & Fineg Old, 1990) این عملیات برای هر نمونه در سه تکرار به طور جداگانه انجام شد.

براساس نتایج بدست آمده از گزارشات و تحقیقات انجام شده (Bayoumi, 1992; Burt, 2003; Chachoyan & Oganessian, 1996; Denyer & Hugo, 1991; Marino et al., 2001; Negueruela & Mata, 1986) اضافه کردن عصاره و پودر به صورت امولسیون کردن هر یک از آنها با آب و به کمک توئین ۸۰ با استفاده از یک میکسر هموژنایزر (IKA-T25-digital ultra turax) به مدت یک دقیقه در پانزده هزار دور در دقیقه انجام شد.

تهیه سوسپانسیون ۰/۵ مک فارلند

سوسپانسیون استاندارد ۰/۵ مک فارلند با استفاده از اضافه کردن ۹۹/۵ میلی لیتر اسید سولفوریک ۱٪ و ۰/۵ میلی لیتر کلرید باریم ۱/۱۷۵٪ به طور آهسته با هم زنی مداوم تهیه گردید.

کدورت ایجاد شده توسط این سوسپانسیون دانسیته سلولی تقریباً معادل $10^8 \times 1/5$ cfu/ml ایجاد می کند. سپس کدورت آن با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (SIGMA-3-30K) در طول موج ۶۲۵nm اندازه گیری شد.

تهیه سوسپانسیون میکروبی

جهت تهیه کشت مادر ۱-۲٪ از سوش میکروبی تحت شرایط استریل به ۵۰۰ml محیط کشت نوترینت برات جهت تهیه سوسپانسیون غلیظ میکروبی اضافه گردید، سپس محیط کشت به اینکوباتور ۱۸-۲۲ درجه سانتی گراد منتقل شد. محیط کشت های نوترینت آگار و مانیتول سالت آگار به روش شیب دار^۱، در لوله های در پیچ داری که قبلاً استریل شده بودند تهیه شد و از محیط نوترینت برات (بعد از ایجاد کدورت) کشت سطحی به شکل زیکزاک بر روی آنها کشت داده شد. محیط کشت ها به مدت ۲۴ ساعت در اینکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفته، سپس لوله ها با پارافین استریل، پر گردید و در یخچال نگه داری شدند.

جدول ۱- مقادیر کد شده و واقعی متغیرهای مستقل در سطوح مختلف

مقادیر کد شده واقعی			علائم	متغیر های مستقل
-۱	۰	+۱		
۰/۱۵	۰/۰۷۵	۰	A	غلظت عصاره و پودر آویشن
۰/۱۵	۰/۰۷۵	۰	B	غلظت عصاره و پودر نعناع
۰/۱۵	۰/۰۷۵	۰	C	غلظت عصاره و پودر کاکوتی

طراحی آزمایشات

در این تحقیق از طرح مرکب مرکزی جهت طراحی آزمایشات استفاده شد. هدف این تحقیق بهینه سازی اثرات عصاره ها و پودرهای طبیعی جهت کاهش جمعیت باکتری پاتوژن در نمونه های دوغ می باشد. سه پارامتر مورد بررسی شامل غلظت مختلف عصاره و پودر آویشن، نعناع و کاکوتی می باشند. لذا جهت بهینه سازی اثر عصاره ها و پودرهای طبیعی سه پارامتر مذکور با توجه به روش استفاده شده برای طراحی آزمایشات به عنوان متغیرهای مورد نظر و با سه سطح در مقادیر کد شده (+۱، ۰ و -۱) و مقادیر واقعی، مطابق جدول ۱ در نظر گرفته شد.

با استفاده از روش CCD و با کمک نرم افزار Design Expert (Version 6.0.2) و سطوح غلظت در نظر گرفته شده برای هر یک از متغیرها، آزمایشات طراحی و چیدمان آنها مطابق جدول ۲ انجام شد. جدول ۲ آرایش روش CCD^۱ را با ۶ تکرار در نقطه مرکزی نشان می دهد. میانگین درصد مقادیر بدست آمده از سه مرتبه تکرار هر آزمایش به عنوان متغیر وابسته یا پاسخ (Y) در نظر گرفته می شود. در روش RSM^۲ برای هر متغیر وابسته مدلی تعریف می شود که آثار اصلی و همزمان فاکتورها را بر روی هر متغیر جداگانه بیان می نماید، مدل چند متغیره به صورت زیر می باشد.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_1 \beta_1 x_1^2 + \beta_2 \beta_2 x_2^2 + \beta_3 \beta_3 x_3^2 + \beta_1 \beta_2 x_1 x_2 + \beta_1 \beta_3 x_1 x_3 + \beta_2 \beta_3 x_2 x_3$$

در معادله ذکر شده Y پاسخ پیش بینی شده، β_0 ضریب ثابت، $\beta_1 \beta_2 \beta_3$ ضرایب اثرات خطی، $\beta_2 \beta_2$ ، $\beta_3 \beta_3$ ، $\beta_1 \beta_1$ ضرایب اثرات مربعات و $\beta_2 \beta_3$ ، $\beta_3 \beta_1$ ، $\beta_1 \beta_2$ ضرایب اثرات متقابل هستند و جهت برازش و محاسبه ضرایب معادله لازم است که داده های تجربی بدست آمده با استفاده از رگرسیون و آنالیز واریانس (ANOVA) تحلیل شود. بدین منظور رگرسیون و تحلیل واریانس با استفاده از نرم افزار Design Exper (Version 6.0.2) انجام گرفت.

با توجه به شرایط تعیین شده، ۴۰ فرمولاسیون نهایی نمونه های دوغ با ترکیبات بازدارنده تهیه شد. به کمک ضرایب رگرسیون اثر سطوح مختلف آویشن، نعناع و کاکوتی بر روی متغیر های وابسته محاسبه شد.

1- Central Composite Design
2- Response Surface Method

جدول ۲- چیدمان روش CCD برای سه متغیر مستقل

شماره آزمایش	آویشن (%v/v)	نعناع (%v/v)	کاکوتی (%v/v)	نتایج بدست آمده نمونه های حاوی پودر بعد از گذشت ۲۴ ساعت (Log/ml)	نتایج بدست آمده نمونه های حاوی عصاره بعد از گذشت ۲۴ ساعت (Log/ml)
۱	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۵/۳۱۶	۵/۱۰۹
۲	۰/۱۵	۰/۰۰	۰/۰۰	۳/۲۶۳	۳/۲۸۲
۳	۰/۰۰	۰/۱۵	۰/۰۰	۳/۶۹۰	۳/۵۱۸
۴	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۰۰	۲/۸۷۸	۲/۴۵۵
۵	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۱۵	۳/۹۱۸	۲/۳۷۹
۶	۰/۱۵	۰/۰۰	۰/۱۵	۳/۷۱۰	۲/۰۰
۷	۰/۰۰	۰/۱۵	۰/۱۵	۳/۷۹۲	۲/۶۳۰
۸	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۱۵	۳/۷۷۸	۳/۳۰۳
۹	۰/۰۰	۰/۰۷۵	۰/۰۷۵	۳/۷۳۰	۲/۲۳۳
۱۰	۰/۱۵	۰/۰۷۵	۰/۰۷۵	۳/۲۷۰	۲/۱۰۰
۱۱	۰/۰۷۵	۰/۰۰	۰/۰۷۵	۳/۸۷۷	۲/۹۹۸
۱۲	۰/۰۷۵	۰/۱۵	۰/۰۷۵	۳/۶۶۸	۲/۳۱۸
۱۳	۰/۰۷۵	۰/۰۷۵	۰/۰۰	۳/۵۳۵	۲/۶۳۹
۱۴	۰/۰۷۵	۰/۰۷۵	۰/۱۵	۳/۶۶۲	۲/۱۰۰
۱۵	۰/۰۷۵	۰/۰۷۵	۰/۰۷۵	۳/۶۲۰	۲/۲۰۰
۱۶	۰/۰۷۵	۰/۰۷۵	۰/۰۷۵	۳/۶۴۹	۲/۲۱۰
۱۷	۰/۰۷۵	۰/۰۷۵	۰/۰۷۵	۳/۴۸۰	۲/۰۷۰
۱۸	۰/۰۷۵	۰/۰۷۵	۰/۰۷۵	۳/۴۱۰	۲/۱۰۰
۱۹	۰/۰۷۵	۰/۰۷۵	۰/۰۷۵	۳/۶۹۰	۲/۲۵۹
۲۰	۰/۰۷۵	۰/۰۷۵	۰/۰۷۵	۳/۵۲۰	۲/۱۰۰

نتایج و بحث

تحلیل آزمایشات و مدل سازی پارامتر های موثر بر کاهش جمعیت استافیلوکوکوس اورئوس

مطابق آنچه در قسمت مواد و روش ها، همچنین قسمت طراحی آزمایشات گفته شد، آزمایشات طبق جدول طراحی شده روش CCD، با در نظر گرفتن سه متغیر عصاره ها و پودرهای آویشن، نعناع و کاکوتی برابر با ۴۰ آزمایش همراه با ۶ تکرار در نقطه مرکزی، برای کاهش خطا انجام گردید. جدول آزمایشات طراحی شده با توجه به متغیرهای فرض شده و نتایج بدست آمده برای کاهش جمعیت استافیلوکوکوس اورئوس مطابق جدول (۲) آورده شده است. با توجه به نتایج بدست آمده به دنبال ارائه مدلی مناسب براساس مدل اولیه (معادله ۱) برای کاهش جمعیت استافیلوکوکوس با توجه به سه متغیر فرض شده

آویشن، نعناع و کاکوتی می باشیم. مدل اولیه به صورت Full quadratic در نظر گرفته شد، به عبارت دیگر فرض اولیه و پیشنهادی، موکد بر موثر بودن تمامی ترم ها (متغیرها با توان اول، دوم و اثر متقابل متغیرها) و در نظر گرفتن آنها در مدل بود. ولی در عمل برخی از ترم های در نظر گرفته شده در مدل اضافی بود و باید حذف شوند لذا احتیاج به یک تحلیل آماری جهت مشخص نمودن ترم های موثر از غیر موثر وجود داشت. این تحلیل با استفاده از آزمون فرض و پارامتر p-value انجام می شود. محاسبات مربوطه توسط نرم افزار Design Expert 6.0.2 انجام شد و پس از حذف ترم های غیر موثر به جدول تحلیل آماری ۳ می رسیم.

جدول ۳- نتایج آنالیز واریانس (ANOVA) مدل سطح پاسخ برای تغییرات جمعیت استافیلوکوکوس اورئوس در نمونه های دوغ حاوی عصاره و پودر (A: آویشن، B: نعناع و C: کاکوتی)

Source	DF	Extracts 24h		Powders 24h	
		SS	P-Value	SS	P-Value
Model	۹	۳/۶۷	۰/۰۰۰۱	۹/۵۶	۰/۰۰۰۱
Linear					
A	۱	۱/۲۶	۰/۰۰۰۱	۰/۳۰	۰/۰۰۱۶
B	۱	۰/۵۲	۰/۰۰۱۵	۰/۶۵	۰/۰۰۰۱
C	۱	۰/۰۰۱۹	۰/۷۹۶۶	۱/۲۹	۰/۰۰۰۱
Quadratic					
A ²	۱	۰/۰۰۳۹	۰/۷۱۳۳	۰/۰۰۴	۰/۶۲۹
B ²	۱	۰/۱۵	۰/۰۴۱۴	۰/۷۷	۰/۰۰۰۱
C ²	۱	۰/۰۰۴۵	۰/۶۹۲۸	۰/۱۶	۰/۰۱۰۴
Interaction					
AB	۱	۰/۲۶	۰/۰۱۲۲	۰/۹۹	۰/۰۰۰۱
AC	۱	۰/۸۷	۰/۰۰۰۲	۰/۶۰	۰/۰۰۰۱
BC	۱	۰/۴۸	۰/۰۰۲۰	۳/۰۹	۰/۰۰۰۱
Residual	۱۰	۰/۲۸		۰/۱۶	
Lack of fit	۵	۰/۲۲	۰/۰۸۹۱	۰/۱۳	۰/۰۶۰۹
Pure error	۵	۰/۰۵۹		۰/۰۲۹	
Total	۱۹	۳/۹۵		۹/۷۳	

نتایج آنالیز آماری در جدول ۳ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می گردد، عبارت هایی از مدل که در آزمون عصاره بعد از ۲۴ ساعت معنی دار بودند شامل عبارت خطی آویشن ($p < 0/0001$) و نعناع ($p < 0/01$)، عبارت درجه دوم نعناع ($p < 0/05$) و عبارات برهم کنش آویشن، نعناع ($p < 0/05$) و آویشن، کاکوتی ($p < 0/01$) و نعناع، کاکوتی ($p < 0/01$) می باشند و از آنجایی که عبارت خطی کاکوتی و روابط درجه دوم آویشن، کاکوتی معنی دار نبوده از مدل حذف شدند. همچنین براساس SS بیشترین تأثیر مربوط به عصاره آویشن می باشد.

همچنین عبارت هایی از مدل که در آزمون پودر بعد از ۲۴ ساعت معنی دار بودند شامل عبارات خطی آویشن ($p < 0/01$)، نعناع و کاکوتی ($p < 0/0001$) و روابط درجه دوم نعناع ($p < 0/0001$) و کاکوتی ($p < 0/05$) و تمامی عبارات بر هم کنش می باشند ($p < 0/0001$). از آنجایی که عبارت درجه دوم آویشن معنی دار نبوده از مدل حذف شد. در بین متغیرها، اثر

در جدول ۳، DF^۱: به معنای درجه آزادی، SS^۲: به معنای مجموع مربعات و P-Value مقادیر عددی تعیین کننده در پذیرش یا رد فرض آماری مورد نظر می باشند. مهم ترین قسمت در جدول تحلیل آماری در بخش آنالیز واریانس، پارامتری به نام آزمون ضعف برازش^۳ می باشد. این پارامتر نشان دهنده مناسب بودن یا نا مناسب بودن مدل می باشد. مقدار P پارامتر ضعف برازش برای کاهش جمعیت باکتری پاتوژن مذکور در نمونه های دوغ حاوی عصاره و پودر در زمان ۲۴ ساعت به ترتیب برابر $P = 0/0891$ ، $P = 0/0609$ بدست آمد، که بیانگر این است که آزمون ضعف برازش مربوط به مدل برازش یافته (چند جمله ای درجه دوم) بر پاسخ معنی دار نبود. بنابراین، مدل توانسته به خوبی بر داده های مورد بررسی برازش شود.

1- DF: Degrees of Freedom

2- SS: Sum of Square

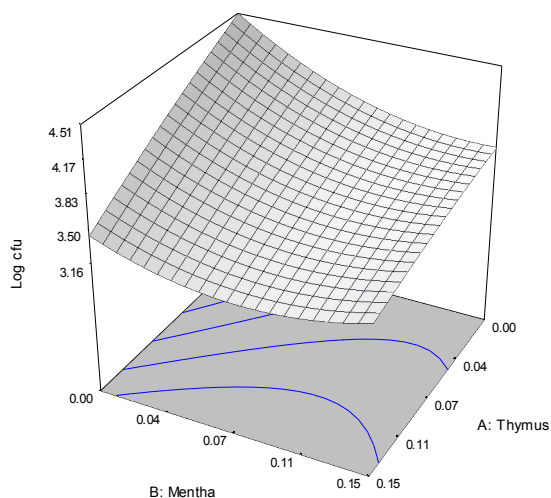
3- Lack of fit

$$Y(3) = +4.98830 - 11.66669X_1 - 30.50602X_2 - 23.15609X_3 + 94.23741X_2^2 + 42.93059X_3^2 + 62.57406X_1X_2 + 48.56372X_1X_3 + 110.48961X_2X_3$$

معادله ۳ نشان دهنده ارتباط مقادیر ضریب واقعی حاصل از آزمایش بعد از گذشت ۲۴ ساعت در نمونه های حاوی پودر می باشد.

نمودارهای سه بعدی^۱

این نمودارها میزان کاهش جمعیت استافیلوکوکوس را در برابر متغیرها به صورت سه بعدی نشان می دهد. این اشکال فضایی با استفاده از نقاط آزمایش شده و همچنین درون یابی سایر نقاط با استفاده از مدل محاسباتی صورت می گیرد. در شکل های ۴ و ۱ نمودار سه بعدی اثر همزمان دو متغیر آویشن- نعناع، شکل ۵ و ۲ اثر همزمان آویشن- کاکوتی و شکل ۶ و ۳ اثر همزمان نعناع- کاکوتی بر تغییرات جمعیت استافیلوکوکوس در نمونه های دوغ حاوی عصاره و پودر نشان داده شده است.



شکل ۱- نمایش نمودار سه بعدی؛ اثر همزمان دو متغیر آویشن- نعناع بر تغییرات جمعیت استافیلوکوکوس در نمونه های دوغ حاوی عصاره بعد از گذشت ۲۴ ساعت

بر این اساس در شکل ۱ قابل ملاحظه است که با افزایش غلظت عصاره آویشن، در تمامی غلظت های

همزمان نعناع، کاکوتی به علت داشتن مقدار بالاتر SS، اثر بیشتری روی مدل داشتند.

برای اینکه مدل توانایی خوبی برای برازش اطلاعات داشته باشد لازم است که R^2 adjusted دارای بالاترین مقدار باشد؛ ضریب تبیین (R^2) به عنوان نسبت تغییرات توصیف شده توسط مدل به تغییرات کل بیان می شود که معیاری از درجه ی تناسب برازش می باشد. بنابراین هر چه مقدار R^2 به یک نزدیک تر شود، قدرت مدل برازش یافته در توصیف تغییرات پاسخ به عنوان تابعی از متغیرات مستقل بیشتر می باشد. Beatriz و همکاران (۲۰۰۵) چنین عنوان کردند که برای یک مدل با برازش خوب، مقدار R^2 بایستی حداقل ۰/۸ باشد. همچنین ضریب تغییرات (CV) نیز بیانگر خطاها در انجام آزمایشات است و هر چه این عدد پایین تر باشد دقت آزمایش را نشان می دهد.

جدول ۴- پارامترهای آماری بدست آمده برای کاهش جمعیت استافیلوکوکوس

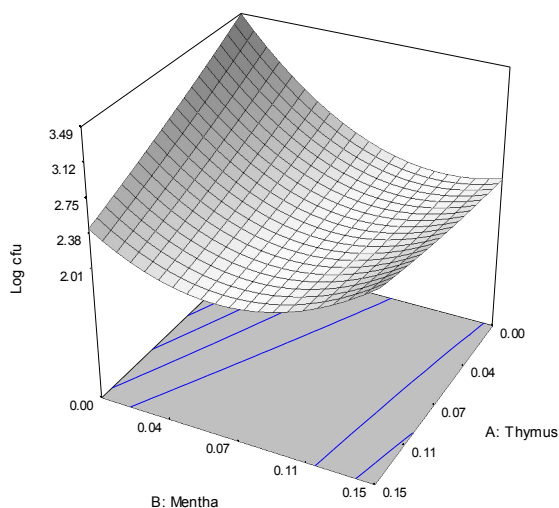
پارامترهای آماری	Extracts 24h	Powders 24h
R^2	۰/۹۲۹۹	۰/۹۸۳۳
Adj- R^2	۰/۸۶۶۸	۰/۹۶۸۳
CV	۳/۹۰	۴/۹۹

با به کارگیری روش آماری سطح پاسخ، معادله های زیر نشان دهنده ی ارتباط مقادیر ضرایب واقعی حاصل از آزمایشات با متغیرهای آزمایش آورده شده است:

$$Y(2) = +5.11224 - 10.51490X_1 - 14.94254X_2 + 41.73241X_2^2 + 31.90283X_1X_2 + 58.69924X_1X_3 + 43.36794X_2X_3$$

معادله (۲) نشان دهنده ارتباط مقادیر ضریب واقعی حاصل از آزمایش بعد از گذشت ۲۴ ساعت در نمونه های حاوی عصاره است.

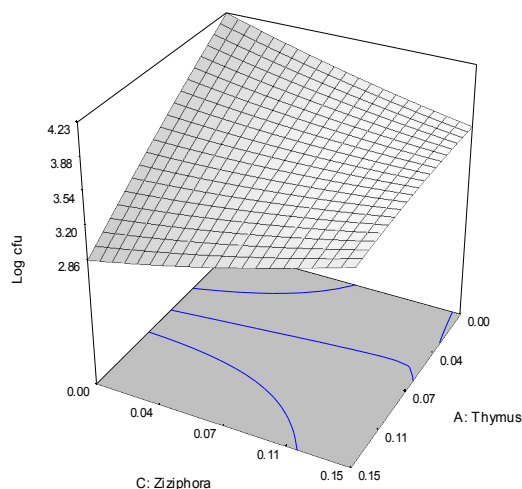
از میان شرایطی که بر روی کاهش استافیلوکوکوس در نمونه های دوغ حاوی عصاره بعد از ۲۴ ساعت موثر بود، مشخص شد که کاهش استافیلوکوکوس اورئوس، از عصاره آویشن، نعنای تأثیر می پذیرد. جمعیت استافیلوکوکوس اورئوس با غلظت عصاره آویشن نسبت معکوس داشت، یعنی با افزایش غلظت جمعیت استافیلوکوکوس اورئوس کاهش یافت.



شکل ۴- نمایش نمودار سه بعدی؛ اثر همزمان دو متغیر آویشن- نعنای بر تغییرات جمعیت استافیلوکوکوس در نمونه های دوغ حاوی پودر بعد از گذشت ۲۴ ساعت

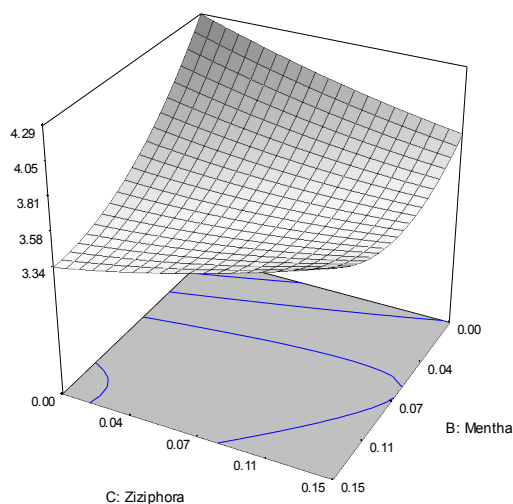
همان طور که در شکل ۴ مشاهده می گردد با افزایش غلظت پودر نعنای، در غلظت ۰ پودر آویشن، جمعیت استافیلوکوکوس اورئوس به صورت نمایی کاهش یافت. با توجه به معنی دار بودن اثر نمایی نعنای ($p < 0.0001$) می توان روند کاهش نمایی را در شکل مشاهده کرد.

عصاره نعنای جمعیت استافیلوکوکوس اورئوس به صورت خطی کاهش یافت.



شکل ۲- نمایش نمودار سه بعدی؛ اثر همزمان دو متغیر آویشن- کاکوتی بر تغییرات جمعیت استافیلوکوکوس در نمونه های دوغ حاوی عصاره بعد از گذشت ۲۴ ساعت

در شکل ۲ قابل ملاحظه است که با افزایش غلظت عصاره آویشن، در تمامی غلظت های عصاره کاکوتی جمعیت استافیلوکوکوس اورئوس به صورت خطی کاهش یافت. با توجه به معنی داری اثر خطی آویشن ($p < 0.0001$) می توان روند کاهش خطی را در شکل مشاهده کرد.



شکل ۳- نمایش نمودار سه بعدی؛ اثر همزمان دو متغیر نعنای- کاکوتی بر تغییرات جمعیت استافیلوکوکوس در نمونه های دوغ حاوی عصاره بعد از گذشت ۲۴ ساعت

اثر نمایی کاکوتی می توان روند کاهش نمایی را در شکل مشاهده کرد ($p < 0.001$).

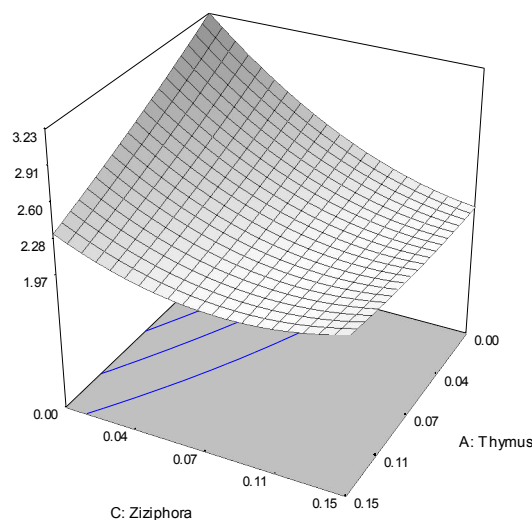
از میان شرایطی که بر روی کاهش استافیلوکوکوس در نمونه های دوغ حاوی پودر بعد از ۲۴ ساعت موثر بود، مشخص شد که کاهش استافیلوکوکوس، از پودرهای آویشن، نعناع و کاکوتی تأثیر می پذیرد، به طوری که پودر کاکوتی به میزان بیشتری از پودر نعناع بر کاهش جمعیت استافیلوکوکوس تأثیر داشت و پودر آویشن نسبت به دو فاکتور دیگر تأثیر کمتری بر کاهش جمعیت استافیلوکوکوس اورئوس داشت. جمعیت استافیلوکوکوس با غلظت پودر کاکوتی نسبت معکوس داشت.

آخوند زاده و همکاران (۲۰۰۷) اثرات متقابل آویشن، PH و دما بر رشد استافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا تیفی موریوم را مورد بررسی قرار دادند. از مقادیر متفاوت آویشن (۰، ۰/۰۳، ۰/۰۶ و ۰/۰۹ درصد)، PH (۷/۳ و ۶) و دمای متفاوت نگهداری (۱۵، ۲۵ و ۳۵) استفاده شد. نتایج مشاهده شده در این مطالعه، اثرات معنی داری از ترکیب اسانس روغنی، PH و دما بر عدم رشد سالمونلا تیفی موریوم و استافیلوکوکوس اورئوس نشان داد.

فاضلی و همکاران (۲۰۰۷) فعالیت ضد میکروبی سماق ایرانی و آویشن شیرازی بر بعضی از باکتری های عامل فساد غذایی را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این بررسی نشان داد هر دو ادویه معروف ایرانی که به طور سنتی به عنوان عامل قابض و طعم دهنده تند به کار می رود اثرات بازدارندگی بر باکتری عامل فساد غذایی نشان می دهند و می توانند به عنوان افزودنی طبیعی غذایی مورد توجه قرار گیرند.

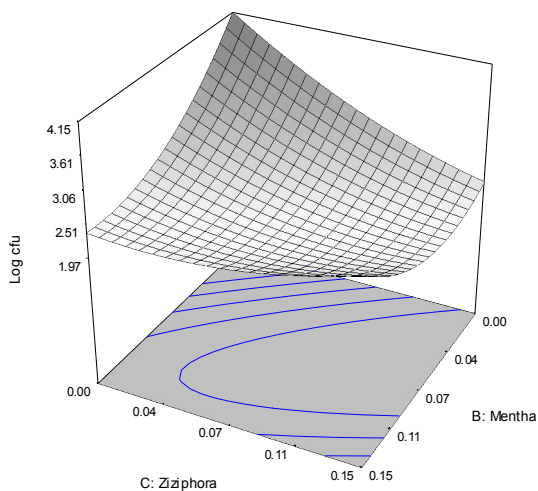
برومند و همکاران (۱۳۸۷) بررسی خاصیت ضد میکروبی اسانس بذرهای شوید و گشنیز بر روی استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلی O157:H7، سالمونلا تیفی موریوم با استفاده از آزمایش حساسیت رقت در محیط مایع مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این بررسی نشان داد که استافیلوکوکوس اورئوس حساس ترین و سالمونلا تیفی موریوم مقاوم ترین باکتری به هر دو اسانس بودند.

Simsek و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که تعداد استریپتوکوکوس ترموفیلوس و لاکتو باسیلوس



شکل ۵- نمایش نمودار سه بعدی؛ اثر همزمان دو متغیر آویشن- کاکوتی بر تغییرات جمعیت استافیلوکوکوس در نمونه های دوغ حاوی پودر بعد از گذشت ۲۴ ساعت

در شکل ۵ قابل ملاحظه است که با افزایش پودر آویشن، در تمامی غلظت های پودر کاکوتی جمعیت استافیلوکوکوس به صورت خطی کاهش یافت. با توجه به معنی داری اثر خطی آویشن ($p < 0.01$) می توان روند کاهش خطی را در شکل مشاهده کرد.



شکل ۶- نمایش نمودار سه بعدی؛ اثر همزمان دو متغیر نعناع- کاکوتی بر تغییرات جمعیت استافیلوکوکوس در نمونه های دوغ حاوی پودر بعد از گذشت ۲۴ ساعت

با توجه به شکل در پی افزودن پودر کاکوتی در غلظت های پایین پودر نعناع جمعیت استافیلوکوکوس به صورت نمایی پایین می رود. با توجه به معنی داری

در این شرایط بیشترین میزان کاهش جمعیت *استافیلوکوکوس* بعد از گذشت ۲۴ ساعت Log/ml ۱/۹۸ می باشد. اثر خوب باکتری کشی پودرها را می توان به ترکیبات تیمول و کارواکرول مربوط دانست، این ترکیبات در طبیعت به صورت فنولیک هستند مطالعات بر روی مکانیسم فنولیک بیان کننده این مطلب می باشد که این ترکیبات بر روی غشاء سلولی تأثیر می گذارند و نفوذ پذیری را مختل می کنند، سپس منجر به اختلال فعالیت غشاء سلولی در پذیرش انتقال الکترونی، برداشت مواد مغذی، سنتز اسید نوکلئیک و ATPase می شوند. این نتیجه مشابه نتایج محققین دیگر می باشد (Denyer & Hugo, 1991; Simonetti, 1991; Negueruela & Mata, 1986).

بولگاریکوس در نمونه های دوغ محلی ترکیه تولید شده با ادویه های نعناع، آویشن و سیر و نمونه شاهد در طول زمان نگهداری به صورت معنی داری کاهش یافت ولی اثر ادویه های مذکور روی تعداد باکتری های آغازگر در مقایسه با نمونه شاهد معنی دار نبود.

نتیجه گیری

پس از بررسی نتایج اثر عصاره ها و پودرهای طبیعی در نمونه های دوغ مشخص شد که پودر گیاهان تیره نعناع در غلظت های به کار رفته در این آزمایش به میزان بیشتری از عصاره گیاهان تیره نعناع بر کاهش جمعیت *استافیلوکوکوس* تأثیر داشت، فرمول بهینه پودرها برای کاهش یا مرگ باکتری پاتوژن با غلظت پودر آویشن (v/v) ۰/۰۹، نعناع (v/v) ۰/۰۶ و کاکوتی (v/v) ۰/۱۴ میزان تلقیح بدست آمده است که

منابع

- ۱- آخوندزاده بستی، ا.، میثاقی، ع.، موسوی، م. ح.، زهرایی صالحی، ت. و کریم، گ. (۱۳۸۶). اثر اسانس گیاه آویشن شیرازی بر رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* در سوپ تجارتي، فصلنامه گیاهان دارویی، شماره ۲۲، ص ۹۸-۹۱.
- ۲- برومند، ع.، حامدی، م.، امام جمعه، ز.، رضوی، ه. و گلمکانی، ت. (۱۳۸۷). بررسی خاصیت ضد میکروبی اسانس بذرهاي شويد و گشنيز بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس*، اشرشیاکلی *O157:H7*، سالمونلا تیفی موریوم با استفاده از آزمایش حساسیت رقت در محیط مایع، فصلنامه پژوهش های علوم و صنایع غذایی ایران، جلد ۴ شماره ۱، ص ۶۹-۵۹.
- 3- Bayoumi, S.1992. Bacteriostatic effect of some spices and their utilization in the manufacture of youghurt. *Chemie – Microbiologie- Technology- der-LebenSmittel*. 14 (1/2): 21-26.
- 4- Barnon, E.J. & Fineg Old, S.M. 1990. Method for testing antimicrobial effectiveness. in: diagnostic microbiology, 8th ed. The Mosby Company. pp, 172-184.
- 5- Beatriz, H. Benrnal, S. Calle, J., Elcy, Q., Pinzon, R. & Velasa/quez, P. 2005. Inulin from tubers of *Dahlia imperialis* Roetz *Revista Colombiana de Ciencias Quimico Farmaceuticas* 34 (2): 122-125.
- 6- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potentiona applications in foods, a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223-253.
- 7- Chachoyan, A. A. & Oganesyanyan, G. B. 1996. Antitumor activity of some spices of the family lamiaceae. *Rastitelnye Resursy*, 32 (4):59-64.
- 8- Delaquis, P.J. and Mazza, G. (1995). Antimicrobial properties of isothiocyanates in food preservation. *J. Food Technology*, 49(11):73-84
- 9- Denyer, S.P., & Hugo, W. B. 1991. Biocide induced damage to the bacterial cytoplasmic membrane. In S.P. Denyer & W.B. Hugo, Mechanisms of action of chemical biocides; their study and exploitation (pp. 171-188). The Society for Applied Bacteriology, Technical Series No 27. Oxford Blackwell Scientific Publication.
- 10- Fazeli, M. R., Armin, G.h., Ahmadian Attari, M. M., Ashtiani, H., Jamalifar, H. & Samadi, N. 2007. Antimicrobial activites of Iranian sumac and avishane Shirazi against some food born bacteria. *Food Control*, 18: 646-649.

- 11- Han, G.H. 2000. Antimicrobial food packaging .Journal of Food Technology, 54 (3): 56-65.
- 12- Holley, R. A. & Patel, D. 2005. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. Food Microbiology, 22: 273-292.
- 13- Marino, M., Barsani, C. & Comi, G. 2001. Impedence measurments of study the antimicrobial activity of essential oil from lamiaceae and compositae. International Journal of Food Microbiology, 67:187-195.
- 14- Mortazavi, A., Zirgani, L. & Tabatabaie yazdi, F. 2009. Applied food microbiology practical and laboratory. Ferdowsi Univercity of Mashhad Publication. 218-227.
- 15- Negueruela, A. V. & Mata, R.M. 1986. The volatile oil of ziziphora hispanica. Flavour and Fragnance Journal, 1 (3): 111-113.
- 16- Nychas, G.J. E. (1995). Natural antimicrobials from plants. In G. W. Gould, New methods of food preservation (pp. 58-89). London: Blackie Academic Professional.
- 17- Simonetti, G. 1991. The acDonald encyclopedia of herbs and spices. Macdonald and Co. (Pub). Ltd. London, pp.255.
- 18- Simsek, B., Sagdic, O., & Ozcelik, S. 2007. Survival of *escherichia coli* O157:H7 during the storage of ayran produced with different spices. Journal of Food Engineering, 79 (2): 679-680.
- 19- Tranter, H. S., Tassou, C.C. & Nychas, G.J. 1993. The effect of the olive phenolic compounds, oleuropein, on growth and enterotoxin B production by *Staphylococcus aureus*. Journal of Applied Bacteriology, 74: 253-260.
- 20- Webb H. By products from milk. The A VI pub Co. 1970: pp: 34-6.
- 21- Wikipedia, Ayran, [http:// en. Wikipedia. Org/ wiki/ Ayran](http://en.wikipedia.org/wiki/Ayran) (retrieved on 8012, 2008).

Investigation and comparison of effects of natural composition inhibitory *Staphylococcus aureus* in industrial doogh samples with response surface method (RSM)

F. Tabatabaie yazdi^{1*}, A. Mortazavi², A. koochaki³, S. Afsharian⁴

1- Associate professor, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad

* Corresponding author (tabatabai@ferdowsi.um.ac.ir, farideh_tabatabaee@yahoo.com)

2- Professor, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad

3- Assistant professor, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad

4- BS., Microbiology laboratory, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad

Abstract

In recent years, the uses of natural antimicrobial compounds, including extracts and herbal powders as preservative compound of the food are increasingly popular. The aim of the study was to evaluate antimicrobial effect of extract and powder of *lamiaceae* plants (*thymus vulgaris* L., *Mentha* spp. and *Ziziphora tenuifolia* L.) over prevention of pathogenic bacteria (*Staphylococcus aureus*) growth by examining industrial Doogh samples. For this purpose, three extracts contained (0, 0.075, 0.15 v/v) and powder contained (0, 0.075, 0.15 v/v) were prepared. Bacterial population decrease or survival in doogh samples were examined according to *Staphylococcus* pure strains in a 24 hours time within separate rounds by measuring the kinetics of bactericidal effects, using response surface design. Analysis Results in the inhibition effects of natural antibiotic agent in the Doogh samples revealed that: the powder of Lamiaceae family have greater effects on decreasing population of *Staphylococcus* than extracts. The best amounts of powder for decreasing pathogenic bacterial population were as following, *Thymus* 0.09 (v/v), *Mentha* 0.06 (v/v), and *Ziziphora* 0.14(v/v). In these circumstances greatest reduction of *Staphylococcus* population in 24 h is 1.98 Log/ml.

Keywords: Natural Inhibitor compounds; *Thymus vulgaris* L.; *Mentha* spp. and *Ziziphora tenuifolia* L.; *Staphylococcus aureus*; Industrial doogh.