نشریه دامپزشکی
در
پژوهش و سازندگی شماره ۱۰۴ پاییز ۱۳۹۳

ارزیابی اثرات ضد باکتریایی عصاره الکلی مرزه بختیاری بر برخی باکتری‌های بیماری زای غذازاد در گوشت قرمز

• **سعید حبیبیان دهکردی**
دانشیار بخش فارماکولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد

• **ساجده قلی پور**
دانش‌آموخته رشته دکترای حرفه‌ای دامپزشکی دانشگاه شهرکرد و دانشجوی دکترای تخصصی فارماکولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز

• **حمدالله مشتاقی بروجنی**
دانشیار بخش بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد

• **عزیزالله فلاح**
استادیار بخش بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد

تاریخ دریافت: مهرماه ۱۳۹۲ تاریخ پذیرش: بهمن‌ماه ۱۳۹۲

habibian@vet.sku.ac.ir

چکیده

در این بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره الکلی مرزه بختیاری بر روی دو باکتری بیماری زای غذا زاد شامل استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کلی به دو روش کمی‌و کیفی مورد بررسی قرار گرفت. تعیین مقادیر MIC و MBC به عنوان روش کمی‌و انتشار دیسک و ایجاد چاهک به عنوان روش‌های کیفی استفاده شدند. نتایج حاصل از آزمایش انتشار دیسک نشان داد که عصاره مرزه بختیاری در رقت‌های ۲ درصد و ۵ درصد هیچ اثر مهاری بر رشد باکتری ندارد. نتایج آزمایش انتشار چاهک نیز نشان داد که عصاره مرزه بختیاری تنها در غلظت ۵ درصد مانع از رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس می‌شود. در این تحقیق نشان داده شد که میزان MIC و MBC عصاره الکلی مرزه بختیاری علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب برابر ۱/۵۶ mg/ml و ۱۲/۵ mg/ml می‌باشد. MIC و MBC عصاره الکلی مرزه بختیاری بر علیه باکتری اشریشیا کلی نیز به ترتیب برابر با ۳/۱۲۵ mg/ml و صفر بود. نتایج حاصل از ارزیابی اثر ضد باکتریایی مرزه بختیاری بر عصاره گوشت نیز آشکار کرد که در دماهای ۴ و ۱۵ درجه سانتی گراد، رشد باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کلی در حضور مرزه بختیاری با غلظت دو و پنج درصد در مقایسه با زمان صفر با کاهش مواجه شد منتها این کاهش در مورد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در دمای ۴ درجه چشمگیرتر بود ($p<0/05$). همچنین تفاوت معنی داری در تعداد میکروارگانیسم‌های شمارش شده در زمان‌های مختلف بین گروه شاهد و گروه‌های آزمایشی در هر دو دما و در مورد هر دو باکتری مورد آزمایش وجود داشت($p<0/05$). بر اساس نتایج بدست آمده نتیجه گیری می‌شود که از مرزه بختیاری می‌توان به عنوان نگهدارنده علیه این باکتری‌ها در صنایع غذایی استفاده کرد.

کلمات کلیدی: مرزه بختیاری، استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیا کلی، عصاره گوشت

● Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 104 pp: 28-37

Evaluating antibacterial effects of alcoholic extract of *Satureja bactiarica* on some foodborne pathogenic bacteria of meat

Habibian Dehkordi S., Pharmacology Dept. Veterinary Faculty of Sharkord University
Gholipour S., Doctorate Student of Pharmacology, Veterinary Faculty of Shiraz University
Moshtaghi Broojeni H., Dept of Foodstuff Hygiene, Veterinary Faculty of Sharkord University
Fallah A., Dept of Foodstuff Hygiene, Veterinary Faculty of Sharkord University
habibian@vet.sku.ac.ir

Received: July 2012 Accepted: January 2013

The antibacterial effect of alcoholic extract of *Satureja bactiarica* were investigated quantitatively and qualitatively on two foodborne pathogenic bacteria including *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Determination of the MIC and MBC values were used as quantitative method, and disk and well diffusion methods were applied as qualitative methods. The results of the disk diffusion test showed that extracts of *Satureja bactiarica* at the concentration of 2% and 5% has no inhibitory effect on bacterial growth. The results of the well diffusion test showed that extracts of *Satureja bactiarica* in concentrations of 5% inhibits *Staphylococcus aureus* growth. In this study it was shown that the MIC and MBC of the alcoholic extract of *Satureja bactiarica* against the *Staphylococcus aureus* were 1.56 mg/ml and 12.5 mg/ml, respectively. MIC and MBC of the alcoholic extract of *Satureja bactiarica* against the *Escherichia coli* were 3.125 mg/ml and zero, subsequently. The results from evaluation of the antibacterial effects of the *Satureja bactiarica* revealed that at 4 and 15 °C, the growth of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in test tubes containing meat extracts has increased from the beginning to the end of the experiment. In the present of the extracts of *Satureja bactiarica* at the concentration of 2% and 5% in the both tested temperatures the growth of the bacteria decreased in comparison to time zero ($p<0.05$). Furthermore, there was a significant difference in the number of counted microorganism at various times between control and experimental groups in both tested temperatures and both examined bacteria ($p<0.05$). Based on the results from this study it is concluded that *Satureja bactiarica* can be used as preservative against these bacteria in the food industry.

Keywords: *Satureja bactiarica, Staphylococcus aureus, Escherichia coli*, Meat extract.

مقدمه

با وجود پیشرفت های فراوان در صنایع غذایی و ارتقای وضعیت بهداشتی کارخانجات و کشتارگاه ها هنوز هم بیماری های ناشی از آلودگی مواد غذایی حدود ۳۰ درصد مردم جهان را تحت تأثیر خود قرار می‌دهد.

عوامل میکروبی مشکل ساز در مواد غذایی عمدتا به دو دسته تقسیم می‌گردند:

دسته اول عواملی هستند که از آن‌ها تحت عنوان عوامل بیماری زای غذا زاد (foodborne pathogens) نام برده می‌شود و دسته دوم تحت عنوان عوامل فساد زای مواد غذایی می‌باشند (food spoilage microrganisms). از دسته اول می‌توان به *Vibrio parahemolyticus* و گونه‌های جنس کامپیلوباکتر، *Staphylococcus aureus, Salmonella typhimurium, Escherichia coli, Bacillus cereus, Clostridium botulinum, Yersinia enterocolitica, Listeria monocytogenes* گونه‌های مختلف جنس شیگلا *Shigella, Plesiomonas shigelloides* و از دسته دوم به *Bacillus subtilis* برخی گونه های *Pseudomunas* و *Acintobacter* اشاره نمود (۳).

از جمله راه‌های مبارزه با این میکروارگانیسم‌ها استفاده از آنتی بیوتیک‌ها و مواد ممانعت کننده از رشد آن‌ها می‌باشد. استفاده از این ترکیبات در مواد غذایی با عوارض جانبی، تولید متابولیت‌های ثانویه ی مضر و افزایش مقاومت میکروارگانیسم‌ها همراه خواهد بود. با این تفاسیر لزوم توجه به روش‌های جدید نگهداری، بیش از پیش روشن می‌گردد. در همین راستا استفاده از داروهای ضد میکروبی با منشاء گیاهی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

با توجه به تنوع آب و هوایی و تنوع فلور گیاهی در ایران، شناسایی مواد موثر گیاهان بومی‌کشور و استخراج آنها به منظور تولید انبوه و در سطح صنعتی آنها اهمیت زیادی پیدا کرده است. مرزه با نام علمی *Satureja hortensis*، گیاهی یک ساله، علفی تا نیمه چوبی، جزء گیاهان عالی گل دار و جزء رده دو لپه ای‌ها می‌باشد، که اغلب در مناطق مدیترانه‌ای پراکندگی دارد (۱). این جنس در ایران دارای ۱۵ گونه می‌باشد که از میان آن‌ها ۹ گونه با نام‌های: *S. intermedia*, *S. edmonde*, *S. khuzistania*, *S. isophyla*, *S. atropatana*, *S. sahendica* *S. bactiarica*, *S. kallarica*, *S. rechinyeri* انحصاری کشور هستند. گونه ی *S. bactiarica* دارای پراکندگی به نسبت وسیعی در ایران است و از استان‌های غربی، مرکزی و جنوب غربی ایران جمع‌آوری گردیده است (۲). هدف تحقیق حاضر بررسی اثرات ضد باکتریایی عصاره الکلی مرزه بختیاری که منحصرا بومی‌ایران بوده، روی

برخی باکتری‌های بیماری زای غذازاد در گوشت قرمز می‌باشد.

روش کار

عصاره‌گیری

مقدار یک و نیم کیلوگرم گیاه مرزه بختیاری پس از جمع‌آوری، در سایه خشک و پودرگردید. ۱۰۰۰ گرم از پودر مرزه بختیاری بدست آمده در ۱/۵ لیتر اتانول ۸۶ درصد به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق و به دور از نور خورشید قرار گرفته و سپس از کاغذ صافی عبورداده شد. باقی مانده مجدد در ۸۰۰ میلی لیتر اتانول ۸۶ درصد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفته و دو مرتبه از صافی عبور داده شد و بار دیگر باقی مانده‌ها در نیم لیتر اتانول ۸۶ درصد به مدت ۲۴ساعت قرار گرفتند. به منظور غلیظ سازی، ابتدا محلول حاصله به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرار گرفت و سپس با استفاده از دستگاه روتاری باقیمانده اتانول تبخیر و در نهایت عصاره به دست آمده به وسیله آسیاب برقی به صورت پودر در آورده شد. پودر حاصله به نسبت ۱ به ۵ در آب مقطر استریل حل گردید (واحد نسبت بر حسب g/ml) و عصاره ۲۰درصد مرزه تهیه شد. جهت استریل کردن محصول نهایی از صافی میلی پور شماره ۰/۲۲ میکرون استفاده شد.

تهیه رقت‌های مورد نیاز از باکتری‌های مورد آزمایش

برای انجام این کار ویال‌های حاوی سوش‌های استاندارد باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کلی (تهیه شده از کلکسیون میکروبی آزمایشگاه کنترل کیفی و بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی شهرکرد) ابتدا در محیط کشت جامد و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد احیا گردیدند و جهت اطمینان از جنس و گونه هر باکتری آزمایش‌های بیوشیمیایی مورد نیاز روی آن‌ها انجام گرفت. سپس توسط آنس استریل و در کنار شعله از هر یک از باکتری‌ها به صورت جداگانه تعدادی کلنی باکتری به داخل محیط کشت مایع تریپتوز سوی براث داخل لوله ی آزمایش در پیچ دار منتقل گردید و پس از بستن در لوله‌ها به داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد منتقل شد و به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شد.

پس از گذشت مدت زمان لازم جهت رشد باکتری‌ها، از هرکدام از محیط‌های کشت حاوی باکتری به صورت جداگانه رقت‌های سریال در داخل لوله‌های حاوی سرم فیزیولوژی استریل تهیه گردید و از هر رقت بر روی دو پلیت محیط کشت جامد به شکل سطحی کشت داده شد. بدین صورت که برای تهیه رقت سری از لوله‌های حاوی ۹ میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل استفاده شد. ابتدا به وسیله سمپلر ۱۰۰۰ میکرولیتری از لوله آزمایش حاوی محیط کشت باکتریایی، ۱ میلی لیتر به لوله اول حاوی سرم فیزیولوژی انتقال داده شد و سپس به ترتیب از هر لوله سرم فیزیولوژی پس از ورتکس کردن ۱ میلی لیتر به لوله بعدی انتقال یافت تا بدین شکل رقت‌های سری تهیه شد. پس از ورتکس کردن، توسط سمپلر ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت بر روی محیط کشت جامد تریپتوز سوی آگار منتقل و توسط لوله ی L شکل استریل در کنار شعله کاملا بر روی سطح پلیت پخش و در انکوباتور ۳۷ درجه به مدت ۲۴ساعت گرمخانه گذاری شدند. محیط‌های کشت مایع حاوی باکتری نیز جهت استفاده‌های بعدی داخل یخچال قرار داده شدند. پس از ۲۴ ساعت تعداد کلنی‌های رشد کرده در رقت‌های قابل شمارش که بین تقریبا ۳۰ تا ۳۰۰ کلنی در آن رشد کرده بود شمارش شد و با ضرب تعداد کلنی در عکس رقت و ضرب در ۱۰ تعداد باکتری موجود در هر میلی لیتر محیط کشت مایع به دست آمد.

روش‌های مورد استفاده برای ارزیابی اثر ضد باکتریایی عصاره مرزه بختیاری

تعیین مقادیر MIC و MBC

با استفاده از روش سری رقت (Serial Dilution)، اقدام به تعیین مقادیر حداقل غلظت مهارکنندگی رشد Minimum Inhibitory Concentration (MIC) و حداقل غلظت کشندگی باکتری Minimum Bacteriocidal Concentration (MBC) مرزه بختیاری علیه استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کلی شد. به این صورت که داخل دو راک ۳۰ خانه ایی، ۳۰ لوله آزمایش ردیف کرده، داخل هر لوله آزمایش نیم سی سی محیط تریپتوز سوی براث استریل اضافه کرده و سپس به ۳ لوله آزمایش ردیف اول هر راک ابتدا نیم سی سی عصاره مرزه بختیاری با غلظت ۲۰ درصد اضافه و مخلوط شد. بعد با پیپت استریل نیم سی سی از ۳ لوله آزمایش ردیف اول هر راک برداشته و داخل ۳ لوله آزمایش ردیف دوم راک مربوطه ریخته شد. در هر راک این عمل برداشت و اضافه کردن تا لوله‌های آزمایش ردیف ۱۰ ادامه یافت. از لوله‌های آزمایش ردیف ۱۰ هر راک نیز نیم سی سی از محتویات آنها برداشته شد و با رعایت نکات بهداشتی دور ریخته شد. در مرحله بعد به هر لوله آزمایش راک اول نیم سی سی از سوسپانسیون باکتری استافیلوکوکوس اورئوس با رقت ۱۰۶ واحد تشکیل دهنده پرگنه و به لوله‌های آزمایش راک دوم همین مقدار از سوسپانسیون باکتری اشریشیا کلی اضافه گردید. برای افزایش دقت و اطمینان از صحت آزمایش برای هر باکتری دو لوله کنترل نیز در نظر گرفته شد، یک لوله حاوی نیم سی سی باکتری و نیم سی سی محیط تریپتوز سوی براث و دیگری حاوی نیم سی سی عصاره مرزه بختیاری و نیم سی سی محیط تریپتوز سوی براث. سپس لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شده و مورد ارزیابی قرار گرفتند. ازآنجائی که طبق تعریف MIC عبارت است از کمترین غلظتی از یک آنتی بیوتیک که باعث ممانعت از رشد یک باکتری به خصوص می‌شود. نحوه ارزیابی به این صورت بود که آخرین لوله‌ای که در آن هیچ گونه کدورتی مشاهده نشد به عنوان MIC در نظر گرفته شد. جهت تعیین MBC نیز به این صورت عمل شد که از لوله‌های شفاف مرحله قبل روی محیط تریپتوز سوی آگار کشت داده شدند و MBC به این روش تعیین شد. طبق تعریف MBC عبارت است از کمترین غلظتی از یک آنتی بیوتیک که باعث از بین بردن باکتری می‌شود، پلیتی که در آن هیچ باکتری رشد نکرد، به عنوان MBC در نظر گرفته شد. سپس جهت بالا بردن دقت از غلظت‌های ما بین نیز جهت تعیین MBC استفاده شد.

روش انتشار دیسک (Disk Diffusion)

در این روش ابتدا باکتری‌های مورد آزمایش در محیط تریپتوز سوی براث کشت داده شد و به مدت۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد. سپس رقت ۱۰۶ از هر باکتری تهیه شد (رقت اولیه هر باکتری به وسیله تهیه سری رقت تعیین شد). با استفاده از سواپ استریل از هر یک از باکتری‌های ذکر شده بر روی محیط تریپتوز سوی آگار کشت داده شد (۱۷). مقدار ده میکرولیتر از عصاره مرزه بختیاری با

غلظت‌های۲ و ۵ درصد روی دیسک‌های بلانک ریخته و در نهایت روی محیط کشت تریپتوز سوی آگار حاوی هر یک از باکتری‌های ذکر شده قرار داده شد و به مدت۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد. دیسک‌های آنتی بیوتیکی تری‌متوپریم و فلورفنیکول به عنوان کنترل استفاده شدند. به منظور جلوگیری از بروز هرگونه خطا در نتایج بدست آمده این آزمایش سه بار تکرار شد.

روش انتشار چاهک (Well Diffusion)

در روشی دیگر با استفاده از سواپ استریل از هر یک از باکتری‌های ذکر شده بر روی محیط تریپتوز سوی آگار کشت داده شد. با استفاده از انتهای یک پیپت پاستور استریل شش چاهک به عمق ۲ میلی متر روی محیط تریپتوز سوی آگار حاوی باکتری‌های مورد نظر ایجاد و عصاره مرزه با غلظت‌های ذکر شده به مقدار ۵۰ میکرولیتر داخل هر یک از چاهک‌ها تزریق شد. محیط‌های تهیه شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شدند. به منظور جلوگیری از بروز هرگونه خطا در نتایج بدست آمده این آزمایش سه بار تکرار شد.

ارزیابی اثر ضد باکتریایی مرزه بختیاری بر عصاره گوشت

ابتدا مقدار ۲۵۰ گرم گوشت چرخ کرده گوساله تازه از یکی از قصابی‌های شهر شهرکرد خریداری و بلافاصله درون کیسه ایی حاوی یخ به آزمایشگاه انتقال داده شد. در آزمایشگاه ابتدا اقدام به تهیه عصاره از این گوشت شد.

برای تهیه عصاره گوشت ابتدا گوشت به نسبت ۱ به ۱۰ با آب مخلوط شد سپس در استومیکر (stomacher) کاملا خرد گردید. سپس برای منعقد شدن پروتئین‌ها، گوشت کاملا پخته شد. آب گوشت به و سیله صافی استخراج شد و به منظور استریل سازی در اتوکلاو قرار گرفت. در مرحله بعد داخل یک راک ۳۰ خانه ایی، ۱۴ لوله آزمایش استریل ردیف کرده و مطابق جدول ۱ مواد ذکر شده به هر لوله آزمایش اضافه شدند.

دلیل اضافه کردن مرزه بختیاری با غلظت‌های ۶ و ۱۵ درصد این بود که غلظت نهایی مرزه بختیاری در هر لوله آزمایش به ترتیب ۲ و ۵ درصد شود.

در مرحله بعد این لوله‌های آزمایش در دو دمای ۴ و ۱۵ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. پس از زمان‌های ۰، ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت از شروع آزمایش رقت سری تهیه شد و به روش کشت سطحی بر روی محیط تریپتوز سوی آگار کشت داده شد و در انکوباتور ۳۷ درجه به مدت ۲۴ قرار گرفت. تعداد کلنی‌های پلیت‌هایی که بین ۳۰ تا ۳۰۰ کلنی بود شمارش گردید و با ضرب تعداد کلنی در عکس رقت و ضرب در ۱۰ تعداد باکتری موجود در هر میلی لیتر محیط کشت مایع به دست آمد. نتایج حاصل از این بررسی پس از ۳ بار تکرار در دو دمای ذکر شده با استفاده از نرم افزار آماری Prism ۳ و به وسیله آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تکمیلی Tukey با هم مقایسه شدند.

نتایج

نتایج تعیین مقادیر MIC و MBC

با استفاده از روش رقت سری، مقادیر MIC و MBC عصاره مورد استفاده در این تحقیق یعنی مرزه بختیاری علیه استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کلی تعیین شد. این نتایج نشان داد که در مورد استافیلوکوکوس اورئوس در لوله‌های آزمایش ردیف اول تا ششم بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون هیچ گونه کدورتی مشاهده نشد و مشخص شد که MIC برای عصاره

جدول ۱: مقدار مواد استفاده شده برای ارزیابی اثرات ضد باکتریایی مرزه بختیاری بر عصاره گوشت

ردیف	عصاره گوشت	سوسپانسیون باکتری استافیلوکوکوس اورئوس با رقت ۱۰۶ واحد تشکیل دهنده پرگنه	سوسپانسیون باکتری اشرشیا کولای با رقت ۱۰۶ واحد تشکیل دهنده پرگنه	عصاره مرزه بختیاری با غلظت ۶ درصد	عصاره مرزه بختیاری با غلظت ۱۵ درصد
لوله آزمایش ۱	۰/۵ml	۰/۵ml	-	۰/۵ml	-
لوله آزمایش ۲	۰/۵ml	۰/۵ml	-	۰/۵ml	-
لوله آزمایش ۳	۰/۵ml	۰/۵ml	-	۰/۵ml	-
لوله آزمایش ۴	۰/۵ml	۰/۵ml	-	-	۰/۵ml
لوله آزمایش ۵	۰/۵ml	۰/۵ml	-	-	۰/۵ml
لوله آزمایش ۶	۰/۵ml	۰/۵ml	-	-	۰/۵ml
لوله آزمایش ۷	۰/۵ml	-	۰/۵ml	۰/۵ml	-
لوله آزمایش ۸	۰/۵ml	-	۰/۵ml	۰/۵ml	-
لوله آزمایش ۹	۰/۵ml	-	۰/۵ml	۰/۵ml	-
لوله آزمایش ۱۰	۰/۵ml	-	۰/۵ml	-	۰/۵ml
لوله آزمایش ۱۱	۰/۵ml	-	۰/۵ml	-	۰/۵ml
لوله آزمایش ۱۲	۰/۵ml	-	۰/۵ml	-	۰/۵ml
لوله شاهد ۱	۰/۵ml	۰/۵ml	-	-	-
لوله شاهد ۲	۰/۵ml	-	۰/۵ml	-	-

مرزه بختیاری علیه استافیلوکوکوس اورئوس در این تحقیق ۱/۵۶/mg/ml می‌باشد. در مورد اشریشیا کلی نیز در لوله‌های ردیف اول تا پنجم بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون هیچ گونه کدورتی مشاهده نشد. یعنی MIC بدست آمده در این بر علیه اشریشیا کلی برابر ۳/۱۲۵ mg/ml می‌باشد.

نتایج جهت تعیین MBC نیز نشان داد که عصاره مرزه بختیاری در غلظت ۱۲/۵ mg/ml قادر به از بین بردن باکتری استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد. عصاره مرزه بختیاری در هیچ غلظتی قادر به از بین بردن باکتری اشریشیا کلی نبود. بنابراین MBC برای عصاره مرزه بختیاری بر علیه اشریشیا کلی به دست نیامد.

نتایج حاصل از روش انتشار دیسک

هیچ گونه‌هاله عدم رشدی در مورد استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کلی در اطراف دیسک‌های آغشته به عصاره مرزه بختیاری مشاهده نشد. قطرهاله عدم رشد برای آنتی بیوتیک تری متوپریم در مورد استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کلی ۲۵ میلی متر و در مورد آنتی بیوتیک فلورفنیکول برای استافیلوکوکوس اورئوس ۳۰ میلی متر و برای اشریشیا کلی ۳۲ میلی متر اندازه گیری شد.

نتایج حاصل از روش ایجاد چاهک

بعد از ایجاد چاهک در محیط‌های کشت تریپتوز سوی آگار حاوی باکتری‌های مورد نظر و تزریق عصاره مرزه بختیاری با غلظت‌های ۲ و ۵ درصد داخل چاهک‌های ایجاد شده‌هاله عدم رشد برای استافیلوکوکوس اورئوس تنها در غلظت پنج درصد مشاهده شد که اندازه آن هم به طور میانگین ۲۰ میلی متر اندازه گیری شد. این در حالی بود که برای اشریشیا کلی‌هاله‌ای مشاهده نگردید

نتایج حاصل از ارزیابی اثر ضد باکتریایی مرزه بختیاری بر عصاره گوشت

اثر ضد باکتریایی مرزه بختیاری بر عصاره گوشت آلوده به استافیلوکوکوس اورئوس نگهداری شده در دمای ۴ درجه سانتی گراد

همان گونه که در جدول ۲ نشان داده شده است، نتایج نشان داد که در دمای ۴ درجه سانتی گراد، رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در لوله شاهد از ابتدا تا انتهای آزمایش افزایش داشته است و این افزایش در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت معنی دار بوده است (p<۰/۰۵). درحضور مرزه بختیاری با غلظت دو درصد رشد این باکتری با کاهش مواجه شد به طوری که این کاهش در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت در مقایسه با زمان صفر معنی دار بود (p<۰/۰۵). همچنین مقایسه این زمان‌ها با زمان‌های بدست آمده در گروه شاهد نشان داد که رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس موجود در عصاره گوشت در حضور مرزه بختیاری با غلظت دو درصد کاهش معنی داری در تمامی‌زمان‌ها بجز زمان صفر و ۶ داشته است (p<۰/۰۵). مرزه بختیاری با غلظت پنج درصد موجب کاهش معنی داری در رشد باکتری در تمامی‌زمان‌های اندازه گیری شده در مقایسه با زمان صفر داشت (p<۰/۰۵). در مقایسه این زمان‌ها با گروه شاهد نیز مشخص شد که کاهش مشاهده شده در زمان‌های ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت معنی دار بوده است (p<۰/۰۵).

اثر ضد باکتریایی مرزه بختیاری بر عصاره گوشت آلوده به استافیلوکوکوس اورئوس نگهداری شده در دمای ۱۵ درجه سانتی گراد

جدول ۳ نشان می‌دهد که در دمای ۱۵ درجه سانتی گراد در گروه شاهد رشد باکتری افزایش داشته و این افزایش در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت در مقایسه با زمان صفر معنی دار بوده است (p<۰/۰۵). در غلظت دو درصد و در دمای ۱۵ درجه عصاره مرزه بختیاری موجب کاهش معنی دار رشد باکتریاستافیلوکوکوس اورئوس در زمان‌های ۶ و ۱۲ در مقایسه با زمان صفر شد (p<۰/۰۵). در غلظت پنج درصد و دمای ۱۵ درجه نیز مرزه بختیاری موجب کاهش رشد شده است و این کاهش در تمامی‌زمان‌ها در مقایسه با زمان صفر معنی دار بوده است (p<۰/۰۵). نتایج اثر رقت‌های مختلف عصاره مرزه بختیاری برعصاره گوشت آلوده به استافیلوکوکوس اورئوس در دمای ۱۵ درجه سانتی گراد کاهش چشمگیری بین گروه شاهد و گروه‌های مورد آزمایش نشان داد. این کاهش در زمان‌های ۶ تا ۴۸ ساعت بین گروه شاهد و گروه‌های تجربی معنی دار بود (p<۰/۰۵).

اثر ضد باکتریایی مرزه بختیاری بر عصاره گوشت آلوده به اشریشیا کلی نگهداری شده در دمای ۴ درجه سانتی گراد

با توجه به جدول ۴ مشخص می‌شود که در مورد باکتری اشریشیا کلی در دمای ۴ درجه در گروه شاهد افزایش رشد وجود داشته که این افزایش در زمان‌های ۱۲ تا ۴۸ نسبت به زمان صفر معنی دار بوده است(p<۰/۰۵). در غلظت دو درصد مرزه بختیاری در دمای ۴ درجه سانتی گراد باعث کاهش رشد باکتری اشریشیا کلی شده است ولی این کاهش در هیچ زمانی نسبت به زمان صفر معنی دار نبوده است(p<۰/۰۵). مرزه بختیاری در غلظت ۵ درصد در دمای ۴ درجه سانتیگراد موجب کاهش تعداد رشد باکتری شده است که این کاهش در زمان‌های ۶ و ۲۴ نسبت به زمان صفر معنی دار بوده است (p<۰/۰۵). همچنین تفاوت معنی داری در تعداد میکروارگانیسم‌های شمارش شده در زمان‌های مختلف بین گروه شاهد وگروه‌های آزمایشی وجود داشت (p<۰/۰۵).

اثر ضد باکتریایی مرزه بختیاری بر عصاره گوشت آلوده به اشریشیا کلی نگهداری شده در دمای ۱۵ درجه سانتی گراد

همانگونه که در جدول ۵ نشان داده شده است، نتایج نشان داد که در دمای ۱۵ درجه سانتی گراد، رشد باکتری اشریشیا کلی در گروه شاهد از ابتدا تا انتهای آزمایش افزایش داشته است و این افزایش در تمامی‌زمان‌ها معنی دار بوده است (p<۰/۰۵). درحضور مرزه بختیاری با غلظت دو درصد رشد این باکتری از لحاظ آماری تغییر معنی داری نداشت (p<۰/۰۵). همچنین مقایسه این زمان‌ها با زمان‌های به دست آمده در گروه شاهد نشان داد که رشد باکتری اشریشیا کلی موجود در عصاره گوشت در حضور مرزه بختیاری با غلظت دو درصد کاهش معنی داری در تمامی‌زمان‌ها بجز زمان صفرداشته است (p<۰/۰۵). مرزه بختیاری با غلظت پنج درصد موجب کاهش معنی داری در رشد باکتری در تمامی‌زمان‌ها در مقایسه با زمان صفر شد (p<۰/۰۵). در مقایسه این زمان‌ها با گروه شاهد نیز مشخص شد که کاهش مشاهده شده در زمان‌های ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت معنی دار بوده است (p<۰/۰۵).

جدول ۲: اثر غلظت‌های مختلف عصاره مرزه بختیاری بر عصاره گوشت آلوده به استافیلوکوکوس اورئوس نگهداری شده در دمای ۴ درجه سانتی گراد (تعداد باکتری بر حسب CFU/ml و زمان برحسب ساعت)

گروه / زمان	صفر	۶	۱۲	۲۴	۴۸
گروه شاهد (باکتری+عصاره گوشت)	۱/۵×۱۰۶	۳×۱۰۶	۲/۸×۱۰۶	۲/۷×۱۰۷ a	۳×۱۰۷ a
گروه ۱ (۲ درصد مرزه+ باکتری+ عصاره گوشت)	۲/۲×۱۰۶	۹/۳×۱۰۵	۶× ۱۰۵ b	۴×۱۰۵ ab	۱/۷×۱۰۵ ab
گروه ۲ (۵ درصد مرزه+ باکتری+ عصاره گوشت)	۲/۵×۱۰۶	۱×۱۰۵ ab	۲/۹×۱۰۵ ab	۵×۱۰۴ ab	۱×۱۰۴ ab

a: در هر ردیف تفاوت مشاهده شده با زمان صفر معنی دار است (p<۰/۰۵)

b: در هر ستون تفاوت مشاهده شده با گروه شاهد معنی دار است (p<۰/۰۵)

جدول ۳: اثر غلظت‌های مختلف عصاره مرزه بختیاری بر عصاره گوشت آلوده به استافیلوکوکوس اورئوس نگهداری شده در دمای ۱۵ درجه سانتی گراد (تعداد باکتری بر حسب CFU/ml و زمان برحسب ساعت)

گروه / زمان	صفر	۶	۱۲	۲۴	۴۸
گروه شاهد (باکتری+عصاره گوشت)	۱/۸×۱۰۶	۵×۱۰۶	۵×۱۰۶	۲/۲×۱۰۷ a	۳×۱۰۸ a
گروه ۱ (۲ درصد مرزه+ باکتری+ عصاره گوشت)	۱/۸×۱۰۶	۲/۸×۱۰۵ ab	۳×۱۰۴ ab	۱/۹×۱۰۶ b	۳/۷×۱۰۶ b
گروه ۲ (۵ درصد مرزه+ باکتری+ عصاره گوشت)	۱/۱×۱۰۶	۱×۱۰۵ ab	۲×۱۰۴ ab	۳ab/۳×۱۰۵	۲/۹×۱۰۵ ab

a: در هر ردیف تفاوت مشاهده شده با زمان صفر معنی دار است (p<۰/۰۵)

b: در هر ستون تفاوت مشاهده شده با گروه شاهد معنی دار است (p<۰/۰۵)

جدول ۴: اثر غلظت‌های مختلف عصاره مرزه بختیاری بر عصاره گوشت آلوده به اشرشیا کولای نگهداری شده در دمای ۴ درجه سانتی گراد (تعداد باکتری بر حسب CFU/ml و زمان برحسب ساعت)

گروه / زمان	صفر	۶	۱۲	۲۴	۴۸
گروه شاهد (باکتری+عصاره گوشت)	۴×۱۰۶	۵×۱۰۶	۲×۱۰۷ a	۴/۶×۱۰۸ a	۱/۵×۱۰۸ a
گروه ۱ (۲ درصد مرزه+ باکتری+ عصاره گوشت)	۲×۱۰۶ b	۸×۱۰۵ b	۲×۱۰۶ b	۸/۵×۱۰۵ b	۱×۱۰۶ b
گروه ۲ (۵ درصد مرزه+ باکتری+ عصاره گوشت)	۷/۹×۱۰۶ b	۷/۵×۱۰۵ ab	۵/۶×۱۰۶ b	۷/۳×۱۰۵ ab	۹/۸×۱۰۵ b

a: در هر ردیف تفاوت مشاهده شده با زمان صفر معنی دار است (p<۰/۰۵)

b: در هر ستون تفاوت مشاهده شده با گروه شاهد معنی دار است (p<۰/۰۵)

جدول ۵: اثر غلظت‌های مختلف عصاره مرزه بختیاری بر عصاره گوشت آلوده به اشرشیا کولای نگهداری شده در دمای ۱۵ درجه سانتیگراد (تعداد باکتری بر حسب CFU/ml و زمان برحسب ساعت)

گروه / زمان	صفر	۶	۱۲	۲۴	۴۸
گروه شاهد (باکتری+عصاره گوشت)	۱×۱۰۶	۱/۰۷×۱۰۷ a	۲×۱۰۸ a	۳/۶×۱۰۸ a	۱/۱۷×۱۰۱۰ a
گروه ۱ (۲ درصد مرزه+ باکتری+ عصاره گوشت)	۱×۱۰۶	۱×۱۰۶ b	۲/۶×۱۰۶ b	۲×۱۰۵ b	۲/۲×۱۰۶ b
گروه ۲ (۵ درصد مرزه+ باکتری+ عصاره گوشت)	۱×۱۰۶	۱/۵×۱۰۵ ab	۷×۱۰۴ ab	۱×۱۰۴ ab	۱/۹×۱۰۵ ab

a: در هر ردیف تفاوت مشاهده شده با زمان صفر معنی دار است (p<۰/۰۵)

b: در هر ستون تفاوت مشاهده شده با گروه شاهد معنی دار است (p<۰/۰۵)

بحث

امروزه روش‌های متنوعی برای کنترل عوامل بیماری زای غذا زاد به کارگرفته می‌شوند، یکی از این روش‌ها افزودن بعضی از داروها است اما با توجه به تنوع ژنتیکی ایجاد شده در عوامل بیماریزای میکروبی و پیدایش سویه‌های مقاوم و همچنین عوارض جانبی ناشی از مصرف بسیاری از این داروها، جایگزین کردن آنها توسط مواد و روش‌های دیگر از اهمیت ویژه‌ای برخوردار بوده و سبب تحقیقات در زمینه یافتن داروهای گیاهی بدون عوارض جانبی شده است. با توجه به تنوع آب و هوایی و تنوع فلور گیاهی در ایران، شناسایی مواد موثر گیاهان بومی‌کشور و استخراج آنها به منظور تولید انبوه و در سطح صنعتی اهمیت زیادی پیدا کرده است. از آنجائی که این کار در مورد گیاهانی از جمله مرزه بختیاری که منحصرا بومی‌ایران بوده، کمتر انجام شده است، هدف تحقیق حاضر بررسی خصوصیات ضد باکتریایی این گیاه می‌باشد زیرا قبل از اینکه یک عصاره یا اسانس بتواند به عنوان یک افزودنی غذایی به مواد غذایی افزوده شود باید خصوصیات متفاوت آن از جمله اثرات ضد میکروبی آن ارزیابی شود. در همین راستا در مطالعه حاضر ابتدا فعالیت ضد باکتریایی عصاره مرزه بختیاری بر علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به نمایندگی از باکتری‌های گرم مثبت و اشریشیا کلی به نمایندگی از باکتری‌های گرم منفی بیماری زای غذا زاد به دو صورت کمی‌و کیفی مورد ارزیابی قرار گرفت. روش کمی‌مورد استفاده، تعیین مقادیر MIC و MBC بود. نتایج این آزمایش نشان داد که MIC برای عصاره مرزه بختیاری علیه استافیلوکوکوس اورئوس در این تحقیق ۱/۵۶ ml/mg و در مورد اشریشیا کلی برابر ۳/۲۵ ml/mg بود.

نتایج جهت تعیین MBCنیز نشان داد که عصاره مرزه بختیاری در غلظت ۱۲/۵ ml/mgقادر به از بین بردن باکتری استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد. عصاره مرزه بختیاری در هیچ غلظتی قادر به از بین بردن باکتری اشریشیا کلی نبود و این باکتری در همه غلظت‌های مورد استفاده رشد کرد بنابراین MBC برای عصاره مرزه بختیاری بر علیه اشریشیا کلی به دست نیامد.

Azaz و همکاران در سال ۲۰۰۲ برای تعیین میزان فعالیت ضد باکتریایی اسانس ۳ گونه از مرزه به نام‌های *S. coeralen*، *S. pilosa* و *S. boissieri* بر باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس آئروژینوزا، اشریشیاکلی و سالمونلا تیفی موریوم از روش Microdilution استفاده کردند، نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که میزان MIC این ۳ گونه مرزه برای سودوموناس آئروژینوزا و اشریشیاکلی ۱۲۵ mg/mlو برای استافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا تیفی موریوم درمحدوده mg/ml ۱۲۵-۶۲/۵ می‌باشد (۵).

در مطالعه تیموری در سال ۱۳۸۸ روی اسانس مرزه بختیاری میزان MIC بر حسب mg/ml برای باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناز آئروژینوزا و باسیلوس سرئوس به ترتیب ۲۵۰، ۱۲۵ و ۲۵۰ گزارش شد. همچنین میزان MBC برای هر سه باکتری >۱۰۰۰ بر حسب mg/ml اندازه گیری شد (۱). محبوبی و فیض آبادی در سال ۱۳۸۸نشان دادند که MICاسانس مرزه برای سالمونلا تیفی موریوم و اشریشیا کلی ۱۲۵ mg/ml می‌باشد (۳). Mahboubi و Kazempour در سال ۲۰۱۱ در تحقیقی به بررسی اسانس *Satureja hortensis* پرداختند. در این بررسی با روش broth Microdilution فعالیت این گونه از مرزه علیه باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس آئروژینوزا، اشریشیاکلی و سالمونلا تیفی موریوم ارزیابی شد. دراین مطالعه سودوموناس آئروژینوزا به اسانس مرزه مقاومت بیشتری نشان داد، در حالی که استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کلی نسبت به آن حساس تر بودند، به طوری که میزان MIC برای استافیلوکوکوس اورئوس ۲ ml/ml اشریشیا کلی و سالمونلا تیفی موریوم ۱ ml/ml و سودوموناس آئروژینوزا ۸ ml/ml بود (۱۵).

همانگونه که ذکر شد در میزان MIC گزارش شده توسط محققین مختلف با هم و با تحقیق حاضر تفاوت مشاهده می‌شود. یکی از دلایل اصلی آن این است که درصد ترکیبات مختلف و از جمله مواد با خاصیت ضد میکروبی موجود در اسانس و عصاره گیاهان بسته به ناحیه جغرافیایی، واریته گیاه، سن گیاه، روش خشک کردن گیاه و روش اسانس و یا عصاره گیری تفاوت‌های چشمگیری دارد (۱۴). در همین راستا Cavar و همکاران در سال ۲۰۰۸ اشاره کردند که فاکتورهایی همچون موقعیت جغرافیایی، دما و طول روز در میزان ترکیبات اسانس مرزه نقش کلیدی دارند (۸).

یکی دیگر از دلایل اختلاف در MIC و MBC اندازه گیری شده در تحقیق حاضر و مطالعات گذشته به این دلیل است که در بررسی حاضر خاصیت ضد باکتریایی عصاره الکلی مرزه بختیاری مورد ارزیابی قرار

گرفته اســت درحالی که در بررسی‌های گذشته به ارزیابی این خاصیت در اســانس گونه‌های مختلف مرزه پرداخته شده است. همچنین در تحقیقات گذشــته بیشــتر به ارزیابی این خاصیت در گونه‌هایی غیر از مرزه بختیاری پرداخته‌اند.

در تحقیق حاضر روش‌های کیفی انتشــار دیسک و ایجاد چاهک جهت ارزیابــی اثرات ضد باکتریایــی مرزه بختیاری به کار گرفته شــدند. ارزیابی نتایــج با توجه بــه حضور یا عدم حضورهاله مهاری در اطراف دیســک‌های آغشــته به عصاره مرزه بختیاری در غلظت‌های مورد استفاده و چاهک‌های حــاوی عصــاره مورد اســتفاده بود. نتایج ایــن ارزیابی نشــان داد که هیچ گونه‌هاله مهاری در اطراف دیســک‌های آغشــته به مرزه بختیاری در مورد هیچ یک از باکتری‌ها مشــاهده نمی‌شــود. این در حالی بود که‌هاله مهاری به قطر ۲۵ میلی متر دراطراف دیسک‌های متوپریم و فلورفنیکل در محیط کشت باکتری اســتافیلوکوکوس اورئوس وهاله مهاری به قطر ۳۰ میلی متر دراطراف دیســک متوپریم و به قطر ۳۲ میلی متر درمحیط کشــت باکتری اشریشیا کلی مشاهده شد. در روش انتشار چاهک نیز در اطراف چاهک‌های حاوی مرزه بختیاری با غلظت‌های دو و پنج درصد در محیط کشت باکتری اشریشیا کلی و در چاهک حاوی مرزه بختیاری با غلظت دو درصد در محیط کشت باکتری استافیلوکوکوس اورئوس هیچ هاله مهاری مشاهده نشد ولی در محیط کشت باکتری اســتافیلوکوکوس اورئوس در اطراف چاهک ایجاد شده حاوی مرزه بختیاری با غلظت پنج درصدهاله مهاری به قطر ۲۰ میلی متر مشاهده شد.

دلایلــی که بــرای آن می‌توان ذکر کرد یکی آن اســت که عصاره مرزه بختیاری در غلظت‌های مورد استفاده فاقد اثر ضد باکتریایی بوده است که البته نتایج بدســت آمده از آزمایش تعییــن مقدار MIC و MBC این دلیل را رد می‌کنــد. دلیل دیگری که به حقیقت نزدیک تر اســت و می‌توان ذکر کرد این است که احتمالاً دیسک‌های آغشته به مرزه پس از مدت کوتاهی خشک شده، پس عدم نفوذ مناسب عصاره به دیسک‌های بلانک و نرسیدن به غلظت مناســب در آن موجب شده اســت که عصاره مورد نظر نتواند اثر ضد باکتریایی خود را نشان دهد.

در مورد عدم مشــاهده اثر در روش انتشار چاهک در غلظت دو درصد برای هر دو باکتریاســتافیلوکوکوس اورئوس و اشریشــیا کلی می‌توان گفت که حجم عصاره ریخته شــده در چاهک‌ها کم بوده و همین احتمالاً موجب خشک شدن چاهک و رشد باکتری‌ها شده است. فرض دیگری که می‌توان مطرح کرد این اســت که غلظت استفاده شده برای گرفتن اثرمثبت در این آزمایش کم بوده و در این غلظت عصاره اســتفاده شده توانایی جلوگیری از رشد باکتری‌ها را نداشته است. در غلظت پنج درصد، عصاره مرزه بختیاری توانسته اســت که مانع رشد باکتری اســتافیلوکوکوس اورئوس شود وهاله مهاری حدود ۲۰ میلی متر در اطراف چاهک مشاهده شد. این در حالی بود که این عصاره در این غلظت نتوانست مانع رشد باکتری اشریشیا کلی شود. در موافقت با نتایج بدست آمده از تحقیق حاضر این گونه گزارش شده است که باکتری‌های گرم مثبت در مقایســه با باکتری‌های گرم منفی حساسیت بیشــتری نســبت به گونه‌های مختلف مرزه دارند (۹). طبق نتایج به دست آمده از مطالعه Mann و همکاران در سال ۲۰۰۰ قدرت و طیف اثر فعالیت اســانس مرزه بیــن گونه‌های مختلف مرزه متغیر اســت و باکتری‌های گرم مثبت نســبت به باکتری‌های گرم منفی حساسیت بیشتری دارند. مقاومت باکتری‌های گرم منفی احتمالاً مربوط به لایه خارجی غشا سلولی آنها است که تقریباً نسبت به مواد و ترکیبات چربی دوست غیر قابل نفوذ است. عدم وجود این ســد در باکتری‌های گرم مثبت موجب تماس ترکیبات آب گریز موجود در مرزه به اسانس به بخش فسفولیپیدی غشا سلولی می‌شود (۱۶). این تمــاس موجب افزایش نفوذ پذیری یون‌ها و نشــت مواد حیاتی داخل سلول شده و به این ترتیب منجر به مرگ سلول می‌گردد (۸).

نتایــج حاصــل از ارزیابی اثر ضــد باکتریایی مرزه بختیــاری بر عصاره گوشــت آلوده به استافیلوکوکوس اورئوس نشــان داد که در دمای ۴ و ۱۵ درجه ســانتی گراد، رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در لوله شاهد از ابتدا تا انتهای آزمایش افزایش داشته است و این افزایش در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت معنی دار بوده است (p<۰/۰۵). این در حالی بود که در دمای ۴ درجه سانتیگراد و در حضور مرزه بختیاری رشد این باکتری با کاهش مواجه شد به طوری که این کاهش در حضور مرزه بختیاری با غلظت دو درصد در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ســاعت و با غلظت پنج درصد در تمامی‌زمان‌های اندازه گیری شــده نســبت به زمان صفر کاهش معنی داری داشــت (p<۰/۰۵). همچنین مقایسه گروه‌های تجربی با گروه شاهد نشان داد که رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس موجود در عصاره گوشت در حضور مرزه بختیاری بــا غلظت دو درصد کاهش معنــی داری در تمامی‌زمان‌ها بجز زمان ۶ و در غلظت پنج درصد درتمامی‌زمان‌ها داشــته اســت (p<۰/۰۵). در دمای ۱۵ درجه ســانتی گــراد و در غلظــت دو درصد عصاره مــرزه بختیاری موجب کاهش معنی دار رشــد باکتری اســتافیلوکوکوس اورئوس در زمان‌های ۶ و ۱۲ و در غلظــت پنج درصد در تمامی‌زمان‌های اندازه گیری در مقایســه با زمان صفر شد (p<۰/۰۵). نتایج اثر رقت‌های مختلف عصاره مرزه بختیاری بر عصاره گوشــت آلوده به اســتافیلوکوکوس اورئــوس در دمای ۱۵ درجه ســانتی گراد کاهش معنی داری در زمان‌های ۶ تا ۴۸ بین گروه شــاهد و گروه‌های تجربی نشان داد (p<۰/۰۵).

نتایــج حاصــل از ارزیابی اثر ضــد باکتریایی مرزه بختیــاری بر عصاره گوشــت آلوده به باکتری اشریشیا کلینشــان داد که در گروه شاهد افزایش رشــد باکتری اشریشیا کلی وجود داشته که این افزایش در دمای ۴ درجه، در زمان‌های ۱۲ تا ۴۸ و در دمای ۱۵ درجه سانتی گراد، در تمامی‌زمان‌ها نســبت به زمان صفر معنی دار بوده است (p<۰/۰۵). در گروه‌های تجربی کاهش رشــد باکتری اشریشــیا کلــی در دمای ۴ درجه ســانتی گراد تنها درحضــور مــرزه بختیاری باغلظــت ۵ درصد و در زمان‌هــای ۶ و ۲۴ و در دمای ۱۵ درجه ســانتیگراد در تمامی‌زمان‌ها نسبت به زمان صفر معنی دار بوده اســت (p<۰/۰۵). همچنین در مقایســه بین گروه شاهد و گروه‌های آزمایشی تفاوت معنی داری در تعداد میکروارگانیسم‌های شمارش شده در هر دو دما در زمان‌های مختلف وجود داشت (p<۰/۰۵).

این نتایج نشــان می‌دهد که عصاره الکلی مرزه در هر دو دمای ۴ و ۱۵ درجه ســانتی گراد دارای فعالیت ضد باکتریایی علیه میکروارگانیســم‌های مورد آزمایش اســت. مطالعات گذشته اثرات دما را بر فعالیت ضد باکتریایی عصاره مرزه مورد بررســی قــرار نداده‌اند و همچنین اثــرات ضد باکتریایی عصاره مرزه در زمان‌های متفاوت به شــیوه تحقیق حاضر کار نشده است و تحقیق حاضر اولین از نوع خود می‌باشــد. لیکن با توجه به مطالعات متعدد بر روی شناخت فاکتورهای ضد باکتریایی متنوع مرزه می‌توان نتایج بدست آمده را توجیه کرد که با توجه به حضور و درصد فاکتورهای ضد باکتریایی

در مرزه بختیاری و اثر بخشی بیشتر آن بر باکتری‌های گرم مثبت، در مطالعه حاضر نیز مرزه بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس اثر بیشتری داشته است. در این مطالعه مشخص شد که باکتری گرم مثبت مورد آزمایش یعنی استافیلوکوکوس اورئوس دارای حساسیت بالاتری نسبت به فعالیت ضد باکتریایی عصاره الکلی مرزه دارد که این یافته در موافقت با گزارش سایر محققین است (۶ و ۱۹).

مطالعات زیادی نشان داده‌اند که کارواکرول و تیمول از مهمترین ترکیبات موجود در اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی هستند که اثرات ضد باکتریایی زیادی دارند (۱۸). این دو ترکیب از جمله فعال ترین ترکیبات بر علیه باکتری‌های بیماری زای غذا زاد هستند (۷). تیمول و کارواکرول از لحاظ ساختمانی بسیار شبیه به هم بوده و دارای یک گروه هیدروکسیل در حلقه فنولیک خود می‌باشند. هر دو این ترکیبات باعث افزایش نفوذ پذیری غشا سلولی باکتری می‌شوند (۱۶). این گونه گزارش شده است که تیمول و کارواکرول از مهمترین ترکیبات موجود در مرزه بختیاری هستند (۵).

بر اساس نتایج Delgado و همکاران در سال ۲۰۰۴ فعالیت ضد میکروبی اسانس مرزه مربوط به ترکیبات فنولی مثل تیمول، کارواکرول و پاراسیمن می‌باشد. تیمول و کارواکرول باعث افزایش نفوذ پذیری غشا سلولی، بر هم خوردن تعادل یونی دو طرف غشا، تغییر pH و در نهایت منجر به تخریب غشا سلولی باکتری می‌شوند. پاراسیمن فعالیت ضد میکروبی ندارد ولی این خصوصیت را درتیمول و کارواکرول افزایش می‌دهد (۱۱). بر اساس گزارشات Helander و همکاران در سال ۱۹۹۸، تیمول و کارواکرول می‌توانند غشای خارجی باکتری‌های گرم مثبت و منفی را تجزیه، لیپوپلی ساکاریدها را آزاد و نفوذپذیری غشای سیتوپلاسمی‌را افزایش دهند (۱۳).

ترکیبات مرزه بسته به شرایط آب و هوایی ناحیه رویش، واریته گیاه و سن گیاه ممکن است متفاوت باشد (۸). ترکیب‌های عمده اسانس *S. khuzistanica* پاراسیمن (۳۹/۶ درصد) و کارواکرول (۲۹/۶ درصد) است. در حالی که اسانس *S. bactiarica* جمع‌آوری شده از استان چهارمحال و بختیاری حاوی تیمول (۴۴/۵ درصد) و گاما-ترپین (۲۳/۹ درصد) به عنوان ترکیب اصلی بوده است. اسانس *S. spiciger* نیز شامل تیمول (۳۵/۱ درصد)، پاراسمین (۲۲/۱ درصد) و گاما-ترپین (۱۳/۷ درصد) بوده است(۲). ترکیب‌های اصلی اسانس *S. mutica*، کارواکرول (۳۰/۹ درصد)، تیمول (۲۶/۵ درصد)، گاما-ترپین (۱۴/۹ درصد) و پاراسیمن بوده است. اسانس *S. macrantha* بیشتر حاوی پاراسیمن (۲۵/۸ درصد) و لیمونن (۱۶/۳ درصد) بوده و تیمول به مقدار کمتر (۸/۱ درصد) در آن وجود دارد (۴). با توجه به این یافته‌ها نتیجه گیری می‌شود که در بین گونه‌های مختلف مرزه، مرزه بختیاری دارای بیشترین میزان تیمول است و از طرفی بر اساس یافته‌های Cox و همکاران در سال ۲۰۰۱ تیمول در برابر استافیلوکوکوس اورئوس فعالیت ضد میکروبی بالایی دارد در حالی که کارواکرول و پاراسیمن ممانعت کننده ی بهتری در برابر اشریشیا کلی هستند (۱۰). پس بنابراین نتایج مطالعه حاضر مبنی بر کارآیی بهتر عصاره مرزه بختیاری بر علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در مقایسه با باکتری اشریشیا کلی منطقی است.

یکی دیگر از فاکتورهایی که احتمالاً بر روی نتایج بدست آمده از آزمایش ارزیابی فعالیت ضد میکروبی عصاره مرزه بختیاری بر عصاره گوشت آلوده به باکتری در تحقیق حاضر اثر گذاشته است، pH گوشت است که یک فاکتور مهم و اثرگذار روی فعالیت اسانس‌ها می‌باشد به طوری که pHهای پایین خاصیت hydrophobicity برخی اسانس‌ها را افزایش می‌دهند در نتیجه اسانس فعالیت ضد میکروبی قوی تری از خود نشان می‌دهد. بررسی Djenane و همکاران در سال ۲۰۱۱ موید این مطلب می‌باشد (۱۲). احتمالاً همین امر موجب شده است که در حضور عصاره گوشت مرزه بختیاری اثر ضد باکتریایی به مراتب بهتری از خود نشان دهد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش در قالب پایان نامه و با حمایت مالی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد اجرا شده است که بدینوسیله محققین مراتب تشکر و سپاس خود را اعلام می‌دارند.

منابع مورد استفاده

۱- تیموری، م.، (۱۳۸۸). تجزیه اسانس و بررسی اثر ضد باکتریایی مرزه *Satureja bachtiarica* در استان اردبیل. فصلنامه پژوهش‌های علوم گیاهی، ۴ (۲): ۲۶-۱۹.

۲- سفیدکن، ف.، صادق زاده، ل.، تیموری، م.، عسگری، ف. و احمدی، ش.، (۱۳۸۶). بررسی اثرات ضدمیکروبی اسانس دو گونه ی مرزه (*Satureja bachtiarica* Bunge, *Satureja khuzistanicajamzoodi*) در دو مرحله برداشت. فصلنامه علمی- پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، ۲۳(۲): ۱۸۲-۱۷۴.

۳- محبوبی، م. و فیض آبادی، م.، (۱۳۸۸). بررسی اثر ضدمیکروبی اسانس‌های آویشن، مرزنجوش، مرزه و اکالیپتوس بر باکتری‌های اشریشیا کلی، سالمونلا تیفی موریوم و قارچ‌های آسپرژیلوس نایجر، آسپرژیلوس فلاووس. فصلنامه ی گیاهان دارویی، ۳۰: ۱۴۴-۱۳۷.

4- Adewunmi, C.O., Agbedahunsi, J.M., Adebajo, A.C., Aladesanmi, A.J., Murphy, N. and Wando, J., (2001). Ethno-veterinary medicine: screening of Nigerian medicinal plants for trypanocidal properties. Journal of Ethnopharmacology, 77(1):19-24.

5- Azaz, D., Demirci, F., Satil, F., Kürkçüoğlu, M. and Başer, K.H., (2002). Antimicrobial Activity of some satureja essential oils. Zeitschrift fur Naturforschung, 57(9-10):817-821.

6- Biavati, B., Ozcun, M. and Piccaglia R., (2004). Composition and antimicrobial properties of *Satureja cuneifolia* Ten and *Thymbra sintenisii* Bornm.et Aznar. Subsp. isaurica P.H. Davis essential oils. Annals of Microbiology, 54(4):393-401.

7- Boyraz, N. and Ozcan, M., (2006). Inhibition of phytopathogenic fungi by essential oil, hydrosol, ground material and extract of summer savory (*Satureja hortensis* L.) growing wild in Turkey. International Journal of Food Microbiology, 107(3):238-242.

8- Cavar, S., Maksimovic, M., Solic, M.E., Jerkovic-Mujkic, A. and Besta, R., (2008). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of two Satureja essential oils. Food Chemistry, 111(3):648-653.

9- Cowan, M.M., (1999). Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews, 12(4):564-582

10- Cox, S.D., Mann, C.M. and Markham, J.L., (2001). Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. Journal of Applied Microbiology, 91(3):492-497.

11- Delgado, B., Fernandez, P.S., Palop, A. and Periago, P.M., (2004). Effect of thymol and cymene on *Bacillus cereus* vegetative cells evaluated through the use of frequency distributions. Food Microbiology, 21(3):327-334.

12- Djenane, D., Yanguela, J., Montanes, L., Djerbal, M. and Roncales, P., (2011). Antimicrobial activity of *Pistacia lentiscus* and Satureja Montana essential oils against *Listeria monocytogenes* CECT 935 using laboratory media: Efficacy and synergistic potential in minced beef. Food control, 22(7):1046-1053.

13- Helander, I.M., Alakomi, H.L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E.J., Gorris, L.G.M. et al., (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46(9):3590-3595.

14- Jerkovic, I., Mastelic, J. and Milos, M., (2001).The Impact of Both the Season of Collection and Drying on the Volatile Constituents of Origanum vulgare. L. spp. Hirtum Grown Wild in Croatia. International Journal of Food Science and Technology. 36(6):649–654.

15- Mahboubi, M. and Kazempour, N., (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of *Satureja hortensis* and *Traschspermum copticum* essential oil. Iranian Journal of Microbiology, 3(4):194-200.

16- Mann, C.M., Cox, S.D. and Markham, J.L., (2000). The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC6749 contributes to its tolerance to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). Letters in Applied Microbiology, 30(4):294-297.

17- Mertz, P.M. and Eaglstein, W.H., (1984). The effect of a semiocclusive dressing on the microbial population in superficial wounds. Archives of Surgery, 119(3):287-289.

18- Mihajilov-Krster, T., Radnovic, D. and Kitic, D., (2010). Antimicobial activity of satureja L. essential oil aiganst phytopathogenic bacteria *Ewinia amylovora*. Biologica Nyssana, 1(1-2): 95-98.

19- Mora, A., Blanco, M., Blanco, J.E., Alonso, M.P., Dhabi, G., Thomson-Carter, F., et al., (2004). Phage types and genotypes of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolates from humans and animals in spain: identification and characterization of two predominating phage types (PT2 and PT8). Journal of Clinical Microbiology, 42(9):4007-4015.