



Investigation of the Antibacterial Effect of *Teucrium polium* L. on *Escherichia coli* in Turkey Breast Meat

Kimia Sahba¹, Nafiseh Zamindar^{1*}, Hamid Azizi Malekabadi²

¹ Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Water, Food, and Nutraceuticals, Isf.C., Islamic Azad University, Isfahan, Iran

² Department of Medical Basic Sciences, Isf.C., Islamic Azad University, Isfahan, Iran

Received Date: 2025.12.03 Accepted Date: 2026.04.19

Abstract

Turkey breast meat holds a prominent position in healthy diets due to its high biological value protein, low fat content and rich micronutrient profile. However, its high water activity and near-neutral pH make it highly susceptible to rapid proliferation of spoilage and pathogenic microorganisms, particularly *Escherichia coli*. The present study aimed to evaluate the antibacterial efficacy of *Teucrium polium* L. essential oil as a natural preservative against *Escherichia coli* in turkey breast meat and to assess its potential for extending microbiological shelf life. Fresh samples were divided into three groups: untreated control, base marinade (3% NaCl + 0.5% lactic acid), and base marinade enriched with 800 ppm *Teucrium polium* essential oil. After surface inoculation with *Escherichia coli*, bacterial counts were monitored over 48 h of refrigerated storage at 4 °C. In vitro antibacterial activity was determined by disk diffusion and well diffusion methods, while chemical composition was analyzed using GC-MS. The essential oil exhibited strong in vitro activity, producing the largest inhibition zone at 20 (μL/mL) among tested concentrations. α-Pinene and β-pinene, identified as the predominant constituents, exerted their bactericidal effect primarily by disrupting bacterial plasma membrane integrity. Nevertheless, no statistically significant differences ($p < 0.01$) in *Escherichia coli* counts were observed among treatments within the meat matrix during the 48h. These findings indicate that, despite the pronounced in vitro antibacterial potential of *Teucrium polium* L. essential oil, achieving significant microbial reduction in real food systems requires optimization of concentration, contact time, application method, and implementation of advanced controlled-release technologies.

Keywords: Antibacterial effect, *Escherichia coli*, Natural preservative, *Teucrium polium* essential oil, Turkey meat

* n.zamindar@iau.ac.ir

EXTENDED ABSTRACT

Introduction: Turkey meat consumption has surged globally due to its superior nutritional attributes: high-quality protein approximately (24 g/100 g), extremely lowfat content (<2%) in breast cuts, favorable polyunsaturated-to-saturated fatty acid ratio, and abundant micronutrients including selenium, zinc, and B-complex vitamins. These characteristics position turkey breast as a preferred choice for health-conscious consumers and diet-specific products. Nevertheless, its high moisture content and water activity, and pH range of 5.9–6.3 create optimal conditions for rapid microbial proliferation immediately after slaughter. Among contaminants, *Escherichia coli* serves not only as a key hygienic process indicator but also includes highly dangerous pathotypes (e.g., enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7) capable of causing hemolytic uremic syndrome. The combination of growing antimicrobial resistance, stricter regulatory limits on synthetic preservatives, and strong consumer demand for “natural” and “clean-label” foods has stimulated intensive screening of plant-derived antimicrobials. Essential oils from the Lamiaceae family consistently demonstrate the strongest and broadest activity profiles. *Teucrium polium* L. locally known as “Kalpooreh” is a perennial aromatic shrub widely distributed across the Mediterranean basin, Southwest Asia, and the Middle East. For centuries, it has been used in traditional medicine for its antidiabetic, antispasmodic, anti-inflammatory, diaphoretic, and antimicrobial effects. Numerous in vitro studies have confirmed that its essential oil, rich in monoterpene hydrocarbons, exhibits potent antibacterial, antifungal, antiviral, and antioxidant properties. Despite this promising background, very limited data exist on its application in real food matrices, especially muscle foods. The present study was therefore undertaken to (1) fully characterize the chemical composition and in vitro anti-*Escherichia coli* activity of *Teucrium polium* L. essential oil collected from southern Iran, and (2) evaluate its practical efficacy when incorporated at a sensory-acceptable concentration (800 ppm) into an acidic-salt marinade system for fresh turkey breast meat during short-term refrigerated storage.

Materials and Methods: Fresh boneless, skinless turkey breast fillets were acquired from a federally inspected processing plant within 6 h post-mortem, transported at 0–4 °C, trimmed. *Teucrium polium* L. flowering aerial parts were harvested at peak blooming from wild populations in Fars Province, shade-dried at 35 °C for 7 days, and hydro distilled for 4 h yield. The resulting pale-yellow oil was dehydrated over anhydrous Na₂SO₄ and stored protected from light. GC-FID and GC-MS analyses identified 46 compounds representing 99.1% of the oil. Dominant constituents were α -pinene (22.75%), β -pinene (7.72%), Germacrene D (2.29%), β -Myrcene (3.22%) and Caryophyllene E (3.5%). Three experimental groups were designed: (1) untreated control, (2) base marinade (distilled water + 3% NaCl + 0.5% lactic acid, final pH 4.1), (3) base marinade enriched with 800 ppm *Teucrium polium* L. essential oil (EO800). Samples were surface-inoculated with *Escherichia coli* to achieve approximately 6.2 log CFU/g, marinated for 30 min at 4 °C with constant agitation meat-to-marinade ratio (1:3), drained, and stored at 4 $\pm$ 1 °C for 48 h. Microbiological analyses were performed at 48 h by enumerating typical colonies on EMB agar after 24 h incubation at 37 °C. Parallel in vitro tests included disk diffusion (10, 15, 20 μ L/disk), agar well diffusion, and well broth microdilution for Minimum inhibitory concentration (MIC) and Minimum bactericidal concentration (MBC) determination. All experiments were conducted in triplicate. Data were statistically analyzed using SPSS with one-way ANOVA and LSD test at ($p < 0.01$).

Results: In vitro assays confirmed exceptional activity: the largest inhibition zone was 28.8 $\pm$ 1.0 mm at 20 μ L/disk (statistically superior to ciprofloxacin 25.0 $\pm$ 0.8 mm). (MIC) and (MBC) values were 0.39 μ L/mL and 0.78 μ L/mL, respectively. In the turkey breast system, however, no statistically significant differences ($p > 0.01$) were detected among treatments at any time point. At 48 h, counts reached 8.44 $\pm$ 0.30 log CFU/g (control), 8.11 $\pm$ 0.36 log CFU/g (base marinade), and 7.91 $\pm$ 0.43 log CFU/g (EO800), corresponding to only a 0.53 log numerical but non-significant reduction in the essential-oil group.

Conclusion: *Teucrium polium* L. essential oil is a powerful natural bactericide against *E. coli* in vitro, driven primarily by its high α -pinene and β -pinene content that irreversibly damages cytoplasmic membranes. Regrettably, when applied at 800 ppm through conventional 30-min marination, its effectiveness was drastically curtailed by strong interactions with meat proteins and lipids, limited penetration depth, reduced volatility at refrigeration temperature, and possible partial inactivation by food components. These results reinforce the well-documented “in vitro vs. in-food” efficacy gap typical of essential oils. To overcome these barriers and unlock commercial potential, future investigations should prioritize advanced delivery systems (nano emulsions, liposomes, cyclodextrin inclusion complexes, or active edible films), synergistic combinations with other natural antimicrobials or mild physical treatments, higher concentrations balanced by rigorous sensory testing, and extended challenge studies incorporating natural microflora, lipid oxidation parameters, and realistic temperature-abuse scenarios. With targeted formulation improvements, *Teucrium polium* L. essential oil could become a valuable clean-label tool for enhancing microbiological safety and extending the shelf life of fresh and minimally processed turkey products.

.

.



بررسی اثر ضدباکتریایی جز کوهی (*Teucrium Polium L.*) بر *شرشیا کلا*ی در گوشت سینه بوقلمون

کیما صهبا^۱، نفیسه زمین دار^{۱*}، حمید عزیزی ملک آبادی^۲

^۱ گروه علوم و صنایع غذایی؛ دانشکده کشاورزی، آب، غذا و فراسودمنداها؛ واحد اصفهان (خوراسگان)؛ دانشگاه آزاد

اسلامی؛ اصفهان؛ ایران

^۲ گروه علوم پایه پزشکی، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۹/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۱/۳۰

چکیده

گوشت سینه بوقلمون به دلیل دارا بودن پروتئین با ارزش بیولوژیکی بالا، محتوای چربی اندک و ریزمغذی‌ها جایگاه ویژه‌ای در رژیم‌های غذایی سالم دارد؛ با این وجود، فعالیت آبی بالا و pH نزدیک به خنثی آن را به بستری مستعد برای رشد سریع میکروارگانیسم‌های فسادزا و بیماری‌زا به‌ویژه *شرشیا کلی* تبدیل کرده است. هدف از پژوهش حاضر، بررسی اثر ضدباکتریایی اسانس جز کوهی (*Teucrium polium L.*) به عنوان یک نگهدارنده طبیعی بر جمعیت *شرشیا کلی* در گوشت سینه بوقلمون و ارزیابی پتانسیل آن در افزایش ماندگاری میکروبی محصول بود. نمونه‌ها به سه گروه تقسیم شدند: شاهد (بدون تیمار)، ماریناد پایه (حاوی ۳٪ کلرید سدیم و ۰.۵٪ اسید لاکتیک) و ماریناد پایه غنی شده با ۸۰۰ ppm اسانس جز کوهی. پس از آلوده‌سازی سطحی با *شرشیا کلی*، شمارش باکتری طی ۴۸ ساعت نگهداری در دمای ۴ درجه سلسیوس انجام شد. فعالیت ضد میکروبی اسانس به‌روش‌های انتشار از دیسک و چاهک و ترکیبات شیمیایی آن به کمک GC-MS بررسی گردید. نتایج نشان داد اسانس جز کوهی فعالیت ضدباکتریایی قوی داشته و بزرگ‌ترین قطر هاله عدم رشد در غلظت ۲۰ µL/mL مشاهده شد؛ α-پنین و β-پنین به‌عنوان اجزای اصلی، با اختلال در یکپارچگی غشای پلاسمایی باکتری اثر خود را اعمال می‌کنند. با وجود این در ماتریکس واقعی گوشت و طی دوره ۴۸ ساعته، تفاوت معنی‌داری بین تیمارها ($p < 0.01$) به‌دست نیامد. در نتیجه، علی‌رغم پتانسیل بالای ضد میکروبی اسانس جز کوهی، دستیابی به اثر قابل توجه در سیستم غذایی نیازمند بهینه‌سازی غلظت، زمان تماس، روش کاربرد و بهره‌گیری از فناوری‌های نوین ورهایش کنترل شده است.

واژگان کلیدی: اثر ضدباکتریایی، اسانس جز کوهی، *شرشیا کلی*، گوشت بوقلمون، نگهدارنده طبیعی.

* n.zamindar@iau.ac.ir

مقدمه

گوشت به عنوان یکی از اصلی ترین منابع پروتئین، نقش کلیدی در تأمین نیازهای تغذیه ای بدن، رشد و حفظ سلامتی ایفا می کند و از ارزش غذایی بسیار بالایی برخوردار است (۱). مصرف گوشت سفید در سال های اخیر نسبت به گوشت قرمز رشد چشمگیری داشته است. عوامل مؤثر در این روند شامل قیمت مناسب، افزایش تولید و ارزش تغذیه ای برتر گوشت سفید هستند (۲،۳).

در میان انواع گوشت سفید، گوشت بوقلمون با بالاترین ظرفیت نگهداری آب و کمترین میزان خونابه خروجی شناخته می شود. با این حال شیوع بیماری های منتقله از غذا همچنان یکی از دغدغه های اصلی مقامات بهداشتی، صنعت غذا و جامعه به شمار می رود. *اشرشیاکلا* (*Escherichia coli*) به عنوان یک پاتوژن مهم عامل طغیان های متعدد در دهه های اخیر بوده و با محصولات آماده مصرف نظیر گوشت، ماهی، لبنیات و سبزیجات مرتبط است. مصرف غذای آلوده به این باکتری می تواند منجر به اسهال آبکی، استفراغ، اسهال مزمن و در موارد شدید کولیت هموراژیک، نارسایی کلیوی و سندرم اورمیک همولیتیک شود (۴).

اسانس های گیاهی^۱ (EOs) ترکیباتی طبیعی با طیف وسیع فعالیت ضد میکروبی و ضد فساد هستند که به طور کلی به عنوان ایمن (GRAS) طبقه بندی می شوند. این ترکیبات که در متابولیسم ثانویه گیاهان سنتز می شوند عمدتاً شامل مخلوطی پیچیده از ترپن ها^۲، سسکوئونی ترپن ها^۳، پلی فنول ها^۴، لاکتون ها^۵، استرها^۶، الکل ها و سایر ترکیبات فرار معطر هستند (۵). اثرات ضد میکروبی متابولیت های ثانویه گیاهی از جمله اسانس ها به خوبی مورد مطالعه قرار گرفته و از آن ها برای مهار رشد باکتری ها و کپک های آلوده کننده مواد

غذایی و افزایش ماندگاری محصولات فرآوری شده استفاده می شود (۶).

چزکوهی (*Teucrium polium L.*) گیاهی معطر از خانواده نعنائیان (Lamiaceae)، زیر خانواده (Ajugoideae) در مناطق کم حاصل، سواحل سنگلاخی و ماسه ای اروپا، مدیترانه، شمال آفریقا و جنوب غربی آسیا از جمله ایران به ویژه خراسان به صورت خودرو رویش دارد. این گیاه دارویی از دیرباز در طب سنتی برای درمان اختلالات گوارشی، التهاب، دیابت و روماتیسم کاربرد داشته است (۷).

حفظ کیفیت ارگانولپتیکی، بهداشتی و ایمنی محصولات کشاورزی و غذایی چالشی اساسی برای صنایع مرتبط به شمار می رود. در این راستا اسانس های گیاهی به عنوان جایگزینی طبیعی برای آفت کش های شیمیایی و افزودنی های مصنوعی در کنترل پاتوژن های گیاهی و نگهداری مواد غذایی مورد توجه فزاینده ای قرار گرفته اند (۸). افزودنی های مصنوعی ضمن افزایش ماندگاری می توانند عوارض جانبی بر سلامت مصرف کننده داشته باشند. در مقابل عصاره ها و اسانس های گیاهی به عنوان عوامل آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی طبیعی راه حلی ایمن و مطلوب برای پاسخ به تقاضای روبه رشد مصرف کنندگان ارائه می دهند (۸).

گونه های مختلف جنس *Teucrium*، به ویژه *T. polium*، *T. chamaedrys* و *T. montanum* در اروپا و آسیا از محبوبیت بالایی برخوردارند و در طب سنتی، داروسازی و صنایع غذایی به عنوان ادویه و نوشیدنی های تلخ به کار می روند. این گیاهان در درمان اختلالات گوارشی و تنفسی، آبله، نقرس و التهاب چشم مؤثر بوده و دارای خواص ضد التهابی، آنتی اکسیدانی، ضد میکروبی و ضد دیابتی هستند. همچنین نقش آن ها در تقویت متابولیسم چربی و کاهش سلولیت نیز گزارش شده است (۹).

هدف این مطالعه بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس چزکوهی (*Teucrium polium L.*) بر کنترل *Escherichia*

^۴ Polyphenol

^۵ Lactone

^۶ Esther

^۱ Essential Oil

^۲ Terpene

^۳ Sesquiterpene

coli در گوشت بوقلمون با رویکرد جایگزینی طبیعی افزودنی‌های مصنوعی بود.

مواد و روش‌ها

اسانس گیری از گیاه چزکوهی

اندام‌های هوایی گیاه چزکوهی (*Teucrium polium* L.) در مرحله گل‌دهی (خرداد ۱۴۰۱) از منطقه الشتر استان لرستان جمع‌آوری شد. پس از خشک شدن در سایه و آسیاب پودر گیاه به روش هیدرودیستیلیشن^۱ با دستگاه کلونجر و نسبت پودر به آب مقطر $\approx ۱:۶$ استخراج گردید. بالن دستگاه تا نیمه با آب مقطر پر شد و با روشن کردن شوف، بخار آب به درون ماده گیاهی نفوذ کرد، اسانس را استخراج نمود و به سمت کندانسور^۲ هدایت شد. مخلوط بخار در تماس با آب سرد کندانس گردید و در محفظه جمع‌آوری اسانس به دلیل چگالی کمتر از آب روی سطح آب شناور شد و با سرنگ برداشت گردید. اسانس خام با سولفات سدیم آب‌گیری و از فیلتر ۰/۴۵ میکرومتری عبور داده شد. در نهایت اسانس در ویال شیشه‌ای تیره و غیرقابل نفوذ در دمای ۴ درجه سلسیوس تا زمان آنالیز نگهداری شد (۱۰-۱۲).

آنالیز اسانس چزکوهی

ترکیبات شیمیایی اسانس گیاه چزکوهی (*Teucrium polium* L.) با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگرافی-طیف‌سنجی جرمی (GC-MS) شناسایی و کمی‌سازی شد (۱۰). پیش از تزریق، اسانس با سولفات سدیم آب‌گیری و در هگزان خالص رقیق گردید. شناسایی ترکیبات از طریق مقایسه زمان بازداری با مواد استاندارد انجام شد. درصد نسبی اجزا با روش نرمال‌سازی سطح زیر پیک محاسبه گردید.

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی اسانس به روش

چاهک و دیسک

روش انتشار دیسک

برای بررسی فعالیت ضد میکروبی اسانس چزکوهی با توجه به شکل (۱) ابتدا ۰/۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتریایی

Escherichia coli معادل استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند (۱۰^۸) با سوآپ استریل به صورت کشت سطحی کامل روی آگار مولر-هینتون پخش و ۱ دقیقه باقی ماند؛ سپس اسانس در ۱۰٪ DMSO (v/v) حل و با رقت‌سازی سریالی به غلظت‌های ۰/۶۲۵، ۱/۲۵، ۲/۵، ۰/۳۱۲ و ۰/۱۵۶ میکرولیتر بر میلی‌لیتر رسید؛ از هر غلظت ۲۰ میکرولیتر روی دیسک‌های استریل (قطر ۶ میلی‌متر) بارگذاری شد (کنترل منفی: ۱۰٪ DMSO؛ کنترل مثبت: آموکسی‌سیلین)، دیسک‌ها پس از ۱ ساعت خشک شدن در نقاط علامت‌گذاری شده پلست قرار گرفتند و پلست‌ها ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شدند؛ در نهایت قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر) اندازه‌گیری شد (۱۴، ۱۳).

روش چاهک

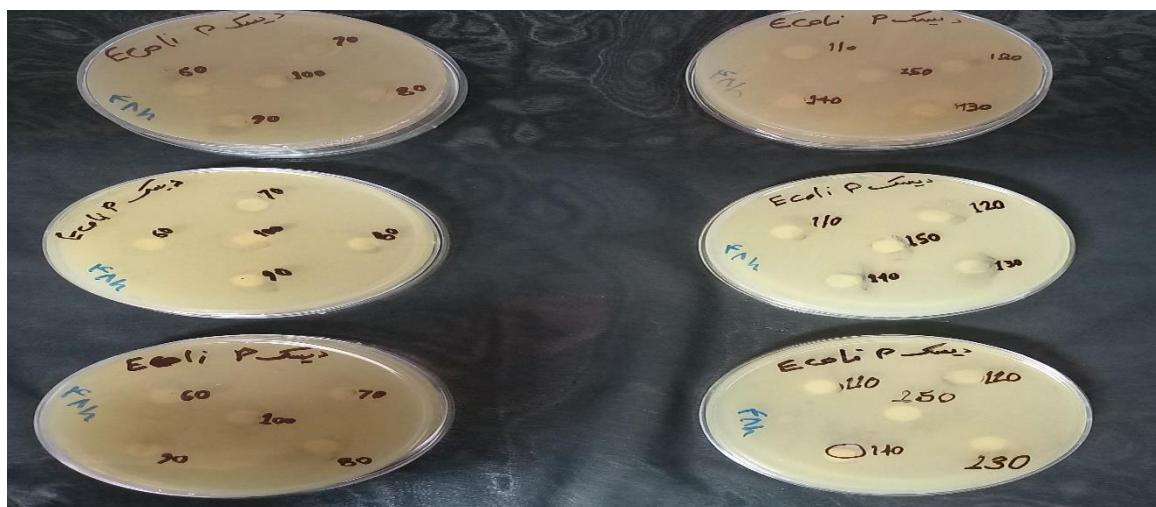
برای بررسی فعالیت ضد میکروبی اسانس چزکوهی با توجه به شکل (۲) ابتدا ۰/۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتریایی *Escherichia coli* معادل ۰/۵ مک‌فارلند (۱۰^۸ CFU/mL) با سوآپ پنبه‌ای استریل به صورت کشت سطحی کامل روی پلست‌های آگار مولر-هینتون پخش و ۱ دقیقه در دمای اتاق باقی ماند. سپس با پیت‌پاستور استریل خنک‌شده، ۶ چاهک (قطر ۶ میلی‌متر) در نقاط علامت‌گذاری شده (فاصله حداقل ۲ سانتی‌متر از لبه و چاهک‌های مجاور) ایجاد و پیت قبل/بعد هر مرحله با الکل ۷۰٪ و شعله استریل شد. اسانس استریل در ۱۰٪ DMSO (v/v) حل گردید؛ ابتدا ۵ میکرولیتر اسانس در ۱ میلی‌لیتر DMSO مخلوط و با شیکر همگن شد، سپس رقت‌سازی سریالی (۱:۲) تا غلظت‌های نهایی ۰/۶۲۵، ۱/۲۵، ۲/۵، ۰/۳۱۲ و ۰/۱۵۶ میکرولیتر بر میلی‌لیتر انجام و ۱ میلی‌لیتر از آخرین لوله دور ریخته شد. از هر غلظت، ۲۰ میکرولیتر با سمپلر استریل به چاهک‌ها منتقل گردید (کنترل منفی: ۲۰ میکرولیتر ۱۰٪ DMSO؛ کنترل مثبت: دیسک آموکسی‌سیلین). پلست‌ها ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری و قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر) اندازه‌گیری شد. اسانس چز

² Condensor

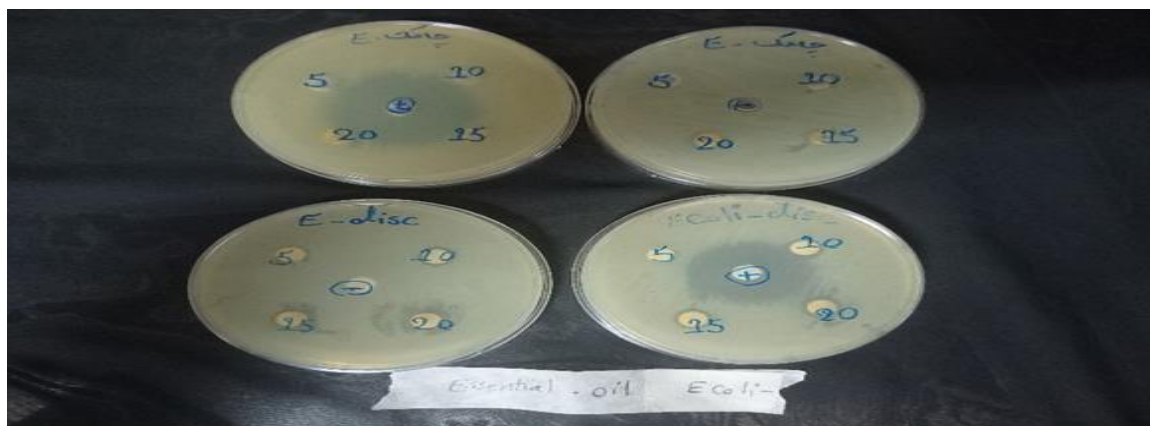
¹ Hydrodistillation

شروع از ۰.۵ (µl/mL)، ممکن بود هیچ هاله‌ای دیده نشود؛ اگر خیلی بالاتر مثلاً ۱۰ (µl/mL) شروع شود، تفاوت هاله‌ها کمتر قابل تمایز می‌شد. این انتخاب کاملاً منطبق با مطالعات قبلی روی همین گیاه است و برای مقایسه فعالیت ضدباکتریایی اسانس چزکوهی مناسب است (۱۳، ۱۴).

کوهی ضعیف‌تر از اسانس‌های خیلی قوی است بنابراین نیاز به غلظت اولیه بالاتر ۲.۵ (µl/mL) دارد تا اثر قابل اندازه‌گیری مشاهده شود. MIC گزارش شده اغلب زیر ۲-۳ µl/mL است که با این رقت‌ها در غلظت‌های ۰.۳۱۲-۱.۲۵ µl/mL هاله قوی و در غلظت‌های پایین‌تر (۰.۱۵۶) هاله ضعیف تشکیل می‌شود که دامنه مناسبی برای مشاهده روند تشکیل هاله می‌باشد. اگر غلظت‌ها خیلی پایین‌تر انتخاب می‌شد مثلاً



شکل ۱- نمایش تصویر روش دیسک



شکل ۲- نمایش تصویر روش چاهک

شد. فیله‌های تهیه شده فاقد ترشح خون قابل مشاهده یا کبودی بودند. برای هر تیمار ۲۰۰ گرم گوشت به قطعات ۱۰ گرمی تقسیم شدند (۱۷-۱۵). محلول ماریناد از پایه اصلی آب

روش تهیه محلول ماریناد و تلقیح باکتری ها به آن گوشت سینه بوقلمون تازه بدون پوست و استخوان از تولید کننده خریداری و به آزمایشگاه (۴ درجه سلسیوس) منتقل

تشکیل شد که ۳ درصد نمک کلرید سدیم (دکتر مجللی، ایران) و ۰.۵ درصد اسید لاکتیک (مرک، آلمان) به آن افزوده شد. این محلول‌ها قبل از اضافه شدن به گوشت به دمای ۴ درجه سلسیوس می‌رسند تا با آن هم دما شوند (۱۸،۱۹).

تیمارهای استفاده شده در این پژوهش عبارت بودند از:

T₁: گوشت به اضافه ی محلول ماریناد

T₂: گوشت به اضافه ی محلول ماریناد و ۸۰۰ پی پی ام اسانس چز کوهی

نسبت گوشت به محلول ماریناد (۱:۳) انتخاب شد. گوشت های آماده شده را درون کیسه های زیپ دار استریل قرارداده و محلول های ماریناد با دو تیمار فوق به کیسه های شامل تکه های گوشت اضافه شد. به هر دو محلول ماریناد (cfu/ml) ۱۰^۷ اشرشیاکلاهی اضافه شد. برای توزیع اسانس در محلول ماریناد از دی متیل سولفوکساید^۱ با نسبت ۱:۱ به اسانس استفاده شد. ماریناد کردن گوشت درون ظروف پلاستیکی استریل به روش غوطه وری همراه با هم زدن به مدت ۲ ساعت در دمای ۴ درجه سلسیوس انجام شد. سپس گوشت برای مراحل بعدی و انجام آزمون ها درون کیسه ی پلاستیکی استریل به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد (۲۱،۲۰).

تحلیل آماری داده ها

تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد تا اثرات اصلی غلظت اسانس چز کوهی در سه سطح، روش اندازه گیری فعالیت ضد میکروبی (انتشار از دیسک در مقابل انتشار از چاهک) و تعامل این دو عامل بر قطر هاله عدم رشد علیه باکتری/اشرشیاکلاهی ارزیابی گردد؛ همچنین، تأثیر محلول ماریناد حاوی اسانس بر کاهش

تعداد باکتری/اشرشیاکلاهی در بافت گوشت سینه بوقلمون طی دوره نگهداری ۴۸ ساعته با طرح کاملاً تصادفی بررسی شد. قطر هاله ی عدم رشد باکتری/اشرشیاکلاهی در غلظت های مختلف اسانس و در غلظت ۵ میکروگرم در میلی لیتر آنتی بیوتیک سفیکسیم^۲ هاله مهار رشد باکتری اشرشیاکلاهی به روش چاهک پلیت و دیسک با کولیس بر حسب میلی متر اندازه گیری شد. برای آنالیز واریانس از نرم افزار SAS^۳ و برای مقایسات میانگین از آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد استفاده شد.

نتایج

نتایج کروماتوگرافی گازی^۴ (GC)

اجزای اسانس به وسیله گاز کروماتوگرافی جدول (۱) شناسایی شد. با توجه به جدول (۱) بیشترین و اصلی ترین ترکیبات شناسایی شده از گیاه چز کوهی توسط سیستم گاز کروماتوگرافی شناسایی شده است. با توجه به جدول (۱) ترکیبات آلفا پینن^۵، بتاپینن^۶، پینوکاروئول^۷ و ورنبون^۸ به ترتیب دارای بیشترین درصد از جز کل ترکیبات را به خود اختصاص دادند و با درصدهای مختلف از اسانس چز کوهی استخراج شد و همگی دارای خاصیت ضد میکروبی بود. به نظر می‌رسد بیشترین خاصیت ضد میکروبی ترکیبات ترپن به ویژه آلفاپینن، بتاپینن و پینوکاروئول است که بیشترین درصد ترکیب شیمیایی را دارند. ممکن است در اسانس به دست آمده از اندام هوایی گیاه بعضی از ترکیبات درصد ناچیزی اختلاف داشته باشد. به طور مثال آلفاپینون یکی از مهم ترین ترکیبات موجود در اسانس بود که خاصیت ضد میکروبی نیز دارد و مقدار آن ۲۲.۷۵ گزارش شده است.

^۵ Alpha Pinene

^۶ Beta Pinene

^۷ Pinot Carveol

^۸ Verbenon

^۱ Dimethyl suldoxide

^۲ Cefixime

^۳ Statical Analyzing System

^۴ Gas Chromotography

جدول ۱- ترکیبات شناسایی شده توسط کروماتوگرافی گازی

نوع	ترکیبات	درصد	زمان بازداری	شماره
MH	alpha.-Pinene	22.75	11.61	۱
MH	verbenene	1.53	12.72	۲
MH	beta.-Pinene	7.72	13.95	۳
MH	beta.-Myrcene	3.22	14.51	۴
MH	alpha.Campholenal	1.26	21.95	۵
MH	Pinocarveol <trans->	6.33	22.66	۶
MH	Verbenol <trans->	5.26	22.89	۷
MO	p-Mentha-1,5-dien-8-ol	1.45	23.17	۸
MO	Pinocarvone	1.06	23.80	۹
MH	Cymen-8-ol<para>	1.08	25.10	۱۰
MH	Myrtenal	4.82	25.48	۱۱
MO	Verbenone	5.98	26.09	۱۲
MH	Carveol <trans->	1.72	26.57	۱۳
MO	Benzaldehyde, 4-(1-methylethyl)	2.19	27.83	۱۴
MO	Fenchyl acetate <endo->	1.52	29.40	۱۵
SH	Caryophyllene E	1.62	35.35	۱۶
SH	Germacrene D	2.29	37.98	۱۷
SH	Bicyclogermacrene	1.65	38.58	۱۸
SO	Spathulenol	3.25	42.01	۱۹
SO	Caryophyllene oxide	1.94	42.21	۲۰
SO	beta.-Eudesmol	1.92	45.07	۲۱
Total Identified		91.55		
Monoterpene Hydrocarbons MH Oxygenated Monoterpenes MO Sesquiterpene Hydrocarbons SH Oxygenated Sesquiterpenes SO				

(روش اندازه گیری دیسک) در غلظت 20 میکرولیتر بر میلی لیتر مشاهده گردید. کمترین میزان قطر هاله ی عدم رشد در غلظت ۵ میکرولیتر بر میلی لیتر مشاهده شد. میزان قطر هاله ی عدم رشد در روش اندازه گیری چاهک کاهش یافت. بیشترین میزان قطر هاله ی عدم رشد (روش اندازه گیری چاهک) در غلظت ۱۵ میکرولیتر بر میلی لیتر مشاهده گردید. کمترین میزان قطر هاله ی عدم رشد در غلظت ۲۰ و ۵۰ میکرولیتر بر میلی لیتر مشاهده شد. در غلظت های مشابه قطر

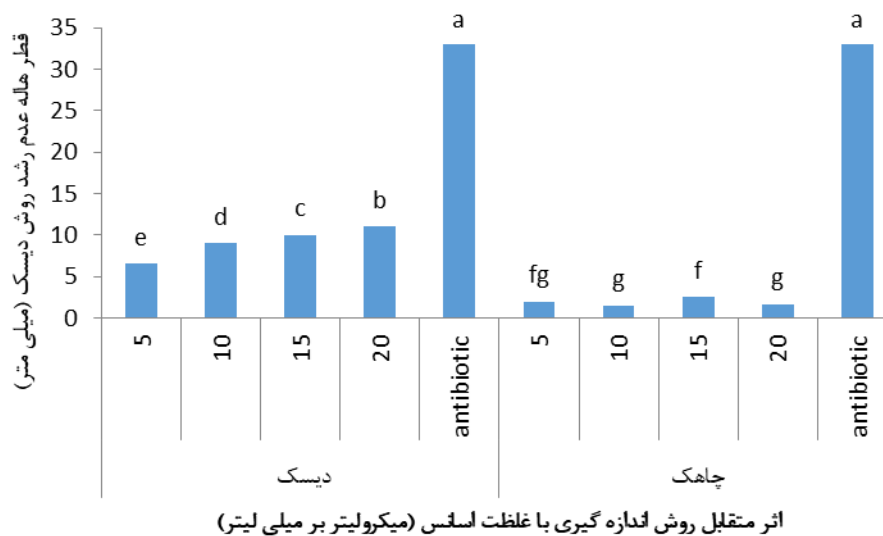
تأثیر اثر متقابل روش اندازه گیری (چاهک ، دیسک) با غلظت اسانس بر قطر هاله ی عدم رشد مطابق جدول (2) اثر غلظت اسانس و روش اندازه گیری قطر هاله ی عدم رشد و اثر متقابل این دو فاکتور بر اندازه قطر هاله عدم رشد معنی دار بود ($p < 0.01$). با توجه به شکل (۳) نشان داد که میزان قطر هاله ی عدم رشد با روش اندازه گیری دیسک افزایش یافت. بیشترین میزان قطر هاله ی عدم رشد

در سطح احتمال ($p < 0.01$) مطابق آزمون LSD وجود داشت. با توجه به نتایج بدست آمده کمترین غلظت بازدارندگی MIC اسانس ۵ میکرولیتر بر میلی لیتر و کمترین غلظت کشندگی MBC اسانس ۲۰ میکرولیتر بر میلی لیتر است. در هر دو روش دیسک و چاهک با افزایش غلظت اسانس قطر هاله عدم رشد نیز افزایش یافته است.

هاله در روش دیسک بزرگتر از روش چاهک است هرچه قطر هاله ی عدم رشد بزرگ تر خاصیت ضد میکروبی آن بیشتر می باشد و هرچه قطر هاله ی عدم رشد کوچک تر یا کم تر باشد خاصیت ضد میکروبی آن کم تر می باشد. باتوجه به نتایج بدست آمده از مقایسه میانگین اثر غلظت اسانس بر قطر هاله عدم رشد نشان داد تفاوت معنی داری بین همه ی تیمارها

جدول ۲- تجزیه واریانس تاثیر روش اندازه گیری قطر هاله ی عدم رشد و غلظت اسانس بر رشد میکروبی

منابع تغییر	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مجموع مربعات	F-test	p-Value
روش اندازه گیری	1	251.72	251.72**	1322.524	0
غلظت اسانس	4	3645.971	911.493**	4788.929	0
روش*غلظت	4	81.451	20.363**	106.9851	0
خطا	20	3.807	0.19		
ضریب تغییرات			3.96		



شکل ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل روش اندازه گیری و اثر غلظت اسانس بر قطر هاله عدم رشد

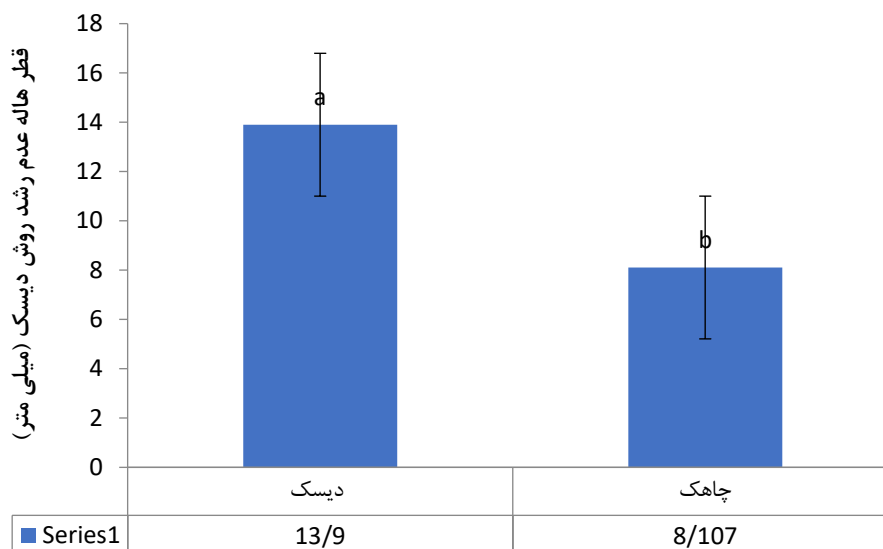
ستونها با حروف انگلیسی غیر مشترک از نظر آماری در سطح احتمال ۱ درصد تفاوت معنی داری دارند

سولفو کساید تلقیح شده بود هیچ هاله ی عدم رشدی تشکیل نداد و قطر هاله عدم رشد سفیکسیم بر روی گوشت سینه بوقلمون تلقیح شده با اشرشیا کلائی ۳۰ میلی متر بود شکل (۴). با توجه به نتایج بدست آمده از مقایسه میانگین روش اندازه گیری و اثر غلظت اسانس بر قطر هاله عدم رشد نشان داد تفاوت معنی داری بین همه ی تیمارها در سطح احتمال

تاثیر روش اندازه گیری بر قطر هاله عدم رشد

همانطور که شکل (۴) نشان می دهد بین اندازه قطر هاله عدم رشد در دو روش اندازه گیری دیسک و چاهک تفاوت معنی داری وجود دارد ($p < 0.01$). در روش دیسک اندازه ی قطر هاله بزرگ تر بوده علاوه بر این، چاهکی که با دی متیل

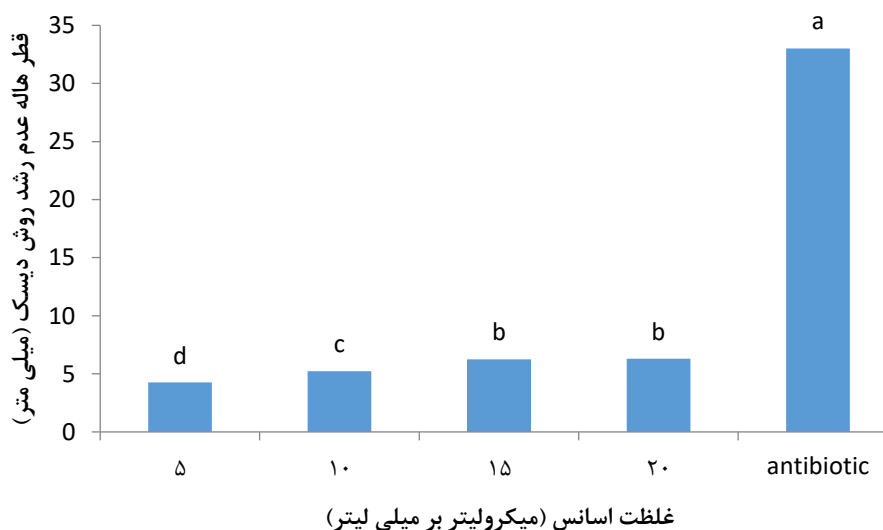
($p < 0.01$) مطابق آزمون LSD وجود داشت. و با بررسی اثر متقابل روش اندازه گیری با غلظت اسانس تفاوت معنی داری بین تیمار ها مشاهده شد.



شکل ۴- مقایسه میانگین روش اندازه گیری قطر هاله عدم رشد ستونها با حروف انگلیسی غیر مشترک از نظر آماری در سطح احتمال ۱ درصد تفاوت معنی داری دارند

دارد. بیشترین قطر هاله عدم رشد در غلظت ۲۰ میکرولیتر بر میلی لیتر مشاهده شد. کمترین میزان قطر هاله عدم رشد در غلظت ۵ میکرولیتر بر میلی لیتر مشاهده شد.

تأثیر اثر غلظت اسانس بر قطر هاله عدم رشد
مطابق شکل (۵) با افزایش غلظت میزان قطر هاله‌ی عدم رشد افزایش پیدا کرده است و اختلاف معنی داری بین سطوح مختلف با غلظت اسانس چزکوهی در سطح ($p < 0.01$) وجود

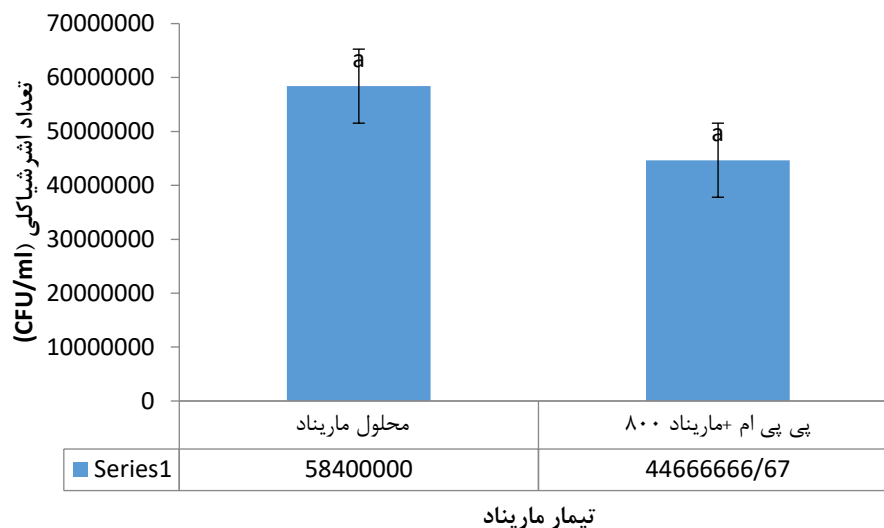


شکل ۵- مقایسه میانگین اثر غلظت اسانس بر قطر هاله عدم رشد ستونها با حروف انگلیسی غیر مشترک از نظر آماری در سطح احتمال ۱ درصد تفاوت معنی داری دارند

تأثیر تیمار ماریناد بر تعداد اشرشیاکلاهی

با توجه به شکل (۶) نشان می دهد که محلول ماریناد بر تعداد اشرشیاکلاهی اثر معنی داری در سطح احتمال ($p < 0.01$) مطابق آزمون LSD نداشت. میزان شمارش اشرشیاکلاهی در هر دو محلول ماریناد نسبت به تلقیح اولیه کاهش داشته است ولی کاهش محلول ماریناد با محلول ماریناد و اسانس طبق

آزمون LSD تفاوت معنی داری نشان نداد ($p < 0.01$). باافزایش میزان تیمار (محلول ماریناد) میزان رشد کم تر در واقع باعث افزایش کاهش شده اما کاهش معنی دار نبود و تفاوت معنی داری بین اثر تیمار (محلول ماریناد با شمارش باکتری/اشرشیاکلاهی در سطح ($p < 0.1$) مطابق آزمون LSD وجود ندارد.



شکل ۶- مقایسه میانگین تأثیر محلول ماریناد بر شمارش اشرشیاکلاهی
ستونها با حروف انگلیسی غیر مشترک از نظر آماری در سطح احتمال ۱ در صد تفاوت معنی داری دارند

بحث و نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که اسانس گیاه چرکوهی فعالیت ضد میکروبی مؤثری علیه *Escherichia coli* دارد و با افزودن آن در غلظت ۸۰۰ ppm به ماریناد، بار میکروبی این باکتری در گوشت سینه بوقلمون به طور معنی دار کاهش یافت ($p < 0.05$) و ماندگاری محصول افزایش یافت در حالی که ماریناد به تنهایی تفاوت معنی داری با گروه شاهد نداشت ($p > 0.05$). این یافته ها با مطالعات پژوهشگران هم خوانی دارد. برای مثال، اسانس *T. polium subsp. gabesianum* جمع آوری شده از تونس، MIC بسیار پایینی برابر با ۰/۰۳۱ (mg/mL) و محدوده ۰/۰۳۱-۰/۱۵۶ (mg/mL) علیه اشرشیاکلاهی نشان داد و به عنوان قوی ترین نمونه آنتی میکروبیال در میان نمونه های بررسی شده معرفی شد. ترکیبات اصلی این اسانس شامل بتاپینن (۳۵/۹۷٪) و

آلفاپینن (۱۳/۳۲٪) بود که مسئول اختلال در غشای سلولی باکتری های گرم منفی هستند. این MIC بسیار پایین توضیح دهنده پتانسیل بالای اسانس در کاربردهای غذایی است هرچند در ماتریکس گوشت به دلیل تعامل با چربی و پروتئین، غلظت های بالاتر مانند ۸۰۰ ppm (۰/۸ mg/mL) برای دستیابی به اثر مشابه لازم است (۲۲، ۲۳). در مطالعات ایرانی نیز فعالیت ضد میکروبی اسانس چرکوهی علیه اشرشیاکلاهی تأیید شده است؛ برای نمونه، MIC حدود ۳/۷۵ (μl/mL) تقریباً معادل ۳/۷۵ (mg/mL) گزارش شد و هاله عدم رشد حدود ۹ (mm) مشاهده گردید. ترکیبات غالب شامل آلفاپینن ۹/۶۷٪، بتاکاروفیلن (۸/۰۷٪) و بتاپینن (۵/۰۴٪) بودند که نقش کلیدی در فعالیت ضد باکتریایی ایفا می کنند (۲۴).

نتیجه گیری کلی

بر اساس نتایج این مطالعه، اسانس گیاه چزکوهی دارای فعالیت ضد میکروبی مؤثری علیه *Escherichia coli* بوده و با کاهش بار میکروبی به افزایش ماندگاری گوشت منجر می شود در حالی که تیمارهای حاوی ماریناد به تنهایی تفاوت آماری معناداری ($p > 0.05$) با گروه شاهد نشان ندادند، افزودن اسانس در غلظت ۸۰۰ ppm تفاوت معنادار ($p < 0.05$) ایجاد کرد. این اسانس می تواند به عنوان یک نگهدارنده طبیعی مؤثر مشروط بر تعیین دقیق دوز بهینه، استفاده کنترل شده در غلظت های پایین و بررسی پایداری در شرایط فرآوری به کار گرفته شود؛ این رویکرد نه تنها امکان جایگزینی نگهدارنده های شیمیایی را فراهم می آورد بلکه با تأکید بر ماهیت طبیعی محصول می تواند پذیرش مصرف کننده را ارتقا داده و به توسعه فرآورده های گوشتی ایمن تر و پایداری تر با کاهش ضایعات غذایی کمک کند. این نتایج پتانسیل اسانس چزکوهی را به عنوان نگهدارنده طبیعی در محصولات گوشتی تأیید می کند و با روند جهانی استفاده از اسانس های گیاهی برای کاهش بار میکروبی و جایگزینی نگهدارنده های شیمیایی هم راستاست.

منابع مالی

این مطالعه فاقد هرگونه حمایت مالی است.

تعارض در منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافع مرتبط با این پژوهش گزارش نمی کنند.

سپاسگزاری

نویسندگان از حمایت های علمی و مشاوره های ارزشمند سرکار خانم مهندس نفیسه قاسمی کمال تشکر و قدردانی را دارند.

در مطالعه های دیگر، MIC اسانس چزکوهی علیه اشرشیاکلای حدود ۱۲/۲۵ (mg/mL) گزارش شده اما در زیرگونه های غنی از پنین ها مانند نمونه تونسسی یا الجزایری، فعالیت به طور قابل توجهی بالاتر MIC ۳-۵ (μl/mL) یا پایین تر است. در الجزایر شرقی، اسانس با ترکیبات bicyclogermacrene ۱۳٪ و germacrene D ۲۵/۸۱٪، pinene ۱۱/۶۹٪، MIC ۳-۵ (μl/mL) علیه اشرشیاکلای و دیگر باکتری ها نشان داد. در زمینه کاربرد اسانس های گیاهی به عنوان نگهدارنده طبیعی در محصولات گوشتی طيور، نتایج حاضر با تحقیقات مرتبط هم راستا است (۲۵،۲۶). اسانس چزکوهی در محصولاتمانند کشک (محصول لبنی تخمیری) در غلظت های ۷۵ و ۱۵۰ (mg/L)، بار اشرشیاکلای O157:H7 را به میزان $\log 1/3-0/8$ (CFU/g) کاهش داد و اثر سینرژیک با پروبیوتیک ها مانند (*Lactobacillus casei*) مشاهده شد (۲۷). همچنین اسانس های گیاهی مانند اورگانو، آویشن و ترکیب با چزکوهی در ماریناد یا مستقیماً در گوشت مرغ/ بوقلمون، رشد (*Escherichia. Coli*، *Salmonella* و *Campylobacter*) را مهار کرده و ماندگاری را افزایش می دهند. برای مثال اسانس های حاوی کارواکول و تیمول مشابه برخی chemotype های چزکوهی در سوسیس تازه بوقلمون، بار اشرشیاکلای را کاهش دادند و تشکیل آمین های بیورژنیک را مهار کردند (۲۸). با این حال اثربخشی در ماتریکس غذایی معمولاً کمتر از تست های *in vitro* است زیرا ترکیبات فعال با پروتئین ها و چربی ها تعامل می کنند و نیاز به غلظت بالاتر ایجاد می شود. این موضوع در کاربرد ۸۰۰ ppm در مطالعه حاضر منطقی است. مطالعات اخیر بر روی گوشت طیور نیز تأکید دارند که اسانس ها گزینه ای پایدار برای مقابله با مقاومت آنتی میکروبی در پاتوژن های گرم منفی مانند اشرشیاکلای هستند (۲۹).

1. Woraprayote W, Malila Y, Sorapukdee S, Swetwathana A, Benjakul S, Visessanguan W. Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products. *Meat Science*. 2016 Oct 1;120:118-32.
2. Awad H, Ali RM. A COMPARATIVE STUDY BETWEEN RED AND WHITE MEAT: A LITERATURE REVIEW. *Mirror*. 2023;2023:00122-1.
3. Basu S. The transitional dynamics of caloric ecosystems: Changes in the food supply around the world. *Critical public health*. 2015 May 27;25(3):248-64.
4. Ghaitaranpour A, Mohebbi M, Oleyaei SA. Effects of coating formulation on structural changes of Turkey nugget during frying: MRI evaluation. *Journal of Future Foods*. 2024 Jun 1;4(2):142-8.
5. Munekata, P. E., Pateiro, M., Rodríguez-Lázaro, D., Domínguez, R., Zhong, J., & Lorenzo, J. M. (2020). The role of essential oils against pathogenic *Escherichia coli* in food products. *Microorganisms*, 8(6), 924.
6. Azizi M, Mashreghi M, Oroojalian F, Shahyahnesebi N. Antibacterial activities of *Kelussia odoratissima* and *Teucrium polium* essential oils in combination of synthetic silver nanoparticles against food-borne pathogens.
7. Mozaffarian V. A dictionary of Iranian plant names: Latin, English, Persian. Farhang Mo'aser; 1996.
8. Benali T, Habbadi K, Bouyahya A, Khabbach A, Marmouzi I, Aanniz T, Chtibi H, Mrabti HN, Achbani EH, Hammami K. Phytochemical analysis and study of antioxidant, anticandidal, and antibacterial activities of *Teucrium polium* subsp. *polium* and *Micromeria graeca* (Lamiaceae) essential oils from Northern Morocco. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2021;2021(1):6641720.
9. Stanković MS, Stefanović O, Čomić L, Topuzović M, Radojević I, Solujić S. Antimicrobial activity, total phenolic content and flavonoid concentrations of *Teucrium* species. *Central European Journal of Biology*. 2012 Aug;7(4):664-71.
10. Adams RP. Identification of essential oils components by gas chromatography mass spectroscopy. 4th. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, USA. 2007.
11. Mahboubi M, Feizabadi MM, Khamechian T, Kazempour N, Zadeh MR, Sasani F, Bekhradi M. The effect of *Oliveria decumbens* and *Pelargonium graveolens* on healing of infected skin wounds in mice. *World journal of plastic surgery*. 2016 Sep;5(3):259.
12. Saharkhiz MJ, Zomorodian K, Taban A, Pakshir K, Heshmati K, Rahimi MJ. Chemical composition and antimicrobial activities of three *satureja* species against food-borne pathogens. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 2016 Nov 16;19(8):1984-92.
13. Motamedi H, Darabpour E, Gholipour M, Seyyednejad SM. Antibacterial effect of ethanolic and methanolic extracts of *Plantago ovata* and *Oliveria decumbens* endemic in Iran against some pathogenic bacteria. *Int J Pharmacol*. 2010 Mar 1;6(2):117-22.
14. M Pirali H. Chemical composition and antimicrobial activity of *Oliveria decumbens* volatile oil from west of Iran.
15. Ergezer H, Gokce R. Comparison of marinating with two different types of marinade on some quality and sensory characteristics of Turkey breast meat.
16. Yusop SM, O'Sullivan MG, Kerry JF, Kerry JP. Influence of processing method and holding time on the physical and sensory qualities of cooked marinated chicken breast fillets. *LWT-Food Science and Technology*. 2012 Apr 1;46(1):363-70.
17. Van Haute S, Raes K, Van Der Meeren P, Sampers I. The effect of cinnamon, oregano and thyme essential oils in marinade on the microbial shelf life of fish and meat products. *Food Control*. 2016 Oct 1;68:30-9.
18. Jafari F, Zamindar N, Goli M, Ghorbani Z. Effect of Ginger extract, citric Acid and ultrasound on physicochemical properties of Camel meat. *Iranian food science and technology research journal*. 2020 May 21;16(2):287-99.
19. Sajadizadeh H, Zamindar N, Esmaeili Y, Lorenzo JM, Pateiro M, Goksen G, Paidari S, Liu L, Doudi M. Antimicrobial activity of *Oliveria decumbens* vent. Essential oil and *Ferula asa-foetida* extract on Turkey breast meat: Antimicrobial activity of *Oliveria decumbens* vent. Essential oil and *Ferula asa-foetida* extract. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 2024 Feb;18(2):1218-28.
20. Irajifar M, Varidi MJ, Varidi M, Zahedi Y. Effects of sodium chloride/acetic acid marinade on some quality properties of Iranian one-humped camel meat.

21. Mahmoudi R, Nosratpour S. *Teucrium polium* L. essential oil: phytochemical component and antioxidant properties. *International food research Journal*. 2013 Oct 1;20(4).
22. Ben Othman M, Bel Hadj Salah-Fatnassi K, Ncibi S, Elaissi A, Zourgui L. Antimicrobial activity of essential oil and aqueous and ethanol extracts of *Teucrium polium* L. subsp. *gabesianum* (LH) from Tunisia. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 2017 Jul;23(3):723-9.
23. Shojaee-Aliabadi S, Hosseini SM, Mirmoghtadaie L. Antimicrobial activity of essential oil. *Essential oils in food processing: Chemistry, safety and applications*. 2017 Nov 22:191-229.
24. Ghavam M, Markabi FS. Evaluation of yield, chemical profile, and antimicrobial activity of *Teucrium polium* L. essential oil used in Iranian folk medicine. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2024 Sep;196(9):6134-50.
25. Belmekki N, Bendimerad N, Bekhechi C, Fernandez X. Chemical analysis and antimicrobial activity of *Teucrium polium* L. essential oil from Western Algeria. *J Med Plants Res*. 2013 May 8;7(14):897-902.
26. Lograda T, Ramdani M, Chalard P, Figueredo G, Deghar A. Chemical analysis and antimicrobial activity of *Teucrium polium* L. essential oil from eastern Algeria. *Am J Adv Drug Deliv*. 2014;2(6):697-710.
27. Sadrizadeh N, Khezri S, Dehghan P, Mahmoudi R. Antibacterial effect of *Teucrium polium* essential oil and *Lactobacillus casei* probiotic on *Escherichia coli* O157: H7 in Kishk. *Applied Food Biotechnology*. 2018 Jun 1;5(3):131-40.
28. Šojić B, Ikonić P, Kocić-Tanackov S, Peulić T, Teslić N, Županjac M, Lončarević I, Zeković Z, Popović M, Vidaković S, Pavlić B. Antibacterial activity of selected essential oils against foodborne pathogens and their application in fresh Turkey sausages. *Antibiotics*. 2023 Jan 16;12(1):182.
29. Kovačević Z, Čabarkapa I, Šarić L, Pajić M, Tomanić D, Kokić B, Božić DD. Natural solutions to antimicrobial resistance: The role of essential oils in poultry meat preservation with focus on Gram-Negative Bacteria. *Foods*. 2024 Dec 3;13(23):3905.