نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۱، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۶، ص.۲۳۴-۲۲۶
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Journal of Horticultural Science
Vol. 31, No. 2, Summer 2017, P. 226-234
ISSN: 2008 - 4730

اثر ضدعفونی کننده اشعه گاما و گاز ازون بر بار میکروبی بادرنجبویه (*Melissa officinalis*)

راضیه ولی اصیل[۱*]- مجید عزیزی[۲]- حسین آروئی[۳]- معصومه بحرینی[٤]- محدثه مربایان[٥]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۷/۰۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۳/۱۰

چکیده

امروزه گیاهان دارویی با روش‌های مختلف ضدعفونی می‌شوند که هر کدام از این روش‌ها تاثیرات متفاوتی بر بار میکروبی آنها می‌گذارد. بنابراین استفاده از روش‌هایی که تاثیر زیادی در سالم‌سازی و کمترین تاثیر را روی مواد موثره این گیاهان داشته باشد ضروری است از این رو هدف از این تحقیق که بصورت طرح کامل تصادفی وآزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام پذیرفت بررسی تاثیر پرتوتابی با اشعه گاما و گاز ازون بر بار میکروبی گیاه دارویی بادرنجبویه می‌باشد. به این صورت که برگهای خشک شده بادرنجبویه در برابر دوزهای ۳، ۷، ۱۰ و ۱۵ کیلوگری اشعه گاما و غلظت‌های ۰/۳، ۰/۶ و ۰/۹ میلی‌گرم در لیتر گاز ازون در مدت زمان‌های ۱۰ و ۳۰ دقیقه قرار گرفتند سپس بار میکروبی آنها مورد بررسی قرارگرفت. نتایج نشان داد که هر دو روش بار میکروبی بادرنجبویه را کاهش دادند. اما ازون‌دهی تاثیر بیشتری در کاهش بار میکروبی این گیاه داشت بیشترین تاثیر اشعه گاما بر بار میکروبی مربوط به دوز ۱۵ کیلوگری بود. و غلظت ۰/۹ میلی‌گرم در لیتر گاز ازون و زمان ۳۰ دقیقه بیشترین تاثیر را در کاهش بار میکروبی داشت. بطور کلی نتایج حاصل از تحقیق نشان داد که استفاده از گاز ازون به منظور ضدعفونی بادرنجبویه روش ضدعفونی مناسبی می‌باشد. با توجه به این که استفاده از ازون هزینه کمتری نسبت به اشعه گاما نیاز دارد . اما باید تحقیقات بیشتری در مورد زمان قرار گیری نمونه‌های گیاهی در برابر گاز ازون و تاثیر آن روی مواد موثره گیاهان دارایی انجام‌شود.

واژه‌های کلیدی: شمارش کلی میکروب‌ها، کولیفرم،کپک و مخمر، ضدعفونی

مقدمه

بطور کلی گیاهان دارویی در مراحل مختلف کاشت، داشت، برداشت ، حمل ونقل، فراوری و بسته بندی بسته بندی می توانند به میکروب‌های مختلفی آلوده شوند که این آلودگی میتواند تاثیر نامطلوبی بر کیفیت این گیاهان و مصرف کننده داشته باشد (۱۶). بنابراین استفاده از یک روش ضدعفونی که علاوه بر کاهش بار میکروبی تاثیر منفی روی خصوصیات گیاهان شامل کیفیت و کمیت مواد موثره این گیاهان نداشته باشد ضروری به نظر می رسد. هدف از این تحقیق بررسی تاثیر پرتو تابی با اشعه گاما و ازون دهی بر بار میکروبی گیاه دارویی بادرنجبویه می‌باشد. گرچه محققان مختلفی تاثیر اشعه گاما را بر بار میکروبی و اسانس گیاهان دارویی گزارش دادند اما اطلاعات کمی در مورد تاثیر ازون بر بار میکروبی گزارش شده است. گزارشاتی در خصوص استفاده از تیمار پرتودهی برای ضدعفونی گیاهان دارویی وجود دارد. حداکثر دوز اشعه گاما (Cobalt-60 یا cesium- 137) برای ضدعفونی گیاهان دارویی ۱۰کیلوگری مشخص شده است و دوز ۵-۱۰ کیلوگری تیمار موثری برای ضد عفونی گیاهان ادویه ایی گزارش شده است (۲۳). داد خواه و همکاران (۲) اثر پرتو گاما را بر بار میکروبی و اسانس زیره سیاه[۶] مورد بررسی قرار دادند. نتایج آنها نشان داد که پرتو دهی علاوه بر کاهش بار میکروبی تنها سبب تغییر آشکار در ۳ ترکیب از ۲۲ ترکیب شناسایی شده در اسانس این گیاه می‌گردد. افزایش فلاوونوئید کل عصاره آبی زیره سیاه در دوز های ۱۰ و ۲۵ کیلوگری مشاهده شده بود. صالحی صورمقی و همکاران (۳) با بررسی تغییرات ترکیبات اسانس گیاهان دارویی و خوراکی نعناع قمی[۷]، نعناع فلفلی[۸]، گشنیز[۹]، رازیانه[۱۰]، زنجبیل[۱۱]، زیره سیاه[۱]، زیره سبز[۲]، بادرنجبویه[۳]، آویشن باغی[۴] و

۱، ۲، ۳ و ۵- کارشناس ارشد، دانشیار، استاد و کارشناس ارشد علوم باغبانی، دانشگده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: Email: valiasill.razieh@mail.um.ac.ir)
۴ - استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد
DOI: 10.22067/jhorts4.v0i0.22040

6- *Carum carvi*
7- *Mentha spicata* L.
8 - *Mentha piperita* L.
9 - *Coriandurm sativum* L
10 - *Foeniculum vulgar* Mill
11 - *Zingiber officinalis* Rose

آویشن شیرازی[5] که با اشعه گاما ضدعفونی می شوند نشان دادند که از بین گیاهان مورد بررسی فقط اسانس گیاه گشنیز دچار تغییرات شده بود. اوح و همکاران (۲۱) تاثیر دوزهای ۰، ۱، ۳، ۵، ۷ و ۱۰ کیلوگری اشعه گاما را برای کاهش ضایعات ارگانیسم ها روی نمونه های بومی و وارد شده به کشور کره (فلفل سیاه[6]، مرزنجوش[7]، پودر سیر[8]، پودر فلفل قرمز[9]، زنجبیل، پودر پیاز[10] و آویشن[11]) مورد بررسی قرار دادند. نتایج آنها نشان داد که دوز ۳ کیلو گری یا بیشتر برای حذف میکروارگانیسم ها موثر است. سوریانی و همکاران (۲۴) تاثیر دوزهای مختلف ۰، ۵/۵، ۴/۱۱و ۸/ ۱۷ کیلوگری اشعه گاما روی ژینکو وگوارانا را بررسی کردند. نتایج آنان نشان دادکه دوز ۱۷/۸ بیشترین تاثیر را در ضدعفونی میکروبها از جمله انتروباکتریاسه، قارچها و باکتریهای هوازی کل داشت به طوری که باکتریهای هوازی کل (بر اساس cfu/g) در ژینکو[12] و گوارانا[13] (بترتیب از ۱×۱۰^{۴} و $۱/۴\times۱۰^{۷}$ در تیمار شاهد) به صفر رسید، میزان قارچها در ژینکو از $۲/۵\times۱۰۲$ در تیمار شاهد به ۲ کاهش یافته بود و میزان انتروباکتریاسه در گوارانا به صفر رسید. تحقیقات اینان و همکاران (۱۰) و اکباس و همکاران (۷) نشان داد که ازون افلاتوکسین B1 و اشرشیاکلی و باسیلوس سرئوس را کاهش داد. ادرنجبویه[14] گیاهی علفی و چند ساله متعلق بته خانواده لمیاسه (Lamiaceae) که منشا شرق مدیترانه و جنوب اروپا است. اسانس حاصل از برگها و پیکره رویشی این گیاه در صنایع مختلف از جمله داروسازی، غذایی و صنایع آرایشی و بهداشتی کاربرد دارد. اسانس این گیاه در درمان بیماریهای مختلف شامل ناراحتیهای عصبی، معده ، سردرد، روماتیس و قلبی و روده ای که منشا عصبی دارند استفاده میشود علاوه بر این اسانس آن خاصیت قارچی و باکتریایی دارد، سترونلال، سیترال، ژرانیول، لینالول و استات اوگنول از عمده ترین ترکیبات بادرنجبویه می باشد (۱، ۱۸ و ۱۹)

مواد و روش‌ها

تهیه مواد گیاهی

جهت تهیه نمونه‌های گیاهی بادرنجبویه، از مزرعه دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد جمع آوری شدند و در پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد از نظر صحت گونه مورد تایید قرار گرفتند و به منظور آماده کردن گیاهان جهت اعمال تیمارهای مختلف اشعه گاما و ازون به آزمایشگاه گروه باغبانی دانشگاه فردوسی مشهد منتقل شدند.

پرتو دهی نمونه‌های گیاهی

جهت پرتو دهی، نمونه‌های گیاهی تهیه شده بصورت بسته‌های ۱۵ گرمی با ۸ تکرار در پاکت‌های پلی اتیلن (zip bags) با اندازه ۱۰×۱۲سانتی متر بسته بندی شد. سپس پاکت‌های حاوی نمونه‌های گیاهی به آزمایشگاه دوزیمتر پژوهشکده کاربرد پرتو ها واقع در سازمان انرژی اتمی ایران منتقل شد. پاکت‌های پلی اتیلنی در داخل دستگاه Gamma cell– 220 با چشمه کبالت ۶۰ (Co^{60}) با سرعت ۴ گری بر ثانیه پرتو دهی شدند.

تولید ازون و ازون دهی نمونه‌های گیاهی بادرنجبویه

تولید گاز ازون به روش تخلیه قوس الکتریکی با ظرفیت تولید ۱۰ گرم در ساعت (شرکت ازون آب، مدل، AS10 سری کا، ساخت ایران) تغذیه دستگاه با اکسیژن به مقدار ۳ لیتر در دقیقه انجام شد. اکسیژن مصرفی در دستگاه تولید گاز ازون بوسیله دستگاه تولید کننده اکسیژن (شرکت لانگفی ، مدل، LFY-I-5A-W) انجام گرفت سپس بوسیله سنسور اندازه‌گیری ازون) شرکت ازون آب، ساخت ایران) مقدار ازون اندازه‌گیری شد. در نهایت گاز ازون تولیدی داخل محفظه مخصوصی که ظروف منفذ دار (جهت قرار دادن نمونه های گیاهی بادرنجبویه) به منظور جریان یافتن ازون در همه قسمت‌ها تعبیه شد هدایت شد.

بررسی بار میکروبی

به منظور تهیه محلول اولیه از نمونه‌های گیاهی ابتدا۱۰ گرم نمونه گیاهی وزن شده و با ۹۰ میلی لیتر آب پپتون دار رقیق شده محلول آماده شده هموژنایز شده برای انجام آزمایشات مورد استفاده قرار گرفت. سپس به منظور تخمین بارمیکروبی رقت‌های $۱۰^{-۱}$ ،$۱۰^{-۲}$ روی محیط کشت پلیت کانت آگار (PCA) ریخته شد و در دمای °C ۳۰ به مدت ۷۲ ساعت طبق روش مرجع ISO ۴۸۳۳ (۱۱) آنکوبه شد. برای تخمین میزان کپک ها و مخمرها از محیط کشت (YGC) استفاده شد (۱۳). جهت تخمین تعداد باکتریهای کولیفرمی مطابق

1- *Bunium persicum (Boiss.)*
2 - *Cuminum cyminum* L.
3 - *Melissa officinalis L.*
4 - *Thymus vulgaris* L
5 - *Zataria multiflora* Boiss
6 - *Piper nigrum*
7 - *Origanum vulgare L*
8 - *Allium sativum*
9 - *Capsicum frutescens*
10 - *Allium cepa*
11 - *Thymus vulgaris*
12 - *Ginkgo biloba L*
13 - *Paullinia cupana H.B.K*
14- *Melissa officinalis L*

روش استاندارد ISO ۴۸۳۲ (۱۲) عمل شد به این صورت که ابتدا رقت‌های ۱۰-۱ ،۱۰-۲ میلی لیتر از محلول روی محیط کشت ویولت رد بایل لاکتوز آگار (VRBL) به صورت دو لایه ریخته شد، سپس پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای°C ۳۷ آنکوبه و کلنی‌های تشکیل شده شمارش شدند. این پژوهش در دو آزمایش مجزا که در آزمایش اول بررسی تاثیر اشعه گاما در ۵ سطح ۰، ۳، ۷، ۱۰ و ۱۵ کیلوگری بصورت طرح کامل تصادفی انجام شد، و آزمایش دوم بررسی تاثیر گاز ازون با غلظت‌های ۰، ۰/۳، ۰/۶ و ۰/۹ میلیگرم در لیتر در زمان های ۱۰و ۳۰ دقیقه بصورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی انجام پذیرفت، سپس داده‌های بدست آمده با استفاده از نرم افزارSAS 9.1 آنالیز شد و مقایسه میانگین ها توسط آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد انجام پذیرفت.

نتایج

اشعه گاما

نتایج حاصل از آنالیز تجزیه واریانس (جدول ۱) تاثیر دوزهای مختلف اشعه گاما بر بار میکروبی بادرنجبویه در جدول زیر منعکس شده است نتایج حاکی از آن است که پرتو گاما تاثیر معنی‌داری بر بار میکروبی این گیاه بر جای گذاشت.

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس تاثیر پرتو گاما بر بار میکروبی (log cfu/g) بادرنجبویه
Table 1- ANOVA of gamma irradiation effect on microbial load of Meliss

منابع تغییرات Sourse of variation	درجه آزادی df	میانگین مربعات Means of squarres شمارش کلی Total count	کپک و مخمر Mold & Yeast	کولیفرم Coliform
پرتو گاما Gamma radiation	4	1.39**	0.19**	1.11**
خطا Error	10	0.00	0.01	0.00
ضریب تغییرات CV (%)		1.95	3.70	2.94

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد
** significant at 1%

مطابق جدول (۲) مقایسه میانگین مربوط به تاثیر پرتوتابی با دوزهای مختلف پرتو گاما بر بار میکروبی نمونه‌های گیاه بادرنجبویه، کمترین شمارش کلی در دوز ۱۵ کیلوگری مشاهده شد این در حالی است که بیشترین شمارش کلی مشاهده شده در دوزهای ۳ کیلوگری بود وشمارش کلی در این تیمار اختلاف معنی داری با دوز ۷ کیلوگری نداشت. و تیمار شاهد و دوز ۱۰ کیلوگری از نظر شمارش کلی تفاوت معنی‌داری نشان ندادند و شمارش کلی آنها در یک سطح بود این نتایج نشان داد که نمونه‌های گیاه بادرنجبویه که با دوز ۱۵ کیلوگری اشعه گاما پرتودهی شدند تاثیر بهتری در کاهش شمارش کلی داشت. تاثیر اشعه گاما بر تعداد کپک و مخمر مشخص کرد که تیمار شاهد و دوز ۳ کیلوگری اشعه گاما دارای بیشترین تعداد کپک و مخمر و دوز ۱۵ کیلوگری دارای کمترین تعداد این آلودگی بود که البته بار میکروبی مشاهده شده در این تیمار کاهش معنی‌داری در مقایسه با دوز ۷ کیلوگری نداشت هم چنین تعداد کپک و مخمر موجود در دوزهای ۷ و ۱۰ کیلوگری تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند. مشاهدات حاصل از این جدول نشان داد که تعداد باکتری‌های کولیفرمی تحت تاثیر پرتودهی با دوزهای مختلف اشعه گاما کاهش یافت بطوریکه بیشترین بار میکروبی در تیمار شاهد و دوزهای ۳ و ۷ کیلوگری و کمترین بار میکروبی در دوزهای ۱۰ و ۱۵ کیلوگری مشاهده شد. بطور کلی در بین دوزهای اشعه گاما که برای سالم‌سازی نمونه‌های گیاه بادرنجبویه استفاده شد دوز ۱۵ کیلوگری بیشترین تاثیر را در کاهش بار میکروبی این گیاه به خود اختصاص داد در حالی که کاهش قابل توجه‌ایی در بار میکروبی در سایر دوزهای استفاده شده اشعه گاما مشاهده نشد.

ازون دهی

در جدول تجزیه واریانس زیر نتایج حاصل از بررسی تاثیر گاز ازون در غلظت‌های ppm ۰/۳، ۰/۶ و ۰/۹ در زمان‌های ۱۰ و ۳۰ دقیقه بر بار میکروبی نمونه های گیاه بادرنجبویه نشان داده شد (جدول ۳). مطابق این جدول ازون دهی بطور معنی‌داری میزان کپک و مخمر و باکتری‌های کولیفرمی را تحت تاثیر قرار داد. ولی اثر متقابل ازون در زمان بر میزان شمارش کلی معنی‌دار نشد.

جدول ۲- مقایسه میانگین بار میکروبی بادرنجبویه تحت تاثیر پرتوگاما (log cfu/g)

Table 2- Mean comparison of Meliss microbial load affected by gamma irradiation

پرتو گاما Gamma radiation	شمارش کلی Total count	کپک و مخمر Mold & Yeast	کوایفرم Coliform
شاهد Control	1.05 b	4.08 a	3.84 a
3	4.47 a	4.05 a	3.85 a
7	4.42 a	3.64 bc	3.76 a
10	4.09 b	3.78 b	2.79 b
15	2.79 c	3.49 c	2.63 b

حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار بر اساس آزمون LSDدر $p\geq0.05$

Means followed by the same letter in a column are not significantly different using LSD test at $p\geq0.05$

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس تاثیر گاز ازون بر بار میکروبی (log cfu/g) بادرنجبویه

Table 3- ANOVA of Ozone gas effect on microbial load of Meliss

منابع تغییرات Sourse of variation	درجه آزادی df	میانگین مربعات		
		شمارش کلی Total count	کپک و مخمر Mold & Yeast	کوایفرم Coliform
گاز ازون Ozone gas	3	54.11 **	13.56 **	15.84 **
زمان time	1	1.03 **	2.84 **	2.68 **
زمان× ازون Ozone× time	16	24.0 ^{ns}	0.58 *	0.82 **
خطا Error	40	0.09	0.12	0.11

** ، * و nsبترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد، معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد و عدم معنی داری

**, * significant; ns = non-significant, respectively at $p<0.05$

نتایج نشان داد که بیشترین تاثیر را در کاهش بار میکروبی تیمار ازون با غلظت ۰/۹ ppm به خود اختصاص داد در صورتی که بیشترین بار میکروبی در شاهد مشاهده شد (جدول ۵). در مدت زمان ۳۰ دقیقه کمترین بار میکروبی در مقایسه با شاهد و زمان ۱۰ دقیقه یافت شد (جدول ۴). نتایج بررسی (شکل ۱) تاثیر ازون‌دهی نمونه‌های گیاه بادرنجبویه نشان داد که کپک و مخمر بطور چشمگیری تحت تاثیر این تیمار قرار گرفت بطوریکه باعث شد کپک و مخمر از ۲/۴ در شاهد به صفر در غلظت ۰/۹ ppm در زمان ۳۰ دقیقه کاهش یافت. اما کپک و مخمر مورد بررسی در تیمار ازون با غلظت ۰/۳ ppm در زمان‌های ۱۰ و ۳۰ دقیقه و غلظت ۰/۶ ppm در مدت زمان ۱۰ دقیقه اختلاف معنی داری نداشتند. این در حالی است که از تیمار گاز ازون با غلظت ۰/۳ ppm در مدت زمان ۳۰ دقیقه تا تیمار ازون در مدت زمان ۳۰ دقیقه کاهش تدریجی کپک و مخمر و در نهایت حذف این آلودگی مشاهده شد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که بیشترین تاثیر گاز ازون بر بار میکروبی گیاه بادرنجبویه مربوط به تاثیر آن بر باکتریهای کولیفرمی بود (شکل۲). بطوریکه تعداد این باکتریها که در شاهد ۵۱/۴ بود در تیمار ازون دهی با غلظت ۰/۹ ppm در مدت زمان ۳۰ دقیقه به صفر رسید. طبق نتایج این تحقیق به غیر از تیمار ازون با غلظت ۰/۳ ppm در مدت زمان ۳۰ دقیقه که تفاوت معنی‌داری از لحاظ این آلودگی با تیمار ازون‌دهی با غلظت ۰/۶ ppm در مدت زمان ۱۰ دقیقه نداشت در سایر تیمارها مورد استفاده جهت ضدعفونی نمونه‌های گیاه بادرنجبویه کاهش تدریجی باکتریهای کولیفرمی با افزایش غلظت ازون و زمان قرارگیر ی نمونه‌های گیاهی در برابر گاز ازون مشاهده شد. ضمنا بعد از تیمار ازون با غلظت ۰/۹ ppm در مدت زمان ۳۰ دقیقه استفاده از تیمار ازون با غلظت ۰/۹ ppm در مدت زمان ۱۰ دقیقه بیشترین تاثیر را درکاهش باکتری‌های کولیفرمی داشت. نتایج این بررسی حاکی از آن بود که کاربرد گاز ازون جهت ضدعفونی گیاه بادرنجبویه از نظر شمارش کلی، کپک و مخمر و باکتریهای کولیفرمی تیمار موثری در کاهش این آلودگی ها بود که این تیمار بطور موثری بار میکروبی را کاهش داد و حتی باعث حذف کپک و مخمر و باکتری‌های کولیفرمی در نمونه‌های مورد بررسی این گیاه شده است.

جدول ٤- مقایسه میانگین بررسی بار میکروبی(Log cfu/g) گیاه بادرنجبویه در زمان‌های مختلف تحت تاثیر پرتو گاما
Table 4- Mean comparison of Meliss microbial load at different times affected by gamma irradiation

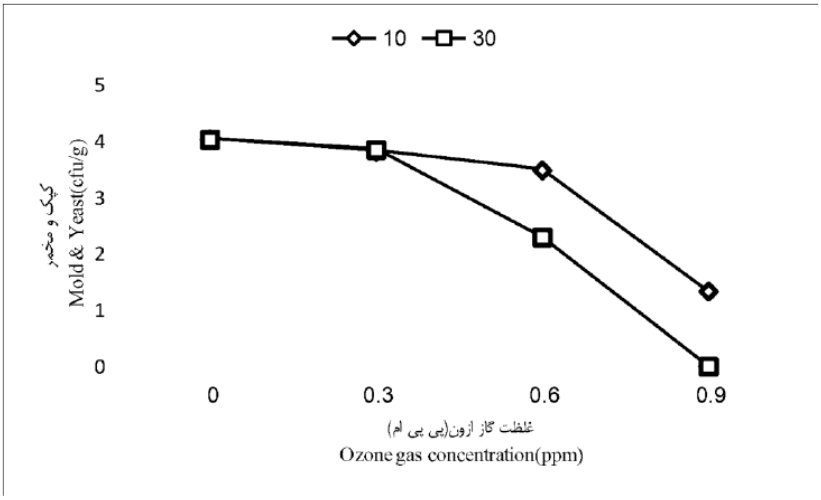
زمان Time (min)	شمارش کلی Total count	کپک و مخمر Mold & Yeast	کوایفرم Coliform
10	3.47 a	3.16 a	3.43 a
30	3.05 b	2.47 b	2.76 b

حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار بر اساس آزمون LSDدر p>0.05.
Means followed by the same letter in a column are not significantly different using LSD test at p=0.05

جدول ٥- مقایسه میانگین بررسی بار میکروبی(Log cfu/g) گیاه بادرنجبویه در زمان‌های مختلف بادرنجبویه تحت تاثیر غلظت‌های مختلف ازون
Table 5- Mean comparison of Meliss microbial load affected by Ozone different concentrations

ازون Ozone (ppm)	شمارش کلی Total count	کپک و مخمر Mold & Yeast	کوایفرم Coliform
0	4.51 a	4.02 a	4.51 a
0.3	4.06 b	3.64 a	3.98 b
0.6	3.10 c	2.93 b	3.05 c
0.9	1.38 d	0.6 c	0.83 d

حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار بر اساس آزمون LSDدر p>0.05.
Means followed by the same letter in a column are not significantly different using LSD test at p=0.05

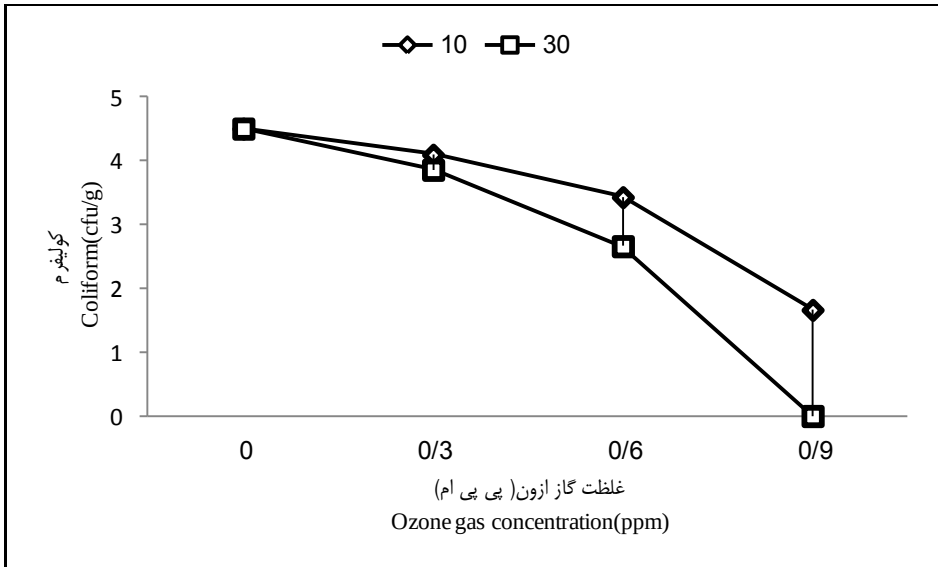


شکل -۱ مقایسه میانگین اثر متقابل کپک و مخمر(Log cfu/g) بادرنجبویه تحت تاثیر غلظت‌های گاز ازون در زمان‌های مختلف
Figure 1- Mean comparison of interaction effect meliss affected by Mold and Yeast and ozone gas concentrations in different times

بحث

نتایج حاصل از این تحقیق نشان می دهد در بین غلظتهای گاز ازون استفاده شده جهت ضدعفونی نمونه‌های بادرنجبویه غلظت ۰/۹ میلیگرم در لیتر در مدت زمان ۳۰ دقیقه کمترین بار میکروبی را دارا بود و حتی حذف کامل کپک و مخمر و کولیفرم را باعث شدکه این نتایج با نتایج ولی اصیل و همکاران (۲۳) مطابقت دارد آنان نشان دادند که غلظت ۰/۹ میلی‌گرم در لیتر در مدت زمان ۳۰ دقیقه بیشترین تاثیر را در کاهش بار میکروبی نعنا فلفلی[1]، مرزه[2] وآیشن شیرازی[3] داشت. اینان و همکاران (۱۰) نشان دادند مقدار افلاتوکسین B1 در فلفل قرمز بترتیب ۸۰ ٪ و ۹۰٪ بعد از قرارگیری در برابر ازون کاهش یافت.

1- *Mentha piperita*
2- *Satureja hortensis*
3- *Zataria multiflora*



شکل ۲- مقایسه میانگین اثر متقابل کولیفرم(Log cfu/g) بادرنجبویه تحت تاثیر غلظت‌های گاز ازون در زمان‌های مختلف

Figure 2- Mean comparison of interaction effect meliss affected by Coliform and ozone gas concentrations in different times

نتایج اکباس و همکاران (۷) حاکی از آن بود که تیمار ازون با غلظت ۱ میلیگرم در لیتر در مدت زمان ۳۶۰ دقیقه میتواند تعداد اشرشیاکلی و باسیلوس سرئوس را در فلفل قرمز کاهش دهد ولی غلظت ازون بیشتر از ۵ میلیگرم در لیتر می تواند برای کاهش اسپورهای باسیلوس سرئوس مورد استفاده قرار گیرد. اکباس و ازدیمیر (۶) مشاهده کردندکه غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر ازون به مدت ۳۶۰ دقیقه تعداد اشرشیاکلی و باسلوس سرئوس را به میزان ۳/۵ لگاریتمی را در نمونه‌های انجیر خشک کاهش داد.کاهش ۲ لگاریتمی تعداد اسپورهای باسیلوس سرئوس در غلظت بیشتر از ۱ میلیگرم در لیتر در پایان زمان ۳۶۰ دقیقه مشاهده شد. گزارش شد که میزان باسیلوس سرئوس و میکروکوکوس در گیاهان ادویه ایی تا ۶ سیکل لگاریتمی کاهش یافت (۱۹، ۲۰، ۱۴ و۲۴). اما نتایج بدست آمده از کاربرد اشعه گاما بر بار میروبی بادرنجبویه نشان داد که در مجموع دوز ۱۵ کیلوگری اشعه گاما بیشرین تاثیر را در کاهش بار میکروبی داشت (۹)، و کمترین بار میکروبی در شاهد مشاهده شد. محققان نشان دادند که اشعه گاما موجب کاهش برا میکروبی گیاهان مختلف شد در این میان ختاک و همکاران (۱۵) تاثیر دوزهای ۱، ۲، ۴ و ۶ کیلوگری اشعه گاما طی مدت ۱۲ روز در انبار در دمای ۴ سانتی گراد را روی ریزوم نیلوفر آبی مورد بررسی قرار داد نتایج نشان داد که تعداد باکتریها در روز نهم و دوازدهم نسبت به روز اول در تمام دوزهای به کار رفته افزایش یافته بود و تعداد قارچها از روز اول به بعد افزایش چشمگیری یافته بود. سادکا و همکاران (۲۲) نشان دادند که که دوزهای ۵، ۷، ۱۰ و ۳۰ کیلوگری اشعه گاما تا ۳۰ روز حذف کامل تعداد کل میکروارگانیسم ها، باکتریهای کولیفرمی و کپک و مخمر را در مرزنجوش در پی داشت. آلام و همکاران (۸) با بررسی تاثیر اشعه گاما روی گیاهان دارویی زیره سبز، زرد چوبه، فلفل و گشنیز که دارای میزان زیادی آلودگی باکتریایی و قارچی بودند نشان دادند که دوز ۱۰ کیلوگری برای کاهش آلودگی به باکتری و میزان ۵ کیلوگری برای حذف آلودگی قارچی کافی بود باکتریهای کولیفرمی در دوز ۵کیلوگری حذف شدند و در مدت انبار ۶ ماهه تیمار با اشعه باعث افزایش بار کیفیت شده بود. نتایج این پژوهش نشان دهنده این مطلب است که کاربرد گاز ازون به منظور ضدعفونی گیاه بادرنجبویه نسبت به پرتو تابی با اشعه گاما تاثیر چشمگیر تری داشت. و این در حالی است که اشعه گاما فقط باعث کاهش بار میکروبی شده بود بطوریکه ولی اصیل و همکاران گزارش نمودند که اشعه گاما سبب کاهش بار میکروبی آویشن شیرازی شد. هم چنین ابرار و همکاران (۵) با بررسی تاثیر دوره انبار و دوزهای ۲، ۴ و۶ کیلوگری اشعه گاما روی فلفل قرمز نشان دادند که افلاتوکسین در دوره انبار ۳۰، ۶۰ و ۹۰ روز در همه دوزها به جز دز ۶ کیلوگری افزایش یافته بود. بطور کلی نتایج نشان داد که گاز ازون می تواند به عنوان یک روش ضدعفونی مهم جهت ضدعفونی گیاه بادرنجبویه مورد استفاده قرار گیرد. محققان دیگر نیز با بررسی تاثیر ازون و اشعه گاما نشان دادند که این دو روش ضدعفونی سبب کاهش و یا ضدعفونی کامل بار میکروبی محصولات مختلف می شود.

منابع

1- Abrar M., Anjum F.M., Zahoor T., and Nawaz H. 2009. Effect of Storage Period and Irradiation Doses on Red Chillies. Pakistan Journal of Nutrition, 8 (8): 1287-1291.

2- Akbas M.Y., and Ozdemir M. 2008. Application of gaseous ozone to control populations of *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* and *Bacillus cereus* spores in dried figs. Journal of Food Microbiology, 25: 386–391.

3- Akbas M.Y., and Ozdemir M. 2008. Effect of gaseous ozone on microbial inactivation and sensory of flaked red peppers. International Journal of Food Science and Technology, 43: 1657–1662.

4- Alam M.K., Choudhuryn N., Chowdhury N.A., and Yous soufi, Q. M. 1992. Decontamination of spices by gamma radiation. Letters in Applied Microbiolog, 14:199-202.

5- Dadkhah A., Kalafi H., Rajaii R., Alame A., Rezaii MB., and Siihon M. 2009. Study of the Effects of gammairradiation on microbial load and efficient extracts of caraway seeds. Journal of Nuclear Science and Technology, 49: 27-34. (in Persian with English abstract).

6- Gupta P.C., Garg N., and Joshi P. 2011. Effect of gamma irradiation on the extraction yield and microbial contamination of medicinal plants. International Journal of Food Safety, 13: 351-354.

7- Inan F., Pala M., and Doymaz I. 2007. Use of ozone in detoxification of Aflatoxin B1 in red pepper. Journal of Stored Products Research, 43: 425–429.

8- International Organization for Standardization ISO 4833:2003. 2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs horizontal method for the enumeration of microorganisms-colony count technique at 30°C. Geneve.

9- International Organization for Standardization, ISO 4832. 2006. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coliforms – Colony-count technique. Geneva. 6 pp.

10- International Organization for Standardization, ISO 7954:1987. 1987. Microbiology – General guidance for enumeration of yeasts and moulds – Colony count technique at 25 °C. Geneva. 3 pp.

11- Khadre M.A., and Yousef A. E. 2001. Sporicidal action of ozone and hydrogen peroxide: a comparative study. International Journal of Food Microbiology, 71: 131–138.

12- Khattak K.F., Simpson T.J., and Ihasnullah. 2009. Effect of gamma irradiation on the microbial load, nutrient composition and free radical scavenging activity of *Nelumbo nucifera* rhizome. Journal of Radiation Physics and Chemistry, 78: 206–212.

13- Kneifel W., Czech E., and Kop, B. 2002. Microbial contamination of medicinal plants. A review. Journal of medicinal plant and natural product research, 6:5–15.

14- Masakova N.S., Tseevatuy B.S., Trofimenko S.L., and Remmer G.S. 1979. The chemical composition of volatile oil in lemon-balm as an indicator of therapeutic use. Journal ofmedicinal plant and natural product research, 36: 274.

16- Mimica-Dukic N., Bozin B., Sokovic M., and Simin N. 2004. Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Melissa officinalis* L Lamiaceae) Essential Oil. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52: 485-489.

17- Naitoh S., Okada Y., and Sakai T. 1987. Studies on utilization of ozone in food preservation: III. Microbicidal properties of ozone on cereal grains, cereal grain powders, peas, beans, and whole spices. Journal of Japan Food Science & Technology Society, 34: 788–793.

18- Naitoh S., Okada Y., and Sakai T. 1988. Studies on utilization of ozone in food preservation: V. Changes in microflora of ozone treated cereals, grains, peas, beans, and spices during storage. Journal of Japan Food Science & Technology Society, 35: 69–77.

19- Oh K.N., Lee S.Y., Lee H.J., Kim K.E., and Yang J.S. 2003. Screening of gamma irradiated spices in Korea by using a microbiological method (DEFT/APC). Journal of Food Control, 14:489–494.

20- Omidbaigi, R. 2009. Production and processing of medicinal plants. V3. Astan quds razavi publications. Mashhad. (in Persian with English abstract).

21- Sadecka J., and Polovka M. 2008. Multi- experimental study of γ- radiation impact on oregano (*Origanum vulgare* L.). Journal of Food and Nutrition Research, 47(2): 85-91.

22- Salehi Sormaghi MH., Amin G., Zahedi H., and Kochesfahani H. 2007. The investigation of essential oil changes of medicinal plants that are decontaminated with gamma radiation. Journal of Medicinal Plants, 2(22): 71-76. (in Persian with English abstract).

23- Saputra T.S., Maha M. and Purwanto Z.I. 1983. Quality ghanges of irradiated spices stored in vario us packaging materials. Risalah Seminar Nasional Pengawetan Makanan Dengan Iradiasi, Jakarta.

24- Soriani R.R., Satomi L.C., and Pinto T.J.A. 2005. Effects of ionizing radiation in ginkgo and guarana. Journal of Radiation Physics and Chemistry, 73:239–242.

25- Valiasill R., Azizi M., Bahraini M., and Aroiee AH. 2012. The effect of gamma irradiation on microbial load and essential oil compound of Shirazi thyme (*Zataria multiflora*). Journal of postharvest physiology and technology of horticultural crops. 1:43-53. (in Persian with English abstract).

26- Valiasill R., Azizi M., Bahreini M., and Arouiee H. 2013. The Investigation of Decontamination Effects of Ozone Gas on Microbial Load and Essential Oil of Several Medicinal Plants. Journal of Notulae Scientia Biologicae,

5(1):34-38. (in Persian with English abstract).
27- Zhao J., and Cranston P.M. 1995. Microbial decontamination of black pepper by ozone and the effect of the treatment on volatile oil constituents of the spice. Journal of Science Food and Agriculture, 68: 11–18.

Journal of Horticultural Science
Vol. 31, No. 2, Summer 2017, P. 226-234
ISSN: 2008 - 4730

نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۱، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۶، ص.۲۳۴-۲۲۶
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

The Disinfectants effect of Gamma Radiation and Ozone Gas on Microbial Load of Meliss (*Melissa officinalis*)

R. Valiasill[1]*- M. Azizi[2]- H.Aroiee[3]- M. Bahraini[4]- M. Morabaian[5]

Received: 24-09-2013
Accepted: 30-05-2016

Introduction: Today, tendency to use drugs and therapies with herbal and natural products are increasing because negative effects of chemical drugs and environmental pollution have been proved. Collection and handling of medicinal plants are not usually done in sanitary conditions and difference in cultivation conditions can also increase pollution, influencing the maintenance period and damaging the aspect and the potential benefit of medicinal plants. Medicinal plants decontaminate with different methods that each of these methods has different effects on their microbial load. Therefore it seems essential to use of methods that can have the highest effect on microbial load decrease and the lowest effect on active substance of these plants.

Materials and Methods: In order to evaluate the effects of Ozone gas and gamma irradiation on microbial load of *Melissa officinalis*, an experiment was conducted based on randomized complete block design with three replications. Plant samples were collected from the Research farm of, Ferdowsi University of Mashhad. Meliss leaves were treated by Ozone gas concentrations 0.3, 0.6 and 0.9 ml/L for 10 and 30 min and irradiated at dosages 3, 7, 10 and 15 KGy by a Co60 source. Then microbial load of Meliss leaves were measured. Coliform bacteria were determined using Violet Red Bile lactose (VRBL) agar (Liofilchem Co., Italia), according to the method of ISO4832. According to ISO 7954, yeast extract of glucose chloramphenicol agar (Liofilchem Co., Italia) was used for determination of mold and yeast. The total count (plate count agar, Liofilchem Co., Italia) was determined by method of ISO 4833, that each replicate was tested with duplicate pour plates. Ozone gas was produced by corona discharge Ozone generator with production capacity 10 g/h of Ozone gas (OZONEAB co. A.S10. Iran). Analysis of variance and means comparison were calculated using SAS 9.1 (Cary, NC, USA, 2002-2003). Means square comparisons were different at the 5% significance level by the least significant difference test.

Results and Discussion: The effect of Gamma radiation on microbial load such as total count, molds, yeasts and Coliform was significant ($p<0.05$), so the highest effect of irradiation on the microbial load was related to the dosage of 15 KGy. However 10 KGy decreased microbial load, but 3 and 7 KGy had no effect on reduction of total count, molds, yeasts and Coliform. According to results of this study, the use of ozone gas, exposure duration to the meliss samples and interaction of duration and ozone gas on microbial load was significant. The highest and lowest levels of contamination were observed in control and 0.9 ppm concentration of ozone gas for 30 min, respectively. Non-ozonation meliss samples showed maximum level of mold and yeast count. Also Coliform were eliminated with 0.9 ppm concentration of ozone gas for 30 min in meliss. It was found that by increasing the Ozone gas concentrations from 0.3 ppm to 0.9 ppm, microbial load reduced significantly ($p<0.05$).

Conclusions: The result showed that both methods decreased microbial load of Meliss. Ozone gas had higher effect than gamma on reduction of microbial load of this plant. Concentrations of ozone gas utilized for decontamination of medicinal plants were 0.9 ppm ozone gas and 15 KGy dosages that those concentrations had the highest effect on total count, mold and yeast and Coliform. Control of environmental conditions and hygiene improvement in production process of medicinal plants such as meliss is essential. In addition, it is recommended to choose a suitable decontamination method for disinfection during packing of medicinal plants and post-packing manipulation and transport. This study showed that gamma irradiation can use as an important decontamination method to reduction the microbial load of meliss. Furthermore, the use of ozone as a method of disinfection for medicinal plants decontamination is a suitable method of decontamination. Finally, the results showed that the use of ozone for disinfection of Meliss is inexpensive and suitable disinfection techniques than gamma radiation. However, further research needs to improve our understanding on duration of exposure to ozone and its impact on active substances of Meliss.

Keyword: Gamma irradiation, Meliss, Microbial load, Ozone gas

1, 2, 3 and 5 - M.Sc., Professor, Associate Professor and M.Sc., Horticulture Department, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran
(*- Corresponding Author Email: valiasill.razieh@mail.um.ac.ir)
4- Assistant Professor, Biology Department, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Iran