J. of Nuclear Sci. and Tech.
No. 49, pp. 27-34, 2009

مجله علوم و فنون هسته‌ای
شماره ۴۹، صفحات ۳۴-۲۷، ۱۳۸۸

بررسی اثرات پرتو گاما بر بار میکروبی و ترکیبات مؤثر زیره‌ی سیاه

ابوالفضل دادخواه[۱و۲]، حسین خلفی*[۲]، رسا رجایی[۲]، عبدالامیر علامه[۱]، محمدباقر رضایی[۳]، مرضیه سیحون[۲]

۱- گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، صندوق پستی: ۱۱۱-۱۴۱۱۵، تهران- ایران
۲- پژوهشکده کاربرد پرتوها، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی ایران، صندوق پستی: ۳۴۸۶-۱۱۳۶۵، تهران ـ ایران
۳- گروه گیاهان دارویی، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع، صندوق پستی: ۱۱۶-۱۳۱۸۵، تهران ـ ایران

چکیده: در این تحقیق، اثرات پرتو گاما بر بار میکروبی و ترکیبات مؤثر استخراج شده از دانه‌های زیره‌ی سیاه مورد بررسی قرار گرفته است. دانه‌های زیره‌ی سیاه با چشمه‌ی کبالت-۶۰ (^{60}Co) تا دزهای ۱۰ و ۲۵ کیلوگری پرتودهی شدند. سپس ترکیبات مؤثر آن‌ها استخراج و میزان تغییر ترکیبات و نیز بار میکروبی دانه‌های زیره‌ی سیاه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان می‌دهد که ضمن کاهش بار میکروبی دانه‌های زیره‌ی سیاه، از بین ۲۲ ترکیب شناسایی شده از طریق تجزیه‌ی عنصری با استفاده از تکنیک GC-MS تنها ۳ ترکیب در اسانس روغنی دانه‌های زیره‌ی سیاه تغییر آشکار داشتند. میزان کل فلاوونوییدهای عصاره‌ی آبی زیره‌ی سیاه نیز با دو دز پرتودهی ۱۰ و ۲۵ کیلوگری افزایش چشم‌گیری داشته است. به طور کلی نتایج نشان می‌دهند که پرتودهی دانه‌های زیره‌ی سیاه تا دز ۲۵ کیلوگری، بدون تأثیر سوء در ترکیبات مؤثر زیره‌ی سیاه باعث کاهش چشم‌گیر بار میکروبی می‌گردد.

واژه‌های کلیدی:* *پرتودهی، زیره‌ی سیاه، بار میکروبی، فلاوونوییدها، اسانس روغنی، تجزیه شیمیایی

Study of the Effects of Gamma-Irradiation on Microbial Load and Efficient Extracts of Caraway Seeds

A. Dadkhah[1,2], H. Khalafi*[2], R. Rajaee[2], A. Allameh[1], M.B. Rezaei[3], M. Seyhoon[2]
1- Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medical Science, Tarbiat Modares University, P.O. Box: 14115-111, Tehran-Iran
2- Radiation Application Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, AEOI, P.O. Box: 11365-3486, Tehran-Iran
3- Department of Medicinal Plants, Institute for Research in Forests and Rangelands, P.O. Box: 13185-116, Tehran-Iran

Abstract: In this study, the effects of γ-radiation on microbial load and efficient compounds derived from caraway seeds were investigated. Caraway seeds were irradiated at dosages of 10 and 25 kGy by a Co^{60} source. Then the efficient compounds were extracted and the composition and microbial load of caraway extracts were evaluated before and after γ-irradiation. The results showed that while decreasing the microbial content of caraway seeds, among the 22 oil fractions separated by GC-MS, only three components were markedly affected by gamma irradiation. Pre-treatment of caraway seeds with 10 and 25 kGy radiation also results in a significant ($p<0.05$) increase in flavonoids content of hydro alcoholic extract. These data may suggest that irradiation of caraway seeds without unfavorable changes on their effective components results in significant decrease in microbial content of this product.

Keywords: ***Irradiation, Caraway Seeds, Microbial Load, Flavonoids, Essential Oils, Chemical Analysis***

*email: hkhalafi@aeoi.org.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۸۷/۳/۲۱ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۷/۱۰/۱۵

۱- مقدمه

میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و غیر بیماری‌زا، در همه جای طبیعت یافت می‌شوند به طوری‌که حتی بهترین فرایندهای فرآوری مواد غذایی و رعایت دقیق‌ترین اصول بهداشتی نیز نمی‌توانند آلودگی‌های ناشی از آن‌ها را به طور کامل از بین ببرند. مواد غذایی در کشورهای در حال توسعه از جمله ایران که اغلب در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری قرار دارند، بیش‌تر در معرض آلودگی و از بین رفتن هستند. افزون بر این، این کشورها فاقد فن‌آوری و تجهیزات لازم برای حفظ بهینه‌ی مواد غذایی می‌باشند. یکی از روش‌های در حال توسعه برای ذخیره‌سازی مواد غذایی، پرتودهی آن‌ها است. در این روش باکتری‌ها، قارچ‌ها و انگل‌های مضر که باعث فساد مواد غذایی می‌شوند، کاهش یافته و ماندگاری مواد غذایی افزایش می‌یابد. این روش جای‌گزین مناسبی برای نگه‌دارنده‌های شیمیایی است که بسیار زیان‌آور هستند. علاوه بر این، در روش پرتودهی تازگی طبیعی اقلام غذایی نیز حفظ می‌شود. در مواردی استفاده از دزهای بالای پرتو، باعث کاهش نیاز به نگه‌داری مواد غذایی در یخچال می‌شود که این امر کاهش مصرف انرژی را به دنبال دارد [۱ و ۲]. استفاده از روش پرتودهی محدودیت‌هایی نیز دارد. سلامت غذاهای پرتو دیده، هنوز مورد بحث است و این، در ایجاد محدودیت استفاده از این فن‌آوری بی‌تأثیر نیست [۲].

امروزه پرتودهی مواد غذایی خشک به خصوص گیاهان دارویی، بسیار رایج است. بر اساس گزارش‌های منابع مختلف کشاورزی در سراسر جهان، گیاهان دارویی از جمله زیره‌ی سیاه در معرض انواع مختلف آلودگی‌های میکروبی و قارچی از جمله افلاتوکسین B1 قرار دارند. پرتودهی، با کاهش تعداد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و مخرب باعث افزایش کیفیت بهداشتی و مدت نگه‌داری آن‌ها می‌گردد [۲].

متأسفانه، با وجود استفاده‌ی تجاری از مواد غذایی پرتودیده، اهمیت بررسی سلامت این دسته از مواد نادیده گرفته شده و تاکنون در مورد حفظ ترکیبات مؤثر آن‌ها، به ویژه در داخل کشور مطالعه‌ی چندانی صورت نگرفته است.

زیره‌ی سیاه یکی از مشهورترین و قدیمی‌ترین گیاهان دارویی است. از دانه‌های زیره‌ی سیاه به عنوان طعم‌دهنده‌ی نان، پنیر، شیرینی‌ها، محصولات گوشتی، سس‌ها و نوشابه‌ها استفاده می‌شود. کارون[1] موجود در اسانس روغنی این گیاه معطر در وسایل آرایشی- بهداشتی، خمیر دندان، آدامس و داروسازی به کار برده می‌شود. این محصول در طب سنتی در درمان بیماری‌های روده‌ای (کولیت) و تنفسی استفاده شده و به هضم غذا به خصوص در کودکان کمک می‌نماید. مطالعات مختلف نشان می‌دهند که زیره‌ی سیاه دارای خواص عملکردی و دارویی فراوانی نظیر آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی، ضد انقباضی، ضد نفخی، خلط‌آوری (اسپکتورانت)، اشتها آوری، ضدسرطانی و ضد جهش‌زایی است [۳].

با توجه به کشت زیره در ایران و نیز احتمال آلودگی آن، فن‌آوری پرتودهی می‌تواند روشی مناسب برای حفظ و نگه‌داری این محصول با ارزش باشد. هم‌چنین با روشن شدن اثرات پرتودهی بر روی خواص آن و تعیین دز بهینه‌ی پرتو می‌توان با اطمینان بیش‌تری از این روش نگه‌داری استفاده کرد. در این پژوهش، در مرحله‌ی اول تأثیر پرتوگاما بر کاهش میزان آلودگی زیره‌ی سیاه با انواع میکروارگانیسم‌ها (مزوفیل‌های هوازی، کلیفرم‌ها، اسپوردارها و قارچ‌ها) و سپس میزان تغییرات ترکیبات مؤثر اسانس روغنی و عصاره‌ی آبی این گیاه تا دزهای ۱۰ و ۲۵ کیلوگری مورد بررسی قرار گرفته است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱ پرتودهی زیره‌ی سیاه

در این تحقیق از دانه‌های زیره‌ی سیاه استفاده شده است. ابتدا نمونه‌ها به سه قسمت تقسیم و پس از بسته‌بندی در کیسه‌های پلی‌اتیلنی به وسیله‌ی دستگاه گاماسل مدل ۲۲۰ با چشمه‌ی ^{60}Co تا دزهای ۱۰ و ۲۵ کیلوگری پرتودهی شدند.

سیستم پرتودهی مورد استفاده در این تحقیق با دزیمترهای استاندارد فریک درجه‌بندی شده است. دز جذبی، بستگی به زمان پرتودهی نمونه‌ی مورد نظر دارد. دمای محیط پرتودهی ۲۲ تا ۲۳°C و تمام نمونه‌ها با آهنگ ۰٫۳۷ Gy/sec پرتودهی شدند. بسته‌های پلی‌اتیلنی نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایش در یخچال (۴ درجه‌ی سانتی‌گراد) نگه‌داری شدند.

۲-۲ تجزیه‌ی میکروبی

۲-۲-۱ تهیه‌ی سوسپانسیون و رقت‌های مختلف

مقدار ۱۰ گرم از نمونه‌ی زیره‌ی سیاه به ۹۰ میلی‌لیتر آب پپتونه[2] اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه مخلوط شد. سپس از سوسپانسیون حاصل رقت $\frac{1}{1000000}$ ساخته شد [۴].

۲-۲-۲ کشت سوسپانسیون نمونه‌های رقیق شده

در این مرحله، برای شمارش باکتری‌های مزوفیل هوازی از محیط پلیت کانت آگار[۳]، برای شناسایی و شمارش قارچ‌ها (کپک‌ها و مخمرها) از محیط کشت سابورا و دکستروز آگار[۴] همراه با آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل ۰/۵ درصد، به منظور بررسی وجود یا عدم وجود پسودوموناس از محیط کشت پسودوموناس آگار[۵] و جهت شمارش کلیفرم‌ها از محیط کشت وایولت ردبیل‌آگار[۶] استفاده شد. جهت شناسایی ای‌کلی (E.Coli) و کلبسیلا، آبگوشت لاکتوز ای‌سی (EC) با رقت 10^{-1} M تهیه و پس از اطمینان از مثبت بودن آن، محیط کشت اندو[۷] آگار به کار برده شد. برای شناسایی و شمارش باکتری‌های اسپوردار، از روش گرمایی یا شوک‌دار استفاده گردید [۴].

۲-۲-۳ روش کشت

کلیه‌ی آزمایش‌ها به صورت دوتایی انجام شد. به این صورت که در دو پلیت، ۱ میلی‌لیتر از رقت‌های تهیه شده $\frac{1}{10}$ تا $\frac{1}{1000000}$ ریخته شد و با محیط‌های کشت مورد نظر (PCA، SDA و VRB) به طور کامل مخلوط گردید. لازم به ذکر است که VRB آگار به صورت دو لایه تهیه شد. برای کشت باکتری‌های اسپوردار، لوله‌های حاوی رقت‌های مورد نظر به مدت ۱۰ دقیقه در آب ۸۰ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفته و سپس با محیط کشت PCA کشت داده شدند. پلیت‌های حاوی نمونه با محیط‌های کشت PCA و VRB در حمام آب گرم با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و با محیط کشت SDA در حمام آب گرم با دمای ۲۶ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت نگه‌داری و سپس شمارش شدند. برای کشت و شناسایی پسودوموناس، ۰/۱ میلی‌لیتر از رقت‌های مورد نظر به صورت پخش در سطح پلیت[۸] بر روی محیط کشت PSF آگار کشت داده شد و در محیط آزمایشگاه (۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد) نگه‌داری و تا یک هفته بررسی گردید [۴].

۲-۲-۴ استخراج اسانس روغنی

اسانس زیره‌ی سیاه به وسیله‌ی دستگاه کلونجر[۹] استخراج شد. برای این کار، ۵۰ گرم از دانه‌های پودر شده پس از افزودن ۷۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر، به مدت ۹۰ دقیقه در یک بالن یک لیتری جوشانده شد. سپس در قسمت نزولی دستگاه، فاز روغنی جدا گردید. اسانس حاصل در یخچال یا فریزر پایدار است.

۲-۲-۵ استخراج عصاره‌ی آبی دانه‌های زیره‌ی سیاه

برای استخراج عصاره‌ی آبی زیره‌ی سیاه، ۳۰ گرم از دانه‌های پودر شده با ۱۰۰ میلی‌لیتر مخلوط آب و متانول ۵۰٪ با دمای ۷۰-۸۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، مخلوط، و در دمای ۶۰°C به مدت ۲۴ ساعت در حمام آب گرم نگه‌داری شد. مخلوط حاصل با کاغذ صافی واتمن شماره ۴ صاف شد. عصاره‌ی فیلتر شده برای مصارف بعدی، لیوفلیزه گردید.

۲-۲-۶ تجزیه‌ی اسانس روغنی استخراج شده

ترکیبات اسانس‌های روغنی به وسیله‌ی دستگاه کروماتوگرافی گازی مدل 9-A-Shimadzu، مجهز به آشکارساز یونش شعله‌ای[۱۰]، جداسازی گردیدند. تجزیه‌ی نمونه‌ها با استفاده از نرم‌افزار Euro Chrom 2000 از KNAUER از طریق بهنجارسازی سطح و با استفاده از ستون سیلیکای مذاب DB-5 (۰/۰۲۵μm ضخامت فیلم، ۳۰m×۰/۲۵mm) و برنامه‌ی دمایی ۴۰-۲۵۰°C با نرخ ۴°C/min، دمای انژکتوری ۲۵۰°C، دمای آشکارساز ۲۶۵°C و گاز حامل هلیم (۹۹/۹۹٪) انجام گرفت.

دستگاه کروماتوگرافی گازی- طیف‌سنج جرمی[۱۱] (GC-MS) شامل کروماتوگرافی گازی مدل Varian-3400 همراه با آشکارساز مدل Saturn II ion trap بوده و ستون مورد استفاده، همانند ستون GC و در شرایط پیش‌گفته می‌باشد. اجزاء و ترکیبات نمونه‌ها با استفاده از روش طیف‌سنجی جرمی و مقایسه‌ی شاخص‌های بازداری آن‌ها با ترکیبات استاندارد شناسایی شدند.

۲-۲-۷ اندازه‌گیری میزان کل فلاوونوییدها در عصاره‌ی آبی زیره‌ی سیاه

برای اندازه‌گیری میزان کل فلاوونوییدها از روش دُود[۱۲] استفاده شد [۵]. به طور خلاصه در این روش، ۵ میلی‌لیتر از آلومینیم تری‌کلرید ($AlCl_3$) ۲ درصد با متانول هم حجم با عصاره‌ی آبی (۰/۱mg/ml) مخلوط گردید. پس از ۱۰ دقیقه، جذب محلول حاصله در طول موج ۴۱۵nm و در مقابل محلول شاهد که حاوی ۵ میلی‌لیتر عصاره‌ی زیره با ۵ میلی‌لیتر متانول بدون $AlCl_3$ بود، خوانده شد. سپس مقدار کل فلاوونوییدها با استفاده از منحنی استاندارد حاصل از کریستین[۱۳] (۰- ۱۰۰ mg/l)، مقایسه و به صورت میلی‌گرم هم ارز کریستین در هر گرم از عصاره‌ی آبی گزارش شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱ تجزیه‌ی میکروبی

در این‌جا، زیره‌ی سیاه به عنوان یک گیاه دارویی مورد بررسی قرار گرفت. بنابراین تمامی محاسبات بر اساس استاندارد گیاهان دارویی مورد استفاده در پژوهشکده‌ی کاربرد پرتوها انجام شد [۶]. برای بالا بردن دقت نتایج، آزمایش‌ها ۴ بار تکرار شدند (جداول ۱ و ۲).

جدول ۱ نشان‌دهنده‌ی محتوای میکروبی نمونه‌ی شاهد زیره‌ی سیاه در محیط‌های کشت مختلف و میانگین آن‌ها می‌باشد. تعداد کلنی‌ها با واحد ایجاد کلنی[۱۴] در یک گرم از نمونه سنجیده می‌شود که این میزان در نمونه‌ی زیره‌ی سیاه مورد آزمایش، بالا بوده و آلودگی میکروبی نسبتاً شدیدی را نشان می‌دهد. مثبت بودن محیط‌های کشت PSF، دلالت بر وجود پسودوموناس دارد. هم‌چنین مثبت بودن آبگوشت EC و شکل کلنی‌ها در محیط کشت اندو حاکی از حضور ای.کلی و کلبسیلا می‌باشد.

براساس اطلاعات جدول ۲ پس از پرتودهی تا دز ۱۰ کیلوگری، باکتری‌های اسپوردار کاملاً حذف و تعداد مزوفیل‌های هوازی، کلیفرم‌ها و قارچ‌ها به طور معنی‌داری کاهش یافته است ($p<0.05$). در این دز، پسودوموناس هم‌چنان پایداری نشان می‌دهد، اما با وجود مثبت بودن آبگوشت EC، آگار اندو منفی است که نشان‌دهنده‌ی حذف ای.کلی و کلبسیلا می‌باشد. علی‌رغم کاهش تعداد مزوفیل‌های هوازی، کلیفرم‌ها و قارچ‌ها، تعداد میکروارگانیسم‌ها هم‌چنان بیش از حد مطلوب می‌باشد [۴ و ۷].

جدول ۱- تعداد کلنی‌های موجود و میانگین آن‌ها در زیره‌ی سیاه پرتوندیده در محیط‌های کشت مختلف.

تکرار	میکروارگانیسم					محیط کشت	
	باکتری‌های مزوفیل هوازی	باکتری‌های اسپوردار	کپک‌ها و مخمرها	کلیفرم‌ها	پسودوموناس	آبگوشت EC	آندو
۱	$۱٫۲ \times ۱۰^{۸}$	$۴٫۰ \times ۱۰^{۶}$	$۷٫۰ \times ۱۰^{۵}$	$۴٫۴ \times ۱۰^{۶}$	+	+	+
۲	$۷٫۰ \times ۱۰^{۷}$	$۴٫۵ \times ۱۰^{۶}$	$۱٫۳ \times ۱۰^{۵}$	$۷٫۷ \times ۱۰^{۶}$	+	+	+
۳	$۹٫۸ \times ۱۰^{۷}$	$۱٫۰ \times ۱۰^{۶}$	$۳٫۱ \times ۱۰^{۵}$	$۲٫۴ \times ۱۰^{۷}$	+	+	+
۴	$۱٫۰ \times ۱۰^{۸}$	$۱٫۵ \times ۱۰^{۶}$	$۶٫۷ \times ۱۰^{۵}$	$۲٫۴ \times ۱۰^{۷}$	+	+	+
میانگین	$۹٫۷ \times ۱۰^{۷}$	$۲٫۸ \times ۱۰^{۶}$	$۴٫۵ \times ۱۰^{۵}$	$۱٫۵ \times ۱۰^{۷}$			

جدول ۲- تعداد کلنی‌های موجود و میانگین آن‌ها در نمونه پرتودیده‌ی زیره‌ی سیاه با دز ۱۰ کیلوگری، در محیط‌های مختلف کشت.

تکرار	میکروارگانیسم					محیط کشت	
	باکتری‌های مزوفیل هوازی	باکتری‌های اسپوردار	کپک‌ها و مخمرها	کلیفرم‌ها	پسودوموناس	آبگوشت EC	آندو
۱	$۳٫۶ \times ۱۰^{۳}$	۰	$۲٫۰ \times ۱۰^{۲}$	$۸٫۲ \times ۱۰^{۲}$	+	+	−
۲	$۴٫۰ \times ۱۰^{۳}$	۰	$۲٫۴ \times ۱۰^{۲}$	$۹٫۰ \times ۱۰^{۲}$	+	+	−
۳	$۳٫۸ \times ۱۰^{۳}$	۰	$۴٫۳ \times ۱۰^{۲}$	$۸٫۴ \times ۱۰^{۲}$	+	+	−
۴	$۴٫۱ \times ۱۰^{۳}$	۰	$۴٫۵ \times ۱۰^{۲}$	$۹٫۱ \times ۱۰^{۲}$	+	+	−
میانگین	$۳٫۹ \times ۱۰^{۳}$	۰	$۳٫۳ \times ۱۰^{۲}$	$۸٫۷ \times ۱۰^{۲}$			

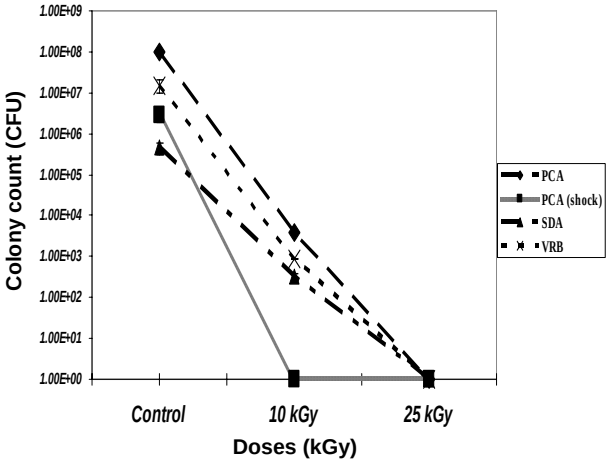
محیط‌های کشت محتوی نمونه‌های پرتودیده تا دز ۲۵ کیلوگری (دز استریل) کاملاً عاری از هر گونه میکروارگانیسم بودند (جدول ۳). این امر نشان‌دهنده‌ی توانایی این دز در از بین بردن کامل میکروارگانیسم‌ها می‌باشد. میانگین داده‌های مربوط به دزهای مختلف پرتو نیز به طور خلاصه در جدول ۳ و شکل ۱ نشان داده شده‌اند.

با توجه به این‌که مقاومت باکتری‌ها، مخمرها و کپک‌ها در مقابل پرتو متفاوت است، دز مورد نیاز برای از بین بردن آن‌ها نیز متفاوت است [۱]. نتایج این مطالعه نیز نشان می‌دهد که با توجه به میزان آلودگی اولیه‌ی محصول، در دز ۱۰ کیلوگری پاسخ میکروارگانیسم‌های مختلف متفاوت است و بیش‌ترین اثر پرتودهی در از بین بردن باکتری‌ها، در میان باکتری‌های اسپوردار مشاهده می‌گردد ($p<۰/۰۵$).

۳-۲ تعیین ارزش $D_{۱۰}$ برای میکروارگانیسم‌های مختلف در نمونه‌ی زیره‌ی سیاه

باکتری‌های آلوده‌کننده‌ی مواد غذایی از نظر سازه شناختی و فیزیولوژیکی بسیار متنوع‌اند و دز مورد نیاز برای از بین بردن انواع مختلف آن‌ها متفاوت است. شاخص مرگ باکتری‌ها، عدم توانایی آن‌ها در تشکیل کلنی در شرایط مناسب و در محیط مغذی است. بعضی از انواع باکتری‌های گیاهی به دلیل توانایی خاصشان در ترمیم DNA آسیب دیده، نسبتاً مقاوم بوده و دزهای پایین‌تر از دز کشنده فقط باعث جهش ژنتیکی در آن‌ها می‌شود [۱].

جدول ۴، دزهای مورد نیاز و مقدار $D_{۱۰}$ [۸] برای انواع مختلف میکروارگانیسم‌ها را نشان می‌دهد. کمیت $D_{۱۰}$ میزان دز مورد نیاز جهت کاهش جمعیت یک نوع خاص به ۱۰٪ مقدار اولیه‌ی آن (به اندازه یک سیکل لگاریتمی) است. مقدار آن برای مزوفیل‌های هوازی، اسپوردارها، قارچ‌ها و کلیفرم‌ها، در زیره‌ی سیاه، به ترتیب، ۲/۲۷، ۲/۵۱، ۳/۱۹ و ۲/۳۶ کیلوگری می‌باشد. هم‌چنین دز کمینه‌ی لازم برای رسانیدن آلودگی میکروبی به حد استاندارد (D) برای این باکتری‌ها، به ترتیب، ۱۱/۳۲، ۸/۶۵، ۱۱/۶۵ و ۱۴/۵۸ کیلوگری است. با در نظر گرفتن حد مطلوب آلودگی میکروبی و میزان آلودگی اولیه، برای کاهش این باکتری‌ها به حد مطلوب، به ترتیب، ۴/۹۹، ۳/۴۵، ۳/۵۶ و ۶/۱۸ سیکل لگاریتمی مورد نیاز است. بنابراین، با توجه به مقادیر D و $D_{۱۰}$، می‌توان نتیجه گرفت که برای رسیدن به استاندارد گیاهان دارویی، زیره‌ی سیاه مورد استفاده در این تحقیق دست کم باید تا دز ۱۴/۶ کیلوگری پرتودهی شود [۶، ۷، ۹ و ۱۰].



شکل ۱- میانگین تعداد کلنی در محیط‌های کشت مختلف برحسب میزان دز جذبی.

جدول ۳- میانگین تعداد کلنی‌های مزوفیل، اسپوردار، قارچ‌ها و کلیفرم‌ها همراه با انحراف معیار آن‌ها.

دز (کیلوگری)	PCA	PCA (SHOCKED)	SDA	VRB	PSF	آبگوشت EC	آندو
۰	$(۹/۷ \pm ۱)\times ۱۰^{۷}$	$(۲/۸ \pm ۰/۸)\times ۱۰^{۶}$	$(۴/۵ \pm ۱)\times ۱۰^{۵}$	$(۱/۵ \pm ۰/۵)\times ۱۰^{۷}$	+	+	+
۱۰	$(۳/۹ \pm ۰/۱)\times ۱۰^{۳}$	۰	$(۳/۳ \pm ۰/۶)\times ۱۰^{۲}$	$(۸/۰۷ \pm ۰/۰۲)\times ۱۰^{۲}$	+	+	−
۲۵	۰	۰	۰	۰	−	−	−

جدول ۴- مقادیر محاسبه شده‌ی $D_{۱۰}$ و D (برحسب کیلوگری) برای کاهش جمعیت برخی از میکروارگانیسم‌ها.

	PCA (مزوفیل‌های هوازی)	PCA (shocked) (اسپوردارها)	SDA (قارچ‌ها)	VRB (کلیفرم‌ها)
$D_{۱۰}$	۲/۲۷	۲/۵۱	۳/۱۹	۲/۳۶
D	۱۱/۳۲	۸/۶۵	۱۱/۶۵	۱۴/۵۸

۳-۳ تجزیه‌ی اسانس روغنی دانه‌های زیره‌ی سیاه پرتودیده و شاهد (پرتوندیده)

آنالیز GC و GC-MS نشان می‌دهد که از میان ۲۲ ترکیب شناخته شده در اسانس روغنی استخراج شده از دانه‌های زیره‌ی سیاه، سه جزء (Z)-β-Ocimene(۳۲٫۷٪)، γ-Terpinene(۲۲٫۰۳٪) و p-Cymene(۸٫۰۳٪) اجزای اصلی می‌باشند (جدول ۵). دیگر مطالعات در مناطق مختلف جهان نشان داده‌اند که (4S)-(+)-carvone (۵۰ تا ۷۰ درصد) و (+)-limonene (۲۵ تا ۳۰ درصد) از اجزاء اصلی اسانس روغنی دانه‌های زیره‌ی سیاه هستند. با توجه به این‌که عواملی نظیر شرایط آب و هوایی و زمان برداشت محصول، ترکیبات اسانس روغنی زیره را به شدت تحت تأثیر قرار می‌دهند [۱۱]، ترکیبات اسانس روغنی دانه‌های زیره‌ی سیاه ایرانی مورد استفاده در این تحقیق، با دیگر دانه‌های زیره‌ی سیاه متفاوت هستند. نتایج نشان می‌دهند که در ترکیبات اسانس روغنی استخراج شده از دانه‌های زیره‌ی سیاه پرتودیده تا دز ۱۰ و ۲۵ کیلوگری، تغییرات کمی ایجاد می‌گردد. جدول ۵ تفاوت ترکیبات زیره‌ی سیاه در قبل و در بعد از پرتودهی تا دزهای ۱۰ و ۲۵ کیلوگری را نشان می‌دهد. سایر مطالعات انجام شده در این زمینه نیز نشان داده‌اند که پرتودهی، ترکیبات شیمیایی اسانس‌های روغنی گیاهان دارویی را تغییر می‌دهد. به عنوان مثال linalool-(+/-) و alpha-terpineol در اسانس‌های روغنی استخراج شده از گیاهانی که تا دز ۱۰ و ۲۵ کیلوگری پرتودهی شده‌اند، کاهش می‌یابد [۱۲].

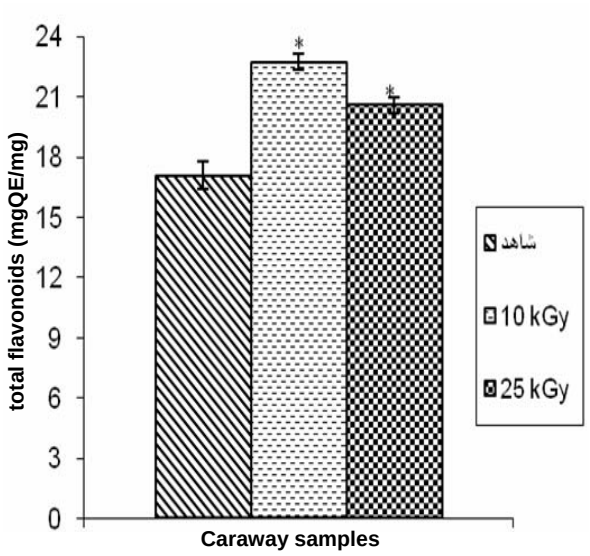
جدول ۵- اسانس‌های روغنی استخراج شده از دانه‌های زیره‌ی سیاه پرتودهی شده با تابش γ.

شماره	ترکیب	شاهد		۱۰kGy		۲۵kGy	
		RI	%	RI	%	RI	%
۱	$\alpha-Thujene$	۵٫۱	۰٫۳۱۶۱	۹۳۱٫۵۸۷۳	۰٫۰۳۰۷۱	۹۳۴٫۱۸۵۶	۰٫۳۰۵۴
۲	$\alpha-Pinene$	۵٫۲۸۸	۳٫۴۵۷۹	۹۸۳٫۶۲۲۲	۳٫۵۰۵۵	۹۴۱٫۰۹۱۴	۳٫۳۵۰۹
۳	Camphene	۵٫۶۷۱	۰٫۱۵۳۹	۹۵۲٫۰۶۳۱	۰٫۱۷۱۲	۹۵۴٫۴۶۶۸	۰٫۲۰۵۷
۴	Sabinene	۶٫۳۳۶	۰٫۶۸۶	۹۷۳٫۶۸۷۷	۰٫۷۶۷۸	۹۷۵٫۷۴۵۷	۰٫۶۲۲۳
۵	$\beta-Pinene$	۶٫۴۵۸	۴٫۷۲۹	۹۷۷٫۱۵۵۳	۴٫۸۳۲۷	۹۷۹٫۱۱۷۴	۴٫۶۵۷۳
۶	Myrcene	۶٫۸۳۶	۱٫۸۱۱	۹۸۸٫۱۲۹۹	۱٫۷۸۸۷	۹۸۹٫۹۸۳۱	۱٫۶۹۶۹
۷	P-Cymene	۷٫۹۶۸	۸٫۰۳۲۷	۱۰۱۷٫۵۹۷	۸٫۶۸۲۵	۱۰۱۸٫۸۲۳	۴٫۷۱۴
۸	Limonene	۸٫۱۲۷	۵٫۸۶۵۸	۱۰۲۱٫۲۸۶	۶٫۱۳۳۸	۱۰۲۲٫۶۵۸	۵٫۶۷۳۵
۹	$(Z)-\beta-Ocimene$	۸٫۵۰۷	۳۲٫۷۲۳۷	۱۰۲۹٫۹۱۶	۳۲٫۴۶۴۶	۱۰۳۱٫۲۷۲	۳۳٫۰۶۱۳
۱۰	$(E)-\beta-Ocimene$	۸٫۷۹۵	۱٫۳۰۰۴	۱۰۳۶٫۶۶۸	۱٫۲۶۷۸	۱۰۳۷٫۸۶۹	۱٫۳۱۱۷
۱۱	$\gamma-Terpinene$	۹٫۲۷	۲۲٫۰۳۰۵	۱۰۴۶٫۵۴۶	۲۱٫۸۵۲۹	۱۰۴۷٫۷۹	۲۴٫۲۱۷۶
۱۲	P-Mentha,2,4-diene	۱۰٫۳۲۵	۴٫۰۲۳۶	۱۰۶۷٫۵۴	۳٫۹۳۹۱	۱۰۶۸٫۶۱۷	۴٫۳۴۰۲
۱۳	Linalool	۱۰٫۷۸۳	۰٫۹۸۶۹	۱۰۷۵٫۹۴۳	۱٫۰۵۸۹	۱۰۷۶٫۸۵	۱٫۱۳۵۴
۱۴	exo-Fenchol	۱۱٫۳۲۲	۰٫۴۹۱۲	۱۱۰۷٫۰۴۴	۰٫۵۱۹۴	۱۱۰۸٫۳۳۸	۰٫۵۴.۳
۱۵	neo-allo-Ocimen	۱۱٫۹۶۹	۱٫۰۹۲۳	۱۱۲۳٫۷۹۶	۱٫۱۱۱۳	۱۱۲۱٫۸۷۶	۱٫۲۷۸۶
۱۶	P-Cymene-B-ol	۱۴٫۳۶۳	۰٫۳۰۹۶	۱۱۷۸٫۵۲	۰٫۳۰۸۳	۱۱۸۶٫۴۳۵	۰٫۴۲۹۱
۱۷	Cumin aldehyde	۱۶٫۸۱۲	۵٫۶۷۳۳	۱۲۲۵٫۳۷۴	۵٫۳۱۵۳	۱۲۲۸٫۴۳۹	۰٫۴۱۴۱
۱۸	$\alpha-Terpinene-7-al$	۱۸٫۷۴	۰٫۸۳۷۷	۱۲۵۸٫۱۲۹	۰٫۸۱۶۶	۱۲۶۰٫۷۹۸	۰٫۱۸۱۷
۱۹	$\gamma-Terpinene-7-al$	۱۹٫۰۷۱	۲٫۱۲۲۶	۱۲۶۳٫۲۷۱	۱٫۸۱۳۱	۱۴۰۳٫۷۰۲	۰٫۳۵۴۵
۲۰	Cuminyl acetate	۲۴٫۹۸	۰٫۲۲۴۷	۱۴٫۶.۱۰۳	۰٫۲۳۵۵	۱۴۱۶٫۰۸۲	۰٫۱۵۵۳
۲۱	$\beta-Selinene$	۲۹٫۲۱۴	۰٫۵۰۱۳	۱۴۸۱٫۸۲۴	۰٫۳۳۸۳	۱۴۸۱٫۸۰۸	۰٫۵۳۷۸
۲۲	Myristicin	۳۰٫۶۸۶	۰٫۱۲۸	۱۵۳۴٫۱۸۴	۰٫۱۸۲۳	۱۵۳۴٫۰۳۵	۰٫۲۶۷۱

RI: Retention Index

۳-۴ تأثیر پرتوگاما بر میزان کل فلاوونوییدها در زیره‌ی سیاه

شکل ۲ میزان کل فلاوونوییدها را بر اساس منحنی استاندارد کریستین نشان می‌دهد. میزان کل فلاوونوییدهای نمونه‌های زیره‌ی سیاه معادل ۱۷mg کریستین در هر گرم عصاره‌ی آبی است که پس از پرتودهی تا دزهای ۱۰ و ۲۵ کیلوگری، به طور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) افزایش یافته است. دیگر مطالعات نیز این نتایج را تأیید می‌کنند. به عنوان مثال میزان فلاوونوییدهای مرکبات بعد از پرتودهی تا دز ۰/۳ کیلوگری به طور قابل‌ملاحظه‌ای افزایش می‌یابند [۱۳]، که علت آن احتمالاً پاره شدن غشای سلولی و آزاد شدن فلاوونوییدها می‌باشد. از طرف دیگر رادیکال‌های آزاد تولید شده در طول پرتودهی به عنوان سیگنال‌های استرس عمل کرده و منجر به ایجاد پاسخ‌های استرسی در مواد غذایی و در نهایت سنتز آنتی اکسیدان‌ها می‌گردد [۱۴]. در مقابل بعضی از مطالعات نیز حاکی از عدم تغییر میزان فلاوونوییدها در اثر پرتودهی هستند. یک بررسی نشان داده است که پرتودهی با گاما تا دزهای ۱۰، ۲۰ و ۳۰ کیلوگری هیچ تأثیری بر روی میزان فلاوونوییدهای بعضی از انواع گیاهان دارویی از جمله شاهی‌آبی، رزماری، ریحان و کنگرفرنگی ندارد [۱۵]. به نظر می‌رسد که این تناقض در تأثیر پرتو بر روی میزان فلاوونوییدها به دلیل تفاوت در میزان از دست رفتن فلاوونوییدها در پس از پرتودهی، در دمای پرتودهی و نیز در نوع فلاوونوییدها می‌باشد.



شکل ۲- میزان تأثیر پرتو گاما بر میزان کل فلاوونوییدهای زیره‌ی سیاه.

۴- نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهند که پرتودهی زیره‌ی سیاه در دز مجاز ۱۰ کیلوگری برای کاهش تعداد میکروارگانیسم‌ها تا حد استاندارد کافی نبوده و جهت رسیدن به حد مطلوب، نمونه‌های زیره‌ی سیاه بایستی تا دز ۱۴/۶ کیلوگری پرتودهی شوند. پرتودهی زیره‌ی سیاه تا حد دز استریل (۲۵ کیلوگری) نشان داد که این دز ضمن از بین بردن بار میکروبی زیره‌ی سیاه، هیچ‌گونه اثر سوء در مواد مؤثر آن ندارد. لذا می‌توان نتیجه گرفت که با توجه به شرایط مختلف کاشت، برداشت و نگه‌داری زیره‌ی سیاه و آلودگی‌های متنوع این گیاه دارویی، پرتودهی آن تا حد دز استریل (۲۵ کیلوگری) برای از بین بردن کامل آلودگی‌ها می‌تواند بلامانع باشد.

تشکر و قدردانی

از کلیه‌ی همکاران گرامی پژوهشکده‌ی کاربرد پرتوها، سرکار خانم‌ها فائزه فاطمی، رامسینا بت عیشو، مونا سرابی، سارا شیخ نصیری، سیده لیلا حسینی و جناب آقای امیر شامی که ما را در انجام این پروژه یاری رساندند کمال تشکر و سپاسگذاری را داریم.

پی‌نوشت‌ها:

۱- Carvone
۲- PW: Peptone Water
۳- PCA: Plate Count Agar
۴- SDA: Sabouraud Dextrose Agar
۵- PAF: Pseudomonas Agar F
۶- VRBA: Violet Red Bile Agar
۷- Endo
۸- Spread Plate
۹- Clevenger
۱۰- Flame Ionization Detector
۱۱- GCMS: Gas Chromatography-Mass Spectrometer
۱۲- Dowd
۱۳- QE: Quercetin
۱۴- CFU: Colony Forming Unit

References:

1. H. Khalafi, M. Ghanadi Maragheh, F. Fatemi, "Food irradiation: principle and application," (2008).

2. S.N. Mahindru, "Food preservation and irradiation," New Delhi (2005).

3. C.C.C.R. De Carvalho, M.M.R. Da Fonseca, "Carvone: Why and how should one bother to produce this terpene," Food Chemistry, 95, 413-422 (2006).

4. ن. رحیمی‌فرد و ط. تیمورزادگان، "راهنمای سریع کنترل میکروبیولوژی مواد غذایی، آشامیدنی، آرایشی بهداشتی،" (۱۳۶۸).

5. A. Arvouet-Grand, B. Vennat, A. Pourrat, P. Legret, "Standardisation d-un extrait de propolis et identification des principaux constituants. Journal de Pharmacie de Belgique," 49, 462-468 (1994).

6. استاندارد داخلی تدوین شده توسط کارشناسان آزمایشگاه میکروبیولوژی پژوهشکده کاربرد پرتوها (۱۳۷۲).

7. مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران "حد مجاز آلودگی‌های فرآورده‌های پف کرده بلغور و آرد ذرت،" شماره ۲۹۶۸، چاپ دوم، (خردادماه ۱۳۷۳).

8. http: //books.google.com: the microbiological safety and quality of food. P. 6 (1999).

9. "آماده کردن نمونه‌های مواد غذایی و شمارش میکروارگانیسم‌های مختلف،" مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، شماره ۳۵۶ (۱۳۷۵).

10. J.M. Jay, "Modern food microbiology," Forth Edition, 300 (1999).

11. G. Chryssavgi, P. Vassiliki, M. Athanasios, T. Kibouris, M. Komaitis, "Essential oil composition of Pistacia lentiscus L. and Myrtus communis L: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts," Food Chemistry, 107, 1120–1130 (2008).

12. O. Sjövall, E. Honkanen, H. Kallio, K. Latva-Kala, A.M. Sjöberg, "The effects of gamma-irradiation on some pure aroma compounds of spices," Z Lebensm Unters Forsch, 191(3), 181-3 (1990).

13. H. Oufedjikh, M. Mahrouz, M.J. Amiot, M. Lacroix, "Effect of gamma-irradiation on phenolic compounds and phenylalanine ammonia-lyase activity during storage in relation to peel injury from peel of Citrus clementina hort. Ex. Tanaka," Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48, 559–565 (2000).

14. X. Fan, P.M.A. Toivonen, K.T. Rajkowski, K.J.B. Sokorai, "Warm water treatment in combination with modified atmosphere packaging reduces undesirable effects of irradiation on the quality of fresh-cut iceberg lettuce," Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 1231–1236 (2003).

15. P.M. Koseki, A.L.C.H. Villavicencio, M.S. Brito, L.C. Nahme, I.S. Katia Relaa, L.B. Almeida-Muradianb, J. Mancini-Filhob, P.C.D. Freitas, "Effects of irradiation in medicinal and eatable herbs," Radiation Physics and Chemistry, 63, 681–684 (2002).