بررسی اثر ضد میکروبی اسانس آویشن شیرازی بر منحنی رشد و تولید شیگا توکسین ۲ باکتری اشرشیا کلی O157: H7

مریم عطائی[۱]، افشین آخوندزاده بستی[۲]*، تقی زهرایی صالحی[۳]، هدایت حسینی[٤]، حسن گندمی نصرآبادی[٥]، نگین نوری[٥]، علی خنجری[٥]، علی طاهری میر قائد[٦]، فاطمه محمدخان[۷]، پیمان فقیه فرد[۸]

۱- دستیار تخصصی بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۲- استاد، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۳- استاد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
٤- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه و صنایع غذایی کشور، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
٥- استادیار، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
٦- استادیار، گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۷- دانشجوی دکترای عمومی، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۸- عضو هیأت علمی دانشگاه علوم انتظامی، تهران، ایران
*آدرس مکاتبه: تهران، خیابان آزادی، خیابان دکتر قریب، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، کدپستی: ۱٤۱۹۹-٦۳۱۱۱، تلفن: ٦٦۹۲۳٥۱۰ (۰۲۱)، نمابر: ٦٦۹۳۳۲۲۲ (۰۲۱)
پست الکترونیک: aakhond@ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۰/٦ **تاریخ تصویب:** ۹۲/٤/۱٥

چکیده

مقدمه: بررسی اثرات ضدمیکروبی گیاه آویشن شیرازی که از گیاهان دارویی در طب سنتی ایرانی بوده بر باکتری‌های بیماریزای مواد غذایی مانند اشرشیاکلی O_{157}: H_7 که مسئول شیوع بیماری‌های غذا زاد و عامل ایجاد هموراژیک کولیت و سندرم همولیتیک اورمیک (HUS) می‌باشد ضروری به نظر می‌رسد.

هدف: بررسی اثر اسانس آویشن شیرازی بر رشد و تولید شیگا توکسین ۲ اشرشیاکلی O_{157}: H_7 می‌باشد.

روش بررسی: حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) و حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC) اسانس آویشن شیرازی برای اشرشیاکلی O_{157}: H_7 به روش براث ماکرودایلوشن، تأثیر غلظت‌های تحت بازدارنده اسانس، بر منحنی رشد باکتری طی ۲٤ ساعت توسط دستگاه اسپکتروفوتومتری و تولید شیگاتوکسین ۲ با استفاده از کیت تعیین شد.

نتایج: در این مطالعه میزان MIC و MBC اسانس آویشن شیرازی برای باکتری مورد مطالعه به ترتیب ۰/۰٤ و ۰/۰٦ درصد به دست آمد. مقادیر OD_{600} طی ۲٤ ساعت مجاورت باکتری با غلظت MIC و غلظت‌های تحت بازدارنده اسانس در دو دما نشان دهنده تأثیر معنی‌دار ($p<0/05$) آن غلظت‌ها بر رشد باکتری *E. coli* O157:H7، بوده و مجاورت باکتری با غلظت‌های مختلف اسانس در دما ۳٥ درجه سانتی‌گراد باعث کاهش تولید شیگاتوکسین ۲ شده و افزایش غلظت اسانس تا ۰/۰۲ درصد (معادل ٥۰ درصد MIC) در این دما اثر بازدارندگی بر تولید شیگاتوکسین ۲ در این سویه باکتریایی می‌گذارد.

نتیجه‌گیری: می‌توان از این اسانس در غلظت بازدارنده رشد جهت جلوگیری از رشد *E. coli* O157: H7 و در غلظت‌های تحت بازدارنده جهت جلوگیری از تولید شیگا توکسین آن در صنایع غذایی استفاده نمود.

گل‌واژگان: آویشن شیرازی، اشرشیاکلی O_{157}: H_7، شیگاتوکسین ۲

مقدمه

بیماری‌های منتقله از راه غذا معضل اصلی سلامت و بهداشت عمومی محسوب می‌شوند که سالانه میلیون‌ها نفر از جمعیت جهان بدان مبتلا و بخشی نیز دچار مرگ و بستری شدن در بیمارستان‌ها می‌شوند. انتروهموراژیک اشرشیاکلی (Enterohemorrhagic E. coli) (EHEC) O_{157}: H_7 به عنوان اشرشیاکلی تولید کننده شیگا توکسین ۲ (Shiga Toxin producing Escherichia coli) (STEC) هم شناخته شده است. این سویهٔ باکتریایی مسئول شیوع بیماری‌های غذا زاد و اسهال‌های تک گیر است. مواجهه با STEC در برخی بیمارها بدلیل ایجاد کولیت هموراژیک وسندرم همولیتیک اورمیک (HUS) منجر به مرگ می‌شود. اکثریت طغیان‌های نسبت داده شده به *E. coli* O_{157}: H_7 از طریق آب و غذا بوده است. شیگا توکسین از سموم باکتریایی بسیار قوی است که از سنتز پروتئین در سلول‌های یوکاریوتی ممانعت می‌کند و در ایجاد کولیت هموراژیک و سندرم همولیتیک اورمیک نقش دارد. STEC شیگا توکسین ۱ و ۲ را تولید می‌کند که هر کدام دارای دو زیر واحد A و B هستند. شیگا توکسین ۲ و ۱ از بیماران مبتلا به کولیت هموراژیک جدا شده است ولی شیگا توکسین ۲ فراوانی بیشتری در بیماری‌های انسانی دارد [۱].

Zataria multiflora (آویشن شیرازی) گیاهی دارای کاربرد ادویه‌ای متعلق به خانواده *Laminaceae* است که از نظر جغرافیایی بومی ایران، پاکستان و افغانستان می‌باشد [۲]. این گیاه تحت عنوان آویشن شیرازی به عنوان طعم‌دهنده در بسیاری از مواد غذایی در ایران به کار رفته و واجد تأثیرات ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی می‌باشد [۳]. فعالیت ضدمیکروبی گونه‌های مختلف گیاه آویشن مربوط به وجود ترکیبات فنولیک آن مانند تیمول، کارواکرول [٤، ۳] و گاما – ترپینن می‌باشد [٤]. طبق نتایج مطالعهٔ ساعی‌دهکردی و همکاران، باکتری‌های گرم منفی مقاوم‌ترین و مخمرها حساس‌ترین میکروارگانیسم‌ها در برابر فعالیت ضدمیکروبی آویشن شیرازی هستند و باکتری‌های گرم مثبت حساسیت متوسطی نسبت به آن نشان داده‌اند [۵]. مطالعات اندکی در مورد تأثیر اسانس آویشن شیرازی در جلوگیری از توکسین‌زایی باکتری‌های مهم مواد غذایی انجام شده است. به عنوان مثال پارسایی‌مهر و همکاران (۲۰۰۹) اثر غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی و نیسین را به تنهایی و در ترکیب با یکدیگر بر روی تولید آلفا_همولیزین و انتروتوکسین C باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در محیط کشت آزمایشگاهی بررسی کردند [٦].

تمایل به استفاده از مواد ضدمیکروبی طبیعی، گیاهان دارویی و ادویه‌ها که جزو طعم‌دهنده‌ها و افزودنی‌های غذایی سنتی نیز به شمار می‌روند در حال افزایش است [۲]. هدف از انجام این مطالعه تعیین حداقل غلظت مهاری و کشنده اسانس آویشن شیرازی بر باکتری اشرشیاکلی تولیدکنندهٔ شیگاتوکسین و همچنین رسم منحنی رشد آن در حضور غلظت‌های بازدارنده و تحت بازدارنده و در نهایت تعیین تأثیر این غلظت‌ها بر تولید شیگاتوکسین ۲ توسط این سویه باکتریایی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری اسانس و شناسایی ترکیبات

گیاه آویشن شیرازی در فصل تابستان از استان فارس جمع‌آوری شد و پس از تأیید نام علمی، نمونه هرباریومی به شماره F_1_8_4_21 توسط گیاه‌شناسان پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی تهران تهیه شد. اسانس از سرشاخه‌های هوایی خشک شده گیاه به روش تقطیر با آب تهیه شد و توسط دستگاه گاز کروماتوگراف متصل به طیف نگارجرمی GC/MS (Gas chromatography- Mass spectrometry) اجزای عمده آن مشخص شد. دستگاه مورد استفاده از نوع Thermoquest finnigan با ستون مویینه به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۲۵۰ میکرومتر و ضخامت لایه داخلی ۰/۲۵ میکرومتر با برنامه دمایی ۵۰ تا ۲٦۵ درجه سانتی‌گراد با افزایش تدریجی ۲/۵ درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه و نگهداری ستون در ۲٦۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه بود. دمای محفظه تزریق ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد، سرعت گاز هلیم ۱/۵ میلی‌لیتر در دقیقه، انرژی یونیزاسیون 70EI شناساگر الکترون ولت و دمای

منبع یونیزاسیون ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد بود [٦].

تهیه مایه تلقیح باکتری اشرشیاکلی $O_{157}:H_7$

باکتری لیوفیلیزه *E. coli ATCC 35218 O157: H7* را در لوله‌های حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت آبگوشت (BHI) در ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ – ١٦ ساعت حداقل دو مرتبه به طور متوالی در دما و مدت زمان مذکور کشت داده شده، سپس از کشت دوم به نسبت ۱ به ۵ با گلیسرین استریل مخلوط و در حجم‌های ۵۰۰ میکرولیتری در میکروتیوب‌های اپندورف در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شده و برای هر آزمایش از این کشت‌های نگهداری شده در ۲۰- درجه سانتی‌گراد استفاده می‌شود و از این کشت دوم برای تحقیق استفاده شد [۷].

جهت تهیه مایه تلقیح یک کلنی تک از *Escherichia coli O157: H7* در آبگوشت BHI در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شبانه‌روز کشت داده می‌شود و تا رسیدن به غلظت مناسب تلقیح (۱×۱۰^{۷} cfu/ml) گرمخانه‌گذاری می‌شود. غلظت آبگوشت *Escherichia coli O157: H7* در یک کوت استریل ۱۰۰ × ۱۳ میلی‌متر تا رسیدن به دانسیته نوری (OD) معادل ۰/۱ در ٦۰۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر تنظیم می‌شود. این OD معادل غلظت سلولی ۳×۱۰^{۸} میلی‌لیتر باکتری *Escherichia coli O157: H7* می‌باشد. تعداد سلول‌ها با پلیت‌گذاری دوبل از سریال رقت‌ها در آگار BHI و شمارش کلنی‌ها بعد از ٢٤ ساعت گرمخانه‌گذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد تعیین می‌شود.

تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد MIC به روش ماکرودایلوشن

روش ماکرودایلوشن، روش تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد در محیط کشت در لوله‌های آزمایش می‌باشد. اساس این روش بر پایه‌ی مهار رشد باکتری توسط ماده مورد آزمایش می‌باشد به طوری که بعد از اتمام دوره گرمخانه‌گذاری هیچ کدورت قابل مشاهده‌ای در لوله‌های مورد نظر وجود نداشته باشد.

در این روش غلظت‌های متوالی ماده مورد نظر در ۲ میلی‌لیتر محیط کشت تهیه شد و باکتری مورد مطالعه هم تلقیح شد و لوله‌ها به مدت ٢٤ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. اولین لوله‌ی شفاف نماینده حداقل غلظت بازدارنده‌ی رشد بود. غلظت‌های مورد استفاده اسانس آویشن شیرازی (صفر، ۰/۰۰۵، ۰/۰۱، ۰/۰۲، ۰/۰٤،۰/۰٦ درصد) و در نهایت ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی با غلظت نهایی در هر لوله ۱×۱۰^{٦} cfu/ml به لوله‌ها منتقل شد و تعداد دقیق باکتری تلقیح شده از طریق کشت باکتری و شمارش تعداد پرگنه‌ها محاسبه شد. سپس همه لوله‌ها به مدت ٢٤ ساعت در ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شده و کدورت یا عدم کدورت در لوله‌ها مشاهده و MIC تعیین شد. در این روش به ازاء هر حالت ذکر شده ۲ لوله مورد استفاده قرار گرفت و کل آزمایش دو بار تکرارشد. در این مطالعه MIC اسانس مورد ارزیابی قرار گرفت.

سوبسترای آبگوشت کنترل و آبگوشت حاوی اسانس

محیط تهیه و جهت حفظ پایداری امولسیون روغن / آب در آبگوشت ۵ درصد (حجمی – حجمی) دی متیل سولفوکساید به عنوان امولسیفایر ۰/۰۵ درصد (وزنی–حجمی) آگار – آگار به عنوان پایدار کننده به سوبسترای آبگوشت اضافه می‌شود. پس از تنظیم حجم نهایی آبگوشت با آب مقطر محتوای هر ارلن (فلاسک) در ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه استریل خواهد شد. اسانس آویشن شیرازی در غلظت‌های مختلف (۰/۰٤، ۰/۰۳، ۰/۰۲، ۰/۰۱، ۰) که به ترتیب معادل MIC، ۷۵، ۵۰، ۲۵ درصد و کنترل می‌باشند به آن اضافه می‌شود [۷].

تلقیح باکتری به سوبسترای آبگوشت استریل شده حاوی اسانس و گرمخانه‌گذاری

در نهایت رقت تهیه شده با غلظت مناسب تلقیح (۱×۱۰^{۷} cfu/ml) از کشت اشرشیاکلی O157: H7 ($OD_{nm٦۰۰}$=۰/۱) به محیط آبگوشت BHI حاوی غلظت‌های

مختلف اسانس تلقیح شده و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت گرمخانه‌گذاری می‌شود.

بررسی اثر غلظت‌های تحت بازدارنده اسانس بر تولید شیگاتوکسین ۲ *Escherchia coli* O157: H7

این آزمون به روش آگلا تیناسیون غیرفعال معکوس انجام شده است. سوسپانسیون باکتریایی تهیه شده از غلظت‌های بازدارنده و تحت بازدارنده اسانس که در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شده بودند با دور ٤٠٠٠ rpm به مدت ۲۰ دقیقه در ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. حضور و یا عدم حضور شیگاتوکسین در مایع رویی توسط کیت VTEC_RPLA مشخص شد.

بررسی اثر غلظت‌های بازدارنده و تحت بازدارنده اسانس روی رشد باکتری *Escherchia coli* O157: H7 در دو دمای ۲۵ و ۳۵ درجه سانتی گراد

همچنین بررسی اثر غلظت‌های بازدارنده و تحت بازدارنده اسانس آویشن شیرازی روی رشد باکتری اشرشیاکلی در دو دمای ۲۵ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد در طی ٢٤ ساعت با روش اسپکتوفتومری مورد ارزیابی قرار گرفت.

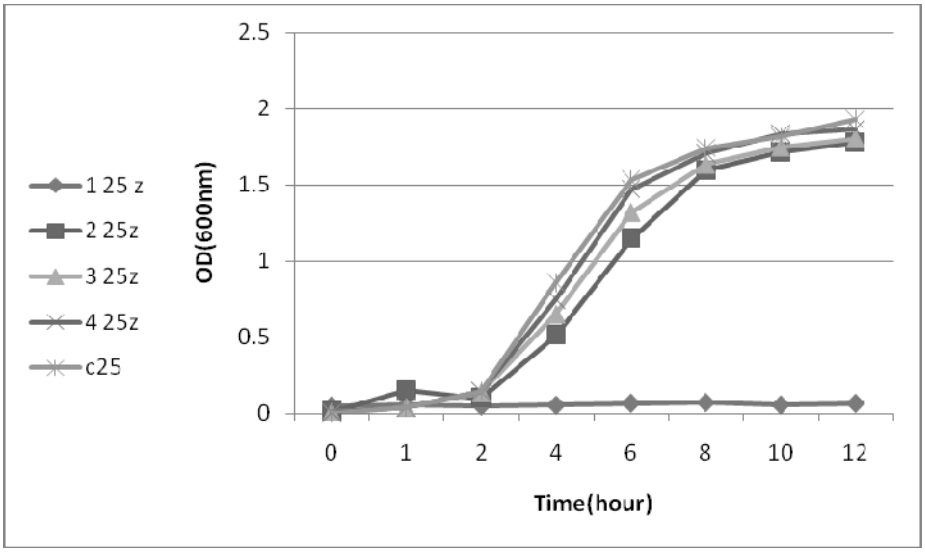
نتایج

بازده اسانس بخش‌های هوایی خشک شده گیاه آویشن شیرازی معادل ١/٦٦ درصد (حجمی/وزنی) بود. درصد ترکیبات اسانس (که توسط GC و GC/MS تعیین شد) در جدول شماره ۱ خلاصه شده است بیانگر این است که ترکیب اصلی این اسانس کارواکرول (۱۲/۷۱ درصد) است [٦].

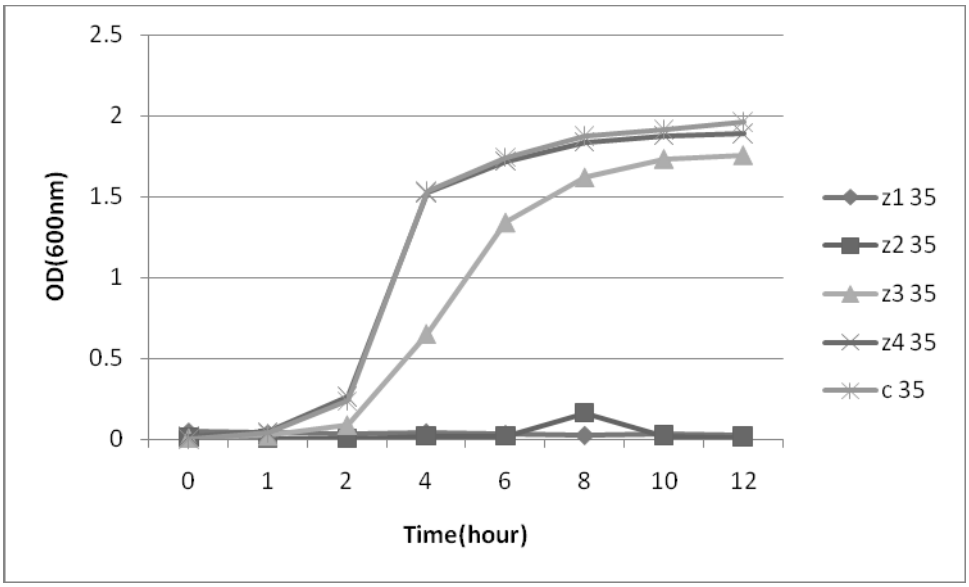
جدول شماره ۱- اجزای تشکیل‌دهنده اسانس آویشن شیرازی که به روش GC/MS تشخیص داده شده است

ترکیب	شاخص احتباس بر روی ستون DB5	شاخص کواتس KI	مقدار (درصد)
Thujene	۹۳۰	۹۳۱	۰/۱۹
Alpha-Pinene	۹۳۷	۹۳۹	٤/٢٦
Beta-Pinene	۹۷٦	۹۸۰	۰/٤۳
Beta-Myrcene	۹۸۵	۹۹۱	۰/۸۵
Eucaliptol	۱۰۲٤	۱۰۳۳	۳/۳۷
Gamma-Terpinene	۱۰۵۵	۱۰٦۰	۷/۳٤
Linalool	۱۰۹۰	۱۱۰٦	۰/٦۳
Thymol methyl ether	۱۲۳٦	۱۲۳۵	۰/٤۷
Carvacrol methyl ether	۱۲٤۳	۱۲٤۵	۰/٤٦
Carvacrol	۱۲۹۹	۱۳۱۸	۷۱/۱۲
Trans-Caryophyllene	۱٤۱۸	۱٤۲۳	۰/٤۱
Globulol	۱۵۸۲	۱۵۷٦	۲/۳۲
مجموع	-		۹۱/۹۰

نتایج تست MIC و MBC اسانس آویشن شیرازی که در دامنه ۰/۰۰۵ تا ۰/۰۶ درصد در ۳۵ درجه سانتی‌گراد مورد ارزیابی قرار گرفت برای اشرشیا کلی O157:H7 به ترتیب ۰/۰۴ و ۰/۰۶ درصد به دست آمد. منحنی رشد باکتری در مجاورت با غلظت‌های MIC و تحت MIC در دو دمای ۲۵ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد در نمودارهای شماره ۱ و ۲ آورده شده است. اسانس در غلظت‌های ۲۵ درصد MIC تأثیر بازدارندگی قابل توجهی بر رشد و تکثیر باکتری ندارد اما در MIC و ۷۵ و ۵۰ درصد به میزان قابل ملاحظه‌ای از رشد باکتری جلوگیری نمود.



نمودار شماره ۱ – منحنی رشد باکتری در مجاورت با غلظت‌های MIC و تحت MIC در دمای ۲۵ °C Z1:0.04, Z2:0.03, Z3:0.02, Z4:0.01, C:0 غلظت‌های اسانس آویشن شیرازی بر حسب درصد



نمودار شماره ۲ – منحنی رشد باکتری در مجاورت با غلظت‌های MIC و تحت MIC در دمای ۳۵ °C غلظت‌های اسانس آویشن شیرازی بر حسب درصد Z1:0.04, Z2:0.03, Z3:0.02, Z4:0.01, C:0

نتایج تولید شیگاتوکسین ۲ در محیط BHI در مجاورت غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی در جدول شماره ۲ آورده شده است. نتایج نشان می‌دهد که مجاورت باکتری با اسانس در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد باعث کاهش تولید شیگاتوکسین ۲ شده و با افزایش غلظت اسانس به میزان ۵۰ درصد MIC از رقت ۱ تا ٦٤/١ عدم تولید شیگا توکسین ۲ مشاهده می‌شود. اسانس آویشن شیرازی در غلظت 25% MIC هیچ‌گونه اثر بازدارندگی بر تولید شیگا توکسین ۲ نداشت.

بحث

انتروهموراژیک اشریشیاکلی (EHEC) یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای خطرناک که حتی می‌تواند باعث مرگ و میر بالا هنگام اپیدمی‌های ناشی از مصرف غذاهای آلوده شود، معرفی شده است. تولید سیتوتوکسین‌هایی موسوم به سموم شیگا (Shiga toxin) از ویژگی‌های بارز این گروه از باکتری‌هاست. از سوی دیگر اسانس‌های گیاهی از مدت‌ها قبل به عنوان ترکیبات طعم‌دهنده در مواد غذایی و نوشیدنی مورد استفاده قرار می‌گیرند و امروزه به علت دارا بودن ترکیبات ضدمیکروبی مختلف به عنوان نگهدارنده‌های طبیعی مورد توجه قرار گرفته‌اند [۸،۹]. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که اثر اسانس آویشن شیرازی بر رشد و تکثیر باکتری مورد مطالعه از الگوی وابسته به دوز پیروی می‌نماید. با ملاحظه نمودار شماره ۱ و ۲ جدول شماره ۲ چنین نتیجه گرفته می‌شود که افزایش درجه حرارت تا حدودی باعث افزایش اثر اسانس بر رشد باکتری می‌شود، همچنین افزایش غلظت اسانس تا ۵۰ درصد MIC تأثیر معنی‌داری ($p< ۰/۰۵$) بر تولید شیگاتوکسین ۲ تولید شده توسط این سویه باکتری دارد. نظر به ارتقای آگاهی و نیز نگرانی مصرف‌کنندگان در مورد استفاده از ترکیبات نگهدارنده و افزودنی‌های مصنوعی، در سال‌های اخیر گرایش به استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی در حال افزایش است، لذا تحقیقات متعددی در رابطه با بررسی تأثیر اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی مختلف بر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای مهم با منشای غذایی انجام گرفته است [۱۰].

جدول شماره ۲ – نتایج تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس بر تولید شیگا توکسین ۲

غلظت اسانس / رقت توکسین	Z: 0.04	Z: 0.03	Z: 0.02	Z: 0.01	Z: 0	CVT2
۱	-	-	-	++	+++	+++
۱/۲	-	-	-	++	++	+++
۱/٤	-	-	-	+	+	+++
۱/۸	-	-	-	+/-	+/-	+++
۱/۱٦	-	-	-	-	-	+++
۱/۳۲	-	-	-	-	-	+++
۱/٦٤	-	-	-	-	-	-

CVT2: کنترل مثبت شیگا توکسین ۲

z: غلظت‌های اسانس آویشن شیرازی بر حسب درصد

رهنما و همکاران (۱۳۸۷) اثرات ضد میکروبی اسانس گیاه آویشن شیرازی و نایسین به تنهایی و ترکیبی با یکدیگر بر علیه لیستریا مونوسیتوژن در آبگوشت قلب - مغز مورد بررسی قرار دادند. نتایج تحقیقات ایشان نشان داد که اسانس آویشن شیرازی به تنهایی دارای اثرات ضدمیکروبی بر لیستریامونوسیتوژن بود (MIC: ۹/۵ MBC: ۱۹ میکروگرم در میلی‌لیتر) اثر متقابل اسانس آویشن شیرازی و نایسین سبب کاهش MIC وMBC شد: (MIC: ۲/۱ MBC: ٤/۲ میکروگرم در میلی‌لیتر). اسانس آویشن شیرازی دارای اثرات بازدارندگی بر لیستریا مونوسیتوژن می‌باشد. این اثرات به وضوح در همراهی با نایسین افزایش یافت [۱۱].

محبوبی و فیض‌آبادی (۱۳۸٦) اثر ضدمیکروبی اسانس‌های آویشن، مرزنجوش، مرزه و اکالیپتوس بر سوش‌های میکروبی اشریشیاکلی، سالمونلاتیفی موریوم و قارچ‌های آسپرژیلوس نایجر، آسپرژیلوس فلاووس از دو روش انتشار در آگار و رقیق‌سازی لوله‌ای ارزیابی نمودند. نتایج تحقیقات ایشان نشان داد که اسانس‌های آویشن، مرزنجوش و مرزه از اسانس اکالیپتوس اثر ضدمیکروبی بیشتری دارد. استفاده از اتانول به عنوان پایه حلال در مقایسه با دی متیل سولفوکساید اثر ضد میکروبی اسانس را افزایش می‌دهد. نوع حلال تفاوت معنی‌داری در اثر بخشی اسانس ایجاد می نماید ($p<$ ۰/۰۰۱) و در روش انتشار در آگار، قارچ‌ها در مقایسه با باکتری‌ها و آسپرژیلوس نایجراز آسپرژیلوس فلاووس نسبت به اسانس‌های گیاهی حساس‌تر بودند. حساسیت باکتری‌ها نسبت به اسانس‌ها به نوع باکتری و نوع اسانس بستگی دارد. اسانس‌ها بر قارچ‌ها اثر مهاری دارند و اثر قارچ‌کشی اسانس‌های گیاهی از اثر باکتری‌کشی آنها ضعیف‌تر است. اثر ضدمیکروبی اسانس‌های مرزنجوش، آویشن و مرزه مربوط به جزء تیمول و کارواکرول به ویژه تیمول آن است [۱۲].

ساری و همکاران (۱۳۸۹) اثر ضدمیکروبی اسانس آویشن شیرازی را بر باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس در ماهی کپور در دو دمای ۲۵ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج تحقیقات ایشان نشان داد که اثر مهارکنندگی اسانس بر باکتری با کاهش درجه حرارت گرمخانه‌گذاری بیشتر می‌شود. همچنین، بررسی‌های ارگانولپتیک بر روی غلظت‌های مورد استفاده از اسانس نشان داد که به کارگیری این غلظت‌ها تا میزان ٤۰۵/۰ درصد نه تنها اثر نامطلوب بر طعم فرآورده نداشت بلکه موجب بهبود طعم آن نیز شد و غلظت ۸۱۰/۰ درصد نیز طعم قابل قبولی ایجاد نمود [۱۳].

تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس *Zataria multiflora* Boiss. و نیسین و ترکیب آنها بر تولید انتروتوکسین C و α- همولیزین توسط استافیلوکوکوس اورئوس در سطوح مختلف تلقیح (10^3، 10^4 و 10^5 cfu/ml) در محیط آبگوشت BHI طی نگهداری در ۳۷°C به مدت ٤۳ روز توسط پارسایی‌مهر و همکاران (۲۰۰۹) مورد بررسی قرار گرفت. غلظت‌های اسانس در مقادیر، به ترتیب، ۰/۰۱۵ و ۰/۰۰۵ درصد به میزان قابل ملاحظه‌ای از تولید SEC (Staphylococcal enterotoxin C) و همولیز به علت کاهش عمده در تولید α- توکسین جلوگیری نمود [٦].

سپهری سرشت و همکاران (۲۰۰۸) دو روش مولکولی (PCR) و سرولوژیکی (VTEC_RPLA) به منظور بازیابی اشرشیاکلی تولید کننده شیگاتوکسین، ٤۰۰ نمونه مدفوعی که از گوساله‌ها و گاوها جمع‌آوری شده بود را مورد مقایسه قرار دادند. ۳۲۸ (۸۲ درصد) نمونه‌ها از گاوها و گوساله‌هایی که اسهال داشتند جمع‌آوری شده و (۱۸ درصد) ۷۲ نمونه از آنهایی که اسهال نداشتند. نتایج PCR ۳٤ (۵/۸ درصد) نمونه را مثبت نشان داد که به ترتیب ۲٤ نمونه (۵/۷۰ درصد) حامل ژن stx1 و ۸ نمونه (۵/۲۳ درصد) حامل ژن stx2 و ۲ نمونه (٦ درصد) حامل هر دو ژن بودند. از این ۳٤ ایزوله تولیدکننده شیگاتوکسین ۲۷ مورد (۵/۷۹ درصد) از گوساله‌های اسهالی و ۷ مورد (۵/۲۰ درصد) از غیر اسهالی جمع‌آوری شده بودند. نتایج حاصل از مقایسه ٤۰۰ ایزوله ارزیابی شده به دو روش PCR و VTEC_RPLA ۱۰۰ درصد با همدیگر مطابقت داشتند [۱۵].

به طور کلی هرچه مقادیر مواد فنولیک در اسانس بالاتر باشد، خواص آنتی‌باکتریال آن علیه پاتوژن‌های غذایی بیشتر خواهد بود. فعالیت ضدمیکروبی گونه‌های مختلف گیاه آویشن

مربوط به وجود ترکیبات فنولیک آن مانند کارواکرول و تیمول و سپس لینالول و پاراسمین است [۱۶،۱۷].

ماهیت اسیدی گروه هیدروکسیل در تیمول و کارواکرول و شرکت نمودن گروه هیدروکسیل در تشکیل پیوندهای هیدروژنی، دلیل فعالیت ضدمیکروبی قابل توجه این ترکیبات محسوب می‌شود [۱۸،۱۹]. به طور کلی عملکرد ضدمیکروبی اسانس‌های گیاهی، حاصل از واکنش میان گروه‌های فعال آنها (مانند گروه هیدروکسیل) و اجزای سلول میکروارگانیسم است [۱۹،۲۰].

احتمالاً مکانیسم اثر این ترکیبات فنولی شامل موارد زیر است: اختلال در عملکرد غشای سیتوپلاسمی، برهم زدن نیروی حرکت پروتونی و جریان الکتریکی، انعقاد محتویات سلولی [۹،۲۱]. ممانعت از تولید و فعالیت توکسین‌ها به وسیله اسانس‌های گیاهی می‌تواند به طور غیرمستقیم در نتیجه اختلال در یک سری از فاکتورها از قبیل رونوشت برادری و ترجمه و یا غیرفعال نمودن مستقیم توکسین‌ها صورت پذیرد. این خاصیت طبیعی چندگانه اسانس‌های گیاهی آنها را نسبت به بسیاری از مواد ضدمیکروبی رایج که تنها بر یک مکان هدف تأثیر می‌گذارند، ارجح می‌سازد. از طرف دیگر طبیعی بودن اسانس‌های گیاهی باعث شده که مصرف‌کنندگان آنها را به مواد ضدمیکروبی شیمیایی و سنتتیک ترجیح دهند [۱۰]. نوری و همکاران (۱۳۹۱) اثر ضد میکروبی اسانس آویشن شیرازی بر رشد اشرشیا کلی O157:H7 در گوشت چرخ کرده گوساله در طی نگهداری در دماهای یخچالی، ٤ و ۱۰ درجه سانتی‌گراد، به مدت ١٤ روز به منظور جایگزینی با نگهدارنده‌های شیمیایی مورد بررسی قرار دادند. نتایج تحقیقات ایشان نشان داد که هر چه مدت زمان بیشتری گوشت چرخ کرده گوساله تحت تأثیر بالاترین غلظت اسانس آویشن شیرازی که در این مطالعه (۰/۰۳ درصد) بوده است در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شود، میزان رشد باکتری به طور معناداری کاهش می‌یابد ($p<$ ۰/۰۱). بنابراین اسانس آویشن شیرازی به عنوان نگهدارنده طبیعی در فراورده‌های گوشتی قابل توصیه است [۲۲]. در این مطالعه نیز، غلظت ۰/۰٤ درصد اسانس آویشن شیرازی از رشد اشرشیاکلی جلوگیری نمود و در ۰/۰۸ درصد موجب مرگ باکتری شد. همچنین، غلظت ۰/۰۲ درصد اسانس تأثیر قابل ملاحظه‌ای در ممانعت از تولید شیگاتوکسین ۲ نشان داد.

از آنجا که سلامت غذا مسأله‌ای بنیادی از دیدگاه مصرف‌کنندگان و تولیدکنندگان مواد غذایی می‌باشد و با توجه به گزارش‌های موارد متعدد در رابطه با عفونت‌ها و مسمومیت‌های ناشی از مصرف مواد غذایی آلوده و اهمیت انتروهموراژیک اشرشیاکلی به عنوان اشرشیاکلی تولیدکننده شیگا توکسین ۲ (STEC) ارائه راهکارهایی جهت حفظ هر چه بیشتر سلامت مواد غذایی در جامعه باید رو به گسترش باشد. بررسی اجمالی متون نشان می‌دهد که تاکنون مطالعات اندکی در مورد ارزیابی تأثیرات عملکرد این ترکیب بر مهار رشد یا تخریب سیستم آنزیمی سلول بخصوص آنزیم‌های شرکت کننده در تولید انرژی و اختلال در سنتز ترکیبات ساختاری و شیگا توکسین ۲ این باکتری انجام گرفته است.

اکثر این بررسی‌ها در محیط‌های کشت آزمایشگاهی صورت گرفته است. لذا، انجام و ادامه این پژوهش‌ها در مدل‌های غذایی و بررسی تأثیر ترکیبات مؤثر موجود در اسانس‌ها بر باکتری‌ها به منظور ایجاد راهکاری بدیع برای کنترل زیستی این باکتری‌ها بدون استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها ضروری به نظر می‌رسد زیرا آنتی‌بیوتیک‌ها باعث اختلال در اکوسیستم باکتریایی و ظهور سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک می‌شوند که از نگرانی‌های عمده در بهداشت عمومی می‌باشند. به علت مخاطرات و مشکلات ناشی از وجود شیگا توکسین از یک سو و فراوان بودن و بومی بودن گیاه آویشن شیرازی در ایران و دسترسی آسان و ارزان به این ماده و پذیرش از جانب مصرف‌کنندگان و از سوی دیگر به دلیل اینکه در غلظت‌های بسیار کم که تأثیر خاصی بر بو و طعم مواد غذایی ایجاد نمی‌کند موجب مرگ باکتری شده و ممانعت از تولید توکسین این سویه باکتریایی می‌کند، این مطالعه می‌تواند مقدمه‌ای جهت استفاده از این اسانس در صنایع غذایی باشد تا بدین طریق هم امکان استفاده از یک منبع قابل دسترس و مقرون به صرفه فراهم شود و در نهایت گامی در جهت رسیدن به سلامت و ایمنی مواد غذایی در جامعه برداشته شود.

نتیجه‌گیری

با در نظر گرفتن طیف وسیع فعالیت‌های ضدمیکروبی اسانس آویشن شیرازی، مطابق یافته‌های این مطالعه و مطالعات سایر محققین، می‌توان از این اسانس در غلظت بازدارنده رشد جهت جلوگیری از رشد اشرشیاکلی و در غلظت‌های تحت بازدارنده جهت جلوگیری از تولید شیگاتوکسین و در صنایع غذایی استفاده نمود که البته این امر مستلزم انجام تحقیقات گسترده‌تر درخصوص شناسایی دقیق مکانیسم عمل هر یک از اجزای اسانس آویشن شیرازی در حوزه مولکولی و عملکرد این اجزا در سیستم‌ها و مدل‌های غذایی است.

منابع

1. Pai H, Ahmed N, Lior H and Bryan LE. Sporadic cases of hemorrhagic colitis associated with *E. coli O157:H7*. *Ann. Intern. Med.* 1984; 624 – 6.
2. Sharififar F, Moshafi M H, Mansouri S H, Khodashenas M and Khoshnoodi M. Invitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. *Food Control*. 2007; 18: 800 - 5.
3. Shaiq Ali M, Saleem M, Ali Z and Ahmad VU. Chemistry of *Zataria multiflora* (Lamiaceae). *Phytochem.* 2000; 55: 933 - 6.
4. Rota MC, Herrera A, Martinez RM, Sotomayer J A and Jordan M.J. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus volganis*, *Thumus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control* 2008; 19: 681 - 7.
5. Saei- Dehkordi S S, Tajik H, Moradi M and Khalighi Sigaroodi F. Chemical composition of essential oil of *Zataria multiflora* Boiss. from different parts of Iran and their radical scavenging and antimicrobial activity. *Food and Chemical Toxicology* 2010; online (unpressed).
6. Parsaeimehr M, Akhondzadeh Basti A, Radmehr B, Misaghi A, Abbasifar A, Karim G, Rokni N, Sobhani Motlagh M, Gandomi H, Noori N and Khanjari A. Effect of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil, nisin, and their combination on the production of enterotoxin C and a-hemolysin by *Staphylococcus aureus*. *Foodborne Path. Dis.* 2010; 7 (3): 456 - 63.
7. Akhondzadeh A, Ekhtiarzadeh H, Misaghi A and et al. Effect of *Zataria multiflora* Boiss. Essential Oil on the Growth of *Listeria monocytogenes* in Salted Fish. *J. Medicinal Plants* 2012; 40: 89 – 96.
8. Akhonzadeh Basti A, Misaghi A and Khaschabi D. Growth response and modelling of *Zataria multiflora* Boiss. essentail oil, PH and temperature on *Salmunella typhmurium* and *Staphylocuccus aureus*., *Food Sci. Technol.* 2007; 40: 973 - 81.
9. Oussalah M, Caillet S, Saucier L, Lacroix M. Inhibitory of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E.coli* O157:H7, *salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control* 2007; 18: 414 - 20.
10. Bart S. Essential oils: their antibacterial properties and potential application in foods- a review. *Int. J. Food Mic.* 2004; 94: 223 - 53.
11. Palmer AS, Steward J and Fyfe L. The potential application of plant essential oils as natural preservatives in soft cheese. *Food Mic*. 2001; 18: 463 – 70.
12. Rahnama M, Razavi Rouhani SM, Tajik H and et al. Effects of *Zataria multiflora Boiss.* essential oil and *Nisin*, alone and in combination against *Listeria monocytogen* in BHI broth. *J. Med. Plants* 2009; 32: 120 - 31.
13. Mahboubi M, Feizabadi MM. The Antimicrobial Activity of *Thyme, Sweet Marjoram, Savory and Eucalyptus oils on Escherichia coli, Salmonella typhimurium, Aspergillus niger and*

Aspergillus flavus. *J. Med. Plants* 2009; 30: 137 - 44.

14. Sari A, Akhondzadeh Basti A, Rokni N, Ebrahimzadeh Moosavi H, Soltani M, Gandomi H, Choobkar N, Khanjari A, Abbaszadeh S, Parovi R, Malasshahi A and Zabihi A. effect of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil on the behavior of *Vibrio parahaemolyticus* in salted fish. *J. Med. Plants* 2010; 9 (36): 136 - 44.

15. Sepehriseresht S, Zahraei Salehi T, Sattari M, Tadjbakhsh H and Aslani MM. Detection of shigatoxigenic *Escherichia coli* from fecal samples of calves and cattle by molecular and serological methods. *Comp. Clin. Pathol.* 2009; 18: 53 – 7.

16. Akhonzadeh Basti A, Misaghi A and Khaschabi D. Growth response and modelling of *Zataria multiflora* Boiss. Essentail oil, PH and temperature on *Salmunella typhmurium* and *Staphylocuccus aureus*. *Food Sci. Technol.* 2007; 40: 973 - 81.

17. Yaltirak T, Aslim B, Ozturk S and Ali H. Antimicrobial and antioxidant activities of *Russula delica* Fr. *Food Chem. Toxicol.* 2009; 47: 52 - 2056.

18. Al-Bayati FA. Synergistic antibacterial activity between *Thymus volganis* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. *J. Ethnopharmacol.* 2008; 116: 403 - 6.

19. Kalemba D and Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.* 2003; 10: 813 - 29.

20. Cavar S, Macsimovic M, Solic M E, Jerkovic-Mujkic A and Besta R. Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of two *Satureja* essential oils. *Food Chem.* 2008; 111: 648 - 53.

21. Bagamboula CF, Uyttendaele M and Debevere J. Inhibitory effect of *thyme* and *basil* essential oils, *carvacrol, thymol, estragol, linalool* and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexeneri*. *Food Mic*. 2004; 21: 32 - 42.

22. Noori N, Rokni N, Akhonzadeh Basti A, Misaghi A, Dabbagh moghaddam A, Yahyaraeyat R and Ganbari Sagharloo N. The antimicrobial effect of *Zataria multiflora* Boiss. Essentail oil against *E. coli o157:H7* in minced beef during refrigerated storage as a replacement for chemical preservatives in order to maintain the consumers health. *J. Army Univ. Med. Sci.* 2012; 10 (3): 192 - 7.