

اثر اسانس سیر بر رشد باکتری اشرشیاکلی O157:H7 و تولید شینگاتوکسین^۲

مهدی طاهری^۲ علی میناقی^{۱*} افشین آخوندزاده بستی^۱ محمد حسین مدرسی^۲ حسن گندمی^۱ پریش خسروی^۱ فاضله طالبی^۱ علی حشمتی^۲

(۱) گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران-ایران
(۲) گروه ژنتیک، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران، تهران-ایران
(۳) گروه تغذیه، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی همدان، همدان-ایران

(دریافت مقاله: ۱۶ آذر ماه ۱۳۹۴، پذیرش نهایی: ۷ بهمن ماه ۱۳۹۴)

چکیده

زمینه مطالعه: با ارتقای سطح دانش و آگاهی نسبت به مضرات نگهدارنده‌های شیمیایی، تمایل به استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی به خصوص اسانس‌ها در مواد غذایی افزایش یافته است. گیاه سیر (*Allium Sativum* L.) از گیاهان دارویی در طب سنتی ایران بوده و بررسی اثرات ضد میکروبی آن بر روی باکتری‌های بیماری‌زای مواد غذایی مانند اشرشیاکلی O157:H7 ضروری به نظر می‌رسد. دوز عفونت‌زایی اشرشیاکلی O157:H7 در انسان بسیار کم می‌باشد و بیماری‌های خطرناکی نظیر کولیت هموراژیک، سندرم کم خونی همولیتیک از عوارض ابتلا انسان به این باکتری می‌باشد. هدف: بررسی اثر غلظت‌های تحت‌بازدارنده اسانس سیر بر رشد باکتری (ATCC 35218) *E. coli* O157:H7 و تولید شینگاتوکسین^۲. روش کار: حداقل غلظت‌بازدارنده رشد (MIC) و حداقل غلظت باکتری کشی (MBC) اسانس سیر بر روی باکتری *E. coli* O157:H7 به روش میکروداپلوشن در دمای ۳۵°C تعیین گردید. باکتری *E. coli* O157:H7 در مجاورت غلظت‌های مختلف اسانس سیر در دمای ۳۵°C کشت داده شد و ۴۸، ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از کشت با انجام کشت سطحی شمارش باکتری انجام شد و نیز تولید شینگاتوکسین^۲ بوسیله کیت سنجش شینگاتوکسین (VTEC-RPLA) مورد بررسی قرار گرفت. از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه جهت مقایسه میانگین‌ها استفاده شد. نتایج: MIC و MBC اسانس سیر برای باکتری اشرشیاکلی O157:H7 به ترتیب ۰/۰۲ و ۰/۰۴٪ به دست آمد. نتایج کشت در ۳۵°C نشان می‌دهد که استفاده از غلظت ۰/۰۱۵٪ اسانس سیر در طی ۷۲ ساعت سبب ۲ لوگ کاهش در رشد باکتری نسبت به نمونه کنترل شد که از نظر آماری معنی‌دار است (P < ۰/۰۵). غلظت ۰/۰۰۵٪ سبب کاهش تولید شینگاتوکسین^۲ و غلظت‌های ۰/۰۱ و ۰/۰۱۵٪ مانع از تولید شینگاتوکسین^۲ شد. نتیجه‌گیری نهایی: به طور کلی چنین نتیجه‌گیری می‌شود که استفاده از اسانس سیر بر روی رشد و تولید شینگاتوکسین^۲ باکتری اشرشیاکلی O157:H7 اثر مہاری دارد.

واژه‌های کلیدی: فعالیت ضد میکروبی، اشرشیاکلی O157:H7، اسانس سیر، شینگاتوکسین^۲

مقدمه

بکارگیری نگهدارنده‌های شیمیایی در مواد غذایی و سرطان‌زا بودن برخی از این ترکیبات، استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی مورد توجه قرار گرفته است که در بین این گونه مواد اسانس‌های گیاهی دارای جایگاه شناخته شده و خاصی می‌باشند. اسانس‌های گیاهی که از گذشته برای ایجاد طعم در مواد غذایی بکار گرفته شده‌اند می‌توانند بعنوان نگهدارنده‌های طبیعی ایفاء نقش نمایند. سیر (*Allium Sativum* L.) و اجزاء تشکیل دهنده آن یکی از این مواد می‌باشد که بر روی بسیاری از باکتری‌های بیماری‌زای منتقله از مواد غذایی دارای فعالیت ضد میکروبی می‌باشند (۲۱، ۱۰). سیر که امروزه بعنوان یکی از شناخته شده‌ترین و پر مصرف‌ترین چاشنی‌ها و ادویه‌ها در بسیاری از نقاط جهان مورد استفاده قرار می‌گیرد در واقع یکی از گیاهان متعلق به تیره Liliaceae است (۴). فعالیت ضد میکروبی سیر بعلا تیبوسولفات‌ها خصوصاً تیوسولفینات‌ها و عمدتاً آلیسین می‌باشد که عامل اصلی فعالیت ضد میکروبی و نیز طعم و بوی سیر می‌باشد. آلیسین بسیار ناپایدار می‌باشد و به ترکیبات ارگانوسولفوری نظیر دی آلیل سولفید، دی آلیل دی سولفید، دی آلیل تری سولفید و سایر ترکیبات سیر تجزیه می‌شود (۱۴). نتایج مربوط به GC-MS اسانس سیر نشان می‌دهد که اجزاء عمده تشکیل دهنده آنرا ترکیباتی نظیر دی آلیل تری سولفید، دی آلیل

بیماری‌های منتقله از راه غذا یکی از مشکلات اصلی سلامت و بهداشت عمومی محسوب می‌شوند که سالانه میلیون‌ها نفر از جمعیت جهان به آن مبتلا و برخی نیز جان خود را از دست می‌دهند. باکتری‌های اشرشیاکلی تولیدکننده شینگاتوکسین (*Shiga toxin producing Escherichia coli*) جزء سویه اشرشیاکلی آنتروهموراژیک (EHEC) هستند که شینگاتوکسین (STX) یا وروتوکسین (VT) تولید می‌کنند. دوز عفونت‌زایی اشرشیاکلی O157:H7 در انسان بسیار کم است و یکی از خطرناک‌ترین عوامل بیماری‌زا می‌باشد که از طریق آب و مواد غذایی منتقل شده و سبب ایجاد بیماری در انسان می‌شود. اشرشیاکلی آنتروهموراژیک (EHEC) توانایی تولید شینگاتوکسین را دارد که فاکتور حدت این بیماری می‌باشد (۱۸). مصرف آب و غذای آلوده به باکتری اشرشیاکلی O157:H7 سبب ابتلاء انسان به بیماری‌های نظیر کولیت خونریزی دهنده، سندرم کم خونی همولیتیک و آسیب‌های کلیوی می‌شود (۱۲). از زمان‌های قدیم کنترل باکتری‌های بیماری‌زا مورد توجه بوده و روش‌های گوناگونی بدین منظور بکار گرفته می‌شود. با توجه به نگرانی مصرف‌کنندگان مواد غذایی از



Concentration): تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) به روش میکرودیالویشن صورت گرفت. بر اساس غلظت‌های مورد نیاز، اسانس در محیط‌های کشت آبگوشت BHI حاوی ۱۰٪ دی‌متیل سولفو کساید (DMSO) حل شد (۱۴).

غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۰۲، ۰/۰۴، ۰/۰۸ و ۰/۱۶٪ تهیه گردید. به هر چاهک از میکروپلیت‌های ۹۶ چاهکی ته گرد ۲۰۰ μl از غلظت‌های مختلف ریخته شد و بعد از آن ۲۰ μl از سوسپانسیون باکتریایی اضافه گردید و برای هر غلظت از اسانس دو چاهک مورد استفاده قرار گرفت. غلظت‌های نهایی باکتری در هر چاهک حدود ۱۰^۸cfu/ml بود. (تعداد دقیق باکتری از طریق کشت سطحی و شمارش کلونی تعیین گردید). در چاهک کنترل رشد، ۲۰۰ μl محیط کشت حاوی ۱۰٪ دی‌متیل سولفو کساید و نیز ۲۰ μl از سوسپانسیون باکتری ریخته شد. محتویات داخل میکروپلیت‌ها به مدت ۲۰ ثانیه در ۲۵۰ rpm توسط شیکر بخوبی مخلوط گردید و در دمای ۳۵°C به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شد و پس از این مدت کدورت یا عدم کدورت در چاهک بصورت چشمی بررسی شد و اولین چاهکی که رشدی در آن صورت نگرفته و شفاف بود بعنوان حداقل غلظت بازدارنده رشد محاسبه گردید. کل آزمایش ۳ بار تکرار شد (۱۴، ۲).

تعیین حداقل غلظت باکتری کشی (Minimum Bactericidal Concentration): بعد از تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC)، از رقت‌هایی که کدورتی در آنها مشاهده نشد در محیط BHI ۱۰۰ μl Agar کشت سطحی داده و پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵°C گرمخانه‌گذاری شد. غلظتی که در آن تعداد کلنی‌ها نسبت به دوز تلقیح ۳ لوگ کاهش را نشان داد بعنوان حداقل غلظت باکتری کشی تعیین گردید (۱۷).

ارزیابی رشد و تکثیر باکتری اشرشیا کلی تحت تأثیر اسانس سیر: در ابتدا غلظت‌های تحت بازدارنده اسانس (۰/۰۵، ۰/۰۱ و ۰/۰۱۵٪) بصورت مجزا در لوله‌های فالکن در محیط آبگوشت BHI حاوی ۱۰٪ DMSO تهیه گردید و باکتری اشرشیا کلی به محیط‌های حاوی غلظت‌های مختلف اسانس اضافه شد و نیز یک کنترل مثبت (حاوی باکتری و محیط کشت فاقد اسانس) و نیز کنترل‌های منفی برای هر غلظت از اسانس تهیه شد که حاوی همه اجزا غیر از باکتری بود تا آسپتیک بودن محیط‌های حاوی اسانس مورد بررسی قرار بگیرد. محاسبه دوز بصورتی انجام گرفت که دوز نهایی باکتری اشرشیا کلی ۱۰^۸cfu/ml، HV:O۱۵۷، باشد. نمونه‌ها در ۳۵°C به مدت ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. جهت شمارش تعداد باکتری در زمان‌های صفر، ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت از کشت‌ها رقت تهیه گردید و از هر رقت ۱۰۰ μl در سطح محیط‌های آگار مغذی یا Nutrient Agar (NA) ریخته و کشت سطحی انجام شد و بعد از آن در ۳۵°C به مدت ۲۰-۱۸ ساعت گرمخانه‌گذاری انجام گرفت (۳).

بررسی اثر غلظت‌های تحت بازدارنده اسانس بر تولید شیگاتوکسین

دی سولفید، متیل آلبل تری سولفید و دی آلبل تتراسولفید تشکیل می‌دهد که اثر ضد میکروبی آنها اثبات شده است (۱۹). در مطالعات متعددی اثر ضد باکتریایی اسانس سیر و ترکیبات گوگردار مشتق شده از آن بر روی باکتری اشرشیا کلی مشخص گردیده است (۲۱، ۷).

در این مطالعه، حداقل غلظت بازدارنده رشد و حداقل غلظت باکتری کشی اسانس سیر برای باکتری اشرشیا کلی محاسبه گردید و نیز تأثیر غلظت‌های تحت بازدارنده اسانس سیر بر روی رشد باکتری و نیز تولید شیگاتوکسین ۲ توسط *E. coli* O۱۵۷:HV (ATCC ۳۵۲۱۸) طی ۰، ۱۸، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت کشت، مورد بررسی قرار گرفت.

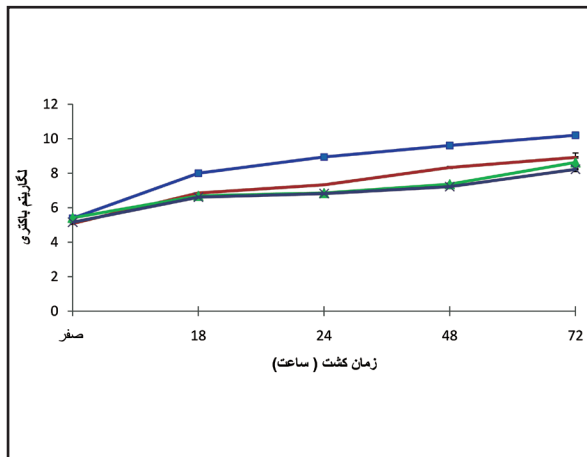
مواد و روش کار

تهیه و شناسایی مواد اسانس: سیر تازه از استان همدان خریداری شد. پوست سیرچه‌ها جدا و با آب مقطر شسته و له شد و به روش تقطیر با بخار آب بوسيله دستگاه کلونجر، اسانس سیر تهیه گردید سپس به منظور حذف رطوبت موجود در اسانس مقدار بسیار اندکی سولفات سدیم بدون آب به اسانس اضافه کرده و به خوبی مخلوط گردید سپس با استفاده از سانتریفوژ سولفات سدیم را رسوب داده و اسانس خالص جدا سازی شد (۱۴). شناسایی مواد مؤثر اسانس جمع‌آوری شده سیر توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی - طیف نگار جرمی (GC-MS) انجام گرفت. دستگاه GC/MS از نوع Thermoquest Trace GC ۲۰۰۰ (انگلستان) با ستون موئینه DB۵ به طول ۳۰m و قطر داخل ۲۵۰ μm و ضخامت فیلم ۰/۲۵ μm بود. برنامه دمایی شامل دمایی ابتدایی ۵۰°C و دمایی انتهایی ۲۶۵°C با افزایش تدریجی ۲/۵°C در هر دقیقه، افزایش دما تا ۲۶۵°C به مدت ۳۰ دقیقه بود. دمایی اتافک تزریق ۲۵۰°C و سرعت جریان گاز هلیوم ۱/۵ ml بود. همچنین طیف نگار جرمی به روش یونیزاسیون الکترونی (EI) با انرژی یونیزاسیون ۷۰eV و دمایی منبع یونیزاسیون ۲۵۰°C انجام شد (۱).

تهیه سوسپانسیون باکتریایی: باکتری *E. coli* O۱۵۷:HV (ATCC ۳۵۲۱۸) از بخش بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه گردید. ابتدا کشت‌های نگهداری شده در ۲۰°C به محیط آبگوشت قلب و مغز (BHI) منتقل شدند و بعد از ۱۸-۱۶ ساعت تجدید کشت انجام شد. سپس کشت‌های شیب دار از آگار BHI تهیه گردید که جهت استفاده در طول آزمایش در دمای ۴°C نگهداری شد. برای تهیه دوز تلقیح باکتری‌ها از روش سنجش جذب نوری با استفاده از اسپکتروفتومتر استفاده شد. جذب نوری ۰/۱ در طول موج ۶۰۰ nm برای باکتری اشرشیا کلی معادل ۱ × ۱۰^۸cfu/ml بدست آمد. در مراحل بعدی با تهیه سوسپانسیون باکتریایی با جذب نوری ۰/۱ و رقیق سازی سوسپانسیون تهیه شده، دوز تلقیح مورد نظر بدست آمد (۱۲).

تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد (Minimum Inhibitory)





نمودار ۱. تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس سیر بر رشد باکتری اشریشیا کلی O157:H7. نمونه دارای ۰/۰۰۵٪ اسانس سیر (نمونه فاقد اسانس (نمونه کنترل))، نمونه دارای ۰/۰۱٪ اسانس سیر (نمونه دارای ۰/۰۱٪ اسانس سیر)، نمونه دارای ۰/۰۱۵٪ اسانس سیر (نمونه دارای ۰/۰۱٪ اسانس سیر)

جدول ۱. ترکیب ترکیبات شیمیایی اسانس سیر که به روش گاز کروماتوگرافی-طیف سنج جرمی شناسایی شده است.

ترکیبات	شاخص بازداری (%)	(%)
دی آلیل تری سولفید	۱۲۰۶	۲۳/۱۲
دی آلیل دی سولفید	۹۷۶	۲۲/۵۴
متیل آلیل تری سولفید	۱۰۴۱	۲۰/۰۵
پروپیتیل دی تیوپروپانوات	۹۹۱	۱۷/۲۹
دی متیل تری سولفید	۸۱۵	۳/۲۰
۳-vinyl-[۴H]-۱,۲-dithiin	۱۰۸۲	۲/۱۹
۲-vinyl-[۴H]-۱,۳-dithiin	۱۱۰۷	۲/۱۱
دی آلیل تتراسولفید	۱۴۳۵	۷/۸۴
مجموع	۸۶۳۴	

جدول ۲. تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس سیر بر تولید شینگاتو کسین ۲. ACVT۲: کنترل مثبت شینگاتو کسین ۲. A: نمونه فاقد اسانس (نمونه کنترل). A1: نمونه دارای ۰/۰۰۵٪ اسانس. A2: نمونه دارای ۰/۰۱٪ اسانس. A3: نمونه دارای ۰/۰۱۵٪ اسانس.

نمونه	۷۲	۷۴	۷۸	۷۱۶	۷۳۲	۷۶۴	۷۱۲۸
ACVT۲	+	+	+	+	+	+	-
A	+	+	+	+	+/-	-	-
A1	+	+/-	-	-	-	-	-
A2	-	-	-	-	-	-	-
A3	-	-	-	-	-	-	-

شده است. بر اساس این داده‌ها افزایش میزان اسانس باعث کاهش تولید شینگاتو کسین ۲ شد. اسانس به میزان ۰/۰۰۵٪ (MIC ۰/۲۵) سبب کاهش تیترا توکسین از ۱/۱۶ در نمونه کنترل به ۱/۲ شد و در غلظت‌های ۰/۰۱٪ و ۰/۰۱۵٪ اسانس (۰/۵۰ و MIC ۰/۷۵) تولید توکسین متوقف گردید.

بحث

باکتری اشریشیا کلی O157:H7 یک باکتری بیماری‌زای شناخته شده

۲ باکتری اشریشیا کلی O157:H7: این آزمون به روش آگلوتیناسیون غیرفعال معکوس (Reverse passive latex agglutination) انجام گرفت. نمونه‌ها حاوی مقادیر تحت بازدارنده اسانس سیر (۲۵٪، ۵۰٪ و ۷۵٪ MIC) طبق آنچه که در مرحله ارزیابی رشد توضیح داده شد تهیه گردید و در ۳۷°C به مدت ۲۰-۱۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شده سپس ۲۰ دقیقه در دمای ۴۰°C با دور ۴۰۰۰ rpm سانتریفوژ شدند. تیترا شینگاتو کسین تولیدی توسط کیت VTEC-RPLA (OXOID - Japan) مورد ارزیابی قرار گرفت. مراحل این آزمون مطابق با دستورالعمل ارائه شده توسط سازنده کیت انجام گرفت.

تحلیل آماری: آنالیز آماری با استفاده از برنامه SPSS version ۱۹.۰

انجام شد. ابتدا نرمال بودن داده‌ها بررسی شد و در صورت نرمال بودن از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه جهت مقایسه میانگین‌ها استفاده شد و در مواردی که بین میانگین‌ها اختلاف معنی‌داری وجود داشت از آزمون Tukey جهت جدا کردن آنها استفاده شد. سطح معنی‌داری $p \leq 0.05$ برای آزمون‌های آماری در نظر گرفته شد.

نتایج

بازده اسانس (V/W) ۰/۱۲٪ بود. نتایج شناسایی ترکیبات اسانس

سیر در جدول ۱ مشاهده می‌شود، اجزای اصلی اسانس سیر شامل: دی آلیل تری سولفید (۲۳/۱۲٪)، دی آلیل دی سولفید (۲۲/۵۴٪) و متیل آلیل تری سولفید (۲۰/۰۵٪) می‌باشد. نتایج تست MIC و MBC اسانس سیر برای باکتری *E. coli* O157:H7 (۳۵۲۱۸ ATCC) به ترتیب ۰/۰۲٪ و ۰/۰۴٪ محاسبه گردید. نتایج تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس سیر روی رشد اشریشیا کلی O157:H7 در نمودار ۱ نشان داده شده است. نتایج آماری نشان داد که اسانس سیر بر روی رشد باکتری اشریشیا کلی تأثیر منفی داشته و سبب شد تا تعداد باکتری بطور معنی‌داری کمتر از نمونه کنترل گردد و با افزایش غلظت اسانس، تعداد باکتری اشریشیا کلی در مقایسه با نمونه کنترل کاهش بیشتری را نشان داد و بیشترین میزان کاهش مربوط به تیمار حاوی غلظت ۰/۰۱۵٪ اسانس سیر (MIC ۰/۷۵) بود که در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از کشت تعداد باکتری اشریشیا کلی نسبت به کنترل به ترتیب ۲/۱، ۲/۴ و ۲/۴ لگاریتم کاهش را نشان داد و این میزان از نظر آماری معنی‌دار است ($p \leq 0.05$) و نیز در مقایسه هر تیمار در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با کنترل همان تیمار مشاهده می‌شود که در این حالت نیز بیشترین تأثیر مهاری اسانس سیر بر روی رشد باکتری مربوط به تیمار حاوی ۰/۰۱۵٪ (MIC ۰/۷۵) می‌باشد. با بررسی نمودار ۱ مشخص می‌شود که در طی ۷۲ ساعت زمان آزمایش، بیشترین تأثیر منفی اسانس سیر بر روی رشد باکتری‌ها در زمان ۴۸ ساعت اتفاق افتاد و بعد از این مدت تأثیر منفی اسانس بر روی رشد اندکی کاهش یافت. نتایج تولید شینگاتو کسین ۲ در محیط آبگوشت BHI در مجاورت غلظت‌های مختلف اسانس در جدول ۲ نشان داده



دی آلیل تری سولفید، دی آلیل دی سولفید، متیل آلیل تری سولفید و دی آلیل تتراسولفید می‌باشد بترتیب: ۲۷/۳۳٪، ۲۴/۶۷٪، ۱۹/۱۱٪ و ۲/۱۸٪. گزارش کردند (۱۴). در مقایسه با ترکیبات اسانس در جدول ۱ مشخص می‌شود که اسانس مصرفی آنها دارای اثر ضد باکتریایی بیشتری بوده که این بعلا متفاوت بودن مسیر مصرفی در تهیه اسانس می‌باشد که سبب تفاوت در میزان ترکیبات و نیز تعداد باندهای دی سولفیدی شده است، زیرا هرچقدر میزان باندهای دی سولفیدی بیشتر باشد اثر ضد میکروبی آن بیشتر خواهد بود. نتیجه تحقیقات Bonaduce و همکاران در سال ۲۰۰۶ و Gomez و همکاران در سال ۲۰۰۴ و Lanzotti در سال ۲۰۰۶ نیز تأیید کننده این موضوع می‌باشد که خصوصیات اسانس سیر به وجود ترکیبات گوگردی ناپایدار و فرار بستگی دارد و به همین خاطر ترکیب شیمیایی اسانس سیر بسیار متفاوت می‌باشد (۵، ۶، ۷). Yin و Tsao نیز در سال ۲۰۰۱ اعلام کردند تعداد باندهای دی سولفیدی بر میزان فعالیت ضد میکروبی اسانس سیر مؤثر است و هر چه تعداد باندهای دی سولفیدی بیشتر باشد فعالیت ضد میکروبی بیشتر می‌شود. مواد زیست فعال موجود در اسانس‌های گیاهی به وارسته و سن گیاه و منطقه جغرافیایی آنها و نیز روش آماده سازی و استخراج اسانس بستگی دارد. در بررسی اثر ضد میکروبی سه ترکیب اصلی تشکیل دهنده اسانس سیر (دی آلیل تتراسولفید، دی آلیل تری سولفید و دی آلیل دی سولفید)، دی آلیل تتراسولفید دارای بیشترین و دی آلیل دی سولفید دارای کمترین فعالیت ضد میکروبی می‌باشند (۴، ۱۹). در بررسی صورت گرفته اسانس سیر در غلظت‌های ۰/۰۰۵٪ (۵۰ ppm) و ۰/۰۱٪ (۱۰۰ ppm) و ۰/۰۱۵٪ (۱۵۰ ppm) بر روی رشد باکتری *O157:H7* اثر مهارتی داشت و با افزایش غلظت اسانس اثر مهارتی بیشتر شد که از نظر آماری معنی دار است. Akhondzadeh Basti و همکاران در سال ۲۰۱۴ اثر اسانس سیر بر روی رشد ویبریوپاراهمولنتیکوس بررسی کردند و اعلام کردند غلظت‌های ۰/۰۰۵٪ و ۰/۰۱۵٪ سبب کاهش رشد باکتری مورد مطالعه شد (۱). Ataee و همکاران در سال ۲۰۱۳ اثر اسانس آویشن شیرازی را بر روی رشد باکتری *O157:H7* مورد بررسی قرار دادند و اعلام کردند غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۰۲ و ۰/۰۳ بر روی رشد اثر منفی داشت که از نظر آماری معنی دار است (۲). در بررسی صورت گرفته مشخص شد غلظت ۰/۰۰۵٪ (۵۰ ppm) سبب کاهش میزان تولید توکسین شد و غلظت‌های ۰/۰۱٪ (۱۰۰ ppm) و ۰/۰۱۵٪ (۱۵۰ ppm) مانع از تولید توکسین شدند. نتایج مربوط به تأثیر اسانس سیر بر روی تولید شیگاتوکسین ۲ نشان داد که عدم تولید توکسین از الگوی وابسته به دوز پیروی می‌کند و اسانس سیر اثر مهارتی دارد. Akhondzadeh Basti و همکاران در سال ۲۰۱۴ اثر اسانس سیر را نیز بر روی تولید توکسین ویبریوپاراهمولنتیکوس بررسی کردند و اعلام کردند که غلظت ۰/۰۱۵٪ سبب کاهش میزان تولید توکسین شد (۱). Ataee و همکاران در سال ۲۰۱۳ نیز اثر اسانس آویشن شیرازی را بر روی تولید شیگاتوکسین ۲ باکتری

می‌باشد که بیماری‌های متعددی در انسان تولید می‌کند و در برخی موارد ممکن است سبب مرگ مبتلایان شود (۱۶). با ارتقای سطح آگاهی و نیز نگرانی مصرف کنندگان در مورد استفاده از ترکیبات نگهدارنده و افزودنی‌های مصنوعی در مواد غذایی، 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 منشأ غذایی انجام گرفته است (۱۳). در تحقیق حاضر تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس سیر بر روی رشد و تولید شیگاتوکسین ۲ باکتری *O157:H7* مورد مطالعه قرار گرفت. با ملاحظه جدول ۲ و نمودار ۱ چنین نتیجه گرفته می‌شود که اسانس سیر بر رشد و تکثیر باکتری مورد مطالعه و نیز تولید شیگاتوکسین از الگوی وابسته به دوز پیروی می‌کند و نیز بیشترین تأثیر اسانس بر روی رشد باکتری مورد مطالعه در مدت زمان ۴۸ ساعت پس از کشت مشاهده شد و این کاهش اثر در زمان ۷۲ ساعت می‌تواند بعلا ناپایداری و فرار بودن ترکیبات اسانس سیر باشد. Brewal و Kumar در سال ۱۹۹۸، حساسیت میکروب‌های بیماری‌زای مواد غذایی را نسبت به سیر مورد بررسی قرار دادند و باکتری *O157:H7* را بعنوان حساس‌ترین باکتری به سیر معرفی کردند (۱۰). Harris و همکاران در سال ۲۰۰۱ ویژگی‌های ضد میکروبی سیر را مورد بررسی قرار دادند و فعالیت ضد میکروبی اسانس سیر را مربوط به وجود سولفیدها دانستند همچنین اعلام کردند که سیر بر روی میکروفلور روده و نیز باکتری‌های انتروباکتر خطرناک تأثیر متفاوتی دارد و اثر مهارتی سیر بر روی باکتری *O157:H7* برابر اثر مهارتی بر روی باکتری *Lactobacillus* کازنی می‌باشد (۷). Kim و همکاران در سال ۲۰۰۴ اعلام کردند که بررسی‌های اندکی بر روی فعالیت ضد باکتریایی اسانس سیر صورت گرفته است و علت اصلی آن تجزیه سریع آلکسین می‌باشد که در طی تهیه اسانس سیر رخ می‌دهد (۹). در تحقیق صورت گرفته میزان MIC و MBC به ترتیب (۲۰۰ ppm) ۰/۰۲٪ و (۴۰۰ ppm) ۰/۰۴٪ محاسبه شد. Xuguang و همکاران در سال ۲۰۰۱ اثر اسانس سیر را بر روی تعدادی از باکتری‌ها و قارچ‌ها بررسی کردند MIC بدست آمده برای باکتری *O157:H7*، ۷۵ ppm و برای باکتری *Staphylococcus aureus* ۹۳/۸ ppm گزارش کردند (۲۰). Akhondzadeh Basti و همکاران در سال ۲۰۱۴ اثر اسانس سیر بر روی رشد ویبریوپاراهمولنتیکوس بررسی کردند و میزان MIC و MBC را (۳۰۰ ppm) ۰/۰۳٪ گزارش کردند (۱). Razavi Rohani و همکاران در سال ۲۰۱۱ تأثیر اسانس سیر را بر روی باکتری لیستریا منوسیتونز مورد بررسی قرار دادند و MIC را ۱۰۰ ppm گزارش کردند. همچنین اعلام کردند دی آلیل تتراسولفید اصلی‌ترین ترکیب گوگرداری است که از آلکسین ایجاد می‌شود و مهمترین ترکیب ضد باکتریایی اسانس سیر است که به روش تقطیر بدست می‌آید. آنها همچنین میزان ترکیبات عمده تشکیل دهنده اسانس سیر را که شامل



References

- Budras, K.D., McCarthy, L., Akhondzadeh Basti, A., Mashak, Z., Khanjari, A., Rezaei, M.A., Mohammadkhan, F., Tayyar Hashtjin, N. (2014) The study on the effects of garlic Essential oil on growth curve and TDH toxin production of *Vibrio parahaemolyticus*. J Med Plants. 2: 156-162.
- Ataee, M., Akhondzadeh Basti, A., Zahraei Salehi, T., Hosseini, H., Gandomi, H., Noori, N., Khanjari, A., Taheri Mirghaed, A., Mohammadkhan, F., Faghih Fard, P. (2013) The effect of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil on growth and production of shiga toxin 2 *E. Coli* O157:H7. J Med Plants. 4: 62-71.
- Azizkhani, M., Misaghi, A., Akhondzadeh Basti, A., Gandomi, H., Hosseini, H. (2012) Effect of *Zataria multiflora* Boiss. Essential Oil on growth and enterotoxin E production of *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. J Med Plants. 4: 185-193.
- Baghalian, K., Ziai, S.A., Naghavi, M.R., Naghdibady, H., Khalighi, A. (2005) Evaluation of allicin content and botanical traits in Iranian garlic (*Allium sativum* L.) ecotypes. Sci Hort. 103: 155-166.
- Bonaduce, I., Colombini, M.P., Diring, S. (2006) Identification of garlic in old gildings by gas chromatography-mass spectrometry. J Chrom A. 1107: 226-232.
- Calvo-Gómez, O., Morales-López, J., López, M.G. (2004) Solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometric analysis of garlic oil obtained by hydrodistillation. J Chrom A. 1036: 91-93.
- Harris, J.C., Cottrell, S.L., Plummer, S., Lloyd, D. (2001) Antimicrobial properties of *allium sativum* (garlic). Applied Microbiol Biotechnol. 57: 282-286.
- Lanzotti, V. (2006) The analysis of onion and garlic. J Chrom A. 1112: 3-22.
- Kim, J.W., Huh, J.E., Kyung, S.H., Kyung, K.H. (2004) Antimicrobial Activity of Alk(en)yl Sulfides Found in Essential Oils of Garlic and Onion. J Food Sci Biotechnol. 2: 235-239.
- Kumar, M., Berwal, J.S. (1998) Sensitivity of

اشرشیا کلی O157:H7 مورد بررسی قرار دادند و اعلام کردند افزایش غلظت اسانس تا ۰/۰۲٪ اثر بازدارندگی بر تولید شیگاتوکسین ۲ داشت (۲). در مقایسه اثر اسانس سیر بر روی رشد و تولید توکسین باکتری‌های اشرشیا کلی O157:H7 و ویبریوپاراهمولتیکوس چنین نتیجه گرفته می‌شود که اثر مهارتی مشابهی روی رشد داشته ولی از نظر مهارت توکسین‌زایی روی باکتری اشرشیا کلی O157:H7 مؤثرتر می‌باشد و این تفاوت می‌تواند باعث متفاوت بودن سیر مصرفی در تهیه اسانس و ترکیبات فرار اسانس باشد (۴). در مقایسه نتایج تحقیق حاضر با نتایج Ataee و همکاران در سال ۲۰۱۳ مؤثرتر بودن اسانس سیر بر روی باکتری اشرشیا کلی O157:H7 با توجه به آنچه که Cheng و Yim در سال ۲۰۰۳ در مورد ترکیبات مؤثر اسانس سیر ذکر کردند قابل توجه می‌باشد (۲۱).

Sepehriseresht و همکاران در سال ۲۰۰۸ دو روش مولکولی (PCR) و سرولوژیکی (VTEC-RPLA) به منظور بازیابی اشرشیا کلی تولید کننده شیگاتوکسین، ۴۰۰ نمونه مدفوعی از گوساله‌ها و گاوها را مورد مقایسه قرار دادند. ۳۲۸ نمونه از دام‌هایی که اسهال داشتند و ۷۲ نمونه از دام‌هایی که اسهال نداشتند جمع‌آوری شده بود. نتایج PCR، ۳۴ نمونه را مثبت نشان داد. از این ۳۴ ایزوله تولید کننده شیگاتوکسین ۲۷ مورد از دام‌های اسهالی و ۷ مورد از دام‌های غیر اسهالی جمع‌آوری شدند و تولید یا عدم تولید شیگاتوکسین مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از مقایسه ۴۰۰ ایزوله ارزیابی شده به دو روش PCR و VTEC-RPLA، ۱۰۰٪ با یکدیگر مطابقت داشتند و این تحقیق دقت بالای آزمون سرولوژیکی را نشان می‌دهد (۱۵). نتایج بررسی حاضر بیانگر اثر مهارتی مناسب اسانس سیر بر روی رشد باکتری اشرشیا کلی O157:H7 و تولید شیگاتوکسین ۲ می‌باشد، اما برای استفاده عملی از این اسانس در مدل‌های غذایی بعنوان جایگزین نگهدارنده‌های شیمیایی نیاز به مطالعات وسیع‌تری می‌باشد.

تشکر و قدردانی

از معاونت محترم پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران جهت حمایت از این تحقیق نهایت تقدیر و تشکر را دارد.

food pathogens to garlic (*Allium sativum*). J Applied Microbiol. 84: 213-215.

- Medellin-Pena, M., Wang, H., Johnson, R., Anand, S., Griffiths, M. (2007) Probiotics Affect Virulence-Related Gene Expression in *Escherichia coli* O157:H7. Applied Environ Microbiol. 73: 4259-4267.
- Misaghi, A., Akhondzade Basti, A. (2007) Effect of *Zataria multiflora* boiss essential oil and nisin on *Bacillus cereus* ATCC 11778. Food Control.



- 18: 1043- 9.
13. Pan, A.S., Steward, J., Fyte, L. (2009) The potential application of plant essential oils as natural preservatives in soft cheese. *Food Microbiol.* 18: 463-470.
14. Razavi Rohani, S.M., Moradi, M., Mehdizadeh, T., Saei-Dehkordi, S.S., Griffiths, M.W. (2011) The effect of nisin and garlic (*Allium sativum* L.) essential oil separately and in combination on the growth of *Listeria monocytogenes*. *LWT - Food Sci Technol.* 44: 2260-2265.
15. Sepehreresht, S., Zahraei Salehi, T., Sattari, M., Tadjbakhsh, H., Aslani, M.M. (2009) Detection of shigatoxigenic *Escherichia coli* from fecal samples of calves and cattle by molecular and serological methods. *Comp Clin Pathol.* 18: 53-57.
16. Shekarforoush, S.S., Nazer, AHK., Firouzi, R., Rostami, M. (2007) Effects of storage temperatures and essential oils of oregano and nutmeg on the growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 in barbecued chicken used in Iran. *Food Control.* 18: 1428-1433.
17. Skandamis, P., Koutsoumanis, K., Fasseas, K., Nychas, G.J.E. (2001) Inhibition of oregano essential oil and EDTA on *E. coli* O157:H7. *Italian J Food Sci.* 13: 55-65.
18. Toshima, H., Yoshimura, A., Arikawa, K., Hida-ka, A., Ogasawara, J., Hase, A., Masaki, H., Ni-shikawa, Y. (2007) Enhancement of shiga toxin production in enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotype O157:H7 by DNase colicins. *Applied Environ Microbiol.* 23:7582-7588.
19. Tsao, S.M., Yin, M.C. (2001) In-vitro antimicrobial activity of four diallyl sulphides occurring naturally in garlic and Chinese leek oils. *J Medical Microbiol.* 50: 646-649.
20. Xuguang, Q., Wei, C., Yashan, H. (2001) Studies on the antibacterial effect of garlic essential oil. *J Shandong Agricultural Uni.* 32: 275-279.
21. Yin, M., Cheng, W. (2003) Antioxidant and antimicrobial effects of four garlic-derived organo-sulfur compounds in ground beef. *Meat Sci.* 63: 23-28.



Effect of garlic (*Allium sativum* L.) essential oil on growth of *E. coli* O157:H7 and shiga toxin 2 production

Taheri, M.³, Misaghi, A.^{1*}, Akhoundzade, A.¹, Modaresi, M.H.², Gandomi, H.¹, Khosravi, P.¹, Talebi, F.¹, Heshmati, A.³

¹Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran- Iran

²Department of Genetic, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran- Iran

³Department of Nutrition, Medicine Faculty, Hamadan University of Medical Sciences and Health Services, Hamadan-Iran

(Received 7 December 2015, Accepted 27 January 2016)

Abstract:

BACKGROUND: Increase of people's awareness about side effects of chemical food preservatives has raised public interest to consume products with natural preservatives such as essential oils. Garlic (*Allium Sativum* L.) is one of the medicinal plants in traditional medicine of Iran and it is necessary to evaluate its antimicrobial effects on some food borne bacteria such as *E.coli* O157:H7. This bacteria has low infectious dose and causes hemorrhagic colitis and hemolytic-uremic syndrome. **OBJECTIVES:** The purpose of this study is to evaluate inhibitory effect of garlic essential oil (*Allium Sativum* L.) on growth of *E. coli* O157:H7 and shiga-toxin 2 (Stx2) production. **METHODS:** The minimum inhibitory concentration (MIC) of garlic essential oil was evaluated by broth microdilution method and minimum bactericidal concentration (MBC) methods. Effect of subinhibitory concentrations (subMICs) of garlic essential oil on bacterial growth over 72 h (at 35 °C) evaluated by surface plate counting and production of Stx2 were evaluated by kit (VTEC-RPLA). **RESULTS:** MIC and MBC of garlic essential oil were estimated 0/02% and 0/04%, respectively. Concentrations of 0.005%, 0/01% and 0.015% of garlic essential oil reduced the bacterial growth. Concentration 0/015% after 72 h reduced 2 log₁₀ (cfu/ml) growth rate and was the most effective concentration. Concentration 0/005% reduced Stx2 production and higher concentrations inhibited Stx2 production. It was found that the effect of different concentrations of essential oil on growth and production of Stx2 by *E. coli* O157:H7 were statistically significant ($p \leq 0.05$). **CONCLUSIONS:** Garlic essential oil showed to be effective against bacterial growth and production of Stx2. This study indicated that garlic essential oil can be used as natural preservative in food system. **Keyword:** antimicrobial effect, *E. coli* O157:H7, garlic essential oil, Shiga-toxin 2

Figure Legends and Table Captions

Figure 1. Effect of different concentrations of garlic essential oil on *E. coli* O157:H7 growth.

Table 1. Chemical composition of *Allium sativum* EO identified by GC/MS.

Table 2. Effect of different concentrations of garlic essential oil on production of Stx2 by *E. coli* O157:H7. ACVT2: Control positive of Shiga toxin2, A: Sample without essential oil, A1: Sample +0.005% essential oil, A2: Sample + 0.01% essential oil, A3: Sample + 0.015% essential oil.



*Corresponding author's email: amisaghi@ut.ac.ir, Tel: 021-61117040, Fax: 021-66933222

J. Vet. Res. 71, 1, 2016