Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 12:17 +0330 on Monday December 10th 2018

ORIGINAL ARTICLE

Effect of Cinnamon, Rosemary and Zataria Essential Oils on Food-borne Gastroenteritis Viruses

Maryam Azizkhani,
Fahimeh Tooryan

Assistant Professor, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran

(Received February 3, 2016 ; Accepted July 4 , 2016)

Abstract

Background and purpose: Since long time ago herbal products and spices have been used as powders, essential oils (EOs), and extracts. They consist of antimicrobial components and could be applied as natural food preservatives. In the present work, the antiviral effect of cinnamon, rosemary, and zataria EOs has been investigated against norovirus surrogates including feline calicivirus (FCV) and murine norovirus (MNV).

Materials and methods: Different concentrations of EOs were individually mixed with each virus at titers of ca. 7-8 log TCID50/ml and incubated for 2 h at 4ºC and 37 ºC. The infectivity of the recovered viruses was evaluated by cell-culture assays.

Results: At 37 ºC, 3% of cinnamon, 2.5% of rosemary and 0.1% of zataria EOs decreased the FCV titers by 2. 38, 3.38, and 4.51 log TCID50/ml, respectively. At lower concentrations they were found to be less effective. Also, different concentrations of EOs decreased MNV titers by 0.25-1.44 log TCID50/ml. The maximum titer reduction (4.51 log TCID50/ml) was achieved when the FCV was treated at 37 ºC with 0.1% of zataria EO.

Conclusion: The reduction on the infectivity titers found for the tested norovirus surrogates with these EOs highlighted their potential role as biopreservatives to improve food hygiene and shelflife.

Keywords: antiviral, cinnamon, norovirus, rosemary, zataria

J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 26(141): 8-15 (Persian).

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 12:17 +0330 on Monday December 10th 2018

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و ششم شماره ۱۴۱ مهر سال ۱۳۹۵ (۱۵-۸)

بررسی تاثیر اسانس دارچین، رزماری و آویشن شیرازی بر سویه های ویروسی عامل عفونت گوارشی منتقله از غذا

مریم عزیزخانی

فهیمه توریان

چکیده

سابقه و هدف: فرآورده های گیاهی و ادویه جات، که از گذشته به صورت پودر، اسانس و عصاره مورد استفاده قرار گرفته‌اند واجد ترکیبات ضدمیکربی و قابلیت کاربرد به عنوان نگهدارنده‌های طبیعی خوراکی می‌باشند. در مطالعه حاضر، تاثیر ضدویروسی اسانس‌های دارچین، رزماری و آویشن شیرازی بر عفونت زایی سویه‌های نورو ویروس، کلسی ویروس گربه (FCV) و نوروویروس موش (MNV)، مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، هر کدام از ویروس‌ها در تیترهای حدود $7-8$ log $TCID_{50}$/ml، به طور جداگانه، با غلظت‌های مختلف اسانس‌ها مخلوط شده و به مدت ۲ ساعت در ۴ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. عفونت‌زایی ویروس‌های بازیابی شده از طریق ارزیابی کشت سلولی بررسی گردید.

یافته‌ها: در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، اسانس دارچین در غلظت ۳ درصد، اسانس رزماری در غلظت ۲/۵ درصد و اسانس آویشن شیرازی در غلظت ۰/۱ درصد تیتر FCV را، به ترتیب، به میزان ۲/۳۸، ۳/۳۸ و ۴/۵۱ log $TCID_{50}$/ml کاهش داده و تاثیر آن‌ها در غلظت‌های پائین‌تر کاهش یافت. هم‌چنین، غلظت‌های مختلف این اسانس‌ها موجب کاهش تیتر MNV به میزان $0/25-1/44$ log $TCID_{50}$/ml گردید. حداکثر کاهش تیتر FCV طی تیمار ویروس در ۳۷ درجه سانتی‌گراد با غلظت ۰/۱ درصد اسانس آویشن شیرازی (به میزان ۴/۵۱ log $TCID_{50}$/ml) به دست آمد.

استنتاج: کاهش مشاهده شده در تیتر عفونت‌زایی سویه‌های نوروویروس توسط اسانس‌های مورد بررسی، پتانسیل این اسانس‌ها را برای کاربرد به عنوان نگهدارنده‌های طبیعی جهت ارتقای سلامت و عمر نگهداری مواد غذایی آشکار می‌سازد.

واژه های کلیدی: آویشن شیرازی، دارچین، رزماری، ضدویروس، نوروویروس

مقدمه

با توجه به افزایش آگاهی مصرف‌کنندگان نسبت به مضرات افزودنی‌های غذایی مصنوعی و تمایل به استفاده از فرآورده‌های غذایی با حداقل تاثیرات سوء بر سلامت و نیز محیط زیست، استفاده از ترکیبات ضد میکروبی طبیعی در تولید محصولات غذایی به طور قابل ملاحظه‌ای در دهه گذشته افزایش یافته است. ترکیبات گیاهی که از گذشته‌های دور به عنوان طعم دهنده در مواد غذایی به کار می‌رفته‌اند، به علت داشتن ترکیبات ضدمیکربی، واجد قابلیت کاربرد در محصولات غذایی به عنوان نگهدارنده‌های طبیعی می‌باشند(۱).

مولف مسئول:مریم عزیزخانی- آمل،:خیابان امام خمینی، آفتاب ۲۴، دانشگاه تخصصی فناوری های آمل E-mail:azizkhani.maryam@gmail.com
استادیار، دانشگاه تخصصی فناوری های نوین آمل، آمل، ایران

تاریخ دریافت : ۱۳۹۴/۱۱/۱۴ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۴/۱۱/۲۰ تاریخ تصویب : ۱۳۹۵/۴/۱۴

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 12:17 +0330 on Monday December 10th 2018

اسانس‌های گیاهی و یا ترکیبات فعال آن‌ها که به‌طور مستقیم به عنوان طعم‌دهنده در مواد غذایی به کار می‌روند، در دهه اخیر به عنوان بخشی از ترکیبات مواد بسته‌بندی جهت کنترل میکروارگانیسم‌های بیماری زا مانند کامپیلوباکتر ژژوانی، لیستریامونوسیژنز، سالمونلا، استافیلوکوکوس اروئوس، اشرشیاکلی O157:H7 مورد استفاده قرار گرفته‌اند، اما تاثیرات ضدویروسی ترکیبات و اسانس‌های گیاهی بر ویروس‌های روده‌ای انسان تاکنون به‌طور گسترده مورد مطالعه قرار نگرفته است(۲). شواهد اپیدمیولوژیک نشان می‌دهد که ویروس‌های روده‌ای، به خصوص نورو‌ویروس انسانی (NV)، علت عمده بروز بیماری‌های ناشی از مواد غذایی در کشورهای توسعه یافته می‌باشد(۴،۳). علاوه بر این، نورو‌ویروس جزو پنج پاتوژن مهم عامل هزینه‌های مربوط به بیماری‌های ناشی از مواد غذایی به شمار می‌رود(۵). با وجود تلاش‌هایی که برای کشت نورو‌ویروس‌های انسانی انجام گرفته(۷،۶)، پژوهش‌ها در این خصوص به علت عدم وجود حیوانات آزمایشگاهی مناسب و عدم امکان تکثیر ویروس در شرایط آزمایشگاهی با مشکل روبرو بوده است. در نتیجه، سویه هایی از جمله کلیسی ویروس گربه (FCV) و نورو‌ویروس موش (MNV) به‌طور گسترده‌ای جهت بررسی اثر ترکیبات نگهدارنده متداول مورد استفاده در صنایع غذایی به کار می‌رود(۹،۸). MNV موجب بروز عفونت کشنده‌ای در موش‌های مبتلا به هپاتیت، ذات‌الریه و یا التهاب سیستم عصبی می‌گردد(۱۰)، درحالی‌که FCV یک ویروس تنفسی است که نسبت به شرایط محیطی مانند pH پائین حساس‌تر است(۱۱، ۱۲). از آن‌جا که MNV از طریق مسیر مدفوعی- دهانی انتقال می‌یابد، در برابر سطوح پایین‌تر pH مقاوم بوده و بنابراین به عنوان نماینده‌ای برای نورو‌ویروس‌های انسانی توسط برخی از محققان مورد استفاده قرار می‌گیرد(۱۴-۱۲). هدف این مطالعه، بررسی تاثیر اسانس‌های دارچین (*Cinnamomum zeylanicum*)، رزماری (*Rosmarinus officinalis* L.) و آویشن شیرازی (*Zataria multiflora* Boiss.) بر دو سویه قابل کشت نورو‌ویروس، MNV-1 و FCV، در دو دمای ۴ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد بوده است.

مواد و روش ها

این پژوهش تجربی در سال ۲۰۱۴ در انیستیتو اگروشیمی و صنایع غذایی دانشگاه والنسیا (اسپانیا) انجام شده است.

سویه های ویروسی و سلول‌ها

سویه سیتوپاتوژن FCV F9 (ATCC VR-782) و MNV-1 (تهیه شده از دانشکده پزشکی دانشگاه واشنگتن، ایالات متحده امریکا)، به ترتیب در سلول‌های CRFK (Crandell Rees feline kidney) و RAW264.7 تکثیر و ارزیابی گردید. سپس استوک‌های نیمه خالص از طریق سانتریفوژ (ایالات متحده امریکا ,Eppendorf) هضم شده سلول‌های آلوده در ۶۶۰ گرم به مدت ۳۰ دقیقه تهیه شد. ویروس‌های عفونت‌زا از طریق تعیین دوز عفونت‌زا در ۵۰ درصد کشت بافتی ($TCID_{50}$)، با استفاده از ۸ چاهک برای هر رقت و ۲۰ میکرولیتر مایه تلقیح در هر چاهک، شمارش شدند.

اسانس ها

اسانس‌های رزماری، دارچین و آویشن شیرازی به صورت خانگی تهیه گردید. اسانس از قسمت‌های هوایی خشک شده گیاه رزماری و آویشن شیرازی و پوست درخت دارچین با استفاده از دستگاه کلونجر، به روش تقطیر با بخار به مدت سه ساعت، تهیه و کلیه اسانس‌ها جهت شناسایی ترکیبات با استفاده از کروماتوگرافی گازی- طیف سنجی جرمی (GC/MS) مورد آنالیز قرار گرفتند. دستگاه GC/MS از نوع Thermoquest Trace GC 2000 FINNIGAN (انگلستان) بوده و ویژگی‌های آن عبارت بود از: ستون موئینه DB5 به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۲۵۰ میکرومتر و ضخامت

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 12:17 +0330 on Monday December 10th 2018

لایه داخلی ۰/۲۵ میکرومتر، با برنامه دمایی ۵۰ تا ۲۶۵ درجه سانتی‌گراد و همراه با افزایش تدریجی ۲/۵ درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه و نگهداری ستون در ۲۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه. دمای اتاقک تزریق ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد و سرعت جریان گاز هلیم ۱/۵ml/min بود. هم‌چنین، طیف سنجی جرمی به روش یونیزاسیون الکترونی (EI) با انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت و دمای منبع یونیزاسیون ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد. اسانس‌ها در اتانول ۵۰ درصد رقیق و تا زمان استفاده در شیشه‌های تیره غیرقابل نفوذ به هوا در ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

تعیین سیتوتوکسیسیته اسانس ها بر سلول ها

اسانس‌ها در غلظت‌های مورد آزمایش به چاهک‌های حاوی سلول‌های CRFK و RAW 264.7 در پلیت های ۹۶ چاهکی منتقل و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق تحت CO2 5% نگهداری شدند. سپس، سلول‌ها با ۱۵۰ میکرولیتر محیط DMEM حاوی ۲ درصد سرم جنین گاو مخلوط و به مدت ۴-۲ روز دیگر گرمخانه‌گذاری (سوئیس، Metrohm) شدند. تاثیر سیتوتوکسیسیته از طریق جستجوی مشاهده‌ای با استفاده از میکروسکوپ نوری (آلمان ,Fein Optic) و مقایسه با گروه کنترل (فاقد اسانس) تعیین گردید.

تاثیر ضدویروسی اسانس ها

غلظت‌های مختلف اسانس‌ها به سوسپانسیون‌های FCV و MNV در DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) حاوی ۲ درصد سرم جنین گاو (حدود $7\text{–}8 TCID_{50}/ml$) منتقل و تیمارها در گرمخانه مجهز به تکان دهنده در ۴ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت نگهداری شدند. کنترل مثبت شامل سوسپانسیون ویروسی حاوی اتانول بود. پس از اتمام دوره گرمخانه گذاری، ویروس‌های عفونت زا از طریق ارزیابی کشت سلولی، که در بالا توضیح داده شد، شمارش شدند. هر تیمار در سه تکرار انجام شد. فعالیت ویروس‌کشی اسانس‌ها از طریق مقایسه تعداد ویروس‌های عفونی‌کننده در سوسپانسیون‌های فاقد اسانس با سوسپانسیون‌های ویروسی تیمار شده با اسانس تخمین زده شد.

تجزیه و تحلیل آماری

نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۲,۰ جهت انجام تجزیه و تحلیل آماری به کار رفت. معنی‌دار بودن اختلاف میان میانگین تعداد ویروس‌ها پس از تیمارهای مختلف از طریق آزمون Student's t test با سطح اطمینان $p < ۰/۰۵$ تعیین شد.

یافته ها

ترکیبات اسانس ها

ترکیبات اصلی اسانس رزماری شامل آلفاپینن (۴۲/۸ درصد)، وربنون(۹/۹ درصد)، کامفن (۷/۵ درصد)، ۱و۸- سینئول (۵/۸۱ درصد)، ۳-اکتانون (۴/۸ درصد)، بتا- میریسین (۳/۶۶ درصد) و پارا- سیمین (۳/۱۳ درصد)؛ اسانس دارچین شامل سینامالدهید (۷۴/۴۳ درصد)، اوژنول (۱۳/۸۵ درصد)، آلفاپینن (۶/۲۴ درصد) و کاریوفیلین (۲/۳۳ درصد) و اسانس آویشن شیرازی شامل کارواکرول (۷۱/۱۲ درصد)، گاماترپینن (۷/۳۴ درصد)، آلفاپینن (۴/۲۶ درصد) و اوکالیپتول (۳/۳۷ درصد) بود.

تعیین سیتوتوکسیسیته اسانس ها بر سلول های CRFK و RAW 264.7

اسانس‌های دارچین، رزماری و آویشن شیرازی در غلظت‌های بالاتر از، به ترتیب ۳ درصد، ۲/۵ درصد و ۰/۱ درصد برای هر دو سلول سیتوتوکسیک بودند. لذا این مقادیر حداکثر غلظتی از اسانس‌ها بود که جهت تعیین تاثیرات ضدویروسی اسانس‌ها بر سلول‌های FCV و MNV-1 به کار رفت.

تاثیر اسانس دارچین بر سویه های ویروسی

در تیمار FCV ا اسانس دارچین، کاهش تیترهای عفونت‌زای ویروسی تنها در ۳۷ درجه سانتی‌گراد مشاهده

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 12:17 +0330 on Monday December 10th 2018

شد و تیمار با اسانس در ۴ درجه سانتی‌گراد تغییر قابل ملاحظه‌ای در تیتر ویروس‌های FCV ایجاد ننمود (جدول شماره ۱).

تیترهای FCV پس از مواجهه با غلظت‌های ۱، ۲ و ۳ درصد اسانس دارچین در ۳۷ درجه سانتی گراد، به ترتیب ۱/۱۴، ۲/۲۰ و ۲/۳۸ $TCID_{50}/ml$ کاهش یافت. کاهش تیتر MNV-1 حدود ۱ $TCID_{50}/ml$ پس از تیمار با غلظت‌های ذکر شده اسانس در ۳۷ درجه سانتی‌گراد بود (۰/۹۰، ۱/۰۲ و ۱/۱۳ $TCID_{50}/ml$، به ترتیب، در غلظت‌های ۱،۲ و ۳ درصد اسانس). تیمار با غلظت‌های مختلف اسانس دارچین در ۴ درجه سانتی‌گراد، تیتر MNV-1 را به میزان ۰/۲۲-۰/۵۱ $TCID_{50}/ml$ کاهش داد (جدول شماره ۲).

تاثیر اسانس رزماری بر سویه های ویروسی

تیمار سویه‌های FCV و MNV-1 با اسانس رزماری در غلظت‌های ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ درصد به مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، موجب کاهش تیتر هر دو سویه نورو‌ویروس گردید (جداول شماره ۱ و ۲). تیتر FCV طی تیمار با اسانس رزماری در غلظت‌های ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ درصد، به ترتیب به میزان ۱/۵۵، ۲/۰۸، ۲/۷۱ و ۳/۳۸ $TCID_{50}/ml$ کاهش یافت؛ هم‌چنین تیتر MNV-1 به میزان ۰/۶۶، ۰/۸۹، ۱/۰۷ و ۱/۴۴ $TCID_{50}/ml$، در غلظت‌های مشابه تنزل پیدا کرد. تیمار با غلظت‌های مختلف اسانس رزماری در ۴ درجه سانتی‌گراد، موجب کاهش تیتر FCV به‌میزان ۰/۴۳-۰/۸۱$TCID_{50}/ml$ و کاهش تیتر MNV-1 در دامنه ۰/۳۵-۰/۷۲$TCID_{50}/ml$ گردید.

تاثیر اسانس آویشن شیرازی بر سویه های ویروسی

تاثیر اسانس آویشن شیرازی بر FCV در ۳۷ درجه سانتی‌گراد بسیار قابل ملاحظه بود. پس از تیمار با غلظت‌های ۰/۰۲، ۰/۰۴، ۰/۰۸ و ۰/۱ درصد این اسانس، تیتر FCV به ترتیب، ۱، ۱/۹، ۴/۱ و ۴/۵$TCID_{50}/ml$ کاهش یافت. تاثیر ضد ویروسی اسانس در ۴ درجه سانتی‌گراد ناچیز بود. در رابطه با MNV-1، اسانس آویشن شیرازی در ۳۷ درجه سانتی‌گراد هیچ کاهش قابل ملاحظه‌ای در تیتر ویروسی در غلظت‌های ۰/۰۱ تا ۰/۱ درصد نشان نداد؛ اما در غلظت‌های ۰/۰۸ و ۰/۱ درصد، موجب کاهش تیتر ویروس، به ترتیب به میزان ۰/۵۵ و ۱ $TCID_{50}/ml$ گردید (جداول شماره ۱ و ۲).

جدول شماره ۱: تاثیر اسانس های دارچین، رزماری و آویشن شیرازی بر کلیسی ویروس گربه (FCV) پس از گرمخانه گذاری در ۴ و ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲ ساعت

ویروس	تیمار	۴°C		۳۷°C	
		Log_{10} $TCID_{50}/ml$		Log_{10} $TCID_{50}/ml$	
		تیتر بازیابی شده	کاهش	تیتر بازیابی شده	کاهش
FCV	کنترل	^{a}۶/۹۱ ± ۰/۰۸		^{a}۸/۱۶ ± ۰/۱۵	۱/۱۴
	۱ درصد دارچین	^{a}۶/۸۷ ± ۰/۱۲	۰/۰۴	^{b}۷/۰۲ ± ۰/۲۳	۲/۲۰
	۲ درصد دارچین	^{a}۶/۸۱ ± ۰/۵۱	۰/۱۰	^{b}۵/۹۶ ± ۰/۵۵	۲/۳۸
	۳ درصد دارچین	^{a}۶/۷۸ ± ۰/۳۵	۰/۱۳	^{b}۵/۷۸ ± ۰/۱۹	
	کنترل	^{a}۷/۶۵ ± ۰/۳۱		^{a}۸/۱۵ ± ۰/۲۸	۱/۵۵
	۱ درصد رزماری	^{a}۷/۲۲ ± ۰/۲۵	۰/۴۳	^{b}۶/۶۰ ± ۰/۶۳	۲/۰۸
	۱/۵ درصد رزماری	^{a}۷/۰۹ ± ۰/۰۶	۰/۵۶	^{b}۶/۰۷ ± ۰/۴۹	۲/۷۱
	۲ درصد رزماری	^{a}۶/۹۱ ± ۰/۳۲	۰/۷۴	^{b}۵/۴۴ ± ۰/۱۱	۳/۳۸
	۲/۵ درصد رزماری	^{a}۶/۸۴ ± ۰/۱۶	۰/۸۱	^{b}۴/۷۷ ± ۰/۷۴	
	کنترل	^{a}۷/۶۵ ± ۰/۲۶		^{a}۶/۲۷ ± ۰/۲۵	۰/۱۳
	۰/۰۱درصدآویشن شیرازی	–	-	^{a}۶/۴۰ ± ۰/۲۱	۱/۰۴
	۰/۰۱درصدآویشن شیرازی	–	-	^{b}۵/۲۳ ± ۰/۷۶	۱/۹۱
	۰/۰۴درصدآویشن شیرازی	^{a}۷/۸۶ ± ۰/۳۱	۰	^{c}۴/۳۶ ± ۰/۴۷	۴/۱۷
	۰/۰۸درصدآویشن شیرازی	^{b}۷/۴۴ ± ۰/۰۷	۰	^{d}۲/۱۰ ± ۰/۶۶	۴/۵۱
	۰/۱ درصد آویشن شیرازی	^{b}۷/۷۷ ± ۰/۲۵		^{d}۱/۷۶ ± ۰/۲۹	

a : هر تیمار در سه تکرار انجام شد. حروف مختلف در هر ستون برای هر ویروس نشان دهنده تفاوت آماری قابل ملاحظه بین تیمارها می باشد($P < ۰/۰۵$) . (–): مورد آزمون قرار نگرفته است.

جدول شماره ۲: تاثیر اسانس های دارچین، رزماری و آویشن شیرازی بر نورو ویروس موش (MNV-1) پس از گرمخانه گذاری در ۴ و ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲ ساعت

ویروس	تیمار	۴°C		۳۷°C	
		Log_{10} $TCID_{50}/ml$		Log_{10} $TCID_{50}/ml$	
		تیتر بازیابی شده	کاهش	تیتر بازیابی شده	کاهش
MNV-1	کنترل	^{a}۷/۸۴ ± ۰/۴۱		^{a}۷/۳۵ ± ۰/۵	
	۱ درصد دارچین	^{a}۷/۶۲ ± ۰/۱۵	۰/۲۲	^{b}۶/۴۵ ± ۰/۶۵	۰/۹۰
	۲ درصد دارچین	^{a}۷/۴۷ ± ۰/۲۱	۰/۳۷	^{b}۶/۳۳ ± ۰/۵۵	۱/۰۲
	۳ درصد دارچین	^{a}۷/۳۳ ± ۰/۷۵	۰/۵۱	^{b}۶/۲۲ ± ۰/۱۶	۱/۱۳
	کنترل	^{a}۶/۷۵ ± ۰/۱۳		^{a}۸/۰۴ ± ۰/۳۶	
	۱ درصد رزماری	^{a}۶/۴۰ ± ۰/۶۵	۰/۳۵	^{b}۷/۳۸ ± ۰/۶۲	۰/۶۶
	۱/۵ درصد رزماری	^{a}۶/۲۷ ± ۰/۳۴	۰/۴۸	^{b}۷/۱۵ ± ۰/۷۱	۰/۸۹
	۲ درصد رزماری	^{a}۶/۱۶ ± ۰/۱۵	۰/۵۹	^{b}۶/۹۷ ± ۰/۱۴	۱/۰۷
	۲/۵ درصد رزماری	^{a}۶/۰۳ ± ۰/۴۲	۰/۷۲	^{b}۶/۶۰ ± ۰/۵۶	۱/۴۴
	کنترل	^{a}۷/۰۳ ± ۰/۰۱		^{a}۶/۸۱ ± ۰/۲۶	
	۰/۰۱درصدآویشن شیرازی	–		^{a}۶/۷۷ ± ۰/۴۵	۰/۰۴
	۰/۰۴درصدآویشن شیرازی	^{a}۷/۰۳ ± ۰/۰۱	۰	^{a}۶/۲۷ ± ۰/۱۴	۰/۵۴
	۰/۰۸درصدآویشن شیرازی	^{b}۶/۴۸ ± ۰/۴۰	۰/۵۵	^{a}۶/۵۲ ± ۰/۲۵	۰/۲۹
	۰/۱ درصد آویشن شیرازی	^{a}۶/۰۲ ± ۰/۰۰	۱/۰۱	^{a}۶/۵۶ ± ۰/۳۶	۰/۲۵

a : هر تیمار در سه تکرار انجام شد. حروف مختلف در هر ستون برای هر ویروس نشان دهنده تفاوت آماری قابل ملاحظه بین تیمارها می باشد ($P < ۰/۰۵$) . (–): مورد آزمون قرار نگرفته است.

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 12:17 +0330 on Monday December 10th 2018

بحث

نتایج مطالعه حاضر به وضوح نشان می‌دهد که اسانس‌های دارچین، رزماری و آویشن شیرازی به طور موثری تیتر FCV را در ۳۷ درجه سانتی‌گراد کاهش داده، و با افزایش غلظت اسانس‌ها تیتر FCV به میزان بیش‌تری کاهش می‌یابد. با این حال در ۴ درجه سانتی‌گراد، اسانس‌های مورد آزمایش تاثیر معنی‌داری بر عفونت‌زایی FCV نشان نداند. به‌طور کلی، روش‌های معمول مورد استفاده برای ارزیابی اثر ضدویروسی در شرایط آزمایشگاهی طی مدت ۱ الی ۳ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و یا دمای اتاق اجرا می‌گردد(۱۶،۱۵) و زمانی که ارزیابی در ۴ درجه سانتی‌گراد انجام می‌شود، تصور می‌گردد که ممکن است فعالیت ضد ویروسی ضعیف‌تر باشد(۱۷).

Saddi و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که اثر ضدویروسی اسانس درمنه بر ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۱، هنگامی که مخلوط ویروس- اسانس در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردید، بیش‌تر از ۴ درجه سانتی‌گراد بود(۱۸). نتایج مطالعه ما برای FCV در راستای این فرض نشان می‌دهد که این اسانس‌ها بیش‌ترین تاثیر را بر FCV در ۳۷ درجه سانتی‌گراد اعمال نموده‌اند و این امر می‌تواند کاربرد نهایی این اسانس‌ها را در مواد غذایی محدود نماید. با این وجود، تاثیر درجه حرارت بر فعالیت ضدویروسی ترکیبات طبیعی ممکن است به نوع ویروس و تفاوت در ترکیبات اسانس‌ها بستگی داشته باشد. به عنوان مثال Lipson و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که غیر فعال‌سازی باکتریوفاژ T4 تیمار شده با مخلوط آب آلبالو مستقل از دما می‌باشد(۱۹).

در خصوص MNV-1، غلظت‌های بالای اسانس رزماری به طور فزاینده‌ای موجب کاهش عفونت‌زایی در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گردید، اسانس آویشن شیرازی موجب کاهش خفیفی در عفونت‌زایی MNV با حداکثر کاهش $TCID_{50}$/ml ۱، بدون در نظر گرفتن غلظت‌های مورد استفاده شد. در مقایسه با نتایج منتشر شده اخیر در خصوص تاثیر اسانس‌های زوفا و مرزنجوش بر MNV-1، نتایج حاصل از مطالعه حاضر امیدوارکننده می‌باشد(۲۰). در رابطه با تاثیر بر FCV، این اسانس‌ها ممکن است دارای پتانسیل‌های کاربرد در پزشکی باشند. از سوی دیگر، $TCID_{50}$/ml ۱ کاهش در ۴ درجه سانتی‌گراد موجب ارتقای ایمنی ماده غذایی طی ذخیره سازی شده و نیز می‌توان تاثیر افزایش درجه حرارت ذخیره‌سازی را با هدف کاهش بیش‌تر عفونت‌زایی ویروس مورد بررسی قرار داد. در مجموع، این مطالعه نشان داد که تیمار با اسانس باعث کاهش بیش‌تری در تیتر FCV نسبت به MNV می‌گردد. این تاثیر برای سایر ترکیبات ضد میکروبی طبیعی، مانند عصاره دانه انگور در غلظت ۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر نیز گزارش شده که موجب ۴/۶۱ PFU/ml کاهش در FCV و تنها ۱/۷۳ PFU/ml کاهش برای MNV گردیده است. روند مشابهی برای فعالیت کیتوزان، آب قره قاط و پروآنتوسیانیدین‌های قره قاط، آب انار و پلی‌فنول‌های انار نیز گزارش شده است(۱۳). در این مطالعات، کاهش در تیتر MNV کم‌تر از ۲ لوگ، به جز برای تیمار با پروآنتوسیانیدین‌های قره قاط با نزدیک به ۳ لوگ کاهش، مشاهده شد(۱۵). به‌طور کلی MNV در برابر شرایط نامساعد و ترکیبات ضد میکربی مقاوم‌تر از FCV می‌باشد و در این مطالعه نیز MNV در مواجهه با اسانس‌ها مقاوم‌تر بوده است(۲۱). براساس کاربردهای حال حاضر اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی طبیعی، پتانسیل بسیار بالایی برای بررسی استفاده از اسانس‌ها جهت شستشو و آبکشی میوه‌ها و سبزیجات برای کاهش تعداد پاتوژن‌های ویروسی ناشی از مواد غذایی در محصولات خوراکی وجود دارد. به عنوان مثال، اسانس آویشن، تعداد سالمونلا انتریکا را بیش از ۴ لوگ در گوجه فرنگی، پس از ۵ دقیقه شستشو، کاهش داد(۲۲). اسانس‌های مورد بررسی در این مطالعه جهت کاربرد به عنوان نگهدارنده طی دوره نگهداری محصول در یخچال انتخاب شدند. در این رابطه، تاثیرگذاری اسانس‌ها در زمان‌های طولانی تر مواجهه و درجه

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 12:17 +0330 on Monday December 10th 2018

حرارت‌های بالاتر ذخیره‌سازی به عنوان مثال ۸ درجه سانتی‌گراد، ۷ روز، باید مورد ارزیابی قرار گیرد. به عنوان نتیجه، کاهش مشاهده شده در تیتر عفونت‌زایی سویه های نوروویروس مورد ارزیابی توسط اسانس‌های دارچین، رزماری و آویشن شیرازی، پتانسیل این اسانس‌ها را برای کاربرد به عنوان نگهدارنده‌های طبیعی جهت بهبود ایمنی مواد غذایی و کاهش خطر بروز عفونت‌های معده‌ای- روده‌ای ناشی از مصرف مواد غذایی آلوده به نورو ویروس‌ها و در نتیجه کاهش هزینه‌های درمانی مربوطه آشکار می‌سازد.

سپاسگزاری

این مطالعه از طریق اعتبار پژوهشی ACOMP/2012/199 اعطا شده از سوی ایالت والنسیا و نیز وزارت علوم، تحقیقات و فناوری ایران حمایت مالی گردیده است. هم‌چنین، نویسندگان از خانم رزا ازنار (انیستیتو اگروشیمی و صنایع غذایی دانشگاه والنسیا، اسپانیا) در رابطه با در اختیار گذاردن فضا و تجهیزات آزمایشگاه و گلوریا سانچز (انیستیتو اگروشیمی و صنایع غذایی دانشگاه والنسیا، اسپانیا) در خصوص مساعدت در کشت سلول‌ها سپاسگزاری می‌نمایند.

References

1. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. Int J Food Mic 2004; 94(3): 223-253.
2. Pilau MR, Alves SH, Weiblen R, Arenhart S, Cueto AP, Lovato LT. Antiviral activity of the Lippia graveolens (Mexican oregano) essential oil and its main compound carvacrol against human and animal viruses. Braz J Microbiol 2011; 42(4): 1616-1624.
3. Widdowson MA, Sulka A, Bulens SN, Beard RS, Chaves SS, Hammond R. Norovirus and foodborne disease, United States, 1991e2000. Emerg Infect Dis 2005; 11(1): 95-102.
4. Bae J, Schwab KJ. Evaluation of murine norovirus, feline calicivirus, poliovirus, and MS2 as surrogates for human norovirus in a model of viral persistence in surface water and groundwater. Appl Environ Microbiol 2008; 74(2): 477-484.
5. Scharff RL. Economic burden from health losses due to foodborne illness in the United States. J Food Prot 2012; 75(1): 123-131.
6. Straub TM, Honer zu BK, Orosz-Coghlan P, Dohnalkova A, Mayer BK, Bartholomew RA. In vitro cell culture infectivity assay for human noroviruses. Emerg Infec Dis 2007; 13(3): 396-403.
7. Guix S, Asanaka M, Katayama K, Crawford SE, Neill FH, Atmar RL. Norwalk virus RNA is infectious in mammalian cells. J Virol 2007; 81(22): 12238-12248.
8. Butot S, Putallaz T, Sanchez G. Effects of sanitation, freezing and frozen storage on enteric viruses in berries and herbs. Int J Food Microbiol 2008; 126(1-2): 30-35.
9. Baert L, Debevere J, Uyttendaele M. The efficacy of preservation methods to inactivate foodborne viruses. Int J Food Microbiol 2009; 131(2-3): 83-94.
10. Karst SM, Wobus CE, Lay M, Davidson J, Virgin HW. STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus. Science 2003; 299(5612): 1575-1578.
11. Duizer E, Bijkerk P, Rockx B, De Groot A, Twisk F, Koopmans M. Inactivation of caliciviruses. Appl Environ Microb 2004; 70(8): 4538-4543.
12. Cannon JL, Papafragkou E, Park GW, Osborne J, Jaykus LA, Vinje J. Surrogates

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 12:17 +0330 on Monday December 10th 2018

for the study of norovirus stability and inactivation in the environment: a comparison of murine norovirus and feline calicivirus. J Food Prot 2006; 69(11): 2761-2765.

13. Su X, Zivanovic S, D'Souza DH. Effect of chitosan on the infectivity of murine norovirus, feline calicivirus, and bacteriophage MS2. J Food Prot 2009; 72(12): 2623-2628.
14. Wobus CE, Thackray LB, Virgin HW. Murine norovirus: a model system to study norovirus biology and pathogenesis. J Virol 2006; 80(11): 5104-5112.
15. Su X, Howell AB, D'Souza DH. Antiviral effects of cranberry juice and cranberry proanthocyanidins on foodborne viral surrogates e a time dependence study in vitro. Food Microbiol 2010; 27(8): 985-991.
16. Su X, D'Souza DH. Grape seed extract for control of human enteric viruses. Appl Environ Microbiol 2011; 77(12): 3982-3987.
17. Cos P, Vlietinck AJ, Berghe DV, Maes L. Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. J Ethnopharmacol 2006; 106(3): 290-302.
18. Saddi M, Sanna A, Cottiglia F, Chisu L, Casu L, Bonsignore L. Antiherpevirus activity of Artemisia arborescens essential oil and inhibition of lateral diffusion in Vero cells. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2007; 6: 10.
19. Lipson SM, Sethi L, Cohen P, Gordon RE, Tan IP, Burdowski A. Antiviral effects on bacteriophages and rotavirus by cranberry juice. Phytomedicine 2007; 14(1): 23-30.
20. Kovac K, Diez-Valcarce M, Raspor P, Hernández M, Rodríguez-Lázaro D. Natural plant essential oils do not inactivate non-enveloped enteric viruses. Food Environ Virol 2012; 4(4): 209-212.
21. CromeansT , Park GW, Costantini V, Lee D, Wang Q, Farkas T, Lee A, Vinje J. Comprehensive comparison of cultivable norovirus surrogates in response to different inactivation and disinfection treatments. Appl Environ Microbiol 2014; 80(18): 5743-5751.
22. Lu Y, Wu C. Reduction of Salmonella enterica contamination on grape tomatoes by washing with thyme oil, thymol, and carvacrol as compared with chlorine treatment. J Food Prot 2010; 73(12): 2270-2275.