

BRIEF REPORT

Effect of Boiss Zataria Multiflora Essential Oil on Escherichia coli and Listeria monocytogenes Inoculated into Ground Silver Carp (*Hypophthalmichthys molitrix*)

Zahra Yaghoubzadeh¹,
Reza Safari¹

¹ Faculty Member Caspian Sea Ecology Research Center, Sari, Iran

(Received July 22, 2014; Accepted December 31, 2014)

Abstract

Background and purpose: *Escherichia coli* is a common cause of food poisoning. After entering the body, toxins will release in the intestinal. Toxin derived from this bacterium can damage the intestinal mucosal and cause severe abdominal pain and diarrhea. *Listeria monocytogenes* in animals and humans causes a serious infection called listeriosis that could be transferred to humans through contaminated food such as cheese, raw vegetables, salads and fish. This study aimed at evaluating the effect of essential oil of *Boiss Zataria multiflora* on the behavior of *E. coli* and *L. monocytogenes* in ground silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) stored at temperature C ° 4.

Materials and methods: The samples were inoculated separately by *E.coli* and *L. monocytogenes* at 4.5 and 4.6 log CFU/gr, respectively. Then, treatments of *B. Zataria multiflora* were prepared in two concentrations of 0.8% and 1.2%. All samples in both treatment and control group were stored at refrigerator temperature for 72 hr. The number of *E.coli* and *L. monocytogenes* were counted daily by cultivation on the Ecc Chromagar liquid and listeria selective chromagar medium.

Results: We observed significant antimicrobial effect in 1.2% concentration of *B. Zataria multiflora*, which was also able to reduce *E. coli* after 48 hours. This treatment had a high bactericidal effect, since no bacterial colonies were isolated at 48 and 72 hours. The studied concentrations of *B. Zataria multiflora*, showed inhibitory effects on *L. monocytogenes*.

Conclusion: *B. Zataria multiflora* was found to have bactericidal activity against *E.coli* while this activity was not considerable against *L. monocytogenes*.

Keywords: *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, Silver carp, *Zataria multiflora*

J Mazandaran Univ Med Sci 2015; 24(120): 100-106(Persian).

تأثیر اسانس آویشن شیرازی بر اشرشیا کلی و لیستریا منوسایتوژنر تلقیح شده به گوشت چرخ شده ماهی فیتوفاک

زهرا یعقوب زاده^۱

رضا صفری^۱

چکیده

سابقه و هدف: اشرشیا کلی علت شایع مسمومیت غذایی است. سم ناشی از این باکتری، مخاط روده را تخریب می‌کند و باعث ایجاد دردهای شدید شکمی و اسهال می‌شود. لیستریا منوسایتوژنر عامل لیستریوزیس در حیوان و انسان بوده و از طریق غذاهای آلوده مانند پنیر، سبزی‌های خام، سالاد و ماهی به انسان منتقل می‌شود. با توجه به احتمال بالای آلدگی ماهیان پرورشی به باکتری‌های اشرشیا کلی و لیستریا منوسایتوژنر، هدف مطالعه حاضر ارزیابی تأثیر اسانس آویشن شیرازی بر رفتار اشرشیا کلی و لیستریا منوسایتوژنر در گوشت چرخ شده ماهی فیتوفاک نگهداری شده در دمای ۴°C بوده است.

مواد و روش‌ها: به نمونه‌های گوشت ماهی فیتوفاک چرخ شده، دو باکتری اشرشیا کلی و لیستریا منوسایتوژنر به ترتیب با لوگ ۴/۵ و ۴/۶ در هر گرم تلقیح شد، سپس تیمارهای آویشن شیرازی در دو غلظت ۰/۸ و ۱/۲ درصد به نمونه‌ها اضافه شدند. تمامی تیمارها و گروه شاهد (دارای باکتری و فاقد عصاره) در دمای یخچال برای مدت ۷۲ ساعت نگهداری شدند. برای شمارش اشرشیا کلی و لیستریا منوسایتوژنر نیز از محیط‌های کشت EC کروم آگار و لیستریا سلکتیو کروم آگار استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد، غلظت ۱/۲ درصد آویشن دارای اثرات مهارکننده بیشتری نسبت به غلظت ۰/۸ درصد بوده ولی با این وجود تأثیر آن بر اشرشیا کلی بهتر از لیستریا بوده و قادر به کاهش تعداد اشرشیا بعد از ۴۸ ساعت است و اثر فوق نیز به صورت باکتری کشی بوده، طوری که در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت هیچ گونه رشدی از اشرشیا مشاهده نشد. تأثیر غلظت‌های مورد استفاده آویشن بر لیستریا به صورت اثر بازدارنده بوده است.

استنتاج: نتیجه‌گیری کلی آنکه اسانس آویشن شیرازی واجد اثرات باکتری کشی علیه اشرشیا بوده ولی با این وجود تأثیر آن بر لیستریا چندان چشمگیر نبوده است.

واژه‌های کلیدی: آویشن شیرازی، اشرشیا کلی، لیستریا منوسایتوژنر، فیتوفاک.

مقدمه

نگهدارنده‌های شیمیایی افزایش یافته است. اسانس‌های گیاهی و اجزاء تشکیل دهنده آن‌ها دارای اثرات شناخته شده ضد میکروبی هستند. به طور کلی هر چه مقادیر مواد فنولیک در اسانس بالاتر باشد، خواص آنتی

برای کنترل رشد باکتری‌های پاتوژن در محصولات غذایی می‌توان از نگهدارنده‌ها و ترکیبات ضد میکروبی استفاده کرد. امروزه تمایل به استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی با توجه به اثرات مضر استفاده از

Email: za_yaghoub@yahoo.com

مؤلف مسئول: زهرا یعقوب زاده - ساری، فخر آباد، پژوهشکده اکولوژی دریای خزر

۱. مری پژوهشی پژوهشکده اکولوژی دریای خزر ساری، ایران

۲. تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۴/۳۱ تاریخ ارجاع چهت اصلاحات: ۱۳۹۳/۸/۱۵

تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۱۰/۱۰

دیگران و مقایسه آن‌ها مشخص شد، غلظت بالاتر دارای تأثیرات کلی بیشتری هستند. از این‌رو در غلظت بالا برای ارزیابی رفتار باکتری‌های مذکور استفاده شد. هدف از انجام این تحقیق پژوهشی بررسی تأثیر اسانس آویشن شیرازی بر رفتار اشرشیا کلی و لیستریا منوسایتوژن در گوشت چرخ شده ماهی فیتوفاجک نگهداری شده در دمای 4°C بوده است.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی آویشن شیرازی: اسانس گیاه آویشن شیرازی (کد ۲۷۴۳، شیشه ۴۰ گرمی) از شرکت مکنولیا (ساوه، ایران) تهیه شد. سرشاخه‌های هوایی آویشن شیرازی حداقل ۰/۶ درصد اسانس، اسیدهای چرب، الثانولیک اسید، بتا-ستروپنیکول و بتولین دارد. اسانس گیاه حاوی ۶۹ درصد فنل و غالباً کارواکرول بوده و جزء اصلی ترکیبات غیر فلئی آن پاراسیمن^۸ است (۶ و ۷). ترکیبات عمده موجود در اسانس گیاه ایرانی، کارواکرول و تیمول و پس از این دو لیتالول^۹ و پاراسیمن است که به ترتیب ۶۱/۲۹، ۶۱/۱۸، ۲۵/۱۸، ۱/۹۰ درصد از اسانس حاصل از نمونه خشک گیاه را تشکیل می‌دهد (۸). کارواکرول جزء اصلی اسانس است.

آماده‌سازی باکتری اشرشیا کلی و لیستریا منوسایتوژن برای تلقیح: سویه استاندارد و لیوفلیزه Listeria monocytogenes PTCC 1163 Escherichia coli PTCC 1395 از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. آمپولهای لیوفلیزه باکتری‌ها ابتدا در شرایط استریل باز شد، سپس به محیط کشت مایع TSB^{۱۰} منتقل یافت و به مدت ۴۸ ساعت در 30°C انکوبه شد.

⁸ P-cymene

⁹ Linalool

¹⁰ Merk, Tryptic Soy Broth

باکتریال آن علیه پاتوژن‌های غذایی بیشتر خواهد بود. این ترکیبات شامل اوژنول^۱ کارواکرول^۲ و تیمول^۳ هستند (۱). از جمله این اسانس‌های گیاهی می‌توان از آویشن شیرازی^۴ نام برد که سرشاخه‌های خشک شده گیاه^۵ است. این گیاه از خانواده نعناعیان^۶ است که پراکندگی محدودی در جهان دارد و در ایران، افغانستان و پاکستان می‌روید (۲). این گیاه از قرن شانزدهم میلادی به عنوان گیاهی دارویی معروف شده است (۳).

لیستریا منوسایتوژن^۷ یک باکتری بیماری‌زای فرصت‌طلب است که باعث عفونت‌های حادی به نام لیستریوزیس در حیوان و انسان می‌شود. لیستریا منوسایتوژن از شایع‌ترین باکتری‌های ایجاد‌کننده منزه‌بیت نیز هست. این باکتری از طریق غذاهای آلوده مانند پنیر، سبزی‌های خام، سالاد آماده فروش و ماهی به انسان منتقل می‌شود (۴).

اساساً اشرشیا کلی علت شایع مسمومیت غذایی است. پس از ورود این باکتری از طریق دهان، وارد روده‌ها می‌شود و به سلول‌های مخاط روده می‌چسبد و شروع به تکثیر می‌کند. هنگامی که تعداد آن‌ها زیاد شود، شروع به آزاد کردن سم می‌کنند. سم ناشی از باکتری‌ها، مخاط روده را تخریب و دردهای شدید شکمی و اسهال ایجاد می‌کند. انتقال بیماری از طریق (مواد غذایی - انسان) است. حداقل غلظت بیماری‌زایی ۱۰۸-۱۰۱۰ در هر گرم ماده غذایی است (۵).

برای ارزیابی اثرات یک عصاره در اکثر مقالات از چند غلظت استفاده می‌شود که با توجه به مطالعات

¹ Eugenol

² Carvacrol

³ Thymol

⁴ Zataria multiflora

⁵ Boiss Zataria multiflora

⁶ Lamiaceae

⁷ Listeria monocytogenes

بررسی در مجموع ۲۷ نمونه بود. شمارش باکتری‌ها مطابق با منابع موجود در مک فادین انجام شد (۹).

تجزیه و تحلیل آماری

آنالیز آماری داده‌ها با بهره‌گیری از نرم‌افزار SPSS17 و توسط آزمون‌های آماری کلموگروف-اسمیرنف و ANOVA یک طرفه و مقایسه میانگین‌ها نیز با آزمون دانکن انجام شد (۱۰).

یافته‌ها و بحث

در این مطالعه اثرات ضد باکتریایی اسانس آویشن شیرازی بر باکتری‌های اشرشیا کلی و لیستریا منوسایتوژنر بررسی شد که نتایج بیانگر وجود اثر بازدارندگی^۳ و باکتری کشی^۴ اسانس آویشن شیرازی بود. در مطالعات متعددی گزارش شده که اثر ضد میکروبی اسانس‌های گیاهی وابسته به غلظت است (۱۱). مارینو^۵ و همکاران در سال ۱۹۹۹ و در سال ۲۰۰۳ نشان داده‌اند، اسانس‌های گیاهی اثر ضد میکروبی بر H7 E.coli O157: با نتایج این تحقیق با نتایج به دست آمده توسط کارمن^۶ و همکاران در سال ۲۰۰۱ که اثرات ضد میکروبی برخی از گیاهان خانواده نعنایان را روی برخی از باکتری‌های گرم مثبت و منفی مثل استافیلوکک ارئوس، لیستریا منوسایتوژنر، اشرشیا کلی و سودوموناس بررسی کرده، مطابقت دارد. آن‌ها علت احتمالی این اثرات را میزان بالای کارواکرول موجود در اسانس بیان کرده‌اند (۱۴). طبق نتایج این مطالعه، غلظت ۱/۲ درصد اسانس آویشن شیرازی اثر باکتری کشی قوی بر باکتری اشرشیا کلی داشته است ولی اثر بازدارندگی پایینی بر رشد

آماده‌سازی ماهی فیتوفاگ^۱: ابتدا ۱۰ کیلوگرم ماهی فیتوفاگ^۱ از سطح مزارع پرورشی صید و داخل جعبه‌های حاوی یخ گذاشته شد. سپس به آزمایشگاه میکروبیولوژی پژوهشکده اکولوژی دریای خزر منتقل شد و پس از شستشوی ماهیان عملیات پوست کنی انجام پذیرفت. سپس سطح زیرین گوشت بدون تماس با امعاواحشا برداشته و به وسیله چرخ گوشت دو بار چرخ شد. بعد از آن به نمونه‌های گوشت چرخ شده ماهی، میزان لگاریتم ۴/۵ CFU/g باکتری تلقیح شد. نمونه‌های گوشت تلقیح شده کاملاً هموژن شدند. از این گوشت تلقیح شده برای تهیه همه تیمارهای مورد آزمایش استفاده شد.

پس از تهیه فیله از ماهی فیتوفاگ^۱، ۲۰ گرم از فیله تهیه شده به ظروف پلاستیکی استریل شده با اشعه گاما اضافه شد. سوش لیوفلیزه اشرشیا کلی و لیستریا منوسایتوژنر پس از آماده‌سازی اولیه در محیط کشت مایع TSB سانتریفوژ شده و پس از شستشو با سرم فیزیولوژی و به دست آوردن لوگ مورد نظر (مقایسه با لوله ۰/۵ مک فارلند^۲، کدورت لوله ۰/۵ مک فارلند معادل ۱۰۸ CFU/ml)، برای تلقیح به فیله آماده شد. غلظت‌های موردنظر برای آویشن ۰/۸ و ۱/۲ و ۰/۸ و ۱/۲ میلی لیتر از اسانس را در ۱۰۰ گرم فیله، این مقدار در محلول DMSO به مقدار لازم اضافه و سپس بر روی فیله اسپری شد) درصد بوده که با احتساب سه تکرار برای هر آزمایش و سه تکرار برای نمونه شاهد، تعداد تیمارهای موردنظر ۹ تیمار بوده که برای دو باکتری ۱۸ تیمار بوده است. پس از اضافه کردن باکتری و آویشن به فیله، رفتار باکتری‌ها (شمارش تعداد کلی‌های باکتری در یک گرم از فیله) در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت. تعداد نمونه‌های مورد

³ Bacteriostatic

⁴ Bactericidal

⁵ Marino

⁶ Karaman

¹ Hypophthalmichthys molitrix

² Mcfarland

جدول شماره ۲: اثر ضد لیستریایی آویشن شیرازی در ۲ سطح ۰/۸ و ۱/۲ درصد (v/w) در گوشت چرخ شده ماهی فیتوفاک طی ۷۲ ساعت نگهداری در دمای یخچال (۴°C)

		زمان (ساعت)		تیمار	
ساعت ۷۲		۴۸ ساعت	۲۴ ساعت	صفرا	شامل
۷/۱۷±۰/۰۷	۷/۰۹±۰/۰۵	۵/۳±۰/۰۷	۴/۶۰±۰/۰۰		شامل
۶/۸±۰/۱۴	۵/۵۷±۰/۱۰	۵/۱۴±۰/۱۰	۴/۶۰±۰/۰۰	آویشن ۰/۸ درصد	آویشن ۰/۸
۴/۵±۰/۰۳	۴/۱۷±۰/۰۷	۴/۸۲±۰/۱۱	۴/۶۰±۰/۰۰	آویشن ۱/۲ درصد	آویشن ۱/۲

*(Log CFU/g) ± SE

نتایج گزارش شده در مورد خواص ضد باکتری اسانس‌های مختلف بسیار مشکل است، از دلایل آن می‌توان به تفاوت در روش‌های مختلف بررسی خواص ضد باکتری اسانس‌ها، منابع تهیه آن‌ها و سویه‌های باکتریایی به کار برده شده، اشاره کرد (۱۷).

نتیجه‌گیری کلی که از این تحقیق حاصل می‌شود، این است که اسانس عصاره‌های گیاهی به عنوان نگهدارنده‌های جدید و بیولوژیک قادر به کاهش بار میکروبی در مواد غذایی از جمله آبزیان هستند و می‌توان از آن‌ها به عنوان مواد نگهدارنده برای کاهش بار میکروبی باکتری‌های گرم منفی نظیر اشرشیا کلی و گرم مثبت نظیر لیستریا منوسایتوژنر استفاده کرد. در نتیجه استفاده از اسانس آویشن شیرازی به عنوان یک افزودنی طبیعی، برای افزایش ماندگاری فیله ماهی فیتوفاک مناسب است.

جدول شماره ۱: اثر ضد اشرشیا کلی آویشن شیرازی در ۲ سطح ۰/۸ و ۱/۲ درصد (v/w) در گوشت چرخ شده ماهی فیتوفاک طی ۷۲ ساعت نگهداری در دمای یخچال (۴°C)

		زمان (ساعت)		تیمار	
ساعت ۷۲		۴۸ ساعت	۲۴ ساعت	صفرا	شامل
۷/۲۴±۰/۱۶	۶/۰۴±۰/۰۳	۵/۵۴±۰/۰۲	۴/۵±۰/۰۰		شامل
۴۲	۴۳	۴/۰۰±۰/۴۶	۴/۵±۰/۰۰	آویشن ۰/۸ درصد	آویشن ۰/۸
۴۳	۴۳	۴/۵±۰/۰۰	۴/۵±۰/۰۰	آویشن ۱/۲ درصد	آویشن ۱/۲

*(Log CFU/g) ± SE

باکتری لیستریا منوسایتوژنر داشت. همان‌طور که در مطالعات انجام شده توسط فریدمن^۱ و همکاران در سال ۲۰۰۲ نشان داده شد، اسانس‌های گیاهی اثر باکتری کشی بر اشرشیا کلی داشته‌اند (۱۵).

در این مطالعه هم غلظت ۰/۸ درصد اسانس آویشن شیرازی اثر مهاری پایینی بر رشد باکتری داشت و غلظت آویشن به مقدار ۱/۲ درصد فعالیت زیادی دارد. برت^۲ و همکاران در سال ۲۰۰۳ دریافتند، اسانس آویشن در غلظت‌های پایین مانند ۰/۱۲ و ۰/۲۵ درصد به ترتیب اثر بازدارندگی و باکتری کشی بر اشرشیا کلی دارد (۱۶). در مطالعه حاضر هم اسانس آویشن در غلظت‌های پایین مانند ۰/۸ و ۱/۲ درصد به ترتیب اثر بازدارندگی و باکتری کشی بر گوشت چرخ شده ماهی فیتوفاک نگهداری شده در دمای یخچال دارد. مقایسه

¹ Friedman

² Burt

References

- Dufour M, Simmonds RS and Brem PJ. Development of a method to quantify in vitro the synergistic activity of "natural" antimicrobials. *Int J Food Microbiol.* 2002; 85(3):249 - 58.
- Misaghi A, Akhondzadeh Basti A. Effects of *Zataria multiflora* Boiss. Essential oil and nisin on *Bacillus cereus* ATCC 11718. *Food Control.* 2007; 18(9): 1043 – 1049.
- Jamzade M. Handbook of zataria. Tehran; Research Institute of Forests and Rangelands;1995.
- Sadiq E, Almasi A, Bohlouli Oskouei S. Survey the microbial total count and Listeria monocytogenes on fresh fish in Kermanshah. *J Mar Sci Tech.* 2010; 9(3).
- Noori N, Rokni N, Akhondzadeh Basti A, Misaghi A, Dabbagh Moghaddam A,
- Yahyaraeyat R, et al. The antimicrobial effect of ZatariamultifloraBoiss essential 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. Journal of Army University. 2012; 10 (3): 192-1976.(Persian).
- Gupta GS, Gupta NL. Constituents of *Zataria multiflora*. *Phytochemistry.*1972; 11(1): 455-456.
- Duke JA. CRC. Handbook of medicinal Herbs. florida: CRC Press, 1989; 483-4, 567.
- Javydnya K. Identification of compounds in essential oils Shirazi, *Ziziphora tenuior* and chamomile species and their antibacterial, Alktrvaspy using mass spectrometry in the study group, nitro compounds [PhD thesis].Tehran: Tehran University of Medical Sciences; 1376.
- Macfaddin JF. Biochemical tests for Identification of Medical Bacterial. 3th ed. Philadelphia:Lippincott Williams &Wilkins; 2000.p. 374 .
- Yin L, CW W, Jiang ST. Biopreservative effect of pediocin ACCEL on refrigerated seafood. *Fisheries Science.* 2007; 73(4):907-912.
- Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int J Food Microbiol.* 2004; 94(3): 223-253.
- Marino M, Bersani C, Comi G. Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus ulgaris* L. measured using a bioimpedometric method. *J Food Prot* 1999; 62(9): 1017-1023.
- Sağdıç O, Kuşcu A, Özcan M, Özçelik S. Effects of Turkish spice extracts at various concentrations on the growth of *Escherichia coli* O157: H7. *Food Microbiology.* 2002; 19(5): 473-480.
- Karaman S, Digrak M, Ravid U, Ilcim A. Antibacterial and antifungal activity of the essential oils of *Thymus revolutus* Celak from Turkey. *Journal of Ethnopharmacol.* 2001;76(2); 183-186.
- Friedman M, Henika PR, Mandrell RE. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *J Food Prot.* 2002; 65(10): 1545-1560.

18. Burt SA, Reinders RD. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. Lett Appl Microbiol 2003; 36(3): 162-167.
19. Akhundzadeh basti A, Razavilor V, Misaghi A, Radmehr B, Abbasi far R, Yazdani D , et al. Effect of Zataria multiflora Bioss on *Staphylococcus aureus* growth potential in the brain and heart infusion broth. Journal of Medicinal Plants. 2004; 3(11):42-47.(Persian).