Archive of SID

مطالعه اثر اسانس آویشن شیرازی و اسید استیک بر تولید توکسین TDH باکتری ویبریوپاراهمولیتیکوس

نرجس چراغی[1]، افشین آخوندزاده‌بستی[2]*، علی خنجری[3]، حسین اسماعیلی[4]، نگین نوری[3]، حمید محمدی نصرآبادی[5]، زهرا امانی[6]

1- دستیار تخصصی، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
2- استاد، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
3- استادیار، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
4- استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
5- دانشجوی دکترای جنگلداری، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
6- دانشجوی دکترای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
*آدرس مکاتبه: تهران، خیابان آزادی، خیابان دکتر قریب، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، کدپستی: 63111 - 14199، تلفن: 66923510 (021)، نمابر: 66933222 (021)
پست الکترونیک: aakhond@ut.ac.ir

تاریخ دریافت: 91/8/27 **تاریخ تصویب:** 92/2/16

چکیده

مقدمه: مصرف غذاهای دریایی آلوده به ویبریوپاراهمولیتیکوس می‌تواند سبب ایجاد گاستروآنتریت در انسان شود. توکسین همولیزین مستقیم مقاوم به حرارت از عوامل حدت ارگانیسم بوده و نقش مهمی در بیماریزایی دارد.

هدف: هدف از مطالعه بررسی اثرات اسانس آویشن شیرازی و اسید استیک روی میزان تولید توکسین همولیزین مقاوم به حرارت توسط باکتری ویبریوپاراهمولیتیکوس در غلظت‌های تحت بازدارنده این ترکیبات بود.

روش بررسی: تولید توکسین باکتری در 5 غلظت اسانس آویشن شیرازی (صفر، 0/005، 0/015، 0/03، 0/045 درصد)، 3 سطح pH (7/5، 6/5 و 5/5) حاصل از اسید استیک و سه درجه حرارت نگهداری (35، 25 و 8 درجه سانتی‌گراد) در محیط کشت آبگوشت قلب و مغز مورد بررسی قرار گرفت و پس از ایجاد کدورت در محیط، تعداد باکتری‌ها شمارش شد و توکسین توسط کیت KAP-Rpla اندازه‌گیری شد.

نتایج: تیترتوکسین تولیدی در pH= 7/5 و دمای 35 درجه در حالت صفر اسانس آویشن شیرازی $\frac{1}{256}$ بود، در حالی‌که این میزان در شرایط مشابه در حالت 0/015 درصد اسانس برابر با $\frac{1}{32}$ بود. همچنین تیترتوکسین در دمای 25 درجه و pH= 6/5 برابر با $\frac{1}{256}$ بود در صورتی‌که این میزان با شرایط یکسان در حالت 0/015 درصد اسانس آویشن شیرازی $\frac{1}{8}$ بود.

نتیجه‌گیری: اسانس آویشن شیرازی به همراه pH ها و دماهای مختلف نگهداری بر میزان تولید توکسین همولیزین مستقیم مقاوم به حرارت (TDH) توسط باکتری اثر کاهشی دارند. پیشنهاد می‌شود این مطالعه در مدل غذایی نیز مورد بررسی قرار گیرد تا در صورت مثبت بودن اثرات آن بتوان از این ترکیبات به عنوان نگهدارنده مناسب جهت پیشگیری از بیماریزایی ویبریوپاراهمولیتیکوس استفاده کرد.

گل‌واژگان: اسید استیک، اسانس آویشن شیرازی، ویبریوپاراهمولیتیکوس، TDH

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

یکی از خطرناک‌ترین پاتوژن‌های نوظهور (Emerging pathogen) باکتری‌های متعلق به جنس ویبریو است [1]. ویبریوپاراهمولیتیکوس (*Vibrio parahaemolyticus*) یک باکتری گرم منفی در مناطق دریایی و میکروفلور معمول آب‌های دریایی و مصب رودخانه‌ها است که در دامنه دمایی 5 تا 43 درجه سانتی‌گراد رشد کرده و جهت رشد به حداقل 0/5 درصد نمک نیاز دارد [2].

ویبریوپاراهمولیتیکوس سبب ایجاد گاستروآنتریت و همچنین گاهی عفونت‌های خارج روده‌ای نظیر عفونت چشم، گوش و عفونت زخم در اندام‌های انتهایی انسان می‌شود [1]. بروز بالای بیماری به طور مستقیم مرتبط با مصرف غذاهای دریایی است و هنگامی غذاهای دیگر عامل ایجادکننده بیماری هستند که آلودگی متقاطع صورت گرفته باشد [۲،۳].

توکسین همولیزین مستقیم مقاوم به حرارت Thermostable Direct Haemolysin (TDH) تولید شده توسط این باکتری که از عوامل حدت آن نیز می‌باشد، به حرارت مقاوم بوده و می‌تواند حرارت 100 درجه سانتی‌گراد را 10 دقیقه در pH= 6 تحمل کند اما به تریپسین حساس می‌باشد [5، 4، 3]. زمانی که تعداد سلول‌های باکتری به 10^6 سلول در هر گرم برسد، TDH قابل تشخیص خواهد بود [3]. توکسین‌های تولید شده توسط ویبریوپاراهمولیتیکوس سبب آسیب سلولی، ایجاد منفذ در سلول و در نتیجه از دست رفتن آب و الکترولیت‌ها می‌شود [6].

تقریباً یک درصد از سویه‌های ویبریوپاراهمولیتیکوس جدا شده از غذاهای دریایی و 96 درصد از سویه‌های جدا شده از بیماران، توکسین TDH تولید می‌کنند. در آزمایش خوراندن سویه‌های فاقد TDH به افراد داوطلب هیچ‌یک از داوطلبان علایم بیماری را نشان ندادند [۱،۴].

اسانس‌های روغنی، ترکیبات روغنی حاوی مواد معطره می‌باشند که از قسمت‌های مختلف گیاهان به طرق مختلف مانند تخمیر، فشار و تقطیر با بخار آب به دست می‌آیند. ترکیبات فنلی موجود در اسانس‌های روغنی مسئول خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی آن می‌باشند [6].

یکی از تقسیم‌بندی‌های پایه‌ای در ارتباط با سلامتی غذا، تقسیم‌بندی بر اساس غذاهای با اسیدیته بالا یا پایین و همچنین بر طبق نگهدارنده موجود در ماده غذایی است [7]. اسیدهای خوراکی تأثیر مستقیم بر طعم و کیفیت برخی از غذاهای طبیعی و فرآوری شده دارند و از آنها به عنوان نگهدارنده یا پایدارکننده در ماده غذایی استفاده می‌شود [8]. اسید استیک محلول در چربی بوده و قادر است به سرعت از طریق غشاء پلاسمایی منتشر شود و موجب کاهش pH سلول‌ها شود. همچنین از آن در سراسر جهان به عنوان افزودنی و نگهدارنده در مواد غذایی استفاده می‌شود [10، 9].

این مطالعه به منظور بررسی اثرات اسانس روغنی آویشن شیرازی (*Zataria multiflora* Boiss.) و اسید استیک بر میزان تولید توکسین همولیزین مقاوم به حرارت توسط باکتری ویبریوپاراهمولیتیکوس در غلظت‌های تحت بازدارنده این ترکیبات صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

طرح کلی

طرح کلی مطالعه شامل 5 غلظت اسانس روغنی آویشن شیرازی (غلظت‌های صفر، 0/005، 0/015، 0/03، 0/045 درصد)، 3 سطح pH حاصل از اسید استیک (7/5، 6/5 و 5/5) و سه درجه حرارت نگهداری (35، 25 و 8 درجه سانتی‌گراد) در محیط کشت آبگوشت قلب و مغز است. لازم به ذکر است که پس از ایجاد کدورت تعداد باکتری در آگار قلب و مغز شمارش و سپس اندازه‌گیری توکسین صورت گرفت.

تهیه اسانس روغنی آویشن شیرازی و آنالیز آن

گیاه آویشن شیرازی ازفیروز آباد شیراز واقع در استان فارس در فصل تابستان جمع‌آوری شد و پس از تأیید نام علمی و تهیه نمونه هرباریومی به شماره F-1-8-4-21 توسط

www.SID.ir

Archive of SID

گیاه‌شناسان پژوهشکده «گیاهان دارویی جهاددانشگاهی»، برگ‌های آن جدا، خشک و پودر شد و در ظروف تیره نگهداری شد و اسانس روغنی آویشن شیرازی به روش تقطیر با بخار آب توسط دستگاه کلونجر تهیه شد. سپس آنالیز اسانس مذکور توسط دستگاه گاز کروماتوگراف متصل به طیف‌نگار جرمی (GC/MS) انجام شد. دستگاه GC/MS با ستون موئینه به طول 30 متر و قطر داخلی 250 میکرومتر و ضخامت لایه داخلی 0/25 میکرومتر با برنامه دمایی 265 - 50 درجه سانتی‌گراد با افزایش تدریجی 2/5 درجه در هر دقیقه و نگهداری ستون در 265 درجه به مدت 30 دقیقه استفاده شد. دمای اتاقک تزریق 250 درجه و گاز کامل هلیم با سرعت 1/5 میلی‌متر در دقیقه بود، شناساگر EI با انرژی یونیزاسیون 70 الکترون ولت و دمای منبع یونیزاسیون 250 درجه بود.

باکتری مورد مطالعه

باکتری مورد مطالعه ویبریوپاراهمولیتیکوس ATCC 43996 از گروه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه شد. در ابتدا این کشت لیوفیلیزه در محیط آبگوشت قلب و مغز در 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 6 ساعت دو مرتبه به طور متوالی کشت داده شد، سپس کشت دوم به نسبت 1 به 5 با گلیسیرین استریل مخلوط و در حجم‌های 500 میکرولیتری در میکروتیوب‌های اپندروف در 20- درجه سانتی‌گراد تا هنگام آزمایش نگهداری شد.

تهیه میزان تلقیح باکتری

تهیه میزان تلقیح باکتری مورد آزمایش، با انتقال باکتری از لوله میکرو اپندرف به محیط آبگوشت قلب و مغز و نگهداری به مدت 6 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. سپس کشت دومی از این کشت 6 ساعته اول، انجام شد و در دمای 37 درجه به مدت 6 ساعت گرمخانه‌گذاری شد. سپس مقادیر مختلفی از این کشت دوم به لوله‌های کووت (Cuvett) حاوی 4 میلی‌لیتر آبگوشت قلب و مغز منتقل شد تا جایی که لوله کووت جذب نوری 0/1 را در طول موج 600 نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Milton Ray Company, USA) نشان داد. سپس از این لوله کووت روی محیط کشت آگار قلب و مغز کشت داده شد تا میزان باکتری‌ها در هر میلی‌لیتر از آبگوشت قلب و مغز کووت موردنظر به دست آمد که این میزان برابر با تعداد $4/9 \times 10^6$ باکتری در هر میلی‌لیتر بود. سپس میزان 204 میکرولیتر از این سوسپانسیون را در داخل لوله‌های 9 میلی‌لیتری حاوی حالات مختلف مورد استفاده در این تحقیق تلقیح شد.

نحوه تعیین تولید و میزان توکسین توسط کیت

پس از ایجاد کدورت در لوله‌ها مقدار 0/5 میلی‌لیتر از آن را برداشت کرده و با روش رقت‌سازی و کشت روی محیط آگار قلب و مغز، تعداد باکتری در هر میلی‌لیتر از آبگوشت قلب و مغز را به دست آوردیم. سپس لوله محتوی باقی‌مانده آبگوشت قلب و مغز را با استفاده از سانتریفوژ در 3000 دور و دمای 20 درجه سانتی‌گراد به مدت 20 دقیقه سانتریفوژ نمودیم. پس از این مرحله مقدار 25 میکرولیتر رقیق‌کننده را در دو ردیف در داخل 8 چاهک ریخته و به داخل دو چاهک اول از هر ردیف رقیق‌کننده اضافه نکردیم. سپس مقدار 25 میکرولیتر از مایع رویی حاصل از سانتریفوژ باکتری را به داخل دو چاهک اول از هر ردیف ریختیم. بعد از این مرحله مقدار 25 میکرولیتر از مایع رویی حاصل از سانتریفوژ باکتری را به داخل چاهک دوم از ردیف اول ریختیم و با روش رقت‌سازی دو تایی و انتقال آن به چاهک‌های بعدی آن را رقیق نمودیم. مشابه همین عمل هم در مورد ردیف دوم صورت پذیرفت. سپس مقدار 25 میکرولیتر از محلول Sensitize latex را به چاهک‌های ردیف اول اضافه کردیم و بعد از آن مقدار 25 میکرولیتر از محلول Control latex را به چاهک‌های ردیف دوم افزودیم. در مرحله بعد مقدار 25 میکرولیتر توکسین خالص را به همراه 25 میکرولیتر محلول Sensitize latex در چاهک جداگانه‌ای به عنوان شاهد مثبت ریختیم و میکرو پلیت را در ظرف دربسته‌ای که کف آن آب وجود داشت، قرار داده، در ظرف را بسته و به مدت 18 ساعت در

www.SID.ir

Archive of SID

دمای اتاق قرار دادیم. آگلوتینه شدن در هر چاهک نشانه وجود توکسین در آن چاهک است و با توجه به مکان چاهک مورد نظر رقت توکسین را طبق پروتوکل شرکت سازنده کیت (DENKA seiken, Japan) محاسبه شد.

آنالیز آماری

اثرات اسانس روغنی آویشن شیرازی بر میزان تولید توکسین باکتری با استفاده از آنالیز واریانس (ANOVA) یک‌طرفه با کمک نرم‌افزار SPSS ارزیابی شد.

نتایج

میزان بازده اسانس روغنی آویشن شیرازی برابر با 2/4 درصد (v/w) بود. نتایج آنالیز اسانس مذکور در جدول شماره 1 نشان داده شده است و مهم‌ترین ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس، کارواکرول (73/64 درصد) و تیمول (4/31 درصد) بود. در غلظت‌های 0/03 درصد و بالاتر اسانس روغنی آویشن شیرازی هیچ‌گونه رشدی رخ نداد. میزان تیترتوکسین تولیدی در pH=7/5 و دمای 35 درجه در حالت صفر درصد اسانس آویشن شیرازی برابر با $\frac{1}{256}$ بود، در حالی‌که این میزان در شرایط مشابه در حالت 0/015 درصد اسانس برابر با $\frac{1}{32}$ بود. همچنین میزان تیترتوکسین تولیدی در دمای 25 درجه و pH=6/5 برابر با $\frac{1}{256}$ بود در صورتی که این میزان با شرایط یکسان در حالت 0/015 درصد اسانس آویشن شیرازی برابر $\frac{1}{8}$ بود. میزان تیتر توکسین تولیدی در دمای 8 درجه و pH=5/5 برابر $\frac{1}{128}$ بود در صورتی‌که این میزان با شرایط یکسان در حالت 0/015 درصد اسانس آویشن شیرازی هیچ‌گونه توکسینی تشخیص داده نشد (جدول شماره 2).

جدول شماره 1- آنالیز ترکیبات اسانس روغنی گیاه آویشن شیرازی بوسیله گاز کروماتوگراف – طیف‌سنج جرمی

ترکیبات	شاخص بازداری	درصد
آلفا پینین (α- pinen)	936	0/63
1 اکتین تریول (1-octen-3-ol)	982	0/29
تری اکتانون (3-octanone)	988	0/75
بتا میرسین (β-myrcene)	992	0/56
تری اکتانول (3-octanol)	996	0/34
1 فلاندرین (1-phellanderene)	1003	0/27
آلفا تریپینین (α -tripenen)	1017	0/76
بتا فلاندرین (β-phellanderene)	1031	0/33
1 و 8 سینئول (1,8-cineole)	1033	0/52
گاما تریپینین (γ-terpinene)	1062	2/27
آلفا تریپینولین (α -tripinolene)	1088	0/26
لینالئول (linalool)	1101	1/28
تیمیل متیل اتر (thymyl methyl ether)	1236	0/62
کارواکرول متیل اتر (carvacrol methyl ether)	1248	3/15
تیمول (thymol)	1294	4/31

www.SID.ir

Archive of SID

ادامه جدول شماره 1-

ترکیبات	شاخص بازداری	درصد
کارواکرول (carvacrol)	1320	73/64
ایزوپیپریتون (isopiperitone)	1365	0/59
کارواکریل استات (carvacryl acetate)	1381	1/7
ترانس کاریوفلین (trans-caryophellene)	1428	2/93
آلفا هومولین (alpha-humulene)	1460	0/35
(+) اسپاتولنول (spathulenol)	1587	0/58
کاریوفلین اکسید (caryophellene oxide)	1595	0/83
مجموع		96/96

جدول شماره 2- میزان تیتر تولید توکسین در غلظت‌های مختلف اسانس روغنی آویشن شیرازی در درجه حرارت‌های 35، 25 و 8 درجه سانتی‌گراد و pH های 7/5، 6/5 و 5/5

دما (درجه سانتی‌گراد)	غلظت اسانس (درصد)	میزان تیتر توکسین		
		pH =7.5	pH=6.5	pH =5.5
35	0	1/256	1/256	1/128
35	0/005	1/256	1/256	1/64
35	0/015	1/32	1/16	-
25	0	1/256	1/256	1/128
25	0/005	1/128	1/128	1/64
25	0/015	1/16	1/8	-
8	0	1/256	1/256	1/128
8	0/005	1/128	1/64	1/64
8	0/015	1/4	1/4	-

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

تا به حال مطالعات زیادی در ارتباط با تأثیر نگهدارنده‌های مختلف بر ممانعت از رشد و بیماریزایی پاتوژن‌های غذایی صورت گرفته اما مطالعات محدودی در رابطه با اثر این ترکیبات بر تولید توکسین و یا سایر عوامل حدت میکروارگانیسم‌ها انجام شده، بخصوص در مورد ویبریوپاراهمولیتیکوس که طبق منابع توکسین باکتری نقش مهمی در بیماریزایی دارد. به برخی از مطالعات صورت گرفته در ادامه اشاره می‌شود.

مطالعه پارسایی‌مهر و همکاران (2009) در مورد اثرات اسانس روغنی آویشن شیرازی، نیسین و ترکیب هم‌زمان این دو روی تولید انتروتوکسین c و آلفا - همولیزین استافیلوکوکوس اورئوس نشان داد که در حضور اسانس آویشن شیرازی تولید انتروتوکسین توسط این باکتری در محیط آبگوشت قلب و مغز به صورت معنی‌داری کاهش می‌یابد، همچنین تولید این دو توکسین در حضور توأم اسانس آویشن و نیسین به صورت معنی‌داری کاهش می‌یابد [11].

فریدمن و همکاران در سال 2011 اثر ترکیب 4- هیدروکسی تیروزول زیتون را بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و انتروتوکسین A این باکتری بررسی کردند و نشان دادند که موجب مهار رشد باکتری و فعالیت بیولوژیک انتروتوکسین نام برده می‌شود [12].

سوزا و همکاران نیز در سال 2010 تأثیر اسانس مرزنجوش را بر تولید توکسین استافیلوکوکوس اورئوس ارزیابی کردند. در این مطالعه کاهش تولید انتروتوکسین در براث در غلظت‌های تحت بازدارنده از این اسانس مشاهده شد [13].

استانساواپاک در سال 2000 نشان داد که میزان تولید TDH توسط ویبریو پاراهمولیتیکوس در درجه حرارت‌های مختلف متفاوت است به طوری‌که بیشترین میزان آن در دمای 35 درجه سانتی‌گراد بود در حالی‌که کمترین میزان تولید در دمای 4 و 42 درجه سانتی‌گراد بود [14]. نتایج تحقیق ما نیز با این مطالعه همخوانی داشت. بر اساس یافته‌های این مطالعه میزان رشد و تولید توکسین بین دماهای مختلف گرمخانه‌گذاری (8 – 25 - 35 درجه سانتی‌گراد) تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($p<0/05$). فاکتور دیگر مورد بررسی در این مطالعه pH محیط کشت بود. برای تنظیم pH جهت انجام این مطالعه، اسید استیک به کار گرفته شد که نسبت به سایر اسیدهای مشابه دارای اثرات ضدمیکروبی بالاتری می‌باشد. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که اسانس روغنی آویشن شیرازی به همراه pH های مختلف به کار گرفته شده و دماهای مختلف نگهداری اثر معنی‌داری بر میزان تولید توکسین توسط باکتری ویبریوپاراهمولیتیکوس دارند به طوری‌که با افزایش غلظت اسانس یا کاهش pH و کاهش درجه حرارت درصد احتمال رشد و میزان تولید توکسین کاهش یافت.

مطالعه‌ی ژانگ و همکاران (2008) نشان داد که غلظت 125 گرم / لیتر عصاره زرشک قرمز توانایی ممانعت‌کنندگی از رشد ویبریو کلرا را دارد. سپس اثر آن بر تولید کلراتوکسین توسط الایزا بررسی و مشخص شد در حضور غلظت‌های کمتر از ممانعت‌کنندگی تولید کلرا توکسین کاهش یافت به طوری که در حضور غلظت 10 گرم/ لیتر این عصاره تولید توکسین مهار شد [15].

نتیجه‌گیری

به علت اینکه استفاده از مقادیر بالای اسانس‌ها از لحاظ اقتصادی و همچنین تأثیر بر خواص ارگانولپتیک غذا مناسب نیست بنابراین تلاش جهت کاهش دادن میزان استفاده از این ترکیبات مدنظر قرار گرفته است تا با تأثیر روی عوامل حدت ارگانیسم‌ها از بیماریزایی آنها کاسته شود. لذا با توجه به نتایج این مطالعه که نشان می‌دهد که اسانس آویشن شیرازی به همراه pH های مختلف به کار گرفته شده و دماهای مختلف نگهداری بر میزان تولید توکسین TDH تولیدی توسط باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس اثر کاهشی دارند، به طوری‌که با افزایش غلظت اسانس یا کاهش pH و کاهش درجه حرارت میزان تولید توکسین کاهش یافت. پیشنهاد می‌شود که این

www.SID.ir

Archive of SID

مطالعه در مدل غذایی مورد بررسی قرار گیرد تا در صورت مثبت بودن اثرات آن بتوان از این ترکیبات به عنوان نگهدارنده مناسب جهت پیشگیری از بیماریزایی ویبریوپاراهمولیتیکوس مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

1. Bhunia AK. Foodborne microbial pathogens: Mechanisms & pathogenesis (Food science texts series). 1st ed. Springer. 2008.

2. Ray B. Fundamental food microbiology. CRC Press. 2004.

3. Jay JM, Loessner MJ, Golden DA. Modern food microbiology. 7th ed. USA. Springer. 2005.

4. Razavilar V. Pathogenic Microorganisms in foods and Epidemiology Food Poisoning. 3rd ed. University of Tehran Press. Tehran. 2008.

5. Desmachelier P. Vibrio, introduction, including *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*. Encyclopedia of food microbiology. Academic Press. London. 2000, pp: 2237 - 42.

6. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int. J. Food Microbiol*. 2004; 94 (3): 223 - 53.

7. Nakai SA, Siebert KJ. Validation of bacterial growth inhibition models based on molecular properties of organic acids. *Int. J. Food Microbiol*. 2003; 86 (3): 249 - 55.

8. Gomis DB. HPLC analysis of organic acids. Food Analysis by HPLC. Marcel Dekker AG. New York. 2000, pp: 371 – 85.

9. Greenacre E, Brocklehurst T, Waspe C, Wilson D, Wilson P. *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* and *Listeria monocytogenes* acid tolerance response induced by organic acids at 20 C: optimization and modeling. *Appl. Environ. Microbiol*. 2000; 69 (7): 3945 - 51.

10. Smulders F, Greer G. Integrating microbial decontamination with organic acids in HACCP programmes for muscle foods: prospects and controversies. *Int. J. Food Microbiol*. 1998; 44 (3): 149 - 69.

11. Parsaeimehr M, Basti AA, Radmehr B, Misaghi A, Abbasifar A, Karim G and et al. Effect of *Zataria multiflora* boiss. Essential oil, nisin, and their combination on the production of enterotoxin C and α-hemolysin by *Staphylococcusaureus*. *Foodborne Pathogens Dis*. 2010; 7 (3): 299 - 305.

12. Friedman M, Rasooly R, Do PM, Henika PR. The Olive Compound 4-Hydroxytyrosol Inactivates *Staphylococcusaureus* Bacteria and Staphylococcal Enterotoxin A (SEA). *J. Food Sci*. 2011; 76 (8): M558 - M63.

13. De Souza EL, de Barros JC, de Oliveira CEV, da Conceição ML. Influence of Origanum vulgare L. essential oil on enterotoxin production, membrane permeability and surface characteristics of *Staphylococcusaureus*. *Int. J. Food Microbiol*. 2010; 137 (2): 308 - 11.

14. Stonsaovapak S. Effects of Temperature and Cell Number on the Production of Hemolysin by *Vibrioparahaemolyticus*. *Kasetsart J*. 2000; 34: 248 - 53.

15. Zhong Z, Yu X, Zhu J. Red bayberry extract inhibits growth and virulence gene expression of the human pathogen *Vibriocholerae*. *J. Antimicrob. Chemotherapy* 2008; 61 (3): 753 - 4.

www.SID.ir