مطالعه اثر ضدمیکروبی اسانس رزماری بر سه باکتری بیماری‌زای غذایی در سبزیجات با استفاده از PCR کمی و پروپیدیوم مونوآزید

مریم عزیزخانی[1*]، پاتریسیا الیزاکویویل[2]

۱- استادیار، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فن‌آوری‌های نوین آمل، آمل، ایران

۲- گروه میکروبیولوژی و اکولوژی دانشگاه والنسیا، بورکاسوت، والنسیا، اسپانیا

* نویسنده مسئول مکاتبات: azizkhani.maryam@gmail.com

(دریافت مقاله: ۹۳/۶/۱۸؛ پذیرش نهایی: ۹۴/۷/۱۱)

چکیده

اسانس‌های گیاهی از دیرباز با هدف بهبود طعم در مواد غذایی به‌کار می‌رفتند. امروزه این اسانس‌ها به‌علت داشتن ترکیبات ضدمیکروبی به‌عنوان نگه‌دارنده‌های طبیعی در محصولات غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند. در این مطالعه، ابتدا حداقل غلظت کشندگی رزماری علیه *اشریشیا کولای* O157: H7، *سالمونلا انتریکا* و *لیستریا مونوسیتوژنز* تعیین شد. سپس کمیت سلول‌های زنده در یک جمعیت باکتریایی تحت تیمار با اسانس رزماری با PMA-qPCR تعیین شد. طبق نتایج مطالعه، غلظت‌های ۱٪ ، ۰/۴۵٪ و ۰/۹٪ به‌ترتیب موجب غیرفعال شدن *لیستریا مونوسیتوژنز*، *اشریشیا کولای* O157: H7 و *سالمونلا انتریکا* شد. *لیستریا مونوسیتوژنز* طی ۴۵ دقیقه غیرفعال گردید، در حالی‌که *سالمونلا انتریکا* و *اشریشیا کولای* طی ۹۰ دقیقه از بین رفتند. از آن‌جایی که اسانس رزماری در غلظت‌های پایین‌تر از سایر اسانس‌ها قادر به غیرفعال‌سازی برگشت‌ناپذیر سه پاتوژن مورد آزمایش شد، لذا دارای پتانسیل لازم جهت استفاده به‌عنوان افزودنی طبیعی یا نگه‌دارنده زیستی در مواد غذایی می‌باشد. علاوه بر این، یافته‌ها نشان داد روش PMA-qPCR یک روش کمی دقیق و اختصاصی برای جستجو و تشخیص انتخابی باکتری‌های بیماری‌زای زنده می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: اسانس رزماری، سبزیجات، PMA-qPCR، نگه‌دارنده طبیعی، ضدباکتری

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

ایمنی میکروبی محصولات غذایی موضوع نگرانی اصلی مصرف‌کنندگان و نیز صنعت غذایی می‌باشد و در حال حاضر تقاضای مصرف‌کنندگان برای جایگزینی ترکیبات ضدمیکروبی سنتتیک شیمیایی با ترکیبات طبیعی جهت حصول اطمینان از ایمنی مواد غذایی رو به افزایش است (Wentao *et al.*, 2007). در این رابطه، اسانس‌های گیاهی به‌عنوان نگه‌دارنده‌های خوراکی طبیعی توجه زیادی را جلب نموده‌اند. *Rosmarinus officinalis* L. گیاهی متعلق به خانواده *Labiateae* است. در پژوهش‌هایی که در ارتباط با ترکیب شیمیایی اسانس رزماری انجام شده، آلفا-پینن به‌عنوان ترکیب اصلی گزارش شده و پس از آن به‌ترتیب ۱،۸-سینئول، کامفن، بتا-میرسین، کامفور و بورنئول عمده‌ترین ترکیبات اسانس رزماری را تشکیل می‌دهند (Jamshidi *et al.*,2009; Moghtader and Afzali, 2009)، در برخی مطالعات نیز ۱،۸-سینئول به‌عنوان ترکیب اصلی این اسانس گزارش شده است (Fu *et al.*, 2007a; Fu *et al.*, 2007b; Debersac *et al.*, 2001). فعالیت ضدمیکروبی اسانس رزماری بر روی قارچ‌ها (Ozcan and Chalchat, 2008) و باکتری‌هایی نظیر *استافیلوکوکوس اورئوس* (Jarrar *et al.*, 2010)، *سالمونلا تیفی‌موریوم* (Zegura *et al.*, 2011)، *لیستریا مونوسیتوژنز* (Ruiz *et al.*, 2009) و هم‌چنین *اشریشیا کولای* (Fu *et al.*, 2007a) مورد مطالعه قرار گرفته است.

فعالیت اسانس‌ها علیه عوامل میکروبی بیماری‌زا و عامل فساد به‌طور معمول با استفاده از روش‌های متداول بر پایه کشت انجام گرفته است. این روش‌ها دارای نواقصی از جمله صرف مدت زمان نسبتاً طولانی برای رشد باکتری و فقدان حساسیت لازم در مورد سلول‌های زنده غیرقابل کشت (Viable But Non-Culturable: VBNC) می‌باشد (Kramer *et al.*, 2009). به‌عنوان یک روش جایگزین، Real time PCR امکان تشخیص و تعیین کمی سریع، حساس و اختصاصی عوامل بیماری‌زا را فراهم می‌آورد. علاوه بر این، این تکنیک از طریق پیش‌تیمار نمونه با عوامل متصل‌شونده به DNA، مانند پروپیدیوم مونوآزید (Propidium monoazide: PMA)، قادر به تمایز بین DNA سلول‌های مرده و زنده می‌باشد (Rudi *et al.*, 2002)، چرا که PMA تنها به درون غشاهای سلولی آسیب‌دیده نفوذ می‌کند، لذا این تکنیک بر اساس سالم بودن یا آسیب‌دیده بودن سلول‌های باکتریایی عمل می‌نماید (Nocker and Camper, 2006). پیش‌تیمار نمونه با PMA و سپس انجام qPCR (Quantitative Polymerase Chain Reaction) به‌طور موفقیت‌آمیزی برای تشخیص پاتوژن‌های باکتریایی مانند *لیستریا مونوسیتوژنز* (Pan and Breidt, 2007)، *اشریشیا کولای* O157:H7 (Elizaquivel *et al.*, 2012b) و *کامپیلوباکتر ژژونی* (Josefsen *et al.*, 2010) به‌کار رفته است. اخیراً در مطالعه‌ای، تکنیک PMA-qPCR به‌عنوان ابزاری با کارایی بالا جهت شمارش سلول‌های زنده پس از تیمار با اسانس‌های دارچین، میخک، آویشن شیرازی و پونه کوهی به‌کار گرفته شده است (Elizaquivel *et al.*, 2012a). با توجه به این‌که اسانس‌های گیاهان مختلف به‌علت دارا بودن ترکیبات متفاوت تأثیرات متفاوتی بر دیواره سلولی باکتری و در نتیجه نفوذ PMA به درون سلول می‌گذارند، در مطالعه حاضر فعالیت ضدمیکروبی

www.SID.ir

اسانس رزماری بر *اشریشیا کولای* O157:H7، *سالمونلا انتریکا* و *لیستریا مونوسیتوژنز* با استفاده از PMA در ترکیب با qPCR مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتریایی، شرایط کشت و جداسازی DNA

اشریشیا کولای O157:H7 (The Spanish type culture collection: CECT 5947) غیرتوکسیژنیک، *سالمونلا انتریکا* زیرگونه *انتریکا* (CECT 4138) و *لیستریا مونوسیتوژنز* (CECT 4031) از مجموعه کشت‌های میکروبی اسپانیا تهیه و در این مطالعه به‌کار رفت. باکتری‌ها در محیط تریپتیک‌سوی براث (Tryptic Soy Broth: TSB) در ۳۷ درجه سلسیوس به‌مدت ۱۸ ساعت کشت و به روش کشت در محیط تریپتیکیز سوی آگار (Trypticase Soy Agar: TSA) در شرایط گرمخانه‌گذاری مشابه بالا شمارش شدند. DNA باکتریایی با استفاده از کیت NucleoSpin Tissue (Machereye Nagel GmbH & Co.، آلمان) مطابق دستورالعمل سازنده جداسازی و تخلیص شد.

تهیه و آنالیز اسانس

برگ و سرشاخه‌های هوایی گیاه رزماری از پژوهشکده گیاهان دارویی، کرج، تهیه و تا زمان استفاده به‌صورت خشک شده (خشک شده با استفاده از هوای گرم) نگه‌داری شد. اسانس از سرشاخه‌های هوایی خشک‌شده گیاه به‌روش تقطیر با آب (Hydro distillation) با سیستم کلونجر به‌مدت ۲ ساعت استخراج شد. متعاقب تهیه اسانس، آنالیز ترکیبات شیمیایی اسانس توسط دستگاه گاز-کروماتوگراف متصل به طیف‌نگار جرمی (Gas chromatography–mass spectrometry: GC/MS) انجام شد. ترکیبات اسانس بر اساس مقایسه مدت زمان نسبی بازداری و طیف جرمی ترکیبات با استاندارد (Adams, 2001) شناسایی شدند. آلکان‌ها به‌عنوان نقاط مرجع در محاسبه شاخص‌های بازداری نسبی به‌کار رفتند (Adams, 2001).

تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد و حداکثر غلظت قابل تحمل

برای تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) و حداکثر غلظت قابل تحمل (Maximum Tolerable Concentration: MTC) از روش میکرودایلوشن براث استفاده شد (Klancnik *et al.*, 2010). MIC به‌عنوان پایین‌ترین غلظتی که در آن دانسیته نوری نمونه مشابه دانسیته نوری نمونه شاهد (همان غلظت اسانس اما بدون باکتری) بود، در نظر گرفته شد. MTC به‌عنوان بیشترین غلظتی که در آن افزودن اسانس از لحاظ آماری تأثیر قابل‌ملاحظه‌ای بر رشد باکتری در مقایسه با شاهد (بدون اسانس) نداشت، به‌دست آمد.

سینیتیک غیرفعال‌سازی

کشت‌های باکتریایی از کشت ٤ ساعته در TSB با تعداد cfu/ml ۱۰^۹–۱۰^۸ تهیه شدند. کشت اصلی جهت به‌دست آوردن ۵ میلی‌لیتر سوسپانسیون حاوی cfu/ml ۱۰^۵ رقیق و سپس اسانس رزماری در غلظت‌های ۰/۰۳٪، ۰/۰۳۵٪ و ۰/۰٤٪ برای *اشریشیا کولای* O157:H7، ۰/۰٤۵٪، ۰/۰۵۰٪ و ۰/۰۵۵٪ برای *سالمونلا انتریکا* و ۰/۰۲٪، ۰/۰۲۵٪ و ۰/۰۳٪ برای *لیستریا مونوسیتوژنز* اضافه و مجدداً در ۳۷ درجه سلسیوس در گرمخانه مجهز به مخلوط‌کن نگه‌داری شد. در زمان‌های

Archive of SID
www.SID.ir

۰، ۳۰ و ٤٥ دقیقه و هم‌چنین ساعت‌های ۱ ، ۱/۵، ۲ و ٤ نمونه‌گیری و در محیط TSA شمارش شد. هر آزمایش در سه تکرار به‌صورت مستقل انجام شد. میانگین log cfu/ml و انحراف معیار محاسبه گردید. غلظتی از اسانس که پس از ٤ ساعت تیمار، فاقد رشد باکتریایی بود نشان‌دهنده کشته شدن همه سلول‌ها یا ورود به مرحله VBNC بود و به‌عنوان حداقل غلظت باکتری‌کشی (Minimum Bactericidal Concentration: MBC) محسوب گردید.

تیمار با PMA

PMA در دی‌متیل سولفوکساید ۲۰٪ جهت به‌دست آوردن محلول استوک ۲۰ mM حل و تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سلسیوس و دور از نور نگه‌داری شد. محلول استوک به ۵۰۰ µl از سلول‌های زنده یا سلول‌های تیمارشده با اسانس تا رسیدن به غلظت نهایی ۱۰۰ µM افزوده شد. جهت اطمینان از تکرارپذیری نتایج تیمار نمونه‌ها در سه تکرار انجام شد. پس از افزودن PMA، نمونه‌ها به‌مدت ۵ دقیقه در تاریکی در دمای اتاق قرار گرفت و برای افزایش نفوذ PMA در سلول، نمونه‌ها تکان داده شدند. سپس نمونه‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه با استفاده از سیستم فعال‌سازی نوری در معرض نور قرار گرفتند (Led-Active Blue, Ingenia Biosystems، بارسلونا، اسپانیا). پس از ایجاد اتصالات عرضی از طریق القای نوری، سلول‌ها در ۷۰۰۰ rpm به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ و محلول رویی دور ریخته شد. رسوب به‌دست آمده برای جداسازی DNA مورد استفاده قرار گرفت.

اندازه‌گیری کمی به‌روش Real-time PCR

الیگونوکلئوتیدهای مورد استفاده در این مطالعه (جدول ۱)، ژن بتا-گلوکورونیداز *اشریشیا کولای* O157:H7 (*uidA*)، ژن تهاجم (*JHOL*) *سالمونلا انتریکا* و ژن لیستریولیزین *لیستریا مونوسیتوژنز* (*hly*) را هدف قرار می‌داد که قبلاً در مطالعه الیزاکویل و همکاران استفاده شده بودند (Elizaquivel *et al.*, 2011). واکنش‌های PCR در حجم نهایی ۲۰ µl، شامل ۱۰ µl مسترمیکس 2× Brilliant II QPCR با میزان بالای ROX (Stratagene، مادرید، اسپانیا)، و ۵ µl از DNA الگو انجام شد. همه واکنش‌ها شامل ۲ µl محلول 10× Exo IPC Mix و ۰/٤ µl محلول Exo IPC DNA 50× (Applied Biosystems، ایالات متحده) به‌عنوان کنترل داخلی بود. غلظت پرایمرها، پروب‌ها و $MgCl_2$ عبارت بود از: برای *اشریشیا کولای* O157:H7، ۲۵۰ nM از هر پرایمر، ۲۵ nM از پروب *uidA* و ۳/۵ mM محلول $MgCl_2$؛ برای *سالمونلا انتریکا*، ۳۰۰ nM از هر پرایمر، ۱۰۰ nM از پروب *JHOL* و ٤/۵ mM محلول $MgCl_2$ و برای *لیستریا مونوسیتوژنز*، ۵۰ nM از هر پرایمر، ۵۰ nM از پروب *hly* و ٦ mM محلول $MgCl_2$. تکثیر به‌صورت یک سیکل در ۵۰ درجه سلسیوس به‌مدت ۲ دقیقه، یک سیکل ۹۵ درجه سلسیوس به‌مدت ۱۰ دقیقه و ٤۰ سیکل ۹۵ درجه سلسیوس به‌مدت ۱۵ ثانیه و ٦۳ درجه سلسیوس به‌مدت ۱ دقیقه در دستگاه GeneAmp 5700 PE Biosystems Sequence Detection System، ایالات متحده) انجام شد. میزان فلورسنس در انتهای هر مرحله گسترش اندازه‌گیری شد. برای هر واکنش دو

www.SID.ir

تکرار و در همه موارد یک کنترل منفی شامل ۵ µl آب به‌جای DNA الگو در نظر گرفته شد.

جدول (۱)- پرایمرهای مورد استفاده جهت شناسایی *اشریشیا کولای*، *سالمونلا انتریکا* و *لیستریا مونوسیتوژنز*

باکتری	نام پرایمر	توالی ('3→'5)	منبع
اشرشیا کولای	*uidA*-F *uidA*-R	CAGTCTGGATCGCGAAAACTG ACCAGACGTTGCCCACATAAT	Jinneman *et al*., 2003
سالمونلا انتریکا	*JHOL*-F *JHOL*-R	TCGTCATTCCATTACCTACC AAACGTTGAAAACTGAGGA	Hoorfar *et al*., 2000
لیستریا مونوسیتوژنز	*hly*-F *hly*-R	CATGGCACCACCAGCATCT ATCCGCGTGTTTCTTTTCGA	Rodríguez-Lázaro *et al*., 2004

منحنی‌های استاندارد با استفاده از توالی‌های ۱۰ برابری رقت از DNA استخراج شده از ۳ پاتوژن غذایی، در دامنه ۱ تا 10^6 معادل ژنوم در هر واکنش، با محاسبه بر پایه اندازه ژنوم این پاتوژن‌ها، تهیه گردید (Glaser *et al*., 2001; Hayashi *et al*., 2001; McClelland *et al*., 2001). مقادیر نقاط عبور (Crossing point: Cp) حاصل از هر رقت جهت رسم منحنی استاندارد برای هر کدام از غلظت‌های مربوطه به‌کار رفت.

فعالیت باکتری‌کشی اسانس در ارزیابی سلول‌های زنده

کشت‌های ٤ ساعته *اشریشیا کولای* O157:H7، *سالمونلا انتریکا* و *لیستریامونوسیتوژنز* با تعداد cfu/ml 10^8–10^9 به‌صورت متوالی در TSB جهت به‌دست آوردن ۵ ml سوسپانسیون حاوی 10^6 و cfu/ml 10^4 رقیق‌سازی و سپس به‌طور جداگانه با اسانس رزماری در غلظت‌های باکتری‌کشی مربوط به هر باکتری تیمار شدند. سوسپانسیون‌ها در دمای اتاق به مدت ٤ ساعت به‌طور مداوم مخلوط شدند. آنالیز نمونه‌ها با استفاده از روش شمارش روی پلیت، qPCR و PMA-qPCR و در سه تکرار انجام شد.

ارزیابی ماده غذایی تلقیح شده به طور مصنوعی

جهت تعیین حساسیت واکنش PMA-qPCR، نسبت‌های مختلف از سلول‌های زنده و کشته شده توسط اسانس به‌طور مصنوعی به مخلوط سبزیجات (اسفناج، منداب، کاهوی سبز و قرمز) تلقیح شد. قبل از تلقیح، ۲۵ گرم از هر نمونه سبزی به روش کشت (ISO, 1998, 2001, 2002) و qPCR جهت اطمینان از عدم وجود *اشریشیا کولای* O157:H7، *سالمونلا انتریکا* و *لیستریا مونوسیتوژنز* مورد بررسی قرار گرفت. تلقیح باکتریایی سبزیجات به‌صورت زیر انجام گرفت: مقدار ۲۵ گرم از مخلوط سبزیجات در شرایط سترون به قطعات کوچک‌تر خرد شده و ۲۲۵ ml محلول آب‌پپتونه بافری (Pronadisa، Condalab، اسپانیا) در یک کیسه پلاستیکی استریل با یک فیلتر جانبی (BagPage S 400, BagSystem, Interscience, St-Nom-la-Breteche، فرانسه) به آن افزوده شد و با استفاده از دستگاه پالسیفایر یکنواخت گردید (Microgen Bioproducts، انگلستان). مخلوط حاصل از قسمت فیلتر برداشت و در قسمت‌های ۳۰ میلی‌لیتری تقسیم شد. هر قسمت با مخلوطی از سلول‌های زنده و

Archive of SID
www.SID.ir

کشته شده توسط اسانس به‌صورت زیر تلقیح شد: ۱۰۰٪ سلول‌های زنده، ۷۵٪ سلول‌های زنده و ۲۵٪ سلول‌های مرده، ۵۰٪ سلول‌های زنده و ۵۰٪ سلول‌های مرده، ۲۵٪ سلول‌های زنده و ۷۵٪ سلول‌های مرده و ۱۰۰٪ سلول‌های مرده. یک کنترل منفی تلقیح نشده در هر آزمایش گنجانده شد. دو جزء ۱۰۰ میکرولیتری از هر نمونه تلقیح شده گرفته شد و یکی از آن دو با PMA تیمار گردید. DNA همه اجزای ۱۰۰ میکرولیتری با استفاده از کیت Nucleospin Tissue استخراج و توسط PMA-qPCR آنالیز شد. شمارش باکتریایی با افزودن ۱۰ گرم از مخلوط سبزی به ml ۹۰ آب‌پپتونه بافری در کیسه پلاستیکی استریل دارای فیلتر جانبی و یکنواخت‌سازی با استفاده از پالسیفایر انجام شد. مقدار ml ۱ از محلول یکنواخت شده به‌صورت متوالی در آب‌پپتونه بافری رقیق‌سازی و در پلیت TSA کشت داده شد. شمارش باکتری‌ها پس از ۴۸-۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در ۳۷ درجه سلسیوس انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری

معنادار بودن اختلاف میان میانگین OD نمونه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف اسانس از طریق آزمون Student's T-test با سطح اطمینان $p< ۰/۰۵$ تعیین شد (Microsoft Office Excel; Microsoft, USA).

یافته‌ها

درصد ترکیبات اسانس (تعیین شده توسط GC و GC/MS) در جدول (۲) آورده شده است. طبق نتایج این جدول، ترکیب اصلی اسانس رزماری (۱ و ۸-سینئول) با غلظت ۴۹/۹۹٪ برآورد شد.

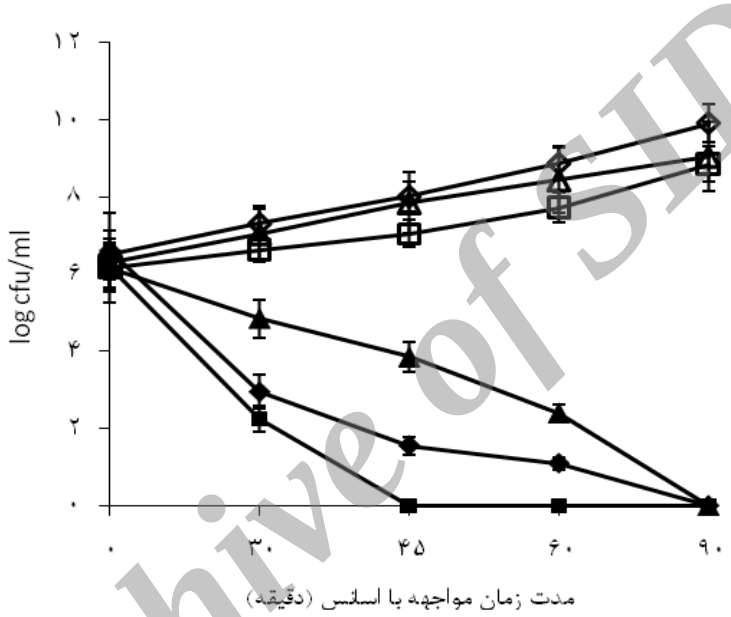
جدول (۲)- ترکیبات اسانس رزماری بر اساس نتایج آنالیز GC/MS

ترکیب	مقدار (٪)	شاخص بازداری بر روی ستون
آلفا-پینن	۹/۹۵	۹۳۰
کامفین	۳/۶۶	۹۴۱
بتا-پینن	۶/۵۳	۹۶۰
بتا-میرسین	۱/۰۸	۹۴۷
آلفا- ترپینن	۰/۴	۱۰۱۸
کیمول	۱/۶	۱۰۲۶
۱ و ۸- سینئول	۴۹/۹۹	۱۱۴۷
گاما- ترپینن	۰/۷۵	۱۱۹۲
کارین	۰/۴۰	۱۲۳۹
کامفور	۱۱/۸۸	۱۴۲۱
لینالول	۰/۸۳	۱۲۵۱
بورنئول	۳/۴۵	۱۵۵۵
۱-ترپینن-۴-ال	۰/۹۵	۱۵۶۲
پارا-منت-۱-ان-۸-ال	۲/۲۳	۱۵۶۷
کوپائن	۰/۲۲	۱۵۸۵
کاریوفیلین	۳/۸۹	۱۶۰۰
آلفا- هومولین	۰/۴۳	۱۸۵۵
سایر	۱/۷۶	-
مجموع	۱۰۰	-

مطابق OD به‌دست آمده، پس از ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری *اشریشیا کولای* O157:H7، *سالمونلا انتریکا* و *لیستریا مونوسیتوژنز* تحت غلظت‌های مختلف اسانس، MIC معادل ۰/۴۵٪ برای *اشریشیا کولای* O157:H7، ۰/۹٪ برای *سالمونلا انتریکا* و ۱٪ برای *لیستریا مونوسیتوژنز* به‌دست آمد. مقدار MTC برای *اشریشیا کولای* O157:H7 معادل ۰/۰۰۹٪، برای *سالمونلا انتریکا* معادل ۰/۰۵٪ و برای *لیستریا مونوسیتوژنز* معادل ۰/۰۶٪ بود. سینیتیک غیرفعال‌سازی باکتری‌ها توسط اسانس در شکل (۱) اشاره شده است. مقادیر MBC بر اساس MIC به‌دست آمده برای هر

www.SID.ir

باکتری و با افزایش غلظت تدریجی اسانس تعیین شد. غلظت‌های مورد بررسی ۰/۴۵٪، ۰/۵٪ و ۰/۵۵٪ برای *اشریشیا کولای* O157:H7، ۰/۹٪، ۰/۹۵٪ و ۱٪ برای *سالمونلا انتریکا*، ۱٪، ۱/۰۵، و ۱/۱٪ برای *لیستریا مونوسیتوژنز* بود. در خصوص *سالمونلا انتریکا* و *لیستریا مونوسیتوژنز*، در غلظت‌های MIC، هیچ رشدی در ۴۵ دقیقه و ۱/۵ ساعت مشاهده نشد، بنابراین این مقادیر MIC به‌عنوان MBC در نظر گرفته شدند. در خصوص *اشریشیا کولای* O157:H7، پس از ۱/۵ ساعت هیچ رشدی در غلظت ۰/۵۵٪ اسانس مشاهده نگردید، لذا این غلظت به‌عنوان MBC تعیین شد.



شکل (۱)- سینتیک غیرفعال‌سازی *اشریشیا کولای* O157:H7 (...◆...)، *لیستریامونوسیتوژنز* (-■-) و *سالمونلا انتریکا* (-▲-) توسط اسانس رزماری در غلظت های MBC تعیین شده توسط شمارش روی پلیت، به‌ترتیب ۰/۵۵٪، ۱٪ و ۰/۹٪ *اشریشیا کولای* O157:H7 در محیط فاقد اسانس (...◇...)، *لیستریا مونوسیتوژنز* در محیط فاقد اسانس (-□-) و *سالمونلا انتریکا* در محیط فاقد اسانس (-Δ-).

سوسپانسیون‌های میکروبی کشته شده توسط اسانس رزماری در غلظت‌های MBC، تحت آنالیز PMA-qPCR قرار گرفتند. مقادیر به‌دست آمده از آنالیز qPCR نمونه‌های تیمار شده با PMA و تیمار نشده در جدول (۳) نشان داد شده است. افزایش Cp برای *اشریشیا کولای* O157:H7 و *سالمونلا انتریکا*، به‌ترتیب، ۱۳/۷۵ و ۱۲/۹۵ بود که نشان‌دهنده تفاوت عمده‌ای میان سلول‌های زنده و مرده می‌باشد. برای *لیستریا مونوسیتوژنز*، افزایش Cp معادل ۳/۹۳ برآورده شد. در غلظت‌های سلولی بالاتر (10^8 cfu/ml)، PMA سیگنال‌های PCR را به‌طور کامل و مطابق آن‌چه در مطالعه پیشین مشاهده شد، حذف ننمود (Elizaquivel

Archive of SID
www.SID.ir

et al., 2011). در سوسپانسیون‌های باکتریایی مرده با جمعیت 10^4 cfu/ml حاوی اسانس، هیچ سیگنالی توسط PMA-qPCR برای هیچ کدام از سه باکتری مورد بررسی به‌دست نیامد.

جدول (۳)- تعیین کمیت انتخابی سلول‌های زنده *اشریشیا کولای* O157:H7، *لیستریا مونوسیتوژنز* و *سالمونلا انتریکا* توسط PMA-qPCR پس از تیمار و غیرفعال‌سازی با اسانس رزماری

باکتری	شمارش در پلیت (cfu/ml)	زنده		مرده		مرده تیمار شده با PMA		ΔCp
		Cp[1] ± SD[2]	مقدار (ge/ml)[3]	Cp ± SD	مقدار (ge/ml)	Cp ± SD	مقدار (ge/ml)	
اشریشیا کولای	$5/25 \times 10^8$	۱۸/۸۳ ± ۰/۳۶	۷/۱۸ ± ۰/۲۳	۱۸/٦٦ ± ۰/۰۷	۷/٤٤ ± ۰/۲۷	۳۲/٤۱ ± ۰/۲۱	۰/۹٦ ± ۰/۰۹	۱۳/۷۵
	$1/43 \times 10^5$	۲۷/۱۵ ± ۰/۱۵	٤/٦۰ ± ۰/۳۵	۲۷/۷٦ ± ۰/۳٦	٤/۷۱ ± ۰/۵٤	<۳۵	۰	
لیستریا	$1/15 \times 10^8$	۱٦/٤۱ ± ۰/۲٦	۸/۱۵ ± ۰/۳۱	۱۷/۲۷ ± ۰/۱۸	۸/۱۹ ± ۰/۳۳	۲۱/۲۰± ۰/۲۲	٤/۷۱ ± ۰/۳۳	۳/۹۳
	$4/35 \times 10^4$	۳۱/۲٦ ± ۰/۱۱	۳/۷۸ ± ۰/۱۱	۳۲/٤۵ ± ۰/۳۱	۳/٦۷ ± ۰/۳٦	<۳۵	۰	
سالمونلا	$2/78 \times 10^8$	۱٦/۹۰ ± ۰/۱۷	۷/۸۷ ± ۰/۱۸	۱۷/۵۹ ± ۰/۳۵	۷/۳۳ ± ۰/۱۸	۳۰/۵٤ ± ۰/۰۸	۱/۸۵ ± ۰/۰۹	۱۲/۹۵
	$5/15 \times 10^5$	۲۸/۷٦ ± ۰/۳۰	٤/۵۱ ± ۰/٤۹	۲۹/٤۸ ± ۰/۵۲	٤/٦۲ ± ۰/۱۵	<۳۵	۰	

[1] Cp: سیکلی از PCR که قطعه تکثیر از حد آستانه (crossing point) عبور می‌کند.

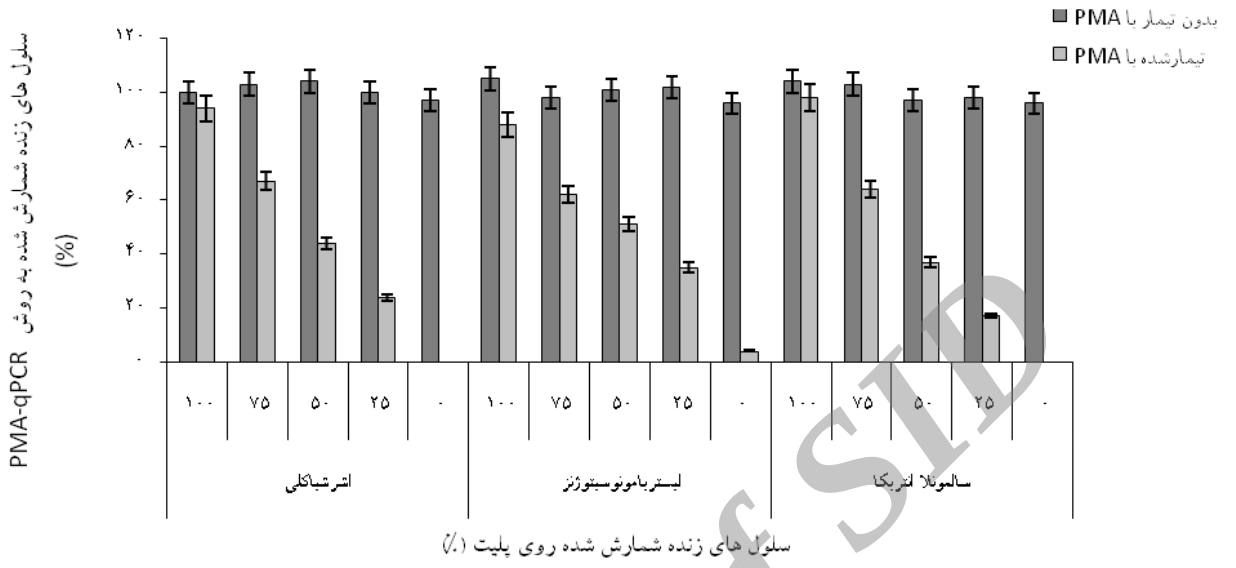
[2] SD: انحراف از میانگین (standard deviation)

[3] ge: معادل ژنومی (genome equivalents)

نتایج PMA-qPCR به‌دست آمده برای ترکیب‌های مختلف سلول‌های زنده و مرده در مخلوط سبزیجات (اسفناج، منداب، کاهوی سبز و قرمز) تلقیح شده به‌طور مصنوعی در شکل (۲) نشان داده شده است. تعداد باکتری‌های در مخلوط سبزیجات $2/89 \times 10^5$ cfu/g بود. مقادیر به‌دست آمده از PMA-qPCR برای *سالمونلا انتریکا* و *اشریشیا کولای* O157:H7، با تعداد سلول‌های زنده شمارش شده روی پلیت مرتبط بود. در خصوص *لیستریا مونوسیتوژنز*، تعداد سلول‌های زنده در همه موارد بیشتر از تعداد واقعی تخمین زده شد و برای نمونه حاوی ۱۰۰٪ سلول‌های مرده، آنالیز PMA-qPCR هم‌چنان وجود حدود ۵٪ سلول زنده را نشان می‌داد.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل (۲)- تعیین کمیت انتخابی نسبت‌های مختلف سلول‌های *اشریشیا کولای* O157:H7، *لیستریا مونوسیتوژنز* و *سالمونلا انتریکای* زنده و کشته شده توسط
اسانس رزماری، تلقیح شده به سبزیجات. برای هر مورد، مقادیر qPCR مربوط به هر نمونه با یا بدون تیمار PMA به‌صورت درصد ارایه شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

به‌رغم استفاده از مواد نگه‌دارنده جهت کنترل فساد و عوامل بیماری‌زای ناشی از مواد غذایی، بحث ایمنی غذا هم‌چنان به‌عنوان چالشی برای این صنعت باقی مانده است. امروزه با وجود ارایه آگاهی از سوی مراجع قانونی صنعت غذا و در نتیجه تمایل کمتر تولیدکنندگان و مصرف‌کنندگان به استفاده از افزودنی‌های شیمیایی و مضر و تولید محصولاتی با تأثیرات سوء کمتر بر محیط زیست، استفاده از ترکیبات ضدمیکروبی طبیعی به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای افزایش یافته است. در این مطالعه، اسانس رزماری به‌علت دارا بودن فعالیت ضدمیکروبی نسبتاً بالاتر از سایر اسانس‌های گیاهی، جهت ارزیابی انتخاب شد.

نتایج مطالعه اخیر نشان داد که اسانس رزماری واجد قابلیت مهار رشد *اشریشیا کولای*، *لیستریا مونوسیتوژنز* و *سالمونلا انتریکا* می‌باشد و در این بین بیشترین تأثیر را بر باکتری گرم منفی *اشریشیا کولای* داشت. مقدار MIC برای *اشریشیا کولای* O157:H7، *لیستریا مونوسیتوژنز* و *سالمونلا انتریکا*، به‌ترتیب برابر با ۰/۰۴۵٪، ۱٪ و ۰/۹٪ بود. یافته‌های مشابهی توسط سلیکتاس و همکاران به‌دست آمد (Celiktas *et al.*, 2007). این محققان گزارش نمودند که *اشریشیا کولای* نسبت به اسانس رزماری حساس می‌باشد. این فعالیت ضدمیکروبی قابل‌ملاحظه به‌علت وجود مقدار زیاد ۱، ۸-سینئول و سایر مونوترپن‌های فنولیک می‌باشد که حدود ۷۵٪ ترکیبات اسانس را به خود اختصاص می‌دهد؛ به‌نظر می‌رسد این ترکیبات با اعمال فعالیت

Archive of SID
www.SID.ir

سینرژیستی موجب ناپایداری در غشای سلولی می‌گردند (Mathlouthi *et al.*, 2010). هم‌چنین، لوپز-لوتز و همکاران اثبات نمودند که فعالیت ضدمیکروبی اسانس رزماری تنها مربوط به ۱، ۸-سینئول نمی‌باشد (Lopes-Lutz *et al.*, 2008). کوردالی و همکاران نیز فعالیت ضدمیکروبی قابل‌توجهی ۳ گونه درمنه ترکی را در شرایط آزمایشگاهی در برابر باکتری‌های بیماری‌زا نشان دادند (Kordali *et al.*, 2005). علاوه بر این، فعالیت ضدمیکروبی ترکیبات جزئی دیگر مانند آلفا-پینن، بتا-پینن، لیمونن، آلفا-ترپینن، کاریوفیلین و کامفن نیز گزارش شده است (Sökmen *et al.*, 2004). راندریاناریولو و همکاران گزارش نمودند که *اشریشیا کولای* حساسیت بیشتری به لینالول خالص در مقایسه با ۱، ۸-سینئول دارد (Randrianarivelo *et al.*, 2009).

هر سه پاتوژن با اسانس در غلظت‌های کشنده تیمار شده و تعداد سلول‌های زنده با استفاده از روش PMA-qPCR تعیین شد که این روش در مطالعات پیشین با استفاده از سایر اسانس‌های متداول (پونه کوهی، میخک و دارچین) نیز موفق بوده است (Elizaquivel *et al.*, 2012a). تأثیر اسانس رزماری بر سوسپانسیون‌های میکروبی ابتدا توسط شمارش روی پلیت ارزیابی گردید که هیچ رشد باکتریایی مشاهده نشد؛ این نتیجه نشان داد که عمده سلول‌های کشته شده و یا فاقد قابلیت رشد می‌باشند. سپس روش پیش‌آزمون شده PMA-qPCR (Elizaquivel *et al.*, 2011) جهت تعیین تعداد سلول‌های زنده تیمارشده با اسانس رزماری به‌کار رفت. نتایج نشان داد زمانی که از سوسپانسیون‌های سلولی با تراکم بالا (10^8 cfu/ml) استفاده می‌شود، PMA-qPCR افزایشی بیش از Cp ۱۳ (حدود بیش از log ٤)، را برای *سالمونلا انتریکا* و *اشریشیا کولای* O157:H7 نشان داد. در خصوص *لیستریا مونوسیتوژنز* افزایش در مقادیر بسیار ناچیز (Cp ۳/۹۳) بود. قابلیت جستجو و تعیین تعداد باکتری‌ها با استفاده از PMA-qPCR در حضور غلظت‌های بالای باکتریایی دچار محدودیت می‌گردد (Elizaquivel *et al.*, 2011; Slimani *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2012) زیرا تعداد بالای سلول‌ها در مرحله برقراری اتصالات عرضی، در زمان فعال‌شدن PMA، اختلال ایجاد می‌نماید. محدودیت دیگر، تأثیر طول قطعه تکثیرشده بر کفایت تیمار با PMA است. بنابراین، تکثیر توالی‌های طولانی به‌همراه تیمار با PMA، موجب بازداری بیشتر تکثیر DNA سلول‌های آسیب دیده می‌شود (Schnetzinger *et al.*, 2011). مطابق پیشنهادات سوئژیما و همکاران، احتمال می‌رود علت تأثیر مثبت هدف قرار گرفتن توالی‌های طولانی‌تر DNA، افزایش احتمال اتصال رنگ در ناحیه هدف و در نتیجه بازداری قوی‌تر باشد (Soejima *et al.*, 2011). علاوه بر این، تخمین فراتر از واقعیت تعداد سلول‌های زنده *لیستریا مونوسیتوژنز* ممکن است به‌علت تفاوت در ساختار دیواره سلولی بین باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت باشد. در این رابطه، الیزاکویویل و همکاران دریافتند که روش PMA-qPCR به طور موفقیت‌آمیزی تعداد سلول‌های زنده *سالمونلا انتریکا* و *اشریشیاکولای* O157:H7 را تعیین می‌نماید (Elizaquivel *et al.*, 2011). هرچند، سیگنال‌های ضعیف حاصل ازسلول‌های مرده طی تعیین تعداد سلول‌های *لیستریا مونوسیتوژنز* موجب تخمین فراتر از واقعیت تعداد سلول‌های *لیستریا مونوسیتوژنز* زنده شد. نتایج مشابهی برای *لیستریا اینوکوا* تیمار شده با حرارت به‌دست آمد (Lovdal *et*

www.SID.ir

(*al.*, 2011). در باکتری‌های گرم منفی ساختار غشای خارجی دیواره‌ای نفوذپذیر را به‌وجود می‌آورد، در حالی که در باکتری‌های گرم مثبت این دیواره از جنس پپتیدوگلیکان است (Nogva *et al.*, 2003). این تفاوت، نفوذ PMA را در باکتری‌های گرم منفی مرده تسهیل نموده و کارآیی بهتر PMA را در تمایز بین سلول‌های زنده و مرده گرم منفی توجیح می‌نماید.

هنگامی که از سوسپانسیون‌های سلولی با غلظت پایین‌تر (10^4 cfu/ml) استفاده شد، هیچ سیگنال qPCR پس از تیمار با PMA به‌دست نیامد. نتایج نشان داد که این تکنیک برای ارزیابی حضور سلول‌های پاتوژن زنده که معمولاً در تعداد پایین (10^2–10^4 cfu/ml) در سبزیجات یافت می‌شوند، مناسب است (Nogva *et al.*, 2003). علاوه بر این، نتایج نشان می‌دهد که PMA به‌طور موفقیت‌آمیزی سیگنال DNA سلول‌های مرده را حذف نمود به‌طوری که هیچ سیگنال تکثیری در هیچ کدام از سه پاتوژن مورد بررسی کشته شده مشاهده نشد. می‌توان نتیجه گرفت، تیمار با اسانس رزماری موجب مرگ سلول‌های باکتریایی و نفوذپذیر شدن آن‌ها نسبت به PMA گردید، بنابراین تأثیر این ترکیب ضدمیکروبی طبیعی را می‌توان با تکنیک PMA-qPCR کنترل و ارزیابی نمود. از سوی دیگر، نسبت بین سلول‌های زنده و مرده و نیز حضور میکروبیوتای موجود در مواد غذایی که به‌طور طبیعی آلوده شده‌اند، از عواملی است که کارآیی PMA-qPCR را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Fittipaldi and Codony, 2012). تعیین تعداد سلول‌های زنده توسط PMA-qPCR در حضور تعداد زیاد سلول‌های مرده، زمانی‌که تعداد سلول‌های زنده اندک باشد، دشوار است (Pan and Breidt, 2007). در برخی مطالعات هیچ تأثیری از سلول‌های مرده بر سیگنال سلول‌های زنده مشاهده نشده است (Wang and Levin, 2006). در مطالعه حاضر از طریق تلقیح نسبت‌های مختلف سلول‌های زنده و مرده به مخلوط سبزیجات این نتیجه به‌دست آمد. در ضمن، جستجوی سلول‌های زنده حتی در حضور میکروبیوتای طبیعی سبزیجات، که حدود 10^5 cfu/g تخمین زده شد، موفقیت‌آمیز بود. به علاوه، نتایج این مطالعه نشان داد که سلول‌های مرده پاتوژن در تعیین کمیت سلول‌های زنده در هیچ کدام از نسبت‌های مورد آزمایش تداخل ایجاد نمی‌کنند. تنها برای *لیستریا مونوسیتوژنز* یک سیگنال ضعیف، زمانی که تنها سلول‌های مرده در سوسپانسیون وجود داشتند، مشاهده شد. این مطالعه پتانسیل اسانس رزماری را در کاربرد به‌عنوان یک افزودنی غذایی طبیعی یا نگه‌دارنده زیستی نشان می‌دهد. اسانس رزماری غلظت‌های پایین‌تر و مدت زمان مواجهه کوتاه‌تر نسبت به سایر اسانس‌ها قادر به غیرفعال‌سازی غیرقابل برگشت سه پاتوژن مورد آزمایش بود. علاوه بر این، حضور سلول‌های زنده اما غیرقابل کشت که اغلب نتیجه تیمار با اسانس‌ها می‌باشد، به‌روش PMA-qPCR قابل ارزیابی است. کفایت این روش برای جستجوی انتخابی باکتری‌های پاتوژن زنده در سبزیجات به‌دنبال غیرفعال‌سازی با اسانس رزماری در این مطالعه اثبات شده است.

سپاسگزاری

این مطالعه با استفاده از امتیاز پژوهشی شماره AGL2009-08603 از طرف وزارت علوم و ابداعات کشور اسپانیا و امتیاز پژوهشی اعطایی

Archive of SID
www.SID.ir

ACOMP/2010/279 و ACOMP/2012/199 از طـرف فرمانداری شهر والنسیا، اسپانیا، انجام شد.

منابع

- Adams, R.P. (2001). Identification of essential oils components by gas chromatography/ quadrupole mass spectroscopy. Illinois: Allured Publishing Corporation.
- Celiktas, O.Y., Kocabas, E.E.H., Bedir, E., Vardar Sukan F., Ozek, T. and Baser, K.H.C. (2007). Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of Rosmarinus officinalis, depending on location and seasonal variations. Food Chemistry, 100: 553–559.
- Debersac, P., Haydel, J.M., Amiot, M.J., Goudonnet, H., Artue, Y., Suschetet, M., *et al*. (2001). Introduction of cytochrome P450 and/or dhietoxication enzymes by various extracts of rosemary description of specific patterns. Food and Chemical Technology, 39(9): 907-918.
- Elizaquivel, P., Gabald¢n, J.A. and Aznar, R. (2011). Quantification of Salmonella spp., *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in non-spiked food products and evaluation of real-time PCR as a disgnostic tool in routine food analysis. Food Control, 22: 158-164.
- Elizaquivel, P., Sanchez, G. and Aznar, R. (2012a). Quantitative detection of viable foodborne E. coli O157:H7, *Listeria monocytogenes* and Salmonella in fresh-cut vegetables combining propidium monoazide and real-time PCR. Food Control, 25: 704-708.
- Elizaquivel, P., Sanchez, G. and Aznar, R. (2012b). Application of propidium monoazide quantitative PCR for selective detection of live Escherichia coli O157:H7 in vegetables after inactivation by essential oils. International Journal of Food Microbiology, 159(2): 115-121.
- Fittipaldi, M., Nocker, A. and Codony, F. (2012). Progress in understanding preferential detection of live cells using viability dyes in combination with DNA amplification. Journal of Microbiological Methods, 91(2): 276-289.
- Fu, Y.J., Zu, Y.G., Chen, L.Y., Shil, X.G., Wang, Z., Sunl, S., *et al*. (2007a). Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. Phytotherapy Research, 21(10): 989–994.
- Fu, Y.J., Zu, Y.G., Chen, L.Y., Efferth, T., Lianch, H., Liu, Z., *et al*. (2007b). Investigation of antibacterial activity of rosemary essential oil against *Propionibacterium acnes* with atomic force microscopy. Planta Medica, 73(12): 1275-1280.
- Glaser, P., Frangeul, L., Buchrieser, C., Rusniok, C., Amend, A., Baquero, F., *et al*. (2001). Comparative genomics of Listeria species. Science, 294: 849-852.
- Hayashi, T., Makino, K., Ohnishi, M., Kurokawa, K., Ishii, K., Yokohama, K., *et al*. (2001). Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with laboratory strain K-12. DNA Research, 8: 11-22.
- Hoorfar, J., Ahrens, P. and Radström, P. (2000). Automated 5ïnuclease PCR assay for identification of *Salmonella enterica*. Journal of Clinical Microbiology, 38(9): 3429-3435.
- International Organization for Standardization (ISO), (1998). Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes -- Part 2: Enumeration method. The European Standard EN. ISO No. 11290: 1998.
- International Organization for Standardization (ISO), (2001). Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection of *Escherichia coli* 0157. The European Standard EN. ISO No. 16654: 2001.
- International Organization for Standardization (ISO), (2002). Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the detection of Salmonella spp. The European Standard EN. ISO No. 6579: 2002.
- Jamshidi, R., Afzali, Z. and Afzali, D. (2009). Chemical composition of hydrodistillation essential oil of rosemary in different origins in Iran and comparison with other countries. American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science, 5(1): 78-81.

Archive of SID
www.SID.ir

- Jarrar, N., Abu-Hijleh, A. and Adwan, K. (2010). Antibacterial activity of Rosmarinus officinalis L. alone and in combination with cefuroxime against methicillin–resistant *Staphylococcus aureus*. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 3(2): 121-123.
- Jinneman, K.C., Yoshitomi, K.J. and Weagant, S.D. (2003). Multiplex real-time PCR method to identify shiga toxin genes stx1 and stx2 and *Escherichia coli* O157:H7/H e serotype. Applied and Environmental Microbiology, 69(10): 6327-6333.
- Josefsen, M.H., Lofstrom, C., Hansen, T.B., Christensen, L.S., Olsen, J.E. and Hoorfar, J. (2010). Rapid quantification of viable Campylobacter bacteria on chicken carcasses, using real-time PCR and propidium monoazide treatment, as a tool for quantitative risk assessment. Applied and Environmental Microbiology, 76(15): 5097-5104.
- Klancnik, A., Piskernik, S., Jersek, B., and Mozina, S.S. (2010). Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. Journal of Microbiological Methods, 81(2): 121-126.
- Kordali, S., Cakir, A., Mavi, A., Kilic, H. and Yildirim, A. (2005). Screening of chemical composition and antifungal and antioxidant activities of the essential oils from three Turkish Artemisia species. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 53: 1408–1416.
- Kramer, M., Obermajer, N., Bogovic, M.B., Rogelj, I. and Kmetec, V. (2009). Quantification of live and dead probiotic bacteria in lyophilised product by real-time PCR and by flow cytometry. Applied Microbiological Biotechnology, 84(6): 1137-1147.
- Lopes-Lutz, D., Alviano, D.S., Alviano, C.S. and Kolodziejczyk, P.P. (2008). Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of Artemisia essential oils. Phytochemistry, 69: 1732–1738.
- Lovdal, T., Hovda, M.B., Bjorkblom, B. and Moller, S.G. (2011). Propidium monoazide combined with real-time quantitative PCR underestimates heat-killed Listeria innocua. Journal of Microbiological Methods, 85(2): 164-169.
- Mathlouthi, N., Bouzaienne, T., Oueslati, I., Recoquillay, F., Hamdi, M., Urdaci, M., *et al*. (2010). Use of rosemary, oregano, and a commercial blend of essential oils in broiler chickens: In vitro antimicrobial activities and effects on growth performance. Journal of Animal Science, 90(3): 813-823.
- McClelland, M., Sanderson, K.E., Spieth, J., Clifton, S.W., Latreille, P. and Courtney, L. (2001). Complete genome sequence of Salmonella enterica serovar Typhimurium LT2. Nature, 413(6858): 852-856.
- Moghtader, M. and Afzali, D. (2009). Study of the antibacterial properties of the essential oil of rosemary. American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science, 5(3): 393-397.
- Nocker, A. and Camper, A.K. (2006). Selective removal of DNA from dead cells of mixed bacterial communities by use of ethidium monoazide. Applied and Environmental Microbiology, 72(3): 1997-2004.
- Nogva, H.K., Dromtorp, S.M., Nissen, H. and Rudi, K. (2003). Ethidium monoazide for DNA-based differenciation of viable and dead bacteria by 5'-nuclease PCR. BioTechniques, 34: 804-813.
- Ozcan, M.M.L. and Chalchat, J.C. (2008). Chemical composition and antifungal activity of rosemary (Rosmarinus officinalis L.) oil from Turkey. International Journal of Food Science and Nutrition, 59(7-8): 691-698.
- Pan,Y. and Breidt, F., Jr. (2007). Enumeration of viable *Listeria monocytogenes* cells by real time PCR with propidium monoazide and ethidium monoazide in the presence of dead cells. Applied and Environmental Microbiology, 73(24): 8028-8031.
- Randrianarivelo, R., Sarter, S., Odoux, E., Brat, P., Lebrun, M., Romestand, B., *et al*. (2009). Composition and antimicrobial activity of essential oils of Cinnamosma fragrans. Food Chemistry, 114: 680–684.

Archive of SID

www.SID.ir

- Rodríguez-Lázaro, D., Hernandez, M. and Pla, M. (2004). Simultaneous quantitative detection of Listeria spp. and *Listeria monocytogenes* using a duplex real-time PCR-based assay. FEMS Microbiology Letters, 233: 257-267.
- Rudi, K., Nogva, H.K., Moen, B., Nissen, H., Bredholt, S., Moretro, T., *et al*. (2002). Development and application of new nucleic acid-based technologies for microbial community analyses in foods. International Journal of Food Microbiology, 78: 171-180.
- Ruiz, A., Williams, S.K., Djeri, N., Hinton, A. Jr. and Rodrick, G.E. (2009). Nisin, rosemary, and ethylene diaminetetraacetic acid affect the growth of *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat turkey ham stored at four degrees Celsius for sixty-three days. Poultry Science, 88(8): 1765-1772.
- Schnetzinger, F., Pan, Y. and Nocker, A. (2013). Use of propidium monoazide and increased amplicon length reduce false-positive signals in quantitative PCR for bioburden analysis. Applied Microbiology and Biotechnology, 97: 2153-2162.
- Slimani, S., Robyns, A., Jarraud, S., Molmeret, M., Dusserre, E. and Mazure, C. (2012). Evaluation of propidium monoazide (PMA) treatment directly on membrane filter for the enumeration of viable but non cultivable Legionella by qPCR. Journal of Microbiological Methods, 88(2): 319-321.
- Soejima, T., Schlitt-Dittrich, F. and Yoshida, S.I. (2011). Polymerase chain reaction amplification length-dependent ethidium monoazide suppression power for heat-killed cells of enterobacteriaceae. Analytical Biochemistry, 418: 37-43.
- Sökmen, A., Gulluce, M., Askin H.A., Daferera, D., Tepe, B., Polissiou, M., *et al*. (2004). The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic Thymus spathulifolius. Food Control, 15: 627–634.
- Wang, S. and Levin, R.E. (2006). Discrimination of viable *Vibrio vulnificus* cells from dead cells in real-time PCR. Journal of Microbiological Methods, 64(1): 1-8.
- Wentao, X., Wei, Q., Kunlun, H., Feng, G., Jiajia, Y., Heng, Z. and YunBo, L. (2007). Antibacterial effect of grapefruit seed extract on food-borne pathogens and its application in the preservation of minimally processed vegetables. Postharvest Biology and Technology, 45(1): 126-133.
- Zegura, B., Dobnikb, D., Niderlc, M.H. and Filipiča, M. (2011). Antioxidant and antigenotoxic effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extracts in *Salmonella typhimurium* TA98 and HepG2 cells. Environmental Toxicology and Pharmacology, 32(2): 296–305.
- Zhu, R.G., Li, T.P., Jia, Y.F. and Song, L.F. (2012). Quantitative study of viable *Vibrio parahemolyticus* cells in raw seafood using propidium monoazide in combination with quantitative PCR. Journal of Microbiological Methods, 90: 262-266.

Archive of SID

www.SID.ir