Archive of SID

مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۵، دوره ۷۱، شماره ۱، ۴۷-۴۱
Original Article
Journal of Veterinary Research. 71,1:41-47, 2016

اثر اسانس سیر بر رشد باکتری اشرشیاکلی O۱۵۷:H۷ و تولید شیگاتوکسین ۲

مهدی طاهری[۳] علی میثاقی[۱*] افشین آخوندزاده بستی[۱] محمد حسین مدرسی[۲] حسن گندمی[۱] پریوش خسروی[۱] فاضله طالبی[۱] علی حشمتی[۳]

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 وآگاهی 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 O۱۵۷:H۷ ضروری به نظر می‌رسد. دوز عفونت‌زایی اشرشیاکلی O۱۵۷:H۷ درانسان 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 تحت بازدارنده اسانس سیر بر رشد باکتری *E. coli* O۱۵۷:H۷ (۳۵۲۱۸ ATCC) و تولید شیگاتوکسین۲. **روش کار:** حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) و حداقل غلظت باکتری کشی (MBC) اسانس سیر بر روی باکتری *E. coli* O۱۵۷:H۷ به روش میکرودایلوشن در دمای ۳۵°C تعیین گردید. باکتری *E. coli* O۱۵۷:H۷ در مجاورت غلظت‌های مختلف اسانس سیر در دمای ۳۵°C کشت داده شد و ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از کشت باانجام کشت سطحی شمارش باکتری انجام شد و نیز تولید شیگاتوکسین۲ بوسیله کیت سنجش شیگاتوکسین (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 O۱۵۷:H۷ 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 سبب۲ لوگ کاهش در رشد باکتری نسبت به نمونه کنترل شد که از نظر آماری معنی‌دار است ($p\leq ۰/۰۵$). غلظت ۰/۰۰۵ ٪ سبب کاهش تولید شیگاتوکسین۲ و غلظت‌های ۰/۰۱ و ۰/۰۱۵٪ مانع از تولید شیگاتوکسین۲ شد. **نتیجه گیری نهایی:** به طور کلی چنین نتیجه گیری می‌شود که استفاده از اسانس سیر بر روی رشد و تولید شیگاتوکسین۲ باکتری اشرشیاکلی O۱۵۷:H۷ اثر مهاری دارد.

واژه‌های کلیدی: فعالیت ضد میکروبی، اشرشیاکلی H۷:O۱۵۷ ، اسانس سیر، شیگاتوکسین۲

مقدمه

بیماریهای منتقله از راه غذا یکی از مشکلات اصلی سلامت و بهداشت عمومی محسوب می‌شوند که سالیانه میلیون‌ها نفر از جمعیت جهان به آن مبتلا و برخی نیز جان خود را از دست می‌دهند. باکتری‌های اشریشیاکلی تولید کننده شیگاتوکسین (Shiga toxin producing *Escherichia coli*) جزء سویه اشرشیاکلی آنتروهموراژیک (EHEC) هستند که شیگاتوکسین (STX) یا وروتوکسین (VT) تولید می‌کنند. دوز عفونت‌زایی اشرشیاکلی O۱۵۷:H۷ 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 شیگاتوکسین را دارد که فاکتور حدت این بیماری می‌باشد (۱۸). مصرف آب و غذای آلوده به باکتری اشرشیاکلی O۱۵۷:H۷ سبب ابتلاء انسان به بیماریهایی 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 مصرف کنندگان مواد غذایی از 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 (۱۰،۲۱). 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 بعلت تیوسولفات‌ها 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

*) نویسنده مسئول: تلفن: ۰۲۱-۶۱۱۱۷۰۴۰ نمابر: ۰۲۱-۶۶۹۳۳۲۲۲ Email: amisaghi@ut.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

دی سولفید، متیل آلیل تری سولفید و دی آلیل تتراسولفید تشکیل می‌دهد که اثر ضد میکروبی آنها اثبات شـده اسـت (۱۹). در مطالعات متعددی اثر ضد باکتریایی اسـانس سیر و ترکیبات گوگرددار مشتق شده از آن بر روی باکتری \شرشیاکلی مشخص گردیده است (۷،۲۱).

در این مطالعه، حداقل غلظت بازدارنده رشـد و حداقل غلظت باکتری کشی اسانس سـیر برای باکتری \شرشیاکلی محاسـبه گردید و نیز تأثیر غلظت‌های تحت بازدارنده اسـانس سـیر بر روی رشد باکتری و نیز تولید شیگاتوکسین ۲ توسط *E. coli* O۱۵۷:H۷ (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 بوسیله دستگاه کلونجر، اسانس سیر تهیه گردید سپس به منظور حذف رطوبت موجود در اسـانس 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 – طیـف نگار جرمی (GC–MS) انجام گرفت. دسـتگاه GC/MS از نوع FINNIGAN ۲۰۰۰ Thermoquest Trace GC (انگلسـتان) بـا ستون موئینه DB۵ به طول ۳۰m و قطر داخل ۲۵۰µm و ضخامت فیلم ۰/۲۵µm بود. برنامه دمایی شـامل دمای ابتدایـی ۵۰°C و دمای انتهایی ۲۶۵°C بـا افزایش تدریجی ۲/۵°C در هر دقیقـه، افزایش دما تا ۲۶۵°C بـه مدت ۳۰ دقیقه بود. دمای اتاقک تزریق ۲۵۰°C و سـرعت جریان گاز هلیوم ۱/۵ml در دقیقه بود. همچنین طیف نگار جرمی به روش یونیزاسیون الکترونی (EI) با انرژی یونیزاسیون ۷۰eV و دمای منبع یونیزاسیون ۲۵۰°C انجام شد (۱).

تهیه سوسپانسیون باکتریایی: باکتری *E. coli* O۱۵۷:H۷ (ATCC ۳۵۲۱۸) از بخش بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشـگاه تهران تهیه گردید. ابتدا کشت‌های نگهداری شده در ۲۰°C– به محیط آبگوشـت قلب و مغز (BHI) منتقل شـدند و بعد از ۱۸–۱۶ ساعت تجدید کشـت انجام شـد. سپس کشت‌های شـیب دار از آگار BHI تهیه گردیـد که جهت اسـتفاده در طول آزمایش در دمای ۴°C نگهداری شـد. برای تهیه دوز تلقیح باکتری‌ها از روش سـنجش جذب نوری با استفاده از اسپکتروفتومتر استفاده شد. جذب نوری ۰/۱ در طول موج ۶۰۰ nm برای باکتری \شرشیاکلی معادل ۱×۱۰^{۸}cfu/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).

تعییـن حداقل غلظـت بازدارنده رشـد (Minimum Inhibitory Concentration**):** تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) به روش میکرودایلوشـن صورت گرفت. بر اسـاس غلظت‌های مورد نیاز، اسـانس در محیط‌های کشـت آبگوشـت BHI حاوی ۱۰٪ دی متیل سولفوکساید (DMSO) حل شد (۱۴).

غلظت‌هـای ۰/۰۰۵، ۰/۰۱، ۰/۰۲، ۰/۰۴، ۰/۰۸ و ۰/۱۶٪ تهیه گردید. به هر چاهک از میکروپلیت‌های ۹۶ چاهکی ته گرد ۲۰۰µl از غلظت‌های مختلف ریخته شد و بعد از آن ۲۰µl از سوسپانسیون باکتریایی اضافه گردید و برای هر غلظت از اسانس دو چاهک مورد استفاده قرار گرفت. غلظت‌های نهایی باکتـری در هر چاهک حدود $۱۰^{۵}$cfu/ml بود. (تعداد دقیق باکتری از طریق کشت سطحی و شمارش کلونی تعیین گردید). در چاهک کنترل رشد، ۲۰۰µl محیط کشت حاوی ۱۰٪ دی متیل سولفوکساید و نیز ۲۰µl از سوسپانسیون باکتری ریخته شد. محتویات داخل میکروپلیت‌ها به مدت ۲۰ ثانیه در ۲۵۰rpm 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(۲،۱۴).

تعیین حداقل غلظت باکتری کشـی (Minimum Bactericidal Concentration**):** بعد از تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشـد (MIC)، ۱۰۰µl از رقت‌هایـی که کدورتی در آنها مشـاهده نشـد درمحیط BHI Agar کشـت سـطحی داده و پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵°C گرمخانه‌گذاری شـد. غلظتی که در آن تعداد کلنی‌ها نسـبت به دوز تلقیح ۳ لـوگ کاهش را نشـان داد بعنوان حداقل غلظت باکتری کشـی تعیین گردید(۱۷).

ارزیابی رشد و تکثیر باکتری \شرشیاکلی تحت تأثیر اسانس سیر: در ابتدا غلظت‌های تحت بازدارنده اسانس (۰/۰۰۵ ، ۰/۰۱ و ۰/۰۱۵٪) بصورت مجزا در لوله‌های فالکن در محیط آبگوشـت BHI حاوی ۱۰٪ DMSO تهیه گردید و باکتری \شرشیاکلی به محیط‌های حاوی غلظت‌های مختلف اسـانس اضافه شد و نیز یک کنترل مثبت (حاوی باکتری و محیط کشت فاقد اسـانس) و نیز کنترل‌های منفی برای هر غلظت از اسـانس تهیه شد که حاوی همه اجزا غیر از باکتری بود تاآسـپتیک بودن محیط‌های حاوی اسـانس مورد بررسـی قرار بگیرد. محاسـبه دوز بصورتی انجام گرفت که دوز نهایی باکتری \شرشـیاکلی O۱۵۷:H۷، ۱×۱۰۵cfu/ml بود. نمونه‌ها در ۳۵°C به مدت ۷۲ سـاعت گرمخانه‌گذاری شدند. جهت شمارش تعداد باکتری در زمان‌های صفر، ۱۸،۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از کشت‌ها رقت تهیه گردید و از هر رقت ۱۰۰µl در سطح محیط‌های آگار مغذی یا Nutrient Agar (NA) ریخته و کشـت سطحی انجام شـد و بعد از آن در ۳۵°C به مدت ۲۰–۱۸ ساعت گرمخانه گذاری انجام گرفت (۳).

بررسی اثر غلظت‌های تحت بازدارنده اسانس بر تولید شیگاتوکسین

www.SID.ir

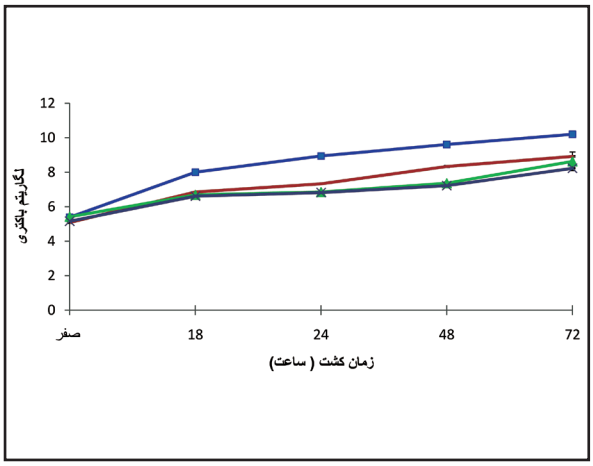
Archive of SID

۲ باکتری اشرشیاکلی O۱۵۷:H۷ : این آزمون به روش آگلاتیناسیون 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 ۴°C با دور ۴۰۰۰ rpm سانتریفوژ شدند. تیتر شیگاتوکسین 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 $p\leq ۰/۰۵$ 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* O۱۵۷:H۷ (۳۵۲۱۸ ATCC) به ترتیب ۰/۰۲٪ و ۰/۰۴٪ محاسبه گردید. نتایج تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس سیر روی رشد اشرشیاکلی O۱۵۷:H۷ در نمودار ۱ نشان داده شده است. نتایج آماری نشان داد که اسانس سیر بر روی رشد باکتری اشریشیاکلی تأثیر منفی داشته و سبب شد تا تعداد باکتری بطور معنی‌داری کمتر از نمونه کنترل گردد و با افزایش غلظت اسانس، تعداد باکتری اشرشیاکلی در مقایسه با نمونه کنترل کاهش بیشتری را نشان داد و بیشترین میزان کاهش مربوط به تیمار حاوی غلظت ۰/۰۱۵٪ اسانس سیر (۰/۷۵ MIC) بود که در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از کشت تعداد باکتری اشرشیاکلی نسبت به کنترل به ترتیب ۲/۱، ۲/۴ و ۲ لگاریتم کاهش را نشان داد و این میزان از نظر آماری معنی‌دار است ($p\leq ۰/۰۵$) و نیز در مقایسه هر تیمار در زمان‌های ۲۴، ۴۸و۷۲ 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٪ (۰/۷۵ MIC) می‌باشد. با بررسی نمودار ۱ مشخص می‌شود که در طی ۷۲ ساعت زمان آزمایش، بیشترین تأثیر منفی اسانس 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 شیگاتوکسین۲ در محیط آبگوشت BHI در مجاورت غلظت‌های مختلف اسانس در جدول ۲ نشان داده



نمودار ۱. تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس سیر بر رشد باکتری اشریشیاکلی O۱۵۷:H۷. —■— نمونه داری ۰/۰۰۵٪ اسانس سیر —■— نمونه فاقد اسانس (نمونه کنترل) —✕— نمونه داری ۰/۰۱۵٪ اسانس سیر —▲— نمونه داری ۰/۰۱٪ اسانس سیر

جدول ۱. ترکیب ترکیبات شیمیایی اسانس سیر که به روش گازکروماتوگرافی-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
پروپنیل دی تیوپروپانوات	۹۹۱	۱۱/۲۹
دی متیل تری سولفید	۸۱۵	۳/۲۰
-۳vinyl-[۴H]-۱,۲- dithiin	۱۰۸۲	۲/۱۹
-۲vinyl-[۴H]-۱,۳-dithiin	۱۱۰۷	۲/۱۱
دی آلیل تترا سولفید	۱۴۳۵	۱/۸۴
مجموع		۸۶/۳۴

جدول ۲. تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس سیر بر تولید شیگاتوکسین ۲. ACVT۲: کنترل مثبت شیگاتوکسین ۲. A: نمونه فاقد اسانس (نمونه کنترل). A۱: نمونه دارای ۰/۰۰۵٪ اسانس. A۲: نمونه دارای ۰/۰۱٪ اسانس. A۳: نمونه دارای ۰/۰۱۵٪ اسانس.

نمونه	۱/۲	۱/۴	۱/۸	۱/۱۶	۱/۳۲	۱/۶۴	۱/۱۲۸
ACVT۲	+	+	+	+	+	+	-
A	+	+	+	+	+/-	-	-
A۱	+	+/-	-	-	-	-	-
A۲	-	-	-	-	-	-	-
A۳	-	-	-	-	-	-	-

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

بحث

باکتری اشرشیاکلی O۱۵۷:H۷ یک باکتری بیماریزای شناخته شده

www.SID.ir

Archive of SID

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 اشرشیاکلی O۱۵۷:H۷ 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 بعلت ناپایداری و فرار بودن ترکیبات اسانس سیر باشد. Kumar و Brewal در سال ۱۹۹۸، حساسیت میکروب‌های بیماریزای مواد غذایی را نسبت به سیر مورد بررسی قرار دادند و باکتری اشرشیاکلی 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 مهاری سیر بر روی باکتری اشرشیاکلی ۱۰ برابر اثر مهاری بر روی باکتری لاکتوباسیلوس کازئی 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 آلیسین 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 (۴۰۰ppm) 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 اشرشیاکلی، ۷۵ppm و برای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ۹۳/۸ppm گزارش کردند (۲۰). Akhondzadeh Basti و همکاران در سال ۲۰۱۴ اثر اسانس سیر بر روی رشد ویبریوپاراهمولتیکوس بررسی کردند و میزان MIC و MBC را (۳۰۰ppm) ۰/۰۳ ٪ گزارش کردند (۱). Razavi Rohani و همکاران در سال ۲۰۱۱ تأثیر اسانس سیر را بر روی باکتری لیستریا منوسیتوژنز مورد بررسی قرار دادند و MIC را ۱۰۰ppm گزارش کردند. همچنین اعلام کردند دی آلیل تتراسولفید اصلی‌ترین ترکیب گوگرددار است که از آلیسین 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 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 بعلت متفاوت بودن سیر 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 اثرضد 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). Tsao و Yin 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 واریته 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٪ (۵۰ppm) ، ۰/۰۱٪ (۱۰۰ppm) و ۰/۰۱۵٪ (۱۵۰ppm) بر روی رشد باکتری اشرشیاکلی O۱۵۷:H۷ اثر مهاری داشت و با افزایش غلظت اسانس اثر مهاری بیشتر شد که از نظر آماری معنی‌دار است. Akhondzadeh Basti و همکاران در سال ۲۰۱۴ اثر اسانس سیر بر روی رشد ویبریوپاراهمولتیکوس 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 اشرشیاکلی O۱۵۷:H۷ 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 معنی‌دار است (۲). در بررسی صورت گرفته مشخص شد غلظت ۰/۰۰۵٪ (۵۰ppm) سبب کاهش میزان تولید توکسین شد و غلظت‌های ۰/۰۱٪ (۱۰۰ppm) و ۰/۰۱۵٪ (۱۵۰ppm) 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 مهاری دارد. Akhondzadeh Basti و همکاران در سال ۲۰۱۴ اثر اسانس سیر را نیز بر روی تولید توکسین ویبریوپاراهمولتیکوس 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 شیگاتوکسین۲ باکتری

www.SID.ir

Archive of SID

اشرشیاکلی O۱۵۷:H۷ مورد بررسی قرار دادند و اعلام کردند افزایش غلظت اسانس تا ۰/۰۲٪ اثر بازدارندگی بر تولید شیگاتوکسین۲ داشت (۲). در مقایسه اثر اسانس سیر بر روی رشد و تولید توکسین باکتری‌های اشرشیاکلی O۱۵۷:H۷ و ویبریوپاراهمولتیکوس چنین نتیجه گرفته می‌شود که اثر مهاری مشابهی روی رشد داشته ولی از نظر مهار توکسین‌زایی روی باکتری اشرشیاکلی O۱۵۷:H۷ مؤثرتر می‌باشد و این تفاوت می‌تواند بعلت 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 باکتری اشرشیاکلی O۱۵۷:H۷ با توجه به آنچه که Cheng و Yim در سال ۲۰۰۳ در مورد ترکیبات مؤثر اسانس سیر ذکر کردند قابل توجیه می‌باشد (۲۱).

Sepehriseresht و همکاران در سال ۲۰۰۸ دو روش مولکولی (PCR) و سرولوژیکی (VTEC–RPLA) به منظور بازیابی اشرشیاکلی 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 مهاری مناسب اسانس سیر بر روی رشد باکتری اشرشیاکلی O۱۵۷:H۷ و تولید شیگاتوکسین۲ 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.

References

1. 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.
2. 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.
3. Azizkhani, M., Misaghi, A., Akhondzadeh Basti, A., Gandomi, H., Hosseini, H. (2012) Effect of *Zataria multifora* Boiss. *Essential Oil* on growth and enterotoxin E production of *Staphylocuccus aureus* ATCC 29213. J Med Plants. 4: 185-193.
4. 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.
5. Bonaduce, I., Colombini, M.P., Diring, S. (2006) Identification of garlic in old gildings by gas chromatographyemass spectrometry. J Chrom A. 1107: 226-232.
6. Calvo-Gómez, O., Morales-López, J., López, M.G. (2004) Solid-phase microextractionegas chromatographice mass spectrometric analysis of garlic oil obtained by hydrodistillation. J Chrom A. 1036: 91-93.
7. Harris, J.C., Cottrell, S.L., Plummer, S., Lloyd, D. (2001) Antimicrobial properties of *allium sativum* (garlic). Applied Microbiol Biotechnol. 57: 282-286.
8. Lanzotti, V. (2006) The analysis of onion and garlic. J Chrom A. 1112: 3-22.
9. 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.
10. Kumar, M., Berwal, J.S. (1998) Sensitivity of food pathogens to garlic (*Allium sativum*). J Applied Microbiol. 84: 213-215.
11. 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.
12. Misaghi, A., Akhondzade Basti, A. (2007) Effect of Zataria multiflora boiss essential oil and nisin on Bacillus cereusATCC 11778. Food Control.

www.SID.ir

Archive of SID

18: 1043- 9.
13. Pan, A.S., Steward, J., Fyte, L. (2009) The potential application of plant essential oils as natural preservativers 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. Sepehriseresht, 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., Hidaka, A., Ogasawara, J., Hase, A., Masaki, H., Nishikawa, 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 organosulfur compounds in ground beef. Meat Sci. 63: 23-28.

www.SID.ir

Archive of SID

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]

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

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

[3]*Department 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**

www.SID.ir