

اثر ضد میکروبی آویشن شیرازی بر روی *E.coli* O157:H7 در گوشت چرخ کرده گوساله

در طی نگهداری در یخچال (سردخانه)

نگین نوری^{*}، نوردهر رکنی¹، افشین آخوندزاده¹، علی میثاقی¹، فهیمه توریان¹

1- گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

*نویسنده مسئول مکاتبات: nnoori@ut.ac.ir

(دریافت مقاله: 89/10/18 پذیرش نهایی: 89/12/9)

چکیده

هدف از مطالعه حاضر، تعیین اثر اسانس آویشن شیرازی بر روی رشد باکتری *E.coli* O157:H7 در گوشت چرخ کرده متأثر از غلظت‌های مختلف (صفر، 0/005، 0/015 و 0/03 درصد) آویشن شیرازی در درجه حرارت‌های 4 و 10 درجه سلسیوس در مدت 14 روز است. در همه غلظت‌های فوق خواص حسی قابل قبولی مشاهده گردید. در غلظت 0/03 درصد اثر ضدباکتریایی قوی مشاهده گردید. ضریب همبستگی غلظت اسانس آویشن شیرازی با لگاریتم تعداد باکتری مورد مطالعه در دماهای 4 و 10 درجه سلسیوس به ترتیب $-0/701$ و $-0/599$ بود، که نشان می‌دهد با افزایش غلظت اسانس، میزان رشد باکتری در طی دوره نگهداری کاهش می‌یابد و از نظر آماری اثر اسانس بر روی رشد باکتری معنی‌دار بود ($p < 0/01$). یافته‌های این مطالعه نشان‌دهنده این است که جمعیت باکتری *E.coli* O157:H7 در گوشت چرخ کرده تیمار شده با غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی نگهداری شده در دمای 4 درجه سانتی‌گراد کاهش بیشتری نسبت به نمونه‌های نگهداری شده در دمای 10 درجه سانتی‌گراد (دمای یخچالی نامناسب) داشتند که این مسأله نشان‌دهنده نقش مفید نگهداری در شرایط سرد می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آویشن شیرازی، اسانس، *E.coli* O157:H7، گوشت چرخ کرده

مقدمه

باکتری‌های مولد فساد و بیماری‌زا می‌شود و در نهایت کیفیت کاهش یافته و بهداشت عمومی در معرض خطر قرار می‌گیرد (Vernozy, 2002).

گوشت و فرآورده‌های گوشتی می‌توانند به‌آسانی با میکروارگانیزم‌های مختلف آلوده شوند و اگر شرایط حمل و نقل و نگهداری آنها مناسب نباشد، منجر به رشد

دارد (Hosseinzadeh, 2000). آویشن شیرازی دارای اثر ضد میکروبی می باشد که این اثر به طور عمده مربوط به ترکیبات فنلی آن است (Bart, 2004). هر قدر مقدار مواد فنولیک در اسانس بالاتر باشد، خواص ضد میکروبی آن بیشتر خواهد بود. این مواد شامل کارواکرول، اوژنول و تیمول هستند (Bagamboula, 2004 and Bart, 2004). استفاده از نگهدارنده های طبیعی برای مهار رشد باکتری های بیماری زای مهم مانند *E. coli* O157:H7 یک ایده ارزشمند در صنعت فرآورده های گوشتی به شمار می آید.

E. coli O157:H7 یک باکتری فوق العاده بیماری زا است. این باکتری گرم منفی، بی هوازی اختیاری است و دوز بیماری زایی آن پایین در حدود 50-5 ارگانیزم است (Betts, 2000). این باکتری وروتوکسین I و II که سیتوتوکسیک هستند و همچنین همولیزین را تولید می کند. می تواند به سطح روده چسبیده و در آن جا کلونیزه شود. این باکتری سبب ایجاد کولیت خونریزی دهنده، سندروم همولیز ناشی از اورمی (HUS) و ترومبوسیتوپاتیک پورپورا شده و می تواند منجر به مرگ شود (karmali, 1989). شیوع بیماری ناشی از این باکتری در سال 1993 در آمریکا نتیجه مصرف همبرگرهای نیم پز بود که در اثر مصرف آنها 600 نفر دچار بیماری شده و 4 کودک تلف شدند. همچنین در سال 1996 باعث ابتلای 500 نفر در اسکاتلند شد که 20 نفر جان خود را از دست دادند (Mortazavi, 2006).

نگهداری در سردخانه معمولاً متداول ترین روش نگهداری در گوشت و فرآورده های گوشتی محسوب می شود. اغلب به منظور افزایش مدت زمان نگهداری، از مواد ضد میکروبی و آنتی اکسیدان که اکثر اوقات سنتتیک هستند استفاده می شود (Imaida, 1983). این در حالی است که امروزه مصرف کنندگان نیز آگاهی بیشتری در مورد عوارض استفاده از نگهدارنده های شیمیایی پیدا کرده اند و تقاضای غذاهای تازه تر، طبیعی تر و همراه با کنترل بیشتر را دارند.

مکانیسم اثر ضد باکتریایی اسانس های گیاهی به خاصیت آب گریزی آنها برمی گردد که موجب نفوذ این مواد به فسفولیپیدهای غشاء سلول باکتری و باکتری ها شده و سبب اختلال در ساختمان های آنها و افزایش نفوذ پذیری می گردد. این مسئله موجب خروج و نشت یون ها و دیگر محتویات سلولی شده که در نهایت مرگ سلول را دربر خواهد داشت (Bart, 2004 and Nazer, 2005).

تاکنون مطالعات بسیاری در زمینه اثر ضد میکروبی اسانس های گیاهی بر روی میکروب های بیماری زای مواد غذایی صورت گرفته است اما تحقیقات زیادی بر روی اثر ضد میکروبی آویشن شیرازی بر روی *E. coli* O157:H7 در گوشت چرخ کرده انجام نشده است.

آویشن شیرازی یکی از گیاهان خانواده نعناع می باشد که بومی ایران، افغانستان و پاکستان است. از این گیاه در طب سنتی به عنوان آنتی سپتیک، ضد اسپاسم و ضد التهاب یاد شده است و به عنوان طعم دهنده در مواد غذایی کاربرد فراوانی

جذب نوری آنها در طول موج 600 نانومتر تعیین گردید. هم‌زمان با عمل فوق، نمونه برداری از محتویات لوله‌های کووت صورت گرفته و شمارش باکتریایی انجام شد و در نهایت لوله کووت که حاوی 1×10^8 باکتری در هر میلی‌لیتر بود مشخص گردید. بدین ترتیب در هر بار انجام آزمایش با مشخص شدن جذب نوری معادل تقریباً 1×10^8 باکتری در میلی‌لیتر که با کشت دادن سطحی نیز تأیید شد، لوله کووت حاوی تقریباً 1×10^8 باکتری در هر میلی‌لیتر مشخص گردید. سپس از این لوله رقت‌های ده‌تایی تهیه نموده و از این رقت‌ها جهت به‌دست آوردن دوز تلقیح 10^3 در این آزمایش استفاده شد (Bouchra, 2003 and Rasavilar, 1998).

تهیه و آماده‌سازی گوشت چرخ‌کرده

مقدار 5 کیلوگرم گوشت چرخ‌کرده نمونه‌گیری شد و به اندازه‌های 25 گرمی در داخل پلاستیک‌های استریل بسته‌بندی شد. سپس در آزمایشگاه سازمان انرژی اتمی به‌منظور استریل نمودن تحت اشعه‌دهی گاما به میزان 5 کیلوگری (5K Gy) قرار گرفت و در تأیید سترون بودن، کشت میکروبی انجام شد.

تهیه اسانس و آنالیز آن

گیاه آویشن شیرازی در فصل تابستان از استان فارس جمع‌آوری شد و توسط هرباریوم پژوهشکده گیاهان دارویی

در این مطالعه، اثر ضد میکروبی اسانس آویشن شیرازی بر روی *E. coli* O157:H7 در گوشت چرخ‌کرده گوساله نگهداری شده در یخچال بررسی شد.

مواد و روش‌ها

باکتری مورد مطالعه

سوش *E. coli* O157:H7 (مولد ورو توکسین Π)، اهدایی توسط خاشابی از انستیتو تحقیقات میکروبیولوژی اتریش می‌باشد. در ابتدا این کشت لیوفیلیزه در محیط آبگوشت قلب و مغز (BHI) در 35 درجه سلسیوس 18 ساعت، 2 مرتبه متوالی مورد تجدید کشت قرار گرفت. سپس کشت دوم به‌میزان 5 به 1 با گلیسرین سترون مخلوط شد و در قسمت‌های مساوی در لوله‌های میکروسانتیفریژ اپندرف سترون در 20- درجه سلسیوس نگهداری شد.

تهیه میزان تلقیح باکتریایی

برای تعیین میزان تلقیح باکتریایی مورد مطالعه، باکتری منجمد داخل میکروسانتیفریژ اپندرف را به محیط آبگوشت BHI منتقل کرده و 2 مرتبه متوالی در 35 درجه سانتی‌گراد به‌مدت 18 ساعت گرم‌خانه‌گذاری گردید. سپس از کشت 18 ساعته دوم مقادیر مختلفی به لوله‌های کووت حاوی 5 میلی‌لیتر آبگوشت BHI سترون اضافه کرده و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Milton Roy company, USA)

دمای یخچالی مناسب و نامناسب به مدت 14 روز نگهداری گردید و از روز صفر، هر 2 روز یکبار تا روز 14 شمارش میکروبی انجام شد.

آنالیز میکروبی

در زمان‌های مورد نظر، به نمونه‌های گوشت چرخ‌کرده گوساله (25 گرم) در کیسه‌های استوماکر در شرایط سترون 225 میلی‌لیتر آب پیتونه 0/1 درصد اضافه کرده و 2 دقیقه در دمای اتاق توسط استوماکر یکنواخت‌سازی شد و سپس رقت‌های بعدی را با استفاده از لوله‌های رقت حاوی آب پیتونه 0/1 درصد به‌دست آورده و در پلیت حاوی آگار قلب و مغز (BHI) کشت داده و در 35 درجه سلسیوس به مدت 24 ساعت گرم‌خانه‌گذاری شد، لازم به ذکر است که این آزمایش در 3 تکرار انجام شد و سپس نتایج در فرم‌های مربوطه ثبت گردید (Thomas, 2004).

آنالیز آماری

ارزیابی اثر غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی حرارت بر روی رشد *E. coli* O157:H7 با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه ANOVA انجام شد و از نرم‌افزار SPSS 16.0 استفاده گردید. جهت مقایسه بین میانگین‌ها از تست Post Hoc(LSD), Tukey استفاده شد.

جهاد دانشگاهی دانشگاه علوم پزشکی تهران تأیید نام علمی گردید. اسانس از سرشاخه‌های گیاه توسط دستگاه Celevenger type apparatus به روش تقطیر با بخار داغ تهیه و توسط گاز کروماتوگراف متصل به طیف نگار جرمی (MS-GC) آنالیز گردید. دستگاه (MS-GC) مورد استفاده از نوع Thermoquest Finnigan با ستون موئینه به طول 30 متر و قطر داخلی 250 میکرومتر و ضخامت لایه داخلی 0/25 میکرومتر با برنامه دمایی 50 تا 265 درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه و نگهداری ستون در 265 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 دقیقه بود. دمای محفظه تزریق 250 درجه سلسیوس، سرعت گاز هلیوم 1/5 میلی‌متر در دقیقه، انرژی یونیزاسیون شناسگر EI 70 الکترون ولت و دمای منبع یونیزاسیون 250 درجه سلسیوس بود.

تلقیح باکتری و اضافه نمودن اسانس به گوشت چرخ‌کرده

مقدار 25 گرم گوشت چرخ‌کرده به‌همراه غلظت‌های مورد نظر اسانس آویشن شیرازی و دوز تعیین‌شده باکتری را در داخل کیسه‌های استریل (bag mixer) به ابعاد 35×19cm قرار داده سپس کیسه‌های استریل را در استوماکر interscience 400vw, France-Model: W (window door/porte fenetre) قرار داده و به مدت 2 دقیقه در دمای اتاق به‌منظور توزیع یکنواخت اسانس و باکتری در گوشت چرخ‌کرده یکنواخت گردید، سپس کیسه‌های استوماکر با درب بسته را در دماهای 4 و 10 درجه سلسیوس به‌ترتیب

یافته‌ها

نتایج بررسی رشد *E.coli* O157:H7 تلقیح شده (10^3 cfu/g) در گوشت چرخ کرده متأثر از غلظت‌های مختلف (صفر، 0/005، 0/015 و 0/03 درصد) اسانس مذکور در طی 14 روز نگهداری در دمای 4 و 10 درجه سانتی‌گراد در جدول 2 و 3 آمده است.

نتیجه آنالیز ترکیبات اسانس آویشن شیرازی مورد استفاده در این مطالعه با استفاده از GC/MS در جدول شماره 1 نشان داده شده است. همان‌گونه که در جدول آمده، بیشترین ترکیب (71/12 درصد) تشکیل‌دهنده اسانس، کارواکرول (Carvacrol) است.

جدول 1: نتایج آنالیز اسانس آویشن شیرازی مورد مطالعه با استفاده از GC/MS

نام ترکیب	اندیس بازدارنده	درصد
Thujene	930	0/19
Alpha_Pinene	937	4/26
Beta Pinene	976	0/43
Beta myrcene	985	0/85
Eucaliptol	1024	3/37
Gama terpinene	1055	7/34
Linalool	1090	0/68
Thymol methyl ether	1236	0/47
Carvacrol methyl ether	1243	0/46
Carvacrol	1299	71/12
Trans_Caryophyllen	1418	0/41
Globulol	1582	2/32
جمع	-	91/90

جدول 2: اثر اسانس آویشن شیرازی بر روی رشد *E.coli* O157:H7 در گوشت چرخ کرده طی 14 روز نگهداری در دمای 10 درجه سلسیوس

روز	تعداد باکتریایی ^A (Log cfu/g) در غلظت‌های مختلف آویشن		
	0/03	0/015	0/005
0	3/03±0/05	3/01±0/02	3/03±0/05
2	3/01±0/02	3/19±0/23	4/01±0/07
4	3/19±0/21	3/46±0/32	4/42±0/27
6	3/46±0/43	3/81±0/39	5/04±0/21
8	3/55±0/67	4/49±0/41	5/69±0/51
10	3/66±0/17	5/08±0/16	6/38±0/29
12	3/65±0/81	5/55±0/41	6/83±0/38
14	3/81±0/98	5/46±0/66	7/43±0/53

A میانگین ± انحراف معیار

جدول 3: اثر اسانس آویشن شیرازی بر روی رشد *E. coli* O157:H7 در گوشت چرخ کرده طی 14 روز نگهداری در دمای 4 درجه سلسیوس

تعداد باکتریایی (Log cfu/g) ^A در غلظت‌های مختلف آویشن				روز
0/03	0/015	0/005	شاهد	
3/03±0/06	3/04±0/06	3/07±0/07	3/02±0/37	0
3/07±0/07	3/07±0/07	3/76±0/26	4/23±0/12	2
3/05±0/08	3/16±0/04	4/17±0/04	5/14±0/03	4
3/12±0/06	3/42±0/15	4/78±0/06	5/33±0/09	6
2/86±0/08	4/23±0/12	5/22±0/1	6/74±0/08	8
2/62±0/1	4/84±0/1	6/14±0/07	7/86±0/07	10
2/04±0/06	5/26±0/11	6/46±0/12	8/38±0/14	12
2/03±0/05	4/87±0/07	6/87±0/08	8/62±0/12	14

A میانگین ± انحراف معیار

بحث و نتیجه‌گیری

درصد در همین دما جمعیت باکتری، $3/81 \text{ Log cfu/g}$ نشان داده شده است که نشان‌دهنده تأثیر مثبت غلظت اسانس آویشن شیرازی است ($P < 0/01$).

اگرچه مدت‌هاست که اثر بازدارندگی ادویه‌جات، عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی شناخته شده است، اما در سال‌های اخیر توجه زیادی به تأثیر عصاره‌های معطر و اسانس‌های گیاهی و یا مواد مؤثره این اسانس‌ها بر روی عوامل بیماری‌زا و میکروارگانیسم‌های عامل فساد مواد غذایی شده است (Valero, 2006; Akgual, 1988; Ali, 1999).

بر طبق نتایج این مطالعه، غلظت 0/005 درصد اسانس آویشن شیرازی اثر مهاری کمی بر روی رشد باکتری داشت. همان‌طور که در مطالعات انجام‌شده توسط Friedman و همکاران در سال 2002، Marino و همکاران در سال 1999 و Sagdic در سال 2003 نشان داده شده است، اسانس‌های گیاهی اثر ضد میکروبی بر روی *E. coli* O157:H7 داشته‌اند.

این مطالعه نشان می‌دهد که در بالاترین غلظت اسانس آویشن شیرازی (0/03 درصد) در 4 درجه سلسیوس هر چه مدت زمان نگهداری بیشتر شود میزان رشد باکتری کاهش می‌یابد ($P < 0/01$).

تعداد *E. coli* O157:H7 در گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف آویشن شیرازی نسبت به گروه کنترل در دمای 4 درجه و 10 درجه سلسیوس اختلاف معنی‌داری داشتند ($P < 0/05$). در غلظت 0/03 درصد آویشن شیرازی تعداد *E. coli* O157:H7 در روز هشتم به $2/86 \text{ Log cfu/g}$ در دمای 4 درجه سلسیوس رسید که این مقدار تقریباً تا انتهای دوره نگهداری بدون تغییر ماند ($P < 0/01$).

در دمای 10 درجه سلسیوس جمعیت باکتری مورد نظر در گروه کنترل طی دوره نگهداری سیر افزایشی داشت و در پایان دوره به $9/16 \text{ Log cfu/g}$ رسید اما در غلظت 0/03

در سال 2005 ندارد. هر چند که Roller و Kisko در سال 2005 یافتند که این ماده فعالیت ضد میکروبی بر علیه *E. coli* O157:H7 در آب سیب دارد.

در مطالعه حاضر، ضریب همبستگی غلظت اسانس با لگاریتم تعداد باکتری در دماهای 4 و 10 درجه سانتی گراد به ترتیب برابر با 0/701 - و 0/599 - بود. منفی بودن این ضریب بدین معنی است که با افزایش غلظت اسانس، میزان رشد باکتری در طی دوره نگهداری کاهش می یابد. همچنین نشان داده شد که تأثیر مقادیر مختلف اسانس بر میزان رشد باکتری معنی دار می باشد (P < 0/01). بر اساس نتایج به دست آمده، تأثیر معنی دار اسانس بر روی رشد باکتری مورد مطالعه نشان داد که اثر بازدارندگی اسانس در 4 درجه سانتی گراد به طور معنی دار (P < 0/01) افزایش پیدا کرده که این موضوع با یافته های بسیاری از محققین هم خوانی دارد (Blackburn, 2002; Fujikawa, 2006; Vaiero, 2003). در مطالعه حاضر مشخص گردید دمای نگهداری، مدت زمان نگهداری و غلظت اسانس آویشن شیرازی بر میزان رشد باکتری تأثیر آماری معنی داری دارد (P < 0/01). بنابراین می توان ادعان نمود که اسانس گیاه مورد مطالعه می تواند به عنوان یک نگهدارنده طبیعی و ضدباکتریایی مناسب علیه باکتری های گرم منفی از جمله *E. coli* O157:H7 در فرآورده های گوشتی مورد استفاده قرار گیرد.

در مطالعات متعددی گزارش شده است که اثر ضد میکروبی اسانس های گیاهی وابسته به دوز است (Burt, 2004 and Sagdic, 2003) که مطالعه حاضر نیز مؤید این مسأله است.

Ozcan و همکاران در سال 2003 نشان دادند که با استفاده از روش انتشار دیسکی اسانس آویشن در غلظت 0/2 درصد هیچ فعالیت ضد میکروبی بر علیه *E. coli* O157:H7 ندارد، در حالی که در غلظت 0/4 درصد فعالیت زیادی دارد.

Burt و همکاران (2003) فهمیدند که اسانس آویشن در غلظت های پایین مانند 0/12 و 0/25 درصد به ترتیب اثر باکتریواستاتیکی و باکتریوسیدی دارند.

به علاوه، Sagdic و همکاران (2002) گزارش کردند که اسانس آویشن در غلظت های 0/5، 1/5 و 2 درصد در نوترینت برات بر روی *E. coli* O157:H7 اثر باکتریوسیدی وابسته به دوز در طی نگهداری در دمای 37 درجه سلسیوس به مدت 7 روز دارد. کارواکرول و تیمول، دو ترکیب فنلی مهم در آویشن شیرازی هستند که اثر قوی ضد میکروبی آنها توسط محققین نشان داده شده است

Akgul, 1988; Bagamboula, 2004; Bouchra, 2003; Chami, 2004; Lopez, 2005; (Didry, 1994; Periago, 2001).

ماده Gama - terpinene یک ترکیب هیدروکربنی مونوترپنی است که در اسانس آویشن شیرازی و thyme وجود دارد و هیچ گونه اثر ضد میکروبی در محیط های آزمایشگاهی بر علیه *E. coli* O157:H7 بر طبق یافته های Burt و همکاران

The antimicrobial effect of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil against *E. coli* O157: H7 in minced beef meat during refrigerated storage

Noori, N.^{1*}, Rokni, N.¹, Basti, A. A.¹, Misaghi, A.¹ and Tooryan, F.¹

Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.

*Corresponding author email: nnoori@ut.ac.ir

(Received: 2010/12/31 Accepted: 2011/2/28)

Abstract

The antimicrobial effect of different concentrations of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil at supplementation levels of (0, 0.005, 0.015, 0.03%), on *E. Coli* O157:H7 was examined in minced beef meat. All of the above concentrations showed acceptable organoleptic properties in minced beef. Eo at 0.03% possessed a strong antibacterial activity against *E.Coli* O157:H7 in minced beef. The correlation coefficient of different concentrations of *zataria multiflora* Boiss. essential oil with logarithm of the numbers of *E. Coli* O157:H7 was -0.701 , -0.599 at 4 and 10°C respectively. It was found that effect of different concentrations of essential oil on growth rate of *E. coli* O157:H7 was statistically significant ($p < 0.01$). In this study, it was found that treatment of minced beef meat with different concentrations of essential oils showed an inhibitory effect on *E. Coli* O157:H7 during storage at 4°C, but not at 10°C. According to the results of present study, storage at a proper refrigerated storage (4°C) is suggested.

Key words: *Zataria multiflora*, Boiss. *E.coli* O157:H7, Minced meat