نشریه فرآوری و نگهداری مواد غذایی
جلد هفتم، شماره دوم، ۹۴
۹۷-۱۱۸
http://ejfpp.gau.ac.ir

بررسی تاثیر ضد میکروبی اسانس آویشن شیرازی بر پاتوژن‌های گوشت چرخ شده با استفاده از PCR زمان واقعی و پروپیدیوم مونو آزید

مریم عزیزخانی[1*]

[1]استادیار دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فن‌آوری‌های نوین آمل، آمل، ایران

تاریخ دریافت: ۹۴/۰۱/۲۳ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۴/۰۵/۰۳

چکیده

سابقه و هدف: به تازگی، PCR زمان واقعی (Real time PCR) در ترکیب با پروپیدیوم مونو آزید با موفقیت برای تمایز بین سلول‌های زنده *اشرشیاکلی* O157: H7 و باکتری‌های مشابه کشته شده توسط اسانس‌های زیره، میخک، پونه کوهی و دارچین به‌کار رفته است. در این مطالعه، تاثیر ضدمیکربی اسانس آویشن شیرازی بر باکتری‌های بیماریزای گوشت چرخ شده با استفاده از روش PCR زمان واقعی و پروپیدیوم مونو آزید مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: آنالیز ترکیبات شیمیایی اسانس توسط دستگاه گاز کروماتوگراف متصل به طیف نگار جرمی انجام شد. آزمایش‌های اولیه به‌منظور تعیین کمینه غلظت کشندگی آویشن شیرازی برای *اشرشیاکلی* O157:H7، *سالمونلا انتریکا* و *لیستریا مونوسیتوژنز* انجام شد. سپس، PCR کمی با پروپیدیوم مونو آزید به منظور تعیین کمی انتخابی سلول‌های زنده در یک جمعیت باکتریایی تحت تیمار با اسانس آویشن شیرازی در گوشت چرخ کرده انجام شد.

یافته‌ها: کارواکرول ترکیب اصلی اسانس آویشن شیرازی (۷۱/۱۲ درصد) بود. غلظت‌های ۰/۰۲ ، ۰/۰۳۵ و ۰/۰۴۵ درصد، به‌ترتیب، موجب غیرفعال سازی *لیستریامونوسیتوژنز*، *اشرشیاکلی* O157:H7 و *سالمونلا انتریکا* شد. *لیستریامونوسیتوژنز* طی ۳۰ دقیقه و باکتری‌های بیماریزای گرم منفی طی ۱ ساعت و ۳۰ دقیقه کشته شدند. مطابق نتایج PCR کمی با پروپیدیوم مونو آزید به‌دست آمده برای ترکیب‌های مختلف سلول‌های زنده و مرده

*نویسنده مسئول: azizkhani.maryam@gmail.com

در گوشت چرخ شده تلقیح شده به‌طور مصنوعی، تعداد باکتری ها در گوشت چرخ شده $۳/۲۷\times۱۰^{٤}$ واحد تشکیل دهنده کلنی در میلی‌لیتر بود. مقادیر به‌دست آمده از PCR کمی با پروپیدیوم مونو آزید برای *سالمونلا انتریکا* و *اشرشیاکلی* O157:H7، با تعداد سلول‌های زنده شمارش شده روی پلیت مرتبط بود. لیکن در خصوص *لیستریامونوسیتوژنز*، تعداد سلول‌های زنده در همه موارد بیشتر از تعداد واقعی تخمین زده شد و برای نمونه حاوی ۱۰۰ درصد سلول‌های مرده، PCR کمی با پروپیدیوم مونو آزید. همچنان وجود ۳/۸ درصد سلول زنده را نشان می‌داد.

نتیجه‌گیری: از آن جا که اسانس آویشن شیرازی در مدت زمان کوتاه قادر به غیر فعال سازی برگشت ناپذیر سه باکتری بیماریزای مورد آزمایش در غلظت‌های پایین بوده است، واجد قابلیت کاربرد به عنوان افزودنی طبیعی یا نگهدارنده زیستی در مواد غذایی می باشد. علاوه بر این، روش PCR کمی با پروپیدیوم مونو آزید به صورت کارآمدی برای جستجو و تشخیص انتخابی باکتری‌های بیماری زای زنده و فعال به دنبال تیمار با اسانس آویشن شیرازی در گوشت چرخ شده به کار رفته است.

واژه‌های کلیدی: آویشن شیرازی، گوشت چرخ شده، PCR کمی با پروپیدیوم مونو آزید، نگهدارنده زیستی

مقدمه

ایمنی میکربی محصولات غذایی موضوع نگرانی اصلی مصرف کنندگان و نیز صنعت غذایی می‌باشد. استراتژی‌های نگهداری مواد غذایی مانند سرد کردن، انجماد، تخمیر، پاستوریزاسیون و استفاده از ترکیبات ضدمیکربی سنتزی به‌صورت گسترده‌ای جهت کنترل میکروارگانیسم‌های عامل فساد و نیز بیماریزا در مواد غذایی به کار رفته است. در حال حاضر، تقاضای مصرف‌کنندگان برای جایگزینی ترکیبات ضدمیکربی سنتزی شیمیایی با ترکیبات طبیعی جهت حصول اطمینان از ایمنی مواد غذایی رو به افزایش است. در این رابطه، اسانس‌های گیاهی به‌عنوان نگهدارنده‌های خوراکی طبیعی توجه زیادی را جلب نموده‌اند. علاوه بر اینکه، اسانس‌های گیاهی از گذشته‌های دور به عنوان طعم دهنده در مواد غذایی به‌کار می‌روند، واجد طیف وسیعی از فعالیت‌های ضدمیکربی در برابر پاتوژن‌های مواد غذایی و میکروارگانیسم‌های عامل فساد (۵ و ۳٦) و بنابراین قابلیت کاربرد در محصولات غذایی به‌عنوان نگهدارنده‌های طبیعی می‌باشند (۳۳). بیش از ۱۳۰۰ گونه گیاهی با ترکیبات ضدمیکربی مشخص وجود دارد، لیکن اطلاعات در مورد کاربرد آنها به‌عنوان نگهدارنده در مواد غذایی تنها برای موارد معدودی گزارش شده است. برخی از این اسانس‌های گیاهی مانند پونه کوهی، میخک، دارچین، سیر، زردچوبه، رزماری، نعناع، ریحان و جعفری یا ترکیبات فعال آنها به‌طور گسترده‌ای مورد مطالعه قرار گرفته‌اند و فعالیت ضدمیکربی آنها در برابر پاتوژن‌های مختلف غذایی مانند *کمپیلوباکتر ژژوانی*[1] (۳۵)، *لیستریامونوسیتوژنز* (۹ و ۳۳) *سالمونلا* (۲۰ و ۳۳)، *استافیلوکوکوس اورئوس*[2] (٤ و ۳۳) و *اشرشیاکلی* (۲۰ و ٤۰) اثبات شده است. آویشن شیرازی گیاهی متعلق به خانواده نعناع است که از نظر جغرافیایی تنها در ایران، افغانستان و پاکستان می‌روید. این گیاه تحت عنوان آویشن شیرازی (در ایران) به‌عنوان طعم‌دهنده در بسیاری از مواد غذایی در ایران به کار رفته و واجد تاثیرات ضدعفونی کنندگی، محرک و ضدنفخ می‌باشد (۲ و ۱٦). همچنین، داروهای خوراکی بر پایه اسانس آویشن شیرازی نیز عرضه شده است. این اسانس در فرمولاسیون داروهای مورد استفاده در درمان عفونت‌های سیستم تنفسی به‌عنوان ضدعفونی‌کننده، ضدسرفه و نیز در درمان سندرم روده تحریک‌پذیر به کار می‌رود (۲). ترکیبات اصلی اسانس آویشن شیرازی شامل ترکیبات فنولیک مانند کارواکرول و تیمول می‌باشد (۳). فعالیت ضدمیکربی اسانس آویشن شیرازی در برابر قارچ‌ها (۲۱ و ۲٦) و بسیاری

1. Campylobacter jejuni
2. Staphylococcus aureus

از پاتوژن‌های غذایی مانند *استافیلوکوکوس ارئوس*، *سالمونلا تیفی موریوم*[1] (۳)، *لیستریامونوسیتوژنز* (۲۸) و نیز سویه‌های نوروویروس[2] (۱۰) مورد بررسی قرار گرفته است.

فعالیت اسانس‌ها در برابر میکروارگانیسم‌های عامل فساد و بیماریزا به‌طور معمول با استفاده از روش‌های سنتی کشت ارزیابی می شود که شامل نواقصی از جمله مدت زمان نسبتاً طولانی برای رشد باکتری و فقدان حساسیت لازم در مورد سلول‌های زنده غیرقابل کشت می‌باشد (۲۳) به‌عنوان یک روش جایگزین، PCR زمان واقعی امکان تشخیص و تعیین کمی سریع، حساس و اختصاصی عوامل بیماری‌زا را فراهم می‌آورد. علاوه بر این، این تکنیک از طریق پیش تیمار نمونه با عوامل متصل شونده به DNA مانند پروپیدیوم مونو آزید، قادر به تمایز بین DNA سلول‌های مرده و زنده می‌باشد (۳۸). از آنجا که پروپیدیوم مونو آزید تنها به درون غشاهای سلولی آسیب دیده نفوذ می‌نماید، این تکنیک بر اساس سالم بودن یا آسیب دیده بودن سلول‌های باکتریایی عمل می‌نماید (۲۹). پیش تیمار نمونه با پروپیدیوم مونو آزید و سپس انجام PCR کمی به‌طور موفقیت‌آمیزی برای تشخیص پاتوژن‌های باکتریایی مانند *لیستریامونوسیتوژنز* (۳٤)، *اشرشیاکلی* O157:H7 (۱۱ و ۳۰) و *کامپیلوباکتر ژژوانی* (۱۸) به کار رفته است. اخیرا در مطالعه‌ای، تکنیک PCR کمی با پروپیدیوم مونو آزید به‌عنوان ابزاری با کارایی بالا جهت شمارش سلول‌های زنده پس از تیمار با اسانس‌های دارچین، میخک و پونه کوهی به اثبات رسیده است (۹). هدف مطالعه حاضر، ارزیابی فعالیت ضدمیکربی اسانس آویشن شیرازی بر *اشرشیاکلی* O157:H7، *سالمونلا انتریکا* و *لیستریا مونوسیتوژنز* در گوشت چرخ شده با استفاده از پروپیدیوم مونو آزید در ترکیب با PCR می‌باشد.

مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتریایی، شرایط کشت و جداسازی DNA: *اشرشیاکلی* O157:H (CECT[3] 5947) غیر توکسیژنیک، *سالمونلا انتریکا* زیرگونه انتریکا (CECT 4138) و *لیستریا مونوسیتوژنز* (CECT 4031) از مجموعه کشت‌های میکربی اسپانیا (CECT) تهیه و در این مطالعه به کار رفت. باکتری‌ها در محیط تریپتیک سوی براث[4] در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۸ ساعت کشت و به روش کشت در محیط

1. Salmonella typhimurium
2. Norovirus
3. The Spanish type culture collection
4. Tryptic soy broth

تریپتیکاز سوی آگار[1] در شرایط گرمخانه گذاری مشابه بالا شمارش شدند. DNA باکتریایی با استفاده از کیت نوکلئواسپین تیشو (شرکت ماچری ناجل، دورن، آلمان) مطابق دستورالعمل سازنده جداسازی و تخلیص شد.

اسانس: گیاه آویشن شیرازی از استان فارس جمع‌آوری و نام علمی آن توسط گروه گیاهشناسی پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی تائید شد. اسانس از سرشاخه‌های هوایی خشک شده گیاه به روش تقطیر با آب با سیستم کلونجر (به‌مدت ۲ ساعت) استخراج شد. اسانس تا زمان کاربرد در شیشه‌های تیره غیرقابل نفوذ به هوا در ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. جهت استفاده، اسانس در اتانول ۵۰ درصد به نسبت ۱:۱۰ رقیق شد.

تعیین ترکیبات شیمیایی اسانس: پس از تهیه اسانس، آنالیز ترکیبات شیمیایی آن توسط دستگاه گاز کروماتوگراف متصل به طیف نگار جرمی انجام شد. این دستگاه از نوع ترموکوئست تریس جی سی ۲۰۰۰ فینیگان (انگلستان) بود. ترکیبات اسانس براساس مقایسه مدت زمان بازداری نسبی (RI) و اجزای طیف‌های جرمی آنها با مقادیر ذخیره شده در کتابخانه کامپیوتری وایلی 7n.1 و نایست (موسسه ملی استاندارد و فناوری) (۱) شناسایی و بر اساس میانگین دو تزریق اسانس تعیین مقدار گردید.

تعیین کمینه غلظت بازدارنده رشد و بیشینه غلظت قابل تحمل: حداقل غلظت بازدارنده رشد و حداکثر غلظت قابل تحمل با استفاده از روش میکرودایلوشن براث[2] تعیین شد (۲۲). حداقل غلظت بازدارنده رشد به‌عنوان کمترین غلظتی که در آن دانسیته نوری مشابه نمونه کنترل تلقیح نشده شامل همان غلظت اسانس، به تنهایی، بود تعیین شد. حداکثر غلظت قابل تحمل به‌عنوان بیشترین غلظتی که در آن افزودن اسانس از لحاظ آماری تاثیر قابل ملاحظه‌ای بر رشد باکتری در مقایسه با کنترل (بدون اسانس) نداشت، به‌دست آمد.

سینتیک غیرفعال‌سازی (فعالیت باکتری‌کشی): کشت‌های باکتریایی از کشت ٤ ساعته در تریپتیک سوی براث ($۱۰^{۹}$–$۱۰^{۸}$ واحد تشکیل‌دهنده کلنی در میلی‌لیتر)، جهت به‌دست آوردن ۵ میلی‌لیتر محلول حاوی $۱۰^{۵}$ واحد تشکیل‌دهنده کلنی در میلی‌لیتر، رقیق و سپس اسانس آویشن شیرازی در غلظت‌های ۰/۰۳ درصد، ۰/۰۳۵ درصد و ۰/۰٤ درصد برای *اشرشیاکلی* O157:H7، ۰/۰٤۵ درصد، ۰/۰۵۰ درصد و

1. Trypticase soy agar
2. Microdilution broth

۰/۰۵۵ درصد برای *سالمونلا انتریکا* و ۰/۰۲ درصد، ۰/۰۲۵درصد و ۰/۰۳درصد برای *لیستریامونوسیتوژنز* اضافه و مجددا در ۳۷ درجه سانتی‌گراد در گرمخانه مجهز به تکان دهنده نگهداری شد. در زمان‌های ۰، ۳۰ دقیقه، ٤٥ دقیقه، ۱ ساعت، ۱/۵ ساعت، ۲ ساعت و ٤ ساعت نمونه‌گیری و کشت روی محیط تریپتیکازئین سوی آگار جهت شمارش انجام شد. هر آزمایش در سه تکرار به‌صورت مستقل انجام شد. میانگین واحد تشکیل‌دهنده کلنی در میلی‌لیتر 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 زنده غیرقابل کشت بوده و به‌عنوان حداقل غلظت باکتری کشی محسوب گردید.

برقراری اتصالات عرضی با پروپیدیوم مونو آزید: پروپیدیوم مونو آزید در دی متیل سولفوکساید ۲۰ درصد جهت به دست آوردن محلول استوک ۲۰ میلی‌مول حل و تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد در تاریکی نگهداری شد. محلول استوک به ۵۰۰ میکرولیتر از سلول‌های زنده یا سلول‌های تیمار شده با اسانس تا رسیدن به غلظت نهایی ۱۰۰ میکرولیتر افزوده شد. جهت اطمینان از تکرارپذیری نتایج، تیمار نمونه‌ها در سه تکرار انجام شد. پس از افزودن پروپیدیوم مونو آزید، نمونه‌ها به‌مدت ۵ دقیقه در تاریکی در دمای اتاق قرار گرفته و برای افزایش نفوذ پروپیدیوم مونو آزید به سلول تکان داده شدند. سپس، نمونه‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه با استفاده از سیستم فعال سازی نوری در معرض نور قرار گرفتند (لراکتیوبلو، اینجنیا بیوسیستمز، بارسلونا، اسپانیا). پس از ایجاد اتصالات عرضی از طریق القای نوری، سلول‌ها در ۷۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۵ دقیقه در ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شده و محلول رویی دور ریخته شد. پلت به‌دست آمده برای جداسازی DNA مورد استفاده قرار گرفت.

اندازه‌گیری کمی با استفاده از PCR زمان واقعی: الیگونوکلئوتیدهای مورد استفاده در این مطالعه، ژن بتا-گلوکورونیداز *اشرشیاکلی* O157:H7 (uidA) (۱۷)، ژن تهاجم (JHOL) *سالمونلا انتریکا* (۱۵) و ژن لیستریولیزین *لیستریامونوسیتوژنز* (hly) (۳٤) را هدف قرار داده و در مطالعات پیشین به کار رفته‌اند (۷). واکنش‌های PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر، شامل ۱۰ میکرولیتر مستر میکس برلیانت ۲ با میزان بالای راکس (استراتاژن، مادرید و اسپانیا) و ۵ میکرولیتر الگوی DNA انجام شد. همه واکنش‌ها شامل ۲ میکرولیتر محلول اگزومیکس و ۰/٤ میکرولیتر محلول اگزو آی پی سی DNA (اپلایدبیوسیستم، فوسترسیتی و ایالات‌متحده) به‌عنوان کنترل داخلی بود. غلظت پرایمرها، پروب‌ها و

کلرید منیزیم عبارت بود از: برای *اشرشیاکلی* O157:H7، ۲۵۰ نانومول از هر پرایمر، ۲۵ نانومول از پروب uidA و ۳/۵ میکرومول محلول کلرید منیزیم؛ برای *سالمونلا*، ۳۰۰ نانومول از هر پرایمر، ۱۰۰ نانومول از پروب JHOL و ٤/٥ میکرومول محلول کلرید منیزیم و برای *لیستریا مونوسیتوژنز*، ۵۰ نانومول از هر پرایمر، ۵۰ نانومول از پروب hly و ٦ میکرومول محلول کلرید منیزیم؛ تکثیر به‌صورت یک سیکل ۵۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲ دقیقه، یک سیکل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه و ٤۰ سیکل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ ثانیه و ٦۳ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه در دستگاه جستجوی توالی سیستم (ژن امپ بیوسیستم، فوسترسیتی، ایالات متحده) انجام شد. میزان فلورسنس در انتهای هر مرحله تکثیر اندازه‌گیری شد. برای هر واکنش دو تکرار و در همه موارد یک کنترل منفی شامل ۵ میکرولیتر آب به جای الگوی DNA در نظر گرفته شد.

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 (۱۳، ١٤ و ۲۷). مقادیر نقاط عبور (Cp) حاصل از هر رقت جهت رسم منحنی استاندارد برای هر کدام از غلظت‌های مربوطه به کار رفت.

فعالیت باکتری‌کشی اسانس در ارزیابی سلول‌های زنده: کشت‌های ٤ ساعته *اشرشیاکلی* O157:H7، *سالمونلا انتریکا* و *لیستریامونوسیتوژنز* (10^{9}–10^{8} واحد تشکیل‌دهنده کلنی در میلی‌لیتر) به‌صورت متوالی در تریپتیک سوی براث جهت به‌دست آوردن ۵ میلی‌لیتر سوسپانسیون حاوی 10^{6} و 10^{4} واحد تشکیل‌دهنده کلنی در میلی‌لیتر رقیق‌سازی و سپس به‌طور جداگانه با اسانس آویشن شیرازی در غلظت‌های باکتری‌کشی مربوط به هر باکتری تیمار شدند. سوسپانسیون‌ها در دمای اتاق به‌مدت ٤ ساعت به‌طور مداوم مخلوط شدند. آنالیز نمونه‌ها با استفاده از روش شمارش روی پلیت، PCR کمی و PCR کمی با پروپیدیوم مونو آزید و در سه تکرار انجام شد.

ارزیابی ماده غذایی تلقیح شده به‌طور مصنوعی: جهت تعیین حساسیت واکنش PCR کمی با پروپیدیوم مونو آزید، نسبت‌های مختلف از سلول‌های زنده و کشته شده توسط اسانس به‌طور مصنوعی به گوشت گاو چرخ شده تلقیح شد. تلقیح باکتریایی نمونه‌ها به‌صورت زیر انجام گرفت: به ۲۵ گرم از گوشت چرخ شده به‌صورت اسپتیک ۲۲۵ میلی‌لیتر محلول آب پپتونه بافری شده (کندالب، مادرید، اسپانیا) در یک کیسه پلاستیکی استریل دارای فیلتر جانبی افزوده و با استفاده از دستگاه پالسیفایر یکنواخت شد (میکروژن بیوپروداکتس، سوری، انگلستان). مخلوط حاصل از قسمت

فیلترشده برداشته و در قسمت‌های ۳۰ میلی‌لیتری تقسیم شد. هر قسمت با مخلوطی از سلول‌های زنده و کشته شده توسط اسانس به‌صورت زیر تلقیح شد: ۱۰۰ درصد سلول‌های زنده، ۷۵ درصد سلول‌های زنده و ۲۵ درصد سلول‌های مرده، ۵۰ درصد سلول‌های زنده و ۵۰ درصد سلول‌های مرده، ۲۵ درصد سلول‌های زنده و ۷۵ درصد سلول‌های مرده و ۱۰۰ درصد سلول‌های مرده. یک کنترل منفی تلقیح نشده در هر آزمایش در نظر گرفته شد. دو قسمت ۱۰۰ میکرولیتری از هر نمونه تلقیح شده گرفته شد و یکی از آن دو با پروپیدیوم مونو آزید تیمار شد. DNA همه اجزای ۱۰۰ میکرولیتری با استفاده از کیت نوکلئواسپین تیشو استخراج و توسط PCR کمی با پروپیدیوم مونو آزید آنالیز شد. شمارش باکتری‌ها پس از ۴۸-۲۴ ساعت گرمخانه گذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد (۱۱).

تجزیه و تحلیل آماری

کلیه آزمایشات در سه تکرار انجام شد. داده‌های به‌دست آمده به‌صورت میانگین ± انحراف معیار نمایش داده شد. آنالیز داده‌های مربوط به ارزیابی بیان ژنی با استفاده از آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) دو طرفه تعیین شد و مقدار P کمتر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار تلقی گردید. معنادار بودن اختلاف بین میانگین دانسیته نوری نمونه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف اسانس از طریق آزمون استودنت T-test با سطح اطمینان $P<۰/۰۵$ تعیین شد.

نتایج و بحث

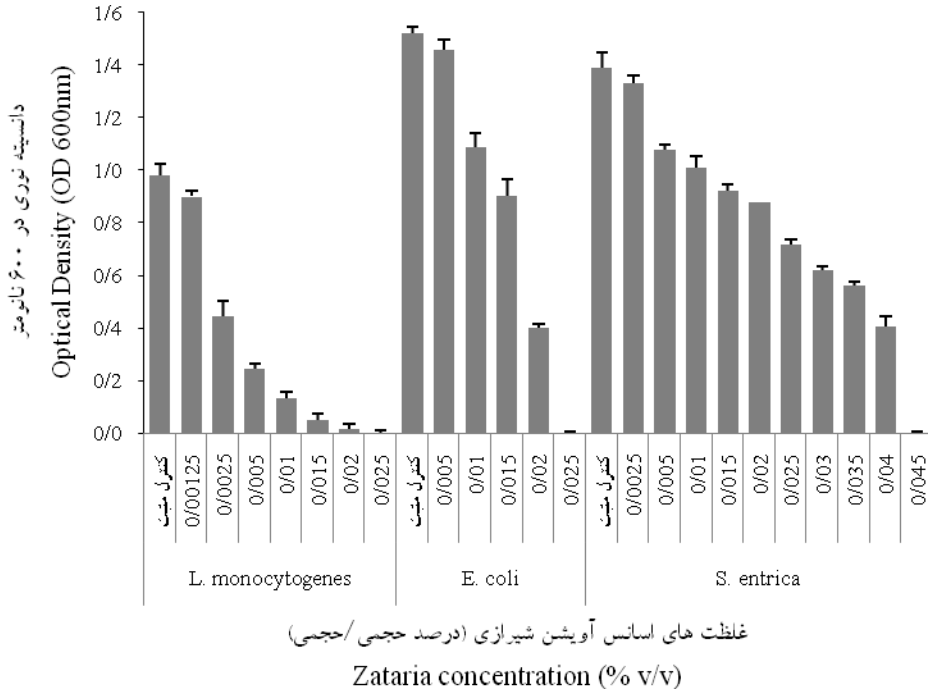
بازده اسانس بخش‌های هوایی خشک شده گیاه آویشن شیرازی ۱/٦٦ درصد (حجمی/ وزنی) بود. درصد ترکیبات اسانس (تعیین شده توسط کروماتوگرافی گازی/ طیف سنجی جرمی) در جدول ۱ آورده شده است. کارواکرول ترکیب اصلی اسانس آویشن شیرازی (۷۱/۱۲ درصد) می‌باشد.

شکل ۱، دانسته نوری به‌دست آمده پس از ۲٤ ساعت گرمخانه گذاری *اشرشیاکلی* O157:H7، *سالمونلا انتریکا* و *لیستریا مونوسیتوژنز* تحت غلظت‌های مختلف اسانس را نشان می‌دهد. به‌طور خلاصه، حداقل غلظت بازدارنده رشد معادل ۰/۰۲۵ درصد برای *اشرشیاکلی* O157:H7، ۰/۰٤۵ درصد برای *سالمونلا انتریکا* و ۰/۰۲ درصد برای *لیستریامونوسیتوژنز* به دست آمد. مقدار حداکثر غلظت قابل تحمل برای *اشرشیاکلی* O157:H7 معادل ۰/۰۰۵درصد، برای *سالمونلا انتریکا* معادل ۰/۰۰۲۵درصد و برای *لیستریامونوسیتوژنز* معادل ۰/۰۰۱۲۵درصد بود.

جدول ۱- ترکیبات اسانس آویشن شیرازی براساس نتایج آنالیز کروماتوگرافی گازی/ طیف سنجی جرمی.

Table 1. Essential oil composition of *Zataria multiflora* Boiss. identified by GC and GC/MS.

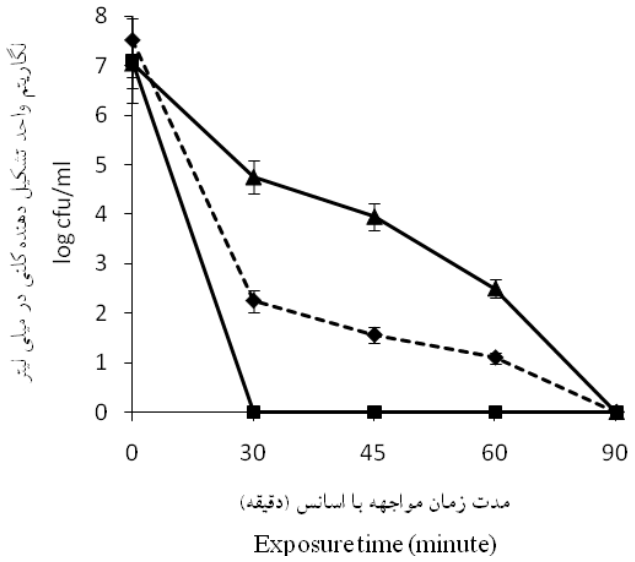
شاخص بازداری بر روی ستون Retention index on culumn	مقدار (٪) Amount (%)	ترکیب Composition
930	0.19	توژن Thujene
937	4.26	آلفا-پینن Alpha-pinene
976	0.43	بتا-پینن Bete-pinene
985	0.85	بتا-میرسین Beta-myrcene
1024	3.37	اکالیپتول Eucaliptol
1055	7.34	گاما-ترپینن Gamma-terpinene
1090	0.63	لینالول Linalool
1236	0.47	تیمول متیل اتر Thymyl methyl ether
1243	0.46	کارواکرول متیل اتر Carvacrol methyl ether
1299	71.12	کارواکرول Carvacrol
1418	0.41	ترانس- کاریوفیلین trans-Caryophyllene
1582	2.32	گلوبولول Globulol
-	91.90	مجموع Total



شکل ۱- میانگین دانسیته نوری مربوط به رشد *لیستریامونوسیتوژنز*، *اشرشیاکلی* و *سالمونلا انتریکا* طی تیمار با غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی. کنترل مثبت فاقد اسانس می‌باشد.

Figure 1. Mean OD values corresponding to the growth of *L. monocytogenes*, *E. coli O157:H7* and *S. entrica* in the presence of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil at different concentrations.

سینتیک غیرفعال سازی باکتری‌ها توسط اسانس در شکل ۲ آورده شده است. مقادیر حداقل غلظت باکتری کشی بر اساس حداقل غلظت بازدارنده رشد به‌دست آمده برای هر باکتری و با افزایش غلظت تدریجی اسانس تعیین شد. در خصوص *سالمونلا انتریکا* و *لیستریا مونوسیتوژنز*، در غلظت‌های حداقل غلظت بازدارنده رشد، هیچ رشدی پس از، به‌ترتیب، ۳۰ دقیقه و ۱/۵ ساعت مشاهده نشد، بنابراین مقادیر حداقل غلظت بازدارنده رشد به‌عنوان حداقل غلظت باکتری کشی در نظر گرفته شد. در خصوص *اشرشیاکلی* O157:H7، پس از ۱/۵ ساعت هیچ رشدی در غلظت ۰/۰۳۵ درصد اسانس مشاهده نگردید، بنابراین این غلظت به‌عنوان حداقل غلظت باکتری کشی تعیین شد.



شکل ۲- سینتیک غیرفعال‌سازی *اشرشیاکلی* O157:H7 (... ◆...)، *لیستریا مونوسیتوژنز* (-■-) و *سالمونلا انتریکا* (-▲-) توسط اسانس آویشن شیرازی در غلظت‌های حداقل غلظت باکتری کشی تعیین شده توسط شمارش روی پلیت، به‌ترتیب ۰/۰۳۵، ۰/۰۲ و ۰/۰٤٥ درصد.

Figure 2. Inactivation kinetics of *E. coli* O157:H7 (…◆...), *L. monocytogenes* (…■…) and *S. enterica* (…▲...) by *Zataria multiflora* Boiss. essential oil at the corresponding minimum bactericidal concentration determined by plate count.

سوسپانسیون‌های میکربی کشته شده توسط اسانس آویشن شیرازی در غلظت‌های حداقل غلظت باکتری کشی، تحت آنالیز PCR کمی با پروپیدیوم مونو آزید قرار گرفتند. مقادیر به‌دست آمده از آنالیز PCR کمی نمونه‌های تیمار شده با پروپیدیوم مونو آزید و تیمار نشده در جدول ۲ آورده شده است. افزایش Cp برای *اشرشیاکلی* O157:H7 و *سالمونلا انتریکا*، به‌ترتیب، ۱۳/۸۲ و ۱۳/۲۳ بود که نشان‌دهنده تفاوت عمده‌ای میان سلول‌های زنده و مرده می‌باشد. برای *لیستریامونوسیتوژنز*، افزایش Cp معادل ٤/۱۳ بود. در غلظت‌های سلولی بالاتر ($۱۰^{۸}$ لگاریتم واحد تشکیل‌دهنده کلنی در میلی‌لیتر)، پروپیدیوم مونو آزید سیگنال‌های PCR را به‌طور کامل، مطابق آنچه در مطالعه پیشین مشاهده شد، حذف ننمود (۸). در سوسپانسیون‌های باکتریایی مرده با جمعیت $۱۰^{٤}$ واحد تشکیل‌دهنده کلنی در

میلی‌لیتر حاوی اسانس، هیچ سیگنالی توسط PCR کمی با پروپیدیوم مونو آزید برای هیچ کدام از سه باکتری مورد بررسی به‌دست نیامد.

جدول ۲- تعیین کمیت انتخابی سلول‌های زنده *اشرشیاکلی* O157:H7، *لیستریامونوسیتوژنز* و *سالمونلا انتریکا* PCR کمی (معادل ژنومی در میلی‌لیتر) با پروپیدیوم مونو آزید پس از تیمار و غیرفعال‌سازی با اسانس آویشن شیرازی

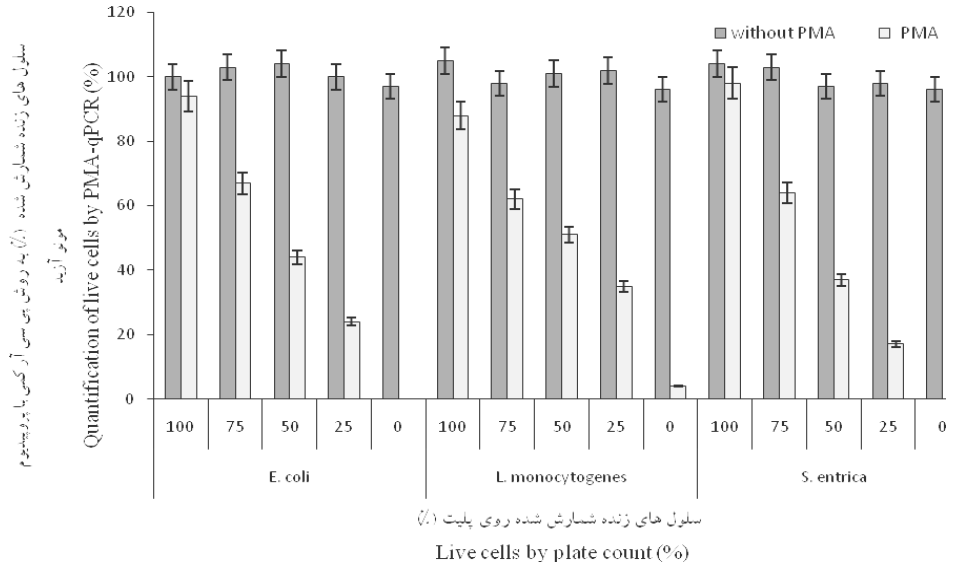
Table 2. Selective quantification *of E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* and *S. enterica* live cells by PMA-qPCR, after inactivation with *Zataria. multiflora* essential oil.

ΔCp	مرده تیمار شده با پرو پیدیوم مونو آزید Dead PMA treated		مرده Dead		زنده Live		شمارش پلیت (واحد کلنی در میلی‌لیتر) Plate counts cfu/ml	پاتوژن Pathogen
	مقدار Quantification	Cp ± SD	مقدار Quantification	Cp ± SD	مقدار Quantification	Cp[۱] ± SD[۲]		
13.82	0.05±0.92	0.17±3.19	0.17±7.34	0.18±19.37	0.13±7.28	19.58± 0.46	10^8×5.40	*اشرشیاکلی*
	0	35<	0.14±4.61	0.47±28.52	0.25±4.80	0.25±27.90	10^5×1.68	*E. coli*
4.13	0.73±4.56	0.24±22.11	0.08±8.10	0.29±17.98	0.11±8.35	0.36±17.16	10^8×1.40	*لیستریامونوسیتوژنز*
	0	35<	0.04±3.54	0.12±33.13	0.41±3.88	0.21±32.01	10^4×4.60	*L.monocytogenes*
13.23	0.01±1.55	0.05±32.18	0.13±7.11	0.47±18.59	0.08±7.97	0.27±17.64	10^8×3.03	*سالمونلا انتریکا*
	0	35<	0.17±4.42	0.63±30.18	0.09±4.61	0.40±29.51	10^5× 5.41	*S. enteric*

[۱] Cp: سیکلی از PCR که قطعه تکثیر از حد آستانه عبور می‌کند

[۲] SD: انحراف از میانگین

نتایج PCR کمی با پروپیدیوم مونو آزید به دست آمده برای ترکیب‌های مختلف سلول‌های زنده و مرده در گوشت چرخ شده تلقیح شده به‌طور مصنوعی در شکل ۳ نشان داده شده است. تعداد باکتری‌ها در گوشت چرخ شده $۳/۲۷×۱۰^۴$ واحد تشکیل‌دهنده کلنی در میلی‌لیتر بود. مقادیر به‌دست آمده از PCR کمی با پروپیدیوم مونو آزید برای *سالمونلا انتریکا* و *اشرشیاکلی* O157:H7، با تعداد سلول‌های زنده شمارش شده روی پلیت مرتبط بود. در خصوص *لیستریامونوسیتوژنز*، تعداد سلول‌های زنده در همه موارد بیشتر از تعداد واقعی تخمین زده شد و برای نمونه حاوی ۱۰۰ درصد سلول‌های مرده، PCR کمی با پروپیدیوم مونو آزید همچنان وجود ۳/۸ درصد سلول زنده را نشان می‌داد.



شکل ۳- تعیین کمی نسبت‌های مختلف سلول‌های *اشرشیاکلی* O157:H7، *لیستریا مونوسیتوژنز* و *سالمونلا* انتریکای زنده و کشته شده توسط اسانس آویشن شیرازی، تلقیح شده به سبزیجات. برای هر مخلوط، مقادیر PCR کمی مربوط به هر نمونه با یا بدون تیمار پروپیدیوم مونو آزید به صورت درصد ارائه شده است.

Figure 3. Quantification of different ratios of live and *Z. multiflora* killed *E. coli* O157:H7, L. *monocytogenes* and *S. entrica* cells inoculated in minced beef. For each mixture, qPCR values corresponding to samples with and without PMA treatment are represented in percentage.

در این مطالعه، اسانس آویشن شیرازی به علت دارا بودن فعالیت ضدمیکروبی که به میزان قابل ملاحظه ای بالاتر از سایر اسانس‌های گیاهی، مانند میخک، دارچین و پونه کوهی که دارای حداقل غلظت بازدارنده رشد بالاتر و حداکثر غلظت قابل تحمل پائین‌تر برای سه پاتوژن مورد بررسی می‌باشند، جهت ارزیابی انتخاب شد (۳۳). این فعالیت ضدمیکربی قابل ملاحظه به علت وجود مقدار زیاد کارواکرول به همراه مونوترپن‌های فنولیک و گاما-ترپینن می‌باشد که به نظر می‌رسد فعالیت سینرژیستی میان ترکیبات فوق موجب ناپایداری در غشای سلولی باکتری می‌گردد (٦ و ۳۲). ماهیت اسیدی گروه هیدروکسیل در کارواکرول و نقش گروه هیدروکسیل در تشکیل پیوندهای هیدروژنی می‌تواند از علل توجیح کننده فعالیت ضدمیکربی قابل توجه اسانس آویشن شیرازی باشد (۱۹).

مقدار حداقل غلظت بازدارنده رشد برای *اشرشیاکلی* O157:H7، *لیستریا مونوسیتوژنز* و *سالمونلا انتریکا*، به‌ترتیب، برابر با ۰/۰۳، ۰/۰۲ و ۰/۰٤٥درصد بود. این نتایج با یافته‌های مطالعات قبلی تطابق دارد (۱۹ و ۲۵). علاوه بر این، هر سه باکتری با اسانس در غلظت‌های کشنده تیمار شده و تعداد سلول‌های زنده با استفاده از روش PCR کمی با پروپیدیوم مونو آزید تعیین شد که این روش در مطالعات پیشین با استفاده سایر اسانس‌های متداول (پونه کوهی، میخک و دارچین) نیز موفق بوده است (۹ و ۱۱). تاثیر اسانس آویشن شیرازی بر سوسپانسیون‌های میکربی ابتدا توسط شمارش روی پلیت ارزیابی گردید که هیچ رشد باکتریایی مشاهده نشد، این نتیجه نشان می‌دهد که همه سلول‌ها کشته شده و یا فاقد قابلیت رشد می‌باشند. سپس، روش پیش آزمون شده PCR کمی با پروپیدیوم مونو آزید (۸). جهت تعیین تعداد سلول‌های زنده تیمارشده با اسانس آویشن شیرازی به کار رفت. نتایج نشان داد زمانی که از سوسپانسیون‌های سلولی با تراکم بالا (10^8 واحد تشکیل دهنده کلنی در میلی‌لیتر) استفاده می‌شود، PCR کمی با پروپیدیوم مونو آزید افزایشی بیش از Cp ۱۳، حدود بیش از ٤ لگاریتم را برای *سالمونلا انتریکا* و *اشرشیاکلی* O157:H7 نشان می‌دهد. در خصوص *لیستریا مونوسیتوژنز*، افزایش در مقادیر بسیار ناچیز (٤Cp) بود. قابلیت جستجو و تعیین تعداد باکتری‌ها با استفاده از PCR کمی با پروپیدیوم مونو آزید در حضور غلظت‌های بالای باکتریایی دچار محدودیت می گردد (۸، ٤۱ و ٤٤). زیرا تعداد بالای سلول‌ها در مرحله برقراری اتصالات عرضی، در زمان فعال شدن پروپیدیوم مونو آزید، اختلال ایجاد می‌نماید. محدودیت دیگر، تاثیر طول قطعه تکثیرشده بر کفایت تیمار با پروپیدیوم مونو آزید است. بنابراین، تکثیر توالی‌های طولانی به همراه تیمار با پروپیدیوم مونو آزید، موجب بازداری بیشتر تکثیر DNA سلول‌های آسیب دیده می‌گردد (۳۹). مطابق پیشنهادات سوجیما و همکاران (۲۰۱۱)، احتمال دارد علت تاثیر مثبت هدف قرار گرفتن توالی‌های طولانی‌تر DNA، افزایش احتمال اتصال رنگ در ناحیه هدف و در نتیجه بازداری قوی تر باشد. علاوه بر این، تخمین فراتر از واقعیت تعداد سلول‌های زنده *لیستریا مونوسیتوژنز* ممکن است به علت تفاوت در ساختار دیواره سلولی بین باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت باشد. در این رابطه، الیزاکویویل و همکاران در سال ۲۰۱۱ دریافتند که روش PCR کمی با پروپیدیوم مونو آزید به‌طور موفقیت‌آمیزی تعداد سلول‌های زنده *سالمونلا انتریکا* و *اشرشیاکلی* O157:H7 را تعیین می‌نماید. هرچند، علائم

ضعیف حاصل از سلول‌های مرده طی تعیین تعداد سلول‌های *لیستریامونوسیتوژنز* موجب تخمین فراتر از واقعیت تعداد سلول‌های *لیستریامونوسیتوژنز* زنده شد. نتایج مشابهی برای *لیستریا اینوکوا*[1] تیمار شده با حرارت به‌دست آمد (۲٤). در باکتری‌های گرم منفی ساختار غشای خارجی دیواره‌ای نفوذپذیر را به وجود می‌آورد، در حالی که در باکتری‌های گرم مثبت این دیواره از جنس پپتیدوگلیکان است (۳۱). این تفاوت، نفوذ پروپیدیوم مونو آزید را در باکتری‌های گرم منفی مرده تسهیل نموده و از دلائل کارآیی بالاتر پروپیدیوم مونو آزید در تمایز بین سلول‌های زنده و مرده گرم منفی به شمار می‌رود. هنگامی که از سوسپانسیون‌های سلولی با غلظت پایین تر ($۱۰^{٤}$ واحد تشکیل‌دهنده کلنی در میلی‌لیتر) استفاده شد، هیچ سیگنال PCR کمی پس از تیمار با پروپیدیوم مونو آزید به‌دست نیامد. نتایج نشان می دهد که این تکنیک برای ارزیابی حضور سلول‌های پاتوژن زنده که معمولاً در تعداد پایین ($۱۰^{٤}$-$۱۰^{۲}$ واحد تشکیل‌دهنده کلنی در میلی‌لیتر) در گوشت چرخ شده یافت می‌شوند، مناسب است (۳۱). علاوه بر این، نتایج نشان می‌دهد که پروپیدیوم مونو آزید به‌طور موفقیت‌آمیزی سیگنال DNA سلول‌های مرده را حذف نمود به‌طوری‌که هیچ سیگنال تکثیری از هیچ کدام از سه پاتوژن مورد بررسی کشته شده مشاهده نشد؛ می‌توان اظهار نمود اسانس آویشن شیرازی موجب کشته شدن باکتری‌های بیماری‌زا و نفوذپذیر شدن غشای سلولی آنها نسبت به پروپیدیوم مونو آزید گردید، بنابراین تاثیر این ترکیب ضدمیکربی طبیعی را می‌توان با تکنیک PCR کمی با پروپیدیوم مونو آزید کنترل و ارزیابی نمود.

از سوی دیگر، نسبت بین سلول‌های زنده و مرده و نیز حضور میکروارگانیسم‌های زمینه‌ای موجود در مواد غذایی که به‌طور طبیعی آلوده شده‌اند، از عواملی است که کارآیی PCR کمی با پروپیدیوم مونو آزید را تحت تاثیر قرار می‌دهد (۱۲). تعیین تعداد سلول‌های زنده توسط PCR کمی با پروپیدیوم مونو آزید در حضور تعداد زیاد سلول‌های مرده، وقتی تعداد سلول‌های زنده اندک باشد، دشوار است. در برخی مطالعات هیچ تاثیری از سلول‌های مرده بر سیگنال سلول‌های زنده مشاهده نشده است (٤۳). ما از طریق تلقیح نسبت‌های مختلف سلول‌های زنده و مرده به گوشت چرخ شده به این نتیجه دست یافتیم. به‌علاوه، نتایج ما 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.

1. *Listeria innocua*

نتیجه‌گیری کلی

این مطالعه توانایی اسانس آویشن شیرازی را در کاربرد به‌عنوان یک افزودنی غذایی طبیعی یا نگهدارنده زیستی نشان می‌دهد. اسانس آویشن شیرازی در غلظت‌های پایین‌تر و مدت زمان مواجهه کوتاه‌تر نسبت به سایر اسانس‌ها قادر به غیرفعال سازی غیر قابل برگشت سه باکتری مورد آزمایش بود. علاوه بر این، عدم حضور سلول‌های زنده اما غیر قابل کشت که اغلب نتیجه تیمار با اسانس‌ها می‌باشد، به روش PCR کمی با پروپیدیوم مونو آزید قابل ارزیابی است. کفایت این روش برای جستجوی انتخابی باکتری‌های بیماریزای زنده در گوشت چرخ شده به دنبال غیرفعال‌سازی با اسانس آویشن شیرازی اثبات شده است.

سپاسگزاری

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

منابع

1. Adams, R.P. 2001. Identification of essential oils components by gas chromatography/ quadrupole mass spectroscopy. Illinois: Allured Publishing Corporation.
2. Ali, M.S., Saleem, M., Ali, Z., and Ahmad, V.U. 2000. Chemistry of Zataria multiflora (Lamiaceae). Phytochem. 55(8): 933-936.
3. Basti, A.A., Misaghi, A., and Khaschabi D. 2007. Growth response and modelling of Zataria multiflora Boiss. Essentail oil, pH and temperature on Salmonella typhmurium and Staphylocuccus aureus. LWT. 40: 973-981.
4. Bouhdid, S., Abrini, J., Amensour, M., Zhiri, A., Espuny, M.J., and Manresa A. 2010. Functional and ultrastructural changes in Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus cells induced by Cinnamomum verum essential oil. J. Appl. Microbiol. 109(4): 1139-1149.
5. Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods e a review. International J. Food Microbiol. 94(3): 223-253.
6. Cao, L., Si, J. Y., Sun, H., Jin, W., Li, Z., Zhao, X.H. et al. 2009. Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant properties of Mosla chinensis Maxim. Food Chem. 115: 801-815.

7. Elizaquivel, P., and Aznar, R. 2008. Comparison of four commercial DNA extraction kits for PCR detection of Listeria monocytogenes, Salmonella, Escherichia coli O157:H7, and Staphylococcus aureus in fresh, minimally processed vegetables. J. Food Prot. 71(10): 2110-2114.
8. 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.
9. 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.
10. Elizaquivel, P., Azizkhani, M., Aznar R., and Sánchez G. 2012b. The effect of essential oils on norovirus surrogates. Food Control. 32: 275-278.
11. Elizaquivel, P., Sanchez, G., Selma, M. V., and Aznar, R. 2012c. Application of propidum monoazide-q PCR to evaluate the ultrasonic inactivation of Escherichia coli O157:H7 in fresh-cut vegetable wash water. Food Microbiol. 30: 316-320.
12. Fittipaldi, M. and Codony, F. 2012. Progress in understanding preferential detection of live cells using viability dyes in combination with DNA amplification. J. Microbiol. Meth. 91(2): 276-289.
13. Glaser, P., Frangeul, L., Buchrieser, C., Rusniok, C., Amend, A., and Baquero, F. et al. 2001. Comparative genomics of Listeria species. Sci. 294: 849-852.
14. Hayashi, T., Makino, K., Ohnishi, M., Kurokawa, K., Ishii, K., and Yokohama, K. et al. 2001. Complete genome sequence of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 and genomic comparison with laboratory strain K-12. DNA Res. 8: 11-22.
15. Hoorfar, J., Ahrens, P., and Radström, P. 2000. Automated 5ïnuclease PCR assay for identification of Salmonella enterica. J. Clin. Microbiol. 38(9): 3429-3435.
16. Hosseinzadeh, H., Ramezani, M. and Salmani G.H. 2000. Antinociceptive, anti-inflammatory and acute toxicity effects of Zataria multiflora Boiss extracts in mice and rats. J. Ethnopharmacol.73: 379-385.
17. 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 Environmental Microbiol. 69(10): 6327-6333.
18. 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. Appl. Environ. Microbiol.76(15): 5097-5104.

19. Kalemba, D. and Kunicka, A. 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Curr. Med Chem. 10(10): 813-829.
20. Karagözlü, N., Ergönül, B. and Özcan, D. 2011. Determination of antimicrobial effect of mint and basil essential oils on survival of E. coli 0157:H7 and S. typhimurium in fresh-cut lettuce and purslane. Food Control. 22: 1851-1855.
21. Khosravi, A. R., Shokri, H., Sharifrohani, M., Mousavi, H.E., and Moosavi, Z. 2012. Evaluation of the antifungal activity of Zataria multiflora, Geranium herbarium, and Eucalyptus camaldolensis essential oils on Saprolegnia parasitica-infected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs. Foodborne Path. Dis. 9(7): 674-679.
22. 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. J. Microbiol. Meth. 81(2): 121-126.
23. 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. Appl. Microbiol. Biotechnol. 84(6): 1137-1147.
24. 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. Microbiol. Meth. 85(2): 164-169.
25. Mahboubi, M., and Bidgoli, F.G. 2010. Antistaphylococcal activity of Zataria multiflora essential oil and its synergy with vancomycin. Phytomed. 17(7): 548-550.
26. Mahmoudabadi, A.Z., Dabbagh, M.A., and Fouladi Z. 2007. In vitro anti-Candida activity of Zataria multiflora Boiss. Evidence-based Complem Alt. Med. 4(3): 351-353.
27. McClelland, M., Sanderson, K.E., Spieth, J., Clifton, S.W., Latreille, P., and Courtney, L. et al. 2001. Complete genome sequence of Salmonella enterica serovar Typhimurium LT2. Nature, 413(6858): 852-856.
28. Moradi, M., Tajik, H., Razavi, Rohani, S.M., and Oromiehie, A.R. 2011. Effectiveness of Zataria multiflora Boiss essential oil and grape seed extract impregnated chitosan film on ready-to-eat mortadella-type sausages during refrigerated storage. J. Sci. Food Agri. 91(15): 2850-2857.
29. Nocker, A., and Camper, A.K. 2006. Selective removal of DNA from dead cells of mixed bacterial communities by use of ethidium monoazide. Appl. Environ. Microbiol.72(3): 1997-2004.
30. Nocker, A., Mazza, A., Masson, L., Camper, A.K. and Brousseau, R. 2009. Selective detection of live bacteria combining propidium monoazide sample treatment with microarray technology. J.Microbiol.Meth.76(3): 253-261.

31. 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. Bio Tech. 34: 804-813.
32. Oke, F., Aslim, B., Ozturk, S. and Altundag, S. 2009. Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of Satureja cuneifolia Ten. Food Chem.112: 874-879.
33. Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L. and Lacroix, M. 2007. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: E. coli O157:H7, Salmonella typhimurium, Staphylococcus aureus and Listeria monocytogenes. Food Control. 18: 414-420.
34. Pan, Y., and Breidt, F. Jr. 2007. Enumeration of viable Listeriamonocytogenes cellsby realtime PCR with propidium monoazide and ethidium monoazide in the presence of dead cells. Appl. Environ. Microbiol.73(24): 8028-8031.
35. Piskernik, S., Klancnik, A., Tandrup Riedel, C., Brondsted, L., and Smole-Mozina, D. 2011. Reduction of Campylobacter jejuni by natural antimicrobials in chicken meat-related conditions. Food Control. 22: 718-724.
36. Ponce, A., Roura, S.I. and Moreira, M.R. 2011. Essential oils as biopreservatives: different methods for the technological application in lettuce leaves. J.Food Sci.76(1): 34-40.
37. 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 Microbiol. Lett. 233: 257-267.
38. Rudi, K., Nogva, H.K., Moen, B., Nissen, H., Bredholt, S. and Moretro T., et al. 2002. Development and application of new nucleic acid-based technologies for microbial communityanalyses infoods. Int. J. Food Microbiol.78: 171-180.
39. 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. Appl. Microbiol. Biotechnol. 97: 2153-2162.
40. Singh, N., Singh, R.K., Bhunia, A.K. and Stroshine, R.L. 2002. Effect of inoculation and washing methods on the efficacy of different sanitizers against Escherichia coli O157:H7 on lettuce. Food Microbiol. 19: 183-193.
41. Slimani, S., Robyns, A., Jarraud, S., Molmeret, M., Dusserre, E., and Mazure, C., et al. 2012. Evaluation of propidium monoazide treatment directly on membrane filter for the enumeration of viable but non cultivable Legionella by qPCR. J. Microbiol. Meth. 88(2): 319-321.
42. 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. Anal. Biochem. 418: 37-43.
43. Wang, S. and Levin, R.E. 2006. Discrimination of viable Vibrio vulnificus cells from dead cells in real-time PCR. J. Microbiol. Meth.64(1): 1-8.

44. 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. Microbiol. Meth. 90: 262-266.

EJFPP, Vol. 7 (2): 97-118
http://ejfpp.gau.ac.ir

Evaluation of antmicrobial effect of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil on food-borne pathogens in minced beef combining real time-PCR and propidium monoazide

M. Azizkhani[1*]
[1]Assistant Prof. of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran

Received: 2015/04/12 ; Accepted: 2015/07/25

Abstract

Background and Objectives: Recently, real-time PCR in combination with PMA has successfully been applied to discriminate between live *Escherichia coli* O157:H7 and dead bacteria killed by cumin, clove, oregano and cinnamon essential oils. In this study, antimicrobial effect of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil on food-borne pathogens in minced beef combining real time-PCR and propidium monoazide has been evaluated.

Materials and methods: Essential oil was analyzed by gas chromatography-mass spectrometry equipment. Initial experiments were performed in order to elucidate the minimum bactericidal concentration of *Z. multiflora* essential oil on *E. coli O157:H7, Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes*. Thereafter PMA-qPCR was applied in order to selectively quantify life cells within a bacterial population treated with *Z. multiflora* essential oil in minced beef.

Results: The main component of *Z. multiflora* Boiss. essential oil was carvacrol (71.12%). Inactivation was obtained at essential oil concentrations of 0.02, 0.035, 0.045 for *L. monocytogenes, E. coli* O157:H7 and *S. enterica*, respectively[1]. *L. monocytogenes* were totally killed in 30 min while it took 1 h 30 min for the gram negative pathogens. According to the results of PMA-qPCR quantification obtained for the different combinations of live and dead cells in artificially inoculated minced beef, endogenous bacterial counts of the minced beef were 3.27×10^4 cfu/g. For *S. enterica* and *E. coli* O157:H7 PMAqPCR quantification values correlated with plate counts of live cells, but for *L. monocytogenes*, live cells were

* Corresponding author; azizkhani.maryam@gmail.com

overestimated in all cases and in the sample with 100% of dead cells PMA-qPCR still detected a 3.8% of live cells.

Conclusion: As a conclusion *Z. multiflora* essential oil has potential as natural food additive or biopreservative since it was able to irreversibly inactivate the three pathogens tested, at lower concentrations than other essential oils and short exposition times. In addition, the PMA-qPCR approach proved efficient to selectively detect live pathogenic bacteria in raw minced beef following inactivation with *Z. multiflora* essential oil.

Keywords: *Zataria multiflora* Boiss., Minced beef, PMA-qPCR, biopreservative