

اثر فعالیت ضد میکروبی برخی از اسانسهای گیاهی بر علیه

Listeria monocytogenes

ترجمه: دکتر محمد جواد مهربان پور و دکتر غلامرضا مؤذنی جولا
کارشناسان مرکز تحقیقات منابع طبیعی و امور دام استان فارس

چکیده

فعالیت ضد میکروبی ۳۲ اسانس گیاهی^۱ مورد استفاده در صنایع غذایی بر علیه چهار سویه از *L. monocytogenes*، دو سویه *L. innocua* آزمایش گردید. دو روش مختلف برای آزمایش اسانسهای اصلی به کار گرفته شد، یکی روش انتشار بر دیسک کاغذی^۲ و دیگری منحنی مهاری^۳، در روش اول یک محلول اتانولیک مطلق (۱:۵ V/V) از هر اسانس بر روی پلتهای تلقیح شده با یک غلظت باکتریایی 10^6 واحد تشکیل دهنده کلنی در یک میلی لیتر (CFU/ml) آزمایش گردید. ۵ نوع اسانس از ۳۲ نوع اسانس گیاهی (دارچین، میخک، پونه کوهی، فلفل فرنگی شیرین، آویشن) اثر ضد باکتریایی نشان دادند. برخی از ۵ اسانس فوق، همچنین در غلظت پائینتر (۱:۵۰ V/V) آزمایش گردیدند. منحنی مهاری برای مطالعه اثرات ضد لیستریایی ۵ اسانس در سرم فیزیولوژی نیز آزمایش شد. اسانس فلفل فرنگی فعالیت زیاد و سریعی نشان داد (عموماً در یک ساعت)، در حالی که اسانس میخک، پونه کوهی و آویشن فعالیت آهسته تری نشان دادند، به نظر می رسد که فعالیت ضد لیستریایی اسانسهای آزمایش شده به سویه باکتری بستگی دارد. یک سویه از *L. monocytogenes* در یک مخلوط غذایی (گوشت خوک خرد شده) بر علیه اسانس آویشن آزمایش گردید. گوشت خوک خرد شده با اسانس آویشن جمعیت *L. monocytogenes* را صد برابر نسبت به اولین هفته ذخیره سازی کاهش داد.

L. monocytogenes میکروارگانیسم گرم مثبتی است که آلودگیهای بنام لیستریوز در انسان و بسیاری از گونه های حیوانی را به وجود می آورد. بیماری در افرادی که سیستم ایمنی آنها به مخاطره افتاده باشد (مانند زنان حامله، جنین یا نوزاد) دیده می شود. عمومی ترین عفونتهای لیستریایی به یکی از صور سپتی سمی، مننژیت و بیماری شبه آنفلوآنزا در دوران بارداری اتفاق می افتد.

در ده سال گذشته، شیوع لیستریوز ناشی از غذا در کشورهای مختلف، توجه به این میکروارگانیسم را افزایش داده است که اکنون به طور کامل به عنوان یک پاتوژن ناشی از غذا شناخته شده است. *L. monocytogenes* در طبیعت وجود داشته و از منابع متعددی نظیر خاک، سبزیجات، مدفوع انسانهای سالم و فرآورده های غذایی از قبیل شیر، پنیر، فرآورده های گوشتی، ماهی و سبزیجات جدا گردیده است. یکی از گزارشهای سازمان بهداشت مربوط به انتقال لیستریوز ناشی از غذا به انسان و در نتیجه آلودگی محیطی شامل غذا و کارخانجات صنایع غذایی می باشد.

تحقیقات در جهت کنترل یا ریشه کنی آلودگی *L. monocytogenes* در غذا انجام گردیده است و فقط نتایج پراکنده ای در مورد فعالیتهای مهاری درمانهای فیزیکی و مواد ضد میکروبی در دسترس می باشد. این امر ما را به آزمایش فعالیت احتمالی ضد لیستریایی برخی ادویه جات که به طور عادی در صنایع غذایی استفاده می شوند تحریک می کند. در چند سال گذشته مطالعات متعددی بر روی اثر ادویه جات برای برخی فعالیتهای ضد میکروبی و یا ضد قارچی انجام گرفته است. اسانسهای اصلی ادویه جات فعالیت مهاری علیه پاتوژنهای ناشی از غذا نظیر *Staphylococcus aureus*، *Aspergillus flavus*، *Salmonella typhimorium* و *Clostridium botulinum* را نشان داده اند که هدف اصلی از این بررسی تعیین اثرات ضد لیستریایی ۳۲ اسانس گیاهی بود.

مواد و روشها

سویه های باکتریایی

سویه های لیستریایی استفاده شده در این بررسی *L. monocytogenes* LL201 (منبع انسانی) و PF59 (جدا شده از پنیر) از دکتر J. Bille بیمارستان مرکزی دانشگاه واتودویس، انستیتو میکروبیولوژی، لوزان، سوئیس، *L. monocytogenes* Scotta (منبع انسانی) از دکتر M.P. Doyle دانشگاه ویسکانسین، مادیسون، *L. monocytogenes* جدا شده از پنیر (1. S.S. 12) از دکتر G. Terplan دانشگاه ما کریملیان، مونیخ، آلمان، *L. monocytogenes* (4. S. S. L28) از دکتر B. M. Hill انستیتو تحقیقات شیر، پالمستون شمالی نیوزلند بودند.

اسانسهای گیاهی

اسانسهای گیاهی استفاده شده در این بررسی در جدول ۱ نام برده شده اند. همه اسانسهای گیاهی از ABOCA (Arezzo) و GGI (Milano) به دست آمده اند. عبار اسانسهای گیاهی کنترل شده ۹۹ درصد بود که در روش کار نشان داده شده است. تمامی اسانسهای گیاهی در دمای اتاق نگهداری شده و در زمان عدم استفاده در تاریکی ذخیره می گردیدند.

تهیه کشتهای باکتریایی جهت آزمایشهای مهاری

سویه های باکتریایی در آگار تریپتیک سوی (TSA، Difco Laboratories Detroit, MT) در ۵ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. کشتهای Stock در آبگوشت تریپتیکاز سوی (۴) و ۰/۶ درصد عصاره مخمر در ۳۲ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴-۱۸

کتابخانه انستیتو رازی

جدول ۱: اسانسهای گیاهی که به دلیل خاصیت ضد میکروبی مورد آزمایش قرار گرفته‌اند

ریحان	بدر رازیانه	مرزنجوش	نعناع صحرایی
بابونه معمولی	سیر	اسانس بهازنارنج	فلفل فرنگی شیرین
بابونه رومی	زنجبیل	جوز	الکیل کوهی - روزماری
کرفس	جل	پیاز	زعفران
دارچین	بادرنجوبه	پرتقال	مریم گلی
میخک	اسانس نارنگی	پونه کوهی	آویشن
گشنیز	کرفس وحشی	وانیل*	زیره سبز
فلفل	ترخون		

* Oleoresin

سانتیمتر در مدت ۵ دقیقه قطعه شد. گوشت‌های قطعه شده به قسمتهای ۲۵ گرمی به طریق اسپتیک تقسیم شد و در کیسه‌های استریل گذاشته شد *L28 L. monocytogenes* به میزان ده به ده برای به دست آوردن $10^7 \times 10^2 - 1$ CFU/g با محلول سرم فیزیولوژی رقیق شد. یکمصد میلی‌لیتر از محلول الکیلی اسانس گیاهی آویشن (۵:۱ در الکل خالص) روی سطح گوشت به غیر از نمونه‌ها تلقیح شد.

L28 L. monocytogenes و اسانسهای گیاهی روی گوشت خوک قطعه قطعه شده به وسیله دست به مدت ۵ دقیقه توزیع شد.

کیسه‌های معدی (۶) شامل گوشت‌های تلقیح شده‌ای در دمای 45 ± 0.2 و 8 ± 0.2 برای ۴ تا ۸ روز نگهداری شد.

بعد از این نمونه‌های گوشت به اضافه ۲۲۵ میلی‌لیتر از محلول سرم فیزیولوژی دوبار تلقیح شدند. همه نمونه‌ها برای ۱۲ ثانیه هم‌وزنیزه شدند که با استفاده از Lab Blende Stomacher (PBI 400) برای سری رقتها از هر نمونه در همان رقت استفاده شد. همه پلتها به مدت ۴۸ ساعت در ۳۲ درجه سانتیگراد به جهت شمارش *L. monocytogenes* در گرمخانه گذاشته شدند. تعدادی از کلنی‌ها قطرشان ۵/۵ تا ۱/۵ میلی‌متر و به رنگ آبی خاکستری با انجام واکنش کاتالیز - آنالیز گرم - کاهش نیترات - کربوهیدرات و حرکت چتری و انتقال نور به طور مایل مورد تأیید قرار گرفتند.

نتیجه و بحث

جدول ۲ اثر ۳۲ عصاره گیاهی روی رشد گونه‌های لیستریا به وسیله متد آگاری منتشره را نشان می‌دهد. ۱۲ تا از اسانسهای گیاهی آزمایش شده خاصیت ضد میکروبی نشان دادند اما تنها ۱۵ اسانس گیاهی (میخک، دارچین، آویشن، پونه کوهی و فلفل)

جدول ۲: خصوصیات بازدارنده اسانسهای گیاهی رقیق‌نشده آزمایش شده بر علیه سویه‌های *Listeria spp* در غلظت باکتریایی 10^6 CFU/ml

اسانس گیاهی	L12	LL201	PF59	Scott A	L28
ریحان	±	±	±	±	±
بابونه معمولی	-	±	-	-	-
بابونه رومی	±	±	±	±	±
کرفس	-	-	±	±	±
دارچین	+++	+++	+++	+++	++
میخک	++	++	++	+	++
گشنیز	±	±	±	±	±
زیره سبز	±	±	±	±	±
پونه کوهی	++++	++++	++++	++++	++++
کرفس وحشی	±	±	±	±	±
نعناع صحرایی	±	±	±	±	±
فلفل فرنگی شیرین	+	+	+	+	++
آویشن	++++	++++	++++	++++	++++

X = تعریف قطر محدوده هاله بازدارنده

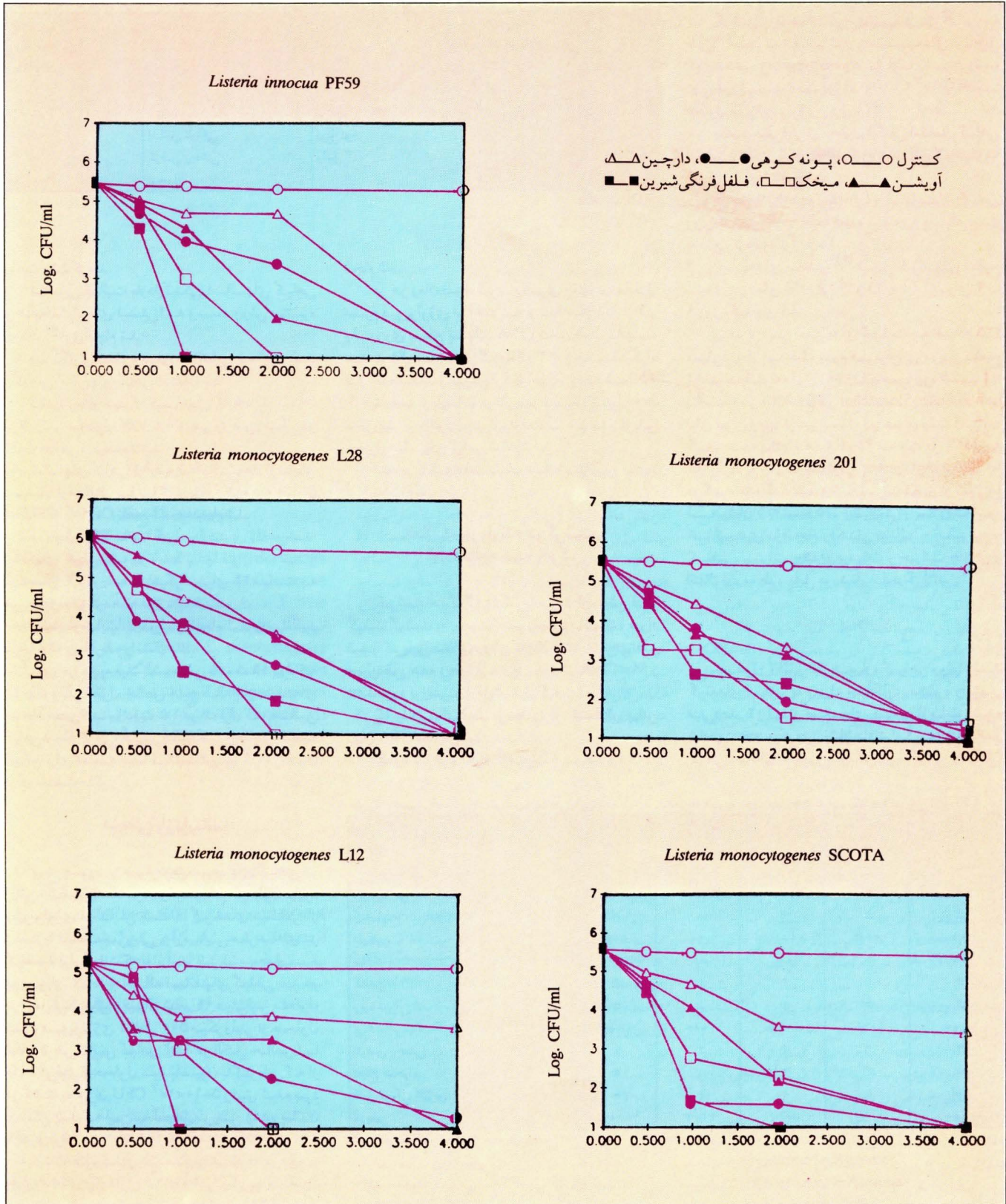
-: منفی $250mm \leq X < 25mm$: ++
 +: رشد محدود $250mm \leq X < 25mm$: +++
 ++: $150mm \leq X < 250mm$: ++++

ساعت رشد کردند. شناسایی فعالیت بازدارندگی اسانسهای گیاهی بر علیه سویه‌های لیستریا به وسیله روش منتشره دیسک آگاری انجام شد. متد آگاری منتشره برای شناسایی فعالیت ضد میکروبی اسانسهای گیاهی استفاده شد. فیلترهای دیسک کساغذی (۵) $13mm$ با 50 میکرولیتر محلول V/V ۱:۵ از هر روغن اصلی در اتانول خالص، خیسانده شد. تمام اسانسهای گیاهی بر علیه تمام گونه‌ها، آزمایش شدند. آزمایش با باکتری‌هایی که به میزان 10^6 CFU/ml تلقیح شدند، انجام شد. محیط TSA با هر گونه با کتری تلقیح شد. دیسکهای خیس شده در وسط پلتها قرار داده شد و در دمای ۳۲ درجه سانتیگراد برای ۲۴ ساعت به طور وارونه در گرمخانه قرار داده شدند. تمام آزمایشات دوبار انجام شد و میانگین نتایج، هاله باز دارنده را نشان داد. برای هر سویه قبلاً تشخیص داده شده بود که 40 میکرولیتر اتانول خالص هیچ هاله باز دارنده‌ای ایجاد نمی‌کند. با دقت ۱:۵ در اتانول سه اسانس گیاهی (پونه کوهی، آویشن، میخک) آزمایش شدند که این برای مقایسه عملکرد اسانسهای گیاهی فوق در دو غلظت مذکور بود.

منحنی بازدارنده

پنج مورد از مؤثرترین اسانسهای گیاهی در روش آگاری منتشره در سیستم محلول سرم فیزیولوژی آزمایش شدند. گونه‌های مختلفی از لیستریا تحت بررسی و آزمایش مرحله‌ای در گرمخانه قرار گرفت که بقاء آنها نیز در محلول سرم فیزیولوژی ۹/۰٪ به اضافه اسانسهای گیاهی نیز در دو آزمایش تزیق و دنبال شد. ۹۹ میلی‌لیتر محلول سرم فیزیولوژی شامل 500 میکرولیتر از محلول الکیلی از هر اسانس گیاهی (۵:۱ در الکل خالص) با یک میلی‌لیتر از محلول سوپانسیون باکتریایی که از هر کشت به میزان $10^7 \times 10^5 - 5$ رقیق شده بود آزمایش شد که این به لحاظ بررسی زنده ماندن باکتری بود.

تمام ظروف در یک صفحه متحرک در درجه حرارت اتاق نگهداری شدند و نمونه‌گیریها به طور متناوب در زمانهای ۰/۵-۱-۲-۴ و ۲۴ ساعت



(جدول ۴). انتقال اثر ضد لیستریایی روغن اختصاصی آویشن در روشهای تجربی در آگار و یا در محیط مایع نسبت به *in vivo* (گوشت خوک قطعه قطعه شده) کاهش اثر را نشان می دهد و یک کاهش $Ca.2 \log$ در تعداد سلولهای زنده $L28$ موجود است.

نتیجه

ادویه و مشتقاتشان در درجه اول به منظور بهبود طعم غذا یا نوشیدنی استفاده می شوند اگر چه مقداری فعالیت ضد میکروبی داشته باشند. بیشترین عضو تشکیل دهنده ادویه ها که خاصیت ضد میکروبی را نشان دادند. شامل: Thymol (پونه کوهی، آویشن)، *Cinnamic aldehyde* (دارچین)، Eugenol (دارچین، میخک، فلفل) و Carvacrol (پونه کوهی و آویشن) بود. Beuchat و Connors گزارش کردند که میخک، فلفل، دارچین، سیر و پیاز از رشد تعدادی میکروارگانیسمهای مولد فساد غذایی جلوگیری می کند.

ناشران دیگر فعالیت ضد میکروبی چند گونه اسانسهای گیاهی روی *St. aureus* و *S. typhimorium*, *Vibrio parahaemolyticus* و *E. coli* را نشان دادند.

قبل از این هیچ تحقیقاتی روی گونه های لیستریا صورت نگرفته بود. یکی از استفاده های اصلی ادویه ها به عنوان مزه یا چاشنی در صنعت گوشت های نمک زده است. علاوه بر این جدا کردن سویه های *L. monocytogenes* در گوشت طیور، گاو، خوک و گوسفند فعالیت ضد لیستریایی تعدادی از اسانس های گیاهی را ثابت می کند.

نتایج این تحقیق نشان داد که امکان استفاده تعدادی از ادویه ها به عنوان نگهدارنده ضد لیستریایی در غذا وجود دارد.

اگر چه که واکنش بین ماده غذایی یا محیط غذایی و پلت شدن را باید در نظر گرفت لیکن تحقیقات کلی برای استاندارد کردن روشها به جهت ارزیابی فعالیت ضد لیستریایی اسانسهای گیاهی احتیاج است و در کل مطالعات بیشتری در این زمینه مورد نیاز است.

پاورقی

1. Essential oil=EO
2. Paper disc diffusion method
3. Inhibition curve
4. Trypticase soy broth
5. Filter paper disks
6. Stomach bags

منبع مورد استفاده

Aureli, P. Costan, A and zolea, S. 1992, Antimicrobial activity of some plant essential oils against *Listeria monocytogenes*, Journal of food protection, Vol 55, pp 344-348.

میکروبی مابین اسانس های گیاهی مختلف و سویه های مورد آزمایش متغیر بود. فعالیت ضد میکروبی روغن اصلی آزمایش شده بر علیه ۵ سویه لیستریا شبیه بودند. کاهش شدیدی در سلولهای زنده برای هر سویه با عصاره فلفل در ۱ ساعت مورد توجه قرار گرفت. فعالیت آویشن، میخک، پونه کوهی باعث کاهش کمتری در سلولهای زنده در ساعت اول گردید. منحنی در ساعت چهارم آزمایش برای همه سویه ها یکسان بود.

روغن دارچین فعالیت ضعیفتری برای جلوگیری از رشد سویه های لیستریا داشت، و در واقع مشخص شد که فعالیت ضد میکروبی در ۲ ساعت اول پایین تر است. در ساعت چهارم، مدلها و الگوهای مشخص از خصوصیات هر کدام از موارد مورد آزمایش دیده شد.

سلولهای زنده *L. monocytogenes* و Scotta L12 در مقایسه با دیگر سویه ها کمتر بودند. معهدا، برای ۵ اسانس گیاهی زمان بیشتری، تا ۲۴ ساعت در آزمایش در نظر گرفته شد.

۱۰ زیر کشت از هر کشت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شد و هیچ رشدی مشاهده نگردید (اطلاعات در شکل نشان داده نشده است).

نتایج به ما نشان می دهد که اسانسهای گیاهی فعال در محیط TSA یا در محلول سرم فیزیولوژی از رشد لیستریا جلوگیری می کند. این نتایج معنی دار است چرا که لیستریا توانایی زنده ماندن برای مدت طولانی بدون آن که تکثیر کند را دارد.

برای تنظیم یا هدایت آزمایش با فرآورده های غذایی، نتایج نشان داد عصاره آویشن یک کاهش در تعداد *L. monocytogenes* L28 زنده در گوشتی که اسانسهای گیاهی به آن اضافه شده ایجاد می کند

معنی دار بودند و هاله بازدارنده نشان دادند. توجه: اسانسهای گیاهی که هیچ هاله بازدارنده ای را ایجاد نکردند شامل ترخون، رازیانه سیر، زنجبیل، جل، بادرنجویه، پیاز، پرتقال، فلفل، اکلیل کوهی، زعفران، مریم گلی و وانیل بود.

جدول ۳ گزارش داده ها بر روی فعالیت ۳ اسانس گیاهی (میخک، آویشن و پونه کوهی) انتخاب شد و بیشترین اثرشان در دو غلظت مختلف بررسی شد.

نتایج نشان داد که در غلظتهای پایین اسانسهای گیاهی فعالیت کمتری به جهت ایجاد هاله بازدارنده از خود نشان می دهند اگر چه که یک هاله بازدارنده در تمام روغنهای اصلی آزمایش شده آشکار شد. اطلاعات یک رابطه بین غلظت پایین تر از اسانسهای گیاهی و گونه های مشخص را نشان داد.

۵ مورد از اسانسهای گیاهی که فعالیت ضد لیستریایی مؤثرتری داشتند در بین گزارشات قبل مورد تأیید قرار گرفته بود.

جدول ۳: خصوصیات بازدارندگی ۳ اسانس گیاهی رقیق شده به نسبت ۱:۵ و ۱:۵۰ آزمایش شده بر علیه سویه های لیستریا spp در غلظت با کتریایی حدود 10^6 CFU/ml، نتایج پرانتز مربوط به رقت ۱:۵ از اسانسهای گیاهی می باشد.

شکل ۱ مجموع منحنیهای کشیده شده برای سویه های لیستریایی زنده تهیه شده ۰/۱٪ رانشان می دهد.

کاهش در زنده ماندن سویه های لیستریا که در محلول سرم فیزیولوژی به اضافه اسانسهای گیاهی معلق بودند نشان داده شد. در کنترل آزمایش تعدادی از سلولهای زنده کشف شدند که برای هر گونه آزمایش شده پایدار باقی ماند. زمان مورد نیاز برای کاهش تعداد عوامل

جدول ۳: خصوصیات بازدارندگی ۳ اسانس گیاهی رقیق شده به نسبت ۱:۵ و ۱:۵۰ آزمایش شده بر علیه سویه های *Listeria spp* در غلظت با کتریایی حدود 10^6 CFU/ml، نتایج پرانتز مربوط به رقت ۱:۵ از اسانسهای گیاهی می باشد.

L28	Scott A	PF59	LL201	L12	اسانس گیاهی (EO)
+	+	+	+	+	میخک
(++)	(+)	(++)	(++)	(++)	پونه کوهی
+++	++	+	+++	+	آویشن
(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	
+++	+++	++	+++	++	
(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)	

X = تعریف قطر محدوده هاله بازدارنده

:- منفی $25mm \leq X < 35mm$: ++
 +: رشد محدود $35mm \leq X < 45mm$: +++
 ++: $45mm \leq X < 55mm$: ++++

جدول ۴- فعالیت اسانس گیاهی آویشن روی گوشت خوک تلقیح شده با *L. monocytogenes* L28

زمان (ساعت)	۰ ساعت		۹۶ ساعت		۱۹۲ ساعت	
	a	b	a	b	a	b
۴	$1-2 \times 10^7$ CFU/g	$1-2 \times 10^7$ CFU/g	3×10^7 CFU/g	2×10^6 CFU/g	6×10^7 CFU/g	8×10^0 CFU/g
۸	$1-2 \times 10^7$ CFU/g	$1-2 \times 10^7$ CFU/g	8×10^7 CFU/g	6×10^6 CFU/g	2×10^8 CFU/g	1×10^6 CFU/g

a: گوشت تکه تکه شده بدون اسانس گیاهی آویشن به عنوان کنترل

b: گوشت تکه تکه شده با اسانس گیاهی آویشن