مقایسه اثر مهاری عصاره الکلی آویشن شیرازی در روی تو لید وروتوکسین به‌وسیله اشریشیاکولی انتروهموراژیک با روش آگلوتیناسیون معکوس و کشت رده سلولی ورو

منصور گودرزی[۱*]؛ دکتر مرتضی ستاری[۲]؛ دکتر شهین نجار پیرایه [۲]؛ غلامرضا گودرزی[۱]؛ مهدی مهدوی[۳]

چکیده

مقدمه: *اشریشیاکولی O157:H7 یکی از عوامل مسئول اپیدمی کولیت هموراژیک و سندروم اورمی همولیتیک می‌باشد. این سروتایپ متعلق به زیرگونه اشریشیاکولی انتروهموراژیک می‌باشد. اشریشیاکولی انتروهموراژیک اینتیمین و شیگاتوکسین‌های ۱ و ۲ و یاهر دو را تولید می‌کند. هدف از این تحقیق بررسی‌مقایسه‌ای اثر مهاری عصاره الکلی آویشن شیرازی در روی تولید وروتوکسین توسط انترو هموراژیک اشریشیاکولی با کیت VTEC-RPLA و سنجش سیتوتوکسیسیته در روی رده سلولی ورو می‌باشد.*

مواد و روش‌ها: *در این مطالعه عصاره‌گیری به‌وسیله اتانول °۸۵ انجام شد، سپس حلال به‌وسیله دستگاه تقطیر در خلأ حذف شد (عصاره تغلیظ‌شده). برای ردیابی اولیه خاصیت ضدباکتری روش انتشار از چاهک در محیط آگار مورد استفاده قرار گرفت. پودر عصاره خشک‌شده با استفاده از روش رقت در لوله در محیط مایع برای تعیین MIC و MBC مورد استفاده قرار گرفت. تولید وروتوکیسین در غلظت‌های کم‌تر از مهارکنندگی با استفاده از کیت VTEC-RPLA آزمایش شد. سنجش سیتوتوکسیسیته روی رده سلولی ورو انجام شد و نتایج با میکروسکوب معکوس بررسی و با نتایج کیت VTEC-RPLA مقایسه شد. تمام آزمایش‌ها سه بار تکرار شد.*

نتایج: *متوسط وزن خشک گیاه ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود و حداقل غلظت مهار رشد و حداقل غلظت کشنده در رقت ۱/۶۴ عصاره برابر با ۷۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود، همچنین غلظت‌های کم‌تر از مهارکنندگی شامل ۱/۱۲۸ و ۱/۲۵۶ برابر با ۳۹۰ و ۱۹۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بود و هاله عدم رشد در غلظت MIC برابر ۱۳ میلی‌متر بود و تولید ورو توکسین در غلظت کم‌تر از مهارکنندگی برابر با ۳۹۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به‌صورت کامل مهار شد و نتایج حاصل ازکیت VTEC-RPLA و سنجش سیتوتوکسیسیته روی سلول‌های ورو مشابه بود.*

نتیجه‌گیری: *نتایج به‌دست‌آمده نشان می‌دهد که استفاده از گیاه مذکور به‌عنوان چاشنی در غذاها می‌تواند رشد و تولید وروتوکسین در انترو هموراژیک را تحت تأثیر قرار دهد و از آن به‌عنوان نگه‌دارنده غذایی به جای مواد شیمیایی استفاده کرد. گرچه برخی غلظت‌های عصاره الکلی فعالیت‌های ضدباکتری مشخص از خود نشان می‌دهد اما معرفی آن به‌عنوان یک ترکیب آنتی‌باکتریال نیاز به اطلاعات بیشتر دارد.*

کلیدواژه‌ها: *انترو هموراژیک اشریشیاکولی، آویشن شیرازی، سنجش سیتو توکسیسیته، وروتوکسین.*

«دریافت: ۱۳۸۵/۶/۱۲ پذیرش: ۱۳۸۷/۱۰/۲۴»

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد باکتری شناسی، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه باکتری‌شناسی

۲- استاد یار دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه باکتری‌شناسی

۳- دانشجوی کارشناسی ارشد ایمنی‌شناسی، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه ایمنی‌شناسی

* **عهده‌دار مکاتبات:** تهران، تقاطع بزرگراه‌های جلال آل احمد و شهید دکتر چمران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه باکتری‌شناسی، تلفن ۸۸۰۱۱۰۰۱-۰۲۱، داخلی ۳۵۶۰

E-mail: goudarzi_m54@yahoo.com

مقدمه

سروتایپ O157:H7 اشریشیاکولی به‌عنوان مسئول اپیدمی‌های کولیت هموراژیک و سندروم اورمی همولیتیک شناخته شده است (۱). این سویه متعلق به فامیل اشریشیاکولی انتروهموراژیک می‌باشد. این باکتری مولد اینتیمین (۲) و شیگا توکسین های ۱و۲ می‌باشد.

وروتوکسین‌ها شامل دو نوع اصلی VT_1 و VT_2 می‌باشند که نوع یک با آنتی‌سرم شیگاتوکسین‌شیگلا خنثی می‌شود درحالی‌که نوع دو با آن خنثی نمی‌شود. خانواده سم شیگا سمومی مرکب و چندواحدی هستند، هولوتوکسین حدود ۷۰ کیلو دالتون است که از یک زیر واحد A بخش کاتالیک ۳۲ کیلودالتونی و ۵ زیر واحد اتصالی B هر کدام با وزن ۷/۷ کیلو دالتون تشکیل شده است. به‌طورکلی طی مطالعات صورت‌گرفته مشخص شده است که VT_1 نسبت به VT_2 اثر ضدتوموری شدیدتری را نشان می‌هد به‌صورتی‌که در مطالعات رده‌های مختلف توموری از جمله آستروسیتومای مقاوم به درمان، مننژیومای بدخیم، سرطان پستان، لنفوما، میلوما، کارسینوما، سارکومای موشی و سمینوماها تأثیرات شدید سایتوتوکسیک انتخابی وروتوکسین ۱ نشان‌داده شده است (۳).

علایم و نشانه‌های بیماری ناشی از این باکتری شامل اسهال، کولیت خون‌ریزی‌دهنده، دردهای شدید شکمی و استفراغ می‌باشد (۴). مکانیسم احتمالی ایجاد اسهال با وروتوکسین، کشته شدن سلول‌های جذبی پرزدار اپی‌تلیال روده به واسطه وروتوکسین است، زیرا این سلول حاوی مقادیر زیاد Gb_3 می‌باشد و با مرگ این سلول‌ها و بقاء سلول‌های ترشحی تعادل جذب و ترشح به‌هم ریخته و موجب اسهال می‌گردد، وروتوکسین با ایجاد آسیب در سلولهای گلومرولی منجر به باریک شدن و بستن عروق کوچک گلومرولی توسط پلاکت‌ها و فیبرین می‌شود و با کاهش فیلتراسیون گلومرولی نارسایی حاد کلیوی که از علایم تیپیک HUS است اتفاق می‌افتد (۵). یکی از مؤثرترین روش‌ها برای جلوگیری از تولید وروتوکسین گرمادهی مناسب غذاها در هنگام پخت و استفاده از نگه‌دارنده‌های شیمیایی در مواد غذایی می‌باشد (۶).

با توجه به این‌که در زمینه استخراج مواد مؤثره آویشن و تأثیر آن در روی اشریشیاکلی انتروهموراژیک و تولید وروتوکسین اطلاعات مدونی در دسترس نمی‌باشد، در این تحقیق مقایسه اثر مهاری عصاره الکلی آویشن شیرازی در روی تولید وروتوکسین به وسیله اشریشیاکولی انتروهموراژیک با دو روش آگلوتیناسیون معکوس و کشت رده سلولی ورو مورد آزمایش قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

گونه آویشن شیرازی (Zataria Multiflora) از مرکز تحقیقات کشاورزی تهران جمع‌آوری و توسط متخصصین گیاه‌شناسی این مرکز تعیین هویت شد. عصاره‌گیری به‌روش Maceration method صورت‌گرفت. براساس این روش ۱۰ گرم از برگ‌های جوان گیاه خردشده آویشن به ۱۰۰ میلی‌لیتر هیدرواتانول ۸۵ درجه و۱۰ گرم به آب مقطر اضافه گردید و به‌مدت ۷۲ ساعت در روی دستگاه

چرخاننده به آرامی مخلوط گردیده تا استخراج به‌خوبی صورت گیرد.

سپس مخلوط حلال و گیاه توسط صافی از هم جدا تا عصاره‌های اولیه(Crude extract) به‌دست‌آید. عصاره‌های اولیه وارد دستگاه تقطیر در خلأ گردیده و در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد حلال آن‌ها به‌مدت یک‌ساعت به آرامی تبخیر گردید و عصاره تغلیظ‌شده به‌دست آمد، سپس عصاره گیاهی به وسیله فیلترهای ۰/۴۵ میلی‌متر استریل و در ظروف استریل ۱۰ میلی‌لیتری در یخچال تا زمان استفاده نگه‌داری شد (۹-۷). یک میلی‌لیتر از عصاره تغلیظ‌شده در دمای ۵۰ درجه به مدت ۲۴ ساعت خشک و وزن خشک آن در میلی‌لیتر مشخص شد.

دو سویه باکتریایی شامل E . coli ATCC 25922 و E. coli O157:H7 ATCC 33150 از آزمایشگاه رفرانس بوعلی تهران تهیه و برای بررسی خاصیت ضدمیکروبی عصاره‌ها مورداستفاده قرار گرفت. سویه‌های به‌دست‌آمده از کشت نمونه رفرانس در ۱۰ میلی‌لیتر محیط نوترینت براث کشت داده شد و هر دو سویه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۸ ساعت نگه‌داری شد. سپس غلظت نهایی هر نمونه برای تلقیح براساس کدورت مک‌فارلند در حدود $۱۰^{۶}$ تا $۱۰^{۷}$ CFU در میلی‌لیتر تنظیم شد (۱۰).

سوپرناتانت کشت ۲۴ ساعته E. Coli O157:H7 ATCC 33150 به وسیله سانتریوفوژ یخچال‌دار با دور ۶۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه از توده سلولی جدا شد. توده سلولی سه‌بار با بافرفسفات نمکی شسته شد و با ۰/۲۵ میلی‌لیتر بافر ۰/۰۱ مولار Tris-HCl (pH 7.5) از آن سوسپانسیون تهیه‌شد. عصاره سلولی با سونیکاسیون توده سلولی طبق روش مارکوس و همکاران تهیه‌شد(۱۴).

برای ردیابی اولیه خاصیت ضد باکتری عصاره تغلیظ‌شده و همچنین تعیین قطر متوسط قطر هاله عدم رشد در غلظت MIC ، روش انتشار از چاهک در محیط آگار مورد استفاده قرار گرفت (۱۱).

پودر عصاره خشک‌شده برای تعیین حداقل غلظت ممانعت‌کننده رشد و حداقل غلظت کشنده عصاره با استفاده از روش رقت در لوله در محیط مایع مورد استفاده قرار گرفت. ۵۰ میلی‌گرم از پودر خشک‌شده عصاره در یک میلی‌لیتر از محیط مایع حل شد و محلول نهایی با روش سریال رقت دوتایی تهیه شد، در نتیجه محلول‌هایی در غلظت‌های ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲، ۱/۵۶، ۰/۷۸۰، ۰/۳۹۰ و ۰/۱۹۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به‌دست‌آمد (۱۲ و ۱۳).

با توجه به تحقیقات قبلی چون محیط TSB در مقایسه با سایر محیط‌ها برای تولید وروتوکسین بهترین محیط شناخته‌شده بود برای آزمایش‌های ردیابی توکسین از محیط TSB استفاده شد. برای انجام آزمایش مذکور غلظت‌های ۱/۸-۱/۲ بازدارندگی رشد باکتری و شاهد فاقد عصاره در محیط TSB تهیه شد و مقدار ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون ۰/۵ مک فارلند سویه توکسین مثبت به آن‌ها اضافه شد. برای کنترل کار به یک لوله شاهد نیز از سویه توکسین منفی ATCC25922 افزوده شد. لوله‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در گرم‌خانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. کشت‌های ۲۴ ساعته سویه‌های مورد مطالعه در محیط TSB با دور ۴۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه

سانتریوفوژ شدند و سپس سوپرناتانت را جدا کردیم و از فیلتر ۰/۲۲ میکرون عبور دادیم، سپس توده سلولی را نیز با استفاده از NaCl ۰/۸۵ درصد دوباره شستشو دادیم و با استفاده از روش سونیکاسیون، لیزات سلولی تهیه و با استفاده از فیلتر ۰/۲۲ میکرون استریل گردید. در مرحله بعد ردیابی توکسین در سوپرناتانت و لیزات سلولی با استفاده از کیت VTEC-RPLA (ساخت شرکت بیومدیکال انگلستان) مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۳ و ۱۴).

برای اندازه‌گیری سایتوتوکسیسیته در روی رده سلولی ورو۱۰ میکرولیتر از سریال رقتی دوتایی سوپرناتانت یا عصاره سلولی کشت ۲۴ ساعته باکتری در محیط نوترینت براث به چاهک‌های محتوی رده سلولی ورو اضافه شد. هر چاهک حاوی 10^4 سلول ورو در۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت سلول EMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گوساله، ۰/۸ میلی‌مول گلوتامین و 10^4 مول کانامایسین بود. پس از انکوباسیون در37^o به‌مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور CO2دار، نتایج با میکروسکوب معکوس بررسی شد (۱۵).

یافته‌ها

● اثر عصاره گیاهی بر رشد اشریشیاکولی انتروهموراژیک:

حداقل غلظت ممانعت‌کننده رشد عصاره گیاهی ۷۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و برابر باحداقل غلظت کشنده بود.

● تأثیرات ممانعتی عصاره گیاهی در روی تولید وروتوکسین:

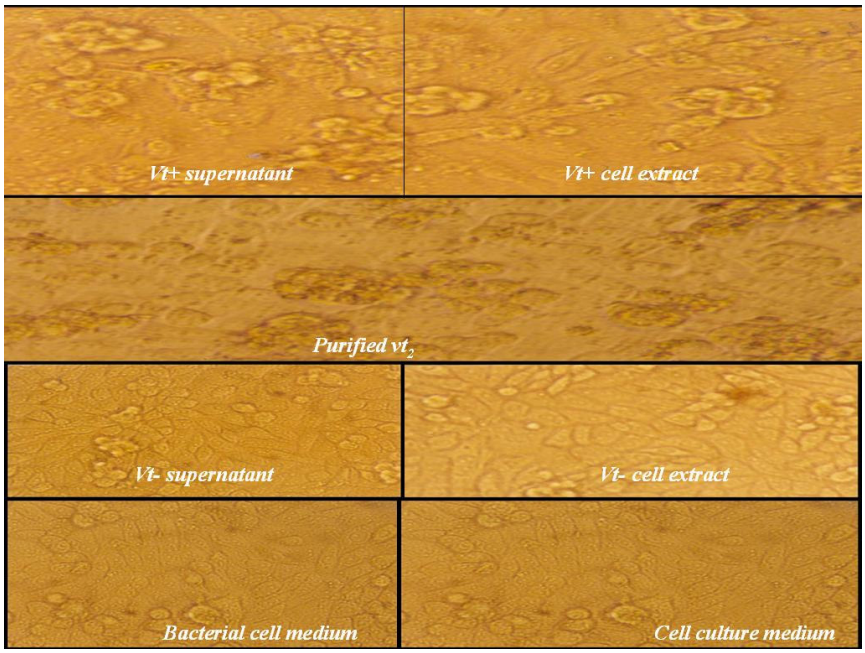
عصاره مورد آزمایش دارای تأثیرات ممانعتی بر تولید وروتوکسین بود و حداقل دوز ممانعت‌کننده تولید وروتوکسین ۳۹۰ میکروگرم در میلی‌لیتر برای وروتوکسین‌های ۱ و ۲ بود (جدول ۱). دوز مورد نیاز برای ممانعت از تولید وروتوکسین کم‌تر از حداقل غلظت ممانعت از رشد بود و در غلظت‌های کم‌تر از مهارکنندگی کاهشی در تعداد باکتری مشاهده نشد هر چند که غلظت عصاره افزایش یافته بود.

● اثر عصاره گیاهی بر سیتوکسیسیته سوپرناتانت و عصاره سلولی اشریشیاکولی انتروهموراژیک:

اثر عصاره گیاهی روی تولید وروتوکسین با استفاده از سیتوکسیسیته در روی رده‌سلولی ورو به‌عنوان اندیکاتوری برای مقدار وروتوکسین، مورد مطالعه بیشتر قرار گرفت. از آنجایی که عصاره گیاهی، رشد باکتری را تحت تأثیر

جدول۱- نتایج حاصل از تأثیر غلظت‌های کم‌تر از بازدارندگی (میکروگرم در میلی‌لیتر) عصاره الکلی آویشن بر تولید وروتوکسین ۱ و ۲ با استفاده از آگلوتیناسیون معکوس

نمونه‌ها	E.coliO157:H7	
	سوپرناتانت	لیزات سلولی
کنترل لاتکس	-	-
VT۲ خالص	++++	++++
E. coli O157:H7	+++	+++
E. coli ATCC25922	-	-
۳۹۰	-	-
۱۹۷	+	+
۹۷	++	++



شکل۱– نتایج حاصل از مواجهه کنترل‌های مثبت و منفی با رده سلولی ورو

CPE (4+) 75-100 % -25 % CPE (2+) 25-50 % CPE (3+) 50-75 %،CPE (1+)

جدول۲–نتایج حاصل از مواجهه کنترل‌های مثبت و منفی با رده سلولی ورو

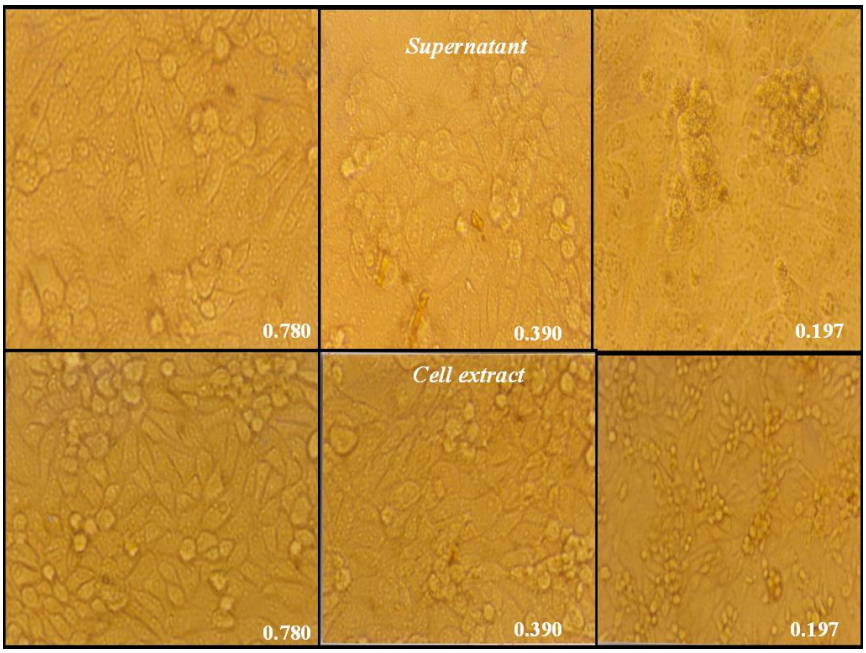
کنترل مثبت		کنترل منفی	
نمونه‌ها	CPE*	نمونه‌ها	CPE
سوپرناتانت E. coli O157:H7	+++	سوپرناتانت E. coli ATCC25922	-
لیزات سلولی E. coli O157:H7	+++	لیزات سلولی E. coli ATCC25922	-
سم خالص ۲VT	++++	محیط‌کشت باکتری	-
کارواکرول تجاری ٪۹۴	++++	محیط‌کشت سلول	-

* CPE (Cytophatic effect)

CPE (1+) ۰-25 % CPE (2+) 25-50 % CPE (3+) 50-75 % CPE (4+) 75-100 %

قرار می‌دهد سیتوتوکسیسیته در غلظت‌های مختلف بیان‌کننده مقدار توکسین در CFU خواهد بود. عصاره گیاهی در غلظت ۳۹۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تولید وروتوکسین را به‌صورت معناداری مهار می‌کند. همچنین کنترل‌های مثبت و منفی برای کنترل کار و استاندارد کردن روش‌ها مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۱ و جدول ۲) سیتوتوکسیسیته سلولی در غلظت‌های مختلف عصاره گیاهی به صورت برجسته‌ای کاهش پیدا می‌کند، به‌صورتی‌که در غلظت صفر، عصاره گیاهی صددرصد و در غلظت ۳۹۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر در حدود صفر درصد می‌باشد(شکل ۲ و جدول ۳).

عصاره گیاهی در غلظت‌هایی که آزمایش‌های سیتوتوکسیسیته انجام پذیرفت فاقد سمیت برای رده سلولی ورو بود و تداخلی با اثر سمی وروتوکسین روی



شکل۲ – نتایج حاصل از تأثیر غلظت‌های کم‌تر از بازدارندگی رشد (میلی‌گرم در میلی‌لیتر) بر تولید وروتوکسین با استفاده از رده سلولی ورو

CPE (4+) 75-100 % -25 % CPE (2+) 25-50 % CPE (3+) 50-75 %٠CPE (1+)

جدول۳– نتایج حاصل از تأثیر غلظت‌های کم‌تر از بازدارندگی رشد (میکروگرم در میلی‌لیتر) عصاره الکلی آویشن شیرازی بر تولید وروتوکسین با استفاده از رده سلولی ورو

سوپرناتانت		لیزات سلولی	
غلظت	CPE *	غلظت	CPE
۳۹۰	–	۳۹۰	+
۱۹۷	+	۱۹۵	–
۹۷	++	۹۷	++

* CPE (1+) ٠-25 % CPE (2+) 25-50 % CPE (3+) 50-75 % CPE (4+) 75-100 %

رده سلولی ورو در غلظت ۳۹۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر نداشت. توجه به نتایج مذکور به روشنی ثابت می‌کند که عصاره الکلی آویشن تولید وروتوکسین را مهار می‌کند.

بحث

در این مطالعه در رقت‌های مختلف تولید وروتوکسین با دو روش کیت تجاری و سیتوتوکسیسیته روی سلول‌های ورو ارزیابی شد و نتایج نشان داد که تولید توکسین در غلظت ۳۹۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر مهار می‌شود که نتایج به‌دست‌آمده از دو روش مورد استفاده دقیقاً مطابق بود و همچنین با مطالعات قبلی که اثر مهاری چای سبز، گل میخک، ماکرولیدها و برخی گیاهان دارویی بومی ژاپن روی تولید وروتوکسین را بررسی کرده بودند نیز مطابق بود (۱۶ و ۱۷).

مطالعات مختلفی روی تولید وروتوکسین با استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها، اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی و اخیراً پروبیوتیک‌ها صورت گرفته است که برخی دارای اثر مهاری بر تولید وروتوکسین بوده و برخی دارای اثر

افزایشی بوده است (۱۸).

نتایج به‌دست‌آمده از این مطالعه نشان داد که عصاره الکلی گیاه آویشن شیرازی دارای اثر مهاری روی تولید وروتوکسین است، ولی مکانیسم اثر آنتی‌بیوتیک‌ها، اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی در مهار تولید وروتوکسین هنوز ناشناخته مانده است، زیرا از طرفی برخی اسانس‌ها، عصاره‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها دارای اثر مهاری هستند و از طرف دیگر برخی از آن‌ها دارای اثر افزایشی هستند، برای مثال آنتی‌بیوتیک‌های کوئینولون مانند اسپاروفلوکساسین و گرپافلوکساسین موجب افزایش تولید وروتوکسین می‌شوند در صورتی که آزیترومایسین، اریترومایسین و کلاریترومایسین دارای اثر مهاری بودند.

پیشنهاداتی که در این زمینه صورت گرفته این است که احتمالاً عصاره‌های گیاهی به صورت مستقیم یا غیرمستقیم با تداخل در مراحل نسخه‌برداری و ترجمه موجب کاهش تولید وروتوکسین می‌شوند و اثر افزایشی آنتی‌بیوتیک‌های کوئینولون و ... چون روی ژنوم باکتری اثر می‌کند ناشی از القاء فاژ مولد توکسین می‌باشد (۱۹).

بنابراین بررسی مکانیسم اثر آویشن شیرازی در مهار رشد باکتری و مهار تولید وروتوکسین و بررسی اثر آن به‌عنوان چاشنی در مواد غذایی و برهم کنش آن با ترکیبات مواد غذایی و بررسی اثر سایر گیاهان بومی ایران بر رشد باکتری و تولید وروتوکسین پیشنهاد می‌گردد.

نتیجه‌گیری

نتایج به دست‌آمده نشان میدهد که استفاده از گیاه مذکور به‌عنوان چاشنی در غذاها می‌تواند رشد و تولید وروتوکسین در انتروهموراژیک را تحت تأثیر قرار دهد و از آن به‌عنوان نگه‌دارنده غذایی به‌جای مواد شیمیایی استفاده کرد و گرچه برخی غلظت‌های عصاره الکلی فعالیت‌های ضدباکتری مشخص از خود نشان می‌دهد اما معرفی آن به عنوان یک ترکیب آنتی‌باکتریال نیاز به اطلاعات بیشتر دارد.

Abstract

Comparison of Inhibitory Effect of Thyme Alcoholic Extract on Verotoxin Production by Entrohemorrhagic Escherichia Coli through Reverse Agglutination and Vero Cell Culture

---

Goudarzi, M.[1]; Sattari, M.[2]; Najar Peerayeh, Sh.[2]; Goudarzi, Gh.[1]; Mahdavi, M.[3]

1. M.Sc student, Tarbiat Modarres University, Faculty of Medicine, Department of Bacteriology

2. Ph.D, Tarbiat Modarres University, Faculty of Medicine, Department of Bacteriology

3. M.Sc student, Tarbiat Modarres University, Faculty of Medicine, Department of Immunology

---

Introduction: *The Escherichia coli O157:H7 is considered an agent responsible for the outbreak of hemorrhagic colitis and the hemolytic uremic Syndrome (HUS). This serotype belongs to the subspecies of enterohemorrhagic E. coli (EHEC). The EHEC O157:H7 produces intimin, Shiga toxins (Stx1, Stx2 or both). This study investigates the effect of thyme alcoholic extract on the growth and production of verotoxin of Escherichia coli o157:h7. We also examine cytotoxicity on the vero cell line*

Materials and Methods: *Extraction was performed using ethanol 85° the extract was then concentrated. For initial screening agar well diffusion assay was used. Dried extract powder was used for determination of Minimal Inhibitory Concentration (MIC) & Minimal Bactericidal Concentration (MBC) through tube dilution method in broth media. Verotoxin was produced in inhibitory concentration using VTEC-RPLA kit (Reverse Passive latex Agglutination) .Cytotoxicity on the vero cell line was performed and the result was examined using a converted microscope and was compared to the result of VTEC-RPLA kit. The procedure was repeated three times.*

Results: *The dried herb mean weight was 50 mg/ml and MIC&MBC was 1/64= 780µg/ml and SIC: 1/128=390µg/ml and SIC: 1/256=195µg/ml.Inhibitory zone of MIC was 13 mm. Verotoxin production in inhibitory concentration of less than 390µg/ml was totally controlled. The results of VTEC-RPLA kit and Vero cell Cytotoxicity were similar.*

Conclusion: *Our result indicates that thyme, as an ingredient added to the food, can affect the growth of Entrohemorrhagic Escherichia coli. This means that it could be used as a natural preservative replacing the chemical ones. Although some of the concentrations of the thyme alcoholic extract showed pronounced antibacterial activity, the introduction of it as an antibacterial compound requires further investigation.*

Key words: *Entrohemorrhagic Escherichia, Thyme (Zataria Multiflura), Cytotoxicity Assay, Verotoxin*

منابع

1. Griffin PM, Ostroff SM, Tauxe RV, Greene KD, Well JG, Lewis JH, Blake PA. Illnesses associated with Escherichia coli O157:H7 infections: a broad clinical spectrum. Ann Intern Med 1988; 109:705-12
2. Jerse AE, Yu J, TallB D, Kaper JB. A geneticlocus of enteropathogenic Escherichia coli necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cell. Proc Natl Acad Sci 1990; 87:7839-43
3. Cohen MB, Giannella RA. Hemorrhagic colitis associated with Escherichia coli O157:H7. Adv Intern Med 1992; 37:173-95
4. MacRae M, Rebate T, Johnston M, Ogden D. The sensitivity of Escherichia coli O157 to some antimicrobials by conventional and conductance assays. Lett Appl Microbiol 1997; 25:135-37
5. Yamamura A, Murai A, Takamatsu H, Watabe K. Antimicrobial effect of chemical preservatives on entero-hemorrhagic Escherichia coli O157: H7. J Health Sci 2000; 46:204-8
6. Marsh J, MacLeod AF, Hanson MF, Emmanuel FXS, Frost JA, Thomas A. A restaurant-associated outbreak of E-coli O157 infection. J Public Health Med 1992; 14:78-83
7. Farkas J, Davidson PM, Montville TJ, Wilkowski K. Food microbiology: In: Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ, editors. Fundamental and frontiers. Washington DC: ASM Press; 1997, PP. 495-578
8. Decal M. Inhibitory effects of spice extracts on the growth of Aspergillus Parasiticus. Z Lebensm Unters Forsch 1998; 207A: 253-55
9. Rauha JP, Remes S, Heinonen M, Hopia A, KThknen M, Kujala T, et al. Antimicrobial effects of Finnish plants extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. Int J Food Microbiol 2000; 56:3-12
10. Ilçim A, Diğrak M, Bağci E. The investigation of antimicrobial effect of some plant extract. Turkish J Biol 1998; 22:119-25
11. Cowan M. Plant products as antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev 1999; 4:56782
12. Nakanishi T, Watabe K. The San-Ei Gen foundation for food chemical research. Annual Report No. 1999; 5:125-31
13. Kai A, Obata H, Hatakeyama K, Igarashi H, Itoh T, Kudoh Y. Evaluation of a late agglutination method for detecting and characterizing verotoxin (VT) produced by Escherichia coli. Kansenshogaku Zasshi 1997; 71:248-54

14. Sagdic O. Sensitivity of four pathogenic bacteria to Turkish thyme and oregano hydrosols. Lebensm Wiss U Techolo 2003; 36: 467-73

15. Y Sajita- Konishi, Y Hara- Kudo, Amano F, Okubo T, Aoi N, Iwaki M, Kumagai S. Epigallocatechin gallate and gallocatechin gallate in green tea catechins Inhibit extracellular release of vero toxin from enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7. Biochemica et Biophysica Acta 1999; 1472: 42-50

16. Rasooli I, Razzaghi Abyaneh M. Inhibitory effects of Thyme oils on growth and afltoxin production by Aspergillus Parasiticus. Food Control 2004; 15: 479-83

17. Kajiura T, Tanaka M, Wada H, Ito K, Koyama Y, Kato F. Effects of disinfections on shiga–like converting phage from entrohemorrhagic Escherichia coli O157: H7. J Health Sci 2001; 47(2):203-7

18. Sagdic O, Kuscu A, Ozcan M, Ozcelik S. Effect of Turkish spice extracts at various concentrations on the growth of Escherichia coli O157:H7. Food Microbiol 2002; 19: 473-80

19. Sakagami Y, Kaikoh S, Kajimura K, Yokoyama H. Inhibitory effect of clove extracts on verotoxin production by enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7. Biocontrol Sci 2000; 5:47-49