

بررسی تأثیر عصاره های آبی والکلی گیاه آویشن شیرازی بر روی اشیریشیا کلی انتر و هموراژیک

منصور گودرزی¹، مرتضی ستاری²، شهین نجار پیرایه²، غلامرضا گودرزی³، محسن بیگدلی⁴

1- دانشجوی کارشناسی ارشد باکتری شناسی پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

2- استادیار، عضو هیأت علمی دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه باکتری شناسی

3- دانشجوی کارشناسی ارشد باکتری شناسی پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

4- استادیار، مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی استان تهران

یافته / دوره هشتم / شماره 3 / پاییز 85 / مسلسل 29

چکیده

دریافت مقاله: 85/2/4، پذیرش مقاله: 85/5/1

Ø مقدمه: به دلیل مقاومت روز افزون باکتری های بیمارزا به آنتی بیوتیک های جدید محققین در پی یافتن مواد ضد میکروبی با منشأ گیاهی به عنوان جایگزین آنتی بیوتیکهای غیر مؤثر هستند. هدف از انجام این مطالعه، بررسی خواص ضد باکتریایی عصاره آبی و الکلی گیاه آویشن شیرازی بر روی سویه های بالینی و استاندارد اشیریشیا کلی انتر و هموراژیک می باشد.

Ø مواد و روش ها: برگ های جوان گیاه پس از خشک شدن به طور جداگانه به میزان 10 گرم در دسی لیتر به اتانول 85 درجه و آب مقطر اضافه شده، سپس عصاره ها به روش تقطیر در خلاء استخراج شدند. خواص ضد باکتریایی عصاره ها ابتدا به روش رقت در لوله تعیین و سپس وزن خشک عصاره ها در هر میلی لیتر محاسبه و حداقل غلظت مهار کنندگی و کشندگی آنها بدست آمد. معادل این غلظت ها به چاهک های حفر شده در محیط مولر - هینتون آگار اضافه و میانگین قطر هاله های عدم رشد برای عصاره ها و سویه ها مقایسه گردید. به منظور شناسایی مواد مؤثره ضد باکتریایی در عصاره های آبی و الکلی از روش کروماتوگرافی با صفحه نازک استفاده گردید.

Ø یافته ها: غلظت های معینی از عصاره الکلی دارای خواص ضد باکتریایی قابل توجهی بود. در غلظت 0/78 میلی گرم در میلی لیتر دارای اثر مهاری و اثر کشندگی بر روی هر سه سویه بود و از این نظر سویه ها با هم تفاوتی نداشتند. همچنین تأثیر عصاره با کم شدن غلظت آن در چاهک ها کم می شد. این در حالی بود که عصاره آبی در هیچکدام از غلظت ها بر روی سویه های استاندارد و بالینی مؤثر نبود.

Ø نتیجه گیری: عصاره الکلی آویشن شیرازی دارای اثرات چشمگیری بر روی سویه های اشیریشیا کلی انتر و هموراژیک می باشد ولی معرفی آن به عنوان یک ترکیب ضد باکتریایی نیاز به تحقیقات وسیع تری دارد.

واژه های کلیدی: آویشن شیرازی، اشیریشیا کلی انتر و هموراژیک، گیاهان دارویی

مقدمه

آویشن از قرن 16 رسماً به عنوان یک گیاه دارویی معرفی شده و در تمام فارماکوپه های معتبر ثبت شده است (1، 2). آویشن یا آویشم گروهی از گیاهان تیره نعناع¹ راسته لاملیلها² می باشد که شامل 3 جنس است:

- 1- جنس زاتاریا³: که گونه ای از آن در جنوب ایران موجود است و به آویشن شیرازی یا پهن برگ معروف است.
- 2- جنس زیزیفورا⁴: آویشن باریک برگ گونه ای از آن است.
- 3- جنس تیموس⁵: که بسیار متنوعند. 17 گونه از آن گزارش شده که 14 گونه آنها متعلق به ایران است. گونه ولگاریس⁶ از این جنس به نام آویشن⁷ یا آویشن باغی و یا آویشن معمولی است (1).

آویشن اثرات ضد عفونی کننده دارد. گاهی از اسانس آن بعنوان داروهای ضد تشنج و ضد روماتیسم، از طعم تند و گرم آن در صنایع غذایی و از اثرات ضد عفونی کننده آن در صنایع بهداشتی در تهیه صابونهای معطر یا در فرمول خمیر دندانها و محلولهای دهان شویه استفاده می شود (2، 5). اسانس آن مایعی زرد رنگ یا زرشکی است، بوی مطبوع و طعم تند دارد. تیمول ترکیبی فنلی و مهمترین ماده مؤثره آن بوده و ترکیب مهم دیگر آن کارواکرول است که به خوبی در الکل و حلالهای آلی حل می شوند و این مواد عمدتاً در طی رشد گیاه در برگهای جوان ذخیره می شوند. از برگهای گیاه به صورت دم کرده برای التیام سرفه استفاده می شود. عصاره الکلی آن اثر ضد عفونی کننده و خلط آور دارد. داروهای متعددی از مواد مؤثره آن به صورت شربت، پماد، قطره و ... در بازارهای دارویی دنیا عرضه می شود. شربت تیمیانی که نوعی خلط آور است در ایران تهیه و مصرف دارویی دارد (3، 4).

اشیریشیا کلی انتروهموراژیک⁸ باکتری بیماری زای انسانی است که از طریق اغذیه آلوده منتقل می شود. بیماری ناشی از این باکتری به صورت انفرادی و اپیدمی در نقاط مختلف دنیا گزارش می شود (6). علائم و نشانه های بیماری عبارتند از

اسهال، تهوع، کولیت خونریزی دهنده و دل پیچه های شدید. در مواردی این بیماری به صورت سندرم همولیتیک اورمیک بویژه در کودکان بروز می کند و موجب نقص کلیه ها می شود که در صورت عدم درمان به مرگ منتهی می گردد (7). دوره نقاهت بیماری بین 6-1 روز و گاهی تا 14 روز گزارش شده است (8). عامل اصلی ایجاد بیماری سم وروتوکسین است که توسط این باکتری در شرایط مساعد تولید می شود. چون باکتری عمدتاً از طریق اغذیه آلوده منتقل می شود، لذا روشهای طبخ و نگهداری مواد غذایی در جلوگیری از شیوع بیماری نقش مهمی ایفا می کند.

اثرات مواد شیمیایی مختلف به عنوان مواد نگهدارنده بر روی رشد اشیریشیا کلی انتروهموراژیک مورد مطالعه قرار گرفته است (9) و گیاهان نیز به عنوان افزودنی های غذایی نقش مهمی در بازدارندگی فلور میکروبی دارند.

در این تحقیق اثر عصاره های الکلی و آبی آویشن بر روی مهار رشد اشیریشیا کلی انتروهموراژیک مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش ها

عصاره گیری

گیاه آویشن شیرازی پس از تأیید از باغ کشاورزی مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی استان تهران به محل انجام تحقیق در گروه باکتری شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انتقال داده شد و پس از خشک کردن کامل گیاه در محل تاریک و بدون رطوبت، برگهای جوان گیاه از سایر قسمت ها جدا شده و سپس کاملاً خرد گردید (10).

تهیه عصاره آبی والکلی

10 گرم از برگهای جوان گیاه خرد شده آویشن به طور جداگانه به 100 میلی لیتر هیدروآتانول 85 درجه و آب مقطر

- | | |
|--|--------------|
| 1. Lamiaceae | 2. lamhiales |
| 3. Zataria | 4. Ziziphora |
| 5. Thymus | 6. Vulgaris |
| 7. Thyme | |
| 8. Entro Hemorrhagic Escherichia Coli (EHEC) | |

اضافه گردید و به مدت 72 ساعت بر روی دستگاه چرخاننده به آرامی مخلوط گردیده تا استخراج به خوبی صورت گیرد¹.

سپس مخلوط حلال و گیاه توسط صافی از هم جدا تا عصاره های اولیه² بدست آید. عصاره اولیه وارد دستگاه تقطیر در خلاء گردیده و در دمای 80 درجه سانتیگراد حلال آنها به مدت یک ساعت به آرامی تبخیر گردید و عصاره تغلیظ شده بدست آمد (11).

تعیین وزن خشک عصاره ها

جهت استاندارد کردن روش و تکرارپذیری آن وزن خشک عصاره ها تعیین گردید. بدین صورت که برای هر عصاره به طور جداگانه سه لوله خالی توسط ترازوی دیجیتالی حساس وزن شد. سپس از هر کدام از عصاره های آبی و الکلی 1 میلی لیتر به هر لوله اضافه شد. پس از انکوباسیون 24 ساعته لوله ها در 50 درجه سانتیگراد عصاره ها کاملاً خشک شده، سپس سه لوله مربوط به هر کدام از عصاره ها مجدداً توزین گردیده و با کم کردن وزن لوله های خالی، میانگین وزن خشک عصاره های آبی و الکلی در میلی لیتر بدست آمد (11).

سویه های مورد آزمایش

در این تحقیق از دو سویه استاندارد و بالینی اشیریشیا کلی انتروهمورائیک استفاده شد. سویه استاندارد اشیریشیا کلی انتروهمورائیک ATCC 33150 از مرکز رفرانس بیمارستان بوعلی و سویه بالینی از انستیتو پاستور ایران تهیه شد. هر دوسویه پس از تعیین هویت نهایی توسط آزمایش های بیوشیمیایی، به روش انتشار در آگار توسط دیسک های آنتی بیوتیک ساخت شرکت پادتن طب، تعیین حساسیت دارویی شدند. جهت انجام آزمایشات حساسیتی و رسیدن باکتری به تعداد استاندارد و فاز رشد لگاریتمی، از دوسویه فوق سوسپانسیون باکتریایی با کدورت 0/5 مک فارلند در محیط مولر- هینتون براث تهیه و سپس از هر لوله روی محیط جامد کشت داده شد تا تعداد باکتری های زنده و فعال در هر میلی لیتر از سوسپانسیون ها مشخص گردد (12).

بررسی کمی حساسیت به روش سریال های رقتی

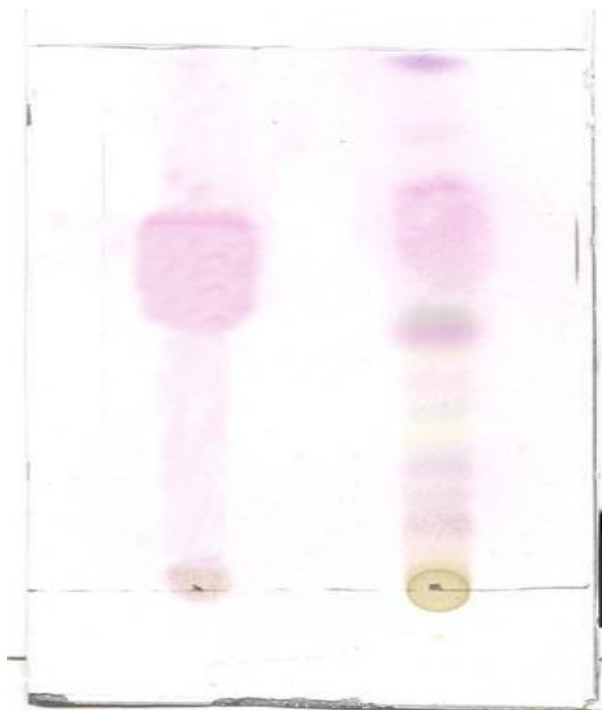
در این روش جهت تعیین نسبی حداقل غلظتی که باعث مهار رشد باکتری ها³ (MIC) و حداقل غلظتی که باعث مرگ باکتری ها⁴ (MBC) می گردد، از عصاره آبی و عصاره تغلیظ شده الکلی سریال های رقتی^{1/2}، ^{1/4}، ^{1/8}، ^{1/16}، ^{1/32} و ... در محیط مولر- هینتون براث تهیه گردید. سپس به هر کدام از رقت ها به ازای هر میلی لیتر محیط مایع، 5×10^5 باکتری فعال اضافه گردید. در کنار لوله ها از کنترل مثبت (محیط کشت حاوی باکتری، بدون عصاره) و کنترل منفی (محیط کشت بدون باکتری) استفاده گردید. در نهایت لوله ها به مدت 24 ساعت در 37 درجه سانتیگراد انکوبه و سپس نتایج قرائت گردید.

برای هر کدام از رقت های عصاره آبی و الکلی، آخرین رقتی که در آن هیچگونه کدورتی مشاهده نگردید (عدم رشد) به عنوان MIC در نظر گرفته شد و از تمام لوله های بدون کدورت روی محیط مولر- هینتون براث آگار کشت داده شد. آخرین رقتی از عصاره ها که قادر به مرگ 99/9% درصد از باکتری های زنده اولیه بود، به عنوان MBC عصاره ها در نظر گرفته شد (11-12).

تعیین MIC و MBC براساس وزن خشک عصاره ها

با توجه به وزن خشک عصاره ها در هر میلی لیتر، رقت هایی که به عنوان MIC و MBC نسبی عصاره ها تعیین گردید به مقادیر وزنی عصاره ها تبدیل شد. در نتیجه به منظور تعیین دقیق MIC و MBC به وسیله ترازوی حساس مقادیر وزنی معادل با MIC و MBC به روش سریال رقتی، از پودر عصاره ها توزین و در 1 میلی لیتر از محیط مولر- هینتون براث حل شد. همانند روش قبل 5×10^5 باکتری به هر لوله اضافه و پس از انکوباسیون 24 ساعته در 37 درجه سانتیگراد مقادیر

1. Maceration method
2. Crude extract
3. Mean Inhibitory concentration
4. Mean Bactriocidal concentration



شکل شماره 1- کروماتوگرام حاصل از عصاره الکلی آویشن (سمت راست) در کنار کارواکروم تجاری (سمت چپ) 94 درصد

یافته ها

نتایج حاصل از آنتی بیوگرام سویه های استاندارد و بالینی با برخی از آنتی بیوتیک های رایج نشان داد که دو سویه از نظر تست های آنتی بیوگرام تفاوت چندانی ندارند (جدول 1). از عصاره های آبی والکلی پس از تغلیظ در دستگاه تقطیر در خلاء در نهایت 3 میلی لیتر عصاره غلیظ بدست آمد که در تعیین MIC و MBC به روش سریال رقتی و وزن خشک عصاره از آنها استفاده گردید.

در تعیین MIC و MBC به روش سریال رقتی، هیچکدام از رقت های عصاره آبی (حتی رقت صفر) قادر به مهار رشد سویه های استاندارد و بالینی نبود (جدول 3). ولی در این روش عصاره الکلی در رقت 1/64 باعث مهار رشد و مرگ باکتری ها و به عنوان MIC و MBC بر روی سویه استاندارد و بالینی مؤثر بود و دو سویه از نظر MIC و MBC با هم تفاوتی نداشتند.

میانگین وزن خشک عصاره های الکلی و آبی به ترتیب 80 و 50 میلی گرم در میلی لیتر بود که با توجه به این اوزان

MIC و MBC بر حسب میلی گرم در میلی لیتر عصاره ها برای هر سویه تعیین گردید (11).

تعیین قطر هاله های عدم رشد برای مقادیر MIC و MBC

برای تعیین قطر هاله های عدم رشد، چاهک هایی به حجم 100 میکرولیتر بر روی محیط مولر- هینتون آگار (قطر 4 mm) به طور جداگانه برای هر عصاره حفر شده و با حفظ شرایط استاندارد درانجام تست های حساسیتی، از سوسپانسیون 0/5 مک فارلند هر سویه به طور جداگانه به روش کشت سفره ای بر روی محیط، کشت داده شد. سپس مقادیر معادل با MIC و MBC بدست آمده در روش های قبل در درون چاهک ها ریخته شد و پس از 24 ساعت انکوباسیون، قطر هاله های عدم رشد به طور دقیق اندازه گیری شدند (13).

بررسی مواد مؤثره

به منظور شناسایی مواد مؤثره ضد باکتریایی در عصاره های آبی و الکلی از روش کروماتو گرافی با صفحه نازک (TLC) استفاده شد. در این روش از صفحات سیلیکاژل ساخت شرکت مرک آلمان به عنوان فاز ثابت استفاده گردید و مقادیر 5 میکرولیتر از عصاره های آبی و الکلی به طور جداگانه روی صفحات سیلیکاژل قطره گذاری شد. در کنار عصاره ها از ماده کارواکروم حل شده در اتانول 96 درجه (10 گرم در 10 میلی لیتر) به عنوان شاهد استفاده گردید. فاز متحرک به کار برده شده در این روش مخلوطی از دو حلال تولوئن و اتیل استات (93/7) بود که پس از اشباع شدن تانک از فاز متحرک، صفحات لکه گذاری شده در درون تانک حلال قرار گرفته و پس از گذشت 30-45 دقیقه در دمای محیط، کروماتوگرام ها از تانک خارج و در یک جریان هوای خنک، خشک گردیدند. به منظور آشکار کردن باندهای مختلف مواد از معرف وانیلین سولفوریک اسید (1 گرم در 100 میلی لیتر اسید 30%) استفاده گردید که پس از اسپری صفحات با معرف مذکور، کروماتوگرام ها به مدت کوتاهی در فور 105 درجه سانتیگراد قرار گرفته و پس از فرایند آشکارسازی باندها مورد مقایسه قرار گرفتند (14).

رقت های مختلف عصاره ها به پارامتر های وزنی تبدیل شد. بر این اساس مقادیر 25، 12/5، 6/25، 3/12، 1/56، 0/780، 0/390 و 0/195 میلی گرم از پودر خشک شده عصاره الکلی و مقادیر 40، 20، 10، 5، 2/5، 1/25، 0/625 و 0/312 میلی گرم از پودر خشک شده عصاره آبی توزین و به چهار سری لوله حاوی 1 میلی لیتر محیط مولر - هینتون براث و 5×10^5 باکتری از سویه های استاندارد و بالینی اضافه گردید. در تعیین MIC و MBC بر اساس وزن خشک عصاره الکلی مقادیر 780 $\mu\text{g/ml}$ از پودر خشک شده عصاره به عنوان MIC و MBC برای هر دو سویه بدست آمد که نتایج مذکور دقیقاً مطابق و مؤید نتایج حاصل از سریال های رقتی بود (جدول 2). میانگین قطر

هاله عدم رشد بر حسب میلی متر در رقت های مختلف عصاره الکلی نشان داد که با افزایش غلظت عصاره در چاهک ها هاله عدم رشد افزایش پیدا میکند و سویه استاندارد نسبت به سویه بالینی به صورت نامحسوس حساس تر میباشد (جدول 4). بین قطر هاله های عدم رشد در طی چهارماه آزمایش اختلاف معنی داری مشاهده نشد که بیانگر پایداری عصاره ها در دمای محیط و یخچال می باشد. جهت حصول اطمینان از نتایج بدست آمده برای عصاره های آبی و الکلی، آزمایشات فوق برای هر سویه سه بار تکرار و داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS تجزیه و تحلیل شد.

جدول شماره 1- نتایج حاصل از آنتی بیوگرام سویه های استاندارد و بالینی با برخی از آنتی بیوتیکهای رایج

آنتی بیوتیک (mg)	پنی سیلین	اگزاسیلین	سیپروفلواکساسین	تتراسیکلین	جنتامایسین	سفتی زوکسیم	آمیکاسین	سولفامتوکسازول - تریمتوپریم
	10	1	5	30	10	30	30	30/75
سویه								
سویه استاندارد	R	R	S	IM	S	IM	S	S
سویه بالینی	R	R	S	IM	S	IM	S	S
R=مقاوم	S=حساس				IM=نیمه حساس			

جدول شماره 2- مقایسه رشد سویه ها در مجاورت با غلظت های (mg/ml) مختلف عصاره الکلی

غلظت (mg/ml)	12/5	6 / 25	3/12	1/56	0/ 780	0/ 390	0/195
سویه							
سویه استاندارد	-	-	-	-	-	+	+
سویه بالینی	-	-	-	-	-	+	+
(-) عدم رشد باکتری	(+) رشد باکتری						

جدول شماره 3- مقایسه رشد سویه ها در مجاورت با غلظت های (mg/ml) مختلف عصاره آبی

غلظت (mg/ml)	40	20	10	5	2/5	1/25	0/625
سویه							
سویه استاندارد	-	-	-	-	-	-	-
سویه بالینی	-	-	-	-	-	-	-
(-) عدم رشد باکتری	(+) رشد باکتری						

جدول شماره 4- میانگین قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی متر در غلظت های مختلف عصاره الکلی

غلظت (mg/ml)	12/5	6 / 25	3 / 12	1/56	0/780	0/390	0/195
سویه							
سویه استاندارد	23	21	19	17	13	11	9
سویه بالینی	22	20	18	16	12	10	8

نتیجه گیری

گیاهان دارویی از دیرباز مورد استفاده قرار می گرفته اند. در دهه اخیر به دلیل بروز مقاومت های دارویی به این منابع به عنوان مخازن طبیعی توجه شده است. بسیاری از گیاهان به صورت خوراکی در جیره غذایی انسان و دام استفاده روزمره دارند و به صورت تجربی ثابت شده است که اثرات سوء ندارند، میزان و نوع متابولیت های موجود در اندام های مختلف گیاه بر حسب شرایط اکولوژیکی متفاوت است. بر این اساس ارزیابی مواد مؤثره گیاهان دارویی بر حسب مناطق جغرافیائی تحت کشت آنها ضروری به نظر می رسد که از جمله آنها گونه های آویشن است که تحت شرایط اقلیمی متفاوت مواد مؤثره آنها تغییر می کند (2).

در سال 2002 مطالعات ان ساینگ و ار کی ساینگ¹ نشان داد که اسانس گیاه آویشن بر روی انترو هموراژیک اشیریشیا کلی اثر بازدارندگی دارد. از بین ترکیبات اسانس بکار رفته تیمول و کارواکرول به عنوان عوامل مؤثر نام برده شده است و این عوامل بر روی باکتری های گرم مثبت و گرم منفی اثر دارند (15). در

تحقیق ما نیز اثر عصاره الکلی حاوی مواد مؤثره آویشن بر روی انترو هموراژیک اشیریشیا کلی به اثبات رسید. آنچه که از بررسی تحقیقات انجام شده در دست است عمدتاً مطالعاتی است که بر روی اسانس آویشن انجام گرفته اند اما در تحقیق حاضر اثرات عصاره الکلی و آبی مورد توجه قرار گرفت و نشان داده شد که مواد مؤثره تیمول و کارواکرول (روش TLC) در ترکیبات اصلی گونه آویشن شیرازی پرورش داده شده در باغ گیاه شناسی جهاد کشاورزی استان تهران نیز وجود دارد و می تواند به عنوان منبع دارویی مورد استفاده قرار گیرد. (شکل 1)

اگرچه کاربرد بالینی عصاره ها و اسانس های گیاهی در شرایط خاص امکان پذیر است اما به نظر می رسد کاربرد بالینی آویشن شیرازی مستلزم مطالعات و تحقیقات بیشتری در زمینه مکانیسم عمل این متابولیت ها بویژه در زمینه باز دارندگی عوامل میکروبی و بروز اشکال مقاوم باکتریایی (نتایج این بخش انتشار نیافته است) مطالعه گسترده تری انجام شود.

References

- 1- جم زاد م. آویشن، انتشارات موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران، 1373، صص: 1 و 5-7
- 2- زرگری ع. گیاهان دارویی، جلد چهارم، انتشارات دانشگاه تهران، 1372، صص: 2-38
- 3- مومنی ت، نوبهار شاهرخی ن. اسانس های گیاهی و اثرات درمانی آنها، انتشارات دانشگاه تهران، 1370، صص: 8-12
4. Hornok L. Effect of environmental factors on the production of some essential oil plants. Horticultural Abstracts. 1997; 3075: 23-27
5. Deans SG, James CP, Ross ZM. Natural antioxidant from thymus vulgaris (thyme) volatile oil. Acta Horticulture. 1992; 322: 171-182
6. Armstrong GL, Hollingworth J, Morris JG. Emerging food born pathogens. Escherichia coli O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of developed world. Epidemiol. Rev. 1996; 18: 29-51
7. Macrae M, Rebate T, Johnston M, Ogden D. The sensitivity of Escherichia O157 to some antimicrobials by conventional and conductance assays. Lett. Appl. Microbiol. 1997; 25: 135-137
8. Marsh J, Macleod AF, Hanson MF, Emmanuel FXS, Frost Thomas AA. Restaurant-associated outbreak of E.coliO157 infection. Public. Health Med. 1992; 14: 78-83
9. Yamamura A, Murai A, Takamatsu H, Watabe K. Antimicrobial effect of chemical preservative on E.coli O157:H7. J. Health sci. 2000; 46: 204-208
- 10- صمصام شریعت ه. عصاره گیری واستخراج مواد مؤثره گیاهان دارویی و روش های شناسایی و ارزشیابی آنها. چاپ اول، انتشارات مانی. 1371، صص: 20-8
- 11- خسروی آ، ملکان م ع. اثر عصاره الکلی و آبی لاواندولاستوکاس بر روی استافیلوکوکوس اورئوس وسایر باکتری های گرم منفی . مجله دانشگاه علوم پزشکی قزوین . 1382، شماره 29، صفحات 3-9
12. Baron E, Finegold S. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 8th ed. Mosby Co. USA. 1990: 171-194
13. Cowan M M. Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews. 1999; 4: 567-582
14. Pothier J. Galand N, Ouali MEI, Viel Cs. Comparison of planar chromatographic method (TLC, OPLC, AMD) applied to essential oils of wild thyme and seven chemotypes of thyme. II Farmaco. 2001; 56: 501-511
15. Singh N, Singh RK. Efficant of inoculation and washing methods on the efficacy of different sanitizers against E.coli O157: H7 on lettce. Food microbiology. 2002; 19: 183-193