بررسی اثر اسانس آویشن شیرازی بر روی تولید انتروتوکسین باکتری استافیلوکوکوس اورئوس

مهنوش پارسایی مهر[۱]، افشین آخوندزاده‌بستی[۲]*، علی میثاقی[۳]، تقی زهرایی‌صالحی[٤]، بهراد رادمهر[٥]، حسن گندمی نصرآبادی[۳]

۱- مربی، گروه دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شوشتر، شوشتر
۲- دانشیار، گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران
۳- استادیار، گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران
٤- استاد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران
٥- استادیار، گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج
*آدرس مکاتبه: تهران، خیابان آزادی، دانشکده دامپزشکی، گروه بهداشت مواد غذایی
صندوق‌پستی: ٦٤٥٣ - ١٤١٥٥، تلفن: ٦٦٩٢٣٥١٠ (٠٢١)، نمابر: ٦٦٩٣٣٢٢٢ (٠٢١)
پست الکترونیک: aakhond@ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۷/۱۱/۹ **تاریخ تصویب:** ۸۸/۲/۲٦

چکیده

مقدمه: مسمومیت استافیلوکوکی در اثر تولید انتروتوکسین توسط استافیلوکوکوس اورئوس در مواد غذایی ایجاد می‌شود. تاکنون گزارشی مبنی بر اثر اسانس آویشن شیرازی بر تولید توکسین توسط این باکتری وجود ندارد.

هدف: در این مطالعه اثر غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی بر روی تولید انتروتوکسین باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در محیط کشت آزمایشگاهی بررسی شد.

روش بررسی: آزمایش به صورت مدل فاکتوریال طراحی شد. در این طرح سه غلظت اسانس آویشن (صفر، ۰/۰۰۵، ۰/۰۱۵ و ۰/۰۳ درصد) استفاده شد. وضعیت رشد باکتری به مدت ٤۳ روز ارزیابی شد و سنجش انتروتوکسین توسط کیت صورت گرفت.

نتایج: اسانس آویشن در غلظت ۰/۰۳ درصد به طور کامل از رشد باکتری جلوگیری نمود. غلظت‌های تحت بازدارنده[1] اسانس آویشن شیرازی، در میزان ۰/۰۰۵ درصد هیچ‌گونه اثر مهاری روی تولید انتروتوکسین استافیلوکوکوس اورئوس نداشت ولی با افزایش غلظت اسانس به ۰/۰۱۵ درصد اثر مهاری معناداری ($p<0/05$) روی تولید انتروتوکسین مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: اسانس آویشن شیرازی می‌تواند در غلظت‌های تحت بازدارنده رشد به عنوان یک نگهدارنده طبیعی مناسب برای ممانعت از تولید انتروتوکسین توسط باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در صنعت غذایی استفاده شود.

گل‌واژگان: آویشن شیرازی، استافیلوکوکوس اورئوس، انتروتوکسین

[1] Subinhibitory

www.SID.ir

مقدمه

استفاده از نگهدارنده‌های شیمیایی یکی از روش‌های رایج در کنترل میکروبی مواد غذایی محسوب می‌شود [۱،۲]. با این وجود امروزه بر کاهش استفاده از این روش‌ها تاکید می‌شود، زیرا از یک سو مصرف‌کنندگان مواد غذایی خواستار غذاهای طبیعی با ماندگاری طولانی، همراه با کمترین تغییر در ساختار آن می‌باشند و از سوی دیگر خاصیت سرطان‌زایی و سمی بودن برخی از نگهدارنده‌های شیمیایی نیز برای انسان به اثبات رسیده است. از این رو فشار بر روی صنایع غذایی برای جایگزینی سریع نگهدارنده‌های شیمیایی و استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی یکی از رویکردهای جدید در جهت ارتقای سلامت میکروبی غذاها و به دنبال آن افزایش سطح سلامت عمومی جوامع می‌باشد [۲]. اسانس‌های گیاهی و اجزای تشکیل‌دهنده آن‌ها یکی از این نگه‌دارنده‌های طبیعی می‌باشند که اثرات ضدمیکربی آن‌ها سال‌ها است که کاملاً شناخته شده است. آویشن شیرازی یکی از این گیاهان شناخته شده می‌باشد که به عنوان یک گیاه ضدمیکرب و ضدکرم در طب سنتی از آن یادشده و به عنوان یک طعم‌دهنده طبیعی نیز مورداستفاده قرار می‌گیرد. کارهای متعددی در مورد خواص ضدباکتریایی اسانس آویشن شیرازی بر روی برخی از باکتری‌های پاتوژن از جمله استافیلوکوکوس ارئوس صورت گرفته است اما مطالعات موردنظر فقط از نظر رشد باکتری بوده و در مورد تاثیر اسانس بر روی سم‌زایی (تولید توکسین که عامل اصلی در مسمومیت غذایی حاصل از این باکتری می‌باشد) تاکنون مطالعه‌ای انجام نشده است. با توجه به نقش توکسین استافیلوکوکوس اورئوس در مسمومیت‌زایی این باکتری، در این مطالعه سعی بر آن شده تا برای اولین بار اثر اسانس آویشن شیرازی بر روی تولید توکسین این باکتری مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

تهیه اسانس آویشن شیرازی

گیاه آویشن شیرازی از استان فارس در فصل تابستان جمع‌آوری شد و نام علمی آن توسط پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی تایید شد. اسانس آویشن شیرازی از سرشاخه‌های هوایی گیاه به روش تقطیر با بخار داغ تهیه و توسط دستگاه گاز کروماتوگراف متصل به طیف نگار جرمی (GC/MS) آنالیز شد.

باکتری موردمطالعه

باکتری لیوفلیزه استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 6538 اهدایی از گروه میکروب‌شناسی دانشکده دامپزشکی تهران تهیه شد.

طراحی آزمایش

جهت ارزیابی اثر غلظت‌های اسانس آویشن شیرازی بر روی تولید انتروتوکسین باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در محیط آبگوشت قلب و مغز، آزمایش به صورت مدل فاکتوریال طراحی شد. در این طرح سه میزان اسانس آویشن (صفر، ۰/۰۰۵، ۰/۰۱۵ و ۰/۰۳ درصد) استفاده شد. وضعیت رشد باکتری به مدت ۴۳ روز ارزیابی شد.

فعال‌سازی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس

به منظور فعال‌سازی باکتری از این کشت لیوفلیزه در محیط آبگوشت قلب و مغز در ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ – ۱۶ ساعت[1] و حداقل برای دو بار متوالی کشت داده شد. سپس بررسی تعداد باکتری در هر میلی‌لیتر از کشت دوم و تکرار کشت و شمارش مجدد حداقل برای سه بار متوالی صورت گرفت و در نهایت نیز تعداد باکتری در هر میلی‌لیتر مشخص شد. همچنین کشت آخر جهت استفاده در تحقیقات بعدی به صورت ۱ به ۵ با گلیسرین ۵۰ درصد استریل مخلوط و در حجم‌های ۱ میلی‌لیتری در میکروتیوپ‌های اپندرف در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و هر بار جهت انجام آزمایش، این کشت نگهداری شده در ۲۰- درجه سانتی‌گراد استفاده شد.

[1] Over night

Archive of SID
www.SID.ir

تهیه میزان دوز تلقیح باکتریایی

جهت تهیه میزان دوز تلقیح باکتریایی، کشت نگهداری شده در ۲۰- درجه سانتی‌گراد جهت خروج از حالت انجماد به مدت ۱۵ دقیقه در زیر هود میکروبیولوژی قرار داده شد. سپس به محیط آبگوشت قلب و مغز منتقل و در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ – ۱٦ ساعت نگهداری شد، در ادامه نیز کشت از آبگوشت قلب و مغز ۱۸ – ۱٦ ساعته اول بر روی آبگوشت قلب و مغز دوم به مدت ۱۸ – ۱٦ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت، سپس لوله‌های استریل مخصوصی به نام کووت تهیه شده و به آن‌ها ۵ میلی‌لیتر از محیط آبگوشت قلب و مغز استریل اضافه شد، در ادامه نیز مقادیر مختلفی از کشت ۱۸ – ۱٦ ساعته دوم در لوله‌های کووت حاوی ۵ میلی‌لیتر آبگوشت قلب و مغز استریل برده شد و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ٦۰۰ نانومتر میزان طول موجشان خوانده شد. سپس از این لوله‌های کووت جهت شمارش تعداد باکتری استفاده شد و در نهایت نیز لوله کووتی که دارای ۱×۱۰^{۷} باکتری در هر میلی‌لیتر بود، مشخص شد، در ادامه نیز این لوله کووت حاوی ۱×۱۰^{۷} باکتری در هر میلی‌لیتر جهت تهیه میزان دوز تلقیح مورد استفاده در تحقیق قرار گرفت.

آماده‌سازی سوبسترای

ابتدا مقدار ۹ میلی‌لیتر از محیط آبگوشت BHI در ۱۲ لوله درپیچ‌دار ریخته و در ادامه به هریک از این لوله‌ها محلول ۵ درصد (۰/۵ ml به هر لوله) دی متیل سولفوکساید به عنوان یک ترکیب آمولسیون کننده اضافه کردیم، زیرا اسانس آویشن روغنی است و جهت جلوگیری از جدا شدن فاز روغنی و یکنواخت‌سازی غلظت آن در محیط آبگوشت BHI از این ماده استفاده کردیم همچنین جهت طولانی‌تر شدن ماندگاری این اثر، آگارآگار را با غلظت ۵ درصد (۰/۰۰۵ ml به هر لوله) به محیط آبگوشت BHI اضافه کردیم سپس این لوله‌های درپیچ‌دار حاوی محیط آبگوشت BHI دی‌متیل سولفوکساید و آگار آگار را اتوکلاو کردیم.

تلقیح اسانس

اسانس آویشن شیرازی را با غلظت‌های صفر، ۰/۰۰۵، ۰/۰۱۵ و ۰/۰۳ درصد به لوله‌های درپیچ‌دار اضافه کردیم، سپس در هشت سطح تلقیح $۱۰^{-۲}$ – $۱۰^{-۵}$ cfu/ ml باکتری استافیلوکوکوس اورئوس را نیز به این لوله‌ها تلقیح کردیم. در پایان چهار غلظت متفاوت از اسانس آویشن شیرازی به همراه هشت دوز تلقیحی از باکتری استافیلوکوکوس اورئوس داریم که مجموعاً سی و دو حالت را تشکیل می‌دهند. جهت مشاهده بهتر رشد باکتری و تعیین کدورت، هر یک از سی و دو لوله را در سه قسمت مساوی به داخل سه لوله و نوجکت ریختیم و در پایان این ۹٦ لوله و نوجکت را در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد جهت بررسی باکتری و رسیدن دوز آن به $۱۰^{۷}$ cuf/ml و ایجاد کدورت، ٤۳ روز در انکوباتور قرار دادیم. در طی این مدت ۱۸ مرتبه (طی روزهای ۱، ۲، ۳، ٤، ۵، ٦، ۷، ۸، ۱۳، ۱٦، ۱۹، ۲۲، ۲۵، ۲۸، ۳۱، ۳٤، ۳۷ و ٤۳ روز) جهت ارزیابی کدورت مورد مشاهده قرار می‌گرفتند. در نهایت نیز به بررسی انتروتوکسین در لوله‌های دچار کدورت، با استفاده از کیت الایزای ریدا اسکرین پرداختیم.

سنجش انتروتوکسین

جهت بررسی توانایی استافیلوکوکوس اورئوس در تولید انتروتوکسین در محیط آبگوشت قلب و مغز در حضور اسانس آویشن شیرازی، از کیت RIDASCREEN SET A,B,C,D,E که یک تست ساندویچ آنزیمی ایمنواسی برای تشخیص انتروتوکسین‌های E, D, C, B, A در غذاهای مایع و جامد و همچنین عصاره‌ی محیط‌های کشت است، استفاده شد. این کیت قادر است با توجه به نوع عصاره‌ای که آزمایش می‌شود میزان ۰/۷ – ۰/۲ نانوگرم از سم را در هر میلی‌لیتر نمونه ردیابی کند. اساس تست بر مبنای واکنش آنتی‌ژن- آنتی‌بادی است. نمونه‌هایی که جذب نوری آن‌ها در طول موج ٤۵۰ mm، کمتر از میزان Cut-off value باشند، منفی و آنهایی که برابر یا بیشتر از Cut-off value باشند، مثبت تلقی می‌شوند. داده‌های مربوط به نتایج آزمون‌های مربوطه با استفاده از نرم‌افزار SPSS 15.0 به کمک آزمون مربع کای[1]

[1] Chi-Square

Archive of SID
www.SID.ir

مورد تجزیه و تحلیل توصیفی قرار گرفت. کلیه لوله‌هایی که کدورت رشدی را در یکی از روزهای مورد مطالعه (طی روزهای ۱، ۲، ۳، ٤، ٥، ٦، ۷، ۸، ۱۳، ۱٦، ۱۹، ۲۲، ۲٥، ۲۸، ۳۱، ۳٤، ۳۷ و ٤۳) نشان داده بودند، در همان روز و بعد از نگهداری در یخچال در روز ٤۳ مطالعه مورد بررسی توکسین قرار گرفتند.

نتایج

در این مطالعه اسانس آویشن در غلظت ۰/۰۳ درصد به طور کامل در تمامی دوزهای تلقیحی از رشد باکتری و ایجاد کدورت جلوگیری کرد. همان‌گونه که در جدول نشان داده شده است باکتری مورد مطالعه فقط قادر به تولید انتروتوکسین C بود. تنها سه مقدار تلقیح اول ($۱۰^{۳}$،$۱۰^{٤}$،$۱۰^{٥}$) از هشت دوز تلقیح که قادر به ایجاد کدورت رشدی در طی مطالعه بودند از نظر بررسی انتروتوکسین مورد ارزیابی قرار گرفتند. اسانس آویشن شیرازی در میزان ۰/۰۰٥ درصد هیچ‌گونه اثر مهاری روی تولید انتروتوکسین C استافیلوکوکوس اورئوس نداشت. با افزایش غلظت Subinhibitory به ۰/۰۱٥ درصد اثر مهاری معناداری ($p<۰/۰٥$) روی تولید انتروتوکسین C مشاهده شد. نتایج دو بار بررسی انتروتوکسین، یکسان بود.

جدول شماره ۱- نتایج تولید توکسین باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 6538 در محیط آبگوشت قلب و مغز تأثیر گرفته از غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی

استافیلوکوکوس اورئوس (cfu/ml)	اسانس آویشن شیرازی (درصد)	تولید انتروتوکسین
$۱۰^{۳}$	صفر	$(c)^{+}$
$۱۰^{۳}$	۰/۰۰٥	+
$۱۰^{۳}$	۰/۰۱٥	–
$۱۰^{٤}$	صفر	$(c)^{+}$
$۱۰^{٤}$	۰/۰۰٥	+
$۱۰^{٤}$	۰/۰۱٥	–
$۱۰^{٥}$	صفر	$(c)^{+}$
$۱۰^{٥}$	۰/۰۰٥	+
$۱۰^{٥}$	۰/۰۱٥	-

بحث

در کارهای قبلی ما، تاثیر معنادار اسانس آویشن شیرازی روی رشد استافیلوکوکوس اورئوس در محیط آبگوشت BHI [۳] و در سیستم مدل غذایی [۷] مشاهده شد. مسمومیت استافیلوکوکی (گاستروانتریت) ناشی ازتوکسین‌های باکتری استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد که ازقبل در غذا تولید شده‌اند [٦]. یافته‌های مشابهی توسط پالمر وهمکاران (۲۰۰۳) نشان داد که غلظت‌های subinhibitory اسانس‌های بو، میخک و دارچین تولید انتروتوکسین A باکتری استافیلوکوکوس اورئوس را کاهش می‌دهد [٦].

نونز و همکاران در سال ۲۰۰۷ در یک مطالعه که در مورد اثر سه اسانس گیاهی آویشن کوهی، میخک و دارچین بر روی رشد و توکسین‌زایی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در محیط آبگوشت BHL انجام دادند، دریافتند که از میان سه اسانس گیاهی ذکر شده اسانس آویشن کوهی تأثیر چشمگیرتری در ممانعت از رشد و توکسین‌زایی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس داشت [٤].

Archive of SID
www.SID.ir

نویک[1] و همکاران نیز در یک پژوهش دریافتند که عصاره زیتون می‌تواند مانع از رشد و توکسین‌زایی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس شود [۵].

ممانعت از فعالیت توکسین‌ها به وسیله اسانس‌های گیاهی می‌تواند به طور غیرمستقیم در نتیجه اختلال در یک سری از فاکتورها از قبیل رونوشت برادری و ترجمه و یا با غیرفعال شدن مستقیم توکسین‌ها صورت پذیرد. با این وجود اسانس‌های گیاهی به علت دارا بودن ترکیبی از استرهای آلدئیدی، کتونی و ترپن‌ها به چندین روش می‌توانند موجب قطع تولید توکسین گردند. این خاصیت طبیعی چندگانه اسانس‌های گیاهی یک برتری نسبت به بسیاری از مواد ضدمیکروبی رایج که تنها بر روی یک مکان هدف تاثیر می‌گذارند، می‌باشد. از طرف دیگر طبیعی بودن اسانس‌های گیاهی باعث شده که مصرف‌کنندگان آنها را به مواد ضدمیکروبی شیمیایی و سنتتیک ترجیح دهند [٦]. این مطالعه نشان داد که اسانس آویشن شیرازی در غلظت ۰/۰۱۵ درصد به طور کامل در تمامی دوزهای تلقیحی از تولید توکسین باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 6538 جلوگیری کرد که این مسأله تحقیقات بیشتری را در آینده در اثر اسانس در جلوگیری از تولید توکسین در مدل‌های غذایی و در مورد نحوه عملکرد اسانس آویشن شیرازی در جلوگیری از تولید توکسین می‌طلبد.

[1] Nychas

نتیجه‌گیری

اسانس آویشن شیرازی که دارای خاصیت ضدباکتریایی می‌باشد و می‌تواند در غلظت‌های پایین‌تر از ممانعت‌کنندگی از رشد به عنوان یک نگهدارنده طبیعی مناسب برای ممانعت از تولید انتروتوکسین توسط باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در صنعت غذایی استفاده شود.

منابع

1. Najafpour Navaei M. Medicinal and aromatic plants researches. Forest and Pastures Research Institute Publications. 1379, pp: 88 -102.

2. Youzbashi M. Study of *Myrtus communis* essential oil. Pharm. D. Thesis. Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Science. 1380.

3. Basti A A, Misaghi A and Khaschabi D. Growth response and modelling of the effects of *Zataria multiflora* Boiss. Essential oil, pH and temperature on *Salmonella* Typhimurium and *Staphylococcus aureus*. *LWT- Food Sci. Technol.* 2007; 40: 973 - 81.

4. Nunez L, Moro AD and Aquino M. Staphylococcal enterotoxins and enzymes in presence of essential oils. *Ars oharmaceutica* 2007; 48: 175 - 85.

5. Nychas GJE, Tassou SC and Board RG. Phenolic extract from olives, inhibition of Staphylococcus aureus. *Lett Appl Microbiol*. 1990; 42: 217 - 20.

6. Smith-Palmer A, Stewart J, and Fyfe L. Influence of subinhibitory concentrations of plant essential oils on the production of enterotoxins A and B and-toxin by Staphylococcus aureus. *J. Med. Microbiol*. 2003; 53: 1023 - 7.

7. Moosavy M-H, Basti A A, Misaghi A, Salehi T Z, Abbasifar A, Mousavi H A E, Alipour M, Razavi N E, Gandomi H, Noori N. Effect of *Zataria multiflora* Boiss. Essential oil and nisin on *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in a food model system and on the bacterial cell memberanes. *Food Res. International* 2008; 41: 1050 - 7.

Archive of SID

www.SID.ir