بررسی اثر اسانس آویشن شیرازی بر رشد و تولید انتروتوکسین E باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 29213

مریم عزیزخانی[1]، علی میثاقی[2]*، افشین آخوندزاده بستی[3]، حسن گندمی نصرآبادی[4]، هدایت حسینی[5]

۱- دانشجوی دکترای تخصصی بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران
۲- دانشیار، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران
۳- استاد، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران
٤- استادیار، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران
۵- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه و صنایع غذایی کشور، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران
*آدرس مکاتبه: تهران، خیابان آزادی، خیابان دکتر قریب، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، کدپستی: ٦٣١١١ - ١٤١٩٩، تلفن: ٦٦٩٢٣٥١٠ (٠٢١)، نمابر: ٦٦٩٣٣٢٢٢ (٠٢١)
پست الکترونیک: a_misaghi@hotmail.com

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۰/۲۸ **تاریخ تصویب:** ۹۱/٤/۱٤

چکیده

مقدمه: گیاه آویشن شیرازی از گیاهان دارویی در طب سنتی ایرانی بوده و بررسی اثرات ضدمیکروبی آن در زمینه مواد غذایی بر باکتری‌های بیماری‌زای مهم و عامل مسمومیت غذایی مانند استافیلوکوکوس اورئوس ضروری به نظر می‌رسد.

هدف: هدف این مطالعه، بررسی اثر اسانس آویشن شیرازی بر رشد و تولید انتروتوکسین E استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 29213 می‌باشد.

روش بررسی: حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) و حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC) اسانس آویشن شیرازی برای استافیلوکوکوس اورئوس، تأثیر غلظت‌های تحت بازدارنده اسانس بر رشد و تکثیر باکتری طی ۷۲ ساعت کشت و تولید انتروتوکسین E در مجاورت غلظت‌های تحت بازدارنده در دو دمای ۲۵ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد تعیین شد.

نتایج: MIC و MBC اسانس آویشن شیرازی به ترتیب ۰/۰۳ و ۰/۰٤ درصد به دست آمد. نتایج کشت در ۲۵ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد نشان می‌دهد که غلظت MIC ۷۵ درصد در ۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۳۵ درجه سانتی‌گراد در ۷۲ ساعت رشد باکتری را، نسبت به گروه کنترل، ۳ لوگ کاهش داده است. مجاورت باکتری با اسانس در هر دو دما باعث کاهش تولید انتروتوکسین E شده و افزایش غلظت اسانس به ۰/۰۱۵ درصد و ۰/۰۲۲ درصد اثر بازدارندگی معنی‌داری بر تولید انتروتوکسین E گذارد.

نتیجه‌گیری: می‌توان از این اسانس در غلظت بازدارنده رشد جهت جلوگیری از رشد استافیلوکوکوس اورئوس و در غلظت‌های تحت بازدارنده جهت جلوگیری از تولید انتروتوکسین و یا کاهش تولید آن در صنایع غذایی استفاده نمود.

گل‌واژگان: آویشن شیرازی، استافیلوکوکوس اورئوس، انتروتوکسین

www.SID.ir

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس یک ارگانیسم بیماری‌زا با قابلیت ایجاد طیف وسیعی از عفونت‌ها، خفیف تا شدید و حتی عامل مرگ و میر در افراد می‌باشد [۱]. عفونت‌های ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس را می‌توان به سه گروه تقسیم نمود: [۱]: آسیب‌های سطحی مانند عفونت زخم، [۲]: توکسینوزها مانند مسمومیت غذایی و سندرم شوک توکسیک که به واسطه مصرف مواد غذایی یا نوشیدنی حاوی مقدار کافی از یک یا انواع بیشتری توکسین (انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی و توکسین سندرم شوک توکسیک) تولید شده توسط سویه‌های انتروتوکسیژنیک استافیلوکوکوس اورئوس رخ می‌دهد [۸-۲] و [۳]: عفونت‌های سیستمیک و عامل مرگ مانند اندوکاردیت، استئومیلیت، پنومونی، آبسه مغزی، منتژیت و باکتریمی [۹].

معمولاً وجود تا 10^3 cfu/g سلول استافیلوکوکوس اورئوس در ماده غذایی خطرساز محسوب نمی‌شود اما زمانی که تعداد سلول‌ها به 10^6 cfu/g - 10^5 برسد، انتروتوکسین تولید شده توسط آنها موجب بروز مسمومیت می‌شود. میزانی از انتروتوکسین استافیلوکوکی که باعث مسمومیت‌زایی در انسان می‌شود برحسب حساسیت افراد و نوع توکسین متغیر بوده و بین ۱ ng/g تا ۰/۱ µg/g می‌باشد [۲،۱۰].

استفاده از افزودنی‌های طبیعی به عنوان ترکیبات ضدباکتریایی، راه حلی مناسب جهت کنترل باکتری‌های بیماری‌زا و افزایش مدت ماندگاری مواد غذایی فرآوری شده می‌باشد که باعث کاهش خطرات بهداشتی و ضررهای اقتصادی ناشی از رشد میکروارگانیسم‌های با منشاء غذایی می‌شود [۱۱]. *Zataria multiflora* Boiss. گیاهی متعلق به خانواده نعناع (*Laminaceae*) است که از نظر جغرافیایی تنها در ایران، افغانستان و پاکستان می‌روید. این گیاه تحت عنوان آویشن شیرازی (در ایران) به عنوان طعم‌دهنده در بسیاری از مواد غذایی در ایران به کار رفته و واجد تأثیرات ضدعفونی‌کنندگی، آنتی‌میکربی و آنتی‌اکسیدانی می‌باشد [۱۱].

ترکیبات عمده موجود در اسانس گیاه ایرانی کارواکرول، لینالول و پاراسمین می‌باشد [۱۲].

در این مطالعه، حداقل غلظت بازدارنده رشد (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) و حداقل غلظت باکتری‌کشی (Minimum Bacteriocidal Concentration :MBC) اسانس آویشن شیرازی برای استافیلوکوکوس اورئوس، تأثیر غلظت‌های تحت بازدارنده (subMIC) اسانس بر تکثیر باکتری طی ۰، ۱۸، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت کشت و تولید انتروتوکسین E توسط استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 29213 در مجاورت غلظت‌های تحت بازدارنده در دو دمای ۲۵ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه اسانس و آنالیز آن

گیاه آویشن شیرازی در فصل تابستان از استان فارس جمع‌آوری شد و نام علمی آن توسط گروه گیاه‌شناسی پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی تأیید شد (*Z. multiflora* Boiss.). اسانس از سرشاخه‌های هوایی خشک شده گیاه به روش تقطیر با آب (Hydro Distillation) با سیستم Clevenger (به مدت ۲ ساعت) استخراج شد. پس از تهیه اسانس، آنالیز ترکیبات شیمیایی آن توسط دستگاه گاز کروماتوگراف متصل به طیف نگار جرمی (GC/MS) انجام شد. دستگاه GC/MS از نوع Thermoquest Trace GC 2000 FINNIGAN (انگلستان) بوده و ویژگی‌های آن عبارت بود از: ستون موئینه DB5 به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۲۵۰ میکرومتر و ضخامت لایه داخلی ۰/۲۵ میکرومتر، با برنامه دمایی ۵۰ تا ۲۶۵ درجه سانتی‌گراد و همراه با افزایش تدریجی ۲/۵ درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه و نگهداری ستون در ۲۶۵ درجه سانتی‌گراد به

Archive of SID
www.SID.ir

مدت ۳۰ دقیقه. دمای اتاقک تزریق ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد و سرعت جریان گاز هلیم ml/min ۱/۵ بود. همچنین، طیف سنجی جرمی به روش یونیزاسیون الکترونی (EI) با انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت و دمای منبع یونیزاسیون ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

سویه باکتریایی

باکتری مورد بررسی، استافیلوکوکوس اورئوس تحت گونه اورئوس ATCC 29213 بود که از انیستیتو تحقیقات پاستور ایران، تهران، تهیه شد و واجد توانایی ترشح انتروتوکسین‌های A، C و E بود.

فعال‌سازی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس

باکتری لیوفیلیزه در محیط آبگوشت TSB در ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ – ۱۶ ساعت (overnight) و حداقل برای دو بار متوالی کشت داده شد. ^{5}۱۰× ۱ باکتری در هر میلی‌لیتر (معادل جذب نوری ۰/۱ در طول موج ۶۰۰ نانومتر) جهت تلقیح باکتریایی مورد استفاده قرار گرفت.

تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC)

MIC به کمترین غلظت از یک ترکیب که رشد میکروارگانیسم را مهار می‌نماید، اطلاق می‌شود. به عبارت دیگر، به کمترین مقدار از یک ترکیب طلاق می‌شود که می‌تواند به طور قابل توجهی رشد یک ارگانیسم را پس از گذشت یک دوره انکوباسیون مشخص (۱۶ تا ۲۰ ساعت بسته به گونه باکتری) مهار نماید. تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد اسانس آویشن شیرازی برای استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 29213) به روش میکروول دایلوشن در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه با استفاده از غلظت‌های ۰/۰۰۰۵، ۰/۰۱، ۰/۰۱۵، ۰/۰۲، ۰/۰۳، ۰/۰۴، ۰/۰۵ و ۰/۰۶ درصد (حجمی / حجمی) و گرمخانه‌گذاری در ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انجام گرفت. برای هر غلظت سه تکرار در نظر گرفته شد [۱۳].

تعیین حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC)

MBC به کمترین غلظت از آنتی‌بیوتیک اطلاق می‌شود که می‌تواند پس از گذشت ۲۴ ساعت جمعیت باکتریایی را به میزان ۹۹/۹ درصد کاهش دهد به عبارت دیگر، جمعیت اولیه را هزار بار کاهش دهد. برای مشخص نمودن حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC) از رقت‌هایی که کدورتی در آنها مشاهده نشد، در محیط TSA کشت سطحی داده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. غلظتی که شمارش تعداد کلونی‌ها در آن صفر بود، به عنوان حداقل غلظت باکتری کشی تعیین شد [۱۴].

ارزیابی رشد و تکثیر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در مجاورت با اسانس آویشن شیرازی

باکتری استافیلوکوکوس اورئوس با دوز ^{5}۱۰×۱ cfu/ml به محیط آبگوشت TSB حاوی غلظت‌های تحت MIC اسانس تلقیح شده و در ۲۵ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری شد و در زمان‌های صفر، ۱۸، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از گرمخانه‌گذاری با استفاده از محیط اختصاصی استافیلوکوکوس اورئوس (BPA) تعداد استافیلوکوکوس اورئوس شمارش شد. محیط حاوی استافیلوکوکوس اورئوس بدون اسانس نیز به عنوان کنترل گرمخانه‌گذاری شد.

بررسی تولید انتروتوکسین

در این مطالعه تولید انتروتوکسین E توسط استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 29213 در مجاورت غلظت‌های MIC و تحت MIC اسانس در ۲۵ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد ۲۴ ساعت پس از کشت مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین‌ترتیب که باکتری استافیلوکوکوس اورئوس با دوز ^{5}۱۰×۱ cfu/ml به محیط آبگوشت TSB حاوی غلظت‌های MIC و تحت MIC اسانس تلقیح شده و در ۲۵ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. جهت بررسی تولید انتروتوکسین، از کیت کیفی RIDASCREEN SET، که یک تست ساندویچ آنزیمی ایمنواسی برای

Archive of SID
www.SID.ir

انتروتوکسین‌های A, B, C, D, E استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد، استفاده شد. قدرت تشخیص این کیت ۰/۷ - ۰/۲ نانوگرم انتروتوکسین در هر میلی‌لیتر سوسپانسیون نمونه است. اساس عمل این کیت بر مبنای واکنش آنتی‌ژن - آنتی‌بادی است. وجود انتروتوکسین در نمونه‌هایی که جذب نوری آنها در طول موج ٤٥٠ نانومتر پایین‌تر از میزان Cut-off value باشد، منفی و در صورتی که برابر یا بالاتر از Cut-off value باشد، مثبت در نظر گرفته می‌شود. مراحل این آزمون مطابق با دستورالعمل ارائه شده توسط سازنده کیت انجام شد.

آنالیز آماری

داده‌های تجربی با استفاده از نرم‌افزار SPSS 12.0 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شد. اختلاف میان داده‌ها با استفاده از آزمون independent Student t-test تعیین و $p<۰/۰۵$ از لحاظ آماری قابل ملاحظه تلقی شد.

نتایج

بازده اسانس بخش‌های هوایی خشک شده گیاه آویشن شیرازی معادل ۱/٦٦درصد (حجمی/وزنی) بود. درصد ترکیبات اسانس (که توسط GC و GC/MS تعیین شد) در جدول شماره ۱ خلاصه شده است. مطابق نتایج حاضر، ترکیب اصلی اسانس کارواکرول (۷۱/۱۲ درصد) است.

نتایج تست MIC و MBC اسانس آویشن شیرازی که در دامنه ۰/۰۰۵ تا ۰/۰٦ درصد در ۳۵ درجه سانتی‌گراد مورد ارزیابی قرار گرفت برای استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 29213 به ترتیب ۰/۰۳ و ۰/۰٤ درصد به دست آمد (جدول شماره‌های ۲ و ۳).

جدول شماره ۱- اجزای تشکیل‌دهنده اسانس آویشن شیرازی که به روش GC/MS تشخیص داده شده است

ترکیب	مقدار (درصد)	شاخص بازداری بر روی ستون
تیوژن	۰/۱۹	۹۳۰
آلفا - پینن	٤/۲٦	۹۳۷
بتا - پینن	۰/٤۳	۹۷٦
بتا - میرسین	۰/۸٥	۹۸٥
اکالیپتول	۳/۳۷	۱۰۲٤
گاما - ترپینن	۷/۳٤	۱۰٥٥
لینالول	۰/٦۳	۱۰۹۰
تیمول متیل اتر	۰/٤۷	۱۲۳٦
کارواکرول متیل اتر	۰/٤٦	۱۲٤۳
کارواکرول	۷۱/۱۲	۱۲۹۹
ترانس - کاریوفیلین	۰/٤۱	۱٤۱۸
گلوبولول	۲/۳۲	۱٥۸۲
مجموع	۹۱/۹۰	-

Archive of SID
www.SID.ir

جدول شماره ۲- نتایج شمارش استافیلوکوکوس اورئوس در مجاورت غلظت‌های subMIC (تحت بازدارنده) اسانس آویشن شیرازی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد

غلظت اسانس بر اساس درصدی از *MIC	تعداد باکتری استافیلوکوکوس ارئوس بر حسب log (cfu/ml)				
	ساعت صفر	ساعت ۱۸	ساعت ۲٤	ساعت ٤۸	ساعت ۷۲
کنترل (فاقد اسانس)	۵/۲ ± ۰/۰۲	٦/۹٤ ± ۰/۰۰٤	۷/۸۵ ± ۰/۰۳	۹/۷۸ ± ۰/۰۱۲	۱۰/۱۹ ± ۰/۰٤۱
۲۵MIC درصد	۵/۱٦ ± ۰/۰۰۳	٦/۱۲ ± ۰/۰۱	۷/٤ ± ۰/۰۵۳	۷/۷۷ ± ۰/۰۱	۹/٤۳ ± ۰/۰۵
۵۰MIC درصد	۵/۲۳ ± ۰/۰۰۱	٦/۰۹ ± ۰/۰۰۸	۷/۰۹ ± ۰/۰٤	۷/۵ ± ۰/۰۰۲	۸/۵٤ ± ۰/۰۱٦
۷۵MIC درصد	۵/۰۱ ± ۰/۰۰۷	۵/۸۸ ± ۰/۰۰۹	٦/۵۱ ± ۰/۰۱۳	۷ ± ۰/۰۲۱	۷/۲۸ ± ۰/۰۳٦

* حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) اسانس آویشن شیرازی در این مطالعه برای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 29213 معادل ۰/۰۳ درصد به دست آمده است.

جدول شماره ۳- نتایج شمارش استافیلوکوکوس اورئوس در مجاورت غلظت‌های subMIC (تحت بازدارنده) اسانس آویشن شیرازی در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد

غلظت اسانس بر اساس درصدی از *MIC	تعداد باکتری استافیلوکوکوس ارئوس بر حسب log (cfu/ml)				
	ساعت صفر	ساعت ۱۸	ساعت ۲٤	ساعت ٤۸	ساعت ۷۲
کنترل (فاقد اسانس)	۵/۱۸ ± ۰/۰۲۳	۸/۲۱ ± ۰/۰۰۱	۸/۸۵ ± ۰/۰۱۷	۹/۸٤ ± ۰/۰۰۳	۱۰/٤۷ ± ۰/۰۱۲
۲۵MIC درصد	۵/۳۹ ± ۰/۰۱۱	٦/۹٤ ± ۰/۰۰۳	۸/۰٤ ± ۰/۰۱۵	۹/۰٦ ± ۰/۰۰٤	۹/۹٤ ± ۰/۰۰۱
۵۰MIC درصد	۵/۸۵ ± ۰/۰۰۲	٦/۳۳ ± ۰/۰۱٤	۷/۷۰ ± ۰/۰۲۳	۸/٦۰ ± ۰/۰۰۵	۸/۹۰ ± ۰/۰۱٦
۷۵MIC درصد	۵/٤٤ ± ۰/۰۵	٦/۲۱ ± ۰/۰٤٦	٦/٦۹ ± ۰/۰۱	۷/٤۹ ± ۰/۰۲۵	۷/۹۰ ± ۰/۰۵۷

* حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) اسانس آویشن شیرازی در این مطالعه برای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 29213 معادل ۰/۰۳ درصد به دست آمده است.

نتایج شمارش کشت‌های گرمخانه‌گذاری شده در ۲۵ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد طی ۷۲ ساعت (جدول شماره‌های ۲ و ۳) نشان می‌دهد که غلظت MIC ۷۵ درصد در ۲۵ درجه سانتی‌گراد در ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت پس از کشت به ترتیب ۱، ۲ و ۳ لوگ و در ۳۵ درجه سانتی‌گراد به ترتیب ۲، ۲ و ۳ لوگ رشد استافیلوکوکوس اورئوس را نسبت به گروه کنترل کاهش داده است و این میزان کاهش از نظر آماری معنی‌دار است ($p<0/05$).

نتایج تولید انتروتوکسین E توسط استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 29213 در محیط TSB در مجاورت غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی در جدول شماره ٤ آورده شده است. نتایج نشان می‌دهد که مجاورت باکتری با اسانس در هر دو دما باعث کاهش تولید انتروتوکسین E شده و با افزایش غلظت اسانس میزان تولید انتروتوکسین کاهش می‌یابد. اسانس آویشن شیرازی در غلظت ۰/۰۰۷۵ درصد هیچ‌گونه اثر بازدارندگی بر تولید انتروتوکسین E استافیلوکوکوس اورئوس نداشت. افزایش غلظت اسانس به ۰/۰۱۵ درصد و ۰/۰۲۲ درصد اثر بازدارندگی معنی‌داری بر تولید انتروتوکسین E گذارد ($p<0/05$).

بحث

اسانس‌های گیاهی از مدت‌ها قبل به عنوان ترکیبات طعم‌دهنده در مواد غذایی و نوشیدنی مورد استفاده بوده و امروزه به علت دارا بودن ترکیبات ضدمیکروبی مختلف به عنوان نگهدارنده‌های طبیعی مورد توجه قرار گرفته‌اند [۱۰،۱۵]. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که اثر اسانس آویشن شیرازی بر رشد و تکثیر باکتری مورد مطالعه از الگوی وابسته به دوز پیروی می‌نماید. با ملاحظه جدول شماره‌های ۲، ۳ و ٤ چنین نتیجه گرفته می‌شود که کاهش درجه حرارت تا

Archive of SID
www.SID.ir

جدول شماره ٤- نتایج تولید انتروتوکسین E توسط استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 29213 در مجاورت غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی

غلظت اسانس	تولید انتروتوکسین E	
	۲۵ درجه سانتی‌گراد	۳۵ درجه سانتی‌گراد
کنترل (فاقد اسانس)	+	+
۲۵MIC درصد	+	+
۵۰MIC درصد	-	-
۷۵MIC درصد	-	-
MIC	-	-

* حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) اسانس آویشن شیرازی در این مطالعه برای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 29213 معادل ۰/۰۳ درصد به دست آمده است

حدودی باعث افزایش اثر مهارکنندگی اسانس بر رشد و تولید انتروتوکسین توسط باکتری می‌شود. نظر به ارتقای آگاهی و نیز نگرانی مصرف‌کنندگان در مورد استفاده از ترکیبات نگهدارنده و افزودنی‌های مصنوعی، در سال‌های اخیر گرایش به استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی در حال افزایش است، لذا تحقیقات متعددی در رابطه با بررسی تأثیر اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی مختلف بر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای مهم با منشای غذایی انجام گرفته است [١٦].

در تحقیقات ساری و همکاران (١٣٨٩)، نتایج نشان داد که اثر مهارکنندگی اسانس بر باکتری با کاهش درجه حرارت گرمخانه‌گذاری بیشتر می‌شود که با نتایج این مطالعه مطابقت دارد. همچنین، بررسی‌های ارگانولپتیک بر روی غلظت‌های مورد استفاده از اسانس نشان داد که به کارگیری این غلظت‌ها تا میزان ۰/٤۰۵ درصد نه تنها اثر نامطلوب بر طعم فرآورده نداشت بلکه موجب بهبود طعم آن نیز شد و غلظت ۰/۸۱۰ درصد نیز طعم قابل قبولی ایجاد نمود [١٧].

همچنین نتایج مطالعات کیو و همکاران (۲۰۱۰) نشان داد که لیکوچالکون A، به میزان قابل توجهی مطابق با دوز مورد استفاده، ترشح SEA و SEB را توسط استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متیسیلین و استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متیسیلین را کاهش می‌دهد [١٨].

در مطالعه پارسایی مهر و همکاران (۲۰۰۹) که تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس *Z. multiflora* Boiss. و نیسین و ترکیب آنها بر تولید انتروتوکسین C و α- همولیزین توسط استافیلوکوکوس اورئو مورد بررسی قرار گرفت، غلظت‌های اسانس در مقادیر، به ترتیب ۰/۰۱۵ و ۰/۰۰۵ درصد به میزان قابل ملاحظه‌ای از تولید SEC و همولیز به علت کاهش عمده در تولید α- توکسین جلوگیری نمود. در مطالعه حاضر نیز غلظت ۰/۰۱۵ درصد اسانس به میزان قابل ملاحظه‌ای از تولید SEE بازداری نمود [١٩].

در مطالعه محبوبی و بیدگلی (۲۰۱۰) که فعالیت ضداستافیلوکوکی اسانس *Z. multiflora* Boiss. و سینرژیسم آن با وانومایسین مورد ارزیابی قرار گرفت، اسانس فعالیت آنتی‌باکتریایی مؤثری در برابر استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متیسیلین و حساس به متیسیلین، با حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) و حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC) در دامنه، به ترتیب ۱ - ۰/۲۵ و ۲ - ۰/۵ میکرولیتر بر میلی‌لیتر نشان داد که با نتایج این مطالعه مطابقت دارد [۲۰].

به طورکلی هرچه مقادیر مواد فنولیک در اسانس بالاتر باشد، خواص آنتی‌باکتریال آن علیه پاتوژن‌های غذایی بیشتر خواهد بود. فعالیت ضدمیکروبی گونه‌های مختلف گیاه آویشن مربوط به وجود ترکیبات فنولیک آن مانند کارواکرول و تیمول و سپس لینالول و پاراسمین است [۱۳،۲۱].

احتمالاً مکانیسم اثر این ترکیبات فنولی شامل موارد زیر است: اختلال در عملکرد غشای سیتوپلاسمی، برهم زدن نیروی حرکت پروتونی و جریان الکتریکی، انعقاد محتویات

Archive of SID
www.SID.ir

سلولی [۱۶،۲۲]. ممانعت ازتولید و فعالیت توکسین‌ها به وسیله اسانس‌های گیاهی می‌تواند به طور غیرمستقیم در نتیجه اختلال در عملکرد یک سری از فاکتورها از قبیل رونوشت‌برداری و ترجمه و یا غیرفعال نمودن مستقیم توکسین‌ها صورت پذیرد. این خاصیت طبیعی چندگانه اسانس‌های گیاهی آنها را نسبت به بسیاری از مواد ضدمیکروبی رایج که تنها بر یک مکان هدف تأثیر می‌گذارند، ارجح می‌سازد. از طرف دیگر طبیعی بودن اسانس‌های گیاهی باعث شده که مصرف‌کنندگان آنها را به مواد ضدمیکروبی شیمیایی و سنتتیک ترجیح دهند [۱۷]. در این مطالعه نیز، غلظت ۰/۰۳ درصد اسانس آویشن شیرازی از رشد استافیلوکوکوس اورئوس جلوگیری نمود و در ۰/۰٤ درصد موجب مرگ باکتری شد. همچنین، غلظت ۰/۰۱۵ درصد اسانس تأثیر قابل ملاحظه‌ای در ممانعت از تولید انتروتوکسین E نشان داد.

بررسی اجمالی متون نشان می‌دهد که تاکنون تحقیقات متعددی راجع به اثرات ضدمیکروبی انواع مختلف اسانس‌های گیاهی بر استافیلوکوکوس اورئوس انجام گرفته و اکثر این بررسی‌ها در محیط‌های کشت آزمایشگاهی صورت گرفته است. لذا، انجام و ادامه این پژوهش‌ها در مدل‌های غذایی و بررسی تأثیر ترکیبات مؤثر موجود در اسانس‌ها بر باکتری‌ها ضروری به نظر می‌رسد. به علت مخاطرات و مشکلات ناشی از وجود انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی از یک سو و فراوان بودن و بومی بودن گیاه آویشن شیرازی در ایران و دسترسی آسان و ارزان به این ماده و پذیرش از جانب مصرف‌کنندگان از سوی دیگر، این مطالعه می‌تواند مقدمه‌ای جهت استفاده از این اسانس در صنایع غذایی باشد تا بدین طریق امکان استفاده از یک منبع قابل دسترس و مقرون به صرفه فراهم شود و در نهایت گامی در جهت رسیدن به سلامت و ایمنی مواد غذایی در جامعه برداشته شود.

نتیجه‌گیری

با در نظر گرفتن طیف وسیع فعالیت‌های ضدمیکروبی اسانس آویشن شیرازی، مطابق یافته‌های این مطالعه و مطالعات سایر محققین، می‌توان از این اسانس در غلظت بازدارنده رشد جهت جلوگیری از رشد استافیلوکوکوس اورئوس و در غلظت‌های تحت بازدارنده جهت جلوگیری از تولید انتروتوکسین و یا کاهش تولید آن در صنایع غذایی استفاده نمود که البته این امر مستلزم انجام تحقیقات گسترده‌تر درخصوص شناسایی دقیق مکانیسم عمل هر یک از اجزای اسانس آویشن شیرازی در حوزه مولکولی و عملکرد این اجزا در سیستم‌ها و مدل‌های غذایی است.

منابع

1. Blaiotta G, Vincenzina F, Christof V et al. Biotyping of Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* by Enterotoxin gene cluster (egc) polymorphism and spa typing analyses. *Appl. Env. Mic*. 2006; 72 (9): 6117 - 23.

2. Su YC and Wong ACL. Current perspectives on detection of Staphylococcal enterotoxins. *J. Food Prot*. 1997; 60: 195 – 202.

3. Rosec JP and Gigaud O. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. *Int. J. Food Mic*. 2002; 77 (1 - 2): 61 - 70.

4. Balaban N and Rasooly A. Staphylococcal enterotoxins, *Int. J. Food Mic*. 2000; 61: 1 – 10.

5. Li M, Diep BA, Villaruz AE, Braughton AR et al. Evolution of virulence in epidemic community-associated methicilin-resistant *Staphylococcus aureus.Proc. Natl. nAcad. Sci. USA* 2009; 106: 5883 - 8.

6. Dinges MM, Orwin PM and Schlievert PM. Exotoxins of Staphylococcus aureus. *Clin. Mic. Rev*. 2000; 13: 16 – 34.

Archive of SID
www.SID.ir

7. Le Loir Y, Baron F and Gautier M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet. Mol. Res*. 2003; 2: 63 – 76.

8. McCormick JK, Yarwood JM and Schlievert PM. Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. *Annu. Rev. Mic*. 2001; 55: 77 – 104.

9. Aires de Sousa M and de Lencastre H. Bridges from hospitals to the laboratory: genetic portraits of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones. *FEMS Imm. Med. Mic.* 2004; 40 (2): 101 - 11.

10. Oussalah M, Caillet S, Saucier L et al. Inhibitory of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Cont*. 2007; 18: 414 - 20.

11. Shaiq Ali M, Saleem M, Ali Z et al. Chemistry of *Zataria multiflora* (Lamiaceae). *Phytochem*. 2000; 55: 933 - 6.

12. Akhonzadeh Basti A, Misaghi A and Khaschabi D. Growth response and modelling of *Zataria multiflora* Boiss. Essentail oil, PH and temperature on *Salmonella typhmurium* and *Staphylocuccus aureus*. *LWT* 2007; 40: 973 - 81.

13. Saei-Dehkordi SS, Tajik H, Moradi M et al. Chemical composition of essential oils in *Zataria multiflora* Boiss. From different parts of Iran and their radical scavenging and antimicrobial activity. *Food Chem. Toxicol*. 2010; doi: 10.1016/j. fct.201. 03. 025.

14. Soltani Nejad S, Mokhtari T and Rahbarian P. Antibacterial effect of Ziziphora clinopodiodes essential oil and methanol extract on pathogen bacteria. *J. Mic. Bio. Tech. of Azad Islamic University* 2010; 2 (5): 1 - 6.

15. Bart S. Essential oils:their antibacterial properties and potential application in foods- a review. *Int. J. Food Mic*. 2004; 94: 223 - 53.

16. Palmer AS, Steward J, and Fyfe L. The potential application of plant essential oils as natural preservatives in soft cheese. *Food Mic*. 2001; 18: 463 – 70.

17. Sari A, Akhondzadeh Basti A, Rokni N et al. Effect of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil on the behavior of *Vibrio parahaemolyticus* in salted fish. *J. Med. Plants* 2010; 9 (36): 136 - 44.

18. Qiu J, Feng H, Xiang H et al. Infuence of subinhibitory concentrations of licochalcone A on the secretion of enterotoxins A and B by *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett*. 2010; 307: 135 – 41.

19. Parsaeimehr M, Akhondzadeh Basti A, Radmehr B et al. Effect of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil, nisin, and their combination on the production of enterotoxin C and a-hemolysin by *Staphylococcus aureus. Foodborne Path. Dis*. 2010; 7 (3): 456 - 63.

20. Mahboubi M and Ghazian Bidgoli F. Antistaphylococcalactivityof *Zataria multiflora* essential oil and its synergywithvancomycin. *Phytomed.* 2010; 17: 548 – 50.

21. Yaltirak T, Aslim B, Ozturk S et al. Antimicrobial and antioxidant activities of *Russula delica* Fr. *Food Chem. Toxic.* 2009; 47: 52 - 2056.

22. Bagamboula CF, Uyttendaele M and Debevere J. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexeneri*, *Food Mic*. 2004; 21: 32 - 42.

Archive of SID
www.SID.ir

Effect of *Zataria multiflora* Boiss. Essential Oil on Growth and Enterotoxin E Production of *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

Azizkhani M (Ph.D. student)[1], Misaghi A (Ph.D.)[1]*, Akhondzadeh Basti A (Ph.D.)[1], Gandomi Nasrabadi H (Ph.D.)[1], Hosseini H (Ph.D.)[2]

1- Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
2- Department of Food science and Technology, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
* Corresponding author: Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, P.O.Box: 14155 - 6453, Tehran, Iran
Tel: +98 – 21 – 61117001, Fax: +98 – 21 – 66933222
E-mail: a_misaghi@hotmail.com

Abstract

Background: ***Z. multiflora*** **Boiss. is one of the Iranian traditional spices and it has antimicrobial effect on the pathogenic bacteria which are agents for some current foodborne intoxications.**

Objectives: The present study was conducted to evaluate the antimicrobial activity of *Z. multiflora* Boiss. Essential oil on *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

Methods: Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of *Z. multiflora* Boiss. essential oil (EO) for *Staphylococcus aureus* at 35°C, the effect of subihibitory concentrations of EO on growth of bacteria up to 72 hours and also production of entertoxin E (SEE), all at 25 and 35°C has been determined.

Results: MIC and MBC of EO which have been evaluated in 0.005 - 0.06% (V/V) were 0.03 and 0.04%, respectively. Colony counting during 72h showed that 75%MIC of EO in 72h reduced 3 log (cfu/ml) at 25°C and 2, 2 and log (cfu/ml) at 35°C in comparison with control culture. Subihibitory concentrations of EO, significantly, decreased the production of SEE at both 25 and 35°C in a dose dependent manner.

Conclusion: The results showed that *Z. multiflora* Boiss. essential oil had inhibitory effect on *Staphylococcus aureus* and it can be used as a natural preservative in food industry.

Keywords: ***Zataria multiflora*** **Boiss.,** ***Staphylococcus aureus,*** **Enterotoxin**

Archive of SID
www.SID.ir