

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

مهنوش پارسايی مهر<sup>۱</sup>، افшин آخوندزاده‌بستی<sup>۲\*</sup>، علی میثاقی<sup>۳</sup>، تقی زهرايی صالحی<sup>۴</sup>، بهراد رادمهر<sup>۵</sup>، حسن گندمی نصرآبادی<sup>۳</sup>

۱- مربي، گروه دامپزشکي، دانشگاه آزاد اسلامي واحد شوشتر، شوشتار

۲- دانشيار، گروه بهداشت و كتربل مواد غذائي، دانشکده دامپزشکي، دانشگاه تهران، تهران

۳- استاديار، گروه بهداشت و كتربل مواد غذائي، دانشکده دامپزشکي، دانشگاه تهران، تهران

۴- استاد، گروه ميكروبیولوري، دانشکده دامپزشکي، دانشگاه آزاد اسلامي واحد کرج، کرج

۵- استاديار، گروه بهداشت و كتربل مواد غذائي، دانشکده دامپزشکي، دانشگاه آزاد اسلامي واحد کرج، کرج

\*ادرس مکاتبه: تهران، خیابان آزادی، دانشکده دامپزشکي، گروه بهداشت مواد غذائي

صندوق پستی: ۶۴۵۳ - ۱۴۱۵۵، تلفن: ۰۲۱-۶۶۹۲۳۵۱۰، نمايزر: ۰۲۱-۶۶۹۳۳۲۲۲

پست الکترونيک: aakhond@ut.ac.ir

تاریخ تصویب: ۲۶/۲/۸۸

تاریخ دریافت: ۹/۱۱/۸۷

### چکیده

**مقدمه:** مسمومیت استافیلوکوکی در اثر تولید انتروتوکسین توسط استافیلوکوکوس اورئوس در مواد غذائي ایجاد می‌شود. تاکنون گزارشي مبني بر اثر اسانس آویشن شیرازی بر تولید توکسین توسط اين باكتري وجود ندارد.

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

**روش بررسی:** آزمایش به صورت مدل فاكتوريال طراحی شد. در اين طرح سه غلظت اسانس آویشن (صفر، ۰/۰۰۵، ۰/۰۱۵ و ۰/۰۳ درصد) استفاده شد. وضعیت رشد باكتري به مدت ۴۳ روز ارزیابي شد و سنجش انتروتوکسین توسط کيت صورت گرفت.

**نتایج:** اسانس آویشن در غلظت ۰/۰۳ درصد به طور كامل از رشد باكتري جلوگیری نمود. غلظت‌های تحت بازدارنده<sup>۱</sup> اسانس آویشن شیرازی، در میزان ۰/۰۰۵ درصد هیچ‌گونه اثر مهاري روی تولید انتروتوکسین استافیلوکوکوس اورئوس نداشت ولی با افزایش غلظت اسانس به ۰/۰۱۵ درصد اثر مهاري معناداري (۰/۰۵<p>) روی تولید انتروتوکسین مشاهده شد.

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

**گل واژگان:** آویشن شیرازی، استافیلوکوکوس اورئوس، انتروتوکسین

<sup>1</sup> Subinhibitory

## مقدمه

دارویی جهاددانشگاهی تایید شد. اسنس آویشن شیرازی از سرشاره‌های هوایی گیاه به روش تقطیر با بخار داغ تهیه و توسط دستگاه گاز کروماتوگراف متصل به طیف نگار جرمی (GC/MS) آنالیز شد.

### باکتری مورد مطالعه

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

### طراحی آزمایش

جهت ارزیابی اثر غلظت‌های اسنس 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 اسنس 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 لیوفلیز در محیط آبگوشت قلب و مغز در ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ - ۱۶ ساعت<sup>۱</sup> 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 میکروتیوب‌های اپندرف در ۲۰ - درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و هر بار جهت انجام آزمایش، این کشت نگهداری شده در ۲۰ - درجه سانتی‌گراد استفاده شد.

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 مصرف کنندگان مواد غذایی خواستار غذاهای طبیعی با ماندگاری طولانی، همراه با کمترین تغییر در ساختار آن می‌باشد و از سوی دیگر خاصیت سرطان‌زاوی 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]. اسنس‌های گیاهی و اجزای تشکیل‌دهنده آن‌ها یکی از این نگهدارنده‌های طبیعی می‌باشند که اثرات ضدمیکروبی آن‌ها سال‌ها است که کاملاً شناخته شده است. آویشن شیرازی یکی از این گیاهان شناخته شده می‌باشد که به عنوان یک گیاه ضدمیکروب و ضدکرم در طب سنتی از آن یادشده و به عنوان یک طعم‌دهنده طبیعی نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد. کارهای متعددی در مورد خواص ضدباکتریایی اسنس آویشن شیرازی بر روی برخی از باکتری‌های پاتوژن از جمله استافیلوکوکوس اورئوس صورت گرفته است اما مطالعات موردنظر فقط از نظر رشد باکتری بوده و در مورد تاثیر اسنس 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 مسمومیت‌زاوی این باکتری، در این مطالعه سعی بر آن شده تا برای اولین بار اثر اسنس آویشن شیرازی بر روی تولید توکسین این باکتری مورد بررسی قرار گیرد.

## مواد و روش‌ها

### تهیه اسنس آویشن شیرازی

گیاه آویشن شیرازی از استان فارس در فصل تابستان جمع‌آوری شد و نام علمی آن توسط پژوهشکده گیاهان

<sup>۱</sup> Over night



## تلقیح اسانس

اسانس آویشن شیرازی را با غلظت‌های صفر، ۰/۰۰۵ و ۰/۰۱۵ درصد به لوله‌های درپیچ دار اضافه کردیم، سپس در هشت سطح تلقیح  $10^0 - 10^5$  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 ۹۶ لوله و نوجکت را در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد جهت بررسی باکتری و رسیدن دوز آن به  $10^7$  cuf/ml اوایجاد کدورت، ۴۳ روز در انکوباتور قرار دادیم. در طی این مدت ۱۸ مرتبه (طی روزهای ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۵، ۱۶، ۱۷، ۱۸، ۱۹، ۲۰، ۲۱، ۲۲، ۲۳، ۲۴، ۲۵، ۲۶، ۲۷، ۲۸) 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.

## تهیه میزان دوز تلقیح باکتریایی

جهت تهیه میزان دوز تلقیح باکتریایی، کشت نگهداری شده در ۲۰-۲۰ درجه سانتی‌گراد جهت خروج از حالت انجامداد به مدت ۱۵ دقیقه در زیر هود میکروبیولوژی قرار داده شد. سپس به محیط آبگوشت قلب و مغز متقل و در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸-۱۶ ساعت نگهداری شد، در ادامه نیز کشت از آبگوشت قلب و مغز ۱۸-۱۶ ساعتی اول بر روی آبگوشت قلب و مغز دوم به مدت ۱۸-۱۶ 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 مقدار ۵ مختلفی از کشت ۱۸-۱۶ ساعتی دوم در لوله‌های کووت حاوی ۵ میلی‌لیتر آبگوشت قلب و مغز استریل برده شد و با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۶۰۰ 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 ۱۰<sup>۷</sup> باکتری در هر میلی‌لیتر بود، مشخص شد، در ادامه نیز این لوله کووت حاوی ۱۰<sup>۷</sup> باکتری در هر میلی‌لیتر جهت تهیه میزان دوز تلقیح مورد استفاده در تحقیق قرار گرفت.

## سنجهش 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  $0/7 - 0/20$  نانوگرم از سم را در هر میلی‌لیتر نمونه ردیابی کند. اساس تست بر مبنای واکنش آنتی‌زن-آنتی‌بادی است. نمونه‌هایی که جذب نوری آن‌ها در طول موج ۴۵۰ 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<sup>۱</sup>

## آماده‌سازی سوبیستای

ابتدا مقدار ۹ میلی‌لیتر از محیط آبگوشت BHI در ۱۲ لوله درپیچ دار 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 طولانی تر 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 درپیچ دار حاوی محیط آبگوشت BHI دی متیل سولفوکساید و آگار آگار را اتوکلاو کردیم.

<sup>۱</sup> Chi-Square



## 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 از توکسین‌های باکتری استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد که از قبل در غذا تولید شده‌اند [۶]. یافته‌های مشابهی توسط پالمر و همکاران (۲۰۰۳) نشان داد که غلاظت‌های subinhibitory اسانس‌های بو، میخک و دارچین تولید انتروتوکسین A باکتری استافیلوکوکوس اورئوس را کاهش می‌دهد [۶].

نوز 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 [۴].

مورد تجزیه و تحلیل توصیفی قرار گرفت. کلیه لوله‌هایی که کدورت رشدی را در یکی از روزهای مورد مطالعه (طی روزهای ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۵، ۱۶، ۱۷، ۱۸، ۱۹، ۲۰، ۲۱، ۲۲، ۲۳، ۲۴، ۲۵، ۲۶، ۲۷، ۲۸) نشان داده بودند، در همان روز و بعد از نگهداری در یخچال در روز ۲۴ مطالعه مورد بررسی توکسین قرار گرفتند.

## نتایج

در این مطالعه اسانس آویشن در غلظت  $0/03$  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 ( $10^0$ ،  $10^1$ ،  $10^2$ ) 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  $0/005$  درصد هیچ‌گونه اثر مهاری روی تولید انتروتوکسین C استافیلوکوکوس اورئوس نداشت. با افزایش غلاظت Subinhibitory به  $0/015$  درصد اثر مهاری معناداری (p < 0.05) 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 غلاظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی

استافیلوکوکوس اورئوس تولید انتروتوکسین (درصد)	اسانس آویشن شیرازی	تولید انتروتوکسین (c)
صفر	+	$10^3$
صفر	-	$10^3$
$10^3$	+	$0/005$
$10^3$	-	$0/015$
$10^4$	+	صفر
$10^4$	-	$0/005$
$10^4$	+	$0/015$
$10^5$	+	صفر
$10^5$	-	$0/005$
$10^5$	-	$0/015$



نشان داد که اسانس آویشن شیرازی در غلظت ۰/۱۵ درصد به طور کامل در تمامی دوزهای تلقیحی از تولید توکسین باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 6538 جلوگیری کرد که این مسئله 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.

### نتیجه گیری

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

نویک<sup>۱</sup> و همکاران نیز در یک پژوهش دریافتند که عصاره زیتون می‌تواند مانع از رشد و توکسین‌زاوی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس شود [۵].

ممانت 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 ترین‌ها 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 مصرف کنندگان آنها را به مواد ضدمیکروبی شیمیایی و سنتتیک ترجیح دهند [۶]. این مطالعه

<sup>1</sup> Nychas

### 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.

