

## فعالیت ضد میکروبی اسانس آویشن شیرازی بر استافیلوکوکوس اورئوس های جدا شده از شیر خام

رضا نارنجی ثانی<sup>۱\*</sup>، اشکان جبلی جوان<sup>۲</sup>، بهنام روزبهام<sup>۳</sup>، حمید استاجی<sup>۴</sup>، حمیدرضا محمدی<sup>۱</sup>

۱. استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

۲. دانشیار گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

۳. دانش آموخته دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

۴. استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

\*نویسنده مسئول مکاتبات: Rezasani\_vet@semnan.ac.ir

(دریافت مقاله: ۹۵/۱۲/۸ پذیرش نهایی: ۹۶/۷/۱۵)

### چکیده

سویه های مولد انتروتوکسین استافیلوکوکوس اورئوس از طریق خوردن فرآورده های شیری آلوده باعث بروز مسمومیت غذایی می شوند. اسانس آویشن شیرازی شامل ترکیباتی است که ویژگی های ضدباکتریایی و ضدقارچی دارند. این مطالعه حاضر به منظور تعیین حداقل غلظت مهار کننده اسانس آویشن شیرازی علیه استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از شیر خام صورت پذیرفت. در مرحله اول اسانس گیاه استخراج و توسط کراماتوگراف و کراماتوگراف متصل به طیف سنج جرمی مورد بررسی قرار گرفت، در ادامه ۸۴ نمونه شیرخام از یک گاوداری در شهر سمنان جهت حضور استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی قرار گرفت. چهارده جدایه استافیلوکوکوس اورئوس از نمونه ها جدا شد. ترکیب شیمیایی اسانس آویشن شیرازی توسط کراماتوگرافی گازی/ اسپکترومتری بررسی شد. مجموع ۲۵ ترکیب که ۹۸/۵۹ درصد اسانس را تشکیل می دادند شناسایی شدند: کارواکرول (۵۰/۵۳٪)، تیمول (۱۴/۷٪)، پاراسیمن (۷/۹٪)، کارواکریل استات (۳/۸۵٪) و ترانس کاربوفیلین (۳/۴٪). غلظت مهار کننده اسانس آویشن شیرازی علیه تمام استافیلوکوکوس اورئوس های جدا شده از طریق روش برات میکروداپلوشن با دامنه ای از ۰/۰۰۰۱ تا ۰/۰۰۰۴ تعیین شد. بنابراین نتایج نشان داد که اسانس آویشن شیرازی دارای اثرات ضدباکتریایی علیه استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از شیر خام می باشد.

واژه های کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، اسانس، آویشن شیرازی، شیر خام

## مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس یکی از عوامل اصلی ایجاد ورم پستان در گاوهای شیری در سرتاسر جهان می‌باشد. غدد پستانی می‌توانند منبع مهمی از سویه‌های مولد انتروتوکسین این باکتری باشند. انتروتوکسین‌های تولید شده توسط سویه‌های مولد انتروتوکسین استافیلوکوکوس اورئوس در گروه‌های A-H و توکسین شوک توکسیک طبقه‌بندی می‌شوند. فراوانی تولید انتروتوکسین در بین سویه‌های استافیلوکوکوس به شدت متغیر است (Mossel and Netten, 1990). مطالعات بر روی استافیلوکوکوس اورئوس‌های جدا شده از شیر خام نشان داده است که تولید انتروتوکسین توسط جدایه‌ها بین صفر تا ۵۶/۵ درصد متغیر است (Bennett et al., 1986; Kenny et al., 1993;). توکسین عامل سندروم شوک توکسیک از استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان بالینی و تحت‌بالینی و همچنین از تانک‌های دامداری یافت گردیده است (Takeuchi et al., 1998). سویه‌های مولد انتروتوکسین استافیلوکوکوس اورئوس از نمونه‌های شیرخام یک شرکت جمع‌آوری شیر در کنیا (Ombui et al., 1992) و در مخزن شیر شیرهای جمع‌آوری شده در تیرینیداد (Adesiyun et al., 1998) جدا سازی شده‌اند. از این مطالعات نتیجه‌گیری می‌شود که شیر منبع محتمل برای سویه‌های مولد انتروتوکسین استافیلوکوکوس اورئوس در شیر و فرآورده‌های شیری می‌باشد و ممکن است برای مصرف‌کننده خطر آفرین باشد. سویه‌های مولد انتروتوکسین استافیلوکوکوس اورئوس از طریق خوردن

فرآورده‌های شیری آلوده باعث بروز تعدادی از مسمومیت‌های غذایی می‌شوند (Adesiyun et al., 2003; Asao et al., 1998). جدیدترین بروز وسیع در سال ۲۰۰۰ در ژاپن به وسیله مصرف شیر کم‌چرب آلوده به انتروتوکسین A رخ داده بود (Asao et al., 2003). آوبیشن شیرازی (*Zataria multiflora Boiss*) گیاهی از خانواده نعنائیان است که در ایران، پاکستان و افغانستان رشد می‌کند. این گیاه در ایران به‌طور گسترده به‌عنوان طعم‌دهنده در طیف وسیعی از غذاها از قبیل ماست، پنیر و سوپ مورد استفاده قرار می‌گیرد (Azizkhani et al., 2013). اجزای اصلی اسانس این گیاه ترکیبات فنلی از قبیل کارواکرول، تیمول و گاما ترپینن می‌باشند (Azizkhani et al., 2013). مشخص شده است که کارواکرول و تیمول فعالیت ضد میکروبی وسیع دارند و این دو ترکیب موضوع مطالعات *in vitro* و *in vivo* (Lambert et al., Manohar et al., 2001; Ultee and Smid, 2001; 2001) بسیاری بوده‌اند که اثر ضد میکروبی کارواکرول و تیمول علیه استافیلوکوکوس اورئوس را اثبات کرده‌اند. در مقایسه با سایر عوامل ضد میکروبی رایج، اطلاعات موجود درباره تأثیر اسانس آوبیشن شیرازی بر عوامل باکتریایی جدا شده از شیر خام از جمله استافیلوکوکوس اورئوس‌های محدود می‌باشد. مطالعه حاضر به منظور جداسازی استافیلوکوکوس اورئوس از شیرخام و تعیین حداقل غلظت مهارکننده اسانس آوبیشن شیرازی بر این باکتری انجام شد.

## مواد و روش‌ها

## - نمونه‌گیری

شیر خام به تعداد ۸۴ نمونه از گاوهای سالم گاوداری شیری درسندان اخذ و در لوله‌های استریل جمع‌آوری گردید. همه نمونه‌ها در حین انتقال به آزمایشگاه در شرایط سرد نگه‌داری شدند و حداکثر طی ۲ ساعت به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان منتقل گردیدند.

## - جداسازی استافیلوکوکوس اورئوس

به‌منظور رقت‌سازی، مقدار ۱ میلی‌لیتر از هر نمونه با ۹ میلی‌لیتر محلول سالین پپتون مخلوط گردید. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از این محلول بر روی سطح محیط بردپارکر آگار تلقیح شد و در دمای  $35 \pm 2$  درجه سلسیوس به مدت ۳۰ تا ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. پنج پرگنه بارز از هر محیط (پرگنه سیاه با هاله روشن)، برای تلقیح به محیط کشت آبگوشت قلب و مغز (BHI broth) انتخاب و در دمای  $35 \pm 2$  درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید (de Oliveira et al., 2012). سپس جدایه‌ها از نظر ریخت‌شناسی و بیوشیمیایی تأیید تشخیص شدند. رنگ‌آمیزی و بررسی شکل ظاهری باکتری توسط بررسی میکروسکوپی اسمیرهای رنگ‌آمیزی شده صورت پذیرفت.

## - آزمون‌های بیوشیمیایی

آزمون‌های اکسیداز، کاتالاز، ایندول، اوره‌آز و کوآگولاز صورت پذیرفت (Roberson et al., 1992). هم‌چنین واکنش تخمیر سوکروز و مالتوز انجام شد (de Oliveira et al., 2012).

## - آماده‌سازی باکتری برای کشت

ابتدا جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس در محیط کشت آبگوشت قلب و مغز در دمای ۳۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۸ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید و این مرحله تکرار شد. کشت باکتری در محیط آبگوشت قلب و مغز رقیق گردید تا به جذب نوری ۰/۱ در طول موج ۶۰۰ نانومتر (Milton Roy Company, USA) برسد. جمعیت کشت باکتری به دست آمده از این رقیق‌سازی شمارش گردید.

## - تعیین حداقل غلظت مهارکننده به روش میکرودیالوشن

در مطالعه حاضر از پلیت‌های ۹۶ خانه ۳۰۰ میکرولیتری ته‌گرد برای تعیین حداقل غلظت مهارکننده اسانس آویشن شیرازی در غلظت‌های ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰، ۱۶۰۰ و ۳۲۰۰ ppm در محیط آبگوشت قلب و مغز حاوی دی‌متیل‌سولفوکساید ۵ درصد استفاده گردید. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از هر غلظت به هر خانه پلیت منتقل شد و به آن ۳۰ میکرولیتر از نمونه‌های باکتری ( $5 \times 10^8$  cfu/ml) در هر خانه) اضافه گردید. محتویات خانه‌های پلیت با پلیت ریدر مجهز به شکر برای ۲ دقیقه مخلوط گردید و جذب نوری در طول موج ۶۳۰ نانومتر در زمان شروع خوانده شد. پلیت‌ها در دمای ۳۵ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند و در پایان این مدت مجدداً جذب نوری آن‌ها توسط ریدر قرائت گردید. افزایش  $\geq 0/1$  واحدی جذب نوری در مقایسه با زمان شروع، نشانه رشد باکتری بود و نخستین غلظت اسانس که این میزان تفاوت در آن تشخیص داده نشد، به‌عنوان حداقل غلظت مهارکننده (MIC) اسانس در نظر گرفته شد.

**- تهیه آوبشن و استخراج اسانس**

آوبشن شیرازی در مرحله گل دهی از گیاهان وحشی در یزد جمع آوری گردید و تشخیص طبقه بندی گیاه توسط موسسه گیاهان دارویی صورت پذیرفت. بخش هایی از گیاه که در مجاورت هوا خشک شده بودند با روش تقطیر در آب با دستگاه کلونجر به مدت ۳ ساعت اسانس گیری شد و اسانس به دست آمده با سدیم سولفات بدون آب خشک گردید و تا زمان آزمون در دمای ۴ درجه سلسیوس و دور از نور نگه داری گردید (Sharififar et al., 2007).

**یافته ها****- ترکیبات اسانس**

اسانس به دست آمده از دستگاه کلونجر ۱/۷۸٪ بود. درصد اجزای اسانس بر اساس گاز کروماتوگراف و گاز کروماتوگراف متصل به طیف سنج جرمی در جدول (۱) آمده است. پروفایل روغنی اسانس، کارواکرول (carvacrol) را به عنوان ترکیب اصلی اسانس (۵۰/۵۳ درصد) نشان داد. علاوه بر این سایر ترکیبات غالب این اسانس شامل تیمول (thymol) (۱۴/۷٪)، پیسیمن (p-Carvacryl) (۷/۹٪)، کارواکریل استات (Carvacryl acetate) (۳/۸۵٪) و ترانس کاریوفیلین (Trans-caryophyllene) (۳/۴٪) بودند.

**- آلودگی شیرهای خام به استافیلوکوکوس اورئوس**

از ۸۴ نمونه مطالعه شده، ۱۴ نمونه آلوده به استافیلوکوکوس اورئوس بودند که شامل ۱۶٪ نمونه ها می شدند.

ترکیب های موجود در اسانس در مرکز جهاد دانشگاهی دانشگاه تهران با استفاده از دستگاه های گاز کروماتوگراف (GC) و گاز کروماتوگراف متصل به طیف سنج جرمی (GC/MS) با مشخصات زیر شناسایی شدند. دستگاه گاز کروماتوگراف متصل به طیف سنج جرمی (Agilent 6890) با ستون موئینه به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۲۵۰ میکرومتر و ضخامت لایه داخلی ۰/۲۵ میکرومتر با برنامه دمایی ۵۰ تا ۲۶۵ درجه سلسیوس با افزایش تدریجی ۲/۵ درجه در هر دقیقه و نگه داری ستون در ۲۶۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه استفاده شد. دمای اتاق تزریق ۲۵۰ درجه سلسیوس و گاز حامل هلیوم با سرعت ۱/۵ میلی لیتر در دقیقه بود. شناساگر EI با انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت و دمای منبع یونیزاسیون ۲۵۰ درجه بود. تشخیص اجزای اسانس با کمک شاخص بازداری به دست آمده در مقایسه با تزریق یک سری از آلکانها (Sigma, UK)

جدول (۱) - درصد ترکیبات اسانس آویشن شیرازی

درصد	RI	ترکیبات
۰/۰۸	۹۲۷	آلفا توجن
۲/۲	۹۳۷	آلفا پینن
۰/۱	۹۵۰	کاکفن
۰/۱۸	۹۶۸	۳-اوکتانن
۰/۱۸	۹۷۸	بتا پینن
۰/۸	۹۸۴	میسرن
۷/۹	۱۰۱۷	سیمن
۰/۹	۱۰۲۶	بتا ترپینول
۲/۵	۱۰۵۵	گاما ترپینن
۱/۲	۱۰۹۰	لینالول
۱/۰۵	۱۱۶۸	رو- من ۱-ان ۴-ال
۱/۰۵	۱۱۸۱	رو- من ۱-ان ۸-ال
۱/۶	۱۲۲۷	کارواکرول متیل اتر
۱۴/۷	۱۲۶۸	تیمول
۵۰/۵۳	۱۲۸۸	کارواکرول
۰/۶۹	۱۳۲۹	تیمیل استات
۳/۸۵	۱۳۵۰	کارواکریل استات
۳/۴	۱۴۳۱	ترنس کاریوفیلن
۰/۱	۱۴۴۸	اودما-۳، ۷-دئین
۲/۰۷	۱۴۵۲	آرومادندرن
۰/۲	۱۴۶۷	آلفاهمولن
۰/۱	۱۴۷۲	سیکلوساتیون
۱/۰۹	۱۵۰۴	لدن
۱/۰۲	۱۵۷۵	اسپاتولنول
۱/۱	۱۵۸۶	اکسید کاریوفیلن
۹۸/۵۹		مجموع

## - نتایج تعیین حداقل غلظت مهار کننده

۰/۰/۰۱٪، در هفت نمونه ۰/۲٪ و در شش جدایه ۰/۰/۴٪ بود. جزئیات نتایج این آزمون در جدول (۲) نشان داده شده است.

میزان حداقل غلظت مهار کننده اسانس آویشن شیرازی علیه استافیلوکوکوس اورئوس در یک جدایه

جدول (۲) - تفاوت میزان جذب نوری جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس قبل و بعد از گرمخانه‌گذاری در غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی

غلظت اسانس (ppm)	جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس													
	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴
۵۰	۰/۵۸۹	۰/۴۰۵	۰/۴۱	۰/۳۷	۰/۶۱۷	۰/۶۳۹	۰/۴۴۱	۰/۳۶۳	۰/۱۰۱	۰/۳۰۲	۰/۵۸۶	۰/۶۳۹	۰/۴۱	۰/۳۶۹
۱۰۰	۰/۲۵۸	۰/۵۰۴	۰/۴۸۶	۰/۵۶۴	۰/۶۰۴	۰/۴۵۸	۰/۴۵۳	۰/۵۴۳	۰/۰۳۵*	۰/۱۴۱	۰/۵۰۴	۰/۶۰۴	۰/۵۶۴	۰/۲۵۸
۲۰۰	۰/۰۰۴*	۰/۰۳۹*	۰/۰۹۳*	۰/۱۶	۰/۱۶۵	۰/۰۰۵*	۰/۱۹۹	۰/۱۶۹	۰/۱۲۱	۰/۰۸۴*	۰/۰۹۳*	۰/۱۶	۰/۱۶۵	۰/۰۳۹*
۴۰۰	۰/۰۲۵	۰/۰۳۴	۰/۰۳۹	۰/۰۳۲*	۰/۰۳۸*	۰/۰۲۹	۰/۰۳*	۰/۰۲۹*	۰/۱۹۸	۰/۱۴۴	۰/۰۳۲	۰/۰۳۹*	۰/۰۲۹*	۰/۰۳۹
۸۰۰	۰/۰۶۸	۰/۰۷	۰/۰۷۸	۰/۰۷۷	۰/۰۷۱	۰/۰۶۸	۰/۰۶۹	۰/۰۶۹	۰/۰۶۹	۰/۴۰۵	۰/۰۷۱	۰/۰۷	۰/۰۶۸	۰/۰۷۷
۱۶۰۰	۰/۲۱۱	۰/۲۱۹	۰/۲۳۸	۰/۲۲۹	۰/۲۱۲	۰/۲۰۷	۰/۲۲۱	۰/۲۱۵	۰/۴۳	۰/۴۶۷	۰/۲۰۷	۰/۲۱۱	۰/۲۱۹	۰/۲۱۲

\* اولین تفاوت جذب نوری ۰/۱ ≤ بین زمان صفر و ۲۴ ساعت

## بحث و نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج این مطالعه، استافیلوکوکوس اورئوس از ۱۴ نمونه (۱۶ درصد) شیر خام جداسازی شد. در یک مطالعه (Gündoğan et al., 2006) نشان داده شد که استافیلوکوکوس اورئوس از همه نمونه‌های شیر خام جداسازی گردید و در یک مطالعه دیگر (Gran et al., 2003) گزارش شد که استافیلوکوکوس اورئوس در ۴۹ نمونه (۸۲ درصد) از مجموع ۶۰ نمونه شیر خام جداسازی گردید. در مطالعه دیگری (Gündoğan et al., 2006) استافیلوکوکوس اورئوس از بیش از ۶۰ درصد نمونه‌های شیر خام جداسازی گردید. دلیل اختلاف بین نتایج مطالعه حاضر و سایر مطالعات ممکن است در روش نمونه‌گیری، روش انتخاب دام برای اخذ نمونه یا تفاوت در روش‌های جداسازی و شناسایی باکتری باشد. به‌طور مثال نمونه‌های مطالعه حاضر از گاوهای سالم اخذ شده بودند در حالی که در سایر مطالعات از نمونه‌های شیر خام در مراکز عرضه شیر خام نمونه‌گیری صورت گرفته بود.

آلودگی شیر با استافیلوکوکوس اورئوس در مطالعات مشابه در کشورهای دیگر گزارش شده است. در ترکیه ۱۸/۱۸ درصد نمونه‌ها مثبت تشخیص داده شدند (Ekici et al., 2004). در مطالعه‌ای دیگر (Bendahou et al., 2008) در مجموع ۲۷ نمونه (۴۰ درصد) آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس را نشان دادند و در هند ۶۱/۷ درصد نمونه‌ها به این باکتری آلوده بودند (Lingathurai and Vellathurai, 2010). اسانس‌ها تاریخچه‌ای طولانی به‌عنوان طعم‌دهنده مواد غذایی دارند ولی استفاده آن‌ها به‌عنوان نگه‌دارنده طبیعی در طول دهه‌های اخیر به‌طور قابل‌توجهی افزایش داشته است (Burt, 2004). اجزای اصلی اسانس آویشن شیرازی ترکیبات فنلیک هستند. اما ترکیبات اسانس گیاه بسته به زمان رشد گیاه، روش آماده‌سازی، روش کشت و موقعیت جغرافیایی، به‌طور گسترده‌ای متغیر است (Saei-Dehkordi et al., 2010). به همین دلیل در برخی از مطالعات نتایجی مشابه مطالعه حاضر داشته و ترکیبات غالب اسانس آویشن شیرازی آن‌ها، ترکیبات فنولیک شامل کارواکرول

ATCC 29213 بود (Azizkhani et al., 2013). مطالعه دیگری چنین اثری برای استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 6538 مشاهده شد ( Parsaeimehr et al., 2015).

افزایش تعداد استافیلوکوکوس اورئوس به بالاتر از  $10^3$  cfu/ml، احتمال تولید توکسین‌هایی را که در مقابل جوشاندن مقاوم هستند را افزایش می‌دهد (Tebaldi et al., 2008). با در نظر گرفتن این‌که اغلب نمونه‌های شیر شمارش باکتری بالای  $10^3$  cfu/ml داشتند (داده‌های مربوطه منتشر نشده‌اند) لذا شیر مصرفی در سمنان می‌تواند یک تهدید مهم برای سلامتی مصرف‌کنندگان باشد. در این مطالعه حداقل غلظت مهار کننده بین  $0/01$  تا  $0/4$  درصد بود و با نتایج مطالعات دیگر هم‌خوانی داشت (Azizkhani et al., 2013). در مطالعه اخیر، اسانس آویشن شیرازی میزان بالایی فعالیت ضد میکروبی علیه استافیلوکوکوس اورئوس در بازه  $0/25$  تا  $0/01$  درصد نشان داد. با توجه به نتایج تحقیق حاضر می‌توان از اسانس آویشن شیرازی علیه استافیلوکوکوس اورئوس استفاده نمود.

### سپاسگزاری

از دانشگاه سمنان برای تأمین مالی مطالعه (پایان‌نامه شماره ۲۷ دانشکده دامپزشکی) تشکر می‌گردد.

### تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافی برای اعلام ندارند.

۶۱/۲۹٪ و تیمول ۲۵/۱۸ درصد بوده است (Shafiee and Javidnia, 1997)؛ در حالی‌که در مطالعات دیگر ترکیبات غالب فنولی گیاه آویشن شیرازی شامل کارواکرول ۷۱/۱۲٪ بوده و تیمول اصلاً یافت نشده است (Azizkhani et al., 2013) و همچنین در یک مطالعه دیگر تیمول ترکیب غالب اسانس بود (Sharififar et al., 2007). این تنوع، استانداردسازی و مقایسه نتایج استفاده از اسانس‌ها را مشکل می‌سازد (Bagamboula et al., 2004). در هر حال، هرچه میزان ترکیبات فنولی اسانس بیشتر باشد، خاصیت ضد میکروبی آن‌ها افزایش خواهد یافت. حضور بعضی اجزای ضد میکروبی از قبیل لینالول (Bassole et al., 2003) و مشتقات اکسیژن‌دار کارواکرول مانند متیل تیمول و متیل اتر کارواکرول (Rota et al., 2008)، گاما ترپینن، پاراسیمین (Gilles et al., 2010)، آلفا پینن و یوکالیپتول، در ترکیب با سایر اجزای اسانس ممکن است در بهتر کردن عملکرد ضد میکروبی اسانس نقش داشته باشد. همچنین ماهیت اسیدی گروه هیدروکسیل در تیمول و کارواکرول و نقش آن‌ها در تشکیل پیوندهای هیدروژنی نیز ممکن است در افزایش خاصیت ضد میکروبی اسانس نقش داشته باشد (Kalemba and Kunicka, 2003). مطالعات مشابه گذشته نیز اثرات ضد میکروبی این اسانس را بر سایر میکروب‌ها ثابت کرده‌اند. به‌طور مثال در مطالعه‌ای بر روی سوبه‌های آزمایشگاهی، اثر ضد میکروبی اسانس آویشن شیرازی بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی گزارش شده است (Sharififar et al., 2007). از طرفی در مطالعه دیگر نشان داده شد که اسانس این گیاه دارای اثرات مهاری بر رشد استافیلوکوکوس اورئوس

## منابع

- Adesiyun, A.A., Webb, L. and Romain, H. (1998). Prevalence and characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bulk and composite milk and cattle handlers. *Journal of Food Protection*, 61: 629–632.
- Asao, T., Kumeda, Y., Kawai, T., Shibata, T., Oda, H., Haruki, K. *et al.*, (2003). An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. *Epidemiology and Infection*, 130: 33–40.
- Azizkhani, M., Misaghi, A., Basti, A.A., Gandomi, H. and Hosseini, H. (2013). Effects of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil on growth and gene expression of enterotoxins A, C and E in *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. *International Journal of Food Microbiology*, 163: 159–165.
- Bagamboula, C., Uyttendaele, M. and Debevere, J. (2004). Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiology*, 21: 33–42.
- Bassole, I., Ouattara, A., Nebie, R., Ouattara, C., Kabore, Z. and Traore, S. (2003). Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkina Faso. *Phytochemistry*, 62: 209–212.
- Bendahou, A., Lebbadi, M., Ennane, L., Essadqui, F.Z. and Abid, M. (2008). Characterization of *Staphylococcus* species isolated from raw milk and milk products (lben and jben) in North Morocco. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 2: 218–225.
- Bennett, R., Yeterian, M., Smith, W., Coles, C., Sassaman, M. and McClure, F. (1986). *Staphylococcus aureus* identification characteristics and enterotoxigenicity. *Journal of Food Science*, 51: 1337–1339.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223–253.
- Dadalioglu, I. and Evrendilek, G.A. (2004). Chemical compositions and antibacterial effects of essential oils of Turkish oregano (*Origanum minutiflorum*), bay laurel (*Laurus nobilis*), Spanish lavender (*Lavandula stoechas* L.), and fennel (*Foeniculum vulgare*) on common foodborne pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 8255–8260.
- de Oliveira, L.P., Soares, L.S., Silva, V.C. and Cirqueira, M.G. (2012). Study of *Staphylococcus aureus* in raw and pasteurized milk consumed in the Reconcavo area of the State of Bahia, Brazil. *Journal of Food Processing & Technology*, 2(6): 128–132.
- Ekici, K., Bozkurt, H. and Isleyici, O. (2004). Isolation of some pathogens from raw milk of different milch animals. *Pakistan Journal of Nutrition*, 3: 161–162.
- Gilles, M., Zhao, J., An, M. and Agboola, S. (2010). Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian Eucalyptus species. *Food Chemistry*, 119: 731–737.
- Gran, H., Wetlesen, A., Mutukumira, A., Rukure, G. and Narvhus, J. (2003). Occurrence of pathogenic bacteria in raw milk, cultured pasteurised milk and naturally soured milk produced at small-scale dairies in Zimbabwe. *Food Control*, 14: 539–544.
- Gündoğan, N., Citak, S. and Turan, E. (2006). Slime production, DNase activity and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk, pasteurised milk and ice cream samples. *Food Control*, 17: 389–392.
- Kalembe, D. and Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10: 813–829.
- Kenny, K., Reiser, R., Bastida-Corcuera, F. and Norcross, N. (1993). Production of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 31: 706–707.



- Lambert, R., Skandamis, P.N., Coote, P.J. and Nychas, G.J. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91: 453–462.
- Lingathurai, S. and Vellathurai, P. (2010). Bacteriological quality and safety of raw cow milk in Madurai, South India. *Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research*, 48(2): 109-114.
- Manohar, V., Ingram, C., Gray, J., Talpur, N.A., Echard, B.W., Bagchi, D. *et al.*, (2001). Antifungal activities of origanum oil against *Candida albicans*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 228: 111–117.
- Mossel, D. and Netten, P.V. (1990). *Staphylococcus aureus* and related staphylococci in foods: ecology, proliferation, toxinogenesis, control and monitoring. Society for Journal of Applied Bacteriology Symposium Series, 19: 123S-145S.
- Ombui, J., Arimi, S. and Kayihura, M. (1992). Raw milk as a source of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* and enterotoxins in consumer milk. *East African Medical Journal*, 69: 123–125.
- Parsaeimehr, M., Akhondzadeh Basti, A., Misaghi, A., Gandomi, H. and Jebellijavan, A. (2015). The effect of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil on gene expression of enterotoxine C in *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39: 1702–1709.
- Roberson, J., Fox, L., Hancock, D. and Besser, T. (1992). Evaluation of methods for differentiation of coagulase-positive staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 30: 3217–3219.
- Rota, M.C., Herrera, A., Martínez, R.M., Sotomayor, J.A. and Jordán, M.J. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control*, 19: 681–687.
- Saei-Dehkordi, S.S., Tajik, H., Moradi, M. and Khalighi-Sigaroodi, F. (2010). Chemical composition of essential oils in *Zataria multiflora* Boiss. from different parts of Iran and their radical scavenging and antimicrobial activity. *Food and Chemical Toxicology*, 48: 1562–1567.
- Shafiee, A. and Javidnia, K. (1997). Composition of essential oil of *Zataria multiflora*. *Planta Medica*, 63: 371–372.
- Sharififar, F., Moshafi, M., Mansouri, S., Khodashenas, M. and Khoshnoodi, M. (2007). In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. *Food Control*, 18: 800–805.
- Takeuchi, S., Ishiguro, K., Ikegami, M., Kaidoh, T. and Hayakawa, Y. (1998). Production of toxic shock syndrome toxin by *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cow's milk and farm bulk milk. *Veterinary Microbiology*, 59: 251–258.
- Tebaldi, V.M.R., Oliveira, T.d., Boari, C.A. and Piccoli, R.H. (2008). Isolation of coliforms, staphylococci, and enterococci in raw milk from communitarian expansion refrigeration tanks: identification, lipolytic and proteolytic action. *Food Science and Technology*, 28: 753–760.
- Ultee, A. and Smid, E. (2001). Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology*, 64: 373–378.

## Antimicrobial activity of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil on *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk

Narenji Sani, R.<sup>1\*</sup>, Jebelli Javan, A.<sup>2</sup>, Rozbahan, B.<sup>3</sup>, Staji, H.<sup>4</sup>, Mohammadi, H.R.<sup>1</sup>

1. Assistant Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran
2. Associate Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran
3. D.V.M. Graduate of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran
4. Assistant Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran

\*Corresponding Author' E.mail: rezasani\_vet@semnan.ac.ir  
(Received: 2017/2/26 Accepted: 2017/10/7)

### Abstract

Enterotoxin-producing strains of *Staphylococcus aureus* can cause food poisoning through the consumption of contaminated dairy products. Essential oil (EO) of *Zataria multiflora* Boiss. contains components with antibacterial and antifungal properties. The present study was conducted to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of *Z. multiflora* Boiss. EO on *S. aureus* isolated from raw milk. Extraction and gas isolation of the EO was provided and analyzed by Chromatography/mass spectrometry. A total of 84 samples of raw milk from a dairy farm in Semnan were analyzed for the presence of *S. aureus*. Fourteen *S. aureus* strains were isolated from raw milk. The chemical composition of hydrodistilled EO of *Z. multiflora* Boiss was analyzed by Chromatography/mass spectrometry. A total of 25 compounds representing 98.59% of the oil were identified: carvacrol (50.53%), thymol (14.7%), p-cymene (7.9%), Carvacryl acetate (3.85%) and Trans-caryophyllene (3.4%). The MIC of *Z. multiflora* Boiss. Using broth microdilution method, MIC of EO on all of the *S. aureus* isolates was estimated at 0.0001-0.004. Based on results, the EO of *Z. multiflora* Boiss possesses antibacterial activity on *S. aureus* isolated from raw milk.

**Conflict of interest:** None declared.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*, *Zataria multiflora* Boiss, Essential oil, Raw milk