فعالیت ضدمیکروبی اسانس آویشن شیرازی بر ضد *استافیلوکوکوس اورئوس‌های* جداشده از شیرخام

رضا نارنجی ثانی[1*]، اشکان جبلی جوان[2]، بهنام روزبهام[3]، حمید استاجی[4]، حمیدرضا محمدی[1]

۱. استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان، سمنان، ایران
۲. دانشیار گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان، سمنان، ایران
۳. دانش‌آموخته دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران
٤. استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان، سمنان، ایران
*نویسنده مسئول مکاتبات: Rezasani_vet@semnan.ac.ir
(دریافت مقاله: ۹۵/۱۲/۸ پذیرش نهایی: ۹٦/۷/۱۵)

چکیده

سویه‌های مولّد انتروتوکسین *استافیلوکوکوس اورئوس* از طریق خوردن فرآورده‌های شیری آلوده باعث بروز تعدادی از مسمومیت‌های غذایی می‌شوند. اسانس آویشن شیرازی شامل ترکیباتی است که ویژگی‌های ضدباکتریایی و ضدقارچی دارند. بنابراین مطالعه حاضر به‌منظور تعیین حداقل غلظت مهارکننده اسانس آویشن شیرازی علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از شیرخام صورت پذیرفت. در مرحله اول اسانس گیاه استخراج و توسط کراماتوگراف و کراماتوگراف متصل به طیف‌سنج جرمی مورد بررسی قرار گرفت، در ادامه ۸٤ نمونه شیرخام از یک گاوداری در شهر سمنان جهت حضور *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد بررسی قرار گرفت. چهارده جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* از نمونه‌ها جدا شد. ترکیب شیمیایی اسانس آویشن شیرازی توسط کراماتوگرافی گازی/ اسپکترومتری بررسی شد. مجموع ۲۵ ترکیب که ۹۸/۵۹ درصد اسانس را تشکیل می‌دادند شناسایی شدند: کارواکرول (۵۰/۵۳٪)، تیمول (۱٤/۷٪)، پاراسیمن (۷/۹٪)، کارواکریل استات (۳/۸۵٪) و ترانس کاریوفیلین (۳/٤٪). غلظت مهارکننده اسانس آویشن شیرازی علیه تمام *استافیلوکوکوس اورئوس‌های* جداشده از طریق روش براث میکرودایلوشن با دامنه‌ای از ۰/۰۰۰۱ تا ۰/۰۰٤ تعیین شد. بنابراین نتایج نشان داد که اسانس آویشن شیرازی دارای اثرات ضدباکتریایی علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از شیرخام می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: اسانس آویشن شیرازی، *استافیلوکوکوس اورئوس*، شیرخام

مقدمه

شیر و فرآورده‌هایی که از شیر گاو مشتق می‌شوند می‌توانند مخزنی برای انواع میکروارگانیسم‌ها و یک منبع مهم برای عوامل عفونت‌زای منتقل شونده از مواد غذایی باشند. حضور عوامل بیماری‌زای منتقل شونده از مواد غذایی در شیر به علت تماس مستقیم با منابع آلودگی در محیط گاوداری‌های شیری و استحصال شیر از گاو عفونی می‌باشد. با وجود این‌که اغلب شیرها پاستوریزه می‌شوند چرا صنایع شیری باید نگران بار میکروبی مخزن شیر باشند؟ برای پاسخ به این سؤال چند دلیل معتبر وجود دارد. این دلایل شامل، بروز بیماری در انسان‌ها در پی مصرف شیر غیرپاستوریزه، مصرف مستقیم شیر غیرپاستوریزه توسط تولیدکنندگان لبنیات، کارگران گاوداری و خانواده‌هایشان، همسایگان و طرفداران شیرخام، مصرف چندین نوع پنیر عمل‌آوری شده از شیر غیرپاستوریزه، آلوده شدن مصرف‌کننده‌ها به عوامل بیماریزای منتقل شونده از راه غذا به تجهیزات صنایع شیری و متعاقب آن آلوده شدن مواد لبنی عمل‌آوری شده و در نهایت از بین نرفتن تمام عوامل بیماریزای غذایی با پاستوریزه کردن ناکافی یا اشتباه آن (Oliver *et al*., 2005).

یکی از عوامل بیماریزا که به‌کرات در مخزن شیر یافت می‌شود و یکی از دلایل چشمگیر ورم پستان در گاوهای شیری در سرتاسر جهان می‌باشد، *استافیلوکوکوس اورئوس* است. غدد پستانی گاوها می‌تواند یک منبع مهم سویه‌های مولّد انتروتوکسین *استافیلوکوکوس اورئوس* باشد. انتروتوکسین‌های تولید شده توسط سویه‌های مولّد انتروتوکسین *استافیلوکوکوس اورئوس* در گروه‌های A-H و توکسین شوک توکسیک طبقه‌بندی می‌شوند. فراوانی تولید انتروتوکسین در بین سویه‌های استافیلوکوکوس به شدّت متغیر است (Mossel and Netten, 1990). مطالعات بر روی استافیلوکوکوس اورئوس‌های جداشده از شیرخام نشان داده است که تولید انتروتوکسین توسط جدایه‌ها بین صفر تا ۵۶/۵ درصد متغیر است (Bennett *et al*., 1986; Kenny *et al*., 1993; Ruzickova, 1994). توکسین عامل سندروم شوک توکسیک از *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از شیرِ گاوهای مبتلا به التهاب پستان بالینی و تحت بالینی و هم‌چنین از مخزن شیر گله یافت گردیده است (Takeuchi *et al*., 1998). سویه‌های مولّد انتروتوکسین *استافیلوکوکوس اورئوس* از نمونه‌های شیرخام یک شرکت جمع‌آوری شیر در کنیا (Ombui *et al*., 1992) و در مخزن شیرِ شیرهایِ جمع‌آوری‌شده در تیرینیداد (Adesiyun *et al*., 1998) جداسازی شده‌اند. از این مطالعات نتیجه‌گیری می‌شود که شیرِ مخزن شیر یک منبع محتمل برای سویه‌های مولّد انتروتوکسین *استافیلوکوکوس اورئوس* در شیر و فرآورده‌های شیری بوده است و ممکن است برای مصرف‌کننده خطرآفرین باشد. گزارش شده است که سویه‌های مولّد انتروتوکسین *استافیلوکوکوس اورئوس* از طریق خوردن فرآورده‌های شیری آلوده باعث بروز تعدادی از مسمومیت‌های غذایی می‌شوند (Adesiyun *et al*., 1998; Asao *et al*., 2003). جدیدترین بروز وسیع در سال ۲۰۰۰ در ژاپن به‌وسیله مصرف شیر کم‌چرب تولید شده از پودر شیر پس چرخ آلوده به انتروتوکسین A *استافیلوکوکوس اورئوس* رخ داده است (Asao *et al*., 2003).

آویشن شیرازی یک گیاه از خانواده نعنائیان است که فقط 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 (۲-متیل ۵-۱-(۱-متیل) فنل) و تیمول (۲-ایزوپروپیل۵-متیل فنل) فعالیت ضدمیکروبی وسیع دارند و این دو ترکیب موضوع مطالعات *in vitro* و *in vivo* (Lambert *et al*., 2001; Ultee Manohar *et al*., 2001 and Smid, 2001;) بسیاری بوده‌اند که اثر ضدمیکروبی کارواکرول و تیمول علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* را اثبات کرده‌اند.

در مقایسه با سایر عوامل ضدمیکروبی رایج، دانسته‌های ما درباره تأثیر اسانس آویشن شیرازی بر *استافیلوکوکوس اورئوس*های جداشده از شیرخام کم است. مطالعه حاضر به‌منظور جداسازی *استافیلوکوکوس اورئوس* از شیرخام و تعیین حداقل غلظت مهارکننده اسانس آویشن شیرازی بر این باکتری انجام شد.

مواد و روش‌ها

- نمونه‌گیری

نمونه‌های شیر از گاوداری شیری درسدنان جمع‌آوری گردید. ۸٤ نمونه به‌صورت استریل در لوله-های استریل از گاوهای سالم اخذ گردید. همه نمونه‌ها در طول مراحل انتقال به آزمایشگاه سرد نگاه داشته شدند و نهایتاً طی ۲ ساعت به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان منتقل گردیدند.

- جداسازی *استافیلوکوکوس اورئوس*

به‌منظور رقت‌سازی یک میلی‌لیتر از هر نمونه به نه میلی‌لیتر محلول سالین پپتون اضافه گردید. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از این محلول بر روی سطح محیط بردپارکر آگار تلقیح شد و در دمای ۲±۳۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ تا ٤۸ 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 ۲±۳۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲٤ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید (de Oliveira *et al*., 2012).

باکتری‌ها 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، اوره آز و کوآگولاز صورت پذیرفت (Roberson *et al*., 1992). هم‌چنین واکنش تخمیر سوکروز و مالتوز انجام شد.

- آزمون کوآگولاز

از هر نمونه کشت داده شده در محیط کشت آبگوشت قلب و مغز، ۰/۳ میلی‌لیتر به لوله‌های استریل حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر از پلاسمای خرگوش اضافه گردید. گرمخانه‌گذاری در دمای ۲±۳۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٦ ساعت انجام شد. نتایج بر اساس میزان لخته شدن به چهار درجه ۱ تا ٤ مثبت دسته‌بندی شدند و

نمونه‌های ۳+ و ٤+ به‌عنوان حضور آنزیم کوآگولاز تلقی گردید (de Oliveira *et al*., 2012).

- آماده‌سازی باکتری برای کشت

ابتدا با یک آنس حلقوی باکتری از اسلنت محیط کشت آبگوشت قلب و مغز برداشته شد و در محیط کشت آبگوشت قلب و مغز در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۸ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. سپس این مرحله تکرار شد. سپس در محیط‌کشت آبگوشت قلب و مغز رقیق گردید تا به جذب نوری ۰/۱ در طول موج ٦۰۰ نانومتر برسد. این مهم با دستگاه اسپکتروفوتومتر (Milton Roy Company, Warminster, PA) انجام شد و با کشت باکتری از این رقت به‌دست آمده در محیط‌کشت آبگوشت قلب و مغز تعداد باکتری شمارش گردید.

- تعیین حداقل غلظت مهارکننده به روش میکرودایلوشن

در مطالعه حاضر از پلیت‌های ۹٦ خانه ۳۰۰ میکرولیتری ته‌گرد برای تعیین حداقل غلظت مهارکننده اسانس آویشن شیرازی در غلظت‌های ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ٤۰۰، ۸۰۰، ۱٦۰۰ و ۳۲۰۰ ppm در محیط‌کشت آبگوشت قلب و مغز حاوی دی‌متیل‌سولفوکساید ۵٪ استفاده گردید. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از هر غلظت به هر خانه پلیت منتقل شد و به آن ۳۰ میکرولیتر از نمونه‌های باکتری اضافه گردید (5×10^5 cfu/ml در هر خانه).

محتویات خانه‌های پلیت با پلیت ریدر مجهز به شیکر برای ۲ دقیقه مخلوط گردید و جذب نوری در طول موج ٦۳۰ نانومتر در زمان شروع خوانده شد. پلیت‌ها در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد برای ۲٤ ساعت گرم‌خانه گذاری و مجدداً توسط ریدر خوانده شدند. افزایش در جذب بیشتر یا مساوی ۰/۱ در مقایسه با زمان شروع، نشانه رشد باکتری بود و نخستین غلظت اسانس بدون این حالت حداقل غلظت مهارکننده اسانس در نظر گرفته شد.

- اجزای گیاه

آویشن شیرازی در مرحله گل‌دهی از گیاهان وحشی در یزد جمع‌آوری گردید و تشخیص طبقه‌بندی گیاه توسط موسسه گیاهان دارویی صورت پذیرفت.

- استخراج اسانس

بخش‌های خشک شده در هوای گیاه، با روش تقطیر در آب با دستگاه کلونجر به‌مدت سه ساعت اسانس گیری شده و اسانس به‌دست آمده با سدیم سولفات بدون آب خشک گردید و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد دور از نور تا زمان آزمون و آنالیز ذخیره گردید (Sharififar *et al*., 2007).

ترکیب‌های موجود در اسانس در مرکز جهاد دانشگاهی دانشگاه تهران با استفاده از دستگاه‌های گاز کروماتوگراف (GC) و گاز کروماتوگراف متصل به طیف‌سنج جرمی (GC/MS) با مشخصات زیر شناسایی شدند. دستگاه گاز کروماتوگراف متصل به طیف‌سنج جرمی (Agilent 6890) با ستون مویینه به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۲۵۰ میکرومتر و ضخامت لایه داخلی ۰/۲۵ میکرومتر با برنامه دمایی ۵۰ تا ۲٦۵ درجه سانتی‌گراد با افزایش تدریجی ۲/۵ درجه در هر دقیقه و نگه‌داری ستون در ۲٦۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ دقیقه استفاده شد. دمای اتاقک تزریق ۲۵۰ درجه و گاز حامل هلیوم با سرعت ۱/۵ میلی‌لیتر 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 دست‌آمده در

مقایسه با تزریق یک‌سری از آلکان‌ها (Sigma,UK) با ستون DB5 و مقایسه با طیف‌های ترکیب‌های استاندارد، تشخیص طیف جرمی و الگوی شکست گزارش شده در منابع معتبر و مقایسه کامپیوتری اطلاعات جرمی به کمک بانک اطلاعاتی انجام شد. درصد نسبی هر یک از اجزا تشکیل‌دهنده اسانس با استفاده از سطح زیر منحنی تعیین شد (Dadalioglu and Evrendilek, 2004).

یافته‌ها

- ترکیبات اسانس

اسانس به‌دست آمده از دستگاه کلونجر ۱/۷۸٪ بود. درصد اجزای اسانس بر اساس گاز کروماتوگراف و گاز کروماتوگراف متصل به طیف‌سنج جرمی در جدول (۱) آمده است. پروفایل روغنی اسانس، کارواکرول (carvacrol) را به‌عنوان ترکیب اصلی اسانس (۵۰/۵۳٪) نشان می‌دهد، علاوه بر این سایر ترکیبات غالب این اسانس شامل تیمول (thymol) (۱٤/۷٪)، پیسیمن (p-cymene) (۷/۹٪)، کارواکریل استات (Carvacryl acetate) (۳/۸۵٪) و ترانس کاریوفیلن (Trans-caryophyllene) (۳/٤٪) بودند.

جدول (۱)- درصد ترکیبات اسانس آویشن شیرازی (تعیین شده به‌وسیله گاز کروماتوگراف و گاز کروماتوگراف متصل به طیف‌سنج جرمی)

ترکیبات	درصد	RI
آلفا توجن	۰/۰۸	۹۲۷
آلفا پینن	۲/۲	۹۳۷
کاکفن	۰/۱	۹۵۰
۳-اوکتانن	۰/۱۸	۹٦۸
بتا پینن	۰/۱۸	۹۷۸
میسرن	۰/۸	۹۸٤
سیمن	۷/۹	۱۰۱۷
بتا تریپئول	۰/۹	۱۰۲٦
گاما تریپنن	۲/۵	۱۰۵۵
لینالول	۱/۲	۱۰۹۰
رو- من ۱-ان ٤-ال	۱/۰۵	۱۱٦۸
رو- من ۱-ان ۸-ال	۱/۰۵	۱۱۸۱
کارواکرول متیل اتر	۱/٦	۱۲۲۷
تیمول	۱٤/۷	۱۲٦۸
کارواکرول	۵۰/۵۳	۱۲۸۸
تیمیل استات	۰/٦۹	۱۳۲۹
کارواکریل استات	۳/۸۵	۱۳۵۰
ترنس کاریوفیلن	۳/٤	۱٤۳۱
اودما-۳، ۷-دئین	۰/۱	۱٤٤۸
آرومادندرن	۲/۰۷	۱٤۵۲
آلفاهمولن	۰/۲	۱٤٦۷
سیکلوساتیون	۰/۱	۱٤۷۲
لدن	۱/۰۹	۱۵۰٤
اسپاتولنول	۱/۰۲	۱۵۷۵
اکسید کاریوفیلن	۱/۱	۱۵۸٦
مجموع	۹۸/۵۹	

- جداسازی باکتری

از ۸٤ نمونه مطالعه شده، ١٤ نمونه آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس* بودند که شامل ١٦٪ نمونه‌ها می‌شدند.

- نتایج تعیین حداقل غلظت مهار کننده

میزان حداقل غلظت مهار کننده اسانس آویشن شیرازی علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* در یک جدایه ۰/۰۱٪، در هفت نمونه ۰/۲٪ و در شش جدایه ۰/٤٪ بود (جدول ۲).

جدول (۲)- تفاوت میزان جذب نوری در زمان شروع کشت و ٢٤ ساعت پس از گرمخانه‌گذاری جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد با غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی

غلظت‌های مختلف اسانس (ppm)	جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*													
	۱	۲	۳	٤	٥	٦	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	١٤
٥۰	۰/٥۸۹	۰/٤۰٥	۰/٤۱	۰/۳۷	۰/٦۱۷	۰/٦۳۹	۰/٤٤۱	۰/۳٦۳	۰/۱۰۱	۰/۳۰۲	۰/٥۸٦	۰/٦۳۹	۰/٤۱	**۰/۳٦۹**
۱۰۰	۰/۲٥۸	۰/٥۰٤	۰/٤۸٦	۰/٥٦٤	۰/٦۰٤	۰/٤٥۸	۰/٤٥۳	۰/٥٤۳	۰/۰۳٥*	۰/۱٤۱	۰/٥۰٤	۰/٦۰٤	۰/٥٦٤	**۰/۲٥۸**
۲۰۰	۰/۰۰٤*	۰/۰۳۹*	۰/۰۹۳*	۰/۱٦	۰/۱٦٥	۰/۰۰٥*	۰/۱۹۹	۰/۱٦۹	۰/۱۲۱	۰/۰۸٤*	۰/۰۹۳*	۰/۱٦	۰/۱٦٥	**۰/۰۳۹***
٤۰۰	۰/۰۲٥	۰/۰۳٤	۰/۰۳۹	۰/۰۳۲*	۰/۰۳۸*	۰/۰۲۹	۰/۰۳*	۰/۰۲۹*	۰/۱۹۸	۰/۱٤٤	۰/۰۳۲	۰/۰۳۹*	۰/۰۲۹*	**۰/۰۳۹**
۸۰۰	۰/۰٦۸	۰/۰۷	۰/۰۷۸	۰/۰۷۷	۰/۰۷۱	۰/۰٦۸	۰/۰٦۹	۰/۰٦۹	۰/٤٤٦	۰/٤۰٥	۰/۰۷۱	۰/۰۷	۰/۰٦۸	**۰/۰۷۷**
۱٦۰۰	۰/۲۱۱	۰/۲۱۹	۰/۲۳۸	۰/۲۲۹	۰/۲۱۲	۰/۲۰۷	۰/۲۲۱	۰/۲۱٥	۰/٤۳	۰/٤٦۷	۰/۲۰۷	۰/۲۱۱	۰/۲۱۹	**۰/۲۱۲**

*اولین تفاوت جذب نوری ۰/۱ ≤ بین زمان صفر و ٢٤ ساعت

بحث و نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج این مطالعه، *استافیلوکوکوس اورئوس* از ١٤ نمونه (١٦٪) شیرخام جداسازی شد. در یک مطالعه (Gündoğan *et al*., 2006) نشان داده شد که *استافیلوکوکوس اورئوس* از همه نمونه‌های شیرخام جداسازی گردید و در یک مطالعه دیگر (Gran *et al*., 2003) گزارش شد که *استافیلوکوکوس اورئوس* در ٤۹ نمونه از مجموع ٦۰ نمونه شیرخام جداسازی گردید (۸۲٪). هم‌چنین در مطالعه دیگر (Gündoğan *et al*., 2006) نشان داده شد که *استافیلوکوکوس اورئوس* در بیش از ٦۰ درصد نمونه‌های شیرخام جداسازی گردیدند. دلیل اختلاف بین نتایج ما و سایر مطالعات ممکن است در نمونه‌گیری باشد. نمونه‌های این مطالعه از گاوها جمع‌آوری شده بودند درحالی‌که سایر مطالعات نمونه شیر خود را از مراکز خرید تهیه می‌نمودند.

آلودگی در شیر با نتایج مشابه در کشورهای دیگر گزارش شده است. در فلسطین اشغالی ۳٦/۹٪٪ نمونه‌ها

از نظر *استافیلوکوکوس اورئوس* مثبت بودند (Farhan and Salik, 2007) در ترکیه در یک مطالعه (Ekici *et al*., 2004) ۱۸/۱۸ درصد نمونه‌ها از نظر استافیلوکوکوس اورئوس مثبت بودند. در مطالعه‌ای دیگر (Bendahou *et al*., 2008) درمجموع ۲۷ نمونه (٤٠٪) آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* را نشان دادند و در هند ٦١/٧ 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. درهرحال، ترکیبات اسانس گیاه بسته به زمان رشد گیاه، روش آماده‌سازی، کشت متفاوت و محل جغرافیایی متفاوت گیاه، به‌طور گسترده‌ای متغیر است (Saei-Dehkordi *et al*., 2010). به همین دلیل مشاهده می‌شود که برخی از مطالعات (Shafiee and Javidnia, 1997) نتایجی مشابه مطالعه ما داشته و ترکیبات غالب اسانس آویشن شیرازی آن‌ها، ترکیبات فنولیک شامل کارواکرول ٦١/٢٩٪ و تیمول ٢٥/١٨ درصد بوده است، درحالی‌که در مطالعات دیگر ترکیبات غالب فنولی گیاه آویشن شیرازی شامل کارواکرول ٧١/١٢٪ 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). درهرحال، هرچه میزان ترکیبات فنولی اسانس بیشتر باشد، خاصیت ضدمیکروبی آن‌ها بیشتر است. حضور بعضی از اجزای ضدمیکروبی از قبیل لینالول (Bassole *et al*., 2003) و مشتقات اکسیژن‌دار کارواکرول مانند متیل تیمول و متیل اتر کارواکرول (Rota *et al*., 2008)، گاما ترپینن، پاراسیمن (Gilles *et al*., 2010)، آلفا پینن و یوکالیپتول، در ترکیب با سایر اجزای اسانس ممکن است در بهتر کردن عملکرد ضدمیکروبی اسانس نقش داشته باشد. هم‌چنین ذات اسیدی گروه هیدروکسیل در تیمول و کارواکرول و نقش آن‌ها در تشکیل پیوندهای هیدروژنی نیز ممکن است در افزایش خاصیت ضدمیکروبی اسانس نقش داشته باشد (Kalemba and Kunicka, 2003). مطالعات مشابه گذشته نیز اثرات ضدمیکروبی این اسانس را بر علیه سلیر میکروارگانیسم‌ها ثابت کرده‌اند. به‌طور مثال در یک مطالعه که بر روی سویه‌های باکتریایی آزمایشگاهی کار کرده‌اند، اثر ضدمیکروبی اسانس آویشن شیرازی را بر علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی گزارش کرده‌اند (Sharififar *et al*., 2007). از طرفی در مطالعه دیگر نشان داده‌شده است که اسانس این گیاه دارای اثرات مهاری بر روی رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC ٢٩٢١٣ و نیز توانایی آن در تولید اینترتوکسین را دارد (Azizkhani *et al*., 2013). در مطالعه‌ای مشابه چنین اثری برای *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC ٦٥٣٨ در مقابل اسانس آویشن شیرازی نیز مشاهده شد (Parsaeimehr *et al*., 2015). در ادامه مطالعات بر روی نمونه‌های آزمایشگاهی، مطالعه حاضر نیز توانست اثر ضدمیکروبی اسانس آویشن شیرازی را بر علیه استافیلوکوکوس‌های جداشده از شیرخام نشان دهد.

افزایش تعداد *استافیلوکوکوس اورئوس* به بالاتر از $۱۰^۳$، احتمال تولید توکسین‌هایی را که در مقابل جوشاندن مقاوم هستند را افزایش داده، بنابراین می‌توانند با خرید شیرخام و یا پاستوریزه میزان آلودگی را افزایش دهند (Tebaldi *et al*., 2008). با در نظر گرفتن این‌که اغلب نمونه‌های شیر شمارش باکتری بالای $۱۰^۳$ داشتند (unpublished data) شیر مصرفی در سمنان می‌تواند یک تهدید مهم برای سلامت باشد. در این مطالعه حداقل غلظت مهار کننده بین ۰/۰۱ تا ۰/٤ درصد بود و با نتایج مطالعات دیگر همخوانی داشت (Azizkhani *et al*., 2013). در مطالعه اخیر، اسانس آویشن شیرازی میزان بالایی فعالیت ضدمیکروبی علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* در بازه ۰/۲۵ تا ۰/۰۱ درصد نشان داد. با توجه به نتایج حاصل از تحقیق حاضر اسانس آویشن شیرازی فعالیت ضدمیکروبی گسترده‌ای علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* داشت.

نتایج نشان داد که اسانس آویشن شیرازی بالقوه خاصیت ضد میکروبی قدرتمندی علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از شیرخام دارد.

سپاسگزاری

با تشکر از دانشگاه سمنان جهت تأمین مالی این مطالعه که در قالب پایان‌نامه شماره ۲۷ دانشکده دامپزشکی به انجام رسید.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی برای اعلام ندارند.

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., Ennanei, 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, 2011.
- 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.
- Farhan, M. and Salik, S. (2007). Evaluation of bacteriological contamination in raw (un-processed) milk sold in different regions of Lahore (Pakistan). Journal of Agriculture and Social Sciences (Pakistan).
- 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.
- Kalemba, 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.
- 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. Journal of Applied Bacteriology, 69.
- Oliver, S.P., Jayarao, B.M. and Almeida, R.A. (2005). Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications. Foodbourne Pathogens & Disease, *2*(2): 115–129.
- 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.
- Ruzickova, V. (1994). Characteristics of strains of Staphylococcus aureus isolated in dairy farms. Veterinarni Medicina-UZPI (Czech Republic),
- 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). Isolamento de coliformes, estafilococos e enterococos de leite cru provenientes de tanques de refrigeração por expansão comunitários: identificação, ação lipolítica e proteolítica. Ciência e Tecnologia de Alimentos, 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 activities of *Zataria multiflora* boiss. essential oil against *Staphylococcus aurous* isolated from raw milk

Sani, N.R[1*], Javan, J.A.[2], Rozbahan, B.[3], Staji H.[4], Mohammadi H.R.[1]

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

[*]Corresponding author: Rezasani_vet@semnan.ac.ir

(Received: 2017/2/26 Accepted: 2017/10/7)

Abstract

Staphylococcus aurous strains produced enterotoxin can cause some food poisonings with consumption of contaminated dairy products. Essential oil of *Zataria multiflora Bioss*. Contains components with antibacterial and antifungal properties. Therefore, the present study was conducted to determine the minimum inhibitory concentration of *Z. multiflora Boiss*. EO against *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk. Extraction and gas Isolation of the plant Boiss. 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*. There were 14 *S. aureus* isolated from these samples. 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*. EO against all of *S. aureus* isolates was determined using broth microdilution method and was 0.0001. Therefore results here show that the EO and methanol extract of *Z. multiflora Boiss* possess antibacterial activity on *S. aureus* isolated from raw milk.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: raw milk, *Staphylococcus aureus, Zataria multiflora Boiss*, essential oil