فصلنامه علمی ـ پژوهشی
دورهٔ ۵، شمارهٔ ۱، بهار ۱۳۹۵، صفحه ۱۴۱- ۱۵۲

بررسی تأثیر اسانس زنیان (*Carum Copticum*) بر رشد و بیان ژنی انتروتوکسین‌های A و C *Staphylococcus aureus* در سوریمی ماهی کیلکا (*Clupeonella cultriventris caspia*)

مریم عزیزخانی[1*]، فهیمه توریان[2]

۱- استادیار، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فن آوری های نوین آمل، آمل، ایران

۲- استادیار، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فن آوری های نوین آمل، آمل، ایران

دریافت: ۹۴/۰۴/۲۱ پذیرش: ۹۵/۰۱/۱۶

*نویسنده مسئول مقاله: m.azizkhani@ausmt.ac.ir

چکیده:

تاثیر اسانس زنیان در غلظت‌های ۰ (شاهد)، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱٪ بر رشد و بیان ژنی انتروتوکسین‌های A و C باکتری *Staphylococcus aureus* در سوریمی ماهی کیلکا (*Clupeonella cultriventris caspia*) در مدت ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ روز نگه داری در یخچال (٤ درجه) بررسی شد. ترکیبات اصلی اسانس شامل تیمول (۳٦/٤٪)، پاراسایمین (۳۱/٤٪) و گاما-ترپینن (۲۱/۷۳٪) بود. حداقل غلظت بازدارنده رشد و حداکثر غلظت قابل تحمل برای باکتری در محیط کشت مایع به‌ترتیب معادل ۰/۰٦٪ و ۰/۰۱۵٪ به‌دست آمد. نتایج ارزیابی رشد تفاوت معناداری را بین تعداد باکتری در نمونه کنترل (log CFU/g 31/11) و نمونه‌های تیمار شده (۹/۷٦، ۷/۲۱ و log CFU/g 06/6 به‌ترتیب در حضور ۰/۵٪، ۰/۷۵٪ و ۱٪ اسانس) نشان داد. نتایج Real-Time PCR بیانگر بیشترین تاثیر بازدارندگی در برابر بیان ژن انتروتوکسین‌ها در غلظت ۱٪ اسانس بود. همچنین تاثیر بازدارندگی غلظت‌های مختلف اسانس بر بیان ژنی انتروتوکسین C بیشتر از انتروتوکسین A بود، به‌طوری‌که در روزهای پنجم و بیستم نگه‌داری، بیان ژن انتروتوکسین A، به ترتیب، ٤/۵ و ۸/۲۳ و بیان ژن انتروتوکسین C، به ترتیب ۵/۱۱ و ۸/۹٤ برابر کمتر از نمونه کنترل بود. به‌طور کلی نتایج این مطالعه نشان داد که اسانس زنیان ترکیب موثری جهت کاهش سرعت رشد باکتری *Staphylococcus aureus* و کاهش تولید انتروتوکسین‌های ناشی از آن در سوریمی ماهی کیلکا می‌باشد.

کلید واژگان: زنیان، *استافیلوکوکوس ارئوس*، انتروتوکسین، بیان ژنی، سوریمی

مقدمه

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2023-04-02]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.1.4.9]

بیماری‌های منتقل شده از راه غذا معضل اصلی سلامت و بهداشت عمومی محسوب می‌شوند که سالیانه با صرف هزینه‌های چند بیلیون دلاری میلیون‌ها نفر از جمعیت جهان بدان مبتلا و بخشی نیز دچار مرگ و بستری شدن در بیمارستان‌ها می‌شوند. *استافیلوکوکوس ارئوس* (*Staphylococcus aureus*) یک باکتری بیماری‌زای مهم برای دامنه وسیعی از عفونت‌های انسانی و حیوانی است که بیماری‌های غذایی ناشی از تولید توکسین را نیز شامل می‌شود. این باکتری یک پاتوژن مهم انسانی است که انواع مختلفی از انتروتوکسین‌ها را تولید می‌کند و در میان توکسین‌های خارج سلولی (اگزوتوکسین‌ها)، توکسین‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* بالاترین درصد احتمال ایجاد خطر را دارند. این انتروتوکسین‌ها، اگزوپروتئین‌های مقاوم به حرارت با وزن مولکولی ۲۶۰۰۰ تا ۳۰۰۰۰ دالتون هستند که سندرم گاستروانتریت در انسان ایجاد می‌کنند. انتروتوکسین A در ایجاد مسمومیت غذایی نسبت به سایر انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی بیشترین نقش را دارد (Akinden et al., 2008; Fraser and Proft, 2008).

استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و نگهدارنده‌های شیمیایی علاوه بر غیرایمن بودن و ایجاد مشکلات فراوان در افراد مصرف‌کننده موجب ظهور پاتوژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها شده است، از این‌رو تمایل به استفاده از ترکیبات طبیعی از جمله عصاره‌ها و اسانس‌های روغنی به‌عنوان نگهدارنده در مواد غذایی افزایش یافته است. بسیاری از اسانس‌های روغنی که از لحاظ اجزای ایمن (GRAS) شناخته شده‌اند، قابلیت استفاده برای جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌ها در مواد غذایی را دارند. در حال حاضر بیشترین استفاده از آنها در مواد غذایی (برای ایجاد عطر و طعم) است (Burt, 2004). فعالیت ضد میکروبی این ترکیبات به‌دلیل افزایش نفوذپذیری و از دست دادن تمامیت غشای ناشی از اختلال در غشای دو لایه فسفولیپیدی، آسیب در سیستم‌های آنزیمی گوناگون و غیرفعال یا تخریب شدن ماده ژنتیکی است (Solomakos et al., 2008). زنیان (*Carum copticum*) از گذشته به‌عنوان ادویه و نگهدارنده مواد غذایی مورد استفاده بوده است. مهم‌ترین مناطق رویش این گیاه در ایران، سیستان و بلوچستان، آذربایجان، اصفهان، خوزستان، فارس، کرمان و خراسان است. عمده ترکیبات زنیان تیمول و پارا-سایمین بوده و عصاره متانولی آن دارای ویژگی ضد باکتریایی در برابر *سالمونلا تیفی* مقاوم به دارو است. همچنین اثرهای ضد باکتریایی آن بر *سودوموناس آئروجینوزا*، *اشرشیاکلی انتروپاتوژنیک*، *سالمونلا تیفی موریوم* و *استافیلوکوکوس ارئوس* به اثبات رسیده است و با توجه به اثرهای ضد میکروبی آن قابلیت استفاده به‌عنوان نگهدارنده طبیعی در مواد غذایی را دارد (Shahnia et al., 2012; Goudarzi et al., 2011). هدف از این مطالعه بررسی تأثیر اسانس زنیان بر رشد و بیان ژنی انتروتوکسین‌های A و C *استافیلوکوکوس ارئوس* در سوریمی تهیه شده از ماهی کیلکا (*Clupeonella cultriventris caspia*) است.

مواد و روش‌ها

تهیه و آنالیز اسانس

اسانس زنیان از شرکت گل قطره توس (مشهد، ایران) در شیشه‌های تیره نفوذناپذیر به هوا خریداری گردید. آنالیز ترکیبات شیمیایی آن با دستگاه گاز کروماتوگراف

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2023-04-02]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.1.4.9]

متصل به طیف نگار جرمی انجام شد. این دستگاه از نوع ترموکوئست تریس جی سی ۲۰۰۰ فینیگان (انگلستان) بود. ترکیبات اسانس براساس مقایسه مدت زمان بازداری نسبی (RI) و اجزای طیف‌های جرمی آنها با مقادیر ذخیره شده در کتابخانه رایانه‌ای وایلی n.۱۷ و نایست (مؤسسه ملی استاندارد و فناوری) (Adams, 2001) شناسایی و براساس میانگین دو تزریق اسانس تعیین مقدار گردید.

سویه باکتریایی و تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد

باکتری مورد بررسی، *استافیلوکوکوس ارئوس* ATCC 29213، از مؤسسهٔ پاستور ایران و به‌صورت لیوفیلیزه تهیه شد. باکتری لیوفیلیزه در محیط آبگوشت تریپتیکاز سوی براث (مرک، آلمان) در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۸– ۱٦ ساعت کشت داده شد. باکتری دو مرتبه به‌طور متوالی تحت شرایط ذکرشده در بالا کشت شد. پس از کشت دوم به نسبت ٤ به ۱ با گلیسرین (مرک، آلمان) استریل مخلوط و در حجم‌های ۵۰۰ میکرولیتری در میکروتیوب‌های اپندورف (اپندورف، آلمان) استریل در ۲۰– درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای هر آزمایش از این کشت‌های نگهداری شده در دمای ۲۰– درجه سانتی‌گراد استفاده گردید. حداقل غلظت بازدارنده رشد (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) و حداکثر غلظت قابل تحمل (Maximum Tolerable Concentration: MTC) با استفاده از روش میکرو دایلوشن براث تعیین شد (Klancnik et al., 2010). حداقل غلظت بازدارنده رشد به‌عنوان کمترین غلظتی که در آن دانسیته نوری مشابه نمونه کنترل تلقیح نشده شامل همان غلظت اسانس تعیین شد. حداکثر غلظت قابل تحمل به‌عنوان بیشترین غلظتی که در آن افزودن اسانس از لحاظ آماری تأثیر قابل ملاحظه‌ای بر رشد باکتری در مقایسه با کنترل (بدون اسانس) نداشت، به‌دست آمد.

تهیه سوریمی، تلقیح باکتریایی و افزودن اسانس

ماهی کیلکا (*Clupeonella cultriventris caspia*) تازه از بازار محلی شهرستان محمودآباد – استان مازندران– تهیه و در مجاورت یخ به کارخانه منتقل شد. برای تهیه سوریمی، ابتدا ماهی با آب سرد شستشو شد، سپس سر به همراه محتویات شکمی و باله‌ها جدا شده و پس از شست‌وشوی مجدد با آب سرد استخوان‌گیری شد. در ادامه بافت استخوان‌گیری چرخ شده و به نسبت ۱ به ۵ با آب سرد (کمتر از ۱۰ درجه سانتی‌گراد) شست‌وشو گردید. شست‌وشوی سوم با استفاده از آب نمک ۰/۰۲ درصد برای آبگیری بهتر از بافت انجام شد. در انتهای مرحله شست‌وشو، آبگیری از بافت تحت خلأ انجام شد (Shimizu et al., 1992). تمام نمونه‌ها برای اطمینان از عدم آلودگی به *استافیلوکوکوس ارئوس* مورد آزمون قرار گرفتند. سپس به هر نمونه (۰/۵ ± ۱۰ گرم در کیسه استریل فیلتردار استومکر) CFU/g $۱۰^{٤}$ باکتری *استافیلوکوکوس ارئوس* تلقیح گردید. نمونه‌ها در چهار گروه مختلف تحت تیمار با اسانس قرار گرفتند: کنترل (فاقد اسانس)، ۰/۵، ۰/۷۵و ۱ درصد حجمی/وزنی (غلظت‌های به‌کار رفته براساس آزمون‌های اولیه برای به‌دست آوردن محدوده‌ای از غلظت اسانس که رشد *استافیلوکوکوس ارئوس* را در سوریمی ماهی کیلکا کاهش می‌دهند، انتخاب شده است). در نهایت تمام نمونه‌ها در دمای ۱ ± ٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ روز نگهداری شدند.

بررسی رشد باکتری

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2023-04-02]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.1.4.9]

برای شمارش باکتریایی در هر نوبت نمونه‌گیری، ۱ گرم از ماهی تازه / سوریمی با ۹ میلی‌لیتر محلول سالین مخلوط شده و سپس یکنواخت شد. رقت‌های 10^{-2} الی 10^{-6} تهیه و برای شمارش تعداد سلول‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* در سوریمی از محیط کشت اختصاصی برد پارکر آگار (مرک، آلمان) به روش کشت سطحی و گرمخانه‌گذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٤٨ ساعت استفاده شد. کلنی‌های محدب، مرطوب، نرم و مدور *استافیلوکوکوس ارئوس* به رنگ سیاه درخشان احاطه شده توسط یک منطقه مات روی محیط کشت شمارش گردید. برای هر تیمار، سه تکرار در نظر گرفته شد.

استخراج RNA

نمونه‌های داخل کیسه استومکر با ۱۰ میلی‌لیتر محلول پایدارکننده RNAlater (کیاژن ، آلمان) و ۳۰ میلی‌لیتر آب پپتون استریل در دستگاه استومکر به‌مدت ٦٠ ثانیه مخلوط شدند. عصاره به‌دست آمده در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد در ۵۰۰۰g به‌مدت ٤ دقیقه سانتریفوژ گردید. استخراج RNA از پلت حاصل از سانتریفوژ با استفاده از محلول بافر Tris-EDTA (سیگما آلدریچ، آلمان) و کیت NucleoSpin® RNA (ماچری ناجل، آلمان) مطابق دستورالعمل سازنده انجام شد. برای بررسی کمی و تعیین غلظت RNA، دانسیته نوری ۲ میکرولیتر از محلول حاوی RNA در ٢٦٠ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ مدل نانودراپ اسپکتروفوتومتر ۲۰۰۰ (ترموساینتیفیک، ایالات متحده) قرائت و براساس نانوگرم در میکرولیتر گزارش شد. نسبت میزان جذب در ٢٦٠ به ٢٨٠ نانومتر (A_{260}/A_{280}) نبود آلودگی به DNA و پروتئین را در نمونه‌های RNA استخراج شده نشان می‌دهد. برای بررسی خلوص و تشخیص کامل بودن قطعات RNA، ۲ میکرولیتر از محلول RNA روی ژل آگارز الکتروفورز شد و وضعیت باندهای RNA بررسی شد.

سنتز cDNA

سنتز cDNA از الگوی RNA با استفاده از کیت Omniscript Reverse Transcriptase (کیاژن، آلمان) دو مرحله‌ای مطابق دستورالعمل سازنده انجام شد. cDNA تا زمان استفاده در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

PCR لحظه به لحظه

واکنش‌های PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر و با استفاده از رنگ سایبرگرین (اپلاید بیوسیستمز، فرانسه) و دستگاه ABI PRISM 7500 Sequence Detection System (اپلاید بیوسیستمز، فرانسه) انجام شد. پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ آورده شده است. شرایط چرخه‌های حرارتی به شرح زیر بود: یک دوره در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه، ٤٠ دوره در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ ثانیه و یک دوره در ٦٠ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه. آنالیز تمام نمونه‌ها در سه تکرار انجام و بیان ژن‌ها در برابر بیان ژن مرجع *16S rRNA* نرمال‌سازی شد. از آنجا که بیان *sec* به‌وسیلهٔ سامانه دو جزئی *agrA* کنترل می‌شود (Recsei et al., 1986)، نسخه‌برداری *agrA* نیز ارزیابی شد. ضمن جستجوی آمپلیکون با استفاده از سایبرگرین برای اطمینان از اختصاصی بودن محصولات و عملکرد پرایمرها، منحنی ذوب محصولات هر یک از ژن‌ها پس از PCR بررسی شد. سطح بیان نسبی ژن‌ها به روش ΔΔCt انجام شد که در بولتن کاربری شماره ۲ Applied Biosystems توضیح داده شده است.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2023-04-02]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.1.4.9]

جدول ۱ پرایمرهای مورد استفاده برای ارزیابی بیان ژن انتروتوکسین‌های A و C .

نام پرایمر	توالی 5) (5'→3')	طول پرایمر (bp)	منبع
SEA-F SEA-R	ATGGTGCTTATTATGGTTATC CGTTTCCAAAGGTACTGTATT	۱۲۰	Qiu et al., 2010
SEC-F SEC-R	TTTTTGGCACATGATTTAATTT CAACCGTTTTATTGTCGTTG	۲۵۷	Fischer et al., 2009
16s rRNA-F *16s rRNA*-R	GCTGCCCTTTGTATTGTC AGATGTTGGGTTAAGTCCC	۲۸۷	Qiu et al., 2010
agrA-F *agrA*-R	TGATAATCCTTATGAGGTGCTT CACTGTGACTCGTAACGAAAA	۲۷٤	Qiu et al., 2010

آنالیز آماری

تمام آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد. داده‌های بـه‌دسـت آمده به‌صورت میانگین ± انحراف معیار نمـایش داده شـد. آنالیز داده‌ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) دو طرفه تعیین شد. مقدار p کمتر از ۰/۰۵ از نظـر آمـاری معنادار تلقی گردید.

نتایج

ترکیبات عمده اسانس زنیان شامل تیمـول (۳٦/٤ درصـد)، پارا-سایمین (۳۱/٤ درصد) و گاما- ترپینن (۲۱/۷۳ درصد) بود (جدول ۲). MIC و MTC اسانس زنیان در ۳۵ درجـه سانتی‌گراد برای باکتری *استافیلوکوکوس ارئـوس* ATCC 29213 به‌ترتیب معادل ۰/۰٦ و ۰/۰۱۵ درصد به‌دست آمد.

جدول ۲ ترکیبات شیمیایی اسانس زنیان تعیین شده توسط کروماتوگرافی گازی/ طیف سنجی جرمی.

ترکیب شیمیایی	مدت زمان بازداری (دقیقه)	میزان (درصد)
آلفا-پینن	۱٤/۱٦	۰/٦۳
بتا-پینن	۱٦/۱۳	۱/۵۰
آلفا-ترپینن	۱۷/۳۸	۰/۳۵
پارا-سایمین	۱۷/۷۰	۳۱/٤
بتا-فلاندرن	۱۷/۸۲	۰/٤٤
گاما-ترپینن	۱۷/۹٦	۲۱/۷۳
آلفا-ترپینئول	۲۲/۳۰	۰/۳۰
کاروون	۲۳/۷۷	۱/۱۵
آنتول	۲٤/۳٦	۰/۱۹
تیمول	۲٤/۵٦	۳٦/٤
کارواکرول	۲٤/۷٦	۰/۷٤
مجموع		۹٤/۸۳

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2023-04-02]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.1.4.9]

مطـابق نتـایج (جـدول ۳)، رونـد رو بـه افزایشـی در جمعیـت *اسـتافیلوکوکوس ارئـوس* طـی دوره ۲۰ روزه نگهداری مشاهده شد و تفـاوت میـان نتـایج در روزهـای مختلف نمونه‌گیری از نظر آماری معنادار بـود (p <۰/۰۵). از روز صفر تا روز بیسـتم نمونـه کنتـرل (فاقـد اسـانس) بالاترین جمعیت *استافیلوکوکوس ارئوس* را نشان داد و در کل دوره نگهداری تفاوت میان شمارش نمونـه کنتـرل بـا تیمارهای حـاوی ۰/۷۵ و ۱ درصـد اسـانس معنـادار بـود (p <۰/۰۵). تفاوت میان قدرت بازدارنـدگی غلظـت‌هـای ۰/۵ و ۰/۷۵ درصد در رشد باکتری در روزهـای ۵،۱۰، ۱۵ و ۲۰ معنادار بود(p <۰/۰۵). غلظت ۱درصد اسانس زنیان، همان‌طور که انتظار می‌رفـت، بـالاترین تـأثیر را در کنـدی روند رشـد بـاکتری در سـوریمی نشـان داد و پـس از آن غلظت ۰/۷۵ درصد قرار داشت. تفاوت میان این دو غلظت در سطح اطمینان p <۰/۰۱ معنادار بود.

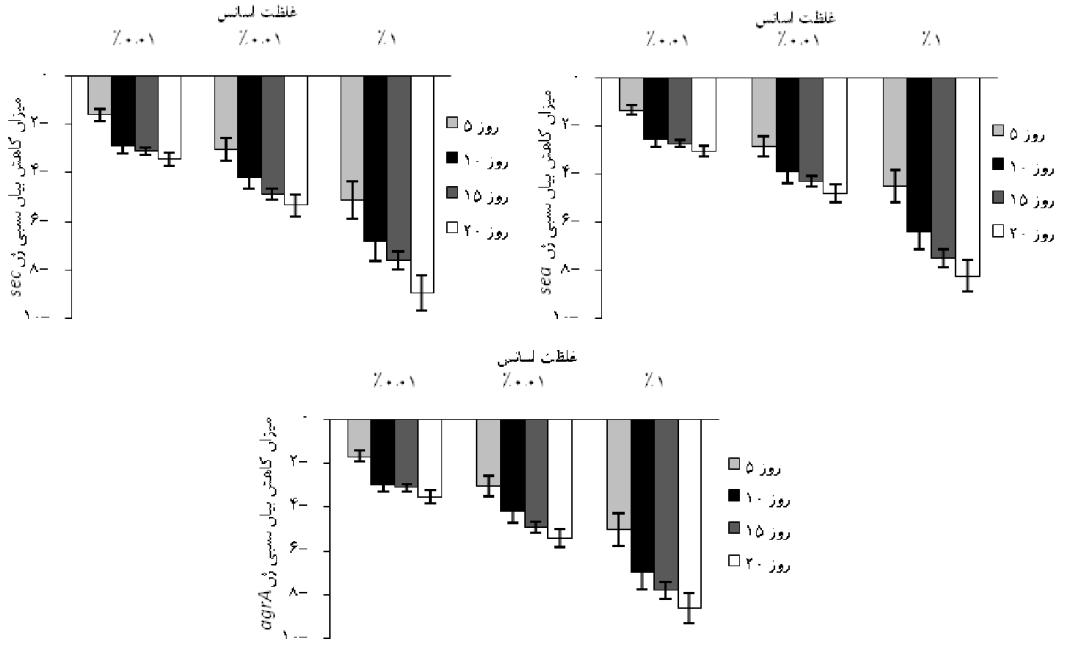
جدول ۳ جمعیت *استافیلوکوکوس ارئوس* در سوریمی تیمار شده با غلظت‌های مختلف اسانس زنیان طی دوره نگهداری.

تیمارها	مدت زمان نگهداری (روز)				
	۰	۵	۱۰	۱۵	۲۰
کنترل (فاقد اسانس)	^{Aa}٤/١١±٠/٠٧	^{aB}٦/٠٥±٠/٠٢	^{aC}٨/٧٥±٠/٠٩	^{aD}٩/٩١±٠/٠١	^{aE}١١/٣١±٠/٠٧
۰/۵ درصد	^{aA}٤/٠٨±٠/٠٣	^{Ba}٥/٩٦±٠/٠٥	^{Ca}٧/٩٤±٠/٠٦	^{Cb}٨/٦٦±٠/٠٥	^{Db}٩/٧٦±٠/٠٧
۰/۷۵ درصد	^{aA}٤/٢٠±٠/٠٢	^{Ab}٤/٨٥±٠/٠٩	^{Bb}٥/٧٩±٠/١١	^{Cc}٦/٣٤±٠/٠٨	^{Dc}٧/٢١±٠/٠٧
۱ درصد	^{aA}٤/١٣±٠/٠٥	^{Ab}٤/٢٥±٠/٠٦	^{Bb}٥/٠١±٠/٠٧	^{Bd}٥/٥١±٠/٠٤	^{Cd}٦/٠٦±٠/٠٧

نتـایج ارزیـابی بیـان نسـبی ژنـی انتروتوکسـین‌هـای *استافیلوکوکوس ارئـوس* در سـوریمی مـاهی کیلکـا در ٤ درجه سانتی‌گراد (شکل ۱) نشان می‌دهد که هر سه غلظت اسانس بـه‌کـار رفتـه در سـوریمی قابلیـت کـاهش تولیـد انتروتوکسین توسط باکتری را دارند. تأثیر بازدارنـدگی هـر سه غلظت تفاوت معناداری از لحـاظ آمـاری بـا یکـدیگر داشته (p <۰/۰۵) و این تأثیر وابسته به غلظت بوده است. مطـابق نتـایج بـه‌دسـت آمـده میـزان تـأثیر بازدارنـدگی غلظت‌های مختلف اسانس بر بیـان ژنـی انتروتوکسـین C بیشتر از انتروتوکسین A است (p <۰/۰۱). همچنین، میزان بیان *sec* و *agrA* تقریباً به میزان مشابه کاهش یافتـه اسـت (p >۰/۰۵) که نشان‌دهندهٔ کنترل مستقیم بیـان *sec* توسـط سامانه دو جزئی *agrA* است. بالاترین تأثیر بازدارندگی در برابر بیان ژن مربـوط بـه هـر دو انتروتوکسـین A و C در غلظت ۱ درصد اسانس مشاهده شده است؛ بـدین ترتیـب کـه بیـان ژن انتروتوکسـین A در روز ۵ و ۲۰ نگهـداری، به‌ترتیب، ٤/۵ و ۸/۲۳ برابر کمتر در مقایسه با کنترل بـوده است (p <۰/۰۵)؛ همچنین میزان بیان ژن انتروتوکسـین C در روز ۵ و ۲۰ نگهداری، بـه‌ترتیـب، ۵/۱۱ و ۸/۹٤ برابـر کمتر از بیان همین ژن در نمونه کنترل بوده اسـت (p <۰/۰۵). نکته دیگری که از نتایج مطالعه حاضـر بـرمی‌آیـد آن است که میزان کـاهش بیـان ژن‌هـا طـی روزهـای متـوالی نگهداری روند یکنواختی داشته و متوقف نشده است.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2023-04-02]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.1.4.9]



شکل ۱ بیان نسبی ژن‌های *sec*،*sea* و *agrA* در *استافیلوکوکوس ارئوس* ATCC 29213 در سریمی ماهی کیلکا حاوی غلظت‌های مختلف اسانس زنیان طی دوره نگهداری ۲۰ روزه.

بحث

استافیلوکوکوس ارئوس طی فرایند خشک کردن، دود دادن و یا تهیه سایر محصولات ماهی حضور داشته و قابل جداسازی است. در طول فرایند تهیه محصول جمعیت *استافیلوکوکوس ارئوس* تا بیش از 10^5 CFU/g افزایش می‌یابد (Eklund et al., 2004). انتروتوکسین‌های تولید شده به‌وسیلهٔ *استافیلوکوکوس ارئوس* از علل عمده بروز التهاب معده‌ای- روده‌ای پس از مصرف ماهی و فراورده‌های تهیه شده از آن محسوب می‌شوند. در مطالعه‌ای در برزیل، آلودگی به *استافیلوکوکوس ارئوس* در برخی از نمونه ماهی تازه بالاتر از حدود سطح تعیین شده سازمان غذا و دارو بود (Vieira et al., 2001). همچنین در مطالعه Ayulo et al., 1994 این باکتری از نمونه‌های ماهی تازه و فیله ماهی مورد آزمایش جداسازی که برخی از جدایه‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* دارای قابلیت تولید انتروتوکسین‌های A، B و D بودند.

مطالعات متعددی دربارهٔ کاربرد ترکیبات نگهدارنده برای افزایش عمر نگهداری فراورده‌های ماهی و به تأخیر انداختن رشد میکروبی انجام شده و در بسیاری از این پژوهش‌ها فعالیت ضدمیکربی اسانس‌های گیاهی و یا ترکیبات آنها برای کاربرد در مواد غذایی مناسب شناخته شده است (Choobkar et al., 2009; Motalebi et al., 2010; Rostamzad et al., 2010). زنیان نیز گیاهی بومی ایران است که به‌طور گسترده‌ای در مواد غذایی به‌کار رفته و همچنین جزئی از ادویه کاری را تشکیل می‌دهد. در این مطالعه، نمونه سوریمی تهیه شده از ماهی کیلکا با غلظت ۱ درصد اسانس زنیان دارای پایین‌ترین جمعیت *استافیلوکوکوس ارئوس* بود. در مطالعه‌ای که از سوی

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2023-04-02]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.1.4.9]

Barakat و همکاران (۲۰۰٤) انجام شد، تأثیر اسانس سیر و ترکیباتی از اسانس‌های گیاهی مانند آلیل ایزوتیوسیانات، کارواکرول، سینامالدهید، سیترال، کومین آلدهید، اوژنول، ایزواوژنول، لینالول و تیمول بر فلور میکروبی طبیعی گوشت ماهی کارپ بررسی شد. بیشترین تأثیر بازدارندگی از کارواکرول و تیمول در برابر *استینتوباکتر*، *آلکالیجنس*، *باسیلوس*، *فلاووباکتریوم*، *میکروکوکوس*، *موراکسلا* و *سودوموناس* مشاهده شد. تیمول یکی از ترکیبات اصلی موجود در اسانس زنیان است و تأثیر بازدارندگی این اسانس در برابر رشد *استافیلوکوکوس ارئوس* می‌تواند به‌علت وجود این ترکیب باشد. همچنین، Bonyadian و Karim (۲۰۰۲) تأثیر بازدارندگی روغن‌های فراری مانند آویشن، زیره، نعناع، پونه کوهی و ترخون را بر رشد *استافیلوکوکوس ارئوس* بررسی و مشاهده نمودند که بیشترین فعالیت بازدارندگی مربوط به اسانس آویشن است که دارای مقدار زیادی تیمول و ترکیبات مونوترپنی می‌باشد که در مطالعه حاضر تیمول و نیز مونوترپن‌هایی مانند گاما-ترپینن و پارا-سایمین از ترکیبات عمده اسانس زنیان تشخیص داده شده‌اند. Moosavy و همکاران (۲۰۰۸) طی بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی بر رشد *استافیلوکوکوس ارئوس* در دو دمای ۸ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد مشاهده کردند که تأثیر بازدارندگی اسانس در دمای یخچالی (۸ درجه سانتی‌گراد) بیشتر است، بنابراین در مطالعه حاضر از دمای پایین (٤ درجه سانتی‌گراد) برای نگهداری سوریمی استفاده شد که علاوه بر جلوگیری از فساد شیمیایی موجب کاهش رشد *استافیلوکوکوس ارئوس* نیز می‌شود. MIC اسانس زنیان در محیط کشت در برابر *استافیلوکوکوس ارئوس* معادل ۰/۰٦ درصد به‌دست آمد، ولی غلظت‌های به‌کار رفته در نمونه‌های سوریمی (۰/۵؛ ۰/۷۵ و ۱ درصد) بسیار بالاتر از مقدار MIC بود زیرا نتایج مطالعات سایر محققان نشان داده است که در غلظت مشابه تأثیرگذاری اسانس‌ها در مواد غذایی نسبت به زمانی‌که در محیط کشت بررسی می‌شوند، کاهش می‌یابد (Tassou et al., 2000; Gutierrez et al., 2009). علت این امر بالا بودن محتوای پروتئین و چربی گوشت ماهی است که می‌تواند تأثیرات ضدمیکربی اسانس‌ها را کاهش دهد. اسانس‌ها دارای ماهیت چربی دوستی بوده و بیشتر در قسمت چربی ماده غذایی محلول‌اند درحالی‌که میکروارگانیسم در بخش آبدوست مستقر می‌شود، از این‌رو فرصت تماس اسانس با باکتری هدف کاهش می‌یابد (Tassou et al., 2000; Burt, 2004). ربیعی و همکاران (۱۹۹۲) به بررسی اثر بازدارندگی اسانس زنیان بر رشد باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* در محیط عصاره و گوشت ماهی سفید دریای خزر پرداخته و مشاهده نمودند که استفاده از اسانس زنیان به‌طور معناداری از رشد باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* جلوگیری کرد. این تأثیر در محیط عصاره ماهی سفید در مقایسه با گوشت ماهی سفید چشمگیرتر بود.

در این مطالعه نیز فعالیت اسانس زنیان در کاهش رشد *استافیلوکوکوس ارئوس* نشان داده شد؛ از این‌رو اسانس زنیان می‌تواند به‌عنوان یک ترکیب ضدمیکربی طبیعی بالقوه برای بازداری از رشد *استافیلوکوکوس ارئوس* در مواد غذایی مورد ملاحظات و بررسی‌های بیشتر قرار گیرد.

از سوی دیگر مطالعات متعددی در رابطه با بررسی تأثیر اسانس‌ها بر بیان ژنی انتروتوکسین‌های باکتریایی در مدل‌های غذایی انجام شده است. برای مثال مطالعه Palmer و همکاران (۲۰۰٤)، فعالیت قابل ملاحظه اسانس‌های میخک، دارچین و خور را در کاهش تولید انتروتوکسین A و آلفا-توکسین به‌وسیلهٔ *استافیلوکوکوس ارئوس* نشان داد. در مطالعه Qiu و همکاران (۲۰۱۰) که به

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2023-04-02]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.1.4.9]

بررسی تأثیر غلظت‌های تحت بازدارنده تیمول بر بیان ژنی دو انتروتوکسین A و B و آلفا همولیزین در *استافیلوکوکوس ارئوس* پرداختند، نتایج نشان داد که غلظت‌های تحت بازدارنده تیمول تولید آلفا همولیزین، SEA و SEB را در سویه‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* کاهش می‌دهد که با نتایج این تحقیق دربارهٔ بیان ژنی مطابقت دارد. نتایج مطالعه Parsaeimehr و همکاران (۲۰۱۰) دربارهٔ تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی، نیسین و ترکیب آنها بر تولید انتروتوکسین Cو α-همولیزین (α-توکسین) توسط *استافیلوکوکوس ارئوس* طی نگهداری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٤۳ روز نشان داد که غلظت‌های اسانس در مقادیر ۰/۰۱۵ و ۰/۰۰۵ درصد به میزان قابل ملاحظه‌ای از تولید SEC و همولیز به علت کاهش عمده در تولید α-توکسین جلوگیری می‌کند که با نتایج مطالعه حاضر دربارهٔ تأثیر اسانس‌ها بر کاهش تولید انتروتوکسین مطابقت دارد. همچنین Azizkhani و همکاران (۲۰۱۳) در بررسی تأثیر اسانس آویشن شیرازی (ترکیبات عمده: کارواکرول، گاما ترپینن و آلفا پینن) بر بیان ژن انتروتوکسین‌های A، C و E/*استافیلوکوکوس ارئوس* در محیط کشت نشان دادند که غلظت‌های تحت MIC اسانس به میزان قابل ملاحظه‌ای رشد باکتری و نیز بیان ژن‌های مربوط به انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی را کاهش می‌دهد که مشابه نتایج حاصل از این مطالعه است.

هدف قرار دادن عوامل بیماری‌زای باکتریایی (انتروتوکسین‌ها، همولیزین‌ها و ...) در حال حاضر به‌عنوان یک راهبرد جایگزین برای توسعه انواع جدیدی از مواد نگهدارنده ضدمیکروبی مورد توجه بسیاری از پژوهشگران و محققان صنایع غذایی قرار گرفته است. پاتوژنیسیته *استافیلوکوکوس ارئوس* مشابه بسیاری دیگر از باکتری‌های گرم مثبت است و شدت آن به تولید فاکتورهای ویرولانس خارج سلولی متعدد بستگی دارد. در نهایت، عملکرد ترکیبات نگهدارنده نه تنها با فعالیت بازدارندگی رشد یا باکتری‌کشی بلکه با تأثیر آنها بر آزادسازی فاکتورهای ویرولانس تعیین می‌شود (Cegelski et al., 2008)، بنابراین به نظر می‌رسد بررسی تأثیر اسانس بر این عوامل در مطالعات آینده در درک بیشتر سازوکار عملکرد ضدمیکربی این ترکیبات مؤثر باشد.

در مجموع نتایج به‌دست آمده از این مطالعه کاربرد اسانس زنیان را به‌عنوان یک نگهدارنده طبیعی در سوریمی ماهی پیشنهاد می‌کند. علاوه بر این، مطالعات بیشتری برای بررسی کاربرد اسانس زنیان در انواع مواد غذایی، ارزیابی طعم و سایر ویژگی‌های حسی، تغییرات شیمیایی، تأثیرات ضدمیکربی در کل سامانه غذایی و نیز استفاده از اسانس در دوره‌ها و دماهای مختلف نگهداری مورد نیاز است.

تشکر و قدردانی

این طرح تحقیقاتی با استفاده از اعتبارات ویژه پژوهشی (گرنت شماره ۸/۱۳۹/ب) دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل انجام شده است.

منابع

Adams, R. P. 2001. Identification of essential oils components by gas chromatography / quadrupole mass spectroscopy. Allured Publishing Corporation, Illinois.

Akinedan, O., Hassan, A.A., Schneider, E. and Usleber, E. 2008. Entrotoxigenic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from goat's milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 124(2):211-216.

Applied Biosystems, User bulletin no. 2. Relative quantification of gene expression. (1997).22. R.

Ayulo, A.M., Machado, R.A. and Scussel, V.M. 1994. Enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in fish and seafood from the southern region of Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, 24: 171–178.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2023-04-02]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.1.4.9]

Benth. & Hook) eEssential oil. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 13:203-208.

Gutierrez, J., Barry-Ryan, C. and Bourke, P. 2009. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components. *Food Microbiology,* 26:142-150.

Klancnik, A., Piskernik, S., Jersek, B., and Mozina, S. S. 2010. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of Microbiological Methods,* 81(2): 121-126.

Moosavy, M., Basti, A.A., Misaghi, A., Zahraei salehi,T., Abbasifar, R., Mousavi, H., Alipour, M., et al. 2008. Effect of *Zataria multiflora* Boiss essential oil and nisin on *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhimurium* in a food model system and on the bacterial cell membranes. *Food Research International*, 41: 1050-1057.

Motalebi, A. A., Hasanzati Rostami, A., Khanipour, A. A. and Soltani, M. 2010. Impacts of whey protein edible coating on chemical and microbial factors of gutted kilka during frozen storage . *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 9(2): 255-264.

Palmer, A., Stewart, J. and Fyfe, L. 2004. Influence of subinhibitory concentrations of plant essential oils on the production of enterotoxins A and B and alpha-toxin by *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology,* 53: 1023–1027.

Parsaeimehr, M., Basti, A.A., Radmehr, B., Misaghi, A., Abbasifar, A., Karim, G., Rokni, N., Sobhani Motlagh, M., Gandomi, H., Noori, N. and Khanjari, A. 2010. Effect of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil, nisin, and their combination on the production of enterotoxin C and a-hemolysin by *Staphylococcus aureus*. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(3): 456-463.

Qiu, J., Wang, D., Xiang, H., Feng, H., Xia, L., Jiang, Y., Xia, L., Dong, J., Lu, J., Lu, Y. and Deng, X. 2010. Subinhibitory concentrations of thymol reduce enterotoxins A and B and a-hemolysin production in *Staphylococcus aureus* isolates. *Plos ONE,* 5(3): e9736.

Rabiei, S., Hossein, H., Rezaei, M. and Mousavi, T. 2013. Inhibitory effects of Ajowan essential oil on growth of Listeria monocytogenes in Rutilus frissi kutum broth medium and fillet. *Iranian*

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,*113:159–165.

Barakat, S. M., Yamazaki, K., Milyasita, K., Il-Shik, S., DongSuk, C. and Suzuki, T. 2004. Bacterial microflora of carp (*Cyprinus carpio*) and its shelf- life extension by essential oil compounds. *Food Microbiology*, 21: 657-666.

Bonyadian, M. and Karim, G. 2001. Study of the effects of some volatile oils of herbs against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in broth media. *Journal of Faculty of Veterinary Medicine of University of Tehran*, 57:81–83.

Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94:223–253.

Cegelski, L., Marshall, G.R., Eldridge, G.R. and Hultgren, S.J. 2008. The biology and future prospects of antivirulence therapies. *Nature Reviews Microbiology,* 6: 17–27.

Choobkar, N., Soltani, M., Mousavi, H. A. E.,

Basti, A. A. and Matinfar, A. 2010. Effect of *Zataria multiflora* Boiss essential oil on the growth of *Staphylococcus aureus* in the light salted fillets of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Iranian Journal of Fisheries Sciences,* 9(3): 352-359.

Eklund, M.W., Peterson, M.E., Poysky, F.T., Paranjpye, R.N. and Pelroy, G.A. 2004. Control of bacterial pathogens during processing of cold-smoked and dried salmon strips. Journal *of Food Protection,* 67: 347–351.

Fischer, A., Francois, P., Holtfreter, S., Broeker, B. and Schrenzel, J. 2009. Development and evaluation of a rapid strategy to determine enterotoxin gene content in *Staphylococcus aureus. Journal of Microbiological Methods,* 77: 184–190.

Fraser, J.D. and Proft, T. 2008. The bacterial superantigen and superantigen-like proteins. *Immunological Reviews,* 225: 226–243.

Goudarzi, G.R., Saharkhiz, M.J., Sattari, M. and Zomorodian, K. 2011. Antibacterial aActivity and chemical cComposition of Ajowan (*Carum copticum*

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2023-04-02]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.1.4.9]

by Lanier, T. and Lee, C. New York: Marcel Dekker.

Solomakos, N., Govaris, A., Koidis, P. and Botsoglou, N. 2008. The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin and their combination against *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef during refrigerated storage. *Meat Science,* 80:159–166.

Tassou, C., Koutsoumanis, K. and Nychas, G.J.E. 2000. Inhibition of *Salmmonella entritidis* and *Staphylococcus aureus* in nutrient broth by mint essential oil. *Food Research International*, 33: 273–280.

Vieira, R.H.S.F., Rodrigues, D.P., Gocalves, F.A., Menezes, F.G.R., Aragao, J.S. and Sousa, O.V. 2001. Microbicidal effect of medicinal plant extracts (*Psidium guajava* Linn. and *Carica papaya* Linn.) upon bacteria isolated from fish muscle and known to induce diarrhea in children. *The Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo,* 43: 145–148.

Journal of Nutrition Sciences & Food Technology, 8(2)71-80.

Recsei, P., Kreiswirth, B., O'Reilly, M., Schlievert, P., Gruss, A. and Novick, R.P. 1986. Regulation of exoprotein gene expression in *Staphylococcus aureus* by *agr*. *Molecular and General Genetics,* 202: 58–61.

Rostamzad, H., Shabanpour, B., Kashaninejad, M. and Shabani, A. 2010. Inhibitory impacts of natural antioxidants (ascorbic and citric acid) and vacuum packaging on on lipid oxidation in frozen . *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 9(2): 279-292.

Shahnia, M., Schaffner, D.W., Khanlarkhani, A., Shahraz, F., Radmehr, B. and Khaksar, R. 2012. Modelling the Growth of Escherichia Coli Under the Effects of Carum Copticum Essential Oil, pH, Temperature and NaCl Using Response Surface Methodology. *Journal of Food Safety,* 32:415–425.

Shimizu Y, Toyohara H, Lanier T. 1992. Surimi Production from Fatty and Dark-Fleshed Fish Species. Pp.181-208. In Surimi Technology, edited

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2023-04-02]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.1.4.9]

Fisheries Science & Technology
TMU
Scientific - Research Journal Vol. 5, No. 1, Spring 2016

Effects of *Carum Copticum* essential oil on growth and gene expression of enterotoxins A and C in *Staphylococcus aureus* in Kilka fish (*Clupeonella cultriventris caspia*) surimi

Maryam Azizkhani[1], Fahimeh Tooryan[2*]

1- Assistant Professor, Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technologies, Amol

2- Assistant Professor, Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technologies, Amol

Received: 12.07.2015 Accepted: 04.04.2016

*Corresponding author: m.azizkhani@ausmt.ac.ir

Abstract:

The effect of essential oil (EO) from *Carum copticum* at concentrations of 0 (control), 0.5%, 0.75% and 1% on Staphylococcus aureus growth and gene expression of enterotoxins (SE) A and C in surimi from kilka (*Clupeonella cultriventris* caspia) was determined during 0, 5, 10, 15 and 20 days of refrigeration storage (4 °C). The main compounds of EO were thymol (36.4%), p-cymene (31.4%) and γ-terpinen (21.73%). Minimum inhibitory concentration and maximum tolerable concentration of EO against in S. aureus in broth medium were 0.06% and 0.015%, respectively. The growth rate significantly differ between *S.aureus* population in control (11.31 log CFU/g) and EO-treated samples, 9.76, 7.21 and 6.06 log CFU/g in samples containing 0.5%, 0.75% and 1%, respectively. The highest inhibitory activity against gene transcription of entertoxins was observed at 1% EO; also, the inhibitory effect of EO concentrations against expression of enterotoxin C was higher than enterotoxin A., as enterotoxin A expression was 4.5 and 8.23 fold lower than control at days 5 and 20, and enterotoxin C expression, at days 5 and 20, decreased 5.11 and 8.94 fold compared to control. The results of this study showed that EO from *C. copticum* is an effective component in reducing bacterial growth rate and staphylococcal enterotoxins production in kilka surimi.

Keywords: *Carum Copticum*, *Staphylococcus aureus*, Enterotoxin, Gene expression, Surimi

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2023-04-02]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.1.4.9]