تعیین میزان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) لیزوزیم و آویشن شیرازی بر باکتری *E. coli O_{157}: H_7*

اعظم حسین‌زاده[۱]، طاهره مهاجرفر[۲]، افشین آخوندزاده‌بستی[۳]*، علی خنجری[٤]، حسن گندمی نصرآبادی[٤]، علی میثاقی[٥]، سمیه صادقی[۲]

۱- دستیار تخصصی، گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران
۲- دکتری عمومی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی،دانشگاه تهران، تهران
۳- استاد، گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران
٤- استادیار، گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران
٥- دانشیار گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران
*آدرس مکاتبه: تهران، خیابان آزادی، دانشکده دامپزشکی، گروه بهداشت و کنترل‌مواد غذایی
صندوق‌پستی: ٦٤٥٣ – ١٤١٥٥ تلفن: ٦٦٩٢٣٥١٠ (٠٢١)، نمابر: ٦٦٩٣٣٢٢٢ (٠٢١)
پست الکترونیک: aakhond@ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۹/۸/۳ **تاریخ تصویب:** ۹۰/۳/۲۱

چکیده

مقدمه: به منظور کاهش، جلوگیری از رشد و یا حذف اجرام بیماری‌زا و عوامل فساد مواد غذایی تحقیقات فراوانی در جهت یافتن نگهدارنده‌های طبیعی صورت گرفته و در حال حاضر نیز در حال انجام است.

هدف: این مطالعه به منظور بررسی حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) لیزوزیم و اسانس آویشن شیرازی بر باکتری ***E. coli O_{157}: H_7*** و همین‌طور تأثیر غلظت‌های تحت بازدارنده‌ی این ترکیبات بر منحنی رشد باکتری فوق انجام گرفته است.

روش مطالعه: در این طرح غلظت‌های مختلف لیزوزیم (صفر، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) و اسانس آویشن شیرازی (صفر، ۰/۰۰۵، ۰/۰۱، ۰/۰۲، ۰/۰٤ و ۰/۰۸ درصد) به صورت تنها و توأم با هم در محیط آبگوشت قلب و مغز جهت تعیین MIC اسانس آویشن شیرازی و لیزوزیم به روش ماکرودایلوشن و میکرودایلوشن و همچنین اثر غلظت‌های تحت بازدارنده‌ی این ترکیبات بر منحنی رشد باکتری ***E. coli O_{157}: H_7*** بررسی شد.

نتایج: میزان حداقل بازدارندگی اسانس در دو روش ۰/۰٤ درصد به دست آمد، در حالی که غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر لیزوزیم نتوانست مانع رشد باکتری مذکور گردد. همچنین نتایج بررسی اثر ترکیبی نشان داد که بالاترین غلظت لیزوزیم نیز نتوانست میزان MIC محاسبه شده برای اسانس را کاهش دهد. اثر ترکیبی غلظت‌های تحت بازدارنده‌ی اسانس به تنهایی و همراه با لیزوزیم نشان داد که ترکیب این دو با هم باعث افزایش فاز تأخیری و کاهش سرعت رشد باکتری موردنظر شد.

نتیجه‌گیری: استفاده توأم لیزوزیم و اسانس باعث کاهش MIC نشد اما ترکیب این دو ماده باعث افزایش فاز تأخیری شده که دارای اهمیت در میکروبیولوژی مواد غذایی است.

گل واژگان: اسانس آویشن شیرازی، لیزوزیم، حداقل غلظت بازدارنده، اشرشیا کولی O_{157}:H_7

www.SID.ir

مقدمه

به منظور کنترل رشد باکتری‌های پاتوژن در محصولات غذایی می‌توان از نگهدارنده‌ها و ترکیبات ضدمیکروبی استفاده نمود. امروزه تمایل به استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی با توجه به اثرات مضر استفاده از نگهدارنده‌های شیمیایی افزایش یافته است.

اسانس‌های گیاهی و اجزاء تشکیل‌دهنده آنها دارای اثرات شناخته شده ضدمیکروبی هستند به طور کلی هر چه مقادیر مواد فنولیک در اسانس بالاتر باشد خواص آنتی‌باکتریال آن علیه پاتوژن‌های غذایی بیشتر خواهد بود. این ترکیبات شامل تیمول (Thymol)، کارواکرول (Carvacrol)، اوژنول (Eugenol) می‌باشند [۱].

از جمله این اسانس‌های گیاهی می‌توان از آویشن شیرازی نام برد که سرشاخه‌های خشک شده گیاه *Zataria multiflora* Boiss. می‌باشد. این گیاه از خانواده نعناعیان (Laminaceace) است که پراکندگی محدودی در جهان دارد و در ایران، افغانستان و پاکستان می‌روید [۲]. این گیاه از قرن ۱۶ میلادی به عنوان یک گیاه دارویی معرفی شده است [۳].

لیزوزیم یک عامل ضدمیکروبی با خاصیت لیزکنندگی دیواره سلولی باکتری‌هاست. نخستین محل اثر لیزوزیم در پپتیدوگلایکان دیواره سلول باکتری باند گلیکوزیدی بتا ۱ به ٤ بین N استیل گلوکز آمین و N استیل مورامیک اسید است که با هیدرولیز این باند باعث لیز سلولی می‌شود [٤،٥].

لیزوزیم به صورت رایج در غذاهایی چون پنیرها، گوشت پخته، انواع سوسیس (پختنی و سالامی)، برای مهار ترک خوردگی پنیر و تولیدات طیور به کار می‌رود. لیزوزیم برای جلوگیری از رشد بسیاری از کلستریدیوم‌ها از جمله کلستریدیوم بوتولینوم (*C. butolinum*) در غذا (سوسیس خوک یا بوقلمون، سالمون، مارچوبه، سیب‌زمینی، گوجه فرنگی و قارچ‌ها) مفید است [٥].

در این مطالعه اثر غلظت‌های مختلف لیزوزیم (صفر، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) و اسانس آویشن شیرازی (صفر، ۰/۰۰۵، ۰/۰۱، ۰/۰۲، ۰/۰٤ و ۰/۰۸ درصد) به صورت تنها و توأم با هم در محیط آبگوشت قلب و مغز جهت تعیین حداقل غلظت بازدارندگی رشد (Minimal inhibitory concentration) MIC اسانس آویشن شیرازی و لیزوزیم به روش ماکرو دایلشن و میکرو دایلوشن و همچنین اثر غلظت‌های تحت باز دارنده این ترکیبات بر منحنی رشد *E. coli* $O_{157}H_{:7}$ بررسی شد.

مواد و روش‌ها

تهیه اسانس آویشن شیرازی

گیاه آویشن شیرازی از استان فارس در فصل تابستان جمع‌آوری شد و نام علمی آن توسط گیاه‌شناسان پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی تأیید شد.

اسانس با روش تقطیر با بخار (Steam distillation) از سرشاخه‌های هوایی گیاه تهیه شد.

غلظت‌های مورد استفاده از اسانس آویشن شیرازی عبارتند از: صفر، ۰/۰۰۵، ۰/۰۱، ۰/۰۲، ۰/۰٤ و ۰/۰۸ درصد.

لیزوزیم

ابتدا پودر لیزوزیم خریداری شده از شرکت سروا (SERVA Electrophoresis, Gmbh, Heidelberg) در محیط آبگوشت BHI حاوی ۵ درصد (Dimethyl Sulfoxide) DMSO حل شد و توسط فیلتر میکروبیولوژیک ۰/٤٥ میکرومتر استریل شد. غلظت‌های به کار رفته لیزوزیم صفر، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود.

باکتری موردمطالعه

باکتری موردمطالعه *E. coli* O_{157}: H_7 وروتوکسیژنیک بود که کشت لیوفیلیزه آن از انستیتو تحقیقات میکروبیولوژی اتریش به دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران اهدا شده بود.

ابتدا کشت لیوفلیزه باکتری به مدت ۱۸ ساعت در دمای

Archive of SID
www.SID.ir

۳۷ درجه سانتی‌گراد در محیط آبگوشت قلب و مغز کشت داده شد. سپس کشت مجدد از کشت اول داده شد و به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

کشت دوم برای تهیه استوک به نسبت ۱ به ۵ با گلیسرین استریل مخلوط شد.

در حجم‌های ۱۰۰ میکرولیتری در لوله‌های اپندورف استریل در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

تهیه میزان تلقیح باکتری

جهت تهیه میزان تلقیح باکتری از کشت استوک به داخل محیط آبگوشت قلب و مغز برده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شد.

سپس از کشت اول کشت مجددی داده شد و در دمای ۳۷ درجه به مدت ۱۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شد.

از کشت دوم مقادیر مختلفی به داخل لوله‌ی کووتی (Cuvett) که حاوی ٤ سلسیوس آبگوشت قلب و مغز (Brain Heart Infusion) استریل بود، منتقل شد تا جذب نوری ۰/۱ در طول موج ٦۰۰ نانومتر به دست آید. سپس با انتقال ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتریایی داخل کووت، به لوله حاوی ۹ میلی‌لیتر آب پپتونه ۰/۱ درصد، رقت‌های متوالی تا ٦- تهیه شد.

از طریق انتقال ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت به پلیت‌های حاوی BHI آگار از رقت‌های تهیه شده، کشت داده شد. پلیت‌ها به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند و پس از این مدت، تعداد باکتری شمارش شد و از این طریق تعداد باکتری در کووت حاوی سوسپانسیون باکتری با جذب نوری معادل ۰/۱ محاسبه شد.

کل آزمایش ۲ مرتبه تکرار شده و میانگین تعداد باکتری در کووت با جذب نوری ۰/۱ معادل 1×10^{8} cfu/ml محاسبه شد. با مشخص شدن این عدد هرگاه که سوسپانسیون باکتریایی با جذب نوری ۰/۱ تهیه شود، تعداد باکتری در آن معادل عدد محاسبه شده بوده و می‌توان از این سوسپانسیون غلظت‌های دلخواه را تهیه نمود.

البته در هر مورد تعداد دقیق باکتری تلقیح شده از طریق کشت همزمان باکتری و شمارش تعداد کلونی محاسبه شد.

تعیین حداقل غلظت باز دارنده رشد به روش ماکرو دایلوشن (Macrodilution)

ابتدا پودر لیزوزیم در محیط آبگوشت BHI حاوی ۵ درصد DMSO حل شد و توسط فیلتر میکروبیولوژیک ۰/٤۵ میکرومتر استریل شد. سپس غلظت‌های متوالی لیزوزیم (صفر، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر) و غلظت‌های متوالی اسانس آویشن شیرازی (صفر، ۰/۰۰۵، ۰/۰۱، ۰/۰۲، ۰/۰٤ و ۰/۰۸ درصد) در محیط آبگوشت قلب و مغز حاوی ۵ در صد DMSO تهیه شد. به هر یک از رقت‌های تهیه شده از لیزوزیم و آویشن شیرازی، ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی تهیه شده (به غلظت نهایی باکتری 5×10^{5} cfu/ml) اضافه شد. سپس لوله‌ها به مدت ٢٤ ساعت در ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند و کدورت یا عدم کدورت در لوله‌ها مشاهده شد و میزان حداقل غلظت بازدارندگی اسانس به تنهایی و همچنین لیزوزیم به تنهایی و حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی ترکیب اسانس و لیزوزیم تعیین شد.

به ازای هر حالت ذکر شده ۲ لوله استفاده شد و کل آزمایش دوبار تکرار شد. حالات مورد مطالعه مطابق جدول شماره ۱ تهیه شد.

تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد به روش میکرودایلوشن (Microdilution)

اساس این روش مشابه ماکرودایلوشن است. با این تفاوت که به جای لوله آزمایش از پلیت‌های ۹٦ خانه با چاهک ته گرد و با حجم ۳۰۰ میکرولیتر استفاده شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از لیزوزیم و اسانس به هر چاهک انتقال داده شد و ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری نیز اضافه شد (غلظت نهایی باکتری در هر چاهک 5×10^{5} cfu/ml) محتویات هر چاهک به مدت ۲ دقیقه توسط Plate Reader مجهز به Shaker مخلوط شد.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول شماره ۱- حالت‌های موردمطالعه در ارتباط با غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی و لیزوزیم

غلظت لیزوزیم (L) (µg/ml)	غلظت اسانس آویشن شیرازی (Z) (درصد)											
	۰		۰/۰۰۵		۰/۰۱		۰/۰۲		۰/۰۴		۰/۰۸	
۰	L=۰	Z=۰	L=۰	Z=۰/۰۰۵	L=۰	Z=۰/۰۱	L=۰	Z=۰/۰۲	L=۰	Z=۰/۰۴	L=۰	Z=۰/۰۸
۱۲۵	L=۱۲۵	Z=۰	L=۱۲۵	Z=۰/۰۰۵	L=۱۲۵	Z=۰/۰۱	L=۱۲۵	Z=۰/۰۲	L=۱۲۵	Z=۰/۰۴	L=۱۲۵	Z=۰/۰۸
۲۵۰	L=۲۵۰	Z=۰	L=۲۵۰	Z=۰/۰۰۵	L=۲۵۰	Z=۰/۰۱	L=۲۵۰	Z=۰/۰۲	L=۲۵۰	Z=۰/۰۴	L=۲۵۰	Z=۰/۰۸
۵۰۰	L=۵۰۰	Z=۰	L=۵۰۰	Z=۰/۰۰۵	L=۵۰۰	Z=۰/۰۱	L=۵۰۰	Z=۰/۰۲	L=۵۰۰	Z=۰/۰۴	L=۵۰۰	Z=۰/۰۸
۱۰۰۰	L=۱۰۰۰	Z=۰	L=۱۰۰۰	Z=۰/۰۰۵	L=۱۰۰۰	Z=۰/۰۱	L=۱۰۰۰	Z=۰/۰۲	L=۱۰۰۰	Z=۰/۰۴	L=۱۰۰۰	Z=۰/۰۸

سپس جذب نوری با استفاده از Plate reader در ساعت صفر و با طول موج ۶۳۰ نانومتر خوانده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند و بعد از اتمام گرمخانه‌گذاری کدورت یا عدم کدروت در چاهک‌ها به صورت چشمی مشاهده و جذب نوری توسط Plate reader در طول موج ذکر شده خوانده شد.

بررسی اثر لیزوزیم و اسانس بر نمودار رشد باکتری

در این مرحله اثر غلظت‌های تحت باز دارنده لیزوزیم و اسانس به تنهایی و به صورت توام با هم روی رشد باکتری *E. coli* O_{157}:H_7 در طی ۲۴ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت.

غلظت‌های مورداستفاده عبارتند از:

لیزوزیم: صفر و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر

اسانس آویشن شیرازی: صفر و ۰/۰۱ درصد

مجموع حالات مورد استفاده در جدول شماره ۲ آمده است.

غلظت‌های مورداستفاده در محیط آبگوشت قلب و مغز حاوی ۵ درصد DMSO تهیه شد. ۱۰ میلی‌لیتر از محلول‌های حاوی غلظت‌های فوق در لوله‌ها توزیع شد، سپس ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری با غلظت (۵×۱۰^{۷}cfu/ml) به هر چهار لوله اضافه شد (غلظت نهایی باکتری ۵×۱۰^{۵} cfu/ml). لوله‌ها در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند و در ساعت‌های صفر، ۱، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰ و ۲۴ رقت‌های مورد مطالعه از هر ۴ لوله تهیه شد و ۱۰۰ میکرولیتر از این رقت‌ها به پلیت BHI آگار انتقال داده شد و بعد از گرمخانه‌گذاری به مدت ۲۴ ساعت در ۳۵ درجه سانتی‌گراد شمارش تعداد کلونی انجام شد و تعداد باکتری‌ها در ساعات موردنظر محاسبه شد. تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16 for windows صورت گرفت.

جهت مقایسه داده‌ها از تست One- way ANOVA همراه Tukey استفاده شد و اختلاف میانگین داده‌ها در سطح ۰/۰۵ از لحاظ آماری معنی‌دار تلقی شد.

نتایج

نتایج تعیین حداقل غلظت بازدارندگی به روش ماکرودایلوشن و میکرودایلوشن

حداقل غلظت بازدارندگی اسانس آویشن شیرازی در هر دو روش ۰/۰۴ درصد به دست آمد. ولی لیزوزیم حتی در بالاترین غلظت نتوانست مانع رشد باکتری *E. coli* O_{157}: H_7

Archive of SID
www.SID.ir

شود. حداقل غلظت بازدارندگی لیزوزیم بیش از ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر محاسبه شد. همچنین ترکیب همزمان غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی و لیزوزیم، اثری بر کاهش میزان محاسبه شده برای هر یک از این دو ماده نداشت.

در روش میکرودایلوشن علاوه بر اندازه‌گیری MIC به روش چشمی، میزان MIC به روش اندازه‌گیری جذب نوری نیز مورد بررسی قرار گرفت که نتایج حاصل با نتایج مشاهده چشمی مطابقت داشت (جدول شماره‌های ۳ و ٤).

جدول شماره ۲- مجموع حالات مورد استفاده در بررسی اثر غلظت‌های مختلف لیزوزیم و اسانس آویشن شیرازی روی نمودار رشد باکتری

	حالت اول	حالت دوم	حالت سوم	حالت چهارم
غلظت لیزوزیم (gμ/(L) ml)	صفر	صفر	۱۰۰۰	۱۰۰۰
غلظت اسانس آویشن شیرازی (Z) (درصد)	صفر	۰/۰۱	صفر	۰/۰۱

جدول شماره ۳- جذب نوری حالت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی و لیزوزیم قبل از گرمخانه گذاری

غلظت لیزوزیم (L) (ml)/gμ	غلظت اسانس آویشن شیرازی (z) (درصد)					
	صفر	۰/۰۰۵	۰/۰۱	۰/۰۲	۰/۰٤	۰/۰۸
صفر	۳/۳۷۵×۱۰$^{-1}$± *۳/۵×۱۰$^{-3}$	۳/۲۲×۱۰$^{-1}$	۳/۰٦×۱۰$^{-1}$± ٦×۱۰$^{-3}$	۳/۰۲۵×۱۰$^{-1}$± ۱/۵×۱۰$^{-3}$	۲/۲۵×۱۰$^{-1}$± ۱/٤×۱۰$^{-2}$	۳/۰۸×۱۰$^{-1}$± ٤×۱۰$^{-3}$
۱۲۵	۳/۰۵۵×۱۰$^{-1}$± ۱/۳۵×۱۰$^{-2}$	۳/۱٦۵×۱۰$^{-1}$± ۸/۵×۱۰$^{-3}$	۳/۰۱۵×۱۰$^{-1}$± ۷×۱۰$^{-3}$	۳/۲۲۵ × ۱۰$^{-1}$± ۲/۵×۱۰$^{-3}$	۳/۲۲×۱۰$^{-1}$± ۷×۱۰$^{-3}$	۳/۲۵۵× ۱۰$^{-1}$± ۵×۱۰$^{-4}$
۲۵۰	۳/۳٦۵×۱۰- ۱±۵×۱۰-٤	۳/۲۸×۱۰- ۱±۱/۲×۱۰-۲	۳/۰٦۵×۱۰- ۱±۱/۲۵×۱۰-۲	۳/۱۷×۱۰- ۱±۱۰-۳	۳/۲×۱۰$^{-1}$± ۳×۱۰$^{-3}$	۳/۲۳۵×۱۰$^{-1}$± ۲/۵×۱۰$^{-3}$
۵۰۰	۳/۹۸×۱۰$^{-1}$±۱×۱۰$^{-3}$	۳/۳۱۵×۱۰$^{-1}$± ۵×۱۰$^{-4}$	۳/۲۰۵×۱۰$^{-1}$± ۵/۵×۱۰$^{-3}$	۳/۳۵۵×۱۰$^{-1}$± ۵×۱۰$^{-4}$	۳/۲۸۵×۱۰$^{-1}$± ٦/۵×۱۰$^{-3}$	۳/۵×۱۰$^{-1}$±۲×۱۰$^{-3}$
۱۰۰۰	۳/۳۷۵×۱۰$^{-1}$± ۳/۵×۱۰$^{-3}$	۳/٤۱۵×۱۰$^{-1}$± ٦/۵×۱۰$^{-3}$	۳/٤۱۵×۱۰$^{-1}$± ۲/۵×۱۰$^{-3}$	۳/٤×۱۰$^{-1}$± ٤×۱۰$^{-3}$	۳/۲۷×۱۰$^{-1}$± ۲×۱۰$^{-3}$	۳/۱۷۵×۱۰$^{-1}$± ۵×۱۰$^{-4}$
۰						

*میانگین ± انحراف معیار

جدول شماره ٤- جذب نوری حالت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی و لیزوزیم بعد از گرمخانه‌گذاری

غلظت لیزوزیم (L) (ml)/gμ	غلظت اسانس آویشن شیرازی (z) (درصد)					
	صفر	۰/۰۰۵	۰/۰۱	۰/۰۲	۰/۰٤	۰/۰۸
صفر	۵/۰۷۵×۱۰$^{-1}$± *۹/۵×۱۰$^{-3}$	۵/۸۳۵×۱۰$^{-1}$± ۵×۱۰$^{-3}$	۵/۷۸×۱۰$^{-1}$± ۱×۱۰$^{-2}$	۵/۷۸×۱۰$^{-1}$± ۲×۱۰$^{-2}$	۲/۳۲×۱۰$^{-1}$± ۱/۵×۱۰$^{-2}$	۳/۱۷۵× ۱۰$^{-1}$± ۵×۱۰$^{-4}$
۱۲۵	۵/۱۰۵×۱۰$^{-1}$± ۵/٤۵×۱۰$^{-2}$	٤/٤٤۵×۱۰$^{-1}$± ۲/۵×۱۰$^{-3}$	٤/٤۰۵×۱۰$^{-1}$± ۸/۵×۱۰$^{-3}$	٤/٦۲×۱۰$^{-1}$± ۲/۲۵×۱۰$^{-2}$	۳/۲۸×۱۰$^{-1}$± ۸×۱۰$^{-3}$	۳/۳۵×۱۰$^{-1}$± ۲×۱۰$^{-3}$
۲۵۰	۵/۵۳۵×۱۰$^{-1}$± ۵×۱۰$^{-2}$	٤/۸۲×۱۰$^{-1}$± ۱×۱۰$^{-3}$	٤/۸×۱۰$^{-1}$± ۳/۳×۱۰$^{-2}$	٤/٦۱×۱۰$^{-1}$± ۱۰$^{-3}$	۳/۲۱۵×۱۰$^{-1}$± ۱/۵×۱۰$^{-3}$	۳/۳۱×۱۰$^{-1}$± ۲×۱۰$^{-3}$
۵۰۰	۵/۰۵۵×۱۰$^{-1}$± ٦/۲۵×۱۰$^{-2}$	٤/٦٤۵×۱۰$^{-1}$± ۱/٤×۱۰$^{-2}$	٤/۵۹۵×۱۰$^{-1}$± ۱/٤۵×۱۰$^{-2}$	٤/۹٤×۱۰$^{-1}$± ۲/۵×۱۰$^{-2}$	۳/۳۵۵×۱۰$^{-1}$± ۹/۵×۱۰$^{-3}$	۳/۵۹۵×۱۰$^{-1}$± ۵×۱۰$^{-4}$
۱۰۰۰	۵/۷۳۵×۱۰$^{-1}$± ٦/۵×۱۰$^{-3}$	۵/۸۷×۱۰$^{-1}$± ۷×۱۰$^{-3}$	۵/۳۹۵×۱۰$^{-1}$± ۲/۰۵×۱۰$^{-2}$	۵/٦۲×۱۰-۱± ۳/۹۵×۱۰$^{-2}$	۳/۳×۱۰$^{-1}$± ۱۰$^{-3}$	۳/۱۹×۱۰$^{-1}$± ۳×۱۰$^{-3}$

*میانگین ± انحراف معیار

Archive of SID

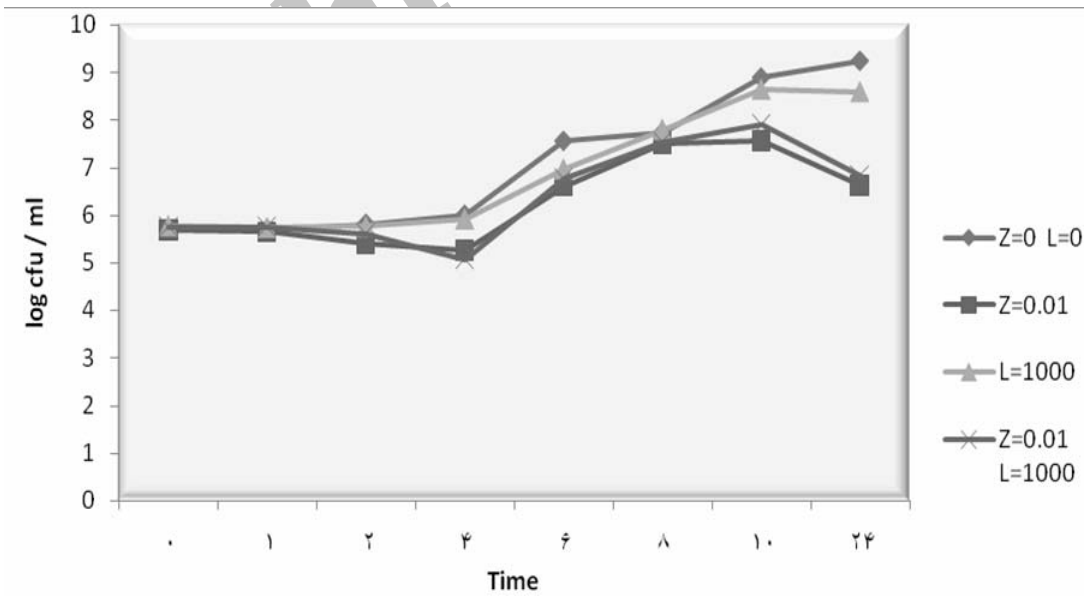
www.SID.ir

نتایج بررسی منحنی رشد باکتری *E. coli O_{157}: H_7* در حضور اسانس آویشن شیرازی و لیزوزیم

همان‌گونه که در نمودار شماره ۱ مشخص است غلظت ۰/۰۱ درصد اسانس آویشن شیرازی به تنهایی باعث کاهش سرعت رشد باکتری به طور معنی‌دار ($p < ۰/۰۵$) نسبت به گروه کنترل شده به طوری که در ساعت ۱۰ گرمخانه‌گذاری لگاریتم تعداد باکتری در این گروه ۷/۵۶ ($۳/۷\times۱۰^{۷}$ cfu/ml) بوده در حالی که در گروه کنترل لگاریتم تعداد باکتری در این ساعت ۸/۸۸ ($۷/۶\times۱۰^{۸}$ cfu/ml) می‌باشد. غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر لیزوزیم به تنهایی تأثیر چندانی بر منحنی رشد باکتری در مقایسه با گروه کنترل نداشت. حضور همزمان غلظت ۰/۰۱ درصد اسانس آویشن شیرازی و غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر هم باعث کاهش رشد باکتری نسبت به گروه کنترل تا ساعت ٤ گرمخانه‌گذاری شد اما در ساعت ۸ به بعد لگاریتم تعداد باکتری به ۷/٥٤ ($٥/٣\times۱۰^{۷}$ cfu/ml) رسید که تفاوت معنی‌داری با گروه‌های دیگر نداشت. اما در ساعت ۲٤ تفاوت معنی‌داری به لحاظ شمارش باکتری بین ترکیب غلظت ۰/۰۱ درصد آویشن و غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر لیزوزیم و گروه کنترل مشاهده شد. از طرفی منحنی رشد باکتری در این گروه شباهت بسیاری به گروه حاوی غلظت ۰/۰۱ درصد اسانس آویشن شیرازی به تنهایی داشت.

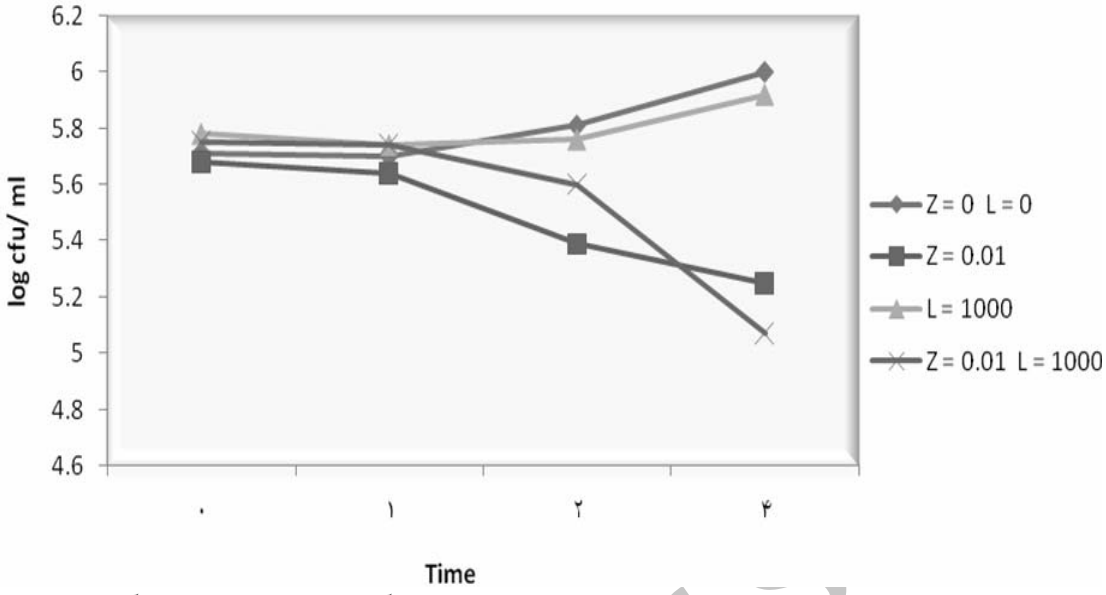
در نمودار ۲ فاز تأخیری منحنی رشد باکتری *E. Coli O_{157}: H_7* در حضور غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی و لیزوزیم نشان داده شده است. همان‌گونه که در نمودار شماره ۲ مشخص است در گروه کنترل طی ساعت اول گرمخانه‌گذاری، شمارش تعداد باکتری تغییر معنی‌داری را نشان نداد و از ساعت ۲ به بعد افزایش معنی‌دار تعداد باکتری مشاهده شد.

در حضور غلظت ۰/۰۱ درصد اسانس آویشن شیرازی کاهش تعداد باکتری تا ساعت ٤ گرمخانه‌گذاری مشاهده شد و از این ساعت به بعد افزایش تعداد باکتری و شروع فاز لگاریتمی مشاهده می‌شود. در محیط حاوی ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر لیزوزیم در طی ساعت اول تغییر معنی‌داری در تعداد باکتری دیده نشد و از آن به بعد تعداد باکتری افزوده شد. حضور همزمان اسانس آویشن شیرازی و لیزوزیم باعث کاهش چشمگیر تعداد باکتری در ٤ ساعت اول گرمخانه‌گذاری شد و بعد از آن افزایش تعداد باکتری مشاهده شد.



نمودار شماره ۱- منحنی رشد باکتری *E. coli O_{157}: H_7* در حضور اسانس آویشن شیرازی و لیزوزیم (Z: آویشن L لیزوزیم)

Archive of SID
www.SID.ir



نمودار شماره ۲- فاز تاخیری منحنی رشد باکتری *E. coli* O_{157}: H_7 در حضور اسانس آویشن شیرازی و لیزوزیم (Z: آویشن L: لیزوزیم)

بحث

بی‌تردید صنایع غذایی یکی از مهم‌ترین صنایع موجود در ایران و جهان است که تولید محصولات غذایی با رویکرد افزایش ایمنی و ارزش غذایی برای حفظ سلامت جامعه یکی از راهبردهای مهم این صنایع می‌باشد که علاوه بر رفع گرسنگی باعث افزایش عمر و ارتقاء سلامت می‌شود.

در سال‌های اخیر مطالعات فراوانی پیرامون استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی در صنایع غذایی صورت گرفته است از جمله این ترکیبات ضدمیکروبی طبیعی، اسانس‌های گیاهی و لیزوزیم می‌باشد. در مورد خواص ضدمیکروبی اسانس آویشن شیرازی مطالعات مختلفی صورت گرفته است.

بررسی آخوندزاده و همکاران نشان داد که اسانس آویشن شیرازی (غلظت‌های ۰/۰۳ و ۰/۰٦) به طور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) بر روی رشد استافیلوکوکوس طلایی تأثیرگذار است [٦].

مطالعات گندمی و همکاران اثر معنی‌دار اسانس آویشن شیرازی را بر رشد و اسپورزایی آسپرژیلوس فلاووس نشان داد ($p<۰/۰۵$). همچنین میزان MIC و MFC در این مطالعات به ترتیب ٤۰۰ و ۱۰۰۰ پی پی ام به دست آمد [۷].

Karaman و همکاران در سال ۲۰۰۱ اثرات باکتریو استاتیک قوی اسانس *Thymus Revolatus* را بر روی باکتری‌های گرم منفی نشان دادند. آنها احتمال دادند این اثرات به علت میزان بالای کارواکرول موجود در اسانس می‌باشد [۸].

مطالعات Bagamboula و همکاران در سال ۲۰۰٤ بر روی اسانس آویشن و ترکیبات کارواکرول و تیمول بر روی باکتری شیگلا، نشان داد که این ترکیبات اثر باکتریوسیدی برروی این باکتری دارند [۹].

- فاضلی و همکاران (۲۰۰۷) اثر ضدمیکروبی عصاره آویشن شیرازی و سماق را بر ضدباکتری‌های باسیلوس سرئوس، استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلی، سالمونلاتیفی، پروتئوس ولگاریس و شیگلافلکسنری به دو روش دیسک و ول دیفیوژن (Disc & well diffusion) بررسی کردند. MIC آویشن شیرازی علیه باکتری‌های مورد مطالعه ۰/٤ تا ۰/۸

Archive of SID
www.SID.ir

درصد به دست آمد. در حالی که سالمونلاتیفی در غلظت ۰/۸ درصد عصاره آویشن شیرازی مقاومت نشان داد [۱۰].

– دخیلی و همکاران (۱۳۸۵) اثرات ضدمیکروبی چهار اسانس دارویی از جمله آویشن شیرازی، خالواش، مرزنجوش و رازیانه را روی باکتری سالمونلا تیفی موریوم بررسی کردند. MIC گیاه آویشن شیرازی ۱۵۶/۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بوده است. در این مطالعه همچنین مشخص شد که تأثیر اسانس آویشن شیرازی بر سالمونلا تیفی موریوم در مقایسه با ۳ آنتی‌بیوتیک اکسی تراسایکلین، فلومکوئین و اریترومایسین بسیار بیشتر بوده است [۱۱].

– اوسالا و همکاران (۲۰۰۶) اثر تعدادی از اسانس‌های گیاهی بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در محیط آبگوشت قلب و مغز را بررسی کردند که حداقل غلظت بازدارنده حدود ۰/۰۵ درصد به دست آمد [۱۲].

– ژانگ و همکاران (۲۰۰۶) اثر مهاری لیزوزیم را بر ضدکلستریدیوم پرفرنژانس تیپ A و توکسین تولیدی آن، به روش میکرودایلوشن بررسی کردند و معلوم شد لیزوزیم با MIC برابر با ۱۵۶ میکروگرم در میلی‌لیتر از رشد این باکتری جلوگیری می‌کند ولی برای مهار توکسین، ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر لیزوزیم نیاز بود [۱۳].

مطالعاتی در ارتباط با اثر سینرژیستی اسانس‌های گیاهی و دیگر ترکیبات و عوامل ضدمیکروبی صورت گرفته است.

– بولند و همکاران (۲۰۰۳) اثر مهاری سه شلاته کننده EDTA، دی سدیم پیروفسفات (DSPP) و پنتاسدیم تری‌پلی‌فسفات (DSTPP) به همراه لیزوزیم را برای مهار رشد ٤ گونه *E. coli O_{157}:H_7* بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که افزودن EDTA فعالیت مهاری لیزوزیم را روی گونه‌های اشرشیاکلی افزایش می‌دهد ولی شلاته کننده‌های فسفات‌دار نیاز به میزان بیشتری لیزوزیم برای مهار اشرشیاکلی دارند [۱٤].

– رضوی روحانی و همکاران (۱۹۹۵) اثر لیزوزیم، BHA (***Butylated hydroxyanizole***)، نمک، pH و عوامل شلاته کننده (EDTA) را علیه باکتری‌های پاتوژن غذایی بررسی کرده و مشاهده کردند لیزوزیم همراه با BHA بر ضدباکتری‌ها (در حضور یا عدم حضور EDTA) با وجود pH پایین‌تر و غلظت نمک بالاتر، اثر مهاری بالاتری داشت. لیزوزیم با شلاته کننده‌های دیگر مثل سدیم سیترات و منوگلیسرول سیترات قادر به مهار کردن نبود [۱۵].

– پارک و همکاران (۲۰۰٤) ثابت کردند که فعالیت ضدباکتری لیزوزیم می‌تواند با الحاق به چیتوزان تقویت شود که این مسأله می‌تواند استفاده از این مواد را در صنایع غذایی افزایش دهد [۱٦].

– اسمیت و همکاران (۱۹۹۱) تأثیر لیزوزیم و حرارت را بر رشد لیستریا منوسیتوژن بررسی و پیشنهاد کردند، لیزوزیم می‌تواند به عنوان نگهدارنده در کنترل این باکتری در غذاهایی که سرد مصرف می‌شوند، استفاده شود [۱۷].

– لیستنر و گوریس (Leistner & Gorris) (۱۹۹۵) بیان کردند که استفاده از غلظت‌های بالای اسانس باعث ایجاد اثرات نامطلوب روی طعم غذا می‌شود و استفاده از یک نگهدارنده با مقادیر بالا مقرون به صرفه نمی‌باشد. پیشنهاد کردند که از چند نگهدارنده با مقادیر کم استفاده شود تا ماندگاری خواص ظاهری غذا، ارزش تغذیه‌ای و صرفه اقتصادی آن بهتر باشد [۱۸].

در مطالعه حاضر حداقل غلظت بازدارندگی اسانس آویشن شیرازی ۰/۰٤ درصد به دست آمد. غلظت ۰/۰۱ درصد به تنهایی باعث کاهش سرعت رشد باکتری نسبت به گروه کنترل شد. بنابراین این اسانس قادر است به عنوان یک نگهدارنده مناسب علیه باکتری‌های پاتوژن غذایی مورد استفاده قرار گیرد.

ماده مورد مطالعه دیگر لیزوزیم بود و نتایج نشان داد که لیزوزیم در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نتوانست مانع رشد باکتری شود و تأثیر چندانی روی منحنی رشد باکتری نداشت که علت این امر می‌تواند به علت مقاوم بودن باکتری نسبت به آنزیم باشد.

در تحقیق حاضر اثر توأم اسانس آویشن شیرازی و لیزوزیم روی باکتری *E. coli O_{157}:H_7* در محیط آبگوشت قلب و مغز مورد بررسی قرار گرفت که حضور توأم لیزوزیم و اسانس

Archive of SID
www.SID.ir

باعث کاهش MIC نشد، اما نتایج بررسی منحنی رشد نشان می‌دهد که ترکیب این دو ماده باعث افزایش فاز تأخیری شده است که این امر در میکروبیولوژی مواد غذایی دارای اهمیت است.

منابع

1. Dufour M, Simmonds RS and Brem PJ. Development of a method to quantify in vitro the synergistic activity of "natural" antimicrobials. *Food Microbiol*. 2002; 85: 249 - 58.

2. Misaghi A, Akhondzadeh Basti A. Effects of *Zataria multiflora* Boiss. Essential oil and nisin on *Bacillus cereus* ATCC 11718. *Food Control* 2007; 18: 1043 – 9.

3. Jamzade M. Handbook of zataria. Research Institute of Forests and RangelandsTehran 1995, pp: 1 - 7.

4. Proctor VA, Cunningham FE. The chemistry of lysozymeand its use as a food preservative and a pharmaceutical. *J. Food Sci Nutr*. 1988; 26: 359 - 95.

5. Davidson MP, Sofa NJ, Branen LA. Antimicrobials in Food. 3th ed. Boca Raton: Taylor & Francis. 2005, pp: 361 - 79.

6. Basti AA, Misaghi A, Moosavy MH, Zahraei Salehi T, Karim G. Effect of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil on the growth of *Staphylococcus aureus* in a commercial barley soup. *J. Med. Plants* 2007; 6 (22): 91 - 8.

7. Gandomi Nasrabadi H. Misaghi A. Basti AA, Khosravi A. Bokaei S. Abbasifar A. Effects of *Zataria multiflora* Boiss. Essential Oil on *Aspergillus flavus*. *J. Med. Plants* 2009; 32: 45 – 51.

8. Karman S, Digark M, Ravid U, lcium A. Antimicrobial and Antifungal activity of essential oils of *thymus revolutus* celak from Turkey. *J. Ethnopharmacol*. 2001; 76: 183 - 6.

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

10. Fazeli M, Amin GH, Ahmadian Attari M, Ashtiani H, Jamalifar H, Samadi N. Antimicrobial activities of Iranian sumac and avishan-e shirazi (*Zataria multiflora*) against some food-borne bacteria. *Food Control*. 2007; 18: 646 - 9.

11. Dakhili M, Zahraei Salehi T, Torabi Goodarzi M, Khavari A. Evaluation of Antimicrobial Effects of 4 Medicinal Plants Against *Salmonella typhimurium* and Comparision them with Common Antibiotics. *J. Med. Plants* 2007; 20: 21 - 6.

12. Oussalah M, Caillet S, Saucier L, Lacotrix M. Inhibitory effect of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli O157: H7, Salmonella typhimurium, Staphylococcus aureus and Listeria monocytogenes*. *Food Control* 2007; 18: 412 - 4.

13. Zhang G, Darius S, Smith SR, Ritchie SJ. In vitro inhibitory effect of hen egg white lysozyme on *Clostridium perfringens* type A associated with broiler necrotic enteritis and its α-toxin production. *Appl. Microbiol*. 2006; 42: 138 - 43.

14. Boland JS, Davidson PM, Weiss J. Enhanced inhibition of *Escherichia coli O157:H7* by lysozyme and chelators. *J. Food Protect*. 2003; 66:1783 - 9.

15. Razavi-Rohani SM, Griffiths MW. The effect of lysozym and butylated hydroxyanizole on spoilage and pathogenic bacteria associated with food. *J. Food Safety* 1996; 16: 59 - 74.

16. Park SI, Daeschel MA, Zhao Y. Functional properties of antimicrobial lysozyme-chitosan composite film. *J. Food Sci*. 2004; 69: 215 - 21.

Archive of SID

www.SID.ir

17. Smith JL, Mccolgan C, Marmer BS, Growth temperature and action of lysozyme on *Listeria monocytogenes*. *Food Sci*. 1991; 56: 1101 - 3.

18. Leistner L, Grris LMG. Food preservation by hurdle technology. *Trends Food Sci. Tech*. 1995; 6: 35 - 67.

Archive of SID

www.SID.ir