

تعیین میزان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) لیزوزیم و آویشن شیرازی بر باکتری

E. coli O157: H7

اعظم حسین زاده^۱، طاهره مهاجرفر^۲، افشین آخوندزاده بستی^{۳*}، علی خنجری^۴، حسن گندمی نصرآبادی^۵، علی میثاقی^۶، سمیه صادقی^۷

- 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
- ۴- استادیار، گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران
- ۵- دانشیار گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران
- *آدرس مکاتبه: تهران، خیابان آزادی، دانشکده دامپزشکی، گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی
صندوق پستی: ۶۴۵۳ - ۱۴۱۵۵ تلفن: ۶۶۹۲۳۵۱۰ (۰۲۱)، نمابر: ۶۶۹۳۳۲۲۲ (۰۲۱)
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 O157: H7* 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، ۰/۰۴ 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 میکروداایلوشن و همچنین اثر غلظت‌های تحت بازدارنده‌ی این ترکیبات بر منحنی رشد باکتری *E. coli O157: H7* بررسی شد.

نتایج: میزان حداقل بازدارندگی اسانس در دو روش ۰/۰۴ 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.

کل واژگان: اسانس آویشن شیرازی، لیزوزیم، حداقل غلظت بازدارنده، اشرشیا کولی *O157:H7*



مقدمه

به منظور کنترل رشد باکتری‌های پاتوژن در محصولات غذایی می‌توان از نگهدارنده‌ها و ترکیبات ضد میکروبی 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 ضد میکروبی 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 نعنائیان (Laminaceae) 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 ضد میکروبی با خاصیت لیزکنندگی دیواره سلولی باکتری‌هاست. نخستین محل اثر لیزوزیم در پپتیدوگلاایکان دیواره سلول باکتری باند گلیکوزیدی بتا ۱ به ۴ بین N استیل گلوکز آمین و N استیل مورامیک اسید است که با هیدرولیز این باند باعث لیز سلولی می‌شود [۴، ۵].

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 [۵].

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، ۰/۰۴ 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) اسانس آویشن شیرازی و لیزوزیم به روش ماکرو دایلشن و میکرو دایلشن و همچنین اثر غلظت‌های تحت باز دارنده این ترکیبات بر منحنی رشد *E. coli O157H7* 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 پژوهشگاه گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی 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، ۰/۰۴ 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 ۰/۴۵ میکرومتر استریل شد. غلظت‌های به کار رفته لیزوزیم صفر، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود.

باکتری مورد مطالعه

باکتری مورد مطالعه *E. coli O157: H7* وروتوکسیژنیک بود که کشت لیوفیلیزه آن از انستیتو تحقیقات میکروبیولوژی تریش به دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران اهدا شده بود. ابتدا کشت لیوفیلیزه باکتری به مدت ۱۸ ساعت در دمای



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 دایلوژن (Macrodilution)

ابتدا پودر لیزوزیم در محیط آگوش BHI حاوی ۵ درصد DMSO حل شد و توسط فیلتر میکروبیولوژیک ۰/۴۵ 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، ۰/۰۴ و ۰/۰۸ درصد) در محیط آگوش قلب و مغز حاوی ۵ درصد 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 ۲۴ 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 میکرو دایلوژن (Microdilution)

اساس این روش مشابه ماکرو دایلوژن است. با این تفاوت که به جای لوله آزمایش از پلیت‌های ۹۶ 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.

۳۷ درجه سانتی‌گراد در محیط آگوش 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 آگوش 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 ۴ سلسیوس آگوش قلب و مغز (Brain Heart Infusion) استریل بود، منتقل شد تا جذب نوری ۰/۱ در طول موج ۶۰۰ 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 ۶- 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 ۲۴ 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.



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

غلظت اسانس آویشن شیرازی (Z) (درصد)											
۰		۰/۰۰۵		۰/۰۱		۰/۰۲		۰/۰۴		۰/۰۸	
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	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	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	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	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

غلظت لیزوزیم (μg/ml) (L)

میکرولیتر سوسپانسیون باکتری با غلظت (5×10^7 cfu/ml) به هر چهار لوله اضافه شد (غلظت نهایی باکتری 5×10^6 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 مورد نظر 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 ماکرودایلوژن و میکرودایلوژن

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 O157: H7*

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 کدورت 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 توأم با هم روی رشد باکتری *E. coli O157: H7* در طی ۲۴ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت.

غلظت‌های مورد استفاده 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 مورد استفاده 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



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

در روش میکرودايلوشن علاوه بر اندازه گیری MIC به روش چشمی، میزان MIC به روش اندازه گیری جذب نوری نیز مورد بررسی قرار گرفت که نتایج حاصل با نتایج مشاهده چشمی مطابقت داشت (جدول شماره های ۳ و ۴).

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

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

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

غلظت اسانس آویشن شیرازی (Z) (درصد)						غلظت لیزوزیم (ml)/gμ (L)
صفر	۰/۰۰۵	۰/۰۱	۰/۰۲	۰/۰۴	۰/۰۸	
۳/۳۷۵×۱۰ ^{-۱} ±	۳/۲۲×۱۰ ^{-۱}	۳/۰۶×۱۰ ^{-۱} ±	۳/۰۲۵×۱۰ ^{-۱} ±	۲/۲۵×۱۰ ^{-۱} ±	۳/۰۸×۱۰ ^{-۱} ±	صفر
۳/۵×۱۰ ^{-۳} *		۶×۱۰ ^{-۳}	۱/۵×۱۰ ^{-۳}	۱/۴×۱۰ ^{-۲}	۴×۱۰ ^{-۳}	
۳/۰۵۵×۱۰ ^{-۱} ±	۳/۱۶۵×۱۰ ^{-۱} ±	۳/۰۱۵×۱۰ ^{-۱} ±	۳/۰۲۵×۱۰ ^{-۱} ±	۳/۲۲×۱۰ ^{-۱} ±	۳/۲۵۵×۱۰ ^{-۱} ±	۱۲۵
۱/۳۵×۱۰ ^{-۲}	۸/۵×۱۰ ^{-۳}	۷×۱۰ ^{-۳}	۲/۵×۱۰ ^{-۳}	۳	۵×۱۰ ^{-۴}	
۳/۳۶۵×۱۰ ^{-۱} ±	۳/۲۸×۱۰ ^{-۱} ±	۳/۰۶۵×۱۰ ^{-۱} ±	۳/۱۷×۱۰ ^{-۱} ±	۳/۲×۱۰ ^{-۱} ±	۳/۲۳۵×۱۰ ^{-۱} ±	۲۵۰
۱±۵×۱۰ ^{-۴}	۱±۱/۲×۱۰ ^{-۲}	۱±۱/۲۵×۱۰ ^{-۲}	۱±۱۰ ^{-۳}	۳×۱۰ ^{-۳}	۲/۵×۱۰ ^{-۳}	
۳/۹۸×۱۰ ^{-۱} ±	۳/۳۱۵×۱۰ ^{-۱} ±	۳/۲۰۵×۱۰ ^{-۱} ±	۳/۳۵۵×۱۰ ^{-۱} ±	۳/۲۸۵×۱۰ ^{-۱} ±	۳/۵×۱۰ ^{-۱} ±	۵۰۰
۱×۱۰ ^{-۳}	۵×۱۰ ^{-۴}	۵/۵×۱۰ ^{-۳}	۵×۱۰ ^{-۴}	۶/۵×۱۰ ^{-۳}	۳	
۳/۳۷۵×۱۰ ^{-۱} ±	۳/۴۱۵×۱۰ ^{-۱} ±	۳/۴۱۵×۱۰ ^{-۱} ±	۳/۴۱۵×۱۰ ^{-۱} ±	۳/۲۷×۱۰ ^{-۱} ±	۳/۱۷۵×۱۰ ^{-۱} ±	۱۰۰
۳/۵×۱۰ ^{-۳}	۶/۵×۱۰ ^{-۳}	۲/۵×۱۰ ^{-۳}	۴×۱۰ ^{-۳}	۳	۵×۱۰ ^{-۴}	۰

* میانگین ± انحراف معیار

جدول شماره ۴- جذب نوری حالت های مختلف اسانس آویشن شیرازی و لیزوزیم بعد از گرمخانه گذاری

غلظت اسانس آویشن شیرازی (Z) (درصد)						غلظت لیزوزیم (ml)/gμ (L)
صفر	۰/۰۰۵	۰/۰۱	۰/۰۲	۰/۰۴	۰/۰۸	
۵/۰۷۵×۱۰ ^{-۱} ±	۵/۸۳۵×۱۰ ^{-۱} ±	۵/۷۸×۱۰ ^{-۱} ±	۵/۷۸×۱۰ ^{-۱} ±	۲/۳۲×۱۰ ^{-۱} ±	۳/۱۷۵×۱۰ ^{-۱} ±	صفر
۹/۵×۱۰ ^{-۳} *	۵×۱۰ ^{-۳}	۱×۱۰ ^{-۲}	۲×۱۰ ^{-۲}	۱/۵×۱۰ ^{-۲}	۵×۱۰ ^{-۴}	
۵/۱۰۵×۱۰ ^{-۱} ±	۴/۴۴۵×۱۰ ^{-۱} ±	۴/۴۰۵×۱۰ ^{-۱} ±	۴/۶۲×۱۰ ^{-۱} ±	۳/۲۸×۱۰ ^{-۱} ±	۳/۳۵×۱۰ ^{-۱} ±	۱۲۵
۵/۴۵×۱۰ ^{-۲}	۲/۵×۱۰ ^{-۳}	۸/۵×۱۰ ^{-۳}	۲/۲۵×۱۰ ^{-۲}	۸×۱۰ ^{-۳}	۲×۱۰ ^{-۳}	
۵/۵۳۵×۱۰ ^{-۱} ±	۴/۸۲×۱۰ ^{-۱} ±	۴/۸۱×۱۰ ^{-۱} ±	۴/۶۱×۱۰ ^{-۱} ±	۳/۲۱۵×۱۰ ^{-۱} ±	۳/۳۱×۱۰ ^{-۱} ±	۲۵۰
۵×۱۰ ^{-۲}	۱×۱۰ ^{-۳}	۳/۳×۱۰ ^{-۲}	۱±۱۰ ^{-۳}	۱/۵×۱۰ ^{-۳}	۲×۱۰ ^{-۳}	
۵/۰۵۵×۱۰ ^{-۱} ±	۴/۶۴۵×۱۰ ^{-۱} ±	۴/۵۹۵×۱۰ ^{-۱} ±	۴/۹۴×۱۰ ^{-۱} ±	۳/۳۵۵×۱۰ ^{-۱} ±	۳/۵۹۵×۱۰ ^{-۱} ±	۵۰۰
۶/۲۵×۱۰ ^{-۲}	۱/۴×۱۰ ^{-۲}	۱/۴۵×۱۰ ^{-۲}	۲/۵×۱۰ ^{-۲}	۹/۵×۱۰ ^{-۳}	۵×۱۰ ^{-۴}	
۵/۷۳۵×۱۰ ^{-۱} ±	۵/۸۷×۱۰ ^{-۱} ±	۵/۳۹۵×۱۰ ^{-۱} ±	۵/۶۲×۱۰ ^{-۱} ±	۳/۳×۱۰ ^{-۱} ±	۳/۱۹×۱۰ ^{-۱} ±	۱۰۰۰
۶/۵×۱۰ ^{-۳}	۷×۱۰ ^{-۳}	۲/۰۵×۱۰ ^{-۲}	۳/۹۵×۱۰ ^{-۲}	۳×۱۰ ^{-۳}	۳×۱۰ ^{-۳}	

* میانگین ± انحراف معیار



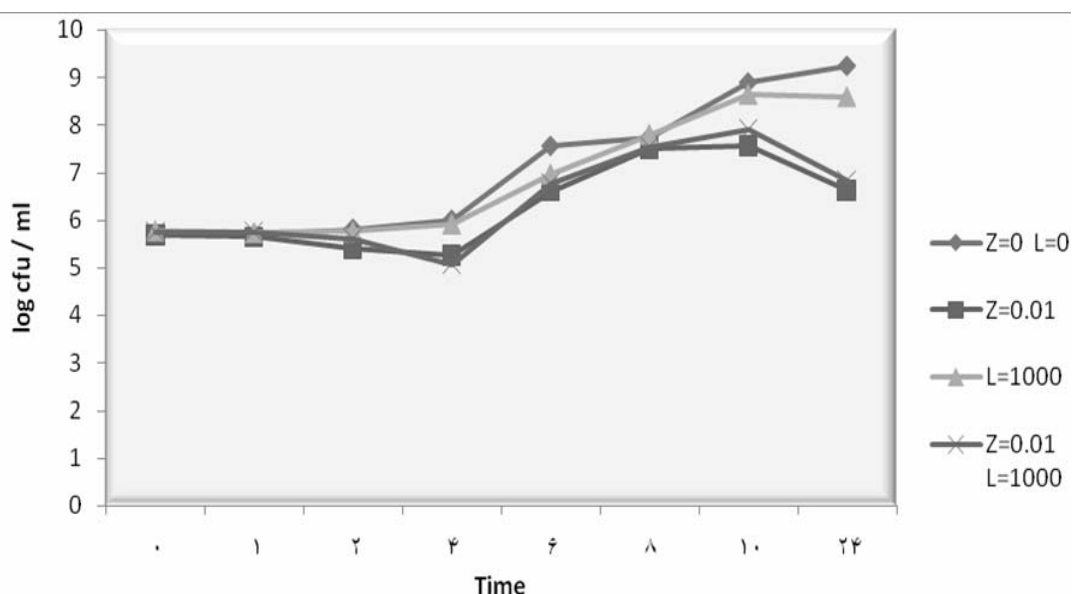
مشاهده شد. از طرفی منحنی رشد باکتری در این گروه شباهت بسیاری به گروه حاوی غلظت ۰/۰۱ درصد اسانس آویشن شیرازی به تنهایی داشت.

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 ۴ 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 ۴ ساعت اول گرمخانه‌گذاری شد و بعد از آن افزایش تعداد باکتری مشاهده شد.

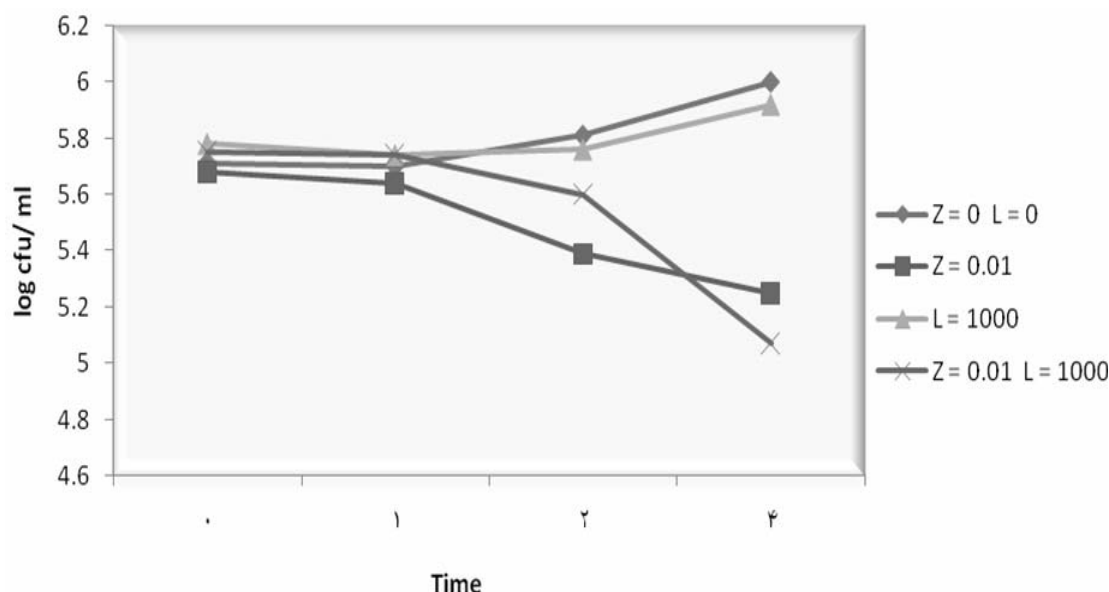
نتایج بررسی منحنی رشد باکتری *E. coli* $O_{157}: H_7$ در حضور اسانس آویشن شیرازی و لیزوزیم

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 ($p < 0.05$) نسبت به گروه کنترل شده به طوری که در ساعت ۱۰ گرمخانه‌گذاری لگاریتم تعداد باکتری در این گروه ۷/۵۶ (3.7×10^7 cfu/ml) بوده در حالی که در گروه کنترل لگاریتم تعداد باکتری در این ساعت ۸/۸۸ (7.6×10^8 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 ۴ گرمخانه‌گذاری شد اما در ساعت ۸ به بعد لگاریتم تعداد باکتری به ۷/۵۴ (5.3×10^7 cfu/ml) رسید که تفاوت معنی‌داری با گروه‌های دیگر نداشت. اما در ساعت ۲۴ تفاوت معنی‌داری به لحاظ شمارش باکتری بین ترکیب غلظت ۰/۰۱ درصد آویشن و غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر لیزوزیم و گروه کنترل



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





نمودار شماره ۲- فاز تاخیری منحنی رشد باکتری *E. coli O157:H7* در حضور اسانس آویشن شیرازی و لیزوزیم (Z: آویشن L: لیزوزیم)

بحث

بی تردید صنایع غذایی یکی از مهم ترین 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 می باشد که علاوه بر رفع گرسنگی باعث افزایش عمر و ارتقاء سلامت می شود.

در سال های اخیر مطالعات فراوانی پیرامون استفاده از نگهدارنده های طبیعی در صنایع غذایی صورت گرفته است از جمله این ترکیبات ضد میکروبی طبیعی، اسانس های گیاهی و لیزوزیم می باشد. در مورد خواص ضد میکروبی اسانس آویشن شیرازی مطالعات مختلفی صورت گرفته است.

بررسی آخوندزاده و همکاران نشان داد که اسانس آویشن شیرازی (غلظت های ۰/۰۳ و ۰/۰۶) به طور معنی داری ($p < 0/05$) بر روی رشد استافیلوکوکوس طلایی تأثیرگذار است [۶].

مطالعات گندمی و همکاران اثر معنی دار اسانس آویشن شیرازی را بر رشد و اسپورزایی اسپرزیلوس فلاووس نشان داد

($p < 0/05$). همچنین میزان MIC و MFC در این مطالعات به

ترتیب ۴۰۰ و ۱۰۰۰ پی پی ام به دست آمد [۷].

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

مطالعات Bagamboula و همکاران در سال ۲۰۰۴ بر روی اسانس آویشن و ترکیبات کارواکرول و تیمول بر روی باکتری شیگلا، نشان داد که این ترکیبات اثر باکتریوسیدی بر روی این باکتری دارند [۹].

- فاضلی و همکاران (۲۰۰۷) اثر ضد میکروبی عصاره آویشن شیرازی و سماق را بر ضد باکتری های 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 باکتری های مورد مطالعه ۰/۴ تا ۰/۸



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 مهاري بالاتری داشت. لیزوزیم با شلاته کننده‌های دیگر مثل سدیم سیترات و منوگلیسرول سیترات قادر به مهار کردن نبود [۱۵].

- پارک و همکاران (۲۰۰۴) 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 [۱۶].

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

- لیسترن 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 ۰/۰۴ 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 O157:H7* در محیط آبگوشت قلب و مغز مورد بررسی قرار گرفت که حضور توأم لیزوزیم و اسانس

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 ضد میکروبی 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 تتراسایکلین، فلوکوئین و اریترومايسين 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 مهاري لیزوزیم را بر ضدکلسترییدیوم پرفرنزانس تیپ A و توکسین تولیدی آن، به روش میکرودايلوشن 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 ضد میکروبی صورت گرفته است.

- بولند و همکاران (۲۰۰۳) اثر مهاري سه شلاته کننده EDTA، دی سدیم پیروفسفات (DSPP) و پتاسدیم تری‌پلی‌فسفات (DSTPP) به همراه لیزوزیم را برای مهار رشد ۴ گونه *E. coli O157:H7* بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که افزودن EDTA فعالیت مهاري لیزوزیم را روی گونه‌های اشرشیاکلی افزایش می‌دهد ولی شلاته کننده‌های فسفات‌دار نیاز به میزان بیشتری لیزوزیم برای مهار اشرشیاکلی دارند [۱۴].

- رضوی روحانی و همکاران (۱۹۹۵) اثر لیزوزیم، BHA (*Butylated hydroxyanizole*)، نمک، pH و عوامل شلاته کننده (EDTA) را علیه باکتری‌های پاتوژن غذایی



است که این امر در میکروبیولوژی مواد غذایی دارای اهمیت است.

باعث کاهش MIC نشد، اما نتایج بررسی منحنی رشد نشان می‌دهد که ترکیب این دو ماده باعث افزایش فاز تأخیری شده

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 Rangelands Tehran 1995, pp: 1 - 7.
4. Proctor VA, Cunningham FE. The chemistry of lysozyme and 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, Icium 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 Comparison 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 lysozyme and butylated hydroxyanisole 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.



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.

