تعیین میزان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) لیزوزیم و آویشن شیرازی روی لیستریا مونوسیتوژنز

طاهره مهاجرفر[۱]، اعظم حسین‌زاده[۲]، افشین آخوندزاده‌بستی[۳]*، علی خنجری[٤]، علی میثاقی[۵]، حسن گندمی‌نصرآبادی[۵]

۱- دکتری عمومی دامپزشکی، گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران
۲- دستیار تخصصی فارماکولوژی پزشکی، گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران
۳- استاد، گروه بهداشت وکنترل موادغذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران
٤- دستیار تخصصی، گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران
۵- استادیار، گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران
*آدرس مکاتبه: تهران، خیابان آزادی، دانشکده دامپزشکی، گروه بهداشت مواد غذایی صندوق‌پستی: ٦٤٥٣ – ١٤١٥٥
تلفن ٦٦٩٢٣١٠ (٠٢١)، نمابر: ٦٦٩٣٣٢٢٢ (٠٢١)
پست الکترونیک: aakhond@ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۹/۸/۳ **تاریخ تصویب:** ۹۱/۱/۱۷

چکیده

مقدمه: از جمله راه‌های حذف یا کاهش رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا یا عامل فساد و افزایش مدت زمان نگهداری مواد غذایی استفاده از نگهدارنده‌های مختلف می‌باشد.

هدف: تعیین میزان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) لیزوزیم و اسانس آویشن شیرازی روی لیستریا مونوسیتوژنز می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه برای تعیین MIC از غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی و لیزوزیم به صورت تنها و توأم با هم در محیط آبگوشت قلب و مغز (BHI broth) به روش ماکرودایلوشن و میکرودایلوشن استفاده شد. همچنین اثر غلظت‌های تحت بازدارنده‌ی این ترکیبات بر منحنی رشد این باکتری نیز بررسی شد.

نتایج: بر اساس نتایج به دست آمده، میزان MIC اسانس آویشن شیرازی به تنهایی در دو روش، ماکرودایلوشن و میکرودایلوشن ۰/۰٤ درصد به دست آمد، در حالی‌که در لیزوزیم به تنهایی در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نتوانست مانع رشد باکتری لیستریامونوسایتوژنز شود. در حالت توأم در دو روش میزان ۰/۰۲ درصد اسانس و ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر لیزوزیم به عنوان کمترین غلظت بازدارنده محاسبه شد. به علاوه اثر ترکیبی غلظت‌های تحت بازدارنده‌ی اسانس مورد مطالعه همراه لیزوزیم نشان داد که لیزوزیم به تنهایی و به صورت توأم با اسانس آویشن شیرازی باعث افزایش فاز تأخیری و کاهش سرعت رشد باکتری مورد مطالعه شد.

نتیجه‌گیری: اسانس آویشن شیرازی به همراه لیزوزیم می‌تواند به عنوان نگهدارنده طبیعی ضدباکتری لیستریا مونوسایتوژنز در مواد غذایی استفاده شود که استفاده از لیزوزیم می‌تواند میزان موردنیاز آویشن شیرازی را کاهش دهد.

گل‌واژگان: آویشن شیرازی، لیزوزیم، حداقل غلظت بازدارندگی (MIC)

مقدمه

امروزه برای تهیه محصولات غذایی در کارخانه‌های صنایع غذایی اغلب از افزودنی‌های و مواد نگهدارنده ضدمیکروبی شیمیایی استفاده می‌شود. این در حالی است که بسیاری از نگهدارنده‌های شیمیایی اثرات مضر بر روی سلامتی انسان دارند، از این رو در سال‌های اخیر مطالعات زیادی روی اثرات نگهدارنده‌های طبیعی جهت جایگزینی نگهدارنده‌های شیمیایی صورت گرفته است. در این میان اسانس‌های گیاهی مورد توجه ویژه هستند اسانس‌های گیاهی و اجزای تشکیل‌دهنده آنها دارای اثرات شناخته شده ضدمیکروبی هستند.

از جمله این اسانس‌های گیاهی می‌توان از اسانس گیاه آویشن شیرازی نام برد که پراکندگی محدودی در جهان دارد و در ایران، افغانستان و پاکستان می‌روید. این گیاه از قرن ۱۶ میلادی به عنوان یک گیاه دارویی معرفی شده است [۲,۱]. لیزوزیم یک عامل ضدمیکروبی با خاصیت لیزکنندگی دیواره سلولی باکتری‌هاست. نخستین محل اثر لیزوزیم باند گلیکوزیدی بین N استیل گلوکز آمین و N استیل مورامیک اسید درپپتیدوگلایکان دیواره سلول باکتری است که با هیدرولیز این باند باعث لیز سلولی می‌شود [۳]. لیزوزیم سفیده تخم‌مرغ به طور معمول بر ضد اجرام گرم مثبت نسبت به اسپور باکتری‌ها و باکتری‌های گرم منفی مؤثرتر است . لیزوزیم به صورت رایج در غذاهایی چون گوشت پخته، انواع سوسیس، غذاهای دریایی، سبزیجات تازه و به منظور مهار ترک خوردگی پنیر به کار می‌رود [۵,٤]. 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، ۰/۰۸ درصد) به صورت تنها و توأم باهم در محیط آبگوشت مغز وقلب جهت تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (Minimum Inhibitory Concentration (MIC)) اسانس آویشن شیرازی و لیزوزیم به روش ماکرو دایلشن و میکرودایلوشن و همچنین اثر غلظت‌های تحت باز دارنده این ترکیبات بر منحنی رشد **لیستریامونوسایتوژنز** بررسی شد.

مواد و روش‌ها

گیاه آویشن شیرازی در فصل تابستان از استان فارس جمع‌آوری و نام علمی آن توسط گیاه‌شناسان پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی تأیید شد. اسانس مورد استفاده در این مطالعه با روش تقطیر با بخار آب از سرشاخه‌های گیاه آویشن شیرازی تهیه و توسط دستگاه گاز کروماتوگراف متصل به طیف نگار جرمی (GC/MS) آنالیز شد. غلظت‌های اسانس آویشن شیرازی به کار رفته عبارت از صفر، ۰/۰۰۵، ۰/۰۱، ۰/۰۲، ۰/۰٤، ۰/۰۸ درصد بود.

لیزوزیم

پودر لیزوزیم خریداری شده از شرکت سروا در محیط BHI broth حاوی ۵ درصد Dimethyl Sulfoxide (DMSO) حل شد و توسط فیلتر میکروبیولوژیک ٤۵ درصد میکرومتر استریل شد. غلظت‌های لیزوزیم به کار رفته عبارتند از: صفر، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر.

باکتری مورد مطالعه

ابتدا کشت لیوفیلیزه باکتری لیستریا مونوسایتوژن (ATCC: ۱۹۱۱۸) به مدت ۱۸ ساعت در دمای 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. از 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.

طراحی آزمایش

غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی (صفر، ۰/۰۰۵، ۰/۰۱، ۰/۰۲، ۰/۰٤، ۰/۰۸ درصد) و لیزوزیم (صفر، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰، میکروگرم در میلی‌لیتر) به صورت تنها و توأم با هم در محیط آزمایشگاهی برای تعیین MIC در غلظت‌های

مختلف اسانس آویشن شیرازی به روش ماکرودایلوشن و میکرودایلوشن بر روی باکتری لیستریا مونوسایتوژنز مورد بررسی قرار گرفت. همچنین اثر غلظت‌های تحت بازدارنده‌ی این ترکیبات بر منحنی رشد این باکتری نیز بررسی 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 سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. از کشت دوم مقادیر مختلفی به داخل لوله‌ی کووتی (Cuvett) که حاوی ٤ درجه سلسیوس آبگوشت قلب و مغز (Brain Heart Infusion) استریل بود، منتقل شد تا جذب نوری ۰/۰۱ 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 ۰/۰۱ 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 شد 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 ۷×۱۰^{۷} 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 بازدارنده رشد (MIC) به روش ماکرو دایلوشن

غلظت‌های متوالی لیزوزیم (صفر، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در هر میلی‌متر) و غلظت‌های متوالی اسانس آویشن شیرازی (صفر، ۰/۰۰۵، ۰/۰۱، ۰/۰۲، ۰/۰٤، ۰/۰۸ درصد) در محیط آبگوشت قلب و مغزحاوی ۵ درصد DMSO تهیه شد. غلظت‌های متوالی ترکیبات موردنظر در دو لوله آزمایش حاوی ۲ میلی‌لیتر از محیط فوق در لوله‌های آزمایش تهیه شد. در نهایت ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی تهیه شده به هر لوله تلقیح شد (غلظت نهایی باکتری ۵×۱۰^{۵} cfu/ml سپس لوله‌ها به مدت ٢٤ ساعت در ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند و کدورت یا عدم کدورت در لوله‌ها مشاهده شد و MIC اسانس به تنهایی و همچنین لیزوزیم به تنهایی و MIC حالات ترکیبی اسانس و لیزوزیم تعیین شد.

تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد به روش میکرودایلوشن

اساس این روش مشابه روش 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. ابتدا مقدار مناسب لیزوزیم در آبگوشت BHI حاوی ۵ درصد DMSO حل شد و توسط فیلتر میکروبیولوژیک ٤۵ درصد میکرومتر استریل شد. غلظت‌های موردنظر اسانس آویشن در آبگوشت BHI حاوی ۵ درصد DMSO تهیه 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 ۵×۱۰^{۵} cfu/ml محتویات هر چاهک به مدت ۲ دقیقه توسط Plate Reader مجهز به Shaker مخلوط شد. سپس جذب نوری با استفاده از Plate reader در ساعت صفر و با طول موج ٦۳۰ nm خوانده شد. پلیت‌ها به مدت ٢٤ 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 خوانده شد.

بررسی اثر لیزوزیم و اسانس روی نمودار رشد باکتری

در این مرحله اثر غلظت‌های تحت بازدارنده لیزوزیم و اسانس به تنهایی و به صورت توأم با هم روی رشد باکتری لیستریامونوسایتوژنز در طی ۲٤ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت. غلظت‌های مورد استفاده عبارتند از: لیزوزیم: صفر، ۱۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر واسانس آویشن شیرازی: صفر، ۰/۰۰۵ درصد. مجموع حالات مورد استفاده در جدول شماره ۲ آمده است.

۱۰ میلی‌لیتر از محلول‌های تهیه شده در لوله‌ها توزیع شد، سپس ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری به هر ٤ لوله اضافه شد (غلظت نهایی باکتری 5×10^5 cfu/ml بود). لوله‌ها در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند و در ساعت‌های صفر، ۱، ۲، ٤، ٦، ۸، ۱۰، ۱۲ و ۲٤ رقت‌های مورد مطالعه از هر ٤ لوله در زمان‌های فوق تهیه شد و در پلیت BHI agar کشت داده شد و بعد از گرمخانه‌گذاری به مدت ۲٤ ساعت در ۳۵ درجه سانتی‌گراد شمارش تعداد کلونی انجام شد و تعداد باکتری‌ها در ساعات مورد نظر محاسبه شد.

تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزارSPSS 16 for windows صورت گرفت. جهت مقایسه داده‌ها از تست One- way ANOVA همراه Tukey استفاده شد و اختلاف میانگین داده‌ها در سطح ۵ درصد از لحاظ آماری معنی‌دار تلقی شد.

نتایج

نتایج این مطالعه آشکار نمود که میزان حداقل غلظت بازدارنده اسانس آویشن شیرازی به روش ماکرودایلوشن ۰/۰٤ درصد می‌باشد در حالی‌که لیزوزیم حتی در بالاترین غلظت نتوانست مانع رشد باکتری لیستریا مونوسایتوژنز شود. نتایج بررسی اثر ترکیبی لیزوزیم و اسانس آویشن شیرازی نشان داد که غلظت ۰/۰۰۵ درصد اسانس آویشن شیرازی همراه با غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر لیزوزیم توانست جلوی رشد باکتری مذکور را بگیرد. همچنین غلظت ۰/۰۲ درصد اسانس آویشن شیرازی و غلظت‌های ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰، میکروگرم در میلی‌لیتر لیزوزیم توانایی جلوگیری از رشد باکتری لیستریامونوسایتوژنز را دارا می‌باشد. میزان MIC اسانس آویشن شیرازی در روش میکرودایلوشن هم ۰/۰٤ به دست آمد. بر اساس نتایج به دست آمده ترکیب اسانس آویشن

جدول شماره ۱- نتایج MIC اسانس آویشن شیرازی و لیزوزیم به صورت تنها و توأم بر لیستریا مونوسایتوژنز

ترکیب استفاده شده	MIC	
	ماکرودایلیشن	میکرودایلیشن
اسانس آویشن شیرازی	۰/۰٤	۰/۰٤
لیزوزیم	> ۱۰۰۰	> ۱۰۰۰
اسانس آویشن شیرازی+ لیزوزیم	Z=۰/۰۲ L=۱۲۵ Z=۰/۰۰۵ L=۱۰۰۰	Z=۰/۰۲ L=۱۲۵ Z=۰/۰۱ L=۲۵۰ Z=۰/۰۰۵ L=۱۰۰۰

جدول شماره ۲- جذب نوری حالت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی و لیزوزیم قبل از گرمخانه‌گذاری

	صفر	۰/۰۰۵	۰/۰۱	۰/۰۲	۰/۰٤	۰/۰۸
صفر	۰/۰۰٤±۰/۲٤۲	۰/۰۰٤±۰/۲۲۵	۰/۰۱±۰/۲۲۹	۰/۰۰۳±۰/۲۲۵	۰/۰۱٤±۰/۲۲۳	۰/۰۰۱±۰/۲٤
۱۲۵	۰/۰۰۰۷±۰/۲۲۷	۰/۰۱۲±۰/۲۳۵	۰/۰۱±۰/۲۳٤	۰/۰۱۳±۰/۲۳۸	۰/۰۰۱٦±۰/۲۳٦	۰/۰۰٤±۰/۲۵
۲۵۰	۰/۰۰۲±۰/۲۰۷	۰/۰۰۷±۰/۲۳۳	۰/۰۰۳±۰/۲۳۱	۰/۰۰۰۷±۰/۲۲۸	۰/۲٤۱	۰/۰۲۳±۰/۲۱
۵۰۰	۰/۰۱۲±۰/۲۲٦	۰/۰۱۱±۰/۲۲۸	۰/۰۰٤±۰/۲٤	۰/۰۱۳±۰/۲۳۲	۰/۰۱±۰/۲۳۱	۰/۰٦۷±۰/۳
۱۰۰۰	۰/۰۰۳±۰/۲٤۱	۰/۰۰۰۷±۰/۲۵۳	۰/۰۰٤±۰/۲۳۳	۰/۰۰۲±۰/۲٤۳	۰/۰۰۰۷±۰/۲۱۱	۰/۰۵±۰/۲۷۳

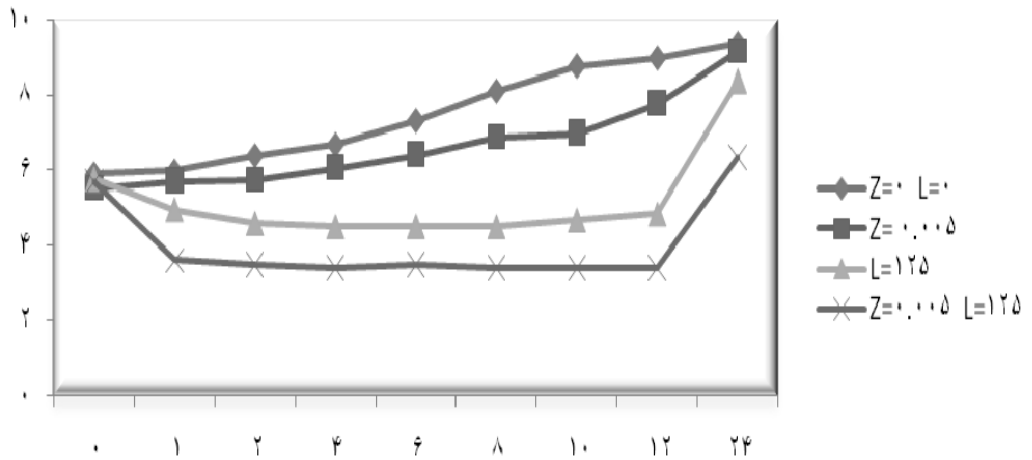
شیرازی و لیزوزیم توانست میزان MIC محاسبه شده برای هر یک را کاهش دهد (جدول شماره ۳) در روش میکرودایلوشن علاوه بر اندازه‌گیری MIC به روش چشمی، میزان MIC به روش اندازه‌گیری جذب نوری نیز مورد بررسی قرار گرفت که نتایج آن در جدول‌های شماره ۳ و ۲ آمده است. در غلظت ۰/۰٤ اسانس آویشن شیرازی در هیچ یک از حالت‌های به کار رفته تغییر معنی‌داری در میزان جذب نوری قبل و بعد از گرمخانه‌گذاری مشاهده نشد. همچنین در غلظت ۰/۰۲ درصد اسانس آویشن شیرازی و ۱۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر لیزوزیم نیز تغییری در جذب نوری قبل و بعد از گرمخانه‌گذاری مشاهده نشد. همچنین نتایج نشان داد که غلظت‌های ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر لیزوزیم و غلظت ۰/۰۱ درصد آویشن شیرازی نیز توانایی جلوگیری از رشد را داشت و غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر لیزوزیم با کمترین غلظت اسانس توانست جلوی رشد باکتری را بگیرد و تغییری در این حالت‌ها دیده نشد.که نتایج آن در جدول شماره۱ آمده است.

نتایج بررسی منحنی رشد باکتری لیستریا مونوسایتوژنز در حضور اسانس آویشن شیرازی و لیزوزیم

همان‌گونه که در نمودار شماره ۱ مشخص است غلظت ۰/۰۰۵ درصد اسانس آویشن شیرازی به تنهایی باعث کاهش سرعت رشد باکتری به طور معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) نسبت به گروه کنترل شده به طوری‌که در ساعت ٦ گرمخانه‌گذاری لگاریتم تعداد باکتری در این گروه ٦/٤٣ ($۷/۸\times۱۰^{٦}$ cfu/ml) بوده در حالی‌که در گروه کنترل لگاریتم تعداد باکتری در این ساعت

جدول شماره ۳- جذب نوری حالت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی و لیزوزیم بعد از گرمخانه‌گذاری

	صفر	۰/۰۰۵	۰/۰۱	۰/۰۲	۰/۰٤	۰/۰۸
صفر	۰/۰۲٤±۰/٤۰٦	۰/۰۲±۰/۳۸۹	۰/۰۵±۰/۳۸۵	۰/۰۰۲±۰/۳۹۲	۰/۰۱±۰/۲۲۳	۰/۰۰۱±۰/۲٤
۱۲۵	۰/۰۷±۰/۳۹۵	۰/۰۳۸۸±۰/۳۷۸	۰/۰۰۰۷±۰/۳۵۸	۰/۰۰۷±۰/۲۵	۰/۰۱٦±۰/۲۳٦	۰/۰۰٤±۰/۲۵
۲۵۰	۰/۰۵۵±۰/۳۹٤	۰/۰۵±۰/۳۸٤	۰/۰۰۲±۰/۰۲٤۱	۰/۰۰۲±۰/۲۲	۰/۲٤۱	۰/۰۲±۰/۲۱
۵۰۰	۰/۰۹±۰/۳٦۳	۰/۰۰۹±۰/۲۸۹	۰/۲۳٤	۰/۰۱۲±۰/۲۲۵	۰/۰۰۱±۰/۲۳۱	۰/۰٦۷±۰/۳
۱۰۰۰	۰/۰۹±۰/۳٤۹	۰/۲۵۳	۰/۰۱±۰/۲۵۳	۰/۰۰۲±۰/۲۳۵	۰/۰۰۰۷±۰/۲۱۱	۰/۰۵±۰/۲۷۳



نمودار شماره ۱- منحنی رشد باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در حضور اسانس آویشن شیرازی و لیزوزیم

($۲/۱\times۱۰^{۷}$ cfu/ml) می‌باشد. این در حالی است که تعداد باکتری در این گروه در ساعت ۲٤ تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل نداشت ($۲/٤\times۱۰^{۹}$ cfu/ml) در مقابل $۱/۵\times۱۰^{۹}$cfu/ml). غلظت ۱۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر لیزوزیم به تنهایی تأثیر معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) روی منحنی رشد باکتری داشت به طوری‌که از ساعت ۱ تا ۱۲ باعث کاهش رشد در میزان شمارش باکتری شد به طوری‌که تا ساعت ۱۲ در پلیت‌های کشت داده شده هیچ رشدی مشاهده نشد و در ساعت ۲٤ نیز شمارش نهایی باکتری $۵/۷\times۱۰^{۷}$ cfu/ml که کمتر از حالت کنترل $۲/٤\times۱۰^{۹}$ cfu/ml بود.

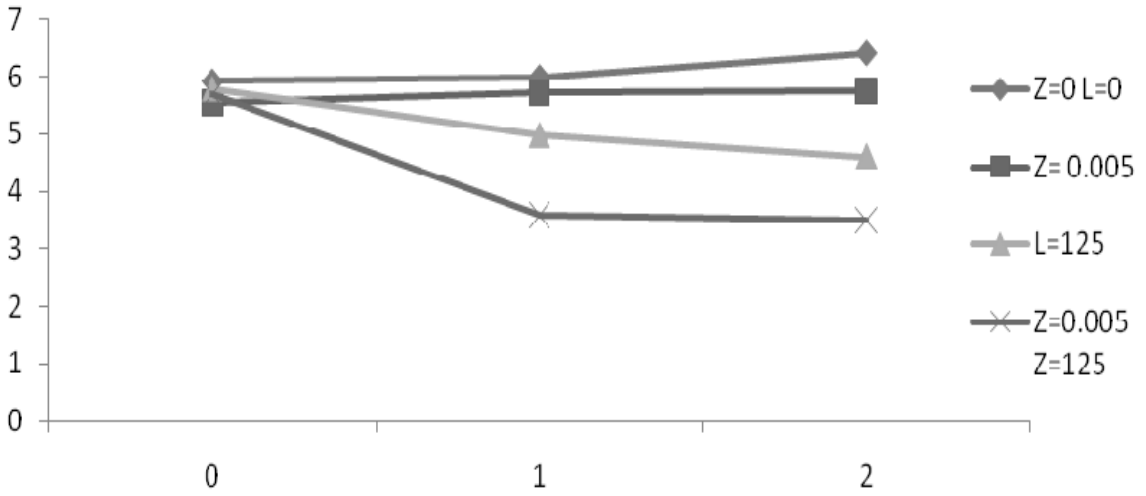
حضور همزمان غلظت ۰/۰۰۵ درصد اسانس آویشن شیرازی و غلظت ۱۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر هم باعث کاهش رشد باکتری نسبت به گروه کنترل ($p<۰/۰۵$) تا ساعت ۲٤ گرمخانه‌گذاری شد ($۲/۳\times۱۰^{٦}$ در مقابل $۲/٤\times۱۰^{۹}$ در گروه کنترل در ساعت ۲٤).

در نمودار شماره ۲ فاز تأخیری منحنی رشد باکتری **لیستریا مونوسایتوژنز** در حضور غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی و لیزوزیم نشان داده شده است. همان‌گونه که در شکل مشخص است در گروه کنترل طی ساعت اول گرمخانه‌گذاری، شمارش تعداد باکتری تغییر معنی‌داری را نشان نداده و از ساعت ۲ به بعد افزایش معنی‌دار تعداد باکتری مشاهده شد.

در حضور غلظت ۰/۰۰۵ درصد اسانس آویشن شیرازی کاهش تعداد باکتری تا ساعت ۲ گرمخانه‌گذاری مشاهده شد و از این ساعت به بعد افزایش تعداد باکتری و شروع فاز لگاریتمی مشاهده می‌شود. در حضور غلظت ۱۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر لیزوزیم به همراه غلظت‌های ۰/۰۰۵ درصد اسانس آویشن شیرازی میزان باکتری ساعت اول گرمخانه‌گذاری به صورت چشمگیری کاهش یافت.

بحث

بدون شک افزایش رشد میکروبی در غذا به سلامت افراد و اقتصاد ملی ضرر می‌زند و از طرفی افزایش روز افزون جمعیت نیاز به حفظ کیفیت و سلامت محصولات غذایی را در مدت طولانی برای مصرف‌کننده افزایش می‌دهد.



نمودار شماره ۲- فاز تأخیری منحنی رشد باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در حضور اسانس آویشن شیرازی و لیزوزیم

با توجه به اینکه برخی از باکتری‌های بیماری‌زا از طریق غذا به انسان منتقل می‌شوند، از ترکیبات ضدمیکروبی (نگهدارنده‌ها) شیمیایی، سنتیک و طبیعی که بر روی باکتری‌های بیماری‌زا و عامل فساد تأثیر گذارند، استفاده می‌شود. از طرفی برخی از ترکیبات شیمیایی و سنتیک اثرات مضر و مخربی را بر روی سلامتی انسان می‌گذارند. بنابراین امروزه تحقیقات زیادی جهت جایگزینی ترکیبات شیمیایی و سنتیک با ترکیبات ضدمیکروبی طبیعی که از منابع گیاهی، حیوانی و میکروبی به‌دست‌می‌آید، در حال بررسی و انجام است.

مطالعات بسیاری جهت مشخص کردن اثرات اسانس ادویه‌ها و گیاهان معطر و ترکیبات به دست آمده از آنها بر روی میکروارگانیسم‌های مختلف صورت گرفته است که در ذیل به چند مورد از آنها اشاره می‌شود.

بررسی آخوندزاده و همکاران نشان داد که اسانس آویشن شیرازی (غلظت‌های ۰/۰۳ و ۰/۰۶) به طور معنی‌داری ($p<0/05$) بر روی رشد استافیلوکوکوس طلایی تأثیرگذار است [۵].

مطالعات گندمی و همکاران اثر معنی‌دار اسانس آویشن شیرازی را بر رشد و اسپورزایی آسپرژیلوس فلاووس نشان داد ($p<0/05$) همچنین میزان MIC و MFC در این مطالعات به ترتیب ۴۰۰ و ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام به دست آمد [۶].

فاضلی و همکاران (۲۰۰۷) اثر ضدمیکروبی عصاره آویشن شیرازی و سماق را بر ضدباکتری‌های باسیلوس سرئوس، استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلی، سالمونلاتیفی، پروتئوسولگاریس و شیگلافلکسنریبه دو روش دیسک وژلدیفیوژن (Disc & well diffusion) بررسی کردند. MIC آویشن شیرازی علیه باکتری‌های مورد مطالعه ۰/۰۴ تا ۰/۰۸ درصد به دست آمد. در حالی‌که سالمونلاتیفی در غلظت ۰/۸ درصد عصاره آویشن شیرازی مقاومت نشان داد [۷].

ژانگ و همکاران (۲۰۰۶) اثر مهاری لیزوزیم را بر ضدکلستریدیوم پرفریجنس 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 [۸].

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

رضوی روحانی و همکاران (۱۹۹۵) اثر لیزوزیم، BHA، 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 [۹].

جلالی و همکاران اثرات ضدمیکروبی عصاره هیدروالکلی تعدادی از گیاهان دارویی علیه باکتری لیستریا مونوسیتوژنز را بررسی کردند. نتایج به دست آمده نشان داد که تنها عصاره هیدروالکلی اکالیپتوس در هر دو روش رقت لوله‌ای و انتشار دیسک، دارای اثرات ضدباکتریایی بر روی لیستریا مونوسیتوژنز بود. حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره اکالیپتوس بر روی باکتری لیستریا مونوسیتوژن ۲۵/۳۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر و حداقل غلظت کشندگی عصاره این گیاه ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود و تفاوت معنی‌داری بین حساسیت دو سروتیپ لیستریا مونوسیتوژنز مشاهده نشد. از عصاره هیدروالکلی دیگر گیاهان مورد آزمایش در این تحقیق، هیچ‌گونه اثرات ضدمیکروبی بر روی هر دو سروتیپ باکتری مشاهده نشد. نتیجه‌گیری: عصاره اکالیپتوس می‌تواند به عنوان ترکیب ضدلیستریایی مطرح شود. استفاده از اسانس این گیاه در غلظت‌های بالاتر و روش‌های دیگر عصاره‌گیری اثرات ضدلیستریایی اکالیپتوس را روشن‌تر خواهد کرد [۱۰].

دهکردی و همکاران (۲۰۰۸) اثر ضدمیکروبی لیزوزیم و آویشن شیرازی در pH و غلظت‌های مختلف Nacl بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که ترکیب لیزوزیم و EOs آویشن شیرازی (۵۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) با غلظت نمک (۱/۵، ۰/۵ و ۳ درصد) در pH های [۵،۶،۷] بهترین اثر سینرجیسمی علیه استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی را دارد.

در تحقیق حاضر اثر توأم اسانس آویشن شیرازی و لیزوزیم روی باکتری لیستریا مونوسایتوژنز در محیط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت که حضور توأم لیزوزیم و اسانس باعث کاهش MIC شد 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 [۱۱].

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه، اسانس آویشن شیرازی و لیزوزیم به تنهایی و به صورت توأم در ممانعت از رشد باکتری مؤثر بوده‌اند. همچنین نتایج حاکی از اثر سینرژیستی بین لیزوزیم و آویشن شیرازی می‌باشد به طوری‌که غلظت ۱۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر لیزوزیم به همراه غلظت ۰/۰۵ درصد اسانس آویشن شیرازی توانایی جلوگیری از رشد باکتری لیستریا مونوسایتوژنز را دارا می‌باشد که با نتایج مطالعات پیشین مطابقت دارد در نتیجه می‌توانند به عنوان نگهدارنده در غذا استفاده شوند تا علاوه بر ایجاد طعم و عطر در غذا از رشد و تکثیر باکتری‌های پاتوژن و مولد فساد جلوگیری نماید.

منابع

1. 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.

2. Jamzade M. Handbook of zataria. Research Institute of Forests and Rangelands Tehran 1995, pp: 1 - 7.

3. 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.

4. Davidson M P, Sofa NJ and Branen LA. Antimicrobials in food. 3th ed. Boca Raton: Talor & Francis 2005, pp: 361 - 79.

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

6. Gandomi Nasrabadi H, Misaghi A, Akhondzadeh basti A, Khosravi A, Bokaei S and Abbasifar A. Effects of *Zataria multiflora* Boiss. Essential Oil on Aspergillus flavus. *J. Medicinal Plants* 2009; 32: 45 - 51.

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

8. Chung W, Hancock R E W. Action of lysozyme and nisin mixtures against lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 2000; 60: 25 - 32.

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

10. Jalali M, Abedi D, Ghasemi Dehkordi N and Chaharmahali A. Evaluation of antibacterial activity of ethanol extracts of some medicinal plants against Listeria monocytogenes. *J. Shahrekord University of Medical Sci.* 2006; 8: 25-33.

11. Dehkordi S, RasaviRohani SM, Tajik H, Moradi M and Aliakbarlou J. Anti microbial effects of Lysozym in combination with *Zataria multiflora* Boiss. *Eos at different PH and Nacl Concentrations on E.coli O157:H7 and Staphylococcus aureus. Medwell. J.* 2008; 7 (11): 1458 - 63.

Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of *Zataria multiflora* Boiss. Essential Oil and Lysozim on *L. monocytogenes*

Mohajerfar T (D.V.M.)[1], Hosseinzadeh A (Ph.D.)[2], Akhondzadeh Basti A (Ph.D.)[1]*, Khanjari A (D.V.M., Ph.D.)[1], Misaghi A (Ph.D.)[1], Gandomi Nasrabadi H (Ph.D.)[1]

1- Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
2- Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3- Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
*Corresponding author: Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, P.O.Box: 14155 - 6453, Tehran, Iran
Tel: +98 – 21 – 61117001, Fax: +98 – 21 – 66933222
E-mail: aakhond@ut.ac.ir

Abstract

Background: Application of natural compounds, including essential oils (EOs) and lysozyme is an effective method against growth of bacterial pathogens in foods.

Objective: Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of lysozyme and *Zataria multiflora* Boiss. essential oil on *L. monocytogenes.*

Methods: In this study different concentrations of lysozyme and *Zataria multiflora* Boiss. EOwere used alone and in combination on BHI broth to determine MIC of *Zataria multiflora* Boiss. EO and lysozyme with macro dilution and micro dilution methods and effect of sub inhibitory concentrations of them on bacterial growth curve of *L. monocytogenes.*

Results: The minimum inhibitory concentration (MIC) of *Z. multiflora* Boiss EO was estimated ٪0.04 using macro and microdilution. lysozyme at the highest concentration (1000 µg/ ml) was not effective in inhibition of bacterial growth and no MIC value obtained. Combination of EO and Lysozyme decreased the MIC value to %0.02 and 250µg/ mlfor *Z. multiflora*Boiss. EO and lysozyme, respectively. The results of growth curve analysis showed that combination was effective in increasing the lag phase.

Conclusion: *Z. multiflora* Boiss and lysozyme showed to be effective against bacterial growth and its potential application in food systems may be suggested.

Keywords: Lysozym, *Z. multiflora,* Minimum inhibitory concentration (MIC)