اثر ترکیبی لیزوزیم و اسانس آویشن شیرازی بر باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس

افشین آخوندزاده بستی[۱]، مجید امین زارع[۲*]، سید مهدی رضوی روحانی[۳]، علی خنجری[٤]، نگین نوری[٤]، اشکان جبلی جوان[٥]، علی طاهری میرقائد[٦]، مجتبی رئیسی[۷]، حسین نقیلی[۲]، فاطمه محمد خان[۸]

۱- استاد، گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۲- دستیار تخصصی بهداشت مواد غذایی، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۳- استاد، گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
٤- استادیار، گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
٥- استادیار، گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران
٦- استادیار، گروه بهداشت و بیمار یهای آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۷- استادیار گروه بهداشت عمومی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران
۸- دانشجوی دکترای عمومی، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
*آدرس مکاتبه: ارومیه، جاده سرو، نازلو، دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی
تلفن: ۰۹۳۰٦٦۳٦۰٥۰
پست الکترونیک: majidaminzare@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۲/٥ **تاریخ تصویب:** ۹۲/۹/٥

چکیده

مقدمه: مطالعات مختلفی در ارتباط با اثر اسانس‌ها و بعضی آنزیم‌ها بر روی میکرواورگانیسم‌های بیماری‌زای مواد غذایی در محیط کشت و غذا انجام گرفته است.

هدف: هدف از این مطالعه تعیین میزان اثر اسانس آویشن شیرازی و لیزوزیم به صورت تنها و توام در مهار رشد ویبریو پاراهمولیتیکوس در محیط کشت بود.

روش بررسی: در مطالعه حاضر سعی بر آن شد تا اثر اسانس آویشن شیرازی و لیزوزیم به صورت جداگانه و توأم از طریق اندازه‌گیری **MIC** آنها به دو روش ماکرودایلوشن و میکرودایلوشن، بر روی یکی از باکتری‌های مهم بیماری‌زای مواد غذایی (ویبریو پاراهمولیتیکوس)، مورد ارزیابی قرار گیرد.

نتایج: در این مطالعه **MIC** آویشن شیرازی به روش ماکرودایلوشن ۰/۰۱ درصد و به روش میکرودایلوشن ۰/۰۲ درصد محاسبه شد. لیزوزیم نیز تا غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نتوانست جلوی رشد باکتری را بگیرد.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد اسانس آویشن شیرازی نسبت به لیزوزیم اثر مناسب‌تری در کاهش میزان ویبریو پاراهمولیتیکوس دارد. اگرچه حضور توأم اسانس و لیزوزیم باعث کاهش **MIC** نشد، ولی نتایج بررسی منحنی رشد تحت تأثیر غلظت تحت بازدارندگی نشان می‌دهد که ترکیب این دو ماده باعث افزایش فاز تأخیری می‌شود که این اثر در میکروبیولوژی مواد غذایی دارای اهمیت بالایی می‌باشد.

گل‌واژگان: ویبریو پاراهمولیتیکوس، آویشن شیرازی، اسانس، لیزوزیم

مقدمه

با توجه به اثرات مضر نگهدارنده‌های شیمیایی مواد غذایی، استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی رشد روز افزونی پیدا کرده است. اسانس‌ها (روغن‌های فرار یا روغن‌های اتری) مایعات روغنی معطری هستند که از اجزای مختلف گیاه به دست می‌آیند [۱]. خواص ضدمیکروبی اسانس‌ها سال‌هاست که شناخته شده است و امروزه رویکرد عموم مردم و همچنین سازمان‌های ملی و بین‌المللی مسئول در زمینه بهداشت مواد غذایی به استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی مختلف به جای مواد شیمیایی، منجر به تمایل بیشتر برای شناخت تأثیرات این ترکیبات شده است [۲، ۱]. با توجه به اثرات ناخواسته احتمالی مقادیر زیاد اسانس‌ها بر روی طعم، مزه، بو و رنگ ماده غذایی و همچنین عدم صرفه اقتصادی استفاده از یک نگهدارنده در مقادیر زیاد، کاربرد آنها به تنهایی به عنوان یک نگهدارنده غذایی محدود شده است. بنابراین تکنولوژی مانعی (Hurdle Technology) در بهداشت مواد غذایی، به صورت بررسی اثر ضدمیکروبی اسانس‌های گیاهی در غلظت‌های مختلف و توأم با سایر ترکیبات، بر علیه باکتری‌های پاتوژن مهم غذا زاد، مورد استفاده قرار می‌گیرد [۳]. آویشن شیرازی (*Zataria multiflora* Boiss.) از خانواده نعناعیان (*Lamiacea*) بوده و حداقل واجد ۰/٦ درصد اسانس و همچنین مقادیری از اسیدهای چرب، اسید الئانولیک (Oleanolic acid)، بتاسیتوسترول (B-Cytosterol) و بتولین (Betolin) است [٤]. ترکیبات اسانس آویشن شیرازی توسط کمیسیون اروپایی جهت استفاده به عنوان طعم‌دهنده در مواد غذایی به ثبت رسیده و مشخص شده است که استفاده از این اسانس خطری برای سلامت مصرف‌کنندگان ندارد. این گیاه در ایران، افغانستان و پاکستان به مقدار زیاد رشد می‌کند و در بسیاری از مناطق ایران به‌صورت سنتی مورد استفاده قرار می‌گیرد [٤]. لیزوزیم یک عامل ضدمیکروبی با خاصیت لیزکنندگی دیواره سلولی باکتری‌ها می‌باشد که در غذاهایی مثل شیر و تخم‌مرغ یافت می‌شود [۵].

ویبریوپاراهمولیتیکوس (*Vibrio Parahemolyticus*) یکی از اعضای خانواده ویبریوناسه (*Vibrionaceae*) می‌باشد و به صورت مکرر از مواد غذایی دریایی مختلف از قبیل ماهی کاد، ساردین، هشت پا، میگو، خرچنگ و بخصوص صدف جدا شده است [۸، ۷، ٦]. تاکنون موارد بسیاری از شیوع ویبریو پاراهمولیتیکوس در انسان توسط مصرف مواد غذایی دریایی خام و کم پخته، بویژه صدف آلوده، گزارش شده است که منجر به گسترش گاستروآنتریت حاد با علائمی از قبیل اسهال (معمولاً آبکی و گاهی خونی)، سر درد، استفراغ، تهوع، دل پیچه و تب ملایم می‌شود [۹]. بنابراین با توجه به اهمیت موضوع، در این مطالعه اثر غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی (صفر، ۰/۰۰۵، ۰/۰۱، ۰/۰۲، ۰/۰٤ و ۰/۰۸ درصد) و لیزوزیم (صفر، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) به صورت تنها و توام جهت تعیین حداقل غلظت بازدارندگی اسانس آویشن شیرازی و لیزوزیم بر روی ویبریو پاراهمولیتیکوس به روش‌های ماکرودایلوشن و میکرودایلوشن مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه گیاه، اسانس و آنالیز آن

میزان ۲ کیلوگرم گیاه آویشن شیرازی در فصل تابستان ۱۳۸۷ از فیروزآباد استان فارس جمع‌آوری شد و پس از تأیید نام علمی آن توسط هرباریوم پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی و تهیه نمونه هرباریومی به شماره‌ی ۲۱۸٤۲ برای این گیاه، اسانس‌گیری انجام پذیرفت. اسانس از سرشاخه‌های هوایی گیاه به روش تقطیر با بخار داغ تهیه و ترکیبات موجود در اسانس توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف نگار جرمی (Gas Chromatography/Mass Spectrophotometer) (GC/MS) آنالیز شد. بدین‌منظور از دستگاه GC/MS Thermoquest Finnigan با ستون موئینه‌ای به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۲۵۰ میکرومتر و ضخامت لایه داخلی ۰/۲۵ میکرومتر، با برنامه دمایی ۵۰ تا ۲٦۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۳۰ دقیقه استفاده شد. دمای اتاقک تزریق ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد و گاز حامل، هلیم با سرعت ۱/۵ میلی‌متر در دقیقه بود. همچنین شناساگر EI با

انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت و دمای منبع یونیزاسیون ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد بود.

تهیه غلظت‌های مختلف از اسانس، لیزوزیم و میزان تلقیح

تهیه‌ی غلظت‌های صفر، ۰/۰۰۵، ۰/۰۱، ۰/۰۲، ۰/۰٤ و ۰/۰۸ درصد با استفاده از حل نمودن میزان محاسبه شده از استوک اسانس در محیط BHI حاوی ۵ درصد DMSO صورت پذیرفت که در مرحله‌ی بعد با استفاده از روش Two Fold Dilution رقت‌های پایین‌تر از اسانس تهیه شد. لیزوزیم مورد نیاز به صورت پودر آماده از شرکت سِروا (SERVA Eletctrophoresis, GmbH, Heidelberg) خریداری شد که برای تهیه غلظت‌های صفر، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از آن، ابتدا پودر لیزوزیم را در محیط BHI حاوی ۵ درصد DMSO حل نموده و پس از استریل کردن به وسیله‌ی عبور از فیلترهای ۰/٤۵ میکرومتری رقت‌های سریالی از آن تهیه شد. جهت تهیه میزان تلقیح ابتدا کشت لیوفلیزه باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس ATCC ۱۷۸۰۲ تهیه شده از بخش میکروب‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دو مرتبه به‌طور متوالی در محیط BHI Broth (Brain Heart Infusion Broth) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت کشت داده شد. سپس از کشت مرحله دوم مقادیر مختلفی به کووت‌های حاوی ٤ میلی‌لیتر BHI Broth استریل منتقل شد و با خواندن جذب نوری کووت‌های مذکور در طول موج ٦۰۰ نانومتر برابر با ۰/۱ شود. 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. ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت بر روی پلیت‌های حاوی BHI آگارکشت داده شد. پلیت‌ها به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند و پس از این مدت، تعداد باکتری شمارش شد و از این طریق تعداد باکتری درکووت حاوی سوسپانسیون باکتری با جذب نوری ۰/۱ محاسبه شد. کل آزمایش ۲ مرتبه تکرارشد و میانگین تعداد باکتری در جذب نوری ۰/۱ برابر ۵×۱۰^{۷} cfu/ml به دست آمد [۱۰، ٤].

تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد (Minimum (Inhibitory Cncenteration (MIC) (MIC) به روش ماکرودایلوشن (Macrodilution)

اساس این روش بر پایه مهار رشد باکتری توسط مواد مورد آزمایش می‌باشد. به طوری‌که بعد از اتمام دوره گرمخانه‌گذاری هیچ کدورت قابل مشاهده‌ای در لوله‌های موردنظر وجود نداشته باشد. اولین لوله شفاف نشان‌دهنده حداقل غلظت بازدارنده رشد می‌باشد. برای تعیین MIC به این روش، ۹۵۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف لیزوزیم تهیه شده و ۹۵۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی به لوله‌های مورد نظر اضافه شد (۳۰ حالت). در نهایت میزان ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی که حدود $۱۰^{٦} \times ۱۰$ cfu/ml باکتری داشت به لوله‌ها منتقل شد (غلظت نهایی باکتری در هر لوله $۱۰^{۵} \times ۵$ cfu/ml بود). در مرحله بعد لوله‌ها به مدت ۲٤ ساعت در ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شده و کدورت یا عدم کدورت در لوله‌ها مورد مشاهده قرار گرفت و MIC این ترکیبات تعیین شد. در این روش MIC اسانس به تنهایی، MIC لیزوزیم به تنهایی و MIC ترکیب اسانس و لیزوزیم نیز مورد ارزیابی قرار گرفت و برای هر غلظت از مواد ضدمیکروبی ۲ تکرار در نظر گرفته شد.

تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد به روش میکرودایلوشن (Microdilution)

اساس این روش مشابه روش ماکرودایلوشن می‌باشد، با این تفاوت که در این روش به جای لوله‌های آزمایش از پلیت ۹٦ خانه‌ای با چاهک ته گرد با حجم ۳۰۰ میکرولیتر استفاده می‌شود و برای تعیین MIC در این روش علاوه‌بر مشاهده چشمی کدورت، تشخیص کدورت با استفاده از جذب نوری توسط دستگاه Plate Reader هم صورت گرفت. در این روش نیز ابتدا غلظت‌های مورد نظر اسانس و لیزوزیم تهیه و سپس ۹۰ میکرولیتر از غلظت‌های لیزوزیم و اسانس به هر چاهک انتقال داده شد. سپس به هر چاهک ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری که تا غلظت $۱۰^{٦} \times ۵$ cfu/ml رقت‌سازی شده بود اضافه شد (غلظت نهایی باکتری در هر چاهک

cfu/ml $۱۰^{۵}$ × ۵ بود). محتویات هر چاهک به مدت ۲ دقیقه با استفاده از Plate Reader مجهز به Shaker مخلوط شد و سپس جذب نوری در ساعت صفر و با طول موج ۶۳۰ نانومتر خوانده شد. پلیت‌ها به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری و سپس کدورت و یا عدم کدورت در چاهک‌ها به صورت چشمی مشاهده و سپس جذب نوری توسط دستگاه Plate Reader خوانده شد.

بررسی اثر ترکیبی لیزوزیم و اسانس بر روی نمودار رشد باکتری

در این مرحله اثر ترکیب همزمان غلظت‌های تحت بازدارنده لیزوزیم واسانس آویشن شیرازی روی رشد باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس در طی ۲٤ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت. غلظت‌های مورد استفاده لیزوزیم، صفر و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و غلظت‌های اسانس صفر و ۰/۰۰۵ درصد بود (مجموعاً ٤ حالت). بدین‌منظور ابتدا میزان ۱۰ میلی‌لیتر از محلول تهیه شده لیزوزیم و اسانس در لوله‌های مربوطه توزیع شد و سپس میزان ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی به هر چهار لوله اضافه شد (غلظت نهایی باکتری cfu/ml $۱۰^{۵}$ × ۵). لوله‌ها در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری و در ساعت‌های صفر، ۱، ۲، ٤، ۸، ۱۰ و ۲٤ با تهیه رقت‌های مورد نظر از ٤ لوله و انتقال ۱۰۰ میکرولیتر به پلیت BHI آگار، کشت و شمارش آنها صورت گرفت.

تحلیل آماری

تحلیل آماری مطالعه‌ی حاضر با استفاده از نرم‌افزار SPSS 11 for windows صورت گرفت. جهت مقایسه داده‌ها از تست One - Way ANOVA همراه Tukey استفاده شد و اختلاف میانگین داده‌ها در سطح آماری ۵ درصد معنی‌دار تلقی شد.

نتایج

ترکیبات اسانس آویشن شیرازی مورد استفاده در این تحقیق با استفاده از GC/MS در جدول شماره ۱ آورده شده است که در بین ترکیبات موجود در آن، کارواکرول (Carvacrol) (با میزان ۷۱/۱۲ درصد) بیشترین میزان را به خود اختصاص داده بود. لازم به ذکر است که میزان بازده اسانس تهیه شده از گیاهان آویشن شیرازی ۱ درصد (وزنی/ حجمی) بوده است.

نتایج تعیین MIC به روش ماکرودایلوشن

بر اساس نتایج به دست آمده میزان MIC اسانس آویشن شیرازی ۰/۰۱ درصد بود و لیزوزیم حتی در بالاترین غلظت نتوانست مانع رشد باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس شود و MIC لیزوزیم بیش از ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر محاسبه شد. همچنین ترکیب همزمان غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی و لیزوزیم (۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر)، اثری بر کاهش MIC محاسبه شده برای هر یک از این دو ماده نداشت.

نتایج تعیین MIC به روش میکرودایلوشن

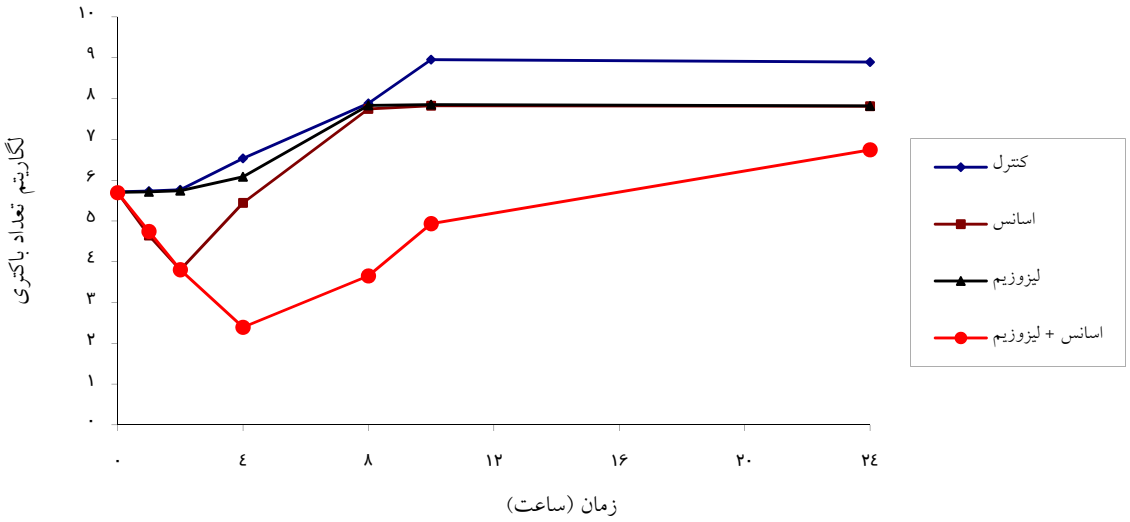
میزان MIC اسانس آویشن شیرازی در این روش ۰/۰۲ درصد و میزان MIC لیزوزیم بیشتر از ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر محاسبه شد. ترکیب اسانس و لیزوزیم نیز نتوانست میزان MIC محاسبه شده برای هر یک از این دو ماده را کاهش دهد. در این روش علاوه‌بر اندازه‌گیری MIC به روش چشمی، میزان MIC به روش اندازه‌گیری جذب نوری نیز مورد بررسی قرار گرفت که در غلظت ۰/۰۲ درصد اسانس در هیچ‌یک از حالت‌های به کار رفته تغییر معناداری در میزان جذب نوری قبل و بعد از گرمخانه‌گذاری مشاهده نشد.

نتایج بررسی منحنی رشد باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس در حضور اسانس آویشن شیرازی

همان‌گونه که نمودار شماره ۱ نشان می‌دهد، غلظت ۰/۰۰۵ درصد اسانس به تنهایی باعث کاهش سرعت رشد باکتری نسبت به گروه کنترل شده است ولی این تأثیر تا ساعت ۱۰ مطالعه به صورت معنی‌دار بوده است ($p<۰/۰۵$) و اختلاف معنی‌داری در تعداد باکتری در ساعت ۱۰ و ۲٤ مطالعه در مورد اسانس و گروه کنترل مشاهده نشد. همچنین غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر لیزوزیم نیز به تنهایی اثر

جدول شماره ۱ – نتایج آنالیز اسانس آویشن شیرازی مورد مطالعه با استفاده از GC/MS

شماره	نام ترکیب	اندیس بازدارندگی محاسبه شده	ضریب بازدارندگی استاندارد	درصد کلی
۱	Carvacerol	۱۲۹۹	۱۲۹۹	۷۱/۱۲
۲	terpinene	۱۰۵۵	۱۰۶۰	۷/۳٤
۳	α pinene	۹۳۷	۹۳۹	٤/۲٦
٤	Eucaliptol	۱۰۲٤	۱۰۳۱	۳/۳۷
٥	Globulol	۱۵۸۲	۱۵۹۰	۲/۳۲
٦	β Myrcen	۹۸٥	۹۹۱	۰/۸٥
۷	Linalool	۱۰۹۰	۱۰۹٥	۰/٦۸
۸	Thymol methyl ether	۱۲۳٦	۱۲۳٥	۰/٤۷
۹	Carvacerol methyl ether	۱۲٤۳	۱۲٤٥	۰/٤٦
۱۰	Trans Caryophyllen	۱٤۱۸	۱٤۱۷	۰/٤۳
۱۱	Terpinolene	۱۰۸٥	۱۰۸۸	۰/٤۱
۱۲	αThujene	۹۳۰	۹۳۰	۰/۱۹
	Total			۹۱/۹۰



نمودار شماره ۱– نمودار منحنی رشد باکتری ویبریوپاراهمولیتیکوس در حضور اسانس آویشن شیرازی و لیزوزیم

بازدارنده‌ی نسبتاً مناسبی در مقابل رشد باکتری داشت اما این اثر نسبت به غلظت ۰/۰۰۵ درصد اسانس، تا پیش از ساعت ۸ مطالعه بسیار کمتر است در حالی‌که، پس از ساعت ۸ اثرات مشابهی را از خود نشان داد. منحنی رشد باکتری در حضور همزمان غلظت ۰/۰۰۵ درصد اسانس و غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر لیزوزیم در ساعات اولیه (تا ساعت ۲) تفاوت معنی‌داری با منحنی رشد باکتری در حضور اسانس تنها نداشت، اما پس از آن اثر ترکیبی ظهور پیدا می‌کند و باعث کاهش شدید تعداد باکتری‌ها نسبت به اثر هر یک از آن ترکیبات به تنهایی شده است ($p<۰/۰۵$).

بحث

از دیرباز اثر بازدارندگی اسانس‌های گیاهی بر رشد میکروارگانیسم‌های مختلف، شناخته شده و به تازگی توجه

زیادی به سوی تأثیر آنها بر روی عوامل پاتوژن و فساد مواد غذایی معطوف شده است [۲]. در این راستا، بررسی اثر اسانس‌های گیاهی بر روی باکتری‌های پاتوژن و غذازاد مانند ویبریو پاراهمولیتیکوس نشان‌دهنده تلاش محققان برای جایگزین نمودن نگهدارنده‌های طبیعی به جای نگهدارنده‌های شیمیایی می‌باشد [۱۱، ۲]. تاکنون بررسی‌های زیادی در مورد اثر سینرژیستی اجزای مختلف اسانس‌های گیاهی در مواد غذایی مختلف جهت افزایش قدرت ضدمیکروبی آنها انجام شده است به طور مثال تأثیر ضدمیکروبی توأم دو جزء کارواکرول و تیمول موجود در اسانس آویشن شیرازی بیش از تأثیر هریک از آنها به تنهایی گزارش شده است [۱۲، ٤، ۲]. فاضلی و همکارانش (۲۰۰٦) اثر ضدمیکروبی عصاره آویشن شیرازی و سماق را علیه باکتری‌های باسیلوس سرئوس، استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلی و سالمونلا تیفی بررسی کردند و MIC اسانس آویشن شیرازی علیه باکتری‌های مذکور ۰/٤ و ۰/۸ درصد به دست آمد [۱۳]. در بررسی دیگر توسط ناواس و همکاران (۱۹۹٦) نشان داده شد که آویشن کوهی در مقایسه با سایر اسانس‌های گیاهی، به دلیل مقادیر بالای کارواکرول و تیمول از خاصیت ضدمیکروبی بالاتری برخوردار می‌باشد [۱٤]. نتایج حاصل از آنالیز ترکیبات اسانس آویشن شیرازی در این مطالعه نیز نشان‌دهنده وجود ترکیبات کارواکرول (بیشترین ترکیب به میزان ۷۱/۱۲ درصد) و تیمول در اسانس آویشن شیرازی می‌باشد. دخیلی و همکارانش (۱۳۸۵) اثر ضدمیکروبی ٤ اسانس دارویی آویشن شیرازی، خالواش، مرزنجوش و رازیانه را روی باکتری سالمونلا تیفی موریوم به روش ماکرودایلوشن بررسی کردند و گزارش کردند که MIC اسانس آویشن شیرازی علیه باکتری مذکور، در مقایسه با آنتی‌بیوتیک فلومکوئین، اُکسی‌تتراسایکلین و اریترومایسین بیشتر بود [۱۵]. بنیادیان و کریم (۱۳۸۱) اثر روغن‌های فرار چند گیاه (آویشن، ترخون، پونه، نعناع و زیره) را علیه استافیلوکوکوس اورئوس واشرشیاکلی مورد بررسی قرار دادند و دریافتند که ترکیبات مذکور اثر ضدمیکروبی قابل قبولی دارند. در مطالعه آنها مشخص شد که بیشترین اثر را عصاره گیاه آویشن شیرازی بر روی باکتری‌های مذکور دارد [۱٦]. موسوی و همکاران (۲۰۰۸) اثر ضدمیکروبی اسانس آویشن شیرازی علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا تیفی موریوم را بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که با افزایش غلظت این اسانس، لگاریتم تعداد باکتری‌های مورد مطالعه در شرایط یکسان کاهش می‌یابد. در این بررسی غلظت‌های پایین‌تر از ۰/۰۳ درصد اسانس آویشن شیرازی اثر ممانعت کنندگی معنی‌داری داشتند [۱۷]. اوسالاه و همکارانش (۲۰۰٦) اثر تعدادی از اسانس‌های گیاهی بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در محیط BHI broth را بررسی کرده و میزان MIC آویشن حدود ۰/۰۵ درصد به دست آمد [۱۸].

در مطالعه حاضر میزان MIC اسانس آویشن شیرازی ۰/۰۱ درصد به دست آمد، اما غلظت ۰/۰۰۵ درصد این اسانس هم به تنهایی باعث کاهش سرعت رشد باکتری نسبت به گروه کنترل شد. ترکیبات اسانس در گیاه در طی گل‌دهی و یا بلافاصله پس از گل‌دهی دارای بیشترین فعالیت ضدمیکروبی است. همچنین ترکیبات اسانس‌های به دست آمده از بخش‌های مختلف گیاه خاص نیز فعالیت ضدمیکروبی متفاوتی دارند. همین‌طور اختلاف در روش‌های ارزیابی خواص ضدمیکروبی اسانس‌ها و تفاوت در حساسیت باکتری‌های مختلف می‌تواند باعث نتایج متفاوت در میزان MIC محاسبه شده در تحقیقات مختلف شود. ماده مورد مطالعه بعدی در این تحقیق، لیزوزیم بود و نتایج نشان داد که لیزوزیم در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نیز نمی‌تواند به طور کامل مانع رشد باکتری ویبریوپاراهمولیتیکوس شود. علت این امر می‌تواند مربوط به غشاء خارجی باکتری‌های گرم منفی باشد، زیرا سوبسترای اصلی لیزوزیم پپتی دوگلیکان است که حدود ۱۰ – ۵ درصد دیواره سلولی باکتری را تشکیل می‌دهد و غشاء خارجی به عنوان سدی در مقابل نفوذ لیزوزیم به دیواره سلولی قرار گرفته است. در مطالعه‌ای که توسط رضوی روحانی و گریفید (۱۹۹٦) انجام گرفت، لیزوزیم در غلظت ٤۷٦۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نتوانست مانع رشد باکتری سالمونلا تایفی موریوم و سایر باکتری‌های مورد مطالعه شود اما در همین مطالعه میزان MIC برای باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس، ۳۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به دست آمد که علت این امر می‌تواند مربوط به حساسیت گونه لاکتوکوکوس باشد [۱۹].

برانن و همکاران (۲۰۰٤) نشان دادند که لیزوزیم در غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نمی‌تواند جلوی رشد سالمونلا انتریدیدیس را بگیرد که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد [۲۰]. در مطالعه حاضر لیزوزیم به تنهایی علیه باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس اثر نسبتاً بازدارنده‌ای داشت، اما شمارش تعداد باکتری در این گروه، در ساعات اولیه تفاوت چندانی با گروه کنترل نداشت. ساعی و همکاران (۱۳۸۸) اثر ضدمیکروبی لیزوزیم به همراه اسانس رزماری را بر علیه باکتری لیستریا مونوسیتوژنز بررسی کردند و نشان دادند که ترکیب لیزوزیم و بخصوص لیزوزیم تیمار شده با اسانس رزماری اثر ضدلیستریایی را افزایش می‌دهد [۲۲]. میثاقی و آخوندزاده (۲۰۰۷) اثر غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی، نیسین و pH را روی باکتری باسیلوس سرئوس مطالعه کرده و نشان دادند که اسانس آویشن شیرازی دارای اثر سینرژیسم با نیسین بوده و این اثر با کاهش pH افزایش می‌یابد [۲۱].

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه، اسانس آویشن شیرازی به تنهایی در ممانعت از رشد باکتری مؤثر بود، اما لیزوزیم به تنهایی نتوانست مانع از رشد باکتری شود. در این تحقیق اگرچه حضور توأم لیزوزیم و اسانس آویشن شیرازی باعث کاهش میزان MIC نشد، اما نتایج بررسی منحنی رشد نشان می‌دهد که ترکیب این دو ماده باعث افزایش فاز تأخیری (Lag phase) شده است که این اثر در میکروبیولوژی مواد غذایی دارای اهمیت بوده و با نتایج مطالعات پیشین نیز مطابقت دارد. در نتیجه این دو ماده به صورت توام می توانند به عنوان نگهدارنده طبیعی علاوه بر ایجاد عطر و طعم مطبوع از رشد و تکثیر باکتری‌های پاتوژن و مولد فساد جلوگیری نمایند.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله محققین این مطالعه از حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه تهران و معاونت پژوهشی دانشکده دامپزشکی تهران قدردانی می نمایند.

منابع

1. Bart S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- A review. *Int. J. Food Microbiol.* 2004; 94 (3): 223 - 53.

2. Palmer S, Stewart J and Fyfe L. The potential application of plant essential oils as natural food preservation in soft cheese. *Food Microbiol.* 2001; 18: 463 - 70.

3. Karaman S, Digrak M, Ravid U and Ilcim A. Antibacterial and antifungal activity of essential oils of *Thymus revolutuscelak* from turkey. *Ethnopharmacol.* 2001; 76: 183 - 6.

4. Basti AA, Misaghi A and Khaschabi D. Growth response and modeling of the effects of *Zataria multiflora* Boiss. Essential oils, pH and temperature on *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. *Food Sci. Technol. Int.* 2007; 40: 973 - 81.

5. Oumzil H, Ghoulami S, Rhajaoui M, Ilidrissi A, Fkihtetouani S, Faid M and Benjoudi A. Antibacterial and antifungal activity of essential oils of Menthasuaveolens. *Phytother. Res.* 2002; 16: 727 - 31.

6. Baumann P and Schubert RH. Family II. *Vibrionaceae* In: Krieg NR, Holt JE. (Eds.), Bergeys manual of systemic bacteriology. Williams & Wilkins Co., Baltimore. 1984, pp: 516 - 550.

7. Liston J. Microbial hazards of seafood consumption. *Food Technol.* 1990; 44: 56 - 62.

8. Duan J and Su YC. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* in two Oregon oyster growing bays. *Food Sci.* 2005; 70: M58 - M63.

9. Davidson PM, Safos GN, Branen AL. Antimicrobials in foods. 3rded. New York. pp: 140 - 3.

10. Millet L, Saubusse M, Didienne R, Tessier L and Montel MC. Control of *Listeria monocytogenes*in raw milk cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* 2006; 108 (1): 105 - 14.

11. Rodriguez E, Gaya P, Nunez M and Medina M. Inhibitory activity of a nisin producing starter culture on *listeria innocua* in raw ewes milk mancho cheese. *Int. J. Food Microbiol*. 1998; 39: 129 - 32.

12. Rasooli I, Mirmostafa SA. Antibacterial properties of *Thymus pubescens* and *Thymus sepylum* essential oils. *Fitotrapia.* 2002; 73: 244 - 50.

13. Fazeli M, Amin GH, Ahmadian AM, Ashtiani H, Jamalifar H and Samadi N. Antimicrobial activities of Iranian sumac and Avishan- e – Shirazi (*Zataria multiflora* Boiss.) against some food borne bacteria. *Food Control* 2006; 18: 646 - 9.

14. Novas MJ and Gimenez AM. Review of chemiluminescent methods in food analysis. *Food Chem.* 1996; 55 (1): 7 - 15.

15. Dakhili M, Zahraei Salehi MT, Torabi M and Khavari A. Evaluation of antibacterial effect of four medicinal plant on *Salmonella typhymurium* and compared them with common antibiotics in veterinary medicine. *J. Med. Plants* 2007; 20: 21 - 26. (In Persian)

16. Bonyadian K, Karim G. Survey on essential oil of some plants (*Artemisia, Oregano*, *peppermint* and *Zataria multiflora*) on *Staphylococcus aureus* and *E. coli* in broth media. *Vet. Res. J. Tehran* 2003; 57 (40): 81 - 3.

17. Moosavy M, Akhondzadeh Basti A, Misaghi A, Zahraei Salehi T, Abbasifar R, Ebrahimzadeh Moosavi H, Alipour M, Emami Razavi N and Gandomi H. Effect of *Zataria muirijiora* Boiss. Essential oil and nisin on *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in a food model system and on the bacterial cell membrane. *Food Res. Int.* 2008; 41: 1050 - 7.

18. Oussalah M, Caillet S, Saucier L and Monique L. Inhibitory effects of selected plant essential oil on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O_{157}*:* H_7*, Salmonella typhimurium, Staphylococcus aureus and Listeria monocytogenes. Food Control* Article in press.

19. Razavi Rohani SM and Griffiths M. The effects of lysozyme and butylatedhydroxyl anisole on spoilage and pathogenic bacteria associated with foods. *Food Saf.* 1996; 16: 56 - 74.

20. Branen JK and Davidson PM. Enhancement of nisin, lysozyme and monolaurin antibacterial activities by ethylenediamineteteraacetic acid and lactoferrin. *Food Microbiol.* 2004; 90: 63 - 74.

21. Misaghi A and Akhondzadeh Basti A. Effects of *Zataria multiflora* Boiss. Essential oil and nisin in *Bacillus cereus* ATCC 1778. *Food Control* 2007; 18: 1043 - 9.

22. Saei - Dehkordi SS, Tajik H, Moradi M, Jafari A and Ghasemi S. Chemical Composition and Antibacterial Effects of *Rosmarinus officinalis* L. Essential Oil with Lysozyme on *Listeria monocytogenes. Armaghan Danesh* 2009; 14: 1 - 11.