

## تعیین میزان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) لیزوژیم و آویشن شیرازی بر باکتری *E. coli O<sub>157</sub>:H<sub>7</sub>*

اعظم حسینزاده<sup>۱</sup>، طاهره مهاجرفر<sup>۲</sup>، افشین آخوندزاده‌بستی<sup>۳\*</sup>، علی خنجری<sup>۴</sup>، حسن گندمی نصرآبادی<sup>۴</sup>، علی میثاقی<sup>۵</sup>، سمیه صادقی<sup>۶</sup>

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: ۱۴۱۵۵ - ۶۴۰۳ - ۶۶۹۳۳۵۱۰ (۰۲۱)، نمبر: ۶۶۹۳۳۲۲۲ (۰۲۱)

پست الکترونیک: aakhond@ut.ac.ir

تاریخ تصویب: ۹۰/۳/۲۱

تاریخ دریافت: ۸۹/۸/۳

### 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) لیزوژیم و انسانس آویشن شیرازی بر باکتری *E. coli O<sub>157</sub>:H<sub>7</sub>* و همین طور تأثیر غلظت‌های تحت بازدارنده‌ی این ترکیبات بر منحنی رشد باکتری فوق انجام گرفته است.

روش مطالعه: در این طرح غلظت‌های مختلف لیزوژیم (صفر، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) و انسانس آویشن شیرازی (صفر، ۱/۰۰۵، ۰/۰۲، ۰/۰۴ و ۰/۰۸ درصد) به صورت تنها و توأم با هم در محیط آبگوشت قلب و مغز جهت تعیین MIC انسانس آویشن شیرازی و لیزوژیم به روش ماکرودایلوشن و میکرودایلوشن و همچنین اثر غلظت‌های تحت بازدارنده‌ی این ترکیبات بر منحنی رشد باکتری *E. coli O<sub>157</sub>:H<sub>7</sub>* بررسی شد.

نتایج: میزان حداقل بازدارندگی انسانس در دو روش ۰/۰۴ درصد به دست آمد، در حالی که غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر لیزوژیم نتوانست مانع رشد باکتری مذکور گردد. همچنین نتایج بررسی اثر ترکیبی نشان داد که بالاترین غلظت لیزوژیم نیز نتوانست میزان MIC محاسبه شده برای انسانس را کاهش دهد. اثر ترکیبی غلظت‌های تحت بازدارنده‌ی انسانس به تهایی و همراه با لیزوژیم نشان داد که ترکیب این دو با هم باعث افزایش فاز تأخیری و کاهش سرعت رشد باکتری موردنظر شد.

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

گل واژگان: انسانس آویشن شیرازی، لیزوژیم، حداقل غلظت بازدارنده، اشرشیا کولی *O<sub>157</sub>:H<sub>7</sub>*



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 MIC) انسانس آویشن شیرازی و لیزوژیم به روش ماکرو دایلشن و میکرو دایلشن و همچنین اثر غلظت‌های تحت باز دارنده این ترکیبات بر منحنی رشد *E. coli O<sub>157</sub>H:7* بررسی شد.

## مواد و روش‌ها

### تهیه انسانس 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.

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

غلظت‌های مورد استفاده از انسانس آویشن شیرازی عبارتند از: صفر، ۰/۰۰۵، ۰/۰۱، ۰/۰۲، ۰/۰۴ و ۰/۰۸ درصد.

### لیزوژیم

ابتدا پودر لیزوژیم خریداری شده از شرکت سرووا (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 لیزوژیم صفر، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود.

### باکتری مورد مطالعه

باکتری مورد مطالعه *E. coli O<sub>157</sub>: H<sub>7</sub>* وروتوکسیژنیک بود که کشت لیوفلیزه آن از انتیتو تحقیقات میکروبیولوژی اتریش به دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران اهدا شده بود. ابتدا کشت لیوفلیزه باکتری به مدت ۱۸ ساعت در دمای

## مقدمه

به منظور کترول 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.

انسانس‌های گیاهی و اجزاء تشکیل‌دهنده آنها دارای اثرات شناخته شده ضدمیکروبی هستند به طور کلی هر چه مقادیر مواد فنولیک در انسان 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 انسانس‌های گیاهی می‌توان از آویشن شیرازی نام برد که سرشاخه‌های خشک شده گیاه *Zataria multiflora* Boiss. می‌باشد. این گیاه از خانواده نعناعیان (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 معروفی شده است [۳]. لیزوژیم یک عامل ضدمیکروبی با خاصیت لیزکنندگی دیواره سلولی باکتری‌هاست. نخستین محل اثر لیزوژیم در پیتیدوگلایکان 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].

لیزوژیم به صورت رایج در غذاهایی چون پنیرها، گوشت پخته، انواع سوسیس (پختنی و سالمی)، برای مهار ترک خوردگی پنیر و تولیدات طیور به کار می‌رود. لیزوژیم برای جلوگیری از رشد بسیاری از کلستریدیوم‌ها از جمله کلستریدیوم بوتولینوم (*C. butolinum*) در غذا (سوسیس خوک یا بوقلمون، سالمون، مارچوبه، سیب زمینی، گوجه فرنگی و قارچ‌ها) مفید است [۵].

در این مطالعه اثر غلظت‌های مختلف لیزوژیم (صفر، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) و انسانس آویشن



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 لیزوژیم در محیط آبگوشت BHI حاوی ۵ درصد DMSO حل شد و توسط فیلتر میکروبیولوژیک ۰/۴۵ میکرومتر استریل شد. سپس غلظت‌های متواتی لیزوژیم (صفر، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر) و غلظت‌های متواتی اسانس آویشن شیرازی (صفر، ۰/۰۰۵، ۰/۰۱، ۰/۰۲، ۰/۰۴ و ۰/۰۸ درصد) در محیط آبگوشت قلب و مغز حاوی ۵ درصد DMSO تهیه شد. به هر یک از رقت‌های تهیه شده از لیزوژیم و آویشن شیرازی، ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی تهیه شده (به غلظت نهایی باکتری  $5 \times 10^5$  cfu/ml) اضافه شد. سپس لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرمانخانه‌گذاری شدند و کدورت یا عدم کدورت در لوله‌ها مشاهده شد و میزان حداقل غلظت بازدارنده‌گی اسانس به نهایی و همچنین لیزوژیم به نهایی و حداقل غلظت ممانعت‌کننده‌گی ترکیب اسانس و لیزوژیم 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 باز دارنده رشد به روش میکرو دایلوشن (Microdilution)

اساس این روش مشابه ماکرو دایلوشن 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 لیزوژیم و اسانس به هر چاهک انتقال داده شد و ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری نیز اضافه شد (غلظت نهایی باکتری در هر چاهک  $cfu/ml = 5 \times 10^5$ ) محتویات هر چاهک به مدت ۲ دقیقه توسط Plate Reader مجهز به Shaker مخلوط شد.

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 ۲۰-۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

### تهیه میزان تلقیح باکتری

جهت تهیه میزان تلقیح باکتری از کشت استوک به داخل محیط آبگوشت قلب و مغز برد 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 لوله کووتی (Cuvett) که حاوی ۴ سلسیوس آبگوشت 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 پیتونه ۰/۱ درصد، رقت‌های متواتی 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 میلی‌لیتر محاسبه شد.

کل آزمایش ۲ مرتبه تکرار شده و میانگین تعداد باکتری در کووت با جذب نوری ۰/۱ معادل  $1 \times 10^4$  cfu/ml محسوب شد. با مشخص شدن این عدد هرگاه که سوسپانسیون باکتریایی با جذب نوری ۰/۰ تهیه شود، تعداد باکتری در آن معادل عدد محاسبه شده بوده و می‌توان از این سوسپانسیون غلظت‌های دلخواه را تهیه نمود.



## تعیین میزان حداقل غلظت ...

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

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

غلظت لیزوزیم (L) (µg/ml)

میکرولیتر سوسپانسیون باکتری با غلظت ( $5 \times 10^7$  cfu/ml) به هر چهار لوله اضافه شد (غلظت نهایی باکتری  $5 \times 10^9$  cfu/ml). لوله‌ها 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 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 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<sub>157</sub>:H<sub>7</sub>* باشد.

سپس جذب نوری با استفاده از Plate reader در ساعت صفر و با طول موج ۳۳۰ 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 توابع با هم روی رشد باکتری *E. coli O<sub>157</sub>:H<sub>7</sub>* 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



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 ۴).

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

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

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

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

غلظت اسانس آویشن شیرازی (Z) (درصد)						
۰/۰۸	۰/۰۴	۰/۰۲	۰/۰۱	۰/۰۰۵	صفرا	غلظت لیزوژیم (ml/gμL)
۳/۰۸×۱۰ <sup>-۱</sup> ± ۴×۱۰ <sup>-۳</sup>	۲/۲۵×۱۰ <sup>-۱</sup> ± ۱/۴×۱۰ <sup>-۲</sup>	۳/۰۲۵×۱۰ <sup>-۱</sup> ± ۱/۵×۱۰ <sup>-۳</sup>	۳/۰۶×۱۰ <sup>-۱</sup> ± ۶×۱۰ <sup>-۴</sup>	۳/۲۲×۱۰ <sup>-۱</sup> ± ۷×۱۰ <sup>-۴</sup>	۳/۳۷۵×۱۰ <sup>-۱</sup> ± ۳/۵×۱۰ <sup>-۳</sup> *	صفرا
۳/۲۵۰×۱۰ <sup>-۱</sup> ± ۵×۱۰ <sup>-۴</sup>	۳/۲۲×۱۰ <sup>-۱</sup> ±۷×۱۰ <sup>-۴</sup>	۳/۲۲۵×۱۰ <sup>-۱</sup> ± ۲/۰×۱۰ <sup>-۳</sup>	۳/۰۱۵×۱۰ <sup>-۱</sup> ± ۷×۱۰ <sup>-۴</sup>	۳/۱۶۵×۱۰ <sup>-۱</sup> ± ۸/۰×۱۰ <sup>-۴</sup>	۳/۳۰۵×۱۰ <sup>-۱</sup> ± ۱/۳۵×۱۰ <sup>-۴</sup>	۱۲۵
۳/۲۳۵×۱۰ <sup>-۱</sup> ± ۲/۰×۱۰ <sup>-۳</sup>	۳/۲۲×۱۰ <sup>-۱</sup> ±۳×۱۰ <sup>-۳</sup>	۳/۱۷×۱۰ <sup>-۱</sup> ± ۱±۱۰ <sup>-۳</sup>	۳/۰۶۵×۱۰ <sup>-۱</sup> ± ۱±۱/۲۵×۱۰ <sup>-۲</sup>	۳/۲۸×۱۰ <sup>-۱</sup> ± ۱±۱/۲۵×۱۰ <sup>-۲</sup>	۳/۳۳۵×۱۰ <sup>-۱</sup> ± ۱±۰×۱۰ <sup>-۴</sup>	۲۵۰
۳/۰۵×۱۰ <sup>-۱</sup> ±۲×۱۰ <sup>-۴</sup>	۳/۲۸۵×۱۰ <sup>-۱</sup> ± ۷/۰×۱۰ <sup>-۳</sup>	۳/۰۳۵۰×۱۰ <sup>-۱</sup> ± ۵×۱۰ <sup>-۴</sup>	۳/۰۲۰۵×۱۰ <sup>-۱</sup> ± ۵/۰×۱۰ <sup>-۴</sup>	۳/۳۱۵×۱۰ <sup>-۱</sup> ± ۵×۱۰ <sup>-۴</sup>	۳/۹۸×۱۰ <sup>-۱</sup> ±۱×۱۰ <sup>-۴</sup>	۵۰۰
۳/۱۷۵×۱۰ <sup>-۱</sup> ± ۵×۱۰ <sup>-۴</sup>	۳/۲۷×۱۰ <sup>-۱</sup> ±۲×۱۰ <sup>-۴</sup>	۳/۰۴×۱۰ <sup>-۱</sup> ± ۴×۱۰ <sup>-۴</sup>	۳/۰۴۱۵×۱۰ <sup>-۱</sup> ± ۲/۰×۱۰ <sup>-۴</sup>	۳/۰۴۱۵×۱۰ <sup>-۱</sup> ± ۷/۰×۱۰ <sup>-۴</sup>	۳/۳۷۵×۱۰ <sup>-۱</sup> ± ۷/۰×۱۰ <sup>-۴</sup>	۱۰۰

\*میانگین ± انحراف معیار

جدول شماره ۴- جذب نوری حالت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی و لیزوژیم بعد از گرمخانه گذاری

غلظت اسانس آویشن شیرازی (Z) (درصد)						
۰/۰۸	۰/۰۴	۰/۰۲	۰/۰۱	۰/۰۰۵	صفرا	غلظت لیزوژیم (ml/gμL)
۳/۱۷۵×۱۰ <sup>-۱</sup> ± ۵×۱۰ <sup>-۴</sup>	۲/۳۲×۱۰ <sup>-۱</sup> ± ۱/۰×۱۰ <sup>-۲</sup>	۵/۷۸×۱۰ <sup>-۱</sup> ±۴/۰	۵/۷۸×۱۰ <sup>-۱</sup> ±۱/۳	۵/۰۳۵×۱۰ <sup>-۱</sup> ±۱/۸	۵/۰۷۵×۱۰ <sup>-۱</sup> ± ۹/۰×۱۰ <sup>-۳</sup> *	صفرا
۳/۲۳۵×۱۰ <sup>-۱</sup> ± ۲×۱۰ <sup>-۴</sup>	۳/۲۸×۱۰ <sup>-۱</sup> ± ۸×۱۰ <sup>-۴</sup>	۴/۶۲×۱۰ <sup>-۱</sup> ± ۲/۰×۱۰ <sup>-۴</sup>	۴/۰۵۰×۱۰ <sup>-۱</sup> ± ۸/۰×۱۰ <sup>-۴</sup>	۴/۴۴۵×۱۰ <sup>-۱</sup> ± ۲/۰×۱۰ <sup>-۴</sup>	۵/۱۰۵×۱۰ <sup>-۱</sup> ± ۵/۰۴۰×۱۰ <sup>-۴</sup>	۱۲۵
۳/۳۱×۱۰ <sup>-۱</sup> ± ۲×۱۰ <sup>-۴</sup>	۳/۲۱۵×۱۰ <sup>-۱</sup> ± ۱/۰×۱۰ <sup>-۴</sup>	۴/۶۱×۱۰ <sup>-۱</sup> ±۱۰ <sup>-۴</sup>	۴/۸۰×۱۰ <sup>-۱</sup> ± ۳/۰×۱۰ <sup>-۴</sup>	۴/۸۲×۱۰ <sup>-۱</sup> ± ۱×۱۰ <sup>-۴</sup>	۵/۰۳۵۰×۱۰ <sup>-۱</sup> ±۱/۶۰	۲۵۰
۳/۰۹۵×۱۰ <sup>-۱</sup> ± ۵×۱۰ <sup>-۴</sup>	۳/۳۵۰×۱۰ <sup>-۱</sup> ± ۹/۰×۱۰ <sup>-۴</sup>	۴/۹۴×۱۰ <sup>-۱</sup> ± ۲/۰×۱۰ <sup>-۴</sup>	۴/۰۵۹۵×۱۰ <sup>-۱</sup> ± ۱/۴۰×۱۰ <sup>-۴</sup>	۴/۶۴۵۰×۱۰ <sup>-۱</sup> ± ۱/۴۰×۱۰ <sup>-۴</sup>	۵/۰۰۵۵×۱۰ <sup>-۱</sup> ± ۷/۰۲۵×۱۰ <sup>-۴</sup>	۵۰۰
۳/۱۹۹×۱۰ <sup>-۱</sup> ± ۳×۱۰ <sup>-۴</sup>	۳/۳۱۰×۱۰ <sup>-۱</sup> ±۱۰ <sup>-۴</sup>	۵/۶۲×۱۰ <sup>-۱</sup> ± ۳/۰۵×۱۰ <sup>-۴</sup>	۵/۰۳۹۵×۱۰ <sup>-۱</sup> ± ۲/۰۵×۱۰ <sup>-۴</sup>	۵/۰۸۷۵×۱۰ <sup>-۱</sup> ± ۷/۰۵×۱۰ <sup>-۴</sup>	۵/۰۷۳۵×۱۰ <sup>-۱</sup> ± ۷/۰۵×۱۰ <sup>-۴</sup>	۱۰۰

\*میانگین ± انحراف معیار



## تعیین میزان حداقل غلظت ...

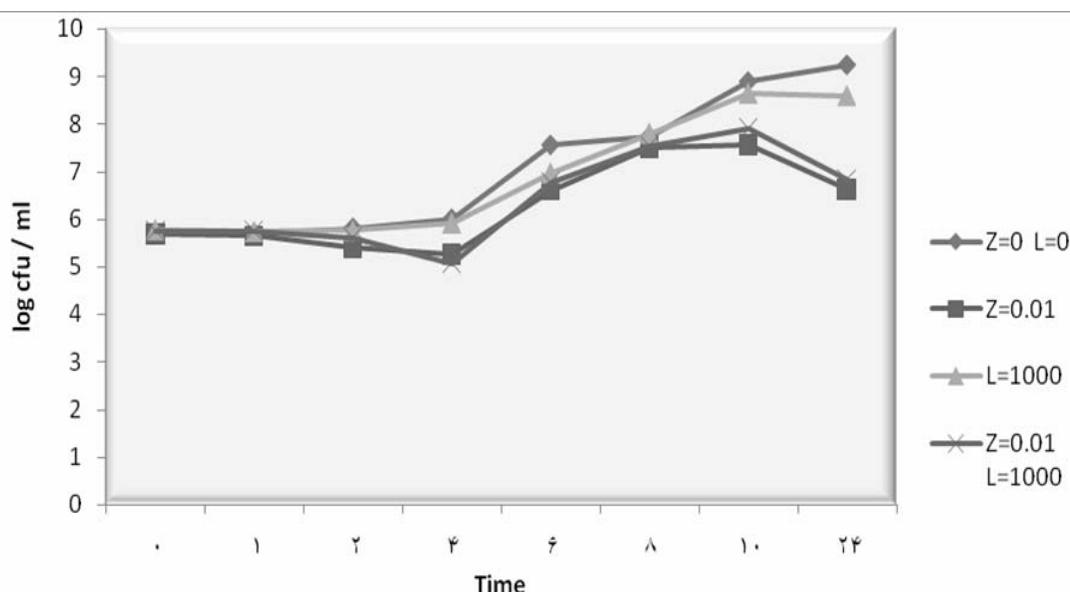
مشاهده شد. از طرفی منحنی رشد باکتری در این گروه شباهت بسیاری به گروه حاوی غلظت  $0/01$  درصد اسانس آویشن شیرازی به تنهایی داشت.

در نمودار  $2$  فاز تأخیری منحنی رشد باکتری *E. Coli*  $O_{157}: H_7$  در حضور غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی و لیزوژیم نشان داده شده است. همان‌گونه که در نمودار شماره  $2$  مشخص است در گروه کنترل طی ساعت اول گرمخانه‌گذاری، شمارش تعداد باکتری تغییر معنی‌داری را نشان نداد و از ساعت  $2$  به بعد افزایش معنی‌دار تعداد باکتری مشاهده شد.

در حضور غلظت  $0/01$  درصد اسانس آویشن شیرازی کاهش تعداد باکتری تا ساعت  $4$  گرمخانه‌گذاری مشاهده شد و از این ساعت به بعد افزایش تعداد باکتری و شروع فاز لگاریتمی مشاهده می‌شود. در محیط حاوی  $1000$  میکروگرم در میلی‌لیتر لیزوژیم 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 لیزوژیم باعث کاهش چشمگیر تعداد باکتری در  $4$  ساعت اول گرمخانه‌گذاری شد و بعد از آن افزایش تعداد باکتری مشاهده شد.

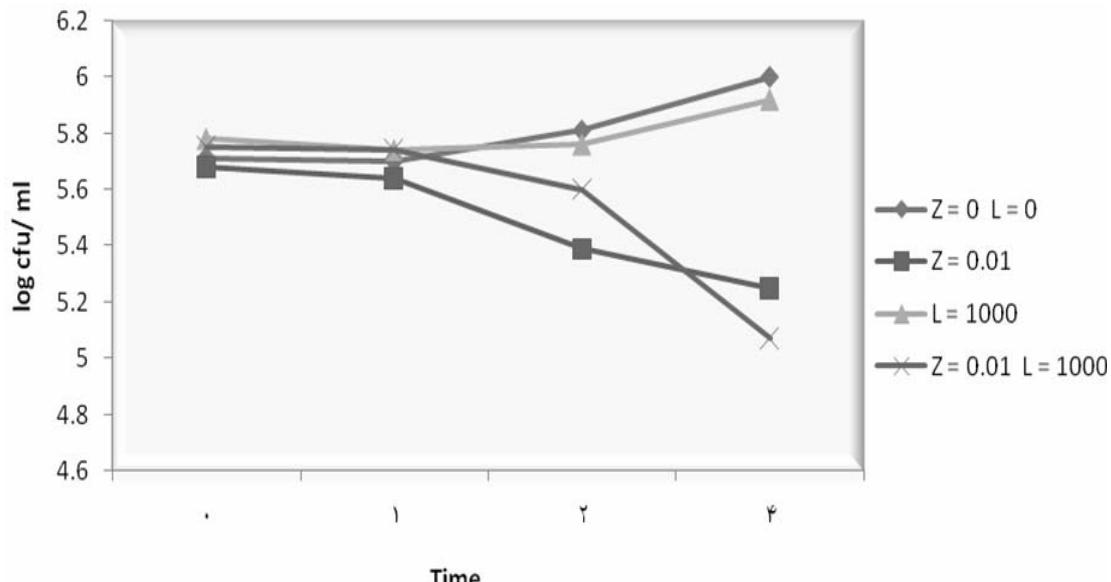
## نتایج بررسی منحنی رشد باکتری *E. coli O<sub>157</sub>: H<sub>7</sub>* در حضور اسانس آویشن شیرازی و لیزوژیم

همان‌گونه که در نمودار شماره  $1$  مشخص است غلظت  $0/01$  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  $10$  گرمخانه‌گذاری لگاریتم تعداد باکتری در این گروه ( $7/56 \times 10^7$  cfu/ml) بوده در حالی که در گروه کنترل لگاریتم تعداد باکتری در این ساعت  $8/88 \times 10^8$  cfu/ml) می‌باشد. غلظت  $1000$  میکروگرم در میلی‌لیتر لیزوژیم به تنهایی تأثیر چندانی بر منحنی رشد باکتری در مقایسه با گروه کنترل نداشت. حضور همزمان غلظت  $0/01$  درصد اسانس آویشن شیرازی و غلظت  $1000$  میکروگرم در میلی‌لیتر هم باعث کاهش رشد باکتری نسبت به گروه کنترل تا ساعت  $4$  گرمخانه‌گذاری شد اما در ساعت  $8$  به بعد لگاریتم تعداد باکتری به  $7/54 \times 10^7$  cfu/ml) رسید که تفاوت معنی‌داری با گروه‌های دیگر نداشت. اما در ساعت  $24$  تفاوت معنی‌داری به لحاظ شمارش باکتری بین ترکیب غلظت  $0/01$  درصد آویشن و غلظت  $1000$  میکروگرم در میلی‌لیتر لیزوژیم و گروه کنترل



نمودار شماره  $1$ - منحنی رشد باکتری *E. coli O<sub>157</sub>: H<sub>7</sub>* در حضور اسانس آویشن شیرازی و لیزوژیم (Z: آویشن L: لیزوژیم)





نمودار شماره ۲- فاز تاخیری منحنی رشد باکتری *E. coli O<sub>157</sub>: H<sub>7</sub>* در حضور اسانس آویشن شیرازی و لیزوزیم (Z: آویشن L: لیزوزیم)

## بحث

(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 قوى اسانس *Thymus Revolutus* را بر روی باکتری های گرم منفی نشان دادند. آنها احتمال دادند این اثرات به علت میزان بالاي 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 برروی 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.

آویشن شیرازی علیه باکتری های مورد مطالعه ۰/۸ تا ۰/۰۵ MIC

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 طایی تأثیرگذار است [۶].

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

بررسی کرده و مشاهده کردند لیزوژیم همراه با BHA بر ضدباکتری‌ها (در حضور یا عدم حضور EDTA) با وجود pH پایین‌تر و غلظت نمک بالاتر، اثر مهاری بالاتر داشت. لیزوژیم با شلاته کننده‌های دیگر مثل سدیم سیترات و منوگلیسروول سیترات قادر به مهار کردن نبود [۱۵].

- پارک و همکاران (۲۰۰۴) ثابت کردند که فعالیت ضدباکتری لیزوژیم می‌تواند با الحاق به چیتوزان تقویت شود که این مسئله می‌تواند استفاده از این مواد را در صنایع غذایی افزایش دهد [۱۶].

- اسمیت و همکاران (۱۹۹۱) تأثیر لیزوژیم و حرارت را بر رشد لیستریا منوسيتوژن بروزی و پیشنهاد کردند، لیزوژیم 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 انسانس باعث ایجاد اثرات نامطلوب روی طعم غذا می‌شود و استفاده از یک نگهدارنده با مقادیر بالا مقرن 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 انسانس آویشن شیرازی ۰/۰۴ درصد به دست آمد. غلظت ۰/۰۱ درصد به تنها بیان کاهش سرعت رشد باکتری نسبت به گروه کنترل شد. بنابراین این انسانس قادر است به عنوان یک نگهدارنده مناسب علیه باکتری‌های پاتوژن غذایی مورد استفاده قرار گیرد. ماده مورد مطالعه دیگر لیزوژیم بود و نتایج نشان داد که لیزوژیم 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 آنریم باشد.

در تحقیق حاضر اثر توأم انسانس آویشن شیرازی و لیزوژیم روی باکتری *E. coli O<sub>157:H7</sub>* در محیط آبگوشت قلب و مغز مورد بررسی قرار گرفت که حضور توأم لیزوژیم و انسانس

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

- دخیلی و همکاران (۱۳۸۵) اثرات ضدمیکروبی چهار انسنس 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 انسنس آویشن شیرازی بر سالمونلا تیفی موریوم در مقایسه با ۳ آنتی‌بیوتیک اکسی تتراسایکلین، فلومکوئین و اریتروماسین بسیار بیشتر بوده است [۱۱].

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

مطالعاتی در ارتباط با اثر سینرژیستی انسنس‌های 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 پتاسدیم تری‌پلی‌فسفات (DSTPP) به همراه لیزوژیم را برای مهار R<sub>4</sub> گونه *E. coli O<sub>157:H7</sub>* بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که افزودن EDTA فعالیت مهاری لیزوژیم را روی گونه‌های اشرشیاکلی افزایش می‌دهد ولی شلاته کننده‌های فسفات‌دار نیاز به میزان بیشتری لیزوژیم برای مهار اشرشیاکلی دارند [۱۴].

- رضوی روحانی و همکاران (۱۹۹۵) اثر لیزوژیم، BHA (**Butylated hydroxyanizole**) و عوامل pH، نمک، و 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 RangelandsTehran 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 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 lysozyme 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.



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.

