

## بررسی اثر ضدبacterیایی سفیده تخم اردک، بلدرچین، مرغ‌های طبیعی و مصنوعی بر روی تعدادی از bacterیهای گرم منفی و گرم مثبت در محیط آزمایشگاهی

آرزو اعظمی<sup>a</sup>، حیدر موسوی<sup>a</sup>، هاجر بدربی<sup>b</sup>، اسماعیل نجفی<sup>c</sup>، مریم زارع<sup>d</sup>، شهرام نظری<sup>b\*</sup>

<sup>a</sup>الجامعة الإسلامية للدراسات العليا، كلية العلوم الطبية، طهران، إيران

<sup>b</sup>گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده علوم پزشکی خلخال، خلخال، ایران

<sup>c</sup>گروه بهداشت عمومی، دانشکده علوم پزشکی خلخال، خلخال، ایران

<sup>d</sup>گروه علوم تغذیه، دانشکده علوم پزشکی خلخال، خلخال، ایران

### چکیده

سابقه و هدف: یکی از مهم‌ترین نگرانی‌های بهداشت عمومی در سراسر جهان عوامل بیماری‌زا ناشی از مواد غذایی (از جمله bacterیهای، ویروس‌ها و انگل‌ها) است. از جمله موادی که خاصیت ضدبacterیایی بالایی دارد، سفیده تخم مرغ می‌باشد. هدف از پژوهش کنونی تعیین حداقل غلظت بازدارندگی و کشنندگی سفیده تخم اردک، بلدرچین، مرغ‌های طبیعی و مصنوعی بر روی تعدادی از bacterیهای گرم منفی و گرم مثبت در شرایط آزمایشگاهی است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، با استفاده از روش مبکر و براث دایلوشن و انتشار دیسک، اثرات ضدبacterیایی سفیده تخم اردک، بلدرچین، مرغ‌های طبیعی و مصنوعی بر روی تعدادی از bacterیهای گرم منفی و گرم مثبت آزمایش شد. در این آزمایش گونه‌های bacterیایی شبکه دیسانتری، پاسیلوس سوبتیلیس، کلبسیلا اکسی‌توکا، استافیلوکوک اورثوس، سالمونولا تیفی موریوم، اشريشیا کلی و سودوموناس آئروژنیزا در مواجهه با غلظت‌های متفاوتی از سفیده تخم‌ها قرار گرفتند و MBC و MIC و قطر هالة عدم رشد ناشی از مواد ضدبacterیایی بر روی این bacterیهای مثبت آزمایشگاهی و بالینی (CLSI) تعیین شد.

یافته‌ها: مقدار MIC سفیده تخم مرغ‌های طبیعی و بلدرچین در محدوده ۲۵ تا ۵۰ درصد برای bacterیهای مورد مطالعه به دست آمد. همچنین مقدار MBC سفیده تخم مرغ‌های طبیعی، مصنوعی، بلدرچین و اردک در محدوده ۵۰ درصد برای بعضی از bacterیهای مورد مطالعه به دست آمد. همچنین قطر هالة عدم رشد در محدوده ۹ تا ۱۴ میلی‌متر بدست آمد.

نتیجه گیری: نتایج پژوهش کنونی نشان می‌دهد که سفیده تخم اردک، بلدرچین، مرغ‌های طبیعی و مصنوعی در حذف bacterیهای گرم منفی و مثبت مؤثر است.

تاریخ دریافت: اسفند ۱۴۰۲

تاریخ پذیرش: تیر ۱۴۰۳

باکتریهای گرم مثبت، bacterیهای گرم منفی

**مقدمه**  
سریع‌ترین اثرات مختلف سالمونولا باعث بیماری‌هایی چون پولوروم هستند که عامل آن سالمونولا پولوروم می‌باشد (۱). پاراتیفوئید بیماری‌ای است که دارای عالائم مشابه پولوروم و دارای اهمیت زیاد می‌باشد؛ زیرا عوامل ایجاد‌کننده آن به ترتیب سالمونولا تیفی موریوم، انتریتیدیس، سالمونولا هاوانا و ... هستند (۲). بررسی‌ها نشان می‌دهند که سالمونولا انتریتیدیس در اغلب اپیدمی‌های سالمونلوز با منشأ تخم مرغی دخالت دارد. مصرف تخم مرغ آلووه از مهم‌ترین منابع عفونت سالمونلایی است (۳). بیشتر گونه‌های

یکی از مهم‌ترین نگرانی‌های بهداشت عمومی در سراسر جهان عوامل بیماری‌زا ناشی از مواد غذایی (از جمله bacterیهای، ویروس‌ها و انگل‌ها) است (۴). پاتوژن‌های منتقله از غذا (عمدتاً عوامل bacterیایی)، منجر به بیماری‌های روده‌ای و خارج روده‌ای می‌شوند (۵). سالمونلاها دسته بزرگی از باسیل‌های گرم منفی اند که مقاومت بالایی به عوامل شیمیایی نظیر غلظت زیاد صفراء و همچنین عوامل فیزیکی نظیر حرارت و مواد ضدغافنی کننده دارند (۶).

محسوب می‌شوند، می‌توانند به سلامتی انسان و محیط زیست آسیب بزنند. بنابراین یافتن مواد ضدمیکروبی طبیعی با کمترین عارضه و نیز کمترین مقاومت، یکی از دغدغه‌های محققان است (۷). یکی از این مواد ضدمیکروبی، که خاصیت ضدمیکروبی بالایی دارد، سفیده تخم مرغ است. سفیده تخم مرغ متشکل از ۸۸ درصد آب، ۱۰/۶ درصد پروتئین، ۰/۹ درصد کربوهیدرات و ۰/۵ درصد مواد معدنی می‌باشد (۱۴). چندین پروتئین در سفیده تخم مرغ شناسایی شده است که بعضی از آنها خواص ضدمیکروبی دارند، مانند لیزوژیم و دیفنسین‌ها به پوشش باکتری‌ها آسیب می‌رسانند (۱۵). برخی دیگر مثل لوواستاتین، سیستاتین، اوآلوبین به عنوان مهارکننده پروتئازهای باکتریایی عمل می‌کند یا دسترسی باکتری را به مواد مغذی موردنیاز خود محدود می‌کند (۱۶). سفیده تخم مرغ همچنین حاوی مقادیر قابل توجهی اووترانسفرین (۱۳ گرم در لیتر) است که یک پروتئین کلات کننده فلزی متعلق به خانواده ترانسفرین‌ها است. اتصال اووترانسفرین به آهن باعث کاهش میزان آهن برای فعالیت باکتری‌ها می‌شود. در میان پروتئین‌های سفیده تخم مرغ که فعالیت ضدمیکروبی را نشان می‌دهند، اووترانسفرین تنها پروتئینی است که از رشد سالمونلا انتریتیدیس جلوگیری می‌کند (۸). علاوه بر این، شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد اووترانسفرین می‌تواند با اتصال به غشای باکتری، نفوذپذیری آن را مختل کند و درنهایت منجر به مرگ باکتری شود (۱۷). سفیده تخم مرغ شرایط خاصی از PH، ویسکوزیته، ترکیب یونی و فعالیت‌های پروتئینی را ارائه می‌دهد که می‌تواند به طور قابل توجهی بر عملکرد ضدباکتریایی اووترانسفرین تأثیر بگذارد (۱۸). ویسکوزیته بالای سفیده تخم مرغ می‌تواند تحرک باکتری‌ها و دسترسی به مواد مغذی از جمله آهن را محدود کند. PH افزایش‌یافته به عنوان بخشی از فعالیت ضدمیکروبی سفیده تخم مرغ شناخته می‌شود که می‌تواند بر فعالیت مولکول‌های ضدمیکروبی و همچنین وضعیت غشای باکتری تأثیر بگذارد (۱۹).

باسیلوس برای انسان خطرناک تلقی نمی‌شوند، بنابراین برای تخمیر برخی غذاها از آنها استفاده می‌شود. با این حال، گونه‌هایی مانند باسیلوس سوبتیلیس و باسیلوس آنتراسیس به عنوان آلووده‌کننده‌های غذایی یا به عنوان عوامل عفونی در نظر گرفته می‌شوند (۷). باسیلوس سوبتیلیس قادر به رشد در غذاها بوده و از طریق تولید انتروتوكسین مولد اسهال و توکسین تهوع‌زا، ایجاد مسمومیت می‌کند. باسیلوس آنتراسیس به دلیل ایجاد سیاهزخم پاتوژن عمده این جنس محسوب می‌شود (۸). اشریشیا کلی نیز یکی از باکتری‌های شایع بیماری‌زایی است که به عنوان شاخص وجود عوامل بیماری‌زا در آب‌های سطحی و شاخصی جهت نشان‌دادن کارایی گندزداها در تصفیه‌خانه محسوب می‌شود. راه ورود این باکتری گرم منفی به بدن از طریق آب، مواد غذایی، سبزیجات و میوه است. دستگاه گوارش انسان نسبت به اشریشیا کلی بسیار آسیب‌پذیر بوده و با ورود به بدن سبب اسهال می‌شود (۹). گونه‌های شیگلا یکی از مهم‌ترین پاتوژن‌های باکتریایی منتقله از غذا در سرتاسر جهان به‌ویژه در کشورهای درحال توسعه محسوب می‌شود، به طوری که ۹۹ درصد از عفونت‌های شیگلایی در این کشورها رخ می‌دهد (۱۰). شیگلا بعد از سالمونلا و استافیلوکوک از نظر ایجاد مسمومیت‌های غذایی در مکان سوم قرار دارد (۱۱). علاوه بر میزان شیوع مقاومت چندارویی، گونه‌های شیگلا اخیراً به یک نگرانی مهم در اینمنی مواد غذایی تبدیل شده است. شیگلا دیسانتری تیپ یک به‌شدت بیماری‌زا و تنها زیرگونه ایجادکننده اپیدمی و پاندمی در جهان است (۱۱، ۱۲). کلبسیلا، باسیلی گرم منفی و غیرمتحرک متعلق به خانواده انتروباکتریاسه است. کلبسیلا دو سویه بیماری‌زا دارد: کلبسیلا پنومونیه و کلبسیلا اکسی‌توکا. کلبسیلا اکسی‌توکا یک پاتوژن فرست طلب در انسان می‌باشد و در حال حاضر به عنوان دومین پاتوژن مهم بالینی از جنس کلبسیلا در نظر گرفته می‌شود (۱۳). انواع مختلفی از مواد ضدمیکروبی مانند کلر، برم، ید، نیتریت و نیترات وجود دارد که در صنایع مختلف از آنها استفاده می‌شود. به دلیل این که هرکدام از این مواد نوعی مواد شیمیایی سنتزی

داده شد. سپس پلیت‌های تلقیح شده در گرمخانه با دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند (۲۳).

#### تهیه استاندارد مکفارلند

در این پژوهش، استاندارد مکفارلند به عنوان مرجعی برای مطابقت‌دادن کدورت ناشی از سوسپانسیون باکتری استفاده شد. مواد مورد استفاده برای تهیه استاندارد نیم مکفارلند شامل: باریم کلرید ( $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) دهیدراته و اسیدسولفوریک ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) بوده که از شرکت Merck تهیه شد. با مخلوط کردن ۰/۰۵ میلی لیتر باریم کلرید دهیدراته (۱/۱۷۵  $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) درصد با ۹/۹۵ میلی لیتر اسیدسولفوریک ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) ۱ درصد، استاندارد نیم مکفارلند تهیه شد. با مخلوط این دو ترکیب رسوب سولفات باریم، که سبب ایجاد کدورت در محلول می‌شود، به وجود آمد. جذب نوری کدورت ایجاد شده توسط محلول نیم مکفارلند در طول موج ۶۱۰ نانومتر به وسیله اسپکتروفوتومتر (مدل Hach) اندازه‌گیری شد. از آنجایی که تعداد باکتری تلقیح شده یکی از مهم‌ترین متغیرهایی است که بر نتیجه این پژوهش اثر می‌گذارد، تراکم سوسپانسیون میکروبی تلقیحی باید استاندارد باشد. به این منظور برای تهیه سوسپانسیون میکروبی، از کشت تازه و جوان باکتری با استفاده از لوب استریل، چند کلنجی به لوله حاوی سرم فیزیولوژی استریل انتقال داده شد. کلنجی‌های باکتری تا حدی به سرم فیزیولوژی اضافه شد تا کدورت ایجاد شده توسط باکتری‌ها معادل با کدورت اندازه‌گیری شده در لوله استاندارد نیم مکفارلند باشد. با توجه به این که غلظت باکتریایی نیم مکفارلند برابر  $10^8 \times 10^5$  میلی لیتر است، برای به دست آوردن سایر رقت‌های باکتریایی از رقیق‌سازی استفاده شد. این عملیات برای همه باکتری‌های موردمطالعه به طور جداگانه انجام گرفت. تمامی آزمایش‌ها برابر با دستورالعمل‌های مؤسسه استاندارد و آزمایشگاه پزشکی CLSI (and Laboratory Standards Institute) انجام شد.

پژوهشگران روش‌های تعیین هالة عدم رشد یا ناحیه بازدارندگی، تعیین حداقل غلظت بازدارندگی و کشنندگی را برای بررسی تأثیر مواد ضدباکتریایی بر باکتری‌های هدف به کار برده‌اند (۲۰، ۲۱). هالة عدم رشد به عنوان یک روش کیفی برای تعیین مقاومت یک باکتری در برابر ماده ضدمیکروبی به کار گرفته می‌شود. حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشنندگی برای بررسی کمی خاصیت ضدمیکروبی سفیده‌های تخم به کار گرفته خواهد شد. حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشنندگی می‌توانند بهترین روش برآورد حساسیت باکتری به صورت کمی باشند (۲۲).

#### مواد و روش‌ها

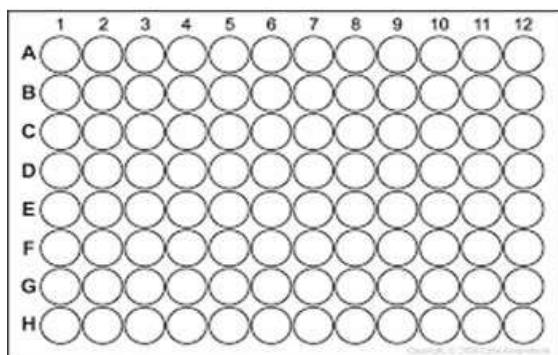
##### مواد مورد استفاده

محیط کشت مولر هیلتون برات، مولر هیلتون آگار، باریم کلرید ( $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) دهیدراته، اسیدسولفوریک ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) و بافر فسفات نرمال سالین ۰/۰۱ M که از شرکت Merck تهیه شد.

##### سویه‌های باکتری

سویه‌های باکتری استفاده شده در پژوهش کنونی شامل سویه استاندارد کلبسیلا اکسی‌توكا (ATCC: 700603)، اشريشیا کلی (ATCC: 23591)، شیگلا دیسانتری (ATCC: 12022)، سالمونلا تیفی‌موریوم (ATCC: 14028)، سودوموناس آروژینوزا (ATCC: 27853)، باسیلوس سوبتیلیس (ATCC: 1254) و استافیلکوک اورئوس (ATCC: 25923) است که از مرکز پژوهش‌های صنعتی ایران تهیه شد. تمامی سویه‌های باکتریایی خریداری شده، در محیط کشت مولر هیلتون برات در شرایط هوایی و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم‌گذاری شدند. سپس با لوب استریل از محیط کشت مولر هیلتون برات مقداری برداشته و بر روی محیط‌های کشت اختصاصی هر باکتری، به حالت خطی کشت

شد. پس از طی زمان گرمانه‌گذاری، چاهک‌ها از نظر کدورت ناشی از رشد باکتری تلقیح شده بررسی شدند. چاهکی با کمترین غلظت از سفیده‌ها که رشد باکتری در آن مشاهده نشد، به عنوان MIC تعیین گردید. برای تعیین MBC سفیده تخم اردک، بلدرچین، مرغ‌های طبیعی و مصنوعی، از چاهک‌هایی که رشد در آنها مشاهده نشده بود ۱۰ میکرولیتر بر روی محیط کشت مولر هیتون آگار کشت داده شدند و در گرمانه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمانه‌گذاری شدند. بعد از گرمانه‌گذاری پلیت مربوط به چاهکی که حاوی کمترین غلظت از سفیده‌ها در آن بود و رشد باکتری برابر یا کمتر از ۱۱ کلنی در آن مشاهده شد، به عنوان MBC در نظر گرفته شد. تمامی این عملیات در زیر هود استریل انجام گردید.



شکل ۱. میکروچاهک‌ها برای تعیین MIC و MBC

## تعیین حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی

آزمایش‌های حداقل غلظت بازدارندگی (Minimum Inhibitory Concentration) و حداقل غلظت کشندگی (Minimum Bactericidal Concentration) از روش رقیقسازی میکرو براساس روش توصیه شده توسط CLSI انجام گرفت.

در این روش از میکروچاهک‌ها (شکل ۱) برای تعیین اثر ضدبacterیایی غلظت‌های مختلف سفیده تخم اردک، بلدرچین، مرغ‌های طبیعی و مصنوعی استفاده شد. یک چاهک شاهد به عنوان کنترل مثبت و یک چاهک شاهد به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. شاهد مثبت حاوی محیط کشت مولر هیتون براث و باکتری است که ماده ضدبacterیایی به آن اضافه نشده است. همچنین شاهد منفی فقط حاوی محیط کشت می‌باشد. برای تعیین مقدار دقیق MIC و MBC سفیده تخم اردک، بلدرچین، مرغ‌های طبیعی و مصنوعی در مقابل هر باکتری، آزمایش‌ها با غلظت‌های مختلف (۵۰ درصد، ۲۵ درصد، ۱۲/۵ درصد، ۶/۲۵ درصد، ۳/۱۲۵ درصد و ...) سفیده‌ها به صورت رقیقسازی سریالی انجام داده شد. به چاهک‌های ردیف A (شکل ۱)، که شامل ۱۲ چاهک است، به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت مولر هیتون براث استریل ریخته شد سپس از سفیده‌های تهیه شده، ۱۰۰ میکرولیتر به چاهک شماره A1 ریخته شد و چندین بار پیپت گردید و سپس از چاهک A1، ۱۰۰ میکرولیتر برداشت شد و به چاهک A2 انتقال داده شد. این عملیات رقیقسازی تا چاهک A10 انجام داده شد و غلظت سفیده در خانه A10 به اندازه ۱۰/۰۵ برابر غلظت اولیه کاهش پیدا کرد. چاهک‌های A11 و A12 به ترتیب به عنوان کنترل مثبت و کنترل منفی در نظر گرفته شد. سپس ۵ میکرولیتر از محلول باکتری با غلظت یکدهم برابر نیم مکارلند به همه چاهک‌ها به جز چاهک کنترل منفی اضافه گردید. سپس میکروپلیت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در گرمانه قرار داده

## روش دیسک آگار دیفیوژن

از کدورت سوسپانسیون میکروبی تهیه شده مطابق با استاندارد نیم مکارلند در پلیت‌های حاوی محیط کشت مولر هیتون آگار به وسیله سواپ استریل به صورت یکنواخت کشت داده شدند، سپس دیسک‌های خالی (Blank disk) ۶ میلی‌متری در شرایط کاملاً استریل به ۵۰ میکرولیتر از سفیده‌ها آغشته و به منظور خشک شدن به مدت ۳۰ دقیقه در کنار شعله قرار داده شدند و سپس دیسک‌ها در داخل پلیت‌ها به فاصله مناسب قرار گرفته و پس از گرمانه‌گذاری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، قطر هاله عدم رشد به وسیله خطکش برای

اشریشیا کلی، باسیلوس سوبتیلیس و سودوموناس آئروژینوزا در غلظت ۵۰ درصد، برای باکتری‌های استافیلوکوک اورئوس و سالمونلا تیفی‌موربیوم در غلظت ۲۵ درصد و برای باکتری شیگلا دیسانتری در غلظت ۶/۲۵ درصد به دست آمد. همچنین MIC سفیده تخم مرغ‌های مصنوعی برای باکتری‌های سالمونلا تیفی‌موربیوم و شیگلا دیسانتری به ترتیب در غلظت ۲۵ درصد و ۵۰ درصد به دست آمد. مقدار MIC سفیده تخم بلدرچین برای باکتری‌های اشریشیا کلی، سودوموناس آئروژینوزا، استافیلوکوک اورئوس و کلیسیلا اکسی‌توكا در غلظت ۵۰ درصد، برای باکتری‌های باسیلوس سوبتیلیس و شیگلا دیسانتری در غلظت ۲۵ درصد و برای باکتری سالمونلا تیفی‌موربیوم در غلظت ۶/۲۵ درصد به دست آمد. مقدار MIC سفیده تخم اردک برای باکتری‌های باسیلوس سوبتیلیس، شیگلا دیسانتری و کلیسیلا اکسی‌توكا در غلظت ۵۰ درصد و باکتری سودوموناس آئروژینوزا در غلظت ۲۵ درصد به دست آمد (شکل ۲-الف). در جدول ۲ نتایج MIC سفیده انواع تخم‌ها نشان داده شده است. نتایج به دست آمده از آزمایش MBC نشان می‌دهد که سفیده تخم مرغ طبیعی در غلظت ۵۰ درصد فقط بر روی باکتری شیگلا دیسانتری و سفیده تخم بلدرچین در غلظت ۵۰ درصد فقط بر روی باکتری اشریشیا کلی اثر کشنندگی دارد (شکل ۲-ب).

هر کدام از آنها اندازه‌گیری و بر حسب میلی‌متر گزارش شد. تمامی این عملیات برای سویه‌های باکتریایی مورد مطالعه به صورت جداگانه انجام گردید.

برای همه نمونه‌های مورد آزمایش یک نمونه به عنوان نمونه شاهد استفاده شد (دیسک آغشته به آب مقطر، بدون سفیده تخم اردک، بلدرچین، مرغ‌های طبیعی و مصنوعی). تمامی آزمایش‌های حذف باکتری‌ها در محیط آبی با خصوصیات PBS (Phosphate Buffered Saline) انجام گردید (جدول ۱).

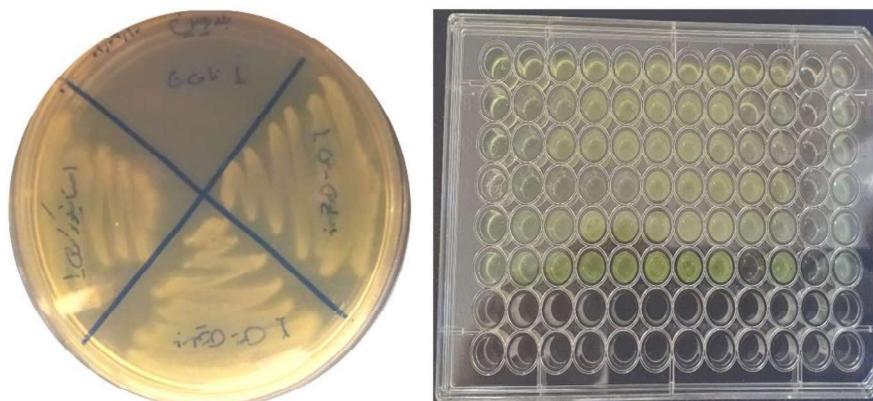
جدول ۱. خصوصیات بافر فسفات نرمال سالین

PBS, ۰/۰۱ M	
۸ گرم	NaCl
۰/۲ گرم	KCl
۲/۱۷ گرم	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O
۰/۲۵۹ گرم	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
۱ لیتر	آب مقطر

#### یافته‌ها

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشنندگی (MBC)

مقدار MIC سفیده تخم مرغ‌های طبیعی برای باکتری‌های



شکل ۲. نمونه‌ای از نتایج آزمایش MIC و آزمایش MBC

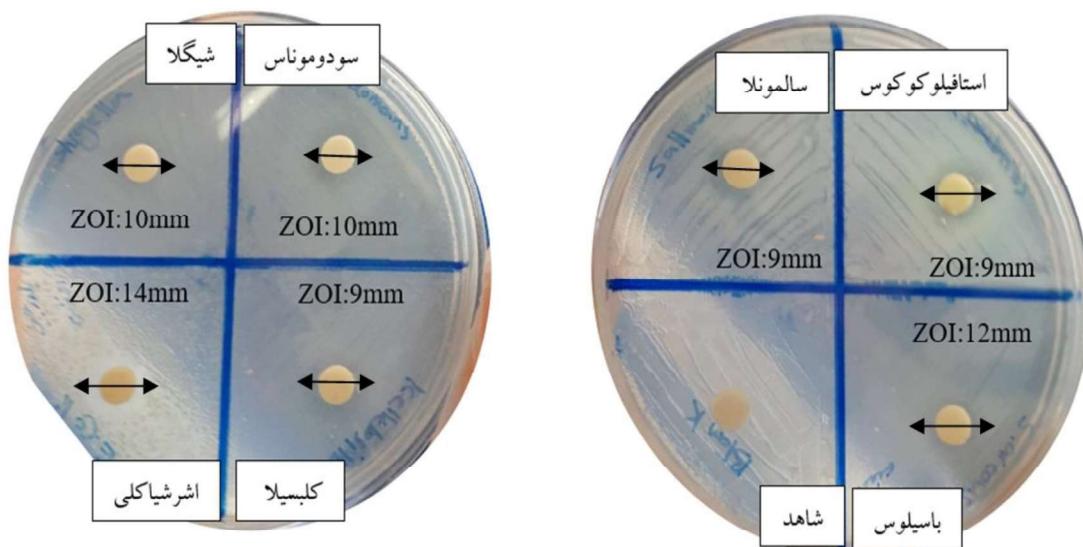
جدول ۲. نتایج MIC سفیده تخم مرغ طبیعی، مصنوعی، بلدرچین و اردک بر روی باکتری‌های مورد مطالعه

شیگلا دیسانتری (درصد)	سالمونلا تیفی‌موریوم (درصد)	کلبیسلا اکسی‌توکا (درصد)	استافیلوكوک اورئوس (درصد)	سودوموناس آئروژینوزا (درصد)	باسیلوس سوپتیلیس (درصد)	اشریشیا کلی (درصد)	MIC
۷/۲۵	۲۵	-	۲۵	۵۰	۵۰	۵۰	تخم مرغ طبیعی
۵۰	۲۵	-	-	-	-	-	تخم مرغ مصنوعی
۲۵	۷/۲۵	۵۰	۵۰	۵۰	۲۵	۵۰	تخم بلدرچین
۵۰	-	۵۰	-	۲۵	۵۰	-	تخم اردک

سودوموناس آئروژینوزا و شیگلا دیسانتری برابر ۱۰ میلی‌متر، برای باکتری باسیلوس سوبتیلیس برابر ۱۲ میلی‌متر و برای باکتری اشریشیا کلی برابر ۱۴ میلی‌متر در مواجهه با سفیده تخم بلدرچین به دست آمد. در مواجهه با سفیده تخم اردک قطره هاله عدم رشد برای هیچ‌کدام از باکتری‌ها تشکیل نشد (شکل ۳). در جدول ۳ نتایج قطره هاله عدم رشد سفیده انواع تخم‌ها نشان داده شده است.

#### تعیین قطر هاله عدم رشد (Zone of Inhibition)

قطر هاله عدم رشد باکتری اشریشیا کلی در مواجهه با سفیده تخم مرغ طبیعی ۱۰ میلی‌متر به دست آمد. همچنین برای باکتری‌های اشریشیا کلی، سودوموناس آئروژینوزا و کلبیسلا اکسی‌توکا در مواجهه با سفیده تخم مرغ مصنوعی به ترتیب برابر ۱۰، ۱۲، ۱۱ به دست آمد. قطره هاله عدم رشد برای باکتری‌های استافیلوكوک اورئوس، کلبیسلا اکسی‌توکا و سالمونلا تیفی‌موریوم برابر ۹ میلی‌متر، برای باکتری‌های



شکل ۳. نمونه‌ای از تصاویر قطره هاله عدم رشد باکتری‌ها در مواجهه با سفیده تخم بلدرچین

جدول ۲. نتایج قطر هاله عدم رشد سفیده تخم مرغ طبیعی، مصنوعی، بلدرچین و اردک بر روی باکتری‌های مورد مطالعه

قطر هاله عدم رشد	اشریشیا کلی (میلی‌متر)	باسیلوس سوبتیلیس (میلی‌متر)	سودوموناس آژروژینوزا (میلی‌متر)	استافیلوکوک اورئوس (میلی‌متر)	کلبسیلا اکسی‌توکا (میلی‌متر)	تیفی‌موریوم (میلی‌متر)	سالمونلا	شیگلا دیسانتری (میلی‌متر)
تخم مرغ طبیعی	۱۰	-	-	-	-	-	-	-
تخم مرغ مصنوعی	۱۰	-	۱۲	-	۱۱	-	-	-
تخم بلدرچین	۱۴	۱۲	۱۰	۹	۹	۹	۹	۱۰
تخم اردک	-	-	-	-	-	-	-	-

این نتیجه حاصل شد که حساس‌ترین باکتری سالمونلا تیفی‌موریوم است که تا رقت ۶/۲۵ درصد نتوانسته بود در برابر سفیده تخم بلدرچین رشد کند. سفیده تخم بلدرچین بر روی بقیه باکتری‌ها هم در رقت‌های مختلف اثر بازدارندگی داشت به‌طوری‌که باکتری‌های شیگلا دیسانتری و باسیلوس سوبتیلیس در رقت ۲۵ درصد از سفیده تخم بلدرچین و سایر باکتری‌ها هم در رقت ۵۰ درصد از سفیده تخم بلدرچین نتوانسته بودند رشد کنند. حساس‌ترین باکتری نسبت به سفیده تخم اردک، باکتری سودوموناس آژروژینوزا است. به‌طوری‌که سفیده تخم اردک در رقت ۲۵ درصد بر روی این باکتری اثر بازدارندگی داشت. همچنین سفیده تخم اردک بر روی باسیلوس سوبتیلیس، شیگلا دیسانتری و کلبسیلا اکسی‌توکا در رقت ۵۰ درصد اثر بازدارندگی داشت و بقیه باکتری‌ها مقاوم بوده و در همه چاهک‌ها کدورت نشان داد و این نشانگر عدم تأثیر سفیده تخم مرغ طبیعی بر روی کلبسیلا اکسی‌توکا است. سفیده تخم مرغ طبیعی بر روی بقیه باکتری‌ها هم در رقت‌های مختلف اثر بازدارندگی نشان داد. در بین دو باکتری گرم مثبت موردمطالعه، مقاومت باسیلوس سوبتیلیس بیشتر از استافیلوکوک اورئوس بود به‌طوری‌که سفیده تخم مرغ طبیعی در رقت ۵۰ درصد بر روی باسیلوس سوبتیلیس اثر بازدارندگی داشت، اما بر روی استافیلوکوک اورئوس در رقت ۲۵ درصد اثر بازدارندگی داشت.

اکثر باکتری‌ها در برابر مورد سفیده تخم مرغ مصنوعی مقاومت نشان دادند و در اکثر چاهک‌ها کدورت مشاهده شد. فقط باکتری‌های شیگلا دیسانتری و سالمونلا اکسی‌توکا به ترتیب در رقت‌های ۵۰ و ۲۵ درصد کدورتی نشان ندادند. پس می‌توان نتیجه گرفت که حساس‌ترین باکتری در بین باکتری‌های موردمطالعه در برابر سفیده تخم مرغ مصنوعی سالمونلا تیفی‌موریوم است و باکتری‌های گرم مثبت نسبت به گرم منفی مقاوم‌تر بودند. در مورد سفیده تخم بلدرچین

## بحث

رشدی مشاهده نشد و با در نظرگرفتن ۶ میلی‌متر قطر دیسک، اندازه قطر هاله عدم رشد برای باکتری اشريشیا کلی در مواجهه با تخم بلدرچین ۱۴ میلی‌متر به دست آمد. کمترین قطر هاله مربوط به باکتری کلبسیلا اکسی توکا، استافیلوکوک اورئوس و سالمونلا تیفی‌موریوم در مواجهه با سفیده تخم اردک بود که تا فاصله ۱/۵ میلی‌متری از لبۀ دیسک کاغذی آغشته به سفیده تخم اردک رشد نکرده بود که با در نظرگرفتن ۶ میلی‌متر قطر کاغذ، اندازه قطر هاله عدم رشد برابر ۹ میلی‌متر به دست آمد.

مقایسه قطر هاله عدم رشد دو باکتری گرم مثبت مورد مطالعه نشان داد که باکتری استافیلوکوک اورئوس با قطر ۹ میلی‌متر نسبت به باسیلوس سوبتیلیس با قطر ۱۲ میلی‌متر مقاومت بیشتری در برابر سفیده تخم بلدرچین دارد. همچنین در برابر سفیده تخم اردک هیچ هاله‌ای تشکیل نشد و همه باکتری‌های مورد مطالعه رشد کردند. النبولسی و همکاران در سال ۲۰۲۰ غیرفعال شدن گونه‌های سالمونلا در تاهینی (تاهینی یک محصول غذایی محبوب در منطقه خاورمیانه است) با استفاده از انسان‌های گیاهی را بررسی کردند. در میان انسان‌های آزمایش شده، آویشن و روغن دارچین بالاترین فعالیت ضدبیکروبی را در برابر گونه‌های سالمونلا آزمایش شده نشان دادند (۲۷). در سال ۲۰۲۱ در مطالعه‌ای، دونگ و همکاران یک کلاس نانوذرات مبتنی بر کربن فعلی شده با نور مرئی به نام نقاط کربنی را، که اخیراً کشف شده است، برای غیرفعال‌سازی فتوکاتالیستی پاتوژن‌های غذایی بررسی کردند. نتایج نشان داد که نقاط کربنی در غلاظت‌های بالا قادر به غیرفعال‌سازی سلول‌های سالمونلا هستند (۲۸).

### نتیجه‌گیری

اثبات فعالیت ضدباکتریایی سفیده تخم مرغ طبیعی، مصنوعی، بلدرچین و اردک بر روی تعدادی از باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت، این امیدواری را ایجاد کرد تا بتوان این ماده یا ترکیبات آن را به عنوان یک داروی ضدباکتریایی مناسب با عوارض جانبی احتمالی کمتر

موضوع نشان می‌دهد که مواد مؤثّرهای که دارای اثرات باکتریایی هستند، در سفیده تخم بلدرچین نسبت به بقیه سفیده‌ها بیشتر می‌باشند؛ از جمله این مواد می‌تواند آنزیم‌های لیزووزیم و دیفنسین باشد که معمولاً بر روی غشای باکتری‌ها تأثیر می‌گذارد و برخی دیگر مثل اوستاتین، سیستاتین و اوآلبومن که مانع از دسترسی باکتری‌ها به مواد مغذی برای رشد می‌شوند. ماده دیگر که می‌تواند اثر ضدباکتریایی داشته باشد اووترانسفیرین است که یک کلات‌کننده فلزی بوده و با اتصال به آهن باعث کاهش آهن مصرفی برای باکتری می‌شود. همچنین با اثر بر روی غشا، نفوذپذیری آن را مختل می‌کند و در نتیجه کنترل ورود و خروج مواد از غشا را از بین می‌برد و باکتری از بین می‌رود. خواص ضدباکتریایی نانو دندریمر پلی‌آمیدوآمین-G5 بر روی باکتری‌های باسیلوس سوبتیلیس، سالمونلا تیفی‌موریوم، شیگلا دیسانتری و اشريشیا کلی در محیط آبی توسط شهرام نظری و همکاران در سال ۱۳۹۵ بررسی شد و نتایج مطالعه نشان داد که نانو دندریمر پلی‌آمیدوآمین-G5 قادر به حذف باسیلوس سوبتیلیس، سالمونلا تیفی‌موریوم، اشريشیا کلی و شیگلا دیسانتری از محلول آبی است (۲۴). نتایج مطالعه واينگ و همکاران در سال ۲۰۱۶ با روش غیرفعال‌سازی فتوکاتالیستی اشريشیا کلی با نور مرئی توسط فتوکاتالیست مغناطیسی  $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-AgBr}$  نشان می‌دهد که فتوکاتالیست مغناطیسی قادر است هر دو باکتری گرم منفی (اشريشیا کلی) و گرم مثبت (استافیلوکوک اورئوس) را غیرفعال کند (۲۵). نتایج مطالعه‌ای که توسط مین‌پارک و همکاران در سال ۲۰۱۳ انجام شد نشان داد که نانو الیاف کیتوزان (CS) ثبت شده با لیزووزیم سفیده تخم مرغ می‌تواند به عنوان یک ماده امیدوارکننده برای کارهای ضدباکتریایی استفاده شود (۲۶). در این مطالعه آزمایش‌های قطر هاله عدم رشد بر روی باکتری‌ها انجام شد که بیشترین قطر مربوط به باکتری اشريشیا کلی در مواجهه با سفیده تخم بلدرچین به دست آمد به طوری که تا فاصله ۴ میلی‌متری از لبۀ دیسک کاغذی آغشته به سفیده تخم بلدرچین

## تضاد منافع

این مقاله هیچ تضاد منافعی ندارد.

## تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مصوب معاونت پژوهشی دانشکده علوم پزشکی خلخال با کد اخلاق: IR.KHALUMS.REC.1401.014 معاونت پژوهشی است و هیچ‌گونه تعارضی بین نویسنده‌گان و دستگاه‌های مرتبط برای انتشار این مقاله وجود ندارد. بدین‌وسیله از همکاری صمیمانه معاونت پژوهشی، کمیته تحقیقات دانشجویی و پرسنل محترم آزمایشگاهی تشکر و قدردانی می‌شود.

مدنظر قرار داد و با انجام تحقیقات بیشتر به عنوان جایگزینی برای داروهای ضدبacterیایی دارای عوارض قابل توجه استفاده کرد. انجام تحقیقات بیشتر روی طیف وسیع تری از باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت پاتوژن و متعاقب آن تحقیق در نمونه‌های بالینی و بیماران مبتلا به عفونت‌های باکتریایی، از جمله موارد اصلی برای نیل به این هدف خواهد بود. بنابراین در مطالعات بعدی پیشنهاد می‌شود اثرات این مواد بر روی طیف وسیع تری از باکتری‌ها بررسی شود و در صورت امکان، ارزیابی اقتصادی برای سنتز و کاربرد گستره آن صورت گیرد.

## References

1. Nyachuba DG. Foodborne illness: Is it on the rise?. *Nutrition Reviews*. 2010 May 1;68(5):257-69.
2. Pakbin B, Amani Z, Allahyari S, Mousavi S, Mahmoudi R, Brück WM, et al. Genetic diversity and antibiotic resistance of *Shigella* spp. isolates from food products. *Food Science & Nutrition*. 2021 Nov;9(11):6362-71.
3. Hessel CT, de Freitas Costa E, Boff RT, Pessoa JP, Tondo EC. A systematic review and Bayesian meta-analysis about *Salmonella* spp. prevalence on raw chicken meat. *Microbial Risk Analysis*. 2022 Aug 1;21:100205.
4. Shen W, Chen H, Geng J, Wu RA, Wang X, Ding T. Prevalence, serovar distribution, and antibiotic resistance of *Salmonella* spp. isolated from pork in China: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Food Microbiology*. 2022 Jan 16;361:109473.
5. Stanaway JD, Reiner RC, Blacker BF, Goldberg EM, Khalil IA, Troeger CE, et al. The global burden of typhoid and paratyphoid fevers: A systematic analysis for the global burden of disease study 2017. *The Lancet Infectious Diseases*. 2019 Apr 1;19(4):369-81.
6. Guillén S, Cebrián G. Relationship between iron bioavailability and *Salmonella Typhimurium* fitness in raw and pasteurized liquid whole egg. *Food Microbiology*. 2022 Jun 1;104:104008.
7. Shi Y, Ma J, Chen Y, Qian Y, Xu B, Chu W, et al. Recent progress of silver-containing photocatalysts for water disinfection under visible light irradiation: A review. *Science of the Total Environment*. 2022 Jan 15;804:150024.
8. Legros J, Jan S, Bonnassie S, Gautier M, Croguennec T, Pezennec S, et al. The role of ovotransferrin in egg-white antimicrobial activity: A Review. *Foods*. 2021 Apr 10;10(4):823.
9. Sokolova E, Ivarsson O, Lillieström A, Speicher NK, Rydberg H, Bondelind M. Data-driven models for predicting microbial water quality in the drinking water source using *E. coli* monitoring and hydrometeorological data. *Science of the Total Environment*. 2022 Jan 1;802:149798.
10. Kotloff KL, Riddle MS, Platts-Mills JA, Pavlinac P, Zaidi AK. Shigellosis. *The Lancet*. 2018 Feb 24;391(10122):801-12.
11. McKenzie R, Venkatesan MM, Wolf MK, Islam D, Grahek S, Jones AM, et al. Safety and immunogenicity of WRSd1, a live attenuated *Shigella dysenteriae* type 1 vaccine candidate. *Vaccine*. 2008 Jun 19;26(26):3291-6.
12. Ingle DJ, Andersson P, Valcanis M, Barnden J, da Silva AG, Horan KA, et al. Prolonged outbreak of multidrug-resistant *Shigella sonnei* harboring bla CTX-M-27 in victoria, Australia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2020 Nov 17;64(12):10-128.
13. Herridge WP, Shibu P, O'Shea J, Brook TC, Hoyles L. Bacteriophages of *Klebsiella* spp., their diversity and potential therapeutic uses. *Journal of Medical Microbiology*. 2020 Feb;69(2):176-94.
14. Guyot N, Jan S, Réhault-Godbert S, Nys Y, Gautier M, Baron F. Antibacterial activity of egg white: Influence of physico-chemical conditions. *World's Poultry Science Journal*. 2013 Sep 15;69:124-p.
15. Guyot N, Réhault-Godbert S, Slugocki C, Harichaux G, Labas V, Helloin E, et al. Characterization of egg white antibacterial properties during the first half of incubation: A comparative study between embryonated and unfertilized eggs. *Poultry Science*. 2016 Dec 1;95(12):2956-70.
16. Feeney RE, Nagy DA. The antibacterial activity of the egg white protein conalbumin. *Journal of Bacteriology*. 1952 Nov;64(5):629-43.
17. Abouhmadi A, Dishisha T, Amin MA, Hatti-Kaul R. Immobilization to positively charged cellulose nanocrystals enhances the antibacterial activity and stability of hen egg white and T4 lysozyme. *Biomacromolecules*. 2017 May 8;18(5):1600-8.
18. Ma B, Guo Y, Fu X, Jin Y. Identification and antimicrobial mechanisms of a novel peptide derived from egg white ovotransferrin hydrolysates. *Lwt*. 2020 Sep 1;131:109720.
19. Brand J, Dachmann E, Pichler M, Lotz S, Kulozik U. A novel approach for lysozyme and ovotransferrin fractionation from egg white by radial flow membrane adsorption chromatography: Impact of product and process variables. *Separation and Purification Technology*. 2016 Mar 17;161:44-52.
20. Strydom SJ, Rose WE, Otto DP, Liebenberg W, De Villiers MM. Poly (amidoamine) dendrimer-mediated synthesis and stabilization of silver sulfonamide nanoparticles with increased antibacterial activity. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2013 Jan 1;9(1):85-93.

21. Salimpour Abkenar S, Mohammad Ali Malek R. Preparation, characterization, and antimicrobial property of cotton cellulose fabric grafted with poly (propylene imine) dendrimer. *Cellulose.* 2012 Oct;19:1701-14.
22. Gholami M, Mohammadi R, Arzanlou M, Akbari Dourbash F, Kouhsari E, Majidi G, et al. In vitro antibacterial activity of poly (amidoamine)-G7 dendrimer. *BMC Infectious Diseases.* 2017 Dec;17:1-1.395.
23. Rastegar A, Nazari S, Allahabadi A, Falanji F, Dourbash FA, Rezai Z, et al. Antibacterial activity of amino-and amido-terminated poly (amidoamine)-G6 dendrimer on isolated bacteria from clinical specimens and standard strains. *Medical Journal of the Islamic Republic of Iran.* 2017;31:64.
24. Nazari S, Rastegar A, Dehghan S, Kouhsari E, Azghani P, Alizadeh Matboo S, et al. The survey of the nano polyamidoamine-G5 (NPAMAM-G5) dendrimer antibacterial properties on *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae* and *Escherichia coli* from aqueous solution. *Razi Journal of Medical Sciences.* 2016;23(150):46-56.
25. Ng TW, Zhang L, Liu J, Huang G, Wang W, Wong PK. Visible-light-driven photocatalytic inactivation of *Escherichia coli* by magnetic Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-AgBr. *Water Research.* 2016 Mar 1;90:111-8.
26. Park JM, Kim M, Park HS, Jang A, Min J, Kim YH. Immobilization of lysozyme-CLEA onto electrospun chitosan nanofiber for effective antibacterial applications. *International Journal of Biological Macromolecules.* 2013 Mar 1;54:37-43.
27. Al-Nabulsi AA, Osaili TM, Olaimat AN, Almasri WE, Ayyash M, Al-Holy MA, et al. Inactivation of *Salmonella* spp. in tahini using plant essential oil extracts. *Food Microbiology.* 2020 Apr 1;86:103338.
28. Dong X, Wang P, Darby JP, Tang Y, Overton CM, Kathariou S, et al. Photoactivated carbon dots for inactivation of foodborne pathogens *Listeria* and *Salmonella*. *Applied and Environmental Microbiology.* 2021 Nov 10;87(23):e01042-21.



## Abstract

# Investigating the antibacterial effect of egg whites of quail, duck, broiler chicken, and country chicken on a number of Gram-negative and Gram-positive bacteria in vitro

Arezoo Azami<sup>a</sup>, Heydar Mousavi<sup>a</sup>, Hajar Badri<sup>b</sup>, Esmail Najafi<sup>c</sup>, Maryam Zare<sup>d</sup>, Shahram Nazari<sup>b\*</sup>

<sup>a</sup>Student Research Committee, Khalkhal School of Medical Sciences, Khalkhal, Iran

<sup>b</sup>Department of Environmental Health Engineering, Khalkhal School of Medical Sciences, Khalkhal, Iran

<sup>c</sup>Department of Public Health, Khalkhal School of Medical Sciences, Khalkhal, Iran

<sup>d</sup>Department of Nutrition, Khalkhal School of Medical Sciences, Khalkhal, Iran

## Abstract

**Background and Purpose:** One of the most important public health concerns worldwide is foodborne pathogens (bacteria, viruses, parasites). Egg white is one of the substances with high antimicrobial properties. The purpose of the present research is to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of egg whites of quail, duck, natural broiler chicken, and country chicken on a number of gram-negative and gram-positive bacteria in vitro

**Materials and Methods:** In this study, using the micro-broth dilution and disc diffusion method were tested the antibacterial effects of egg whites of quail, duck, natural broiler chicken, and country chicken on a number of Gram-negative and Gram positive bacteria. In this experiment, *Shigella dysenteriae*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella oxytoca*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa* were exposed to different concentrations of egg white, and MIC, MBC, and the zone of growth inhibition were determined according to the instructions of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

**Results:** The MIC of country chicken and quail egg whites were in the range of 6.25-50% and broiled chicken and duck egg whites were in the range of 25-50% for the studied bacteria. Moreover, the MBC the egg white of broiled and country chicken, quail, and duck was in the range of 50% for some of the studied bacteria. The zone of inhibition was found to be in a range of 9-14 mm for the studied bacteria.

**Conclusion:** The results of the present research show that egg whites of quail, duck, broiled chicken, and country chicken are effective in eradicating Gram-negative and Gram-positive bacteria.

**Keywords:** Anti-bacterial agents, Egg white, Gram-positive bacteria, Gram-negative bacteria

Corresponding Author: nazari.sh@tak.iums.ac.ir