

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

آرزو اعظمی الف، حیدر موسوی الف، هاجر بدری ب، اسماعیل نجفی ج، مریم زارع د، شهرام نظری ب*

الف کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده علوم پزشکی خلخال، خلخال، ایران
ب گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده علوم پزشکی خلخال، خلخال، ایران
ج گروه بهداشت عمومی، دانشکده علوم پزشکی خلخال، خلخال، ایران
د گروه علوم تغذیه، دانشکده علوم پزشکی خلخال، خلخال، ایران

چکیده

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

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، با استفاده از روش میکرو برات دایلوشتن و انتشار دیسک، اثرات ضدباکتریایی سفیده تخم اردک، بلدرچین، مرغ‌های طبیعی و مصنوعی بر روی تعدادی از باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت آزمایش شد. در این آزمایش گونه‌های باکتریایی شینگلا دیسانتری، باسیلوس سوبتیلیس، کلبسیلا اکسی‌توکا، استافیلوکوک اورئوس، سالمونلا تیفی موریوم، اشریشیا کلی و سودوموناس آئروژینوزا در مواجهه با غلظت‌های متفاوتی از سفیده تخم‌ها قرار گرفتند و MIC، MBC و قطر هاله عدم رشد ناشی از مواد ضدباکتریایی بر روی این باکتری‌ها طبق دستورکارهای مؤسسه استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی (CLSI) تعیین شد.

یافته‌ها: مقدار MIC سفیده تخم مرغ‌های طبیعی و بلدرچین در محدوده‌های ۶/۲۵ تا ۵۰ درصد و تخم مرغ‌های مصنوعی و اردک در محدوده ۲۵ تا ۵۰ درصد برای باکتری‌های مورد مطالعه به دست آمد. همچنین مقدار MBC سفیده تخم مرغ‌های طبیعی، مصنوعی، بلدرچین و اردک در محدوده ۵۰ درصد برای بعضی از باکتری‌های مورد مطالعه به دست آمد. همچنین قطر هاله عدم رشد در محدوده ۹ تا ۱۴ میلی‌متر به دست آمد.

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

کلیدواژه‌ها: داروهای ضدباکتری، سفیده تخم مرغ، باکتری‌های گرم مثبت، باکتری‌های گرم منفی

سروتیپ‌های مختلف سالمونلا باعث بیماری‌هایی چون پولورووم هستند که عامل آن سالمونلا پولورووم می‌باشد (۴). پاراتیفوئید بیماری‌ای است که دارای علائمی مشابه پولورووم و دارای اهمیت زیاد می‌باشد؛ زیرا عوامل ایجادکننده آن به ترتیب سالمونلا تیفی موریوم، انتریتیدیس، سالمونلا هاوانا و ... هستند (۵). بررسی‌ها نشان می‌دهند که سالمونلا انتریتیدیس در اغلب اپیدمی‌های سالمونلوز با منشأ تخم مرغی دخالت دارد. مصرف تخم مرغ آلوده از مهم‌ترین منابع عفونت سالمونلایی است (۶). بیشتر گونه‌های

مقدمه

یکی از مهم‌ترین نگرانی‌های بهداشت عمومی در سراسر جهان عوامل بیماری‌زای ناشی از مواد غذایی (از جمله باکتری‌ها، ویروس‌ها و انگل‌ها) است (۱). پاتوژن‌های منتقله از غذا (عمدتاً عوامل باکتریایی)، منجر به بیماری‌های روده‌ای و خارج روده‌ای می‌شوند (۲). سالمونلاها دسته بزرگی از باسیل‌های گرم منفی‌اند که مقاومت بالایی به عوامل شیمیایی نظیر غلظت زیاد صفرا و همچنین عوامل فیزیکی نظیر حرارت و مواد ضدعفونی‌کننده دارند (۳).

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 به‌عنوان آلوده‌کننده‌های غذایی یا به‌عنوان عوامل عفونی در نظر گرفته می‌شوند (۷). باسیلوس سوبتیلیس قادر به رشد در غذاها بوده و از طریق تولید انتروتوکسین مولد اسهال و توکسین تهوع‌زا، ایجاد مسمومیت می‌کند. باسیلوس آنتراسیس به‌دلیل ایجاد سیاه‌زخم پاتوژن عمده این جنس محسوب می‌شود (۸). اشریشیا کلی نیز یکی از باکتری‌های شایع بیماری‌زایی است که به‌عنوان 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 درحال‌توسعه محسوب می‌شود، به‌طوری‌که 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 چنددارویی، گونه‌های شیگلا اخیراً به یک نگرانی مهم در ایمنی 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 فرصت‌طلب در انسان می‌باشد و در حال حاضر به‌عنوان دومین پاتوژن مهم بالینی از جنس کلبسیلا در نظر گرفته می‌شود (۱۳). انواع مختلفی از مواد ضد میکروبی مانند کلر، برم، ید، نیتريت و نترات وجود دارد که در صنایع مختلف از آنها استفاده می‌شود. به‌دلیل این‌که هرکدام از این مواد نوعی مواد شیمیایی سنتزی

محسوب می‌شوند، می‌توانند به سلامتی انسان و محیط زیست آسیب بزنند. بنابراین یافتن مواد ضد میکروبی طبیعی با کمترین عارضه و نیز کمترین مقاومت، یکی از دغدغه‌های محققان است (۷). یکی از این مواد ضد میکروبی، که خاصیت ضد میکروبی 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 ضد میکروبی دارند، مانند لیزوزیم و دیفنسین‌ها به پوشش باکتری‌ها آسیب می‌رسانند (۱۵). برخی دیگر مثل لوواستاتین، سیستاتین، اوآلبومین به‌عنوان مهارکننده پروتئازهای باکتریایی عمل می‌کند یا دسترسی باکتری را به مواد مغذی مورد نیاز خود محدود می‌کند (۱۶). سفیده تخم مرغ همچنین حاوی مقادیر قابل توجهی اووترانسفرین (۱۳ گرم در لیتر) است که یک پروتئین کلات‌کننده 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 ضد میکروبی 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 در نهایت منجر به مرگ باکتری شود (۱۷). سفیده تخم مرغ شرایط خاصی از PH، ویسکوزیته، ترکیب یونی و فعالیت‌های پروتئینی را ارائه می‌دهد که می‌تواند به‌طور 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 افزایش یافته به‌عنوان بخشی از فعالیت ضد میکروبی سفیده تخم مرغ شناخته می‌شود که می‌تواند بر فعالیت مولکول‌های ضد میکروبی و همچنین وضعیت غشای باکتری تأثیر بگذارد (۱۹).

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

تهیهٔ استاندارد مک‌فارلند

در این پژوهش، استاندارد مک‌فارلند به عنوان مرجعی برای مطابقت دادن کدورت ناشی از سوسپانسیون باکتری استفاده شد. مواد مورد استفاده برای تهیهٔ استاندارد نیم مک‌فارلند شامل: باریم کلرید ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) دهیدراته و اسیدسولفوریک (H_2SO_4) بوده که از شرکت Merck تهیه شد. با مخلوط کردن ۰/۰۵ میلی‌لیتر باریم کلرید دهیدراته ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ۱/۱۷۵ درصد با ۹/۹۵ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک (H_2SO_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 ایجادشده توسط محلول نیم مک‌فارلند در طول موج ۶۱۰ نانومتر به وسیلهٔ اسپکتروفتومتر (مدل Hach) اندازه‌گیری شد. از آنجایی که تعداد باکتری تلقیح‌شده یکی از مهم‌ترین متغیرهایی است که بر نتیجهٔ این پژوهش اثر می‌گذارد، تراکم سوسپانسیون میکروبی تلقیحی باید استاندارد باشد. به این منظور برای تهیهٔ سوسپانسیون میکروبی، از کشت تازه و جوان باکتری با استفاده از لوپ استریل، چند کلنی به لولهٔ حاوی سرم فیزیولوژی استریل انتقال داده شد. کلنی‌های باکتری تا حدی به سرم فیزیولوژی اضافه شد تا کدورت ایجادشده توسط باکتری‌ها معادل با کدورت اندازه‌گیری‌شده در لولهٔ استاندارد نیم مک‌فارلند باشد. با توجه به این که غلظت باکتریایی نیم مک‌فارلند برابر $1/5 \times 10^8$ میلی‌لیتر است، برای به دست آوردن سایر رقت‌های باکتریایی از رقیق‌سازی استفاده شد. این عملیات برای همهٔ باکتری‌های مورد مطالعه به طور جداگانه انجام گرفت. تمامی آزمایش‌ها برابر با دستورالعمل‌های مؤسسهٔ استاندارد و آزمایشگاه پزشکی (Clinical and Laboratory Standards Institute) انجام شد.

پژوهشگران روش‌های تعیین هالهٔ عدم رشد یا ناحیهٔ بازدارندگی، تعیین حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی را برای بررسی تأثیر مواد ضدباکتریایی بر باکتری‌های هدف به کار برده‌اند (۲۰، ۲۱). هالهٔ عدم رشد به عنوان یک روش کیفی برای تعیین مقاومت یک باکتری در برابر مادهٔ ضد میکروبی به کار گرفته می‌شود. حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی برای بررسی کمی خاصیت ضد میکروبی سفیده‌های تخم به کار گرفته خواهند شد. حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی می‌توانند بهترین روش برآورد حساسیت باکتری به صورت کمی باشند (۲۲).

مواد و روش‌ها

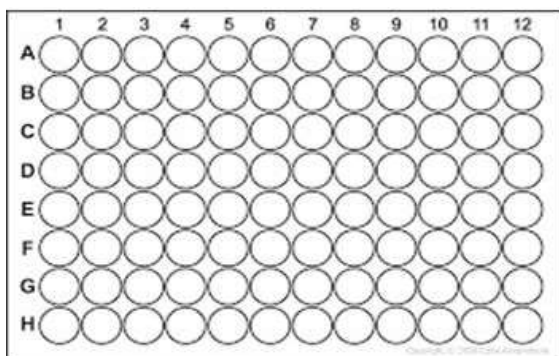
مواد مورد استفاده

محیط کشت مولر هینتون براث، مولر هینتون آگار، باریم کلرید ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) دهیدراته، اسیدسولفوریک (H_2SO_4) و بافر فسفات نرمال سالین M 01/0 که از شرکت Merck تهیه شد.

سویه‌های باکتری

سویه‌های باکتری استفاده‌شده در پژوهش کنونی شامل سویهٔ استاندارد کلبسیلا اکسی‌توکا (ATCC: 700603)، اشیریشیا کلی (ATCC: 23591)، شیگلا دیسانتری (ATCC: 12022)، سالمونلا تیفی‌موریوم (ATCC: 14028)، سودوموناس آئروژینوزا (ATCC: 27853)، باسیلوس سوبتیلیس (ATCC: 1254) و استافیلوکوک اورئوس (ATCC: 25923) است که از مرکز پژوهش‌های صنعتی ایران تهیه شد. تمامی سویه‌های باکتریایی خریداری‌شده، در محیط کشت مولر هینتون براث در شرایط هوازی و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس گرماگذاری شدند. سپس با لوپ استریل از محیط کشت مولر هینتون براث مقداری برداشته و بر روی محیط‌های کشت اختصاصی هر باکتری، به حالت خطی کشت

شد. پس از طی زمان گرمخانه‌گذاری، چاهک‌ها از نظر کدورت ناشی از رشد باکتری تلقیح‌شده بررسی شدند. چاهکی با کمترین غلظت از سفیده‌ها که رشد باکتری در آن مشاهده نشد، به‌عنوان 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 گرمخانه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. بعد از گرمخانه‌گذاری 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، به‌عنوان MBC در نظر گرفته شد. تمامی این عملیات در زیر هود استریل انجام گردید.



شکل ۱. میکروچاهک‌ها برای تعیین MIC و MBC

روش دیسک آگار دیفیوژن

از کدورت سوسپانسیون میکروبی تهیه‌شده مطابق با استاندارد نیم مک‌فارلند در پلیت‌های حاوی محیط کشت مولر هیتون آگار به‌وسیله سوپ استریل به‌صورت یکنواخت کشت داده شدند، سپس دیسک‌های خالی (Blank disk) ۶ میلی‌متری در شرایط کاملاً استریل به ۵۰ میکرولیتر از سفیده‌ها آغشته و به‌منظور خشک‌شدن به مدت ۳۰ دقیقه در کنار شعله قرار داده شدند و سپس دیسک‌ها در داخل پلیت‌ها به فاصله مناسب قرار گرفته و پس از گرمخانه‌گذاری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، قطر هاله عدم رشد به‌وسیله خط‌کش برای

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل کشندگی

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

در این روش از میکروچاهک‌ها (شکل ۱) برای تعیین اثر ضدباکتریایی غلظت‌های مختلف سفیده تخم اردک، بلدرچین، مرغ‌های طبیعی و مصنوعی استفاده شد. یک چاهک شاهد به‌عنوان کنترل مثبت و یک چاهک شاهد به‌عنوان کنترل منفی استفاده گردید. شاهد مثبت حاوی محیط کشت مولر هیتون براث و باکتری است که ماده ضدباکتریایی 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 به‌صورت 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 تهیه‌شده، 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 به‌اندازه ۱۰ (۰/۵) برابر غلظت اولیه کاهش پیدا کرد. چاهک‌های A11 و A12 به ترتیب به‌عنوان کنترل مثبت و کنترل منفی در نظر گرفته شد. سپس ۵ میکرولیتر از محلول باکتری با غلظت یک‌دهم برابر نیم مک‌فارلند به همه چاهک‌ها به‌جز چاهک کنترل منفی اضافه گردید. سپس میکروپلیت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در گرمخانه قرار داده

هرکدام 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 (Phosphate Buffered Saline) PBS 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 ₂ HPO ₄ .7H ₂ O
۰/۲۵۹ گرم	KH ₂ PO ₄
۱ لیتر	آب مقطر

یافته‌ها

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

مقدار MIC سفیده تخم مرغ‌های طبیعی برای باکتری‌های

اشریشیا کلی، باسیلوس سوبتیلیس و سودوموناس آئروژینوزا در غلظت ۵۰ درصد، برای باکتری‌های استافیلوکوک اورئوس و سالمونلا تیفی‌موریوم 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 تیفی‌موریوم 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 کلبسیلا اکسی‌توکا در غلظت ۵۰ درصد، برای باکتری‌های باسیلوس سوبتیلیس و شیگلا دیسانتری در غلظت ۲۵ درصد و برای باکتری سالمونلا تیفی‌موریوم در غلظت ۶/۲۵ درصد به دست آمد. مقدار MIC سفیده تخم اردک برای باکتری‌های باسیلوس سوبتیلیس، شیگلا دیسانتری و کلبسیلا اکسی‌توکا 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 کشندگی دارد (شکل ۲-ب).



ب



الف

شکل ۲. نمونه‌ای از نتایج آزمایش MIC و آزمایش MBC

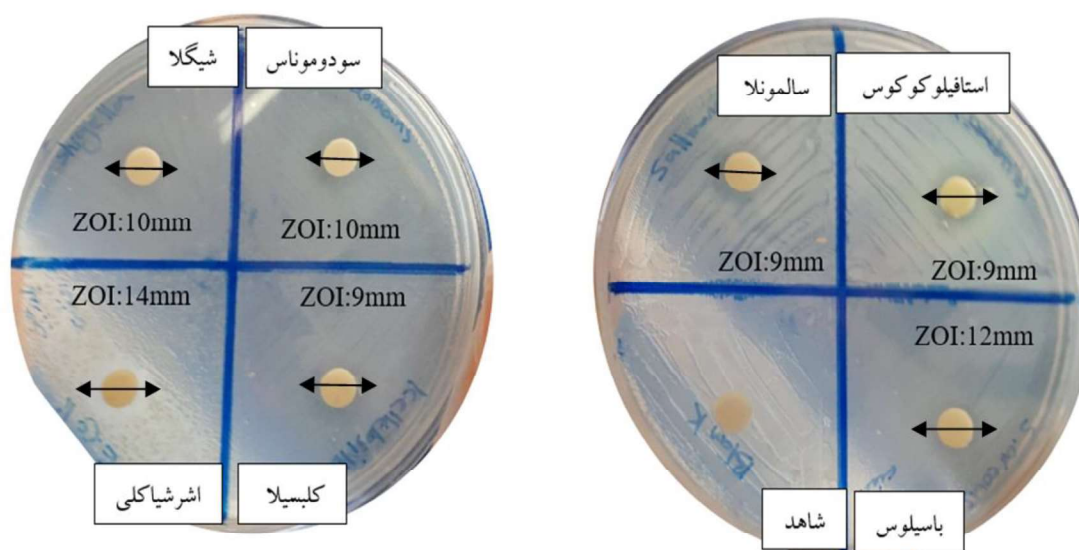
جدول ۲. نتایج MIC سفیده تخم مرغ طبیعی، مصنوعی، بلدرچین و اردک بر روی باکتری‌های مورد مطالعه

MIC	اشریشیا کلی (درصد)	باسیلوس سوبتیلیس (درصد)	سودوموناس آئروژینوزا (درصد)	استافیلوکوک اورئوس (درصد)	کلبسیلا اکسی توکا (درصد)	سالمونلا تیفی موریوم (درصد)	شیگلا دیسانتري (درصد)
تخم مرغ طبیعی	۵۰	۵۰	۵۰	۲۵	-	۲۵	۶/۲۵
تخم مرغ مصنوعی	-	-	-	-	-	۲۵	۵۰
تخم بلدرچین	۵۰	۲۵	۵۰	۵۰	۵۰	۶/۲۵	۲۵
تخم اردک	-	۵۰	۲۵	-	۵۰	-	۵۰

تعیین قطر هاله عدم رشد (Zone of Inhibition)

قطر هاله عدم رشد باکتری اشریشیا کلی در مواجهه با سفیده تخم مرغ طبیعی ۱۰ میلی متر به دست آمد. همچنین برای باکتری‌های اشریشیا کلی، سودوموناس آئروژینوزا و کلبسیلا اکسی توکا در مواجهه با سفیده تخم مرغ مصنوعی به ترتیب برابر ۱۰، ۱۲، ۱۱ به دست آمد. قطر هاله عدم رشد برای باکتری‌های استافیلوکوک اورئوس، کلبسیلا اکسی توکا و سالمونلا تیفی موریوم برابر ۹ میلی متر، برای باکتری‌های

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



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

جدول ۳. نتایج قطر هاله عدم رشد سفیده تخم مرغ طبیعی، مصنوعی، بلدرچین و اردک بر روی باکتری های مورد مطالعه

قطر هاله عدم رشد	اشریشیا کلی (میلی متر)	باسیلوس سوبتیلیس (میلی متر)	سودوموناس آئروژینوزا (میلی متر)	استافیلوکوک اورئوس (میلی متر)	کلبسیلا اکسی توکا (میلی متر)	سالمونلا تیفی موریوم (میلی متر)	شیگلا دیسانتری (میلی متر)
تخم مرغ طبیعی	۱۰	-	-	-	-	-	-
تخم مرغ مصنوعی	۱۰	-	۱۲	-	۱۱	-	-
تخم بلدرچین	۱۴	۱۲	۱۰	۹	۹	۹	۱۰
تخم اردک	-	-	-	-	-	-	-

بحث

از نتایج حاصل از آزمایش MIC می توان گفت که حساس ترین و مقاوم ترین باکتری در برابر سفیده تخم مرغ طبیعی شیگلا دیسانتری و کلبسیلا اکسی توکا هستند، به طوری که در این آزمایش شیگلا دیسانتری تا چاهک شماره ۴ یعنی رقت ۶/۲۵ درصد از سفیده تخم مرغ طبیعی نتوانست کدورتی ندهد و باکتری کلبسیلا اکسی توکا در همه چاهک ها کدورت نشان داد و این نشانگر عدم تأثیر سفیده تخم مرغ طبیعی بر روی کلبسیلا اکسی توکا است. سفیده تخم مرغ طبیعی بر روی بقیه باکتری ها هم در رقت های مختلف اثر بازدارندگی نشان داد. در بین دو باکتری گرم مثبت مورد مطالعه، مقاومت باسیلوس سوبتیلیس بیشتر از استافیلوکوک اورئوس بود به طوری که 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 باکتری ها در برابر مورد سفیده تخم مرغ مصنوعی مقاومت نشان دادند و در اکثر چاهک ها کدورت مشاهده شد. فقط باکتری های شیگلا دیسانتری و سالمونلا اکسی توکا به ترتیب در رقت های ۵۰ و ۲۵ درصد کدورتی نشان ندادند. پس می توان نتیجه گرفت که حساس ترین باکتری در بین باکتری های مورد مطالعه در برابر سفیده تخم مرغ مصنوعی سالمونلا تیفی موریوم است و باکتری های گرم مثبت نسبت به گرم منفی مقاوم تر بودند. در مورد سفیده تخم بلدرچین

این نتیجه حاصل شد که حساس ترین باکتری سالمونلا تیفی موریوم است که تا رقت ۶/۲۵ درصد نتوانسته بود در برابر سفیده تخم بلدرچین رشد کند. سفیده تخم بلدرچین بر روی بقیه باکتری ها هم در رقت های مختلف اثر بازدارندگی داشت به طوری که باکتری های شیگلا دیسانتری و باسیلوس سوبتیلیس در رقت ۲۵ درصد از سفیده تخم بلدرچین و سایر باکتری ها هم در رقت ۵۰ درصد از سفیده تخم بلدرچین نتوانسته بودند رشد کنند. حساس ترین باکتری نسبت به سفیده تخم اردک، باکتری سودوموناس آئروژینوزا است. به طوری که 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 اکسی توکا در رقت ۵۰ درصد اثر بازدارندگی داشت و بقیه باکتری ها مقاوم بوده و در همه چاهک ها کدورت داده بودند. از بین باکتری های گرم مثبت مورد مطالعه، مقاومت استافیلوکوک اورئوس در برابر سفیده تخم اردک بیشتر از باسیلوس سوبتیلیس بود. نتایج حاصل از MBC نشان می دهد که سفیده تخم مرغ طبیعی فقط بر روی شیگلا دیسانتری و در رقت ۵۰ درصد و سفیده تخم بلدرچین در رقت ۵۰ درصد فقط بر روی اشریشیا کلی اثر کشندگی داشت و بقیه باکتری ها رشد کرده بودند. همچنین بقیه سفیده ها بر روی دیگر باکتری ها اثر کشندگی نداشتند پس می توان نتیجه گرفت سفیده تخم بلدرچین اثرات ضدباکتریایی بیشتری نسبت به بقیه سفیده ها دارد. این

موضوع نشان می‌دهد که مواد مؤثره‌ای که دارای اثرات باکتریایی هستند، در سفیده تخم بلدرچین نسبت به بقیه سفیده‌ها بیشتر می‌باشند؛ ازجمله این مواد می‌تواند آنزیم‌های لیزوزیم و دیفنسین باشد که معمولاً بر روی غشای باکتری‌ها تأثیر می‌گذارد و برخی دیگر مثل اووستانین، سیستاتین و اوآلبومین که مانع از دسترسی باکتری‌ها به مواد مغذی برای رشد می‌شوند. ماده دیگر که می‌تواند اثر ضدباکتریایی داشته باشد اووترانسفرین 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 تیفی موریوم، شیگلا دیسانتری و اشریشیا 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 تیفی موریوم، اشریشیا کلی و شیگلا دیسانتری از محلول آبی است (۲۴). نتایج مطالعه وای‌نگ و همکاران در سال ۲۰۱۶ با روش غیرفعال‌سازی فوتوکاتالیستی اشریشیا 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 (اشریشیا 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) تثبیت‌شده با لیزوزیم سفیده تخم مرغ می‌تواند به‌عنوان 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 اشریشیا کلی در مواجهه با سفیده تخم بلدرچین به‌دست آمد به‌طوری‌که تا فاصله ۴ میلی‌متری از لبه دیسک کاغذی آغشته به سفیده تخم بلدرچین

رشدی مشاهده نشد و با در نظرگرفتن ۶ میلی‌متر قطر دیسک، اندازه قطر هاله عدم‌رشد برای باکتری اشریشیا کلی در مواجهه با تخم بلدرچین ۱۴ میلی‌متر به‌دست آمد. کمترین قطر هاله مربوط به باکتری کلبسیلا اکسی‌توکا، استافیلوکوک اورئوس و سالمونلا تیفی موریوم در مواجهه با سفیده تخم اردک بود که تا فاصله ۱/۵ میلی‌متری از لبه دیسک کاغذی آغشته به سفیده تخم اردک رشد نکرده بود که با در نظرگرفتن ۶ میلی‌متر قطر کاغذ، اندازه قطر هاله عدم‌رشد برابر ۹ میلی‌متر به‌دست 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. ال‌نوبلسی و همکاران در سال ۲۰۲۰ غیرفعال‌شدن گونه‌های سالمونلا در تاهینی (تاهینی یک محصول غذایی محبوب در منطقه خاورمیانه است) با استفاده از اسانس‌های گیاهی را بررسی کردند. در میان اسانس‌های آزمایش‌شده، آویشن و روغن دارچین بالاترین فعالیت ضد میکروبی را در برابر گونه‌های سالمونلا آزمایش‌شده نشان دادند (۲۷). در سال ۲۰۲۱ در مطالعه‌ای، دونگ و همکاران یک کلاس نانوذرات مبتنی بر کربن فعال‌شده با نور مرئی به نام نقاط کربنی را، که اخیراً کشف شده است، برای غیرفعال‌سازی فتودینامیک پاتوژن‌های غذایی بررسی کردند. نتایج نشان داد که نقاط کربنی در غلظت‌های 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 به‌عنوان یک داروی ضدباکتریایی مناسب با عوارض جانبی احتمالی کمتر

تضاد منافع

این مقاله هیچ تضاد منافی ندارد.

تشکر و قدردانی

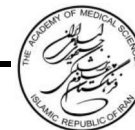
این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مصوب معاونت پژوهشی دانشکده علوم پزشکی خلخال با کد اخلاق: IR.KHALUMS.REC.1401.014 و حمایت مالی معاونت پژوهشی است و هیچ‌گونه تعارضی بین نویسندگان و دستگاه‌های مرتبط برای انتشار این مقاله وجود ندارد. بدین‌وسیله از همکاری صمیمانه معاونت پژوهشی، کمیته تحقیقات دانشجویی و پرسنل محترم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

مدنظر قرار داد و با انجام تحقیقات بیشتر به‌عنوان جایگزینی برای داروهای ضدباکتریایی دارای عوارض قابل‌توجه استفاده کرد. انجام تحقیقات بیشتر روی طیف وسیع‌تری از باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت پاتوژن و متعاقب آن تحقیق در نمونه‌های بالینی و بیماران مبتلا به عفونت‌های باکتریایی، ازجمله موارد اصلی برای نیل به این هدف خواهد بود. بنابراین در مطالعات بعدی پیشنهاد می‌شود اثرات این مواد بر روی طیف وسیع‌تری 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. Abouhmad 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 Fe₂O₃-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.



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^a, Heydar Mousavi^a, Hajar Badri^b, Esmail Najafi^c, Maryam Zare^d, Shahram Nazari^{b*}

^aStudent Research Committee, Khalkhal School of Medical Sciences, Khalkhal, Iran

^bDepartment of Environmental Health Engineering, Khalkhal School of Medical Sciences, Khalkhal, Iran

^cDepartment of Public Health, Khalkhal School of Medical Sciences, Khalkhal, Iran

^dDepartment 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 dysentery*, *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.iuums.ac.ir