مقایسه‌ی اثر ضدمیکروبی جنیستئین و دایدزئین روی تعدادی از باکتری‌های بیماری‌زای غذایی

مهدی زارعی[۱*]، علی فضل‌آرا[۲] و سمیه محمدی[۳]

تاریخ دریافت: ۹۱/۳/۳۱ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۲/۶

چکیده

جنیستئین و دایدزئین از جمله ایزوفلاون‌های مهم موجود در سویا می‌باشند که با توجه به فعالیت‌های بیولوژیک زیاد آن‌ها، در سال‌های اخیر مطالعات بسیاری روی آن‌ها انجام شده است. این ترکیبات، استروژن‌های گیاهی بوده و دارای اثرات حفاظتی در برابر سرطان‌ها، امراض قلبی عروقی و استئوپروز می‌باشند؛ اما در مورد اثرات ضدمیکروبی آن‌ها اطلاعات محدودی در دسترس است. این مطالعه با هدف مقایسه‌ی اثرات ضدمیکروبی جنیستئین و دایدزئین روی هفت باکتری بیماری‌زای مهم غذایی، شامل *اشریشیا کلای O157:H7*، *لیستریا مونوسیتوژنز*، *باسیلوس سرئوس*، *استافیلوکوکوس آرئوس*، *ویبریو پاراهمولیتیکوس*، *سالمونلا تایفی موریوم* و *کرونوباکتر ساکازاکی* انجام گرفت. برای این کار تأثیر غلظت‌های مختلف این دو ترکیب در افزایش مدت زمان فاز تأخیری رشد باکتری‌ها با اندازه‌گیری میزان جذب نوری نمونه‌ها طی مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که این دو ترکیب تا غلظت ۱۰۰۰ میکرومولار تأثیری در افزایش مدت زمان فاز تأخیری رشد *اشریشیا کلای O157:H7* ندارند ($P>0/05$)؛ در مقابل، افزایش معنی‌داری در مدت زمان فاز تأخیری رشد باکتری‌های *باسیلوس سرئوس*، *استافیلوکوکوس آرئوس* و *سالمونلا تایفی موریوم* در حضور غلظت ۵۰۰ میکرومولار جنیستئین و ۱۰۰۰ میکرومولار دایدزئین مشاهده گردید ($P<0/05$). این دو ایزوفلاون باعث افزایش معنی‌داری در مدت زمان فاز تأخیری رشد باکتری‌های *لیستریا مونوسیتوژنز* و *ویبریو پاراهمولیتیکوس* در غلظت ۱۲۵ میکرومولار و نیز در مدت زمان فاز تأخیری رشد *کرونوباکتر ساکازاکی* در غلظت ۱۰۰۰ میکرومولار شدند ($P<0/05$)؛ بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که در صورت استفاده از غلظت ۱۰۰۰ میکرومولار جنیستئین و دایدزئین، فاز تأخیری رشد کلیه باکتری‌های مورد آزمایش، به غیر از *اشریشیا کلای O157:H7*، به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد.

کلمات کلیدی: جنیستئین، دایدزئین، ایزوفلاون، فاز تأخیری رشد

مقدمه

مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های متداول، از جمله مشکلاتی است که بشر سال‌هاست که با آن مواجه است. طبق بررسی‌های انجام شده در کشور آمریکا، ۷۰ درصد از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان‌ها حدّاقل نسبت به یک آنتی‌بیوتیک مقاوم می‌باشند. وجود استافیلوکوکوس‌های مقاوم به متی‌سیلین[۱] یک مشکل گسترده و جهانی است؛ برای مثال، در کشور انگلستان تخمین زده می‌شود که حدود ۵۰ درصد از سویه‌های جدا شده‌ی این باکتری، مقاوم به متی‌سیلین هستند (Cushnie and Lamb 2005). مثال دیگر گسترش وجود استافیلوکوکوس‌های مقاوم به پنی‌سیلین است. زمانی که پنی‌سیلین در سال ۱۹۴۱ برای اوّلین بار مورد استفاده قرار گرفت، کم‌تر از یک درصد *استافیلوکوکوس آرئوس*ها نسبت به آن مقاوم بودند؛ امّا براساس یافته‌های Hugo و Russell در سال ۱۹۹۸ بیش

[۱*] استادیار گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز E-mail: zarei@scu.ac.ir (نویسنده مسئول)

[۲] دانشیار گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

[۳] دانش‌آموخته دانشکده دامپزشکی اهواز

1- Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

از ۹۰ درصد جدایه‌های این باکتری نسبت به پنی‌سیلین مقاوم بوده‌اند. از سوی دیگر، فساد و سمی شدن مواد غذایی به وسیله‌ی میکروارگانیسم‌ها مشکلی است که با وجود راه‌های مختلف نگهداری و روش‌های مختلف میکروب‌زدایی مواد غذایی، هنوز به طور کامل تحت کنترل قرار نگرفته است. علاوه بر این، در سال‌های اخیر تمایل مصرف‌کنندگان به مصرف غذاهای عاری از نگهدارنده‌های شیمیایی بسیار افزایش یافته است؛ بنابراین یافتن مواد ضد میکروبی و آنتی‌بیوتیک‌های با منشأ طبیعی برای استفاده در مواد غذایی و افزایش مدت زمان نگهداری آن‌ها و نیز جهت حفظ امنیت مصرف‌کنندگان از اهمیت بالایی برخوردار است.

ایزوفلاون‌ها از جمله ترکیبات گیاهی هستند که اثرات سودمند فراوانی در مورد آن‌ها به اثبات رسیده است. جنیستئین[1] و دایدزئین[2] از جمله ایزوفلاون‌های مهم موجود در سویا می‌باشند که با توجه به فعالیت‌های بیولوژیک زیاد آن‌ها، در سال‌های اخیر مطالعات بسیاری روی آن‌ها انجام شده است. بیشتر این مطالعات تمرکز خود را بر خواص دارویی این دو ایزوفلاون، از قبیل مهارکننده تیروزین‌کیناز، اثرات حفاظتی آن در برابر سرطان‌ها، امراض قلبی عروقی، استئوپروز و نقش فیتواستروژنی آن‌ها گذاشته‌اند. این ترکیبات با داشتن خواص ضد میکروبی به گیاه برای مقابله با بیماری‌های میکروبی کمک می‌رسانند (Alekel el al. 2005, Chang et al. 1995, Dixon and Ferreira 2002, Fritz et al. 1998, Havsteen 2002, Hong et al. 2006, Hwang et al. 2001, MerzDemlow et al. 2000). در مورد اثرات ضد میکروبی این ترکیبات، مطالعات کمی صورت گرفته است و نتایج پراکنده و گاهی متناقض در تحقیقات مختلف به دست آمده است (Cushnie et al. 2003, Dastidar et al. 2004, Hong et al. 2006)؛ از این رو با توجه به تحقیقات اندک صورت گرفته و نتایج متفاوت ارائه شده، در این تحقیق سعی گردید تا وجود یا عدم وجود فعالیت مهاری یا کشندگی این دو ایزوفلاون مهم موجود در سویا بر ضد هفت باکتری بیماری‌زای مهم غذایی شامل *اشریشیا کلای*[3] *O157:H7*، *لیستریا مونوسیتوژنز*[4]، *باسیلوس سرئوس*[5]، *استافیلوکوکوس آرئوس*[6]، *ویبریو پاراهمولیتیکوس*[7]، *سالمونلا تایفی موریوم*[8] و *کرونوباکتر ساکازاکی*[9] مورد ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روش کار

باکتری‌های *اشریشیا کلای O157:H7* (NCTC 12900)، *لیستریا مونوسیتوژنز* (ATCC 7644)، *استافیلوکوکوس آرئوس* (PTCC 1189)، *سالمونلا تایفی-موریوم* (ATCC 15277)، *باسیلوس سرئوس* (PTCC 1015)، *کرونوباکتر ساکازاکی* (PTCC 1550) و *ویبریو پاراهمولیتیکوس* (PSU 2591)، که به صورت کشت ذخیره حاوی گلیسرول در دمای ۲۰°C- نگهداری می‌شدند، جهت فعال‌سازی به محیط TSB (در مورد *ویبریو پاراهمولیتیکوس* TSB-2% NaCl) منتقل و به مدت ۲۰ ساعت در دمای ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت حاوی هر یک از میکروارگانیسم‌های فعال‌شده‌ی مورد آزمایش، به ۵ میلی‌لیتر محیط TSB (در مورد *ویبریو پاراهمولیتیکوس* TSB-2% NaCl) تلقیح شد و در دمای ۳۵°C گرم‌خانه‌گذاری گردید و بعد از مدت زمان ۲۰ ساعت، اقدام به رقیق‌سازی متوالی و کشت روی محیط آگار مغذی شد. پلیت‌ها در دمای ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شدند و سپس تعداد

1 - Genistein
2 - Daidzein
3 - *Escherichia col*i O157:H7
4 - *Listeria monocytogenes*
5 - *Bacillus cereus*
6 - *Staphylococcus aureus*
7 - *Vibrio parahaemolyticus*
8 - *Salmonella typhimurium*
9 - *Cronobacter sakazakii*

باکتری‌های زنده‌ی هر پلیت، شمارش گردید. این آزمایش‌ها در سه تکرار انجام گردید. با این عمل تعداد هر باکتری پس از ۲۰ ساعت مشخص گردید. برای انجام آزمایش‌های بعدی با رقیق‌سازی کشت ۲۰ ساعته مربوط به هر باکتری دوز مناسب تلقیح، یعنی حدود 10^5 cfu/ml تهیه شد.

به منظور تعیین حدّاقل غلظت جنیستئین (LC Laboratories, USA) و دایدزئین (LC Laboratories, USA) که باعث مهار رشد باکتری‌های مورد آزمایش می‌شود[1]، غلظت‌های صفر، ۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار از جنیستئین و دایدزئین در محیط کشت TSB (در مورد *ویبریو پاراهمولیتیکوس* TSB-2% NaCl) تهیه گردید و هر یک از باکتری‌ها با دوز حدود 10^5 cfu/ml به آن تلقیح گردید . این آزمایش‌ها در حجم ۲۰۰ میکرولیتر و درون میکروپلیت استریل انجام شد. به منظور حذف اثر کدورت ناشی از محیط کشت، جنیستئین، دایدزئین و باکتری مورد استفاده، قبل و بعد از افزودن باکتری، میزان جذب نوری[2] کلیه‌ی حفرات میکروپلیت اندازه‌گیری گردید. سپس میکروپلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور، با دمای ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شدند و پس از آن با اندازه‌گیری میزان جذب نوری و بررسی وجود یا عدم وجود کدورت ناشی از رشد باکتری اقدام به تعیین حدّاقل غلظت مهارکننده رشد باکتری گردید (Hong et al. 2006). این آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد.

به منظور تخمین تأثیر جنیستئین و دایدزئین بر مدت زمان فاز تأخیری، رشد[3] هر یک از پاتوژن‌های مورد آزمایش نیز، همین روش استفاده شد و اندازه‌گیری میزان جذب نوری قبل و بعد از افزودن باکتری مورد نظر، انجام گردید و سپس میکروپلیت‌ها درون دستگاه میکروپلیت‌ریدر[4] دارای انکوباتور در دمای ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدّت ۲۴ ساعت قرار داده شد و هر نیم ساعت میزان جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده شد. براساس داده‌های به دست آمده از میزان جذب نوری نمونه‌ها، مدت زمان سپری شده تا آغاز روند افزایش پایدار در میزان جذب نوری نمونه‌ها، که نشان‌دهنده‌ی ورود باکتری به فاز رشد لگاریتمی است، به عنوان مدّت زمان فاز تأخیری رشد هر باکتری تخمین زده شد (Baty et al. 2002). این آزمایش‌ها در سه تکرار انجام گردید.

آنالیز آماری

داده‌های به دست آمده به وسیله‌ی نرم‌افزار SPSS16 و آزمون‌های آماری One-Way ANOVA و Two-Way ANOVA آزمون تکمیلی Scheffe مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

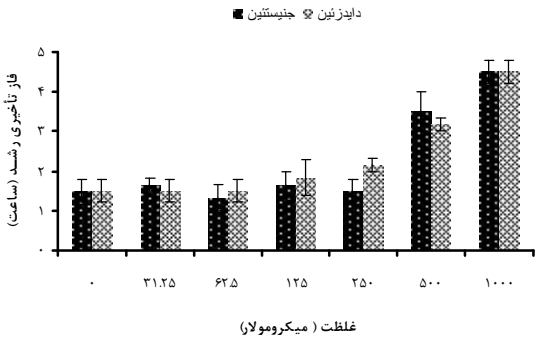
نتایج

این مطالعه در ابتدا با هدف تعیین حدّاقل غلظت مهارکننده‌ی رشد و حدّاقل غلظت کشنده‌ی باکتری[5] دو ایزوفلاون جنیستئین و دایدزئین صورت پذیرفت. نتایج تعیین حدّاقل غلظت مهارکننده رشد که به روش کدورت‌سنجی پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای مناسب صورت پذیرفت، نشان داد که این دو ایزوفلاون توانایی مهار رشد باکتری‌های مورد آزمایش در این تحقیق را ندارند، به طوری که پس از طی مدت زمان انکوباسیون، کم و بیش کدورت در همه‌ی غلظت‌های مورد استفاده از این دو ترکیب (صفر، ۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار) مشاهده گردید؛ بنابراین بررسی تأثیر یا عدم تأثیر این دو ایزوفلاون در به تأخیر

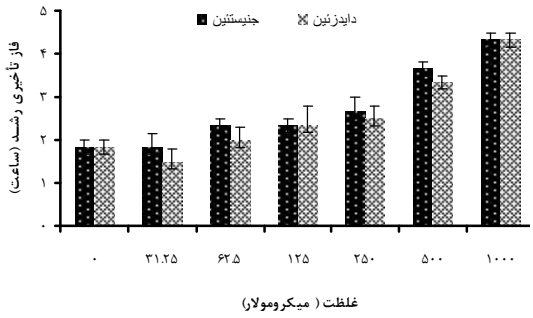
1 - Minimum inhibitory concentration-MIC
2 - Absorbance
3 - Lag phase
4- Multimode microplate reader
5- Minimum bactericidal concentration-MBC

انداختن رشد باکتری‌ها یا به عبارت دیگر، بر مدّت زمان فاز تأخیری رشد باکتری‌ها مورد توجه قرار گرفت که در زیر به نتایج آن اشاره می‌گردد.

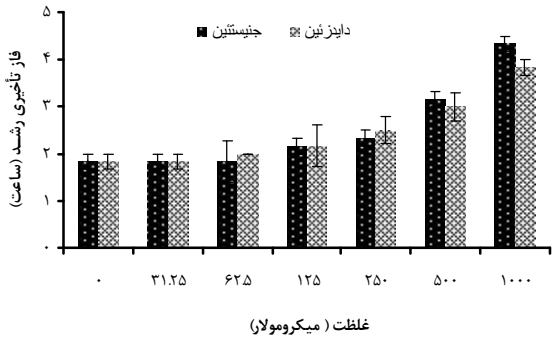
همان طور که در نمودار ۱ مشاهده می‌گردد، تفاوت معنی‌داری بین جنیستئین و دایدزئین از نظر تأثیر بر مدت زمان فاز تأخیری رشد *باسیلوس سرئوس* در هیچ کدام از غلظت‌ها وجود نداشت (P>۰/۰۵)؛ جنیستئین در غلظت ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار و دایدزئین در غلظت ۱۰۰۰ میکرومولار تأثیر معنی‌داری در افزایش مدت زمان فاز تأخیری رشد *باسیلوس سرئوس* نشان دادند (P<۰/۰۵). بنابراین می‌توان گفت که برای افزایش معنی‌دار مدت زمان فاز تأخیری رشد *باسیلوس سرئوس*، جنیستئین با دوز حداقل ۵۰۰ میکرومولار و دایدزئین با دوز حداقل ۱۰۰۰ میکرومولار مورد نیاز است. نتایج مشابهی در مورد *استافیلوکوکوس آرئوس* (نمودار ۲) و *سالمونلا تایفی موریوم* (نمودار ۳) مشاهده گردید.



نمودار ۱: تأثیر غلظت‌های مختلف جنیستئین و دایدزئین بر مدت زمان فاز تأخیری رشد باسیلوس سرئوس



نمودار ۲: تأثیر غلظت‌های مختلف جنیستئین و دایدزئین بر مدت زمان فاز تأخیری رشد استافیلوکوکوس آرئوس

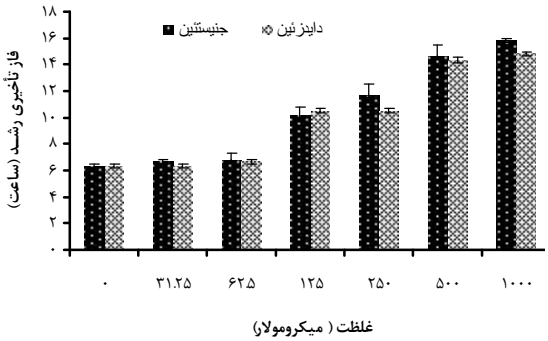


نمودار ۳: تأثیر غلظت‌های مختلف جنیستئین و دایدزئین بر مدت زمان فاز تأخیری رشد سالمونلا تایفی موریوم

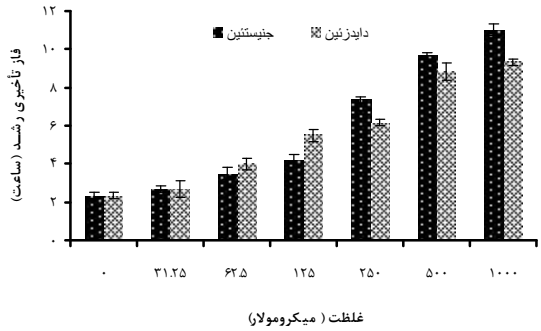
تفاوت معنی‌داری بین جنیستئین و دایدزئین از نظر تأثیر بر مدّت زمان فاز تأخیری رشد *لیستریا مونوسیتوژنز* در هیچ کدام از غلظت‌ها وجود نداشت (P>۰/۰۵). با توجه به تأثیر معنی‌دار (P<۰/۰۵) جنیستئین و دایدزئین در افزایش مدت زمان فاز تأخیری رشد *لیستریا مونوسیتوژنز* در غلظت‌های ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار، می‌توان گفت که برای افزایش مدّت زمان فاز تأخیری رشد *لیستریا مونوسیتوژنز*، جنیستئین و دایدزئین با دوز حدّاقل ۱۲۵ میکرومولار مورد نیاز است (نمودار ۴). نتایج مشابهی در مورد *ویبریو پاراهمولیتیکوس* به دست آمد (نمودار ۵)، اما در مورد این باکتری، تفاوت معنی‌داری در غلظت ۱۰۰۰ میکرومولار این دو ترکیب، از نظر میزان اثر بر مدت زمان فاز تأخیری رشد باکتری، مشاهده شد؛ به طوری که مدت زمان فاز تأخیری رشد در مورد جنیستئین ۰/۲۸± ۱۱ ساعت و در مورد دایدزئین ۰/۱۶±۹/۳ ساعت بود (P <۰/۰۵).

همان طور که در نمودار ۶ مشاهده می‌گردد، تفاوت معنی‌داری بین جنیستئین و دایدزئین از نظر تأثیر بر مدت زمان فاز تأخیری رشد *اشریشیا کلای O157:H7* در هیچ کدام از غلظت‌ها وجود نداشت (P>۰/۰۵). جنیستئین و دایدزئین در هیچ کدام از غلظت‌ها تأثیر معنی‌داری در افزایش مدت زمان فاز تأخیری رشد این باکتری نشان ندادند (P>۰/۰۵). در مقابل، این دو ایزوفلاون در غلظت ۱۰۰۰ میکرومولار تأثیر معنی‌داری را در افزایش مدّت زمان

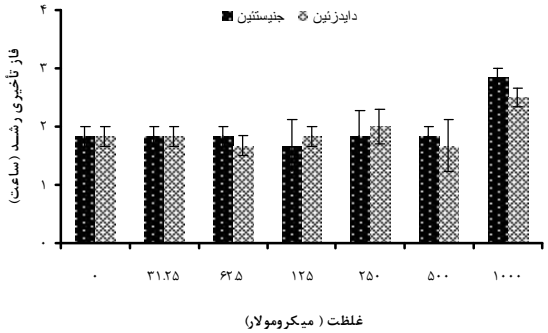
فاز تأخیری رشد *کرونوباکتر ساکازاکی* نشان دادند (P<۰/۰۵) و در هیچ کدام از غلظت‌ها تفاوت معنی‌داری بین آن‌ها از نظر تأثیر بر مدت زمان فاز تأخیری رشد *کرونوباکتر ساکازاکی* وجود نداشت (P>۰/۰۵) (نمودار ۷).



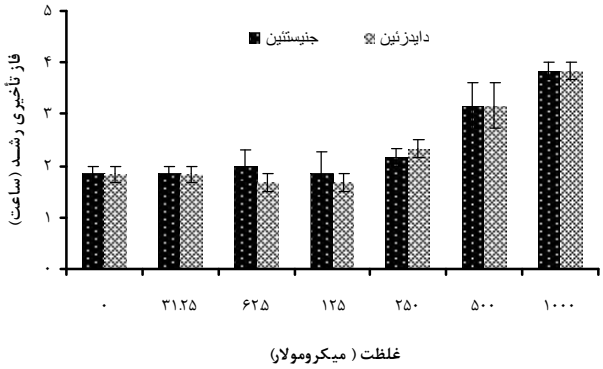
نمودار ۴: تأثیر غلظت‌های مختلف جنیستئین و دایدزئین بر مدت زمان فاز تأخیری رشد *لیستریا مونوسیتوژنز*



نمودار ۵: تأثیر غلظت‌های مختلف جنیستئین و دایدزئین بر مدت زمان فاز تأخیری رشد *ویبریو پاراهمولیتیکوس*



نمودار ۶: تأثیر غلظت‌های مختلف جنیستئین و دایدزئین بر مدت زمان فاز تأخیری رشد *اشریشیا کلای O157:H7*



نمودار ۷: تأثیر غلظت‌های مختلف جنیستئین و دایدزئین بر مدت زمان فاز تأخیری رشد *کرونوباکتر ساکازاکی*

بحث

ایزوفلاون‌ها از جمله ترکیبات گیاهی هستند که اثرات سودمند فراوانی در مورد آن‌ها به اثبات رسیده؛ امّا در مورد اثرات ضد میکروبی آن‌ها مطالعات کمی صورت گرفته است و نتایج پراکنده و گاهی متناقض در تحقیقات مختلف به دست آمده است؛ به عنوان مثال، Basile و همکاران در سال ۲۰۰۰ بیان کردند که آپیگنین[1] تا دوز ۱۲۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر هیچ تأثیری بر روی *استافیلوکوکوس آرئوس* ندارد، اما در همین سال Sato و همکاران اثرات ضد میکروبی این ترکیب را با دوز ۱۵/۶–۳/۹ میکروگرم برروی میلی‌لیتر بر همین باکتری گزارش کردند. در مورد تأثیر دایدزئین هم بر *استافیلوکوکوس آرئوس* نتایج مختلفی به دست آمده است؛ به طوری که Verdrengh و همکاران در سال ۲۰۰۴ اثرات مهاری این ترکیب را بر رشد باکتری گزارش نموده‌اند، امّا Ulanowska و همکاران در سال ۲۰۰۷ عدم تأثیر دایدزئین بر *استافیلوکوکوس آرئوس* را گزارش کرده‌اند.

با توجه به تحقیقات اندک صورت گرفته و نتایج متفاوت ارائه شده، در این تحقیق سعی شد تا وجود یا عدم وجود فعالیت مهاری یا کشندگی دو ایزوفلاون مهم موجود در سویا، یعنی جنیستئین و دایدزئین بر روی هفت باکتری بیماری‌زای مهم غذایی مورد ارزیابی قرار گیرد.

1- Apigenin

بدین منظور تأثیر یا عدم تأثیر این دو ایزوفلاون بر مدّت زمان فاز تأخیری رشد باکتری‌ها مورد نظر قرار گرفت. همان طور که در بخش نتایج آورده شده است، جنیستئین و دایدزئین بر روی *اشریشیا کلای* تأثیری نداشتند. نتایج مشابهی به وسیله‌ی Verdrengh و همکاران در سال ۲۰۰۴ گزارش شده است. نتایج تحقیق حاضر هم‌چنین نشان داد که جنیستئین با دوز حداقل ۵۰۰ میکرومولار و دایدزئین با دوز حدّاقل ۱۰۰۰ میکرومولار تأثیر معنی‌داری در افزایش مدت زمان فاز تأخیری رشد باکتری‌های *باسیلوس سرئوس*، *استافیلوکوکوس آرئوس* و *سالمونلا تایفی‌موریوم* دارند. در مورد *کرونوباکتر ساکازاکی* حداقل دوز مورد نیاز جنیستئین و دایدزئین برای افزایش معنی‌دار در مدت زمان فاز تأخیری رشد ۱۰۰۰ میکرومولار بود.

Verdrengh و همکاران در سال ۲۰۰۴ اثرات مهاری جنیستئین را بر رشد *استافیلوکوکوس آرئوس*، *استرپتوکوکوس پاستوریانوس*[1]، *باسیلوس سرئوس* و *هلیکوباکتر پایلوری*[2] نشان دادند. آن‌ها هم‌چنین دریافتند که دایدزئین نیز، اثرات مهاری بر رشد باکتری‌های مذکور دارد، امّا میزان اثر مهارکنندگی آن کم‌تر از جنیستئین بود. Bae و همکاران در سال ۲۰۰۱ نتایج مشابهی را در مورد *هلیکوباکتر پایلوری* مشاهده کردند.

از بین باکتری‌های مورد آزمایش در این تحقیق، حسّاس‌ترین باکتری نسبت به جنیستئین و دایدزئین *لیستریا مونوسیتوژنز* و *ویبریو پاراهمولیتیکوس* بودند؛ به طوری که دوز ۱۲۵ میکرومولار این دو ایزوفلاون توانست به صورت معنی‌داری مدت زمان فاز تأخیری رشد این باکتری‌ها را افزایش دهد.

Dastidar و همکاران در سال ۲۰۰۴ با بررسی اثرات ضد میکروبی تعدادی از ایزوفلاون‌ها، بیان کردند که جنیستئین اثرات مهارکنندگی متوسطی بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس آرئوس*، *سالمونلا*، *شیگلا*، *کلبسیلا*، *سودوموناس*، *ویبریو کلرا* و *ویبریو پاراهمولیتیکوس* دارد، اما دایدزئین هیچ گونه اثرات مهاری بر این باکتری‌ها ندارد. Cushnie و همکاران در سال ۲۰۰۳ فعالیت ضد میکروبی سه فلاونوئید آپیگنین، بیکالین[3] و گالانگین[4] را بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس آرئوس*، *انتروکوکوس فیکالیس*[5] ، *انتروکوکوس فیسیوم*[6] ، *اشریشیا کلای* و *سودوموناس آئروجینوزا*[7] بررسی کردند. نتایج ایشان نشان داد که گالانگین تنها بر رشد *استافیلوکوکوس آرئوس* تأثیر مهاری دارد و روی سایر باکتری‌های مورد آزمایش بی‌تأثیر است؛ آپیگنین نیز تأثیر مهاری کمی را فقط روی *استافیلوکوکوس آرئوس* نشان داد؛ حال آن که بیکالین روی هیچ یک از باکتری‌های مورد آزمایش اثر مهاری نداشته است.

بر اساس نتایج Rauha و همکاران در سال ۲۰۰۰ فلاونوئید کرستین[8] اثر مهاری بر رشد باکتری‌های *استافیلوکوکوس آرئوس*، *باسیلوس سابتیلیس*، *اشریشیا کلای*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*[9]، *میکروکوکوس لوتئوس* و *سودوموناس آئروجینوزا* دارد، اما فرم گلیکوزیدی آن، یعنی روتین[10] فاقد اثر مهاری بر باکتری‌های مذکور می‌باشد. فلاونوئید دیگری که به وسیله‌ی Rauha و همکارانش مورد بررسی قرار گرفته نارینگنین[11] بوده است. نارینگنین نیز، اثرات مشابهی با کرستین بر باکتری‌های مذکور نشان داده است. Ulanowska و همکاران در سال ۲۰۰۷ اثر مهارکنندگی جنستئین و آپیگنین را بر روی رشد *باسیلوس سابتیلیس* نشان دادند. آن‌ها دریافتند که دایدزئین روی این باکتری بی‌تأثیر است؛ امّا تأثیر مهاری خوبی بر *سودوموناس*

1- *Streptococcus pasteurianus*
2- *Helicobacter pylori*
3- Baicalin
4- Galangin
5- *Enterococcus faecalis*
6- *Enterococcus faecium*
7- *Pseudomunas aeruginosa*
8- Quercetin
9- *S. epidermidis*
10- Rutin
11- Naringenin

آئروجینوزا دارد. هم‌چنین جنیستئین، بر خلاف دو ترکیب دیگر توانایی مهار رشد *استافیلوکوکوس آرئوس* را دارد. Hong و همکاران در سال ۲۰۰۶ اثرات مهارکنندگی جنیستئین را در دوز ۱۰۰ میکرومولار روی *استافیلوکوکوس آرئوس* و *باسیلوس آنتراسیس* نشان دادند و بیان کردند که جنیستئین در دوز ۱۰۰ میکرومولار اثری بر *اشریشیا کلای*، *شیگلا سونئی*[1] و *کلبسیلا نومونیا*[2] ندارد.

مکانیسم اثر ضد میکروبی ایزوفلاون‌ها و فلاونوئیدها هنوز به طور کامل شناخته شده نیست؛ امّا نتایج بعضی تحقیقات نشان می‌دهد که مهار سنتز اسیدهای نوکلئیک احتمالاً باعث بروز اثرات ضد میکروبی این ترکیبات می‌گردد (Ulanowska et al. 2006). هم‌چنین ثابت شده است که جنیستئین باعث مهار آنزیم توپوایزومراز نوع I و نوع II[3] می‌گردد، امّا دایدزئین تنها روی توپوایزومراز نوع I اثرات مهاری دارد و اثرات مهاری آن بر روی توپوایزومراز نوع II ضعیف است (Chang et al. 1995, Yamagishi et al. 2001). توپوایزومرازها آنزیم‌هایی هستند که در تنظیم همانندسازی DNA در سلول باکتری‌ها نقش دارند. بر اساس نظر Cushnie و همکاران در سال ۲۰۰۳ علت به دست آمدن نتایج مختلف در مطالعاتی که در مورد اثرات ضد میکروبی ایزوفلاون‌ها و فلاونوئیدها صورت پذیرفته است، می‌تواند ناشی از موارد زیر باشد: حلالیت متفاوت و بعضاً کم ایزوفلاون‌ها و فلاونوئیدهای مختلف در آب، عدم پایداری طولانی مدت این ترکیبات در محیط، تفاوت در روش سنجش فعالیت ضد میکروبی در تحقیقات مختلف، نوع حلال استفاده شده برای این ترکیبات در مطالعات مختلف، تعداد باکتری اوّلیه[4]، نوع محیط کشت به کار رفته، مخزن ایزوفلاون یا فلاونوئید مورد آزمایش و سویه یک گونه خاص که مورد آزمایش قرار گرفته است.

در نهایت، با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق، می‌توان بیان کرد که در صورت استفاده از غلظت ۱۰۰۰ میکرومولار جنیستئین و دایدزئین، فاز تأخیری رشد کلیه‌ی باکتری‌های مورد آزمایش به غیر از *اشریشیا کلای* O157:H7 به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به جهت تأمین بودجه‌ی طرح، تقدیر و تشکر می‌شود. هم‌چنین از سرکار خانم اصفهانی، کارشناس محترم آزمایشگاه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی به خاطر همکاری در انجام طرح قدردانی می‌گردد.

1- *Shigella sonnei*
2- *Klebsiella pneumonia*
3- Topoisomerases type I and type II
4- Inoculum size

منابع

Alekel, D.L.; Germain, A.; Peterson, C.T.; Hanson, K.B.; Stewart, J.W. and Toda, T. (2000). Isoflavone-rich soy protein isolate attenuates bone loss in the lumbar spine of perimenopausal women. American Journal of Clinical Nutrition, 72: 844-852.

Bae, E.A.; Han, M.J. and Kim, D.H. (2001). In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of irisolidone isolated from the flowers and rhizomes of *Pueraria thunbergiana*. Planta Medica, 67: 161-163.

Basile, A.; Sorbo, S.; Giordano, S.; Ricciardi, L.; Ferrara, S.; Montesano, D.; et al. (2000). Antibacterial and allelopathic activity of extract from *Castanea sativa* leaves. Fitoterapia, 71: s110- s116.

Baty, F.; Flandrois, J.P. and Delignette-Muller, M.L. (2002). Modeling the lag time of *Listeria monocytogenes* from viable count enumeration and optical density data. Applied and Environmental microbiology, 68: 5816-5825.

Chang, Y.C.; Nair, M.G. and Nitiss, J.L. (1995). Metabolites of daidzein and genistein and their biological activities. Journal of Natural Products, 58: 1901-1905.

Cushnie, T.P.T.; Hamilton, V.E.S. and Lamb, A.J. (2003). Assessment of antibacterial activity of selected flavonoids and consideration of discrepancies between previous reports. Microbiological Research, 158: 281-289.

Cushnie, T.T.P. and Lamb, A.J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. International Journal of Antimicrobial Agents 26: 343-356.

Dastidar, S.G.; Manna, A.; Asok Kumar, K.; Mazumdar, K.; Dutta, N.K.; Chakrabarty, A.N.; et al. (2004). Studies on the antibacterial potentiality of isoflavones. International Journal of Antimicrobial Agents, 23: 99-102.

Dixon, A. and Ferreira, D. (2002). Molecules of Interest Genistein. Phytochemistry, 60: 205-211.

Fritz, W.A.; Coward, L.; Wang, J. and Lamartiniere, C.A. (1998). Dietary genistein: perinatal mammary cancer prevention bioavailability and toxicity testing in the rat. Carcinogenesis, 19: 2151-2158.

Havsteen, H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. Pharmacology & Therapeutics, 96: 67-202.

Hong, H.; Landauer, M.R.; Foriska, M.A. and Ledney, G.D. (2006). Antibacterial activity of the soy isoflavone genistein. Journal of Basic Microbiology, 46 (4): 329-335.

Hugo, W.B. and Russell, A.D. (1998). Pharmaceutical Microbiology. Blackwell Science Ltd Edinburgh. Quoted by: Cushnie T.P.T., Hamilton V.E.S. and Lamb A.J. (2003). Assessment of antibacterial activity of selected flavonoids and consideration of discrepancies between previous reports. Microbiological Research, 158: 281-289.

Hwang, J.L.; Hodis, H.N. and Sevanian, A. (2001). Soy and alfalfa phytoestrogen extracts become potent low-density lipoprotein antioxidants in the presence of aceroal cherry extract. Journal of Agricultural Food Chemistry, 49: 308-314.

MerzDemlow, B.E.; Duncan, A.M.; Wangen, K.E.; Xu, X.; Carr, T.P.; Phipps, W.R.; et al. (2000). Soy isoflavones improve plasma lipids in normocholesterolemic. Premenopausal woman. American Journal of Clinical Nutrition, 71: 1462-1469.

Rauha, J.P.; Remes, S.; Heinonen, M.; Hopia, A.; Kähkönen, M.; Kujala, T.; et al. (2000). Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. International Journal of Food Microbiology, 56: 3-12.

Sato, Y.; Suzaki, S.; Nishikawa, T.; Kihara, M.; Shibata, H. and Higuti, T. (2000). Phytochemical flavones isolated from *Scutellaria barbata* and antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Journal of Ethnopharmacology, 72: 483-488.

Ulanowska, K.; Majchrzyk, A.; Moskot, M.; Jakóbkiewicz-Banecka, J. and Węgrzyn, G. (2007). Assessment of antibacterial effects of flavonoids by estimation of generation times in liquid bacterial cultures. Biologia Bratislava, 62 (2): 132-135.

Ulanowska, K.; Tkaczyk, A.; Konopa, G. and Węgrzyn, G. (2006). Differential antibacterial activity of genistein arising from global inhibition of DNA, RNA protein synthesis in some bacterial strains. Archives in Microbiology, 184: 271-278.

Verdrengh, M.; Collins, L.V.; Bergin, P. and Tarkowski, A. (2004). Phytoestrogen genistein as an anti-staphylococcal agent. Microbes and Infection, 6: 86-92.

Yamagishi, T.; Otsuka, E. and Hagiwara, E. (2001). Reciprocal control of expression of mRNA for osteoclast differentiation factor and OPG in osteogenic stromal cells by genistein Evidence for the involvement of topoisomerase II in osteoclastogenesis. Endocrinology, 142: 3632-3637.

Comparing the antimicrobial effectiveness of genistein and daidzein on some food-borne pathogen bacteries

Zarei, M.[1]; Fazlara, A.[2] and Mohammadi, S.[3]

Received: 20.06.2012 Accepted: 24.02.2013

Abstract

The isoflavones genistein and daidzein are phytoestrogens which are found at high levels in soy products. These isoflavones are currently of growing interest owing to their beneficial effects on many disorders, including cancer, cardiovascular diseases and osteoporosis. However, there is little information on the antimicrobial effects of these isoflavones. The purpose of the present study was to compare the antimicrobial effects of genistein and daidzein against seven important foodborne pathogens, namely *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus, Salmonella typhimurium*, and *Cronobacter sakazaki*. To achieve this purpose, the effect of different concentrations of genistein or daidzein on the lag phase duration of growing bacteria was evaluated by measuring the optical density of the samples during 24 h at 35 ºC. According to the results of the present study, the lag phase duration of *E. coli* O157:H7 was not altered significantly in the presence of up to 1000 µM of both the isoflavones ($p>0.05$). However a significant increase in the lag phase duration of *B. cereus*, *S. aureus* and *S. typhimurium* was observed in the presence of 500 µM of genistein or 1000 µM of daidzein ($p<0.05$). Furthermore, both isoflavones made a significant increase in the lag phase duration of *L. monocytogenes* and *V. parahaemolyticus* in the concentration of 125 µM and also in the lag phase duration of *C. sakazakii* in the concentration of 1000 µM ($p<0.05$). In conclusion, in the presence of 1000 µM of genistein and daidzein, the lag phase duration of all the tested bacteria were significantly increased except for *E. coli* O157:H7.

Key Words: Genistein, Daidzein, Isoflavone, Lag phase

1- Assistant Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz
2- Associate Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of VeterinaryMedicine, Shahid Chamran University of Ahvaz
3- Graduated from Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz
Corresponding Author: Zarei, M., E-mail: zarei@scu.ac.ir