تعیین فعالیت ضد میکروبی اسانس ها

فهرست

- ۱-چکیده
- ۲-مقدمه
- ۳- تعریف اسانس های گیاهی
- ۴-کاربرد اسانس ها
- ۵-ویژگی فیزیکی اسانس ها
- ۶-مواد شیمیایی تشکیل دهنده اسانس ها
- ۷-استخراج و نگهداری اسانس ها
- ۸-روش استخراج اسانس های گیاهی
- ۹-روش تقطیر
- ۱۰-روش اسانس گیری فشاری
- ۱۱-روش استخراج با حلال
- ۱۲- روش استخراج به وسیله آنزیم
- ۱۳-روش های آزمایشگاهی برای تعیین فعالیت
- ۱۴-تهیه سوسپانسیون میکروبی
- ۱۵-ارزیابی اثر ضد میکروبی اسانس به روش کمی و کیفی

فهرست

- ۱۳- تعیین حداقل غلظت بازدارندگی
- ۱۴-تعیین حداقل غلظت کشندگی
- ۱۵-دیسک دیفیوژن
- ۱۶-روش انتشار دیسک در آگار
- ۱۷-انتشار دیسک به روش کربن بائر
- ۱۸-روش انتشار دیسک بر روی گیاه بادرنجوبه
- ۱۹-روش انتشار در حفره آگار
- ۲۰- روش انتشار در پلاگ آگار
- ۲۱-روش انتشار در آگار
- ۲۲-روش بیو اتوگرافی مستقیم
- ۲۳-روش سنجش زیستی اندود کردن با آگار
- ۲۴-روش چاهک های آگار
- ۲۵- رقیق کردن بر روی آگار
- ۲۶-رقیق کردن بر روی آگار در گیاه حنا
- ۲۷-رقیق کردن در براث
- ۲۸-رقیق کردن در محیط مایع
- ۲۹- رقیق کردن در آگار
- ۳۰-روش شیب ضد میکروبی
- ۳۱-روش خط متقاطع
- ۳۲-روش غذای سمی
- ۳۳- یافته ها
- ۳۴- رقیق کردن در براث

چکیده

بیماری های ناشی از مصرف مواد غذایی آلوده به باکتری های پاتوژن از موارد مهم مرتبط با سلامت عمومی می باشد . جهت کاهش زیان های اقتصادی و خطرات جانی ناشی از عوامل بیماری زای میکروبی استفاده از مواد طبیعی به عنوان ترکیبات ضد میکروبی روشی موثر برای کنترل حضور باکتری های بیماری زا و نیز افزایش ماندگاری غذاهای فراوری شده به نظر می رسد.در میان این ترکیبات عصاره های به دست آمده از گیاهان دارویی دارای خواص ضد میکروبی بوده و به عنوان منبع مواد ضد میکروبی در مقابل پاتوژن ها ی بیماری زا عمل می کنند .

چکیده

- این گیاهان اثرات بازدارندگی در مقابل باکتری های بیماری زا نشان می دهند .با در نظر گرفتن اثرات ضد میکروبی موثر اسانس های گیاهی ، آن ها قابل استفاده به عنوان جایگزین مواد شیمیایی ضد میکروبی در صنایع غذایی می باشند . در این مبحث کلیاتی از اسانس های گیاهی ، روش های تعیین کمترین غلظت بازدارندگی از رشد و نحوه عملکرداسانس ها مورد بررسی قرار می گیرد.

مقدمه

- درقرن حاضر ، حفظ ایمنی ماده غذایی و کیفیت آن در دوره ماندگاری امری است که نه تنها توجه متخصصین صنعت غذا و مسئولین سلامت کشور ها را به خود جلب کرده ، بلکه بی توجهی یا کم توجهی به آن می تواند صدمات جبران ناپذیری به جامعه وارد کند .امروزه بیماری های ناشی از مصرف غذا های آلوده در همه جای دنیا حتی در کشور های پیشرفته ای چون آمریکا هم یک مشکل اساسی به شمار می رود .

مقدمه

- از آنجا که مصرف کنندگان به ایمنی مواد غذایی که حاوی نگهدارنده های سنتزی بوده ، اطمینان ندارند به مصرف مواد غذایی طبیعی که از محصولات طبیعی به عنوان نگهدارنده (جایگزین نگهدارنده های شیمیایی) استفاده شده گرایش پیدا کردند . از جمله ترکیبات طبیعی که می توانند به عنوان نگهدارنده در مواد غذایی به کار روند اسانس های گیاهی به دست آمده از گیاهان معطر دارای خاصیت ضد باکتری ، ضد قارچ ، ضد اکسایشی و ضد سرطانی بوده و قادر هستند رشد پاتوژن ها و تولید سم توسط ریز سازواره ها را کنترل کنند .

اسانس های گیاهی

- اسانس های گیاهی ، مخلوط های کمپلکسی از ترکیبات فرار تولید شده توسط ارگانیسم های زنده بوده که توسط روش های فیزیکی چون عصاره گیری و تقطیر از همه گیاه ، یا بخش هایی از گیاه بدست می آیند .
- اسانس های گیاهی ترکیبات معطر ، آب گریز ، تغلیظ شده و فراری هستند که در سلول ها و کرک های ترشحی منفرد یا مجتمع ، غده های ترشحی ، مجاری ترشحی در قسمت های سطحی و درونی اندام های مختلف از جمله : برگ ، گل ، میوه ، جوانه و شاخه های گیاهان وجود دارند

کاربرد اسانس ها

- اسانس ها در صنایع آرایشی و بهداشتی و غذایی و دارویی به کار می روند . اسانس ها علاوه بر اینکه برای خوش طعم کردن و معطر ساختن دارو ها به کار می روند در برخی از داروها به عنوان پایدار کننده و محافظت کننده کاربرد دارند
- به طور کلی خواص درمانی شناخته شده برای اسانس ها عبارتند از گند زدا ، ضد نفخ ، ضد انگل ، هضم کننده غذا ، متحرک سیستم اعصاب مرکزی و ...می باشند (واترین ۱۳۷۹)
- روغن های اسانس به عنوان آنتی اکسیدان در فراورده های غذایی کاربرد دارند.

ویژگی فیزیکی اسانس ها

- اسانس ها دارای فعالیت نوری هستند . هر اسانسی دارای چرخش نوری معیین و ثابتی است ، ضریب شکست یکی دیگر از خصوصیات فیزیکی است
- از ضریب شکست برای تعیین درجه خلوص استفاده می شود
- اسانس ها به طور کلی با آب غیر قابل اختلاط بوده ولی به مقدار کم در آب حل می شود
- اسانس ها در اثر مجاورت با هوا اکسید و رزینی می شود به همین دلیل باید در محیط خشک و خنک در ظرف دربسته و شیشه تیره نگه داری گردد .

مواد شیمیایی تشکیل دهنده اسانس ها

- اسانس ها از دو گروه ترکیب شیمیایی عمده تشکیل شده اند که عبارتند از ترین ها و فنیل پروپن ها که به عنوان عامل اصلی طعم و عطر اسانس هستند.
- اسانس ها از دو بخش فرار:
- که حدود ۹۰-۹۵ درصد وزن اسانس را روغن تشکیل می دهد و شامل مونوترپن ها ، ترپن هیدرو کربن ها و مشتقات اکسیژن دار از قبیل آلدهید های آلیفاتیک ، الکل ها و استر های می باشد
- بخش غیر فرار که :
- ۱۰ تا ۱۰۰ درصد روغن اسانس است و شامل هیدرو کربن ها ، اسید چرب ، استرول ها و کاروتنوئید ها و واکس ها می باشد

استخراج و نگهداری اسانس ها

- روش های مختلفی برای تهیه اسانس های گیاهی مورد استفاده قرار می گیرد
- متداول ترین روش تولید اسانس ها در صنعت روش تقطیر است .
- اسانس گیری به وسیله دی اکسید کربن مایع تحت درجه حرارت پایین و فشار بالا تولید مواد ارگانولپتیک طبیعی بیشتری می کند اما بسیار پر هزینه تر است .
- اسانس های استخراج شده به وسیله دی اکسید کربن فعالیت ضد میکروبی بیشتری نسبت به اسانس های به دست آمده از روش تقطیر دارند

روش های استخراج اسانس های گیاهی

- روش های استخراج متعددی در تولید اسانس های گیاهی استفاده می شود و بسته به نوع ماده گیاهی روش به کار رفته متفاوت می باشدو در واقع این نوع گیاه است که روش مورد استفاده را تعیین می نماید. انتخاب روش اسانس گیری یکی از نکات کلیدی است که نوع کیفیت بدست آمده را تعیین می نماید .
- فرایند جداسازی ترکیب های معطر به طور معمول با روش های گوناگونی مانند :
- تقطیر
- اسانس گیری فشاری
- استخراج با حلال
- استخراج به وسیله آنزیم
- روش تجزیه ای

روش تقطیر

- در فرایند تقطیر مایعات فرار (اسانس) را به بخار تبدیل کرده و سپس متراکم شده و به فاز مایع برگردانده می شود . در این روش استخراج ، از روش های متفاوتی نامبرده می شود که روش های عمومی آن عبارتند از : روش تقطیر با بخار آب ، تقطیر با آب و بخار آب است

اسانس گیری فشاری

- عبارت است از استخراج اسانس به شیوه فشردن سرد است زیرا هیچگونه گرمایی در این روش استفاده نمی شود.همچنین می توان اسانس را به وسیله فشار زیاد مکانیکی روی مواد گیاهی تولید کرد و اسانس با کیفیت بالا ایجاد نمود
- این روش بیشتر برای استخراج اسانس های مرکبات استفاده می شود
- شامل سه روش :
- روش فشار اسفنجی
- روش پیاله مخصوص اسانس گیری
- روش سایش ماشینی

استخراج با حلال

- استخراج با مایع مخصوصاَ برای مواد گیاهی که بازده خیلی پایینی دارند مناسب است . همچنین در موادیکه سازنده اسانس ، رزینی و چسبناک باشند و یا حتی زمانی که عطر با کیفیت زیاد و بهتر از روش تقطیر مورد نظر باشد از این روش استفاده می شود .
- در طی استخراج ترکیب های غیر فرار مواد گیاهی مانند : موم ها و رنگدانه ها استخراج و جدا می گردند.

استخراج به وسیله آنزیم ها

- اسانس های گلیکوزیده مانند اسانس بادام تلخ را به وسیله آب کافت آنزیمی گلیکوزید های مربوط به دست می آورند

مکانیسم ضد میکروبی اسانس ها

- اگر چه مطالعات زیادی روی خصوصیات ضدباکتریایی اسانس ها و ترکیباتشان انجام شده است، اما جزئیات مکانیسم عمل آنها بطور کامل مورد بررسی قرار نگرفته است. ساختمان شیمیایی هر یک از ترکیبات اسانس‌ها بر طرز عمل و فعالیت ضدباکتریایی آنها تأثیر می‌گذارد.
- ترپن های موجود در اسانس‌های ادویه‌جات عوامل ضد میکروبی اولیه هستند، مکانیسم عملی مشابه به این ترکیبات، نسبت داده شده است.
- بسیاری از ترپن های بسیار فعال بطور طبیعی ساختمان فنلی دارند، بنابراین معقول به نظر می‌رسد که نحوه فعالیت آنها مرتبط با ساختمان فنلی شان باشد.

مکانیسم ضد میکروبی اسانس ها

- اهمیت حضور گروههای هیدروکسیل در ترکیبات فنلی به اثبات رسیده است

- بطورکلی میزان بازدارندگی اسانس‌ها را می‌توان به حضور یک حلقه آروماتیک متصل به یک گروه قطبی نسبت داد.

روش های آزمایشگاهی برای تعیین فعالیت ضد باکتریایی اسانس ها

- ۱- روش دیسک دیفیوژن
- ۲-روش چاهک های آگار
- ۳-رقیق کردن بر روی آگار
- ۴- رقیق کردن در براث
- ۵- روش انتشار دیسک در آگار
- ۶- روش شیب ضد میکروبی
- ۷-روش انتشار در حفره آگار

روش های آزمایشگاهی برای تعیین فعالیت ضد باکتریایی اسانس ها

- ۸-روش انتشار در پلاگ آگار
- ۹-روش غذای سمی
- ۱۰-روش انتشار در آگار
- ۱۱-بیواتوگرافی مستقیم
- ۱۲-سنجش زیستی اندود کردن با آگار
- ۱۳-روش رقیق کردن در محیط مایع
- ۱۴-روش رقیق کردن در آگار
- ۱۵-روش خط متقاطع

تهیه سوسپانسیون میکروبی

- به منظور دستیابی به کشت فعال و تازه ، ۲۴ ساعت قبل از آزمایش ، باکتری های منجمد را در دمای آزمایشگاه از انجماد خارج و پس از کشت خطی روی محیط کشت مولر هینتون آگار به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه گرمخانه گذاری می کنیم .
- از آنجا که تعداد باکتری های تلقیح شده یکی از مهم ترین متغیر هایی است که بر نتیجه تحقیق اثر دارد ، تراکم سوسپانسیون میکروبی تلقیحی معادل $۱/۵*۱۰^{۸}$ (CFU/ML) باشد.
- سپس سطح محیط کشت با محلول رینگر شسته و سوسپانسیون غلیظ میکروبی حاصل می گردد .

تهیه سوسپانسیون میکروبی

- سپس مقداری از این سوسپانسیون به لوله های استریل درب دار حاوی محلول رینگر منتقل و کدورت آن با اسپکتروفوتومتر در طول موج ۶۳۰ نانومتر اندازه گیری می شود .
- سوسپانسیون تهیه شده در تعیین اثر ضد میکروبی اسانس به دو صورت کمی و کیفی مورد استفاده قرار می گیرد .

ارزیابی اثر ضد میکروبی اسانس به روش کمی و کیفی

- ارزیابی اثر ضد میکروبی اسانس به صورت کیفی به روش انتشار در آگار (دیسک و چاهک)
- و به صورت کمی با روش میکرودایلوشن براث و در پلیت ۹۶ خانه ای استریل جهت تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی MIC انجام می شود .
- پس از آن حداقل غلظت کشندگی MBC تعیین می گردد که برای این منظور ، ابتدا غلظتی برابر ۵۱۲ میلی گرم بر میلی لیتر از اسانس در محلول دی متیل سولفوکساید (حلال اسانس) تهیه و با استفاده از فیلتر سرنگی استریل می گردد و پس از آن غلظت های متوالی از اسانس تهیه می گردد.
- روش انتشار چاهک در آگار و انتشار دیسک جهت غربالگری اولیه فعالیت ضد میکروبی اسانس ها به کار گرفته می شود .

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی از رشد

- به منظور تعیین حداقل غلظت از روش میکرودایلوشن در پلیت ۹۶ خانه ای استریل استفاده می گردد .
- ۷۰ میکرولیتر محیط کشت مولر هینتون براث (برای باکتری) و پوتیتو دکستروز براث (برای قارچ) به چاهک اضافه می شود .
- ۷۰ میکرو لیتر سوسپانسیون میکروبی نیم مک فارلند به چاهک های میکروپلیت اضافه می گردد .
- سپس ۷۰ میکرولیتر از غلظت های تهیه شده از اسانس به چاهک ها اضافه و گرمخانه گذاری به مدت ۲۴ و ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ و ۲۷ درجه به ترتیب برای باکتری و قارچ صورت می گردد.
- در مرحله بعد ۲۰ میکرو لیتر از نمک تترازولیوم حل شده در آب مقطر به چاهک ها اضافه می شود و به مدت نیم ساعت برای باکتری ها و ۲۴ ساعت برای قارچ ها گرمخانه گذاری می شود .
- نتیجه : در خانه هایی که میکروب رشد کرد، رنگ قرمز تیره یا ارغوانی ظاهر گردید و اولین خانه ای که در آن رشد میکروبی روی نداد به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی گزارش می شود .

تعیین حداقل غلظت کشندگی

- از غلظتی که به عنوان غلظت بازدارندگی MIC گزارش شد و غلظت های بیشتر از آن ۵ میکرولیتر روی محیط کشت مولر هینتون آگار برای باکتری ها و محیط کشت پوتیتو دکستروز آگار برای قارچ کشت داده می شود و پس از گرمخانه گذاری ، پلیت ها از نظر رشد باکتری مورد بررسی قرار می گیرد .
- غلظتی که در آن هیچ گونه باکتری رشد نکرده به عنوان حداقل غلظت باکتری / قارچ گزارش می شود .

دیسک دیفیوژن

- دراین روش DISK diffusion یک دیسک کاغذی در اسانس خیسانده می شود و روی پلیت آگاری که با باکتری تلقیح شده است قرار داده می شود .
- این روش عموماً برای یک بررسی مقدماتی جهت اندازه گیری فعالیت آنتی باکتریال قبل از انجام مطالعات دقیق تر صورت می گیرد .
- فاکتورهایی مثل میزان یا حجم اسانس قرار داده شده روی دیسک کاغذی ، ضخامت لایه آگار و این که آیا حلالی استفاده شده است یا خیر ، در بین مطالعات مختلف متفاوت است .
- این بدان معناست که این روش برای انتخاب بین اسانس ها مفیداست ولی برای مقایسه اطلاعات منتشر شده در مطالعات مختلف مناسب نیست .

روش انتشار دیسک در آگار

- این روش در سال ۱۹۴۰ گسترش یافت و یک روش معمول مورد استفاده جهت تست حساسیت ضد میکروبی در آزمایشگاه می باشد .
- در این روش پلیت آگار با مقدار استانداردی از میکروارگانیسم مورد نظر تلقیح می شود سپس ، دیسک های کاغذ فیلتر حاوی ترکیب تست در غلظت مورد نظر بر روی سطح آگار قرار داده می شود . تحت شرایط مناسب انکوبه می شود .
- معمولاً عامل ضد میکروبی در آگار پخش شده و مانع جوانه زنی و رشد میکروارگانیسم مورد آزمایش شده و پس از آن قطر ناحیه مهار کننده رشد اندازه گیری می شود .

انتشار دیسک به روش کربی - بائر

- از سوسپانسیون میکروبی استاندارد هر سوش بر سطح محیط مولر هینتون آگار (برای باکتری) و پوتیتو دکستروز آگار (برای قارچ) کشت سطحی انجام می دهیم .
- سپس دیسک های کاغذی بلانک توسط پنس استریل و در کنار شعله با فاصله ی معیین از یکدیگر و از لبه ی پلیت بر سطح آگار آلوده به باکتری قرار داده می شود .
- ۲۰ میکرو لیتر از رقت های تهیه شده از اسانس به دیسک ها اضافه می گردد .
- DMSO (حلال اسانس)به عنوان کنترل منفی و از دیسک های آنتی بیوتیک جنتامایسین و نکومایسین به ترتیب برای باکتری های گرم منفی و گرم مثبت و آنتی بیوتیک آمفوتریپسین B به عنوان کنترل مثبت برای قارچ استفاده شد .

انتشار دیسک به روش کربی – بائر

- محیط کشت حاوی باکتری و قارچ به ترتیب در دمای ۳۷ و ۲۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ و ۷۲ ساعت گرمخانه گذاری شدند .
- قطر هاله های تشکیل شده در اطراف دیسک ها بوسیله خط کش اندازه گیری و به صورت میلی متر گزارش می شود .

روش انتشار دیسک بر روی گیاه بادرنجبویه

- جهت فعالیت ضد میکروبی اسانس بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ، اشرشیا و سودوموناس آئروژینوزا و کاندیدا آلبیکنس با روش انتشار دیسک بر روی کاغذی ۶ میلی متری و رقت سازی در محیط کشت مولر هینتون آگار و براث بررسی شد .
- پس از تهیه سوسپانسیون میکروبی ، پلیت ها به وسیله سوآپ استریل آغشته به سوسپانسیون ، میکروبی شدند و دیسک های حاوی ۰/۱ گرم بر میلی لیتر اسانس در شرایط استریل در روی محیط کشت انجام شد .
- پلیت ها به مدت ۱۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه نگهداری شدند .
- پس از سپری شدن زمان ، قطر هاله های عدم رشد با کولیس اندازه گیری و از دیسک حاوی حلال به عنوان کنترل استفاده شد .

روش انتشار دیسک بر روی گیاه بادرنجبویه

- جهت تعیین MIC ، رقت هایی از اسانس تهیه و از هر رقت ۵۰ میکرولیتر به لوله های استریل محتوی ۳ میلی لیتر سوسپانسیون باکتری و محیط کشت اضافه گردید و پس از مخلوط کردن به مدت ۱۸-۲۴ ساعت در گرمخانه ، گرماگذاری شد .
- نتایج بر حسب کدورت لوله و MIC تعیین گردید ، سپس ۰/۱ میلی لیتر از لوله هایی که هیچ گونه کدورتی در آنها مشاهده نشده بود برداشته و در محیط مولر هینتون کشت داده شد بدین ترتیب قدرت کشندگی MBC نمونه بدست آمد .
- نتایج : بیشترین قطر هاله عدم رشد بر روی باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس مشاهده شد
- اسانس بادرنجبویه بر روی باکتری های مورد آزمایش ، خاصیت ضد میکروبی داشت.

روش انتشار در حفره آگار

- در این روش سوسپانسیون میکروبی را در سطح پلیت آگار طوری پخش می نماییم که به طور یکنواخت تمام سطح پلیت را بپوشاند ، سپس یک سوراخ با قطر ۶ تا ۸ میلی متر در شرایط استریل با پانچ استریل از آگار بر میداریم و یک مقداری از عامل ضد میکروبی یا عصاره تهیه شده با غلظت معین داخل حفره وارد می کنیم .
- سپس ، پلیت آگار را تحت شرایط مناسب بسته به نوع میکروارگانیسم مورد آزمایش انکوبه می کنیم .
- عامل ضد میکروبی در محیط آگار پخش شده و مانع از رشد سویه میکروبی مورد آزمایش می شود.

روش انتشار در پلاگ آگار

- این روش اغلب برای تشخیص رابطه آنتاگونیسمی بین میکروارگانیسم ها مورد استفاده قرار می گیرد
- اساس این روش بر ساختن یک محیط آگار استوار است که روی محیط کشت آن رگه های نازکی در سطح پلیت مشخص می باشد .
- سلول های میکروبی در طول رشد خود ، مولکول هایی را در محیط کشت آگار ترشح می کنند
- پس از انکوبه کردن ، با استفاده از آگار پلیت یا لوله ای در شرایط استریل در محیط آگار یک برشی ایجاد کرده و از سطح آگار برداشته و در یک سطح دیگر که میکروارگانیسم های مورد آزمایش در آنجا هستند قرار داده می شوند .
- مواد پخش شده از محیط را به محیط آگار منتقل کرده سپس فعالیت ضد میکروبی با استفاده از شناسایی هاله مهار رشد که در اطراف آگار پلاگ تشکیل می شود قابل تشخیص می گردد.

روش انتشار در آگار

- این روش به عنوان روش تماس با آگار نیز معروف می باشد .
- این روش شامل انتقال عامل ضد میکروبی از طریق انتشار از کروماتوگرام لایه نازک به آگاری که قبلاَ با میکروارگانیسم مورد آزمایش تلقیح شده است می باشد .
- بعد از چند دقیقه یا چند ساعت انتشار کروماتوگرام متوقف و آگار انکوبه می شود .
- مناطق مهار رشد در مکان هایی که در آن ترکیبات ضد میکروبی با لایه آگار تماس داشته ظاهر می گردد.

بیواتوگرافی مستقیم

- شامل صفحه کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) گسترده ای است که در داخل مواد میکروبی غوطه ور یا اسپری شده است و بعد بیواتو گرام است که در دمای ۲۵ درجه به مدت ۴۸ ساعت تحت شرایط رطوبتی خاص انکوبه شده است .
- برای دیدن رشد میکروبی ، اغلب از املاح تترازولیوم استفاده می شود.

سنجش زیستی اندود کردن با آگار

- ترکیبی است از روش انتشار در آگار و بیواتوگرافی مستقیم می باشد
- صفحه TLC (کروماتوگرافی لایه نازک)که با محیط کشت آگار مذاب پوشیده شده است اجازه می دهد یک انتشار خوب از ترکیبات مورد آزمایش به محیط کشت آگار انجام گیرد.
- صفحات در دمای پایین برای چند ساعت قبل از انکوباسیون قرار می گیرند .
- پس از انکوباسیون تحت شرایط مناسب بسته به میکروارگانیسم مورد آزمایش ، رنگ آمیزی را می توان با رنگ تترازولیوم انجام داد.
- این روش یک تکنیک ساده و موثر برای جداکردن یک مخلوط پیچیده می باشد.

روش چاهک های آگار

- در روش Agar Well ، اسانس در داخل گوده ای روی آگار قرار داده می شود . این تست را می توان به عنوان تست غربالگر وقتی تعداد زیادی اسانس و یا تعداد زیادی از باکتری های جدا شده مورد غربالگری قرار می گیرد استفاده کرد .

روش چاهک در آگار

- در این روش به کمک دیسک کشت یکنواختی از سوسپانسیون میکروبی استاندارد هر سوش بر محیط های کشت انجام می شود .سپس در هر پلیت ۵ چاهک به قطر ۶ میلی متر با استفاده از انتهای پیپت پاستور استریل در سطح محیط کشت ایجاد شد و ته چاهک ها با استفاده از محیط کشت مذاب آگار پوشانده شد .
- هر یک از چاهک ها با ۲۰ میکرولیتر از غلظت های مختلف تهیه شده از اسانس پر شد .
- پس از گرمخانه گذاری به مدت معیین ، کشت های میکروبی از نظر تشکیل یا عدم تشکیل هاله عدم رشد در اطراف چاهک ها مورد بررسی قرار گرفت .

رقیق کردن بر روی آگار

- برای بررسی قدرت فعالیت ضد باکتریایی می توان اسانس را در آگار رقیق کرد و قدرت فعالیت آنها را تعیین نمود .
- در مطالعات منتشر شده از روش رقیق سازی در آگار ، حلال های مختلفی برای حل کردن اسانس ها در محیط کشت و حجم های مختلف تلقیح استفاده شده است که گاهی به صورتخطی و گاهی به صورت نقطه ای بوده است .

رقیق سازی آگار بر روی گیاه حنا

- رقیق سازی آگار براساس توصیه NCCLS
- جهت تعیین فعالیت ضد میکروبی عصاره حنا بر علیه باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس (گرم مثبت) و سودوموناس آئروژینوزا (گرم منفی)
- ۱۵ میلی لیتر محیط مولر – هینتون آگار با غلظت های مختلف از عصاره های حنا مخلوط شد و به آن 10^4 از هر نمونه باکتری مورد نظر تلقیح گردید . پلیت ها در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردیدند .
- حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) به عنوان کمترین غلظت هر عصاره که از رشد باکتری بر روی محیط کشت جلوگیری می کند ، تعیین گردید

رقیق سازی آگار بر روی گیاه حنا

- در مرحله بعدی از روش رقیق سازی مایع جهت تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره فوق استفاده شد .
- جهت انجام این آزمایش حجم های یکسان از هر سوسپانسیون باکتریایی شامل 10^5 به محیط مولر – هینتون براث حاوی غلظت های مختلف از عصاره حنا تلقیح گردید .
- سپس محیط های کشت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند .
- متعاقبا ۱۰۰ میکرولیتر از هر محیط کشت مایع بر روی محیط مولر – هینتون آگار کشت داده شد و مجددا در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند .
- حداقل غلظت کشندگی (MBC) به عنوان کمترین غلظت عصاره حنا ، به طور کامل باعث مرگ باکتری ها گردید

یافته ها

- نتایج فعالیت های ضد میکروبی عصاره آبی و الکی بر روی گونه های باکتریایی نشان داد :

- عصاره آبی حنا فعالیت ضد میکروبی کمی بر علیه باکتری گرم منفی مانند اشرشیا کلی و سودوموناس دارد
- با این حال این عصاره دارای فعالیت ضد میکروبی بسیار خوبی بر علیه گونه های استافیلوکوک به عنوان باکتری گرم مثبت می باشد

رقیق کردن در براث

- در مطالعات رقیق سازی در براث تکنیک های مختلفی استفاده شده است که مهم ترین آنها Optical density یا همان اندازه گیری کدورت و نیز شمارش کلنی ها به روش شمارش سلول های زنده است .

روش رقیق کردن در محیط مایع

- ماکرو دایلوشن : این روش مستلزم آماده کردن ۲ تا رقت از یک ماده ضد میکروبی در یک محیط کشت مایع است که به لوله های حاوی حداقل حجم ۲ میلی لیتر توزیع می شود
- میکرو دایلوشن : از لوله های با حجم کمتر استفاده می شود سپس هر لوله را با حجم مناسبی از تلقیح میکروبی آماده شده در همان محیط بعد از رقیق کردن سوسپانسیون میکروبی استاندارد شده تلقیح می کنند تا کدورت معادل نیم در مقیاس مک فارلند به دست آید.سپس لوله های تلقیح شده انکوبه می شوند.

روش رقیق کردن در آگار

- این روش شامل ترکیب غلظت های مختلف از عوامل ضد میکروبی مورد نظر در یک محیط کشت آگار می باشد . که معمولاَ به صورت ۲ برابر رقت آگار پس از تلقیح یک معرف میکروبی بر روی سطح آگار تلقیح می گردد.
- نقطه پایانی MIC به عنوان کم ترین غلظت عامل ضد میکروبی به طور کامل مانع از رشد تحت شرایط مناسب انکوبه می گردد

روش شیب ضد میکروبی

- این روش ترکیبی از روش اصلی رقیق سازی و روش تغلیظ به منظور تعیین اندازه MIC (غلظت ممانعت کنندگی)بوده که با ایجاد یک غلظت گرادیانی از عامل ضد میکروبی آزمایش شده در محیط آگار همراه می باشد .
- ETEST یک فرم تجاری از این روش است . در این روش یک نوار آغشته با غلظت گرادیانی افزایشی با عامل ضد میکروبی از یک انتها به قسمت دیگر بر روی سطح آگاری پخش می شود که قبلاً با میکروارگانیسم مورد آزمایش مورد تلقیح قرار گرفته است .

روش خط متقاطع

- این روش برای غربالگری سریع میکروارگانیسم ها از لحاظ رابطه آنتاگونیسمی بکار می رود
- سویه میکروبی دلخواه توسط یک خط واحد در مرکز آگار کشت داده می شود .
- پس از یک دوره انکوباسیون بر اساس سویه میکروبی ، با میکروارگانیسم مورد آزمایش به صورت یک خط منفرد عمود بر خط مرکزی محیط کشت تلقیح می گردد.
- پس از انکوباسیون بعدی ، برهم کنش های ضد میکروبی با مشاهده ، اندازه هاله عدم رشد مورد تفسیر قرار می گیرد.

روش غذای سمی

- این روش عمدتاَ به منظور بررسی اثر ضد قارچی بر علیه کپک مورد استفاده قرار می گیرد .
- عامل ضد قارچ و یا عصاره آن به آگار مایع در غلظت نهایی مورد نظر رسانده شده و به خوبی مخلوط می شوند
- پس از آن ، محیط کشت در پتری دیش ریخته و یک شب بعد از انکوباسیون ، تلقیح را می توان با یک دیسکی از میسیلیوم های قارچ با محدوده اندازه از ۲ تا ۵ میلی متر که در مرکز دیسک قرار داده می شود انجام داد.
- با اندازه گیری قطر رشد قارچ در دیسک ها اثر ضد قارچی اندازه گیری می گردد.

منابع

- -بررسی فعالیت ضد باکتریایی عصاره آبی و اتانولی حنا علیه استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس- دانشگاه علوم پزشکی گناباد -۱۳۸۸
- بررسی اثر ضد میکروبی اسانس مرزه -مجله علوم و صنایع غذایی -۱۳۹۷
- مروری بر تاثیر ضد میکروبی اسانس ها - مجله بهداشت مواد غذایی - ۱۳۹۴
- بررسی اثر ضد میکروبی و روش های تعیین حداقل غلظت بازدارندگی اسانس ها - مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران -۱۳۹۱
- بررسی ترکیبات شیمیایی و فعالیت ضد میکروبی اسانس حاصل از گیاه بادرنجبویه - مقاله پژوهشی-۱۳۹۴
- مروری بر روش های ارزیابی فعالیت ضد میکروبی در آزمایشگاه - مقاله پژوهشی -۱۳۹۶

منابع

- Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases Ashraf A. Mostafa, Abdulaziz A. Al-Askar, Journal of Ethnopharmacology 74 (2001) 217–220
- Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine
- D. Srinivasan a, Sangeetha Nathan a, T. Suresh b, P. Lakshmana Perumalsamy Khalid S. Almaary, Turki M. Dawoud, Essam N. Sholkamy, Marwah M. Bakr

تهیه کننده: خانم مهندس سمانه رمضانی

کارشناس مسئول آرایشی و بهداشتی معاونت غذا و دارو نیشابور

دریافت جدیدترین مطالب آموزشی در حوزه سلامت از طریق:

سایت معاونت غذا و دارو نیشابور : https://vcfda.nums.ac.ir/

صفحات اطلاع رسانی معاونت غذا و دارو نیشابور در فضای مجازی: @numsifda