doi: 10.69107/koomesh-149775

جلد ۲۶ ، شماره ۳، پیاپی۹۹، خرداد و تیر ۱۴۰۳

مقاله پژوهشی

بررسی اثر ضد باکتریایی سفیده تخم غاز، بوقلمون، مرغ‌های طبیعی و مصنوعی بر روی باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت در محیط آزمایشگاهی

شیوا علیپور [۱]، حیدر موسوی [۱]، هاجر بدری [۲]، اسماعیل نجفی [۳]، گلچین موسوی تکان‌تپه [۴]، شهرام نظری [۲،*]

[۱] کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی خلخال، خلخال، ایران

[۲] گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشگاه علوم پزشکی خلخال، خلخال، ایران

[۳] گروه بهداشت عمومی، دانشگاه علوم پزشکی خلخال، خلخال، ایران

[۴] گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

*نویسنده‌ی مسئول: گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشگاه علوم پزشکی خلخال، خلخال، ایران. ایمیل: shahramnazari73@yahoo.com

دریافت: ۱۴۰۲/۰۷/۱۷ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۳/۱۲

چکیده

مقدمه: عوامل بیماری‌زای غذایی (از جمله باکتری‌ها، ویروس‌ها و انگل‌ها) یکی از مهم‌ترین نگرانی‌های بهداشت عمومی در سراسر جهان به شمار می‌آید. یکی از مواردی که خاصیت ضدمیکروبی بالایی دارد، سفیده تخم‌مرغ است.

اهداف: هدف از پژوهش کنونی بررسی اثرات ضد باکتریایی سفیده تخم برخی از پرندگان بر روی باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت در محیط آزمایشگاهی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، با استفاده از روش میکرو براث دایلوشن و قطر هاله عدم رشد، اثرات ضد باکتریایی سفیده‌های پرندگان بر روی باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت مورد آزمایش قرار گرفت. حداقل غلظت بازدارندگی، حداقل غلظت کشندگی و قطر هاله عدم رشد این ترکیبات بر روی این باکتری‌ها طبق دستورکارهای موسسه استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی تعیین گردید.

نتایج: مقدار حداقل غلظت بازدارنده (MIC) سفیده تخم‌مرغ‌های طبیعی و بوقلمون در رقت‌های ۵۰ الی ۶/۲۵ درصد و تخم‌مرغ‌های مصنوعی و غاز در رقت‌های ۲۵ الی ۵۰ درصد برای باکتری‌های مورد مطالعه به دست آمد. همچنین مقدار حداقل غلظت باکتری کش (MBC) سفیده تخم‌مرغ‌های طبیعی، مصنوعی، بوقلمون و غاز در رقت ۵۰ درصد برای بعضی از باکتری‌های مورد مطالعه به دست آمد. قطر هاله عدم رشد در محدوده ۸ الی ۱۸ میلی‌متر برای باکتری‌های مورد مطالعه به دست آمد.

نتیجه‌گیری: نتایج پژوهش کنونی نشان می‌دهد که سفیده تخم‌های مورد مطالعه در حذف باکتری‌های گرم منفی و مثبت موثر است. در این میان سفیده تخم‌مرغ طبیعی تاثیر ضدباکتریایی بیشتری نسبت به بقیه سفیده‌ها بر روی باکتری‌های مورد مطالعه داشت.

کلمات کلیدی: عامل ضدباکتریایی، باکتری‌های گرم منفی ، باکتری‌های گرم مثبت، سفیده تخم‌مرغ

۱. مقدمه

عوامل بیماری‌زای موجود در مواد غذایی (از جمله باکتری‌ها، ویروس‌ها و انگل‌ها) یکی از مهم‌ترین نگرانی‌های بهداشت عمومی در سراسر جهان به شمار می‌آید. هنگامی که یک پاتوژن از طریق مواد غذایی یا نوشیدنی آلوده خود را در میزبان انسان مستقر می‌کند یا سم یک پاتوژن وارد بدن می شود، یک بیماری منتقل‌شده از غذا رخ می‌دهد (۱). طبق گزارش سازمان جهانی بهداشت سالانه بیش از ۶۰۰ میلیون مبتلا و ۴۲۰۰۰۰ مرگ ناشی از ۲۲ بیماری عمده غذایی در سراسر جهان رخ می‌دهد. پاتوژن‌های منتقل‌شده از غذا (عمدتا عوامل باکتریایی)، منجر به بیماری‌های روده‌ای و خارج روده‌ای می‌شوند (۲).

گونه‌های شیگلا از مهمترین پاتوژن‌های باکتریایی منتقل‌شده از غذا در سرتاسر جهان به ویژه در کشورهای در حال توسعه مانند هند، تونس، ایران و مصر به شمار می‌رود

Copyright © 2024, Alipour et al. This open-access article is available under the Creative Commons Attribution 4.0 (CC BY 4.0) International License (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which allows for unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided that the original work is properly cited.

که ۹۹ درصد از عفونت‌های ناشی از شیگلا در این کشورها رخ می‌دهد (۳). شیگلا بعد از سالمونلا و استافیلاکوک از نظر ایجاد مسمومیت‌های غذایی در مکان سوم قرار دارد. از بین ۵۰ سروتایپ مختلف شگیلا، ۴ گونه‌ی شیگلا دیسانتری، شیگلا فلکسنری، بوئیدی و سونئی در ارتباط با عفونت‌های انسانی هستند (۴, ۵). علاوه بر میزان شیوع، مقاومت چند دارویی گونه‌های شیگلا اخیرا به یک نگرانی مهم در ایمنی مواد غذایی تبدیل شده است. شیگلا دیسانتری تیپ یک به شدت بیماری‌زا و تنها زیرگونه ایجادکننده اپیدمی و پاندمی در جهان است. آنتی‌بیوتیک درمانی برای کاهش احتمال عوارض، مرگ و تسریع بهبودی درمان اولیه بیماری ناشی از شیگلا می‌باشد (۴, ۶).

بیشتر گونه‌های باسیلوس برای انسان خطرناک تلقی نمی‌شوند، بنابراین برای تخمیر برخی غذاها استفاده می‌شود. با این‌حال، گونه‌هایی مانند باسیلوس سوبتلیس و باسیلوس آنتراسیس به عنوان آلوده‌کننده‌های غذایی یا به عنوان عوامل عفونی در نظر گرفته می‌شوند (۷). باسیلوس سوبتلیس قادر به رشد در غذاها بوده و از طریق تولید انتروتوکسین مولد اسهال و توکسین تهوع‌زا، ایجاد مسمومیت می‌نماید. باسیلوس آنتراسیس به دلیل ایجاد سیاه‌زخم پاتوژن عمده این جنس محسوب می‌گردد (۸). سیاه‌زخم یک عفونت آنتروپوزونوز است که توسط باکتری گرم مثبت باسیلوس آنتراسیس ایجاد می‌شود (۹).

کلبسیلا، باسیلی گرم منفی و غیر متحرک متعلق به خانواده انتروباکتریاسه است که دارای رابطه ژنتیکی نسبتا نزدیکی با سایر جنس‌های این خانواده نظیر اشریشیا، سالمونلا، شیگلا و یرسینیا می‌باشد. جنس کلبسیلا دو سویه بیماری‌زا دارد: (۱) کلبسیلا پنومونیه و (۲) کلبسیلا اکسی‌توکا. در انسان کلبسیلا پنومونیه به عنوان یک ساپروفیت در حلق و دستگاه روده‌ای وجود دارد. قابلیت این ارگانیسم برای انتشار سریع اغلب منجر به عفونت‌های بیمارستانی، بخصوص در واحد نوزادان می‌گردد (۱۰, ۱۱). کلبسیلااکسیتوکا یک پاتوژن فرصت‌طلب در انسان می‌باشد و در حال حاضر به عنوان دومین پاتوژن مهم بالینی از جنس کلبسیلا در نظر گرفته می‌شود (۱۲).

انواع مختلفی از مواد ضدمیکروبی مانند کلر، برم، ید، نیتریت و نیترات وجود دارد که در صنایع مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد. به دلیل این‌که هر کدام از این مواد نوعی مواد شیمیایی سنتزی محسوب می‌شوند، می‌توانند باعث آسیب به سلامتی انسان و محیط زیست شوند. بنابراین یافتن مواد ضدمیکروبی جدید طبیعی با کمترین عارضه و مقاومت از دغدغه‌های محققان است (۱۲, ۱۴).

یکی از این مواد ضدمیکروبی که خاصیت ضدمیکروبی بالایی دارد سفیده تخم‌مرغ است (۱۵). سفیده تخم‌مرغ متشکل از ۸۸ درصد آب، ۱۰/۶ درصد پروتئین، ۰/۹ درصد کربوهیدرات و ۰/۵ درصد مواد معدنی می‌باشد (۱۶). چند صد پروتئین در سفیده تخم‌مرغ شناسایی شده است که بعضی از آن‌ها خواص ضدمیکروبی دارند مانند لیزوزیم و دیفنسین‌ها که به پوشش باکتری‌ها آسیب می‌رسانند (۱۷). برخی دیگر مثل اووستاتین، سیستاتین، اووآلبومین به عنوان مهارکننده پروتئازهای باکتریایی عمل می‌کنند یا دسترسی باکتری را به مواد مغذی مورد نیاز خود محدود می‌کنند (۱۳). سفیده تخم‌مرغ 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 (۱۸). در میان پروتئین‌های سفیده تخم‌مرغ که فعالیت ضدمیکروبی را نشان می‌دهند، اووترانسفرین تنها پروتئینی است که از رشد سالمونلا انتریتیدیس جلوگیری می‌کند (۱۹). علاوه بر این، شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد اووترانسفرین تخم‌گذاری با اتصال به غشای باکتری، نفوذپذیری آن را مختل کرده و در نهایت منجر به مرگ باکتری شود (۲۰). سایر پارامترها نیز در ایمنی غیرفعال سفیده تخم‌مرغ نقش دارد و تخم‌گذاری فعالیت پروتئین‌های ضدمیکروبی سفیده تخم‌مرغ مانند اووترانسفرین را تعدیل کند (۲۱). در واقع، سفیده تخم‌مرغ شرایط خاصی از pH، ویسکوزیته، ترکیب یونی و فعالیت‌های پروتئینی را ارائه می‌دهد که تخم‌گذاری به‌طور قابل توجهی بر عملکرد ضد باکتریایی اووترانسفرین تاثیر بگذارد (۱۸). ویسکوزیته بالای سفیده تخم‌مرغ تخم‌گذاری تحرک باکتری‌ها و دسترسی به مواد مغذی از جمله آهن را محدود کند. pH سفیده تخم‌مرغ طی ۲ الی ۳ روز پس از تخم‌گذاری در دمای اتاق افزایش می‌یابد. این pH افزایش یافته به عنوان بخشی از فعالیت ضدمیکروبی سفیده تخم‌مرغ شناخته می‌شود که تخم‌گذاری بر فعالیت مولکول‌های ضدمیکروبی و همچنین وضعیت غشای باکتری تاثیر بگذارد (۲۲).

تاکنون مطالعه‌ای در زمینه تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC)، حداقل غلظت کشندگی (MBC) و قطر هاله عدم رشد بر روی باکتری‌های شیگلا دیسانتری و باسیلوس سوبتلیس و کلبسیلا اکسی توکا، استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا تیفیموریوم، اشرشیا کلی و سودوموناس آئروژینوزا انجام نشده است.

۲. اهداف

هدف از این مطالعه تعیین قطر هاله عدم رشد و مقدار حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی ناشی از تاثیر سفیده

تخم غاز، بوقلمون، مرغ‌های طبیعی و مصنوعی بر روی باکتری‌های مورد بررسی در محیط آزمایشگاهی می‌باشد. سفیده‌های تخم پرندگان مورد بررسی می‌توانند به عنوان بازدارنده رشد باکتری‌ها و ممانعت از فساد مواد غذایی در صنایع غذایی مورد استفاده قرار گیرد.

۳. مواد و روش‌ها

پژوهشگران روش‌های تعیین هاله عدم رشد یا ناحیه بازدارندگی، تعیین حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی را برای بررسی تاثیر مواد ضد باکتریایی بر باکتری‌های هدف به کار برده‌اند (۲۳, ۲۴). هاله عدم رشد به‌عنوان یک روش کیفی برای تعیین مقاومت یک باکتری در برابر ماده ضدمیکروبی به‌کار برده می‌شود. حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی برای بررسی کمی خاصیت ضدمیکروبی سفیده‌های تخم به کار گرفته خواهند شد. حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی می‌توانند بهترین روش برآورد حساسیت باکتری به‌صورت کمی باشند. MIC و MBC درجه مقاومت باکتری در برابر ماده ضدمیکروبی را نشان می‌دهند (۲۵). این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مصوب معاونت پژوهشی دانشکده علوم پزشکی خلخال با کد اخلاق:IR.KHALUMS.REC.1401.013 است.

۱.۳. سویه‌های باکتری

سویه‌های باکتری استفاده شده در پژوهش کنونی شامل سویه استاندارد کلبسیلا اکسیتوکا (ATCC: 700603)، اشرشیاکلی (ATCC: 23591)، شیگلا دیسانتری (ATCC:12022) ، سالمونلا تیفیموریوم (ATCC:14028)، سودوموناس آئروژینوزا (ATCC 27853)، باسیلوس سوبتلیس (ATCC 1254) و استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 25923) است که از مرکز پژوهش‌های صنعتی ایران تهیه گردید. تمامی سویه‌های باکتریایی خریداری‌شده، در محیط کشت نوترینت براث در شرایط هوازی و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرماگذاری شد. سپس با لوپ استریل از محیط کشت نوترینت براث مقداری برداشته و بر روی محیط‌های کشت اختصاصی هر باکتری، به‌حالت خطی کشت داده شد. سپس پلیت‌های تلقیح‌شده در گرمخانه با دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند.

۲.۳. تهیه استاندارد مک فارلند

در این پژوهش، استاندارد مک‌فارلند به‌عنوان مرجعی برای مطابقت دادن کدورت ناشی از سوسپانسیون باکتری استفاده شد. مواد مورد استفاده برای تهیه استاندارد نیم مک‌فارلند شامل: (۱) باریم کلرید ($BaCl_2.2H_2O$) دهیدراته و (۲) اسید سولفوریک (H_2SO_4) بوده که از شرکت Merck تهیه گردید. با مخلوط نمودن ۰/۰۵ میلی‌لیتر باریم کلرید دهیدراته ۱/۱۷۵٪ با ۹/۹۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۱ درصد، استاندارد نیم مک‌فارلند تهیه گردید. با مخلوط این دو ترکیب رسوب سولفات باریم که سبب ایجاد کدورت در محلول می‌شود، به‌وجود آمد. جذب نوری کدورت ایجاد شده توسط محلول نیممک فارلند در طول موج ۶۱۰ نانومتر به وسیله اسپکتروفتومتر (مدل Hach) اندازه‌گیری گردید. از آن‌جایی که تعداد باکتری تلقیح‌شده یکی از مهمترین متغیرهایی است که بر نتیجه این پژوهش اثر می‌گذارد، تراکم سوسپانسیون میکروبی تلقیحی باید استاندارد باشد. بدین‌منظور برای تهیه سوسپانسیون میکروبی، از کشت تازه و جوان باکتری با استفاده از لوپ استریل چند کلنی به لوله حاوی سرم فیزیولوژی استریل انتقال داده شد. کلنی‌های باکتری تا حدی به سرم فیزیولوژی اضافه گردید تا کدورت ایجاد شده توسط باکتری‌ها معادل با کدورت اندازه‌گیری شده در لوله استاندارد ۰/۵ مک فارلند باشد. با توجه به این‌که غلظت باکتریایی ۰/۵ مک فارلند برابر ۱۰۸ × ۱/۵ میلی لیتر است، برای به‌دست آوردن سایر رقت‌های باکتریایی از رقیق‌سازی استفاده گردید. این عملیات برای همه باکتری‌های مورد مطالعه به‌طور جداگانه انجام گردید. تمامی آزمایش‌ها برابر با دستورالعمل‌های موسسه استاندارد و آزمایشگاه پزشکی (Clinical and Laboratory Standards Institute) انجام شد.

۳.۳. ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی سفیده تخم غاز، بوقلمون، مرغ‌های طبیعی و مصنوعی به سه روش استاندارد

۱.۳.۳. تعیین حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی

آزمایشات حداقل غلظت بازدارندگی (Minimum Inhibitory Concentration) و کشندگی (Minimum Bactericidal Concentration) با استفاده از روش رقیق‌سازی میکرو بر اساس روش توصیه شده توسط Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) انجام گردید.

در این روش از میکرو چاهک‌ها برای تعیین اثر ضدباکتریایی غلظت‌های مختلف سفیده تخم غاز، بوقلمون، مرغ‌های طبیعی و مصنوعی استفاده گردید. یک چاهک شاهد برای کنترل مثبت و یک چاهک شاهد برای کنترل

منفی استفاده شد. شاهد مثبت حاوی محیط کشت نوترینت براث و باکتری که ماده ضد باکتریایی به آن اضافه نشده است. همچنین شاهد منفی فقط حاوی محیط کشت بود. برای تعیین مقدار دقیق MIC و MBC سفیده تخم غاز، بوقلمون، مرغهای طبیعی و مصنوعی در مقابل هر باکتری، آزمایشات با رقتهای مختلف (۵۰ درصد، ۲۵ درصد، ۱۲/۵ درصد، ۶/۲۵ درصد، ۳/۱۲۵ درصد ...) سفیدهها بهصورت رقیقسازی سریالی انجام داده شد. به چاهکهای ردیف A که شامل ۱۲ چاهک میباشد، به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت نوترینت براث استریل ریخته شد سپس از سفیدههای تهیه شده ، ۱۰۰ میکرولیتر به چاهک شماره A۱ ریخته شد و چندین بار پیپتاژ گردید و سپس از چاهک A۱، ۱۰۰ میکرولیتر برداشت شد و به چاهک A۲، انتقال داده شد. این عملیات رقیقسازی تا چاهک A۱۰، انجام داده شد و غلظت سفیده در خانه A۱۰ به اندازه ۱۰(۰/۵) برابر غلظت اولیه کاهش یافت. چاهکهای A۱۱ و A۱۲ به ترتیب بهعنوان کنترل مثبت و کنترل منفی در نظر گرفته شد . سپس ۵ میکرولیتر از محلول باکتری با غلظت یک دهم برابر ۰/۵ مک فارلند به همه چاهکها به جز چاهک کنترل منفی اضافه گردید. سپس میکروپلیت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در گرمخانه قرار داده شد. پس از طی زمان گرماگذاری، چاهکها از نظر کدورت ناشی از رشد باکتری تلقیحشده بررسی شد. چاهکی با کمترین غلظت از سفیدهها که کدورت ناشی از رشد باکتری در آن مشاهده نشد، به عنوان MIC تعیین گردید. برای تعیین MBC سفیده تخم غاز، بوقلمون، مرغهای طبیعی و مصنوعی، از چاهکهایی که رشد در آنها مشاهده نشده بود ۱۰ میکرولیتر بر روی محیط کشت نوترینت آگار کشت داده شد و در گرمخانه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری گردید. بعد از گرماگذاری 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.

۲.۳.۳. روش دیسک آگار دیفیوژن (Zone of Inhibition)

از کدورت سوسپانسیون میکروبی تهیه شده مطابق با استاندارد ۰/۵ مک فارلند در پلیتهای حاوی محیط کشت نوترینت آگار بهوسیلهی سواپ استریل به صورت یکنواخت کشت داده شد، سپس دیسکهای خالی (Blank disk) ۶ میلیمتری در شرایط کاملا استریل به ۵۰ میکرولیتر از سفیدهها آغشته و به منظور خشک شدن به مدت ۳۰ دقیقه در گرمخانه در دمای ۳۰ درجه سلسیوس قرار داده شد 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 هالهی عدم رشد بهوسیله خطکش برای هر کدام از آنها اندازهگیری و بر حسب میلیمتر گزارش گردید. 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 (حاوی محیط کشت نوترینت براث و باکتریها، بدون سفیده تخمغاز، بوقلمون، مرغهای طبیعی و مصنوعی). تمامی آزمایشات حذف باکتریها در محیط آبی با خصوصیات بافر فسفات نرمال سالین (Phosphate Buffered Saline) انجام گردید (جدول ۱).

جدول ۱. خصوصیات بافر فسفات نرمال سالین

PBS, 0.01 M	مقدار
NaCl	۸ گرم
KCl	۰/۲ گرم
Na2HPO4.7H2O	۲/۱۷ گرم
KH2PO4	۰/۲۵۹ گرم
آب مقطر	۱ لیتر

۴. نتایج

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

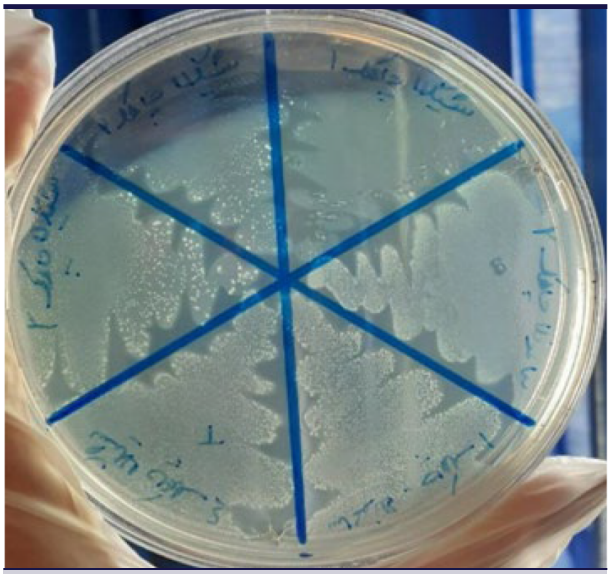
مقدار MIC سفیده تخممرغهای طبیعی برای باکتریهای اشرشیاکلی، باسیلوس سوبتلیس و سودوموناس آئروژینوزا در رقت ۵۰ درصد، برای باکتریهای استافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا تیفیموریوم در رقت ۲۵ درصد و برای باکتری شیگلا دیسانتری در رقت ۶/۲۵ درصد بهدست آمد. همچنین MIC سفیده تخممرغهای مصنوعی برای باکتریهای سالمونلا

تیفیموریوم و شیگلا دیسانتری به ترتیب در رقت‌های ۲۵ درصد و ۵۰ درصد به‌دست آمد. مقدار MIC سفیده تخم بوقلمون برای باکتری‌های اشرشیاکلی و سالمونلا تیفی‌موریوم در رقت ۵۰ درصد و برای باکتری شیگلا دیسانتری در رقت ۶/۲۵ درصد به‌دست آمد. مقدار MIC سفیده تخم غاز برای باکتری‌های باسیلوس سوبتلیس و استافیلوکوکوس اورئوس در رقت ۵۰ درصد و باکتری سودوموناس آئروژینوزا در رقت ۲۵ درصد به‌دست آمد. نتایج به‌دست آمده از آزمایش MBC نشان می‌دهد که فقط سفیده‌ی تخم‌مرغ طبیعی در رقت ۵۰ درصد فقط برای باکتری شیگلا دیسانتری اثر کشندگی داشت (جدول ۲ و تصویر ۱).

جدول ۲. نتایج آزمایش MIC سفیده‌ی تخم‌مرغ طبیعی، مصنوعی، بوقلمون و غاز بر روی باکتری‌های مورد مطالعه [الف]

MIC	اشرشیاکلی	باسیلوس سوبتلیس	سودوموناس آئروژینوزا	استافیلوکوکوس اورئوس	کلبسیلا اکسی‌توکا	سالمونلا تیفی‌موریوم	شیگلا دیسانتری
تخم‌مرغ طبیعی	۵۰	۵۰	۵۰	۲۵	-	۲۵	۶/۲۵
تخم‌مرغ مصنوعی	-	-	-	-	-	۲۵	۵۰
تخم بوقلمون	۵۰	-	-	-	-	۵۰	۶/۲۵
تخم غاز	-	۵۰	۲۵	۵۰	-	-	-

[الف] داده‌ها به صورت درصد نمایش داده شده‌اند.



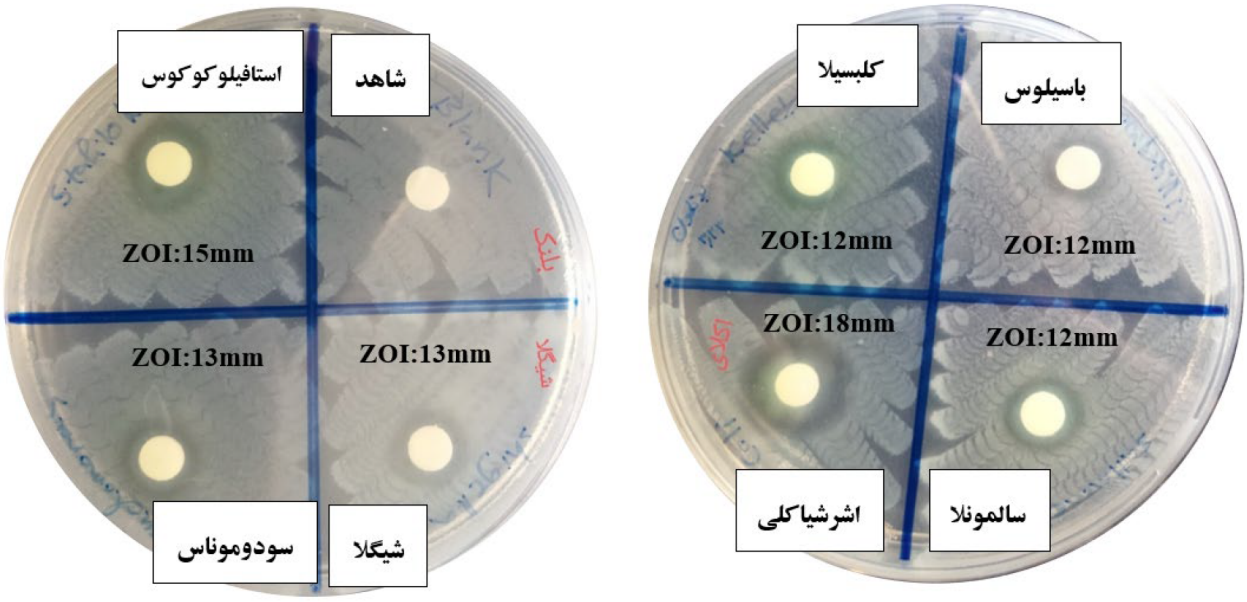
تصویر ۱. نتایج آزمایش MBC سفیده تخم مرغ طبیعی در مقابل باکتری شیگلا دیسانتری.

۲.۴. تعیین قطر هاله عدم رشد

قطر هاله عدم رشد باکتری اشرشیاکلی در مواجهه با سفیده تخم‌مرغ طبیعی ۱۰ میلی‌متر به‌دست آمد. همچنین برای باکتری‌های اشرشیاکلی، سودوموناس آئروژینوزا و کلبسیلا اکسیتوکا در مواجهه با سفیده تخم‌مرغ مصنوعی به ترتیب برابر ۱۰، ۱۲، ۱۱ به‌دست آمد. همچنین قطر هاله عدم رشد برای باکتری‌های باسیلوس سوبتلیس، کلبسیلا اکسیتوکا و سالمونلا تیفیموریوم برابر ۱۲ میلی‌متر، برای باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا و شیگلا دیسانتری برابر ۱۳ میلی‌متر، برای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ۱۵ میلی‌متر و برای باکتری اشرشیاکلی برابر ۱۸ میلی‌متر در مواجهه با تخم بوقلمون به‌دست آمد. در مواجهه با تخم غاز قطر هاله عدم رشد برای باکتری‌های باسیلوس سوبتلیس و سودوموناس آئروژینوزا برابر ۱۰ میلی‌متر و برای باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و کلبسیلا اکسیتوکا به ترتیب برابر ۹ و ۸ میلی‌متر به‌دست آمد (جدول ۳ و تصویر ۲).

جدول ۳. نتایج قطر هاله عدم رشد سفیده تخم‌مرغ طبیعی، مصنوعی، بوقلمون و غاز بر روی باکتری‌های مورد مطالعه بر حسب میلی‌متر

قطر هاله عدم رشد	اشرشیاکلی	باسیلوس سوبتلیس	سودوموناس آئروژینوزا	استافیلوکوکوس اورئوس	کلبسیلا اکسی‌توکا	سالمونلا تیفی‌موریوم	شیگلا دیسانتری
تخم‌مرغ طبیعی	۱۰	-	-	-	-	-	-
تخم‌مرغ مصنوعی	۱۰	-	۱۲	-	۱۱	-	-
تخم بوقلمون	۱۸	۱۲	۱۳	۱۵	۱۲	۱۲	۱۳
تخم غاز	-	۱۰	۱۰	۹	۸	-	-



تصویر ۲. نمونه‌ای از تصاویر قطر هاله عدم رشد باکتری‌ها در مواجهه با تخم بوقلمون.

۵. بحث

از نتایج حاصل از آزمایشات MIC می‌توان نتیجه گرفت که سفیده تخم‌مرغ طبیعی روی همه باکتری‌های مورد مطالعه به جز کلبسیلا اکسیتوکا اثر ضدباکتریایی مناسبی دارد. حساس‌ترین باکتری در برابر سفیده تخم‌مرغ طبیعی شیگلا دیسانتری می‌باشد. به‌طوری که MIC سفیده تخم‌مرغ طبیعی برای باکتری شیگلا دیسانتری در رقت ۶/۲۵ درصد به‌دست آمد و روی باکتری کلبسیلا اکسیتوکا خاصیت ضدباکتریایی نشان نداد. با مقایسه مقاومت دو باکتری گرم مثبت مورد مطالعه در برابر سفیده تخم‌مرغ طبیعی نشان داده شد که مقاومت باسیلوس سوبتلیس بیشتر از استافیلوکوکوس اورئوس بود. به‌طوری‌که رقت ۵۰ درصد از سفیده تخم‌مرغ طبیعی روی باسیلوس سوبتلیس اثر بازدارندگی داشت اما این اثر روی استافیلوکوکوس اورئوس در رقت ۲۵ درصد به‌دست آمد. خاصیت ضدباکتریایی سفیده تخم‌مرغ مصنوعی بر روی باکتری‌های مورد مطالعه نسبتا کمتر بود و به جز باکتری‌های شیگلا دیسانتری (در رقت ۵۰ درصد سفیده) و سالمونلا تیفی موریوم (در رقت ۲۵ درصد سفیده) بر روی بقیه باکتری‌ها خاصیت ضدباکتریایی نشان نداد. پس می‌توان نتیجه گرفت که حساس‌ترین باکتری در بین باکتری‌های مورد مطالعه در برابر سفیده تخم‌مرغ مصنوعی سالمونلا تیفیموریوم بود. همچنین باکتری‌های گرم مثبت نسبت به گرم منفی مقاوم‌تر بودند.

حداقل غلظت بازدارندگی سفیده تخم بوقلمون برای باکتری‌های اشرشیاکلی و سالمونلا تیفیموریوم در رقت ۵۰ درصد و برای باکتری شیگلا دیسانتری در رقت ۶/۲۵ درصد به‌دست آمد و بر روی بقیه باکتری‌ها تاثیر ضدباکتریایی نداشت. به‌عبارتی دیگر حساس‌ترین باکتری در مقابل سفیده تخم بوقلمون باکتری شیگلا دیسانتری است. بنابرین می‌توان نتیجه گرفت باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی مقاوم‌تر بودند.

در مورد سفیده‌ی تخم غاز می‌توان گفت که باکتری سودوموناس آئروژینوزا حساس‌ترین باکتری در مقابل این ماده بود به‌طوری‌که MIC آن در رقت ۲۵ درصد به‌دست آمد. همچنین MIC سفیده‌ی تخم غاز برای هر دو باکتری‌های گرم مثبت مورد مطالعه یعنی استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سوبتلیس در رقت ۵۰ درصد به‌دست آمد. سفیده‌ی تخم غاز بر روی بقیه باکتری‌های مورد بررسی خاصیت ضدباکتریایی نشان نداد. بنابراین می‌توان گفت که باکتری‌های گرم منفی نسبت به گرم مثبت‌ها در برابر سفیده‌ی تخم غاز مقاومت بیشتری داشتند. نتایج حاصل از MBC نشان می‌دهد که فقط سفیده‌ی تخم‌مرغ طبیعی بر روی شیگلا دیسانتری در رقت ۵۰ درصد اثر کشندگی داشت و بقیه باکتری‌ها در همه چاهک‌ها رشد کرده بودند. همچنین سفیده‌های دیگر بر روی بقیه‌ی باکتری‌ها اثر کشندگی نداشتند. به‌طور کلی می‌توان نتیجه گرفت سفیده‌ی تخم طبیعی اثرات ضدباکتریایی بیشتری نسبت به بقیه سفیده‌ها دارد. این موضوع نشان می‌دهد که مواد موثرهای که دارای اثرات ضد باکتریایی هستند، در سفیده‌ی تخم‌مرغ‌های طبیعی نسبت به بقیه سفیده‌ها بیشتر وجود دارند. از جمله این مواد می‌توانند آنزیم‌های لیزوزیم

و دیفنسین باشد که معمولا بر روی غشای باکتری‌ها تاثیر می‌گذارند، برخی دیگر مثل اووستاتین، سیستاتین و اووآلبومین که مانع از دسترسی باکتری‌ها به مواد مغذی برای رشد می‌شوند. ماده دیگری که تخم‌گذاری اثر ضدباکتریایی داشته باشد اووترانسفرین است که یک کلات‌کننده‌ی فلزی بوده و با اتصال به آهن باعث کاهش آهن مصرفی برای باکتری می‌شود. همچنین با اثر روی غشا، نفوذپذیری آن را مختل کرده و در نتیجه کنترل ورود و خروج مواد از غشا را از بین برده و باکتری را از بین می‌برد. خواص ضدباکتریایی نانو دندریمر پلی‌آمید و آمین نسل پنجم بر روی باکتری‌های باسیلوس سوبتیلیس، سالمونلا تیفی، شیگلا دیسانتری و اشریشیاکلی در محیط آبی توسط نظری و همکاران در سال ۱۳۹۵ مورد بررسی قرار گرفت و نتایج مطالعه نشان داد که نانو دندریمر پلی‌آمید و امین نسل پنجم قادر به حذف باسیلوس سوبتیلیس، سالمونلا تیفی موریوم، اشرشیاکلای و شیگلا دیسانتری از محلول آبی است (۲۴). اثربخشی میکرو فیلتراسیون با جریان متقاطع برای حذف میکروارگانیسم‌های مرتبط با سفیده‌ی تخم‌مرغ مایع که توسط Mukhopadhyay و همکاران در سال ۲۰۰۹ انجام شد، مثبت بود و راندمان حذف میکروبی حداقل 5log(10) CFU/mL بود (۲۵). نتایج مطالعه‌ای که توسط Park و همکاران در سال ۲۰۱۳ انجام گردید نشان داد که نانوالیاف کیتوزان (CS) تثبیت‌شده با لیزوزیم سفیده‌ی تخم‌مرغ -CLEA (دانه‌های آنزیمی متقاطع) تخم‌گذاری به عنوان یک ماده‌ی امیدوارکننده برای کارهای ضدباکتریایی استفاده شود (۲۶).

در مطالعه‌ی حاضر آزمایشات قطر هاله‌ی عدم رشد بر روی باکتری‌ها انجام شد که بیشترین قطر هاله‌ی عدم رشد مربوط به باکتری اشرشیاکلی در مواجهه با سفیده تخم بوقلمون به‌دست آمد به‌طوری که تا فاصله ۶ میلی‌متری از لبه‌ی دیسک کاغذی آغشته به سفیده تخم بو قلمون رشدی مشاهده نشد و با در نظر گرفتن ۶ میلی‌متر قطر دیسک، اندازه قطر هاله‌ی عدم رشد برای باکتری اشرشیاکلی برابر ۱۸ میلی‌متر به‌دست آمد. کمترین قطر هاله مربوط به باکتری کلبسلا اکسیتوکا در مواجهه با سفیده‌ی تخم غاز بود که تا فاصله یک میلی‌متری از لبه دیسک کاغذی آغشته به سفیده‌ی تخم غاز رشد نکرده بود که با در نظرگرفتن ۶ میلی‌متر قطر کاغذ، اندازه قطر هاله عدم رشد برابر ۸ میلی‌متر به‌دست آمد. مقایسه‌ی قطر هاله‌ی عدم رشد دو باکتری گرم مثبت مورد مطالعه نشان داد که باکتری استافیلوکوکوس اورئوس با قطر ۱۵ میلی‌متر نسبت به باسیلوس سوبتلیس با قطر ۱۲ میلی‌متر مقاومت کمتری در برابر سفیده‌ی تخم بوقلمون دارد اما این مقاومت در برابر سفیده‌ی تخم غاز برعکس سفیده‌ی تخم بوقلمون به‌دست آمد. به‌طوری که باسیلوس سوبتلیس با قطر هاله‌ی ۱۰ میلی‌متر نسبت به استافیلوکوکوس اورئوس با قطر هاله‌ی ۹ میلی‌متر مقاومت کمتری داشت. اثبات فعالیت ضدباکتریایی سفیده‌ی تخم‌مرغ طبیعی، مصنوعی، بوقلمون و غاز بر روی باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت، این امیدواری را ایجاد نمود تا بتوان این ماده یا ترکیبات آن را به عنوان یک عامل ضد باکتریایی مناسب با عوارض جانبی احتمالی کمتر مدنظر قرار داده و با انجام تحقیقات بیشتر به عنوان جایگزینی برای عامل‌های ضدباکتریایی دارای عوارض قابل توجه، مورد استفاده قرار داد. 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، از جمله موارد اصلی برای نیل به این هدف خواهد بود.

تشکر و قدردانی:

بدین‌وسیله از همکاری صمیمانه معاونت تحقیقات و فناوری و کمیته تحقیقات دانشجویی در تامین هزینه‌های آن تقدیر و تشکر می‌گردد. همچنین از کارشناس محترم آزمایشگاه دانشکده علوم پزشکی خلخال تشکر و قدردانی می‌گردد.

مشارکت نویسندگان:

ش. ن.: تحقیق، تامین مالی؛ ح. م.: نگارش مقاله، مرور و ویرایش؛ ش. ع.: مرور، ویرایش و ناظر پروژه؛ ه. ب.: تحقیق؛ ا. ن.: روش‌شناسی؛ گ. م. ت. ت.: مرور و ویرایش.

تضاد منافع:

نویسندگان اظهار داشتند که فاقد هرگونه تضاد منافع هستند.

کد اخلاق:

IR.KHALUMS.REC.1401.013

حمایت مالی/معنوی:

این مطالعه توسط دپارتمان محیط زیست و مهندسی بهداشت دانشگاه علوم پزشکی خلخال حمایت شده است.

References

1. Nyachuba DG. Foodborne illness: is it on the rise? Nutr Rev. 2010;68(5):257-69. [PubMed ID:20500787]. https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2010.00286.x.
2. Pakbin B, Amani Z, Allahyari S, Mousavi S, Mahmoudi R, Bruck WM, et al. Genetic diversity and antibiotic resistance of Shigella spp. isolates from food products. Food Sci Nutr. 2021;9(11):6362-71. [PubMed ID:34760266]. [PubMed Central ID:8565218]. https://doi.org/10.1002/fsn3.2603.
3. Kotloff KL, Riddle MS, Platts-Mills JA, Pavlinac P, Zaidi AKM. Shigellosis. Lancet. 2018;391(10122):801-12. [PubMed ID:29254859]. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)33296-8.
4. 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;26(26):3291-6. [PubMed ID:18468742]. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.03.079.
5. 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. Antimicrob Agents Chemother. 2020;64(12). [PubMed ID:33020158]. [PubMed Central ID:7674062]. https://doi.org/10.1128/AAC.01518-20.
6. Romo-Barrera CM, Castrillon-Rivera LE, Palma-Ramos A, Castaneda-Sanchez JI, Luna-Herrera J. Bacillus licheniformis and Bacillus subtilis, Probiotics That Induce the Formation of Macrophage Extracellular Traps. Microorganisms. 2021;9(10). [PubMed ID:34683348]. [PubMed Central ID:8540962]. https://doi.org/10.3390/microorganisms9102027.
7. Murray PR, Rosenthal K, Pfaller MA. Medical Microbiology E-Book. Philadelphia: Elsevier Health Sciences; 2020.
8. Romanenko YO, Riabko AK, Marin MA, Kartseva AS, Silkina MV, Shemyakin IG, et al. Mechanism of Action of Monoclonal Antibodies That Block the Activity of the Lethal Toxin of Bacillus Anthracis. Acta Naturae. 2021;13(4):98-104. [PubMed ID:35127153]. [PubMed Central ID:8807536]. https://doi.org/10.32607/actanaturae.11387.
9. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Emerg Infect Dis. 2011;17(10):1791-8. [PubMed ID:22000347]. [PubMed Central ID:3310682]. https://doi.org/10.3201/eid1710.110655.
10. Edwards PR, Ewing WH. Identification of Enterobacteriaceae. Burgess Publishing Company; 1962.
11. Herridge WP, Shibu P, O'Shea J, Brook TC, Hoyles L. Bacteriophages of Klebsiella spp., their diversity and potential therapeutic uses. PeerJ Preprints. 2019;7:e27890v1. https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.27890v1.
12. 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. Sci Total Environ. 2022;804:150024. [PubMed ID:34517318]. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150024.
13. 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;10(4). [PubMed ID:33920211]. [PubMed Central ID:8070150]. https://doi.org/10.3390/foods10040823.
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 Poult Sci J. 2013;69(Suppl):1-15.
15. Abdel-Shafi S, Osman A, Enan G, El-Nemer M, Sitohy M. Antibacterial activity of methylated egg white proteins against pathogenic G(+) and G(-) bacteria matching antibiotics. Springerplus. 2016;5(1):983. [PubMed ID:27429892]. [PubMed Central ID:4932028]. https://doi.org/10.1186/s40064-016-2625-3.
16. Carrillo W, Garcia-Ruiz A, Recio I, Moreno-Arribas MV. Antibacterial activity of hen egg white lysozyme modified by heat and enzymatic treatments against oenological lactic acid bacteria and acetic acid bacteria. J Food Prot. 2014;77(10):1732-9. [PubMed ID:25285490]. https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-009.
17. Ma B, Guo Y, Fu X, Jin Y. Identification and antimicrobial mechanisms of a novel peptide derived from egg white ovotransferrin hydrolysates. LWT. 2020;131:109720. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109720.
18. Wesierska E, Saleh Y, Trziszka T, Kopec W, Siewinski M, Korzekwa K. Antimicrobial activity of chicken egg white cystatin. World J Microbiol Biotechnol. 2005;21(1):59-64. https://doi.org/10.1007/s11274-004-1932-y.
19. Tan JC, Tang HY, Xu QL, Zheng YM, Su DX, He S, et al. The formation of egg white polypeptide-selenium complex particles: mechanism, stability and functional properties. Int J Food Sci Technol. 2022;57(9):6155-64. https://doi.org/10.1111/ijfs.15976.
20. 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. Sep Purif Technol. 2016;161:44-52. https://doi.org/10.1016/j.seppur.2016.01.032.
21. 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. 2013;9(1):85-93. [PubMed ID:22470054]. https://doi.org/10.1016/j.nano.2012.03.006.
22. Salimpour Abkenar S, Mohammad Ali Malek R. Preparation, characterization, and antimicrobial property of cotton cellulose fabric grafted with poly (propylene imine) dendrimer. Cellulose. 2012;19(5):1701-14. https://doi.org/10.1007/s10570-012-9744-y.
23. Gholami M, Mohammadi R, Arzanlou M, Akbari Dour-

bash F, Kouhsari E, Majidi G, et al. In vitro antibacterial activity of poly (amidoamine)-G7 dendrimer. BMC Infect Dis. 2017;17(1):395. [PubMed ID:28583153]. [PubMed Central ID:5460590]. https://doi.org/10.1186/s12879-017-2513-7.

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 J Med Sci. 2016;23(150):46-56. Persian.
25. Mukhopadhyay S, Tomasula PM, Van Hekken D, Luchansky JB, Call JE, Porto-Fett A. Effectiveness of cross-flow microfiltration for removal of microorganisms associated with unpasteurized liquid egg white from process plant. J Food Sci. 2009;74(6):M319-27. [PubMed ID:19723218]. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01228.x.
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. Int J Biol Macromol. 2013;54:37-43. [PubMed ID:23201775]. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.11.025.

doi: 10.69107/koomesh-149775 Volume 26, Issue 3, May 2024

Research Article

Investigating the Antibacterial Effect of Goose, Turkey, Natural and Artificial Chickens Egg White on Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria In Vitro

Shiva Alipour [1], Heydar Mousavi [1], Hajar Badri [2], Esmail Najafi [3], Golchin Mousavi Tekantapeh [4], Shahram Nazari [2, *]

[1] *Student Research Committee, Khalkhal University of Medical Sciences, Khalkhal, Iran*

[2] *Department of Environmental Health Engineering, Khalkhal University of Medical Sciences, Khalkhal, Iran*

[3] *Department of Public Health, Khalkhal University of Medical Sciences, Khalkhal, Iran*

[4] *Department of Environmental Health Engineering, School of Public Health, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran*

**Corresponding Author:* Department of Environmental Health Engineering, Khalkhal University of Medical Sciences, Khalkhal, Iran. Email: shahramnazari73@yahoo.com.

Received 10/9/2023; Accepted 6/1/2024

Abstract

Background: : Foodborne pathogens (including bacteria, viruses, and parasites) are a major public health concern worldwide. One of the substances that has a high antimicrobial effect is egg white.

Objectives: The aim of the present study is to the examine antibacterial effects of egg whites of some birds on gram-negative and gram-positive bacteria in vitro.

Methods: In this study, by using the micro-broth dilution and zone of inhibition method were tested the antibacterial effects of egg white of some birds on gram-negative and gram-positive bacteria. Minimum inhibitory concentration (MIC) minimum bactericidal concentration (MBC) and zone of inhibition against gram-negative and gram-positive bacteria were examined according to clinical and laboratory standards Institute (CLSI).

Results: The MIC of natural and turkey egg whites were in the dilutions of %50 - 6.25 and artificial eggs and goose were in the dilutions of %50 - 25 for the studied bacteria. Also, the MBC of the white of natural, artificial, turkey, and goose egg whites was obtained in the dilution of %50 for some of the studied bacteria. The zone of inhibition was found in the range of 18 - 8 mm for the studied bacteria.

Conclusion: : The results of the present study show that goose, turkey, natural, and artificial chicken egg whites are effective in the removal of gram-negative and positive bacteria. Meanwhile, natural egg whites had a greater antibacterial effect than other whites on the studied bacteria.

Keywords: Anti-bacterial Agents, Egg White, Gram-Positive Bacteria, Gram-Negative Bacteria

Copyright © 2024, Alipour et al. This open-access article is available under the Creative Commons Attribution 4.0 (CC BY 4.0) International License (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which allows for unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided that the original work is properly cited.