مجله میکرب شناسی پزشکی ایران
سال ۴ شماره ۴، زمستان۱۳۸۹، صفحات ۵۸ -۵۱

بررسی آزمایشگاهی تاثیرات ضد باکتریایی اسیدهای چرب و منوگلیسریدهای آن‌ها بر سویه O157:H7 *اشریشیا کلی*

حسین تاجیک[۱] * ، فرنود شکوهی ثابت جلالی[۲]

۱. گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذائی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه
۲. گروه علوم بالینی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه
نویسنده رابط: حسین تاجیک ، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذائی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه
همراه : ۰۹۱۴۱۴۵۳۲۸۷ Tajik_h@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۸۹/۲/۲۰ تاریخ پذیرش :۸۹/۱۱/۲۰

چکیده :

زمینه و اهداف: اسیدهای چرب و مشتقات آن‌ها ترکیباتی هستند که به‌فراوانی در فرآوردهای طبیعی گیاهی و دامی یافت می‌شوند. هدف از انجام این مطالعه تعیین اثرات مهاری اسیدهای چرب (اسیدلوریک، اسیدکاپریک، اسید پالمیتولئیک، اسید اولئیک) و منوگلیسریدهای آن‌ها (منولورین، منوکاپرین، منوپالمیتولئین، منولئین) بر سویه O157 :H7 *اشریشیا کلی* بود.

روش بررسی: به‌منظور ارزیابی اثرات ضد باکتریایی، از روش رقیق‌سازی در محیط مایع (Broth dilution) به‌روش میکرو استفاده گردید. به‌محیط کشت، همراه با باکتری، میزان لازم از هر یک از اسیدهای چرب و منوگلیسرید آنها اضافه شد تا غلظت نهایی آنها در داخل محیط کشت، ۰/۱۶، ۰/۳۱، ۰/۶۳، ۱/۲۵ و ۲/۵ میلی‌مول گردد. سپس نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. نمونه‌های حاوی باکتری و بدون اسیدهای چرب و منوگلیسیریدها به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شد. برای پردازش داده‌ها از نرم‌افزار SPSS (version 11.0.01) و برای تجزیه و تحلیل نتایج از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه ANOVA استفاده شد.

یافته‌ها: اسید کاپریک و منوگلیسرید آن نسبت به‌سایر اسیدهای چرب مورد آزمایش به‌طور معنی‌دار اثرات ضد باکتریایی بیشتری بر روی سویه O157 :H7 نشان دادند ($P<0.05$). همچنین اسید کاپریک در غلظت ۰/۶۳ میلی‌مول و بیشتر قدرت ضد باکتریایی قابل ملاحظه‌ای داشت.

نتیجه‌گیری: اسیدهای چرب و منوگلیسیریدهای آنها، به‌ویژه اسید کاپریک و منوگلیسرید آن بر سویه O157 :H7 اثر ضد باکتریایی دارند. این تاثیر با افزایش غلظت اسید کاپریک بیشتر است.

کلید واژه‌ها: اسیدهای چرب، منوگلیسریدها، ضدباکتریایی، *اشریشیا کلی*، O157 :H7

مقدمه:

بیماری‌های منتقله از غذا، یکی از معضلات بهداشتی در کشورهای در حال توسعه و توسعه یافته محسوب می‌شوند(۱). در بین آلودگی‌های باکتریایی که از طریق مصرف فرآورده‌های گوشتی منتقل می‌شوند آلودگی به‌سویه O157:H7 *اشریشیا کلی* از اهمیت قابل ملاحظه‌ای برخوردار است. باکتری مذکور یکی از باکتری‌های بیماریزای شناخته شده‌ای است که مسئول بروز یکسری بیماری در انسان و دام می‌باشد. بیماری‌هایی نظیر کولیت هموراژیک (Hemorahagic colitis)، سندرم یورمی همولیتیک (Hemolytic uremic syndrome) و عارضه آن پورپورای ترومبوسیتوپنیک ترومبوتیک (Thrombotic thrombocytopenic purpura)، از جمله مهم‌ترین بیماری‌هایی هستند که باکتری مذکور مسبب بروز آنها است که برخی از آنها در موارد شدید می‌توانند به‌مرگ مبتلایان منجر شوند(۲). از جمله مخازن شناخته شده این باکتری، دام‌های اهلی به‌ویژه گاوها می‌باشند. مهمترین راه انتقال این باکتری به‌بیماران مصرف گوشت و شیر خام گاو است که از عوامل اصلی بروز همه‌گیری‌های بیماری‌های ناشی از سویه O157:H7 بوده است (۴،۳). با این حال، گزارشاتی از بروز آلودگی در اثر مصرف سایر فرآورده‌های غذائی نیز وجود دارد (۵،۶). در این بین فرآورده‌های غذائی تهیه شده از گوشت طیور از اهمیت بسزائی برخوردارند و گزارشات چندی از آلودگی کشتارگاه‌های طیور به‌باکتری مذکور وجود دارد (۸،۷). تا کنون تلاش‌های زیادی در کشتارگاه‌های طیور برای کاهش آلودگی در لاشه طیور با استفاده از مواد گوناگون آنتی‌باکتریال صورت پذیرفته است که نتایج متفاوتی را به‌دنبال داشته است (۱۰،۹). علی‌رغم این تلاش‌ها، هنوز هم آلودگی گوشت خام طیور و فرآورده‌های مرتبط با آن سبب بروز مشکلات جدی بهداشتی در بسیاری از کشورها می‌گردند. یکی از روش‌های پیش‌گیری از بروز مسمویت‌های غذائی و افزایش طول مدت نگهداری مواد غذائی استفاده از ترکیبات شیمیائی نگهدارنده در فرآورده‌های غذائی است. متاسفانه به‌دلیل بروز عوارض جانبی و ماهیت غیر مغذی بسیاری از این ترکیبات شیمیائی، استفاده از آنها با محدودیت‌ها و ممنوعیت‌های متعددی از نظر بهداشتی مواجه است. استفاده از لیپیدها و مشتقات منوگلیسریدی آنها یکی از راه‌های ایده‌آل حل چنین معضلی است. تحقیقات نشان داده است که ترکیبات مذکور در عین داشتن ماهیت طبیعی و مغذی، دارای قدرت مهاری بر روی طیف وسیعی از باکتری‌ها می‌باشند (۱۲،۱۱). در این طیف، باکتری‌هایی نظیر *کامپیلوباکتر ژژونی*، *سالمونلا تیفی‌موریوم*، *لیستریا منوسیتوژنز*، *کلامیدیا تراکوماتیس*، *نیسریا گنوره*، هلیکوباکتر پیلوری، *استافیلوکوکوس اورئوس*، استرپتوکک-های گروه A و B قرار دارند (۱۶،۱–۱۳). با وجود آنکه، بیشتر گونه‌های میکربی اعم از باکتری‌های گرم مثبت و منفی در مقابل لیپیدها و مشتقات منوگلیسریدی آنها آزمایش شده‌اند، با این حال هنوز برخی میکروارگانیسم-های پاتوژن که نقش بسزائی به‌ویژه در بروز آلودگی با منشاء غذائی دارند، در این زمینه مغفول مانده‌اند. سویه O157:H7 از جمله چنین میکروارگانیسم‌هایی است. با توجه به‌نقش باکتری فوق‌الاشاره در آلودگی فرآورده‌های غذائی با منشاء دام و طیور، مطالعه حاضر به‌تعیین تاثیرات مهاری برخی اسیدهای چرب و منوگلیسرید آنها بر روی باکتری مذکور پرداخت.

مواد و روش‌ها:

چربی‌ها

تمام اسیدهای چرب و منوگلیسریدهای مورد استفاده در این مطالعه (اسید لوریک Lauric acid، منولورین Monolaurin، اسید کاپریک Capric acid، منوکاپرین Monocaprin، اسید پالمیتولئیک Palmitoleic acid، منوپالمیتولئین Monopalmitolein، اسید اولئیک Oleic acid و منواولئین Monoolein) از شرکت سیگما (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) تهیه شدند.

باکتری مورد مطالعه

باکتری مورد استفاده در این مطالعه، *Escherichia coli O157:H7* از گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذائی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران تهیه شد. تهیه کشت میکربی با انتقال باکتری لیوفلیزه به‌محیط مایع BHI (Brain Heart Infusion broth) (Merck , KGaA , Darmastead , Germany) انجام شد. کشت مذکور در گرمخانه به‌مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. واکشت (تجدید کشت) برای حداقل دو بار متوالی انجام شد. کشت نهایی برای ادامه مطالعه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا هنگام آزمایش نگهداری شد (۱۷، ۱۸).

تهیه کشت باکتریای

از کشت نهایی باکتری، به‌محیط مایع BHI منتقل شد و به‌مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شد. واکشت حداقل دوبار متوالی تکرار شد. در ادامه از کشت مذکور به لوله‌های کووت (Cuvett) حاوی ۵ میلی لیتر محیط مایع BHI منتقل گردید. با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر Spectrophotometr (Pharmacia LKB-Nova Spacell, USA) در طول موج ۶۰۰ نانومتر، جذب نوری لوله‌های مذکور خوانده شد. همزمان با این کار، نمونه‌برداری از محتویات لوله‌ها صورت گرفت و شمارش باکتریایی به‌روش پورپلیت (pour plate) انجام شد. در انتها لوله‌ای که حاوی $CFU\ ml^{-1}$ ۱×۱۰^۸ بود، مشخص می‌گردید. بنابر این، در هر بار انجام آزمایش از رقت‌های جذب نوری معادل $CFU\ ml^{-1}$ ۱×۱۰^۸ استفاده شد. این رقت بعد با شمارش باکتری به‌روش پورپلیت تائید می‌شد.

ارزیابی فعالیت ضد میکربی

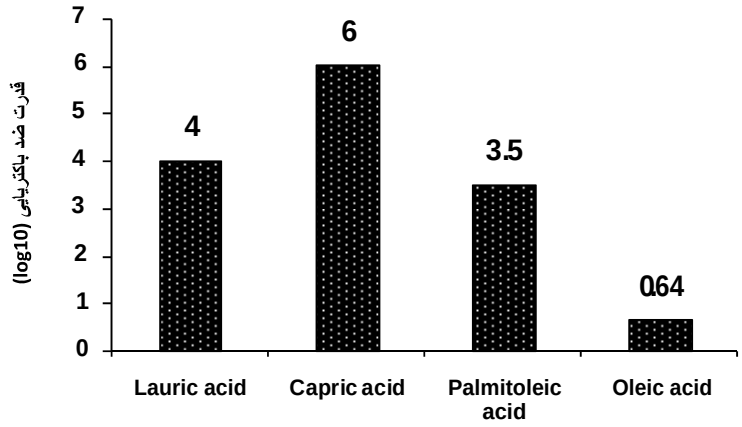
روش ارزیابی توان ضد باکتریایی چربی‌های مورد آزمایش به این ترتیب بود: ابتدا اسیدهای چرب و منوگلیسریدهای آنها به‌محیط کشت مایع BHI اضافه شد، و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بهم زده می‌شد تا امولسیونی با پراکنش یکنواخت از چربی و محیط کشت فراهم گردد. در ادامه میزان ۲۰۰ میکرولیتر از محلول چربی‌ها با غلظت ۲/۵ میلی‌مول و ۲۰۰ میکرولیتر از کشت سویه O157:H7 با غلظت ۱×۱۰^۸ باکتری در هر میلی‌لیتر به‌محیط کشت BHI اضافه می‌گردید. محلول کشت باکتریایی و محیط کشت BHI براث (بدون چربی‌ها) به‌عنوان شاهد مثبت و محیط مایع BHI (بدون باکتری و چربی‌ها) به‌عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شدند. کلیه محلول‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق نگهداری شدند تا تاثیرات مهاری اسیدهای چرب و منوگلیسریدهای آنها بر روی محلول‌های نهایی به‌خوبی صورت گیرد. سپس نمونه‌های مورد آزمایش در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. پس از انتقال و کشت در محیط BHI آگار، در نهایت تعداد کلنی‌های باکتریایی رشد کرده سنجش می‌گردید. در هر مورد سه مرتبه مجزا ارزیابی تکرار شد. اختلاف تیتر مخلوط‌های مورد آزمایش (محلول باکتری، چربی و محیط کشت) ($\log_{10}$ CFU) و تیتر مخلوط شاهد مثبت (محلول باکتری و محیط کشت) ($\log_{10}$ CFU) نشان دهنده میزان فعالیت آنتی‌باکتریایی چربی‌های مورد آزمایش بود.

در ادامه اسید چربی که بیشترین قدرت مهاری را بر باکتری داشت انتخاب شد. برای آنکه میزان پتانسیل ضد باکتریایی آن بر باکتری مورد آزمایش در غلظت‌های کمتر مشخص گردد، با استفاده از روش پیش گفته تاثیرات ضد باکتریایی آن در غلظت‌های (۲/۵، ۱/۲۵، ۰/۶۳، ۰/۳۱ و ۰/۱۶ mM) مورد سنجش قرار می‌گرفت.

برای پردازش داده‌ها از نرم‌افزار (version 11.0.01) SPSS و برای تجزیه و تحلیل نتایج از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه ANOVA استفاده شد.

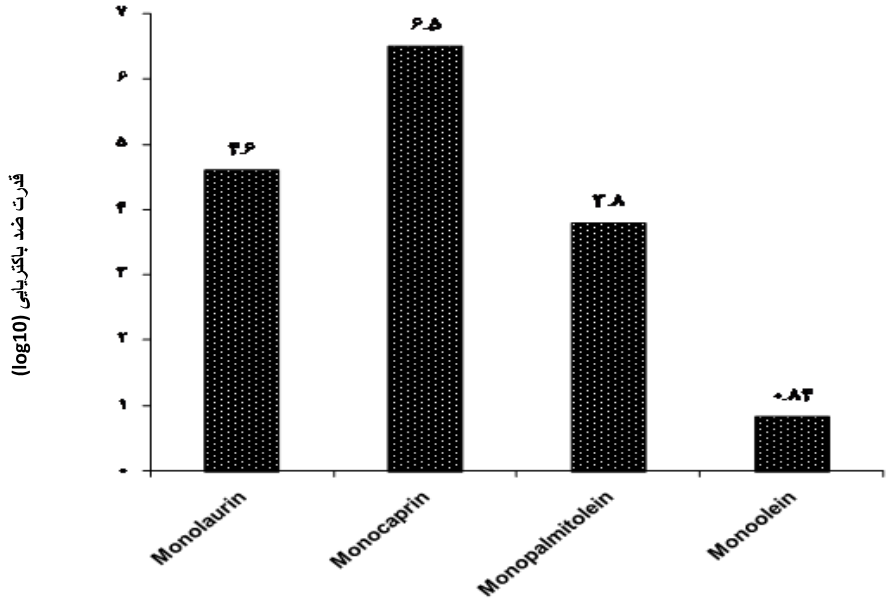
یافته‌ها:

یافته‌های حاصل از مقایسه فعالیت ضد باکتری اسیدهای چرب مورد آزمایش بر سویه O157:H7 در نمودار شماره ۱ نشان داده شده است. در بین اسیدهای چرب مورد مطالعه، اسید کاپریک دارای بیشترین قدرت ضدباکتریایی بود و سپس به‌ترتیب اسید لوریک، اسید پالموتیک و اسید اولیک قرار داشت.

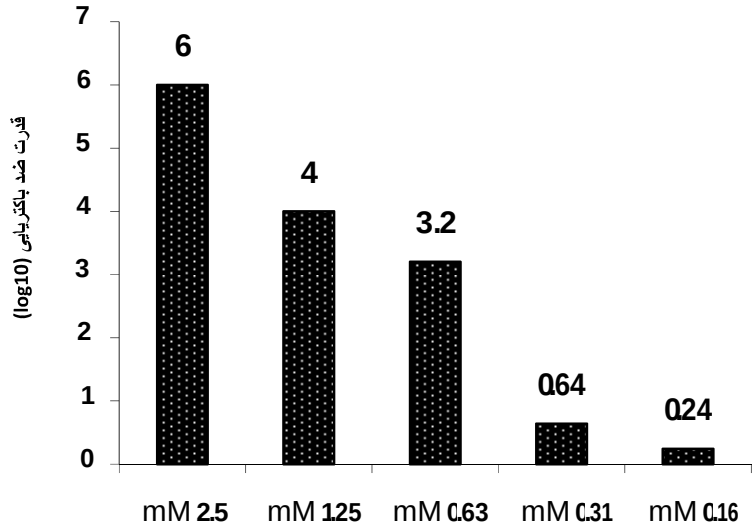


نمودار ۱: مقایسه پتانسیل ضد باکتریایی اسیدهای چرب بر سویه O157:H7 *اشریشیاکلی*

منوکاپرین (منوگلیسرید اسید کاپریک) دارای بیشترین (۶/۵ $\log_{10}$ CFU) و منواولئین (منوگلیسرید اسید اولئیک) دارای کمترین (۰/۸۴ $\log_{10}$ CFU) تاثیرات مهاری بر رشد باکتری بوده است (نمودار ۲). در عین حال یافته‌ها بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار آماری بین تاثیرات ضدباکتریایی غلظت‌های مختلف اسید کاپریک به‌عنوان اسید چرب دارنده بایشترین پتانسیل ممانعتی بر روند رشد سویه O157:H7 بود (نمودار۳) ($p<0.05$). این نمودار همچنین نشان‌دهنده آنست که اسید کاپریک در غلظت ۰/۶۳ میلی‌مول و بالاتر از آن دارای خاصیت ضد باکتریایی بر روی باکتری مذکور بوده است.



نمودار ۲: مقایسه پتانسیل ضد باکتریایی منوگلیسرید اسیدهای چرب بر سویه O157:H7 *اشریشیاکلی*



نمودار۳ : مقایسه تاثیر ضد باکتریایی غلظت‌های مختلف اسید کاپریک بر سویه O157:H7 *اشریشیاکلی*

بحث:

یافته‌ها نشان داد اسیدهای چرب و منوگلسیریدهای آنها بر سویه O157:H7 *اشریشیاکلی* تاثیر ضد باکتریایی دارند. بر اساس نتایج به‌دست آمده، اختلاف معنی‌داری بین اسیدهای چرب مورد آزمایش از منظر اثر کاهندگی بر رشد سویه O157:H7 وجود دارد ($p<0.05$). در بین این اسیدهای چرب، اسید کاپریک بیشترین (۶ $\log_{10}$ CFU) و اسید اولئیک کمترین (۰/۶۴ $\log_{10}$ CFU) تاثیر ممانعتی را بر رشد باکتری مورد اشاره نشان داده‌اند. مقایسه پتانسیل ضد باکتریایی منوگلسیریدهای اسیدهای چرب نشان دهنده آنست که ترتیب قدرت مهاری آنها از همان الگوی پتانسیل ضدباکتریایی اسیدهای چرب تبعیت می‌نماید.

نتایج مطالعه حاضر با گزارشات موجود در زمینه تاثیرات ضد باکتریایی چربی‌ها موافقت دارد. تحقیقات موجود نشان دهنده آنست که در بین اسیدهای چرب و مشتقات آنها دو اسید چرب اسید لوریک و اسید کاپریک و منوگلیسریدهای آنها بیشترین قدرت مهاری بر ضد طیف گوناگونی از باکتری‌ها و ویروس‌ها دارند (۲۰،۱۹). اگرچه مکانیسم و سازوکار فعالیت ضد باکتریایی اسیدهای چرب و مشتقات آنها هنوز به‌خوبی شناخته نشده است ولی اعتقاد بر آنست که ماهیت عملکرد تاثیرات ضد میکربی آنها به‌قدرت نفوذ و از هم‌گسیختگی غشائی و ایجاد تغییرات مهلک در غشاء سیتوپلاسمی باکتری باز می‌گردد، و از این طریق سبب اختلال در سیستم‌های هدایتی وابسته به‌غشاء می‌گردند (۲۳-۲۰). با بروز اختلال در این سیستم هدایت غشائی (روند ارتباط هدفمند بین دو غشاء سلولی)، در تولید پروتئین‌های خارجی اشکالات جدی ایجاد می‌شود. این امر به نوبه خود منجر به‌اختلال در تولید زهرابه‌های خارجی باکتریایی می‌شود. این سازوکار سبب کاستن از حدت و شدت بروز بیماری توسط باکتری‌های بیماریزا می‌گردد(۲۵،۲۴). از دیگر تاثیرات اسیدهای چرب و منوگلیسریدهای آنها بر غشاء سلولی مهار القاء مقاومت به وانکومایسین Vancomycin در انتروکوکسی است. این امر سبب آسیب‌پذیری بیشتر و کاهش مقاومت آنها در برابر ترکیبات ضد میکربی می‌گردد(۲۵). تحقیقات نشان داده‌اند که دو دسیل گلیسرول Dodecylglycerol (متناظر اتری منولورین) با فعال نمودن نوعی آنزیم پروتئولیتیک تحت عنوان اتولیزین (Autolysin) سبب فعال کردن روند خودتخریبی دیواره سلولی در *انتروکوکوس فاسیوم* (*Enterococcus faecium*) می‌شود. همچنین باعث مهار بیوسنتز اسید گلیسرولیپید و لیپوتیکوئیک در *استرپتوکوکوس موتانتس* *Streptococci mutanse* می‌گردد (۲۹-۲۶). با عنایت به این نکته که

بیشترین تاثیرات ضد میکربی اسیدهای چرب و منوگلیسریدهای آنها بر روی دیواره غشائی باکتری‌ها می‌باشد، برای تقویت و گسترش طیف ضدباکتریایی آنها از برخی تمهیدات استفاده می‌شود که اکثر آنها سبب افزایش نفوذ پذیری غشاء سلولی نسبت به اسیدهای چرب و مشتقات آنها می‌گردند. برای این منظور از مواردی نظیر: افزایش درجه حرارت، فریز نمودن، استفاده از ترکیبات اسید کننده و مواد شلاته کننده می‌توان نام برد (۳۴-۳۰).

نتیجه‌گیری:

با توجه به نتایج این مطالعه و سایر گزارشات موجود در این زمینه، اسیدهای چرب و منوگلیسریدهای آنها (به‌ویژه منوکاپرین و منولورین) به‌عنوان ترکیباتی هستند که ماهیت غذائی دارند و تاثیرات قابل ملاحظه ضد باکتریایی بر طیف وسیعی از باکتری‌ها به‌ویژه سویه *O157:H7* می‌باشند. اسیدهای چرب و منوگلیسریدهای آنها این قابلیت را دارند که جهت افزایش طول مدت نگهداری و کاستن از احتمال بروز آلودگی‌ها و مسمومیت‌های غذائی در قالب افزودنی‌های مجاز و همچنین به‌عنوان یک غذا-دارو (Medicinal food) مورد توجه صنایع غذائی، آرایشی و داروئی قرار گیرند.

تقدیر و تشکر:

نگارندگان کمال قدردانی و تشکر خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه ارومیه به‌جهت حمایت مالی و پشتیبانی از انجام این مطالعه دارند. همچنین نهایت تشکر و سپاسگزاری خود را از کارشناس محترم گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذائی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه و کلیه کسانیکه در اجراء این پروژه ما را یاری نمودند اعلام می‌داریم.

فهرست مراجع:

1. Thormar H, Hilmarsson H, Bergsson G . Stable concentrated emulsions of the 1-monoglyceride of capric acid (monocaprin) with microbicidal activities against the food-borne bacteria *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp, and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbio*, 2006; **72** (1) : 522–526.

2.Shekarforoush SS, Nazer AHK, Firouzi R, Rostami M. Effects of storage temperatures and essential oils of oregano and nutmeg on the growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 in barbecued chicken used in Iran. *Food Control* 2007; **18**:1428-1433.

3.Chapman PA, Wright DJ, Higgins R. Untreated milk as a source of verotoxigenic *Escherichia coli* O157. *Vet Record* 1993; **133**: 171-172.

4. Rodrigue DC, Mast EE, Greene KD, Davis JP, Hutchinson MA, Wells JG. A university outbreak of *Escherichia coli* O157 infections associated with roast beef and an unusually benign clinical course. *J Infect Dis* 1995; **172**:1122-1125.

5.Carter AO, Borczyck AA, Carlson AA, Harvey B, Hockin JC, Karmarli MM. A severe outbreak of *Escherichia coli* O157 associated hemorrhagic colitis in a nursing home. *New England J Med* 1987; **317**:1496-1500.

6.Pritchard JC, Willshaw GA, Bailey JR, Carson T, Cheasty T. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 on a farm open to the public: outbreak investigation and longitudinal bacteriological study. *Vet Record* 2000; **147**:259-264.

7.Doyle MP, Schoeni JL. Isolation of *Escherichia coli* O157 from retail fresh meats and poultry. *Appl Environ Microbiol* 1987; **53**:2394-2396.

8.Pilipcinec E, Tkacikova L, Naas HT, Cabadaj R, Mikula I. Isolation of verotoxigenic *Escherichia coli* O157 from poultry. *Folia Microbiol* 1999; **44**:455-456.

9.Hwang CA,Beuchat L. Efficacy of selected chemicals for killing pathogenic and spoilage microorganisms on chicken skin. *J Food Prot* 1995; **58**:19–23.

10.White PL, Baker AR, James WO. Strategies to control *salmonella* and *campylobacter* in raw poultry products. *Rev Sci Tech Off Int Epizoot* 1997; **16**:525–541.

11. Kabara JJ, Swieczkowski DM, Conley AJ, Truant JP. Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1972; **2:**23–28.
12.Conley AJ, Kabara JJ. Antimicrobial action of esters of polyhydric alcohols. *Antimicrob Agents Chemother* 1973; **4:**501–506.
13.Bergsson G, Arnfinnsson J, Karlsson SM, Steingrı´msson O´, Thormar H. In vitro inactivation of *Chlamydia trachomatis* by fatty acids and monoglycerides. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; **42**:2290–2294.
14.Bergsson G, Steingrı´msson O´, Thormar H. In vitro susceptibilities of *Neisseria gonorrhoeae* to fatty acids and monoglycerides. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; **43**:2790–2792.
15.Bergsson G, Arnfinnsson J, Steingrı´msson O´, Thormar H. Killing of gram-positive cocci by fatty acids and monoglycerides. *APMIS* 2001; **109**:670–678.
16.Bergsson G, Steingrı´msson O´, Thormar H. Bactericidal effects of fatty acids and monoglycerides on *Helicobacter pylori*. *Int J Antimicrob Agents* 2002; **20**:258–262.
17.Basti AA, Razavilar V. Growth response and modeling of the effects of selected factors on the time-to-detection and probability of growth initiation of *Salmonella typhimurium*. *Food Microbiol* 2004; **21**:431-8.
18. Misaghi A, Basti AA. Effects of zataria multiflora Boiss, essential oil and nisin on *Bacillus cereus* ATCC 11778. *Food control* 2007; **18**:1043-1049.
19. Hilmarsson H, Thormar H, Thrainsson JH, Gunnarsson E, Dadadottir S. Effect of glycerol monocaprate (monocaprin) on broiler chickens: an attempt at reducing intestinal *Campylobacter* infection . *Poultry Sci* 2006; **85**(4): 588-592.
20.Dufour M, Manson JM, Bremer PJ, Dufour JP, Cook GM, Simmonds RS. Characterization of monolaurin resistance in *Enterococcus faecalis*. *Appl Environ Microbio* 2007 ;**51**: 5507–5515.
21.Bohach GA, Fast DJ, Nelson RD, Schlievert PM. Staphylococcal and streptococcal pyrogenic toxins involved in toxic shock syndrome and related illnesses. *Crit Rev Microbiol* 1989; **17**:251-272.
22. Regassa LB, Couch JL, Betley MJ. Steady-state staphylococcal enterotoxin type C mRNA is affected by a product of the accessory gene regulator (agr) and by glucose. *Infect Immun* 1991 ; **59**:955-962.
23. Schlievert PM, Deringer JR, Kim MH, Projan SJ, Novick RP. Effect of glycerol monolaurate on bacterial growth and toxin production. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;**36**:626–31.
24. Projan SJ, Brown-Skrobot S, Schlievert PM, Vandenesch F, Novick RP. Glycerol monolaurate inhibits the production of b-lactamase, toxic shock syndrome toxin-1, and other staphylococcal exoproteins by interfering with signal transduction. *J Bacteriol* 1994 ; **176**:4204–4209.
25.Ruzin A, Novick RP. Glycerol monolaurate inhibits induction of vancomycin resistance in *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol* 1998; **180**:182–185.
26.Pooley HM, Shockman GD. Relationship between the latent form and the active form of the autolytic enzyme of *Streptococcus faecalis*. *J Bacteriol* 1969 ; **100:**617–624.
27. Ved HS, Gustow E, Pieringer RA. The involvement of the proteinase of *Streptococcus faecium* ATCC 9790 in the stimulation of its autolysin activity by dodecylglycerol. *J Biol Chem* 1984; **259**:8122–8124.
28.Ved HS, Gustow E, Pieringer RA. Dodecylglycerol. A new type of antibacterial agent which stimulates autolysin activity in *Streptococcus faecium* ATCC 9790. *J Biol Chem* 1984; **259:**8115–8121.
29.Brissette JL, EA Cabacungan, RA Pieringer. Studies on the antibacterial activity of dodecylglycerol. Its limited metabolism and inhibition of glycerolipid and lipoteichoic acid biosynthesis in *Streptococcus mutans* BHT. *J Biol Chem* 1986; **261:**6338–6345.
30. Kato N, Shibasaki I. Enhancing effect of fatty acids and their esters on the thermal destruction of *E. coli* and *Pseudomonas*

aeruginosa. *J Ferment Technol* 1975; **53**:802.
31- Kato N, Shibasaki I. Combined effect of citric and polyphosphoric acid on the antibacterial activity of monoglycerides. *J Antibact Antifung Agents* 1976; **4**:254–261.
32. Takano M, Symbol AB, Yasin M, Shibasaki I. Bactericidal effect of freezing with chemical agents. *J Food Sci* 1979; **44**:112–115.
33. Smith JL, Palumbo SA. Inhibition of aerobic and anaerobic growth of *Staphylococcus aureus* in a model sausage system. *J Food Safety* 1980 ; **2**:221–233.
34.Catsara M, Danjoy JP, Seynave R.. Temperature and action of Lauric acid on multiplication of *Salmonella* in minced meat. Bull Acad Vet Fr 1987; **60**:359.