ارزیابی کارآیی نایسین بر روی باکتری *لیستریا منوسیتوژنز* جدا شده از شیر و مقاوم نسبت به برخی از اسیدهای آلی در پنیر

آمنه نصر*، روحا کسری کرمانشاهی و ایرج نحوی

اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم،گروه زیست‌شناسی

تاریخ دریافت ۸۵/٦/۱۹ تاریخ پذیرش:۸۵/۱۲/۲٦

چکیده

در این تحقیق یک سویه باکتری *لیستریا منوسیتوژنز* بومی ایران از شیر غیر پاستوریزه بدون ماده نگهدارنده جدا شد و میزانMIC و MBC اسیدهای آلی و نمکهای آن و نایسین به روش رقت لوله‌ای بر روی این سویه تعیین و با *لیستریا منوسیتوژنز* PTCC1164 مقایسه شد. MIC *لیستریا منوسیتوژنز* جدا شده نسبت به بنزوات‌سدیم (۷ درصد)، اسیدسوربیک (۱ درصد)، سوربات‌پتاسیم (۲/۵ درصد)، سیترات‌سدیم (۱/۵ درصد)، اسیدپروپیونیک(۱/۲۵ درصد)، و اسیداستیک (۰/٦۲۵ درصد) است که نشانه مقاومت و نسبت به نایسین(۱۲۵ IU/ml) و اسیدبنزوییک (۰/۰۱۲۵ درصد) می‌باشد که نشانه حساسیت آن به غلظتهای مجاز این مواد در غذا یعنی به ترتیب ۰/۲ درصد ، ۰/۳ درصد ، ۰/۳ درصد ، ۱ درصد ، ۰/۳۸ درصد ، و ۰/۱ درصد ، می‌باشد. سپس کارآیی نایسین (۸۰۰IU/ml) بر روی *لیستریا منوسیتوژنز* جدا شده در پنیر ساخت داخل در دمای یخچال بمدت ۲۱ روز بررسی شد. نتایج نشان داد که این سویه *لیستریا منوسیتوژنز* به شرایط ذکر شده مقاومت نشان می‌دهد و در مقایسه با مطالعات دیگران که مقاومت سویه‌های مختلف *لیستریا منوسیتوژنز* را نسبت به نایسین در غلظت ۵۰۰ IU/ml گزارش کرده اند مقاومت بالاتر می باشد (۸۰۰ IU/ml). همچنین گزارشات موجود در شرایط آزمایشگاهی است در حالیکه تحقیق حاضر مقاومت به نایسین را در شرایط طبیعی داخل پنیر بررسی کرده است.

واژه های کلیدی: نایسین، *لیستریا منوسیتوژنز*، ماده نگهدارنده، کارآیی، پنیر

* نویسنده مسئول، تلفن تماس: ۰۹۱۳۲۲۷۳۹٥٤ ، پست الکترونیک: am_nasr60@yahoo.com

مقدمه

اسیدهای آلی بمنظور اسیدی کردن و یا جلوگیری از رشد میکروارگانیسمها یا بطور مستقیم به بعضی ازمواد غذایی اضافه می‌شود و یا با عمل بعضی از ارگانیسمها مثل لاکتوباسیلها یا باکتریهای پروپیونیک‌اسید تولید می‌شوند. اسید بنزوییک و اسید سوربیک مهارکننده مؤثر رشد میکروبی هستند و بعنوان نگهدارنده به مواد غذایی اضافه می‌شوند. در سالهای اخیر بعلت توجه مصرف‌کنندگان به مواد غذایی با فراوری و مواد شیمیایی کمتر استفاده از مواد نگهدارنده بیولوژیکی مورد توجه قرار گرفته است (۷). باکتریوسینها از باکتریهای لاکتیک اسید (Lactic Acid Bacteria) از جمله لاکتوکوکوس*(Lactococcus)* ، لاکتوباسیلو*(Lactobacillus)* ، پدیوکوکوس *(Pediococcus)* و...تولید می‌شوند. از جمله این باکتریوسینها نایسین است که پپتیدی با ۳٤ اسید آمینه از گروه A لنتی بیوتیکها(Lantibiotics) بوده و از باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس تولید می‌شود و در مقابل باکتریهای گرم مثبت مختلف از جمله *لیستریا منوسیتوژنز* و باکتریهای تولید کننده اسپور مثل گونه‌های *باسیلوس* و *کلستریدیوم* اثر باکتری‌کشی(Bacteriocide) دارد (۲٤). نایسین اولین بار توسط روگرز(Rogerz) در سال ۱۹۲۸ (۱۷) بعنوان

Archive of SID
www.SID.ir

ماده‌ای جهت جلوگیری از رشد لاکتوباسیلوس بولگاریکوس(*Lactococcus bulgaricus*) شرح داده شد (۱۵). ولی بعلت طیف فعالیت ضد میکروبی کم، حلالیت کم آن در مایعات بدن، تجزیه آن توسط پروتئازهای دستگاه گوارش و عدم پایداری آن در pH فیزیولوژیک برای اهداف کلینیکی نامناسب بود (٦). بنابراین تا سال ۱۹٤۰ نایسین مورد توجه قرار نگرفت (۱۵). در سال ۱۹۵۱ هریس(Hrisch) نشان داد که نایسین از تشکیل گاز ناشی از کلستریدیوم جلوگیری می‌کند. سرانجام این ماده با نام تجاری نیزاپلین(Nisaplin) در انگلستان توسط آپلین (Aplin) و بارت(Barrett) تولید شد، و در سال ۱۹٦۹ سازمان غذا و کشاورزی (Food and Agriculture Organization (FAO)) و سازمان سلامت جهانی(World Health Organization (WHO)) مشترکاً، استفاده از نایسین را بعنوان ماده نگهدارنده غذایی به جای مواد شیمیایی تایید کردند (٦). بنابراین نایسین از سال ۱۹۸۷ بعنوان افزودنی مجاز در مواد غذایی و در محصولات لبنی استفاده شده است. امروزه نایسین بعنوان یک ماده نگهدارنده در بیش از ۵۰ کشور درسراسر دنیا در محصولات متنوع مثل پنیر، غذاهای کنسرو شده و گوشت سود شده استفاده می‌شود (٦، ۷،۱۰، ۱۹، ۲۱، ۲۲، ۲۳ و ۲۸).

ویژگیهای مطلوب نایسین بعنوان یک ماده نگهدارنده غذایی غیرسمی بودن، طبیعی بودن، پایداری در برابر حرارت و قابلیت انبار داری بسیار خوب، قابلیت تجزیه توسط آنزیمهای هضم‌کننده، عدم تغییر طعم یا بو در غذا و محدودیت دامنه فعالیت آن است (۲). نایسین باعث تخریب غشای سیتوپلاسمی و نشت مواد ضروری مثل ATP، اسیدهای آمینه و جریان ترکیبهای کوچک سیتوپلاسمی می‌شود. نایسین این کار را با تشکیل منفذ در غشای سیتوپلاسمی و توقف گرادیان یونهای حیاتی و در نتیجه متوقف کردن PMF (Proton motive force) انجام می‌دهد. در نهایت همه فرآیندهای بیوسنتزی سلول متوقف می‌شود و سلول باکتری از بین می‌رود (٤ و۲۵). اثر نایسین بر روی اسپورها شدیدتر از سلولهای رویشی است و از جوانه‌زنی آنها در مراحل اولیه جوانه‌زنی جلوگیری می‌کند (۱۵).

مشابه مقاومت باکتریها به داروها که بعد از قرار گرفتن در معرض آنها رخ می‌دهد باکتریها می‌توانند نسبت به نایسین نیز مقاومت نشان دهند اولین مقاومت باکتریها نسبت به نایسین در سال ۱۹۷۱ توسط Farr و Jarvis گزارش شد. آنها یک پروتئین از باسیلوس سرئوس جدا کردند که قادر به غیرفعال کردن نایسین بود و آن را بعنوان یک دهیدروآلانین ردوکتاز(Dehydro alanine rodoctase) طبقه بندی کردند (۲۰). باکتریهای تولید کننده نایسین نیز از خودشان در مقابل نایسین محافظت می‌کنند. بدین صورت که نایسین توسط پروتئین انتقال دهنده که توسط ژن *nisEFG* کد می‌شود به بیرون سلول ترشح می‌شود و از تجمع آن درون سلول جلوگیری می‌شود (۱۱، ۱۳و ۲٦). در *لیستریا منوسیتوژنز* مقاومت به نایسین شامل تغییر در ترکیب اسید چرب، ترکیب فسفولیپید، سیالیت غشاء و دیواره سلولی است. در *لیستریا منوسیتوژنز* مقاوم به نایسین نسبت اسیدهای چرب زنجیری نسبت به شاخه‌ای بیشتر است و نیز سویه‌های مقاوم فسفاتیدیل اتانول آمین (Phosphatidylethanolamine) بیشتر و فسفاتیدیل گلیسرول (Phosphatidylglycerol) آنیونی و کاردیولیپین (Cardiolipin) کمتر دارند. در نتیجه این تغییرات استحکام غشاء بیشتر می‌شود و از ورود نایسین به سلول ممانعت می‌کند (۸ و ۳۰).

لیستریا منوسیتوژنز یک باکتری بیماریزای غذایی است و در یک محدوده وسیع دمایی از ۰/٤- تا ٤۵ درجه سانتی گراد و همچنین pH ٤/٤ تا ۹/٤ رشد می‌کند و باعث مسمومیت غذایی می‌شود(۲، ۳۱، ۱٤). پراکندگی گسترده در محیط، توانایی رشد در دمای یخچال، توانایی آغاز رشد در pH نسبتاً پایین و تحمل مقادیر زیاد نمک، باکتری

Archive of SID

www.SID.ir

لیستریا منوسیتوژنز را یک بیماریزا خطرناک در غذا ساخته است. این باکتری در پنیر سفید با رطوبت حدود درصد٥٦-٥٥ و pH حدود ٤/٣ و دمای ٤ درجه سانتی گراد بیش از سه ماه زنده می‌ماند. مسمومیتهای حاصل از این باکتری بیشتر در اثر مصرف پنیر و گوشت و فرآورده‌های آن عارض می‌شود که لیستریوز(Listeriosis) نامیده می‌شود. در زنان باردار لیستریوز ابتدا بصورت یک سرماخوردگی با تب و لرز و سردرد شروع شده و نهایتاً ممکن است منجر به زایمان زودرس، عقب ماندگی ذهنی نوزاد و یا سقط جنین شود.

میکروبهای بیماریزا در مواد غذایی بطور تخمینی سالانه در ایالات متحده ٦/٥ تا ٣٣ میلیون نفر را بیمار می‌کنند و ٢/٩ تا ٦/٧ بیلیون دلار خسارت وارد می‌کنند. که ٠/٢ تا ٠/٣ بیلیون دلار آن مربوط به باکتری *لیستریا منوسیتوژنز* است(١٤). از آن جهت که کنترل باکتریها مخصوصاً باکتریهای بیماریزا در مواد غذایی مهم بوده و نیز بعلت ایجاد مقاومت این باکتریها در برابر مواد نگهدارنده و کاهش اثر نگهدارنده سبب انتشار بیماری و به خطر انداختن سلامت جامعه می‌گردد، لذا شناسایی سویه‌های مقاوم و پیشنهاد راههایی جهت کنترل آنها در مواد غذایی ضروری می باشد(١٠). هدف از این مطالعه بررسی تأثیر نایسین در کنترل سویه *لیستریا منوسیتوژنز* جدا شده از شیر غیر پاستوریزه فاقد مواد نگهدارنده در ایران است. بعبارت دیگر هدف پاسخ به این سوال می باشد که آیا نایسین در شرایط آزمایشگاهی و سپس در محیط غذایی، از جمله پنیر و شرایط نگهداری معمول لبنیات قادر به کنترل سویه *لیستریا منوسیتوژنز* جدا شده از شیر می‌باشد یا اینکه مقاومت در باکتری ایجاد می‌شود.

مواد و روشها

الف- مواد مورد استفاده: نایسین از شرکت زیگما آلدریچ انگلیس، اسید سیتریک، اسید سوربیک، اسید استیک، اسید پروپیونیک، اسید بنزوییک، سوربات پتاسیم، سیترات سدیم، بنزوات سدیم از شرکت مرک آلمان، محیط کشت تریپتوکاز سوی برات از شرکت بیومریوکس فرانسه، محیط کشت نوترینت آگار ، BHI آگار، TSB از شرکت مرک آلمان، باکتری *لیستریا منوسیتوژنز* PTCC1164(Persian type culture collection (PTCC)) تهیه شده از کلکسیون میکروبی ایران و پنیر خامه‌ای پگاه.

ب- جداسازی و شناسایی باکتری *لیستریا منوسیتوژنز* مقاوم به مواد نگهدارنده: جهت جداسازی باکتریهای زنده در حضور مواد نگهدارنده از ٨ ماده غذایی مختلف نمونه‌گیری شد: ١ - پنیر پیتزای شیرآوران که در ترکیب آن سیترات سدیم بکار رفته بود، ٢ - شیر بسته بندی نشده بدون ماده نگهدارنده، ٣ - بیسکویت آناتا حاوی اسید سیتریک، ٤ - کیک آشنا حاوی سوربات پتاسیم، ٥ - سس سالاد مهرام حاوی بنزوات سدیم و سوربات پتاسیم و اسید سیتریک، ٦ - نوشابه زمزم حاوی بنزوات سدیم و اسید سیتریک، ٧ - ژله فرمند حاوی اسید سیتریک، ٨ - شربت پرتقال سن‌ایچ حاوی اسید آسکوربیک و اسید سیتریک. ١٠ گرم از هر یک از نمونه‌ها با ٩٠ میلی‌لیتر محلول رینگر بطور کامل مخلوط و از آنها سری رقت (تا رقت 10^{-4}) تهیه شد. یک میلی‌لیتر از رقتهای مختلف از هر نمونه با دو تکرار بر روی پلیتهای نوترینت آگار ریخته و به آرامی با میله شیشه‌ای سرکج در سطح پلیت پخش شد(١٨). سپس پلیت‌ها بمدت ٢٤ ساعت درانکوباتور ٣٧ درجه سانتی گراد قرار گرفت. پس از خالص‌سازی آزمایشهای بیوشیمیایی زیر جهت شناسایی باکتریهای جداسازی شده انجام پذیرفت: رنگ آمیزی گرم، کاتالاز، اکسیداز، حرکت، اندول، احیاء نیترات، رشد بی‌هوازی، تست وژپرسکوئر، رشد در ٤٥ درجه سانتی گراد و تخمیر هیدراتهای کربن (گلوکز، آرابینوز، گزیلوز، مانیتول، ترهالوز، ساکاروز، سلوبیوز، رافینوز، گالاکتوز) سپس باکتری *لیستریا منوسیتوژنز* شناسایی شده بعلت داشتن قدرت بیماریزایی

Archive of SID

www.SID.ir

انتخاب و جهت بررسی حساسیت آن نسبت به مواد نگهدارنده مختلف مورد بررسی قرار گرفت(۳).

ج- تهیه محلول ذخیره مواد نگهدارنده: مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم از نایسین (نیزاپلین ۲/۵ درصد) در ۱۰ میلی‌لیتر اسیدکلریدریک ۰/۰۲ نرمال حل شد تا غلظت آن به IU/ml 10^4 برسد (٤۰IU=۱µg). سپس با استفاده از فیلتر ۰/٤۵ میکرومتری استریل، و در دمای ۲۰ - درجه سانتی گراد منجمد شد، و برای تهیه رقتهای مختلف از آب مقطر استریل استفاده شد (۱۲). جهت تهیه محلول ۱۰ درصد اسیدهای آلی با حل کردن ۱۰ گرم از پودر آنها در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر تهیه و سپس با استفاده از فیلتر ۰/٤۵ میکرومتری استریل شد و در دمای ٤ درجه سانتی گراد نگهداری شد. اسید بنزوییک در آب نامحلول است و از محلول ۱۰ درصد الکلی آن استفاده شد. جهت تهیه رقت‌های مختلف آب مقطر استریل بکار رفت.

د- تعیین میزان MIC (Minimum Inhibitory Concentration) **و MBC** (Minimum Bacteriocidal Concentration) **مواد نگهدارنده در *لیستریا منوسیتوژنز* جدا شده از شیر:** ۱۰ لوله آزمایش استریل آماده و از ۱ تا ۱۰ شماره گذاری شد. یک میلی‌لیتر از ماده نگهدارنده استریل در لوله شماره یک و یک میلی‌لیتر در لوله شماره دو ریخته شد. سپس از محیط کشت TSB استریل بمیزان یک میلی‌لیتر به لوله‌های شماره ۲ تا ۱۰ اضافه شد. جهت تهیه سری رقت ۱ میلی لیتر از محتویات لوله ۲ پس از مخلوط شدن به لوله شماره ۳ منتقل و بهمین طریق از لوله ۳ به لوله ٤ و تا لوله شماره ۹ انتقال انجام گرفت و از لوله ۹ یک میلی‌لیتر دور ریخته شد. از کشت میکروبی که حاوی $1/5\times10^6$CFU/ml است به هر لوله یک میلی‌لیتر اضافه شد. حجم نهایی هر لوله ۲ میلی‌لیتر است. لوله ۱۰ بعنوان کنترل مثبت و حاوی ۱ میلی‌لیتر محیط کشت و ۱ میلی‌لیتر باکتری است. لوله ۱ بعنوان کنترل منفی است و حاوی ۱ میلی‌لیتر ماده ضد میکروبی و ۱ میلی‌لیتر باکتری می‌باشد. لوله‌ها بمدت ۱٦ تا ۲۰ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. سپس لوله ها از نظر وجود کدورت بررسی شد . حداقل غلظتی که در آن غلظت ماده نگهدارنده رشد باکتری را مهار کرده است و لوله شفاف دیده می شود مشخص کننده میزان MIC است (۱). پس از تعیین حداقل غلظت ماده نگهدارنده برای مهار باکتری، حداقل غلظت کشندگی ماده نگهدارنده در برابر باکتری تعیین شد. از لوله های شفاف که رشد در آنها مهار شده بود به کمک سواپ استریل بر روی محیط کشت جامد مولر هینتون آگار کشت داده و پلیتها ٤۸ تا ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. کمترین غلظت ماده نگهدارنده که در آن غلظت هیچ باکتریی زنده نمانده باشد بیان کننده میزان MBC آن ماده است (۱).

ه- بررسی اثر مهاری نایسین بر روی *لیستریا منوسیتوژنز* در دمای یخچال: درشرایط استریل پنیر خامه‌ای استریل تازه که بدون مواد نگهدارنده (نمونه های ۲۵ گرمی برای هر تیمار)، را در بشرهای استریل بسته شده با فویل آلومینیومی استریل ریخته، و با ۱۰ میلی‌لیتر محلول بافر پپتون نمکی دارای ۰/۱ درصد پپتون و ۰/۸۵ درصد نمک کلرید سدیم نمونه پنیر بصورت هموژن درآمد و با قاشقک چوبی یکنواخت شد. سویه *لیستریا منوسیتوژنز* جدا شده از غذا و رشد کرده در محیط کشت TSB بمیزان $1/5\times10^6$CFU/g به هر نمونه تلقیح شد. از یک نمونه کنترل بدون تلقیح باکتری و بدون نایسین و یک نمونه کنترل فقط دارای باکتری *لیستریا منوسیتوژنز* استفاده شد. محلول ذخیره نایسین تا ۸۰۰IU/ml در آب مقطر استریل رقیق و بمیزان ۲۰ میلی‌لیتر به هر تیمار اضافه شد. حجم نهایی نمونه ۳۰ میلی‌لیتر بود. نمونه ها بمدت ۲۱ روز در دمای ٤ درجه سانتی گراد انکوبه شد. جهت شمارش سلولهای زنده هر ۳ روز یکبار از نمونه‌های کنترل و تیمار رقت تهیه و بر سطح محیط کشت BHI آگار تلقیح شد. نمونه ها بمدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه و تعداد باکتریها شمارش شد(۲۷).

Archive of SID

www.SID.ir

و- ارزیابی‌های آماری: جهت بررسی معنی‌دار بودن تفاوت بین منحنیهای حاصل در مقایسه با کنترل از طرح فاکتوریل تک عاملی استفاده شد. بدلیل نرمال نبودن داده‌ها از آنها لگاریتم گرفته شد و با استفاده از نرم‌افزار Minitab میزان F تعیین و معنی‌دار بودن اختلاف بین منحنیهای کنترل و مورد آزمایش بررسی شد. جهت بررسی معنی‌دار بودن اختلاف بین باکتریها از نظر حساسیت یا مقاومت از نرم‌افزار SPSS 13 ، آزمونPaired-Samples T Test با احتمال خطای ۰/۰۵ استفاده شد.

نتایج

در کل ۱۸ نوع باکتری از لبنیات جدا شد. ۱۲ کلنی متفاوت از پنیر و ٦ کلنی متفاوت از شیر بر روی پلیتهای نوترینت آگار رشد کرد. که از بین آنها لیستریا منوسیتوژنز جدا شده از شیر بدلیل پتانسیل بیماریزایی آن انتخاب و میزان حساسیت آن به مواد نگهدارنده بررسی شد. جدول ۱ نشان دهنده نتایج تعیین میزان MIC مواد نگهدارنده در باکتری *لیستریا منوسیتوژنز* جدا شده از شیر و مقایسه آن با باکتری *لیستریا منوسیتوژنز* PTCC1164 ، و جدول ۲ نتایج مربوط به تعیین میزان MBC را نشان می دهد. شکل ۱ نشان دهنده نتایج شمارش هر ۳ روز یکبار باکتریهای در معرض نایسین طی ۲۱ روز شمارش می باشد.

بحث و نتیجه گیری

از باکتریهای جداسازی شده ۸٤/٥٦ درصد باکتری گرم مثبت (٥۳/۸ درصد باسیل و ۳۰/۷٦ درصد کوکسی) و ۱٥/۳۸ درصد باسیل گرم منفی است که تقریباً با نتایج آزمایش Lateef و همکاران در سال ۲۰۰٤ مطابقت دارد. آنها ۸۳ درصد باکتری گرم مثبت و ۱۷ درصد باکتری گرم منفی مقاوم از شربت پرتقال جداسازی کردند (۱۸). در جداسازی اولیه ۱۸ نوع باکتری از لبنیات جدا شد که پس از شناسایی، سویه لیستریا منوسایتوژنز انتخاب و میزان حساسیت آن به مواد نگهدارنده بررسی شد.

باکتری *لیستریا منوسیتوژنز* جدا شده نسبت به غلظت مجاز بنزوات‌سدیم (۰/۲درصد)، اسیدسوربیک (۰/۳ درصد)، سوربات‌پتاسیم (۰/۳ درصد)، سیترات‌سدیم (۱ درصد)، اسیدپروپیونیک(۰/۳۸ درصد)، و اسیداستیک (۰/۱ درصد) در غذا مقاوم بود. از آنجا که سمیت اسیدهای آلی بواسطه مولکول یونیزه نشده آن است، بنابراین سمیت این مواد بر روی میکروارگانیسم بستگی به نوع اسیدآلی، غلظت آن و دمای انکوباسیون دارد (۱٥).

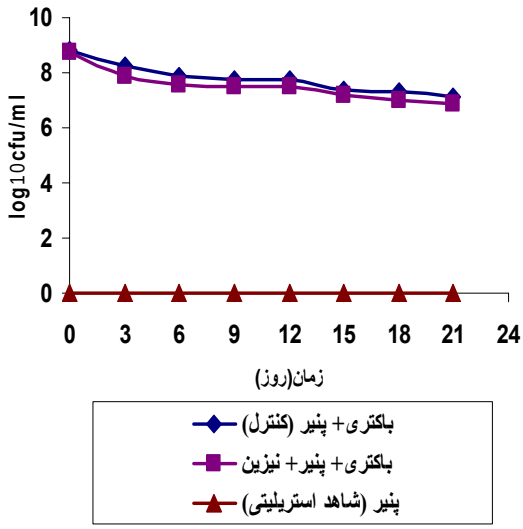
جدول ۱: مقایسه MIC مواد نگهدارنده شیمیایی و طبیعی در محیط TSB بر روی *لیستریا منوسیتوژنز* جدا شده از شیر و *لیستریا منوسیتوژنز* PTCC1164

نام مواد نگهدارنده		MIC بر حسب g/ml	
		لیستریا منوسیتوژنز جدا شده	*لیستریا منوسیتوژنز* PTCC1164
شیمیایی	اسیدسیتریک	۰/۷٥درصد	۰/۱۸۷درصد
	سیترات‌سدیم	۱/٥درصد	۰/۷٥درصد
	اسیدبنزوییک	۰/۰۱۲٥درصد	۰/۰۰٦۲٥درصد
	بنزوات‌سدیم	۷درصد	۱/۷٥درصد
	اسیدسوربیک	۱درصد	۱درصد
	سوربات‌پتاسیم	۲/٥درصد	۰/٦۲٥درصد
	اسیداستیک	۰/٦۲٥درصد	۰/٦۲٥درصد
	اسیدپروپیونیک	۱/۲٥درصد	۰/٦۲٥درصد
طبیعی	نایسین	۱۲٥IU/ml	٥۰۰IU/ml

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۲: مقایسه MBC مواد محافظ شیمیایی و طبیعی در محیط کشت TSB بر روی *لیستریا منوسیتوژنز* جدا شده از شیر و *لیستریا منوسیتوژنز* PTCC1164

نام مواد نگهدارنده		MBC بر حسب g/ml	
		لیستریا منوسیتوژنز جدا شده	*لیستریا منوسیتوژنز* PTCC1164
شیمیایی	اسیدسیتریک	۱/۵درصد	۰/۱۸۷درصد
	سیترات‌سدیم	۳درصد	۰/۷۵درصد
	اسیدبنزوییک	۰/۰۲۵درصد	۰/۰۰٦۲۵درصد
	بنزوات‌سدیم	۷درصد	۱/۷۵درصد
	اسیدسوربیک	۲درصد	۱درصد
	سوربات‌پتاسیم	۵درصد	۰/٦۲۵درصد
	اسیداستیک	۱/۲۵درصد	۰/٦۲۵درصد
	اسیدپروپیونیک	۲/۵درصد	۰/٦۲۵درصد
طبیعی	نایسین	۱۲۵IU/ml	۵۰۰IU/ml



شکل(۱): ارزیابی کارآیی نیسین بر روی باکتری *لیستریا منوسیتوژنز* جدا شده در دمای یخچال

باکتری *لیستریا منوسیتوژنز* جدا شده نسبت به اسیدبنزوییک، بنزوات‌سدیم، اسیدسیتریک، سیترات‌سدیم، اسیدسوربیک، سوربات‌پتاسیم، اسیداستیک و اسیدپروپیونیک مقاومتر از باکتری *لیستریا منوسیتوژنز* PTCC1164 است. مکانیسم عمل اسیدهای آلی وابسته به نفوذ آنها به غشاء سلول میکروبی است که باعث جدا شدن انتقال ماده و فسفریلاسیون اکسیداتیو از سیستم انتقال الکترون می شود. رها شدن پروتون (H^+) باعث اسیدی شدن محتوای سلول شده و دیواره سلول آنیون اسیدهای آلی را متابولیزه می‌کند. این علت اصلی مرگ میکروارگانیسم در حضور اسیدهای آلی است. اما پیشنهاد شده که کسر کوچکی از جمعیت سلولی با قرار گرفتن در معرض اسید، نسبت به سایر سلولها مقاومتر است یا اینکه سلول های صدمه دیده بازیابی شده و رشد می‌کنند. همچنین قرار گرفتن *لیستریا منوسیتوژنز* در معرض اسید، باکتری را در برابر اسیدیته بیشتر سازگار می‌کند(۱۲). سویه *لیستریا منوسیتوژنز* جدا شده نسبت به غلظت مجاز نایسین (٤۰۰ IU/ml) در مواد غذایی حساسیت نشان می دهد(MIC=۱۲۵ IU/ml). اثر نایسین نسبت به *لیستریا منوسیتوژنز* وابسته به سویه است و MIC های مختلفی گزارش شده است. از جمله Mohamed و همکاران در سال ۱۹۸٤ در غلظت ۳۲ IU/ml تا ۲۵٦ IU/ml نایسین سویه‌های مختلف *لیستریا منوسیتوژنز* را مهار کردند Harris 1991. در مطالعه دیگر سه سویه از *لیستریا منوسیتوژنز* در غلظت ٤۰۰ IU/ml مهار شد(۲٤).

اگرچه *لیستریا منوسیتوژنز* جدا شده از شیر با غلظتهای مجاز نایسین در محیط کشت مهار شد اما درک اینکه باکتری در ماده غذایی چگونه عمل می‌کند مشکل است. در غذا مهارکننده‌های طبیعی و میکروفلور رقابت کننده وجود دارد: داشتن اسید کمتر از آنچه برای مهار یا غیرفعال سازی باکتری

Archive of SID
www.SID.ir

لازم است، تیمار حرارتی، دمای نگهداری، فعالیت آب محصول و حضور افزودنیهای غذایی دیگر که می‌تواند با ماده نگهدارنده مورد نظر برهمکنش داشته باشد (تشدید کنندگی یا ممانعتی) باعث می‌شود ماده نگهدارنده در محیط غذایی در غلظتهای متفاوت با آنچه در آزمایشها به آن اشاره شد عمل کند(۵). در این آزمایش pH پنیر برابر با ٦/٧٥–٦/٧ و غلظت نمک در پنیر ۳/۱۵–۳ درصد بود. دمای ٤ درجه سانتی گراد بعلت نگهداری لبنیات در یخچال، بکار رفت. غلظت نایسین بکار رفته بیش از میزان MIC نایسین برای باکتریها انتخاب شد تا از غیرفعال شدن ماده ضد میکروبی در صورت نامناسب بودن شرایط محیطی و ایجاد مقاومت در باکتری جلوگیری شود. از طرفی بعلت امکان وجود مواد نگهدارنده دیگر در پنیر، از یک کنترل استفاده شد تا رشد باکتری در غیاب نایسین بررسی شود. سویه *لیستریا منوسیتوژنز* مورد بررسی در حضور نایسین با آنالیز آماری به روش فاکتوریل تک عاملی و با احتمال خطای ۰/۰۵ کاهش معنی‌داری نشان نداد. علت این امر می‌تواند مقاومت سویه *لیستریا منوسیتوژنز* به نایسین در محیط غذایی (پنیر خامه‌ای) در دمای ٤ درجه سانتی گراد باشد. با توجه به اینکه سویه‌های مقاوم با قرار گرفتن باکتری در معرض نایسین در غذا مورد انتظار است (١٦) و در ایران از این ماده نگهدارنده برای محافظت مواد غذایی استفاده نمی‌شود ایجاد مقاومت در سویه‌های جدا شده در ایران دور از انتظار است. اما نمی‌توان گفت که نایسین غیرفعال شده چون در همین شرایط و با همین غلظت توانسته سویه *باسیلوس سرئوس* جدا شده از پنیر را طی ۲۱ روز logCFU/ml۵ کاهش دهد (نتایج در اینجا نشان داده نشده است). طبق مطالعات Ganzle و همکاران در سال ۱۹۹۹ فعالیت باکتریوسین ممکن است در محیط غذایی بعلت تغییر در حلالیت و بار باکتریوسین، اتصال آن به اجزاء غذا و غیر فعال شدن باکتریوسین توسط پروتئازها مهار شود (۷). همچنین Abdalla و همکاران اثر نایسین و سوربات پتاسیم را بر *لیستریا منوسیتوژنز* در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد و بمدت ٤٨ ساعت در پنیر بررسی کردند. اما این مواد در غلظت مهار کننده بر باکتری اثر نداشتند که شاید بعلت کاهش مواد ضد میکروبی در حین فرآیند، تجزیه در طی مراحل اولیه عمل آمدن و یا نامناسب بودن شرایط محیط برای عمل ماده ضد میکروبی باشد (٢٤). همچنین امکان ایجاد بیماریزاهای غذایی مقاوم در برابر مواد ضد میکروبی در مراحل مختلف تولید غذا ممکن است بر کارآیی تیمارهای محافظت‌کننده اثر بگذارد (۱۵). Davies و همکاران در سال ۱۹۹٤ توانستند *لیستریا منوسیتوژنز* را بطور مؤثر در پنیر در دمای ۸–٦ درجه سانتی گراد کنترل کنند (۹). Abee و همکاران در سال ۱۹۹٤ متوجه شدند که فعالیت نایسین در دمای پایین کاهش می‌یابد. چون در دمای پایین غشاء سویه‌های مقاوم انعطاف‌پذیری کمتری نسبت به سویه‌های حساس دارند. در نتیجه تغییر زنجیره های هیدروکربنی لیپیدهای غشاء که در سویه های مقاوم و در دمای پایین رخ می‌دهد، سیالیت غشاء کاهش یافته و انتقال ماده غذایی به داخل سلول تحت تأثیر قرار می گیرد و مانع ورود نایسین به سلول باکتری می‌شود (۲۰). مقاومت به نایسین در باکتری *لیستریا منوسیتوژنز* توسط Davies و همکاران در سال ۱۹۹٤ و Harris و همکاران در سال ۱۹۹۱ گزارش شد (١٦ و ٢٧). Pol & Smid نیز در سال ۱۹۹۹ نشان دادند که در دمای ۸ درجه سانتی گراد حساسیت باسیلوس سرئوس بیشتر از *لیستریا منوسیتوژنز* به نایسین است؛ اما در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد حساسیت آنها مشابه می باشد (٢٤). مقاومت سویه‌های مختلف *لیستریا منوسیتوژنز* نسبت به IU/ml ۵۰۰ نایسین نیز گزارش شده است (۲۹).

این تحقیق نشان می‌دهد که حساسیت *لیستریا منوسیتوژنز* در دمای یخچال و در داخل پنیر از حساسیت آن در شرایط آزمایشگاه کمتر است لذا بایستی از غلظتهای بالاتر از IU/ml ۸۰۰ استفاده شود. با توجه به نتایج حاصل اسیدهای آلی و نمک آنها مواد نگهدارنده مناسبی جهت کنترل مواد غذایی نبوده و بایستی با مواد نگهدارنده طبیعی جایگزین شوند. نایسین برای کنترل بعضی از باکتریها کارایی زیادی دارد اما بایستی جهت جلوگیری از گسترش مقاومت در باکتریها از

Archive of SID

www.SID.ir

غلظتهای مناسب آن استفاده شود. پیشنهاد می‌شود که تحقیقات بیشتری پیرامون مکانیسم مقاومت به نایسین در باکتریها و استفاده از روشهای مختلف برای حداقل کردن مقاومت انجام شود(١٦) یکی از این روشها استفاده از نایسین بهمراه سایر روشهای نگهداری غذا است (١٩). همچنین بررسی تأثیر افزودن نایسین به شیر در هنگام تولید پنیر پیشنهاد می‌شود.

منابع

١- ناظم، ح. (١٣٦٥). بررسی اثر ضد میکروبی برگ گیاه بارهنگ و تعیین MIC و MBC برگ گیاهان توت سفید و زبان گنجشک. پایان نامه دکترای داروسازی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان: ٤٢-٤١.

2- (1992). Modern food microbiology. Fourth edition. New York. London.

3- (1993). Cowan and steel's manual for the identification of medical bacteria. Third edition. Cambridge university press. England.

4- (1999) Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization. Third edition. Blackwell Science, USA.

5- Ahamad, N. and Marth, E. H. (1989). Behavior of *Listeria monocytogenes* at 7, 13, 21, and 35°C in tryptose broth acidified with acetic, citric, or lactic acid. Journal of Food Protection, 52: 688-695.

6- Broughton, J. D. (1990). Nisin and its uses as a food Preservative. Food Technology: 100-112.

7- Chen, H. and Hoover, D. G. (2003). Bacteriocins and their food application. Comprehensive Reviews Food Science and Food Safety, 2: 82-100.

8- Crandall, A. D. and Montville T. J. (1998). Nisin Resistance in *Listeria monocytogenes* ATCC 700302 is a complex phenotype. Applied and Environmental Microbiology, 64: 231-237.

9- Davies, E. A., Bevis, H. E. and Delves-Broughton. (1997). The use of bacteriocin, nisin, as a preservative in ricotta type cheeses to control the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes*. Letters in Applied Microbiology, 24: 343-346.

10- De Martinis, E. C. P., Crandall, A. D., Mazzotta, A. S. and Montville, T. J. (1997). Influence of pH, salt, and temperature on nisin resistance in Listeria monocytogenes. Journal of Food Protection, 60: 420-423.

11- Dodd, H. M., Horn, N., Giffard, C. J. and Gasson, M. J. (1996). A gene replacement strategy for engineering nisin. Microbiology, 142: 47-55.

12- Ellin Doyle, M. (1999). Literature survey of the various techniques used in *Listeria* intervention. (http://www.wisc.edu/fri/briefs.htm)

13- Ennhar, S. and Sashihara, T. (2000). Class IIa bacteriocins: biosynthesis structure and activity. FEMS Microbiology Review, 24: 85-106.

14- Forysythe, S. J. (2000). The microbiology of safe food, Blackwell Science: 10-62.

15- Harris, L. J. and Fleming, H. G. (1992). Development in nisin research. Food Research International, 25: 57-66.

16- Harris, L. J., Fleming, H. P., and Klaenhammer, T. R. (1991). Sensitivity and resistance of *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, ScottA, and UAL500 to nisin. Journal of Food Protection, 54: 836-840.

17- Ivanova, I., Kabadjova, P., Pantev, A., Danova, S. and Dousset, X. (2000). Detection, purification and partial characterization of a novel bacteriocin substance from Boza-Bulgarian Cereal beverage. Biocatalysis: Fundamentals and Application, 41: 47-53.

18- Lateef, A., Oloke, J. K. and Gueguim-Kana, E. B. (2004). Antimicrobial resistance of bacterial strains isolated from orange juice products. African Journal of Biotechnology, 3: 334-338.

19- Martirani, L., Varcamonti, M., Naclerio, G. and Felice, M. (2002). Purfication and partial characterization of bacillocin 490, a novel bacteriocin produced by a thermophilic Bacillus licheniformis. Microbial Cell Factories, 1: 1-5.

20- Ming, X. and Daeschel, M. A. (1993). Nisin resistance of foodborne bacteria and the specific resistance responses of *Listeria monocytogenes* ScottA. Journal of Food Protection, 56: 944-948.

21- Morgan, S. M., Galvin, M., Kelly, J., Ross, R. P. and Hill, C. (1999). Development of a lacticin 3147-enriched whey powder with inhibitory

Archive of SID
www.SID.ir

activity against foodborne pathogens. Journal of Food Protection, 62: 1011-1016.

22- Noonpakdee, W., Snativarangekna, C., Jumriangrit, P., Sonomot, K. and Panyim, S. (2003). Isolation of nisin producing Lactococcus lactis WNC20 from Nham, a traditional Thi. International Journal of Food Microbiology, 81: 137-145.

23- Olasapo, N. A., Schillinger, U. and et al. (1999). Occurrence of nisin z production in *Lactococcus lactis* BFE 1500 isolated from wara, a traditional Nigerian cheese product. International Journal of Food Microbiology, 53: 141-152.

24- Pol, I. E. and Smid, E. J. (1999). Combined action of nisin and carvacrol on *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. Letters in Applied Microbiology, 29: 166-170.

25- Sahl, H. G. and Bierbaum, G. (1998) Lantibiotics: Biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from gram-positive bacteria. Annual Review Microbiology, 52: 41-79.

26- Siegrs, K. and Entian, K. D. (1995). Genes involved in immunity to the lantobiotic nisin produced by *Lactococcus lactis* 6F3. Applied and Environmental Microbiology, 61: 1082-1089.

27- Song, H-J. and Richard, J. (1997). Antilisterial activity of three bacteriocins used at sub minimal inhibitory concentrations and cross-resistance of the survivors. International Journal of Food Microbiology, 36: 155-161.

28- Soomro, A. H., Masud, T. and Anwaar, K. (2002). Role of lactic acid bacteria (LAB) in food preservation and human health. Pakistan Journal of Nutrition, 1: 20-24.

29- Ukuku, D. O. and Shelef, L. A. (1997). Sensitivity of six strains of *Listeria monocytogenes* to nisin. Journal of Food Protection, 60: 867-869.

30- Verheul, A., Russell, N. J., Vanthof, R., Rombouts, F. M. and Abee, T. (1997). Modifications of membrane phospholipids composition in nisin-resistant *Listeria monocytogenes* Scott A. Applied and Environmental Microbiology, 63: 3451-3457.

31- Zapico, P., Medina, M., Gaya, P. and Nuñes, M. (1998). Synergistic effect of nisin and the lactoperoxidase system on *Listeria monocytogenes* in skim milk. International Journal of Food Microbiology, 40: 35-42.

Archive of SID

www.SID.ir

Evaluation of applicability of Nisin on milk isolated bacteria *Listeria monocytogenes* which is also resistant to some organic acids in cheese

Nasr A., Kasra Kermanshahi R., and Nahvi I.

Biology Dept., Faculty of Sciences, Isfahan University, Isfahan, I.R. of Iran

Abstract

In this investigation one strain of local Iranian *Listeria monocytogenes* was isolated from nonpasturized milk and then MICs & MBCs of organic acids & their salts and nisin were measured against this strain with serial dilutiom method and it was compared with *Listeria monocytogenes* PTCC1164. The MICs of isolated strain for sodium benzoat (7%), sorbic acid (1%), potassium sorbat (2.5%), sodium citrate (1.5%), propionic acid (1.25%) and acetic acid (0.625%) show resistance and for nisin (125 IU/ml) and benzoic acid (0.0125درصد) show sensitivity to permitted dose of preservatives in foods that are 0.2%, 0.3%, 0.3%, 1%, 0.38% and 0.1% respectively. Then the efficacy of nisin (800 IU/ml) was measured against isolated *Listeria monocytogenes* in cheese at refrigerator temperature for 21 days. The results showed that this strain of *listeria monocytogenes* was resistant to this condition. In other studies resistance was reported *in Listeria monocytogenes* to 500 IU/ml of nisin but in this study it was 800 IU/ml and it was in labroatory condition however in this study it was reported in cheese condition.

Keywords: Nisin, *Listeria monocytogenes*, preservative, efficacy, cheese

Archive of SID

www.SID.ir