بررسی اثر لیزوزیم بر باکتری‌های زئونوز *استرپتوکوکوس اینیایی* و *لاکتوکوکوس گارویه* جداشده از گوشت ماهی قزل آلای رنگین‌کمان پرورشی

معصومه محمودی[۱]، امین نعمت اللهی[۲*]، حمدالله مشتاقی[۲]، مجتبی بنیادیان[۲]

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بهداشت آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

۲. گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی ،دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

[*] **نویسنده مسئول:** *anematolahi@yahoo.com*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۲/۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۹/۰۸

چکیده

باکتری‌های *استرپتوکوکوس اینیایی* و *لاکتوکوکوس گارویه* عوامل بیماری‌های استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس در ماهیان هستند که قابلیت انتقال به انسان در صورت تماس یا مصرف ماهی آلوده را دارند. این دو عامل در سال‌های اخیر شیوع زیادی در مزارع پرورش ماهی در ایران داشته‌اند. این مطالعه به‌منظور بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف لیزوزیم بر باکتری‌های *استرپتوکوکوس اینیایی* و *لاکتوکوکوس گارویه* و همچنین تعیین MIC و MBC این غلظت‌ها بر میزان رشد باکتری‌های فوق انجام‌گرفته است. بدین منظور، خاصیت ضدمیکروبی غلظت‌های مختلف لیزوزیم (۱۹/۵۳، ۳۹/۰۶، ۷۸/۱۳، ۱۵۶/۲۵، ۳۱۲/۵، ۶۲۵، ۱۲۵۰، ۲۵۰۰ و ۵۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) علیه باکتری‌های *استرپتوکوکوس اینیایی* و *لاکتوکوکوس گارویه* جداشده از ماهیان قزل آلای رنگین‌کمان در استان چهارمحال و بختیاری با استفاده از روش میکرودایلوشن و قرائت جذب نوری در سه pH ۵/۵، ۶ و ۷ موردبررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از روش میکرودایلوشن نشان داد که مهار رشد هر دو باکتری تحت تاثیر لیزوزیم در pH های ۶ و ۵/۵ در غلظت ۵۰۰۰ µg/ml مشاهده گردید. درحالی‌که در pH=۷ مهار رشد باکتری‌ها مشاهده نشد. تغییرات جذب نوری حاصل از رشد هر دو باکتری در pH های مختلف موردمطالعه، با افزایش غلظت لیزوزیم رو به کاهش بود. ولی در غلظت ۵۰۰۰ µg/ml در pH های ۶ و ۵/۵ در مقایسه با مقادیر کمتر به‌طور معنی‌داری جذب نوری پایین بود ($P<۰/۰۵$) درنتیجه، لیزوزیم در مهار رشد باکتری‌های *استرپتوکوکوس اینیایی* و *لاکتوکوکوس گارویه* موثر بوده و همچنین کاهش مقادیر pH تاثیر معنی‌داری در فعالیت ضدمیکروبی لیزوزیم دارد.

واژگان کلیدی: لیزوزیم، *استرپتوکوکوس اینیایی*، *لاکتوکوکوس گارویه*، قزل آلای رنگین‌کمان.

مقدمه

در سال‌های اخیر پرورش آبزیان یکی از بخش‌های مهم تولید غذا در جهان به حساب می‌آید که با سرعت زیاد در حال رشد است. دلیل آن استقبال مردم به استفاده از این منابع پروتئینی و در پی آن گسترش صنایع مرتبط به‌ویژه درزمینه‌ی پرورش آبزیان است. مشکلاتی که نگه‌دارنده‌های شیمیایی برای مصرف‌کنندگان مواد غذایی ایجاد کرده‌اند تحقیقات را به سمت استفاده از ترکیبات ضد باکتریایی طبیعی سوق داده است (مرتضوی و صادقی ماهونک، ۱۳۸۲؛ آخوندزاده و ابراهیم‌زاده، ۱۳۹۲؛ Zahang et al., 2006). ازجمله این ترکیب‌ها می‌توان به لیزوزیم اشاره کرد. لیزوزیم درواقع یک آنتی‌بیوتیک طبیعی و دارای فعالیت‌های زیستی متعددی نظیر فعالیت ضدمیکروبی و ضد سرطانی می‌باشد (Roos et al., 1998؛ Johnson et al., 2005؛ Knubovets et al., 1999). آنزیم لیزوزیم ازجمله ترکیباتی است که به وفور در طبیعت یافت می‌شود و به‌وسیله گیاهان، قارچ‌ها، باکتری‌ها، پرندگان و پستانداران یافت می‌شود (Barakat et al., 2000). لیزوزیم به عنوان جزء ذاتی از سیستم ایمنی انسان تلقی می‌شود؛ بنابراین انتظار می‌رود دارای سمیت اندکی باشد و درنتیجه برای افزودن به مواد غذایی ایمن است (Valerie et al., 2009). از وظایف لیزوزیم می‌توان به بهبود جریان گردش و افزایش توانایی سیستم ایمنی در انسان اشاره نمود زیرا خون انسان حاوی بیشترین میزان باکتری

Archive of SID
www.SID.ir

است، بنابراین لیزوزیم موجود در گردش خون همراه سیستم ایمنی، نقش حفاظتی بسیار قوی ایفا می‌کند (Dood et al., 1996). لیزوزیم علیه باکتری‌های گرم مثبت بسیار موثر است ولی علیه باکتری‌های لاکتیکی و باکتری‌های گرم منفی موثر نیست، زیرا لایه لیپو پلی‌ساکارید غشای خارجی نسبت به عبور ماکرو مولکول‌ها و ترکیب‌های هیدروفوبیک عایق می‌باشد (Dembczynski et al., 2002). چندین نوع لیزوزیم در بخش‌های مختلف از سلسله حیوانات توزیع‌شده‌اند و به نظر می‌رسد نقش آن‌ها در زندگی حیوان‌ها به خاطر مقابله با باکتری‌های عفونی کننده فرصت‌طلب حائز اهمیت است (Ponkham et al., 2010). می‌توان از لیزوزیم در نگه‌داری محصولاتی مانند فرآورده‌های گوشتی، شیلات، میوه‌ها، سبزی‌ها و دربسته بندی مواد غذایی استفاده کرد (Nakamura et al., 1991). استان چهارمحال و بختیاری با تولیدی بالغبر ۱۵۰۰۰ تن ماهی قزل‌آلا در سال، رتبه اول کشور در تولید ماهی سردابی را دارا است. متاسفانه به نظر می‌رسد باوجود توسعه کمی مزارع پرورش ماهی، کیفیت تولید ازنظر دور بوده است. به‌طوری‌که برخی از بیماری‌های باکتریایی به‌وفور مشاهده می‌شوند. ازجمله این بیماری‌ها می‌توان به استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس اشاره کرد. استرپتوکوکوزیس اصطلاحی است که برای بیماری ناشی از چندین گونه کوکسی گرم مثبت به کار می‌رود (Ravelo et al. 2003) و نوع باکتری عامل بیماری استرپتوکوکوزیس تحت تاثیر منطقه جغرافیایی می‌باشد. این بیماری عفونی که سپتی سمیک می‌باشد ممکن است به شکل حاد، مزمن و یا بدون علامت بروز یابد (Eldar et al., 1999). بااین‌حال تلفات بیماری قابل‌توجه است. علاوه بر اهمیت بیماری در آبزی‌پروری، تهدیدی برای سلامت عمومی انسان‌هایی که با آبزیان سروکار دارند محسوب می‌شود (Mata et al., 2004).

لاکتوکوکوس گارویه عامل بیماری لاکتوکوکوزیس، کوکوباسیل گرم مثبت و فاقد تحرک با همولیز آلفا است که از بسیاری از گونه‌های ماهی به‌ویژه قزل‌آلای رنگین‌کمان به‌عنوان ناقل بیماری جداشده است (Ravelo et al,. 2003). نخستین همه‌گیری لاکتوکوکوزیس در مزارع پرورش ماهی کشور اسپانیا و در سال ۱۹۸۸ گزارش شد (Palacios et al., 1993) و پس‌ازآن، همه‌گیری‌های متعددی از کشورهای مختلف گزارش شد (Baeck et al., 2006؛ Pereira et al., 2004). دامنه میزبانی این باکتری محدود به ماهیان نیست و از گاو، سگ، گربه و بوفالو (Carvalho et al. 1997 ; Deveriese et al.) و فرآورده‌های خام دامی مانند شیر گاو (Rantsiou et al., 2005) و گوشت ماکیان (Barakat et al., 2000) نیز جداشده است. هدف از این مطالعه بررسی فعالیت ضد باکتریایی لیزوزیم و همچنین تعیین MIC (حداقل غلظت ممانعت از رشد) و MBC (حداقل غلظت کشندگی) این ترکیب بر میزان رشد و مهار باکتری‌های *استرپتوکوکوس اینیایی* و *لاکتوکوکوس گارویه* جداشده از ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در استان چهارمحال و بختیاری بود.

مواد و روش کار

تهیه لیزوزیم و آماده‌سازی آن

آنزیم لیزوزیم (Sigma-Aldrich) در آب مقطر استریل حل و قبل از رقیق‌سازی با پالایه میکرو بیولوژیک ۰/۴۵ میکرو لیتر استریل شد.

جداسازی و شناسایی باکتری‌های *استرپتوکوکوس اینیایی* و *لاکتوکوکوس گارویه*

بعد از نمونه‌گیری از ماهیان ۳۳ مزرعه پرورش ماهی در استان چهارمحال و بختیاری در تابستان ۱۳۹۲ از موارد مشکوک اعلام‌شده و با مجموع ۱۰۰ ماهی دارای علامت یا مشکوک به بیماری، در مجاورت یخ به مرکز تحقیقات شیلات دانشگاه آزاد واحد شهرکرد انتقال یافت.

www.SID.ir
Archive of SID

تعیین خاصیت ضد باکتریایی لیزوزیم

روش سنجش رقت میکرو براث برای بررسی اثر ضدمیکروبی لیزوزیم علیه باکتری‌های *استرپتوکوکوس اینیایی* و *لاکتوکوکوس گارویه* در دمای ۲۴ °C در pH های ۶ و ۷ و دمای ۳۰ °C در pH=۵/۵ به کار گرفته شد. پلیت های استریل ۹۶ خانه‌ایی پلی استرین با ظرفیت ۳۰۰ میکرو لیتر با محلول لیزوزیم با غلظت ۵۰۰۰ µg/ml پس از عبور از پالایه استریل غشایی با منافذ ۰/۴۵ µm به هر چاهک از ستون اول با استفاده از یک پیپتور چندکاناله پر شدند سپس ۱۵۰ µl از محیط TSB به ستون اول اضافه‌شده و به‌طور کامل با مایع داخل چاهک‌های متناظر از ستون دوم ۱۰ بار مخلوط شد. پس‌ازآن ۱۵۰ µl نمونه برداشته و به ستون کناری اضافه و مخلوط شد. برای تمامی چاهک‌های دو برابر رقت نیز این کار صورت گرفت. از یک ستون به‌عنوان شاهد باکتری و ستون دیگری نیز به‌عنوان شاهد محیط کشت استفاده شد. ۱۰ میکرو لیتر از محیط کشت هرکدام از باکتری‌های مورد آزمایش پس از انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در هر چاهک پلیت به‌جز چاهک ۱۰ که شاهد ماده موردمطالعه بود و چاهک ۱۲ با غلظت حاصل نهایی 10^5cfu/ml کشت داده شدند. پلیت میکرو تیتر در انکوباتور به مدت ۴۸ ساعت در ۲۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده‌شده و رشد باکتریایی به‌وسیله ELISA reader و تغییر در جذب با طول‌موج ۶۳۰nm اندازه‌گیری شد (Alxander and Richard 2003). MIC به‌عنوان کمترین غلظت لیزوزیم در مهار رشد باکتری‌های مورد آزمایش مشخص شد. سنجش MIC برای هر باکتری دو بار انجام‌شده و همچنین سنجش هرکدام از موارد مختلف سه بار تکرار گردید (Zahang et al. 2006). برای تعیین MBC نیز تعداد کلونی‌های باکتری بر روی محیط کشت MHA شمارش گردید.

تجزیه‌وتحلیل آماری

کلیه آزمون‌ها در سه تکرار انجام شد و تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌های حاصله با نرم‌افزار SPSS انجام پذیرفت. برای مقایسه میانگین‌ها از روش چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال $p\leq0/05$ استفاده شد.

نتایج

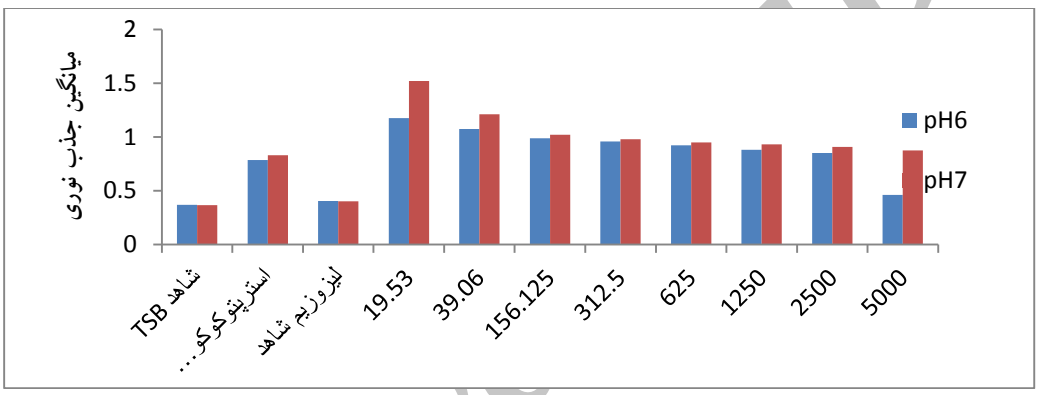
اثر ضد باکتریایی غلظت‌های مختلف لیزوزیم علیه *استرپتوکوکوس اینیایی* و *لاکتوکوکوس گارویه* در محیط کشت TSB در دماهای ۲۴ و ۳۰ °C مهار رشد باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* و *لاکتوکوکوس گارویه* تحت تاثیر لیزوزیم با توجه به نتایج روش میکرودایلوشن در pH های ۶ و ۵/۵ در غلظت ۵۰۰۰ µg/ml مشاهده گردید درحالی‌که در pH=۷ مهار رشد باکتری مشاهده نشد (جدول۱). تغییرات جذب نوری حاصل از رشد باکتری‌های فوق در تمامی pH های موردمطالعه با افزایش غلظت لیزوزیم رو به کاهش بود ولی در غلظت ۵۰۰۰ µg/ml در pH های ۶ و ۵/۵ در مقایسه با مقادیر کمتر به‌طور معنی‌داری پایین بود (P<۰/۰۵). درحالی‌که در pH=۷ مهار رشد باکتری‌های مذکور با توجه به تغییرات جذب نوری حتی در بالاترین غلظت به‌کاررفته لیزوزیم مشاهده نگردید (نمودار ۱، ۲، ۳ و ۴).

Archive of SID

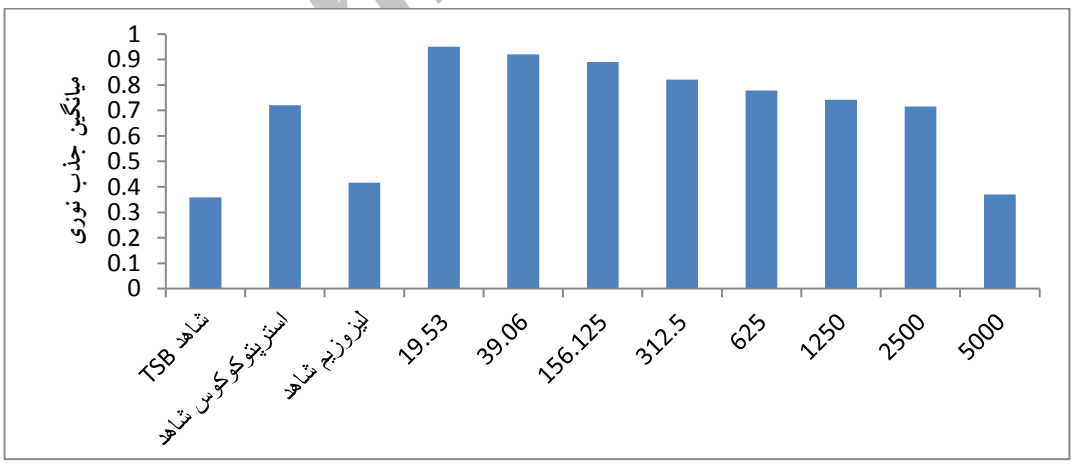
www.SID.ir

جدول ۱- تعیین مقادیر MIC و MBC لیزوزیم علیه *لاکتوکوکوس گارویه* و *استرپتوکوکوس اینیایی* در pH های متفاوت
*حداقل غلظت مهار رشد، **حداقل غلظت کشندگی

نام باکتری	غلظت لیزوزیم (µg/mL)	pH		
		۵/۵	۶	۷
لاکتوکوکوس گارویه	MIC*	۵۰۰۰	۵۰۰۰	-
	MBC**	-	-	-
استرپتوکوکوس اینیایی	MIC	۵۰۰۰	۵۰۰۰	-
	MBC	-	-	-

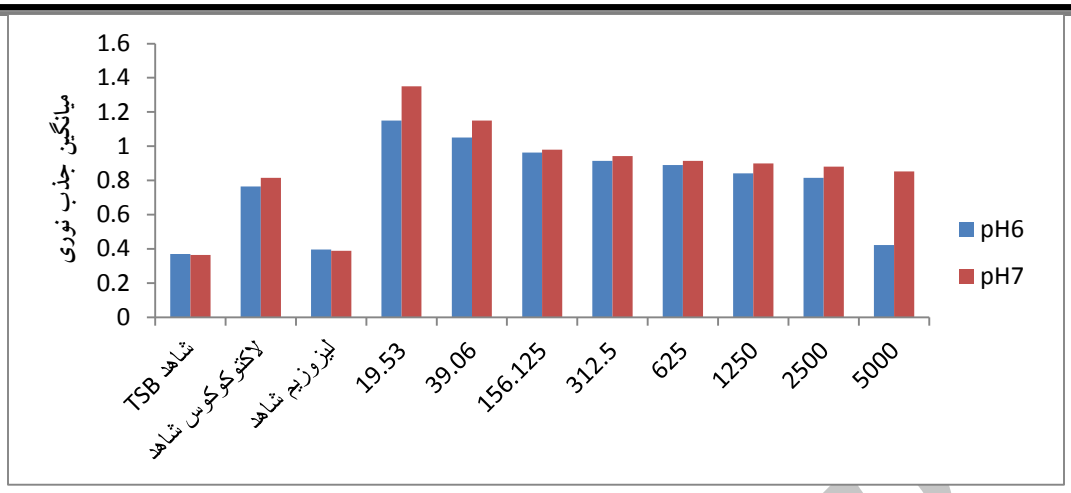


شکل ۱- اثر ضد باکتریایی غلظت‌های مختلف لیزوزیم (µg/ml) بر روی *استرپتوکوکوس اینیایی* در محیط کشت TSB در دمای ۲۴ °C و pHهای ۶ و ۷

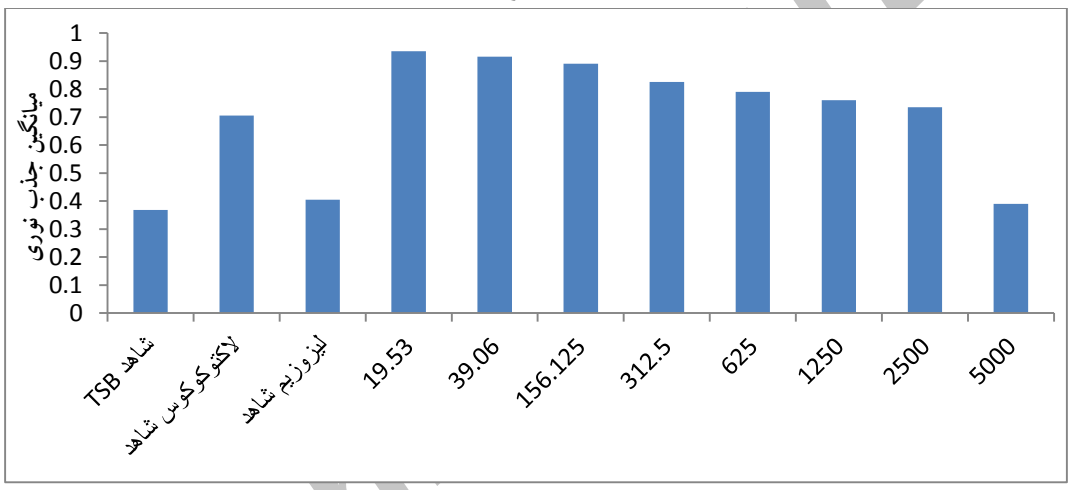


شکل ۲- اثر ضد باکتریایی غلظت‌های مختلف لیزوزیم (µg/ml) بر روی *استرپتوکوکوس اینیایی* در محیط کشت TSB در دمای ۳۰ °C و pH=۵/۵

www.SID.ir



شکل ۳: اثر ضد باکتریایی غلظت‌های مختلف لیزوزیم (µg/ml) بر روی *لاکتوکوکوس گارویه* در محیط کشت TSB در دمای ۲۴ °C و pH های ۶ و ۷



شکل ۴: نمودار اثر ضد باکتریایی غلظت‌های مختلف لیزوزیم بر روی *لاکتوکوکوس گارویه* در محیط کشت TSB در دمای ۳۰ °C و pH=۵/۵

بحث

با توجه به این‌که درصد قابل‌توجهی از انسان‌ها غذای مصرفی خود را به‌صورت آماده یا فرآوری شده مصرف می‌کنند درنتیجه نیاز به نگه‌داری کیفیت در فرآورده‌های غذایی و جلوگیری از رشد و افزایش جمعیت باکتری‌ها در مواد غذایی گوناگون بسیار حائز اهمیت است. ازاین‌رو افزودنی‌های طبیعی مانند لیزوزیم برای افزایش کیفیت و به‌خصوص ماندگاری به محصولات غذایی اضافه می‌شود (حسین زاده و همکاران، ۱۳۹۰).به‌منظور بررسی اثرات عوامل ضد باکتریایی می‌توان از روش‌های مختلف استفاده کرد، اما در همه این روش‌ها اصول کار یکسان بوده و عبارت است از سنجیدن اثر غلظت‌های معین از یک عامل ضد باکتریایی در مهار رشد یا نابود کردن باکتری‌های مورد آزمایش می‌باشد. در تعریف MIC می‌توان گفت حداقل غلظتی از یک مهارکننده که مانع رشد میکروارگانیسم می‌شود. حداقل غلظت ممانعت کننده توسط اکثر پژوهشگران به‌عنوان معیاری برای تعیین فعالیت ضد باکتریایی نگه‌دارنده‌ها ذکرشده است. در تعریف

www.SID.ir

MBC می‌توان گفت حداقل غلظتی از یک مهارکننده که سبب نابودی میکروارگانیسم‌ها می‌شود.در مطالعه حاضر اثر ضد باکتریایی لیزوزیم علیه *استرپتوکوکوس اینیایی* و *لاکتوکوکوس گارویه* با استفاده از روش میکرودایلوشن و نیز خواندن تغییرات جذب نوری موردسنجش قرار گرفت. بر اساس نتایج موجود در مقالات لیزوزیم فعالیت آنزیمی خود را در محدوده pH بین ۳/۵ تا ۷ نشان داده است (Wang and Shelef, 1992) و به‌موازات کاهش pH برخی از باکتری‌های گرم مثبت توسط لیزوزیم ممانعت شده‌اند (Razavi-Rohani and Griffth, 1996). در تحقیقی کاهش pH تا میزان ۵/۵ سبب ممانعت از رشد *لیستریا مونوسیتوژنز* گردیده است (Johansen et al., 1994). در مطالعه‌ای اثر مهاری لیزوزیم را بر ضد *کلستریدیوم پرفرنجنس* تیپ A و توکسین تولیدی آن به روش میکرودایلوشن بررسی و مشخص شد لیزوزیم با MIC برابر با ۱۵۶ µg/ml از رشد این باکتری جلوگیری می‌کند ولی برای مهار توکسین ۱۰۰ µg/ml لیزوزیم نیاز بود (Zahang et al. 2006). در مطالعه همسو دیگر تأثیر لیزوزیم و حرارت را بر رشد *لیستریا مونوسیتوژنز* بررسی و پیشنهاد کردند لیزوزیم می‌تواند به‌عنوان نگه‌دارنده در کنترل این باکتری در غذاهایی که سرد مصرف می‌شوند استفاده شود (Smith et al., 1991). نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که کاهش pH از ۷ به ۶ و ۵/۵ می‌تواند بر حداقل غلظت مهاری لیزوزیم علیه دو باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* و *لاکتوکوکوس گارویه* تاثیر گذار و میزان MIC در بالاترین غلظت به‌کاررفته این ترکیبات (۵۰۰۰ µg/ml) در pH های ۶ و ۵/۵ مشاهده شد. این در حالی است که در pH=۷ ممانعت از رشد مشاهده نگردید (جدول ۱). در مطالعه‌ای فعالیت لیزوزیم و نایسین را به‌صورت توأم علیه باکتری‌های اسیدلاکتیک بررسی و تغییرات در طول‌موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری و بیان کردند که استفاده توأم آن‌ها موجب بهبود حداقل غلظت مهاری در مقایسه با ترکیبات به‌صورت جداگانه می‌شود (Chun and Hancock, 2000). در مطالعه‌ی دیگری برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی رشد (MIC) لیزوزیم و آویشن شیرازی بر باکتری *E. Coli* $O_{157}H_7$ با استفاده از روش‌های میکرودایلوشن و ماکرودایلوشن و همچنین اثر غلظت‌های تحت بازدارندگی این ترکیبات بر منحنی رشد این باکتری عمل کردند و نشان دادند که استفاده توأم لیزوزیم و اسانس باعث کاهش MIC نمی‌شود اما ترکیب این دو ماده باعث افزایش فاز تأخیری می‌شود که دارای اهمیت در میکروبیولوژی مواد غذایی می‌باشد (حسین زاده و همکاران، ۱۳۹۰). در مطالعه Razavi-Rohani and Griffiths اثر لیزوزیم و نمک BHA (Butylatedhydroxyanizole)، pH و Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) را علیه باکتری‌های پاتوژن غذایی بررسی و مشاهده کردند لیزوزیم همراه با BHA علیه باکتری‌ها (در حضور یا عدم حضور EDTA) باوجود pH پایین‌تر و غلظت نمک بالاتر اثر مهاری بالاتری داشت. لیزوزیم با شلاته کننده‌های دیگر مثل سدیم سیترات و منوگلیسرول سیترات قادر به مهار کردن نبود (Razavi-Rohani and Griffiths, 1996). در مطالعه حاضر مهار رشد باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* تحت تاثیر لیزوزیم با توجه به نتایج روش میکرودایلوشن و تغییرات جذب نوری در pH های ۶ و ۵/۵ در غلظت ۵۰۰۰ µg/ml مشاهده گردید درحالی‌که در pH=۷ مهار رشد باکتری مشاهده نشد. تغییرات جذب نوری حاصل از رشد باکتری در تمامی pH های موردمطالعه با افزایش غلظت لیزوزیم رو به کاهش بود ولی در غلظت ۵۰۰۰ µg/ml و pH های ۶ و ۵/۵ در مقایسه با مقادیر کمتر به‌طور معنی‌داری پایین بود ($P<0/05$). درحالی‌که در pH=۷ مهار رشد باکتری با توجه به تغییرات جذب نوری حتی در بالاترین غلظت به‌کاررفته لیزوزیم مشاهده نگردید.

www.SID.ir
Archive of SID

در مورد باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* آ نیز نتایج به همین صورت مشاهده شد (نمودار ۳ و ۴).

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش، لیزوزیم در مهار رشد باکتری‌های زئونوز باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* و *لاکتوکوکوس گارویه* موثر بود. همچنین کاهش مقادیر pH تاثیر معنی‌داری در فعالیت ضدمیکروبی لیزوزیم داشت، به‌گونه‌ای که بالاترین فعالیت ضد باکتریایی در pH های ۵/۵ و ۶ مشاهده شد. لذا به‌کارگیری این ترکیب ضدمیکروبی طبیعی علیه باکتری‌های موردمطالعه در pH های نسبتاً اسیدی در مقایسه با pH خنثی و بازی توصیه می‌شود.

منابع

۱. آخوندزاده بستی افشین ا، ابراهیم‌زاده موسوی حسین. ۱۳۹۲. بهداشت مواد غذایی با منشا آبزیان. انتشارات دانشگاه تهران، ص ۱۳۲-۱۵۰

۲. اخلاقی مصطفی. ۱۳۹۰. بیماری های باکتریایی شایع در پرورش ماهی مدیریت بهداشتی و پیشگیری، انتشارات دانشگاه شیراز، ص ۸۰-۸۵.

۳. حسین زاده اعظم ,مهاجرفر طاهره ,آخوندزاده بستی افشین ,خنجری علی ,گندمی نصرآبادی حسن ,میثاقی علی ,صادقی سمیه. ۱۳۹۰. تعیین حداقل بازدارندگی (MIC) لیزوزیم و آویشن شیرازی بر باکتری *E.coli* $O_{157}H_7$. *فصلنامه گیاهان دارویی*، ۸: ۲۰۸- ۲۱۷.

۴. مرتضوی سید علی و صادقی ماهونک علیرضا. ۱۳۸۲ میکروبیولوژی غذایی ادمز. مشهد، انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد،۱۳۸۲: صص ۱۵، ۲۰۲، ۲۰۳، ۲۱۴ و ۲۱۵.

5. Alxander, O.G., Richard, A.H. 2003. Interactiv inhibition of meat spoilage and pathogenic bacteria by lysozyme, nisin and EDTA in the presence of nitrite and sodium chloride at 24^0c. Int J food Microbiol. 80: 251-259.

6. Ansari, M., Raissy, M., Rahimi M. 2012. Determination of florfenicol residue in rainbow trout muscles by HPLC in Chaharmahal va Bakhtiari Province, Iran. Comparative Clinical Pathol. 23(1): 61-2.

7. Baeck, G.W., Kim, J.H., Gomez, D.K., Park, S.C. 2006. Isolation and characterization of *Streptococcus sp*. from diseased flounder (*Paralichthys olivaceous*) in Jeju Island. J Vet Scie. 7(1): 53-8.

8. Barakat, R.K., Griffiths, M.W., Harris, L.J. 2000. Isolation and characterization of *Carnobacterium*, *Lactococcus*, and *Enterococcus sp*. from cooked, modified atmosphere, packaged, refrigerated poultry meat. Int J Food Microbiol. 62 (1-2): 83-94.

9. Carvalho, M.G., Vianni, M.C., Elliot, J.A., Reeves, M., Facklam, R.R. 1997. Molecular analysis of *Lactococcus garvieae* and *Enterococcus gallinarum* isolated from water buffalos with subclinical mastitis. Advances in Experiment Med and Biol. 418: 401-4.

10. Chun, W., Hancock R.E.W. 2000. Action of lysozyme and nisin mixtures against lactic acid bacteria. Int J Food Microbiol. 60: 25-32.

11. De Roos, A.L., Walstra, P.J., Geurts, T. 1998.The association of lysozyme with casein. Int Dairy J. 8: 319-329.

12. Dembczynski, R., Regulski T. 2002. Lysozyme extraction from hen egg white in an aqueous two- phase system composed of

Archive of SID

www.SID.ir

lysozyme dextran conjugate. J Agric Food chem. 39: 647-650.

21. Nakamura, S., Kato, A., Kobayashi, K. 1990. Novel bifunctional lysozyme –dextran conjugate that acts on both gram-negative and gram –positive bacteria. Agric Biological Chem. 54: 3057-3059.

22. Palacios, M.A., Zamora, M.J., Vasquez, J., Zamora, E., Duran, A. 1993. *Streptococcosis* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Spain. Bollettino societa' italiana patologia ittica.*13: 11*-6.

23. Pereira, F., Ravelo, C., Toranzo, A.E., Romalde, JL. 2004. *Lactococcus garvieae,* an emerging pathogen for the Portuguese trout culture. Bulletin of European Association of Fish Patholo. 24(6):274-9.

24. Ponkham P., Daduang S., Kitimasak, W. 2010. Complete amino acid sequence of three reptile lysozyme, J Comparative Biochem and physiol. 151: 75-83.

25. Rantsiou, K., Urso, R., Iacumin, L., Cantoni, C., Cattaneo, P. 2005. Culture-dependent and independent methods to investigate the microbial ecology of Italian fermented sausages. Appl Environmental Microbiol. 71 (4): 1977-86.

26. Ravelo, C., Magarin˜os, B., Lo´pezRomalde, S., Toranzo, A.E., Romalde JL. 2003. Molecular fingerprinting of fish-pathogenic *Lactococcus garvieae* strains by random amplified polymorphic DNA analysis. J Clinical Microbiol. 41(2): 751-6.

27. Razavi-Rohani S.M., Griffiths M.W. 1996 the effect of lysozyme and butylated hydroxyanizole on spoilage and pathogenic bacteria associated with food. J Food Safety. 59- 74.

28. Smith, J.L, Mccolgan, C., Marmer BS. 1991. Growth temperature and action of ethylene oxide and propylene oxide thermoseparating copolymer and potassium phosphate process. Biochem. 45: 369-374.

13. Deveriese, L.A., Hommez, J., Laevens, H., Banadme, P. Haesebrouck, F. 1999. Identification of aesculinhydrolyzing *streptococci* and *enterococci* from subclinical intramammary infections in dairy cows. Vet Microbiol. 70 (1-2): 87-94.

14. Dood, H.M., Horn, N., Giffard, C.J. 1996. A gene replacement strategy for engineering nisin. Microbiol. 142: 47-55.

15. Eldar, A., Ghittio, C. 1999. *Lactococcus garviea* and *Streptococcus iniae* infection in rinbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), similar but different diseases. Dis. Aquat. Org. 36: 227-231.

16. Habeeb, A.F.S.A. 1966. Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzenesulfonic acid . Anal Biochem. 14: 328-336.

17. Johnson, E.A., Larson, A.E. 2005. Lysozyme. in Antimicrobial in foods. Eds. Davidson, P.M., Sofos, N.J., Branen, A.L., New York, 361-387.

18. Knubovets, T., Osterhout J.J., Connolly P.J. 1999. Structure, thermostability, and conformational flexibility of hen egg-white lysozyme dissolved in glycerol. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1262-1267.

19. Mata, A.I., Blanco, M.M., Duminguez, L., Fernandez-Garayzabal J.F. 2004. Development of a PCR assay for *Streptococcus iniae* based on the lactate oxidase (IctO) gen with potential diagnostic value. Vet Microbiol. 101(2): 109-116.

20. Nakamura, S., Kato, A., Kobayashi K. 1991. New antimicrobial characteristics of

Archive of SID
www.SID.ir

30. Zahang, G., Darius, S., Smith SR. 2006. In vitro inhibitory effect of hen egg white lysozyme on Clostridium perfringenstype A associated white broiler necrotic enteritis and its toxin production. Letters in Appl Microbiol. 24: 138-144.

lysozyme on *Listeria monocytogenes.* Food Sci. 56: 1101-1103.

29. Valerie, A., Cunningham, F.E., Daiel Y.C., 2009. The chemistry of lysozyme and its use as a food preservative and a pharmaceutical, Food Sci. and Nutr. 26 (4): 359-395.

Archive of SID

www.SID.ir

Study on the effect of lysozyme on zoonosis bacteria: *Streptococcus iniae* and *Lactococcus garviea* isolated from meat of reared rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*)

Mahmoudi M[1], Nematollahi A[2*], Moshtaghi H[2], Boniadian M[2]

1. Graduated of Aquatic Animal Health (Msc), Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.

2. Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.

***Corresponding author:** *anematolahi@yahoo.com*

Received: 22 April 2017 Accepted: 29 November 2017

Abstract

Streptococcus iniae and *lactococcus garviea* are causative agents of Streptococcosis and Lactococcosis respectively, diseases in fish. These diseases can be transmitted to humans by direct contact or consumption of infected fish. In recent years, these diseases had largely occured in fish farms in Iran. The aim of this study was to evaluate the effect of lysozyme on *S. iniae* and *L. garviea* and also to determine MIC and MBC of different concentrations of lysozyme on the bacterial growth. Thus, antimicrobial effect of different concentrations of Lysozyme (19/53, 78/13, 89/06, 156/25, 312/5, 625, 1250, 2500 and 5000 µg/ml) against *S. iniae* and *L. garviea* isolated form rainbow trout in Chaharmahal and Bakhtiari province was investigated using the spectrophotometric and microdilution methods in three pH including: 5/5, 6 and 7. Results of microdilution showed the inhibition of the growth of both bacteria effect by Lysozyms at pH=6 and concentration of 5000 µg/ml, whereas, at pH=7 was observed inhibition. Spectrophotometric method showed that the growths of both bacteria were decreased with increasing concentrations of lysozyme in various pH. In comparison, the inhibition in Lysozyme concentration of 5000 µg/ml at pH=6 and 5/5 was significantly lower that others (p<0/05). In conclusion, lysozyme was inhibited the growth of *S. iniae* and *L. garviea* and also pH reducing had a significant effect on the antimicrobial activity of lysozyme.

Keywords: *Streptococcus iniae*, Rainbow trout, *Lactococcus garviae*, Lysozyme.

Archive of SID

www.SID.ir