

# تأثیر برخی از مواد نگاهدارنده شیمیایی و طبیعی در غلظت‌های کمتر از غلظت مهارکننده بر رشد لیستریا منوسیتوژنز جدا شده از شیر

آمنه نصر<sup>۱\*</sup>، روحا کسری کرمانشاهی<sup>۲</sup>، ایرج نحوی<sup>۳</sup>

۱- کارشناسی ارشد میکروبیولوژی دانشگاه اصفهان

۲- دکتری میکروبیولوژی و استاد گروه میکروبیولوژی دانشگاه اصفهان

۳- دکتری میکروبیولوژی و استاد گروه میکروبیولوژی دانشگاه اصفهان

## چکیده

نگهداری غذا امروزه شامل به کار بردن روشهایی جهت به حداقل رساندن آلودگی است که یکی از این راهها افزودن مواد نگاهدارنده غذایی می‌باشد. این مواد با دخالت در اعمال غشای سلولی، فعالیت آنزیمی یا ساختارهای ژنتیکی بر ریزسازواره‌ها اثر بازدارندگی دارند. در این تحقیق اثر مواد نگاهدارنده مختلف بر روی منحنی رشد باکتری لیستریا منوسیتوژنز جدا شده از شیر مورد بررسی قرار گرفت. به این صورت که ابتدا منحنی رشد باکتری در عدم حضور مواد نگاهدارنده رسم شد و سپس منحنی رشد باکتری در حضور اسید سیتریک که یک ماده نگاهدارنده شیمیایی است و نیزین که یک ماده نگاهدارنده طبیعی است در غلظت‌های کمتر از حداقل غلظت مهارکننده (sub-MIC) رسم شد. همچنین منحنی رشد این باکتری در حضور اسید استیک و سیترات سدیم به طور توأم در غلظت‌های مختلف رسم شده و تغییرات pH در این مدت بررسی شد. لیستریا منوسیتوژنز در حضور هیچ یک از غلظت‌های sub-MIC اسید سیتریک رشد نکرد که نشان دهنده حساسیت لیستریا منوسیتوژنز به اسید سیتریک است. این باکتری در حضور نیزین با حداقل غلظت مهارکننده (MIC) رشدی نشان نداد. اما در غلظتهای کمتر با تأخیر ۱۸ ساعته رشد کرد. اختلاف بین نمونه کنترل و سایر نمونه‌ها معنی‌دار است. همچنین اسید استیک و سیترات سدیم وقتی با هم استفاده شوند اثر یکدیگر را افزایش می‌دهند. طبق این آزمایشها لیستریا منوسیتوژنز جدا شده از غذا نسبت به غلظت‌های sub-MIC برخی از مواد نگاهدارنده مقاومت نشان می‌دهد که پیشنهاد می‌شود از کاربرد غلظت‌های sub-MIC اجتناب شود.

**کلید واژگان:** لیستریا منوسیتوژنز، نیزین، مواد نگاهدارنده، کمترین غلظت مهارکننده

## ۱- مقدمه

مواد نگاهدارنده<sup>۱</sup> برای محدود کردن رشد و فعالیت ریز سازواره‌ها در محصولات دارویی، آرایشی و غذایی استفاده می‌شوند و با دخالت در فعالیت غشای سلولی، آنزیمها یا ساختارهای ژنتیکی بر ریزسازواره‌ها اثر بازدارندگی دارند. مواد ضد میکروبی که از رشد باکتریها و مخمرها و قارچها جلوگیری می‌کنند، نگاهدارنده‌های شیمیایی یا طبیعی می‌باشند. از آن جا که هیچ یک از مواد نگاهدارنده موجود که اکنون

کنترل ریزسازواره‌ها یکی از مهمترین جنبه‌های نگهداری غذا است [۱]. حذف ارگانسیم‌های فاسدکننده و بیماری‌زا از غذاها هدف بسیاری از تحقیقات است. بیماری‌زاهای میکروبی در غذاها به طور تخمینی سالانه در ایالات متحده ۶/۵ تا ۳۳ میلیون نفر را بیمار می‌کنند و ۲/۹ تا ۶/۷ میلیارد دلار خسارت وارد می‌کنند. به طور کلی ۲۵ تا ۵۵ درصد هزینه‌ها مربوط به بیماری‌های حاصل از باکتریهای گرم مثبت است [۲].

\* مسئول مکاتبات: am\_nasr60@yahoo.com

در بین ارگانسیم‌های حساس استفاده آنها را محدود می‌کند. در نتیجه جهت بهبود فعالیت آنها راهکارهای مختلفی پیشنهاد شده است که یکی از آنها استفاده از ترکیب مواد نگهدارنده مختلف می‌باشد [۷]. تکنولوژی ترکیبی روشی است که با استفاده از ترکیب روشهای نگهداری، تغییرات ناخواسته در خصوصیات مواد غذایی به حداقل رسانده می‌شود و بنابراین به بهبود کیفیت محصول کمک می‌کند [۸]. استفاده از نیزین در حضور اسید استیک و سوربات برای کنترل لیستریا منوسیتوزنز در نگهداری طولانی پنیر پیشنهاد شده است [۹].

از آن جهت که کنترل باکتریها مخصوصاً باکتریهای بیماریزا در غذا مهم است و نیز به علت اینکه با ایجاد مقاومت در این باکتریها در برابر مواد نگهدارنده از تأثیر آنها در برابر باکتری کاسته می‌شود و سبب انتشار بیماری و به خطر انداختن سلامت جامعه می‌گردد، لذا شناسایی سویه‌های مقاوم و پیشنهاد راههایی جهت کنترل آنها در مواد غذایی ضروری است [۱۰].

لیستریا منوسیتوزنز یک باکتری بیماریزای غذایی است که باعث مسمومیت می‌شود [۱۱]. در سالهای اخیر لیستریا منوسیتوزنز مهمترین باکتری بیماریزای مورد توجه صنایع غذایی بوده که با مصرف غذا و مخصوصاً شیر ولبنیات ایجاد آلودگی می‌کند [۱۲]. خصوصیات این پراکنندگی گسترده در محیط، توانایی رشد در دمای یخچال، توانایی آغاز رشد در pH نسبتاً پایین در حدود ۴/۳ و تحمل مقادیر زیاد نمک، باکتری لیستریا منوسیتوزنز را یک بیماری‌زای خطرناک در غذا ساخته است [۱۳]. این باکتری در پنیر سفید با رطوبت حدود ۵۶-۵۵٪ و دمای ۴+ درجه بیش از سه ماه زنده می‌ماند. مسمومیت‌های حاصل از این باکتری بیشتر در اثر مصرف شیر و فرآورده‌های آن به ویژه پنیر و گوشت و فرآورده‌های آن عارض می‌شود که لیستریوز<sup>۶</sup> نامیده می‌شود. در زنان باردار لیستریوز ابتدا به صورت یک سرماخوردگی با تب و لرز و سردرد شروع شده و نهایتاً ممکن است منجر به زایمان زودرس، سقط جنین و مرگ نوزاد و یا نوزاد عقب مانده ذهنی شود. همچنین باعث مننژیت و آنسفالیت، عفونت خونی، آندوکاردیت و سپتی‌سمی در نوزادان و بیماران دارای ضعف سیستم ایمنی می‌شود [۱۴]. در بیشتر مطالعات یک سویه لیستریا انتخاب شده و در حضور غلظتهای پایین‌تر از MIC

مورد استفاده هستند، ایده‌آل نمی‌باشند و کارایی و ایمنی آنها متغیر است، امکان مشخص کردن یک ماده نگهدارنده ایده‌آل حتی برای یک نوع ماده غذایی خاص وجود ندارد. در هر مورد برای تصمیم‌گیری در استفاده از سیستم محافظ باید فواید حاصل از آن را در نظر گرفت و آن را با خطری که از عدم محافظت کافی فرآورده و خطرات ناخواسته ممکن که از ماده نگهدارنده مصرفی حاصل می‌شود مقایسه کرده و کافی بودن محافظت با خطری که ماده نگهدارنده برای مصرف کننده دارد متعادل شود [۳]. اسیدهای آلی و نمک آنها مثل پروپیونیک اسید و پروپیونات ها، لاکتیک اسید، سوربیک اسید و سورباتها که از نگهدارنده‌های مورد استفاده در لبنیات هستند [۴]، به منظور اسیدی کردن و یا جلوگیری از رشد ریزسازواره‌ها یا به طور مستقیم به بعضی از غذاها اضافه می‌شوند و یا با عمل بعضی از ارگانسیمها مثل لاکتوباسیل‌ها یا باکتریهای پروپیونیک اسید تولید می‌شوند. نگهدارنده‌های طبیعی از میکروب، گیاه و حیوان منشأ می‌گیرند. دسته‌ای از پپتیدهای ضد میکروبی که خود باکتریها تولید می‌کنند باکتریوسین‌ها هستند مثل نیزین<sup>۱</sup>، پدیوسین<sup>۲</sup>، کلی‌سین<sup>۳</sup> که دارای فعالیت باکتری‌کشی هستند و به عنوان نگهدارنده در غذاها استفاده می‌شوند. در سال ۱۹۶۹ سازمان غذا و دارو<sup>۴</sup> و سازمان سلامت جهانی<sup>۵</sup> به همراه هم، استفاده از نیزین را به عنوان ماده نگهدارنده غذایی به جای مواد شیمیایی تایید کردند. بنابراین نیزین از سال ۱۹۸۷ به عنوان افزودنی مجاز در غذاها و در فرآورده‌های لبنی استفاده شده است. امروزه نیزین به عنوان یک ماده نگهدارنده در بیش از ۵۰ کشور در سراسر دنیا در محصول‌های متنوع مثل پنیر، غذاهای کنسرو شده و گوشت نمک‌زده استفاده می‌شود [۵]. یک نگرانی عمده در مورد استفاده از مواد نگهدارنده طبیعی امکان ایجاد مقاومت در باکتریها به صورت طبیعی یا اکتسابی است. فرکانس مقاومت به نیزین در باکتری لیستریا منوسیتوزنز بین ۱۰<sup>-۹</sup> تا ۱۰<sup>-۵</sup> مشاهده شده است [۶]. باکتریوسین‌های باکتری‌های لاکتیک اسید رشد باکتری‌های بیماری‌زا و مولد فساد را مهار می‌کنند اما طیف کم فعالیت آنها و عدم مهار باکتری‌های گرم منفی و مخمرها و نیز ایجاد جمعیت‌های مقاوم

1. nisin
2. pediocin
3. colicin
4. FDA: Food and Drug Administration
5. WHO: World Health Organization

6. Listeriosis

با استفاده از فیلتر ۰/۴۵ میکرومتری سترون شد و در دمای ۲۰°C - منجمد شد [۱۷]. جهت تهیه محلول ۱۰٪ اسیدهای آلی ۱۰ گرم از پودر آنها در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد. سپس با استفاده از فیلتر ۰/۴۵ میکرومتری سترون شده و در دمای ۴°C نگهداری شد. جهت تهیه رقت‌های مختلف از آب مقطر سترون استفاده شد.

**تعیین حداقل غلظت مهار کننده (MIC) و حداقل غلظت کشنده مواد نگاهدارنده (MBC) به روش رقت لوله‌ای:** میزان MIC و MBC مواد نگاهدارنده مختلف بر روی باکتری لیستریا منوسیتوژنز جدا شده تعیین و با لیستریا منوسیتوژنز PTCC1164 مقایسه شد. برای این کار از روش رقت لوله‌ای به تعداد ۱۰ لوله آزمایش استفاده گردید. یک میلی لیتر از ماده نگاهدارنده سترون در لوله شماره یک و یک میلی لیتر در لوله شماره دو ریخته شد. سپس از محیط کشت TSB سترون به میزان یک میلی لیتر در لوله‌های شماره ۲ تا ۱۰ اضافه شد. جهت تهیه سری رقت محتویات لوله ۲ خوب مخلوط شده و یک میلی لیتر از آن به لوله شماره ۳ اضافه شد. سپس از لوله ۳ به لوله ۴ و به همین ترتیب تا لوله شماره ۹ ادامه داده شد. به این صورت که از لوله ۹ یک میلی لیتر برداشته و دور ریخته شد. از کشت شبانه میکروبی که حاوی  $10^8 \text{ CFU/ml}$  باکتری است به هر لوله یک میلی لیتر اضافه شد. حجم نهایی هر لوله ۲ میلی لیتر است. لوله ۱۰ به عنوان کنترل مثبت است و حاوی ۱ میلی لیتر محیط کشت و ۱ میلی لیتر باکتری است. لوله ۱ به عنوان کنترل منفی است و حاوی ۱ میلی لیتر ماده ضد میکروبی و ۱ میلی لیتر باکتری می‌باشد. لوله‌ها به مدت ۱۶ تا ۲۰ ساعت در دمای ۳۷°C گرمخانه‌گذاری شد. سپس لوله‌ها از نظر وجود کدورت بررسی گردید. حداقل غلظتی که در آن غلظت ماده نگاهدارنده رشد باکتری را مهار کرده است و لوله شفاف دیده می‌شود مشخص کننده میزان MIC آن ماده است [۱۸].

**بررسی تأثیر مواد نگاهدارنده در غلظت‌های sub-MIC بر منحنی رشد باکتری لیستریا منوسیتوژنز:** ابتدا منحنی رشد باکتری لیستریا منوسیتوژنز بدون حضور ماده نگاهدارنده رسم شد. به این صورت که ۵۰ میلی لیتر باکتری ( $10^9 \text{ CFU/ml}$ ) به ارلن حاوی ۴۵۰ میلی لیتر نوترینت برات تلقیح شد. جهت بررسی غلظت‌های مختلف مواد نگاهدارنده در آزمایش‌های

باکتریوسین کشندگی آن بررسی می‌شود. به نظر می‌رسد که یک سیستم مایع برای بررسی مقاومت باکتریها مناسبتر باشد [۱۵].

## ۲- مواد و روشها

**الف- مواد مورد استفاده:** شیر غیر پاستوریزه تهیه شده از سطح شهر، سرم فیزیولوژی، نیزین از شرکت زیگما آلدریچ انگلیس، محیط کشت تریپتون سوی برات<sup>۱</sup> از شرکت بیومریوکس فرانسه، محیط کشت نوترینت آگار، نوترینت برات و مولر هیتون آگار از شرکت مرک آلمان، کیت رنگ آمیزی گرم از شرکت فن آوری روز آزمون، باکتری لیستریا منوسیتوژنز PTCC1164 از کلکسیون میکروبی ایران تهیه شد.

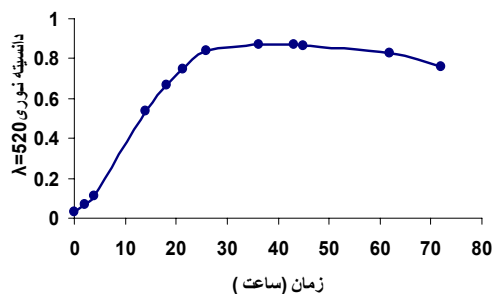
**ب- وسایل مورد استفاده:** دستگاه فیلتراسیون مدل Soviriel از فرانسه، فیلتر ۰/۴۵ میکرومتری، شیکر مدل Heraeus، دستگاه اسپکتروفتومتر UV مدل Shimadzu

**ج- روش کار:** برای جداسازی باکتری، ۱۰ گرم از شیر غیر پاستوریزه تهیه شده از سطح شهر در شرایط سترون با ۹۰ میلی لیتر محلول رینگر به طور کامل مخلوط گردید و از آن سری رقت (تا رقت  $10^{-4}$ ) تهیه شد. از رقت‌های مختلف از هر یک از نمونه‌ها یک میلی لیتر بر روی پلیت‌های نوترینت آگار ریخته و به آرامی با میله شیشه‌ای سرکچ در سطح پلیت پخش شد. این کار برای هر نمونه ۲ بار تکرار شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷°C قرار گرفتند. 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 وژیرسکوثر، رشد در ۴۵°C و تخمیر هیدرات‌های کربن (گلوکز، آرابینوز، گزیلوز، مانیتول، ترهالوز، ساکاروز، سلوبیوز، رافینوز، گالاکتوز) سپس باکتری لیستریا منوسیتوژنز شناسایی شده به علت داشتن قدرت بیماری‌زایی آن انتخاب و جهت بررسی حساسیت آن نسبت به مواد نگاهدارنده مختلف مورد بررسی قرار گرفت [۱۶]. جهت تهیه محلول ذخیره مواد نگاهدارنده مختلف به این صورت عمل شد: مقدار ۱۰۰ میلی گرم از نیزین (نیزاپلین ۲/۵٪) در ۱۰ میلی لیتر اسیدکلریدریک ۰/۰۲ نرمال حل شد تا غلظت آن به  $10^4 \text{ IU/ml}$  برسد سپس

2. Minimum Inhibitory Concentration  
3. Minimum Bactericide Concentration

1. TSB: Trypton Soy Broth

$H^+$  باعث اسیدی شدن محتوای سلول شده و دیواره سلول آنیون اسیدهای آلی را متابولیزه می‌کند. شاید این علت اصلی مرگ ریزسازواره 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 منوسیوتوزنز در معرض اسید، باکتری را در برابر اسیدیته بیشتر سازگار می‌کند [۲۱]. MIC به دست آمده برای نیزین بر روی سویه لیستریا منوسیوتوزنز مورد بحث با نظر Sandine و Benkerroum در سال ۱۹۸۸ مبنی بر اینکه MIC نیزین برای سویه‌های مختلف لیستریا منوسیوتوزنز ۱۰۰۰-۱/۸۵ IU/ml است مطابقت دارد [۱۰]. این دو پژوهشگر حساسیت سویه های مختلف لیستریا منوسیوتوزنز را نسبت به نیزین با روش چاهک پلیت تعیین کردند و ذکر کردند که اثر نیزین بر لیستریا منوسیوتوزنز بسیار وابسته به سویه است. حساسیت لیستریا منوسیوتوزنز به نیزین با کاهش pH افزایش می‌یابد. این افزایش یا به علت افزایش کارایی نیزین در pH پایین و یا به دلیل افزایش اثر اسیدیته با نیزین است [۲۲]. با مقایسه MIC به دست آمده برای لیستریا منوسیوتوزنز مشخص می‌شود که باکتری مورد بررسی مشابه سویه‌های دیگر به نیزین حساسیت نشان می‌دهد و میزان MIC به دست آمده مشابه MIC نیزین در برابر لیستریا منوسیوتوزنز ATCC15313 است [۲۳]. منحنی رشد باکتری لیستریا منوسیوتوزنز در عدم حضور ماده نگهدارنده در شکل ۱ آورده شده است. سپس منحنی رشد باکتریها با حضور مواد نگهدارنده در غلظت‌های مختلف رسم شد تا واکنش باکتری‌ها نسبت به آنها بررسی شود.



شکل ۱ منحنی رشد باکتری لیستریا منوسیوتوزنز جدا شده از شیر بدون حضور ماده نگهدارنده

بعدی غلظت‌های مختلفی از اسید سیتریک، نیزین، اسید استیک و سترات سدیم به محیط کشت نوترینت برات اضافه گردید. آنگاه پس از هم زدن ارلن اولین نمونه گیری به عنوان زمان صفر انجام شد و جذب نوری مایع در طول موج ۵۲۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده شد. ارلن حاوی محیط کشت و باکتری در انکوباتور شیکردار با دمای  $37^{\circ}C$  و با دور rpm ۱۰۰ قرار داده شد. هر ۲ ساعت یکبار جذب نوری مایع در طول موج فوق‌الذکر خوانده شد و در نهایت منحنی رشد باکتری رسم شد.

### ۳- نتایج و بحث

از آنجا که سمیت اسیدهای آلی به طور ابتدایی با یون های هیدروژن ایجاد نمی‌شود بلکه به واسطه مولکول جدا نشده است، بنابراین سمیت این مواد بر روی ریزسازواره بستگی به نوع اسید آلی، غلظت آن و دمای گرمخانه‌گذاری دارد [۱۹]. باکتری لیستریا منوسیوتوزنز جدا شده نسبت به بنزوات سدیم، اسید سیتریک، اسید بنزویک، سترات سدیم، اسید سوربیک، سوربات پتاسیم، اسید استیک و اسید پروپیونیک از باکتری استاندارد مقاومتر است. یک تفاوت قابل توجه در اثر مواد نگهدارنده مختلف تست شده بر روی لیستریا منوسیوتوزنز وجود دارد. بنابراین می‌توان آنها را به ترتیب کاهش قدرت عمل نگهدارندگی در شرایط آزمایش به این ترتیب مرتب کرد: نیزین با غلظت  $3/125 \mu g/ml$  (معادل با  $125 IU/ml$ )، اسید بنزویک با غلظت  $0/0125$ ، اسید استیک با غلظت  $0/0625$ ، اسید سیتریک با غلظت  $0/075$ ، اسید سوربیک با غلظت  $1/1$ ، اسید پروپیونیک با غلظت  $1/25$ ، سترات سدیم با غلظت  $1/5$ ، سوربات پتاسیم با غلظت  $2/5$  و بنزوات سدیم با غلظت  $7$ .

تأثیر بیشتر اسید استیک نسبت به اسید سیتریک توسط Robert در سال ۲۰۰۲ مشاهده شد که مشابه با نتایج این تحقیق می‌باشد [۲۰]. طبق نتایج حاصل باکتری لیستریا منوسیوتوزنز مورد بررسی نسبت به سویه‌های دیگر این باکتری که توسط Marth و Ahamad در سال ۱۹۸۹ بررسی گردیده بودند در برابر اسید سیتریک و اسید استیک مقاومتر است [۴]. 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 می‌شود. رها شدن پروتون

جدول ۱ مقایسه MIC مواد نگاهدارنده شیمیایی و

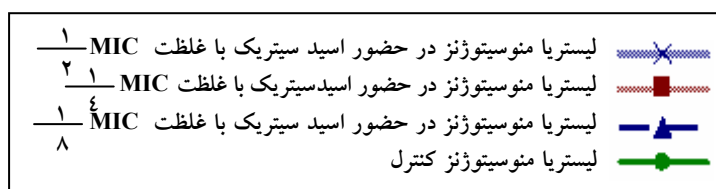
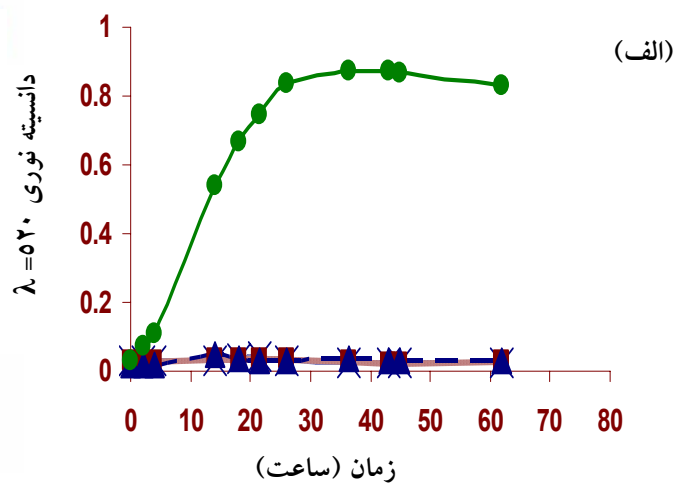
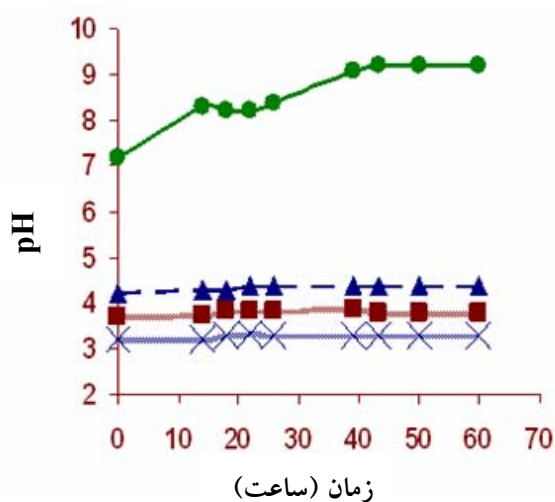
جدول ۲ مقایسه MBC مواد نگاهدارنده شیمیایی و

طبیعی در محیط TSB بر روی لیستریا منوسیتوژنز  
جدا شده از شیر و لیستریا منوسیتوژنز PTCC1164

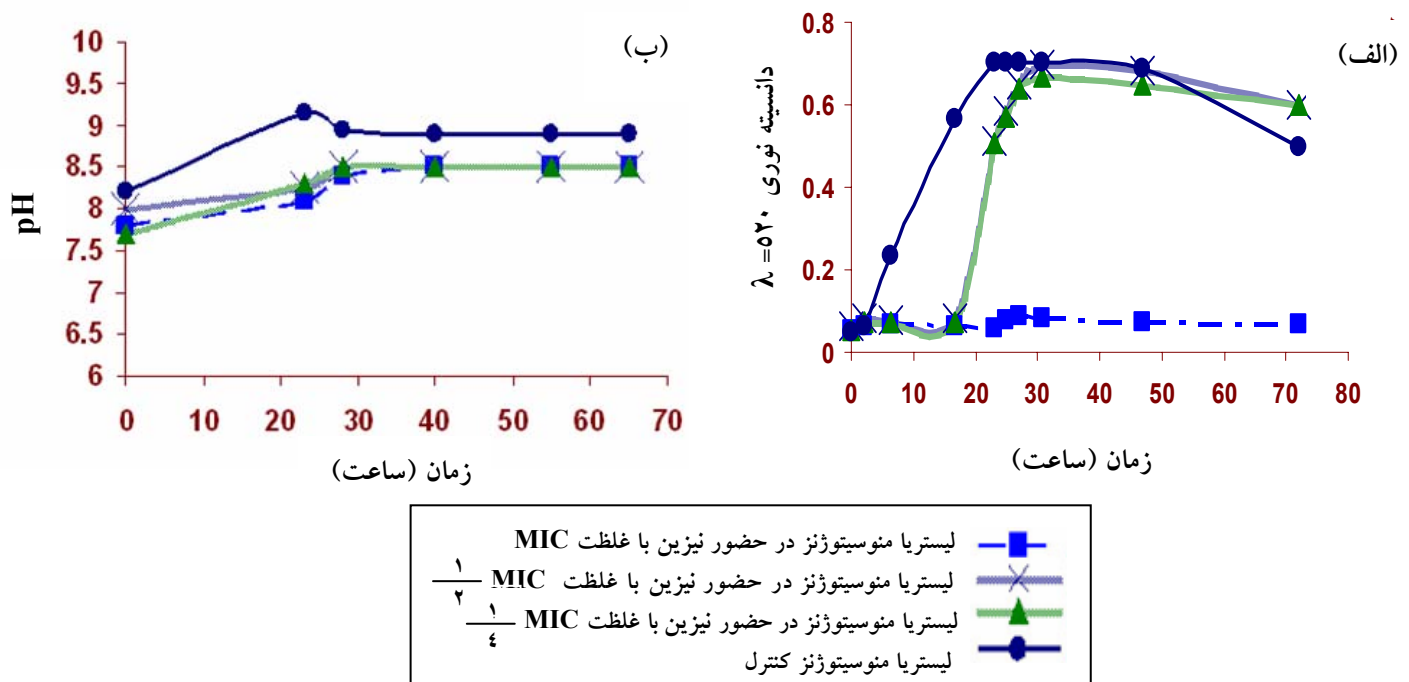
طبیعی در محیط کشت TSB بر روی لیستریا منوسیتوژنز  
جدا شده از شیر و لیستریا منوسیتوژنز PTCC1164

MBC بر حسب g/ml		نام مواد نگاهدارنده	طبیعی
لیستریا منوسیتوژنز PTCC1164	لیستریا منوسیتوژنز جدا شده		
٪۰/۱۸۷	٪۱/۵	اسید سیتریک	شیمیایی
٪۰/۰۰۶۲۵	٪۰/۰۲۵	اسید بنزویک	
٪۰/۷۵	٪۳	سیترات سدیم	
٪۱/۷۵	٪۷	بنزوات سدیم	
٪۱	٪۲	اسید سوربیک	
٪۰/۶۲۵	٪۵	سوربات پتاسیم	
٪۰/۶۲۵	٪۱/۲۵	اسید استیک	
٪۰/۶۲۵	٪۲/۵	اسید پروپیونیک	
۵۰۰ IU/ml	۱۲۵ IU/ml	نیزین	طبیعی

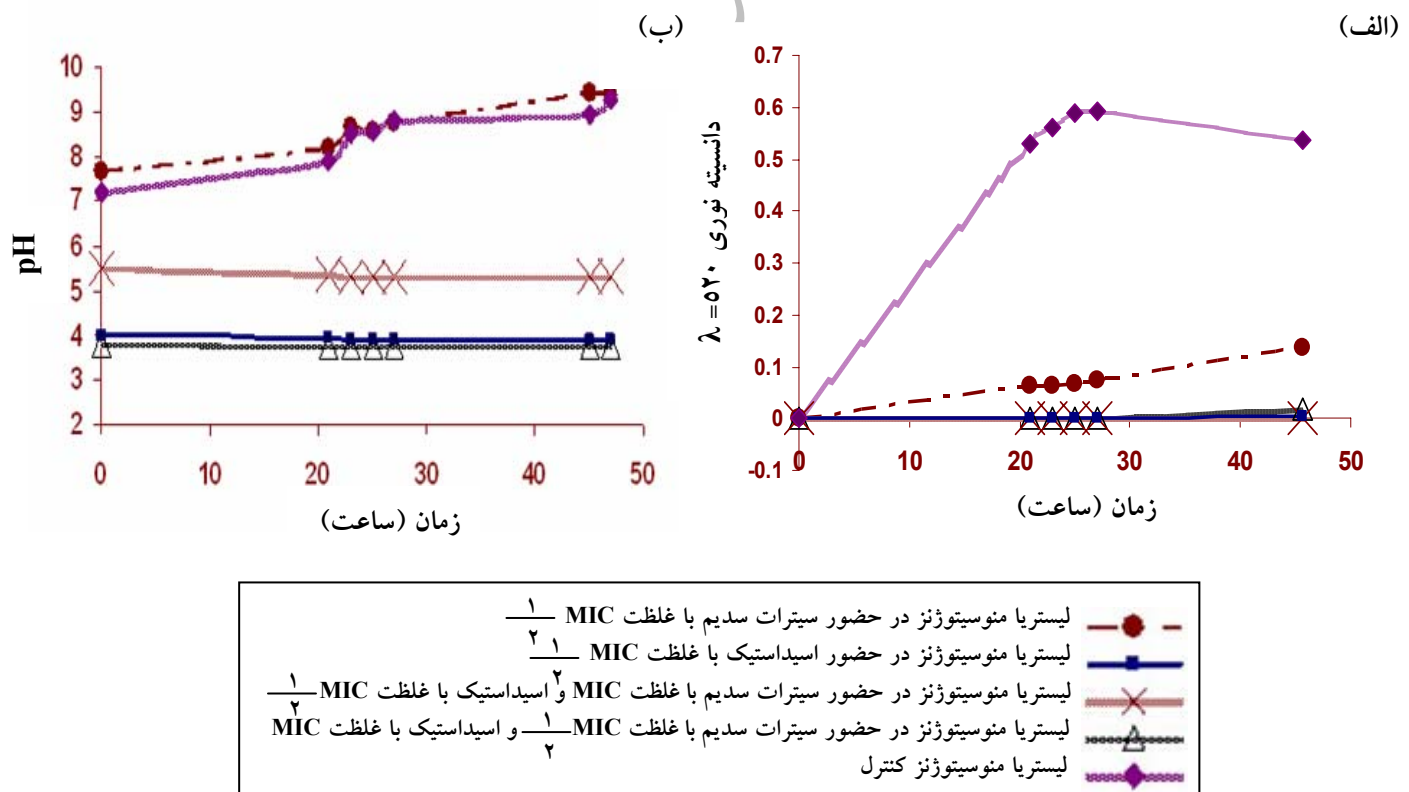
MIC بر حسب g/ml		نام مواد نگاهدارنده	طبیعی
لیستریا منوسیتوژنز PTCC1164	لیستریا منوسیتوژنز جدا شده		
٪۰/۱۸۷	٪۰/۷۵	اسید سیتریک	شیمیایی
٪۰/۰۰۶۲۵	٪۰/۰۱۲۵	اسید بنزویک	
٪۰/۷۵	٪۱/۵	سیترات سدیم	
٪۱/۷۵	٪۷	بنزوات سدیم	
٪۱	٪۱	اسید سوربیک	
٪۰/۶۲۵	٪۲/۵	سوربات پتاسیم	
٪۰/۶۲۵	٪۰/۶۲۵	اسید استیک	
٪۰/۶۲۵	٪۱/۲۵	اسید پروپیونیک	
۵۰۰ IU/ml	۱۲۵ IU/ml	نیزین	طبیعی



شکل ۲ منحنی رشد لیستریا منوسیتوژنز در حضور اسید سیتریک با غلظت های  $\frac{1}{8}$  MIC،  $\frac{1}{4}$  MIC و  $\frac{1}{2}$  MIC (الف) و تغییرات pH محیط کشت در حضور غلظت های  $\frac{1}{8}$  MIC،  $\frac{1}{4}$  MIC و  $\frac{1}{2}$  MIC (ب) اسید سیتریک



شکل ۳ منحنی رشد لیستریا منوسیتوژنز در حضور نیزین با غلظت های MIC، MIC و MIC (الف) و تغییرات pH محیط کشت در حضور غلظت های MIC، MIC و نیزین (ب)



شکل ۴ بررسی بر هم کنش اسید استیک و سیترات سدیم بر روی باکتری لیستریا منوسیتوژنز (الف) و تغییرات pH محیط کشت در حضور غلظت های مختلف اسید استیک و سیترات سدیم (ب)

استفاده از تکنولوژی ترکیب مواد نگاهدارنده می‌تواند به محافظت مؤثر محصول کمک شایانی کند.

## ۵- منابع

- [1] Beales N. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2004; 3: 1-18.
- [2] Morgan SM, Galvin M, Kelly J, Ross RP and Hill C. Development of a lactacin 3147-enriched whey powder with inhibitory activity against foodborne pathogens. *Journal of Food Protection* 1999; 62: 1011-1016.
- [۳]. برد، ر. م. و بلوم فیلد، س. ف. ترجمه فضلی بزاز، ص. ۱۳۷۸. تضمین کیفیت در برابر میکروبها در فرآورده های آرایشی، بهداشتی و داروهای غیر استریل. انتشارات دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ۱۲۱-۱۰۱، ۱۵۷، ۱۹۸-۱۹۳.
- [4] Davidson Pm and Hrisson MA. Resistance and adaptation to food antimicrobials, sanitizers, and other process controls. *Food Technology* 2002; 56: 69-77.
- [5] Broughton JD. Nisin and its uses as a food Preservative. *Food Technology* 1990; 100-112.
- [6] Gravesen A, Jydegaard Axelsen AM, Mendes da silva J, Hansen TB and Knøchel S. Frequency of bacteriocin resistance development and associated fitness costs in *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002; 68: 756-764.
- [7] Mulet-Powell N, Lacoste-Armynot AM, Vinas M and Simeon De Buovhberg M. Interactions between pairs of bacteriocins from lactic bacteria. *Journal of Food Protection* 1998; 61: 1210-1212.
- [8] Russell AD, Hugo WB and Ayliffe GA. Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization. Third edition. 1999; 485-523.
- [9] Davies EA, Bevis HE and Delves-Broughton. The use of bacteriocin, nisin, as a preservative in ricotta type cheeses to control the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*. 1997; 24: 343-346.

مهار شدن باکتری در غلظت کمتر از MIC مواد نگاهدارنده نشان دهنده حساسیت بیشتر باکتری به آن ماده است. منحنی رشد لیستریا منوسیوتوزنز در حضور اسید سیتریک با غلظتهای sub-MIC یعنی  $1/2$  MIC،  $1/4$  MIC و  $1/8$  MIC رسم شد که نتایج آن در شکل ۲ آمده است. نتایج مربوط به رشد باکتری لیستریا منوسیوتوزنز در حضور نیزین با غلظت‌های sub-MIC در شکل ۳ آمده است. همچنین منحنی رشد باکتری لیستریا منوسیوتوزنز در حضور اسید استیک و سیترات سدیم رسم شد که در شکل ۴ نشان داده شده است. شکل ۲ نشان می‌دهد که باکتری لیستریا منوسیوتوزنز در حضور اسید سیتریک در هیچ یک از غلظت‌های sub-MIC رشد نکرد که قدرت زیاد اسید سیتریک در مهار لیستریا منوسیوتوزنز را نشان می‌دهد. اختلاف بین نمونه کنترل و سایر نمونه‌ها معنی‌دار است. در محیط دارای اسید سیتریک با غلظتهای یک به دو، یک به چهار و یک به هشت به ترتیب pH در دامنه ۳/۳-۳/۲، ۳/۷-۳/۸ و ۴/۲-۴/۳۶ ثابت باقی ماند و باکتری قادر به تعدیل pH و رشد نبود. تفاوت بین منحنی‌های pH نیز معنی‌دار است.

نتایج مربوط به اثر نیزین بر باکتری لیستریا منوسیوتوزنز در شکل (۳) آمده است. این باکتری در حضور نیزین با غلظت برابر با MIC رشدی نشان نداد. اما در غلظت کمتر یعنی  $1/2$  MIC و  $1/4$  MIC با تأخیر ۱۸ ساعته رشد کرد. اختلاف بین نمونه کنترل و سایر نمونه‌ها معنی‌دار است. اثر تشدیدکنندگی اسیداستیک و سیترات سدیم بر روی لیستریا منوسیوتوزنز با رسم منحنی رشد باکتری در حضور اسیداستیک به تنهایی، سیترات سدیم به تنهایی، اسیداستیک در حضور سیترات سدیم و سیترات سدیم در حضور اسیداستیک همانطور که در شکل (۴) نشان داده شده است تأیید شد. لیستریا منوسیوتوزنز در حضور سیترات سدیم ( $1/2$  MIC) رشد کندی نشان داد و OD را به میزان ۰/۱ افزایش داد. اما در حضور اسیداستیک ( $1/2$  MIC) هیچ رشدی نشان نداد و pH در محدوده ۴-۳/۹۲ ثابت باقی ماند. اگر این دو ماده با هم ترکیب شوند و سیترات سدیم در غلظت MIC و اسیداستیک در غلظت  $1$  MIC باشد، pH در ۵/۳۶-۵/۵ ثابت باقی مانده و باکتری هیچ رشدی نشان نمی‌دهد. همچنین با ترکیب اسیداستیک در غلظت MIC و سیترات سدیم در غلظت  $1$  MIC، باکتری هیچ رشدی ندارد و pH در ۳/۷۵-۳/۸ ثابت می‌ماند. این نتایج نشان می‌دهد که

- [۱۸]. ناظم، ح. ۱۳۶۵. 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، ۴۲-۴۱.
- [19] Ahamad N and Marth EH. Behavior of *Listeria monocytogenes* at 7, 13, 21, and 35°C in tryptose broth acidified with acetic, citric, and lactic acid. *Journal of Food Protection* 1989; 52: 688-695.
- [20] Roberts AK. The effect of sorbic acid on the survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus* on shredded cheddar and mozzarella cheese. Thesis submitted to the Faculty of Virginia Polytechnic Institute & State University, Blacksburg. 2002.
- [21] Ellin Doyle M. Literature survey of the various techniques used in *Listeria* intervention. 1999. (<http://www.wisc.edu/fri/briefs.htm>).
- [22] Pawar DD, Malik SVS, Bhilegaonkar KN and Barbuddhe SB. Effect of nisin and its combination with sodium chloride on the survival of *Listeria monocytogenes* added to raw buffalo meat mince. *Meat Science*. 2000; 56: 215-219.
- [23] Harris LJ, Fleming HP and Klaenhammer TR. Sensitivity and resistance of *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, ScottA, and UAL500 to nisin. *Journal of Food Protection* 1991; 54: 836-840.
- [10] De Martinis ECP, Crandall AD, Mazzotta AS and Montville TJ. Influence of pH, salt, and temperature on nisin resistance in *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*. 1997; 60, 420-423.
- [11] Zapico P, Medina M, Gaya P. and Nuñez M. Synergistic effect of nisin and the lactoperoxidase system on *Listeria monocytogenes* in skim milk. *International Journal of Food Microbiology* 1998; 40, 35-42.
- [12] El-ziney MG and Debevere JM. The effect of reuterin on *listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in milk and cottage cheese. *Journal of Food Protection* 1998; 61: 1275-1280.
- [۱۳]. مهدی زاده، م. ا. و علیپور، م. م. ۱۳۷۷. آلودگیهای باکتریایی و قارچی مواد غذایی، انتشارات ارکان، اصفهان، ۸۱-۹۱-۹۳.
- [14] Jay JM. *Modern food microbiology*. Fourth edition. Chapman & Hall. New York. Londo. 1992; p102.
- [15] Song H-J and Richard J. Antilisterial activity of three bacteriocins used at sub minimal inhibitory concentrations and cross-resistance of the survivors. *International Journal of Food Microbiology* 1997; 36: 155-161.
- [16] Barrow GI and Feltham RKA. *Cowan and steel's manual for the identification of medical bacteria*. Third edition. Cambridge University Press. England. 1993; 51-164.
- [17] Banerjee, M and Sarkar PK. Antibiotic resistance and susceptibility to some food preservative measure of spoilage and pathogenic microorganisms from spices. *Food Microbiology* 2004; 21: 335-342.