مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال دوم، شماره۱، بهار ۱۳۸۶ ، صفحات ۲۱ تا ۳۰

بررسی تأثیر اسیدهای آلی و نایسین در غلظت‌های کمتر از مهارکننده بر رشد سویه *باسیلوس سرئوس* جدا شده از پنیر

آمنه نصر[۱]، روحا کسری کرمانشاهی[۲]، ایرج نحوی[۲]

۱- نویسنده مسئول: کارشناس ارشد میکروبیولوژی پست الکترونیکی: am_nasr60@yahoo.com
۲- استاد گروه میکروبیولوژی ، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان

تاریخ دریافت: ۸۵/۹/۲۵ تاریخ پذیرش: ۸۶/۲/۱۰

چکیده

سابقه و هدف: کاهش آلودگی یکی از راهکارهای نگهداری مواد غذایی است که با افزودن مواد نگهدارنده قابل انجام است. این مواد با تغییر ساختار و اعمال غشای سلولی، عمل آنزیم‌ها یا ساختارهای ژنتیکی میکروارگانیسم‌ها، اثر بازدارندگی روی آنها دارند.

مواد و روشها: در این تحقیق، اثر مواد نگهدارنده مختلف بر منحنی رشد باکتری *باسیلوس سرئوس* جدا شده از پنیر مورد بررسی قرار گرفت. به این صورت که ابتدا منحنی رشد باکتری در عدم حضور مواد نگهدارنده، رسم شد و سپس منحنی رشد باکتری در حضور اسید استیک که یک ماده نگهدارنده شیمیایی است و نایسین که یک ماده نگهدارنده طبیعی است، در غلظت‌های پایین‌تر از کمترین غلظت مهار کننده[۱] رسم شد. منحنی رشد این باکتری در حضور اسید سیتریک و سوربات پتاسیم به طور توأم در غلظت‌های مختلف، رسم و تغییرات pH در این مدت بررسی شد.

یافته ها: *باسیلوس سرئوس* در حضور اسید استیک با غلظت نصف کمترین غلظت مهارکننده، هیچ رشد معنی داری نداشت و pH ، در این مدت ثابت و برابر با ۵ بود اما در غلظت‌های ربع و یک هشتم کمترین غلظت مهارکننده، باکتری با تعدیل pH رشد کرد. *باسیلوس سرئوس* پس از تقریبا ۱۲ ساعت در حضور نایسین شرایط را تعدیل کرده و با افزایش pH رشد خود را شروع می‌کند. همچنین استفاده توام اسید سیتریک و سوربات پتاسیم اثر یکدیگر را افزایش داد.

نتیجه‌گیری: *باسیلوس سرئوس* جدا شده از پنیر نسبت به غلظت‌های کمتر از MIC مواد نگهدارنده مختلف مقاومت نشان می‌دهد و به همین دلیل پیشنهاد می‌شود که از کاربرد غلظت‌های کمتر از MIC اجتناب شود.

واژگان کلیدی: *باسیلوس سرئوس*، مواد نگهدارنده، کمترین غلظت مهارکننده

• مقدمه

کنترل میکروارگانیسم‌ها یکی از مهمترین جنبه‌های نگهداری مواد غذایی است (۱). میکروب‌های بیماریزا در مواد غذایی سالانه ۶/۵ تا ۳۳ میلیون نفر را در ایالات متحده بیمار و ۲/۹ تا ۶/۷ بیلیون دلار خسارت وارد می‌کنند (۲). مواد نگهدارنده[۲] با دخالت در فعالیت و ساختار غشای سلولی، آنزیم‌ها یا ساختارهای ژنتیکی، بر میکروارگانیسم‌ها اثر بازدارندگی دارند. اسیدهای آلی ضعیف که دسته‌ای از مواد نگهدارنده هستند، بر حفظ هموستازی pH اثر می‌گذارند و درنتیجه، باعث اختلال در انتقال مواد و مهار مسیرهای متابولیک می‌شوند (۳، ۱).

1 - MIC: Minimum Inhibitory Concentration
2- preservatives

Archive of SID
www.SID.ir

فعالیت ضدمیکروبی اسیدهای لیپوفیل با افزایش درجه غیراشباع بودن افزایش می‌یابد. ایزومرهای سیس اثر بیشتری نسبت به ایزومرهای ترانس دارند. اسیدهای لیپوفیل کوتاه زنجیره به دلیل حلالیت بهتر، سمّیت کمتر و مزه مطبوع به عنوان مواد ضد میکروبی انتخاب شده‌اند (۶-۴). کاهش pH ، اثر ضدمیکروبی اسیدهای آلی ضعیف را افزایش می‌دهد (۶).

باکتریوسین‌ها دسته‌ای از پپتیدهای ضدمیکروبی هستند که از باکتری‌های لاکتیک اسید[1] مانند: لاکتوکوکوس[2]، لاکتوباسیلوس[3] و پدیوکوکوس[4] تولید می‌شوند. نایسین[5]، پدیوسین[6]، کلی‌سین[7] باکتریوسین‌هایی هستند که به عنوان نگهدارنده در مواد غذایی استفاده می‌شوند. نایسین پپتیدی با ۳۴ اسید آمینه از گروه A لنتی بیوتیک‌ها[8] از باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* تولید می‌شود و در مقابل باکتری‌های گِرم مثبت مانند *لیستریا منوسیتوژنز* و باکتری‌های تولید کننده اسپور مثل گونه‌های باسیلوس و کلستریدیوم اثر باکتری‌کُشی[9] دارد (۷).

سازمان خواربار و کشاورزی ملل متحد[10] و سازمان جهانی بهداشت[11] در سال ۱۹۶۹، استفاده از نایسین را به عنوان ماده نگهدارنده غذایی به جای مواد شیمیایی تایید کردند. نایسین به علت غیرسمی بودن، طبیعی بودن، پایداری در برابر حرارت و قابلیت انبارداری بسیار خوب، قابلیت تجزیه توسط آنزیم‌های هضم‌کننده، تغییر ندادن بو یا طعم غذا و محدودیت دامنه فعالیت آن به عنوان یک ماده نگهدارنده مطلوب در مواد غذایی، مطرح است (۸). اثر نایسین بر اسپورها شدیدتر از سلول‌های رویشی است و مراحل اولیه جوانه‌زنی را مهار می‌کند (۹). امروزه، نایسین به عنوان یک ماده نگهدارنده در بیش از ۵۰ کشور در سراسر دنیا درمحصول‌های متنوع مثل پنیر، غذاهای کنسرو شده و گوشت نمک‌سود استفاده می‌شود (۱۰). غلظت مجاز مواد نگهدارنده در غذاهای مختلف و حتی در انواع پنیر متفاوت است. به عنوان مثال اسید سوربیک و نمک سدیم و پتاسیم آن و اسید پروپیونیک و نمک سدیم و کلسیم آن در پنیر فرایند شده ۳g/kg و در پنیر نرسیده[12] ۱g/kg است. بیشترین غلظت مجاز نایسین خالص در پنیر فرایند شده ۱۲/۵ mg/kg است (۱۱).

با وجود اینکه مواد نگهدارنده طبیعی (باکتریوسین‌ها) رشد باکتری‌های بیماریزا و مولد فساد را مهار می‌کنند، اما محدودیت‌هایی دارند، مانند طیف کم فعالیت آنها ، عدم مهار باکتری‌های گِرم منفی و مخمرها، ایجاد جمعیت‌های مقاوم در بین ارگانیسم‌های حساس و قیمت بالا (۱۲). وقتی میکروب‌ها در معرض غلظتهای پایین مواد نگهدارنده قرار می‌گیرند، در برابر غلظتهای بالاتر از خود مقاومت نشان می‌دهند. اولین مقاومت باکتری‌ها نسبت به نایسین در سال ۱۹۷۱ توسط فار و جرویس گزارش شد که در مقاله مینگ و همکاران به آن اشاره شده است (۱۳). آنها یک پروتئین از *باسیلوس سرئوس*[13] جدا کردند که قادر به غیرفعال کردن نایسین بود و آن را به عنوان یک دهیدروآلانین ردوکتاز[14] طبقه بندی کردند (۱۳). بعضی از میکروارگانیسم‌ها وقتی نسبت به یک ماده نگهدارنده، مثل بنزوآت، مقاوم شوند، نسبت به سایر مواد مثل سوربات و استات نیز مقاومت نشان می‌دهند (۱). اختلاط مواد نگهدارنده مختلف یکی از راه‌هایی است که برای بهبود فعالیت مواد ضدمیکروبی پیشنهاد شده است (۱۴). استفاده از تکنولوژی ترکیبی برای نگهداری مواد غذایی، تغییرات ناخواسته در خصوصیات محصول را به حداقل می‌رساند. غلظت مواد افزودنی و تیمارهای حرارتی را کاهش می‌دهد و کیفیت محصول و سلامتی آن را حفظ می‌کند (۶).

باسیلوس سرئوس با داشتن اسپور بسیار مقاوم وتوانایی رشد در دمای ۴°C یکی از باکتری‌های

1- Lactic Acid Bacteria
2- Lactococcus
3- Lactobacillus
4-Pediococcus
5 -Nisin
6 -Pediocin
7 -Colicin
8- Lantibiotics
9- Bacteriocide
10 -Food and Agriculture Organization (FAO)
11 -World Health Organization (WHO)
12- Unripened cheese
13- *Bacillus cereus*
14- Dehydro alanine rodoctase

Archive of SID
www.SID.ir

سرمادوست بیماریزا و عامل فساد مواد غذایی است (۱۵). این باکتری باعث ترش شدن شیر، هیدرولیز پروتئین‌های آن، طنابی شدن و تغییر چربی شیر و ایجاد طعم تلخ در آن می‌شود. مهمترین مشکل در آلودگی غذاها مربوط به سم تولید شده از این باکتری است (۱۵). *باسیلوس سرئوس* حداقل از سال ۱۹۰۶ به عنوان عامل مسمومیت غذایی شناخته شده است (۱۴). *باسیلوس سرئوس* دو نوع سم، یکی عامل تهوع و دیگری عامل اسهال، تولید می‌کند. بیماری‌های دیگری که توسط *باسیلوس سرئوس* ایجاد می‌شوند عبارتند از: شامل ماستیت گاوی، مننژیت، آندوکاردیت، عفونت خونی وعفونت‌های چشمی هستند (۱۶، ۱۷).

استفاده از مواد نگهدارنده در غلظت‌های پایین‌تر از حداقل غلظت مهارکنندگی به علت قیمت بالای این مواد، مقرون به صرفه است. همچنین ممکن است با کاهش غلظت ماده نگهدارنده در مواد غذایی به دلیل واکنش‌های شیمیایی کمتر، سلول هدف، به طور ناقص تخریب شود (۱۸). هدف این تحقیق، بررسی مقاومت باکتری *باسیلوس سرئوس* نسبت به مواد نگهدارنده در غلظتهای پایین‌تر از حداقل غلظت مهارکنندگی و همچنین بررسی اثر اختلاط دو ماده نگهدارنده بر رشد این باکتری بود.

• مواد و روشها

مواد مورد استفاده: نایسین از شرکت زیگما آلدریچ انگلستان، اسیدهای سیتریک، سوربیک، استیک، پروپیونیک و بنزوئیک، سوربات پتاسیم، سیترات سدیم و بنزوات سدیم از شرکت مرک آلمان، محیط کشت تریپتون سوی برات از شرکت بیومریو فرانسه، محیط کشت‌های نوترینت آگار ، نوترینت برات و مولرهینتون‌آگار از شرکت مرک آلمان، کیت رنگ‌آمیزی گرم از شرکت فناوری روزآزمون، باکتری *باسیلوس‌سرئوس* PTCC1015 از کلکسیون میکروبی ایران تهیه شد.

وسایل مورد استفاده: دستگاه فیلتراسیون مدل Soviriel از فرانسه ، فیلتر ۰/۴۵ میکرومتری، انکوباتور، شیکرمدل Heraeus ، دستگاه اسپکتروفتومترUV مدل Shimadzu و کووت.

روش کار: جهت بررسی حضور باکتری‌های زنده در مواد غذایی حاوی مواد نگهدارنده، جداسازی باکتری‌ها از ۸ نمونه غذایی انجام شد: پنیر پیتزای شیرآوران حاوی سیترات سدیم و کلرید کلسیم، شیر بسته بندی نشده بدون ماده نگهدارنده، بیسکویت آناتا حاوی اسید سیتریک، کیک آشنا حاوی سوربات پتاسیم، سس سالاد مهرام حاوی بنزوات سدیم و سوربات پتاسیم و اسید سیتریک، نوشابه زمزم حاوی بنزوات سدیم و اسید سیتریک، ژله فرمند حاوی اسید سیتریک و شربت پرتقال سن‌ایچ حاوی اسید آسکوربیک و اسید سیتریک. برای جداسازی باکتری ۱۰ گرم از هر یک از نمونه‌ها با ۹۰ میلی‌لیتر محلول رینگر به طور کامل مخلوط و رقت‌های مختلف (تا رقت 10^{-4}) تهیه شد. از رقت‌های مختلف، یک میلی‌لیتر روی پلیت‌های نوترینت آگار ریخته و به آرامی با میله شیشه‌ای سرکج در سطح پلیت پخش شد (۱۹). این کار برای هر نمونه ۲ بار تکرار شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور $37^{\circ}C$ قرار گرفتند. پس از خالص‌سازی، آزمایش‌های بیوشیمیایی جهت شناسایی باکتری‌های جداسازی شده انجام شد (۱۰،۲۱،۲۲).

سویه *باسیلوس سرئوس* جدا شده جهت بررسی حساسیت نسبت به برخی از مواد نگهدارنده، مورد بررسی قرار گرفت و با *باسیلوس سرئوس* PTCC1015 مقایسه شد. جهت تهیه محلول ذخیره مواد نگهدارنده به این صورت عمل شد: مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم از نایسین (نیزاپلین ۲/۵٪) در ۱۰ میلی‌لیتر اسیدکلریدریک ۰/۰۲ نرمال حل شد تا غلظت آن به 10^{4} IU/ml برسد (۴۰ IU=۱µg). سپس با استفاده از فیلتر ۰/۴۵ میکرومتری استریل و در دمای $-20^{\circ}C$ منجمد شد (۲۲). همچنین محلول ۱۰٪ وزنی- حجمی اسیدهای آلی تهیه شد و با استفاده از فیلتر ۰/۴۵ میکرومتری استریل و در دمای $4^{\circ}C$ نگهداری شد. برای تهیه رقت‌های مختلف از آب مقطر استریل استفاده شد. حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کُشندگی (MBC)[1]

1- Minimum Bacteriocide Concentration

Archive of SID

www.SID.ir

مواد نگهدارنده مختلف بر سویه *باسیلوس سرئوس* جدا شده تعیین و با *باسیلوس سرئوس* PTCC1015 مقایسه شد. برای این کار، روش رقت لوله‌ای (۱۰ لوله آزمایش) به کار رفت (۱۷). ۱ml از نمونه میکروبی حاوی $۱/۵\times۱۰^{۶}$CFU/ml به هر لوله اضافه شد (حجم نهایی هر لوله ۲ml). لوله اول به عنوان کنترل منفی حاوی ۱ml ماده ضد میکروبی و ۱ml محلول باکتریایی بود. لوله دهم به عنوان کنترل مثبت، حاوی ۱ml محیط کشت و ۱ml محلول باکتریایی بود.

لوله‌ها به مدت ۱۶ تا ۲۰ ساعت در دمای ۳۷°C گرمخانه‌گذاری و سپس از نظر کدورت بررسی شدند (۱۷،۱۸). حداقل غلظتی که ماده نگهدارنده، رشد باکتری را مهار می‌کند، مشخص کننده میزان حداقل غلظت مهارکنندگی آن ماده است. جهت بررسی معنی‌دار بودن اختلاف بین باکتری‌ها از نظر حساسیت، یا مقاومت از نرم‌افزار $SPSS_{13}$ آزمون Paired-Samples t- test ($p<۰/۰۵$) استفاده شد. جهت تعیین حداقل غلظت کشندگی ماده نگهدارنده، از لوله‌های شفاف که رشد در آنها مهار شده بود، به کمک سواپ استریل روی محیط کشت جامد مولر هینتون آگار کشت داده شد و پلیت‌ها ۴۸ تا ۷۲ ساعت در دمای ۳۷°C انکوبه شدند. حداقل غلظت ماده نگهدارنده که همه باکتری‌ها را از بین ببرد، بیان کننده میزان MBC آن ماده است (۱۷).

منحنی رشد باکتری *باسیلوس سرئوس* در حضور و عدم حضور مواد نگهدارنده، رسم شد. به این صورت که از کشت مایع میکروبی ۲۴ ساعتی ($۱۰^{۹}$ CFU/ml) ۵۰ml به ارلن حاوی ۴۵۰ml نوترینت برات تلقیح شد (۱۸). جهت بررسی غلظت‌های مختلف مواد نگهدارنده در آزمایشهای بعدی، غلظت‌های مختلفی از اسید استیک (۰/۳۱۲٪، ۰/۱۵۶٪، ۰/۰۷٪) ، نایسین (۵۰۰،۲۵۰،۱۲۵ IU/ml) ، اسید سیتریک (۰/۳۷۵٪) و سوربات پتاسیم (۱/۲۵٪) به محیط کشت نوترینت برات اضافه شد. پس از هم زدن ارلن‌ها، اولین نمونه‌گیری به عنوان زمان صفر در نظر گرفته شد و جذب نوری مایعات در طول موج ۵۲۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده شد. ارلن‌های حاوی محیط کشت و باکتری در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۷°C و با دور ۱۰۰rpm قرار داده شدند. هر ۲ ساعت یک بار، جذب نوری مایعات، اندازه‌گیری و منحنی رشد باکتری رسم شد. برای تعیین معنی‌دار بودن اختلاف بین منحنی‌های رسم شده از آزمون آنالیز واریانس، طرح دانکن ($p<۰/۰۵$) و نرم‌افزار $SPSS_{13}$ استفاده شد.

• یافته ها

در کل ۱۸ نوع باکتری از نمونه‌های شیر و پنیر جدا شد. ۱۲ کلنی متفاوت از پنیر و ۶ کلنی متفاوت از شیر روی پلیت‌های نوترینت آگار رشد کرد. این سویه‌ها شامل باکتری‌های زیر بود: *باسیلوس کواگولانس*[1]، *باسیلوس ماسرانس*[2]، *باسیلوس سرئوس*، *باسیلوس مگاتریوم*[3]، *باسیلوس برویس*[4]، *باسیلوس پلی میکسا*[5]، *باسیلوس مارینوس*[6]، *استافیلوکوکوس گزیلوزوس*[7]، *استافیلوکوکوس اوریکولاریس*[8]، *انتروکوکوس فسیوم*[9]، *کورتیا گیبسونی*[10]، *لیستریا مورایی*[11] و *لیستریا منوسیتوژنز*[12].

از بین باکتریهای جدا شده، سویه *باسیلوس سرئوس* جدا شده از پنیر به دلیل اهمیت آن در فساد مواد غذایی و پتانسیل بیماریزایی، انتخاب و میزان حساسیت آن به مواد نگهدارنده، بررسی شد. خصوصیات بیوشیمیایی سویه *باسیلوس سرئوس* جدا شده از پنیر در جدول ۱ و کلنی‌های آن روی نوترینت آگار در شکل۱ آمده است. همان طور که در جداول۲ و ۳ مشاهده می‌شود باکتری *باسیلوس سرئوس* جدا شده، نسبت به غلظت مجاز بنزوات سدیم (۰/۲٪)، اسید سوربیک (۰/۳٪)، سیترات سدیم (۱٪)، سوربات پتاسیم (۰/۳٪) و اسید استیک (۰/۱٪) مقاومت نشان داد.

1- *Bacillus coagulans*
2 - *Bacillus macerans*
3 - *Bacillus megaterium*
4- *Bacillus brevis*
5- *Bacillus polymyxa*
6- *Bacillus marinus*
7- *Staphylococcus xylosus*
8- *Staphylococcus auricularis*
9- *Enterococcus faecium*
10- *Kurthia gibsonii*
11- *Listeria murrayi*
12- *Listeria monocytogenes*

Archive of SID
www.SID.ir

جدول۱- خصوصیات بیوشیمیایی سویه *باسیلوس سرئوس* جدا شده از مواد غذایی

خصوصیات بیوشیمیایی *باسیلوس سرئوس*			
رنگ آمیزی گرم	+	تخمیر سلوبیوز	–
اسپور	+	تخمیر رافینوز	–
کاتالاز	+	حرکت	+
اکسیداز	–	مصرف سیترات	–
رشد بی هوازی	+	احیاء نیترات	+
تخمیر گلوکز	+	رشد در نمک ۱۰٪	+
تخمیر گالاکتوز	–	رشد در PH=۵/۷	+
تخمیر آرابینوز	–	تست وژپروسکوئر	+
تخمیر گزیلوز	+	رشد در 30^0C	+
تخمیر مانیتول	–	لسیتیناز	+
تخمیر ترهالوز	+	اندول	–
تخمیر ساکارز	–		

شکل ۱- سویه *باسیلوس سرئوس* جدا شده از پنیر روی محیط کشت نوترینت آگار

جدول۲- مقایسه حداقل غلظت مهار کنندگی مواد نگهدارنده بر رشد *باسیلوس سرئوس* جدا شده از پنیر و *باسیلوس سرئوس* PTCC1015

مواد نگهدارنده	MIC بر حسب g/100ml	
	باسیلوس سرئوس جدا شده از پنیر	*باسیلوس سرئوس* PTCC1015
اسید سیتریک	۰/۷۵	۰/۷۵
سیترات سدیم	۷	۷
اسید بنزوییک	۰/۰۵	۰/۰۲۵
بنزوات سدیم	۳/۵	۳/۵
اسید سوربیک	۱	۱
سوربات پتاسیم	۲/۵	۱/۲۵
اسید استیک	۰/۰۶۲۵	۰/۰۶۲۵
اسید پروپیونیک	۰/۳۱۲۵	۰./۳۱۲۵
نایسین	$۱/۲۵\times۱۰^{-۳}$	$۲/۵\times۱۰^{-۳}$

منحنی رشد باکتری *باسیلوس سرئوس* درعدم حضور ماده نگهدارنده در شکل۲ آورده شده است. منحنی رشد باکتری در حضور مواد نگهدارنده در غلظت‌های مختلف رسم شده است. مهار شدن باکتری در کمتر از حداقل غلظت مهار کنندگیِ مواد نگهدارنده، نشان دهنده حساسیت بیشتر باکتری به آن ماده است. منحنی رشد *باسیلوس سرئوس* در حضور اسید استیک با غلظت‌های کمتر از MIC یعنی $\frac{1}{2}$MIC، $\frac{1}{4}$MIC و $\frac{1}{8}$MIC رسم شد که نتایج آن در شکل۳ آمده است. نتایج مربوط به رشد باکتری *باسیلوس سرئوس* در حضور نایسین با غلظت‌های کمتر از MIC در شکل۴ آمده است. منحنی رشد باکتری *باسیلوس سرئوس* در حضور اسید سیتریک و سوربات پتاسیم در شکل۵ نشان داده شده است.

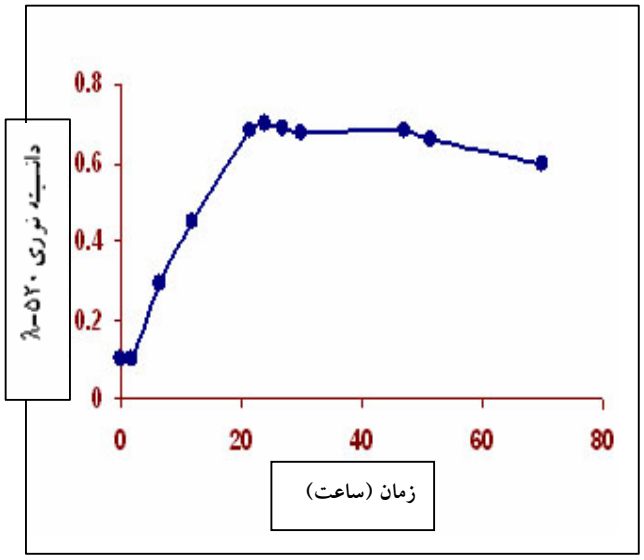
طبق شکل۳ *باسیلوس سرئوس* در حضور اسید استیک با غلظت $\frac{1}{2}$MIC هیچ رشدی نکرد و pH در این مدت، ثابت و برابر ۵ بود اما در غلظت‌های $\frac{1}{4}$MIC و $\frac{1}{8}$MIC با pH ابتدایی ۵/۴ و ۶، باکتری پس از زمان کوتاهی قادر به تعدیل pH و رشد شد.

Archive of SID

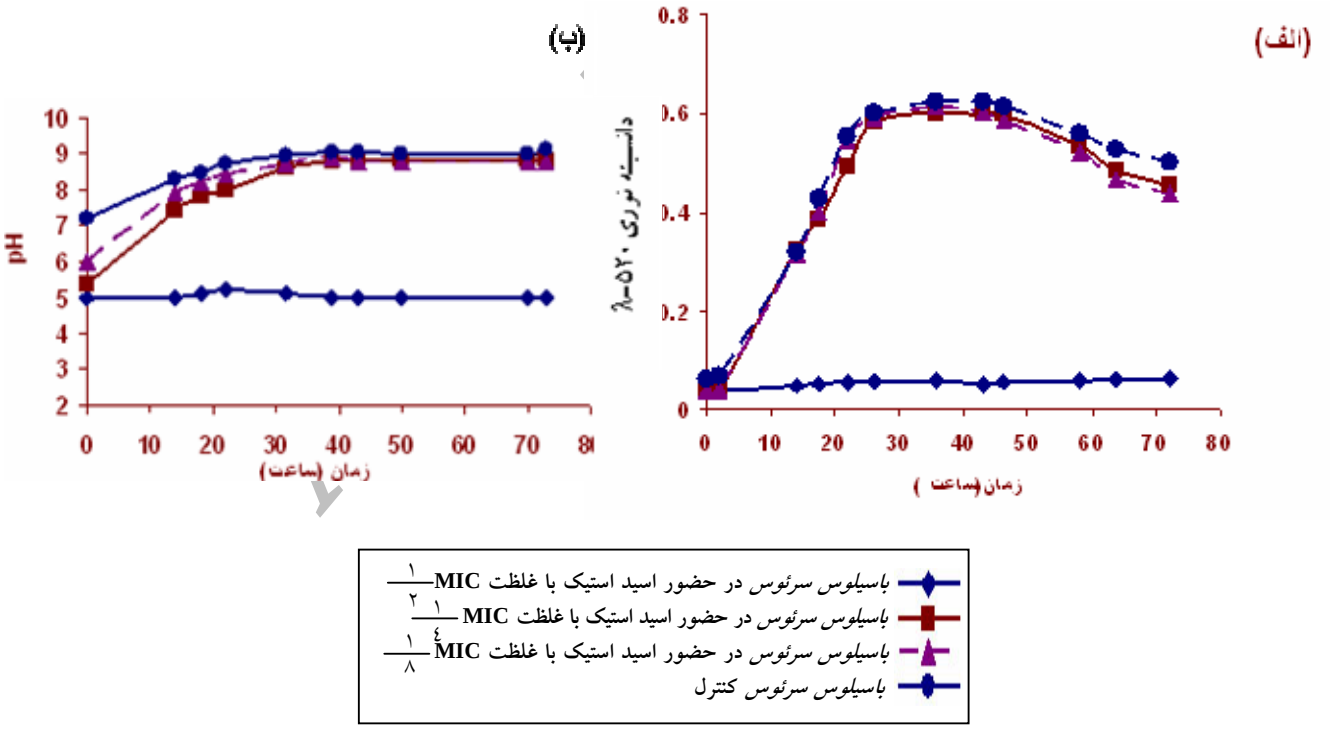
www.SID.ir

جدول۳- مقایسه حداقل غلظت کُشندگی مواد نگهدارنده بر رشد *باسیلوس سرئوس* جدا شده از پنیر و *باسیلوس سرئوس* PTCC1015

مواد نگهدارنده	MBC بر حسب g/100ml	
	باسیلوس سرئوس جدا شده از پنیر	*باسیلوس سرئوس* PTCC1015
اسید بنزوییک	۰/۰۵	۰/۰۲۵
اسید سیتریک	۰/۷۵	۰/۷۵
سیترات سدیم	۷	۷
بنزوات سدیم	۳/۵	۳/۵
اسید سوربیک	۱	۱
سوربات پتاسیم	۲/۵	۱/۲۵
اسید استیک	۵	۵
اسید پروپیونیک	۰/۳۱۲۵	۰/۳۱۲۵
نایسین	$۱/۲۵\times۱۰^{-۳}$	$۲/۵\times۱۰^{-۳}$



شکل۲- منحنی رشد باکتری باسیلوس سرئوس بدون حضور ماده نگهدارنده

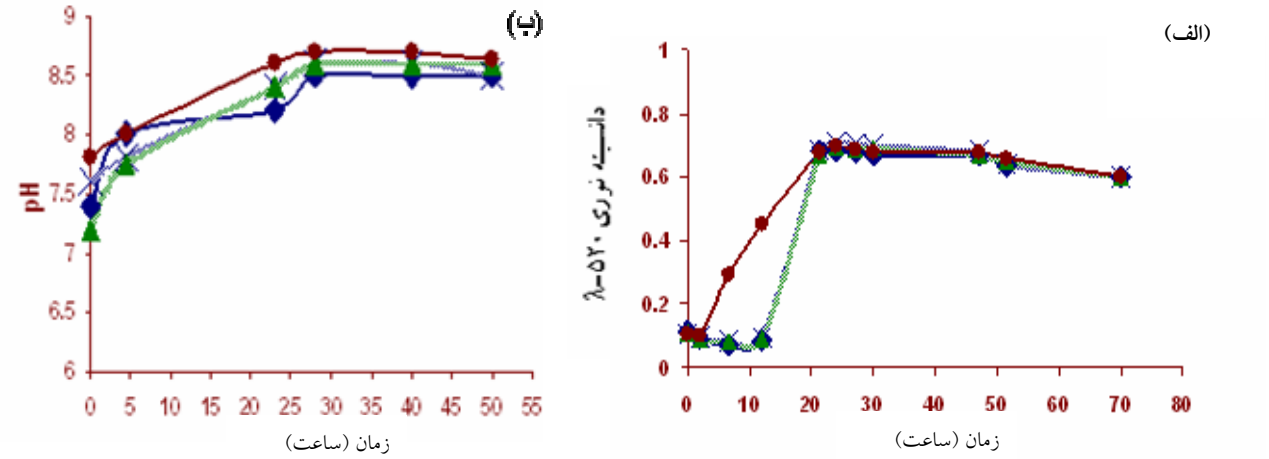


شکل۳- الف) منحنی رشد باکتری *باسیلوس سرئوس*، در حضور اسیداستیک با غلظتهای MIC $\frac{1}{2}$، MIC $\frac{1}{4}$ و MIC $\frac{1}{8}$

ب) تغییرات pH محیط کشت در غلظت‌های MIC $\frac{1}{2}$ ، MIC $\frac{1}{4}$ و MIC $\frac{1}{8}$ اسید استیک

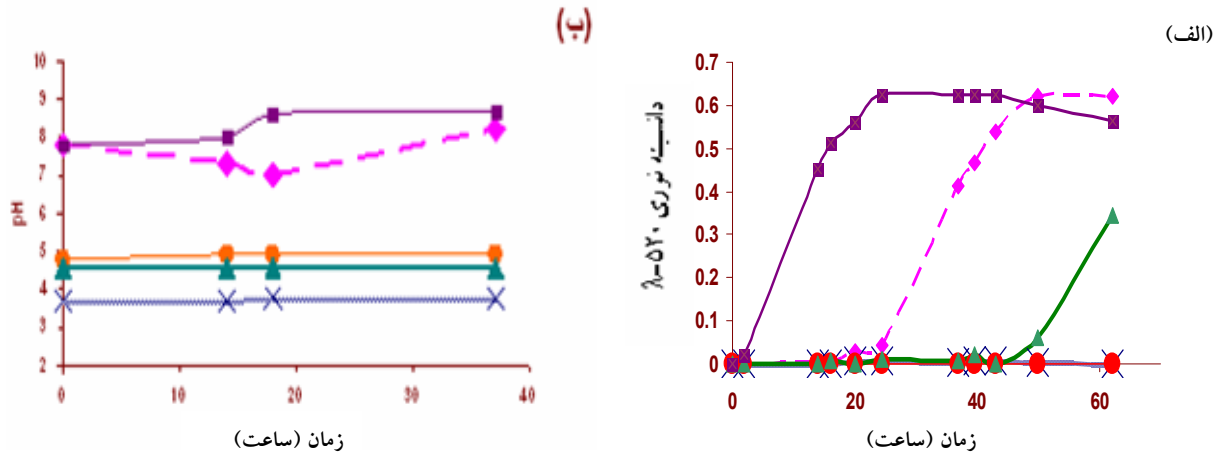
Archive of SID

www.SID.ir



شکل۴- الف) منحنی رشد *باسیلوس سرئوس* در حضور نایسین با غلظت‌های MIC ، $\frac{1}{2}$ MIC و $\frac{1}{4}$ MIC

ب) تغییرات pH محیط کشت در غلظتهای MIC ، $\frac{1}{2}$ MIC و $\frac{1}{4}$ MIC نایسین



شکل۵- الف) سینرژیسم اسید سیتریک و سوربات پتاسیم بر باکتری *باسیلوس سرئوس*

ب) تغییرات pH محیط کشت در غلظت‌های مختلف اسید سیتریک و سوربات پتاسیم

www.SID.ir

همان‌طور که در شکل۴ مشاهده می‌شود، *باسیلوس سرئوس* (10^9CFU/ml) در حضور نایسین با غلظت‌های MIC، $\frac{1}{2}$MIC و $\frac{1}{4}$MIC رشد کرد و اختلاف بین منحنی‌ها معنی‌دار نبود. ولی رشد آن در غلظت‌های یاد شده با تأخیر تقریبا ۱۲ ساعته انجام شد.

شکل۵ سینرژیسم اسید سیتریک و سوربات پتاسیم بر *باسیلوس سرئوس* را نشان می‌دهد. *باسیلوس سرئوس* در حضور اسید سیتریک با غلظت $\frac{1}{2}$MIC نه تنها هیچ رشدی نکرد، بلکه تعداد باکتری‌ها پس از ۵۱ ساعت (فاز سکون باکتری کنترل) از 10^9CFU/ml به $1/8\times10^4$CFU/ml کاهش یافت. با توجه به اینکه PK_a اسید سیتریک ۳/۱ است، اسید در pH=۳/۸ توانست باکتری را کاملا مهار کند. اما این باکتری در حضور سوربات پتاسیم با غلظت $\frac{1}{2}$MIC پس از طی ۱۸ ساعت، رشد خود را با سرعت کمتری نسبت به کنترل شروع کرد به بیان دیگر اثر اسید سیتریک بیشتر از سوربات پتاسیم است.

• بحث

میانگین تعداد باکتری جدا شده از پنیر پیتزا $4/01\times10^3$CFU/g بود که از نظر تعداد باکتری با استاندارد فراورده‌های لبنی در ایالات متحده مطابق است و تعداد باکتری‌ها در آن کمتر از ۲۰۰۰۰ عدد در میلی‌لیتر است (۸). باکتری‌های جدا شده از سایر مواد غذایی شامل ۸۴/۵۶٪ باکتری گِرم مثبت (۵۳/۸٪ باسیل و ۳۰/۷۶٪ کوکسی) و ۱۵/۳۸٪ باسیل گِرم منفی بود که تقریبا با نتایج آزمایش لطیف و همکاران در سال ۲۰۰۴ مطابقت دارد. آنها ۸۳٪ باکتری گِرم مثبت و ۱۷٪ باکتری گِرم منفی مقاوم از شربت پرتقال جداسازی کردند (۱۹). جداسازی این باکتری‌ها از پنیر، نشانه پاستوریزاسیون ضعیف یا آلودگی پس از پاستوریزاسیون است. بنابراین، استفاده از مواد ضد میکروبی مناسب برای مهار رشد آنها ضروری است (۱۹).

از آنجا که سمّیت اسیدهای آلی به طور ابتدایی با یون‌های هیدروژن ایجاد نمی‌شود، بلکه به واسطه مولکول جدا نشده است، بنابراین، سمّیت این مواد برای میکروارگانیسم‌ها به نوع اسید آلی، غلظت آن و دمای گرمخانه‌گذاری بستگی دارد (۲۲). باکتری *باسیلوس سرئوس* جدا شده نسبت به غلظت مجاز بنزوات سدیم (۰/۲٪)، اسید سوربیک (۰/۳٪)، سیترات سدیم (۱٪)، سوربات پتاسیم (۰/۳٪) و اسید استیک (۰/۱٪) مقاوم بود. این نتایج با نتایج وارث در سال ۱۹۸۸ مشابه است که دیویدسون در مقاله خود به آن اشاره کرده است (۲۳).

با توجه به جداول۲ و ۳ و مقایسه *باسیلوس سرئوس* جدا شده با *سویه باسیلوس سرئوس* PTCC1015 ($p<0/05$) تفاوتی که از نظر مقاومت بین دو سویه وجود دارد، معنی‌دار نیست. در حالی که فرض بر این بود که سویه جدا شده به دلیل زنده بودن در حضور سیترات سدیم و کلرید کلسیم در پنیر، مقاومت بیشتری نسبت به مواد نگهدارنده نشان می‌دهد. احتمالا علت تشابه دو سویه این بوده که ماده نگهدارنده در ماده غذایی با واکنش‌هایی که با سایر مواد موجود در پنیر انجام داده، اثر خود را از دست داده و بنابراین، باکتری توانسته در حضور آن زنده بماند.

حساسیت سویه *باسیلوس سرئوس* جدا شده با سویه‌های مورد بررسی توسط هسیو و سیبرت از نظر حداقل غلظت مهار کنندگی اسیدهای سیتریک، بنزوئیک و استیک ($p<0/05$) مشابه است (۵). همچنین، مقاومت سویه جدا شده در این پژوهش، نسبت به اسیدهای بنزوئیک و سوربیک ($p<0/05$) مشابه سویه مورد بررسی توسط بنرجی و سرکار در سال ۲۰۰۴ است (۲۴).

اختلاف بین OD و pH در نمونه *باسیلوس سرئوس* کنترل و نمونهٔ حاوی اسیداستیک با غلظت $\frac{1}{4}$MIC و $\frac{1}{8}$MIC معنی‌دار نبود. اما غلظت $\frac{1}{2}$MIC اسیداستیک، اختلاف معنی‌داری با سایر نمونه‌ها نشان داد. از آنجا که PK_a اسید استیک ۴/۷۵ است، هر قدر pH ، بیشتر از ۴/۷۵ باشد، فعالیت اسید استیک، کاهش بیشتری نشان می‌دهد (۲۰). باکتری *باسیلوس سرئوس* پس از قرار گرفتن در حضور نایسین، شرایط را تعدیل کرده و با افزایش pH شروع به رشد می‌کند. نایسین باعث تخریب غشای سیتوپلاسمی و نشت

Archive of SID

www.SID.ir

مواد ضروری مثلATP ، اسیدهای آمینه و جریان ترکیب‌های کوچک سیتوپلاسمی می‌شود. نایسین از طریق تشکیل منفذهایی در غشای سیتوپلاسمی و توقف جریان یون‌های حیاتی و در نتیجه، متوقف کردن PMF[1] تاثیر می‌کند. در نهایت، همه فرایندهای بیوسنتزی سلول متوقف شده و سلول باکتری از بین می‌رود (۶،۲۵). رشد *باسیلوس سرئوس* شاید به دلیل کاهش فعالیت باکتری‌کُشی نایسین در pH و دمای بالاتر بعد از گذشت زمان گرمخانه‌گذاری باشد. عامل دیگری که باعث رشد باکتری می‌شود، ممکن است غیر فعال شدن نایسین در اثر آنزیم تولید شده توسط *باسیلوس سرئوس* باشد (۲۶). مطالعه پل و اسمیت در سال ۱۹۹۹ نشان داد که نایسین در غلظت‌های کم فقط فاز تاخیری[2] را در باکتری *باسیلوس سرئوس* طولانی‌تر می‌کند، اما در غلظت‌های زیاد، رشد باکتری را مهار می‌کند. تغییر ترکیب غشای باکتری می‌تواند باعث کاهش بار منفی فسفولیپیدها در غشای دو لایه و درنتیجه، کاهش توانایی نایسین برای اتصال و واکنش متقابل با غشاء شود (۷). مقاومت به نایسین در *لیستریا منوسیتوژنز* توسط هریس و همکاران در سال ۱۹۹۴ و دیویس و آدامس در سال ۱۹۹۴ گزارش شد. آنها دریافتند نایسین به میزان کمتری، وارد سلول‌های مقاوم در مقایسه با سلول‌های حساس می‌شود. این تفاوت به ساختار غشای سلول و تفاوت در ترکیب و خصوصیات آن مربوط می‌شود (۱۸).

اختلاف بین منحنی‌های مربوط به اسیدسیتریک با غلظت MIC و سوربات پتاسیم با غلظت $\frac{1}{2}$MIC معنی‌دار بود. اما اگر این دو ماده با هم ترکیب شوند و اسید سیتریک در غلظت MIC و سوربات پتاسیم در غلظت $\frac{1}{2}$MIC به کار رود، pH در ۴/۸ ثابت باقی مانده و باکتری هیچ رشدی نشان نداد و تعداد باکتریها از 10^9CFU/ml به $4/3\times10^2$CFU/ml کاهش یافت. در صورتی که باکتری در حضور ترکیب سوربات پتاسیم در غلظت MIC و اسیدسیتریک در غلظت $\frac{1}{2}$MIC پس از حدود ۴۶ ساعت شروع به رشد کرد. شمارش باکتری‌ها پس از ۵۱ ساعت (فاز سکون باکتری کنترل) نشان داد که تعداد آنها از 10^9CFU/ml به $2/9\times10^3$ CFU/ml کاهش یافته است. از آنجا که کاهش pH محیط، اثر ضدمیکروبی اسیدهای آلی ضعیف را افزایش می‌دهد، وجود سینرژیسم بین اسیدهای آلی دور از انتظار نیست (۲۷). چنان که سینرژیسم بین سوربات پتاسیم و اسید استیک در مقابل *لیستریا منوسیتوژنز* در سال ۲۰۰۲ گزارش شده است (۲۸).

درک بهتر روش‌هایی که میکروارگانیسم‌ها نسبت به استرس‌های محیطی، مقاومت نشان می‌دهند، به منظور جلوگیری از فساد مواد غذایی، مهم است. با توجه به نتایج این پژوهش، اسیدهای آلی و نمک آنها مواد نگهدارنده مناسبی جهت کنترل مواد غذایی نیستند و باید مواد نگهدارنده طبیعی مثل نایسین، جایگزین آنها شوند. نایسین برای کنترل بعضی از باکتری‌ها کارایی دارد، اما بهتر است از غلظتهای مناسب آن استفاده شود تا از ایجاد مقاومت در باکتری‌ها جلوگیری شود یا نایسین همراه سایر مواد نگهدارنده به کار رود (۲۹) تا ضمن به حداقل رساندن مقاومت بتوان غلظت‌های کمتر آن را به کار برد. برای حل مشکل ایجاد مقاومت در باکتری‌ها استفاده از غلظت مناسب مواد نگهدارنده و همچنین ترکیب مواد ضد میکروبی با مکانیسم‌های مختلف، پیشنهاد می‌شود (۳). به علاوه، پیشنهاد می‌شود که تحقیقات بیشتری درباره مکانیسم‌های مقاومت باکتری‌ها انجام شود (۳۰).

• References

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, Hill C. Development of a lacticin 3147-enriched whey powder with inhibitory activity against foodborne pathogens. Journal of Food Protection 1999; 62: 1011-1016.
3. Brul S, Coote P. Preservative agents in foods mode of action and microbial resistance mechanisms. International Journal of Food Microbiology 1999; 50: 1-17.
4. Block SS. 1991. Disinfection, sterilization, and preservation, fourth edition. 802-825.

1 - Proton motive force
2- Lag phase

Archive of SID

www.SID.ir

5. Hsiao CP, Siebert KJ. Modeling the inhibitory effects of organic acids on bacteria. International Journal of Food Microbiology 1999; 47: 189-201.
6. Russell AD, Hugo WB, Ayliffe GA. Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization. 3th ed; 1999: 485-523.
7. Pol IE, Smid EJ. Combined action of nisin and carvacrol on Bacillus cereus and Listeria monocytogenes. Letters in Applied Microbiology 1999; 29: 166-170.
8. Jay JMM. Modern food microbiology. 4th ed. New York: Chapman and Hall. 1992.
9. Harris LJ, Fleming HG. Development in nisin research. Food Research International 1992; 25: 57-66.
10. Broughton JD. Nisin and its uses as a food Preservative. Food Technology 1990; 100-112.
11. Codex general standard for process(ed) cheese and spreadable process(ed) cheese. A-8(b)-1978 and 221-2001. http://www.codexalimentarius.net/web/index_en.jsp.
12. Dufour M, Simmonds RS, Bremer PJ. Development of a method to quantify in vitro the synergistic activity of natural antimicrobials. International Journal of Food Microbiology 2003; 85, 249-258.
13. Ming X, Daeschel MA. Nisin resistance of foodborne bacteria and the specific resistance responses of Listeria monocytogenes ScottA. Journal of Food Protection 1993; 56: 944-948.
14. Mulet-Powell N, Lacoste-Armynot AM, Vinas M, Simeon De Buovhberg M. Interactions between pairs of bacteriocins from lactic bacteria. Journal of Food Protection 1998; 61: 1210-1212.
15. Ultee A, Smid EJ. Influence of carvacrol on growth and toxin production by Bacillus cereus. International Journal of Food Microbiology 2001; 64, 373-378.
۱۶. مهدی زاده م ا، علیپور م م. آلودگیهای باکتریایی و قارچی مواد غذایی، اصفهان: ارکان، ۱۳۷۷.
۱۷. ناظم ح. بررسی اثر ضد میکروبی برگ گیاه بارهنگ و تعیین MIC و MBC برگ گیاهان توت سفید و زبان گنجشک. [پایان‌نامه] اصفهان: دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ۱۳۶۵.
18. Song HJ, 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.
19. Lateef A, Oloke JK, Gueguim-Kana EB. Antimicrobial resistance of bacterial strains isolated from orange juice products. African Journal of Biotechnology 2004; 3: 334-338.
20. Barrow G.I, Feltham RKA. Cowan and steel's manual for the identification of medical bacteria. 3th ed. England: Cambridge university press. 1993, 51-164.
21. De Martinis ECP, Crandall AD, Mazzotta AS, Montville TJ. Influence of pH, salt, and temperature on nisin resistance in Listeria monocytogenes. Journal of Food Protection 1997; 60: 420-423.
22. Ahamad N, Marth EH. 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 1989; 52: 688-695.
23. Davidson PM, Hrisson MA. Resistance and adaptation to food antimicrobials, sanitizers, and other process controls. Food Technology 2002; 56: 69-77.
24. Banerjee M, Sarkar PK. Antibiotic resistance and susceptibility to some food preservative measure of spoilage and pathogenic microorganisms from spices. Food Microbiology 2004; 21: 335-342.
25. Sahl HG, Bierbaum G. Lantibiotics: Biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from gram-positive bacteria. Annual Review Microbiology 1998; 52: 41-79.
26. Jaquette CB, Beuchat LR. Combined effects of pH, nisin and temperature on growth and survival of psychotropic Bacillus cereus. Journal of Food Protection 1998; 61: 563-570.
27. Periago PM, Moezelaar R. Combined effect of nisin and carvacrol at different pH and temperature levels on the viability of different strains of Bacillus cereus. International Journal of Food Microbiology 2001; 8: 141-148.
28. 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], Faculty of Virginia Polytechnic Institute & State University, 2002.
29. Martirani L, Varcamonti M, Naclerio G, Felice M. Purfication and partial characterization of bacillocin 490, a novel bacteriocin produced by a thermophilic Bacillus licheniformis. Microbial Cell Factories 2002; 1: 1-5.
Harris LJ, Fleming HP, Klaenhammer TR. Sensitivity and resistance of Listeria monocytogenes ATCC 19115, ScottA, and UAL500 to nisin. Journal of Food Protection 1991; 54: 836-840.

Archive of SID

www.SID.ir