

ارزیابی کارایی 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 زیست شناسی

تاریخ دریافت ۸۵/۶/۱۹ تاریخ پذیرش: ۸۵/۱۲/۲۶

چکیده

در این تحقیق یک سویه باکتری لیستریا منوسیتوژنز بومی ایران از شیر غیر پاستوریزه بدون ماده نگهدارنده جدا شد و میزان MIC 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 بنزوات سدیم (۷ درصد)، اسیدسوربیک (۱ درصد)، سوربات پتاسیم (۲/۵ درصد)، سترات سدیم (۱/۵ درصد)، اسیدپروپیونیک (۱/۲۵ درصد)، و اسیداستیک (۰/۶۲۵ درصد) است که نشانه مقاومت و نسبت به نایسین (۱۲۵ IU/ml) و اسیدبنزوویک (۰/۱۲۵ 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 کارایی نایسین (۸۰۰ IU/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 می‌باشد (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، کارایی، پنیر

* نویسنده مسئول، تلفن تماس: ۰۹۱۳۲۲۷۳۹۵۴، پست الکترونیک: am_nasr60@yahoo.com

مقدمه

Bacteria از جمله لاکتوکوکوس (*Lactococcus*) ، لاکتوباسیلو (*Lactobacillus*) ، پدیوکوکوس (*Pediococcus*) و... تولید می‌شوند. از جمله این باکتریوسینها نایسین است که پپتیدی با ۳۴ 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 کلستریادیوم اثر باکتری‌کشی (Bacteriocide) دارد (۲۴). نایسین اولین بار توسط روگرز (Rogerz) در سال ۱۹۲۸ (۱۷) بعنوان

اسیدهای آلی بمنظور اسیدی کردن و یا جلوگیری از رشد میکروارگانیسمها یا بطور مستقیم به بعضی از مواد غذایی اضافه می‌شود و یا با عمل بعضی از ارگانیسرها مثل لاکتوباسیلها یا باکتریهای پروپیونیک اسید تولید می‌شوند. اسید بنزوویک و اسید سوربیک مهارکننده مؤثر رشد میکروبی هستند و بعنوان نگهدارنده به مواد غذایی اضافه می‌شوند. در سالهای اخیر بعلاوه 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)

می‌شود و سلول باکتری از بین می‌رود (۴ و ۲۵). 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 reductase) 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، ۱۳ و ۲۶). در لیستریا منوسیترنرز مقاومت به نایسین شامل تغییر در ترکیب اسید چرب، ترکیب فسفولیپید، سیالیت غشاء و دیواره سلولی است. در لیستریا منوسیترنرز 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 منوسیترنرز یک باکتری بیماری‌زای غذایی است و در یک محدوده وسیع دمایی از ۰/۴- تا ۴۵ درجه سانتی گراد و همچنین pH ۴/۴ تا ۹/۴ رشد می‌کند و باعث مسمومیت غذایی می‌شود (۲، ۳۱، ۱۴). پراکندگی گسترده در محیط، توانایی رشد در دمای یخچال، توانایی آغاز رشد در pH نسبتاً پایین و تحمل مقادیر زیاد نمک، باکتری

ماده‌ای جهت جلوگیری از رشد لاکتوباسیلوس بولگاریکوس (*Lactococcus bulgaricus*) شرح داده شد (۱۵). ولی بعلاطف فعالیت ضد میکروبی کم، حالیت کم آن در مایعات بدن، تجزیه آن توسط پروتئازهای دستگاه گوارش و عدم پایداری آن در pH فیزیولوژیک برای اهداف کلینیکی نامناسب بود (۶). بنابراین تا سال ۱۹۴۰ نایسین مورد توجه قرار نگرفت (۱۵). در سال ۱۹۵۱ هریس (Hrisch) نشان داد که نایسین از تشکیل گاز ناشی از کلاستریدیوم جلوگیری می‌کند. سرانجام این ماده با نام تجاری نیزاپلین (Nisaplin) در انگلستان توسط آپلین (Aplin) و بارت (Barrett) تولید شد، و در سال ۱۹۶۹ 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 (۶). 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 در سراسر دنیا در محصولات متنوع مثل پنیر، غذاهای کنسرو شده و گوشت سود شده استفاده می‌شود (۶، 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 هضم کننده، 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 گرادبان یونهای حیاتی و در نتیجه متوقف کردن PMF (Proton motive force) انجام می‌دهد. در نهایت همه فرآیندهای بیوستزی سلول متوقف

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 ۸ ماده غذایی مختلف نمونه‌گیری شد: ۱- پنیر پیتزای شیرآوران که در ترکیب آن سیترات سدیم بکار رفته بود، ۲- شیر بسته بندی نشده بدون ماده نگهدارنده، ۳- بیسکویت آنا تا حاوی اسید سیتریک، ۴- کیک آشنا حاوی سوربات پتاسیم، ۵- سس سالاد مهرام حاوی بنزوات سدیم و سوربات پتاسیم و اسید سیتریک، ۶- نوشابه زمزم حاوی بنزوات سدیم و اسید سیتریک، ۷- ژله فرمند حاوی اسید سیتریک، ۸- شربت پرتقال سن‌ایچ حاوی اسید آسکوربیک و اسید سیتریک. ۱۰ گرم از هر یک از نمونه‌ها با ۹۰ 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 (۱۸). سپس پلیت‌ها بمدت ۲۴ ساعت درانکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد 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 ۴۵ درجه سانتی‌گراد و تخمیر هیدراتهای کربن (گلوکز، آرابینوز، گزیلوز، مانیتول، ترهالوز، ساکاروز، سلوبیوز، رافینوز، گالاکتوز) سپس باکتری لیستریا منوسیتوژنز شناسایی شده بعلت داشتن قدرت بیماریزایی

لیستریا منوسیتوژنز را یک بیماریزا خطرناک در غذا ساخته است. این باکتری در پنیر سفید با رطوبت حدود درصد ۵۶-۵۵ و pH حدود ۴/۳ و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد 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.

میکروبیهای بیماریزا در مواد غذایی بطور تخمینی سالانه در ایالات متحده ۶/۵ تا ۳۳ میلیون نفر را بیمار می‌کنند و ۲/۹ تا ۶/۷ بلیون دلار خسارت وارد می‌کنند. که ۰/۲ تا ۰/۳ بلیون دلار آن مربوط به باکتری لیستریا منوسیتوژنز است (۱۴). 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 می‌باشد (۱۰). 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 می‌باشد 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 بنزوئیک، سوربات پتاسیم، سیترات

بمدت ۱۶ 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 سوپ استریل بر روی محیط کشت جامد مولر هیتون آگار کشت داده و پلیتها ۴۸ تا ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. کمترین غلظت ماده نگهدارنده که در آن غلظت هیچ باکتری زنده نمانده باشد بیان کننده میزان MBC آن ماده است (۱).

۵- بررسی اثر مهاري نایسین بر روی لیستریا منوسیتوژنز در دمای یخچال: در شرایط استریل پنیر خامه ای 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 میلی لیتر محلول بافر پیتون نمکی دارای ۰/۱ درصد پیتون و ۰/۸۵ درصد نمک کلرید سدیم نمونه پنیر بصورت هموزن درآمد و با قاشقک چوبی یکنواخت شد. سویه لیستریا منوسیتوژنز جدا شده از غذا و رشد کرده در محیط کشت TSB بمیزان $10^6 \times 1/5$ CFU/g به هر نمونه تلقیح شد. از یک نمونه کنترل بدون تلقیح باکتری و بدون نایسین و یک نمونه کنترل فقط داری باکتری لیستریا منوسیتوژنز استفاده شد. محلول ذخیره نایسین تا ۸۰۰ IU/ml در آب مقطر استریل رقیق و بمیزان ۲۰ میلی لیتر به هر تیمار اضافه شد. حجم نهایی نمونه ۳۰ میلی لیتر بود. نمونه ها بمدت ۲۱ روز در دمای ۴ درجه سانتی گراد انکوبه شد. جهت شمارش سلولهای زنده هر ۳ روز یکبار از نمونه های کنترل و تیمار رقت تهیه و بر سطح محیط کشت BHI آگار تلقیح شد. نمونه ها بمدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه و تعداد باکتریها شمارش شد (۲۷).

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

ج- تهیه محلول ذخیره مواد نگهدارنده: مقدار ۱۰۰ میلی گرم از نایسین (نیزاپلین ۲/۵ درصد) در ۱۰ میلی لیتر اسیدکلریدریک ۰/۰۲ نرمال حل شد تا غلظت آن به IU/ml 10^4 برسد ($1 \mu\text{g} = 10 \text{ IU}$). سپس با استفاده از فیلتر ۰/۴۵ میکرومتری استریل، و در دمای ۲۰ - درجه سانتی گراد منجمد شد، و برای تهیه رفتهای 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 میلی لیتر آب مقطر تهیه و سپس با استفاده از فیلتر ۰/۴۵ میکرومتری استریل شد و در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد. اسید بنزوئیک در آب نامحلول است و از محلول ۱۰ درصد الکلی آن استفاده شد. جهت تهیه رقت های 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 میلی لیتر از ماده نگهدارنده استریل در لوله شماره یک و یک میلی لیتر در لوله شماره دو ریخته شد. سپس از محیط کشت TSB استریل بمیزان یک میلی لیتر به لوله های 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 ۴ و تا لوله شماره ۹ انتقال انجام گرفت و از لوله ۹ یک میلی لیتر دور ریخته شد. از کشت میکروبی که حاوی $10^6 \times 1/5$ CFU/ml است به هر لوله یک میلی لیتر اضافه شد. حجم نهایی هر لوله ۲ میلی لیتر است. لوله ۱۰ بعنوان کنترل مثبت و حاوی ۱ میلی لیتر محیط کشت و ۱ میلی لیتر باکتری است. لوله ۱ بعنوان کنترل منفی است و حاوی ۱ میلی لیتر ماده ضد میکروبی و ۱ میلی لیتر باکتری می باشد. لوله ها

بحث و نتیجه گیری

از باکتریهای جداسازی شده ۸۴/۵۶ درصد باکتری گرم مثبت (۵۳/۸ درصد باسیل و ۳۰/۷۶ درصد کوکسی) و ۱۵/۳۸ درصد باسیل گرم منفی است که تقریباً با نتایج آزمایش Lateef و همکاران در سال ۲۰۰۴ 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 منوسیتوژنز انتخاب و میزان حساسیت آن به مواد نگهدارنده بررسی شد.

باکتری لیستریا منوسیتوژنز جدا شده نسبت به غلظت مجاز بنزوات سدیم (۰/۲ درصد)، اسیدسوربیک (۰/۳ درصد)، سوربات پتاسیم (۰/۳ درصد)، سترات سدیم (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 (۱۵).

و- ارزیابی های آماری: جهت بررسی معنی دار بودن تفاوت بین منحنیهای حاصل در مقایسه با کنترل از طرح فاکتوریل تک عاملی استفاده شد. بدلیل نرمال نبودن داده ها از آنها لگاریتم گرفته شد و با استفاده از نرم افزار Minitab میزان F تعیین و معنی دار بودن اختلاف بین منحنیهای کنترل و مورد آزمایش بررسی شد. جهت بررسی معنی دار بودن اختلاف بین باکتریها از نظر حساسیت یا مقاومت از نرم افزار SPSS 13، آزمون Paired-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 ۶ 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.

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

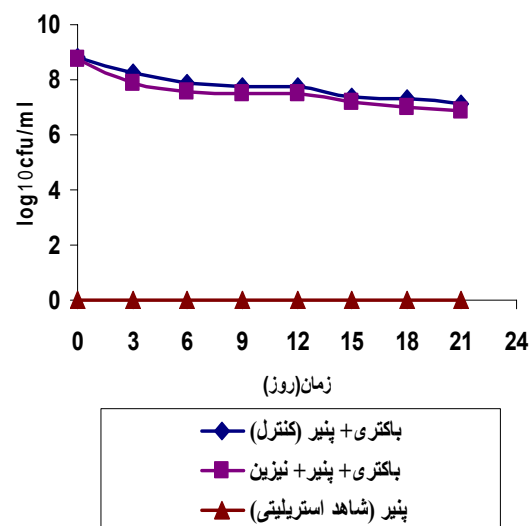
| MIC بر حسب g/ml | | نام مواد نگهدارنده | |
|----------------------------|-----------------------------|--------------------|---------|
| لیستریا منوسیتوژنز جدا شده | لیستریا منوسیتوژنز PTCC1164 | | |
| ۰/۷۵ درصد | ۰/۱۸۷ درصد | اسیدسیتریک | شیمیایی |
| ۱/۵ درصد | ۰/۷۵ درصد | سترات سدیم | |
| ۰/۱۲۵ درصد | ۰/۰۰۶۲۵ درصد | اسیدبنزوئیک | |
| ۷ درصد | ۱/۷۵ درصد | بنزوات سدیم | |
| ۱ درصد | ۱ درصد | اسیدسوربیک | |
| ۲/۵ درصد | ۰/۶۲۵ درصد | سوربات پتاسیم | |
| ۰/۶۲۵ درصد | ۰/۶۲۵ درصد | اسیداستیک | |
| ۱/۲۵ درصد | ۰/۶۲۵ درصد | اسیدپروپیونیک | |
| ۱۲۵ IU/ml | ۵۰۰ IU/ml | نایسین | |

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

| MBC بر حسب g/ml | | نام مواد نگهدارنده |
|-----------------------------|----------------------------|--------------------|
| لیستریا منوسیتوژنز PTCC1164 | لیستریا منوسیتوژنز جدا شده | |
| ۰/۱۸۷ درصد | ۱/۵ درصد | اسیدسیتریک |
| ۰/۷۵ درصد | ۳ درصد | سیترات سدیم |
| ۰/۰۰۶۲۵ درصد | ۰/۰۲۵ درصد | اسیدبنزویک |
| ۱/۷۵ درصد | ۷ درصد | بنزوات سدیم |
| ۱ درصد | ۲ درصد | اسیدسوربیک |
| ۰/۶۲۵ درصد | ۵ درصد | سوربات پتاسیم |
| ۰/۶۲۵ درصد | ۱/۲۵ درصد | اسیداستیک |
| ۰/۶۲۵ درصد | ۲/۵ درصد | اسیدپروپیونیک |
| ۵۰۰ IU/ml | ۱۲۵ IU/ml | نایسین |
| | | طبیعی |

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 بازبازی 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 (۴۰۰۰ IU/ml) در مواد غذایی حساسیت نشان می‌دهد (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 ۱۹۸۴ در غلظت ۳۲ IU/ml تا ۲۵۶ IU/ml نایسین سویه‌های مختلف لیستریا منوسیتوژنز را مهار کردند Harris 1991. در مطالعه دیگر سه سویه از لیستریا منوسیتوژنز در غلظت ۴۰۰ IU/ml مهار شد (۲۴).

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



شکل (۱): ارزیابی کارایی نایسین بر روی باکتری لیستریا منوسیتوژنز جدا شده در دمای یخچال

باکتری لیستریا منوسیتوژنز جدا شده نسبت به اسیدبنزویک، بنزوات سدیم، اسیدسیتریک، سیترات سدیم، اسیدسوربیک، سوربات پتاسیم، 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 می‌شود. رها شدن پروتون (H^+) باعث اسیدی شدن محتوای سلول شده و دیواره سلول

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 (۲۴). همچنین امکان ایجاد بیماریزاهای غذایی مقاوم در برابر مواد ضد میکروبی در مراحل مختلف تولید غذا ممکن است بر کارایی تیمارهای محافظت کننده اثر بگذارد (۱۵). Davies و همکاران در سال ۱۹۹۴ توانستند لیستریا منوسیوتوزن را بطور مؤثر در پنیر در دمای ۸-۶ درجه سانتی گراد کنترل کنند (۹). Abee و همکاران در سال ۱۹۹۴ متوجه شدند که فعالیت نایسین در دمای پایین کاهش می یابد. چون در دمای پایین غشاء سویه های مقاوم انعطاف پذیری کمتری نسبت به سویه های حساس دارند. در نتیجه تغییر زنجیره های هیدروکربنی لیپیدهای غشاء که در سویه های مقاوم و در دمای پایین رخ می دهد، سیالیت غشاء کاهش یافته و انتقال ماده غذایی به داخل سلول تحت تأثیر قرار می گیرد و مانع ورود نایسین به سلول باکتری می شود (۲۰). مقاومت به نایسین در باکتری لیستریا منوسیوتوزن توسط Davies و همکاران در سال ۱۹۹۴ و Harris و همکاران در سال ۱۹۹۱ گزارش شد (۱۶ و ۲۷). Pol & Smid نیز در سال ۱۹۹۹ نشان دادند که در دمای ۸ درجه سانتی گراد حساسیت باسیلوس سرئوس بیشتر از لیستریا منوسیوتوزن به نایسین است؛ اما در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد حساسیت آنها مشابه می باشد (۲۴). مقاومت سویه های مختلف لیستریا منوسیوتوزن نسبت به IU/ml ۵۰۰ نایسین نیز گزارش شده است (۲۹).

این تحقیق نشان می دهد که حساسیت لیستریا منوسیوتوزن 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

لازم است، تیمار حرارتی، دمای نگهداری، فعالیت آب محصول و حضور افزودنیهای غذایی دیگر که می تواند با ماده نگهدارنده مورد نظر برهمکنش داشته باشد (تشدید کنندگی یا ممانعتی) باعث می شود 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 ۶/۷-۶/۷ و غلظت نمک در پنیر ۳-۳/۱۵ درصد بود. دمای ۴ 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 منوسیوتوزن مورد بررسی در حضور نایسین با آنالیز آماری به روش فاکتوریل تک عاملی و با احتمال خطای ۰/۰۵ کاهش معنی داری نشان نداد. علت این امر می تواند مقاومت سویه لیستریا منوسیوتوزن به نایسین در محیط غذایی (پنیر خامه ای) در دمای ۴ درجه سانتی گراد باشد. با توجه به اینکه سویه های مقاوم با قرار گرفتن باکتری در معرض نایسین در غذا مورد انتظار است (۱۶) و در ایران از این ماده نگهدارنده برای محافظت مواد غذایی استفاده نمی شود ایجاد مقاومت در سویه های جدا شده در ایران دور از انتظار است. اما نمی توان 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 \log_{10} CFU/ml 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 حالیت 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 منوسیوتوزن در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد و بمدت ۴۸ ساعت در پنیر بررسی کردند. اما این مواد

نایسین به‌مراه سایر روشهای نگهداری غذا است (۱۹). همچنین بررسی تأثیر افزودن نایسین به شیر در هنگام تولید پنیر پیشنهاد می‌شود.

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 (۱۶) یکی از این روشها استفاده از

منابع

- ۱- 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: ۴۱-۴۲.
- 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- Forsythe, 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). Purification 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

- activity against foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*, 62: 1011-1016.
- 22- Noonpakdee, W., Snavarangekna, C., Jumriangrit, P., Sonomot, K. and Panyim, S. (2003). Isolation of nisin producing *Lactococcus lactis* WNC20 from Nham, a traditional Thai. *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 lantibiotic 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 Nuñez, M. (1998). Synergistic effect of nisin and the lactoperoxidase system on *Listeria monocytogenes* in skim milk. *International Journal of Food Microbiology*, 40: 35-42.

Evaluation of applicability of Nisin on milk isolated bacteria *Listeria monocytogenes* which is also resistant to some organic acides 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 nonpasteurized milk and then MICs & MBCs of organic acids & their salts and nisin were measured against this strain with serial dilution method and it was compared with *Listeria monocytogenes* PTCC1164. The MICs of isolated strain for sodium benzoate (7%), sorbic acid (1%), potassium sorbate (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 (0.0125 درصد) 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 laboratory condition however in this study it was reported in cheese condition.

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