

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

آمنه نصر<sup>۱\*</sup>، رoha 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 منوستیوژنر 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 اسیدیک و سیترات سدیم به طور توان در غلظت‌های مختلف رسم شده و تغییرات pH در این مدت بررسی شد. لیستریا منوستیوژنر در حضور هیچ یک از غلظت‌های sub-MIC اسید سیتریک رشد نکرد که نشان دهنده حساسیت لیستریا منوستیوژنر 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 معنی دار است. همچنین اسید استیک و سیترات سدیم وقتی با هم استفاده شوند اثر یکدیگر را افزایش می‌دهند. طبق این آزمایشها لیستریا منوستیوژنر 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 منوستیوژنر ، نیزین ، مواد نگاهدارنده ، کمترین غلظت مهارکننده

## ۱- مقدمه

مواد نگاهدارنده<sup>۱</sup> برای محدود کردن رشد و فعالیت ریزسازواره‌ها 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 مخمراها 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 ارگانیسم‌های 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 ۶/۷ تا ۲/۹ بیلیون دلار خسارت وارد می‌کنند . به طور کلی ۵۵ تا ۲۵ درصد هزینه‌ها مربوط به بیماری‌های حاصل از باکتریهای گرم مثبت است [۲].

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

در بین ارگانیسم‌های حساس استفاده آنها را محدود می‌کند. در نتیجه جهت بهبود فعالیت آنها راهکارهای مختلف پیشنهاد شده است که یکی از آنها استفاده از ترکیب مواد نگاهدارنده مختلف می‌باشد<sup>[۷]</sup>. تکنولوژی ترکیبی روشنی 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<sup>[۸]</sup>. استفاده از نیزین در حضور اسید استیک و سوربات برای کنترل لیستریا منوسیتوژنر در نگهداری طولانی پنیر پیشنهاد شده است<sup>[۹]</sup>.

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 نگاهدارنده از تأثیر آنها در برابر باکتری کاسته می‌شود و سبب انتشار بیماری و به خطر اندختن سلامت جامعه می‌گردد، لذا شناسایی سویه‌های مقاوم و پیشنهاد راههایی جهت کنترل آنها در مواد غذایی ضروری است<sup>[۱۰]</sup>.

لیستریا منوسیتوژنر یک باکتری بیماری‌ای غذایی است که باعث مسمومیت می‌شود<sup>[۱۱]</sup>. در سالهای اخیر لیستریا منوسیتوژنر مهمترین باکتری بیماریزا مورد توجه صنایع غذایی بوده که با مصرف غذا و مخصوصاً شیر و لبنیات ایجاد آلودگی می‌کند<sup>[۱۲]</sup>. خصوصیاتی چون پراکنده‌گی 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 منوسیتوژنر را یک بیماری‌زای خطرناک در غذا ساخته است<sup>[۱۳]</sup>. این باکتری در پنیر سفید با رطوبت حدود ۵۵-۵۶٪ و دمای +۴ درجه بیش از سه ماه زنده می‌ماند. مسمومیت‌های حاصل از این باکتری بیشتر در اثر مصرف شیر و فراورده‌های آن به ویژه پنیر و گوشت و فراورده‌های آن عارض می‌شود که لیستریوز<sup>۱</sup> نامیده می‌شود. در زنان باردار لیستریوز ابتدا به صورت یک سرماخوردگی با تب و لرز و سرد در شروع شده و نهایتاً ممکن است منجر به زایمان زودرس، سقط جنین و مرگ نوزاد و یا نوزاد عقب مانده ذهنی شود. همچنین باعث منزئت و آنسفالیت، عفونت خونی، آندوکاردیت و سپتی سمی در نوزادان و بیماران دارای ضعف سیستم ایمنی می‌شود<sup>[۱۴]</sup>. در بیشتر مطالعات یک سویه لیستریا انتخاب شده و در حضور غلاظتهای پایین تر از MIC

موردن استفاده هستند، ایده‌آل نمی‌باشد و کارآیی و ایمنی آنها متغیر است، امکان مشخص کردن یک ماده نگاهدارنده ایده‌آل حتی برای یک نوع ماده غذایی خاص وجود ندارد. در هر مورد برای تصمیم‌گیری در استفاده از سیستم محافظت باید فواید حاصل از آن را در نظر گرفت و آن را با خطری که از عدم محافظت کافی فراورده و خطرات ناخواسته ممکن که از ماده نگاهدارنده مصرفی حاصل می‌شود مقایسه کرده و کافی بودن محافظت با خطری که ماده نگاهدارنده برای مصرف کننده دارد متعادل شود<sup>[۳]</sup>. اسیدهای آلی و نمک آنها مثل پروپیونیک اسید و پروپیونات‌ها، لاکتیک اسید، سوربیک اسید و سورباتها که از نگاهدارنده‌های مورد استفاده در لبنیات هستند<sup>[۴]</sup>، 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 ارگانیسمها مثل لاکتوباسیل‌ها یا باکتریهای پروپیونیک اسید تولید می‌شوند. نگاهدارنده‌های طبیعی از میکروب، گیاه و حیوان منشأ می‌گیرند. دسته‌ای از پیتیدهای 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 نگاهدارنده 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 نگاهدارنده غذایی به جای مواد شیمیایی تایید کردند. بنابراین نیزین از سال ۱۹۸۷ به عنوان افزودنی مجاز در غذاها و در فراورده‌های لبنی استفاده شده است، امروزه نیزین به عنوان یک ماده نگاهدارنده در بیش از ۵۰ کشور در سراسر دنیا در محصول‌های متنوع مثل پنیر، غذاهای کنسرو شده و گوشت نمک‌زده استفاده می‌شود<sup>[۵]</sup>. یک نگرانی عمده در مورد استفاده از مواد نگاهدارنده طبیعی امکان ایجاد مقاومت در باکتریها به صورت طبیعی یا اکتسابی است. فرکانس مقاومت به نیزین در باکتری لیستریا منوسیتوژنر بین  $10^{-۹}$  تا  $10^{-۵}$  مشاهده شده است<sup>[۶]</sup>. 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

با استفاده از فیلتر  $0.45\text{ }\mu\text{m}$  میکرومتری سترون شد و در دمای  $20^\circ\text{C}$ - منجمد شد<sup>[۱۷]</sup>. جهت تهیه محلول  $10\%$  اسیدهای آلی  $10\text{ g}$  از پودر آنها در  $100\text{ ml}$  لیتر آب مقطر حل شد. سپس با استفاده از فیلتر  $0.45\text{ }\mu\text{m}$  میکرومتری سترون شده و در دمای  $0^\circ\text{C}$  نگهداری شد. جهت تهیه رقت‌های مختلف از آب مقطر سترون استفاده شد.

**تعیین حداقل غلظت مهار کننده (MIC)<sup>۲</sup> و حداقل غلظت کشنده مواد نگاهدارنده (MBC)<sup>۳</sup> به روش رقت لوله‌ای:** میزان MIC و MBC مواد نگاهدارنده مختلف بر روی باکتری لیستریا منوسیتوژنر جدا شده تعیین و با لیستریا منوسیتوژنر PTCC1164 مقایسه شد. برای این کار از روش رقت لوله‌ای به تعداد  $10\text{ ml}$  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  $10$  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  $1/5 \times 10^7\text{ CFU/ml}$  باکتری است به هر لوله یک میلی لیتر اضافه شد. حجم نهایی هر لوله  $2\text{ ml}$  لیتر است. لوله  $10$  به عنوان کنترل مثبت است و حاوی  $1\text{ ml}$  لیتر محیط کشت و یک میلی لیتر باکتری است. لوله  $1$  به عنوان کنترل منفی است و حاوی  $1\text{ ml}$  لیتر ماده ضد میکروبی و  $1\text{ ml}$  لیتر باکتری می‌باشد. لوله‌ها به مدت  $16\text{ h}$  تا  $20\text{ h}$  ساعت در دمای  $37^\circ\text{C}$  گرمخانه گذاری 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<sup>[۱۸]</sup>.

**بررسی تأثیر مواد نگاهدارنده در غلظت‌های sub-MIC بر منحنی رشد باکتری لیستریا منوسیتوژنر:** ابتدا منحنی رشد باکتری لیستریا منوسیتوژنر بدون حضور ماده نگاهدارنده رسم شد. به این صورت که  $50\text{ ml}$  لیتر باکتری ( $10^9\text{ CFU/ml}$ ) به ارلن حاوی  $450\text{ ml}$  لیتر نوترینت برات تلقیح شد. جهت بررسی غلظت‌های مختلف مواد نگاهدارنده در آزمایش‌های

باکتریوسین کشنندگی آن بررسی می‌شود. به نظر می‌رسد که یک سیستم مایع برای بررسی مقاومت باکتریها مناسبتر باشد<sup>[۱۵]</sup>.

## ۲- مواد و روشها

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

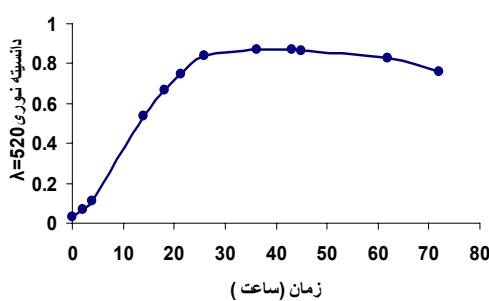
**ب- وسائل مورد استفاده:** دستگاه فیلتراسیون مدل Soviriel از فرانسه ، فیلتر  $0.45\text{ }\mu\text{m}$  میکرومتری، شیکر مدل Shimadzu Heraeus

**ج- روش کار:** برای جداسازی باکتری،  $10\text{ ml}$  از شیر غیر پاستوریزه تهیه شده از سطح شهر در شرایط سترون با  $90\text{ ml}$  لیتر محلول رینگر به طور کامل مخلوط گردید و از آن سری رقت (تا رقت  $4^\circ\text{C}$ ) 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  $2$  بار تکرار شد. سپس پلیت‌ها به مدت  $24$  ساعت در انکوباتور  $37^\circ\text{C}$  قرار گرفتند. پس از خالص‌سازی آزمایش‌های بیوشیمیابی زیر جهت شناسایی باکتری‌های جداسازی شده انجام پذیرفت: رنگ آمیزی گرم، کاتالاز، اکسیداز، حرکت، اندول، احیاء نیترات، رشد بی‌هوایی، تست وزپرسکوئر، رشد در  $45^\circ\text{C}$  و تخمیر هیدراتهای کربن (گلوکر، آرایینوز، گریلوز، مانیتول، ترمالوز، ساکاروز، سلوبیوز، رافینیوز، گالاکتوز) سپس باکتری لیستریا منوسیتوژنر شناسایی شده به علت داشتن قدرت بیماریابی آن انتخاب و جهت بررسی حساسیت آن نسبت به مواد نگاهدارنده مختلف مورد بررسی قرار گرفت<sup>[۱۶]</sup>. جهت تهیه محلول ذخیره مواد نگاهدارنده مختلف به این صورت عمل شد: مقدار  $100\text{ ml}$  یک گرم از نیزین (نیزابلین  $2/5\%$ ) در  $10\text{ ml}$  بروندیک  $10^4\text{ IU/ml}$  بر سد سپس  $0/02$  نرمال حل شد تا غلظت آن به

2. Minimum Inhibitory Concentration  
3. Minimum Bacteriocide Concentration

1.TSB: Tripton 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 سلول‌های صدمه دیده بازیابی شده و رشد می‌کنند. همچنین قرار گرفتن لیستریا منوسیتوژنر در معرض اسید، باکتری را در برابر اسیدیته بیشتر سازگار می‌کند[۲۱]. MIC به دست آمده برای نیزین بر روی سویه لیستریا منوسیتوژنر مورد بحث با نظر Sandine و Benkerroum در سال ۱۹۸۸ مبنی بر اینکه MIC نیزین برای سویه‌های مختلف لیستریا منوسیتوژنر  $100-185\text{ IU/ml}$  است مطابقت دارد[۱۰]. این دو پژوهشگر حساسیت سویه‌های مختلف لیستریا منوسیتوژنر را نسبت به نیزین با روش چاهک پلیت تعیین کردند و ذکر کردند که اثر نیزین بر لیستریا منوسیتوژنر بسیار وابسته به سویه است. حساسیت لیستریا منوسیتوژنر به نیزین با کاهش pH افزایش می‌یابد. این افزایش یا به علت افزایش کارآئی نیزین در pH پایین و یا به دلیل افزایش اثر اسیدیته با نیزین است[۲۲]. با مقایسه MIC به دست آمده برای لیستریا منوسیتوژنر مشخص می‌شود که باکتری مورد بررسی مشابه سویه‌های دیگر به نیزین حساسیت نشان می‌دهد. و میزان MIC به دست آمده مشابه ATCC15313 MIC نیزین در برابر لیستریا منوسیتوژنر در عدم است[۲۳]. منحنی رشد باکتری لیستریا منوسیتوژنر در عدم حضور ماده نگاهدارنده در شکل ۱ آورده شده است. سپس منحنی رشد باکتریها با حضور مواد نگاهدارنده در غلظت‌های مختلف رسم شد تا واکنش باکتری‌ها نسبت به آنها بررسی شود.



شکل ۱ منحنی رشد باکتری لیستریا منوسیتوژنر جدا شده از شیر بدون حضور ماده نگاهدارنده

بعدی غلظت‌های مختلفی از اسید سیتریک، نیزین، اسید استیک و سیترات سدیم به محیط کشت نوترینت برات اضافه گردید. آنگاه پس از هم زدن ارلن اولین نمونه گیری به عنوان ۵۲۰ زمان صفر انجام شد و جذب نوری مایع در طول موج ۳۷°C نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده شد. ارلن حاوی محیط کشت و باکتری در انکوباتور شیکردار با دمای  $100\text{ rpm}$  و با دور  $2\text{ ساعت}$  یکبار جذب نوری مایع در طول موج فوق الذکر خوانده شد و در نهایت منحنی رشد باکتری رسم شد.

### ۳- نتایج و بحث

از آنجا که سمیت اسیدهای آلی به طور ابتدایی با یون‌های هیدروژن ایجاد نمی‌شود بلکه به واسطه مولکول جدا شده است، بنابراین سمیت این مواد بر روی ریزسازواره بستگی به نوع اسید آلی، غلظت آن و دمای گرمخانه‌گذاری دارد[۱۹]. باکتری لیستریا منوسیتوژنر جدا شده نسبت به بنزووات سدیم، اسید سیتریک، اسید بنزویک، سیترات سدیم، اسید سوربیک، سوربات پتاسیم، اسید استیک و اسیدپروپیونیک از باکتری استاندارد مقاومتر است. یک تفاوت قابل توجه در اثر مواد نگاهدارنده مختلف تست شده بر روی لیستریا منوسیتوژنر وجود دارد. بنابراین می‌توان آنها را به ترتیب کاهش قدرت عمل نگاهدارنده‌گی در شرایط آزمایش به این ترتیب مرتب کرد: نیزین با غلظت  $125\text{ }\mu\text{g/ml}$  (معادل با  $125\text{ IU/ml}$ )، اسید بنزویک با غلظت  $125\text{ }\mu\text{g/ml}$  (۰٪)، اسید استیک با غلظت  $625\text{ }\mu\text{g/ml}$  (۰٪)، اسید سیتریک با غلظت  $75\text{ }\mu\text{g/ml}$  (۰٪)، اسید سوربیک با غلظت  $125\text{ }\mu\text{g/ml}$  (۱٪)، اسید پروپیونیک با غلظت  $125\text{ }\mu\text{g/ml}$  (۱٪)، سیترات سدیم با غلظت  $125\text{ }\mu\text{g/ml}$  (۱٪)، سوربات پتاسیم با غلظت  $125\text{ }\mu\text{g/ml}$  (۲٪) و بنزووات سدیم با غلظت  $125\text{ }\mu\text{g/ml}$  (۷٪).

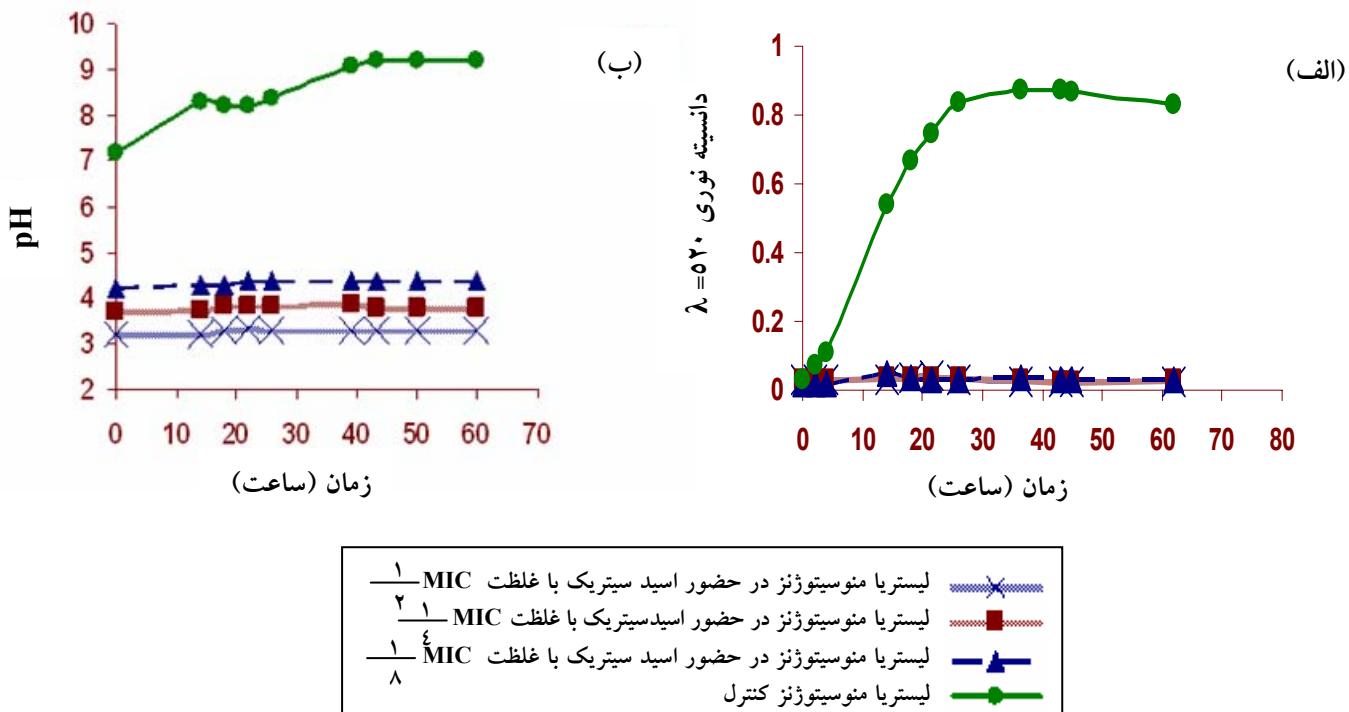
تأثیر بیشتر اسید استیک نسبت به اسید سیتریک توسط Robert در سال ۲۰۰۲ مشاهده شد که مشابه با نتایج این تحقیق می‌باشد[۲۰]. طبق نتایج حاصل باکتری لیستریا منوسیتوژنر مورد بررسی نسبت به سویه‌های دیگر این باکتری که توسط Marth و Ahamad در سال ۱۹۸۹ بررسی گردیده بودند در برابر اسید سیتریک و اسید استیک مقاوم‌تر است [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 ۲ مقایسه MBC مواد نگاهدارنده شیمیایی و طبیعی در محیط کشت TSB بر روی لیستریا منوسیتوژنز PTCC1164 جدا شده از شیر و لیستریا منوسیتوژنز

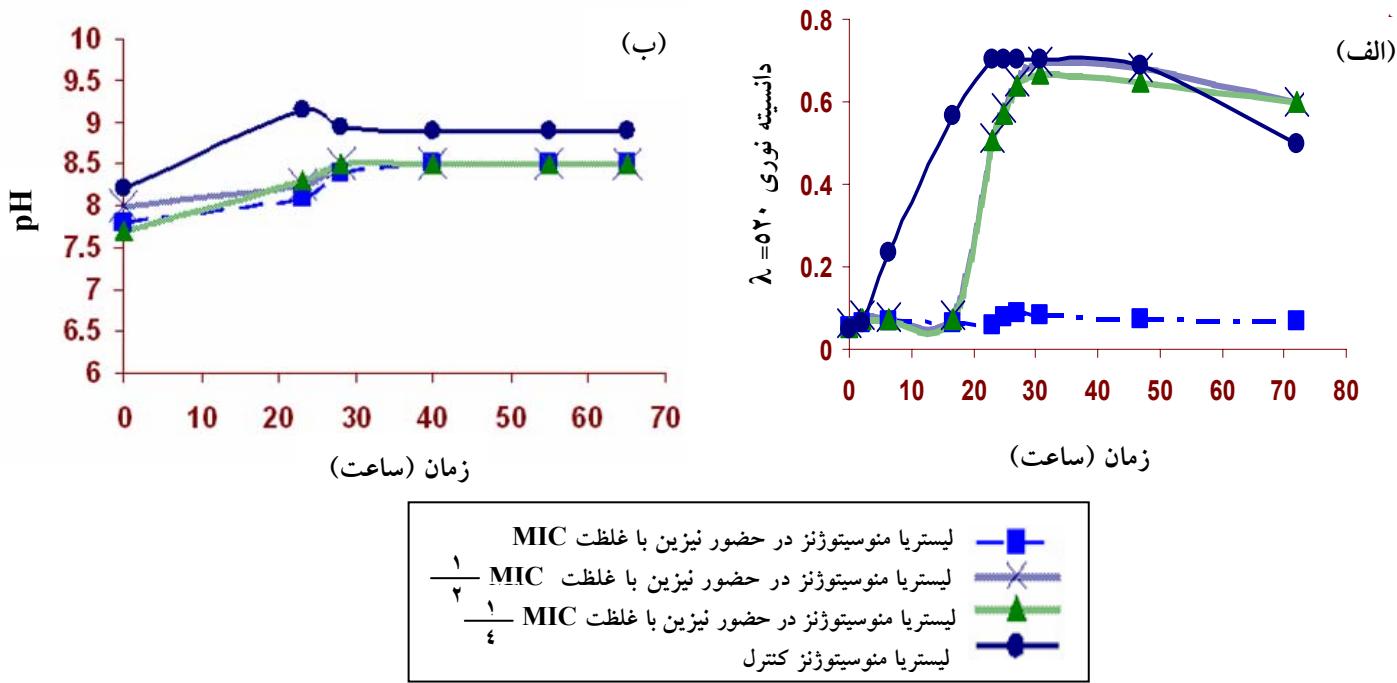
MBC بر حسب g/ml		نام مواد نگهدارنده
لیستریا منوسیتوژنز PTCC1164	لیستریا منوسیتوژنز جدا شده	
٪/۰.۱۸۷	٪/۱۵	اسید سیتریک
٪/۰.۰۶۲۵	٪/۰.۰۲۵	اسید بنزویک
٪/۰.۷۵	٪/۳	سیترات سدیم
٪/۱.۷۵	٪/۷	بنزووات سدیم
٪/۱	٪/۲	اسید سوربیک
٪/۰.۶۲۵	٪/۵	سوربات پتاسیم
٪/۰.۶۲۵	٪/۱.۲۵	اسید استیک
٪/۰.۶۲۵	٪/۲.۵	اسید پروپیونیک
۵۰۰ IU/ml	۱۲۵ IU/ml	طبیعی
		نیزین

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

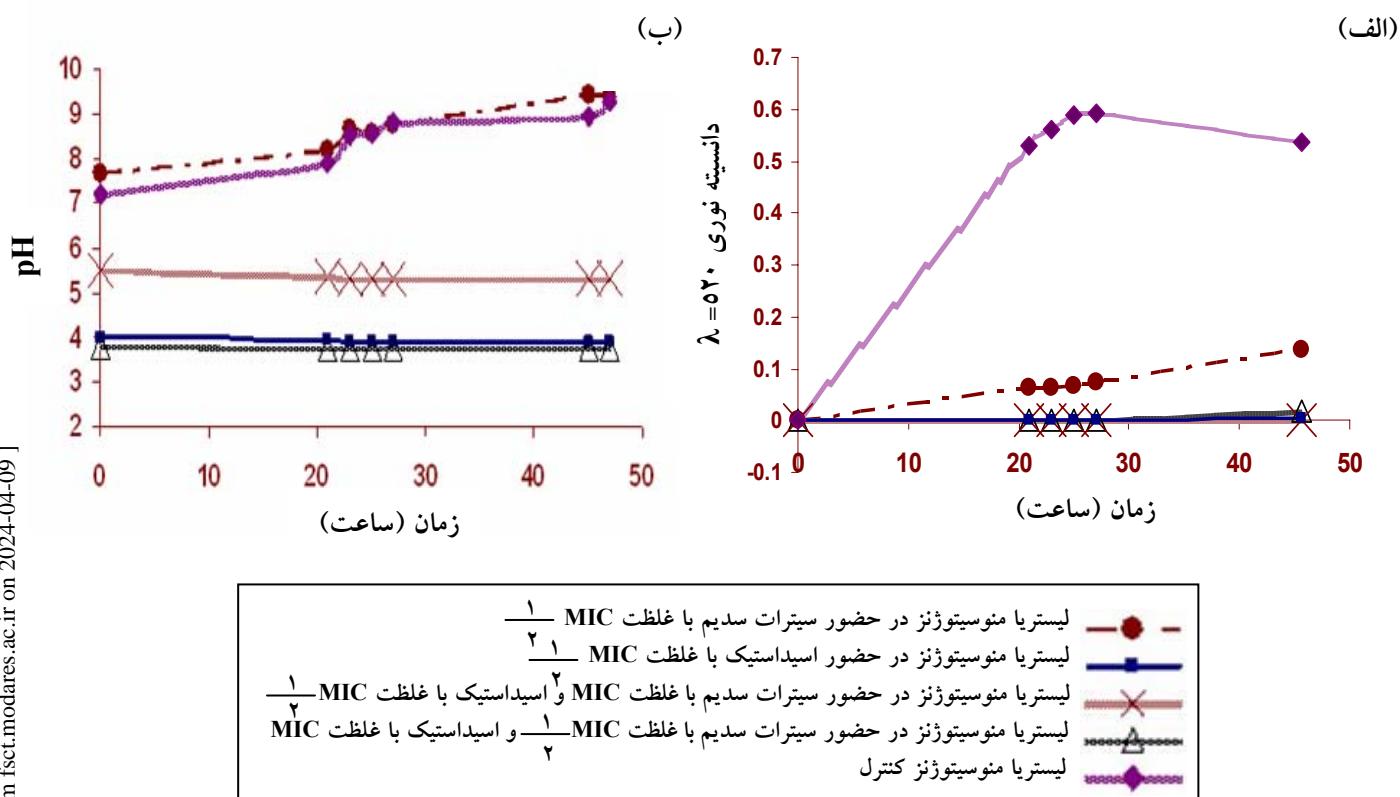
MIC بر حسب g/ml		نام مواد نگهدارنده
لیستریا منوسیتوژنز PTCC1164	لیستریا منوسیتوژنز جدا شده	
٪/۰.۱۸۷	٪/۰.۷۵	اسید سیتریک
٪/۰.۰۰۶۲۵	٪/۰.۰۱۲۵	اسید بنزویک
٪/۰.۷۵	٪/۱.۵	سیترات سدیم
٪/۱.۷۵	٪/۷	بنزووات سدیم
٪/۱	٪/۱	اسید سوربیک
٪/۰.۶۲۵	٪/۲.۵	سوربات پتاسیم
٪/۰.۶۲۵	٪/۰.۶۲۵	اسید استیک
٪/۰.۶۲۵	٪/۱.۲۵	اسید پروپیونیک
۵۰۰ IU/ml	۱۲۵ IU/ml	طبیعی
		نیزین



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



شکل ۳ منحنی رشد لیستریا منو سیتوژن در حضور نیزین با غلظتهای  $\frac{1}{4}$  MIC،  $\frac{1}{2}$  MIC و  $\frac{1}{4}$  MIC (الف)  
و تغییرات pH محیط کشت در حضور غلظتهای  $\frac{1}{4}$  MIC،  $\frac{1}{2}$  MIC و  $\frac{1}{4}$  نیزین (ب)



شکل ۴ بررسی بر هم کش اسید استیک و سیترات سدیم بر روی باکتری لیستریا منو سیتوژن (الف) و تغییرات pH محیط کشت در حضور غلظتهای 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 lacticin 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 براز، ص. ۱۳۷۸. تضمین کیفیت در برابر میکروبها در فراورده های آرایشی، بهداشتی و داروهای غیر استریل. انتشارات دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ۱۹۳-۱۹۸، ۱۰۱-۱۲۱، ۱۵۷.
- [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 منوسیتوژنر در حضور اسید سیتریک با غلظتهاي 1/8 MIC، 1/4 MIC، 1/2 MIC sub-MIC یعنی می دهد که نتایج آن در شکل ۲ آمده است. نتایج مربوط به رشد باکتری لیستریا منوسیتوژنر در حضور نیزین با غلظتهاي sub-MIC در شکل ۳ آمده است. همچنین منحنی رشد باکتری لیستریا منوسیتوژنر در حضور اسید اسیدیک و سیترات سدیم رسم شد که در شکل ۴ نشان داده است. شکل ۲ نشان می دهد که باکتری لیستریا منوسیتوژنر در حضور اسید سیتریک در هیچ یک از غلظتهاي sub-MIC رشد نکرد که قدرت زیاد اسید سیتریک در مهار لیستریا منوسیتوژنر را نشان می دهد. اختلاف بین نمونه کنترل و سایر نمونه ها معنی دار است. در محیط دارای اسید سیتریک با غلظتهاي یک به دو ، یک به چهار و یک به هشت به ترتیب pH در دامنه ۳/۳-۳/۲، ۳/۲-۳/۸ و ۳/۷-۴/۲ ثابت باقی ماند و باکتری قادر به تعدیل pH و رشد نبود. تفاوت بین منحنی های pH نیز معنی دار است.

نتایج مربوط به اثر نیزین بر باکتری لیستریا منوسیتوژنر در شکل (۳) آمده است. این باکتری در حضور نیزین با غلظت برابر با 1/2MIC رشدی نشان نداد. اما در غلظت کمتر یعنی MIC و 1/4 MIC با تأخیر ۱۸ ساعته رشد کرد. اختلاف بین نمونه کنترل و سایر نمونه ها معنی دار است. اثر تشیدیکنندگی اسیداستیک و سیترات سدیم بر روی لیستریا منوسیتوژنر 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 منوسیتوژنر در حضور سیترات سدیم (MIC<sub>۱</sub>) رشد کننده نشان داد و OD<sub>۱</sub> به میزان ۰/۱ افزایش داد. اما در حضور اسیداستیک (MIC<sub>۲</sub>) هیچ رشدی نشان نداد و pH در محدوده ۴-۶/۹۲ ثابت باقی ماند. اگر این دو ماده با هم ترکیب شوند و سیترات سدیم در غلظت MIC و اسیداستیک در غلظت MIC<sub>۱</sub> باشد، pH در ۵/۳۶-۵/۵ ثابت باقی مانده و باکتری هیچ رشدی نشان نمی دهد. همچنین با ترکیب اسیداستیک در غلظت MIC و سیترات سدیم در غلظت MIC<sub>۱</sub>، باکتری هیچ رشدی ندارد و pH در ۳/۸-۳/۷۵ ثابت می ماند. این نتایج نشان می دهد 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، ۴۱-۴۲.
- [۱۹] 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.
- [۲۰] 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.
- [۲۱] Ellin Doyle M. Literature survey of the various techniques used in *Listeria* intervention. 1999. (<http://www.wisc.edu/fri/briefs.htm>).
- [۲۲] 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.
- [۲۳] 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.
- [۱۰] 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.
- [۱۱] Zapico P, Medina M, Gaya P. and Nuñes M. Synergistic effect of nisin and the lactoperoxidase system on *Listeria monocytogenes* in skim milk. *International Journal of Food Microbiology* 1998; 40, 35-42.
- [۱۲] 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. آلدگیهای باکتریایی و قارچی مواد غذایی، انتشارات ارکان، اصفهان، ۸۱-۹۱، ۷۸.
- [۱۴] Jay JM. Modern food microbiology. Fourth edition. Chapman & Hall. New York. Londo. 1992; p102.
- [۱۵] 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.
- [۱۶] 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.
- [۱۷] 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.