مطالعه استفاده از نیسین در کنترل رشد *استرپتوکوکوس اینیایی* و *لاکتوکوکوس گارویه* در فیله ماهی قزل‌آلای رنگین کمان

لاله رومیانی*[۱]، آزاده محمودی[۲]، منصوره قائنی[۱] و سارا احمدی[۱]

۱. گروه شیلات، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران

۲. گروه شیلات، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

***نویسنده مسئول:** *L.roomiani@yahoo.com*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۱/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۲/۲۲

چکیده

در این مطالعه اثر غلظت‌های مختلف نیسین (۰، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) علیه باکتری‌های زئونوز *استرپتوکوکوس اینیایی* و *لاکتوکوکوس گارویه* در فیله ماهی قزل‌آلا در دمای یخچال مورد بررسی قرار گرفت. *استرپتوکوکوس اینیایی* (GQ850377) و *لاکتوکوکوس گارویه* (Ir-170A856bp) به صورت لیوفیلیزه شده از بخش بهداشت و بیماری‌های آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه شدند و پس از تعیین دوز تلقیح هر دو باکتری ($۱/۴ \times ۱۰^{۸}$ و $۹/۲ \times ۱۰^{۷}$ واحد تشکیل دهنده کلونی در هر میلی‌لیتر) و آماده‌سازی محلول نیسین، تلقیح باکتری‌ها به فیله ماهی انجام شد. نتایج نشان دادند که غلظت‌های مختلف نیسین در کاهش هر دو باکتری دارای تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه شاهد بودند ($P<0.05$). بیشترین اثر ممانعت از رشد باکتری در غلظت ۰/۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نیسین به میزان ۶۵/۷۷ درصد علیه *لاکتوکوکوس گارویه* و ۶۰/۸۸ درصد علیه *استرپتوکوکوس اینیایی* مشاهده شد به طوری که نتایج نشان داد نیسین می‌تواند به عنوان یک ماده نگهدارنده در کنترل باکتری‌های بیماری‌زای مواد غذایی موثر باشد.

واژگان کلیدی: *استرپتوکوکوس اینیایی*، *لاکتوکوکوس گارویه*، نیسین، قزل آلای رنگین کمان.

مقدمه

عفونت‌های ناشی از مواد غذایی در میان پرهزینه‌ترین و جدی‌ترین مسائل بهداشتی در سطح جهان به شمار می‌روند. در میان عوامل عفونی بیماری‌زای مواد غذایی که بین ماهی و انسان مشترک هستند می‌توان به *لاکتوکوکوس گارویه* و *استرپتوکوکوس اینیایی* اشاره کرد (Soltani et al., 2014). *لاکتوکوکوس گارویه* و *استرپتوکوکوس اینیایی* باکتری‌های کوکوسی گرم مثبت، بدون هاگ، غیر متحرک، بی هوازی اختیاری و به صورت زنجیره‌های کوتاه هستند (Bowker et al., 2010). تاکنون بیشتر از ۲۵ مورد عفونت ناشی از *استرپتوکوکوس اینیایی* به انسان از امریکا، کانادا، تایوان و چین گزارش شده است (Buchanan et al., 2008). هر دو باکتری فوق سبب مشکلات پوستی در انسان می‌شوند و در وضعیت حاد منجر به مشکلات قلبی و همچنین مننژیت می شوند. این دو باکتری در امریکا از لوله‌های ادراری، خون، پوست و مجاری تنفسی و در کانادا از قلب بیماران جدا شده‌اند (Elliot and Facklam, 1996; Milani et al., 2010; Keirstead et al., 2014).

انتقال عوامل فوق از طریق مصرف ماهیان خام یا نیم پز و یا بواسطه دستکاری ماهی آلوده در زمان حمل و نقل یا تمیز کردن صورت می پذیرد. *استرپتوکوکوس اینیایی* و *لاکتوکوکوس گارویه* از انواع ماهیان آب شیرین و شور و حتی ماهیان آکواریومی جدا شده‌اند (Chio et al., 2014; El-Aamri et al., 2014; Woo and Bruno, 2014). قزل‌آلای رنگین‌کمان یکی از حساس‌ترین این گونه‌هاست و در ایران بدلیل گستردگی پرورش این ماهی، بیماری ناشی از این دو

باکتری نیز از شیوع بالایی برخوردار است (Fadaeifard et al., 2012).

یکی از مهم‌ترین جنبه‌های نگهداری غذا کنترل میکروارگانیسم‌ها است، بطوری که حذف ارگانیسم‌های مولد فساد و پاتوژن‌ها از مواد غذایی هدف بسیاری از تحقیقات است. محصولات شیلاتی و سایر محصولات غذایی زمینه مناسبی برای شیوع گسترده بیماری‌های منتقل شده از طریق غذا در انسان هستند. از آن جهت که کنترل این باکتری‌ها در مواد غذایی مهم است و نیز به علت ایجاد مقاومت این باکتری‌ها در برابر مواد نگهدارنده از تاثیر آنها در برابر باکتری کاسته می‌گردد و سبب انتشار بیماری و به خطر انداختن سلامت جامعه می‌شود. لذا شناسایی سویه‌های مقاوم و پیشنهاد راه حل‌هایی جهت کنترل آنها در مواد غذایی ضروری است (Moosavy et al., 2008). به علت مضر بودن مواد شیمیایی نگهدارنده، استفاده از مواد طبیعی خواسته بسیاری از مصرف‌کنندگان و محققان است. رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در سطوح مواد غذایی لزوم استفاده از مواد ضد میکروبی را بیان می‌کنند که می‌توانند بصورت حمام در ترکیبات ضد میکروبی، اسپری یا بعنوان پوشش بصورت ژل‌های خوارکی و سیستم‌های بسته‌بندی بکار روند که روش‌های فوق در محصولات گوشتی کاربرد فراوان دارند (Razavi Rohani et al., 2012).

باکتریوسین نیسین اولین بار توسط Rogers and Whittier (1928) در انگلیس از باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* به وجود آمد. نیسین اولین بار بوسیله سازمان خوار و بار جهانی در سال ۱۹۶۹ به عنوان نگهدارنده در غذا رواج پیدا کرد و از سال ۱۹۸۷در غذاها و محصولات لبنی مورد استفاده واقع شد. نیسین سمی نیست و سریعاً بوسیله آنزیم‌های هضم کننده غیرفعال می‌شود. پپتیدی است که در برابر گرما پایدار، دارای ۳۴ آمینواسید و با وزن ملکولی ۳۵۱۰ دالتون و فعالیت آن می‌تواند تحت تاثیر عواملی مانند کنستانتره شدن، میکروارگانیسم‌های هدف، واکنش با اجزاء مواد غذایی، میزان چربی، نوع فسفات، شرایط نگهداری و عمل‌آوری غذا قرار گیرد (Pol and Smid, 1999).

هدف از انجام این بررسی، مطالعه تاثیر نیسین بر روی *استرپتوکوکوس اینیایی* و *لاکتوکوکوس گارویه* به عنوان دو پاتوژن زئونوز می‌باشد تا با استفاده از نتایج آن بتوان در صنایع غذایی از آن بهره برد.

مواد و روش کار

تهیه باکتری مورد مطالعه

کشت لیوفیلیزه *استرپتوکوکوس اینیایی* (GQ850377) و *لاکتوکوکوس گارویه* (Ir-170A856bp) از گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران جهت این بررسی مورد استفاده قرار گرفت. تحت شرایط استریل ابتدا کشت لیوفیلیزه در محیط براث در ۳۳ ^{o}C به مدت ۱۸ ساعت دو مرتبه بطور متوالی تجدید کشت گردید. سپس کشت دوم به میزان ۵ به ۱ با گلیسیرین مخلوط شد و در قسمت‌های مساوی در لوله‌های میکروسانتریفیوژ اپندروف استریل در^{o}C۲۰- نگهداری شد (Roomiani and Rokni, 2015).

میزان برآورد دوز تلقیح باکتری

در زیر هود بیولوژیک، برای تهیه میزان دوز تلقیح هر دو باکتری مورد آزمایش، با انتقال باکتری از لوله میکروسانتریفیوژ اپندروف به محیط براث و نگهداری به مدت ۲۴ ساعت در ۳۳ ^{o}C انجام گرفت. مجدداً کشت دومی از این کشت ۲۴ ساعته در براث دیگر (به مدت ۲۴ ساعت در ۳۳ ^{o}C) تهیه شد. سپس لوله‌های کووت حاوی ۵ میلی‌لیتر براث استریل تهیه گردید. مقادیر مختلفی از کشت براث ۲۴ ساعته دوم بر روی لوله‌های کووت مذکور برده شد. با استفاده از دستگاه اسپکتوفوتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر جذب نوری لوله‌های مذکور خوانده شد. بدین ترتیب در هر بار انجام آزمایش (در شرایط مواد غذایی^{3}۱۰ باکتری در هر میلی‌لیتر) با مشخص شدن جذب نوری که تقریبا

معادل 10^5 باکتری در هر میلی‌لیتر بود ۱ میلی‌لیتر از محتویات کووت را برداشته و در شیشه زیمکس ۳۹ میلی‌لیتر آب پپتونه استریل به آن افزوده تا در نهایت در هر ۱۰۰ میکرولیتر از محتویات شیشه زیمکس $10^8 \times$ ۱/۴باکتری موجود باشد. در زمان تلقیح برش‌های ماهی از ۱۰۰ میکرولیتر محتویات شیشه زیمکس استفاده می‌شود تا در هر سانتی‌متر مربع از برش ماهی $10^3 \times 1$ باکتری موجود باشد (Roomiani and Rokni, 2015).

آماده سازی محلول نیسین

از پودر نیسین ۲/۵ درصد (Sigma 5764) استفاده گردید. در زیر هود بیولوژیک نیسین در ۵۰ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۰/۰۲ نرمال حل گردید و از فیلتر ۰/۲ میکرومتری عبور داده شد و با استفاده از رابطه $N_1V_1 = N_2V_2$ مقدار مورد نظر از آن را برداشته و به برش‌های ماهی‌های مورد نظر اضافه گردید (Roomiani and Rokni, 2015).

آماده‌سازی نمونه‌های ماهی

ماهیان ۲۵۰ گرمی قزل‌آلا از ماهی‌سرای کرج خریداری شدند و پس از قطع سر و دم و خارج‌کردن محتویات شکم به فیله‌های ۲۵ گرمی با اندازه ۳×۸ سانتی‌متر تقسیم شدند و با بسته‌بندی بصورت تکی در کیسه‌های زیپ‌دار همراه با یخ به سازمان انرژی اتمی فرستاده شده و با استفاده از اشعه گاما (۵ کیلوگری) استریل شدند. سپس غلظت‌های مختلف نیسین (۰، ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵میکروگرم بر میلی‌لیتر) به آن‌ها اضافه شدند. در نهایت نسبت به تلقیح دوز مورد اشاره باکتری بر روی آن‌ها اقدام گردید. برای این کار هر فیله را در زیر هود بیولوژیک به روش تلقیح نقطه‌ای، به این صورت که باکتری مورد نظر را در ۱۰ نقطه (جمعا به میزان ۱۰۰ میکرولیتر) تلقیح و آن را در حرارت اتاق (۲۵°C) به مدت ۱ ساعت نگه داشته تا خشک شوند. سپس یک فیله از هر تیمار را داخل یک کیسه استریل قرار داده و سپس در روزهای ۳،۰، ۶، ۹ و ۱۵ از نظر رشد باکتری و رسیدن به حد دوز مسمومیت زا یعنی $10^6 <$ بررسی شدند (Roomiani and Rokni, 2015).

نتایج

لگاریتم رشد *استرپتوکوکوس اینیایی* در فیله‌های قزل‌آلا در دمای ۴ °C در جدول ۱ آورده شده است. همانطور که از جدول پیداست غلظت‌های مختلف نیسین در مقایسه با گروه کنترل توانستند اثر معنی‌داری بر رشد باکتری داشته باشند ($P<0.05$). استفاده از کمترین غلظت نیسین (۰/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در روز صفر توانست تعداد باکتری را از log ۴/۰۳CFU/g به ۳/۴۴ log CFU/g در روز نهم کاهش دهد. در حالی که بیشترین غلظت نیسین (۰/۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) توانست در روز نهم لگاریتم رشد باکتری را به ۲/۱۷ کاهش دهد که نشان‌دهنده تفاوت معنی دار آماری با غلظت ۰/۲۵ نیسین بود ($P\leq0.05$) ولی با غلظت ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به جز در روز ششم کشت تفاوت معنی‌داری نداشت ($P\geq0.05$).

جدول ۱- لگاریتم رشد (CFU/g) *استرپتوکوکوس اینیایی* تحت غلظت‌های مختلف نیسین در فیله قزل‌آلا در دمای ۴ °C

نیسین (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	روز صفر	روز سوم	روز ششم	روز نهم	روز پانزدهم
۰	۵/۵۲±۰/۲۳^{a*}	۴/۳۰±۰/۳۱ ^{a}	۴/۰۰±۰/۲۶^{a}	۳/۷۲±۰/۱۲ ^{a}	۲/۲۴±۰/۲۲ ^{b}
۰/۲۵	۴/۰۳±۰/۲۴^{a}	۳/۹۸±۰/۲۸ ^{b}	۳/۴۹±۰/۳۶^{b}	۳/۴۴±۰/۷۵ ^{b}	رشدی مشاهده نشد
۰/۵	۴/۰۳±۰/۲۴^{a}	۳/۶۶±۰/۱۸ ^{b}	۳/۳۶±۰/۱۷ ^{b}	۲/۷۷±۰/۶۱ ^{c}	رشدی مشاهده نشد
۰/۷۵	۴/۰۰±۰/۱۵^{a}	۳/۲۶±۰/۱۴ ^{b}	۳/۱۶±۰/۱۵ ^{c}	۲/۱۷±۰/۱۸ ^{c}	رشدی مشاهده نشد

حروف نامشابه در ستون‌ها اختلاف معنی دار را نشان می دهد ($P<0.05$).

جدول ۲ لگاریتم رشد *لاکتوکوکوس گارویه* در فیله قزل‌آلا در دمای ۴ ^{o}C را نشان می‌دهد. مقایسه جدول ۱ با ۲ نشان از آن دارد که نیسین در کنترل رشد *لاکتوکوکوس گارویه* تاثیر بیشتری داشته است. به طوری که غلظت ۰/۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر توانست در روز نهم لگاریتم رشد باکتری را به کمتر از log CFU/g ۲ برساند. غلظت ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نیسین نیز لگاریتم باکتری را به حد مرز کمترین رشد باکتری رسانده بود (۲/۰۰±۰/۱۱ log CFU/g). غلظت‌های مختلف نیسین در مقایسه با گروه شاهد در کنترل باکتری اثر معنی‌دار آماری داشتند ($P<0.05$) که بیشترین اثر در روز نهم کشت دیده شد.

جدول ۲- لگاریتم رشد (CFU/g) *لاکتوکوکوس گارویه* تحت غلظت‌های مختلف نیسین در فیله قزل‌آلا در دمای ۴^{o}C

نیسین (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	روز صفر	روز سوم	روز ششم	روز نهم	روز پانزدهم
۰	۵/۴۳±۰/۲۱^{a}	۳/۹۶±۰/۱۱ ^{a}	۴/۰۰±۰/۲۶^{a}	۳/۷۲±۰/۱۲ ^{a}	۲/۲۴±۰/۲۲ ^{b}
۰/۲۵	۴/۳۰±۰/۱۴^{a}	۳/۴۹±۰/۲۸ ^{b}	۳/۰۰±۰/۳۶^{b}	۲/۴۴±۰/۷۵ ^{b}	رشدی مشاهده نشد
۰/۵	۳/۸۸±۰/۱۱^{a}	۲/۹۸±۰/۱۱ ^{b}	۲/۵۵±۰/۱۳ ^{c}	۲/۰۰±۰/۱۱^{c}	رشدی مشاهده نشد
۰/۷۵	۳/۳۰±۰/۱۴^{a}	۲/۹۶±۰/۴۴ ^{b}	۲/۱۶±۰/۱۷ ^{c}	رشدی مشاهده نشد	رشدی مشاهده نشد

حروف نامتشابه در ستون‌ها اختلاف معنی دار را نشان می دهد ($P<0.05$).

بحث

نیسین مدتهاست که با توجه به خصوصیات ضد-میکروبی و سمیت کم آن برای انسان به عنوان یک ماده GARS (Generally Recognized As Safe) شناخته شده است. تنها باکتریوسینی که با تصویب سازمان بهداشت جهانی در صنعت مواد غذایی کاربرد عملی وسیعی پیدا کرده نیسین است (Pol and Smid, 1999). فعایت ضدباکتری نیسین بخصوص بر روی باکتری‌های گرم مثبت توسط محققان زیادی به اثبات رسیده است (Prudencio et al., 2014; Liu et al., 2015).

در مطالعه حاضر تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف- اسمیرنوف نشان داد که غلظت ۰/۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نیسین در دمای ۴ ^{o}C اثر ممانعت کنندگی بر روی *استرپتوکوکوس اینیایی* (df= 19, t=60.88) و *لاکتوکوکوس گارویه* (df= 19, t= 65.77) داشته است. افزایش حساسیت پاتوژن‌ها در دمای پایین به نیسین می‌تواند مربوط به سیالیت تغییر یافته غشاء باشد که هدف اولیه نیسین است. در دماهای پایین‌تر شکل‌گیری زنجیره‌های اسیدهای چرب غیراشباع افزایش می‌یابد که نتیجه آن افزایش سیال بودن غشاء است که می‌تواند سبب اتصال ترکیبات لیپوفیلیک مانند نیسین گردد (Prudencio et al., 2014). بر اساس مطالعه‌ای که بر روی تاثیر نیسین و اسانس آویشن شیرازی به تنهایی و توام با یکدیگر در گوشت ماهی چرخ شده فیتوفاگ علیه باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* در طی ۱۲ روز انجام شد این نتیجه حاصل گردید که باکتریوسین نیسین اثر ضعیفی در مهارکنندگی باکتری فوق در سطح ۵۰۰ IU/g داشت و با گذشت زمان از میزان فعالیت آن کاسته شد که احتمالاً به دلیل ترکیب نیسین با پروتئین و چربی غذا، بروز مقاومت میکروبی و یا بخاطر فعالیت آنزیم‌های موجود در گوشت بوده است (عبدالله زاده و همکارن، ۱۳۹۰).

استفاده از نیسین و اسانس زیره سبز در کنترل *استرپتوکوکوس اینیایی* در فیله ماهی قزل‌آلای رنگین-کمان در دمای ۴^{o}C توسط رومیانی و رکنی (۱۳۹۴) مورد مطالعه قرار گرفت و نتایج نشان دادند که غلظت‌های مختلف نیسین در مقایسه با گروه شاهد در

کاهش رشد باکتری دارای تفاوت معنی‌دار آماری بودند و تا روز نهم رشد باکتری را به تاخیر انداختند. در تحقیق دیگر که توسط Raju et al. (2003) انجام شد نیسین به عنوان یک نگهدارنده علیه باکتری‌های گرم مثبت در سوسیس ماهی به کار گرفته شد. استفاده از ۵۰ میلی‌گرم در لیتر نیسین توانست ۵ log CFU/g از میزان کل باکتری‌ها بکاهد، ضمن این که دما نقش مهمی داشت. در دمای یخچالی کاهش فعالیت نیسین در سوسیس‌های نگهداری شده مشاهده شد. به طوری که در دوره ۶۰ روزه فعالیت نیسین بیشتر از ۶۰ درصد نسبت به نمونه‌های تازه کاهش داشت. pH و دما نقش بسیار مهمی را در فعالیت ضد باکتریایی نیسین ایفا می‌کنند به طوری که در دمای بالا (۱۰°C) و pH پایین (۴/۳) از تاثیر نیسین کاسته می‌شود.

استفاده از نیسین در کنترل باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* در گوشت چرخ شده ماهی نشان داد که استفاده از ۵۰۰ IU/g اثر ضعیفی از خود نشان می‌دهد (Abdollahzadeh et al., 2014). در گوشت گاو نیز نتایج مشابهی به دست آمد (Solomakos et al., 2008). دوز کم نیسین و واکنش نیسین با پروتئاز و سایر ترکیبات موجود در گوشت از دلایل احتمالی می‌تواند باشد (Stergiou et al., 2006).

نتیجه گیری

فعالیت باکتریوسین‌ها در غذا تحت تاثیر چند فاکتور است که از آن جمله ترکیب شیمیایی غذا و شرایط فیزیکی مانند pH و دما می باشد. پیشنهاد می‌شود که سطح نیسین استاندارد شده برای استفاده از آن در محصولات غذایی لازم است و به عواملی مانند زمان نگهداری، دوره فرآوری، وضعیت میزان باکتری‌های اولیه و میزان نیسین باقیمانده بستگی دارد که باید در مطالعات آینده مورد توجه واقع شود.

منابع

۱. عبدالله زاده، اسماعیل.، رضایی، مسعود.، حسینی، هدایت و صفری، رضا. (۱۳۹۰). تأثیر نایسین و اسانس آویشن شیرازی به تنهایی و توأم با یکدیگر بر جمعیت لیستریا مونوسیتوژن تلقیح شده در گوشت چرخ شده ماهی فیتوفاگ. مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران. سال ششم، شماره ۴. صفحه ۲۹-۲۳.

2. Abdollahzadeh, E., Rezaei, M., and Hosseini, H. 2014 Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control *Listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat. Food Control. 35: 177-183.
3. Bowker, J.D., Ostland, V.E., Carty, D., and Bowman, M.P. 2010. Effectiveness of Aquaflor (50% Florfenicol) to Control Mortality Associated with *Streptococcus iniae* in Freshwater-Reared Sub adult Sunshine Bass. J Aquatic Anim Health. 22:254–265.
4. Buchanan, J.T., K.M., Colvin, M.R., Vicknair, S.K., Patel, A., Timmer, M., and Nizet, V. 2008. Strain-associated virulence factors of *Streptococcus iniae* in hybrid-striped bass. Vet Microbiol. 131:145–153.
5. Choi, W.M., Lam, C.L., Mo, W.Y., Cheng, Z., Mak, N.K., Bian, Z.X., and Wong, M.H. 2014. Effects of the modified Huanglian Jiedu decoction on the disease resistance in grey mullet (*Mugil cephalus*) to *Lactococcus garvieae*. Marine Poll Bull. 85: 816-823.
6. El- Aamri, F., Caballero, M.J., Real, F., Acosta, F., Deniz, S., Roman, L., and Padilla, D. 2014. *Streptococcus iniae* in Gilthead Seabream (*Sparus aurata*, L.) and Red Porgy (*Pagrus pagrus*, L.). Vet Pathol. 2: 510-514.

7. Elliott, J.A., and Facklam, R.R. 1996. Antimicrobial susceptibilities of *Lactococcus lactis* and *Lactococcus garvieae* and a proposed method to discriminate between them. Clin Microbiol. 34: 1296-1289.
8. Fadaeifard, F., Momtaz, H., Rahimi, E. and Mirzakhani, A. 2012. Detection of *Streptococcus iniae* and *Lactococcus garvieae* by multiplex polymerase chain reaction (PCR) in some rainbow trout farms of Iran. Afr J Biotechnol. 11: 260-263.
9. Keirstead, N.D., Brake, J.W., Griffin, M.J., Halliday-Simmonds, I., Thrall, M.A., and Soto, E. 2014. Fatal Septicemia Caused by the Zoonotic Bacterium *Streptococcus iniae* During an Outbreak in Caribbean Reef Fish. Vet Pathol. 51: 1035-1041.
10. Liu, H., Pei, H., Han, Zh., Feng, G., and Li, D. 2015. The antimicrobial effects and synergistic antibacterial mechanism of the combination of ε-Polylysine and nisin against *Bacillus subtilis*. Food control. 47: 444-450.
11. Milani, J.E., Aziz, R.K., Locke, J.B., Dahesh, S., Nizet, V., and Buchanan, J.T. 2010. The novel polysaccharide deacetylase homologue Pdi contributes to virulence of the aquatic pathogen *Streptococcus iniae*. Microbiol. 156: 543-554.
12. Moosavy, M.H., Akhondzadeh Basti, A., Misaghi, A., Zahraei Salehi, T., Abbasifar, R., Ebrahimzadeh Mousavi, H.A., Alipour, M., Emami Razavi, N., Gandomi, H., and Noori, N. 2008. Effect of *Zataria multiflora* Boiss. Essential oil and nisin on *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in a food model system and on the bacterial cell membranes. Food Res Int. 41: 1050–1057.
13. Pol, I.E., and Smid, E.J. 1999. Combined action of nisin and carvacrol on *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. Appl Microbiol. 29: 166-170.
14. Prudencio, C.V., Mantovani, H.C., Cecon, P.R., and Vanetti, M.C.D. 2014. Differences in the antibacterial activity of nisin and bovicin HC5 against *Salmonella typhimurium* under different temperature and pH conditions. Appl Microbiol. 118: 18-26.
15. Raju, C.V., Shamasundar, B.A., and Udupa, K.S. 2003. The use of nisin as a preservative in fish sausage stored at ambient (28 ± 2 °C) and refrigerated (6 ± 2 °C) Temperatures. Food Sci Technol. 38: 171–185.
16. Razavi Rohani, S.M., Moradi, M., Mehdizadeh, T., Saei-Dehkordi, S.S., and Griffiths, M.W. 2011. The effect of nisin and garlic (*Allium sativum* L.) essential oil separately and in combination on the growth of *Listeria monocytogenes*. Food Sci Technol. 44: 2260-2265.
17. Rogers, L.A., and Whittier, E.O. 1928. Limiting factors in the lactic fermentation. Bacteriol. 16: 28-32.
18. Roomiani, L., and Rokni, N. 2015. Study of inhibition effect of *Cuminum cyminum* essential oil and Nisin on the growth of *Streptococcus iniae* in fillets of Rainbow trout using Hurdle Technology. J Food Sci Technol. 48: 37-46.
19. Solomakos, N., Govaris, A., Koidis, P., and Botsoglou, N. 2008. The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin, and their combination against *Listeria monocytogenes* in minced beef during refrigerated storage. Food Microbiol. 25: 120-127.
20. Soltani, M., Ghodratnama, M., Ebrahimzadeh-Mosavi, H.A., Nikbakht-

Brujeni, G., Mohamadian, S., and Ghasemian, M. 2014. Shirazi thyme (*Zataria multiflora* Boiss) and Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oils repress expression of sag A, a streptolysin S-related gene in *Streptococcus iniae*. Aquaculture. 430: 248-252.

21. Stergiou, V.A., Thomas, L.V., and Adams, M.R. 2006. Interactions of nisin with glutathione in a model protein system and meat. Food Prot. 69: 951-956.
22. Woo, P.T.K., and Bruno, D.W. 2014. Diseases and Disorders of finfish in cage culture. CAB publication, UK.