

Efficacy of microencapsulated nisin with sodium alginate and chitosan on biofilm formation in *Listeria monocytogenes*

Babakhani, S.¹, Hosseini, F.^{2*}, Pakzad, P.³, Bikhof Torbati, M.⁴

1. PhD. Student, Department of Microbiology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2 Assistant professor, Department of Microbiology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

3. Professor, Department of Microbiology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

4. Assistant professor, Department of Biology, College of Science, Shahr-e-Rey Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

*Corresponding author: hosseinimicrobiology@gmail.com

(Received: 2022/7/5 Accepted: 2022/8/20)

Abstract

Listeria monocytogenes is a foodborne pathogen the cause of listeriosis that has long-term survival due to biofilm formation. This study aimed to investigate the efficacy of nisin 10² IU/ml, encapsulated nisin with chitosan and sodium alginate on biofilm formation and changing the expression level of genes related to biofilm formation. *L. monocytogenes* ATCC 19115 (serotype 4b) was treated by nisin 10² IU/ml and microencapsulated nisin with chitosan and sodium alginate solutions. The effectiveness of nisin on cell survival was estimated by calculating the optical absorbance. After proving the presence of *prfA*, *sigB*, and *agrA* genes, the effect of 10² IU/ml nisin dilution on *L. monocytogenes* biofilm was investigated by the microtiter plate method. The expression level of *prfA*, *sigB*, and *agrA* genes was analyzed using real-time PCR methods (qRT-PCR). The inhibition rate of biofilm formation in *L. monocytogenes* by nisin 10² IU/ml was 57% at 37°C and pH 5.5. The maximum inhibition of biofilm formation was related to the simultaneous use of nisin 10² IU/ml with chitosan and sodium alginate at 37°C and pH 5.5. Microencapsulated nisin with chitosan and sodium alginate can increase its effectiveness in preventing the biofilm formation of *L. monocytogenes* to 76% ($p < 0.0001$). Nisin 10² IU/ml decreased the expression level of *prfA*, *sigB*, and *agrA* by -2.313, -2.808, and -1.453-fold compared to the control ($p < 0.0001$). Nisin only had significant inhibitory activity against *L. monocytogenes* biofilm. Microencapsulated nisin with chitosan and sodium alginate had high efficacy in preventing the biofilm formation of *L. monocytogenes*.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: Probiotics, Listeriosis, Cell invasion, Microencapsulation, Food products, Virulence

DOI: 10.30495/JFH.2022.1962616.1363

«مقاله پژوهشی»

اثربخشی نایسین ریزپوشانی شده با سدیم آلژینات و کیتوزان بر تشکیل بیوفیلم در لیستریا مونسائیتوجنز

سجاد باباخانی^۱، فرزانه حسینی^{۲*}، پرویز پاکزاد^۳، مریم بی خوف تربتی^۴

۱. دانشجوی دکتری گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲. استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳. استاد گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۴. استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، واحد شهر ری، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

*نویسنده مسئول مکاتبات: hosseinimicrobiology@gmail.com

(دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۴/۱۴ پذیرش نهایی: ۱۴۰۱/۵/۲۹)

چکیده

لیستریا مونسائیتوجنز عامل لیستریوزیس منتقله از طریق غذا است و بقای طولانی از طریق تشکیل بیوفیلم دارد. هدف این مطالعه بررسی اثر رقت 10^2 IU/ml نایسین و نایسین میکروکپسوله شده با کیتوزان و سدیم آلژینات بر تشکیل بیوفیلم و تغییر سطح بیان ژن‌های مرتبط با بیوفیلم در لیستریا مونسائیتوجنز بود. لیستریا مونسائیتوجنز ATCC 19115، سرو تایپ b4 به وسیله نایسین 10^2 IU/ml و نایسین میکروکپسوله با کیتوزان و سدیم آلژینات تیمار شد. اثربخشی نایسین بر بقای سلولی از طریق محاسبه جذب نوری برآورد شد. پس از اثبات وجود ژن‌های *agrA* و *sigB prfA* اثر نایسین 10^2 IU/ml بر روی بیوفیلم لیستریا مونسائیتوجنز به روش میکروتیتر پلیت بررسی شد. تغییر بیان ژن‌های *agrA* و *sigB prfA* با استفاده از روش ریل تایم (qRT-PCR) واکاوی شد. میزان مهار بیوفیلم لیستریا مونسائیتوجنز در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و pH ۵/۵ توسط نایسین ۵۷ درصد بود. بیشترین مهار بیوفیلم مربوط به استفاده هم‌زمان نایسین 10^2 IU/ml با کیتوزان و سدیم آلژینات در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و pH ۵/۵ بود. ریزپوشانی با کیتوزان و سدیم آلژینات توانست اثرگذاری نایسین در مهار بیوفیلم را به ۷۶ درصد برساند ($p < 0/0001$). نایسین 10^2 IU/ml موجب کاهش بیان ژن‌های *agrA* و *sigB prfA* به ترتیب به میزان $-2/808$ ، $-2/313$ و $-1/453$ برابر نسبت به کنترل شد ($p < 0/0001$). نایسین فعالیت مهاري قابل توجهی در برابر بیوفیلم لیستریا مونسائیتوجنز داشت. نایسین میکروکپسوله شده با کیتوزان و سدیم آلژینات دارای یک اثربخشی فوق‌العاده در مهار بیوفیلم لیستریا مونسائیتوجنز بود. نایسین 10^2 IU/ml می‌تواند موجب کاهش بیان برخی ژن‌های درگیر در تشکیل بیوفیلم لیستریا مونسائیتوجنز شود.

واژه‌های کلیدی: پروبیوتیک، لیستریوزیس، تهاجم سلولی، میکروکپسوله‌سازی، مواد غذایی، ویروالانس

مقدمه

باکتری‌های بیماری‌زا در ایجاد مسمومیت در بدن انسان نقش دارند و کنترل رشد آن‌ها در برخی صنایع همچون صنایع غذایی، از اهمیت زیادی برخوردار است (Abebe et al., 2020; Ramaswamy et al., 2007).

لیستریا مونوسایتوجنز یکی از باکتری‌های بیماری‌زایی است که به‌طور وسیع در محیط‌های مختلف وجود دارد و به‌علت داشتن عوامل ویروالانس همچون توانایی ایجاد بیوفیلم در سطوح و مواد غذایی و همچنین توانایی حرکت، مورد توجه محققان قرار گرفته است (Rossi et al., 2008). لیستریا مونوسایتوجنز یک پاتوژن منتقله از طریق غذا است که باعث بیماری‌های شدید به‌ویژه در افراد دارای نقص ایمنی می‌شود (Hernandez-Milian and Payeras-Cifre, 2014).

بیوفیلم می‌تواند به‌عنوان تجمعی از رشد سلول‌های میکروبی بر روی یک سطح غیرزنده یا زنده که توسط مواد پلیمری احاطه گردیده است تعریف شود. بیوفیلم‌ها نقش محافظتی در باکتری‌های متصل شده به سلول‌ها و سطوح دارند که این امر موجب دشواری فرآیند گندزدایی می‌گردد و در نهایت باعث کاهش بهره‌وری و افزایش هزینه‌ها می‌شود (Salama et al., 2016). معمولاً بیوفیلم‌ها دربرگیرنده عوامل میکروبی بیماری‌زایی هستند که می‌تواند منبع اصلی آلودگی در سطوح فرآوری مواد غذایی باشند که باعث افزایش خطر آلودگی محصولات غذایی و مسمومیت‌های غذایی می‌گردد (Galie et al., 2018).

فناوری‌های مورد استفاده برای کنترل یا حذف آلودگی میکروبی سطوح در صنایع غذایی شامل به‌کارگیری عوامل شیمیایی (مانند کلر، ید، ترکیبات

آمونیم چهارتایی و اسید پراکسی استیک)، باکتریوسین مانند نایسین و کشت هم‌زمان با باکتری‌های تولیدکننده نایسین است (Cabeça et al., 2012). با این وجود عوامل شیمیایی که ممکن است حذف‌کننده‌های مؤثر بیوفیلم باشند ممکن است لزوماً از شکل‌گیری بیوفیلم جلوگیری نکنند (Xihong Zhao et al., 2017).

یکی از راه‌های جلوگیری از آلودگی در صنایع غذایی استفاده از باکتریوسین‌های تولیدشده توسط برخی باکتری‌ها است که پپتیدهای ضد میکروبی هستند (Balciunas et al., 2013). نایسین که باکتریوسین تولید شده توسط سویه‌های لاکتوکوکوس لاکتیس است در حال حاضر تنها باکتریوسین مجاز با کاربرد تجاری در صنایع غذایی است (Rahmati, 2017) که می‌تواند از رشد باکتری‌های گرم مثبت جلوگیری کند (Sen and Ray, 2019). برخی مطالعات اثر ریزپوشانی با نانوذرات را در ماندگاری و بهبود عملکرد نایسین گزارش کرده‌اند که می‌تواند در جلوگیری از تشکیل بیوفیلم میکروبی بیشتر مؤثر باشد (Lopes et al., 2019; Maresca et al., 2016; Martinez et al., 2016; Were et al., 2004). محافظت از نایسین در برابر فعالیت پروتئازی و تأخیر در آزادسازی نایسین، دو مکانیسم اصلی اثر بخشی میکروکپسوله‌سازی نایسین می‌باشند (Martinez et al., 2015; Pisano et al., 2016).

ظهور نانو تکنولوژی توسعه رویکردهای جدید برای تحویل پپتیدهای ضد میکروبی را امکان‌پذیر کرده است. سیستم‌های تحویل نانو متشکل از نانوذرات مختلف (مانند پلیمر، لیپید، کربوهیدرات و فلز) می‌توانند برای هدف قرار دادن مؤثر این پپتیدهای ضد میکروبی در میزبان آلوده مورد بهره‌برداری قرار گیرند. برخلاف

مونوسایتوجنز نقش دارند. در حالی که نشان داده شده است که ژن‌های این سیستم با تشکیل بیوفیلم مرتبط هستند اما تحقیقات محدودی در این زمینه انجام شده است (Gray et al., 2021). هدف مطالعه ما بررسی نقش ریزپوشانی نایسین با کیتوزان، سدیم آلزینات و همچنین اثر هم‌زمان هر دو نانوذره در جلوگیری از تشکیل بیوفیلم تشکیل شده به وسیله لیستریا مونوسایتوجنز و تأثیر آن در میزان بیان سه ژن اشاره شده دخیل در تشکیل بیوفیلم بود.

مواد و روش‌ها

-آماده‌سازی نمونه باکتریایی

در این مطالعه از سویه لیستریا مونوسایتوجنز ATCC 19115 (سروتایپ 4b) جدا شده از سوسیس در بانک میکروبی دانشگاه علوم پزشکی ایران استفاده شد. به منظور بهره‌برداری در آزمایش‌های بعدی، سویه میکروبی در دمای ۸۰- درجه سلسیوس در محیط کشت عصاره قلب و مغز آگار (Brain Heart Infusion agar: BHI) (Germany, Merck) همراه با ۲۰ درصد حجمی-حجمی گلیسرول (Germany, Merck)، نگهداری گردید. جهت بررسی اثر بازدارندگی نایسین روی بیوفیلم باکتری و میزان بیان *prfA* و *sigB* آماده‌سازی باکتری‌ها در محیط کشت تریپتون سوی برات (United Kingdom) (Tryptone Soy Broth: TSB) همراه با پودر عصاره مخمر (۵ گرم در لیتر) در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت انجام شد.

باکتریوسین‌های آزاد، باکتریوسین‌های فرموله شده نانوذراتی طیف وسیع‌تری از فعالیت ضد میکروبی و پایداری بالاتری هستند (Fahim et al., 2016). در بخش مواد غذایی، نانوکپسوله‌سازی باکتریوسین‌ها، محافظت در برابر تخریب توسط آنزیم‌های پروتئولیتیک را تضمین می‌کند و پایداری و فعالیت ضد میکروبی آن‌ها را در برابر میکروارگانیسم‌های عامل فساد مواد غذایی بهبود می‌بخشد (Brandelli, 2012). نانوذرات لیپیدی جامد (Solid Lipid Nanoparticles) می‌توانند از باکتریوسین‌ها در برابر تخریب محافظت کنند و فعالیت ضدباکتریایی آن‌ها را برای مدت طولانی‌تری افزایش دهد (Feng and Mumper, 2013).

باکتریوسین‌ها از جمله نایسین (در گروه لانتی‌بیوتیک‌ها) می‌توانند از طریق کاهش و افزایش بیان ژن‌های مرتبط با ویروانس باکتری‌ها، میزان بیماری‌زایی آن‌ها را کنترل کنند (Good et al., 2016). ژن *prfA* یک تنظیم‌کننده کلیدی بیماری‌زایی لیستریا مونوسایتوجنز است و تنظیم‌کننده توانایی رشد باکتری در دماهای پایین و شرایط سخت است (Chaturongakul et al., 2008; Good et al., 2016). پروتئین فاکتور تنظیمی مثبت A (PrfA) توسط *prfA* رمزگذاری می‌شود که این پروتئین تنظیم‌کننده رونویسی بسیاری از ژن‌های ضروری در حدت و بیماری‌زایی لیستریا مونوسایتوجنز است (Good et al., 2016). توانایی لیستریا مونوسایتوجنز برای مقاومت در برابر بسیاری از شرایط محیطی نامطلوب تا حدی به فعال شدن فاکتور سیگما (B) که توسط ژن *sigB* کدگذاری شده است نسبت داده شده است (Pinheiro et al., 2018). ژن‌های *agrABCD* در تهاجم، بیماری‌زایی و تشکیل بیوفیلم در لیستریا

- ریزپوشانی محلول نایسین با سدیم آلژینات و کیتوزان ریزپوشانی نایسین با استفاده از دستگاه انکپسولاتور و پمپ سرنگ ۸۰ میکرومتری انجام شد. برای ریزپوشانی نایسین، از روش مورد تأیید مطالعات پیشین استفاده شد (Mauriello et al., 2005) و تنها تغییرات کمی در آن اعمال گردید. این مخلوط در سرنگ بارگذاری شد و به محفظه پالس گذاری دستگاه وارد گردید تا فرم مورد نظر را از طریق یک نازل تشکیل دهد. شرایط ریزپوشانی مورد استفاده عبارت بود از: سرعت جریان ۲/۹۱ میلی لیتر در دقیقه، فرکانس ارتعاش ۲۰۰۰ هرتز و ولتاژ الکتروود ۹۵۰ ولت. این شرایط بر اساس نتایج به دست آمده در آزمایش‌های اولیه با کاربردهای مختلف انجام شده، انتخاب گردید. میکروکپسول‌های حاوی نایسین از سخت شدن قطرات در ۱۰۰ میلی لیتر محلول کلرید کلسیم استریل (۰/۵ مول بر لیتر) (Germany, Merck) با pH ۶ و دمای ۲۵ درجه سلسیوس (دمای اتاق) و سانتیفریوژ ۳۰۰۰ دور در دقیقه، به دست آمدند. این مرحله تعلیق ذرات تا زمان ته نشین شدن میکروکپسول‌ها ادامه یافت و محلول سخت کننده قطرات دور ریخته شد تا ۳۰ میلی لیتر حجم نهایی میکروکپسول حاصل شد. اندازه و مورفولوژی سطح میکروکپسول با استفاده از میکروسکوپ نوری زایس مدل (Germany, Carl Zeiss) Axio Star Plus با بزرگنمایی ۲۰۰ صورت پذیرفت. تمامی مراحل ذکر شده برای نایسین به صورت جداگانه برای سدیم آلژینات و کیتوزان اجرا شد تا ریزپوشانی توسط دو نانوذره مختلف بررسی شود (Mauriello et al., 2005).

- آماده سازی محلول‌های نایسین، سدیم آلژینات و کیتوزان به منظور آماده سازی نایسین، ۱/۱ گرم پودر نایسین ۲/۵ درصد (USA, Sigma-Aldrich) در ۱۰ میلی لیتر اسید کلریدریک ۰/۰۲ مول بر لیتر (Germany, Merck) حل گردید و به منظور جداسازی مایع سطحی از رسوبات به مدت ۱۰ دقیقه، دو بار سانتیفریوژ (۵۲۰۰ دور در دقیقه) شد. استوک اصلی با غلظت 10^4 IU/ml به دست آمد و سپس رقت 10^2 نایسین (IU/ml) با استفاده از رقت سازی با آب مقطر استریل به دست آمد. محلول نایسین 10^2 (IU/ml) به دست آمده جهت مرحله ریزپوشانی در دمای ۴ درجه سلسیوس در یخچال نگهداری شد. برای تهیه محلول کیتوزان ۴ گرم کیتوزان سبک مولکول (USA, Sigma-Aldrich) با ۹۰ میلی لیتر آب مقطر استریل ترکیب شد و با کاغذ واتمن فیلتر شد و نهایتاً جهت استریلیزاسیون در اتوکلاو به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس قرار داده شد (Rahmati, 2020). جهت آماده سازی محلول سدیم آلژینات، ۵ گرم سدیم آلژینات (Sigma-Aldrich, USA) به ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر استریل اضافه شد و بعد از استریلیزاسیون با اتوکلاو در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شد. با ترکیب ۵ میلی لیتر از محلول نایسین در ۲۰ میلی لیتر از سدیم آلژینات و هم چنین ۵ میلی لیتر از محلول نایسین در ۳۰ میلی لیتر از کیتوزان آماده شده در مراحل قبل، محلول‌های تغذیه اولیه به دست آمد که عملیات تخلیه گاز در آن‌ها انجام شد و پس از ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس استریل شدند.

- تیمار لیستریا مونوسایتوجنز با نایسین ریزپوشانی شده

در این مرحله کشت ۲۴ ساعته جوان لیستریا مونوسایتوجنز در محیط کشت TSB غنی شده با عصاره مخمر استفاده شد. ۱۰۰ میکرولیتر از آن به محیط کشت TSB حاوی یک درصد گلوکز اضافه گردید و در نهایت ورتکس شد. به منظور بررسی تأثیر رقت 10^2 IU/ml از نایسین ریزپوشانی شده با سدیم آلزینات و کیتوزان بر بیوفیلم لیستریا مونوسایتوجنز، از پلیت‌های ۹۶ خانه استفاده شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت تهیه شده حاوی باکتری که دربرگیرنده 10^7 CFU/ml سلول بود به چاهک‌ها اضافه گردید و با رقت 10^2 IU/ml از نایسین (۱۰۰ IU/ml) مورد تیمار قرار گرفت. از چاهک باکتری بدون نایسین به عنوان کنترل مثبت و از چاهک حاوی محیط TSB غنی شده با عصاره مخمر و یک درصد گلوکز به عنوان کنترل منفی استفاده شد. جهت حصول اطمینان، برای هر آزمایش ۳ چاهک تکرار در نظر گرفته شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دو دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سلسیوس، مایع رویی دور ریخته شد و چاهک‌ها سه بار با ۲۵۰ میکرولیتر از محلول نمکی فسفات (Phosphate-Buffered Saline: PBS)

(USA, Sigma-Aldrich) به منظور حذف باکتری‌های اتصال نیافته شستشو داده شدند. در ادامه جهت تثبیت سلول‌ها در کف چاهک‌ها پس از خشک شدن، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از متانول ۹۹ درصد برای هر چاهک به مدت ۲۰ دقیقه استفاده گردید. چاهک‌ها با ۲۰۰ میکرولیتر کریستال‌ویوله ۰/۱ درصد برای ۱۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند. پس از آن رنگ تخلیه و ۲۰۰ میکرولیتر از اتانول ۹۵ درصد به مدت ۳۰ دقیقه به چاهک‌ها اضافه شد. در مرحله پایانی جهت شمارش سلول‌ها از دستگاه الیزا ریدر مدل ELx-808 (Bio-Tek، ایالات متحده آمریکا) در طول موج ۵۹۵ نانومتر استفاده گردید. تأثیر نایسین ریزپوشانی شده با سدیم آلزینات و کیتوزان به صورت جداگانه و هم‌زمان بر کیفیت بیوفیلم در دو دمای متفاوت ۲۵ و ۳۷ درجه سلسیوس و هم‌چنین دو pH مختلف ۵/۵ و ۶/۵ پس از گذشت ۲۴ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. جهت تنظیم اسیدیته درون چاهک‌ها از اسیدکلریدریک (دیجی شیمی، ایران) و پتاسیم هیدروکسید یک درصد (اوج آزماپلاست، ایران) و pH متر (طب آزما، ایران) استفاده گردید. میزان درصد تشکیل بیوفیلم و درصد ممانعت از تشکیل توسط فرمول زیر محاسبه گردید (Liu et al., 2020).

$$100 \times \text{میزان جذب نوری نمونه کنترل} / \text{میزان جذب نوری نمونه} = \text{درصد تشکیل بیوفیلم}$$

$$\text{درصد تشکیل بیوفیلم} - 100 = \text{درصد مهار بیوفیلم}$$

-تائید وجود ژن‌ها در لیستریا مونوسایتوجنز

جهت تأیید نهایی سوبه مورد مطالعه از ژن S ۱۶rRNA استفاده شد. در مرحله ابتدایی کلونی باکتریایی در محیط TSA کشت داده شد و DNA

ژنومی لیستریا مونوسایتوجنز ATCC 19115 جهت شناسایی وجود و یا عدم وجود ژن‌های *sigB* *prfA* و *agrA* با استفاده از کیت High Pure PCR Template Preparation Kit (Germany, Roche) بررسی شد.

استخراج شده بالقوه را حذف کند. RNA جدا شده در دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شد.

- سنتز cDNA

جهت سنتز cDNA، ۲ میکرولیتر از نمونه‌های تخلیص شده RNA، ۱۰ میکرولیتر آب تیمار شده با دی اتیل پیروکربنات (Diethyl pyrocarbonate (DEPC)- treated water) بدون RNase و ۱ میکرولیتر پرایمر Oligo Dt₁₈ طبق دستورالعمل (Germany, Roche) در Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit میکروتیوب‌های RNase free مخلوط شدند و در دمای ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه انکوبه گردیدند. سپس میکروتیوب‌ها به مدت ۳ دقیقه به سرعت روی یخ قرار گرفتند. سپس ۴ میکرولیتر بافر واکنش ۵X حاوی دی‌تیوتریتول (Dithiothreitol: DTT)، ۲ میکرولیتر dNTPs، ۰/۵ میکرولیتر مهارکننده RNase و ۱ میکرولیتر رونوشت‌بردار معکوس ویروس لوسمی موشی Maloney Murine leukemia virus reverse transcriptase (M-MLVRT (200 U/μl)) نیز به آرامی به مخلوط واکنش اضافه شد. سپس میکروتیوب‌ها به مدت ۱ ساعت در دمای ۴۲ درجه سلسیوس قرار گرفتند. در نهایت، واکنش با قرار دادن میکروتیوب‌ها در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳ دقیقه تکمیل شد. واکنش‌های سنتز cDNA در چرخاننده حرارتی (Bio-Rad, T100™ Thermal Cycler) انجام شد. محصول نهایی واکنش در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد.

- سنجش بیان ژن‌ها

برای سنجش میزان بیان ژن‌ها در این مطالعه از روش Real-Time PCR کمی (qRT-PCR) و رنگ سایبرگرین

توالی مربوط به پرایمرها از بانک داده (National Center for Biotechnology Information) NCBI کمک نرم‌افزارهای Oligo 7 و Primer 3 طراحی شدند (جدول ۱). به طور کلی حجم نهایی ۲۵ میکرولیتری تیوب واکنش PCR شامل ۵ میکرولیتر از PCR master mix 5X (سیناکلون، ایران) حاوی MgCl₂ (3 mM)، Taq DNA polymerase (0.08 U/μl)، dNTPs (0.4 mM) و ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر (غلظت ۰/۸ میکرومولار)، ۰/۵ میکرولیتر از الگو DNA (۱۰ نانوگرم) و ۱۸/۵ میکرولیتر آب دیونیزه استریل برای ۳۵ سیکل بود. مراحل هر سیکل شامل یک دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس برای واسرشتگی، ۴۵ ثانیه در دمای ۶۵ درجه سلسیوس برای اتصال پرایمرها و مرحله طولی سازی به مدت ۵۰ ثانیه در ۷۲ درجه سلسیوس بود. در پایان محصول نهایی واکنش با ژل الکتروفورز حاوی ۱/۵ درصد آگار مورد بررسی قرار گرفت.

- جداسازی RNA

مراحل تشکیل بیوفیلم و رنگ آمیزی سلول‌ها در چاهک‌های ۹۶ خانه‌ای مجدد انجام گردید با این تفاوت که در این مرحله فقط رقت ۱۰^۲ IU/ml از نایسین بدون هیچ گونه ریزپوشانی استفاده شد. با استفاده از High pure RNA isolation kit (Germany, Roche) و دستورالعمل مربوطه، RNA در چهار بازه زمانی ۰، ۴، ۸ و ۲۴ ساعت استخراج گردید. برای تعیین صحت و کیفیت تخلیص RNA استخراج شده، از ژل الکتروفورز ۱ درصد آگار و برای سنجش غلظت و خلوص از اسپکتروفتومتر نانودراپ Q6000 (Quawell)، ایالات متحده آمریکا) استفاده شد. در مرحله بعد، آنزیم DNase به نمونه RNA اضافه شد تا مولکول‌های DNA

مقایسه میزان تغییرات بیان سه ژن مورد مطالعه با و بدون نایسین، qRT-PCR اجرا و از iTaq™ Universal SYBR Green Supermix 2X (Bio-Rad) شناساگر استفاده گردید. تیوب واکنش در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۳ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه، ۱ میکرولیتر cDNA، ۰/۵ میکرولیتر از هر یک پرایمرهای واکنش و ۵ میکرولیتر مسترمیکس ۲X در ۴۵ سیکل شامل ۱۰ دقیقه در ۹۵ درجه سلسیوس جهت نگهداری، ۱۵ ثانیه در ۹۵ درجه سلسیوس برای مرحله ذوب و ۳۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سلسیوس برای اتصال و تکثیر بود. جهت بررسی ساختارهای ثانویه و عدم وجود ساختارهای ناخواسته از نرم افزارهای Oligo Analyzer و BLAST استفاده گردید. نهایتاً واکنش زنجیره دو مرتبه تکرار گردید و نتایج به روش لیواک مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (Livak and Schmittgen, 2001).

به عنوان شناساگر استفاده گردید. توالی مربوط به پرایمرها از مرکز ملی داده های بیوتکنولوژی (National Center for Biotechnology Information: NCBI) به کمک نرم افزارهای Oligo 7 و Primer 3 طراحی شدند (جدول ۱). برای جلوگیری از تداخل در بررسی پیک های فلورسانس ایجاد شده و اتصال سایبرگرین به DNA های دو رشته ای مختلف، برای هر نمونه به صورت جداگانه میزان بیان ژن های هدف و اینترنال کنترل در دو تیوب مختلف به صورت هم زمان انجام شد. سپس CT (Cycle Time) به دست آمده برای هر کدام از ژن ها توسط برنامه Rotor gene با نمونه کالیبراتور مقایسه و محاسبه شدند. در این مطالعه میزان اثر نایسین IU/ml^{۱۰۲} بدون ریزپوشانی و بدون هیچ گونه نانوذره بر تغییرات بیان سه ژن *prfA*، *sigB* و *agrA* که در تشکیل بیوفیلم لیستریا مونوسایتوجنز ATCC 19115 نقش دارند مورد واکاوی قرار گرفت. در مرحله پایانی جهت

جدول (۱). پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه حاضر

منبع	دمای اتصال (°C)	اندازه محصول (bp)	توالی	ژن هدف
مطالعه حاضر	۶۰	۱۳۲	ATGAACGCTCAAGCAGAAGA CGAAAGCACCTTTGTAGTATTG	<i>prfA</i> (Forward) <i>prfA</i> (Reverse)
	۶۰	۱۲۸	GATGATGGATTGAAACGTGTGAA CGCTCATCTAAAAACAGGGAGAAC	<i>sigB</i> (Forward) <i>sigB</i> (Reverse)
	۶۳	۱۱۲	ATGAAGCAAGCGGAAGAAC TACGACCTGTGACAACGATAAA	<i>agrA</i> (Forward) <i>agrA</i> (Reverse)
	۶۳	۱۵۸	ACCGTCAAGGGACAAGCA GGGAGGCAGCAGTAGGGA	<i>16S rRNA</i> (Forward) <i>16S rRNA</i> (Reverse)

شده و کاهش بیان ژن های دخیل در تشکیل بیوفیلم در لیستریا مونوسایتوجنز، آزمون های آماری تحلیل واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) و توکی (Tukey test) استفاده شد.

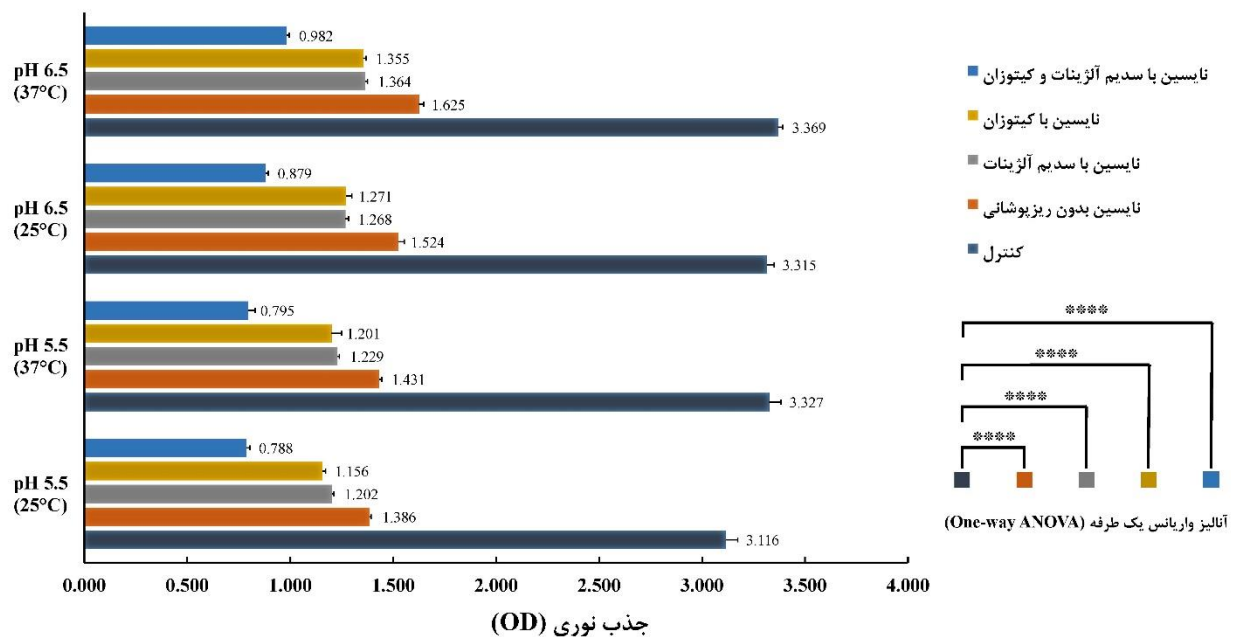
- تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل نتایج با استفاده از نرم افزارهای Graphpad Prism version 9 (GraphPad Software, USA)، SPSS (SPSS Inc., Chicago IL, USA) و اکسل (Microsoft Corporation, USA) انجام شده است. برای تخمین معناداری بین نایسین میکروکپسوله

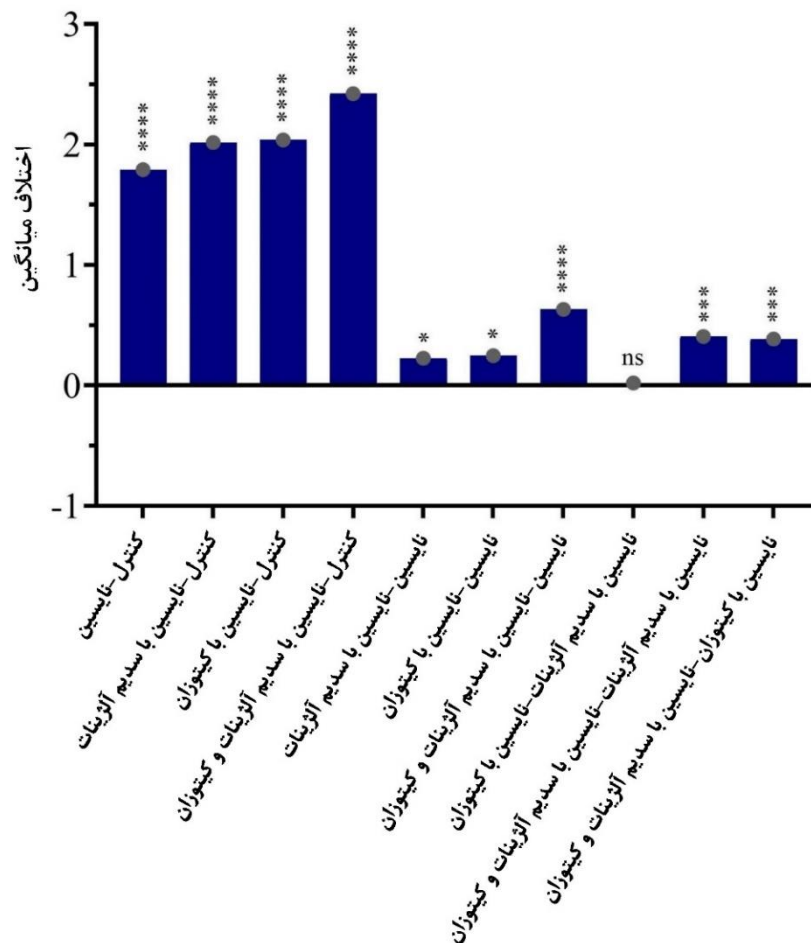
یافته‌ها

ریزپوشانی (حالت نرمال) و ریزپوشانی نایسین با سدیم آلژینات، کیتوزان و هم‌چنین تیمار هم‌زمان با هر دو در رقت 10^2 IU/ml در جلوگیری از تشکیل بیوفیلم لیستریا مونوسیتوجنز در شرایط محیطی متفاوت را نمایش می‌دهد. نتایج آزمون آماری توکی مشخص کرد که بین میزان جذب نوری گروه‌های نایسین ریزپوشانی شده با کیتوزان و نایسین ریزپوشانی شده با سدیم آلژینات اختلاف معناداری وجود نداشت. اختلاف میانگین آماری در میان کنترل و نایسین 10^2 IU/ml، نایسین ریزپوشانی شده با کیتوزان، سدیم آلژینات و هر دو در شکل (۲) ارائه شده است.

کمترین میزان جذب نوری در لیستریا مونوسیتوجنز تیمار شده با سدیم آلژینات و کیتوزان مربوط به ریزپوشانی نایسین با رقت 10^2 IU/ml با هر دو سدیم آلژینات و کیتوزان در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و ۵/۵ pH به میزان 0.788 ± 0.116 بود. بیشترین میزان جذب نوری نایسین بدون ریزپوشانی در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و ۶/۵ pH به میزان 1.625 ± 0.369 بود. شکل (۱) میزان جذب نوری لیستریا مونوسیتوجنز بدون تیمار (نمونه کنترل)، نایسین با رقت 10^2 IU/ml بدون



شکل (۱). مقایسه میزان جذب نوری لیستریا مونوسیتوجنز بدون تیمار (کنترل) و تیمار شده با نایسین 10^2 IU/ml بدون ریزپوشانی، نایسین ریزپوشانی شده با نانوذرات کیتوزان، سدیم آلژینات و هر دو به‌طور هم‌زمان در شرایط دمایی و اسیدیته مختلف. Error Bar نشان دهنده انحراف معیار (SD); **** نشان‌دهنده $p < 0.0001$



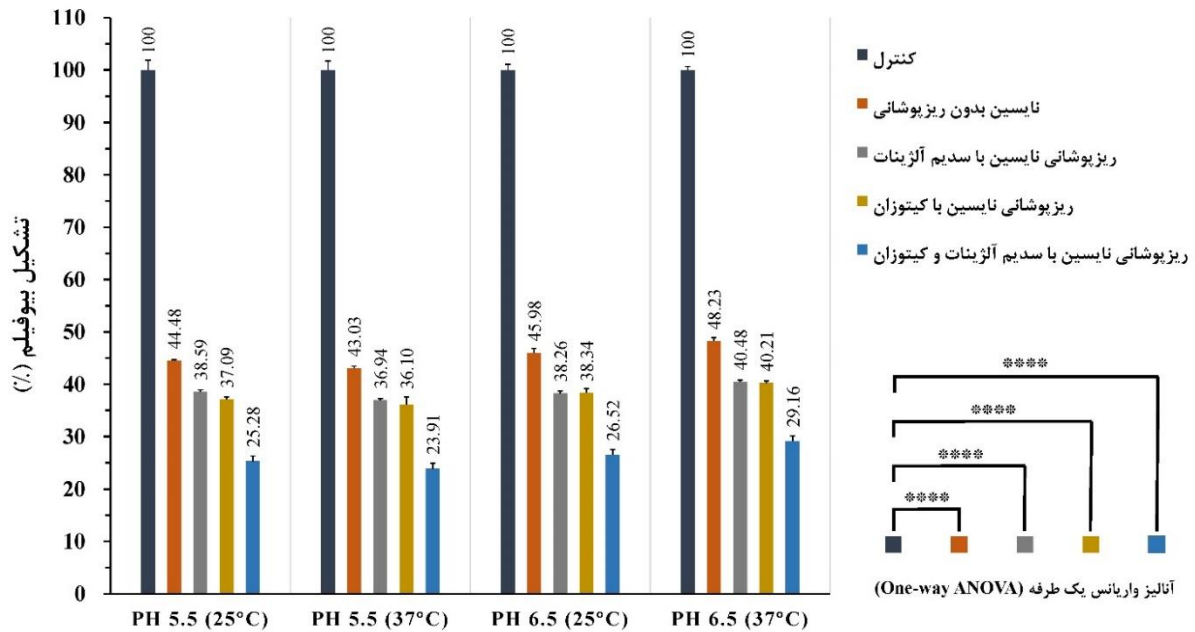
شکل (۲). میانگین اختلاف و تفاوت آماری جذب نوری در میان لیستریا مونوسایتوجنز بدون تیمار (کنترل) و تیمار شده با نایسین 10^2 IU/ml بدون ریزپوشانی، نایسین ریزپوشانی شده با نانوذرات کیتوزان، سدیم آلزینات و هر دو به طور هم زمان با استفاده از آزمون توکی (Tukey's HSD). Error Bar نشان دهنده انحراف معیار (SD)، **** نشان دهنده $p < 0.0001$ ، *** نشان دهنده $p < 0.001$ ، * نشان دهنده $p < 0.05$ ، ns نشان دهنده عدم معناداری

نایسین 10^2 IU/ml (در دمای 37°C درجه سلسیوس و pH 6/5)، ۵۲ درصد بود. درصد تشکیل بیوفیلم لیستریا مونوسیتوژنز بدون تیمار (کنترل)، تیمار شده با نایسین 10^2 IU/ml بدون ریزپوشانی و ریزپوشانی نایسین با سدیم آلزینات، کیتوزان و هر دو در شکل (۳) نشان داده شده است. بر اساس این نتایج، نایسین ریزپوشانی شده با سدیم آلزینات، کیتوزان و هر دو موجب کاهش معناداری در میزان جذب نوری و مهار بیوفیلم لیستریا مونوسیتوژنز شد ($p < 0.0001$). نتایج آزمون آماری تحلیل

بیوفیلم لیستریا مونوسایتوجنز به وسیله نایسین ریزپوشانی شده با هر دو سدیم آلزینات و کیتوزان در دمای 25°C درجه سلسیوس و pH 5/5 به میزان ۷۵ درصد کاهش یافت. همچنین تشکیل بیوفیلم لیستریا مونوسایتوجنز به وسیله نایسین ریزپوشانی شده با هر دو سدیم آلزینات و کیتوزان در دمای 37°C درجه سلسیوس و pH 6/5 به میزان ۷۱ درصد مهار شد. در حالی که میزان مهار بیوفیلم لیستریا مونوسایتوجنز توسط نایسین 10^2 IU/ml (دمای 25°C درجه سلسیوس و pH 5/5)، ۵۵ درصد و

در جلوگیری از تشکیل بیوفیلیم اختلاف معناداری وجود دارد ($p < 0.0001$).

واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) بین کنترل و نایسین 10^2 IU/ml، نایسین ریزپوشانی شده با کیتوزان، سدیم آلزینات و هردو در شرایط دمایی و pH



شکل (۳). درصد تشکیل بیوفیلیم لیستریا مونوسایتوجنز بدون تیمار (کنترل) و تیمار شده با نایسین 10^2 IU/ml و نایسین ریزپوشانی شده با نانوذرات کیتوزان، سدیم آلزینات و هردو به طور همزمان در شرایط دمایی و اسیدیته مختلف. Error Bar نشان دهنده انحراف معیار (SD)؛ **** نشان دهنده $p < 0.0001$

سه ژن *prfA*، *sigB* و *agra* شد. سطح بیان ژنهای *prfA* و *sigB* به ترتیب به میزان $-2/808$ ، $-2/313$ و $-1/453$ کاهش یافت (جدول ۲).

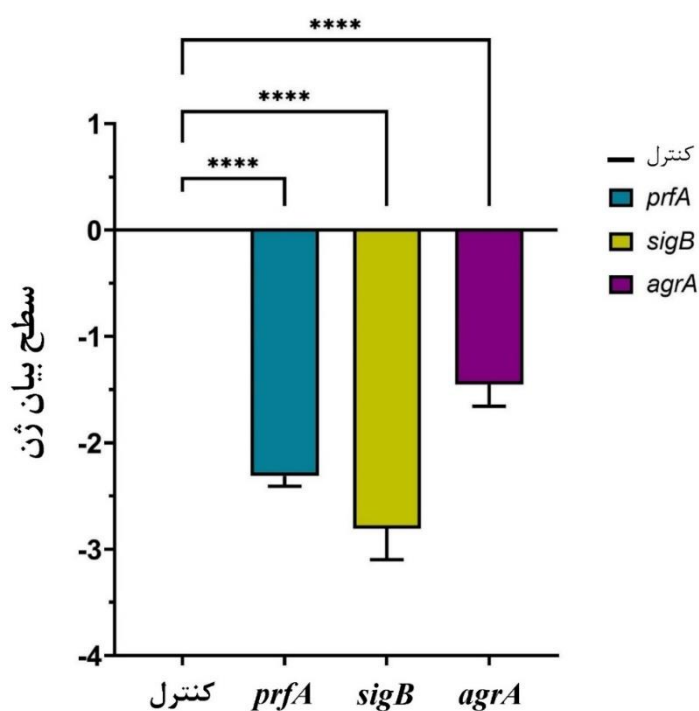
پس از محاسبه میزان اختلاف در CT های ایجاد شده نسبت به اینترنال کنترل (ژن 16S rRNA) و نمونه های تیمار شده با نایسین 10^2 IU/ml بدون ریزپوشانی، رقت 10^2 IU/ml نایسین مورد استفاده موجب کاهش بیان هر

جدول (۲). فولد چینج (Fold change) و سطح بیان (Expression level) ژنهای مؤثر در تشکیل بیوفیلیم لیستریا مونوسایتوجنز در حضور نایسین 10^2 IU/ml

ژن هدف	<i>prfA</i>	<i>sigB</i>	<i>agra</i>
ژن هدف \pm فولد چینج \pm SD	$0.0 \pm 201/013$	$0.0 \pm 143/027$	$0.0 \pm 365/050$
سطح بیان \pm SD	$-2/0 \pm 313/095$	$-2/0 \pm 808/293$	$-1/0 \pm 453/206$

پس از تیمار با نایسین 10^2 IU/ml در مقایسه با نمونه کنترل در لیستریا مونوسایتوجنز پس از نرمالیزاسیون به کمک ژن کنترل داخلی 16S rRNA در شکل (۴) ارائه شده است.

نتایج آزمون آماری تحلیل واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) نشان داد که ارتباط معنی داری بین استفاده از نایسین 10^2 IU/ml و کاهش بیان ژنهای دخیل در تشکیل بیوفیلم در لیستریا مونوسایتوجنز وجود دارد ($p < 0/0001$). نتایج تغییر سطح بیان ژنهای مورد مطالعه



شکل (۴). اثر رقت 10^2 IU/ml نایسین بر میزان سطح بیان ژنهای مرتبط با تشکیل بیوفیلم در لیستریا مونوسایتوجنز. Error Bar نشان دهنده انحراف معیار (SD)؛ **** نشان دهنده $p < 0/0001$

با هر دو محلول را نشان می دهد. در این مطالعه جلوگیری از تشکیل بیوفیلم لیستریا مونوسایتوجنز توسط نایسین ریزپوشانی شده با سدیم آلژینات و نایسین ریزپوشانی شده با کیتوزان در دمای 37°C درجه سلسیوس و $5/5$ pH و $6/5$ برابر بود. مطالعه حاضر نشان داد که دماهای 25°C و 37°C درجه سلسیوس و هم چنین $5/5$ pH و $6/5$ اثر قابل توجهی بر اثربخشی نایسین 10^2 IU/ml به تنهایی و

بحث و نتیجه گیری

در مطالعه حاضر نایسین 10^2 IU/ml به تنهایی حدود ۵۰ درصد مانع از تشکیل بیوفیلم لیستریا مونوسایتوجنز شد. حال نایسین 10^2 IU/ml میکروکپسوله به وسیله سدیم آلژینات و کیتوزان این ممانعت ۵۰ درصدی را حدود ۲۰ درصد افزایش داد ($p < 0/0001$). این نتایج نقش پراهمیت ریزپوشانی نایسین به وسیله تیمار هم زمان

برابر تخریب توسط آنزیم‌های پروتئولیتیک را تضمین می‌کند و پایداری و فعالیت ضد میکروبی آن‌ها را در برابر میکروارگانیسم‌های عامل فساد مواد غذایی بهبود می‌بخشد (Brandelli, 2012). نانوذرات لیپیدی جامد (Solid Lipid Nanoparticles) می‌توانند از باکتریوسین‌ها در برابر تخریب محافظت کنند و فعالیت ضد باکتریایی آن‌ها را برای مدت طولانی‌تری افزایش دهد (Feng and Mumper, 2013).

در برخی بررسی‌ها اثر پتیده‌های ضد میکروبی بر باکتری‌های بیماری‌زا مطالعه شده است. در دو مطالعه جداگانه مشخص شد که برخلاف نایسین بدون پوشش، نانوذرات لیپیدی جامد حاوی نایسین، فعالیت بسیار طولانی‌تری در برابر لاکتوباسیلوس پلاتناروم TISTR 850 (تا ۱۵ روز) و لیستریا مونوسایتوجنز DMST 2871 (به مدت ۲۰ روز) از خود نشان داده‌اند (Feng and Mumper, 2013; Prombutara et al., 2012).

از نانوذرات کیتوزان برای انتقال باکتریوسین نایسین با راندمان به دام افتادن ۹۵ درصد در مقابل استافیلوکوکوس اورئوس استفاده شده است (Zohri et al., 2010). مطالعات پیشین نشان داده است که کیتوزان و آلژینات بارگذاری شده با نایسین در مقایسه با فعالیت ضد میکروبی نایسین آزاد، سطح فعالیت بسیار بالاتری را در برابر استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 19117 نشان می‌دهد (Zohri et al., 2010; Zohri et al., 2013). مطالعه ما همانند نتایج کسب شده در این مطالعه، موجب کاهش تشکیل بیوفیلم باکتری لیستریا مونوسایتوجنز گردید. یافته‌های مطالعه حاضر تأیید کننده نتایج مطالعه‌های پیشین توسط سایر محققین است که تأثیر نایسین ریزپوشانی شده با لیپوزوم (Pinilla et al.,

میکروکپسوله به وسیله سدیم آلژینات و کیتوزان نداشتند. بالاترین اختلاف شرایط محیطی از نظر بازدهی نایسین در جلوگیری از تشکیل بیوفیلم مربوط به لیستریا مونوسایتوجنز مربوط به نایسین IU/ml 10^2 بدون ریزپوشانی و نایسین ریزپوشانی شده با هردو سدیم آلژینات و کیتوزان در دمای ۲۵ درجه (با pH ۵/۵) و دمای ۳۷ درجه (با pH ۶/۵) به میزان ۴ درصد بود.

باکتریوسین‌ها از جمله نایسین به دلیل اندازه کوچک، ماهیت غیرایمونوژنیک، زیست‌سازگاری و زیست تخریب‌پذیری، جایگزینی امیدوار کننده برای آنتی‌بیوتیک‌ها هستند. با این حال، برای اجرای بالقوه آن‌ها برای استفاده پزشکی، مسائل مختلفی از جمله حلالیت، پایداری در مقادیر مختلف pH، خالص‌سازی و تولید در مقیاس بزرگ باید مورد توجه قرار گیرد. برای اثربخشی پتیده‌های ضد میکروبی (به دلیل کاهش نیمه‌عمر آن‌ها و عدم اختصاصیت) به دوزهای بالایی نیاز است که همین امر منجر به ظهور عوارض جانبی می‌شود. از این رو تحویل هدفمند با استفاده از حامل‌های مناسب یک ضرورت است (Fahim et al., 2016; Urban et al., 2012). ظهور نانو تکنولوژی توسعه رویکردهای جدید برای تحویل پتیده‌های ضد میکروبی را امکان‌پذیر کرده است. سیستم‌های تحویل نانو متشکل از نانوذرات مختلف (مانند پلیمر، لیپید، کربوهیدرات و فلز) می‌توانند برای هدف قرار دادن مؤثر این پتیده‌های ضد میکروبی در میزبان آلوده مورد بهره‌برداری قرار گیرند. برخلاف باکتریوسین‌های آزاد، باکتریوسین‌های فرموله شده نانو دارای طیف وسیع‌تری از فعالیت ضد میکروبی و پایداری بالاتری هستند (Fahim et al., 2016). در بخش مواد غذایی، نانوکپسوله‌سازی باکتریوسین‌ها، محافظت در

نصف کاهش دهد. در همین راستا، قرار دادن نایسین در میکروکپسول‌های متشکل از دو ترکیب سدیم آلزینات و کیتوزان اثربخشی بیشتری در کاهش بیوفیلم و همچنین بیان ژن‌های درگیر در ویرولانسی و بیوفیلم لیستریا مونوسایتوجنز داشت. متأسفانه، اطلاعات چندانی پیرامون سطح بیان ژن‌های دخیل در تشکیل بیوفیلم لیستریا مونوسایتوجنز در دسترس نیست و با توجه به قدرت بیماری‌زایی، انتقال از طریق مواد غذایی و تشکیل بیوفیلم لیستریا مونوسایتوجنز، لازم است این موضوع به‌طور گسترده بررسی شود. برای تحقیقات آتی در این زمینه پیشنهاد می‌گردد که به ریزپوشانی باکتری در دولایه مختلف (یک لایه به‌عنوان پوشش و یک لایه به‌عنوان محافظ) از نانوذرات مختلف مانند نانوفیبرها و لپیدهای جامد پرداخته شود تا اثرگذاری آن در تشکیل بیوفیلم و ویرولانسی لیستریا مونوسایتوجنز بررسی شود.

تائیدیه کمیته اخلاق

این مطالعه با شناسه IR.IAU.TNB.REC.1400.090 در کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال مورد تائید قرار گرفته است.

سپاسگزاری

نویسندگان از ریاست محترم دانشکده زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال جناب پروفیسور عباس اخوان سپهی برای مشاوره و کمک ایشان نهایت سپاس را دارند.

تضاد منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تضاد منافی ندارند.

نانوذرات آلزینات (Maresca et al., 2016) و نقره (Xinghong Zhao and Kuipers, 2021) در کاهش تشکیل بیوفیلم باکتری‌های بیماری‌زای منتقله از طریق مواد غذایی را گزارش کرده‌اند.

عمدتاً اثربخشی نایسین از طریق کاهش بیان ژن‌های مرتبط با زنجیره تأمین انرژی و متابولیسم باکتری است. لیستریا مونوسایتوجنز به‌علت برخورداری از ژن‌های متعدد با خواص ویرولانسی قوی دارای توانایی ویژه‌ای در ایجاد بیوفیلم روی سطوح و مواد غذایی است (Kiral et al., 2021). برای مثال ژن *sigB* به‌عنوان یکی از ژن‌های مورد مطالعه در این بررسی مسئول ایجاد مکانیسم‌های مقاومت در شرایط پراسترس محیطی است که کاهش بیان آن می‌تواند باعث اختلال در تشکیل بیوفیلم شود (Chaturongakul et al., 2008; van der Veen and Abee, 2010). ژن *prfA* دخیل در چندین عامل بیماری‌زایی (Good et al., 2016; Pinheiro et al., 2018) و *agra* مرتبط با کروم‌سنسینگ در لیستریا مونوسایتوجنز هستند (Gray et al., 2021; Li, 2020). هر سه ژن مورد بررسی در مطالعه حاضر در حضور نایسین کاهش بیان را نشان دادند؛ به‌طوری‌که کمترین میزان سطح بیان مرتبط با *agra* و بیشترین میزان، مرتبط با *sigB* بود. نتایج تحقیق حاضر بر صحت یافته‌های مطالعه‌ای دیگر که گزارش کردند نایسین ریزپوشانی شده در کاهش بیان ژن‌های کدکننده پروتئین‌های سطحی مانند پروتئین‌های کمپلکس پیرووات دهیدروژناز و پروتئین‌های مرتبط با فلاژلین در مراحل تشکیل بیوفیلم لیستریا مونوسایتوجنز همسو است (Stinconone et al., 2020).

نتایج این مطالعه نشان داد که نایسین به‌تنهایی می‌تواند قدرت تشکیل بیوفیلم در لیستریا مونوسایتوجنز را به

منابع

- Abebe, E., Gugsu, G. and Ahmed, M. (2020). Review on Major Food-Borne Zoonotic Bacterial Pathogens. *Journal of Tropical Medicine*, 2020: 4674235.
- Balciunas, E.M., Martinez, F.A.C., Todorov, S.D., de Melo Franco, B.D.G., Converti, A. and de Souza Oliveira, R.P. (2013). Novel biotechnological applications of bacteriocins: a review. *Food Control*, 32(1): 134-142.
- Brandelli, A. (2012). Nanostructures as promising tools for delivery of antimicrobial peptides. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 12(8): 731-741.
- Cabeça, T.K., Pizzolitto, A.C. and Pizzolitto, E.L. (2012). Activity of disinfectants against foodborne pathogens in suspension and adhered to stainless steel surfaces. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(3): 1112-1119.
- Chaturongakul, S., Raengpradub, S., Wiedmann, M. and Boor, K.J. (2008). Modulation of stress and virulence in *Listeria monocytogenes*. *Trends in Microbiology*, 16(8): 388-396.
- Fahim, H.A., Khairalla, A.S. and El-Gendy, A.O. (2016). Nanotechnology: a valuable strategy to improve bacteriocin formulations. *Frontiers in Microbiology*, 7: 1385.
- Feng, L. and Mumper, R.J. (2013). A critical review of lipid-based nanoparticles for taxane delivery. *Cancer letters*, 334(2): 157-175.
- Galie, S., Garcia-Gutierrez, C., Miguelez, E.M., Villar, C.J. and Lombo, F. (2018). Biofilms in the food industry: health aspects and control methods. *Frontiers in Microbiology*, 9: 898.
- Good, J.A., Andersson, C., Hansen, S., Wall, J., Krishnan, K.S., Begum, A. *et al.*, (2016). Attenuating *Listeria monocytogenes* virulence by targeting the regulatory protein PrfA. *Cell Chemical Biology*, 23(3): 404-414.
- Gray, J., Chandry, P.S., Kaur, M., Kocharunchitt, C., Fanning, S., Bowman, J.P. *et al.*, (2021). Colonisation dynamics of *Listeria monocytogenes* strains isolated from food production environments. *Scientific Reports*, 11(1): 12195.
- Hernandez-Milian, A. and Payeras-Cifre, A. (2014). What is new in listeriosis? *BioMed Research International*, 358051.
- Kiral, E., kaczmarz, E., Bozan, G., Arslanoglu, O., Kilic, O. and Dinleyici, E.C. (2021). 261. A rare case of meningitis and symptomatic hydrocephalus by *Listeria monocytogenes* in dermatomyositis: A Case Report. *Open Forum Infectious Diseases*, 8(Supplement_1): S237-S238.
- Li, M. (2020), Exploring the connection between acid exposure and virulence in *Listeria monocytogenes*, Utah State University.
- Liu, Y., Wu, L., Han, J., Dong, P., Luo, X., Zhang, Y. *et al.*, (2020). Inhibition of biofilm formation and related gene expression of *Listeria monocytogenes* in response to four natural antimicrobial compounds and sodium hypochlorite. *Frontiers in Microbiology*, 11: 617473.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method. *Methods*, 25(4): 402-408.
- Lopes, N.A., Pinilla, C.M.B. and Brandelli, A. (2019). Antimicrobial activity of lysozyme-nisin co-encapsulated in liposomes coated with polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 93: 1-9.
- Maresca, D., De Prisco, A., La Stora, A., Cirillo, T., Esposito, F. and Mauriello, G. (2016). Microencapsulation of nisin in alginate beads by vibrating technology: Preliminary investigation. *LWT-Food Science and Technology*, 66: 436-443.
- Martinez, R.C.R., Alvarenga, V.O., Thomazini, M., Fávoro-Trindade, C.S. and de Souza Sant'Ana, A. (2016). Assessment of the inhibitory effect of free and encapsulated commercial nisin (Nisaplin®), tested alone and in combination, on *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* in refrigerated milk. *LWT-Food Science and Technology*, 68: 67-75.

- Mauriello, G., De Luca, E., La Stora, A., Villani, F. and Ercolini, D. (2005). Antimicrobial activity of a nisin-activated plastic film for food packaging. *Letters in Applied Microbiology*, 41(6): 464-469.
- Pinheiro, J., Lisboa, J., Pombinho, R., Carvalho, F., Carreaux, A., Brito, C. *et al.*, (2018). MouR controls the expression of the *Listeria monocytogenes Agr* system and mediates virulence. *Nucleic Acids Research*, 46(18): 9338-9352.
- Pinilla, C.M.B., Stincone, P. and Brandelli, A. (2021). Proteomic analysis reveals differential responses of *Listeria monocytogenes* to free and nanoencapsulated nisin. *International Journal of Food Microbiology*, 346: 109170.
- Pisano, M.B., Fadda, M.E., Melis, R., Ciusa, M.L., Viale, S., Deplano, M. *et al.*, (2015). Molecular identification of bacteriocins produced by *Lactococcus lactis* dairy strains and their technological and genotypic characterization. *Food Control*, 51: 1-8.
- Prombutara, P., Kulwatthanasal, Y., Supaka, N., Sramala, I. and Chareonpornwattana, S. (2012). Production of nisin-loaded solid lipid nanoparticles for sustained antimicrobial activity. *Food Control*, 24(1-2): 184-190.
- Rahmati, F. (2017). Characterization of *Lactobacillus*, *Bacillus* and *Saccharomyces* isolated from Iranian traditional dairy products for potential sources of starter cultures. *AIMS Microbiology*, 3(4): 815.
- Rahmati, F. (2020). Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus plantarum* in Eudragit S100 and alginate chitosan under gastrointestinal and normal conditions. *Applied Nanoscience*, 10(2): 391-399.
- Ramaswamy, V., Cresence, V.M., Rejitha, J.S., Lekshmi, M.U., Dharsana, K., Prasad, S.P. *et al.*, (2007). *Listeria*-review of epidemiology and pathogenesis. *Journal of Microbiology Immunology and Infection*, 40(1): 4.
- Rossi, M.L., Paiva, A., Tornese, M., Chianelli, S. and Troncoso, A. (2008). *Listeria monocytogenes* outbreaks: a review of the routes that favor bacterial presence. *Revista Chilena de Infectologia: organo oficial de la Sociedad Chilena de Infectologia*, 25(5): 328-335.
- Salama, Y., Chennaoui, M., Sylla, A., Mountadar, M., Rihani, M. and Assobhei, O. (2016). Characterization, structure, and function of extracellular polymeric substances (EPS) of microbial biofilm in biological wastewater treatment systems: a review. *Desalination and Water Treatment*, 57(35): 16220-16237.
- Sen, C. and Ray, P.R. (2019). Biopreservation of dairy products using bacteriocins. *Indian Food Industry*, 1: 51-60.
- Stincone, P., Miyamoto, K.N., Timbe, P.P.R., Lieske, I. and Brandelli, A. (2020). Nisin influence on the expression of *Listeria monocytogenes* surface proteins. *Journal of Proteomics*, 226: 103906.
- Urban, P., Jose Valle-Delgado, J., Moles, E., Marques, J., Diez, C. and Fernandez-Busquets, X. (2012). Nanotools for the delivery of antimicrobial peptides. *Current Drug Targets*, 13(9): 1158-1172.
- van der Veen, S. and Abee, T. (2010). Importance of *SigB* for *Listeria monocytogenes* static and continuous-flow biofilm formation and disinfectant resistance. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(23): 7854-7860.
- Were, L.M., Bruce, B., Davidson, P.M. and Weiss, J. (2004). Encapsulation of nisin and lysozyme in liposomes enhances efficacy against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 67(5): 922-927.
- Zhao, X., and Kuipers, O.P. (2021). Synthesis of silver-nisin nanoparticles with low cytotoxicity as antimicrobials against biofilm-forming pathogens. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 206: 111965.
- Zhao, X., Zhao, F., Wang, J. and Zhong, N. (2017). Biofilm formation and control strategies of foodborne pathogens: food safety perspectives. *RSC Advances*, 7(58): 36670-36683.
- Zohri, M., Alavidjeh, M.S., Haririan, I., Ardestani, M.S., Ebrahimi, S.E.S., Sani, H.T. *et al.*, (2010). A comparative study between the antibacterial effect of nisin and nisin-loaded chitosan/alginate

-
- nanoparticles on the growth of *Staphylococcus aureus* in raw and pasteurized milk samples. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2(4): 258-266.
- Zohri, M., Shafiee Alavidjeh, M., Mirdamadi, S.S., Behmadi, H., Hossaini Nasr, S.M., Eshghi Gonbaki, S. *et al.*, (2013). Nisin-loaded chitosan/alginate nanoparticles: A hopeful hybrid biopreservative. *Journal of Food Safety*, 33(1): 40-49.