نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره چهاردهم، شماره دوم، ۱۳۹۷، پیاپی ۳۷: ۸۱-۶۹

بررسی اثر ضد باکتریایی نیسین و لیزوزیم روی *لیستریا مونوسیتوژنز* و *اشریشیا کلی* در pHهای مختلف و دمای ۲۴ درجه سانتی گراد

حمدالله مشتاقی*[۱]، آزاده رشیدی مهر[۲]، بهزاد شارقی[۳]

۱- دانشیار، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

۳- استاد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۷/۱ تاریخ پذیرش: ۹۷/۲/۲۰

چکیده

با توجه به اثرات سوء استفاده از مواد شیمیایی صنعتی و بحث های قابل قبولی که در خصوص سرطان زایی و سمیت آن ها برای انسان صورت گرفته است، علاقه روز افزونی به استفاده از مواد نگهدارنده طبیعی وجود دارد. به منظور جلوگیری از رشد یا مهار اجرام بیماری زا و عوامل فساد مواد غذایی تحقیقات فراوانی با استفاده از نگهدارنده های طبیعی صورت گرفته و در حال حاضر نیز در حال انجام است. این مطالعه به منظور بررسی تأثیر غلظت های مختلف لیزوزیم و نیسین بر میزان رشد باکتری های *اشریشیا کلی* و *لیستریا مونوسیتوژنز* و همچنین تعیین MIC و MBC این ترکیبات بر باکتری های فوق انجام گرفت. در این مطالعه غلظت های مختلف لیزوزیم و نیسین به صورت تنها و توأم (صفر، ۱۹/۵۳، ۳۹/۰۶، ۷۸/۱۳، ۱۵۶/۲۵، ۳۱۲/۵، ۶۲۵، ۱۲۵۰، ۲۵۰۰، ۵۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) در شرایط آزمایشگاهی در شش pH ۵/۵، ۶، ۶/۵، ۷، ۷/۵ و ۸ تنظیم شده بود، به روش میکرودایلوشن و در دمای ۲۴ درجه سانتی گراد و قرائت اثر ترکیبات روی میزان رشد باکتری ها با استفاده از الیزا ریدر انجام شد. نتایج حاصل نشان داد که لیزوزیم تأثیر کمتری روی *اشریشیا کلی* دارد و نیسین روی *لیستریا مونوسیتوژنز* کمتر تأثیر داشت. استفاده توأم لیزوزیم و نیسین در pH های پایین موجب کاهش MIC شد.

کلمات کلیدی: نیسین، لیزوزیم، لیستریا مونوسیتوژنز، اشریشیا کلی

* نویسنده مسئول: حمدالله مشتاقی

آدرس: گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران تلفن: ۰۹۱۳۱۸۱۲۸۱۵

پست الکترونیک: moshtaghi@vet.sku.ac.ir

مقدمه

با توجه به اثرات سوء استفاده از مواد شیمیایی صنعتی و بحث های قابل قبولی که در خصوص سرطان زایی و سمیت آن ها برای انسان صورت گرفته است، علاقه روز افزونی به استفاده از مواد نگهدارنده طبیعی وجود دارد (۱۷). لیزوزیم (E.C.3.2.1.17) به وسیله کمیته آنزیم ها طبقه بندی شده است و معمولاً به نام مورامیداز نامیده می شود. لیزوزیم سفیده تخم مرغ یک زنجیره پلی پپتیدی تکی متشکل از ۱۲۹ اسیدآمینه است که ۴ پیوند دی سولفیدی با وزن مولکولی ۱۴/۴۰۰دالتون دارد (۱۸). آنزیم لیزوزیم، آنزیمی سخت و پایدار می باشد؛ به نحوی که در دمای فیزیولوژیک این آنزیم هیچ گونه تغییر ساختاری را از pH های ۱/۲ تا ۱۱/۳ نشان نداده و از طرفی در دامنه pH فیزیولوژیک، تا دمای ۷۷ درجه سانتی گراد هیچ گونه تغییر ساختاری را نشان نمی دهد. لیزوزیم این پایداری بالا را مدیون حضور ۴ پیوند دی سولفیدی و هم چنین پیوندهای هیدروژنی و میانکنش های آب گریز بین اسیدآمینه های این آنزیم است. با این که پیوندهای دی سولفیدی باعث پایداری لیزوزیم در مقابل عوامل دگرگون کننده و گرما می شوند ولی این پیوندها توسط عوامل سورفاکتانت و احیاکننده از بین می روند (۲۵).

امروزه، استفاده از روش های نوین نگهداری نظیر استفاده از باکتریوسین ها و اسانس های گیاهی جایگاه ویژه ای در صنایع غذایی پیدا کرده اند. باکتریوسین ها پروتئین ها یا پپتیدهایی هستند که اغلب به عنوان ابزارهای بیولوژیکی با ارزشی جهت ارتقای ایمنی غذا و رشد و مهار کننده رشد باکتری ها در مواد غذایی استفاده می شوند. یکی از این باکتریوسین ها، نیسین است. نیسین ترکیب بیواکتیو و پپتیدی است که توسط برخی از باکتری های لاکتیک اسید تولید می شود(۲۸). نیسین به خوبی مورد مطالعه قرار گرفته است و توسط باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* تولید می شود (۱۵، ۱۷، ۳۰، ۳۱). از باکتری های اسید لاکتیک از جمله لاکتوکوکوس، لاکتوباسیلوس، پدیوکوکوس و غیره نیز تولید می شود، نیسین آنتی بیوتیک پپتیدی کاتیونی است که از ۳۴ اسید آمینه که شامل ۵ حلقه درون مولکولی می باشد تشکیل شده است (۲۰). نیسین برای اولین بار توسط روگرز در سال ۱۹۲۸ به عنوان ماده ای جهت جلوگیری از رشد *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* معرفی شده است. ولی به علت این که طیف فعالیت ضد میکروبی آن کم، حلالیت کم در مایعات بدن، تجزیه آن توسط پروتئاز های دستگاه گوارش و عدم پایداری آن در pH فیزیولوژیک برای اهداف کلینیکی نامناسب بود، تا سال ۱۹۴۰ مورد توجه قرار نگرفت. در سال ۱۹۵۱ هریس نشان داد که نیسین از تشکیل گاز تولید شده توسط کلستریدیوم جلوگیری می کند. در انگلستان توسط آپلین و بارت تولید شد، و در سال ۱۹۶۹ سازمان غذا و کشاورزی Food and Agriculture Organization (FAO) و سازمان بهداشت جهانی World Health Organization (WHO) مشترکاً، استفاده از نیسین را به عنوان ماده نگهدارنده غذایی به جای مواد شیمیایی تأیید کردند. بنابراین نیسین از سال ۱۹۸۷ به عنوان افزودنی مجاز در مواد غذایی و در محصولات لبنی استفاده شده است (۴،۱۹). یکی از معیارهایی که به وسیله بیشتر محققین جهت اندازه گیری فعالیت ضد باکتریایی عوامل ضد میکروب استفاده می گردد، اندازه گیری حداقل غلظت مهارکنندگی رشد یا MIC (Minimum inhibitory concentration) است. مطالعات متعددی در ارتباط با تعیین MIC عوامل ضد میکروب طبیعی انجام شده است با توجه به این که عوامل ضد میکروب هر کدام

دارای اثرات متفاوت روی میکروارگانیسم ها می باشند، crandal و همکاران اثر نیسین و سوربات پتاسیم را بر *لیستریا مونوسیتوژنز* در دمای 35 درجه سانتی گراد و به مدت 48 ساعت در پنیر بررسی کردند .اما این مواد در غلظت مهار کننده بر باکتری اثر نداشت (۱۱). Davies و همکاران توانستند *لیستریا مونوسیتوژنز* را به طور موثر در پنیر در دمای ۶-۸ درجه سانتی گراد مهارکنند (۱۲). مقاومت به نیسین در باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* توسط Davies و همکاران (۱۲) و Harris و همکاران (۱۷) گزارش شده است. Pol و Smid نیز نشان دادند که در دمای 8 درجه سانتی گراد حساسیت *باسیلوس سرئوس* بیشتر از *لیستریا مونوسیتوژنز* به نیسین است؛ اما در دمای 21درجه سانتی گراد حساسیت مشابه است(۲۷). مقاومت سویه های مختلف *لیستریا مونوسیتوژنز* نسبت به نیسین نیز گزارش شده است(۱۶، ۳۵). نصر و همکاران نشان دادند که حساسیت *لیستریا مونوسیتوژنز* به نیسین در دمای یخچال و در داخل پنیر از حساسیت آن در شرایط آزمایشگاه کمتر است(۶). در مطالعه مبصری و همکاران، فعالیت ضد باکتریایی نیسین و تأثیر آن در کاهش غلظت نگهدارنده های شیمیایی رایج، علیه باکتری های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا مونوسیتوژنز* بررسی شد و نشان داد که می توان از نیسین به عنوان یک نگهدارنده بی ضرر درمواد غذایی استفاده کرد و غلظت نگهدارنده های شیمیایی را کاهش داد (۵). استفاده توأم از نیسین و لیزوزیم علیه باکتری های گرم مثبت مکانیسم کشته شدن باکتری تقویت می شود(۱۰). بنابراین برای تشدید فعالیت، توأم نمودن این عوامل با یکدیگر و نیز پی بردن به اثرات توأم آنها مدنظر محققین قرار گرفته است. تحقیق حاضر نیز با این هدف در شرایط آزمایشگاهی انجام شد.

مواد و روش ها

تعیین میزان تلقیح باکتریایی

ابتدا باکتری های مورد مطالعه که شامل *اشرشیاکلی* RTCC۲۳۱۰ (تهیه شده از انستیتو واکسن و سرم سازی رازی) و *لیستریامونوسیتوژنز* ATCC ۱۱۴۳ (تهیه شده از انستیتو واکسن و سرم سازی رازی) می باشند در تریپتیک سوی آگار کشت داده شد و در شرایط یخچال نگهداری شدند و در فواصل زمانی سه الی چهار هفته، برای حفظ فعالیت، تجدید کشت می شدند. برای به دست آوردن پرگنه تک از سوسپانسیون باکتری ها، در محیط آگار مغذی کشت خطی داده شد. در مرحله بعد، سه پرگنه تک، از هرکدام از باکتری ها برداشت نموده و در لوله های آزمایش محتوی ۵ میلی لیتر تریپتیک سوی براث کشت شدند. پس از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری در ۳۷ درجه سانتی گراد، برای تخمین تعداد باکتری در هر میلی لیتر، جذب نوری (Optical density) کشت های باکتری ها، با استفاده از دستگاه الیزا ریدر (AWARENESS Technologinic ساخت کشور آمریکا) در طول موج ۶۳۰ نانومتر تعیین شدند.

نیسین

ابتدا پودر نیسین ۲/۵ درصد از شرکت سیگما آلدریچ (ساخت کشور آمریکا) در آب مقطر استریل حل شد و توسط فیلتر میکروبیولوژیک ۰/۴۵ میکرومتر استریل شد. غلظت‌های به‌کاررفته نیسین صفر، ۱۹/۵۳، ۳۹/۰۶، ۷۸/۱۳، ۱۵۶/۲۵، ۳۱۲/۵، ۶۲۵، ۱۲۵۰، ۲۵۰۰، ۵۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود.

لیزوزیم

پودر لیزوزیم را از شرکت سیگما آلدریچ (ساخت کشور آمریکا) خریداری‌شده و در آب مقطر استریل حل شد و توسط فیلتر میکروبیولوژیک ۰/۴۵ استریل

شد. غلظت‌های به‌کاررفته لیزوزیم صفر، ۱۹/۵۳، ۳۹/۰۶، ۷۸/۱۳، ۱۵۶/۲۵، ۳۱۲/۵، ۶۲۵، ۱۲۵۰، ۲۵۰۰، ۵۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود.

تهیه بافر (تامپون) فسفات‌سدیم (NaH_2PO_4) تنظیم pH های ۶، ۶/۵ و ۷

جهت تهیه تامپون فسفات‌سدیم ۵۰ میلی مولار با pH= ۷، ۱/۹۵ گرم از فسفات‌سدیم در مقداری آب مقطر دو بار تقطیر حل گردد و به‌وسیله دستگاه pH متر و باافزودن NaOH ۰/۱ نرمال، pH تامپون به ۷ رسانده شد و سپس با اضافه کردن آب مقطر دو بار تقطیر، در بالون ۲۵۰ سی‌سی به حجم رسانده شد و در یخچال نگهداری گردید. برای pH های ۶ و ۶/۵ نیز به همین صورت عمل گردید ولی برای تنظیم pH آن از HCl ۰/۱ نرمال نیز استفاده شد.

تهیه بافر استات‌سدیم

جهت تهیه تامپوناستات سدیم ۰/۰۵ مولار، ۰/۰۷۱ سی‌سی اسیداستیک را با ۰/۱ گرم سدیم استات در مقداری آب مقطر دو بار تقطیر حل گردید و به‌وسیله pH متر به pH= ۵/۵ رسانده شد و با اضافه کردن آب مقطر دو بار تقطیر، در بالون ۲۵۰ سی‌سی به حجم رسانده شد و در یخچال نگهداری گردید.

تهیه بافر (تامپون) Na_2HPO_4

برای تهیه بافر فسفات‌دی‌سدیم ۵۰ میلی مولار برای pH= ۸، ۴/۴۸ گرم از فسفات‌دی‌سدیم در مقداری آب مقطر دو بار تقطیر حل گردد و به‌وسیله دستگاه pH متر با افزودن NaOH ۰/۱ نرمال، pH تامپون به ۸ رسانده شد و سپس با اضافه کردن آب مقطر دو بار تقطیر، در بالون ۲۵۰ سی‌سی به حجم رسانده شد و در یخچال نگهداری گردید.

تعیین MIC

روش سنجش رقت میکروبراث (Microdilution broth assay) برای بررسی اثر ضد میکروبی لیزوزیم و نیسین روی باکتری های *لیستریا مونوسیتوژنز* و *اشریشیا کلی* در دمای ۲۴ درجه سانتی گرادو pH۵/۵، ۶/۰، ۶/۵، ۷/۰، ۷/۵ و ۸/۰ مورد استفاده قرار گرفت (۷). پلیت های استریل ۹۶ خانه ای پلی استایرن با ظرفیت ۳۰۰ میکرولیتر استفاده شد. محلول ذخیره لیزوزیم و نیسین با غلظت µg/ml ۱۰۰۰۰ با عبور از فیلتر استریل غشایی با منافذ µm ۰/۴۵ صاف شد. ۱۵۰ میکرولیتر از محلول لیزوزیم و نیسین به هر چاهک از ستون اول با استفاده از یک پیپتور چند کاناله استفاده شد. سپس µl ۱۵۰ از محیط آبگوشت TSB به ستون اول اضافه شده و به طور کامل با مایع داخل چاهک های متناظر از ستون دوم ده بار مخلوط شد. پس از آن ۱۵۰ µl نمونه برداشته و به ستون کناری اضافه و مخلوط شد. برای تمامی چاهک های دو برابر رقت انجام شد. به جز ستون ۱۱ که به عنوان شاهد باکتری و ستون ۱۲ به عنوان شاهد محیط کشتبه کار گفته شدند. در نتیجه این گونه رقت سازی، گرادیان غلظت لیزوزیم و نیسین از ۰ تا ۱۰ mg/ml در سراسر پلیت به دست آمد. ۱۰ میکرولیتر از محیط کشت هر کدام از باکتری های مورد آزمایش پس از انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در هر چاهک پلیت به جزء چاهک ۱۰ که شاهد ماده مورد مطالعه بود و چاهک ۱۲ با غلظت حاصل نهایی cfu/ml 10^5 کشت داده شدند. پلیت میکروتیتر در انکوباتور به مدت ۴۸ ساعت در ۲۴ درجه سانتی گراد گرم خانه گذاری شد. رشد باکتریایی به وسیله الیزا ریدر(ELISA reader) و تغییر در جذب با طول موج ۶۳۰nm اندازه گیری شد. MIC به عنوان کمترین غلظت لیزوزیم و نیسین در مهار رشد باکتری های مورد آزمایش

مشخص می شود. ۵۰ میکرولیتر از محتویات آن دسته از چاهک هایی که لکه دار نشدند روی محیط کشت اختصاصی MH برای تایید مهار رشد کشت داده شد. سنجش MIC برای هر باکتری دو بار انجام می شود و همچنین سنجش هر کدام از موارد مختلف سه بار تکرار شده است(۳۷). در مرحله دوم فعالیت آنزیم لیزوزیم در غلظت ها و pH فوق در ۲۴ درجه سانتی گراد به وسیله الیزا ریدر ارزیابی شده است (۷). برای تعیین MBC نیز تعداد کلونی های باکتری بر روی محیط کشت MH شمارش شدند.

تجزیه وتحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار Sigmastatو از روش واریانس یک طرفه انجام شد (۸).

نتایج

نتایج حاصل از ارزیابی اثر ضد باکتریایی نیسین و لیزوزیم و تواماً نشان داد که این ترکیبات در دمای ۲۴ درجه سانتی گراد روی رشد باکتری های *اشریشیا کلی* و *لیستریا مونوسیتوژنز* در محیط کشت TSB خاصیت ضد باکتریایی آن ها افزایش داشته است همچنین تفاوت معنی داری در جذب نوری میکروارگانیسم های حاضر در pH های مختلف بین گروه های شاهد و گروه های آزمایشی وجود داشت ($p<0.05$).

مطابق نمودار ۲،۱ و ۳برای *اشریشیا کلی*:

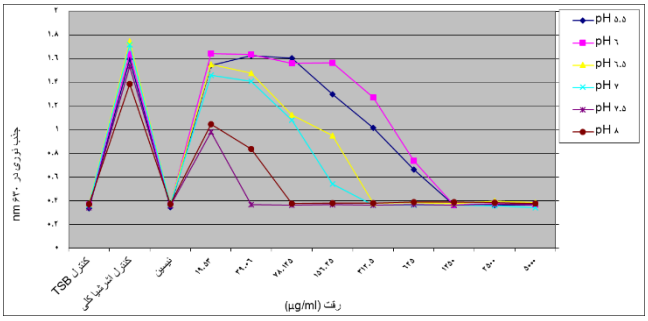
درتمامیpHها اثر مهاری نیسین روی رشد *اشریشیا کلی* ملاحظه شد اما بهترینpH برای عملکرد نیسین ۸ بود که درتمامی رقت ها باعث مهار رشد باکتری شده است($p<0.05$). اما لیزوزیم درمجموع کاهش قابل توجهی در رشد باکتری نشان نداده اما در رقت های ۵۰۰۰ و ۲۵۰۰ µg/mlلیزوزیم در اکثرمواقع به جز ۷ =pHعمکرد قابل قبولی داشت($p<0.05$) و ترکیب این نگهدارنده درpHهای ۸ و ۷/۵ بهترین عمکرد را داشت ($p<0.05$).

طبق نمودارهای ۴، ۵ و ۶ برای *لیستریامونوسیتوژنز*:

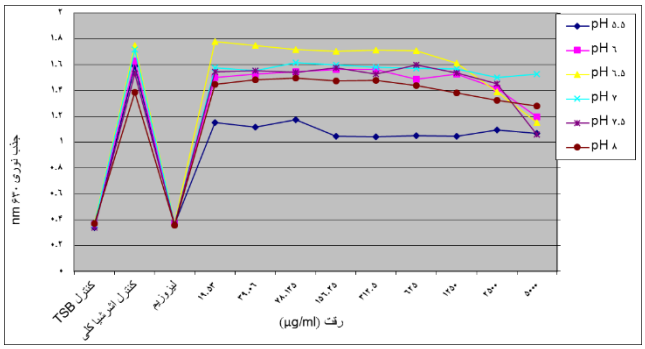
بهترینpH برای اثر نیسین روی *لیستریا مونوسیتوژنز* pH های بالا به خصوص ۷/۵ است ($p<0.05$).

در pH=۵/۵ لیزوزیم روی *لیستریا مونوسیتوژنز* بهترعمل کرد($p<0.05$) و برای ترکیب آن ها تمامی pH ها به خصوص در pH= ۵/۵ کاهش جذب باکتری دررقت های اولیه مشاهده شد ($p<0.05$).

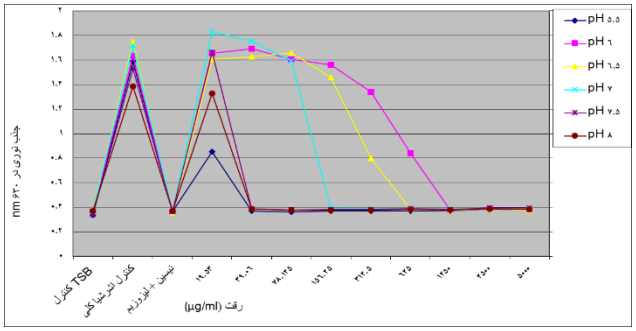
همان طور که در نمودارهای ۳ و ۶ و جدول ۳ دیده می شود اثر توأم نیسین و لیزوزیم نسبت به هر کدام از آن ها به تنهایی به خصوص در pH های ۷/۵ و ۸ بهتر بود. طبق نمودار ۵ حساسیت *لیستریا مونوسیتوژنز* به نیسین به تنهایی بیشتر از اثر توأم آن با لیزوزیم بود و حساسیت *اشریشیا کلی* به ترکیب توأم نیسین و لیزوزیم بیشتر بود ($p<0.05$).



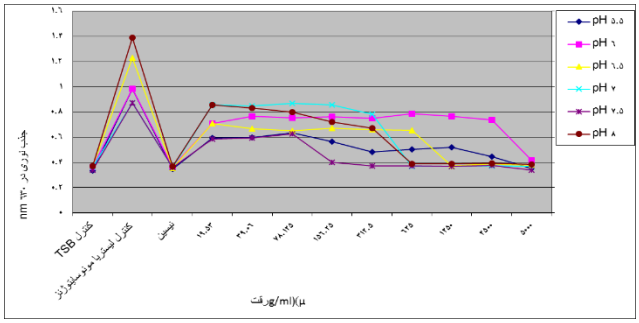
نمودار ۱ اثر ضد باکتریایی غلظت های مختلف نیسین روی *اشریشیا کلی* در محیط کشت TSBدر دمای ۲۴ سانتی گراد



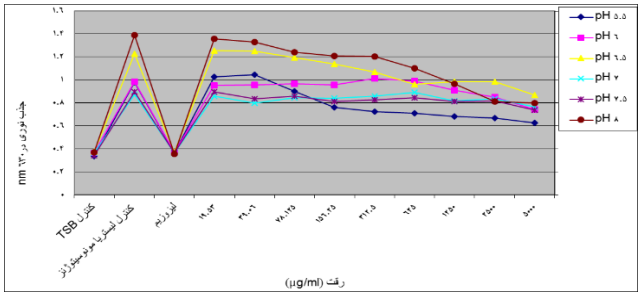
نمودار ۲ اثر ضد باکتریایی غلظت های مختلف لیزوزیم روی *اشریشیا کلی* در محیط کشت TSB در دمای ۲۴ درجه سانتی گراد



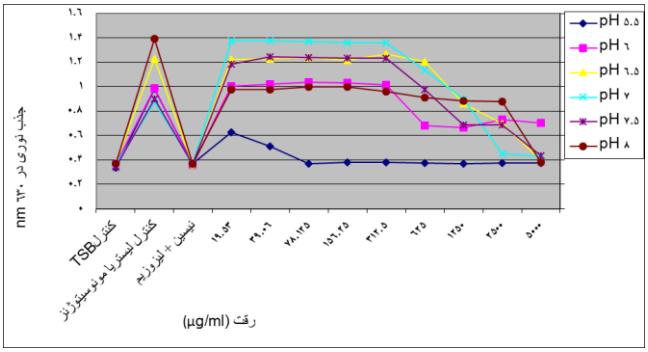
نمودار۳ اثرضد باکتریایی غلظت های مختلف توأم لیزوزیم و نیسین روی *اشریشیا کلی* درمحیط کشتTSB دردمای ۲۴ درجه سانتی گراد



نمودار ۴ اثرضد باکتریایی غلظت های مختلف نیسین روی *لیستریا مونوسیتوژنز* درمحیط کشتTSB دردمای ۲۴ درجه سانتی گراد



نمودار ۵ اثر ضد باکتریایی غلظت های مختلف لیزوزیم روی *لیستریا مونوسیتوژنز* در محیط کشت TSB در دمای ۲۴ درجه سانتی گراد



نمودار۶ اثرضد باکتریایی غلظت های مختلف توأم لیزوزیم و نیسین روی *لیستریا مونوسیتوژنز* درمحیط کشتTSB دردمای ۲۴ درجه سانتی گراد

جدول ۱ تعیین MIC وMBC های نیسین در شش pH و درباکتری‌های *لیستریا مونوسیتوژنز* و *اشریشیا کلی*

		نیسین					
	غلظت (µg/ml)	pH					
		5/5	6	6/5	7	7/5	8
اشریشیا کلی	MIC	1250	1250	625	78/125	69/3	78/125
	MBC	1250	1250	625	156/25	78/125	78/125
لیستریا مونوسیتوژنز	MIC	5000	5000	2500	625	312/5	625
	MBC	0	0	5000	2500	625	1250

جدول ۲ تعیین MIC و MBC های لیزوزیم در شش pH و در باکتری‌های *لیستریا مونوسیتوژنز* و *اشریشیا کلی*

		نیسین					
	غلظت (µg/ml)	pH					
		5/5	6	6/5	7	7/5	8
اشریشیا کلی	MIC	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	MBC	0	۰	۰	۰	۰	۰
لیستریا مونوسیتوژنز	MIC	0	0	0	۰	۰	۰
	MBC	0	0	0	0	۰	0

جدول ۳ تعیین MIC و MBC های توأم لیزوزیم و نیسین در شش pH و در باکتری‌های *لیستریا مونوسیتوژنز* و *اشریشیا کلی*

		نیسین + لیزوزیم					
	غلظت (µg/ml)	pH					
		5/5	6	6/5	7	7/5	8
اشریشیا کلی	MIC	19/53	1250	625	156/25	39/06	5000
	MBC	156/25	1250	1250	312/5	78/125	5000
لیستریا مونوسیتوژنز	MIC	2500	0	5000	2500	5000	39/06
	MBC	5000	0	5000	5000	5000	78/125

بحث و نتیجه گیری

بر اساس مطالعات Chen و Hoover فعالیت باکتریوسین ها ممکن است در محیط غذایی به علت تغییر در حلالیت و با باکتریوسین، اتصال آن به اجزاء غذا و غیر فعال شدن باکتریوسین توسط پروتئازها مهار شود(۹). در عین حال که فعالیت نیسین 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 تاثیر قرار می گیرد و مانع ورود نیسین به سلول باکتری می شود(۲۵).

Mastromatteo و همکاران، در سال ۲۰۱۰، اثرات ضدمیکروبی لیزوزیم، نیسین و EDTA (mix1: ۲۵۰ ppmلیزوزیم، ۲۵۰ ppm نیسین، ۵Mm EDTA، Mix2 : ۵۰۰ ppmلیزوزیم، ۵۰۰ ppmنیسین، ۵ Mm EDTA) بر رشد باکتری پاته شترمرغ بسته بندی شده در هوا، خلاء و ۲ اتمسفرتغییریافته مورد بررسی قرار دادند که مخلوطی با غلظت کم لیزوزیم ونیسین بهترین اثرات آنتی اکسیدانی را نشان داد و غلظتهای بالا لیزوزیم و نیاسین بیشترین میزان رنگ را نشان داد. همچنین off-odors پاته تیمارنشده سریع تر ازنمونه های تحت تیماربود (۲۲). فعالیت سینرژیک ضد میکروبی لیزوزیم (۲۵۰ ppm)،نایسین (۲۵۰ ppm)، و disodium ethylenediaminetetraacetic acid EDTA)

۲۰ Mm) علیه باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* و پاتوژن های باکتریایی گوشت در شترمرغ بسته بندی شده در هوا و خلاء را مورد مطالعه قرار دادند. تیمار ضد میکروبی جمعیت *لیستریا مونوسیتوژنز* درپاته شترمرغ به کمتراز حد استاندارد اتحادیه اروپا (<۲ log CFU / g) کاهش داده است (۲۳).

Park و همکاران ثابت کردند که فعالیت ضد باکتری لیزوزیم می تواند با الحاق به کیتوزان تقویت شود که این مسأله می تواند استفاده از این مواد را در صنایع غذایی افزایش دهد (۲۶). Smith و همکاران تأثیر لیزوزیم و حرارت را بر رشد *لیستریا مونوسیتوژنز* بررسی و پیشنهاد کردند، لیزوزیم می تواند به عنوان نگهدارنده در کنترل این باکتری در غذاهایی که سرد مصرف می شوند، استفاده شود (۳۳). White اثر ضد باکتریایی کارواکرول و فوسویتین(Phosvitin) با نیسین به تنهایی یا به صورت ترکیبی روی پاتوژن های غذایی روده ای انسان را مورد مطالعه قرار داد و بر اساس نتایج حاصل از مطالعات نتیجه گرفت استفاده از فوسویتین وکارواکرول به صورت ترکیبی دارای پتانسیل خوبی برای کنترل رشد پاتوژن های غذایی موجود در سوپ پیاز و قارچ و ایجاد ایمنی میکروبی در موادغذایی با پتانسیل خطرهستند. ترکیب نیسین و فوسویتین به مراتب برای جلوگیری از رشد عوامل پاتوژن در سوپ کمتر موثر است (۳۶). Tong و همکاران اثر توام نیسین و سدیم فلوراید و یا کلرهگزیدین روی *استرپتوکوکوس موتانس* (*Streptococcus mutans*) را ارزیابی کردند و بیان داشتند که ترکیب نیسین و سدیم فلوراید موجب آسیب شدیدتری به *استرپتوکوکوس موتانس* می شود، علاوه براین در آزمایش آنتی بیوفیلم (antibiofilm) نیسین با سدیم فلوراید اثر باکتریوسیدی شدیدتری روی بیوفیلم *استرپتوکوکوس موتانس* گذاشتند که می توان به صورت ترکیبی برای تولید داروهایی جهت جلوگیری از پوسیدگی دندان استفاده کرد (۳۴). Govaris و همکاران اثر ضد باکتریایی پونه کوهی،نیسین و ترکیب آنها در برابر *سالمونلا انتریتیدیس*(*Salmonella enteritidis*) را در گوشت گوسفند چرخ شده در هنگام ذخیره سازی در یخچال بررسی کردند و نتیجه گرفتند که ترکیب پونه کوهی۰/۶٪ با نیسین (۵۰۰ IU/g) اثر ضدمیکروبی قوی تری در برابر *سالمونلا انتریتیدیس*دارند و درصد مهارکنندگی در ۱۰ درجه سانتی گراد بالاتر از ۴ درجه سانتی گراد است (۱۴). رهنما و همکاران اثرات ضدمیکروبی اسانس گیاه آویشن شیرازی و نیسین به تنهایی و ترکیبی با یکدیگر علیه *لیستریا مونوسیتوژنز* در آبگوشت قلب- مغز بررسی کردند و نشان دادند که اثر بازدارندگی آویشن شیرازی در همراهی با نیسین علیه *لیستریا مونوسیتوژنز*افزایش می یابد (۲). دباغ و همکاراندر تحقیقی بیان داشتند نیسین و دی استات سدیم می توانند طی دوره ماندگاری سس فرانسوی از رشد میکروارگانیسم های عامل فساد سس جلوگیری کنند(۱). زایر زاده و همکاران تاثیر معنی داری بین عملکرد نیسین آزاد و محصور در نانوکپسول های لیپوزومی بر روند کاهش جمعیت لیستریایی را گزارش کردند. در ارتباط با تغییرات pH در دوتیمار نیسین محصور در نانوکپسول های لیپوزومی، روند تغییرات pH اختلاف معنی داری با هم و با شاهد نداشتند، ولی در تیمار نیسین آزاد، تفاوت معنی داری در تمام هفته های نگهداری پس از تولید مشاهده گردید(۳). Silvaو همکاران در تحقیقی اثر nanovesicle-encapsulatedنیسین را روی رشد *لیستریا مونوسیتوژنز* موجود در شیر مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که استفاده از آن برای غلبه بر پایداری و کاهش فعل و

انفعالات غذا با ترکیب درجه حرارت پایین برای کنترل *لیستریا مونوسیتوژنز* شیر موثر است (۳۲). Malinowska اثر لیزوزیم و نیسین را روی برخی از باکتری ها با فشار بالا و دمای زیر صفر درجه بررسی کردند. باکتری های گرم مثبت و منفی در فشار ۱۹۳ مگا پاسکال و دمای ۲۰-درجه سانتی گراد در حضور لیزوزیم و نیسین در غلظت mg/ml ۴۰۰ بررسی شدند، در فشار بالا و دمای پایین *سودوموناس فلوروسنس* (*Pseudomonas flouresence*) به آن حساس بود. رشد *اشریشیا کلی* کاهش یافت اما عملاً رشد دو سویه از *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus*) ناچیز بود (۲۱). Goodman و همکاران نشان دادند که لیز *استرپتوکوکوس موتانس* به وسیله لیزوزیم در حضور نمک های معدنی افزایش می یابد و برای کلر بیشتر از فلور است (۱۳). و متوجه شدند که فعالیت نیسین 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 تاثیر قرار می گیرد و مانع ورود نیسین به سلول باکتری می شود(۲۴). مقاومت به نیسین در باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* توسط Davies و همکاران(۱۲) گزارش شد. Pol و Smid نیز نشان داند که در دمای ۸ درجه سانتی گراد حساسیت *باسیلوس سرئوس* بیشتر از *لیستریا مونوسیتوژنز* به نیسین است؛ اما در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد حساسیت مشابه است(۲۷). مقاومت سویه های مختلف *لیستریا مونوسیتوژنز* نسبت به IU/ml ۵۰۰ نیسین نیز گزارش شده است (۳۵). Chun و Hancocok فعالیت لیزوزیم و نیسین را به صورت توأم بر علیه باکتری های اسید لاکتیک بررسی کردند و تغییرات در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه گیری کردند و بیان کردند که استفاده توأم آن ها موجب بهبود حداقل غظت مهاری در مقایسه با استفاده به صورت جداگانه می شود (۱۰). Razavi-Rohani و همکاران اثر لیزوزیم، BHA (Butylatedhydroxyanizole)، نمک، pH و عوامل شلاته کننده (EDTA) را علیه باکتری های پاتوژن غذایی بررسی کرده و مشاهده کردند لیزوزیم همراه با BHA بر ضد باکتری ها (در حضور یا عدم حضور EDTA) با وجود pH پایین تر و غلظت نمک بالاتر، اثر مهاری بالاتری داشت. لیزوزیم با شلاته کننده های دیگر مثل سدیم سیترات و مونوگلیسرول سیترات قادر به مهار کردن نبود(۲۹).

در مطالعه حاضر اثر لیزوزیم بر روی *اشریشیا کلی* باعث مهار رشد نشد اما کاهش رشد را به همراه داشت، در مورد *لیستریا مونوسیتوژنز* نیز همین گونه عمل کرد اما این کاهش رشد بیشتر بود. اثر نیسین بر روی *لیستریا مونوسیتوژنز* در رقت µg/ml ۵۰۰۰ در تمامی pH ها مهار رشد را به همراه داشت و بهترین عمکرد را در pH، ۷/۵ داشت اما اثر این ماده بر روی *اشریشیا کلی* بیشتر بود و در تمامی pH ها حداقل در سه رقت ۵۰۰۰، ۲۵۰۰ و ۱۲۵۰ مهار رشد مشاهده شد و نیز در pH= ۷/۵ در تمامی رقت ها به جز رقت ۱۹/۵۳ موجب مهار رشد شد.

بنابراین استفاده توأم از نیسین و لیزوزیم علیه باکتری های گرم مثبت همکاری باهم نشان می دهند و مکانیسم کشته شدن باکتری تقویت می شود. تأثیر توأم این دو ماده بر روی *اشریشیا کلی* بهتر از هرکدام به صورت جداگانه عمل کرد به خصوص در pH های ۷/۵ و ۸ موجب بهبود عملکرد ضد باکتریایی آن ها شد و حداقل در رقت های µg/ml ۵۰۰۰، ۲۵۰۰ و ۱۲۵۰

موجب مهار رشد شد. لیزوزیم به دلیل ساختار دیواره سلولی باکتری های گرم منفی و با اثر بر پیوند گلیکوزیدی ساختلر پپتیدوگلیکانی تنها می تواند دیواره سلولی باکتری های گرم مثبت را مورد هدف قرار دهد. هرچند لایه لیپوپلی ساکاریدی باکتری های گرم منفی مانع از اثر لیزوزیم روی سلول باکتری است اما تحقیقات نشان داده است که لیزوزیم، نیسین و برخی دیگر از باکتریوسین ها روی بعضی از گونه های باکتری های گرم منفی اثر ضدباکتریایی دارند که به دلیل تخریب لایه خارجی و ایجاد منافذ بزرگتر در این دیواره، به ویژه هنگام استفاده توام باکتریوسین ها از جمله لیزوزیم و نیسین اثر به صورت سینرژیستی قوی تر است. اما در مورد *لیستریا مونوسیتوژنز* این تأثیر توأم کمتر بود و بهبود عملکرد فقط در pH= ۵/۵ در اکثر رقت ها مشاهده شد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از حمایت معاونت پژوهشی و دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد در انجام این پژوهش که در قالب پایان نامه کارشناسی ارشد بود، تشکر و قدردانی می نمایند.

منابع:

۱- دباغ، ن؛ حسینی، ا؛ شعبانی، ش و علیمی، م (۱۳۹۱). بررسی امکان استفاده از نیسین و دی استات سدیم به عنوان نگهدارنده های طبیعی در نگهداری سس فرانسوی. *علوم غذایی و تغذیه*، دوره ۹ - شماره ۳ – صفحات ۳۹ -۵۶,

۲- رهنما، م؛ رضوی روحانی، س. م؛ تاجیک، حسین خلیقی سیگارودی، ف و رضازادباری، م (۱۳۸۸). بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس گیاه آویشن شیرازی و نیسین به تنهایی و ترکیبی با یکدیگر برعلیه *لیستریا مونوسیتوژنز* درآبگوشت قلب- مغز. *فصلنامه گیاهان دارویی*، سال ۸، شماره ۳۲.

۳- زایرزاده، ا؛ مرتضوی، س.ع. جعفری، م. ر. افشارنژاد، س؛ طباطبایی یزدی، ف ونصیری محلاتی، مهدی(۱۳۹۰). بررسی اثر ضد باکتریایی نیسین به دو فرم آزاد و نانوکپسوله در لیپوزوم بر ماندگاری و کاهش جمعیت لیستریایی پنیرسفید ایرانی فراپالایش. *نشریه پژوهش های علوم و صنایع غذایی ایران*، سال ۷، شماره ۳، صفحات ۱۹۱-۱۹۹.

۴- عبداله زاده، ا. رضایی، م. حسینی، ه و صفری، ر. (۱۳۹۰). تاثیر نیسین و آویشن شیرازی به تنهایی و توام با یکدیگر برجمعیت *لیستریا مونوسیتوژنز* تلقیح شده درگوشت چرخ شده ماهی فیتو فاگ. *مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران*، دوره۶، شماره ۴، صفحات ۲۰-۱۳,

۵- مبصری، ص. ملک زاده، ف. پوربابایی، ا.ع. (۱۳۸۸). ارزیابی تاثیر نیسین روی کاهش غلظت نگهدارنده های شیمیایی مواد غذایی. *مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد*، شماره ۳صفحات ۱۹۷-۲۰۰,

۶- نصر، آ. کسری کرمانشاه، ر. و نحوی، ا. (۱۳۸۶). ارزیابی کارآیی نیسین بر روی باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* جدا شده از شیر و مقاومت نسبت به برخی از اسید های آلی در پنیر. *مجله زیست شناسی ایران*، شماره ۲۰، صفحات ۱۹۶-۲۰۵.

7. Alexander, O. and Richard, A. (2003). Interactive inhibition of meat spoilage and pathogenic bacteria by lysozyme, nisin and EDTA in the presence of nitrite and sodium chloride at 24°C. *International Journal of Food Microbiology*, **80:** 251–259.
8. Broughton, J. (1990). Nisin and its uses as a food Preservative. *Food Technology*, 100-112.
9. Chen, H. and Hoover, D.G. (2010). Bacteriocins and their food application. *Comprehensive Reviews Food Science and Food Safety*, **2:** 82-100.
10. Chun, W. and Hancock, R.E.W. (2000). Action of lysozyme and nisin mixtures against lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, **60:** 25–32.
11. Crandal, 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.
12. Davies, E.A., Bevis, H.E., Delves, B. (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.
13. Goodman, H., Pollock, J.J., Katona, L.I., Iacono, VJ., Cho, MI., Thomas, E. (1980).

Lysis of *Sreptococcus mutans* by hen egg white lysozyme and inorganic sodium salts. *Journal of Bacteriology*, **146:** 764-774.
14. Govaris, A., Solomakos, N., Pexara, A., Chatzopoulou, P.S. (2010). The antimicrobial effect of oregano essential oil, nisin and their combination against *Salmonella Enteritidis* in minced sheep meat during refrigerated storage. *International Journal of Food Microbiology*, **137:** 175–180.
15. Hansen, J. (1993). The molecular biology of nisin and its structural analogs. In D. Hoover and L. Steenson (eds.), Bacteriocins of lactic acid bacteria, Academic Press, New York: 93-120.
16. Hansen, J.N. (1997). Nisin and related antimicrobial peptides. In W.R. Strohl (ed.), Biotechnology of antibiotics, Marcell Dekker, Inc., New York: 437-470.
17. Harris, L.J., Fleming, H.P., Klaenhammer, TR. (1992). Sensitivity and resistance of *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, Scott A, and UAL500 to nisin. *Journal of Food Protection*, **54:** 836-840.
18. Johnson, E. and Larson, A. (2005). lysozyme. In Antimicrobial in foods. Davidson, P.M., Sofos, N.J., Branen, A.L., New York: 361-387.
19. Kotra, L.P., Samama J. P., and Mobashery, S. (2001). β-Lactamases and resistance to β-lactam antibiotics. In Bacterial resistance to antimicrobials (ed. K. Lewis, A.A. Salyers, H.W. Taber, and R.G. Wax). Marcel Dekker, Inc., New York: 123–159.
20. Kovacs-Nolan, J.; Phillips, M.; Mine, Y. (2005). Advances in the value of eggs and egg components for human health. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, **53:** 8421-8431.
21. Malinowska-Paczyk, E. and Kołodziejska, I. (2009). Effect of lysozyme or nisin on survival of some bacteria treated with high pressure at subzero temperature. *Brazilian Journal of Microbiology*, **40:** 767-777.
22. Mastromatteo, M., Lucera, A., Sinigaglia, M., &Corbo, M. R. (2010). Synergic antimicrobial activity of lysozyme, nisin, and EDTA against *Listeria monocytogenes* in ostrich meat patties. *Journal of Food Science*, **75:** 34-41.
23. Mastromatteo, M., Lucera, A., Sinigaglia, M., and Corbo, M. R. (2010). Use of lysozyme, nisin, and EDTA combined treatments for maintaining quality of packed ostrich patties. *Journal of Food Science*, **75(3)**: 123-129.
24. Moll, G.N., Clark, J., Chan, W.C., Bycroft, B.W., Roberts, G.C., Konings, W.N., Driessen, A.J. (1997). Role of trans membrane pH gradient and membrane binding in nisin pore formation. *Journal of Bacteriology*, **179:** 135-140.
25. Nakamura, S., Kato, A. and Kobayashi, K. (1991). New antimicrobial characteristics of lysozyme dextran conjugate. *Journal of Agriculture and Food Chemistry,* **39:** 647–650.
26. Park, S-I., Daeschel, M.A. and Zhao, Y. (2004). Functional properties of antimicrobial lysozyme-chitosan composite film. *Journal Food Science*, **69:** 215- 221.
27. Pol, I. and Smid, E. (1999). Combined action of nisin and carvacrol on Bacillus cereus and *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, *29:* 166-170.
28. Ponkham, P., Daduang, S., Kitimasak, W. (2010). Complete amino acid. *Toxicology and Pharmacology*, **151:** 75-83.
29. Razavi-Rohani, S. and Griffiths, M. (1996). The effect of lysozyme and butylated hydroxyl anizole on spoilage and pathogenic bacteria associated with food. *Journal Food Safety*, **16:** 59- 74.
30. Ruso, JM., Prieto, G. andSamiento, F.L. (2003). Study of the interactions between lysozyme and a fully-fluorinated surfactant in aqueous solution at different surfactant`s protein ratios. *International Journal of Biological Macromolecules*, **33:** 67-73.
31. Schuenzed, K. and Hrrison, K. (2002). Microbial antagonists of food borne Pathogens on Fresh minimally Processed vegetables. *Journal of Food Protection*, **65:** 1909-1915.
32. Silva Malheirosa, P., Daroita, J.D., Silveirab, N.P., Brandelli, A. (2010). Effect of nanovesicle-encapsulated nisin on growth of *Listeria monocytogenes* in milk. *Food Microbiology*, **27:** 175-178.
33. Smith, J.L., Mccolgan, C., Marmer, B.S. (1991). Growth temperature and action of lysozyme on *Listeria monocytogenes*. *Food Science*, **56:** 1101-1103.
34. Tong, Z., Zhou, L., Jiang, W., Kuang, R., Li, J., Tao, R., Ni, L. (2011). An in vitro

synergetic evaluation of the use of nisin and sodium fluoride or chlorhexidine against *Streptococcus mutans*. *Peptides*, **32:** 2021–2026.

35. Ukuku, D.O. and Shelef, L.A. (1997). Sensitivity of six strains of *Listeria monocytogenes* to nisin. *Journal of Food Protection,* **60:** 867-869.
36. White, S. (2011). Antibacterial efficacy of phosvitin, carvacrol, or nisin alone or combined enteric pathogens against foodborne pathogens. Theses, Iowa State University: 20- 24.
37. Zhang, G., Darius, S., Smith, SR. and Ritchie, SJ. (2006). In vitro inhibitory effect of hen egg white lysozyme on *Clostridium perfringens* type A associated with broiler necrotic enteritis and its α-toxin production. *Letters in Applied Microbiology*, **24:** 138–114.

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 14, Issue 2, 2018

Investigation the antimicrobial activity of nisin and lysozyme on *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* at different pH and at 24 ° C

Moshtaghi, H.[1, *], Rashidi Mehr, A.[2] & Shareghi, B.[3]

1. Associate Professor،Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran
2. M.Sc.Graduated student Health and Food Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran
3. Professor, Department of Biology, Faculty of Science, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran

Received: 23 September 2017 Accepted: 10 May 2018

Abstract

In order to prevent or inhibit the growth of pathogenic objects and factors of food spoilage, great deal of research has been done by using natural preservatives and currently is performed. This study has been done to investigate the effect of different concentrations of lysozyme and nisin on the growth rate of the bacteria Escherichia coli and Listeria monocytogenes and also determination of MIC and MBC of this combinations on these bacteria.In this study, various concentrations of lysozyme and nisin was set in form of alone concentration and in combination concentration (0, 19.53, 39.06, 78.13, 156.25, 312.5, 625, 1250, 2500, 5000) in vitro conditions and pH 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5 and 8.These actions was done in microdilution method at 24 ° C and reading the combined effect on the growth of bacteria was performed by using ELISA reader.The results showed that lysozyme is less effective on the E. coli and nisin have less effective on the L.monocytogenes. The combined use of lysozyme and nisin at low pH was decreased MIC.

Keyword: nisin, lysozyme, Listeria monocytogenes, Escherichia coli

**Corresponding author: Moshtaghi, H.*
Address: Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran. Tel: +989131812815
E-mail address: moshtaghi@vet.sku.ac.ir