اثرات ضد باکتریایی ترکیبی نیسین و اسانس پیاز تحت غلظت‌های مختلف نمک و pH بر باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* در شرایط آزمایشگاهی

سید مهدی رضوی روحانی[۲،۱]، مهران مرادی[۳*]، تورج مهدی زاده[۴]

۱- دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، ارومیه، ایران.
۲- دانشگاه ارومیه، پژوهشکده زیست فناوری، گروه بیوتکنولوژی گیاهان دارویی و صنعتی، ارومیه، ایران.
۳- دانشگاه تبریز، دانشکده کشاورزی اهر، گروه علوم و صنایع غذایی، تبریز، ایران.
۴- دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، ارومیه، ایران.
*نویسنده مسئول مکاتبات: moradi.mehran@yahoo.com
(دریافت مقاله: ۹۰/۸/۲۱ پذیرش نهایی: ۹۰/۹/۲۹)

چکیده

در این مطالعه اثرات ضد لیستریایی اسانس پیاز (*Allium cepa* L.) و نیسین به تنهایی و در ترکیب با هم در ۳ pH، ۴/۸، ۵/۸ و ۶/۸ و ٤ غلظت نمک کلرید سدیم (۰، ۰/۵، ۲/۵ و ٤/۵ درصد) بر علیه باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به روش میکروتیتر مورد ارزیابی قرار گرفت. حداقل غلظت ممانعت از رشد (MIC) نیسین و اسانس به تنهائی و سپس به صورت ترکیبی و تحت شرایط مختلف pH و نمک بدست آمد و برای محاسبه غلظت ممانعت کننده کسری یا FIC استفاده گردید. هر دو ترکیب ضد میکروبی مورد استفاده، اثر ضد میکروبی مشخص و بارزی بر علیه باکتری نشان داد، بطوریکه MIC های mL^{-1} ۱۲/۵IU برای نیسین و mL^{-1} ۱۲۵µg برای پیاز بدست آمد. نتایج FIC نیسین و اسانس نشان داد که ترکیبات ضد میکروبی مورد استفاده، در حالت ترکیبی اثر ضد لیستریایی مؤثر را بروز می‌دهند که این اثرات به صورت سینرژیستی، افزایشی و گاهی بدون اثر است. این تأثیرات علاوه بر غلظت نمک به طور کامل تحت تأثیر pH قرار داشت. از طرفی و صرف نظر از مقدار pH، رشد میکروارگانیسم از افزایش غلظت نمک متأثر گردید. به طوری که در pH ٤/۸ و غلظت نمک ٤/۵ فعالیت ضد لیستریایی معنی‌داری توسط دو ترکیب مشاهده گردید. نکته قابل توجه این است که اثر ترکیبی نمک برای هر دو ترکیب در pH های مختلف، متفاوت بوده و نیازمند طراحی مدل‌های پیشگویی بیشتری است.

واژه های کلیدی: *لیستریا مونوسیتوژنز*، **نیسین، اسانس پیاز، استفاده ترکیبی.**

مقدمه

ترکیبات ضد میکروبی، مواد شیمیایی و یا طبیعی هستند که توانایی از بین بردن و یا مهار رشد ارگانیسم‌های میکروسکوپی و حتی اجرام ریزتر را دارند (Anonymous, 2009). مواد ضد باکتریایی متعددی با منشاء حیوانی، گیاهی و میکروبی وجود دارد که نقش دفاعی مهمی در برابر میکروارگانیسم‌ها بر عهده دارند. از مهم‌ترین این ترکیبات می‌توان به آنزیم‌های ضد میکروبی (لاکتو پراکسیداز، لاکتوفرین)، پپتیدهای ضد میکروبی (مگااینین Magainins، سسروپین Cecropins) و دفنسین Defensins) فنل‌های طبیعی(هیدرو کینون کاتچین Catechins)، استرهای اسیدهای چرب، آنتی اکسیدان‌های فنلی، آنتی بیوتیک‌ها و فلزات (مس) اشاره کرد. در بین ترکیبات مذکور، ترکیباتی با منشاء طبیعی به دلیل GRAS (Generally Recognized As Safe) بودن، اثرات تغذیه‌ای و سلامتی، بسیار مورد توجه می‌باشند (Appendiniand Hotchkiss, 2002; Embuscado and Huber, 2009).

امروزه استفاده از گیاهان خوراکی، گیاهان با مصرف پزشکی و مشتقات آنها (اسانس‌ها، هیدروسل(فرآورده جانبی استخراج اسانس) و عصاره‌های گیاهی) به دلیل داشتن ترکیبات ضد میکروبی قوی و متنوع، به طور وسیعی برای جلوگیری از رشد عوامل میکروبی و قارچی بیماری‌زا استفاده می‌شود. ترکیبات ضد میکروبی گیاهان در اسانس‌های تهیه شده از بخش-های مختلف گیاه از جمله برگ، گل یا غنچه، ریشه، دانه، ریزوم، میوه و سایر قسمت‌ها یافت می‌شود. تاکنون بیش از ۳۴۰ گیاه با خاصیت ضد میکروبی شناسایی و بیش از ۳۰ هزار ترکیب فنلی با خاصیت ضد میکروبی از اسانس‌ها جدا شده است (Tajkarimi et al., 2010; Tiwari et al., 2009).

پیاز (*Allium cepa*L) به لحاظ گیاه‌شناسی متعلق به خانواده آلیاسه بوده و در قسمت‌های مختلفی از اروپا، آسیا، آمریکا و آفریقا یافت می‌شود. به دلیل طعم و بوی خاص، پیاز در اغلب کشورها به عنوان بخش مهمی از رژیم غذایی از مقبولیت زیادی برخوردار است. پیاز به دلیل داشتن فلاونوئیدها و آلکیل سیستئین سولفوکسیاد از اهمیت تغذیه‌ای خاصی در سلامت انسان برخوردار است. آلکیل سیستئین سولفوکسیاد مهمترین پیش‌ساز مواد طعم‌دار پیاز می-باشد. ترکیبات موجود در پیاز دارای اثرات ضد سرطانی، ضد تشکیل لخته خونی، آنتی هیستامینی و ضدمیکروبی است (Griffiths et al., 2002).

باکتریوسین‌ها یک گروه ازمواد ضد میکروبی پپتیدی هستند که به وسیله باکتری‌های اسید لاکتیک تولید شده و اثر بازدارندگی و بعضاً کشندگی بر روی سویه‌های همان گونه را دارند. استفاده از این مواد پروتئینی، در مواد غذایی مصرفی انسان مشکلی ایجاد نمی‌کند و تا به حال گزارشی در مورد محدودیت استفاده از این مواد وجود ندارد (RazaviRohani et al., 2011). این ترکیبات مقاوم به حرارت و هیپوآلرژیک (Hypoallergic)، توسط آنزیم‌های پروتئولیتیک دستگاه گوارش انسان تخریب می‌شوند (Thomas and Delves-Broughton, 2001). باکتریوسین‌های متعددی وجود دارند، برخی مثل

نیسین، پدیوسین PA-1 و لاکتیسین ۳۱٤۷ برای استفاده تأیید شده‌اند، در بین اینها نیسین شناخته شده‌ترین باکتریوسین است که به طور وسیع در مواد غذایی استفاده می‌شود. نیسین تولید شده از *لاکتوکوکوس لاکتیس* تحت گونه لاکتیس و پدیوسین حاصل از استارتر کالچر فرآورده‌های تخمیری، جزء مهم‌ترین ترکیبات ضد میکروبی بر علیه لیستریا و سایر عوامل گرم مثبت باکتریایی سطح مواد غذایی می‌باشند. نیسین طی چند مرحله در غشاء سلول ایجاد یکسری روزنه نموده، سپس از بخش N به فاز لیپیدی غشاء وارد شده و شرایط را برای خروج سریع ترکیبات کوچک سیتوپلاسمی مهیا و نهایتاًباعث مرگ سلول می‌شود (Pol and Smid, 1999). نیسین حداقل به سه دلیل در بین انواع باکتریوسین‌ها و حتی در بین انواع دیگر ترکیبات ضد میکروبی، می‌تواند دارای کاربرد تجاری باشد: ۱) داشتن تمامی خصوصیات یک افزودنی سالم و قانونی ۲) در دسترس بودن (تولید تجاری) ۳) اثرات موثر بر علیه *لیستریا مونوسیتوژنز* (Cagri et al., 2004; Coma, 2008; Joerger, 2007). هدف از این مطالعه، ارزیابی اثرات ترکیبی اسانس پیاز و نیسین در pH ۳ (٤/۸ ، ۵/۸ و ٦/۸) و ٤ غلظت مختلف نمک (۰، ۰/۵، ۲/۵ و ٤/۵ درصد) در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد بر عیله رشد و بقاء *باکتری لیستریا مونوسیتوژنز* در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

استخراج اسانس‌ها

پیاز تازه از بازار خریداری و پس از شناسایی گونه، اسانس آن به روش تقطیر با بخار با استفاده از دستگاه کلونجر تهیه گردید. اسانس زرد رنگ با بوی منحصر به فرد استخراج شده از گیاه (۰/۰۱ گرم اسانس به ازاء هر کیلوگرم پیاز)، با سولفات سدیم آنهیدروز، آبگیری و از فیلترهای ۰/۲۲ میکرونی عبور داده و تا زمان استفاده، در شیشه‌های مخصوص درب‌دار تیره رنگ، در ٤ درجه سانتی گراد نگه‌داری شد.

تهیه و آماده‌سازی نیسین

محلول استوک نیسین (10^4 IU/mL) با حل نمودن ۲۰ میلی گرم نیسین تهیه شده از شرکت سیگما آلدریچ، در ۱ میلی لیتر اسید کلردریک ۰/۰۲ مولار تهیه گردید. سپس محلول در دور g ۱۵۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شده و پس از عبور از فیلترهای ۰/۲۲ میکرونی در ٤ درجه سانتی گراد تا زمان استفاده نگه‌داری گردید.

تهیه میزان تلقیح باکتریایی

باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز ATCC 19118* از کلکسیون میکروبی گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه تهیه و در داخل لوله‌های کرایو (Cryo tube) به روش توصیه شده توسط شرکت سازنده، تلقیح و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری گردید. سپس یک گرانول از لوله کرایو مورد نظر در شرایط سترون خارج و به ۱۰ میلی لیتر محیط آبگوشت قلب و مغز BHI (Brain heart infusion) براث منتقل و در ۱±۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲٤ ساعت نگه‌داری و سپس در

اسلنت BHI آگـار کشـت داده و در ٤ درجـه سـانتی گراد نگـه‌داری گردیـد. بـرای حفـظ قابلیـت زیسـتی باکتری، هر پـانزده روز یکبارتجدیـد کشـت گردیـد. باکتری قبل از استفاده به طور متوالی دو بار در محیط BHI براث تجدید کشت گردید. کشت دوم با انتقـال ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی به ۱۰ میلـی لیتر از محـیط مـذکور، تهیـه شـده و در۱±۳۵ درجـه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ساعت نگه‌داری گردید. سپس از کشت ۲۰ ساعته رقت لازم تهیه و همزمان با تعیین میزان جذب نوری با دستگاه اسپکتروفتومتر در طـول موج ٦۰۰ نانومتر، در رقت‌های تهیـه شـده، شـمارش باکتریایی به روش شمارش صفحه‌ای سـطحی انجـام گردید. در نهایت جذب نوری معـادل تقریبـی ۱×۱۰^{۹} باکتری در هـر میلـی لیتـر مشـخص گردیـد. در هـر آزمایش از لوله حـاوی ۱×۱۰^{۹} بـاکتری در هـر میلـی لیتر، رقـت‌هـای ۱۰ تـایی لازم را در آب پپتونـه ۰/۱ درصد تهیه واز لوله حاوی تعداد تقریبی باکتری مورد نظر به عنوان دوز تلقیح استفاده گردید.

تعیـین حـداقل غلظـت ممانعـت از رشـد (MIC) Minimum Inhibitory Concentration اسانس و نیسین بر علیه *لیستریامونوسیتوژنز*

بـرای تعیـین MIC از روش میکرودایلوشـن و بـا استفاده از میکروپلیت‌های ۹٦ خانه‌ای استفاده گردید. در ابتدا با استفاده از دی متیل سولفواکساید ۱۰ درصد (به عنـوان حـلال پخـش کننـده) محلـول اسـتوک از اسانس (٦٤۰۰ میلی گرم در هر میلی لیتر) تهیه گردید سپس رقت‌های دوتایی (از ۲۵ تا ۳۲۰۰ میلی گـرم در میلی لیتـر) از اسـانس در لولـه‌هـای درب‌دار حـاوی محـیط کشـت BHI بـراث تهیـه گردیـد. رقـت‌هـای ۳/۱۲ IU/mL، ٦/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ٤۰۰ از نیسین نیز تهیـه گردیـد (Razavi Rohani et al., 2011). سـپس در هـر چاهـک میکروپلیـت ۱٦۰ میکرولیتر محیط کشـت BHI بـراث، ۲۰ میکرولیتـراز باکتری و ۲۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف اسانس و یا نیسین ریخته شـد تـا نهایتـاً در هـر چاهـک دوز باکتری به ۵×۱۰^{۵}cfu/ml برسد. سپس میکروپلیـت‌هـا به مدت ۳۰ ثانیه در ۲۵۰۰ دور در دقیقه شیک شده و به مدت ۲٤ ساعت در ۱±۳۵ درجه سانتی‌گـراد قـرار داده شد. پس از این مدت MIC آنها به روش چشمی و مشاهده کـدورت و کشـت در محـیط آگـار تعیـین گردید (Razavi Rohani et al., 2011).

ارزیابی اثر ترکیبی اسانس پیاز و نیسین

برای ارزیابی اثرات ترکیبی نیسین و اسانس پیـاز، از غلظت ممانعت کننـده کسـری یـا FIC (Fractional inhibitory concentration) استفاده گردید.۸ رقت از اسانس پیاز و نیسین مشـابه روش تعیـین MIC تهیـه گردید. از این ۸ رقت، ۵ رقـت کمتـر از رقـت MIC، یک رقت خود MIC و ۲ رقت بیشـتر از رقـت MIC بدست آمده برای هر ترکیب ضد میکروبی بود. سپس در هـر چاهـک میکروپلیـت، ۱٤۰ میکرولیتـر محـیط کشـت BHI بـراث، ۲۰ میکرولیتـراز بـاکتری و ۲۰ میکرولیتر از یک رقت اسانس و ۲۰ میکرولیتراز یـک رقت نیسین ریخته شد. این کار برای سایر رقت‌هـای نیسین و اسانس به صورت ترکیبی انجـام گردیـد. دز باکتری در هر چاهـک ۵×۱۰^{۵}cfu/ml تعیـین گردیـد،

سپس میکروپلیت‌ها به مدت ۳۰ ثانیه در ۲۵۰۰ دور در دقیقه شیک شده و به مدت ۲٤ ساعت در ۱±۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از این مدت MIC ترکیبی اسانس و پیاز به روش چشمی و مشاهده کدورت و کشت در محیط آگار تعیین گردید. تمامی آزمایشات در سه pH٤/۸ ، ۵/۸ و ٦/۸ و چهار غلظت نمک کلرید سدیم ۰، ۰/۵، ۲/۵ و ٤/۵ درصد و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انجام گردید. برای تنظیم pH محیط کشت از اسید سیتریک ۱ نرمال استفاده گردید.

برای تعیین غلظت ممانعت کننده کسری یا FIC از فرمول‌های ذیل استفاده گردید.

$$FIC_{\text{نیسین}} \frac{MIC \text{ نیسین در حالت ترکیبی}}{MIC \text{ نیسین به تنهایی}}$$

$$FIC_{\text{اسانس}} \frac{MIC \text{ ترکیبی حالت در اسانس}}{MIC \text{ اسانس به تنهایی}}$$

نیسین FIC + اسانس FIC= شاخص FIC یا FICI

اگر شاخص FIC ترکیبات ضدمیکروبی کوچکتر از ۰/۵ باشد اثر متقابل ترکیبات ضدمیکروبی سینرژیستی، اگر بین ۰/۵ و یک باشد اثرات افزایشی، اگر بین ٤-۱ باشد، بدون اثر و در صورتی که بزرگتر از چهار باشد آنتاگونیستی بیان گردید (Schwalbe et al., 2007).

آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از برنامه آماری SPSS صورت گرفت. تمامی آزمایشات در حداقل سه تکرار انجام و نتایج به صورت میانگین ± خطای معیار میانگین بیان گردید.

یافته‌ها

نتایج مربوط به میزان MIC دو ترکیب مورد مطالعه حاکی از اثرات ضد لیستریایی مناسب این دو ترکیب بود به طوری که میزان MIC نیسین و اسانس پیاز به ترتیب ۱۲/۵ IU/mL و ۱۲۵ میکروگرم در میلی لیتر گزارش گردید.

جدول ۱: شاخص FIC اسانس پیاز و نیسین به تنهایی و در ترکیب با هم بر علیه باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* در محیط براث BHI در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد

pH	NaCl (%)	اسانس (µg/mL)			نیسین (IU/mL)			FICI	FICI stdev	اثرات متقابل
		MIC_a	MIC_c	FIC	MIC_a	MIC_c	FIC			
٦/٨	٠	١٢٥	١٥/٦	٠/١٢	١٢/٥	٦/٢٥	٠/٥	٠/٦٢	± ٠/٢٢	افزایشی
	٠/٥	١٢٥	١٥/٦	٠/١٢	١٢/٥	٦/٢٥	٠/٥	٠/٦٢	±٠/٠٥	افزایشی
	٢/٥	١٢٥	٣١/٢٥	٠/٢٥	١٢/٥	١٢/٥	١	١/٢٥	±٠/٠٦	بی اثر
	٤/٥	١٢٥	٣١/٢٥	٠/٢٥	١٢/٥	١٢/٥	١	١/٢٥	±٠/٠٦	بی اثر
٥/٦	٠	١٢٥	٣/٩	٠/٠٣	١٢/٥	٣/١٢	٠/٢٤	٠/٢٧	±٠/٠٤	سینرژیستی
	٠/٥	١٢٥	١٥/٦	٠/١٢	١٢/٥	٣/١٢	٠/٢٤	٠/٣٦	±٠/٣٥	سینرژیستی
	٢/٥	١٢٥	١٥/٦	٠/١٢	١٢/٥	٦/٢٥	٠/٥	٠/٦٢	±٠/٠٦	افزایشی
	٤/٥	١٢٥	٣١/٢٥	٠/٢٥	١٢/٥	٦/٢٥	٠/٥	٠/٧٥	±٠/٠٦	افزایشی
٤/٨	٠	١٢٥	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	٠/٥	١٢٥	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	٢/٥	١٢٥	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	٤/٥	١٢٥	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

MIC_a: MIC ترکیب ضد میکروبی به تنهایی

MIC$_c$: ترکیب ضد میکروبی در حال ترکیبی

FICI: یا شاخص FIC که از جمع FICاسانس و FIC نیسین بدست می‌آید

ND: رشد میکروارگانیسم مشاهده نگردید

ارزیابی اثرات ترکیبی اسانس پیاز و نیسین بر علیه *لیستریا مونوسیتوژنز* در ۳ pH و ٤ غلظت مختلف نمک در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به روش تعیین شاخص FIC در جدول ۱ آورده شده است. نتایج نشان داد که اسانس و نیسین تنها در ٥/٦ pH و نمک صفر و ۰/۵ درصد دارای اثرات سینرژیستی با هم بودند (جدول۱). اثرات افزایش این دو ترکیب در غلظت‌های مختلف نمک متأثر از میزان pH بود. اثرات افزایشی در ٦/٨ pH و در غلظت نمک صفر و ۰/۵ درصد و در ٥/٦ pH در غلظت نمک ۲/۵ و ٤/٥ درصد مشاهده گردید.

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج MIC نیسین بدست آمده در این مطالعه مشابه گزارش Murdock و همکاران (۲۰۰۷) بود که نشان دادند MIC نیسین بر علیه باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز*، ۲۵ IU/mL است (Murdock et al., 2007). MIC های بالاتر بدست آمده در سایر مطالعات، ممکن است تحت تاثیر گونه باکتریایی و یا محیط مورد استفاده باشد (Thomas and Wimpenny, 1996). برای مثال میکروارگانیسم‌ها در محیط کشت تریپتوز سوی آگار به دلیل میزان کاتیون-های دی والان بالا، نسبت به نیسین مقاوم‌تر بوده لذا MIC بالاتری را نشان می‌دهند (Murdock et al., 2007). اثرات کشندگی نیسین در pH خیلی پائین و درصد نمک خیلی بالا، تشدید شد.

بررسی‌های زیادی برای تشخیص گیاهان دارای خاصیت ضد *لیستریا مونوسیتوژنز* صورت گرفته است. ترکیباتی مثل سیلانترو Cilantro (٦٪)، رزماری

(۰/۱٪)، مریم گلی (۰/۱٪)، پونه کوهی (۰/۷-۰/۱)، میخک (۰/۵٪)، آویشن (۰/۱٪)، دارچین (۰/۱٪) و فلفل فرنگی (۰/۱٪) فعالیت لیستریاکشی مناسبی را نشان می‌دهند. حساسیت به ترکیبات گیاهی در بین سویه‌های لیستریا متفاوت است. حالت کشندگی و جلوگیری از رشد لیستریا، توسط اسانس‌های گیاهی در مواد غذایی نیز گزارش شده است (Ryser and Marth, 2007).

برای بررسی حساسیت *لیستریا مونوسیتوژنز* به نیسین مطالعه‌ای تحت شرایط زیر صورت گرفت: ۱) اضافه کردن مقدار مشخصی نیسین به محیط براث ۲) اضافه کردن تدریجی نیسین به محیط براث با استفاده از یک پمپ ۳) استفاده توام از دو روش فوق. بر اساس نتایج بدست آمده، تاثیر ضد میکروبی نیسین روی باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* به طور قوی بستگی به روش مورد استفاده داشت. استفاده از روش ۱ و ۲ باعث مهار *لیستریا مونوسیتوژنز* می شود ولی در طول زمان باکتری به نیسین مقاومت پیدا می‌کند که این مقاومت در حالت استفاده از روش ۱ بیشتر از روش ۲ است (Yamazahi et al., 2004). این مطالعه نشان داد که تعمیم استفاده از روش ۳ در غذا که در آن مقدار مشخصی نیسین به غذا استفاده می‌شود و از طریق بسته بندی نیز نیسین به تدریج وارد غذا شود، روش مؤثری در مهار *لیستریا مونوسیتوژنز* است (Yamazahi et al., 2004).

کاربرد نیسین به دلیل پایداری کم این ماده در pH بالاو محدودیت استفاده از آن در برخی مواد غذایی محدود می‌باشد. همچنین قابلیت برخی میکروارگانیسم‌ها از جمله *لیستریا مونوسیتوژنز* در تحمل نیسین نیز یک محدودیت دیگر در استفاده از این ترکیب به شمار می‌رود (Boziaris and Nychas, 2006). استفاده ترکیبی نیسین با سایر ترکیبات طبیعی ضد میکروب یک راهکار مهم در استفاده بهتر از این ماده ضدمیکروبی است. همچنین با عنایت به جایگاه اثر هر دو ترکیب ضدمیکروبی که غشاء سلولی است، می‌توان تصور نمود که استفاده ترکیبی باعث افزایش اثرات ضدمیکروبی اسانس و نیسین گردد.

نکته جالب توجه عدم وجود اثرات متقابل بین نیسین و اسانس پیاز در غلظت نمک ۲/۵ و ٤/٥ درصد در pH ٦/٨ بود. در این مطالعه، اثرات آنتاگونیست مشخصی بین نیسین و اسانس بر علیه باکتری لیستریا در شرایط مختلف مورد مطالعه، مشاهده نگردید و همچنان که که متصور می شد، در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و در pH ٤/٨ باکتری لیستریا در حضور نیسین و اسانس رشد نیافت. این نتایج مشابه مطالعه ای است که نشان داده شد که با کاهش میزان pH، اثر بخشی نیسین بر علیه باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* افزایش می یابد (Rayman et al., 1981). افزایش هیدروفوبی روغن‌های اساسی در مقادیر پایین pH سبب افزایش انحلال پذیری آنها در لیپیدهای غشاهای سلولی باکتری‌ها شده و نهایتا حساسیت باکتریایی افزایش می‌یابد (Burt, 2004). عدم توانایی رشد *لیستریا مونوسیتوژنز* کاملاً وابسته به دما نیز می‌باشد به طوری که در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد حتی باکتری توانایی

رشد در pH های بالادر حضور نیسین و اسانس به تنهایی و به صورت ترکیبی را نیز ندارد (نتایج منتشر نشده). این نتایج نشان می‌دهد که استفاده از نیسین و اسانس پیاز در دمای پایین اثرات کنترلی مشخصی بر روی رشد و بقاء باکتری لیستریا داشته، به طوری که در دماهای پایین دیگر نیازی به تغییرpH و یا غلظت نمک نیز وجود ندارد.

در مطالعه‌ای، اثرات سینرژیک عصاره آلی سیر و نیسین به صورت تعیین MIC بر روی ٦ سویه *لیستریا مونوسیتوژنز* در یک مدل محیط کشت مایع بررسی شد و یک تأثیر سینرژیستی ضد باکتریایی بر روی سویه‌های لیستریا در هنگام استفاده این دو ماده با هم مشاهده شد (Bhurinder et al., 2001). علاوه بر این، تأثیر سایر فاکتورهای رشد از قبیل pH و دماهای ٤ و٢٠ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت و نشان داد که افزایش pH باعث کاهش تأثیر هر دو ماده شد (Bhurinder et al., 2001). در ضمن تأثیر هر دو ماده در دمای ٤ درجه سانتی-گراد بیشتر از ٢٠ درجه سانتی‌گراد بود (Bhurinder et al., 2001). مکانیسم دقیق سینرژیستی نیسین و اسانس پیاز کاملاً مشخص نمی‌باشد ولی گمان می‌شود اسانس با افزایش تعداد و یا اندازه سوراخ در دیواره سلولی باعث بهبود اثرات ضد لیستریایی نیسین می‌گردد (Pol and Smid, 1999).

با توجه به نتایج بدست آمده و موارد مطرح شده در بحث، اثرات سینرژیستی، افزایشی و بدون اثر نیسین و اسانس پیاز بخوبی مشخص گردیده است. این اثرات تحت تأثیر عواملی نظیر کاهش pH و افزایش غلظت نمک بکار رفته دارد. البته تأثیر غلظت نمک در pH و دماهای مختلف فرآیندی بسیار پیچیده است و کاملاً وابسته به فاکتورهای هاردل مورد استفاده دارد. استفاده ترکیبی این دو ماده باعث کاهش غلظت مؤثر اسانس مورد نظر می‌گردد که این خود باعث برطرف شدن اثرات منفی اسانس در القاء بو، طعم و مزه مشخص در مواد غذایی می‌گردد. لذا انجام مطالعات تکمیلی در زمینه میکروبیولوژی پیشگو و سپس تعمیم آن بر مدل‌های غذایی به عنوان گام بعدی می تواند نتایج ارزنده‌ای را در برداشته باشد.

منابع

- Anonymous. (2009). http://www.answers.com/topic/antimicrobial agent.
- Appendini, P. and Hotchkiss, J.H. (2002). Review of antimicrobial food packaging. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 3: 113-126.
- Bhurinder, S., Bernadette, F. and Martin, R. (2001). Synergistic inhibition of *Listeria monocytogenes* by nisinsnd garlic extract. Food Microbiology, 15: 133-139.

- Boziaris, I.S. and Nychas G.J. (2006). Effect of nisin on growth boundaries of *Listeria monocytogenes* Scott A, at various temperatures, pH and water activities. Food Microbiology,23: 779-784.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. International Journal of Food Microbiology, 94: 223-53.
- Cagri, A., Ustunol, Z. and Ryser, E.T. (2004). Antimicrobial edible films and coatings. Journal of Food Protection, 67: 833-848.
- Coma, V. (2008). Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. Meat Science, 78: 90-103.
- Embuscado, M.E. and Huber, K.C. (2009). Edible films and coatings for food applications. Springer, New York, NY, pp. 295-314.
- Griffiths, G., Trueman, L., Crowther, T., Thomas, B. and Smith, B. (2002). Onions-A global benefit to health. Phytotherapy Research, 16: 603-615.
- Joerger, R.D. (2007). Antimicrobial films for food application: A quantitative analysis of their effectiveness. Packaging Technology and Science, 20: 231-273.
- Murdock, C.A., Cleveland, J., Matthews, K.R. and Chikindas, M.L. (2007). Thesynergistic effect of nisin and lactoferrin on the inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coliO157:H7*. Letters in Applied Microbiology, 44: 255-261.
- Pol, I.E. and Smid, E.J. (1999). Combined action of nisin and carvacrol on *Bacilluscereus* and *Listeria monocytogenes*. Letters in Applied Microbiology, 29: 166-170.
- Rayman, M.K., Aris, B. and Hurst, A. (1981). Nisin: a possible alternative or adjunct to nitrite in the preservation of meats, Applied Environmental Microbiology, 41: 375-380.
- 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*. LWT Food Science and Technology,14: 2260-2265.
- Ryser, E.T. and Marth, E.H. (2007). Listeria, Listeriosis and Food Safety. 3th edition, Taylor and Francis, pp. 1-20, 157-214.
- Schwalbe, R., Steele-Moore, L. and Goodwin. A.C. (2007). Antimicrobial susceptibility testing protocols. CRC Press, pp. 275-298.
- Tajkarimi, M.M., Ibrahim, S.A. and Cliver, D.O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. Food Control, 21: 1199-1218.
- Thomas, L.V. and Wimpenny, J.W.T. (1996). Investigation of the effect of combinedvariations in temperature, pH and NaCl concentration on nisin inhibition *of Listeriamonocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. Applied and Environmental Microbiology, 62: 2006-2012.
- Thomas, L.V. and Delves-Broughton, J. (2001). New advances in the application of the food preservative nisin. Research Advances in Food Science, 2:11-22.
- Tiwari, B.K., Valdramidis, V.P., O' Donnell, C.P., Muthukumarappan, K., Bourke, P. and Cullen, P.J. (2009). Application of natural antimicrobial for food preservation. Journal of Agricultural Food Chemistry, 57: 5987-6000.
- Yamazaki, K., Yamamoto, T., kawai, Y. and Inoue, N. (2004). Enhancement of anti Listerial activity of essential oil constitutes by nisin and diglycerol fatty acid ester. Food Microbiology, 21: 283-289.

Antibacterial combined effects of nisin and onion essential oil under different concentration of NaCl and pH against *Listeria monocytogenes* in vitro

Razavi Rohani, S.M.[1,2], Moradi, M.[3*], Mehdizadeh, T.[4]

1- Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.
2- Department of Medicinal and Industrial Plant, Institute of Biotechnology, Urmia University, Urmia, Iran.
3- Department of Food Science and Technology, Ahar Faculty of Agriculture, Tabriz University, Tabriz, Iran.
4- Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.
Corresponding author email: moradi.mehran@yahoo.com
(Received: 2011/11/12 Accepted: 2011/12/20)

Abstract

In the present study, the anti-listeria activity of onion (*Allium cepa* L.*)* essential oil (EO), nisin as well as their combination at various pH values (4.8, 5.8 and 6.8) and different NaCl concentrations (0, 0.5, 2.5 and 4.5%) was investigated against *Listeria monocytogenes* by microtiter plates at 30°C. Minimum inhibitory concentrations (MICs) were assessed for the nisin, onion EO as well as their combination. Subsequently, fractional inhibitory concentration (FIC) was evaluated under different pH and NaCl concentrations. Both nisin and EQ showed significant antimicrobial effects against *L.monocytogenes.* Moreover, the nisin and onion EO exhibited MICs of 12.5 IU mL^{-1} and 125 µg mL^{-1}, respectively. FICs of the nisin and onion EO alone and in combined form, along with various combinations of pH and NaCl concentration, showed clearly anti-listeria effect as synergistic, additional or indifference. Regardless of NaCl concentrations, the anti-listeria activity of both agents was strongly influenced by pH. Moreover, regardless of pH value, the growth of the bacterium was also affected by increasing of NaCl concentrations. It was concluded that, pH value of 4.8 and NaCl concentration of 4.5% had significant anti-listeria effect. In addition, it was found that, the effect of NaCl concentrations for each of the combination forms of treatments at various pH was different.Therefore, there are necessity to design and apply a comprehensive predictive model.

Key words: *L .monocytogenes*, Nisin, Oinion essential oil, Combination