مجله میکرب شناسی پزشکی ایران
سال ۴ شماره ۳، پاییز ۱۳۸۹، صفحات ۵۲-۴۵

فعالیت ضدمیکربی نیسین روی *باسیلوس سرئوس* و *باسیلوس سوبتیلیس* در مدل غذایی و بررسی فوق ریز بینی آنها

محمدرضا پژوهی[۱]، حسین تاجیک*[۱]، امیر عباس فرشید[۲]

۱) گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه
۲) مرکز میکروسکپ الکترونی، دانشگاه ارومیه
نویسنده رابط: حسین تاجیک، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه
تلفن: ۰۴۴۱-۲۷۷۰۵۰۸ H.tajik@urmia.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله:۸۹/۲/۱۵ تاریخ پذیرش مقاله:۸۹/۷/۳۰

چکیده:

زمینه و اهداف: نیسین تنها باکتریوسین مورد تأیید سازمان جهانی بهداشت (WHO)و به‌عنوان محافظت کننده طبیعی مواد غذایی است. نیسین جزء ترکیبات بی‌خطر طبقه‌بندی می‌شود. در این مطالعه تأثیر ضدمیکربی نیسین بر روی *باسیلوس سرئوس* و *باسیلوس سوبتیلیس* در سوپ جو تجارتی در شرایط دمایی مختلف تعیین شد. همچنین مکانیسم اثر نیسین بر روی ساختار باکتری‌های مورد مطالعه با میکروسکپ الکترونی تعیین شد.

روش بررسی: لگاریتم تعداد سلول‌های رویشی *باسیلوس سرئوس* و *باسیلوس سوبتیلیس* تحت تأثیر غلظت‌های ۰/۱۲۵ μg/ml، ۰/۲۵، ۰/۵ نیسین در مدت ۲۱ روز نگهداری سوپ جو تجارتی در دو دمای ۸ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد ارزیابی گردید. آزمایش‌ها سه مرتبه تکرار شد. ساختار سلولی باکتری‌های مورد مطالعه در تماس با زیادترین غلظت نیسین بررسی شد. لگاریتم تعداد باکتری‌ها تحت تأثیر غلظت‌های مختلف نیسین، درجه حرارت و مدت‌زمان نگهداری با آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) ارزیابی شد.

یافته‌ها: نیسین در تمام غلظت‌های استفاده شده در سوپ جو، میزان رشد و بقاء باکتری‌های مورد مطالعه را تحت تأثیر قرار داد. تأثیر دمای ۸ درجه سانتی‌گراد در مهار باکتری‌های مورد مطالعه در مدت نگهداری سوپ جو بیشتر از دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بود($P<۰/۰۵$). تصاویر میکروسکپ الکترونی حاکی از صدمه و آسیب به غشاء سیتوپاسمی باکتری‌های مورد مطالعه بود.

نتیجه‌گیری: نیسین فعالیت ضدمیکربی دارد و با کاهش دما به‌طور معنی‌دار از رشد باکتری‌های پاتوژن غذازاد ممانعت می‌کند.

کلید واژه‌ها: نیسین، *باسیلوس سرئوس*، *باسیلوس سوبتیلیس*، سوپ جو تجارتی، دما

مقدمه:

با توسعه فرآیندهای حفاظت و نگهداری مواد غذایی، به‌افزایش طول عمر نگهداری مواد غذایی توجه روزافزون شده است. اگر چه امروزه شرایط بهداشتی فرآیندهای مواد غذایی بهبود یافته، اما هنوز روش‌های کنترل میکروارگانیسم‌ها در مواد غذایی نتوانسته بیماری‌های منتقله از مواد غذایی را محدود کند (۱). اکثر مصرف کنندگان نسبت به‌خطرات و عوارض ناشی از محافظت کننده‌های شیمیایی و سنتیک به‌طور وسیع آگاه شده‌اند و خواهان جایگزینی آنها با نگهدارنده‌های طبیعی و بی‌خطر هستند. از جمله ترکیبات ضدمیکربی طبیعی که به‌طور وسیعی در صنعت مواد غذایی کاربرد پیدا کرده، نیسین است. نیسین تنها باکتریوسین مورد تأیید سازمان جهانی بهداشت (WHO) است و محافظت کننده طبیعی مواد غذایی می‌باشد. نیسین به‌وسیله سویه‌های خاصی از *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونه *لاکتیس* تولید می‌شود و جزء ترکیبات بی‌خطر (GRAS : Generally Recognized as Safe) نیز طبقه‌بندی می‌گردد (۲و۳). نیسین تحت شرایط سرما و گرما پایدار است و توسط سیستم گوارشی به‌راحتی هضم می‌شود. از این ترکیب در بیش از ۵۰ کشور به‌عنوان افزودنی غذایی استفاده می‌گردد (۴). نشان داده شده که نیسین اکثراً بر طیف وسیعی از باکتری‌های گرم مثبت موثر است، از رشد فرم رویشی اسپور آنها جلوگیری می‌کند و موجب لیز سلول‌های رویشی می‌شود (۵).

*باسیلوس*ها باکتری‌های گرم مثبت، هوازی، میله‌ای اسپورزا با گسترش همه‌جایی می‌باشند. *باسیلوس سرئوس* یک پاتوژن غذازاد است که از شایع‌ترین عوامل مسمومیت غذایی به‌شمار می‌رود. این باکتری انواع مختلفی توکسین تولید می‌کند که در میان آنها دو نوع بکرات با مسمومیت غذایی همراه هستند. یک انتروتوکسین حساس به‌حرارت، مسوول سندرم اسهالی، دیگری توکسین مقاوم به‌حرارت که با سندرم استفراغی همراه است (۶ و ۷). سلول‌های رویشی آن به آسانی به‌وسیله حرارت غیر فعال می‌شوند، اما اسپورهای آن قادر هستند تحت چنین تیمارهایی باقی‌مانده و بعد از تکثیر در ماده غذایی سبب مسمومیت غذایی شوند (۸). *باسیلوس سوبتیلیس* همچون *باسیلوس سرئوس* به‌دلیل اسپورزا بودن تا حدودی دارای مقاومت در برابر فرآیندهای محافظتی مواد غذایی است. این باکتری در صورت رشد و تکثیر در ماده غذایی توکسین مقاوم به‌حرارت تولید می‌کند که علایم مشابه شکل استفراغی *باسیلوس سرئوس* دارد. از جمله علایم مسمومیت با *باسیلوس سوبتیلیس* می‌توان به استفراغ، دردهای شکمی و تهوع ناگهانی اشاره کرد. بیشترین غذاهایی که درگیر و آلوده به گونه‌های *باسیلوس* هستند شامل محصولات گیاهی و سبزیجات، گوشت، ادویه‌ها، آرد غلات، فرآورده‌های برنجی یا غذاهای نشاسته‌ای است(۶).

در چندین مطالعه فعالیت ضدمیکربی نیسین در محیط کشت آزمایشگاهی و روی چندین باکتری پاتوژن غذازاد مورد بررسی قرار گرفته است. در این مطالعات باکتری‌های مورد مطالعه رفتار متفاوتی در برابر غلظت‌های مهاری نیسین از خود نشان دادند که ناشی از تفاوت سویه‌های آنها و همچنین استفاده توأم سایر ترکیبات ممانعت کننده مانند اسیدهای آلی با نیسین بود (۹ و۱۰). به‌منظور اثبات تاثیر محافظت کننده‌های ضدمیکربی طبیعی، این ترکیبات باید به‌تنهایی و یا به‌صورت توأم با سایر عوامل محافظتی مواد غذایی، برای ایجاد اثرات سینرژیستی مورد ارزیابی قرار گیرند (۱۱). در صورت به‌کارگیری مواد نگهدارنده در غلظت‌های پایین‌تر با توجه به‌قیمت زیاد آنها، در یک سیستم ترکیبی (Hurdle Technology) می‌توان هم از صرفه اقتصادی تولید فرآورده غذایی و هم از سلامت و بهداشت آن اطمینان حاصل کرد. در این مطالعه تأثیر نیسین بر روی *باسیلوس سرئوس* و *باسیلوس سوبتیلیس* در سوپ جو تجارتی به‌عنوان یک مدل غذایی، در شرایط دمایی مختلف تعیین گردید. همچنین مکانیسم اثر نیسین بر روی ساختار باکتری‌های مورد مطالعه با میکروسکپ الکترونی تعیین شد.

مواد و روش‌ها:

نیسین:

پودر نیسین حاوی۲/۵ درصد نیسین فعال، از شرکت SIGMA–ALDRICH (United Kingdom, EC

215-807-5) خریداری شد. جهت آماده‌سازی نیسین از اسید کلریدریک ۲ ۰/۰ مول در لیتر (با pH حدود ۱/۶) استفاده گردید. سپس با عبور محلول از میکروفیلتر استرلیزه یکبار مصرف محلول استوک نیسین استریل شد. غلظت‌های نیسین در این مطالعه به‌صورت نیسین فعال بیان می شود(۱۲).

باکتری‌های مورد مطالعه:

باسیلوس سرئوس ATCC 11778 و *باسیلوس سوبتیلیس* ATCC 6633 از گروه میکرب شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه شد. باکتری‌های لیوفیلیزه به محیط مایع (Brain Heart Iinfusion broth) (Merck, KGaA, Darmstadt, Germany) منتقل شد و در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. حداقل دو بار متوالی تجدید کشت گردید. در ادامه سویه‌ها بر روی محیط آگار شیب‌دار (Streak Brain Heart Infusion agar) (Merck, KGaA) کشت شد. برای استفاده در طول آزمایش کشت شیب‌دار در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد(۱۳).

تهیه سوسپانسیون باکتریایی:

برای تهیه و محاسبه میزان غلظت باکتری از روش اسپکتروفتومتری استفاده شد. سوسپانسیون شکل رویشی باکتری‌های مورد مطالعه با کشت آنها در محیط BHI برای حداقل دو بار متوالی به‌مدت ۱۸ ساعت و گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد تهیه گردید. از سوسپانسیون باکتری رقت‌های مختلف تهیه شد و بعد از قرائت جذب نوری آنها با دستگاه اسپکتروفتومتر (Pharmacia LKB-Nova Spacell England) در طول موج ۶۰۰ نانومتر، شمارش باکتریایی به‌روش کشت سطحی (Spread Plate Count) در محیط آگار صورت گرفت. با توجه به‌جذب نوری بدست آمده تعداد باکتری 10^{7} CFU/ml محاسبه گردید.(۱۳) بدین‌ترتیب در هر بار انجام آزمایش سوسپانسیون باکتریایی با جذب نوری محاسبه شده، تهیه و جهت تلقیح در مدل غذایی استفاده گردید.

آماده‌سازی مدل غذایی:

با توجه به‌حضور گسترده گونه‌های مختلف باسیلوس در مواد غذایی خشک، در مطالعه حاضر از سوپ جو تجارتی به‌عنوان مدل غذایی استفاده گردید. سوپ جو با توجه به‌دستورالعمل کارخانه تولید کننده آماده‌سازی شد. استریل‌سازی نمونه‌های سوپ جو در فلاسک‌های قابل اتوکلاو صورت گرفت. در ادامه غلظت‌های µg/ml ۰، ۰/۱۲۵، ۰/۲۵ و ۰/۵ نیسین به هر فلاسک افزوده شد(۱۳).

تلقیح و نگهداری مدل غذایی:

مقادیر مناسب از سوسپانسیون فرم رویشی باکتری‌های مورد مطالعه به‌طور مجزا و تحت شرایط آسپتیک به‌داخل فلاسک‌ها تلقیح شد. به‌نحوی که تعداد نهایی باکتری در هر نمونه 10^{3} CFU/ml بود، که با کشت سطحی تأیید گردید. سپس هر تیمار به‌طور مجزا در دو دمای ۸ درجه سانتی‌گراد (به‌عنوان دمای نامناسب یخچال) و ۲۵ درجه سانتی‌گراد (به‌عنوان دمای محیط)، به‌مدت ۲۱ روز نگهداری شد. نمونه‌های سوپ جو به‌منظور مقایسه زمان رسیدن تعداد باکتری‌های مورد مطالعه از میزان اولیه تلقیح (10^{3} CFU/ml) به 10^{6} CFU/ml و یا کمتر از 10^{1} CFU/ml در روزهای صفر، ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۹، ۱۲، ۱۵، ۱۸ و ۲۱ نگهداری، به‌روش کشت سطحی بر روی محیط BHI آگار مورد ارزیابی قرار گرفتند. تمام آزمایش‌ها سه بار تکرار شد. (۹)

ارزیابی میکروسکپی الکترونیک:

سلول‌های رویشی باکتری‌های مورد مطالعه که در محیط مایع BHI رشد کرده بودند، به‌مدت ۳ ساعت تحت تأثیر بیشترین غلظت نیسین (۰/۵ µg/ml) در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس نمونه‌ها پس از برداشت از محیط کشت به‌وسیله محلول گلوتارآلدهید ۲/۵ درصد به‌مدت ۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد فیکس اولیه شدند. نمونه‌ها با محلول بافر فسفات ۰/۱ مولار (PBS) ۳ بار شستشو داده شد و با کمک سانتریفوژ با دور پایین (۳۰۰۰rpm) به‌مدت ۱۰ دقیقه رسوبات باکتریایی تهیه شد. به‌منظور فیکساسیون ثانویه نمونه‌ها به‌مدت یک ساعت در محلول تتروکساید اوسمیوم (osmium tetroxide) ۰/۱

قرار داده شد. در ادامه نمونه‌ها ۳ بار با محلول بافر فسفات شستشو شد. پس از آبگیری نمونه‌ها در غلظت‌های مختلف الکل و استون، در رزین TAAB embedding قالبگیری شدند. سپس نمونه‌ها در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت حداقل ۴۸ ساعت پلیمریزه شدند. مقاطع با ضخامت ۵۰ نانومتر با دستگاه اولتراتوم مدل LKB 4801A تهیه شد و دو بار با محلول ۲۰ درصد استات اورانیل در متانول خالص و محلول Reynold (سیترات سدیم و نیترات نقره) به‌مدت ۴۵ دقیقه رنگ‌آمیزی شد (۱۴). در نهایت نمونه‌ها توسط میکروسکپ الکترونی ترانسمیشن (PHILIPS BIOTWIN100) در 75KV مشاهده شد و الکترون میکروگراف‌ها تهیه شد.

تجزیه و تحلیل آماری:

به‌منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار SPSS 17.0 تحت ویندوز استفاده شد. لگاریتم تعداد باکتری‌های مورد مطالعه در غلظت‌های مختلف نیسین، درجه حرارت و مدت زمان نگهداری با آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) ارزیابی شد. سطح معنی‌داری برابر P <۰/۵ بود.

یافته‌ها:

نتایج لگاریتم تعداد سلول‌های *باسیلوس سرئوس* و *باسیلوس سوبتیلیس* تحت تأثیر غلظت‌های مختلف نیسین، درجه حرارت و مدت زمان نگهداری در نمونه‌های سوپ جو تجارتی در جدول‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است.

جدول ۱: لگاریتم تعداد سلول‌های رویشی *باسیلوس سرئوس* تحت تأثیر غلظت‌های مختلف نیسین (µg/ml) نگهداری شده در سوپ جو به‌مدت ۲۱ روز در دو دمای ۸ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد

نیسین	دما	روزهای نگهداری											
		۰	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۹	۱۲	۱۵	۱۸	۲۱
۰	۸ °C	۳/۰۸±۰/۰۱	۲/۶۹±۰/۰۰	۲/۱۱±۰/۰۳	۱/۹۵±۰/۵۵	۱/۸۸±۰/۰۳	۱/۶۹±۰/۰۰	۱/۴۱±۰/۱۰	۱/۱۰±۰/۱۷	۰/۷۷±۰/۰۰			
۰/۱۲۵		۳/۰۹±۰/۰۱	۲/۵۶±۰/۰۱	۲/۰۱±۰/۰۶	۱/۸۲±۰/۰۳	۱/۶۹±۰/۰۸	۱/۳۲±۰/۰۴	۱/۱۰±۰/۱۷	۱/۰۰±۰/۰۰	۰/۵۱±۰/۰۰			
۰/۲۵		۳/۰۶±۰/۰۲	۲/۰۲±۰/۰۲	۱/۳۸±۰/۰۸	۱/۲۰±۰/۱۷	۱/۰۰±۰/۰۰	۰/۷۷±۰/۰۰						
۰/۵		۳/۰۵±۰/۰۱	۱/۷۹±۰/۰۸	۱/۲۲±۰/۰۲	۱/۰۰±۰/۰۰	۰/۶۳±۰/۰۰							
۰	۲۵ °C	۳/۰۹±۰/۰۱	۶/۵۳±۰/۰۰										
۰/۱۲۵		۳/۰۷±۰/۰۰	۲/۹۵±۰/۰۰	۳/۱۴±۰/۰۰	۳/۸۵±۰/۰۰	۵/۲۵±۰/۰۰	۶/۵۵±۰/۰۰						
۰/۲۵		۳/۰۵±۰/۰۱	۲/۸۴±۰/۰۰	۳/۰۲±۰/۰۱	۳/۸۰±۰/۰۱	۴/۱۱±۰/۰۰	۵/۲۰±۰/۰۰	۷/۰۷±۰/۰۰					
۰/۵		۳/۰۲±۰/۰۱	۲/۲۴±۰/۰۱	۲/۰۹±۰/۰۲	۲/۸۰±۰/۰۰	۳/۱۱±۰/۰۱	۴/۰۳±۰/۰۰	۵/۳۰±۰/۰۰	۷/۳۹±۰/۰۰				

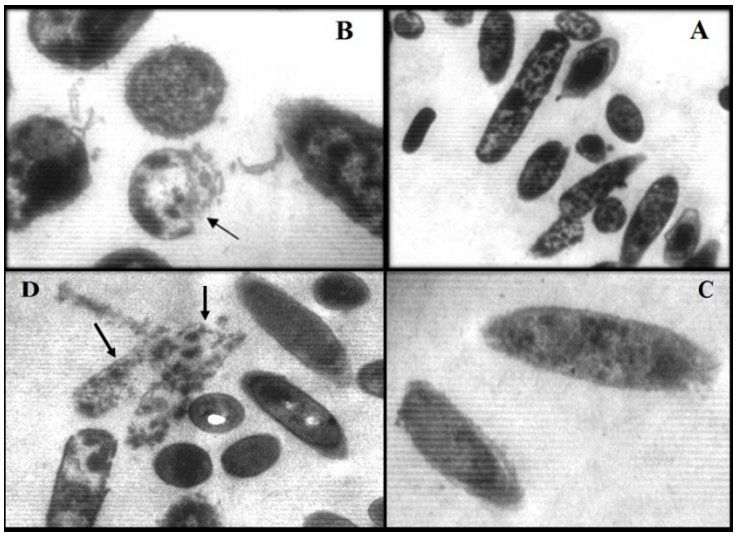
جدول ۲: لگاریتم تعداد سلول‌های رویشی باسیلوس سوبتیلیس تحت تأثیر غلظت‌های مختلف نیسین(µg/ml) نگهداری شده در سوپ جو به‌مدت ۲۱ روز در دو دمای ۸ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد

نیسین	دما	روزهای نگهداری											
		۰	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۹	۱۲	۱۵	۱۸	۲۱
۰	۸ °C	۳/۱۰±۰/۰۰	۳/۱۹±۰/۰۰	۳/۰۰±۰/۰۰	۲/۸۷±۰/۰۰	۲/۰۴±۰/۰۳	۱/۸۰±۰/۰۳	۱/۷۷±۰/۰۷	۱/۰۰±۰/۰۰	۰/۷۱±۰/۰۵			
۰/۱۲۵		۳/۰۹±۰/۰۰	۲/۸۵±۰/۰۰	۲/۶۰±۰/۰۱	۲/۳۰±۰/۰۲	۱/۸۴±۰/۰۶	۱/۲۲±۰/۲۰	۰/۶۳±۰/۰۰					
۰/۲۵		۳/۰۱±۰/۰۲	۲/۸۲±۰/۰۰	۲/۴۹±۰/۰۱	۲/۱۷±۰/۰۲	۱/۱۷±۰/۱۰	۰/۵۱±۰/۰۰						
۰/۵		۳/۰۲±۰/۰۱	۲/۷۵±۰/۰۰	۲/۴۰±۰/۰۰	۲/۰۴±۰/۰۳	۱/۲۲±۰/۲۰	۰/۴۹±۰/۰۰						
۰	۲۵ °C	۳/۰۸±۰/۰۰	۶/۷۶±۰/۰۰										
۰/۱۲۵		۳/۰۲±۰/۰۰	۱/۰۰±۰/۰۰	۰/۶۸±۰/۰۰									
۰/۲۵		۳/۰۴±۰/۰۱	۰/۳۶±۰/۰۰										
۰/۵		۳/۰۳±۰/۰۰	۰/۳۶±۰/۰۰										

نمونه‌های شاهد فاقد نیسین در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، در هر دو باکتری افزایش رشد ثابت داشتند. تأثیر تمام غلظت‌های نیسین تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد داشت (P<۰/۰۵) (جدول‌های۱و۲). کمترین غلظت نیسین (۰/۱۲۵ µg/ml) در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد ، نسبت به‌گروه شاهد، از رشد شکل رویشی *باسیلوس سرئوس* به‌طور معنی‌دار کاست (P<۰/۰۵). نیسین در این دما نتوانست به‌طور کامل رشد *باسیلوس سرئوس* را مهار کند(جدول۱). غلظت‌های نیسین از رشد سلول‌های رویشی *باسیلوس سوبتیلیس* در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نسبت به‌گروه شاهد ممانعت کرد(جدول ۲). در دمای ۸ درجه سانتی‌گراد غلظت‌های ۰/۲۵ µg/ml و ۰/۵ µg/ml نیسین، نسبت به‌گروه شاهد، توانستند به‌طور معنی‌دار از رشد *باسیلوس سرئوس* جلوگیری کنند(جدول ۱). بیشترین غلظت نیسین (۰/۵ µg/ml) در روز ۴ در دمای ۸ درجه سانتی‌گراد به‌طور کامل از رشد *باسیلوس سرئوس* ممانعت کرد (جدول ۱). در دمای ۸ درجه سانتی‌گراد، تمام غلظت‌های نیسین رشد *باسیلوس سوبتیلیس* را مهار نمود (جدول ۲). ممانعت از رشد باکتری با غلظت‌های µg/ml ۰/۲۵ و ۰/۵ µg/ml اختلاف معنی‌دار نشان نداد (P<۰/۰۵) (جدول ۱). در غلظت ۰/۵ µg/ml حساسیت سلول‌های رویشی *باسیلوس سرئوس* نسبت به *باسیلوس سوبتیلیس* در دمای ۸ درجه سانتی‌گراد بیشتر بود. در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نیسین اثر مهاری بیشتری را بر روی *باسیلوس سوبتلیس* نسبت به *باسیلوس سرئوس* نشان داد (جدول‌های۱و۲). کاهش دما توأم با نیسین تأثیر بسزایی در ممانعت از رشد باکتری‌های مورد مطالعه داشت.

ارزیابی فوق ریزبینی:

تصاویر سلول‌های *باسیلوس سرئوس* و *باسیلوس سوبتیلیس* شامل گروه‌های شاهد و تیمار شده (بیشترین غلظت نیسین) در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در تصویر ۱ نشان داده شده است. در گروه شاهد (A و C) ساختار کامل سلول‌ها با دیواره مشخص و سیتوپلاسم یکپارچه نشان داده شده است. نیسین موجب تخریب دیواره سلولی باکتری‌ها و خروج محتویات سلولی آنها شده است (B و D). آسیب سلولی در *باسیلوس سوبتیلیس* بیشتر نمایان بود. به‌نحوی که علاوه بر پارگی دیواره سلولی، سیتوپلاسم سلول‌های رویشی دچار از هم پاشیدگی شده بود (D).



تصویر ۱- الکترون میکروگراف *باسیلوس سرئوس* و *باسیلوس سوبتیلیس*. A- گروه شاهد: سلول *باسیلوس سرئوس* با دیواره سالم و یکنواخت (3400 x)، B- تیمار سلول *باسیلوس سرئوس* با نیسین: تخریب دیواره سلولی و خروج محتویات سلولی (پیکان) (9700 x)، C- گروه شاهد: سلول *باسیلوس سوبتیلیس* با دیواره سلولی کامل و سیتوپلاسم یکپارچه (7400 x)، D- تیمار سلول *باسیلوس سوبتیلیس* با نیسین: تخریب کامل دیواره سلولی *باسیلوس سوبتیلیس* و از هم گسیختگی سیتوپلاسم سلول (پیکان)(7400 x)

بحث:

ترکیبات ضدمیکربی طبیعی به‌طور کاربردی، نقش موثری در کنترل پاتوژن‌های غذایی دارند. بنابراین، برای تأیید اثر آنها باید فعالیت آنها به‌تنهایی و در ترکیب با سایر عوامل محافظتی در محیط‌های غذایی ارزیابی شوند (۱۱و۱۶). مطالعات گسترده حاکی از تأثیر بالقوه بکارگیری نیسین به‌همراه سایر روش‌ها و ترکیبات در محافظت از مواد غذایی است (۱۲، ۱۳و۱۶). با توجه به‌نتایج این مطالعه نیسین در تمام غلظت‌های مورد بررسی بر روی رشد شکل رویشی *باسیلوس سرئوس* و *باسیلوس سوبتیلیس* دارای اثر ممانعت کنندگی بود. اتیبی و همکاران (۲۰۰۰) نشان دادند که غلظت‌های مورد نیاز برای کنترل رشد *باسیلوس سوبتیلیس* و *لیستریا منوسیتوژنز* در صورت بکارگیری توأم نیسین با سایر ترکیبات ضدمیکربی می‌تواند کاهش یابد (۱۷). هدف اولیه و اصلی نیسین در ممانعت از رشد باکتری‌ها، لیپید نوع II غشاء سیتوپلاسمی باکتری‌های گرم مثبت است. از این طریق سبب افزایش نفوذپذیری در غشاء و ایجاد روزنه در آن می‌گردد. در نهایت این مسئله منجر به‌خروج سریع مولکول‌های کوچک و ترکیبات حیاتی داخل سلولی و مرگ سلول می‌شود (۱۸ و ۱۹). در مطالعه پریاگو و موزلار (۲۰۰۱) تأثیر نیسین در محیط مایع BHI همراه با کارواکرول در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد بیشتر از ۸ درجه سانتی‌گراد بود. آنها نشان دادند که نیسین در ۸ درجه تأثیر کمتری روی سلول‌های رویشی *باسیلوس سرئوس* دارد (۲۰). در حالیکه راجکویک و همکاران (۲۰۰۵)، نشان دادند که با کاهش دما اثر ممانعت کنندگی نیسین همراه با کارواکرول بر روی سویه‌های *باسیلوس سرئوس* در محیط کشت افزایش می‌یابد (۲۱). با توجه به‌نتایج مطالعه حاضر در مقایسه با گروه شاهد نیسین در دمای پایین موجب مهار هر دو باکتری شد، اما میزان تأثیر روی *باسیلوس سوبتیلیس* در دمای بالا (۲۵ درجه سانتی‌گراد) به‌مراتب بیشتر بود، که می‌تواند ناشی از تغییرات غشاء باکتری در این دما و حساسیت آن باشد. دما به‌عنوان یکی از عوامل محافظتی در فناوری هاردل می‌تواند رشد میکروارگانیسم‌ها در مواد غذایی را به‌تأخیر بیاندازد. در مطالعات متعدد صورت گرفته کاهش دما تأثیر ممانعت کنندگی نیسین روی باکتری‌های پاتوژن را کاهش داده است. این امر ناشی از کاهش سیالیت غشاء سلولی این باکتری‌ها است (۲۲و۲۳). سولوماکوس و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که فعالیت ضدمیکربی نیسین بر روی *لیستریا منوسیتوژنز* در گوشت چرخ شده گاو وابسته به‌عواملی مانند ترکیبات ممانعت کننده همراه، دمای نگهداری و سویه باکتری بکار گرفته شده است (۲۴). با توجه به‌مطالعات صورت گرفته تأثیر ضدمیکروبی نیسین می‌تواند تحت تأثیر شرایط محیطی مختلف از جمله ارگانیسم های مورد بررسی، دمای نگهداری و مدل غذایی قرار بگیرد.

نتایج بررسی ساختار باکتری تحت تأثیر نیسین با میکروسکپ الکترونی (TEM) مبین آن است که نیسین با آسیب‌رسانی و تخریب غشاء سلولی باکتری‌ها و صدمه به سیتوپلاسم آنها زمینه را برای نابودی باکتری توسط سایر عوامل فراهم می‌کند. به‌دلیل وجود اختلاف در محتوای فسفولیپیدها و ترکیب اسیدهای چرب غشاء سلول باکتری که منجر به‌عدم توانایی نیسین در ایجاد روزنه در غشاهای سخت و محکم می‌شود، میزان اثرگذاری نیسین در سویه‌های مختلف باکتری‌ها متفاوت است (۲۷-۲۵). چنانکه در این مطالعه *باسیلوس سوبتیلیس* نسبت به *باسیلوس سرئوس* بیشترین آسیب را از خود نشان داد.

نتیجه‌گیری:

مطالعه حاضر نشان داد که بکارگیری نیسین در دماهای پایین می‌تواند مانع از رشد سلول‌های رویشی *باسیلوس سوبتیلیس* و *باسیلوس سرئوس* در سوپ جو تجارتی شود. در صورت بکارگیری نیسین به‌عنوان یک ترکیب ضدمیکربی به‌منظور افزایش ماندگاری مواد غذایی، کاهش دما می‌تواند تأثیر آن را افزایش دهد و مدت‌زمان نگهداری ماده غذایی افزایش یابد. اگرچه اجزا تشکیل دهنده ماده غذایی می‌تواند در فعالیت ضدمیکربی نیسین بر روی ارگانیسم‌های بیماریزا تأثیرگذار باشد. با این وجود برای رسیدن به یک سیستم هاردل متشکل از ترکیبات

ضدمیکربی طبیعی نیاز به‌بررسی‌های بیشتری جهت بکارگیری نیسین در مدل‌های غذایی گوناگون بر علیه پاتوژن‌های غذایی می‌باشد.

تقدیر و تشکر:

بدینوسیله از کارشناس محترم آزمایشگاه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، جناب آقای هادی قاسم مهدی به خاطر همکاری‌های بی‌دریغشان در انجام این مطالعه تشکر و قدردانی می‌نماید.

فهرست مراجع:

۱۰.نصر آ، کسری کرمانشاهی ر، نحوی آ. بررسی تأثیر اسیدهای آلی و نایسین در غلظت های کمتر از مهار کننده بر رشد سویه *باسیلوس سرئوس* جدا شده از پنیر. *مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران*. ۱۳۸۶، دوره ۲، شماره ۱، صص ۳۰-۲۱.

1.Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, *et al*. Food-related illness and death in the United States. *Emer Infect Dis* 1999; **5**:607–625.

2.Ray B. Bacteriocins of starter culture bacteria as food biopreservative. In: Ray B, Daeschel M, eds. *Food Biopreservatives of Microbial Origin*, Vol. 8. Florida: CRC Press. 1992; pp. 177-205.

3.Delves-Broughton J, Blackburn P, Evans RJ, Hugenholtz J. Applications of the bacteriocin, nisin. *Ant Van Leeuwen* 1996; **69**: 193-202.

4.Delves-Broughton J, Gasson MJ. Nisin. In: *Natural Antimicrobial Systems and Food Preservation*. Dillon VM , Board RG, eds. Wallingford: Cab International. 1994; pp. 99–131.

5.Harris LJ, Fleming HP, Klaenhammer TR. Developments in nisin research. *Food Res Int* 1992; **25**: 57-66.

6.Jay JM, Loessner MJ, Golden DA. *Bacillus cereus* Gastroenteritis. In: *Modern Food Microbiology*, 7th ed, New York, Springer Science. 2005; pp: 583-590.

7.Granum PE. *Bacillus cereus*. In: Doyle M, Beuchat L , eds . *Food Microbiology: Fundaments and Frontiers*, 3rd ed. Washington, DC: ASM Press, 2,007; pp: 445-456.

8.Choma C, Clavel T, Dominguez H, Razafindramboa N, Soumille H, Nguyen-the C, *et al*. Effect of temperature on growth characteristics of *Bacillus cereus* TZ415. *Int J Food Microbiol* 2000; **55**:73–77.

9.Moosavi MH, Basti AA, Misaghi A, Karim G, Zahraei Salehi T, Mostafavi E. Effect of nisin on the growth of *staphylococcus aureus* in commercial barley soup. *Pharm Sci* 2009; **15**: 235- 240.

11.Lopez-Malo A, Alzamora SM, Argaiz A. Vanillin and pH synergistic effects on mold growth. *J. Food Sci*. 1998; **63**: 143-146.

12.Misaghi A, Akhondzadeh Basti A. Effects of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil and nisin on *Bacillus cereus* ATCC 11778. *Food Control* 2007; **18**(9): 1043-1049.

13.Moosavi MH, Akhondzadeh Basti A, Misaghi A, Zahraei Salehi T, Abbasifar R, Ebrahimzadeh Mousavi HA, *et al*. Effect of Zataria multiflora Boiss. essential oil and nisin on *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in a food model system and on the bacterial cell membranes. *Food Res Int* 2008; **41**: 1050-1057.

14.Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain 556 in electron microscopy. *J Cell Biol* 1963; **17**: 208-212.

15.Beuchat LR, Clavero MRS, Jaquette CB. Effects of nisin and temperature on survival, growth and enterotoxin production characteristics of psychrotrophic *Bacillus cereus* in beef gravy. *Appl Environ Microbiol*, 1997; **63**: 1953-1958.

16.Yamazaki K, Yamamoto T, Kawui Y, Inoue N. Enhancement of antilisterial activity of essential oil constituents by nisin and diglycerol fatty acid ester. *Int J Food Microbiol* 2004; **21**: 283-289.

17.Ettayebi K, Yamani EIJ, Rossi-Hassani BD. Synergistic effects of nisin and thymol

on antimicroibial activities in *listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett* 2000; **183**(1): 191-195.

18.Montville TJ, Chen Y. Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions. *Appl Microbiol and Biotech* 1998; **50**: 511–519.

19.Breukink E, Wiedemann I, van Kraaij C, Kuipers OP, Sahl HG, De Kruijff B. Use of the cell wall precursor lipid II by the pore-forming peptide antibiotic. *Science* 1999; **286**: 2361–2364.

20.Periago PM, Moezelaar R. Combined effect of nisin and carvacrol at different pH and temperature levels on the viability of different strains of *Bacillus cereus*. *Int J Food Microbiol* 2001; **68**: 141–148.

21.Rajkovic A, Uyttendaele M, Courtens T, Debevere J. Antimicrobial effect of nisin and carvacrol and competition between *Bacillus cereus* and *Bacillus circulans* in vacuum-packed potato puree. *Food Microbiol* 2005; 22: 189-197.

22.Abee T, Rombouts FM, Hugenholtz J, Guihard G, Letellier L. Mode of action of Nisin Z against *Listeria monocytogenes* Scott A grown at high and low temperatures. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60: 1962-1968.

23.Thomas LV, Wimpenny JWT. Investigation of the effect of combined variations in temperature, pH, and NaCl concentration on nisin inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol* 1996; **62**: 2006-2012.

24.Solomakos N, Govaris A, Koidis p, Botsoglou N. The antimicrobial effect of thyme essential oil against *Listeria monocytogenes* in minced beef during refrigerated storage. *Food Microbiol* 2008; **25**; 120-127.

25.Abee T. Pore-forming Bacteriocins of Gram-positive bacteria and self-protection mechanisms of producer organisms. *FEMS Microbiology Letters* 1995; **129**: 1-10.

26.Castellano P, Farias ME, Holzapfel W, Vignolo G. Sensitivity variations of Listeria strains to the bacteriocins, lactocin 705, enterocin CRL35 and nisin. *Biotechnol Lett* 2001; **23**: 605-608 **.**

27. Singh B, Falahee MB, Adams MR. Synergistic inhibition of *Listeria monocytogenes* by nisin and garlic extract. *Food Microbiol* 2001; **18**: 133-139.