بررسی اثر تشدیدکنندگی برخی از مواد نگهدارنده بیولوژیکی و شیمیایی در کنترل باسیلوس سرئوس مقاوم در مواد غذایی

آمنه نصر[1]، روحاکسری کرمانشاهی[2] و ایرج نحوی[2]

تاریخ دریافت: ۸۴/۴/۱۰

چکیده

یکی از راههای نگهداری غذا افزودن مواد نگهدارنده[3] به آن است. اما اغلب یک ماده نمی‌تواند یک فراورده را به اندازه کافی محافظت نماید. بنابراین لازم است که سیستم محافظی ایجاد شود که بر محدودیت‌هایی که هر یک از مواد نگهدارنده دارند غلبه کند. با استفاده از مخلوط مواد نگهدارنده در صورت انتخاب صحیح هر یک از اجزاء می‌توان به فواید عملی قابل ملاحظه‌ای رسید. در این تحقیق باکتری باسیلوس سرئوس مقاومی که از پنیر پیتزای حاوی سیترات سدیم به عنوان ماده نگهدارنده، جدا شده بود از نظر میزان حساسیت به مواد نگهدارنده مختلف شیمیایی و طبیعی بررسی شد. سپس میزان MIC[4] و MBC[5] مواد نگهدارنده نسبت به آن تعیین گردید. نتایج آزمایش‌ها نشان داد که این باکتری به غلظت‌های مجاز بنزوات سدیم، اسید سوربیک، سیترات سدیم، سوربات پتاسیم و اسید استیک در غذا مقاوم است. حساسیت سویه باسیلوس سرئوس جدا شده نسبت به سویه استاندارد باسیلوس سرئوس PTCC1015 اختلاف معنی‌دار ندارد. اما به علت مقاومت این باکتری به غلظت‌های مجاز مواد نگهدارنده غذایی و برای کنترل آن در غذا اثر ترکیب مواد نگهدارنده بر آن بررسی شد. این باکتری به علت وجود اثر تشدیدکنندگی بین مواد نگهدارنده با غلظت های چندین بار کمتر از زمانی که به تنهایی استفاده شوند مهار شد. در این مطالعه اسید سیتریک(۰/۱۸۷ درصد) و اسید بنزوئیک(۰/۰۰۶ درصد)، اسید سوربیک(۰/۰۰۱۸ درصد) و اسید پروپیونیک(۰/۱۵۶ درصد)، اسید پروپیونیک(۰/۰۱۹ درصد) و سوربات پتاسیم(۰/۰۱۹ درصد)، بنزوات سدیم(۰/۰۲۶ درصد) و اسید پروپیونیک(۰/۰۱۹ درصد)، اسید سیتریک(۰/۳۷۵ درصد) و سوربات پتاسیم(۰/۶۲۵ درصد)، نیسین(۱۲۵ IU/ml) و اسید پروپیونیک(۰/۱۵۶ درصد) بر روی باکتری باسیلوس سرئوس اثر تشدیدکنندگی[6] نشان دادند.

واژه های کلیدی: باسیلوس سرئوس، مقاومت، مواد نگهدارنده، تشدیدکنندگی، غذا

مقدمه

کنترل میکروارگانیسم‌ها یکی از مهم‌ترین جنبه‌های نگهداری غذا است(۸). حذف ارگانیسم‌های مولد فساد و پاتوژن‌ها از مواد غذایی هدف بسیاری از تحقیقات است. پاتوژن‌های میکروبی در غذاها به طور تخمینی سالانه در ایالات متحده ۶/۵ تا ۳۳ میلیون نفر را بیمار می‌کنند و ۲/۹ تا ۶/۷ بیلیون دلار خسارت وارد می‌نمایند. در این میان ۲۵ تا ۵۵ درصد هزینه‌ها مربوط به بیماری‌های حاصل از باکتری‌های گرم مثبت است(۱۴). از آن جهت که کنترل این باکتری‌ها در غذاها مهم است و نیز به علت اینکه با ایجاد مقاومت در این باکتری‌ها در برابر مواد نگهدارنده از تأثیر آنها در برابر باکتری کاسته می‌شود و سبب انتشار بیماری و به خطر انداختن سلامت جامعه می‌گردد، لذا شناسایی سویه‌های مقاوم و پیشنهاد راه‌هایی جهت کنترل آنها در مواد غذایی ضروری است(۱۲).

مواد نگهدارنده برای محدود کردن رشد و فعالیت میکروارگانیسم‌ها درمحصولات دارویی، آرایشی وغذایی استفاده می‌شوند و با دخالت درغشای سلولی، آنزیم‌ها یا ساختارهای ژنتیکی بر میکروارگانیسم‌ها اثر بازدارندگی دارند. مواد ضد میکروبی که از رشد

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد رشته میکروبیولوژی، دانشگاه اصفهان. پست الکترونیکی am.nasr60@yahoo.com

۲ – اعضاء هیات علمی بخش میکروبیولوژی دانشگاه اصفهان

3- Preservative 4- Minimum Inhibitory Concentration

5- Minimum Bactericidal Concentration 6- Synergism

باکتری‌ها و مخمرها و قارچ‌ها جلوگیری می‌کنند، نگهدارنده‌های شیمیایی و طبیعی می‌باشند. از جمله مواد نگهدارنده شیمیایی می‌توان اسیدهای آلی ضعیف را نام برد(۱۰و۱۱و۱۷). اسیدهای آلی به منظور اسیدی کردن و یا جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌ها یا به طور مستقیم به برخی ازغذاها اضافه می‌شوند و یا با عمل بعضی از ارگانیسم ها مثل لاکتوباسیل‌ها یا باکتری‌های اسید پروپیونیک تولید می‌شوند.

مواد نگهدارنده طبیعی از میکروب، گیاه و حیوان منشأ می‌گیرند. دسته‌ای از پپتیدهای ضدمیکروبی که توسط باکتری‌ها تولید می‌شوند باکتریوسین‌ها هستند مثل نیسین[1]، پدیوسین[2] و کلی‌سین[3] که دارای فعالیت باکتری‌کشی می باشند و به عنوان نگهدارنده در غذاها استفاده می‌شوند. در سال ۱۹۶۹ سازمان غذا و دارو (FDA) و سازمان سلامت جهانی (WHO) هر دو، استفاده از نیسین را به عنوان ماده نگهدارنده غذایی به جای مواد شیمیایی مجاز دانستند و بر آن تأکید کردند. امروزه نیسین به عنوان یک ماده نگهدارنده در بیش از ۵۰ کشور در سراسر دنیا در فراورده‌های متنوعی مثل شیر، پنیر، دسرهای لبنی، غذاهای کنسروشده، گوشت نمک زده، نوشیدنی‌های الکلی و ... استفاده می‌شود(۹).

باکتریوسین‌های باکتری‌های اسید لاکتیک رشد باکتری‌های پاتوژن و مولد فساد را مهار می‌کنند اما طیف کم فعالیت آنها و عدم مهار باکتری‌های گرم منفی و مخمرها و نیز ایجاد جمعیت‌های مقاوم در بین ارگانیسم‌های حساس استفاده از آنها را محدود می‌کند. در نتیجه جهت بهبود فعالیت آنها استراتژی‌های مختلفی پیشنهاد شده است. از جمله می‌توان به استفاده از مواد مهارکننده[4]، تولید پروتئین مهندسی شده برای افزایش حلالیت و پایداری و استفاده از ترکیب مواد نگهدارنده مختلف اشاره کرد(۱۵). علاوه بر این گاهی محافظت مؤثر به خصوص در یک فرمولاسیون پیچیده امکان‌پذیر نیست. لذا اغلب یک ماده نمی‌تواند یک فراورده را به اندازه کافی محافظت نماید. بنابراین لازم است که سیستم محافظی ایجاد شود که مناسب باشد و بر محدودیت‌هایی که هر یک از مواد نگهدارنده دارند غلبه کند. با استفاده از مخلوط مواد نگهدارنده در صورت انتخاب صحیح هر یک از اجزاء بر اساس آگاهی از عمل و رفتار مواد نگهدارنده، می توان به فواید عملی قابل ملاحظه‌ای رسید از جمله:

۱. طیف وسیعی از فعالیت؛

۲. استفاده ازغلظت‌های کمتر هر یک از اجزای مواد نگهدارنده و در نتیجه کاهش احتمال توکسیسیته؛

۳. جلوگیری از بروز مقاومت میکروبی نسبت به هر ماده نگهدارنده؛

۴. افزایش احتمالی فعالیت ضد میکروبی درمجموع ، بیش از آن میزانی که از جمع کردن ساده آنها حاصل می‌شود(۱).

وقتی مخلوط چند ماده نگهدارنده همزمان بر روی جمعیت میکروبی یکنواختی عمل می‌کنند، ممکن است در مقایسه با مجموع اثرات آنها، منجر به پاسخ ضد میکروبی افزایش یافته یا بدون تغییر شوند. مواد شیمیایی که از یک گروه می‌باشند و دارای مکانیسم عمل یکسان هستند. احتمالا فقط اثر جمع شوندگی دارند، در حالی که آنها که مکانیسم عمل متفاوت دارند یا محل اثر آنها متفاوت است ممکن است هر یک اثر دیگری را تقویت کند (اثرتشدیدکنندگی) یا کاهش دهد (اثر ممانعت‌کنندگی).

1. Nisin
2. Pediocin
3. Colicin
4. Chelating agents

تکنولوژی ترکیبی برای نگهداری مواد غذایی، تغییرات ناخواسته در خصوصیات محصول را حداقل می‌کند و غلظت مواد افزودنی و تیمار های حرارتی را کاهش داده و کیفیت محصول و سلامتی آن را حفظ می نماید(۱۸).

باسیلوس سرئوس باکتری میله‌ای گرم مثبت کوتاه، اسپورزا و هوازی است اما به صورت بی‌هوازی هم می‌تواند رشد کند. باسیلوس سرئوس با سنتز دو نوع سم، یکی عامل تهوع و دیگری عامل اسهال موجب بیماری و مسمومیت غذایی می‌شود. بیماری‌های دیگری که توسط باسیلوس سرئوس ایجاد می‌گردد ماستسیت گاوی، مننژیت، آندوکاردیت، عفونت خونی وعفونت‌های چشمی هستند(۳و۴). بنابراین این باکتری جهت بررسی انتخاب گردید.

مواد و روش‌ها

الف- مواد مورد استفاده: پنیر پیتزای شیرآوران، محلول رینگر، سرم فیزیولوژی، نیسین از شرکت زیگما آلدریچ انگلیس، اسید سیتریک، اسید سوربیک، اسید استیک، اسید پروپیونیک، اسید بنزوئیک، سوربات پتاسیم، سیترات سدیم و بنزوات سدیم از شرکت مرک آلمان، محیط کشت تریپتون سوی برات(TSB) از شرکت بیومریوکس فرانسه، محیط کشت‌های نوترینت آگار و مولرهینتون‌آگار[1] از شرکت مرک آلمان و باکتری باسیلوس سرئوس PTCC1015 از کلکسیون میکروبی ایران تهیه شدند.

ب- وسایل مورد استفاده: پلیت میکروتیتر ۹۶ خانه‌ای، دستگاه خواننده الایزا مدل Statfax 2100 ، دستگاه فیلتراسیون، فیلتر ۰/۴۵ میکرومتری، انکوباتور

ج- روش کار: برای جداسازی باکتری‌های مقاوم به مواد نگهدارنده، مواد لبنی که در ترکیب آنها مواد نگهدارنده به کار رفته بود به صورت بسته‌بندی به آزمایشگاه منتقل شدند و ۱۰ گرم از هر یک از نمونه‌ها با ۹۰ میلی‌لیتر محلول رینگر به طور کامل مخلوط گردید و از آنها سری رقت (تا رقت 10^{-4}) تهیه شد. از رقت‌های مختلف از هر یک از نمونه‌ها یک میلی‌لیتر بر روی پلیت‌های نوترینت آگار ریخته و به آرامی با میله شیشه‌ای سرکج در سطح پلیت پخش شد. این کار برای هر نمونه ۲ بار تکرار گردید. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور $37^{o}C$ قرار گرفتند. پس از خالص‌سازی آزمایش های بیوشیمیایی زیر جهت شناسایی باکتری‌های جداسازی شده انجام پذیرفت: رنگ آمیزی گرم، بررسی وجود اسپور، کاتالاز، اکسیداز، حرکت، لسیتیناز، اندول، سیترات، احیای نیترات، رشد بی‌هوازی، رشد در ۱۰ درصد نمک، رشد در ۷ درصد نمک، تست وژپرسکوئر، رشد در pH=۵/۷، رشد در $30^{o}C$ و تخمیر هیدرات های کربن (گلوکز، آرابینوز، گزیلوز، مانیتول، ترهالوز، ساکاروز، سلوبیوز، رافینوز، گالاکتوز) سپس باکتری باسیلوس سرئوس شناسایی شده به علت داشتن قدرت بیماری زایی آن انتخاب و جهت بررسی حساسیت آن نسبت به مواد نگهدارنده مختلف مورد بررسی قرار گرفت(۲و۷).

جهت تهیه محلول ذخیره مواد نگهدارنده مختلف به این صورت عمل شد: مقدار ۱۰۰ میلی گرم از نیسین (نیزاپلین ۲/۵ درصد) در ۱۰ میلی‌لیتر اسیدکلریدریک ۰/۰۲ نرمال حل شد تا غلظت آن به 10^{4} IU/ml برسد ، سپس با استفاده از فیلتر ۰/۴۵ میکرومتری استریل شد و در دمای $-20^{o}C$ فریز شد(۶). جهت تهیه محلول ۱۰ درصد اسیدهای آلی ۱۰ گرم از پودر آنها در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد. سپس با استفاده از فیلتر ۰/۴۵ میکرومتری استریل شده و در دمای $4^{o}C$ نگهداری شد. جهت تهیه رقت‌های مختلف از آب مقطر استریل استفاده شد.

1. Mueller-Hinton Agar

بررسی اثر ضد میکروبی مواد نگهدارنده مختلف به روش چاهک پلیت

به منظور بررسی اثر ضد میکروبی مواد نگهدارنده بر باسیلوس سرئوس جدا شده و مقایسه آن با باکتری باسیلوس سرئوس PTCC1015 از روش چاهک پلیت استفاده شد. به این ترتیب که محیط کشت مولرهینتون‌آگار آماده شده در پلیت به وسیله باکتری که کدورت آن به میزان کدورت نیم مک فارلند ($۱/۵\times۱۰^{۸}$CFU/ml) است به وسیله سواپ استریل به صورت چمنی کشت داده شد. آنگاه در آن چاهک‌هایی به قطر ۶ میلی‌متر ایجاد شد. سپس یک قطره از محیط کشت مولرهینتون‌آگار مذاب که در دمای ۵۰°C است به درون چاهک ریخته تا ته آن ببندد. آنگاه از ماده نگهدارنده استریل به میزان ۱۰۰ میکرولیتر در چاهک ریخته شد و از آب مقطر استریل به عنوان شاهد منفی استفاده شد. پلیت‌ها یک ساعت در دمای ۴°C قرار داده شد تا مواد موجود در چاهک جذب آگار شود. سپس در دمای ۳۷°C به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد و قطر هاله‌های عدم رشد جهت تعیین حساسیت یا مقاومت باکتری به ماده مورد نظر تعیین شد(۵).

تعیین MIC و MBC به روش رقت لوله‌ای

میزان MIC و MBC مواد نگهدارنده مختلف بر روی باکتری باسیلوس سرئوس جدا شده تعیین و با باسیلوس سرئوس PTCC1015 مقایسه شد. برای این کار از روش رقت لوله‌ای به تعداد ۱۰ لوله آزمایش استفاده گردید. یک میلی‌لیتر از ماده نگهدارنده استریل در لوله شماره یک و یک میلی‌لیتر در لوله شماره دو ریخته شد. سپس از محیط کشت TSB استریل به میزان یک میلی‌لیتر در لوله‌های شماره ۲ تا ۱۰ اضافه شد. جهت تهیه سری رقت محتویات لوله ۲ خوب مخلوط شده و یک میلی‌لیتر از آن به لوله شماره ۳ اضافه شد. سپس از لوله ۳ به لوله ۴ و به همین ترتیب تا لوله شماره ۹ ادامه داده شد. به این صورت که از لوله ۹ یک میلی‌لیتر برداشته و دور ریخته شد. از مایه میکروبی که حاوی $۱/۵\times۱۰^{۶}$CFU/ml است به هر لوله یک میلی لیتر اضافه شد. حجم نهایی هر لوله ۲ میلی‌لیتر است. لوله ۱۰ به عنوان کنترل مثبت است و حاوی ۱ میلی‌لیتر محیط کشت و ۱ میلی‌لیتر باکتری است. لوله ۱ به عنوان کنترل منفی است و حاوی ۱ میلی‌لیتر ماده ضد میکروبی و ۱ میلی‌لیتر باکتری می‌باشد. لوله‌ها به مدت ۱۶ تا ۲۰ ساعت در دمای ۳۷°C گرمخانه‌گذاری شد. سپس لوله ها از نظر وجود کدورت بررسی گردید. حداقل غلظتی که در آن غلظت ماده نگهدارنده رشد باکتری را مهار کرده است و لوله شفاف دیده می‌شود مشخص کننده میزان MIC آن ماده است(۴).

تعیین FIC[1] با استفاده از میکروپلیت

برای تعیین نوع برهم‌کنش دو ماده نگهدارنده بر هم میزان غلظت خاص مهاری (FIC) که نشان دهنده کسری از غلظت ماده مهارکننده در حالت ترکیب نسبت به وقتی که به تنهایی استفاده شود، می‌باشد(۱۵)، بر روی باکتری باسیلوس سرئوس جدا شده از مواد غذایی به این ترتیب عمل شد که با استفاده از پلیت میکروتیتر ۹۶ چاهکی غلظت‌های مختلف دو ماده نگهدارنده در مجاورت باکتری قرار داده شدند و رشد باکتری در آن بررسی گردید. به این ترتیب که در یک ردیف ۱۲تایی در چاهک شماره ۱ تا ۱۰ از سری رقت ماده A به میزان ۵۰ میکرولیتر ریخته شد. از ماده B به میزان ۵۰ میکرولیتر با غلظت نصف MIC باکتری مورد نظر به همه چاهک‌ها اضافه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از باکتری مورد نظر ($۱۰^{۳}$CFU/ml) که در محیط کشت استریل TSB رشد کرده و با

1. FIC: Fractional Inhibitory Concentration

سرم فیزیولوژی استریل رقیق شده‌اند به همه چاهک‌ها اضافه شد. چاهک شماره ۱۱ کنترل مثبت است که در آن ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت استریل TSB و ۱۰۰ میکرولیتر باکتری ریخته شد. چاهک شماره ۱۲ کنترل منفی می‌باشد که در آن ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت، ۵۰ میکرولیتر ماده A و ۵۰ میکرولیتر ماده B ریخته شد(۱۵). میکروپلیت‌ها ۲۴-۱۶ ساعت در دمای ۳۷°C گرمخانه‌گذاری شدند. آنگاه جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۶۳۰ نانومتر با استفاده از دستگاه خواننده الایزا مطابق شکل شماره ۱، خوانده و رشد یا عدم رشد در آنها بررسی گردید. پس از خواندن نتایج در دستگاه خواننده الایزا و تعیین میانگین اعداد حاصل در تکرار چاهک‌ها و مقایسه جذب نوری خوانده شده، چاهک‌هایی که در مقایسه با کنترل منفی و مثبت رشدی نشان نمی‌دادند مشخص شد. با توجه به این که ازچاهک شماره ۱ به طرف چاهک شماره ۱۰، غلظت مواد نگهدارنده در هر چاهک نصف چاهک قبلی بود حداقل غلظت مهارکنندگی مواد نگهدارنده نسبت به یکدیگر تعیین گردید. برای تعیین FIC ابتدا میزان $MIC_{(A+B)}$ با اضافه کردن باکتری به سری رقت ماده A به اضافه ماده B با غلظت ثابت (MIC $\frac{}{2}$) در همه چاهک‌ها تعیین شد و سپس میزان $MIC_{(B+A)}$ با اضافه کردن باکتری به سری رقت ماده B به اضافه ماده A با غلظت ثابت (MIC $\frac{}{2}$)تعیین شد و در نهایت با استفاده از فرمول زیر میزان FIC تعیین شد(۱۵).

$$FIC = FIC_A + FIC_B = \frac{MIC_{(A+B)}}{MIC_A} + \frac{MIC_{(B+A)}}{MIC_B}$$

در این فرمول $MIC_{(A+B)}$ حداقل غلظت مهارکنندگی A درحضور B است و $MIC_{(B+A)}$ حداقل غلظت مهارکنندگی B در حضور A است و MIC_A و MIC_B حداقل غلظت مهارکنندگی A و B به تنهایی است. در حقیقت FIC نشان دهنده کسری از غلظت مهارکننده ماده در حالت ترکیب نسبت به وقتی که به تنهایی استفاده شود، می‌باشد. اگر میزان FIC مساوی یا کمتر از ۰/۷۵ باشد دو ماده نگهدارنده بر هم اثر تشدیدکننده دارند. اگر FIC برابر با یک باشد آن دو اثر هم را افزایش می‌دهند. ولی اگر FIC بین ۱ و ۲ باشد، این دو ماده هیچ اثری بر هم ندارند و اگر FIC مساوی یا بزرگ‌تر از ۲ باشد دو ماده بر هم اثر ممانعتی دارند(۱۵).

شکل ۱- دستگاه خواننده الایزا و میکروپلیت در آن جهت تعیین FIC

آنالیز آماری

جهت بررسی معنی‌دار بودن اختلاف بین باکتری ها از نظر حساسیت یا مقاومت از نرم‌افزار

SPSS 13، آزمون Paired-Samples T Test با احتمال خطای ۰/۰۵ درصد استفاده شد.

نتایج و بحث

از آنجا که در ترکیب پنیر استفاده شده جهت جداسازی، سیترات سدیم به کار رفته بود، این سؤال پیش می‌آید که آیا باکتری جدا شده نسبت به سیترات سدیم مقاومت پیدا کرده است که توانسته در حضور آن زنده بماند و یا سیترات سدیم در غلظت استفاده شده در پنیر کارآیی لازم را نداشته است. برای پاسخ به این پرسش اثر مواد نگهدارنده مختلف که در نگهداری مواد لبنی حائز اهمیت هستند در غلظت‌های مجاز بر روی باکتری باسیلوس سرئوس جدا شده بررسی و با باکتری استاندارد مقایسه شد. طبق نتایج حاصل که در شکل شماره ۲، آمده است باکتری باسیلوس سرئوس جدا شده نسبت به غلظت مجاز بنزوات سدیم (۰/۲ درصد)، اسید سوربیک (۰/۳ درصد)، سیترات سدیم (۱ درصد)، سوربات پتاسیم (۰/۳ درصد) و اسید استیک (۰/۱ درصد) مقاوم بود. این نتایج با نتایج Warth در سال ۱۹۸۸ مشابه است که Davidson در مقاله خود به آن اشاره نموده است(۱۱). او علت مقاومت ذاتی بعضی میکروارگانیسم‌ها از جمله باسیلوس را به بنزوات، متابولیزه کردن آن ذکر کرده است. اسید بنزوئیک از طریق مسیر بتاکتوآدیپات تجزیه شده و به اسید سوکسینیک و استیل کوآنزیم A تبدیل می‌شود. مقاومت ذاتی برخی از باکتری‌ها به سوربات نیز ذکر شده است(۱۱). با مقایسه باسیلوس سرئوس جدا شده با باسیلوس سرئوس PTCC1015 در جدول شماره ۱ و۲ با احتمال خطای ۰/۰۵ درصد، تفاوتی که از نظر مقاومت بین دو سویه وجود دارد، معنی‌دار نیست. MIC اسید های آلی برای باسیلوس سرئوس در مورد همه مواد نگهدارنده مورد بررسی به جز اسید بنزوئیک و سوربات پتاسیم در دامنه مجاز این ماده در غذا بود. یعنی با استفاده از غلظت‌های مجاز این مواد می‌توان باکتری باسیلوس سرئوس را مهار نمود. مقایسه MIC اسید سیتریک، اسید بنزوئیک و اسیداستیک با نتایج Hsiao و Siebert در سال ۱۹۹۹ بر روی باسیلوس سرئوس با احتمال خطای ۰/۰۵ درصد نشان داد که سویه باسیلوس سرئوس جدا شده نسبت به اسید سیتریک، اسید بنزوئیک و اسید استیک مشابه سویه مورد بررسی توسط Hsiao و Siebert می‌باشد(۱۳). همچنین مقاومت سویه جدا شده در این پژوهش نسبت به اسید بنزوئیک و اسید سوربیک نیز با احتمال خطای ۰/۰۵ درصد مشابه سویه مورد بررسی توسط Banerjee و Sarkar در سال ۲۰۰۴ می‌باشد(۶). طبق نتایج حاصل می‌توان مواد نگهدارنده به کار رفته برای مهار باکتری باسیلوس سرئوس مورد بررسی را به ترتیب کاهش قدرت عمل محافظت در شرایط آزمایش مرتب کرد: نیسین با غلظت ۱۲/۵ µg/ml، اسیدبنزوئیک با غلظت ۰/۰۵ درصد، اسید پروپیونیک با غلظت ۰/۳ درصد، اسید سیتریک با غلظت ۰/۷۵ درصد، اسید سوربیک با غلظت ۱ درصد، سوربات پتاسیم با غلظت ۲/۵ درصد، بنزوات سدیم با غلظت ۳/۵ درصد، اسید استیک با غلظت ۰/۰۶۲۵ درصد و سیترات سدیم با غلظت ۷ درصد. به علت وجود مقاومت باکتری‌ها نسبت به مواد نگهدارنده مختلف و محدودیت غلظت مجاز این مواد در غذاها ترکیب تیمارها ابزار مناسبی برای کنترل پاتوژن‌های غذایی در محصولات لبنی است(۲۱). همراه کردن نیسین با سایر روش‌های معمول نگهداری غذا فرکانس مقاومت را کاهش می‌دهد. مزیت عمده ترکیب فرایندها غیر فعال کردن میکروارگانیسم‌ها در غذا بدون نیاز به حرارت و بدون تخریب بافت و مزه غذا است. استفاده از ترکیب روش‌های محافظتی توسط Schillinger و همکاران (۱۹۹۸) و Vanschaik و همکاران (۱۹۹۹) پیشنهاد شد (۱۹ و ۲۰). در این تحقیق اکثر مواد نگهدارنده به

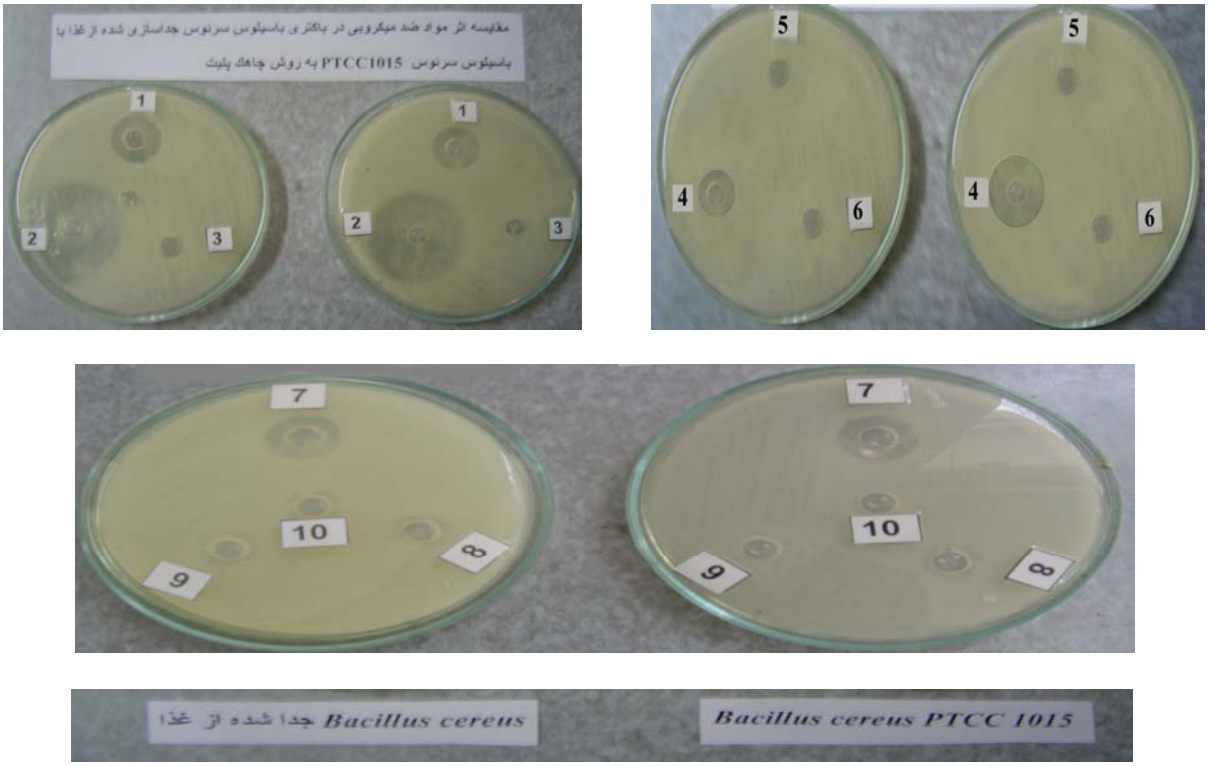
کار رفته برای مهار باسیلوس سرئوس نسبت به هم اثر تشدیدکنندگی نشان دادند. به این معنی که اثر ترکیب این مواد از آنچه از جمع ساده آنها به دست می‌آید بیشتر می‌باشد. نتایج مربوط به بررسی بر همکنش مواد نگهدارنده بر باکتری‌ها در جدول شماره ۳، نشان داده شده است. از آنجا که کاهش pH محیط اثر ضد میکروبی اسیدهای آلی ضعیف را افزایش می دهد وجود اثر تشدیدی بین اسیدهای آلی دور از انتظار نیست(۱۶).

جدول ۱- مقایسه MIC مواد نگهدارنده شیمیایی و طبیعی در محیط TSB بر روی باسیلوس سرئوس جدا شده از پنیر و باسیلوس سرئوس PTCC1015

نام مواد نگهدارنده		MIC بر حسب g/ml	
		باسیلوس سرئوس جدا شده	باسیلوس سرئوس PTCC1015
شیمیایی	اسید سیتریک	۰/۷۵ درصد	۰/۷۵ درصد
	اسید بنزوییک	۰/۰۵ درصد	۰/۰۲۵ درصد
	سیترات سدیم	۷ درصد	۷ درصد
	بنزوات سدیم	۳/۵ درصد	۳/۵ درصد
	اسید سوربیک	۱ درصد	۱ درصد
	سوربات پتاسیم	۲/۵ درصد	۱/۲۵ درصد
	اسید استیک	۰/۰۶۲۵ درصد	۰/۰۶۲۵ درصد
	اسید پروپیونیک	۰/۳۱۲۵ درصد	۰/۳۱۲۵ درصد
طبیعی	نیسین	۵۰۰IU/ml	۱۰۰۰IU/ml

جدول ۲- مقایسه MBC مواد نگهدارنده شیمیایی و طبیعی در محیط کشت TSB بر روی باسیلوس سرئوس جدا شده از پنیر و باسیلوس سرئوس PTCC1015

نام مواد نگهدارنده		MBC بر حسب g/ml	
		باسیلوس سرئوس جدا شده	باسیلوس سرئوس PTCC1015
شیمیایی	اسید سیتریک	۰/۷۵ درصد	۰/۷۵ درصد
	اسید بنزوییک	۰/۰۵ درصد	۰/۰۲۵ درصد
	سیترات سدیم	۷ درصد	۷ درصد
	بنزوات سدیم	۳/۵ درصد	۳/۵ درصد
	اسید سوربیک	۱ درصد	۱ درصد
	سوربات پتاسیم	۲/۵ درصد	۱/۲۵ درصد
	اسید استیک	۵ درصد	۵ درصد
	اسید پروپیونیک	۰/۳۱۲۵ درصد	۰/۳۱۲۵ درصد
طبیعی	نیسین	۵۰۰IU/ml	۱۰۰۰IU/ml



شکل ۲- مقایسه اثر مواد نگهدارنده مختلف در باکتری باسیلوس سرئوس جدا شده با باکتری باسیلوس سرئوس PTCC1015 ،

توضیح علائم : ۱- نیسین IU/ml ۴۰۰۰، ۲- اسید پروپیونیک ۰/۳۸ درصد، ۳- بنزوات سدیم ۰/۲ درصد، ۴- اسید بنزوئیک ۰/۰۵ درصد، ۵- اسید سوربیک ۰/۳ درصد، ۶- سیترات سدیم ۱ درصد، ۷- اسید سیتریک۱ درصد، ۸- سوربات پتاسیم۰/۳ درصد، ۹- اسید استیک۰/۱ درصد، ۱۰- آب مقطر استریل (شاهد).

جدول ۳- بررسی بر هم کنش مواد نگهدارنده مختلف در برابر باکتری باسیلوس سرئوس جدا شده از غذا

ترکیب ۲ ماده نگهدارنده A وB		MIC A	MIC B	MIC A+B	واکنش (میزانFIC)
A	B				
بنزوات سدیم	سوربات پتاسیم	۳/۵ درصد	۲/۵ درصد	۲/۵ درصد+۳/۵ درصد	بدون بر همکنش(۲)
اسید سیتریک	اسید بنزوئیک	۰/۷۵ درصد	۰/۰۵ درصد	۰/۰۰۶ درصد+۰/۱۸۷ درصد	تشدیدکننده (۰/۳۷)
اسید سوربیک	اسید پروپیونیک	۱ درصد	۰/۳۱۲۵ درصد	۰/۱۵۶ درصد+۰/۰۰۱۸ درصد	تشدیدکننده (۰/۵)
اسید پروپیونیک	سوربات پتاسیم	۰/۳۱۲۵ درصد	۲/۵ درصد	۰/۰۱۹ درصد+۰/۰۱۹ درصد	تشدیدکننده (۰/۰۶۷)
بنزوات سدیم	اسید پروپیونیک	۳/۵ درصد	۰/۳۱۲۵ درصد	۰/۰۱۹ درصد+۰/۰۲۶ درصد	تشدیدکننده (۰/۰۶۷)
اسید سیتریک	سوربات پتاسیم	۰/۷۵ درصد	۲/۵ درصد	۰/۶۲۵ درصد+۰/۳۷۵ درصد	تشدیدکننده (۰/۷۵)
نیسین	اسید پروپیونیک	۵۰۰IU/ml	۰/۳۱۲۵ درصد	۰/۱۵۶ درصد+۱۲۵ IU/ml	تشدیدکننده (۰/۷۵)

فهرست منابع

۱. برد، ر. م. و بلوم فیلد، س. ف. ترجمه فضلی بزاز، ص. ۱۳۷۸. تضمین کیفیت در برابر میکروب ها در فراورده‌های آرایشی، بهداشتی و داروهای غیر استریل. انتشارات دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ۱۲۱-۱۰۱، ۱۵۷، ۱۹۸-۱۹۳.

۲. کریم، گ. ۱۳۷۴. آزمون های میکروبی مواد غذایی. انتشارات دانشگاه تهران ۲۱۲-۲۱۰.

۳. مهدی زاده، م. ا. و علیپور، م. م. ۱۳۷۷. آلودگیهای باکتریایی و قارچی مواد غذایی، انتشارات ارکان، اصفهان، ۸۱-۷۸، ۹۳-۹۱.

۴. ناظم، ح. ۱۳۶۵. بررسی اثر ضد میکروبی برگ گیاه بارهنگ و تعیین MIC و MBC برگ گیاهان توت سفید و زبان گنجشک. پایان نامه دکترای داروسازی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ۴۲-۴۱.

۵. نصری، ع. ۱۳۷۴. بررسی اثر ضد میکروبی برخی از گیاهان آبزی بر روی تعدادی از میکروارگانیسم های مضر موجود در تأسیسات فاضلاب‌ها و پساب‌های صنعتی. پایان نامه دکترای داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ۴۴-۴۱.

6. Banerjee, M., and P.K, Sarkar. 2004. Antibiotic resistance and susceptibility to some food preservative measure of spoilage and pathogenic microorganisms from spices. Food Microbiology, 21: 335-342.

7. Barrow, G. I. and R. K. A, Feltham. 1993. Cowan and steel's manual for the identification of medical bacteria. Third edition. Cambridge University Press. England. 51-164.

8. Beales, N. 2004. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 3: 1-18.

9. Broughton, J. D. 1990.Nisin and its uses as a food preservative. Food Technology, 40: 100-112.

10. Brul, S. and P, Coote. 1999. Preservative agents in foods mode of action and microbial resistance mechanisms. International Journal of Food Microbiology, 50: 1-17.

11. Davidson, P. M. and M. A, Hrisson. 2002. Resistance and adaptation to food antimicrobials, sanitizers, and other process controls. Food Technology 56: 69-77.

12. De Martinis, E. C. P., A. D, Crandall., A. S, Mazzotta. and T. J, Montville. 1997. Influence of pH, salt, and temperature on nisin resistance in *Listeria monocytogenes*. Journal of Food Protection, 60: 420-423.

13. Hsiao, C.P. and K. J, Siebert. 1999. Modeling the inhibitory effects of organic acids on bacteria. International Journal of Food Microbiology, 47: 189-201.

14. Morgan, S. M., M. Galvin., J. Kelly., R. P. Ross. and C, Hill. 1999. Development of a lacticin 3147-enriched whey powder with inhibitory activity against foodborne pathogens. Journal of Food Protection, 62: 1011-1016.

15. Mulet-Powell, N., A. M. Lacoste-Armynot., M, Vinas. and M, Simeon De Buovhberg. 1998. Interactions between pairs of bacteriocins from lactic bacteria. Journal of Food Protection, 61: 1210-1212.
16. Periago, P. M. and R, Moezelaar. 2001. Combined effect of nisin and carvacrol at different pH and temperature levels on the viability of different strains of Bacillus cereus. International Journal of Food Microbiology, 68: 141-148.
17. Roberts, A. K. 2002. The effect of sorbic acid on the survival and growth of Escherichia coli O157:H7, Salmonella, Listeria monocytogenes, and Staphylococcus aureus on shredded cheddar and mozzarella cheese. Thesis submitted to the Faculty of Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg.
18. Russell, A. D., W. B, Hugo. and G. A, Ayliffe. 1999. Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization. Third edition. Blackwell Science, USA. 485-523.
19. Schillinger, U., H. S, Chung., K, Keppler. and W. H, Holzapfel. 1998. Use of bacteriocinogenic lactic acid bacteria to inhibit spontaneous nisin-resistant mutants of Listeria monocytogenes ScottA. Journal of Applied Microbiology, 85: 657-663.
20. Vanschaik, W., C. G. M, Gahan. and C, Hill., 1999. Acid adapted Listeria monocytogenes displays enhanced tolerance against the lantibiotics nisin and lacticin 3147. Journal of Food Protection, 62: 536-539.
21. Zapico, P., M, Medina., P, Gaya. and M, Nuñes. 1998. Synergistic effect of nisin and the lactoperoxidase system on Listeria monocytogenes in skim milk. International Journal of Food Microbiology, 40: 35-42.

Study the hurdle effect of some organic and chemical food preservatives on a resistance of *Bacillus cereus* sp.

A. nasr[1*], R. K. Kermanshahi[2], A. Nahvi[2]

Abstract

Food preservatives are often added to food as preservation method. Mostly one preservative alone cannot preserve a product effectively. So it is required to create a preservation system to overcome limitations derived from each preservative. Using proper selection of different preservatives may lead to significant practical benefits. In this investigation, resistant strain of *Bacillus cereus* isolated from pizza cheese containing sodium citrate as a preservative was used to study its sensitivity to different chemical and biological preservatives. The MIC and MBC values of preservatives were measured. Results showed that this bacterium is resistant to permitted concentrations of sodium benzoate, sorbic acid, sodium citrate, potassium sorbate and acetic acid. The sensitivity of this strain was not different from *Bacillus cereus* PTCC1015.

It was realized that citric and benzoic acids (0.187% and 0.006% respectively), sorbic and propionic acids (0.0018% and 0.156% respeetively), propionic acid and potassium sorbate (0.019% and 0.019% respectively), sodium benzoate and propionic acid (0.026% and 0.019% respectively), citric acid and potassium sorbate (0.375% and 0.625% respectively), nisin and propionic acid (125 IU/ml and 0.156% respectively) had synergistic effect on *Bacillus cereus.*

Keywords: *Bacillus cereus*, Resistant, Preservatives, Synergism, Food

* Corresponding author: E-mail: am_nasr60@yahoo.com
1- Former MSc. Student, Dept. Microbiology, University of Isfahan, Isfahan, Iran.
2- Dept. Microbiology, University of Isfahan, Isfahan, Iran.