

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

آمنه نصر^۱، روحاکسری کرمانشاهی^۲ و ایرج نحوی^۲

تاریخ دریافت: ۸۴/۴/۱۰

یکی از راههای نگهداری غذا افزودن مواد نگهدارنده^۳ به آن است. اما اغلب یک ماده نمی‌تواند یک فرآورده را به اندازه کافی محافظت نماید. بنابراین لازم است که سیستم محافظتی 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^۴ و MBC^۵ 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 غلظت‌های 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 (۰/۰۱۸ درصد) و اسید پروپیونیک (۰/۱۵۶ درصد)، اسید پروپیونیک (۰/۱۹ درصد) و سوربات پتاسیم (۰/۱۹ درصد)، بنزوات سدیم (۰/۰۲۶ درصد) و اسید پروپیونیک (۰/۱۹ 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^۶ نشان دادند.

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

مقدمه

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 در محصولات دارویی، آرایشی و غذایی استفاده می‌شوند و با دخالت درغشای سلولی، آنزیم‌ها یا ساختارهای ژنتیکی بر میکروارگانیسم‌ها اثر بازدارندگی دارند. مواد ضد میکروبی که از رشد

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

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

...

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 امکان پذیر نیست. لذا اغلب یک ماده نمی تواند یک فراورده را به اندازه کافی محافظت نماید. بنابراین لازم است که سیستم محافظی ایجاد شود که مناسب باشد و بر محدودیت هایی 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 ملاحظه ای رسید از جمله:

۱. طیف وسیعی از فعالیت؛
 ۲. استفاده از غلظت های 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 در مجموع، بیش از آن میزانی که از جمع کردن ساده آنها حاصل می شود (۱).
- وقتی مخلوط چند ماده نگهدارنده همزمان بر روی جمعیت میکروبی یکنواختی عمل می کنند، 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 می باشند و دارای مکانیسم عمل یکسان هستند. احتمالاً 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 (اثر تشدید کنندگی) یا کاهش دهد (اثر ممانعت کنندگی).

باکتری ها و مخمرها و قارچ ها جلوگیری می کنند، نگهدارنده های شیمیایی و طبیعی می باشند. از جمله مواد نگهدارنده شیمیایی می توان اسیدهای آلی ضعیف را نام برد (۱۰ و ۱۱ و ۱۷). اسیدهای آلی به منظور اسیدی کردن و یا جلوگیری از رشد میکروارگانیسم ها یا به طور مستقیم به برخی از غذاها اضافه می شوند و یا با عمل بعضی از ارگانیسم ها مثل لاکتوباسیل ها یا باکتری های اسید پروپیونیک تولید می شوند.

مواد نگهدارنده طبیعی از میکروب، گیاه و حیوان منشأ می گیرند. دسته ای از پپتیدهای ضد میکروبی که توسط باکتری ها تولید می شوند باکتریوسین ها هستند مثل نسیسین^۱، پدیوسین^۲ و کلی سین^۳ که دارای فعالیت باکتری کشی می باشند و به عنوان نگهدارنده در غذاها استفاده می شوند. در سال ۱۹۶۹ سازمان غذا و دارو (FDA) و سازمان سلامت جهانی (WHO) هر دو، استفاده از نسیسین را به عنوان ماده نگهدارنده غذایی به جای مواد شیمیایی مجاز دانستند و بر آن تأکید کردند. امروزه نسیسین به عنوان یک ماده نگهدارنده در بیش از ۵۰ کشور در سراسر دنیا در فراورده های متنوعی مثل شیر، پنیر، دسرهای لبنی، غذاهای کنسرو شده، گوشت نمک زده، نوشیدنی های الکلی و ... استفاده می شود (۹).

باکتریوسین های باکتری های اسید لاکتیک رشد باکتری های پاتوژن و مولد فساد را مهار می کنند اما طیف کم فعالیت آنها و عدم مهار باکتری های گرم منفی و مخمرها و نیز ایجاد جمعیت های مقاوم در بین ارگانیسم های حساس استفاده از آنها را محدود می کند. در نتیجه جهت بهبود فعالیت آنها استراتژی های مختلفی پیشنهاد شده است. از جمله می توان به استفاده از مواد مهار کننده^۴، تولید پروتئین مهندسی شده برای

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

تکنولوژی ترکیبی برای نگهداری مواد غذایی، تغییرات ناخواسته در خصوصیات محصول را حداقل می کند و غلظت مواد افزودنی و تیمارهای 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 می تواند رشد کند. باسیلوس سرئوس با سنتز دو نوع سم، یکی عامل تهوع و دیگری عامل اسهال موجب بیماری و مسمومیت غذایی می شود. بیماری‌های دیگری که توسط باسیلوس سرئوس ایجاد می گردد ماستسیت گاوی، مننژیت، آندوکاردیت، عفونت خونی و عفونت‌های چشمی هستند (۳ و ۴). بنابراین این باکتری جهت بررسی انتخاب گردید.

مواد و روش‌ها

الف- مواد مورد استفاده: پنبه پیتزای شیرآوران، محلول رینگر، سرم فیزیولوژی، نیسین از شرکت زیگما آلد ریچ انگلیس، اسید سیتریک، اسید سوربیک، اسید استیک، اسید پروپیونیک، اسید بنزوئیک، سوربات پتاسیم، سترات سدیم و بنزوات سدیم از شرکت مرک آلمان، محیط کشت تریپتون سوی برات (TSB) از شرکت بیومریوکس فرانسه، محیط کشت‌های نوترینت آگار و مولر هینتون آگار^۱ 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 الیزا 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 میلی لیتر محلول رینگر به طور کامل مخلوط گردید و از آنها سری رقت (تارقت^۴ ۱۰) تهیه شد. از رقت‌های مختلف از هر یک از نمونه‌ها یک میلی لیتر 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 ۳۷°C قرار گرفتند. پس از خالص سازی آزمایش‌های بیوشیمیایی زیر جهت شناسایی باکتری‌های جداسازی شده انجام پذیرفت: رنگ آمیزی گرم، بررسی وجود اسپور، کاتالاز، اکسیداز، حرکت، لسیتیناز، اندول، سترات، احیای نترات، رشد بی‌هوازی، رشد در ۱۰ درصد نمک، رشد در ۷ درصد نمک، تست وژرپرسکوئر، رشد در pH=۵/۷، رشد در ۳۰°C و تخمیر هیدرات‌های 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 (۲ و ۷).

جهت تهیه محلول ذخیره مواد نگهدارنده مختلف به این صورت عمل شد: مقدار ۱۰۰ میلی گرم از نیسین (نیزاپلین ۲/۵ درصد) در ۱۰ میلی لیتر اسید کلریدریک ۰/۰۲ نرمال حل شد تا غلظت آن به ۱۰^۴ IU/ml برسد، سپس با استفاده از فیلتر ۰/۴۵ میکرومتری استریل شد و در دمای ۲۰°C فریز شد (۶). جهت تهیه محلول ۱۰ درصد اسیدهای آلی ۱۰ گرم از پودر آنها در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد. سپس با استفاده از فیلتر ۰/۴۵ میکرومتری استریل شده و در دمای ۴°C نگهداری شد. جهت تهیه رقت‌های مختلف از آب مقطر استریل استفاده شد.

شده و یک میلی لیتر 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 میلی لیتر برداشته و دور ریخته شد. از مایه میکروبی که حاوی $10^8 \times 1/5$ CFU/ml است به هر لوله یک میلی لیتر اضافه شد. حجم نهایی هر لوله ۲ میلی لیتر است. لوله ۱۰ به عنوان کنترل مثبت است و حاوی ۱ میلی لیتر محیط کشت و ۱ میلی لیتر باکتری است. لوله ۱ به عنوان کنترل منفی است و حاوی ۱ میلی لیتر ماده ضد میکروبی و ۱ میلی لیتر باکتری می باشد. لوله ها به مدت ۱۶ تا ۲۰ ساعت در دمای 37°C گرمخانه گذاری 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 می شود مشخص کننده میزان MIC آن ماده است (۴).

تعیین FIC^۱ با استفاده از میکروپلیت

برای تعیین نوع برهم کنش دو ماده نگهدارنده بر هم میزان غلظت خاص مهاري (FIC) که نشان دهنده کسری از غلظت ماده مهار کننده در حالت ترکیب نسبت به وقتی که به تنهایی استفاده شود، می باشد (۱۵)، بر روی باکتری باسیلوس سرئوس جدا شده از مواد غذایی به این ترتیب عمل شد که با استفاده از پلیت میکروتیتر ۹۶ چاهکی غلظت های مختلف دو ماده نگهدارنده در مجاورت باکتری قرار داده شدند و رشد باکتری در آن بررسی گردید. به این ترتیب که در یک ردیف ۱۲ تایی در چاهک شماره ۱ تا ۱۰ از سری رقت ماده A به میزان ۵۰ میکرو لیتر ریخته شد. از ماده B به میزان ۵۰ میکرو لیتر با غلظت نصف MIC باکتری مورد نظر به همه چاهک ها اضافه شد. سپس ۱۰۰ میکرو لیتر از باکتری مورد نظر (10^8 CFU/ml) که در محیط کشت استریل TSB رشد کرده و با

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 مولر هیتون آگار آماده شده در پلیت به وسیله باکتری که کدورت آن به میزان کدورت نیم مک فارلند ($10^8 \times 1/5$ CFU/ml) است به وسیله سواپ استریل به صورت چمنی کشت داده شد. آنگاه در آن چاهک هایی به قطر ۶ میلی متر ایجاد شد. سپس یک قطره از محیط کشت مولر هیتون آگار مذاب که در دمای 50°C است به درون چاهک ریخته تا ته آن بیند. آنگاه از ماده نگهدارنده استریل به میزان ۱۰۰ میکرو لیتر در چاهک ریخته شد و از آب مقطر استریل به عنوان شاهد منفی استفاده شد. پلیت ها یک ساعت در دمای 4°C قرار داده شد تا مواد موجود در چاهک جذب آگار شود. سپس در دمای 37°C به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شد و قطر هاله های عدم رشد جهت تعیین حساسیت یا مقاومت باکتری به ماده مورد نظر تعیین شد (۵).

تعیین MIC و MBC به روش رقت لوله ای

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 لوله ای به تعداد ۱۰ لوله آزمایش استفاده گردید. یک میلی لیتر از ماده نگهدارنده استریل در لوله شماره یک و یک میلی لیتر در لوله شماره دو ریخته شد. سپس از محیط کشت TSB استریل به میزان یک میلی لیتر در لوله های شماره ۲ تا ۱۰ اضافه شد. جهت تهیه سری رقت محتویات لوله ۲ خوب مخلوط

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 ۱۶-۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C گرمخانه‌گذاری شدند. آنگاه جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۶۳۰ نانومتر با استفاده از دستگاه خواننده الیزا مطابق شکل شماره ۱، خوانده و رشد یا عدم رشد در آنها بررسی گردید. پس از خواندن نتایج در دستگاه خواننده الیزا 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 از چاهک 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 $MIC_{(A+B)}$ 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 $MIC_{(B+A)}$ تعیین شد و در نهایت با استفاده از فرمول زیر میزان FIC تعیین شد (۱۵).

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



شکل ۱- دستگاه خواننده الیزا و میکروپلیت در آن جهت

تعیین FIC

آنالیز آماری

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

در این فرمول $MIC_{(A+B)}$ حداقل غلظت مهارکنندگی A در حضور 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).

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 سورییک 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 $\mu\text{g/ml}$ ، اسید بنزوئیک با غلظت ۰/۰۵ درصد، اسید پروپیونیک با غلظت ۰/۳ درصد، اسید سیتریک با غلظت ۰/۷۵ درصد، اسید سورییک 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 سترات 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

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، سترات سدیم به کار رفته بود، این سؤال پیش می‌آید که آیا باکتری جدا شده نسبت به سترات سدیم مقاومت پیدا کرده است که توانسته در حضور آن زنده بماند و یا سترات 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 سورییک (۰/۳ درصد)، سترات 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 بتاکتوآدیبات 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 و ۲ با احتمال خطای ۰/۰۵ درصد، تفاوتی که از نظر مقاومت بین دو سویه وجود دارد، معنی‌دار نیست. MIC اسیدهای آلی برای باسیلوس سرئوس در مورد همه مواد نگهدارنده مورد بررسی به جز اسید بنزوئیک و سوربات پتاسیم در دامنه مجاز این

شده است. از آنجا که کاهش pH محیط اثر ضد میکروبی اسیدهای آلی ضعیف را افزایش می دهد وجود اثر تشدیدي بين اسیدهای آلی دور از انتظار نیست (۱۶).

کار رفته برای مهار باسیلوس سرئوس نسبت به هم اثر تشدید کنندگی نشان دادند. به این معنی که اثر ترکیب این مواد از آنچه از جمع ساده آنها به دست می آید بیشتر می باشد. نتایج مربوط به بررسی بر همکنش مواد نگهدارنده بر باکتری ها در جدول شماره ۳، نشان داده

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

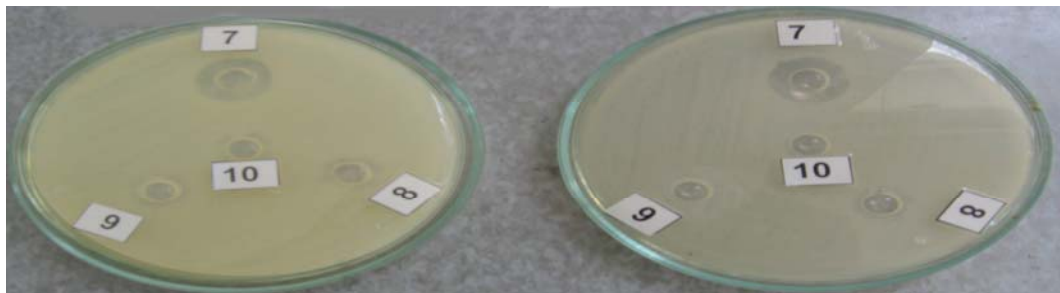
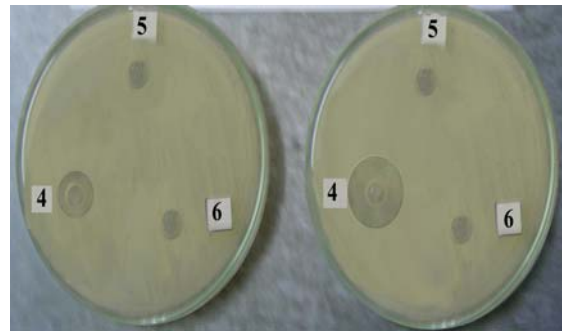
سرئوس PTCC1015

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

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

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



شکل ۲- مقایسه اثر مواد نگهدارنده مختلف در باکتری باسیلوس سرئوس جدا شده با باکتری باسیلوس سرئوس PTCC1015، توضیح علائم: ۱- نیسین ۴۰۰۰ IU/ml، 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 سیتریک ۱ درصد، ۸- سوربات پتاسیم ۰/۳ درصد، ۹- اسید استیک ۰/۱ درصد، ۱۰- آب مقطر استریل (شاهد).

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

واکنش (میزان FIC)	MIC _{A+B}	MIC _B	MIC _A	ترکیب ۲ ماده نگهدارنده A و B	
				B	A
بدون بر همکنش (۲)	۲/۵ درصد+۳/۵ درصد	۲/۵ درصد	۳/۵ درصد	سوربات پتاسیم	بنزوات سدیم
تشدیدکننده (۰/۳۷)	۰/۰۰۶ درصد+۰/۱۸۷ درصد	۰/۰۵ درصد	۰/۷۵ درصد	اسید بنزوئیک	اسید سیتریک
تشدیدکننده (۰/۵)	۰/۱۵۶ درصد+۰/۰۱۸ درصد	۰/۳۱۲۵ درصد	۱ درصد	اسید پروپیونیک	اسید سوربیک
تشدیدکننده (۰/۰۶۷)	۰/۰۱۹ درصد+۰/۰۱۹ درصد	۲/۵ درصد	۰/۳۱۲۵ درصد	سوربات پتاسیم	اسید پروپیونیک
تشدیدکننده (۰/۰۶۷)	۰/۰۱۹ درصد+۰/۰۲۶ درصد	۰/۳۱۲۵ درصد	۳/۵ درصد	اسید پروپیونیک	بنزوات سدیم
تشدیدکننده (۰/۷۵)	۰/۶۲۵ درصد+۰/۳۷۵ درصد	۲/۵ درصد	۰/۷۵ درصد	سوربات پتاسیم	اسید سیتریک
تشدیدکننده (۰/۷۵)	۰/۱۵۶ درصد+۱۲۵ IU/ml	۰/۳۱۲۵ درصد	۵۰۰ IU/ml	اسید پروپیونیک	نیسین

فهرست منابع

- . برد، ر. م. و بلوم فیلد، س. ف. ترجمه فضل‌ی بزاز، ص. ۱۳۷۸. تضمین کیفیت در برابر میکروب‌ها در فرآورده‌های آرایشی، بهداشتی و داروهای غیر استریل. انتشارات دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ۱۲۱-۱۰۱، ۱۵۷، ۱۹۸-۱۹۳.
- . کریم، گ. ۱۳۷۴. آزمون‌های میکروبی مواد غذایی. انتشارات دانشگاه تهران ۲۱۲-۲۱۰.
- . مهدی زاده، م. ا. و علیپور، م. م. ۱۳۷۷. آلودگی‌های باکتریایی و قارچی مواد غذایی، انتشارات ارکان، اصفهان، ۸۱-۹۱-۹۳، ۷۸.
- . 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.
- . نصری، ع. ۱۳۷۴. بررسی اثر ضد میکروبی برخی از گیاهان آبی بر روی تعدادی از میکروارگانیسم‌های 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, Holzappel. 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 lactacin 3147. *Journal of Food Protection*, 62: 536-539.
 21. Zapico, P., M, Medina., P, Gaya. and M, Nuñez. 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. Kermanshahi², A. Nahvi²

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% respectively), 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.