View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk

brought to you by CORE

provided by kashan university of medical sciences

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 12:30 +0430 on Tuesday July 25th 2017

*Original Article*

# Antibacterial activity of acetic and lactic acid against *Listeria monocytogenes* and their effect on the intracellular constituent release

**Shiravani Z*, Aliakbarlu J, Tajik H**

Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, I. R. Iran.

Received August 8, 2016; Accepted December 21, 2016

## Abstract:

**Background:** Organic acids (e.g. acetic and lactic acid) have been used in foods as natural preservatives. Acetic acid and its salts are used in foods as antimicrobial and acidulant agents. The aim of this study was to evaluate the antibacterial activity of acetic and lactic acids against the *Listeria monocytogenes*.

**Materials and Methods:** This experimental study was conducted at the Department of Food Hygiene (Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University) during autumn 2015. The antibacterial effects of acetic and lactic acid against *Listeria monocytogenes* were determined using minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC) and cell constituents release methods. The concentration ranges of acetic and lactic acid (0.0195-10 and 0.043-22.2 µl/ml, respectively) were used to determine the MIC of acids.

**Results:** Based on the results, acetic and lactic acid inhibited the growth of *Listeria monocytogenes* and acetic acid had stronger effect against the the bacterium. The MIC values for acetic acid and lactic acid were 2.5 and 5 µl/ml, respectively. Cell constituents release showed that acetic and lactic acids are able to lyze the bacterial cell.

**Conclusion:** Acetic and lactic acids were effective in inhibiting the growth of *Listeria monocytogenes* and the antibacterial effect of acetic acid was stronger than that lactic acid. These acids can be used in foods in combination with other preservatives to inhibit the food borne pathogens and food spoilage microorganisms.

**Keywords:** Acetic acid, Lactic acid, Antibacterial, *Listeria monocytogenes*

* **Corresponding Author.**
**Email:** z.shiravani682@yahoo.com
**Tel:** 0098 443 277 0508
**Fax:** 0098 443 277 1926

Conflict of Interests: ***No***

***Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, June, 2017; Vol. 21, No 2, Pages 162-169***

***Please cite this article as:*** Shiravani Z, Aliakbarlu J, Tajik H. Antibacterial activity of acetic and lactic acid against *Listeria monocytogenes* and their effect on the intracellular constituent release. ***Feyz*** 2017; 21(2): 162-9.

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 12:30 +0430 on Tuesday July 25th 2017

# بررسی فعالیت ضدباکتریایی اسید استیک و اسید لاکتیک علیه *لیستریا مونوسیتوژنز* و اثر آنها بر رهایش ترکیبات داخل سلولی

زلیخا شیروانی [۱*]، جواد علی‌اکبرلو [۲]، حسین تاجیک [۳]

**خلاصه:**

**سابقه و هدف:** اسیدهای آلی از جمله اسید استیک و اسید لاکتیک در مواد غذایی به‌عنوان نگهدارنده‌های طبیعی به‌کار می‌روند. هم‌چنین، اسید استیک و نمک‌های آن در مواد غذایی به‌عنوان عوامل ضدمیکروبی و اسیدی‌کننده به‌کار گرفته می‌شوند. هدف این مطالعه بررسی فعالیت ضدباکتریایی اسید استیک و اسید لاکتیک علیه باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی اثرات ضدباکتریایی اسید استیک و اسیدلاکتیک بر *لیستریا مونوسیتوژنز* با استفاده از روش‌های حداقل غلظت مهارکنندگی، حداقل غلظت کشندگی و رهایش ترکیبات داخل سلولی تعیین شد. برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی اسید استیک و اسید لاکتیک به‌ترتیب محدوده ۱۰- ۰/۰۱۹۵ و ۲۲/۲ – ۰/۰۴۳ میکرولیتر بر میلی‌لیتر استفاده شد.

**نتایج:** اسید استیک و اسید لاکتیک رشد *لیستریامونوسیتوژنز* را مهار کرده و اسید استیک اثر مهاری قوی‌تری بر باکتری داشت. مقدار حداقل غلظت مهارکنندگی اسید استیک و اسید لاکتیک به‌ترتیب ۲/۵ و ۵ میکرولیتر بر میلی‌لیتر بود و روش رهایش ترکیبات داخل سلولی نشان داد که اسید استیک و اسید لاکتیک توانایی لیز سلولی را دارند.

**نتیجه‌گیری:** اسید استیک و اسید لاکتیک در ممانعت از رشد *لیستریا مونوسیتوژنز* موثر بوده و اسید استیک اثر ضد-باکتریایی قوی‌تری نسبت به اسید لاکتیک دارد. می‌توان از اسید استیک و اسید لاکتیک در مواد غذایی در ترکیب با سایر نگهدارنده‌ها جهت مهار میکروارگانیسم‌های عامل بیماری و فساد بهره جست.

**واژگان کلیدی:** اسید استیک، اسید لاکتیک، فعالیت ضدباکتریایی، *لیستریا مونوسیتوژنز*

دو ماه‌نامه علمی– پژوهشی فیض، دوره بیست و یکم، شماره ۲، خرداد و تیر ۱۳۹۶، صفحات ۱۶۹-۱۶۲

## مقدمه

*لیستریا مونوسیتوژنز* به‌عنوان یک پاتوژن ناشی از مواد غذایی به‌خوبی شناخته شده است و باعث ایجاد لیستریوزیس، یک بیماری با مرگ‌ومیر بالا، می‌شود. تحمل شرایط اسیدی و درجه حرارت پایین این باکتری، در مورد مواد غذایی با حداقل فرآوری که در شرایط یخچالی نگهداری می‌شوند موجب نگرانی شده است.

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

[۲] دانشیار، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

[۳] استاد، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

* **نشانی نویسنده مسئول:**
گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

**تلفن:** ۰۴۴۳۲۷۷۰۵۰۸ **دورنویس:** ۰۴۴۳۲۷۷۱۹۲۶

**پست الکترونیک:** z.shiravani682@yahoo.com

**تاریخ دریافت:** ۹۵/۵/۱۸ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۹۵/۱۰/۱

شیوع بیماری لیستریوزیس در مواد غذایی مانند سالاد کلم [۱]، شیر [۲]، پنیر نرم [۴،۳]، سوپ گوشت زبان خوک [۵] و پنیر بری [۶] بالا است. هم‌چنین، شیوع زیاد *لیستریامونوسیتوژنز* باعث نگرانی‌های زیادی در صنعت مواد غذایی شده است [۷] و در این میان می‌توان به گزارش چندین شیوع لیستریوزیس ناشی از عفونت مواد غذایی در آفریقای جنوبی اشاره نمود [۸]. در این راستا، کنترل پاتوژن‌ها تبدیل به یک نگرانی عمده برای مواد غذایی آماده به خوردن (Ready to eat; RTE) به‌ویژه محصولات با ماندگاری بالا شده است [۹،۸]. در سال‌های اخیر مقاومت ضدمیکروبی مشکل جدی بهداشت عمومی شده است که می‌توان آن را به استفاده بیش از حد از آنتی‌بیوتیک‌ها و انتقال مقاومت در داخل و بین میکروارگانیسم‌ها نسبت داد [۱۴،۸–۱۰]. طی یک دهه گذشته باتوجه به ایجاد شدن سویه‌های مقاوم، آنتی‌بیوتیک‌ها اثرات سریع خود را از دست داده‌اند [۱۵]. بنابراین، برای کشف آنتی‌بیوتیک‌های طبیعی و کارآمد تلاش می‌شود. برای مدت طولانی است که اسیدهای آلی به‌عنوان عوامل ضدمیکروبی طبیعی و سنتی، افزودنی‌های مواد غذایی و مواد نگهدارنده و به‌منظور جلوگیری از فساد مواد غذایی، افزایش ماندگاری مواد غذایی، و حتی برای کنترل آلودگی میکروبی و انتشار پاتوژن‌های ناشی از مواد غذایی

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 12:30 +0430 on Tuesday July 25th 2017

در طول تولید استفاده می‌شوند [۱۶۸-۱۸]. اگرچه مکانیسم ضدباکتری اسیدهای آلی به‌طور کامل مشخص نشده است، اما می‌دانیم که فعالیت ضدباکتری آنها بسته به وضعیت فیزیولوژیک ارگانیسم و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی محیط خارجی متفاوت است [۱۷]. نشان داده شده است که اسیدهای آلی پتانسیل بیشتری برای غیرفعال کردن باکتری‌ها نسبت به اسیدهای غیرآلی دارند که عمدتا به‌دلیل فرم تفکیک نشده اسید است که به‌راحتی می‌توانند از طریق عبور از غشا سلول‌های آب-گریز، رهایش $H^+$ در سیتوپلاسم و با وارد نمودن آسیب به پروتئین‌ها و دیگر ترکیبات داخل سلولی باکتریایی، اثر ضدباکتریایی خود را بر-جای بگذارند [۱۹]. اسید استیک نسبت به سایر اسیدهای خوراکی مانند اسید سیتریک، اسید مالیک، اسید تارتاریک و اسید لاکتیک دارای $PK_a$ بالاتری می‌باشد و فعالیت ضدباکتریایی بیشتری دارد [۲۰]. In و همکاران در سال ۲۰۱۳ فعالیت ضدباکتریایی اسید استیک، اسید سیتریک و اسید لاکتیک را بر علیه چهار گونه *شیگلا دیسانتری*، *شیگلا فلکسنری*، *شیگلا بوئیدی* و *شیگلا سونئی* تعیین کردند؛ حداقل غلظت مهارکنندگی اسید استیک و اسید سیتریک در برابر آنها به‌ترتیب ۲۰۰ و ۳۰۰ ppm بود، اما برای شیگلا سونئی ppm ۴۰۰ گزارش کردند، اسید لاکتیک ۰/۵ درصد نیز رشد تمام گونه-های شیگلا را مهار کرد [۲۱]. در تحقیق دیگر Fraise و همکاران نشان دادند که اسید استیک در حداقل غلظت مهارکنندگی خود (۰/۱۶۶ درصد) فعالیت ضدباکتریایی خوبی علیه *سودوموناس آئروژینوزا* دارد [۲۲]. در مطالعه حاضر نیز ارزیابی فعالیت ضد-باکتریایی اسید استیک و اسید لاکتیک روی باکتری پاتوژن *لیستریا مونوسیتوژنز* مورد بررسی قرار گرفته است.

## مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی که در پاییز سال۱۳۹۴ در دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه انجام شد، اسید استیک ۱۰۰ درصد و اسید لاکتیک ۹۰ درصد از شرکت مواد شیمیایی مرک (Darmstadt, Germany)، محیط‌های کشت میکروبی Brain Heart Infusion Agar; BHIA و Brain Heart Infusion Broth; BHIB از شرکت بیولایف (Milano, Italia) خریداری شدند. باکتری مورد مطالعه، *لیستریا مونوسیتوژنز* (ATCC 1163)، از کلکسیون میکروبی گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه تهیه شد. داده‌ها با نرم‌افزار اکسل تجزیه و تحلیل شدند.

### تنظیم باکتری

ابتدا یک گرانول باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* از لوله‌های کرایو مورد نظر در شرایط سترون خارج شده و به ۱۰ میلی‌لیتر محیط BHI براث منتقل شد و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری شد. باکتری قبل از استفاده به‌طور متوالی دو بار تجدید کشت گردید؛ برای این منظور، ۵-۴ کلونی باکتری از BHI آگار به ۱۰ میلی‌لیتر BHI براث منتقل شد و در ۳۷ درجه سلسیوس به‌مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. کشت دوم با انتقال ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری به ۱۰ میلی‌لیتر BHI براث تهیه شده و در ۳۷ درجه سلسیوس به‌مدت ۲۰ ساعت نگهداری گردید. سپس، از کشت ۲۰ ساعته رقت لازم تهیه شده و تعداد باکتری روی استاندارد ۰/۵ مک فارلند معادل cfu/ml $۰/۳۲\times۱۰^۸$ تنظیم گردید و با رقیق سازی به $۱۰^۶$ در محیط کشت BHI براث تهیه گردید. تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) به روش رقیق سازی در میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای انجام شد؛ برای این روش از میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای با چاهک ته گرد و با حجم ۳۰۰ میکرولیتر که دارای ۱۲ ستون و ۸ ردیف می‌باشند استفاده شد. ابتدا اسید استیک و اسید لاکتیک در آب مقطر استریل حل شدند و توسط صافی میکروبیولوژیک ۰/۲۲ میکرومتر استریل شدند. دامنه غلظتی اسید استیک µl/mL ۰/۰۳۹- ۱۰ و برای اسید لاکتیک µl/mL ۰/۱۵۶- ۲۰ بود. در هر چاهک میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای، ۹۵µl محیط کشت BHI براث و ۵µl باکتری ریخته شد و ۱۰۰µl از محلول استوک اسید استیک و اسید لاکتیک به اولین چاهک افزوده شد، سپس ۱۰۰µl از رقت‌های سریالی در ۷ چاهک پی‌درپی انتقال یافت. آخرین ستون به‌وسیله µl ۱۹۵ از BHI براث و ۵µl از باکتری پر شد و به‌عنوان شاهد منفی درنظر گرفته شد. از اریترومایسین به‌عنوان شاهد مثبت استفاده شد. حجم نهایی در هر چاهک ۲۰۰µl بود. سپس، میکروپلیت به‌وسیله پارافیلم پوشانده شد. به‌منظور مخلوط شدن تمام محلول‌های درون چاهک‌ها از میکروپلیت شیکر (BOECO, Germany) با سرعت ۳۰۰rpm برای ۲۰ ثانیه استفاده گردید و سپس در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به‌مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. بعد از اتمام گرمخانه‌گذاری، کدورت یا عدم کدورت در چاهک‌ها به‌صورت چشمی مشاهده شد. اولین چاهک شفاف به‌عنوان MIC درنظر گرفته شد. برای تست MBC از چاهک‌هایی

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 12:30 +0430 on Tuesday July 25th 2017

که شفاف بودند و نشان‌دهنده عدم رشد باکتری بودند، به‌مقدار ۵ میکرولیتر برداشته شد و روی BHI آگار کشت سطحی داده شد [۲۳].

رهایش ترکیبات داخل سلولی (Cell constituents release)

در این روش ابتدا OD کشت ۲۰-۱۸ ساعته باکتری با اسپکتروفتومتر (Novaspect) ساخت انگلیس در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده شد و سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه با دور ۵۰۰۰ rpm در سه مرحله سانتریفیوژ انجام شده و هر مرحله با PBS ۰/۱ مولار (pH= ۰/۷) شستشو داده و سپس غلظت MIC ترکیبات را اضافه نموده و در شیکر انکوباتور به‌مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده، و مجددا به‌مدت ۲ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ g سانتریفیوژ کرده و در نهایت جذب نوری ۲ ml مایع رویی توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۶۰ نانومتر خوانده شد. این آزمایش به‌طور همزمان برای PBS ۰/۱ مولار (pH=۰/۷) به‌همراه مواد ضدمیکروبی در غلظت MIC آنها بدون باکتری صورت گرفت و از حالت حاوی باکتری تفریق داده شد. هم‌چنین، از PBS ۰/۱ مولار (pH=۰/۷) به‌عنوان شاهد استفاده شد [۲۴].

اندازه‌گیری pH

برای اندازه‌گیری pH از pH متر متهوم ساخت سویس استفاده شد و با وارد کردن الکترود pH متر در غلظت MIC ترکیبات ضدمیکروبی، pH آنها اندازه‌گیری شد [۲۵].

## نتایج

بررسی MIC و MBC مواد ضدباکتریایی نشان داد که اسید استیک با داشتن MIC برابر با ۲/۵ میکرولیتر بر میلی‌لیتر اثر ضدباکتریایی قوی‌تری نسبت به اسید لاکتیک دارد (جدول شماره ۱). رهایش ترکیبات سلولی توسط جذب UV در ۲۶۰ nm اندازه گیری شد و جدول شماره ۲ نتایج زمانی که باکتری با اسید استیک و اسید لاکتیک به‌مدت ۱ ساعت تحت تاثیر قرار گرفتند، را نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که پس از اضافه کردن اسید استیک و اسید لاکتیک رهایش و خروج ترکیبات داخل سلولی به‌طور مشخصی نسبت به گروه شاهد افزایش می‌یابد که نشان دهنده وارد شدن آسیب غیرقابل برگشت به غشای سیتوپلاسمی باکتری می‌باشد. به‌علاوه، نتایج نشان می‌دهند که اسید استیک روی باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* موثرتر بوده و موجب لیز سلولی و خروج بیشتر ترکیبات داخل سلولی آن شده است. در جدول شماره ۳ مقادیر pH مواد ضدباکتریایی آورده شده است و بر اساس نتایج، pH اسید لاکتیک (pH=۲/۳۵) در غلظت MIC خود نسبت به اسید استیک پایین‌تر می‌باشد.

جدول شماره ۱- نتایج MIC و MBC اسید استیک و اسید لاکتیک بر *لیستریا مونوسیتوژنز*

| ترکیب استفاده شده | MIC(µl/mL) | MBC(µl/mL) |
|---|---|---|
| اسید استیک | ۲/۵ | ۵ |
| اسید لاکتیک | ۵ | ۵ |
| اریترومایسین µg/mL | ۸ | - |

MIC حداقل غلظت مهار کنندگی اسیدهای آلی علیه باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* را نشان می‌دهد.
MBC حداقل غلظت کشندگی اسیدهای آلی علیه باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* را نشان می‌دهد.

جدول شماره ۲- نتایج رهایش ترکیبات داخل سلولی (Cell constituents release) *لیستریا مونوسیتوژنز* در OD= 260 nm

| تیمار | OD=260 nm ترکیبات حاوی باکتری | OD=260 nm ترکیبات بدون باکتری | تفاوت |
|---|---|---|---|
| شاهد | $^{c}$۰/۱۱۰±۰/۰۰۰ | - | - |
| اسید استیک | $^{b}$۰/۱۹۰±۰/ ۰۰۱ | ۰/۱۳۲±۰/۰۰ | ۰/۰۵۸ |
| اسید لاکتیک | $^{a}$۰/۱۵۷±۰/۰۰۲ | ۰/۱۲۶±۰/۰۰ | ۰/۰۳۱ |

OD سنجش میزان جذب نوری نمونه توسط دستگاه اسپکتروفتومتری را بیان می‌نماید.
حروف کوچک متفاوت (a,b,c) در هر ردیف بیانگر تفاوت آماری معنی‌دار ($P$<۰/۰۵) می‌باشد.

جدول شماره ۳- pH اسید استیک و اسید لاکتیک در غلظت MIC

| تیمار | غلظت | pH |
|---|---|---|
| اسید استیک | MIC | ۲/۸۲ |
| اسید لاکتیک | MIC | ۲/۳۵ |

MIC حداقل غلظت مهارکنندگی اسیدهای آلی علیه باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* را نشان می‌دهد. pH میزان اسیدیته اندازه‌گیری شده رانشان می‌دهد.

## بحث

*لیستریا مونوسیتوژنز* باکتری گرم مثبتی است که به‌طور گسترده در طبیعت یافت می‌شود و به‌دلیل توانایی رشد آن در دمای یخچال و غذاهای یخ‌زده، یک مشکل مهم برای تولیدکنندگان مواد غذایی محسوب شده و لذا به‌عنوان پاتوژن غذایی مهم در سطح جهان شناخته شده است [۲۶]. حداقل درجه حرارت و pH برای رشد *لیستریامونوسیتوژنز* تعریف شده است [۲۷] و برخی از محققان اثر اسیدهای استیک و لاکتیک در ترکیب با درجه حرارت و pH را روی این باکتری مورد مطالعه قرار داده‌اند [۲۸-۳۳]. در این مطالعه نیز اثر اسید استیک و اسید لاکتیک بر مهار رشد باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* بررسی شد. Jang و همکاران در سال ۲۰۰۷

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 12:30 +0430 on Tuesday July 25th 2017

اثر اسید استیک را بر علیه *لیستریا مونوسیتوژنز* بررسی کردند. MIC اسید استیک برابر با ppm ۲۵۰۰ از رشد این باکتری جلوگیری کرد [۳۴]. این یافته با MIC تحقیق حاضر یکسان است. Zhou و همکاران نشان دادند که رشد *سالمونلا تیفی‌موریوم* در محیط کشت مولر- هینتون براث حاوی اسید استیک، اسید لاکتیک و اسیدسیتریک با غلظت ۰/۲ درصد حجمی/حجمی به‌طور معنی‌داری مهار می‌شود [۳۵]. Ahn و Shin نیز در سال ۱۹۹۹ انواع متفاوتی از اسیدهای آلی که اثرات مهاری ضدمیکروبی در برابر میکروارگانیسم‌های مختلف دارند را گزارش کردند [۳۶]. در مطالعات مختلف فعالیت ضدباکتریایی اسید استیک، اسید لاکتیک، اسید سیتریک، اسید مالیک، اسید تارتاریک و اسید پروپیونیک در برابر پاتوژن‌های ناشی از مواد غذایی مثل *اشریشیاکولای* :$O_{157}$ $H_7$، *لیستریامونوسیتوژنز*، *سالمونلا تیفی‌موریوم* و دیگر باکتری‌های توکسین‌زا در محصولات غذایی نشان داده شده است [۳۷، ۳۸]. تفاوت این مطالعات با تحقیق حاضر در مقدار اسیدهای آلی به‌کار رفته و مدل غذایی می‌باشد؛ در مطالعه Huang و همکاران [۳۸] مقدار ۱ درصد اسید استیک، اسید سیتریک، اسید مالیک و اسید تارتاریک علیه *اشریشیاکولای* $O_{157}$: $H_7$ در سبزیجات بررسی شده و در مطالعه Dubal و همکاران [۳۸] ۲ درصد اسید لاکتیک و ۱/۵ درصد اسید استیک + ۱/۵ درصد اسید پروپیونیک علیه *لیستریا مونوسیتوژنز*، *سالمونلا تیفی‌موریوم*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کولای* به‌صورت اسپری به گوشت گوسفند و بز در کشتارگاه به‌کار گرفته شده است. در مطالعه حاضر مقدار ۲/۵ میکرولیتر اسید استیک و ۵ میکرولیتر اسید لاکتیک به‌صورت جداگانه علیه *لیستریا مونوسیتوژنز* استفاده شد که اسید استیک و اسید لاکتیک توانستند رشد این باکتری را مهار کنند. اندازه‌گیری رهایش ترکیبات داخل سلولی توسط جذب اشعه UV شاخصی برای لیز سلولی و تشکیل منافذ غیرانتخابی است [۳۹]. پروتئین نقش مهمی در فعالیت سلول‌های باکتریایی دارد. Wang و همکاران در سال ۲۰۱۵ گزارش کردند که اسید لاکتیک می‌تواند باعث افزایش نشت پروتئین از طریق غشا در باکتری‌های سالمونلا، *E. coli* و *لیستریا مونوسیتوژنز* شود. هم‌چنین، نشان دادند که نشت پروتئین، عمدتا در ۲ ساعت اول آزمایش رخ داده است و ۰/۵ درصد اسید لاکتیک می‌تواند به‌طور کامل رشد این سه باکتری را مهار کند [۴۰]. هم‌چنین، Wu و همکاران در سال ۲۰۱۳ تاثیر غلظت‌های مختلف اسید استیک را روی باکتری *لیستریا اینوکوا* (*L. innocua*) بررسی کردند و نتایج نشان داد که اسید استیک در pH=۴/۱۳ می‌تواند به ساختار سلولی باکتری از جمله اسید تیکوئیک (پلیمرهایی در دیواره سلولی می‌باشند که همراه با گلیسرول یا ریبیتول هستند و به گروه‌های فسفات متصل شده‌اند و تنها در باکتری‌های گرم مثبت وجود دارد)، غشای سلولی، DNA/RNA، و پروتئین‌های سیتوپلاسمی آسیب وارد کند و هم‌چنین باعث تغییر در پروتئین، لیپید و کربوهیدرات‌های سلول باکتری گردد که در نهایت منجر به مرگ سلول باکتری می‌شود [۴۱]. نتایج تحقیق حاضر نیز نشان‌دهنده خروج ترکیبات داخل سلولی می‌باشد. Devi و همکاران اثر اوژنول بر نشت مواد از *سالمونلا تیفی* را توسط جذب نور در طول موج ۲۶۰ نانومتری اندازه گیری کردند و نشان دادند که پس از اضافه کردن اوژنول (V/V) ۱ درصد و (V/V) ۵ درصد، OD از ۰/۰۱ به ۰/۴ افزایش یافته است. این نتایج نشان می‌دهد که اوژنول به غشای سیتوپلاسمی باکتری آسیب وارد کرده و باعث خروج پروتئین‌های داخل سلولی و یون‌های آن شده است. خروج اجزای درون سلولی نشان‌دهنده اثر اوژنول و ایجاد منافذ در غشای پلاسمایی این باکتری می‌باشد و در نهایت مرگ سلولی رخ می‌دهد [۴۲]. Shen و همکاران نشان دادند که جذب UV باکتری *E. coli* تحت تاثیر غلظت‌های MIC, 2MIC, 4MIC سینامالدئید بعد از ۴ ساعت افزایش یافته و هم‌چنین جذب UV باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در تماس با همین غلظت‌های سینامالدئید در ساعات اولیه به‌خصوص در ساعت ۲ افزایش می‌یابد. این اختلاف در خروج مواد داخل سلولی را می‌توان به‌دلیل اینکه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* یک باکتری گرم مثبت است و فاقد فرآیندهای غشایی لازم که بتواند مانع از هجوم مولکول‌های خارجی شود را توجیه کرد [۴۳]. Petran و Zottola گزارش کردند که حداقل pH برای سویه اسکات *لیستریا مونوسیتوژنز* در ۳۰ درجه سلسیوس برابر با ۴/۷ می‌باشد و رشد آن در pH=۴/۵ مشاهده نشده است [۴۴] و Sorrells و همکاران حداقل pH=۴/۴ در ۱۰ درجه سلسیوس برای رشد ۴ سویه را با HCL تنظیم کردند [۳۰]. دیگر مطالعات آزمایشگاهی نشان داده‌اند که حداقل pH=۴/۳ برای رشد سویه اسکات A می‌باشد [۴۵] و رشد ضعیفی از سویه ۸۸/۱ در pH=4/2 در یک پنیر ایزوله مشاهده شد [۴۶]، که در هر دو مورد pH با HCL و دمای ۲۰ درجه سلسیوس تنظیم شده بود. اسید استیک اثر مهاری بیشتری نسبت به اسید لاکتیک در حالت وزن در حجم بر رشد *لیستریا مونوسیتوژنز* دارد. این مشاهده با یافته‌های قبلی که اسید استیک حداقل pH رشد بیشتری نسبت به اسید لاکتیک دارد، مطابقت می‌کند [۳۰،۲۹]. اثربخشی بیشتر اسید استیک را به $PK_a$ پایین‌تر آن نسبت به فرم تفکیک نشده آن می‌دانند. $PK_a$ اسید استیک در ۲۰ درجه سلسیوس برابر با ۴/۷۵۵۸ محاسبه شده، درحالی‌که $PK_a$ اسید لاکتیک ۳/۸۵۹۴ می‌باشد [۴۷].

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 12:30 +0430 on Tuesday July 25th 2017

درمقابل در یک غلظت برابر از اسید تفکیک نشده (از نظر وزن)، اسید لاکتیک اثر باز دارنده‌تری نسبت به اسید استیک نشان می‌دهد [۳۳]. اثر pH عمدتاً بر غشای سلول می‌باشد که دناتوره شدن پروتئین، مانند ATPase که ناشی از نشت یون‌هایی مانند $K^+$، $Na^+$ و $Mg^{2+}$ از ماتریس سیتوپلاسم و ورود $H^+$ از خارج غشا سلول به درون آن می‌باشد، را باعث می‌شود [۵۰-۴۸]. هم‌چنین، در مطالعه‌ای مشابه Wesche و همکاران نشان دادند که در pH پایین $H^+$ در سلول افزایش می‌یابد و می‌تواند RNA را به‌وسیله مهار فرآیندهای متابولیک که نیاز به $Mg^{+2}$ دارد تخریب کند، زیرا $Mg^{+2}$ نقش مهمی در حفظ یکپارچگی ریبوزوم و جلوگیری از فعالیت ریبونوکلئاز دارد. $Mg^{+2}$ در محیط اسیدی از داخل به خارج غشا آزاد می‌شود و باعث دناتوره شدن ATPase در غشای سلولی می‌گردد و درنتیجه تجزیه ریبوزوم طی شرایط اسیدی را خواهیم داشت [۵۱].

## نتیجه گیری

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که اسید استیک و اسید لاکتیک در غلظت MIC خود و هم‌چنین با توانایی تخریب غشای سلولی باعث مهار رشد باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* شده‌اند که در این میان اثر ضد باکتریایی اسید استیک نسبت به اسید لاکتیک قوی‌تر بوده است. بنابراین با توجه به نتایج حاصل از پژوهش حاضر، استفاده از اسید استیک و اسید لاکتیک می‌تواند در جهت محافظت از غذا و کنترل میکروارگانیسم‌های عامل فساد و پاتوژن، به‌جای نگهدارنده‌های سنتزی و نیز کنترل بیماری-های میکروبی انسان مورد توجه و بررسی قرار گیرد و هم-چنین می‌توان با انجام پژوهش‌های مشابه زمینه را برای جایگزین کردن این ترکیبات با مواد ضدمیکروبی سنتزی فراهم ساخت.

## تشکر و قدردانی

این مطالعه نتایج حاصل از پایان‌نامه به شماره د ۲-۴۷۰ می‌باشد. بدین‌وسیله نویسندگان مراتب سپاس خود را از همکاری مسئولین محترم دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه به‌دلیل تامین بودجه پژوهشی این مطالعه اعلام می دارند. هم‌چنین، از همکاری آقای علی کاظم‌نیا (کارشناس آزمایشگاه) تشکرو قدردانی به‌عمل می‌آید.

## *References:*

[1] Schlech WF 3rd, Lavigne PM, Bortolussi RA, Allen AC, Haldane EV, Wort AJ, et al. Epidemic listeriosis-evidence for transmission by food. ***N Engl J Med*** 1983; 308(4): 203-6.

[2] Fleming DW, Cochi SL, MacDonald KL, Brondum J, Hayes PS, Plikaytis BD, et al. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. ***N Engl J Med*** 1985; 312(7): 404-7.

[3] Centers for Disease Control (CDC). Listeriosis outbreak associated with Mexican-style cheese--California. ***MMWR Morb Mortal Wkly Rep*** 1985; 34(24): 357.

[4] Bille J, Glauser MP. Listeriose en Suisse. ***Bull Bundesamtes Ges*** 1988; 3: 28-9.

[5] Jacquet C, Catimel B, Brosch R, Buchrieser C, Dehaumont P, Goulet V, et al. Investigations related to the epidemic strain involved in the French listeriosis outbreak in 1992. ***Appl Environ Microbiol*** 1995; 61(6): 2242-6.

[6] Goulet V, Jacquet C, Vaillant V, Rebiere J, Mouret E, Lorente C, et al. Listeriosis from consumption of raw-milk cheese. ***Bull Epidemiol Hebd*** 1995; 23: 106-7.

[7] Byelashov OA, Daskalov H, Geornaras I, Kendall PA, Belk KE, Scanga JA, et al. Reduction of Listeria monocytogenes on frankfurters treated with lactic acid solutions of various temperatures. ***Food Microbiol*** 2010; 27(6): 783-90.

[8] Borges A, Ferreira C, Saavedra MJ, Simoes M. Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. ***Microb Drug Resist*** 2013; 19(4): 256-65.

[9] Lues JFR, Theron MM. Comparing organic acids and salt derivatives as antimicrobials against selected poultry-borne Listeria monocytogenes strains in vitro. ***Foodborne Pathogens Dis*** 2012; 9(12): 1126-9.

[10] Andersson DI. Persistence of antibiotic resistant bacteria. ***Curr Opin Microbiol*** 2003; 6(5): 452-6.

[11] Andersson DI, Levin BR .The biological cost of antibiotic resistance. ***Curr Opin Microbiol*** 1999; 2(5): 489-93.

[12] Baquero F, Negri MC, Morosini MI, Blázquez J. Antibiotic-selective environments. ***Clin Infect Dis*** 1998; 27 Suppl 1: S5-11.

[13] Guillemot D. Antibiotic use in humans and bacterial resistance. ***Curr Opin Microbiol*** 1999; 2(5): 494-8.

[14] Monroe S, Polk R. Antimicrobial use and bacterial resistance. ***Curr Opin Microbiol*** 2000; 3(5): 496-501.

[15] Saleem M, Nazir M, Ali MS, Hussain H, Lee YS, Riaz N, et al. Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. ***Nat Prod Rep*** 2010; 27(2): 238-54.

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 12:30 +0430 on Tuesday July 25th 2017

[16] Hsiao CP, Siebert KJ. Modeling the inhibitory effects of organic acids on bacteria. ***Int J Food Microbiol*** 1999; 47(3): 189-201.
[17] Ricke SC. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. ***Poult Sci*** 2003; 82(4): 632-9.
[18] Wang C, Wang S, Chang T, Shi L, Yang H, Shao Y, et al. Efficacy of lactic acid in reducing foodborne pathogens in minimally processed lotus sprouts. ***Food Control*** 2013; 30(2): 721-6.
[19] Zeuthen P, Bøgh-Sørensen L. Food preservation techniques: Elsevier; 2003.
[20] Salmond CV, Kroll RG, Booth IR. The effect of food preservatives on pH homeostasis in Escherichia coli. ***J Gen Microbiol*** 1984; 130(11): 2845-50.
[21] In YW, Kim JJ, Kim HJ, Oh SW. Antimicrobial activities of acetic acid, citric acid and lactic acid against Shigella species. ***J Food Safety*** 2013; 33(1): 79-85.
[22] Fraise A, Wilkinson M, Bradley C, Oppenheim B, Moiemen N. The antibacterial activity and stability of acetic acid. ***J Hospital Infection*** 2013; 84(4): 329-31.
[23] Al-Bayati FA. Synergistic antibacterial activity between Thymus vulgaris and Pimpinella anisum essential oils and methanol extracts. ***J Ethnopharmacol*** 2008; 116(3): 403-6.
[24] Rhayour K, Bouchikhi T, Tantaoui-Elaraki A, Sendide K, Remmal A. The mechanism of bactericidal action of oregano and clove essential oils and of their phenolic major components on Escherichia coli and Bacillus subtilis. ***J Essential Oil Res*** 2003; 15(4): 286-92.
[25] Zheng L, Bae YM, Jung KS, Heu S, Lee SY. Antimicrobial activity of natural antimicrobial substances against spoilage bacteria isolated from fresh produce. ***Food Control*** 2013; 32(2): 665-72.
[26] Jay JM, Loessner M, Golden D. Modern food microbiology 7th. New York, NY: Springer Since+ Business Media, LLC; 2005.
[27] Conner DE, Brackett RE, Beuchat LR. Effect of temperature, sodium chloride ,and pH on growth of Listeria monocytogenes in cabbage juice. ***Appl Environ Microbiol*** 1986; 52(1): 59-63.
[28] Ahamad N, Marth EH. Behavior of Listeria monocytogenes at 7, 13, 21, and 35 C in tryptose broth acidified with acetic, citric, or lactic acid. ***J Food Protection*** 1989; 52(10): 688-95.
[29] Farber J, Sanders G, Dunfield S, Prescott R. The effect of various acidulants on the growth of Listeria monocytogenes. ***Lett Appl Microb*** 1989; 9(5): 181-3.
[30] Sorrells KM, Enigl DC, Hatfield JR. Effect of pH, acidulant, time, and temperature on the growth and survival of Listeria monocytogenes. ***J Food Protect*** 1989; 52(8): 571-3.
[31] Sorrells KM, ENIGL DC. Effect of pH, acidulant, sodium chloride and temperature on the growth of Listeria monocytogenes. ***J Food Safety*** 1990; 11(1): 31-7.
[32] Conner DE, Scott VN, Bernard DT. Growth, inhibition, and survival of Listeria monocytogenes as affected by acidic conditions. ***J Food Prot*** 1990; 53(8): 652-5.
[33] Young KM, Foegeding PM. Acetic, lactic and citric acids and pH inhibition of Listeria monocytogenes Scott A and the effect on intracellular pH. ***J Appl Bacteriol*** 1993; 74(5): 515-20.
[34] Jang JS, Lee HJ, Oh BY, Lee JM, Go JM, Kim YH. Inactivation of Escherichia coli O157: H7, Salmonella and Listeria monocytogenes by organic acid. ***Korean J Environ Health Sci*** 2007; 33(5): 403-7.
[35] Zhou F, Ji B, Zhang H, Jiang H, Yang Z, Li J, et al. Synergistic effect of thymol and carvacrol combined with chelators and organic acids against Salmonella Typhimurium. ***J Food Prot*** 2007; 70(7): 1704-9.
[36] Ahn YS, Shin DH. Antimicrobial Effects of organic acids and ethanol on several foodbome microorganisms. ***Korean J Food Sci Technol*** 1999; 31(5): 1315-23.
[37] Dubal ZB, Paturkar AM, Waskar VS, Zende RJ, Latha C, Rawool DB, et al. Effect of food grade organic acids on inoculated S. aureus, L. monocytogenes, E. coli and S. Typhimurium in sheep/goat meat stored at refrigeration temperature. ***Meat Sci*** 2004; 66(4): 817-21.
[38] Huang Y, Chen H. Effect of organic acids, hydrogen peroxide and mild heat on inactivation of Escherichia coli O157: H7 on baby spinach. ***Food Control*** 2011; 22(8): 1178-83.
[39] Zhou K, Zhou W, Li P, Liu G, Zhang J, Dai Y. Mode of action of pentocin 31-1: an antilisteria bacteriocin produced by Lactobacillus pentosus from Chinese traditional ham. ***Food Control*** 2008; 19(8): 817-22.
[40] Wang C, Chang T, Yang H, Cui M. Antibacterial mechanism of lactic acid on physiological and morphological properties of Salmonella Enteritidis, Escherichia coli and Listeria monocytogenes. ***Food Control*** 2015; 47: 231-6.
[41] Wu D, Rasco B, Vixie KR, Ünlü G, Swanson B, Liu Y. Using Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy to detect sublethally-or lethally-stressed Listeria innocua treated with acetic acid. ***LWT-Food Sci Technol*** 2013; 54(2): 456-62.
[42] Devi KP, Nisha SA, Sakthivel R, Pandian SK. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against Salmonella typhi by disrupting the cellular membrane. ***J Ethnopharmacol*** 2010; 130(1): 107-15.
[43] Shen S, Zhang T, Yuan Y, Lin S, Xu J, Ye H. Effects of cinnamaldehyde on Escherichia coli and Staphylococcus aureus membrane. ***Food Control*** 2015; 47: 196-202.

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 12:30 +0430 on Tuesday July 25th 2017

[44] Petran R, Zottola E. A study of factors affecting growth and recovery of Listeria monocytogenes Scott A. ***J Food Sci*** 1989; 54(2): 458-60.
[45] Lund BM. Quantification of factors affecting the probability of development of pathogenic bacteria, in particularClostridium botulinum, in foods. ***J Industrial Microbiol Biotechnol*** 1993; 12(3): 144-55.
[46] George SM, Lund BM, Brocklehurst TF. The effect of pH and temperature on initiation of growth of Listeria monocytogenes. ***Lett Appl Microb***1988; 6(6): 153-6.
[47] Robinson RA. Stokes, RH Electrolyte Solutions. Butterworths, London; 1959.
[48] Bender GR, Sutton S, Marquis RE. Acid tolerance, proton permeabilities, and membrane ATPases of oral streptococci. ***Infection Immunity*** 1986; 53(2): 331-8.
[49] Bender GR, Marquis RE. Membrane ATPases and acid tolerance of Actinomyces viscosus and Lactobacillus casei. ***Appl Environ Microbiol*** 1987; 53(9): 2124-8.
[50] Cherrington C, Hinton M, Mead G, Chopra I. Organic acids: chemistry, antibacterial activity and practical applications. ***Adv Microb Physiol*** 1991; 32: 87-108.
[51] Wesche AM, Gurtler JB, Marks BP, Ryser ET. Stress, sublethal injury, resuscitation, and virulence of bacterial foodborne pathogens. ***J Food Protect*** 2009; 72(5): 1121-38.