

## 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.

# بررسی فعالیت ضدباکتریایی اسید استیک و اسید لاکتیک علیه لیستریا مونوسیژنوزن و اثر آنها بر رهائش ترکیبات داخل سلولی

زلیخا شیروانی<sup>\*۱</sup>، جواد علی اکبرلو<sup>۲</sup>، حسین تاجیک<sup>۳</sup>

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 ضد میکروبی و اسیدی‌کننده به‌کار گرفته می‌شوند. هدف این مطالعه بررسی فعالیت ضدباکتریایی اسید استیک و اسید لاکتیک علیه باکتری لیستریا مونوسیژنوزن می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی اثرات ضدباکتریایی اسید استیک و اسید لاکتیک بر لیستریا مونوسیژنوزن با استفاده از روش‌های حداقل غلظت مهارکنندگی، حداقل غلظت کشندگی و رهائش ترکیبات داخل سلولی تعیین شد. برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی اسید استیک و اسید لاکتیک به ترتیب محدوده ۱۰-۰/۱۹۵ و ۲۲/۲-۰/۰۴۳ میکرولیتر بر میلی‌لیتر استفاده شد.

**نتایج:** اسید استیک و اسید لاکتیک رشد لیستریا مونوسیژنوزن را مهار کرده و اسید استیک اثر مهاری قوی‌تری بر باکتری داشت. مقدار حداقل غلظت مهارکنندگی اسید استیک و اسید لاکتیک به ترتیب ۲/۵ و ۵ میکرولیتر بر میلی‌لیتر بود و روش رهائش 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 مونوسیژنوزن 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 مونوسیژنوزن

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

## مقدمه

شیوع بیماری لیستریوزیس در مواد غذایی مانند سالاد کلم [۱]، شیر [۲]، پنیر نرم [۳،۴]، سوپ گوشت زبان خوک [۵] و پنیر بری [۶] بالا است. هم‌چنین، شیوع زیاد لیستریا مونوسیژنوزن 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 ضد میکروبی 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 [۱۰-۱۴،۸]. 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 ضد میکروبی 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

لیستریا مونوسیژنوزن 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.

<sup>۱</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه  
<sup>۲</sup> دانشیار، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه  
<sup>۳</sup> 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

## تنظیم باکتری

ابتدا یک گرانول باکتری لیستریا مونوسیوتوژنز از لوله‌های کرایو مورد نظر در شرایط سترون خارج شده و به ۱۰ میلی‌لیتر محیط BHI برات منتقل شد و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری شد. باکتری قبل از استفاده به‌طور متوالی دو بار تجدید کشت گردید؛ برای این منظور، ۴-۵ کلونی باکتری از BHI آگار به ۱۰ میلی‌لیتر BHI برات 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 برات 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  $10^8 \times 0.32$  تنظیم گردید و با رقیق سازی به  $10^6$  در محیط کشت BHI برات 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  $0.039 \mu\text{l/mL}$  - ۱۰ و برای اسید لاکتیک  $0.156 \mu\text{l/mL}$  - ۲۰ بود. در هر چاهک میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای،  $95 \mu\text{l}$  محیط کشت BHI برات و  $5 \mu\text{l}$  باکتری ریخته شد و  $100 \mu\text{l}$  از محلول استوک اسید استیک و اسید لاکتیک به اولین چاهک افزوده شد. سپس  $100 \mu\text{l}$  از رقت‌های سریالی در ۷ چاهک پی‌درپی انتقال یافت. آخرین ستون به‌وسیله  $195 \mu\text{l}$  از BHI برات و  $5 \mu\text{l}$  از باکتری پر شد و به‌عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شد. از اریتروماسین به‌عنوان شاهد مثبت استفاده شد. حجم نهایی در هر چاهک  $200 \mu\text{l}$  بود. سپس، میکروپلیت به‌وسیله پارافیلیم 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 در نظر گرفته شد. برای تست MBC از چاهک‌هایی

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 ارگانیزم و ویژگی‌های فیزیوشیمیایی محیط خارجی متفاوت است [۱۷]. نشان داده شده است که اسیدهای آلی پتانسیل بیشتری برای غیرفعال کردن باکتری‌ها نسبت به اسیدهای غیرآلی دارند که عمدتاً به‌دلیل فرم تفکیک نشده اسید است که به‌راحتی می‌تواند 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 همکاران در سال ۲۰۱۳ فعالیت ضدباکتریایی اسید استیک، اسید سیتریک و اسید لاکتیک را بر علیه چهار گونه شیگلا دیسانتری، شیگلا فلکسنسری، 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 گونه‌های 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 مونوسیوتوژنز مورد بررسی قرار گرفته است.

## مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی که در پاییز سال ۱۳۹۴ 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 مونوسیوتوژنز (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.

فعالیت ضد باکتریایی اسید استیک و اسید لاکتیک، ...

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 پایین تر می باشد.

جدول شماره ۱- نتایج MIC و MBC اسید استیک و اسید لاکتیک

بر لیستریا مونوسیژنوز

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

MIC حداقل غلظت مهار کنندگی اسیدهای آلی علیه باکتری لیستریا مونوسیژنوز را نشان می دهد. MBC حداقل غلظت کشندگی اسیدهای آلی علیه باکتری لیستریا مونوسیژنوز را نشان می دهد.

جدول شماره ۲- نتایج رهایش ترکیبات داخل سلولی (Cell constituents release)

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

OD سنجش میزان جذب نوری نمونه توسط دستگاه اسپکتروفتومتری را بیان می نماید. حروف کوچک متفاوت (a,b,c) در هر ردیف بیانگر تفاوت آماری معنی دار (P<۰/۰۵) می باشد.

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

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

MIC حداقل غلظت مهار کنندگی اسیدهای آلی علیه باکتری لیستریا مونوسیژنوز را نشان می دهد. pH میزان اسدبته اندازه گیری شده را نشان می دهد.

## بحث

لیستریا مونوسیژنوز باکتری گرم مثبتی است که به طور گسترده در طبیعت یافت می شود و به دلیل توانایی رشد آن در دمای یخچال و غذاهای یخ زده، یک مشکل مهم برای تولیدکنندگان مواد غذایی محسوب شده و لذا به عنوان پاتوژن غذایی مهم در سطح جهان شناخته شده است [۲۶]. حداقل درجه حرارت و pH برای رشد لیستریا مونوسیژنوز 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 داده اند [۲۸-۳۳]. در این مطالعه نیز اثر اسید استیک و اسید لاکتیک بر مهار رشد باکتری لیستریا مونوسیژنوز بررسی شد. Jang و همکاران در سال ۲۰۰۷

که شفاف بودند و نشان دهنده عدم رشد باکتری بودند، به مقدار 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 ۱۸-۲۰ ساعته باکتری با اسپکتروفتومتر (Novaspect) ساخت انگلیس در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده شد و سپس به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۵۰۰۰ rpm در سه مرحله سانتریفیوژ انجام شده و هر مرحله با ۰/۱ PBS (pH=۰/۷) شستشو داده و سپس غلظت MIC ترکیبات را اضافه نموده و در شیکر انکوباتور به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده، و مجدداً به مدت ۲ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ کرده و در نهایت جذب نوری ۲ ml مایع رویی توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۶۰ نانومتر خوانده شد. این آزمایش به طور همزمان برای ۰/۱ PBS (pH=۰/۷) به همراه مواد ضد میکروبی در غلظت MIC آنها بدون باکتری صورت گرفت و از حالت حاوی باکتری تفریق داده شد. همچنین، از ۰/۱ PBS (pH=۰/۷) به عنوان شاهد استفاده شد [۲۴].

اندازه گیری pH

برای اندازه گیری pH از pH متر متیوم ساخت سویس استفاده شد و با وارد کردن الکتروود pH متر در غلظت MIC ترکیبات ضد میکروبی، pH آنها اندازه گیری شد [۲۵].

## نتایج

بررسی MIC و MBC مواد ضدباکتریایی نشان داد که اسید استیک با داشتن MIC برابر با ۲/۵ میکرولیتر بر میلی لیتر اثر ضدباکتریایی قوی تری 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 به مدت ۱ ساعت تحت تاثیر قرار گرفتند، را نشان می دهد. نتایج نشان داد که پس از اضافه کردن اسید استیک و اسید لاکتیک رهایش و خروج ترکیبات داخل سلولی به طور مشخصی نسبت به گروه شاهد افزایش می یابد که نشان دهنده وارد شدن آسیب غیرقابل برگشت به غشای سیتوپلاسمی باکتری می باشد. به علاوه، نتایج نشان می دهند که اسید استیک روی باکتری لیستریا مونوسیژنوز موثرتر

اثر اسید استیک را بر علیه لیستریا مونوسیوتوژنز بررسی کردند. MIC اسید استیک برابر با ۲۵۰۰ ppm از رشد این باکتری جلوگیری کرد [۳۴]. این یافته با MIC تحقیق حاضر یکسان است. Zhou و همکاران نشان دادند که رشد سالمونلا تیفی موریوم در محیط کشت مولر- هیتون برات حاوی اسید استیک، اسید لاکتیک و اسیدسیتریک با غلظت ۰/۲ درصد حجمی/حجمی به طور معنی داری مهار می شود [۳۵]. Shin و Ahn نیز در سال ۱۹۹۹ انواع متفاوتی از اسیدهای آلی که اثرات مهار ضدمیکروبی در برابر میکروارگانسیم های 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 پاتوژن های ناشی از مواد غذایی مثل اشریشیاکولای O<sub>157</sub>:H<sub>7</sub>، لیستریا مونوسیوتوژنز، سالمونلا تیفی موریوم و دیگر باکتری های توکسینزا در محصولات غذایی نشان داده شده است [۳۷، ۳۸]. تفاوت این مطالعات با تحقیق حاضر در مقدار اسیدهای آلی به کار رفته و مدل غذایی می باشد؛ در مطالعه Huang و همکاران [۳۸] مقدار ۱ درصد اسید استیک، اسید سیتریک، اسید مالیک و اسید تارتاریک علیه اشریشیاکولای O<sub>157</sub>:H<sub>7</sub> 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 مونوسیوتوژنز، سالمونلا تیفی موریوم، استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کولای به صورت اسپری به گوشت گوسفند و بز در کشتارگاه به کار گرفته شده است. در مطالعه حاضر مقدار ۲/۵ میکرولیتر اسید استیک و ۵ میکرولیتر اسید لاکتیک به صورت جداگانه علیه لیستریا مونوسیوتوژنز استفاده شد که اسید استیک و اسید لاکتیک توانستند رشد این باکتری را مهار کنند. اندازه گیری رهایش ترکیبات داخل سلولی توسط جذب اشعه UV شاخصی برای لیز سلولی و تشکیل منافذ غیرانتخابی است [۳۹]. پروتئین نقش مهمی در فعالیت سلول های باکتریایی دارد. Wang و همکاران در سال ۲۰۱۵ گزارش کردند که اسید لاکتیک می تواند باعث افزایش نشت پروتئین از طریق غشا در باکتری های سالمونلا، *E. coli* و لیستریا مونوسیوتوژنز شود. هم چنین، نشان دادند که نشت پروتئین، عمدتاً در ۲ ساعت اول آزمایش رخ داده است و ۰/۵ درصد اسید لاکتیک می تواند به طور کامل رشد این سه باکتری را مهار کند [۴۰]. هم چنین، Wu و همکاران در سال ۲۰۱۳ تاثیر غلظت های مختلف اسید استیک را روی باکتری لیستریا اینوکوا (*L. innocua*) بررسی کردند و نتایج نشان داد که اسید استیک در pH=۴/۱۳ می تواند به ساختار سلولی باکتری از جمله اسید تیوکونیک (پلیمرهایی در دیواره سلولی می باشند که همراه با

گلیسرول یا ریبتول هستند و به گروه های فسفات متصل شده اند و تنها در باکتری های گرم مثبت وجود دارد)، غشای سلولی، DNA/RNA، و پروتئین های سیتوپلاسمی آسیب وارد کند و هم- چنین باعث تغییر در پروتئین، لیپید و کربوهیدرات های سلول باکتری گردد که در نهایت منجر به مرگ سلول باکتری می شود [۴۱]. نتایج تحقیق حاضر نیز نشان دهنده خروج ترکیبات داخل سلولی می باشد. 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 ۰/۱ به ۰/۴ افزایش یافته است. این نتایج نشان می دهد که اوژنول به غشای سیتوپلاسمی باکتری آسیب وارد کرده و باعث خروج پروتئین های داخل سلولی و یون های آن شده است. خروج اجزای درون سلولی نشان دهنده اثر اوژنول و ایجاد منافذ در غشای پلاسمایی این باکتری می باشد و در نهایت مرگ سلولی رخ می دهد [۴۲]. Shen و همکاران نشان دادند که جذب UV باکتری *E. coli* تحت تاثیر غلظت های MIC، 2MIC، 4MIC سینامالدئید بعد از ۴ ساعت افزایش یافته و هم چنین جذب UV باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در تماس با همین غلظت های سینامالدئید در ساعات اولیه به خصوص در ساعت ۲ افزایش می یابد. این اختلاف در خروج مواد داخل سلولی را می توان به دلیل اینکه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس یک باکتری گرم مثبت است و فاقد فرآیندهای غشایی لازم که بتواند مانع از هجوم مولکول های خارجی شود را توجیه کرد [۴۳]. Petran و Zottola گزارش کردند که حداقل pH برای سویه اسکات لیستریا مونوسیوتوژنز در ۳۰ درجه سلسیوس برابر با ۴/۷ می باشد 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 داده اند که حداقل pH=۴/۳ برای رشد سویه اسکات A می باشد [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 مهار بیشتری نسبت به اسید لاکتیک در حالت وزن در حجم بر رشد لیستریا مونوسیوتوژنز دارد. این مشاهده با یافته های قبلی که اسید استیک حداقل pH رشد بیشتری نسبت به اسید لاکتیک دارد، مطابقت می کند [۳۰، ۲۹]. اثربخشی بیشتر اسید استیک را به PK<sub>a</sub> پایین تر آن نسبت به فرم تفکیک نشده آن می دانند. PK<sub>a</sub> اسید استیک در ۲۰ درجه سلسیوس برابر با ۴/۷۵۵۸ محاسبه شده، در حالی که PK<sub>a</sub> اسید لاکتیک ۳/۸۵۹۴ می باشد [۴۷].

لیستریا مونوسیژنوز 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 بیماری‌های میکروبی انسان مورد توجه و بررسی قرار گیرد و هم‌چنین می‌توان با انجام پژوهش‌های مشابه زمینه را برای جایگزین کردن این ترکیبات با مواد ضد میکروبی سنتزی فراهم ساخت.

#### تشکر و قدردانی

این مطالعه نتایج حاصل از پایان‌نامه به شماره د ۲-۴۷۰ می‌باشد. بدین وسیله نویسندگان مراتب سپاس خود را از همکاری مسئولین محترم دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه به‌دلیل تامین بودجه پژوهشی این مطالعه اعلام می‌دارند. هم‌چنین، از همکاری آقای علی کاظم‌نیا (کارشناس آزمایشگاه) تشکر و 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.

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 دنا توره 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 [۴۸-۵۰]. 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 دنا توره شدن ATPase در غشای سلولی می‌گردد و در نتیجه 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

- [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.

- [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, Moiemmen 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 7<sup>th</sup>. 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 foodborne 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.

- [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 particular *Clostridium 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.