Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 10, Number 2 (May-June)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Antimicrobial effects of magnesium oxide nanoparticles and ε-poly-L-lysine against *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*

Masumeh Samadi, Seyed Shahram Shekarforoush, Hamid Reza Gheisari

Department of Food Hygiene and Public Health, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran

Article Information

Article history:
Received: 2015/11/21
Accepted: 2016/01/12
Available online:2016/07/24

Article Subject:
Food Microbiology

IJMM 2016; 10(2): 33-41

Corresponding author at:

Dr. Seyed Shahram Shekarforoush

Department of Food Hygiene and Public Health, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran

Tel:
09173141526

Email:
shekar@shirazu.ac.ir

Abstract

Background and Aim: Microbial food contamination is of great threat to human health. Nanotechnology is considered as a promising solution to produce and develop such novel antimicrobial substances. The potential effects of nanostructured metal oxides on the reduction of such contaminants are well established. The present study was aimed to investigate the antimicrobial activities of magnesium oxide (MgO) nanoparticles and ε-poly-L-lysine against two major food borne bacteria, *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*.

Materials and Methods: The minimum inhibitory concentration (MIC) values of the antimicrobial compounds, as single and in combination uses, against *E. coli* O157:H7 and *L. monocytogenes* were determined by resazurin reduction and micro-dilution methods, in order to calculate the fractional inhibitory concentration (FIC) index.

Results: The growing of both microorganisms was inhibited by nano MgO at the concentration of 4.10 mg/ml and at the concentrations of 2.05 and 0.13 mg/ml, ε-poly-L-lysine was effective against *E. coli* and *L. monocytogenes*, respectively. The FIC indices of 0.52 and 0.75 against *E. coli* and *L. monocytogenes*, were respectively confirmed, when the combination of both antimicrobial agents was employed.

Conclusions: The current study was revealed the inhibitory effects of both substances against *E. coli* and *L. monocytogenes*. Furthermore, a limited synergy (0.5-0.75) was noticed in using them, in combination.

KeyWords: Magnesium oxide nanoparticles, ε-polylysine, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*

Copyright © 2016 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Samadi M, Shekarforoush S S, Ghaisari H R. Antimicrobial effects of magnesium oxide nanoparticles and ε-poly-L-lysine against Escherichia coli O157:H7 and Listeria monocytogenes. Iran J Med Microbiol. 2016; 10 (2) :33-41

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۰ – شماره ۲ – خرداد و تیر ۱۳۹۵

Journal homepage: www.ijmm.ir

بررسی اثر ضد میکروبی نانوذرات اکسید منیزیم و پپتید پلی‌ال‌لایزین بر علیه *اشریشیا کلی* O157:H7 و *لیستریا منوسیتوژنز*

معصومه صمدی، سید شهرام شکرفروش، حمیدرضا قیصری

گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت:۱۳۹۴/۰۸/۲۰

پذیرش:۱۳۹۴/۱۰/۲۲

انتشار آنلاین:۱۳۹۵/۰۵/۰۳

موضوع:

میکروبیولوژی مواد غذایی

IJMM 1395; 10(2): 33-41

نویسنده مسئول:

دکتر سید شهرام شکرفروش

گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

تلفن: ۰۹۱۷۳۱۴۱۵۲۶

پست الکترونیک:

shekar@shirazu.ac.ir

چکیده

زمینه و اهداف: آلودگی میکروبی مواد غذایی خطر بزرگی برای سلامت انسان محسوب می‌شود. فناوری نانو روشی برای تولید و ترکیبات ضدمیکروبی جدید فرآروی بشر قرار داده است. نانو اکسیدهای فلزی پتانسیل خوبی برای کاهش آلودگی میکروبی دارند. هدف از این تحقیق بررسی اثر ضد میکروبی نانوذرات اکسید منیزیم و پلی‌ال‌لایزین بر علیه دو پاتوژن مهم غذازاد *اشریشیا کلی* O157:H7 و *لیستریا منوسیتوژنز* بود.

مواد و روش کار: حداقل غلظت مهارکنندگی نانوذرات اکسید منیزیم و پلی‌ال‌لیزین بر علیه *اشریشیا کلی* **O157:H7** و *لیستریا منوسیتوژنز* به تنهایی و در ترکیب با هم به روش میکرودایلوشن و احیاء رزازورین بررسی گردید و غلظت‌های مهاری مشترک (شاخص FIC) محاسبه گردید.

یافته‌ها: نانو اکسید منیزیم در غلظت ٤/١٠ میلی‌گرم در میلی‌لیتر رشد هر دو باکتری را مهار نمود و پلی‌ال‌لیزین در غلظتهای ۲/۰۵ و ۰/۱۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به ترتیب رشد *اشریشیا کلی* و *لیستریا منوسیتوژنز* را مهار نمود. FIC ترکیب نانوذرات اکسید منیزیم با پلی‌ال‌لایزین بر علیه *اشریشیا کلی* و *لیستریا منوسیتوژنز* به ترتیب ۰/۵۲ و ۰/۷۵ بود.

نتیجه‌گیری: این تحقیق نشان داد که نانوذرات اکسید منیزیم و ماده ضد میکروبی طبیعی پلی‌ال‌لایزین اثر ضد میکروبی بر روی *اشریشیا کلی* O157:H7 و *لیستریا منوسیتوژنز* داشتند و استفاده توام آن‌ها با محاسبه شاخص FIC اثر هم‌افزایی جزیی (۰/۷۵ – ۰/۵) داشت.

کلمات کلیدی: *نانوذرات اکسید منیزیم، پلی‌ال‌لایزین، اشریشیا کلی O157:H7، لیستریا منوسیتوژنز*

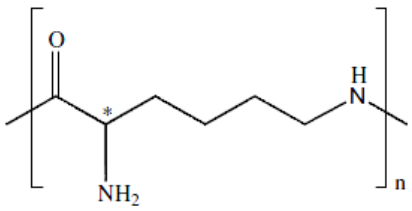
کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

ایمنی در تولید و نگه‌داری مواد غذایی یک نگرانی مهم بهداشت عمومی در سراسر جهان است (۱). به رغم رشد فزآینده صنعت غذا و رعایت اصول بهداشتی درتولید و فرآوری مواد غذایی، آلودگی میکروبی به عنوان منبع اصلی شیوع مکرر بیماریهای ناشی از مواد غذایی شناخته می‌شود (۲). از این روی یافتن ترکیبات ضدمیکروبی جدید برای اطمینان از سلامت مواد غذایی و افزایش ماندگاری آنها کاملاً ضروری به نظر می‌رسد (۳). در سالهای اخیر کاربرد ترکیبات ضدمیکروبی غیرآلی به منظور کنترل میکروارگانیسم‌ها افزایش یافته است. مزیت اصلی مواد غیرآلی ایمنی و پایداری بیشتر در دما و فشار بالا نسبت به مواد آلی می‌باشد (۴). براساس تحقیقات مختلف ترکیبات غیرآلی از جمله اکسیدهای فلزی مانند اکسید منیزیم با اندازه ذرات کمتر از ۱۰۰ نانومتر فعالیت ضدمیکروبی خوبی نشان داده‌اند (۵). با کاهش اندازه ذرات درحد نانومتر، فعالیت سطحی مواد افزایش چشمگیری می‌یابد و نسبت واکنش مواد با محیط اطراف به دلیل ازدیاد سایت‌های فعال سطحی بیشتر می‌شود (۶).

اکسید منیزیم به دلیل خواص گسترده آن از نقطه نظر تغذیه‌ای و سلامتی مورد توجه قرار گرفته است. منیزیم جزو مواد معدنی ضروری برای سلامت انسان می‌باشد (۵). اکسید منیزیم یکی از ترکیبات شش‌گانه منیزیم می‌باشد که در موارد بیولوژیکی مانند تسکین سوزش سردل و بازسازی استخوان مصرف می‌شود. اخیراً مطالعات سیتوتوکسیسیتی در نانو پزشکی توانایی نانو اکسید منیزیم را در درمان سرطان ثابت کرده‌اند (۷). نانو اکسید منیزیم توسط وزارت غذا و داروی آمریکا (FDA) به عنوان یک ماده ایمن برای سلامت انسان شناخته شده است (۹، ۸). نانو اکسید منیزیم فعالیت ضدمیکروبی خوبی برعلیه باکتری‌های گرم مثبت، گرم منفی وکپک‌ها نشان می‌دهد. از علل فعالیت ضدمیکروبی آن می‌توان قلیائیت (Alkalinity)، تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) مانند سوپراکسید و جذب الکترواستاتیک نانو ذرات به دیواره سلول باکتری را نام برد. اکسید منیزیم در مقایسه با دیگر اکسیدهای فلزی از جمله اکسید تیتانیوم، نقره و مس سمی نیست و می‌توان آن را از مواد اولیه قابل دسترس و ارزان تهیه کرد (۱۰).

از دیگر ترکیبات طبیعی جدید که به دلیل داشتن ایمنی و فعالیت ضدمیکروبی عالی برای نگهداری مواد غذایی مورد توجه قرارگرفته است پلی‌ال‌لیزین (ε-Poly-L-lysine) می‌باشد (۱). این ترکیب یک همو پلیمر از اسیدآمینه لایزین با ۳۵-۲۵ رزیدیو می‌باشد. ساختار شیمیایی پلی‌ال‌لیزین در شکل ۱ آمده است (۱۱). این پلی‌پپتید از تخمیر بی‌هوازی موتانت *استرپتومایس آلبولوس* لایزینوپلیمراز گونه ۳۴۶ تولید می‌شود (۱۲).



شکل ۱: ساختار ε پلی‌ال‌لیزین

بر اساس تحقیقات انجام شده پلی‌ال‌لیزین فعالیت ضدمیکروبی خوبی برطیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها شامل باکتری‌های گرم مثبت، گرم منفی، کپک‌ها و مخمرها دارد (۱۳). مکانیزم فعالیت ضدمیکروبی پلی‌ال‌لیزین به صورت جذب الکترواستاتیک به سطح سلول که مانع از تشکیل غشاء بیرونی و توزیع غیرعادی سیتوپلاسم می‌شود، می‌باشد (۱). پلی‌ال‌لیزین در محدوده وسیعی از pH فعالیت ضدمیکروبی نشان می‌دهد. حتی در غلظتهای زیاد برای انسان غیرسمی است، در غلظت‌های بسیار کم اثر ضدمیکروبی نشان می‌دهد (۱۴). پلی‌ال‌لیزین در سال ۲۰۰۴ به‌عنوان یک ماده بی خطر برای مصارف غذایی توسط وزارت غذا و داروی آمریکا معرفی شده است (۱۵). با توجه به این که استفاده ترکیبی از عوامل ضدمیکروبی نسبت به استفاده از هر یک از عوامل به تنهایی بسیار موثرتر خواهد بود (۱۴) در این پژوهش اثر ضد میکروبی نانو اکسید منیزیم و پلی‌ال‌لیزین به تنهایی و به صورت توام با تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) بررسی شد. همچنین وجود اثر هم‌افزایی (Synergistic effect) بین آنها با استفاده از حداقل غلظت مهاری مشترک(FIC) در برابر دو باکتری بیماریزای غذایی *اشریشیا کلی* O157:H7 و *لیستریا منوسیتوژنز* مورد پژوهش قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه سوسپانسیون نانوذرات اکسید منیزیم

نانوذرات اکسید منیزیم با درجه خلوص ۹۹ درصد و اندازه ذرات ۲۰ نانومتر خریداری شد (US Research Nanomaterials Inc.). شکل و اندازه نانوذرات با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و آنالیز پراش اشعه ایکس (XRD) بررسی و تعیین گردید (شکل۲). برای تهیه محلول استوک ابتدا پودر نانوذرات اکسید منیزیم در محیط کشت تریپتیکاز سوی براث (Tryptic Soy Broth, Merck) سوسپانسه شد. سپس سوسپانسون در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو گردید و به مدت۳۰ دقیقه درحمام التراسونیک (Grant XB6, UK) همگن شد.

تهیه محلول پلی‌ال‌لایزین

پودر پلی‌ال‌لایزین تولید شرکت هاندری بلژیک (Epolyly TM, Handry, Belgium) توسط شرکت آرمان صنعت اهدا گردید. ابتدا محلول استوک در آب مقطر تهیه و پس از استریل کردن با فیلتر سرسرنگی ۰/۲۲ میکرومتر، رقت‌های مورد نظر تهیه شد.

تهیه محلول رزازورین

رزازورین با غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم در ۴۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل، با ورتکس کردن یکنواخت گردید و با فیلتر سرسرنگی ۰/۲۲ میکرومتر استریل شد. رزازورین یک اندیکاتور مناسب برای ارزیابی رشد باکتری‌ها می‌باشد (۱۶).

آماده‌سازی سوسپانسیون باکتریایی

باکتری لیوفیلیزه *اشریشیا کلی* O157:H7 (ATCC 35218) و *لیستریا منوسیتوژنز* (ATCC 19118) از گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی شیراز تهیه شد. از کشت لیوفیلیزه هر باکتری در محیط TSB کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. برای ارزیابی خالص بودن باکتری‌ها از *اشریشیا کلی* روی محیط مک‌کانکی آگار (MacConkey Agar, Merck) و از باکتری *لیستریا منوسیتوژنز* روی محیط پالکام آگار (Palkam Listeria Selective Agar, Merck) کشت خطی داده شد و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. مجدداً از هر پلیت در محیط TSB کشت تهیه شد و یک شب گرمخانه‌گذاری شد. مقداری از این کشت شبانه با بافر فسفات سالین استریل مخلوط گردید تا سوسپانسیونی با کدورت معادل نیم مک‌فارلند (کدورت معادل $۱/۵\times۱۰^{۸}$ باکتری در هر میلی‌لیتر) تهیه شد (۱۷). سپس با استفاده از بافرفسفات سالین استریل رقت‌های ۱۰تایی متوالی از سوسپانسیون باکتری مذکور تهیه گردید تا در نهایت دوز تلقیح (۱×۱۰^{۵} باکتری در هر میلی‌لیتر) بدست آمد. به منظور تأیید میزان دوز تلقیح، از رقت مورد نظر روی محیط تریپتیکاز سوی آگار (Tryptic Soy Agar, Merck) کشت سطحی داده شد و تعداد پرگنه‌ها شمارش شد.

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی نانوذرات اکسید منیزیم به روش احیاء رزازورین

با توجه به این که سوسپانسیون نانوذرات اکسید منیزیم شیری رنگ بود امکان ارزیابی اثر ضد میکروبی آن به روش کدورت‌سنجی چشمی یا جذب نوری با اسپکتروفتومتر وجود ندارد به همین دلیل از روش احیاء رزازورین استفاده شد. رزازورین یک اندیکاتور اکسیداسیون- احیاء است که برای بررسی رشد سلول به ویژه در بررسیهای سیتوتوکسیسیتی استفاده می‌شود. این ترکیب آبی رنگ بوده و غیرسمی و غیر فلورسنت است که در اثر واکنش اکسیداسیون- احیاء ناشی از متابولیسم سلولهای زنده به ترکیب رزورافین صورتی رنگ و بسیار فلورسنت تبدیل می‌شود (۱۸، ۱۶). در این روش حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) به عنوان کمترین غلظتی از ماده ضد میکروب که از تغییر رنگ کامل رزازورین از آبی به صورتی ممانعت می‌کند تعریف می‌شود (۴).

برای انجام این آزمایش تحت شرایط استریل به هر یک از چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه ۱۰۰ میکرولیتر محیط TSB اضافه شد. ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون نانوذرات اکسید منیزیم با غلظت اولیه ۸۱۹۲ میکروگرم در میلی‌لیتر به اولین چاهک هر ردیف اضافه شد و سپس تا دوازده چاهک رقت‌سازی متوالی انجام شد. سپس به هر چاهک ۳۰ میکرولیتر محلول رزازورین، ۲۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری (۱×۱۰^{۵} باکتری در هر میلی‌لیتر) و ۵۰ میکرولیتر محیط TSB استریل اضافه گردید و حجم همه چاهک‌ها ۲۰۰ میکرولیتر شد (غلظت نهایی نانوذرات اکسید منیزیم از ۴۰۹۶ در چاهک اول تا ۲ میکروگرم در میلی-لیتر در چاهک دوازدهم بود). برای جلوگیری از تبخیر محتوای چاهک‌ها اطراف درب میکرپلیت با چسب نواری پوشانده شد. برای هر آزمون کنترل مثبت (محیط کشت حاوی محلول رزازورین و سوسپانسیون باکتری) و کنترل منفی (محیط کشت حاوی محلول رزازورین و نانو ذرات) در نظر گرفته شد. میکروپلیت به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور شیکردار (۳۷ درجه سلسیوس و ۱۰۰ دور در دقیقه) گرمخانه‌گذاری شد. تغییر رنگ از آبی به صورتی رشد باکتری را نشان داد. کمترین غلظت از نانو ذرات که از این تغییر رنگ جلوگیری کرد، حداقل غلظت مهار کنندگی در نظر گرفته شد.

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی پلی‌ال‌لیزین

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی پلی‌ال‌لیزین به روش میکرودایلوشن انجام شد. روش رقیق‌سازی و رقت‌های تهیه شده مشابه نانوذرات اکسید منیزیم بود. سپس کدورت میکروپلیت (درساعت صفر و هر دو ساعت یک بار) با استفاده از دستگاه میکروپلیت ریدر (Biotek, ELX800, USA) درطول موج ۶۰۰ نانومتر و دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت خوانده شد. آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شدند.

ارزیابی اثر ترکیبی نانوذرات اکسید منیزیم و پلی‌ال-لایزین

به منظور بررسی برهمکنش ضدمیکروبی نانوذرات اکسید منیزیم و پلی‌ال‌لایزین غلظت مهاری مشترک Fractional (Inhibitory) Concentration تعیین گردید. FIC کسری از غلظت ماده مهارکننده در حالت ترکیب نسبت به وقتی که به تنهایی استفاده شود را نشان می‌دهد. برای تعیین FIC روشی موسوم به چکربورد (Checkerboard assay) استفاده شد (۱۹) و FIC از رابطه زیر محاسبه گردید (۲۰).

$FIC_{Nano\ mgO} = MIC_{Nano\ mgO}$ in combination $/MIC_{Nano\ mgO}$ alone

$FIC_{Polylysine} = MIC_{Polylysine}$ in combination $/MIC_{Polylysine}$ alone

$FIC\ index = FIC_{Nano\ mgO} + FIC_{Polylysine}$

ابتدا غلظت‌های دو برابر کم شونده متوالی از نانوذرات اکسید منیزیم و پلی‌ال‌لایزین به طور جداگانه تهیه شد. در ردیف بالا و ستون سمت چپ میکروپلیت ۹۶ خانه، در امتداد افقی ۵۰ میکرولیتر از نانوذرات اکسید منیزیم و در امتداد قائم ۵۰ میکرو-لیتر از پلی‌ال‌لایزین در هر چاهک ریخته شد. در هر چاهک ۳۰ میکرولیتر از محلول رزازورین و ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری اضافه شد. در مجموع حجم نهایی هر چاهک با محیط TSB به ۲۰۰ میکرولیتر رسانده شد. دو ستون به عنوان کنترل مثبت و کنترل منفی درنظر گرفته شد. سطح میکروپلیت با نوارچسب پوشانده شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور شیکردار (۱۰۰ دور در دقیقه، ۳۷ درجه سلسیوس) قرار گرفت. این آزمایش برای هر باکتری در سه تکرار جداگانه صورت گرفت.

نتایج تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی نانوذرات اکسید منیزیم

فعالیت ضدمیکروبی نانوذرات اکسید منیزیم برعلیه *شریشیا کلی* O157:H7 و *لیستریا منوسیتوژنز* به روش رزازورین تعیین شد (شکل ۳). بر این اساس مقدار MIC نانوذرات اکسید منیزیم برای *شریشیا کلی* O157:H7 و *لیستریا منوسیتوژنز* یکسان و برابر ۴/۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود.

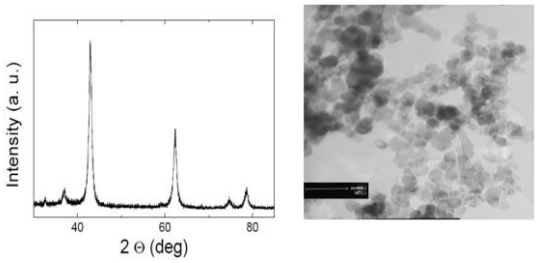
نتایج تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی پلی‌ال‌لیزین

در بررسی نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی پلی‌ال‌لیزین بر اساس جذب نوری، MIC به عنوان کمترین غلظتی در نظر گرفته شد که بعد از طی مدت زمان گرمخانه‌گذاری در ۳۷ درجه سلسیوس هیچ افزایش جذبی در طول موج ۶۰۰ نانومتر نداشت. حداقل غلظت مهارکنندگی پلی‌ال‌لیزین در مورد *لیستریا منوسیتوژنز* ۰/۱۳ و برای *شریشیا کلی* O157:H7 ۲/۰۵ میلی-گرم در میلی‌لیتر بود (نمودار ۱ و ۲). نتایج نشان داد که *لیستریا منوسیتوژنز* نسبت به *شریشیا کلی* حساسیت بیشتری نسبت به پلی‌ال‌لیزین داشت.

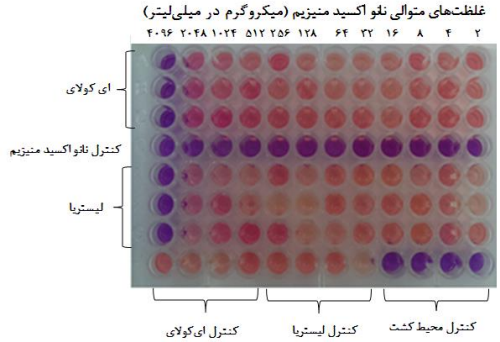
یافته‌ها

ویژگی‌های نانو ذرات اکسید منیزیم

برای بررسی اندازه، نحوه توزیع و مطالعات ساختاری نانوذرات اکسید منیزیم اندازه‌گیری SEM و آنالیز XRD انجام شد (۲۱). تصویر SEM نشان داد که نانوذرات اکسید منیزیم کروی با قطری در حدود ۲۰ نانومتر می‌باشند و به خوبی پراکنده شده‌اند و در الگوی XRD گسترش قله پیکها و عرض نسبتاً کم آنها درجه بالای کریستالینیتی نانوذرات و تشکیل ساختار نانو کریستالین کامل بدون ماده خارجی را نشان داد (شکل ۲).



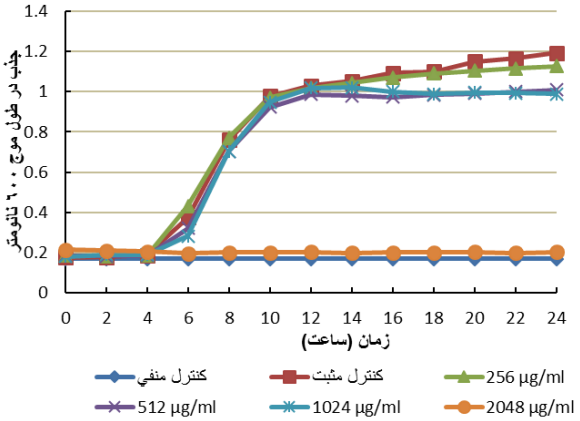
شکل ۲: تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) نانو ذرات اکسید منیزیم (سمت راست) و آنالیز پراش اشعه ایکس(XRD) (سمت چپ) (داده‌ها از کمپانی تولید کننده US Research Nanomaterials Inc. تهیه شده است)



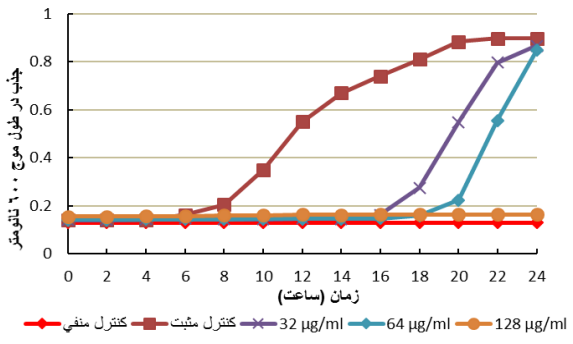
شکل ۳: تعیین MIC نانوذرات اکسیدمنیزیم برعلیه *شریشیا کلی* O157:H7 و *لیستریا منوسیتوژنز* با استفاده از رزازورین. رنگ صورتی نشانه رشد باکتری و رنگ آبی نشانگر مهار رشد می‌باشند.

نتایج تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی پلی‌ال‌لیزین

در بررسی نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی پلی‌ال‌لیزین بر اساس جذب نوری، MIC به عنوان کمترین غلظتی در نظر گرفته شد که بعد از طی مدت زمان گرمخانه‌گذاری در ۳۷ درجه سلسیوس هیچ افزایش جذبی در طول موج ۶۰۰ نانومتر نداشت. حداقل غلظت مهارکنندگی پلی‌ال‌لیزین در مورد *لیستریا مونوسیتوژنز* ۰/۱۳ و برای *اشریشیا کلی* O157:H7 ۲/۰۵ میلی-گرم در میلی‌لیتر بود (نمودار ۱ و ۲). نتایج نشان داد که *لیستریا مونوسیتوژنز* نسبت به *اشریشیا کلی* حساسیت بیشتری نسبت به پلی‌ال‌لیزین داشت.



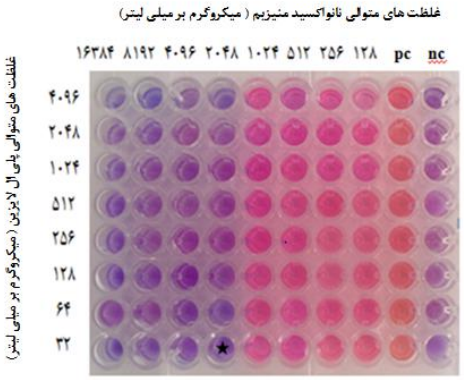
نمودار ۱: اثر غلظت‌های مختلف پلی‌ال‌لایزین بر مهار رشد باکتری *اشریشیا کلی* O157:H7 در دمای ۳۷ درجه سلسیوس. اعداد میانگین سه تکرار هستند.



نمودار ۲: اثر غلظت‌های مختلف پلی‌ال‌لایزین بر مهار رشد باکتری *لیستریا منوسیتوژنز* در دمای ۳۷ درجه سلسیوس. اعداد میانگین سه تکرار هستند.

نتایج تعیین حداقل غلظت مهاری مشترک

در این مطالعه حداقل غلظت مهاری مشترک برای نانوذرات اکسید منیزیم و پلی‌ال‌لایزین در حالت ترکیبی به روش چکربورد با استفاده از معرف رزازورین به دست آمد (شکل ۴).



شکل ۴: تعیین FIC نانوذرات اکسید منیزیم برعلیه *اشریشیا کلی* O157:H7 با استفاده از رزازورین. رنگ صورتی رشد و رنگ آبی مهار رشد را بیان می کند. pc: کنترل مثبت (محیط TSB و باکتری)، nc: کنترل منفی (محیط TSB و نانوذرات اکسید منیزیم)

همان طور که در جدول ۱ نشان داده شده است مقدار MIC برای دو باکتری درحالت ترکیب نانوذرات اکسید منیزیم و پلی‌ال‌لایزین کمتر از حالت منفرد آنهاست. این دو باکتری حساسیت بیشتری به ترکیب دو ماده ضد میکروبی دارند. نتایج حاصل از این آزمون به صورت غلظت مهاری مشترک بیان شد. مقدار FIC برای *لیستریا منوسیتوژنز* ۰/۷۵ و برای باکتری *اشریشیا کلی* ۰/۵۲ بدست آمد. بر این اساس ترکیب نانو اکسید منیزیم و پلی‌ال‌لایزین در مهار رشد دو باکتری اثر هم‌افزایی جزیی داشته‌اند.

بحث

این تحقیق نشان داد که نانوذرات اکسید منیزیم اثر ضد میکروبی قابل قبولی بر علیه لیستریا مونوسیتوژنز و اشریشیا کلای O157:H7 دارد به طوری که در غلظت ۴/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر مانع از رشد آنها گردید. Gokulakrishna و همکاران اثر ضد باکتریایی پنج نانو اکسید فلزی مختلف از جمله نانو اکسید منیزیم را روی باکتری‌های پاتوژن بررسی کردند و نشان دادند که حداکثر حساسیت را *استرپتوکوکوس پنومونیه* و کمترین حساسیت را کلبسیلا به نانو اکسید منیزیم داشتند (۲۲).

جدول ۱: نتایج مقدار حداقل غلظت بازدارنده رشد و غلظت بازدارنده مشترک نانو اکسید منیزیم و پلی‌ال‌لیزین

باکتری	MIC (mg /ml)			شاخص FIC	تاثیر متقابل
	نانو اکسید منیزیم	پلی‌ال‌لایزین	نانو اکسید منیزیم + پلی‌ال‌لایزین		
لیستریا منوسیتوژنز	۴/۱۰	۰/۱۳	۰/۰۳۲ + ۲/۰۵	۰/۷۵	هم‌افزایی جزیی
اشریشیا کلی	۴/۱۰	۲/۰۵	۰/۰۳۲ + ۲/۰۵	۰/۵۲	هم‌افزایی جزیی

مطالعات زیادی نشان داده‌اند که فعالیت ضدمیکروبی نانو اکسید منیزیم به دلیل تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن مانند آنیون سوپراکسید می‌باشد. با افزایش سطح نانوذرات غلظت آنیون سوپراکسید درمحلول زیاد می‌شود که باعث تخریب بیشتر دیواره سلول باکتری می‌شود (۹). در یک کار پژوهشی Krishnamoorthy و همکاران مکانیسم فعالیت ضد میکروبی نانو اکسید منیزیم را بر علیه باکتری‌های گرم منفی *اشریشیا کلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* و باکتری‌های گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* تعیین کردند. حداقل غلظت مهاری رشد روی *اشریشیا کلی* ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و روی *سودوموناس آئروژینوزا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. آنها اذعان داشتند که حساسیت باکتری‌ها به نانوذرات فقط به ساختار دیواره سلولی مربوط نمی‌شود بلکه ممکن است به پراکسیداسیون چربی و تولید گونه‌های فعال اکسیژن نیز مربوط باشد (۴).

Ingudam و همکاران تاثیر ضد باکتریایی نانو ذرات اکسید منیزیم با میانگین اندازه ۲۰ نانومتر بر تعدادی از پاتوژن‌های غذایی از جمله *اشریشیا کلی*، سالمونلا و کمپیلوباکتر را بررسی کردند. مقادیر MIC به روش میکروپلیت و معرف رزازورین درغلظت‌های مختلف نانوذرات با میزان تلقیح باکتریایی 10^4cfu/ml تعیین شد. MIC برای *اشریشیا کلی*، سالمونلا و کامپیلوباکتر به ترتیب ۱، ۲ و ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بدست آمد. در غلظت ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر کامپیلوباکتر در مدت ۲ ساعت کاملاً مهار شد. در غلظت ۲ تا ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر رشد *اشریشیا کلی* و سالمونلا طی ۸-۶ ساعت کاملاً متوقف شدند. بررسی‌های بیشتر نشان داد که اختلاف بار منفی سلول باکتری و بار مثبت نانو ذره به صورت یک جاذب الکتروستاتیک عمل کرده و باعث اتصال نانو ذره به سطح سلول شده است در نتیجه با تخریب غشاء سلول باکتری و نشت مواد موجب مرگ سلول می‌شود (۲۳).

در تحقیق حاضر پلی‌ال‌لایزین اثر ضد میکروبی قابل توجهی بر *لیستریا مونوسیتوژنز* داشت به طوری که در غلظت ۰/۱۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر موجب مهار رشد آن گردید. این مقدار برای مهار رشد باکتری اشرشیا کلای ۲/۰۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. مطالعات متعددی در مورد فعالیت ضدمیکروبی پلی‌ال‌لایزین صورت گرفته است. Li و همکاران فعالیت ضدمیکروبی و مکانیسم عمل پلی‌ال‌لایزین را بر علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* بررسی کردند. قطر هاله باز دارنده رشد دو باکتری تیمار شده با ۰/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر پلی‌ال‌لایزین بزرگتر از گروه کنترل بود. مشاهده با میکرسکوپ الکترونی نشان داد که مورفولوژی سلول باکتری‌ها تغییر کرد و افزایش هدایت الکتریکی سوسپانسیون باکتری نشان داد که شکست غشاء سیتوپلاسمی سلول باکتری باعث نشت یونهای درون سلول باکتری شد. مطالعات دیگر بر روی پروتئین سلول باکتری ثابت کرد که پلی‌ال‌لایزین با تخریب پروتئینها باعث مرگ سلول باکتری می‌شود (۱۳). مطالعات دیگر بر روی پروتئین سلول باکتری ثابت کرد که پلی‌ال‌لایزین با تخریب پروتئینها باعث مرگ سلول باکتری می‌شود (۲۴). در یک بررسی دیگر Najjar و همکاران ترکیب پلی‌ال‌لایزین و نایسین را برای کنترل *استافیلوکوکوس اورئوس* و فلور میکربی دهان به روش چکر بورد بکار بردند. محاسبات FIC نشان داد ترکیب این دو ماده *استافیلوکوکوس اورئوس* را به طور کامل مهار کرد، اما بر فلور میکربی دهان اثر مهاری کمی داشت (۱۴).

در مطالعه حاضر تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی نانو اکسید منیزیم و پلی‌ال‌لایزین نشان داد که این دو ترکیب باعث مهار رشد باکتری‌ها نسبت به گروه کنترل شدند. براساس نتایج FIC حضور توأم نانو اکسید منیزیم و پلی‌ال‌لایزین بر رشد *اشریشیا کلی* O157:H7 و *لیستریا منوسیتوژنز* اثر هم‌افزایی جزئی داشت. همچنین باعث کاهش حداقل غلظت مهارکنندگی ترکیبی دو ماده شد. مقادیر شاخص FIC کوچکتر از ۰/۵ نشان-

دهنده اثر هم‌افزایی، مقادیر بین ۰/۷۵-۰/۵ هم‌افزایی جزئی، مقادیر مابین ۱-۰/۷۵ اثر جمع‌پذیر (Additive effect)، مقادیر بالای ۱ عدم واکنش و مقادیر بالای ۴ ناشی از وجود اثر متضاد (Antagonist effect) می‌باشد (۱۴). به نظر می‌رسد به دلیل افزایش نفوذپذیری غشاء سلول باکتری در حضور پلی‌ال‌لیزین اثر ضدمیکروبی نانوذرات اکسید منیزیم افزایش می‌یابد (۲۵).

وقتی مخلوط چند ماده ضدمیکروبی همزمان بر جمعیت میکروبی یکنواختی عمل می‌کنند، ممکن است در مقایسه با اثرات انفرادی آنها، منجر به پاسخ ضد میکروبی افزایش یافته یا بدون تغییر شوند. مواد ضدمیکروبی که از یک گروه می‌باشند یا دارای مکانیسم عمل یکسان هستند احتمالاً فقط اثر جمع‌پذیر دارند، درحالی که آنهایی که مکانیسم عمل متفاوت دارند یا محل اثر آنها متفاوت است ممکن است اثر هم‌افزایی یا متضاد داشته باشند (۲۶، ۲۷). در واقع تکنولوژی ترکیبی در نگهداری مواد غذایی، غلظت مواد نگهدارنده را کاهش داده و با افزایش اثرات ضد میکروبی مواد کیفیت محصول و سلامتی آن را بهتر حفظ می‌نماید.

این تحقیق نشان داد که نانوذرات اکسید منیزیم و ماده ضد میکروبی طبیعی پلی‌ال‌لایزین اثر ضد میکروبی بر روی دو باکتری غذازاد *اشریشیا کلی* O157:H7 (ATCC 35218) و *لیستریا منوسیتوژنز* (ATCC 19118) داشتند و استفاده توام آن‌ها اثر هم‌افزایی جزیی داشت. برای مطالعات آتی پیشنهاد می‌شود که اثر نانو اکسید منیزیم به تنهایی و توام با پلی‌ال‌لایزین در حفظ سلامت و ماندگاری مواد غذایی بررسی گردد.

تقدیر و تشکر

از شرکت آرمان صنعت مشهد به خاطر تامین پلی‌ال‌لایزین و از پرسنل محترم آزمایشگاه‌های میکروب‌شناسی و شیمی مواد غذایی گروه بهداشت دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه شیراز به خاطر فراهم کردن شرایط مناسب برای انجام تحقیق تقدیر و تشکر می‌گردد.

تعارض منافع:

بین نویسندگان و مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران هیچ گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

References

1. Ye R, Xu H, Wan C, Peng SH, Wanga L, Xu H, Aguilar ZP, Xiong Y, Zeng ZH. Antibacterial activity and mechanism of action of e-poly-L-lysine. Biochem Biophys Res Commun. 2013;439:148–53.
2. Moshtaghi H, Abbasvali M, Mohammadi E, Safian AR, Adel M. Investigation of antibacterial effects of ethanolic extract of Sumac (*Rhus coriaria* L.) against *Escherichia coli* in vitro. Iraninan J Food Hygine. 2013;3(10):1-9.
3. Jin T, He Y. Antibacterial activities of magnesium oxide (MgO) nanoparticles against foodborne pathogens. J Nanopart Res. 2011;13:6877–85.
4. Krishnamoorthy K, Manivannan G, Kim SJ, Jeyasubramanian K, Premanathan M. Antibacterial activity of MgO nanoparticles based on lipid peroxidation by oxygen vacancy. J Nanopart Res. 2012;14:1063-6.
5. Shi L, Xing L, Hou B, Ge H, Guo X, Tang ZH. Inorganic nano mental oxides used as anti-microorganism agents for pathogen control. Current Research Technol and Edu Topics in Applied Microb and Microb Biotechnol. 2010;361-8.
6. Emamifar A, Kadivar M, Shahedi M, Soleimanian-Zad S. Effect of nanocomposite packaging containing Ag and ZnO on inactivation of *Lactobacillus plantarum* in orange juice. Food Control. 2011;22:408-13.
7. Krishnamoorthy K, Moon JY, Hyun HB, Cho SK, Kim SJ. Mechanistic investigation on the toxicity of MgO nanoparticles toward cancer cells. J Mater Chem. 2012;22:24610–7.
8. Li X, Xing Y, Jiang Y, Ding Y, Li W. Antimicrobial activities of ZnO powder-coated PVC film to inactivate food pathogens. Int J Food Sci Technol. 2009;44:2161–8.
9. Tang ZH, Lv BF. MgO nanoparticles as antibacterial agent: prepration and activity. Brazilian J Chem Eng. 2014;31(30):591-601.
10. Lei H, Dianqing L, Yanjun L, Evans DG, Xue D. Influence of nano-MgO particle size on bactericidal action against *Bacillus subtilis* var. niger. Chinese Sci Bulletin. 2005;50(6):514-9.
11. Shih IL, Shen MH, Van YT. Microbial synthesis of poly-l-lysine and its various applications. Bioresour Technol. 2006;97:1148–59.

12. Chang SS, Wendy-Lu WY, Park SH, Kang DH. Control of foodborne pathogens on ready-to-eat roast beef slurry by ε-polylysine. Int J Food Microbiol. 2010;141:236–41.

13. Li YQ, Han Q, Feng JL, Tian WL, Mo HZ. Antibacterial characteristics and mechanisms of poly-lysine against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Food Control. 2014;43:22-7.

14. Najjar MB, Kashtanov D, Chikindas ML. Natural antimicrobials ε-poly-l-lysine and Nisin A for control of oral microflora. Probiotics & Antimicro Prot 2009;1(2):143-7.

15. Miya S, Takahashi H, Hashimoto M, Nakazawa M, Kuda Ta, Koiso H, Kimura B. Development of a controlling method for *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. in fresh market beef by using polylysine and modified atmosphere packaging. Food Control. 2014;37:62-7.

16. Gahlut A, CHhillar AK. Evaluation of antimicrobial potential of plant extracts using resazurin based microtiter dilution assay. Int J Pharm Pharm Sci. 2013;5(2):372-6.

17. Petrus EM, Tinakumari S, Chai LC, Ubong A, Tunung R, Elexson N, Chai LF, Son R. A study on the minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of nano colloidal silver on food-borne pathogens. Int Food Res J. 2011;18:55-66.

18. Sarker SD, Nahar L, Kumarasamy Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurinas an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. Methods. 2007;42:321–4.

19. Najjar MB, Kashtanov D, Chikindas ML. Poly-L-lysine and Nisin A act synergistically against gram-positive food-borne pathogens *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. Journal compilation The Society for Applied Microbiology. Lett Appl Microbiol. 2007;45:13–8.

20. Basri DF, Xian LW, Shukor NIA, Latip J. Bacteriostatic antimicrobial combination: Antagonistic interaction between Epsilon-Viniferin and Vancomycin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. BioMed Res Int. 2014. vol. 2014, Article ID 461756

21. Tang ZhX, Fang X, Zhang ZH, Zhou T, Zhang XY, Sh LE. Nano-size MgO as antibacterial agent: prepration and characteristics. Brazilian J Chem Eng. 2012;29:775-81.

22. Gokulakrishnan R, Ravikumar S, Raj JA. In vitro antibacterial potential of metal oxide nanoparticles against antibiotic resistant bacterial pathogens. Asian Pac J Trop Dis. 2012;2(5):411-3.

23. Ingudam SH, Irwin P, Reed S, He Y. Antibacterial activity of magnesium oxide nanoparticles on *Escherichia coli* O157:H7 Salmonella, and Campylobacter. J Nanomed Nanotechol. 2012;3(9):78.

24. Li S, Tang L, Chen X, Liao L, Li F, Mao Z. Isolation and characterization of a novel ε-poly- L-lysine producing strain: Streptomyces griseofuscus. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 2010;38: 557-63.

25. Liu H, Pei H, Han Z, Feng G, Li D. The antimicrobial effects and synergistic antibacterial mechanism of the combination of ε-Polylysine and nisin against Bacillus subtilis. Food Control. 2015;47: 444-50.

26. Nasr A, Kermanshahi RK, Nahvi A. Study the hurdle effect of some organic and chemical food preservatives on a resistance of Bacillus cereus sp. Iranian J Food Sci and Tech Res. 2007;2:11-21.

27. Bell A. Antimalarial drug synergism and antagonism: Mechanistic and clinical significance. FEMS Microbiology Letters. 2005;253:171-84.