

بررسی اثرات نایسین و نیتريت عليه لیستریامو نوسایتوجنز

باقر یخچالی*، دکتر منوچهر شهاست و دکتر فریدون ملک‌زاده

گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه تهران

چکیده

در این بررسی اثرات باکتریوستاتیکی و باکتری‌ساییدی نایسین علیه لیستریامونوسایتوجنز و نقش آن در حفظ و نگهداری مواد غذایی و همچنین امکان جایگزینی ویا همراه کردن آن با نیتريت مورد مطالعه قرار گرفته است. این آنتی‌بیوتیک پولی‌پپتیدی در $\text{pH} = 5.5$ در تراکم پائین بر روی باکتری‌ها اثر باکتری‌ساییدی دارد ولی در pH های بالاتر تراکم بالایی از آن لازم است. تعیین تعداد باکتری‌های زنده بعد از قرار گرفتن سوسپانسیون آنها در معرض تراکم‌های مختلف نایسین نشان داد که برای از بین بردن همه باکتری‌ها بایستی تراکم نایسین به حد کافی فراهم گردد. هنگامی که نایسین همراه نیتريت بکار برده میشود تراکم نیتريت لازم برای کشتن باکتری‌ها حتی از حد مجاز (۲۰۰ ppm) نیز پائین‌تر می‌آید. در شرایط اسیدی مقدار نیتريت و نایسین کافی برای کشتن باکتری‌ها فوق‌العاده کاهش پیدا می‌کند.

Evaluation of the Antimicrobial Activity of Nisin and Nitrite on *Listeria monocytogenes*

B. Yakhchali; Dr.M. Shahamat and Dr.F. Malekzadeh

Department of Biology, Faculty of Science, University of Tehran, Iran.

Abstract

Nisin, this polypeptide antibiotic, exhibited bactericidal activity when tested against bacteria at low Concentration in the medium of $\text{pH} = 5.5$. At the higher PH values higher concentration of nisin were needed. Moreover, it was shown that to kill all bacterial cells in medium, concentration of nisin must be sufficient. Our studies indicated that, when nisin used in combination of nitrite against *L. monocytogenes*, it reduced the concentration of nitrite needed for the eradication of bacteria, even lower than the standard safety and permissible value (200 ppm). In the acid conditions the amount of nitrite plus nisin—sufficient to kill bacteria, reduced markedly.

This preliminary experiments showed that nisin in combination of nitrite can be used as a reliable and promising food preservative.

مقدمه

در pH های مختلف بررسی شده تا امکان استفاده از آن به تنهایی یا همراه بانیتريت به منظور کاهش دادن مقدار نیتريت در حفظات و نگهداری مواد غذایی مشخص گردد.

وسایل کار و روشهای مطالعه

۱- مواد و وسایل

در آزمایشات انجام شده از باکتری و مواد و وسایل زیر استفاده شده است. باکتری *Listeria monocytogenes* nctc 7973 از آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده علوم فراهم شده است. برای کشت باکتری و بررسی اثر نایسین و نیتريت و بدست آوردن حداقل تراکم بازدارنده رشد (MIC) از محیط کشت (T. S. B) و برای تجدید کشت و بدست آوردن حداقل تراکم باکتری کش (MBC) از محیط (T. S. A) استفاده شده است. مواد ضد میکروبی بکار برده شده در این آزمایش نایسین^۳ با نام تجارتي نيساپلین^۴ ساخت کارخانه Aplin and Barrett Ltd Eng با فعالیت

۱۰۰۰۰۰ واحد در هر گرم و نیتريت به صورت نیتريت سدیم (Merck) میباشد.

۲- روش مطالعه

در بررسی اثر نایسین و نیتريت به تنهایی و توأم با یکدیگر علیه لیستریا، ابتدا محیط کشت مایع T. S. B با سه pH مختلف (۰٫۰، ۶ و ۷) تهیه و آنگاه تراکم های مختلف نایسین (۱۰۰-۱۰۰۰ ppm) و نیتريت (۲۰۰-۵۰۰ ppm) به تنهایی و نیز توأم با یکدیگر در محیط های کشت فوق تنظیم شده است. PH محیط های کشت با اسید کلریدریک (۶N و ۱N) به میزان ۱٫۰ واحد بالاتر از PH مورد نظر تنظیم گردید (در اثر اتوکلاو PH محیط ۱٫۰ واحد پائین می آید) (Shahamat et al., 1981). برای اندازه گیری PH از PH متر با الکتروود شیشه ای استفاده شده و محیط ها توسط اتوکلاو در حرارت ۱۲۱ به مدت ۱۰ دقیقه استریل شده است برای تلقیح محیط های آماده شده فوق از سوسپانسیون حاوی ml^{۱۰۰} × ۸ باکتری در سرم فیزیولوژیک استفاده شده است. (تعداد باکتریها در سوسپانسیون اولیه با استفاده از روش pour plate تعیین گردیده). یک قطره از سوسپانسیون اولیه بوسیله سرنگ استریل یکبار مصرف به هر لوله آزمایش افزوده شده و آنگاه لوله ها در ۳۷°C قرار داده شد، و پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت رشد باکتری در مقایسه با لوله های شاهد (محیط کشت ماده ضد میکروبی بدون

نایسین ماده ضد میکروبی با طیف اثر باریک و اختصاصی است و علیه باکتری های گرم مثبت مؤثر است ولی با کتریهای منفی، کپکها و مخمرها نسبت به آن مقاوم اند. (Bell et al., 1985 & Hurst, 1983) حساسیت باکتریهای (g⁺) در برابر نایسین متغیر بوده و گونه های مختلف یک جنس و حتی سویه های یک گونه حساسیت متفاوتی نسبت به آن نشان میدهند.

(Somers, 1981; Scott, 1981; Rayman, 1983 & Hurst, 1983)

مکانیسم اثر نایسین دوگانه است: (۱) مرحله دوم تندش اسپوررا متوقف میسازد و اسپورهای حرارت دیده در برابر نایسین حساسیت بیشتری نشان می دهند. (۲) در سلولهای رویشی مانع سنتز دیواره سلولی میشود (Linnett, 1973; Reisinger et al, 1980) که بنظر میرسد این نقش ثانویه بوده و محل اثر اصلی غشاء سیتوپلاسمی باشد. تاثیر بر روی غشاء نظیر اثر دترجنت ها بوده و ضایعه غیر قابل برگشت ایجاد میکنند (Rayman et al. 1981; Ruhr, 1985). خواص ضد میکروبی نایسین به pH محیط بستگی دارد (Hurst, 1973).

نایسین برای حفظ و نگهداری مواد غذایی بویژه غذاهای اسیدی از آسیب باکتریهای g⁺ مننده بکار رفته است (Hurst, 1978). در اغلب کشورهای جهان، از جمله ایران (نشریه شماره ۹۰ موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی) افزودن نایسین به لبنیات، کنسرو سبزیجات، شیر خشک، ژلاتین، قارچها، گوشت های کنسرو شده مجاز شناخته شده است (Hurst, 1983; Rayman et al., 1981). در سالهای اخیر کوششهایی در جهت جایگزین کردن مواد نگهدارنده بی خطر بجای نیتريت که اثرات سرطان زایی آن روشن گشته بعمل آمده و نشان داده شده که در مورد کلاستره یدئومها با بکار بردن نایسین به همراه نیتريت میتوان به میزان قابل توجهی از مقدار نیتريت لازم در کنسروها کاست (Rayman et al. 1983, Rayman et al. 1981) با توجه به اهمیت حفظ و نگهداری مواد غذایی کنسرو شده بوسیله مواد نگهدارنده سالم، در این بررسی اثرات نایسین به تنهایی و همراه بانیتريت علیه لیستریا مونوسایتو جنز که در انسان و حیوانات بیماریزا بوده و لیستریوز ایجاد مینماید و رویداد آن در انسان در اثر خوردن شیر خام و پاستوریزه نشده، محصولات گوشتی و سبزیجات تازه گزارش شده است. (Michael et al. 1981; Fleming et al., 1985; Altaf., 1979; Michael, 1985; Schlech et al, 1983).

1- Tryptic Soy Broth

3- Nisin

2- Tryptic Soy Agar

4- Nisaplin

همانطور که در جدول ۱ مشخص شده است در PH=۵ تا تراکم ۳۰۰ ppm اثر ضد میکروبی نایسین مشهود نبوده و رشد با کتری مشاهده میشود. از تراکم ۴۰۰ ppm نایسین اثر خود را نشان میدهد. در PH=۶ تراکم موثر ۶۰۰ و در PH=۶ تراکم موثر ۸۰۰ ppm است. در هر سه مورد MIC برابر با MBC است و بنظر میرسد که نایسین اثر کشنده بر روی با کتری دارد. نتایج نشان میدهد که هرچه PH محیط بالا می رود MIC و MBC نایسین نیز افزایش می یابد، بطوریکه مقدار بیشتری نایسین برای از بین بردن با کتری لازم است. اثر نیتريت تا حد تراکم مجاز مصرف آن در مواد غذایی بر روی با کتری در سه PH مورد بررسی قرار گرفته است.

جدول ۲- اثر نیتريت عليه L. monocytogenes در سه PH مختلف

PH			تراکم نیتريت ppm
۶	۵	۶	
+	+	+	۵۰
+	+	+	۱۰۰
+	+	+	۱۵۰
+	+	+	۲۰۰

—= رشد با کتری
 —= عدم رشد با کتری
 بطوریکه در جدول ۲ مشاهده میشود تراکم ۲۰۰ ppm نیتريت عليه لیستریا اثر ضد میکروبی نداشته و با کتری در این تراکم در سه PH مختلف اسیدی رشد نموده است. در بررسی اثرات توأم نایسین و نیتريت نتایج جالبی بچشم می خورد جدول ۳ نتایج بکار بردن توأم نیتريت و نایسین عليه لیستریا را نشان میدهد. در PH=۵ تراکم های ۲۰۰-۵۰۰ ppm نیتريت و ۱۰۰ ppm نایسین از رشد با کتری ممانعت بعمل می آورد. در صورتیکه تراکم موثر نایسین به تنهایی ۴۰۰ ppm است و نیتريت نیز تا حد تراکم ۲۰۰ ppm قادر به از بین بردن لیستریا نیست. در حالیکه بکار بردن توأم این دو ماده تراکم مورد نیاز هر دو ماده را به میزان قابل توجهی کاهش داده است (۵۰ ppm نیتريت و ۱۰۰ ppm نایسین). در PH=۶ نیز در تراکم های ۲۰۰-۵۰۰ ppm نیتريت ۱۰۰ ppm نایسین از رشد

کشت با کتری) مورد سنجش قرار گرفته است. به منظور تعیین اثر با کتریوستاتیک یا با کتریسایدی مواد ضد میکروبی از کشت های فاقد رشد آشکار (شفاف) به محیط کشت T.S.A انتقال داده با قرار دادن در گرمای ۳۷°C رشد یا عدم رشد با کتریها ثبت شده است. هر آزمایش ۲ بار تکرار گردیده است.

نتایج

در این بررسی اثر نایسین به تنهایی و توأم با نیتريت عليه با کتری Listeria monocytogenes در سه PH ۶، ۵، ۶ مورد مطالعه قرار گرفته است. مطالعات انجام شده درباره اثر PH بر روی فعالیت نایسین نشان داده که نایسین در PH خنثی کمترین فعالیت را دارد و در PH بالاتر غیر فعال است. چون بنظر میرسد PH اسیدی برای فعالیت نایسین مناسبتر است لذا در این مطالعه در PH اسیدی اثر نایسین بررسی شده است و تأثیر سه PH اسیدی بر فعالیت این ماده عليه با کتری مذکور مورد مطالعه قرار گرفته و نتایج آن در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱- اثر با کتریوستاتیکی و با کتریسایدی نایسین عليه L. monocytogenes در سه PH مختلف

PH						تراکم نایسین ppm
۶		۵		۶		
MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	
+	+	+	+	+	+	۰
+	+	+	+	+	+	۱۰۰
+	+	+	+	+	+	۲۰۰
+	+	+	+	+	+	۳۰۰
+	+	+	+	-	-	۴۰۰
+	+	+	+	-	-	۵۰۰
+	+	-	-	-	-	۶۰۰
+	+	-	-	-	-	۷۰۰
-	-	-	-	-	-	۸۰۰
-	-	-	-	-	-	۹۰۰
-	-	-	-	-	-	۱۰۰۰

—= عدم رشد با کتری
 + = رشد با کتری

جدول ۲- اثر توام بهترینیت (ppm ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰) و تراکم های مختلف نایسین علیه *L.monocytogenes*

PH=۶/۵						PH=۶						PH=۵/۵						نایسین						
۲۰۰ppm		۱۵۰ppm		۱۰۰ppm		۵۰ppm		۲۰۰ppm		۱۵۰ppm		۱۰۰ppm		۵۰ppm		۲۰۰ppm			۱۵۰ppm		۱۰۰ppm		۵۰ppm	
MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC		MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC
+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	۱۰۰
-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	۲۰۰
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	۴۰۰
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	۵۰۰
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	۶۰۰
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	۷۰۰
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	۸۰۰
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	۹۰۰
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	۱۰۰۰

+ = رشد باکتری - = عدم رشد باکتری

از تراکم ۶۰۰ ppm و ۸۰۰ ppm نمایان می‌گردد. بطور کلی به نظر می‌رسد که نایسین در تراکم‌های نسبتاً پائین (۴۰۰ ppm) می‌تواند اثر باکتری‌سایدی علیه لیستریا داشته باشد و این اثر در $PH = ۵$ آشکارتر است. ولی در $PH = ۶$ در تراکم‌های بالاتر نایسین اثر باکتری‌سایدی از خود بروز می‌دهد. به عبارت دیگر با بالا رفتن pH فعالیت نایسین کاهش یافته و برای از بین بردن باکتریها تراکم بیشتری از نایسین لازم است. در زمینه حفظ و نگهداری مواد غذایی از مواد شیمیائی ضد میکروبی استفاده می‌شود (Frazier et al 1983) و علاوه اثرات توام چند فاکتور علیه باکتریها از جمله لیستریا مورد بررسی قرار گرفته است. شهاست و همکارانش در سال ۱۹۸۱ (Shahamat et al 1981) تأثیر توام کلرورسدیم، PH و درجه حرارت را در خاصیت ضد میکروبی نیتريت بررسی کرده و به این نتیجه رسیده‌اند که بالا رفتن PH اثر ضد میکروبی نیتريت را کاهش می‌دهد و نیتريت در $PH = ۵$ حداکثر فعالیت را علیه لیستریا دارد. کاهش درجه حرارت فعالیت نیتريت علیه لیستریا را افزایش می‌دهد بطوریکه در PH ثابت هرچه درجه حرارت کاهش پیدا میکند فعالیت ضد باکتریایی نیتريت افزایش می‌یابد کاهش درجه حرارت همراه با کاهش PH فعالیت ضد باکتریایی نیتريت علیه لیستریا را شدیداً افزایش می‌دهد بطوریکه در درجه حرارت $۳۷^{\circ}C$ و $PH = ۷$ رشد لیستریا در تراکم بالای ppm ۲۰۰۰ متوقف می‌شود در حالیکه در درجه حرارت ۴ و $PH = ۵$ رشد این باکتری در تراکم بالای ppm ۴۰۰ متوقف می‌شود. این محققین همچنین نشان دادند که کلرورسدیم بیشترین تأثیر را روی اثر باکتریوستاتیکی نیتريت سدیم دارد. تلفیق این سه فاکتور (کاهش PH، کاهش درجه حرارت و افزایش تراکم نمک طعام) میزان نیتريت لازم برای رشد لیستریا را به پائین‌تر از حد مجاز مصرف نیتريت (۲۰۰ ppm) در مواد غذایی کاهش داده است.

Bell و همکارانش در سال ۱۹۸۵ (Bell et al., 1985) اثر توام کلرورسدیم و نایسین را در متوقف کردن رشد *B. licheniformis* مطالعه نموده و نشان داده‌اند که نمک اثر اسپورکشی نایسین را با متوقف کردن جذب نایسین بر روی سلول مختل می‌سازد.

ما در کار تحقیقی خود، کوششی در جهت نشان دادن تأثیر توام نایسین و نیتريت در سه PH مختلف در مقایسه با اثرات هر یک از آنها به تنهایی در حفظ و نگهداری اغذیه کنسرو شده بعمل آورده‌ایم. طبق استانداردهای بین‌المللی حداکثر تراکم مجاز نیتريت در اغذیه کنسرو شده ۲۰۰ ppm است و هدف در این بررسی جستجوی تراکمی از نایسین بوده که به هنگام همراه کردن با تراکم‌های پائین نیتريت (کمتر از ۲۰۰ ppm) بتواند

با کتری سماعت بعمل می‌آورد. تراکم موثر نایسین و نیتريت به تنهایی بترتیب ۶۰۰ ppm و بالای ۲۰۰ ppm است. بنابراین بکار بردن توأم این دو ماده MBC آنها را کاهش داده و اثر نیتريت در کاهش MBC نایسین در این PH بیش از $PH = ۵$ بوده است. در $PH = ۶$ تراکم ppm ۵ نیتريت اثری بر تراکم موثر نایسین برای از بین بردن باکتری نشان نمی‌دهد و ۸۰۰ ppm نایسین برای این منظور مورد نیاز است. در تراکم‌های ppm ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ نیتريت میزان نایسین مورد نیاز برای از بین بردن باکتری کاهش یافته و در تراکم ppm ۲۰۰ نیتريت تراکم موثر نایسین علیه باکتری ۲۰۰ ppm است. نتایج بدست آمده وجود اثر سینرژیسم بین نیتريت و نایسین را ثابت می‌کند.

بحث

لیستریا مونوسایتوجنز عامل بسیاری از بیماریهای عفونی نظیر مننژیت، مننگوآنسفالیت و سقط جنین بوده و در سالهای اخیر لیستریوز در رابطه با آلودگی مواد غذایی شیوع بسیاری داشته و یکی از راههای انتقال آن مصرف مواد غذایی آلوده بوده است. لیستریوز در برخی موارد بویژه در بیماران ایمنوساپرسد و در دوره حاملگی زنان بیماری خطرناک و مهلکی محسوب می‌شود (Fleming et al, 1985)

برای حفظ و نگهداری مواد غذایی و جلوگیری از انتقال بیماریهای عفونی از طریق مواد غذایی از مواد شیمیائی ضد میکروبی استفاده بعمل می‌آید. نایسین ماده ضد میکروبی است که از *Strep. lactis* بدست می‌آید به مقدار تجارتنی تهیه شده و در دسترس قرار دارد. این ماده بویژه در سالهای اخیر به منظور حفظ و نگهداری مواد غذایی مصرف بیشتری پیدا کرده است (Frazier et al, 1983). در این مطالعه کوشش در جهت بررسی اثرات باکتریوستاتیکی و باکتری‌سایدی نایسین علیه لیستریا و نقش آن در حفظ و نگهداری مواد غذایی و امکان جایگزینی یا تلفیق آن با نیتريت بعمل آمده است.

در مطالعه اثر نایسین علیه لیستریا مونوسایتوجنز سه PH اسیدی، ۵، ۶، ۷ در نظر گرفته شد. زیرا مطالعات گذشته و تجربیات مقدماتی نشان داده است که PH بالا کاهش دهنده فعالیت نایسین است و در PH قلیائی نایسین غیر فعال می‌شود (Hurst, 1978; Rayman et al. 1981; Scott et al. 1981).

همانطور که جدول (۱) نشان می‌دهد در $PH = ۵$ از تراکم ppm ۴۰۰ اثر متوقف کننده رشد نایسین علیه لیستریا ظاهر می‌شود و این اثر از این تراکم به بالا کشنده باکتری است (MIC=MBC). با بالا رفتن PH به ۶ و ۷ این اثر به ترتیب

Rayman et al.,) ۱۹۸۱ و همکارانش در سال ۱۹۸۱ (Rayman et al., 1981) امکان جانشین کردن نایسین بجای نیتريت با بکاربردن این دو ماده به همراه یکدیگر را در حفظ و نگهداری انواع گوشت مورد مطالعه قرار داده و نتیجه میگیرند که ۷۰ ppm نایسین بر ۱۰۰ ppm نیتريت برای متوقف کردن رشد اسپور *Cl. sporogenes* در گوشت برتری دارد. همراه کردن ۴ ppm نیتريت با ۷۰-۱۰۰ ppm نایسین تقریباً بطور کامل از رشد اسپورها جلوگیری بعمل می‌آورد و از این رو این دو ماده اثر سینرژیستی بیکدیگر دارند در کار تحقیقی دیگر Rayman و همکارانش در سال ۱۹۸۳ (Rayman et al., 1981) تراکم ۵۰ ppm نایسین توأم با تراکم ۶ ppm نیتريت در $PH = ۵.۸$ را برای متوقف کردن رشد اسپورهای *Cl. botulinum* در گوشت خوک کافی نمی‌دانند و اظهار می‌دارند که با پائین آوردن PH فعالیت ضد میکروبی نایسین تشدید میگردد.

بطور کلی در بررسی‌هایی که در آن اثر نایسین به تنهایی و توأم بانیتريت مورد تحقیق قرار گرفت به این نتیجه رسیدیم که گرچه نایسین به تنهایی در $PH = ۵.۵$ موثرترین اثر را علیه *L. monocytogenes* از خود نشان میدهد ولی در روشهای حفظ مواد غذایی کنسرو شده توأم کردن آن با نیتريت از یک طرف تراکم نیتريت ضروری را پائین آورده و از طرف دیگر اثر حفاظت بخش خود را در تراکم نسبتاً پائین تر بروز میدهد و با توجه به نتایج بدست آمده از بررسی اثر توأم این دو ماده علیه باکتری‌های دیگر به نظر می‌رسد می‌توان این دو ماده را توأم‌آدر صنایع کنسرو سازی برای حفظ مواد غذایی توصیه کرد.

در حفظ مواد غذایی مؤثر واقع شود. به هر حال نتیجه بررسی‌ها نشان داده هنگامیکه نایسین با نیتريت همراه می‌شود این ترکیب دو تایی در تراکم پائین موثرتر از تراکم‌های بالای هر یک از اجزاء به تنهایی است و با کاهش PH مقدار ضروری این مواد نیز کاهش مییابد.

بطوریکه نتایج نشان میدهد در تراکم ۵ ppm نیتريت در ۶ و ۵ ppm نایسین از تراکم ۱۰۰ ppm به بالا اثر باکتری کش خود را بروز می‌دهد و همانطور که قبلاً اشاره شد با بالا رفتن PH اثر ضد میکروبی نایسین و نیتريت به تنهایی کاهش پیدا میکند. در بکار بردن توأم نایسین و نیتريت نیز، بالا رفتن PH اثر باکتری کشی ترکیب این دو را کاهش می‌دهد. بطوریکه در $PH = ۶.۵$ تراکم ۷۰ ppm نایسین همراه با ۵ ppm نیتريت قادر به از بین بردن لیستریا نیست و از تراکم ۸۰ ppm به بالا اثر ضد میکروبی نایسین نمایان میشود. هنگامیکه نیتريت با تراکم ۱۰۰ ppm را همراه با تراکم‌های مختلف نایسین بررسی می‌کنیم مشاهده می‌شود که همانند تراکم ۵ ppm در $PH = ۵.۵$ و ۶ و ۷ ppm نایسین از ۱۰۰ ppm به بالا اثر باکتری کشی داراست منتهی در $PH = ۶.۵$ نیز تراکم موثر نسبت به نایسین تنها کاهش پیدا میکند (نایسین به تنهایی در این PH از تراکم ۸۰ ppm به بالا ولی همراه با ۱۰۰ ppm نیتريت از تراکم ۱۰۰ ppm به بالا موثر واقع میشود). در تراکم ۱۰۰ ppm نیتريت اثر مشابه تراکم ۱۰۰ ppm به چشم می‌خورد و بالاخره در تراکم ۲۰۰ ppm نیتريت، نایسین اثر باکتری کشی خود را از تراکم ۱۰۰ ppm به بالا در همه PH های مورد سنجش بروز داده است.

References

- مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، ۱۳۵۶، استاندارد نگهدارنده‌های مجاز در مواد خوراکی، نشریه شماره ۹۵
- Altaf khan. M. (1979) Advances in listeria monocytogenes and listeric infection J. S. I. (Karachi) 4, 9- 25.
- Ball R. G. & Karen M. De -lacy (1985) The effect of nisin - sodium chloride interactions on the outgrowth of Bacillus licheniformis spores. *J. of Applied Bacteriology*. 59, 127 - 132.
- Fleming P.W. etal (1935) Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *The New England journal of medicine*. 312 (7), 404 - 407.
- Frazier W,C. and DC. westhoff (1933) *Food microbiology*. third edition.
- Hurst. A, (1978) nisin : Its Preservative effect and Function in the growth cycle of the producer organism. The Society for Applied Bacteriology Symposium Series No:7. Streptococci ed by F.A.Skinner and L.Baulsnel
- Hurst. A. (1983) *Nisin and other inhibitory substances from lactic acid Bacteria. Antimicrobials in foods*. ed - by. A. L. Branen and P. M. Davidson.
- Linnett. P. E, and A. L. strominger (1973) Additional antibiotic inhibitors of peptidoglycan synthesis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 4(3), 231 - 236.
- Michael Barza. M. (1985) Listeriosis and milk. *The new England. Journal of medicins*. 312(7), 438 - 440.
- Michael P. Doyle etal(1987) Survival of listeria monocytogenes in milk during High - Temperature, short Time pasteurization. *Applied and environmental Microbiology*. 53(7), 1433 - 1438.
- Rayman. M. K, B. Aris and A. Hurst. (1981) Nisin : a possible alternative or adjunct to nitrite in the preservation of meats. *Applied and Environmental microbiology*. 41(2), 375 - 380.
- Rayman. K,N. malik and A. Hurst. (1983) Failure of nisin to inhibit outgrowth of clostridium botulinum in a Model cured meat system. *Applied and Environmental Microbiology*. 46(6), 1450 - 1452.
- Reisinger, P. H.etal(1980) The effect of nisin on murein synthesis. *Arch. microbiol*. 127, 187 - 193.
- Ramsier. H. R. (1960) Die wirkung von nisin auf clostridium butyricum prazm. *Archiv fur mikrobiologie*. 37, 57 - 94.
- Ruhr. E and H. sahl. (1985) Mode of action of the peptide antibiotic nisin and influence on the membrane potential of whole cells, and on cytoplasmic and artificial membrane vesicles. *Anti - microbial Agent and chemotherapy*. 27 (5), 841 - 845.
- Schlech. W. F. et al. (1983) Epidemic listeriosis Evidenc for transmission by food. *N. Eng. J. med*. 308(4), 203 - 206.
- Scott v. n. and S. L. taylor(1981) Effect of nisin on the outgrowth of clostridium botulinum spores . *J. of food science*. 46, 117 - 120.
- Shahamat. M. A. seaman and woodbine,(1981) Influence of sodium chloride,pH.and temperature on the inhibitory activity of sodium nitrite on L. monocytogenes.
- Somers E. B. and S.L. taylor (1981) further studies. on the antibotulinal Effectiveness of nisin in acidic media. *J. of food science*. 46 , 1972 - 1973.