فعالیت ضد باکتریایی اسانس زیره سبز(*Cuminum cyminum*) و نیسین در مهار باکتری*Streptococcus iniae* در محیط آزمایشگاه و فیله قزل آلا

لاله رومیانی*

L.roomiani@yahoo.com

گروه شیلات, استادیار دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات خوزستان، ، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۳۹۲ **تاریخ پذیرش: مرداد ۱۳۹۲**

چکیده

اثر ضد باکتریایی غلظت های متفاوت اسانس زیره سبز(۰، ۰/۰۰۵، ۰/۰۱۵، ۰/۰۴۵، ۰/۱۳۵، ۰/۴۰۵ درصد) و نیسین(۰، ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ میکروگرم بر لیتر) در محیط آزمایشگاه و مدل غذایی (فیله ماهی قزل آلا) برای مهار باکتری *Streptococcus iniae* طی ۱۵ روز در دمای ۸ درجه سانتی گراد در سال ۱۳۹۲ بررسی گردید. برای این منظور، ابتدا با استفاده از روش رقت لوله ای حداقل غلظت بازدارندگی(MIC) و حداقل غلظت باکتری کشی(MBC) نیسین و اسانس زیره در آزمایشگاه بدست آمد و سپس برای استفاده در مدل غذایی بکار گرفته شد. نتایج نشان داد که (MIC) و(MBC) اسانس زیره و نیسین به ترتیب ۰/۰۱۵، ۰/۰۰۵ درصد و ۰/۲۵، ۰/۱۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر بود. پس از ۱۵ روز نتایج نشان دادند که غلظت های مختلف اسانس زیره و نیسین برای کنترل رشد باکتری در فیله ماهی مورد نظر با گروه شاهد دارای اختلاف معنی دار بودند. نتایج حاکی از آن بود که ماده نگهدارنده نیسین تا روز سوم و اسانس زیره تا روز ششم (در بالاترین غلظت اسانس) و در ترکیب با هم تا روز ششم توانستند مانع رشد باکتری شوند. بیشترین تاثیر اسانس زیره سبز با نیسین در تیمار ۰/۱۳۵ و ۰/۴۰۵ درصد اسانس با ۰/۷۵ میکروگرم بر میلی لیتر نیسین اتفاق افتاد. نیسین همراه با اسانس زیره سبز توانستند تاثیر مثبتی در کنترل باکتری فوق در فیله ماهی قزل آلا داشته باشند.

لغات کلیدی: نیسین، اسانس زیره سبز، استرپتوکوکوس اینیایی، قزل آلا

*نویسنده مسئول

مقدمه

اگرچه تکنیک های تولید و پروسه های بهداشت و ایمنی مواد غذایی پیشرفت معنی داری داشته اند اما ایمنی غذا هنوز یکی از مهم ترین مباحث بهداشت عمومی در جهان محسوب می شود. تخمین زده شده است که ۳۰ درصد افراد در جوامع پیشرفته از بیماریهای منتقل شده از طریق مواد غذایی رنج می برند. در سال ۲۰۰۰ میلادی ۲ میلیون نفر بخاطر بیماری های ناشی از مواد غذایی جان باختند (Tsironi *et al*., 2011).

در میان عوامل بیماری زای مواد غذایی، باکتری استرپتوکوکوس اینیایی عامل بیماری زای مشترک در ماهی و انسان و از پاتوژن های مهم نوظهور در چند دهه اخیر بوده است. در جهان حداقل ۲۵ مورد عفونت انسانی ناشی از باکتری فوق در مقالات علمی مختلف گزارش شده است. باکتری فوق حداقل از ۲۷ گونه اقتصادی ماهیان پرورشی آب شور و شیرین جدا شده است (Sun *et al*., 2013).

ماهیان در مقایسه با سایر غذاهای گوشتی از فسادپذیری بالاتری برخوردارند. فساد ماهی پروسه ای پیچیده است که می تواند فیزیکی، شیمیایی و میکروبی باشد که در این میان سهم فساد میکروبی بیشتر است. از طرفی تقاضای مصرف کنندگان برای غذای بدون عامل عفونت زا با حداقل مواد نگهدارنده مصنوعی در حال افزایش است. امروزه تحقیقات قابل توجهی بر روی بهبود کیفیت و افزایش مدت زمان مصرف ماهی مانند استفاده از اسانس های گیاهی، پوشش های خوراکی، دودی کردن، روش های پیشرفته انجماد و اتمسفر تغییریافته انجام گردیده است. از وقتی که عوارض جانبی مواد شیمیایی بخصوص سرطان زا بودن آنها شناخته شد، علاقه روزافزون برای استفاده از مواد نگهدارنده طبیعی بیشتر گردید (Hong *et al*., 2012).

اسانس های گیاهی روغن هایی فراری هستند که اثرات ضد میکروبی آنها شناخته شده و از بخش های مختلف گیاه به دست می آیند. این اسانس ها مایع، خالص و بندرت رنگی هستند و از طریق ناپایدار ساختن لایه فسفولیپیدی غشاء سلولی، سیستم آنزیمی و مواد ژنتیکی باکتری نقش ضد باکتریایی خود را ایفا می کنند (Abdollahzadeh *et al*., 2014).

زیره سبز (*Cuminum cyminum*) در نواحی وسیعی با آب و هوای مدیترانه ای می روید و از زمان های گذشته بعنوان ادویه و داروی طب سنتی شناخته شده است. بیشترین ترکیبات اسانس دانه زیره سبز شامل کومین آلدهید، بنزالدهید، مشتقات منتون، گاما ترپینن و پاراسیمن می باشند که در مناطق مختلف جغرافیایی درصد آنها متفاوت است (پژوهی الموتی و همکاران،۱۳۹۱).

نیسین تنها باکتریوسینی است که در صنایع و کارخانجات مواد غذایی بیش از ۵۰ کشور جهان به عنوان افزودنی برای ایمنی و افزایش مدت زمان مصرف محصولات غذایی بکار می رود (Abdollahzadeh *et al*., 2014).

ترکیب اسانس های گیاهان با نیسین تاثیرات سینرژیکی بر روی کاهشATP برون سلولی میکروارگانیسم ها دارد. نکته قابل توجه این است که اگر مواد نگهدارنده طبیعی بجای مواد شیمیایی در مواد غذایی استفاده شوند لازم است که ارزیابی فعالیت ضد میکروبی آنها در آزمایشگاه و سپس در مدل های غذایی صورت گیرد. بنابراین ما نیازمند به پیشرفت تکنیک های جدید برای حذف یا کاهش عوامل بیماری زای مواد غذایی از طریق ترکیب شیوه های نوین با روش های امروزه هستیم (Norhana *et al*., 2012).

اگرچه اکثریت اسانس ها بعنوان افزودنی های بی خطر طبقه بندی می شوند، اما غلظت های موثر آنها از مقادیر پذیرش حسی در مواد غذایی تجاوز می کند. به همین دلیل کاربرد اسانس ها در مواد غذایی بعنوان محافظت کننده بدلیل تأثیرات نامطلوب در خصوصیات حسی غذا محدود می گردد. بنابراین تقاضا برای شناخت صحیح مقادیر موثر و کاربردی اسانس ها همراه با ایجاد تعادل بین پذیرش حسی و تأثیر ضدمیکروبی آنها رو به افزایش بوده و تحقیقات گسترده ای بر روی اسانس ها در مواد غذایی مختلف صورت گرفته است (پژوهی الموتی و همکاران،۱۳۹۱). هدف از انجام این مطالعه بررسی اثر سینرژیک نیسین و اسانس زیره سبز برای کنترل باکتری زئونوز استرپتوکوکوس اینیایی در فیله ماهی قزل آلا می باشد.

مواد و روش کار

- تهیه اسانس زیره سبز

اسانس گیاه زیره سبز(*Cuminum cyminum*) از پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی تهیه شد. به این ترتیب که اسانس گیاه به روش تقطیر با بخار(Steam distillation) با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگراف متصل به طیف نگار جرمی (GC/MS) به دست آمد. دستگاه (GC/MS) از نوع (Termoquest Finnigan) با ستون مویینه به طول ۳۰ متر و قطر داخل ۲۵۰ میکرومتر و ضخامت لایه داخلی ۰/۲۵ میکرومتر با برنامه دمایی ۵۰ تا ۲۶۵ و همراه با افزایش تدریجی ۲/۵ در هر دقیقه و نگهداری ستون در ۲۶۵ به مدت ۳۰ دقیقه استفاده شد. دمای اتاقک تزریق ۲۵۰ درجه فارنهایت و گاز حاصل از هلیم با سرعت ۱/۵ میلی متر در دقیق بود. شناساگر (EI) با انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت و دمای منبع یونیزاسیون ۲۵۰ درجه فارنهایت بود (فضل آرا و همکاران، ۱۳۹۱).

- آماده سازی باکتری

کشت لیوفیلیزه باکتری *Streptococcus iniae* (GQ850377) از گروه بهداشت و بیماری های آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران مورد استفاده قرار گرفت. در ابتدا این کشت لیوفلیزه در عصاره قلب و مغز (BHI) در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۱۸ ساعت دو مرتبه بطور متوالی تجدید کشت گردید. سپس کشت دوم به میزان ۵ به ۱ با گلیسیرین مخلوط شد و در قسمت های مساوی در لوله های میکروسانتریفیوژ اپندروف استریل در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد (Soltani *et al*., 2009).

- تهیه محلول نیسین

در مطالعه حاضر، از پودر نیسین ۲/۵ درصد (Sigma 5764) استفاده شد. این ماده تا زمان استفاده بایستی در دمای ۲ تا ۸ درجه سلسیوس نگهداری شود. مقدار۵۰ میلی لیتر آب مقطر استریل را با ۸۰ میکرولیتر اسید کلریدریک ۰/۰۲ نرمال حل کرده و در ظرف درداری، که از قبل استریل شده بود، مخلوط شد (اسید به آب اضافه شد). سپس ۵۰۰ میلی گرم پودر نیسین را در ۵۰ میلی لیتر اسید آماده شده بخوبی حل کرده بطوری که در ظرف استریل دیگری این محلول از فیلتر ۰/۲ میکرومتری عبور داده شد و با استفاده از رابطه $N_1V_1 = N_2V_2$ مقدار مورد نظر از آن را برداشته و به ظروف دردار افزوده و پس از پخش شدن آن در آب، برش های ماهی های مورد نظر به آن اضافه گردید (Rahnama *et al*., 2011).

- تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی و حداقل غلظت کشندگی باکتری

غلظت های متوالی اسانس زیره (۰، ۰/۰۰۵، ۰/۰۱۵، ۰/۰۴۵، ۰/۱۳۵، ۰/۴۰۵ درصد) و نیسین (۰، ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ میکروگرم بر لیتر) در محیط آبگوشت قلب و مغز حاوی ۵ درصد DMSO به کار گرفته شد. غلظت های متوالی ترکیبات مورد نظر در دو لوله آزمایش حاوی ۲ میلی لیتراز محیط فوق در لوله های آزمایش تهیه شد و در نهایت ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی تهیه شده به هر لوله تلقیح شد(غلظت نهایی باکتری5×10^5cfu/ml). سپس لوله ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۵ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شدند و کدورت یا عدم کدورت در لوله ها مشاهده شد و MIC (Minimum Inhibitory Concentration) اسانس و نیسین تعیین شدد.

پس از تعیین MIC که دلیل بر عدم رشد باکتری در آن لوله است، تعیینMBC (Minimum Bacteriocidal Concentration) که حداقل غلظت باکتری کشی است، انجام گرفت. این کار با استفاده از عدم رشد باکتری به دنبال تلقیح مجدد از پلیت های حاوی غلظت های مختلف اسانس زیره و نیسین به محیط آگار تعیین شد (رومیانی،۱۳۹۱).

- آماده سازی نمونه های ماهی

در این مطالعه از ماهی قزل آلای رنگین کمان ۲۵۰ گرمی استفاده شد. ماهیان مورد نظر از ماهی سرای کرج خریداری شدند که پس از جدا کردن سر و دم و خارج کردن محتویات آن ها به فیله های ۲۵ گرمی با اندازه ۳×۸ سانتی متر مربع تقسیم شدند و با بسته بندی بصورت تکی در کیسه های فریزر همراه با یخ به سازمان انرژی اتمی فرستاده شده و تا حدود ۵ کیلوگری اشعه گاما به آن ها داده شد تا از عدم وجود کلیه میکروارگانیسم ها اطمینان حاصل گردد (Ekhtiarzadeh *et al*., 2012). فیله ها در شیشه های بزرگ دردار که حاوی آب مقطر، دی متیل سولفوکساید (Dimethyl Sulfoxide) (DMSO) ۵ درصد و

آگار آگار ۱ درصد بود قرار داده شد و در دمای ۱۲۱/۱ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه استریل شدند. غلظت های مختلف اسانس زیره سبز (۰، ۰/۰۴۵، ۰/۱۳۵، ۰/۴۰۵ درصد) (بر اساس می نیمم غلظت بازدارنده اسانس(MIC) بدست آمده در آزمایشگاه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران انتخاب شدند. از آنجاییکه غلظت های مورد استفاده در محیط آزمایشگاه و ماده غذایی به علت وجود چربی، پروتئین، کربوهیدرات و تعامل آنها با اسانس، تاثیرات متفاوتی دارند، بنابراین از یک غلظت بالاتر استفاده شد و نیسین (۰، ۰/۲۵، ۰/۷۵ میکروگرم بر میلی لیتر) و ترکیب آن ها با همدیگر به شیشه های دردار استریل اضافه شدند. سپس فیله های ماهی را در زیر هود به ظروف دردار اضافه کرده و در یخچال در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت باقی مانند و فیله های ماهی در این مدت مواد را به خوبی جذب کنند. پس از ۲۴ ساعت در زیر هود، برش های ماهی توسط پنس استریل از ظروف دردار به پلیت های استریل منتقل گشته و تنظیم وزن آنها انجام شد. پس از مدت ۱۵ دقیقه نسبت به تلقیح دوز مورد اشاره باکتری به روش تلقیح نقطه ای بر روی آن ها اقدام گردید. سپس یک فیله از هر تیمار را داخل یک کیسه (Bag mixer) استریل قرار داده شد،روی آن برچسب زده و درب آن محکم بسته شد و در انکوباتور ۸ (نامناسب یخچالی) درجه سلسیوس قرار گرفت. سپس به مدت ۱۵ روز از نظر رشد باکتری و رسیدن به حد دوز مسمومیت زا یعنی $۱۰^{۶}$ < بررسی شدند (رومیانی،۱۳۹۱).

- تجزیه و تحلیل آماری

داده های مربوط به نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS.20 مورد تجزیه و تحلیل توصیفی قرار گرفتند. ابتدا از تجزیه واریانس یکطرفه جهت مقایسه میانگین ها استفاده شد و در مواردی که بین میانگین ها اختلاف معنی داری وجود داشت جهت جدا کردن آنها از تست Tukey استفاده گردید. میانگین ها در سطح اعتماد ۹۵ درصد از نظر آماری متفاوت قلمداد شدند.

نتایج

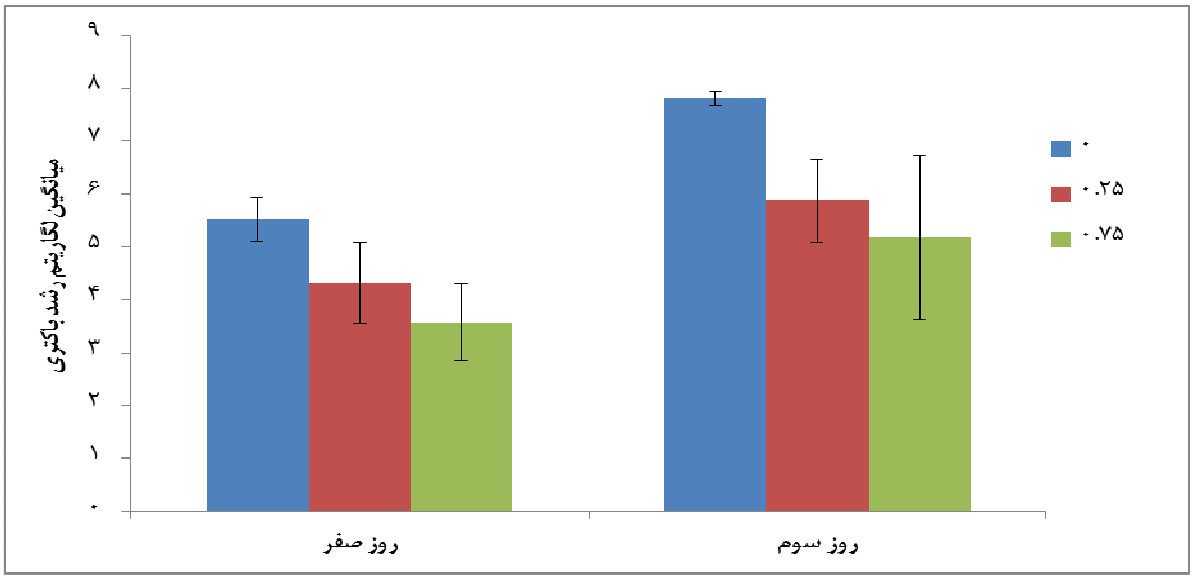
نتایج حاصل از آنالیز اسانس زیره سبز توسط دستگاه گاز کروماتوگراف متصل به طیف نگار جرمی شامل درصد، نوع ترکیبات و زمان نگهداری آنها در جدول ۱ ارائه شده است. همانطور که از جدول ۱ آشکار می گردد، بیشترین ترکیب اسانس زیره سبز با ۲۷/۱۸ درصد مربوط به بنزالدهید است.

جدول ۱: ترکیب شیمیایی اسانس زیره سبز توسط GC/MS

ترکیب	درصد	زمان نگهداری (دقیقه)
B pinene	۷/۱۱	۱۳/۰۷
Benzene 1 methyl	۷/۷۳	۱۵/۵۷
B phellandrene	۱/۰۱	۱۵/۶۹
Gama terpinene	۱۲/۵۶	۱۷/۳۶
Isopropylbicyclo	۲/۷۶	۲۳/۸۸
Benzaldehyde	۲۷/۱۸	۲۶/۴۶
Isopropylidene	۳/۷۷	۲۸/۱۱
Phenylpropanol	۱۷/۵	۲۸/۷۴
Benzenemethanol	۱۰/۸۲	۲۸/۹۹
Ethanediol	۳/۰۲	۲۹/۳۵
جمع	۹۳/۴۶	

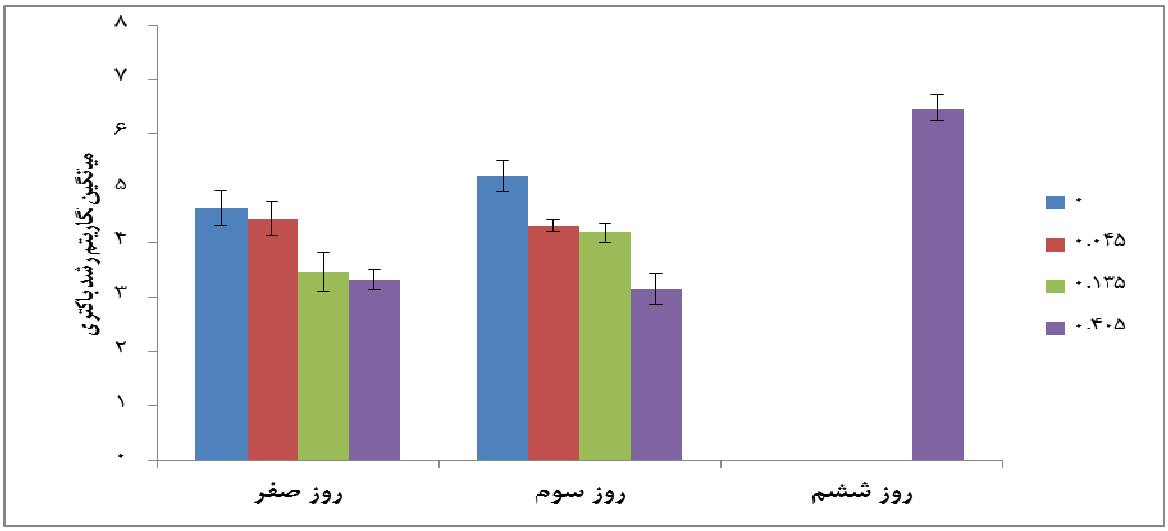
در آزمایشگاه میزان MIC و MBC اسانس زیره سبز به ترتیب ۰/۰۱۵ و ۰/۰۰۵ درصد و نیسین ۰/۲۵ و ۰/۱۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر محاسبه شد، که برای استفاده در مدل غذایی (فیله ماهی قزل آلا) بکار گرفته شدند.

لگاریتم رشد استرپتوکوکوس اینیایی در فیله های قزل آلای رنگین کمان در دمای ۸ درجه سانتی گراد تحت غلظت های مختلف اسانس زیره سبز و نیسین و ترکیب آنها در نمودارهای (۳-۱) آورده شده است. همانطور که از نمودار۱مشخص است غلظت های متفاوت نیسین با گروه کنترل تفاوت معنی دار آماری نشان دادند ($F=?, d.f.=?, P\leq ۰/۰۵$). نیسین توانست تا روز سوم مانع رشد باکتری در فیله شود و از روز سوم به بعد رشد باکتری به بالاتر از حد مجاز رسید ($۱۰^{۷}$ log cfu/ml).



نمودار۱- میانگین لگاریتم رشد باکتری تحت غلظت های متفاوت نیسین (میکروگرم بر میلی لیتر). بارها نمایانگر خطای استاندارد میباشند.

همانطور که از نمودار۱ مشخص می شود نیسین تا روز سوم توانست مانع رشد باکتری شود که در روز صفر و سوم تیمار ۰/۲۵ و ۰/۷۵ میکروگرم بر میلی لیتر نیسین با گروه کنترل تفاوت معنی دار آماری داشتند (F=?, d.f.=?, $P\leq$۰/۰۵). تیمار ۰/۷۵ میکروگرم بر میلی لیتر نیسین بیشترین تاثیر ضد باکتریایی را داشت (۵/۱۷ log cfu/ml) ولی با تیمار ۰/۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر نیسین تفاوت معنی دار نداشت (F=?, d.f.=?, ۰/۰۵≥ P).



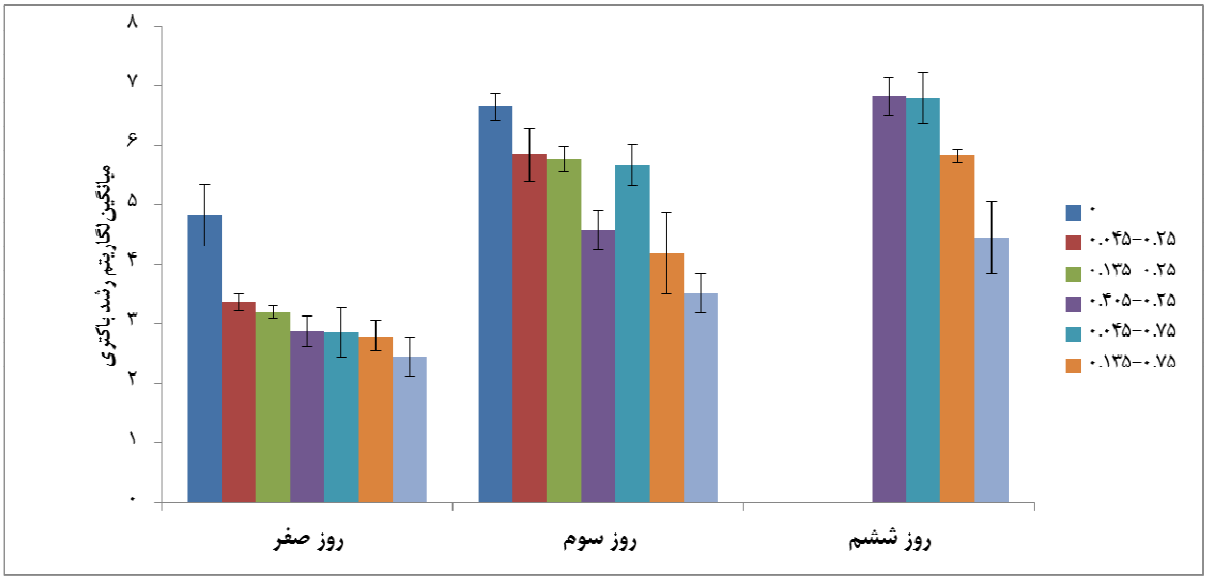
نمودار۲- میانگین لگاریتم رشد باکتری تحت غلظت های متفاوت اسانس زیره سبز(درصد). بارها نمایانگر خطای استاندارد میباشند.

نمودار۳ نشان می دهد که تیمار۰/۴۰۵ درصد اسانس زیره سبز توانست تا روز ششم مانع رشد باکتری شود (۶/۸۴ log cfu/ml). در روز صفر تیمار۰/۰۴۵ درصد اسانس تفاوت معنی داری در کاهش باکتری با گروه کنترل نشان نداد (F=?, d.f.=?, ۰/۰۵

$P\leq$). در روز سوم هر سه تیمار اسانس با گروه کنترل تفاوت معنی دار آماری داشتند (F=?, d.f.=?, $P\leq$۰/۰۵).

نمودار۳ مشخص می سازد که ترکیب اسانس زیره با نیسین از تیمار بیشترین غلظت اسانس با ۰/۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر نیسین تا تمامی تیمارهای اسانس با بیشترین تیمار نیسین (۰/۷۵ میکروگرم بر میلی لیتر) توانستند تا روز ششم باکتری را زیر حد مسمومیت زای آن (۷ log cfu/ml) برسانند و از روز نهم رشد باکتری به بالاتر از این حد رسید. در روز صفر و سوم تمامی تمارها با گروه کنترل تفاوت معنی دار آماری نشان دادند (F=?, d.f.=?, $P\leq$۰/۰۵).

در روز ششم تیمارهای ۰/۱۳۵ و ۰/۴۰۵ درصد اسانس با تیمار ۰/۷۵ میکروگرم بر میلی لیتر نیسین تفاوت معنی دار آماری در کنترل باکتری نداشتند (F=?, d.f.=?, $P\leq$۰/۰۵).



نمودار۳- میانگین لگاریتم رشد باکتری تحت غلظت های متفاوت نیسین (میکروگرم بر میلی لیتر) و اسانس زیره سبز (درصد). بارها نمایانگر خطای استاندارد میباشند.

بحث و نتیجه گیری

در این بررسی برای اولین بار در یک مدل غذایی (فیله ماهی) با استفاده از تکنولوژی ممانعتی سعی به بررسی اثر اسانس زیره سبز و نیسین به تنهایی و توام در کنترل استرپتوکوکوس اینیایی (باکتری نوظهور و زئونوز مواد غذایی) شده است. نتایج این بررسی نشان دادند که در دمای ۸ درجه سانتی گراد اسانس زیره سبز و نیسین به صورت توام با هم توانستند تاثیر بیشتری در ممانعت رشد باکتری نسبت به گروه کنترل و به تنهایی شوند که اسانس زیره موثرتر از نیسین عمل کرد. تیمار ترکیبی ۰/۴۰۵ درصد اسانس و ۰/۷۵ میکروگرم بر میلی لیتر نیسین توانست بیشترین کاهش را در رشد باکتری از خود نشان دهد (log cfu/ml ۴/۴۴) و با اینکه تیمار ۰/۱۳۵ درصد اسانس با ۰/۷۵ میکروگرم بر میلی لیتر نیسین توانست در رشد باکتری تاثیر کمتری داشته باشد (log cfu/ml ۵/۸۲) ولی با تیمار ۰/۴۰۵ درصد اسانس تفاوت معنی دار آماری نشان نداد و تا شش روز ماندگاری فیله را افزایش داد، در حالیکه تیمار ۰/۷۵ میکروگرم بر میلی لیتر نیسین به تنهایی تا روز سوم توانست مانع از رشد باکتری شود (log cfu/ml ۵/۱۷) اما تیمار ۰/۴۰۵ درصد اسانس زیره نیز تا روز ششم مانع رشد استرپتوکوکوس اینیایی در فیله شد (log cfu/ml ۶/۸۴) که از تفاوت معنی دار آماری برخوردار بودند.

محمودی (۱۳۹۱) تاثیر اسانس آویشن شیرازی و نیسین به تنهایی و به صورت ترکیبی با هم در مدل غذایی برای مهار لاکتوکوکوس گارویه در یک دوره ۹ روزه را مورد مطالعه قرار داد. نتایج حاصله نشان داد که نیسین در سه غلظت متفاوت علیه این باکتری موثر بوده است. به طوریکه با توجه به عدد t در غلظت ۰/۷۵ میکروگرم بر میلی لیتر این اثرگذاری به میزان ۶۵/۷۷ درصد بیشترین تاثیر را بر روی رشد باکتری داشته است. به لحاظ اثر گذاری، اسانس آویشن بر روی رشد لاکتوکوکوس گارویه در تمامی غلظت‌های مورد نظر مورد تایید واقع گردیده است اما با توجه به عدد t در غلظت ۰/۴۰۵ درصد این اثرگذاری به میزان۷۱/۹۱ درصد بیشترین تاثیر را بر رشد باکتری ها به همراه داشته است. نتایج حاصله نشان داد که استفاده توام دارای بیشترین اثر علیه لاکتوکوکوس گارویه بوده است.

رومیانی (۱۳۹۱) تاثیر اسانس رزماری و نیسین را بر رفتار رشد استرپتوکوکوس اینیایی بررسی کرد و به این نتیجه رسید که در دمای ۸ درجه سانتی گراد در تمام غلظت های نیسین و رزماری از روز سوم به بعد نگهدارنده ها نتوانستند مانع رشد باکتری شوند. غلظت های مختلف رزماری و نیسین برای کنترل رشد باکتری مورد نظر با گروه شاهد دارای اختلاف معنی دار آماری بودند اما غلظت های بالای اسانس رزماری (۰/۱۳۵ و ۰/۴۰۵ درصد) تفاوت معنی دار نشان ندادند که با مطالعه فعلی همخوانی دارد.

رفتار رشد باکتریهای ویبریو پاراهمولایتیکوس و لیستریا مونوسیتوژنز در فیله ماهیان شور شده تحت تاثیر نیسین و اسانس آویشن شیرازی و ترکیب آنها با هم توسط Ekhtiarzadeh و همکاران (۲۰۱۲) گزارش شد. برای باکتری لیستریا مونوسیتوژنز اثر بازدارندگی اسانس و در ترکیب با نیسین در دمای ۴ درجه سلسیوس مشاهده شد. رشد باکتری ویبریو پاراهمولایتیکوس در ۸ درجه سلسیوس (گروه کنترل) در روز اول کشت متوقف گردید و به زیر log cfu/ml ۲ رسید. بهترین اثر بازدارندگی اسانس در ترکیب با نیسین برای باکتری ویبریو پاراهمولایتیکوس در غلظت ۰/۴۰۵ درصد اسانس و ۰/۷۵ میکروگرم بر میلی لیتر نیسین (مشابه با مطالعه حاضر) و برای لیستریا مونوسیتوژنز ۰/۴۰۵ درصد اسانس و ۰/۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر نیسین حاصل شد. نتایج مطالعه ثابت کرد که دما نقش مهمی در کنترل باکتری تحت تاثیر نگهدارنده های طبیعی ایفا می کند.

نتایج مطالعه ای که در آن اثر اسانس رزماری، دارچین و نیسین بر روی فیله ماهی بررسی شد، اسانس دارچین و رزماری بیشترین فعالیت ضد باکتریایی را علیه لیستریا مونوسیتوژنز از خود نشان دادند. نیسین در غلظت های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ واحد بین المللی توانست تاثیر ضد باکتری از خود نشان دهد. این مطالعه ثابت کرد که نیسین در فیله پخته شده موثرتر از فیله خام بود (Abdollahzadeh *et al*., 2014).

تفاوت نتایج مطالعات پیشین با نتایج بررسی حاضر می تواند به علت اختلاف در اسانس بکار گرفته شده باشد. اختلاف در ترکیبات روغن های فرار گیاهان می تواند مربوط به تغییرات فصلی و دوره رویشی گیاه باشد. ضمن اینکه فاکتورهای محیط زیستی مانند دما، شرایط جغرافیایی، طول مدت روز، مواد مغذی در دسترس گیاه می توانند نقش کلیدی در ترکیبات اسانس داشته باشند (Machado *et al*., 2013). از طرفی نیسین و اسانس می توانند روی غشای سیتوپلاسم باکتری اثر بگذارند و در نهایت موجب افزایش تخریب ساختاری و عملکردی غشای باکتری ها شوند اما نیسین در عملکرد با اسانس ها و شرایط محیط زیستی مختلف متفاوت عمل می کند (Guo *et al*., 2012).

تاریخ مصرف محصولات شیلاتی در دمای یخچالی (۴ درجه سلسیوس) ۴ تا ۹ روز اعلام شده است. ثابت شده است که استفاده از اسانس های گیاهی در ترکیب با دمای یخچالی روش موثری برای افزایش تاریخ مصرف غذا است. مدل های ریاضی برای پیشگویی عوامل بیماری زای منتقله از طریق غذا در محیط آزمایشگاه (براث) نسبت به مدل های غذایی قابلیت پاسخگویی بیشتر و بهتری دارد چون شمارش عوامل بیماری زا در غذا با میکروفلور طبیعی موجود در آن مشکل است. هر چند مدل های پیشرفته در محیط های براث استریل شده همیشه از پیشگویی های قابل اعتمادی در مورد رشد میکروارگانیسم ها در غذاهای استریل نشده و غیر یکنواخت برخوردار نیستند (Rey *et al*., 2012).

پیشنهاد می شود که روغن های فرار یا ترکیبات آنها بصورت بخشی از سیستم ممانعتی در نظر گرفته شوند و می توان از آنها بصورت ترکیبات ضد میکروبی در خلال سایر تکنیک های نگهداری مانند دمای کاهش یافته، pH کاهش یافته یا استفاده از اثر سینرژیتیک روغن های فرار و ترکیبات آنها سود جست.

منابع

پژوهی الموتی، م.ح.؛ تاجیک، ح.؛ آخوندزاده، ا.؛ گندمی، ح. و احسانی، ع.، ۱۳۹۱. مطالعه ترکیب شیمیایی و فعالیت ضد میکروبی اسانس های پونه کوهی و زیره سبز در سوپ. فصلنامه علوم و صنایع غذایی. شماره۴۵-۳۳ :(۹)۳۶.

رومیانی، ل.، ۱۳۹۱. مطالعه تاثیر اسانس رزماری و نیسین بر رفتار رشد باکتری استرپتوکوکوس اینیایی در شرایط آزمایشگاهی و بر روی فیله ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). پایان نامه دکتری شیلات. دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران. ۱۶۰ صفحه.

فضل آرا، ع.؛ صادقی، ا. و رستمی سلیمانی، پ.، ۱۳۹۱. مطالعه تاثیر اسانس گیاه زیره سبز بر باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در پنیر سفید ایرانی. فصلنامه علوم و صنایع غذایی. ۴۴-۳۵ :(۹)۳۵.

محمودی، آ.، ۱۳۹۱. مطالعه تاثیر اسانس آویشن شیرازی و نیسین بر رفتار رشد لاکتوکوکوس گارویه روی فیله ماهی قزل آلای رنگین کمان. پایان نامه دکتری شیلات. دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران. ۱۴۶ صفحه.

Abdollahzadeh E., Rezaei M., Hosseini H., 2014. Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control *Listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat. Journal of Food Control, 35(1): 177–183.

Ekhtiarzadeh H., Akhondzadeh Basti A., Misaghi A., Sari A., Khanjar A., Rokni N., Abbaszadeh S., Partovi R., 2012. Growth response of *Vibrio parahemolyticus* and *Listeria monocytogenes* in salted fish fillets as affected by *Zataria multiflora* Boiss. Essential oil, nisin and their combination. Journal of Food Processing and Preservation, . 32(3): 263–269

Guo J.J., Kuo C.M., Chuang Y.C., Hong J.W., Chou R.L., Chen T.I., 2012. The effects of garlic-supplemented diets on antibacterial activity against *Streptococcus iniae* and on growth in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. Journal of Aquaculture, 364 (365): 33-38.

Hong H., Luo Y., Zhou Z., Shen H., 2012. Effects of low concentration of salt and sucrose on the quality of bighead carp (*Aristichthys nobilis*) fillets stored at 4 ºC. Journal of Food Chemistry, 133: 102–107.

Machado D.G., Cunha M.P., Neis V.B., Balen G.O., Colla A., Bettio L.E.B., Oliveira A., Pazini F.L., Dalmarco J.B., Simionatto E.L., Pizzolatti M.G., Rodrigues A.L.S., 2012. Antidepressant-like effects of fractions, essential oil, carnosol and betulinic acid isolated from *Rosmarinus officinalis* L. Journal of Food Chemistry, 136: 999–1005.

Norhana M.N.W., Poole S.E., Deeth H.C., Gary A., Dykes A., 2012. Effects of nisin, EDTA and salts of organic acids on *Listeria monocytogenes*, Salmonella and native microflora on fresh vacuum packaged shrimps stored at 4 ºC. Journal of Food Microbiology, 31: 43-50.

Rahnama M., Najimi M., Shahraki A., 2011. Antibacterial effects of *Myristica fragrans*, *Zataria multiflora* Boiss, *Syzygium aromaticum*, and *Zingiber officinale* Rosci essential oils, alone and in combination with nisin on *Listeria monocytogenes*.

Academic Journal.21(6): 1313 - 1316

Rey M.S., García-Soto B., Fuertes-Gamundi J.R., Aubourg S., Barros-Velázquez J., 2012. Effect of a natural organic acid-icing system on the microbiological quality of commercially relevant chilled fish species. Journal of Food Science and Technology, 46: 217-223.

Soltani M., Ghodratnema M., Ahari H., Ebrahimzadeh Mousavi H.A., Atee M., Dastmalchi F., Rahmanya J., 2009. The inhibitory effect of silver nanoparticles on the bacterial fish pathogens, and Streptococcus iniae Lactococcus garvieae,Yersinia ruckeri Aeromonas hydrophila. International Journal of Veterinary Research .3(2): 137-142.

Sun Y., Sun L., Xing M., Liu C. Hu Y., 2013. Sag E induces highly effective protective immunity against *Streptococcus iniae* mainly through an immunogenic domain in the extracellular region. Journal of Acta Veterinaria Scandinavica, 55: 2-9.

Tsironi T., Stamatiou A., Giannoglou M., Velliou E., Taoukis P.S., 2011. Predictive modelling and selection of time temperature integrators for monitoring the shelf life of modified atmosphere packed gilthead sea bream fillets. Journal of Food Science and Technology, 44: 1156-1163.

Antibacterial activity of *Cuminum cyminum* essential oil and Nisin on *Streptococcus inaie* in lab and fillets of rainbow trout

Laleh Roomiani*

L.roomiani@yahoo.com.

Department of Fisheries, Khouzestan Science and Research Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran.

Received: May 2013 Accepted: August 2013

Keywords: Nisin, *Cuminum cyminum*, essential oil, *Streptococcus iniae*, Rainbow trout

Abstract

The antibacterial activity of different concentrations of *Cuminum cyminum* essential oil (0, 0.005, 0.015, 0.045, 0.135, 0.405%) and nisin (0, 0.125, 0.25, 0.75 µg/ml) was explored in lab and food model (fillets of rainbow trout) in controling *Streptococcus iniae* for 15 days at 8 ºC. The micro-dilution method was used to determine MIC and MBC for nisin and the essential oil, so used for food model. Results showed that MIC and MBC for essential oil and nisin were 0.015, 0.005% and 0.25, 0.125 µg/ml, respectively. For the duration of 15 days no statistical significance was recorded between the different concentrations of nisin and essential oil and control treatment. Results showed that the bacterial growth was delayed in different samples being treated with nisin and essential oil from 3 to 6 days for the given compounds and 6 days for nisin and essential oil in combination. The highest synergistic effect of nisin with essential oil was found in 0.135 and 0.405% concentrations for essential oil and 0.75 µg/ml for nisin at 8 ºC.

**Corresponding author*