

خاصیت ضد باکتریایی اسانس زیره سبز و نیسین بر جمعیت لیستریا

مونوسیتوزن تلقیح شده در گوشت چرخ شده ماهی شیزوتوراکس زارودنی

محمد رهنما^۱، افسانه نوری جنگی^۲، مجید علیپور اسکندانی^{۳*}

۱. گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

۲. واحد فراوری محصولات شیلاتی، اداره شیلات شهرستان زهک، سیستان و بلوچستان، ایران

چکیده

زمینه و هدف: باکتری لیستریا مونوسیتوزن یکی از مهمترین باکتری های بیماری زای منتقله از مواد غذایی بوده و در حال حاضر کنترل آن مهمترین چالش در صنایع غذایی محسوب می شود. هدف از این مطالعه بررسی خاصیت اسانس زیره سبز و نیسین در کنترل رشد لیستریا مونوسیتوزن در گوشت چرخ شده ی شیزوتوراکس می باشد.

روش ها: آنالیز ترکیب های تشکیل دهنده اسانس زیره سبز با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی انجام گرفت. به نمونه های گوشت چرخ شده، باکتری لیستریا مونوسیتوزن با لوگ ۳ در هر گرم تلقیح شد، سپس تیمارهای زیره سبز و نیسین به تنهایی و یا توأم به نمونه ها اضافه شد. شمارش لیستریا مونوسیتوزن در روزهای ۰، ۱، ۳، ۵، ۷، ۹، ۱۱ انجام گردید.

نتایج: نتایج نشان داد که غلظت ۳ درصد اسانس دارای اثرات بازدارندگی رشد بر لیستریا بوده است. ۴۰ میکروگرم در گرم نیسین به تنهایی و ترکیب اسانس زیره سبز و نیسین به ترتیب ۱ درصد اسانس و ۱۰ میکروگرم در گرم دارای اثرات ممانعت کنندگی بر رشد لیستریا مونوسیتوزن بوده است. **نتیجه گیری:** نتایج نشان داد که از اسانس زیره سبز و نیسین می توان بعنوان یک نگهدارنده طبیعی در کنترل رشد باکتری لیستریا مونوسیتوزن استفاده نمود.

کلید واژه ها:

لیستریا مونوسیتوزن، زیره سبز، نیسین، شیزوتوراکس زارودنی

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی تربت حیدریه محفوظ است.

مقدمه

جامعه جهانی علاقه روز افزونی به استفاده از مواد نگهدارنده نظیر اسانس ها و آنتی بیوتیک های طبیعی وجود دارد (۳). گرچه رابطه مستقیمی بین شیوع لیستریا و آلودگی مواد غذایی دریائی گزارش نشده ولی این باکتری از فرآورده های دریائی خام و فرآوری شده، جداسازی شده است (۴). باکتری لیستریا از نظر مسمومیت غذایی و بیماری لیستریوزیس که در انسان ایجاد می کند از اهمیت خاصی برخوردار است (۵، ۶). همچنین ۵ درصد از انسانها بدون نشان دادن هر گونه علامتی می توانند این باکتری را سال ها در روده خود حمل نمایند (۲، ۷). لیستریا از طریق استنشاق، خوردن مواد غذایی آلوده و تماس با

بیماری های ناشی از غذا در نتیجه مصرف غذاهای آلوده به باکتری های عامل فساد و بیماری زا به طور مستقیم در سلامت جامعه نقش دارد (۱). استفاده از مواد شیمیایی به منظور جلوگیری یا به تاخیر انداختن فساد مواد غذایی امروزه دارای کاربرد وسیعی می باشد. در ارتباط با اثرات سوء استفاده از مواد شیمیایی صنعتی بحث های قابل قبولی درخصوص سرطان زایی و سمیت آنها برای انسان صورت گرفته است. به این دلیل تولیدکنندگان مواد غذایی و مصرف کنندگان آن بایستی در استفاده از این گونه مواد نگهدارنده احتیاط نمایند (۲). در نتیجه بالا رفتن سطح آگاهی مصرف کنندگان در سطح

*آدرس نویسنده مسئول: زابل، دانشگاه زابل، دانشکده دامپزشکی، گروه بهداشت مواد غذایی

آدرس پست الکترونیک: alipour@uoz.ac.ir

جز گیاهان دارویی مهم و اقتصادی کشورمان بوده و در مناطق مختلفی از جمله تبریز، کرمان، یزد و برخی مناطق دیگر کشت می شود (۱۴). از زیره سبز در درمان بیماری های مختلف به عنوان ضد تشنج، ضد صرع، تقویت کننده معده، ادار آور، ضدنفخ و سوء هاضمه و محرک تعریق استفاده شده و برای بیماران دیابتی نیز مفید است (۱۵). بررسی اثرات ترکیبی نیسین و اسانس ها نتایج امیدوارکننده ای دربرداشته هرچند که این تحقیقات هنوز در مراحل ابتدایی قرار دارد (۱۶، ۱۷). هدف از انجام این مطالعه بررسی خواص ضدباکتریایی اسانس زیره سبز و نیسین بروی باکتری لیستریا مونوسیتوژن در گوشت چرخ شدهی شیزوتوراکس بود.

روش ها

تهیه اسانس: در این پژوهش برای استخراج و اندازه گیری اسانس، بوته ها در دمای اتاق (حدود ۲۵ درجه سانتی گراد) و در سایه خشک گردیدند و سپس با استفاده از دستگاه کلونجر و روش تقطیر با آب، اسانس گیری شدند. از هر نمونه خشک شده ۱۰۰ گرم آسیاب گردید و به مدت دو ساعت با استفاده از روش تقطیر با آب، اسانس گیری (Gerhart) و درصد آن تعیین شد. ترکیب های تشکیل دهنده فرجه تجاری توسط کروماتوگرافی گازی (GC) مدل Agilent 7890 متصل شده با طیف سنج جرمی (Mass) مدل (Agilent 5975) ستون HP-5MS و نیمه قطبی به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ستون ۰/۲۵ میکرون، دتکتور MS، گاز حامل هلیوم (He)، سرعت جریان گاز حامل ۱ میلی لیتر بر دقیقه، برنامه حرارتی ۶۰-۲۲۵ درجه سانتی گراد با سرعت ۴ درجه سانتی گراد بر دقیقه و دمای محفظه تزریق ۲۷۰ درجه سانتی گراد) در مؤسسه دانش پژوهان تهران تجزیه شد. پس از تزریق اسانس به دستگاه های نامبرده، با استفاده از زمان بازداری ترکیب ها (tR)، اندیس بازداری (RT) طیف جرمی و مقایسه این پارامترها با ترکیب های استاندارد و یا با اطلاعات موجود در کتابخانه نسبت به شناسایی ترکیب های تشکیل دهنده اسانس اقدام گردید. درصد کمی این ترکیب ها نیز با

فرآورده های حیوانی وارد بدن انسان می شود. در اغلب مواقع انسان از طریق مواد غذایی به لیستریوزیس مبتلا می گردد (۸). لیستریا یک باکتری گرم مثبت، کوچک و به شکل میله ای است که به دمای بالا حساس می باشد. این باکتری بطور وسیعی در نقاط مختلف گسترش دارد. سلول های این باکتری قادرند در محیط های خشک، مرطوب، نمکی و در محیط بدون اکسیژن زنده بمانند (۹). باکتریوسین ها پروتئین های باکتری کشی هستند که تولید آنها توسط باکتری اسیدلاکتیک در سال های اخیر به صورت گسترده ای مورد بررسی و مطالعه قرار گرفته است. با عنایت به این واقعیت که این ترکیبات به وسیله ارگانسیم های مفید موجود در مواد غذایی تولید می شوند، عنوان طبیعی را به آنها نسبت داده لذا به عنوان نگهدارنده های طبیعی مواد غذایی (بیونگهدارنده) مقبولیت بیشتری دارند. نیسین نوعی باکتریوسین پلی پپتیدی آمفی پاتیک دارای سی و چهار اسید آمینه می باشد، که توسط سوش های خاص لاکتوکوکوس لاکتیس زیر گونه لاکتیس تولید شده و مدت ها است که با توجه به خصوصیات ضد میکروبی آن و سمیت پایین آن برای انسان به عنوان یک نگهدارنده مواد غذایی در صنایع غذایی استفاده می شود (۱۰). تنها باکتریوسینی که با تصویب سازمان جهانی بهداشت در صنعت مواد غذایی کاربرد عملی وسیعی پیدا کرده نیسین می باشد (۴). نیسین از رشد باکتری های گرم مثبت جلوگیری کرده و مانع شیوع اسپوره های کستریدیوم و باسیلوس می شود. نیسین در این باکتری ها با ایجاد منافذ در غشاء سلولی، کارکرد آن را مختل می نماید (۱۱، ۱۲).

در سال های اخیر کاربرد مصرف اسانس های گیاهی در مواد غذایی خام به خصوص مواد غذایی فرآوری شده به عنوان جایگزین مناسبی برای مواد نگهدارنده سنتتیک و افزودنی های شیمیایی افزایش یافته است (۱۳). زیره سبز، گیاهی علفی یکساله، ظریف و معطر از خانواده چتریان بوده و با نام علمی *Cuminum cyminum L* معروف می باشد، این گیاه در مناطق مدیترانه ای و جنوب غرب و مرکز آسیا می روید، زیره سبز

بعد از آن به نمونه های گوشت چرخ شده ماهی، باکتری تلقیح شد. نمونه های گوشت تلقیح شده کاملاً هموژن شدند. از این گوشت تلقیح شده برای تهیه همه تیمارهای مورد آزمایش استفاده شد (۱۴).

ماربندی و شمارش باکتری لیستریا مونوسیتوژن طی دوره نگهداری: تیمارهای شاهد، گوشت تلقیح شده اسانس زیره سبز با غلظت های ۱، ۲ و ۴ % v/w در نظر گرفته شد. همه تیمارها در کیسه های پلاستیکی بسته بندی و در طول دوره آزمایش در دمای یخچال نگهداری شدند. در طول دوره آزمایش، شمارش باکتری لیستریا مونوسیتوژن هر ۴۸ ساعت انجام پذیرفت. به منظور شمارش لیستریا مونوسیتوژن از محیط انتخابی کشت CHROMagar کروموژنیک، شرکت میکروبیولوژی کوروم آگار فرانسه) و مکمل آن (CHROMagar Listeria supplement) استفاده شد (۱۹).

برای شمارش باکتری در هر بار زمان نمونه گیری، به ۵ گرم گوشت چرخ شده ماهی مقدار ۴۵ میلی لیتر سرم فیزیولوژی اضافه و سپس هموژن شد. به منظور شمارش باکتریها، رقتهای سریالی (۱:۱۰) تهیه شد. ۰/۱ میلی لیتر نمونه CHROMagar TM رقیق شده را روی محیط کشت کشت سطحی داده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد بکارید. باکتری لیستریا مونوسیتوژن روی این محیط، کلنی هایی به رنگ آبی با هاله سفید تشکیل داد. برای هر تیمار دو تکرار در نظر گرفته شد که پس از کشت پلیت های استاندارد، انتخاب و شمارش شدند.

تجزیه و تحلیل آماری: آنالیز آماری داده ها با بهره گیری از نرم افزار SPSS ورژن ۱۷ و توسط آزمون های آنووا یک طرفه و تعقیبی دانکن انجام شد.

نتایج

آنالیز اسانس: نتایج آنالیز ترکیب های اسانس زیره سبز مورد استفاده در این مطالعه در جدول ۱ نشان داده شده است. همانطور که در این جدول آمده است، ترکیب های اصلی تشکیل دهنده اسانس شامل منتول (۴۲/۹۶ درصد)، منتون (۱۸/۴۳)

محاسبه سطوح زیر منحنی در کروماتوگرافها محاسبه شد (۱۸).

نیسین: نیسین حاوی ۲/۵ درصد نیسین فعال از کمپانی SIGMA-ALDRICH خریداری شد. نیسین استوک با استفاده از اسید کلریدریک ۰/۰۲ مول در لیتر با pH برابر با ۱/۶ تهیه شد و به وسیله میکروفیلتر استریلیزه یک بار مصرف و سرنگ فیلتر شد (۱۶).

آماده سازی باکتری لیستریا مونوسیتوژن برای تلقیح:

سویه استاندارد و لیوفیلیزه باکتری Listeria monocytogenes PTCC 1295 از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. آمپولهای لیوفیلیزه باکتری ابتدا در شرایط استریل باز شد، سپس به محیط کشت مایع Tryptic Soy Broth (TSB) انتقال یافت و به مدت ۴۸ ساعت در ۳۰°C انکوبه شد. سپس محیط کشت حاوی باکتری به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ و مایع رویی با محلول رینگر جایگزین شد. به منظور جداسازی کامل محیط کشت از باکتریها محلول حاصل دوباره به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. تعداد باکتریها در مایع زیرین توسط روش کدورت سنجی در طول موج ۵۷۰ نانومتر به دست آمد؛ به طوری که جذب نوری ۰/۸ تا ۰/۱ تقریباً معادل 1×10^8 باکتری در هر میلی لیتر در نظر گرفته شد. به منظور دستیابی به این محدوده جذب نوری، رقیق سازی با رینگر استریل انجام شد. به منظور تأیید نتایج، شمارش باکتریایی به روش کشت سطحی روی محیط مولر هینتون آگار (۲۴ ساعت گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد) انجام پذیرفت.

آماده سازی خمیر شیزوتوراکس: ابتدا ۵ کیلوگرم ماهی شیزوتوراکس (Schizothorax zarudnyi) از مرکز تکثیر ماهیان بومی زهک- زابل تهیه و داخل جعبه های حاوی یخ گذاشته شد. سپس به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی زابل منتقل شد و پس از شستشوی ماهیان عملیات پوست کنی انجام پذیرفت. سپس سطح زیرین گوشت بدون تماس با امعا و احشا برداشته و توسط چرخ گوشت دو بار چرخ شد.

شیزوتوراکس در جدول ۳ نشان داده شده است. میانگین تعداد کلی باکتری لیستریا مونوسیتوژن در گوشت چرخ شده شیزوتوراکس در روز صفر $10^7 \times 10$ CFU/g بود و با گذر زمان تعداد باکتری در نمونه شاهد (فاقد نیسین) افزایش رشد داشتند. در روز اول نگهداری تعداد باکتری های تیمارهای حاوی نیسین نسبت به گروه شاهد کاهش معنی داری داشت ($P=0/001$). در روز سوم نگهداری تعداد باکتری لیستریا در تیمار شاهد غیر قابل شمارش شدند. اما بین غلظت ۱۰ و ۱۵ میکروگرم در گرم نیسین اختلاف معنی داری مشاهده نشد ($P>0/05$). بقیه تیمارها اثر مهارکنندگی معنی داری را در برابر باکتری لیستریا از خود نشان دادند در تیمارهای نیسین (۴۰، ۵۰) میکروگرم در گرم مانع از رشد باکتری شدند و تعداد باکتری را به صفر رساند ($P=0/001$). در روز سوم تیمارهای نیسین (۱۰، ۱۵) میکروگرم در گرم اثر مهار ضعیفی نشان دادند ولی اختلاف نسبت به گروه شاهد معنی دار بود ($P=0/001$). روز دوازدهم اختلاف معنی دار بود ولی اثر مهارکنندگی ضعیفی از خود نشان دادند و نتوانستند بطور کامل باکتری را مهار کنند ($P=0/001$).

درصد، منتوفوران (۶/۲۴)، منتیل استات (۲/۷۶ درصد)، نئو منتول (۲/۱۳ درصد)، لیمونن (۱/۰۹ درصد) می باشد. نتایج میانگین لگاریتم تعداد سلول های لیستریا مونوسیتوژن تحت تاثیر غلظت های مختلف اسانس زیره سبز در گوشت چرخ شده شیزوتوراکس در روز صفر $10^7 \times 10$ CFU/g بود که در جدول ۲ نشان داده شده است. با گذر زمان تعداد باکتری لیستریا در گروه شاهد افزایش یافت. در روز اول نگهداری تعداد باکتری های تیمارهای حاوی اسانس زیره سبز نسبت به گروه شاهد کاهش معنی داری داشت ($P=0/001$). ولی در روز سوم نگهداری تعداد باکتری لیستریا در تیمار شاهد غیر قابل شمارش شدند بقیه تیمارها اثر مهارکنندگی ضعیف و معنی داری را در برابر باکتری لیستریا از خود نشان دادند ولی تیمار ۳ درصد اسانس در روز اول مانع از رشد باکتری شد و تعداد باکتری را به صفر رساند ($P=0/001$). زیره سبز در سطح ۱ و ۲ درصد اثر مهارکنندگی ضعیف و معنی داری را نسبت به گروه شاهد در برابر باکتری لیستریا از خود نشان داد ولی نتوانست باکتری را بطور کامل مهار کند ($P=0/001$). نتایج میانگین لگاریتم تعداد سلول های لیستریا مونوسیتوژن تحت تاثیر غلظت های مختلف نیسین در گوشت چرخ شده

جدول شماره ۱. نتایج آنالیز اسانس زیره سبز با استفاده از GC/MS

| درصد | ترکیب | ردیف | درصد | ترکیب | ردیف |
|------|----------------------|------|-------|---------------------|------|
| ۰/۳۵ | β -Bourbonene | ۱۵ | ۰/۲۸ | α -Pinene | ۱ |
| ۰/۲۱ | Octanol | ۱۶ | ۰/۳۹ | β -Pinene | ۲ |
| ۰/۶۲ | Ethylamylcarbinol | ۱۷ | ۰/۲۴ | β -Myrcene | ۳ |
| ۰/۲۷ | spathulenol | ۱۸ | ۱/۰۹ | Limonene | ۴ |
| ۰/۲۶ | isosphathulenol | ۱۹ | ۴۲/۹۶ | Menthol | ۵ |
| ۰/۹۵ | Caryophyllene oxide | ۲۰ | ۰/۶ | Camphene | ۶ |
| ۰/۲۵ | cis-sabinene hydrate | ۲۱ | ۰/۲۵ | Tymol | ۷ |
| ۰/۱ | Borneol | ۲۲ | ۲/۱۳ | neo-Menthol | ۸ |
| ۲/۷۶ | Menthyl acetate | ۲۳ | ۰/۵۶ | Neoisomenthol | ۹ |
| ۰/۷۲ | Menthol acetate | ۲۴ | ۱۸/۴۳ | Menthone | ۱۰ |
| ۰/۹۶ | Viridiflorol | ۲۵ | ۰/۲۲ | α -Terpineol | ۱۱ |
| ۰/۲۹ | Farnesene | ۲۶ | ۶/۲۴ | Menthofuran | ۱۲ |
| ۰/۱۸ | α -Humulene | ۲۷ | ۰/۲۵ | Sabinene | ۱۳ |
| ۲/۷۶ | Menthyl acetate | ۲۸ | ۰/۲۷ | gamma-Terpinene | ۱۴ |

جدول شماره ۲. اثر ضد لیستریایی اسانس زیره سبز در سه سطح ۱، ۲ و ۳ درصد در گوشت چرخ شده ماهی شیزوتوراکس طی نگهداری در دمای یخچال (۴ درجه سانتی گراد)

| زمان (روز) | ۰ | ۱ | ۲ | ۳ | ۴ | ۵ | ۶ | ۷ | ۸ | ۹ | ۱۰ | اسانس (%) |
|------------|-----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| شاهد | ۳±* | ۸/۳۷±۰/۰۱۷ | TNTC** | TNTC | TNTC | TNTC | TNTC | TNTC | TNTC | TNTC | TNTC | TNTC |
| ۱ | ۳±۰ | ۵/۳۰±۰/۰۰۱ | ۶/۴۰±۰/۰۱۱ | ۶/۵۰±۰/۰۵۷ | ۶/۵۰±۰/۰۵۷ | ۶/۵۰±۰/۰۵۷ | ۶/۵۰±۰/۰۵۷ | ۶/۵۰±۰/۰۵۷ | ۶/۵۰±۰/۰۵۷ | ۶/۵۰±۰/۰۵۷ | ۶/۵۰±۰/۰۵۷ | ۷/۳۰±۰/۰۰۵ |
| ۲ | ۳±۰ | ۵/۳۰±۰ | ۶/۳۰±۰/۰۱۱ | ۶/۴۰±۰/۰۱۱ | ۶/۴۰±۰/۰۱۱ | ۶/۴۰±۰/۰۱۱ | ۶/۴۰±۰/۰۱۱ | ۶/۴۰±۰/۰۱۱ | ۶/۴۰±۰/۰۱۱ | ۶/۴۰±۰/۰۱۱ | ۶/۴۰±۰/۰۱۱ | ۷/۳۰±۰/۰۱۱ |
| ۳ | ۳±۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ |

* میانگین (Log CFU/g)±SE، ** غیر قابل شمارش

جدول شماره ۳. اثر ضد لیستریایی نیسین در سه سطح ۱۰، ۱۵، ۴۰ و ۵۰ میکروگرم در گرم در گوشت چرخ شده شیزوتوراکس طی نگهداری در دمای یخچال (۴ درجه سانتی گراد)

| ردیف زمان (روز) | ۰ | ۱ | ۲ | ۳ | ۴ | ۵ | ۶ | ۷ | ۸ | ۹ | ۱۰ | نیسین (µg/g) |
|-----------------|-----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|--------------|
| شاهد | ۳±* | ۸/۳۷±۰/۰۱۷ | TNTC** | TNTC | TNTC | TNTC | TNTC | TNTC | TNTC | TNTC | TNTC | TNTC |
| ۱۰ | ۳±۰ | ۳/۵۸±۰/۰۰۶ | ۷/۵۰±۰/۰۱۱ | ۷/۶۰±۰/۰۱۵ | ۷/۶۰±۰/۰۱۵ | ۷/۶۰±۰/۰۱۵ | ۷/۶۰±۰/۰۱۵ | ۷/۶۰±۰/۰۱۵ | ۷/۶۰±۰/۰۱۵ | ۷/۶۰±۰/۰۱۵ | ۷/۶۰±۰/۰۱۵ | ۷/۹۰±۰/۰۱۱ |
| ۱۵ | ۳±۰ | ۳/۷۶±۰/۰۱۱ | ۶/۶۱±۰/۰۱۷ | ۶/۶۹±۰/۰۰۶ | ۶/۶۹±۰/۰۰۶ | ۶/۶۹±۰/۰۰۶ | ۶/۶۹±۰/۰۰۶ | ۶/۶۹±۰/۰۰۶ | ۶/۶۹±۰/۰۰۶ | ۶/۶۹±۰/۰۰۶ | ۶/۶۹±۰/۰۰۶ | ۷/۸۰±۰/۰۱۷ |
| ۴۰ | ۳±۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ |
| ۵۰ | ۳±۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ |

* میانگین (Log CFU/g)±SE، ** غیر قابل شمارش

نیسین و اسانس با هم بر لگاریتم رشد باکتری ها نسبت به استفاده از اسانس و نیسین به تنهایی نتایج معنی دار می باشند (P=۰/۰۰۱).

بحث

بطور کلی مقایسه نتایج بدست آمده در مورد خواص ضد باکتریایی اسانس های مختلف بسیار مشکل می باشد. از دلایل آن می توان به تفاوت در روش های مختلف بررسی خواص ضد باکتریایی اسانس ها، منابع تهیه آنها و سویه های باکتریایی بکار برده شده، روش عصاره گیری، فاز رشد و میزان باکتری، نوع محیط کشت مورد استفاده، عوامل خارجی و داخلی مواد غذایی نظیر pH، چربی، پروتئین، آب، آنتی اکسیدانها، مدت زمان و دمای گرمخانه گذاری، روش بسته بندی و ساختار فیزیکی مواد غذایی اشاره کرد. مدل های مختلفی در مطالعات متعدد به منظور بررسی اثرات ضد باکتریایی و نگهدارندگی اسانس های گیاهی

نتایج میانگین لگاریتم تعداد سلول های لیستریا مونوسیتوژن تحت تاثیر غلظت های مختلف نیسین و اسانس زیره در گوشت چرخ شده شیزوتوراکس در جدول ۴ نشان داده شده است. میانگین تعداد کلی باکتری لیستریا مونوسیتوژن در گوشت چرخ شده ماهی شیزوتوراکس در روز صفر 1×10^2 CFU/g بود. در روز اول تعداد باکتری در تیمارهای دارای نیسین و زیره سبز نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی داری داشتند (P=۰/۰۰۱). در روز سوم تعداد باکتری لیستریا در تیمارهای حاوی نیسین و زیره سبز نسبت به گروه شاهد کاهش معنی داری داشتند (P=۰/۰۰۱) و تیمار شاهد غیر قابل شمارش شدند. در روز سوم تیمارهای حاوی نیسین (۱۰ µg/g) و زیره سبز (۱%) تعداد باکتری لیستریا را به صفر رساندند. در روز پنجم اختلاف معنی داری و مهار کنندگی ضعیف بین تیمارها وجود داشت (P=۰/۰۰۱). همچنین در بررسی نتایج تاثیر سینرژیست

در گوشت چرخ شده ماهی شیزوتوراکس دارد که احتمالاً به دلیل منتول فراوان موجود در اسانس زیره سبز است. مطالعات در محیط آزمایشگاهی نشان می دهند که این ترکیب فنولی موجود در اسانس زیره سبز فعالیت ضد لیستریایی دارند (۱۷).

استفاده شده است. در برخی از این روشها از محیط کشت و در برخی دیگر از مدلهای غذایی برای بررسی اثرات ضد باکتریایی اسانس ها استفاده شده است (۱۵، ۲۰). نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که اسانس زیره سبز در سطح ۳ درصد (v/w) اثر مهارکنندگی و باکتری کشی قوی علیه لیستریا مونوسیتوژن

جدول ۴. اثر ضد لیستریایی نیسین و زیره سبز در گوشت چرخ شده شیزوتوراکس طی نگهداری در دمای یخچال (۴ درجه سانتی گراد)

| زمان (روز) | | | | | | | شاهد |
|----------------------------|------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|------------------|---------|
| ۱۲ | ۹ | ۷ | ۵ | ۳ | ۱ | ۰ | |
| انسیسین (μg/g) + اسانس (%) | | | | | | | |
| TNTC | TNTC | TNTC | TNTC | TNTC | TNTC | Ab $3 \pm 0/000$ | |
| TNTC | TNTC | TNTC | $7/60 \pm 0/011$ Aa | $7/50 \pm 0/005$ Ab | $4/50 \pm 0/00$ Bc | $3 \pm 0/000$ Ad | %۰/۵+۲ |
| TNTC | TNTC | TNTC | $7/61 \pm 0/01$ Aa | $7/51 \pm 0/01$ Ab | $4/41 \pm 0/288$ Bc | $3 \pm 0/000$ Ad | %۱+۲ |
| TNTC | TNTC | TNTC | $7/30 \pm 0/005$ Ba | $7/21 \pm 0/017$ Bb | $Cc3/50 \pm 0/005$ | $3 \pm 0/000$ Ad | %۰/۵+۴ |
| TNTC | TNTC | TNTC | $7/30 \pm 0/005$ Ba | $7/21 \pm 0/015$ Bb | $Cc3/48 \pm 0/017$ | $3 \pm 0/000$ Ad | %۱+۴ |
| TNTC | TNTC | $7/61 \pm 0/028$ Aa | $5/35 \pm 0/098$ Cb | $4/63 \pm 0/051$ Cc | $Cd3/44 \pm 0/128$ | $3 \pm 0/000$ Ae | %۰/۵+۱۰ |
| . | . | . | . | $2/44 \pm 0/046$ Dc | $Da3/13 \pm 0/034$ | $3 \pm 0/000$ Ab | %۱+۱۰ |

می باشند. نیسین و اسانس زیره سبز هر دو بر روی غشای سلولی باکتری ها تاثیر می گذارند. در واقع نیسین با تاثیر بر غشای سیتوپلاسمی میکروارگانیسم ها و ایجاد حفره در این غشاء سبب اختلال در تبادل مواد مورد نیاز سلول نظیر ATP می شود. همچنین تشکیل حفرات در غشای سلولی روی نیروی محرکه بار مثبت سلول اثر نموده باعث مرگ میکروارگانیسم می شود (۱۶). علاوه بر این، خاصیت آبگریزی اسانس های روغنی نیز سبب می شود که این ترکیب به راحتی در غشای لیپیدی نفوذ کند و نشأت مواد درون باکتری ها به بیرون و در نهایت باعث مرگ آنها می گردد (۳).

استفاده از اسانس زیره سبز به همراه نیسین سبب برطرف شدن محدودیت های استفاده از این ماده می شود، چرا که نیسین ترکیبی است که حلالیت کمی در آب دارد و همچنین بیشترین میزان تاثیر آن در شرایط اسیدی می باشد، یکی دیگر از محدودیت های استفاده از نیسین این است که بسیاری از باکتری ها مثل برخی از سویه های لیستریا مونوسیتوژن به آن مقاومت دارند (۲۲)، نتایج این پژوهش نشان میدهد که با ترکیب

در مطالعه حاضر، تجزیه و تحلیل داده ها نشان می دهد که نیسین در غلظتهای مختلف و در روزهای مختلف اثر ممانعت کنندگی بر روی لیستریا داشته است، اما غلظت بالای ۴۰ میکروگرم در گرم نیسین دارای بیشترین تاثیر بازدارندگی بر رشد باکتری بوده، که با سایر تیمارها تفاوت معنی دار آماری داشته است. فتار رشد باکتری های ویبریو پاراهمولایتیکوس و لیستریا مونوسیتوژن در فیله ماهیان شور شده تحت تاثیر نیسین و اسانس آویشن شیرازی و ترکیب آنها با هم توسط Ekhtiarzadeh و همکاران در سال ۲۰۱۲ بررسی شد. ترکیب با نیسین در دمای ۴ درجه سانتی گراد مشاهده شد. رشد باکتری ویبریو در ۸ درجه سانتی گراد (گروه کنترل) در روز اول کشت متوقف گردید و به زیر ۲ لوگ رسید. بهترین اثر بازدارندگی اسانس در ترکیب با نیسین برای باکتری ویبریو در غلظت ۰/۴ اسانس و ۰/۷۵ میکروگرم بر میلی لیتر نیسین و برای لیستریا ۰/۴ اسانس و ۰/۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر نیسین حاصل شد (۲۱).

استفاده از پارامترهای چند مانعی راهکاری مناسب برای کاهش میزان غلظت مورد استفاده مواد نگهدارنده در مواد غذایی

می شود (۱۸). در سال ۲۰۱۲ Roomiani تاثیر اسانس رزماری و نیسین را بر رفتار رشد باکتری استرپتوکوکوس اینیایی بررسی کرد و به این نتیجه رسید که در دمای ۴ درجه سلسیوس رشد باکتری در غلظت های مختلف نیسین و رزماری به تنهایی تا روز نهم و در ترکیب با هم تا روز سوم به تأخیر افتاد. در دمای ۸ درجه سلسیوس در تمام غلظت های نیسین و رزماری از روز سوم به بعد نگره دارنده ها نتوانستند مانع رشد باکتری شوند (۱۴).

نتیجه گیری

در این تحقیق خواص ضد میکروبی اسانس زیره سبز و نیسین به عنوان نگهدارنده طبیعی در رشد باکتری لیستریا مونوسیژن بررسی شد. البته لازم است که قبل از استفاده از اسانس زیره سبز به عنوان نگهدارنده غذا مطالعات بیشتری جهت شناسایی خصوصیات ضد میکروبی اسانس های گیاهی صورت گیرد. با توجه به نتایج به دست آمده در این پژوهش و موارد مطرح شده در بحث، اثرات سینرژیک نیسین و اسانس های زیره سبز بخوبی مشخص گردیده است. این اثرات تحت تأثیر عواملی نظیر کاهش pH افزایش می یابد و نقطه ضعف نیسین را که عدم تأثیر بر باکتری های گرم منفی است، می پوشاند. ضمن آنکه باعث کاهش غلظت مؤثره اسانس های مورد نظر می گردد که این خود باعث برطرف گردیدن اثرات منفی آن ها، بو، طعم و مزه مواد غذایی می گردد. لذا انجام مطالعات تکمیلی در مدل های آزمایشگاهی و سپس تعمیم آن بر مدل های غذایی به عنوان گام بعدی می تواند نتایج ارزنده ای را در برداشته باشد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی (شماره گرنت: UOZ-GR-9517-60) دانشگاه زابل انجام شد. بدین وسیله، نویسندگان مراتب سپاس خود را از معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه زابل برای حمایت مالی انجام شده اعلام می دارند.

این دو میتوان به مشکلات استفاده از نیسین و همچنین اسانس زیره غلبه کرد.

Yano در سال (۲۰۰۶) به بررسی اثر ضد میکروبی اسانس تهیه شده از ۱۸ گیاه مختلف به صورت جداگانه بر رشد ویبریو پاراهمولیتیکوس پرداخت آثار بازاریابی آن در غلظت ۲/۵ درصد تأیید گردید اثرات هر کدام از آنها در دو دمای ۵ و ۲۰ درجه ی سانتی گراد بررسی شد و مشخص گردید که زیره سبز در هر دو دما دارای اثرات ضد میکروبی است و باعث حداقل ۱Log کاهش در جمعیت میکروبی گردید (۲۳).

در پژوهشی دیگر که توسط عروج علیان و همکاران انجام شد (۲۰۰۹) اثر عصاره ی روغنی زیره ی سبز بر روی چهار نوع باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، اشیریشیا کلی و لیستریا مونوسیژن بررسی شد و حداقل غلظت مهارتی آن ۰/۳۷ تا ۳ میلی گرم در هر میلی لیتر برآورد شد (۲۴).

در مطالعه ای، اثرات سینرژیک عصاره آلی سیر بر روی ۶ سویه MIC و نیسین به صورت تعیین لیستریا مونوسیژن در یک مدل محیط کشت مایع بررسی شد و یک تأثیر سینرژیک ضد باکتریایی بر روی سویه های لیستریا در هنگام استفاده این دو ماده با هم مشاهده شد (۲۵).

در سال ۱۹۹۹ Pol و همکارانش از اسانس های گیاهی به همراه نیسین و استرهای دی گلیسیرید اسیدهای چرب برای مهار باکتری لیستریا مونوسیژن استفاده نمودند. در این بین کارواکرول و تیمول موثرترین ترکیبات علیه لیستریا مونوسیژن بودند و بعد از آنها به ترتیب اوژنول، سینامالدئید و ایزواوژنول موثر بودند. در بین استرهای دی گلیسیرید اسیدهای چرب، دی گلیسرول منو لورات موثرترین ترکیب علیه لیستریا مونوسیژن بود. در استفاده توأم از این ترکیبات، این مطالعه نشان داد که میتوان از نیسین و دی گلیسرول منولورات برای بالا بردن اثر ضد لیستریایی ترکیبات گیاهی (کارواکرول، تیمول و اوژنول) استفاده نمود که در این حالت از مقدار (دوز) کمتری از اسانس گیاهی در ماده غذایی استفاده می شود و در نتیجه از اثرات نامطلوب اسانس گیاهی روی طعم و مزه غذا جلوگیری

تضاد منافع

در این پژوهش هیچ گونه تعارض منافی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

References

- Oussalah M, Caillet S, Saucier L and Lacroix M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: E. coli O157:H7, Salmonella Typhimurium, Staphylococcus aureus and Listeria monocytogenes. Food control. 2007; 18: 414-20.
- Skandamis P, Koutsoumanis K, Fasseas K and Nychas GJE. Inhibition of oregano essential oil and EDTA on Escherichia coli O157:H7. Ital. J. Food Sci. 2001; 13: 65-75.
- Shannon EM, Milillo SR, Johnson MG and Ricke SC. Inhibition of Listeria monocytogenes by exposure to a combination of nisin and coldpressed terpene less valencia oil. J. Food Sci. 2011; 9: 600-604.
- Dillon VM, Board RG. Natural antimicrobial systems and food preservation. J. Food Safe. 1994; 16:239-41.
- Ettayebi K, Yamani EI, Rossi-Hassani BD. Synergistic effects of nisin and thymol on antimicrobial activities in listeriamonocytogenes and Bacillus subtilis. FEMS Microbiol Lett .2000; 183(1): 191-195.
- FAO. Fisheries Report No. 604. Expert consultation on the trade impact of listeria in fish products. Amherst, MA, USA. FAO; 1999.
- Tirziu E, Nichita I, Cumpanasolu C, Gros RV, Seres M. Listeria monocytogenes, monographic study. Anim Science Biotechnol. 2010; 43: 441-446.
- Yin LJ, Wu CW, Jiang ST. Biopreservative effect of pediocin ACCEL on refrigerated seafood. Fisher Sci. 2007; 73(4):907-12.
- Vázquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Domínguez-Bernal G, Goebel W, et al. Listeria pathogenesis and molecular virulence determinants. Clin microbiol rev. 2001; 14(3):584-640.
- Kuwano K, Tanaka N, Shimizu T, Nagatoshi K, Nou S, Sonomoto K. Dual antibacterial mechanisms of nisin Z against Gram-positive and Gram-negative bacteria. Int J Antimicrob Agents. 2005; 26(5):396-402.
- Helander IM, Mattila-Sandholm T. Permeability barrier of the Gram-negative bacteria outer membrane with special reference to nisin. Int J Food Microbiol. 2000; 60(2):153-61.
- Breukink E, Wiedemann I, Van Kraaij C, Kuipers OP, Sahl HG, De Kruijff B. Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. Sci. 1999; 6(5448):2361-4.
- Thomas LV, Wimpenny JW. Investigation of the effect of combined variations in temperature, pH, and NaCl concentration on nisin inhibition of Listeria monocytogenes and Staphylococcus aureus. Appl. Environ. Microbiol. 1996; 62(6):2006-12.
- Roomiani, L. Study of effect Rosmarinus officinalis and nisin on the growth of Streptococcus iniae in lab conditions and fillet of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Thesis of Fisheries. Islamic Azad University. Science and Research Branch of Tehran. 2012; pp:164.
- Moubarz G, Embaby MA, Doleib NM, Taha MM. Effect of dietary antioxidant supplementation (Cuminum cyminum) on bacterial susceptibility of diabetes-induced rats. Cent Eur J Immunol 2016; 41(2):132.
- Misaghi A, Basti AA. Effect of Zataria multiflora Boiss. Essential oil and nisin on Bacillus ATCC 11778. Food control. 2007;18 (9):1043-9.
- Ravi R, Prakash M, Bhat KK. Characterization of aroma active compounds of cumin (Cuminum cyminum L.) by GC-MS, e-Nose, and sensory techniques. Int. J. Food Proper. 2013; 16(5):1048-58.
- Pol IE and Smid EJ. Combined action of nisin and carvacrol on Basillus cereus and Listeriamonocytogen. Lett. Appl. Microbiol. 1999; 29: 166-70.
- Farber JM. Listeria monocytogenes in fish products. Journal of Food Protection. 2000; 54:922-924, 934.
- Azimizadeh M. Genetic assessment of Iranian Bunium persicum Boiss using ITS. Tehran: University of Tehran; 2009. p.81.[persian]
- Ekhtiarzadeh H, Akhondzadeh Basti A, Misaghi A, Sari A, Khanjar A, Rokni N, Abbaszadeh S, Partovi R. Growth response of Vibrio parahemolyticus and Listeria monocytogenes in

salted fish fillets as affected by *Zataria multiflora* Boiss. Essential oil, nisin and their combination. Food processing and preservation. 2012; 32(3):263-69.

22. Boziaris IS, Nychas and GJE. Effect of nisin on growth boundaries of *Listeria monocytogenes* Scott A, at various temperatures, pH and water activities. Food Microbiol. 2006; 8: 779-84.

23. Yano Y, Satomi M, Oikawa H. Antimicrobial effect of spices and herbs on *Vibrio parahaemolyticus*. Int. J. Food Microbiol. 2006: 6-11.

24. Oroojalian F, Kasra-Kermanshahi R, Azizi M, Bassami MR. Phytochemical composition of the essential oils from three Apiaceae species and their antibacterial effects on food-borne pathogens. Food chem. 2010; 120(3):765-70.

25. Sousa AAS, Soares PMG, de Almeida ANS, Maia AR, de Souza EP, Assreuy AMS. 2010. Antispasmodic effect of *Mentha piperita* essential oil on tracheal smooth muscle of rats. Journal of Ethnopharmacol. 2010;130: 433-446.

Archive of SID

The effect of *Cuminum Cyminum* essence in preventing the growth of *Listeria monocytogenes* in the minced meat of *Schizothorax Zarudnyi*

Mohammad Rahnama¹, Afsaneh Noorijangi², Majid Alipour Eskandani^{1*}

1. Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran

2. Department of fisheries products Processing, Zahak fisheries office, Sistan and Baluchestan, Iran

Corresponding author: alipour@uoz.ac.ir

Abstract

Background & Aim: *Listeria monocytogenes* is one of the main food-borne bacterial pathogens and its control is currently considered as the most important challenges in food industry. This study was aimed to investigate the effect of *Cuminum cyminum* essence and Nisin in preventing the growth of *Listeria monocytogenes* in the minced meat of *Schizothorax zarudnyi*.

Methods: The analysis of the main components of *Cuminum cyminum* essence was achieved using Gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS). Further, 10^3 CFU/g of *Listeria monocytogenes* was inoculated in minced meat of *Schizothorax zarudnyi*. Then the essence of *Cuminum cyminum* and nisin were added to the samples separately or in combination. *Listeria monocytogenes* was counted on days 0, 1,3,5,7,9,11.

Results: The results showed that a concentration of 3% of *Cuminum cyminum* essence had growth preventing effect on *Listeria monocytogenes*. Fourtry micrograms of Nisin alone, and the combination of *Cuminum cyminum* essence (1%) and nisin (10 micrograms) had growth preventing effects on *Listeria monocytogenes*.

Conclusion: The results demonstrated that *Cuminum cyminum* essence may be suitable as a natural preservative for controlling the growth of *Listeria monocytogenes*.

Keywords:

Cuminum cyminum essence, *Listeria monocytogenes*, *Schizothorax zarudnyi*

©2018 Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences. All rights reserved.

How to Cite this Article: Rahnama M, Noorijangi A, Alipour Eskandani M. The effect of *Cuminum Cyminum* essence in preventing the growth of *Listeria monocytogenes* in the minced meat of *Schizothorax Zarudnyi*. Journal of Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences. 2018;6(1):27-36.