شیلات، مجله منابع طبیعی ایران

دوره ۶۹، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۵

صفحات ۴۸۰-۴۷۱

تاثیر نایسین و اسانس نعناع فلفلی بر رشد استرپتوکوکوس اینیایی در فیله قزل‌آلای رنگین‌کمان

مینا خبازی[۱]، لاله رومیانی*[۲]، منصوره قائنی[۳]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد تکثیر و پرورش آبزیان، گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز، اهواز، ایران.

۲. استادیار گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز، اهواز، ایران.

۳. دانشیار گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز، اهواز، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۳/۳۱ تاریخ تصویب: ۱۳۹۶/۸/۸

چکیده

در این مطالعه اثرات ضد باکتریایی اسانس نعناع فلفلی (*Mentha piperita*) در غلظت‌های ۰، ۰/۴ و ۰/۸ درصد و نایسین در غلظت‌های ۰، ۰/۲۵ و ۰/۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌صورت تنهایی و توام برای کنترل استرپتوکوکوس اینیایی (*Streptococcus iniae*) در فیله قزل آلای‌رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در دو دمای ۴ و ۸ درجه سانتی‌گراد مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که اسانس نعناع فلفلی در مقایسه با نایسین قدرت بازدارندگی بالاتری در هر دو دمای ۴ و ۸ درجه سانتی‌گراد دارد. در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، اسانس نعناع فلفلی و نایسین به‌صورت توام در مقایسه با تیمار شاهد عملکرد بهتری داشتند و در تیمار توام ۰/۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نایسین و ۰/۸ درصد اسانس نعناع فلفلی رشد استرپتوکوکوس اینیایی از روز سوم متوقف شد. همچنین با افزایش میزان نایسین و اسانس نعناع فلفلی فعالیت ضدمیکروبی افزایش پیدا کرد و در دمای ۸ درجه سانتی‌گراد این ترکیب توانست تا روز نهم از رشد باکتری جلوگیری کند. نتایج این بررسی نشان داد که اسانس نعناع فلفلی دارای خاصیت ضد باکتریایی بیشتری در مقایسه با نایسین علیه استرپتوکوکوس اینیایی بود. در هر دو تیمار با افزایش سطح نایسین و اسانس نعناع فلفلی فعالیت بازدارندگی در دو دمای ۴ و ۸ به شکل معنی‌داری در مقایسه با تیمار شاهد و تیمارهایی با مقادیر کمتر نایسین و اسانس نعناع فلفلی افزایش یافت. در هر دو دمای نگهداری ۴ و ۸ درجه سانتی‌گراد بهترین عملکرد در تیمار با بالاترین سطح یعنی ۰/۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نایسین و ۰/۸ درصد اسانس نعناع فلفلی مشاهده شد.

واژگان کلیدی: استرپتوکوکوس اینیایی، اسانس نعناع فلفلی، نایسین، قزل‌آلای رنگین‌کمان، دما.

* نویسنده مسوول: تلفن: ۹۸۹۱۶۶۴۳۶۹۷۱+ ایمیل: l.roomiani@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir

۱. مقدمه

فسادپذیری ماهیان تازه به‌عنوان یک محصول با میزان پروتئین بالا، بیشتر تحت تاثیر ترکیبات بیولوژیکی اتفاق می‌افتد، که در این میان میکرو-ارگانیسم‌های فاسدکننده از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند (Martin *et al.*, 2000). استرپتوکوکوزیس یک بیماری عفونی سپتی سمیک در ماهیان گرم‌آبی و سردابی است و توسط گونه‌های کوکسی گرم‌مثبت شامل استرپتوکوکوس، لاکتوکوکوس و واگوکوکوس ایجاد می‌شود. این باکتری گرم‌مثبت، کوکوسی شکل کپسول‌دار، بدون اسپور و غیرمتحرک است، که اولین بار در سال ۱۹۷۶ از آبسه‌های زیر پوستی دلفین‌های آب شیرین جدا شد. اپیدمی در ژاپن در سال‌های ۱۹۸۱ و ۱۹۸۳، سنگاپور در سال ۱۹۸۵، فلسطین اشغالی و تایوان سال ۱۹۸۶ و عربستان سعودی در سال ۱۹۹۴ در ماهیان تیلاپیای هیبرید اتفاق افتاد و تا به امروز ادامه دارد. در میان گونه‌های آب شیرین آلوده به این باکتری، قزل‌آلای رنگین‌کمان و تیلاپیای نیل از اهمیت بیشتری برخوردارند (Costa *et al.*, 2012). تحقیقات نشان داده‌اند که انجماد یا سرد کردن نمونه-های کلینیکی، قابلیت زنده ماندن کوکسی‌های گرم-مثبت را گسترش داده است. بقا کوکسی‌های گرم مثبت بعد از ۱ تا ۲ سال در شرایط انجماد ادامه خواهد داشت. پس انجماد نمی‌تواند به تنهائی از رشد باکتری جلوگیری کند (Evans *et al.*, 2099). از این‌رو استفاده از مواد نگهدارنده علاوه بر انجماد یکی از روش‌های جدید برای مقابله با رشد باکتری‌ها است. نایسین در مواد غذایی به‌عنوان یک نگهدارنده کاربرد داشته و فعالیت ضد میکروبی بسیار قوی و موثر بر روی انواع باکتری‌های گرم مثبت دارد. اما افزایش آگاهی عموم درباره اثرات منفی استفاده بیش از حد مواد شیمیایی مصنوعی منجر به تحقیق درباره محلول‌های سبز مانند اسانس‌های گیاهی و بدون مواد شیمیایی گردیده است (Hyldgaard *et al.*, 2012). اسانس‌ها از طریق ناپایدار ساختن لایه فسفولیپیدی غشاء سلولی، سیستم آنزیمی و مواد ژنتیکی باکتری نقش ضدباکتریایی خود را ایفا می‌کنند. ترکیب اسانس‌های گیاهی با نایسین تاثیرات سینرژیستیکی بر روی کاهش ATP برون سلولی میکروارگانیسم‌ها دارد (Ivanovic *et al.*, 2012). بنابراین نظر متخصصان بهداشت مواد غذایی با بکارگیری سیستم تکنولوژی ممانعتی ابتدا در مدل‌های آزمایشگاهی و سپس در مدل‌های اصلی یعنی ابتدا در محیط مایع و سپس جامد سعی در بکارگیری اسانس‌های گیاهی به تنهایی و توام با سایر نگهدارنده‌های طبیعی دیگر در غلظت‌ها و درجات ترکیبی مختلف با اثر بر روی باکتری‌های بیماری‌زای مهم با منشاء غذایی نموده‌اند تا بتوان به ترکیب سینرژیستی مطمئن و مناسبی از نگهدارنده‌های طبیعی با بیشترین اثر ضدمیکروبی و در عین حال به کمترین اثر نامطلوب ارگانولپتیکی دست یافت (Fazeli *et al.*, 2007). مطالعات متعددی بر روی استفاده از عصاره‌های گیاهی در کاهش بار باکتریایی انجام شده است، از جمله این مطالعات می‌توان به مطالعه انصاری و همکاران (۱۳۹۳)، بر روی اثر اسانس مرزه خوزستانی (*Satureja khuzestanica*) در ممانعت از رشد باکتری لاکتوکوکوس گارویه در گوشت قزل‌آلای رنگین‌کمان در دمای یخچال، Roomiani و Rokni (۲۰۱۵) اثر بازدارندگی اسانس زیره‌سبز و نایسین را بر میزان رشد استرپتوکوکوس‌اینیایی در فیله ماهی قزل‌آلا و نیز Ghasemipirbalouti و همکاران (۲۰۱۰)، بر روی قدرت ضدمیکروبی آویشن دنایی و مزره بختیاری در مقابل رشد لیستریا مونوسایتوژنز اشاره کرد. از این رو هدف از این مطالعه، تعیین اثر اسانس نعناع فلفلی (*Mentha piperital*) و نایسین بصورت انفرادی و همزمان برای کنترل استرپتوکوکوس‌اینیایی در نمونه غذایی می‌باشد.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. تهیه گیاه نعناع فلفلی، اســـانس و آنالیز ترکیبات شیمیایی آن

گیاه نعناع فلفلی از استان البرز (شهر کرج) در فصل تابستان سال ۱۳۹۵ جمع آوری گردید و توسط پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی تایید شد. پس از تهیه اسانس به روش تقطیر با بخار از سرشاخه-های هوایی گیاه، آنالیز اسانس توسط دستگاه گاز کروماتوگراف متصل به طیف نگار جرمی مدل Agilent 6890 انجام شد. نوع ستون دستگاه HP-

Archive of SID

www.SID.ir

5MS، طول ستون دستگاه ۳۰ متر، قطر داخلی ستون ۰/µ۲۵، نوع گاز حامل هلیوم و دمای اولیه و نهایی ستون به ترتیب ۵۰ و ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد بود.

۲.۲. تهیه باکتری مورد مطالعه

کشت لیوفلیزه استرپتوکوکوس اینیایی GQ850377 از گروه بهداشت و بیماریهای آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران جهت این بررسی مورد استفاده قرار گرفت. در ابتدا این کشت لیوفلیزه در محیط براث BHI در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت، دو مرتبه به‌طور متوالی تجدید کشت گردید. سپس کشت دوم به میزان ۵ به ۱ با گلیسیرین مخلوط شد و در قسمت‌های مساوی در لوله‌های میکروسانتریفیوژ اپندروف استریل در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Soltani *et al*., 2005). برای تهیه میزان دوز تلقیح باکتری مورد آزمایش، با انتقال باکتری از لوله میکروسانتریفیوژ اپندروف به محیط براث و نگهداری به مدت ۲۴ ساعت در ۳۳ درجه سانتی گراد انجام گرفت. مجددا کشت دومی از این کشت ۲۴ ساعته در براث دیگر (به مدت ۲۴ ساعت در ۳۳ درجه سانتی‌گراد) تهیه شد. سپس لوله‌های کووت حاوی ۵ میلی‌لیتر براث استریل تهیه گردید. مقادیر مختلفی از کشت براث ۲۴ ساعته دوم، بر روی لوله‌های کووت مذکور برده شد. با استفاده از دستگاه اسپکتوفوتومتر (Milton Roy Company USA) در طول موج ۶۰۰ نانومتر، جذب نوری لوله‌های مذکور خوانده شد (رومیانی و رکنی، ۱۳۹۴). بدین ترتیب در هر بار انجام آزمایش با مشخص شدن جذب نوری که تقریبا معادل 10^5 باکتری در هر میلی‌لیتر بود، لوله کووت حاوی تقریباً 10^5 باکتری در هر میلی‌لیتر مشخص گردید. سپس ۱ میلی لیتر از این کووت را برداشته و در شیشه زیمکس، ۳۹ میلی‌لیتر از آب پپتونه استریل به آن افزوده گردید تا در نهایت در هر ۱۰۰ میکرولیتر از محتویات شیشه زیمکس $1/4\times10^8$ باکتری موجود باشد. در زمان تلقیح برش‌های ماهی از ۱۰۰ میکرولیتر محتویات شیشه زیمکس استفاده می‌شد تا در هر سانتیمتر مربع از برش ماهی 1×10^3 باکتری موجود باشد (Roomiani and Rokni, 2015).

۳.۲. آماده‌سازی محلول نایسین

از پودر نایسین ۲/۵ درصد (Sigma 5764) استفاده شد. به منظور استفاده از این ماده ۵۰۰ میلی‌گرم پودر نایسین در ۵۰ میلی لیتر اسیدکلریدریک (Merk) ۰/۰۲ نرمال آماده شده در زیر هود بیولوژیکی بخوبی حل شد، در ظرف استریل دیگری این محلول از فیلتر ۰/۲ میکرومتری عبور داده می‌شد و با استفاده از رابطه $N_1V_1 = N_2V_2$ مقدار مورد نظر از آن را برداشته و به ظروف درب‌دار افزوده شد و پس از پخش شدن آن در آب، برش های ماهی‌های مورد نظر به آن اضافه شد (Moosavy *et al*., 2008).

۴.۲. آماده‌سازی نمونه‌های ماهی

در این مطالعه از ماهی قزل‌آلای رنگین کمان ۲۵۰ گرمی استفاده شد. ماهیان مورد نظر خریداری و پس از سر و دم زنی و خارج کردن محتویات آنها، به فیله‌های ۲۵ گرمی با اندازه ۳×۸ سانتی‌متر مربع تقسیم شدند و با بسته بندی به‌صورت تکی در کیسه‌های فریزر همراه با یخ به سازمان انرژی اتمی فرستاده شده و تا حدود ۵ کیلوگری اشعه گاما به آنها داده شد، تا از عدم وجود کلیه میکروارگانیسم ها اطمینان حاصل گردد. مجدداً در مجاورت یخ به آزمایشگاه انتقال داده شدند. سپس در شیشه‌های بزرگ درب‌دار، آب مقطر، دی متیل سولفوکساید ۵ درصد و آگارآگار ۱ درصد را با هم مخلوط کرده و در دمای ۱۲۱/۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه استریل شدند. سپس غلظت‌های مختلف اسانس نعناع فلفلی (۰، ۰/۲۵ و ۰/۷۵ درصد) و نایسین (۰ ، ۰/۴ و ۰/۸ میکروگرم بر میلی لیتر) و ترکیب آنها با همدیگر به شیشه‌های درب‌دار استریل اضافه شد. باکتری به فیله ماهی تلقیح شد و در حرارت اتاق به مدت ۱ ساعت جهت خشک‌شدن نگهداری شد. سپس در انکوباتور ۴ و ۸ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. در روزهای ۰، ۳، ۶، ۹ و ۱۵ از نظر رشد باکتری و رسیدن به حد دوز مسمومیت زا یعنی $10^6 <$ بررسی شدند (Varnam and Evans, 1991).

۵.۲. روش شمارش میکروبی

از محتویات هر یک از لوله‌ها مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر برداشت شد و در سطح دو پلیت آگار کشت داده

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- ترکیبات شیمیایی اسانس نعناع فلفلی(*Mentha piperital*)

ترکیب شیمیائی	درصد	ترکیب شیمیائی	درصد
آلفا- پنین	۱۱/۷	ایزو- منتل استات	۳۰/۴۴
سابینین	۱۳/۷۷	بتا- بوربونین	۳۳/۸۷
بتا- پینین	۱۴/۰۴	بتا-المین	۳۴/۰۸
۳-اکتانول	۱۵/۱۶	E-کاریوفیلین	۳۵/۴۷
الفا-ترپینین	۱۶/۰۹	بتا-کوپائین	۳۵/۹۱
p- سیمین	۱۶/۶۰	Z- بتا-فارنسینین	۳۶/۶۸
لیمونین	۱۶/۷۶	آلفا- هیومیولین	۳۷/۰۲
۱،۸-سینئول	۱۶/۹۵	ژرماسنین D	۳۸/۰۹
ترپینین	۱۸/۲۹	بیوسیکلوژرماسرین	۳۸/۶۹
سیس-سایسن هیدرات	۱۹/۰۱	کادینین	۳۹/۵۵
ترپینولین	۱۹/۶۸	اسپاتیلنول	۴۲/۱۰
لینانول	۲۰/۵	کاریوفیلین اکساید	۴۲/۳۰
ایزوپولیگول	۲۳/۰۸	کارواکرول	۳۰/۰۴
منتون	۲۳/۵۳	منتیل استات	۲۹/۷۲
منتوفورن	۲۳/۸۳	نئو- منتیل استات	۲۸/۸۸
ایزو- منتون	۲۳/۹۶	پی پریتونی	۲۸/۳۷
نئو – منتول	۲۴/۱۶	پیولگونی	۲۷/۵۷
منتول	۲۴/۶۹	آلفا- ترپینول	۲۵/۴۸
ایزو- منتول	۲۵/۱۲	نئوایزو- منتول	۲۵/۲۵

شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۳ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شدند. میانگین پرگنه‌های شمارش شده در دو پلیت برای رقت مربوطه در نظر گرفته شد و حاصل ضرب تعداد باکتری در فاکتور رقت به عنوان تعداد استرپتوکوکوس اینیایی در هر گرم یا میلی‌لیتر از نمونه گزارش گردید (*et al.*, Snoussi 2015).

۶.۲. تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های مربوط به نتایج مربوطه با اســـتفاده از نرم افزار SPSS 20.0 و آ نالیز وار یانس یک طر فه مورد بررسی قرار گرفتند.

۳. نتایج

۱.۳. نتایج GC-MS

بر اساس نتایج آنالیز ترکیب شیمیایی اسانس جدا شده از اسانس نعناع فلفلی با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی دارای طیف سنج جرمی ترکیبات ژرماسنین D (۳۸/۰۹ درصد)، بیوسیکلوژرماسرین (۳۸/۶۹ درصد)، اسپاتیلنول (۴۲/۱۰ درصد)، کاریوفیلین اکساید (۴۲/۳۰ درصد) فراوان‌ترین ترکیبات موجود در اسانس نعناع فلفلی بودند (جدول ۱).

۲.۳. نتایج آزمون میکروبی

مطابق جدول ۲، در بیشترین غلظت نایسین (۰/۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در روز صفر، تعداد باکتری از ۳/۰۴ log cfu/g به ۱ log cfu/g باکتری رسید. همچنین این جدول نشان داد که، استفاده از غلظت‌های ۰/۲۵ و ۰/۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نایسین در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در فیله ماهی با لگاریتم تعداد باکتری در گروه شاهد اختلاف معنی‌دار داشتند ($P<۰/۰۵$). همچنین دو گروه ۰/۲۵ و ۰/۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نایسین نیز از نظر لگاریتم رشد باکتری با یکدیگر اختلاف معنی داری داشتند ($P<۰/۰۵$) و در غلظت ۰/۷۵ میکروگرم در میلی‌لیتر نایسین لگاریتم رشد باکتری از ۳/۰۴ log cfu/g به ۱ log cfu/g در روز نهم رسید و در روز پانزدهم رشد این باکتری قابل شمارش نبود، در حالی‌که در غلظت ۰/۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر نایسین رشد باکتری از ۳/۰۲±۰/۰۱log cfu/g به ۱/۰۱±۰/۰۱ log cfu/g در روز پانزدهم رسید.

مطابق جدول ۳، در بیشترین غلظت اسانس نعناع فلفلی (۰/۸ درصد) در روز صفر، تعداد باکتری از ۳/۰۴ log cfu/g به ۱/۱۲ log cfu/g باکتری رسید. همچنین استفاده از غلظت‌های ۰/۴ و ۰/۸ درصد از اسانس نعناع فلفلی در لگاریتم تعداد باکتری‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در فیله ماهی با لگاریتم تعداد باکتری در گروه شاهد اختلاف معنی‌دار داشتند

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲- لگاریتم رشد باکتری‌ها در غلظت‌های مختلف نایسین در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد

اسانس نعناع فلفلی(%)	نایسین (µg/ml)	روز صفر	روز سوم	روز ششم	روز نهم	روز پانزدهم
۰	۰	۳/۰۷±۰/۰۰^{a}	۳/۶۰±۰/۰۱^{a}	۴/۰۳±۰/۰۳^{a}	۳/۰۱±۰/۰۲^{a}	۴/۲۴± ۰/۰۱^{a}
۰	۰/۲۵	۳/۰۲±۰/۰۱^{a}	۲/۵۶±۰/۰۱ ^{b}	۱/۳۵±۰/۰۱^{a}	۱/۲۱±۰/۰۴^{b}	۱/۰۱±۰/۰۱ ^{c}
۰	۰/۷۵	۳/۰۴±۰/۰۰^{a}	۲/۰۲±۰/۰۱^{b}	۱/۲۲±۰/۰۲^{c}	۱/۰۰±۰/۰۱^{d}	-

جدول ۳- لگاریتم رشد باکتری ها غلظت‌های مختلف اسانس نعناع فلفلی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد

نایسین (µg/ml)	اسانس نعناع فلفلی (%)	روز صفر	روز سوم	روز ششم	روز نهم	روز پانزدهم
۰	۰	۳/۰۶±۰/۰۰^{a}	۳/۱۹±۰/۰۲^{a}	۲/۲۴±۰/۰۶^{a}	۲/۰۵±۰/۰۱^{a}	۱/۰۲±۰/۰۱^{b}
۰	۰/۴	۳/۰۶±۰/۰۰^{a}	۱/۵۵±۰/۰۳^{a}	۱/۲۷±۰/۰۱^{b}	–	–
۰	۰/۸	۳/۰۴±۰/۰۰^{a}	۱/۳۰±۰/۰۵^{b}	۱/۱۲±۰/۰۲^{c}	–	–

جدول ۴- لگاریتم رشد باکتری ها در غلظت‌های نایسین و اسانس نعناع فلفلی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد

اسانس نعناع فلفلی (%)	نایسین (µg/ml)	روز صفر	روز سوم	روز ششم	روز نهم	روز پانزدهم
۰	۰	۳/۰۰±۰/۰۰^{a}	۲/۵۳±۰/۰۱^{a}	۲/۲۴±۰/۰۵^{b}	۱/۲۴±۰/۰۴^{c}	۱/۰۵±۰/۰۱^{d}
۰/۴	۰/۲۵	۳/۰۲±۰/۰۰^{a}	۲/۰۰±۰/۰۴^{b}	۱/۰۴±۰/۰۱^{c}	–	–
۰/۸	۰/۲۵	۳/۰۴±۰/۰۰^{a}	۱/۶۶±۰/۰۲^{c}	–	–	–
۰/۴	۰/۷۵	۳/۰۱±۰/۰۰^{a}	۱/۲۳±۰/۰۲^{d}	–	–	–
۰/۸	۰/۷۵	۳/۰۳±۰/۰۱^{a}	۱/۰۰±۰/۰۰^{d}	–	–	–

جدول ۵- لگاریتم رشد باکتری‌های استرپتوکوکوس اینیایی در غلظت‌های نایسین در دمای ۸ درجه سانتی‌گراد

اسانس نعناع فلفلی (%)	نایسین (µg/ml)	روز صفر	روز سوم	روز ششم	روز نهم	روز پانزدهم
۰	۰	۳/۰۸±۰/۰۱^{a}	۶/۵۵±۰/۰۰^{b}	–	–	–
۰	۰/۲۵	۳/۰۷±۰/۰۳^{a}	۴/۱۹±۰/۰۱ ^{c}	۴/۲۵±۰/۰۲^{c}	۵/۲۰±۰/۰۲^{d}	-
۰	۰/۷۵	۳/۰۲±۰/۰۰^{a}	۴/۳۹±۰/۰۲^{c}	۴/۰۰±۰/۰۷^{c}	۴/۸۹±۰/۰۸^{d}	-

($P<$۰/۰۵). همچنین دو گروه ۰/۴ و ۰/۸ درصد نیز از نظر لگاریتم رشد باکتری با یکدیگر اختلاف معنی‌داری داشتند ($P<$۰/۰۵) و در هر دو غلظت ۰/۴ و ۰/۸ رشد در روزهای نهم و پانزدهم قابل شمارش نبود.

جدول ۴ نشان می‌دهد که لگاریتم رشد استرپتوکوکوس اینیایی در تیمارهای دریافت کننده نایسین و اسانس نعناع فلفلی نسبت به تیمار شاهد در تمام روزهای مورد بررسی به جز روز صفر از نظر آماری اختلاف معنی‌دار داشتند($P<$۰/۰۵). همچنین مقایسه لگاریتم رشد استرپتوکوکوس اینیایی نشان داد که، زمانی که نایسین و اسانس نعناع فلفلی با هم استفاده شوند، رشد باکتری به شکل معنی‌داری در مقایسه با حالت منفرد این دو ماده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، کمتر است($P<$۰/۰۵).

جدول ۵ نشـــان می دهد که، در غلظت‌های مختلف ۰، ۰/۲۵ و ۰/۷۵ میکروگرم در میلی‌لیتر در دمای ۸ درجه ســـانتی‌گراد با افزایش زمان نگهداری رشـــد باکتری‌ها افزایش یافت. اما رشـــد باکتری‌ها در دوز ۰/۷۵ میکروگرم در میلی‌لیتر با اختلاف معنی‌دار از رشـــد باکتری در ۰/۲۵ میکروگرم در میلی لیتر کمتر بود($P<$۰/۰۵) و هر دو غلظـت ۰/۲۵ و ۰/۷۵ درصـد تا روز نهم توانســـتند به شـــکل معنی‌داری در مقایســـه با شـــاهد جلوی رشـــد باکتری‌ها را بگیرند ($P<$۰/۰۵).

مطابق جدول ۶، کمترین میزان رشد باکتریایی در دمای ۷ درجه سانتی‌گراد مربوط به ۰/۸ درصد اسانس نعناع فلفلی بود که لگاریتم رشد باکتری از log cfu/g ۳/۰۰±۰/۰۰ به log cfu/g ۴/۷۲±۰/۰۳ در مقایسه با ۰/۴ درصد (log cfu/g ۰/۰۱ ۵/۵۵) و صفر(log cfu/g ۶/۶۹±۰/۱۱) رسید که دارای اختلاف معنی‌دار بود ($P<$۰/۰۵). همچنین غلظت ۰/۸ درصد اسانس نعناع فلفلی توانست تا روز نهم از رشد باکتری-ها جلوگیری کند.

در جدول ۷، لگاریتم رشـــد باکتری ها در

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۶- لگاریتم رشد باکتری ها در غلظت‌های مختلف اسانس نعناع فلفلی در دمای ۸ درجه سانتی‌گراد

اسانس نعناع فلفلی (%)	نایسین (µg/ml)	روز صفر	روز سوم	روز ششم	روز نهم	روز پانزدهم
۰	۰	۳/۰۸±۰/۰۰^{a}	۳/۱۷±۰/۰۲^{a}	۶/۶۹±۰/۱۱^{a}	-	-
۰/۴	۰	۳/۰۰±۰/۰۰^{a}	۳/۱۷±۰/۰۴^{a}	۵/۵۵±۰/۰۱^{b}	-	-
۰/۸	۰	۳/۰۰± ۰/۰۰ ^{a}	۳/۲۹±۰/۰۵^{b}	۴/۷۲±۰/۰۳^{c}	۵/۳۳±۰/۰۷^{d}	-

جدول ۷- لگاریتم رشد باکتری ها در غلظت‌های نایسین و اسانس نعناع فلفلی در دمای ۸ درجه سانتی‌گراد

اسانس نعناع فلفلی(%)	نایسین (µg/ml)	روز صفر	روز سوم	روز ششم	روز نهم	روز پانزدهم
۰	۰	۴/۰۵±۰/۰۰^{a}	۶/۶۶±۰/۰۲	-	-	-
۰/۴	۰/۲۵	۳/۶۷±۰/۰۹^{a}	۴/۳۳±۰/۱۴^{b}	۶/۹۰±۰/۰۶^{c}	-	-
۰/۸	۰/۲۵	۳/۹۰±۰/۰۰^{a}	۴/۸۰±۰/۰۷^{b}	۶/۸۱±۰/۰۹^{c}	-	-
۰/۴	۰/۷۵	۳/۴۴±۰/۰۰^{a}	۴/۲۳±۰/۰۶^{b}	۵/۷۴±۰/۲۲^{c}	-	-
۰/۸	۰/۷۵	۳/۹۰±۰/۰۳^{a}	۴/۵۴±۰/۰۲^{b}	۵/۰۰±۰/۰۶^{c}	۶/۲۶±۰/۰۴	-

غلظت‌های مختلف ترکیب نایسین و اسانس نعناع فلفلی در دمای ۸ درجه سانتی‌گراد نشان داده شده است. مقایسه تیمارها با یکدیگر نشان داد بین تمام تیمارها در غلظت های مختلف ترکیب نایسین و اسانس نعناع فلفلی با شاهد اختلاف معنی‌دار وجود داشت و رشد باکتری در دوز صفر در روز ششم افزایش شدید نشان داد. در حالی که در تیمارهای ۰/۴ در صد اسانس نعناع فلفلی و ۰/۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر نایسین، ۰/۸ در صد اسانس نعناع فلفلی و ۰/۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر نایسین و ۰/۴ درصد اسانس نعناع فلفلی و ۰/۷۵ میکروگرم بر میلی لیتر نایسین رشد زیاد باکتری در روز ششم افزایش شدید نشان داد.

۴. بحث و نتیجه گیری

نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که اغلب اسانس-های گیاهی استخراج شده از گیاهان دارویی دارای خواص ضدقارچی، ضدانگلی، ضدباکتریایی و ضد-ویروسی می‌باشند (Choobkar *et al*., 2010; Ivanovic *et al*., 2012; Snoussi *et al*., 2015). از این‌رو محققان تلاش‌هایی را در جهت بکارگیری اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهان بومی و دارویی به‌عنوان جایگزینی برای نگهدارنده‌های شیمیایی انجام داده‌اند (Madsen and Bertrlsen, 1995) و نتایج آن‌ها نشان می‌دهد این ترکیبات ضمن ایجاد عملکرد قابل مقایسه با ترکیبات شیمیایی (Philipson, 1990)، سمیت پایین‌تری برای انسان و سایر پستانداران داشته و با داشتن اثرات مخرب کمتر در محیط زیست (Mason *et al*., 2006)، می‌توانند جایگزین یا مکمل مواد شیمیایی باشند (Ghasemi pirbalouti and Rahimi, 2010). از آنجایی‌که بیماری ناشی از استرپتوکوکوس اینیایی بین انسان و ماهی مشترک است، بنابراین همواره خطر انتقال بیماری از طریق مصرف ماهیان آلوده وجود دارد (Roomiani and Rokni, 2015). نتایج پژوهش حاضر نشان داد هم اسانس نعناع فلفلی و هم نایسین دارای اثر بازدارندگی بر روی استرپتوکوکوس اینیایی هستند، در هر دو مورد با افزایش سطح نایسین و یا درصد اسانس قدرت باز دارندگی در دو دمای ۴ و ۸ به شکل معنی‌داری در مقایسه با تیمار شاهد و تیمارهایی با مقادیر کمتر اسانس افزایش یافت. در مورد فعالیت باکتری‌کشی نعناع فلفلی نیز نظیر نایسین با افزایش غلظت، فعالیت باکتری‌کشی افزایش نشان داد به گونه‌ایی که در هر دو دمای نگهداری ۴ و ۸ درجه سانتی‌گراد بهترین عملکرد در تیماری با بالاترین سطح یعنی ۰/۸ درصد اسانس نعناع فلفلی مشاهده شد. در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد این اسانس توانست در روز نهم رشد باکتری را متوقف کند و در دمای ۸ درجه سانتی‌گراد توانست تا روز ۹ مانع از رشد استرپتوکوکوس اینیایی در فیله قزل‌آلا شود. Choobakar و همکاران (۲۰۱۰)، در بررسی تاثیر آویشن بر روی رشد استافیلوکوکوس اورئوس فیله شور شده فیتوفاگ نشان دادند که غلظت‌های بالای اسانس (۰/۱۳۵ درصد) رشد باکتری را کاهش داد اما غلظت‌های کمتر اسانس تفاوت معنی‌دار را با شاهد

Archive of SID

www.SID.ir

نشان ندادند. در تحقیق حاضر حتی غلظت‌های پایین نیز در مقایسه با شاهد تحت تاثیر عصاره نعناع فلفلی قرار گرفتند. ترکیبات اصلی موجود در اسانس نعناع فلفلی متنانول و منتون است و فعالیت ضدباکتریایی اسانس نعناع فلفلی را می توان به وجود این ترکیبات نسبت داد (Ramezani *et al*., 2004)، که در تحقیق حاضر نیز این ترکیبات شناسایی شدند. از جمله ترکیبات خاص دیگر در این جنس که به گروه منوترپنوئیدها مربوط می‌شود، فنلی تیمول و کارواکرول (Simasam, 2003) را می‌توان نام برد. همچنین ترکیب شاخص دیگر در این جنس پاراسمین است که مانند دو ترکیب دیگر جز منوترپن‌های حلقوی می‌باشد (Essawi and Srurr, 2000). بسیاری از محققین تاکید کرده‌اند که خاصیت آنتی باکتریال اجزا اصلی اسانس‌ها به خاصیت هیدروفوبیک آن‌ها و دیواره غشا پلاسمایی میکروب بستگی دارد. افزایش مقدار برخی یون‌های ویژه بر روی و یا داخل غشا پلاسمایی تاثیر وسیعی بر روی نیروی محرکه پروتون‌ها، میزان ATP درون سلولی و فعالیت کلی سلول‌های میکروبی (شامل کنترل فشار ورم سلول‌های زنده، انتقال مواد حل شونده و تنظیم متابولیسم) دارد، که این مکانیزم‌ها از رشد باکتری جلوگیری می‌کنند. مطالعات مختلف نشان می‌دهند که ترکیبات فنولیک بر روی غشا سلولی موثر هستند و در واقع این ترکیبات نه تنها به غشا سیتوپلاسمی حمله می‌کنند بلکه باعث تخریب قابلیت نفوذ پذیری غشا شده و باعث آزاد شدن اجزای اصلی داخل سلولی می‌شوند و نیز می‌توانند تخریب عملکرد در زمینه انتقال الکترون، جذب مواد مغذی، سنتز نوکلئیک اسید و همچنین فعالیت آنزیم ATPase را به همراه داشته باشند (Beuchat and Golden, 1998). که همگی موارد تایید کننده فعالیت باکتری-کشی اسانس عصاره نعناع فلفلی در تحقیق حاضر است که در تحقیقات مختلف که در ادامه ذکر شده است، نیز این امر مشاهده شده است.

Fadaei و همکاران (۲۰۱۰)، فعالیت ضدباکتریایی اسانس نعناع فلفلی را بر روی *Salmonella typhimurium*، *Bacillus subtilis* و *Escherichia coli* مورد بررسی قرار دادند و نتایج آنها نشان دهنده خاصیت ضدمیکروبی بالای اسانس نعناع فلفلی بود. Snoussi و همکاران (۲۰۱۵)، فعالیت آنتی‌باکتریایی عصاره نعناع فلفلی را ضد ویبریوها مورد بررسی قرار دارند. نتایج آنها نشان از تاثیر شدید نعناع فلفلی بر روی ویبریوها و خاصیت آنتی‌باکتریایی و آنتی‌اکسیدانی عصاره داشت و عنوان کردند این عصاره می‌تواند نقش مهمی در بهبود سلامت غذاها در طول نگهداری داشته باشد. در مطالعه Roomiani و Rokni(۲۰۱۵)، بررسی اثر بازدارندگی اسانس زیره سبز و نایسین بر میزان رشد استرپتوکوکوس اینیایی در فیله ماهی قزل‌آلا مورد بررسی قرار دادند و عنوان کردند که استفاده از اسانس‌های گیاهی در ترکیب با دمای یخچالی در مقایسه با ترکیبات شیمیایی در محصولات شیلاتی، موثرتر عمل می کنند. که نتیجه-ایی مشابه تحقیق حاضر است. از جمله دلیل کاهش فعالیت نایسین در مقایسه با اسانس‌های گیاهی در این شرایط را می‌توان به ترکیب نایسین با پروتئین و چربی و همچنین کاهش قدرت مهارکنندگی به دلیل فعالیت آنزیم‌های موجود در گوشت اشاره کرد (Abdollahzadeh *et al*., 2011). همانطور که نتایج این مطالعه نشان داد، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، اسانس نعناع فلفلی و نایسین به صورت توام در مقایسه با شاهد عملکرد بهتری داشتند و با افزایش میزان درصد نایسین و مقدار میکرگرم اسانس نعناع فلفلی این عملکرد افزایش پیدا کرد، به گونه‌ای که بهترین عملکرد در تیمار ۰/۸ درصد اسانس نعناع فلفلی و ۰/۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نایسین مشاهده شد و در این تیمار رشد استرپتوکوکوس‌اینیایی از روز سوم متوقف شد. این نتیجه مورد انتظار بود، زیرا در حالت ترکیب اسانس گیاهی و نایسین به صورت مکمل عمل کرده و سبب بهبود کارکرد و فعالیت ضد میکروبی می-شوند. در این حالت طیف عملکردی نایسین وسیع تر شده و چون هر دو به طور همزمان بر روی غشا سیستوپلاسمی عمل می‌کنند، اثر سینرژیستی بالاتری در مقایسه با حالت منفرد دارند. در دمای ۸ درجه سانتی‌گراد این ترکیب توانست تا روز نهم از رشد باکتری جلوگیری کند. اما در دمای بالاتر به دلیل خروج آب از بافت ماهی و تشکیل فاز آبی، کارکرد اسانس‌ها و مواد نگهدارنده کاهش می‌یابد. زیرا روغن-های اسانسی و ترکیبات آن‌ها هیدروفوبیک هستند، به دلیل اینکه این که میکروارگانیسم‌ها در فاز آبی سیستم‌های غذایی قرار دارند، سرعت انتقال جرم

Archive of SID

www.SID.ir

ترکیبات فعال به میکروارگانیسم‌ها کم است. همچنین در مورد نایسین، دمای بالا بر روی لپید II که نایسین از طریق اتصال به آن از تشکیل دیواره سلولی باکتری جلوگیری می‌کند، تاثیر منفی دارد و مانع فعالیت ضد باکتریایی نایسین می‌شود (Icobellis *et al*., 2006). این مسائل دلیلی برای فعالیت پایین‌تر این ترکیبات در مواد غذای در دمای ۸ درجه سانتی‌گراد در مقایسه با ۴ درجه سانتی‌گراد است (Snoussi *et al*., 2015). در مجموع نتایج بالا نشان دادند که در شرایط نگهداری در یخچال، ترکیب اسانس نعناع فلفلی و نایسین در مقایسه با هر کدام از آنها به صورت مجزا، در مقابله با استرپتوکوکوس اینیایی، توانمندتر عمل کرده است.

References

Abdollahzadeh, E., Rezaei, M., Hosseini, H., Safari, R., 2011. Effects of nisin and thyme essential oil, individually and in combination, on inoculated populations of *Listeria monocytogenes* in minced silver carp. *Journal of Food Science and Technology* 6, 13-20.

Ansari, M., Soltani, M., Hosseini, E., Kamali, A., 2014. Study of the effect of *Satureja khuzestanica* essential oil on the growth of *Lactococcus garvieae* in rainbow trout fillet at the refrigerator temperature. *Journal of Food Microbiology* 3, 39-33.

Beuchat, L.R., Golden, D.A., 1998. Antimicrobials naturally in foods. *Food Technology* 11,134-142.

Choobkar, N., Soltani, M., Ebrahimzadeh Mousavi, H.M., Akhonzadeh Basti, A., Matinfar, A., 2010. Effect of *Zataria multiflora* Boiss essential oil on the growth of Staphylococcus *aureus* in the light salted fillets of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Iranian Journal of Fisheries Sciences* 9, 352-362.

Costa, G., Danz, H., Kataria, P., Bromage, E., 2012. A holistic view of the dynamisms of teleost IgM: A case study of *Streptococcus iniae* vaccinated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Developmental and Comparative Immunology* 36, 298-305.

Essawi, T., Srurr, M., 2000. Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology* 70, 343-349.

Evans, J., Klesius, P., Shoemaker, C., 2009. First isolation and characterization of *Lactococcus garvieae* from Brazilian Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of Fish Diseases* 32, 943-951.

Fadaei, S., Aberoomand Azar, P., Sharifan, A., Larijani, K., 2010. Evaluation of Antimicrobial activity of *Mentha piperita* L. essential oil and its comparison with sodium benzoate. *Food Technology and Nutrition* 8, 1-9.

Fazeli, M., Amin, G.H., Ahmadian Attari, M., Ashtiani, H., Jamalifar, Samadi, N., 2007. Antimicrobial activities of Iranian sumac and avishan-e shirazi (*Zataria multiflora*) against some food-borne bacteria. *Food Control* 18, 646-649.

Ghaeni, M., Roomiani, L., 2013. Synergistic effect of Nisin and *Cuminum cyminum* L. essential oil on the growth of *Streptococcus iniae* in fillets of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Food Hygiene* 3, 65-76.

Ghasemipirbalouti, A., Rahimi, E., 2010. Antimicrobial activity of essential oils of three herbs against Listeriamonocytogenes on chicken frankfurters. *Acta Agriculture Slovenica Abbreviation* 95, 219-223.

Hyldgaard, M., Mygind, T., Meyer, R.L., 2012. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy* 25, 3-12.

Icobellis, N.S., Cantore, P.L., Capasso, F., Senatore, F., 2006. Antibacterial activity of *Cuminum cyminum* L. and *Carum carvi* L. essential oil. *Agriculture Food Chemistry* 53, 57-61.

Ivanovic, J., Misic, D., Zizovic, I. and Ristic, M., 2012. In vitro control of multiplication of some food-associated bacteria by thyme, rosemary and sage isolates. *Food Control* 25, 110-116.

Kordali, S., Kotan, R., Mavi, A., Cakir, A., Ala, A., Yildirim, A., 2005. Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculus* and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *A. dracunculus*, *Artemisia santonicum* and *Artemisia spicigera* essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 9452-9458.

Madsen, H.L., Bertelsen, G., 1995. Spices as antioxidants. *Trends in Food Science and Technology* 6, 277-271.

Martin, R.E., Carter, E.P., JR, G.J.F., Davis, L.M., 2000. Marine and fresh water products handbook. Technomic Publishing Company, 983 p.

Mason, T.G., Wilking, J.N., Meleson, K., Chang, C.B., Graves, S., 2006. Nanoemulsions: formation, ucture and physical properties. Journal of Physics: *Condensed Matter* 18, 35-66.

Moosavy, M.H., Akhondzadeh Basti, A., Misaghi, A., Zahraei Salehi, T., Abbasifar, R., Ebrahimzadeh Mousavi, H.A., Alipour, M., Emami Razavi, N., Gandomi, H., Noori, N., 2008. Effect of *Zataria multiflora* Boiss essential oil and nisin on *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in a food model system and on the bacterial cell membranes. *Food Research International* 41, 1050-1057.

Archive of SID

www.SID.ir

Philipson, J.D., 1990. Plants as a source of valuable products. In: Charlwood, BV, Rhodes MJ, Secondary products from plants tissue culture.2th Ed. Oxford, Clarendon press, pp. 1-22.

Ramezani, M., Hosseinzadeh, H., Samizadeh, S., 2004. Antinociceptive effect on Zataria multiflora Bioss fractions in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 91,167-170

Roomiani, L., Rokni, N., 2015. Study of inhibition effect of *Cuminum cyminum* essential oil and Nisin on the growth of *Streptococcus iniae* in fillets of Rainbow trout using Hurdle Technology. *Quarterly Journal of Food Science and Technology* 48, 37-46.

Simasam, S., 2003. Breeding and replanting of medicinal plants. 30 pp.

Snoussi, M., Noumi, E., Trabelsi, N., Flamini, G., Papetti, A., Feo, V. D., 2015. *Mentha spicata* Essential Oil: Chemical Composition, Antioxidant and Antibacterial Activities against Planktonic and Biofilm Cultures of *Vibrio* spp. *Molecules* 20, 14402-14424.

Soltani, M, Mousavi, H.A., Mirzargar. S., 2009. Status of aquaculture health management in the Islamic Republic of Iran. 1th international congress on aquatic animal, Tehran, pp. 27 - 28.

Archive of SID

www.SID.ir