Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 10, Number 1 (March-April)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Effect of *Rosmarinus officinalis* essential oil and nisin on probability of growth of *Streptococcus iniae* in BHI broth

Laleh Roomiani[1], Mehdi Soltani[2], Afshin Akhondzadeh Basti[3]

1. Department of Fisheries, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran
2. Department of Aquatic Animals Health and Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
3. Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

Article Information

Article history:
Received: 2015/01/10
Accepted: 2015/10/01
Available online:2016/03/10

Article Subject:
Food Microbiology

IJMM 1395; 10(1): 35-43

Corresponding author at:
Dr. Laleh Roomiani

Department of Fisheries, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran.

Tel:
+98 916 6436971

Email:
L.roomiani@yahoo.com

Abstract

Background and Aim: *Streptococcus* is one of the most important food-borne diseases and zoonotic that caused by streptococcus species especially *S.iniae*. The present study was undertaken to evaluate the effects of *R. officinalis* essential oil, nisin, temperature, pH and storage time (43 days) on the log10 probability percentage of growth initiation (log P %) of *S.iniae* in brain heart infusion (BHI) broth in a factorial design study.

Materials and Methods: The essential oil yield of the air-dried material was analyzed by gas chromatography (GC) . Lyophilized cultures of *S. iniae* obtained from Department of Aquatic Animals Health and Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran, were used in this study. The log P% was calculated from the number of total tubes (out of 24) for each EO–N–pH–*T* combination.

Results: Concentrations of essential oil with 0.75 µg/ml nisin can inhibit growth of bacterial and log P% was calculated as -4.241in 37 ºC. The synergistic effect 0.25 µg/ml of nisin with concentrations of essential oil (0.005 and 0.015%) was observed in 15 ºC, thus no significantly affected (P>0.01) with 0.75 µg/ml of nisin. The growth of bacterial was completely inhibited at combinations of 0.0015% essential oil with 0.75 µg/ml of nisin, 4 ºC and pH= 5.5 during storage times.

Conclusions: The synergistic effect of *R. officinalis* essential oil and nisin could increase the scope of essential oil usage within the food industry.

Key Words: *Rosmarinus officinalis*, Nisin, *Streptococcus iniae*

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

How to cite this article:

Roomiani L, Soltani M, Akhondzadeh Basti A. Effect of Rosmarinus officinalis essential oil and nisin on Log P% of Streptococcus iniae in BHI broth. Iran J Med Microbiol. 2016; 10 (1) :35-43

www.SID.ir

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران
سال ۱۰، شماره ۱، فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۵
Journal homepage: www.ijmm.ir

اثر اسانس رزماری و نیسین بر روی احتمال رشد *استرپتوکوکوس اینیه* در محیط آبگوشت قلب و مغز

لاله رومیانی[۱]، مهدی سلطانی[۲] و افشین آخوندزاده بستی[۳]

۱. گروه شیلات، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران
۲. گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۳. گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله
دریافت: ۱۳۹۳/۱۱/۲۴
پذیرش: ۱۳۹۴/۱۰/۰۵
انتشار آنلاین: ۱۳۹۴/۱۲/۲۱
موضوع:
میکروب‌شناسی غذایی
IJMM 1395; 10(1): 35-43

نویسنده مسئول:
دکتر لاله رومیانی
گروه شیلات، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران
تلفن: ۰۹۱۶۶۴۳۶۹۷۱
پست الکترونیک:
L.roomiani@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: استرپتوکوکوزیس یکی از مهمترین بیماری‌های منتقله از طریق غذا و زئونوز است که توسط گونه‌های استرپتوکوکوس بخصوص *استرپتوکوکوس اینیه* ایجاد می‌شود. مطالعه حاضر با هدف تعیین مطالعه لگاریتم درصد احتمال رشد *استرپتوکوکوس اینیه* تحت تاثیر غلظت‌های مختلف اسانس رزماری، نیسین، دما و pH طی ۴۳ روز نگهداری در محیط آبگوشت قلب و مغز به صورت یک طرح چند عاملی انجام شد.

مواد و روش ها: استخراج اسانس از بخش‌های هوایی گیاه رزماری توسط دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف نگار جرمی انجام شد. باکتری لیوفیلیزه *استرپتوکوکوس اینیه* از بخش بهداشت و بیماری‌های دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران از ماهیان قزل‌آلای بیمار به دست آمد. محاسبه لگاریتم درصد احتمال رشد باکتری از طریق روش ۲۴ لوله‌های با ترکیبی از اسانس، نیسین، دما و pH به دست آمد.

یافته‌ها: در دمای ۳۷ درجه سلسیوس غلظت‌های اسانس در ترکیب با غلظت ۰/۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نیسین توانستند مانع رشد باکتری شوند و حداکثر لگاریتم درصد احتمال رشد برای آنها ۴/۲۴۱- به دست آمد. در دمای ۱۵ درجه سلسیوس و pH ۵/۵ غلظت ۰/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نیسین در کنترل رشد باکتری تاثیر سینرژیستیک خود را با غلظت‌های ۰/۰۰۵ و ۰/۰۱۵ درصد اسانس نشان داد که تفاوت معنی‌داری با غلظت ۰/۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نیسین نداشت ($P>0/01$). غلظت ۰/۰۰۱۵ درصد اسانس با ۰/۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نیسین، دمای ۴ درجه سلسیوس و pH ۵/۵ توانستند در طی ۴۳ روز نگهداری کاملاً از رشد باکتری جلوگیری کنند.

نتیجه‌گیری: نتایج این بررسی تاثیر ضدباکتریایی و اثر سینرژیستیک اسانس رزماری و نیسین را نشان داد که با استفاده از این نتایج می توان در صنعت غذا از آن بهره برد.

کلمات کلیدی: اسانس رزماری، نیسین، *استرپتوکوکوس اینیه*

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

مقدمه

در چند دهه اخیر عامل بیماریزای نوظهور *استرپتوکوکوس اینیه* مانعی در پیشرفت صنعت آبزی‌پروری در جهان محسوب میشود. باکتری زئونوز فوق در نقاطی از جهان که ماهیان را به صورت خام مصرف می‌کنند و از طریق کارگرانی که با حمل و نقل و دستکاری ماهی سروکار دارند می‌تواند از ماهی به انسان منتقل شود (۱). تاکنون بیشتر از ۲۵ مورد عفونت *استرپتوکوکوس اینیه* به انسان از امریکا، کانادا، تایوان و چین گزارش شده است که ایمنی بدن را به مخاطره انداخته است (۲).

استرپتوکوکوس اینیه در ماهیان وحشی و پرورشی در آب شور و شیرین دیده شده است. در ماهیان دریایی از *Sparus aurata* (۳)، *Paralichthys olivaceus* (۴)، *Sciaenops ocellatus* (۵) و از ماهیان آب شیرین از گونه *Oncorhynchus mykiss* (۶) و *Oreochromis niloticus* (۷) جدا گردیده است. این باکتری می‌تواند از طریق ماهیان وارداتی جدید به مزارع منتقل شود، بویژه زمانی که تجهیزات قرنطینه وجود نداشته باشد. پرندگان، حشرات و سایر جانوران می‌توانند حامل باکتری فوق از یک مزرعه به مزرعه دیگر باشند (۸). از آن جهت که کنترل باکتری‌های بیماریزا در مواد غذایی مهم است و نیز به علت مقاومت باکتری در برابر داروها و کاهش تاثیر

www.SID.ir

روزبروز داروها، لذا شناسایی راه حل‌هایی جهت کنترل آنها در مواد غذایی ضروری است. بهداشت مواد غذایی مرتبط با محصولات تولید شده از آبزیان صید شده و پرورشی در دهه اخیر رشد وسیعی داشته است. دلیل آن روی آوردن مردم به استفاده از این منابع پروتئینی و درپی آن گسترش صنایع مرتبط به ویژه در زمینه پرورش آبزیان است. از این رو بهداشت محصولات تولید شده از آبزیان برای مصارف انسانی از مهمترین مسائل بهداشت عمومی محسوب می‌شود. استفاده از افزودنی‌های طبیعی به عنوان ترکیبات ضدباکتریایی یک راه حل مناسب در جهت کنترل باکتری‌های بیماریزا و افزایش مدت ماندگاری مواد غذایی می‌باشد که نتیجه آن کاهش خطرات بهداشتی و ضررهای اقتصادی ناشی از رشد میکروارگانیسم های در ارتباط با مواد غذایی است (۹). بطور کلی غلظت‌های بیشتری از اسانس‌های گیاهی در مواد غذایی نسبت به محیط کشت مورد نیاز است. به خاطر همین دلیل کاربرد اسانس‌ها محدود است و از طرفی اضافه کردن آنها به مواد غذایی سبب تغییر طعم و بوی آنها خواهد شد و از این رو اسانس‌های گیاهی در ترکیب با سایر مواد ضد میکروبی مانند نیسین و سیترات سدیم بکار می‌روند، اما باید تاثیر سینرژیستیک آنها در شرایط آزمایشگاه مشخص گردد و بعد به سیستم غذایی تعمیم داده شود (۱۰).

نیسین یک پپتید ضد باکتری است که از *لاکتوکوکوس لاکتیس* بدست می‌آید و سالهاست در صنعت غذا به عنوان یک ماده (Generally Recognized As Safe: GARS) شناخته شده و تنها باکتریوسینی است که با تصویب سازمان جهانی بهداشت در صنعت مواد غذایی کاربرد عملی وسیعی پیدا کرده است. مطالعات مختلفی تاثیر آن را بر روی باکتریهای گرم مثبت نشان داده‌اند (۱۱). گیاه رزماری از تیره نعناعیان است که ارزش دارویی، بهداشتی و خوراکی آن از دیرباز شناخته شده است. مطالعات متعددی اثرات ضد میکروبی آن را اثبات کرده‌اند (۱۲، ۱۳، ۱۴)

هدف این مطالعه بررسی اثرات غلظت‌های متفاوت اسانس رزماری و نیسین بر روی یکی از فاکتورهای رشد یعنی لگاریتم درصد احتمال رشد *استرپتوکوکوس اینیه* در محیط آبگوشت قلب و مغز در دمای ۴، ۱۵، ۳۷ درجه سلسیوس و pH های ۵/۵ و ۷ طی ۴۳ روز نگهداری می باشد تا با استفاده از نتایج مطالعه بتوان در مدل‌های غذایی از آن استفاده کرد.

مواد و روش‌ها

تهیه اسانس و آنالیز آن

گیاه رزماری از استان البرز (شهر کرج) در فصل تابستان جمع‌آوری گردید و نام علمی آن توسط پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی دانشگاه تهران تایید شد. پس از تهیه اسانس به روش تقطیر با بخار از سرشاخه های هوایی گیاه، آنالیز اسانس توسط دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف نگار جرمی (GC/MS) انجام گردید. مشخصات این دستگاه در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱ : مشخصات دستگاه GC/MS مورد استفاده

مدل دستگاه GC	Agilent 6890
مدل دستگاه Mass	Agilent 5973
نوع ستون	HP-5MS
طول ستون	۳۰ متر
قطر داخلی ستون	۰/۵۲ میکرون
دمای اولیه ستون	۵۰ سانتیگراد
دمای نهائی ستون	۳۰۰ سانتیگراد
نوع گاز حامل	هلیوم
دتکتور	Mass

باکتری مورد مطالعه

باکتری لیوفیلیزه *استرپتوکوکوس اینیه* (GQ۸۵۰۳۷۷) از بخش بهداشت و بیماریهای دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران از ماهیان قزل‌آلای آلوده به این باکتری تهیه و در محیط آبگوشت قلب و مغز در ۳۵ درجه سلسیوس به مدت ۶ ساعت حداقل ۲ مرتبه به طور متوالی کشت داده شده و سپس از کشت دوم به نسبت ۱ به ۵ با گلیسیرین استریل مخلوط و در حجم‌های ۵۰۰ میکرولیتری در میکروتیوپ‌های اپندروف در ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شده و برای هر آزمایش از این کشت‌های نگهداری شده در ۲۰- درجه سلسیوس استفاده شد (۱۵).

تهیه میزان تلقیح باکتری

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 ۳۵ درجه سلسیوس انجام گرفت. مجدداً کشت دومی از این کشت ۲۴ ساعته در براث دیگر (به مدت ۲۴ ساعت در ۳۵ درجه سلسیوس) 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. سپس از این

Archive of SID
www.SID.ir

لوله کووت بر روی محیط کشت آگار قلب و مغز کشت داده شد تا میزان باکتری در هر میلی‌لیتر از آبگوشت قلب و مغز به دست آمد که این میزان برابر با تعداد $۱/۴ \times ۱۰^{۸}$ باکتری در هر میلی لیتر بود. سپس از این کووت حاوی $۱/۴ \times ۱۰^{۸}$ در هر میلی لیتر سریال های رقت ۸ تایی از $۱۰^{۵}$ تا $۱۰^{-۲}$ باکتری در هر میلی لیتر با استفاده از سوبسترای آبگوشت قلب و مغز همراه با ترکیب فاکتورهای مورد نظر آزمایش تهیه گردید. از مجموع رقت‌های $۱۰^{۵}$ تا $۱۰^{-۲}$ جهت تعیین لگاریتم درصد احتمال رشد باکتری استفاده شد (۱۵).

تهیه مدل آبگوشت قلب و مغز

۳۷ گرم پودر محیط کشت آبگوشت قلب و مغز را در ۹۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر در یک ارلن مایر با حرارت ملایم حل نموده و میزان ۱۰ گرم نمک، ۰/۵ گرم آگار- آگار (به عنوان تثبیت کننده) و ۵۰ میلی‌لیتر دی متیل سولفوکساید (به عنوان امولسیون کننده) به آن اضافه نموده و در نهایت با استفاده از آب مقطر حجم آن را به ۱۰۰۰ میلی‌لیتر رسانده و در اتوکلاو قرار داده و پس از سرد شدن اسانس رزماری و نیسین در غلظت‌های مشخص شده اضافه شد (۱۵).

تلقیح آبگوشت قلب و مغز و گرمخانه‌گذاری

با استفاده از لوله کووت حاوی $۱/۴ \times ۱۰^{۸}$ باکتری در هر میلی‌لیتر محیط کشت آبگوشت قلب و مغز و ۸ لوله درپیچ دار حاوی ۹ میلی‌لیتر آبگوشت قلب و مغز برای هر حالت از غلظت اسانس و نیسین رقت‌های مورد نظر از $۱۰^{۵}$ تا $۱۰^{-۲}$ در هر میلی‌لیتر به دست آمد.

مجموع ۴۸ لوله درپیچ دار حاوی ۹ میلی‌لیتر آبگوشت قلب و مغز برای رقت‌های مختلف باکتری (از $۱۰^{۵}$ تا $۱۰^{-۲}$) و غلظت‌های مختلف اسانس رزماری (۰، ۰/۰۰۲۵، ۰/۰۰۵، ۰/۰۱۵ درصد) و نیسین (۰، ۰/۲۵، ۰/۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تهیه شد. سپس محتویات هر یک از لوله‌های درپیچ‌دار استریل در قسمتهای ۳ میلی‌لیتری داخل سه لوله درپیچ‌دار (Becton Dickson) استریل ریخته و به این ترتیب غلظت‌های مختلف اسانس رزماری و نیسین به دست آمد و در دمای ۴، ۱۵ و۳۷ درجه سلسیوس در دو pH ۵/۵ و ۷ به مدت ۴۳ روز نگهداری شد (۱۵)

طی این مدت تمام لوله‌ها جهت مشاهده کدورت قابل رویت مورد بررسی و نتایج ثبت گردید.

محاسبه لگاریتم درصد احتمال رشد

در روش MPN (Most Probable Number) تعداد ارگانیسم‌های زنده در نمونه بر اساس احتمالات آماری تخمین زده می‌شود. تخمین بر اساس آماده نمودن ۱۰ برابر رقت هر نمونه و انتقال آن به رقت‌های پایین‌تر در یک محیط کشت براث انجام شد. نمونه‌هایی که کدورت در آنها دیده شد شمارش و با نمونه استاندارد مقایسه و سطح آلودگی محصول مشخص گردید. بر اساس تعداد لوله‌هایی که رشد در آنها صورت گرفته بود و با استفاده از جدول MPN تعداد باکتری با بیشترین درصد احتمال در هر میلی‌لیتر سوبسترا مشخص گردید و پس از تبدیل مقدار MPN به لگاریتم پایه ۱۰ با استفاده از فرمول زیر لگاریتم درصد احتمال رشد یک سلول باکتری در هر یک از شرایط محیطی موجود در براث طراحی شده در زمان مشخص محاسبه گردید (۱۵):

$$\text{Log P \%} = ۲ - (\text{Log I} - \text{Log G})$$

Log P % = لگاریتم درصد احتمال رشد یک سلول باکتری

Log I = لگاریتم تعداد باکتری تلقیح شده در هر میلی لیتر سوبسترای اولیه

Log G = لگاریتم MPN شمارش شده در هر میلی لیتر سوبسترا

آنالیز آماری و انتخاب مدل پیشگو

اثرات اسانس رزماری و نیسین بر روی لگاریتم درصد احتمال رشد باکتری با استفاده از آنالیز واریانس ANOVA با کمک نرم افزار SPSS ارزیابی گردید.

یافته ها

نتیجه آنالیز ترکیبات اسانس رزماری با استفاده از GC-MS در جدول شماره ۲ آمده است. همانطور که جدول نشان می‌دهد ۱و۸-سینئول با ۷۸/۶ درصد و آلفا- پینن با ۱۵/۸۷ درصد بیشترین ترکیبات گیاه رزماری را بخود اختصاص داده‌اند.

در جدول ۳ نتایج حداکثر درصد احتمال رشد *استرپتوکوکوس اینیه* در آبگوشت قلب و مغز تحت تاثیر غلظت‌های مختلف اسانس رزماری و نیسین در دمای ۴، ۱۵ و ۳۷ درجه سلسیوس در دو pH ۵/۵ و ۷ طی ۴۳ روز گرمخانه‌گذاری نشان داده شده است. غلظت‌های مختلف اسانس رزماری تاثیر معنی‌داری ($P<۰/۰۱$) بر روی لگاریتم درصد احتمال رشد باکتری در مقایسه با گروه کنترل (بدون اسانس) داشته است. در دمای ۴ درجه سلسیوس و pH ۵/۵، از غلظت ۰/۰۰۵ درصد اسانس رزماری و غلظتهای ترکیبی اسانس با نیسین هیچ‌گونه رشدی از باکتری مشاهده نگردید. در pH ۷ و دمای ۴ درجه سلسیوس گراد غلظت ۰/۰۰۲۵ درصد اسانس به تنهایی و در ترکیب با نیسین فقط تا روز ۱۹ توانست مانع رشد باکتری شود که با گروه کنترل تفاوت

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲ : آنالیز ترکیبات اسانس گیاه رزماری با استفاده از گاز کروماتوگرافی متصل به طیف نگار جرمی

ترکیب شیمیایی	زمان جداسازی (دقیقه)	درصد
آلفا- پینن	۱۱/۳۹	۱۵/۸۷
کامفن	۱۲/۰۱	۴/۲۰
۳- اکتانن	۱۳/۹۸	۲/۷۶
بتا- میرسن	۱۴/۲۳	۲/۳۸
۱ و۸- سینئول	۱۶/۲۴	۷۸/۶۰
لینالول	۱۹/۸۰	۲/۲۰
کامفور	۲۱/۹۲	۸/۲۲
بربونون	۲۲/۶۴	۷/۷۵
بی سیکلوهپتان	۲۸/۶۹	۲/۳۴
تولوئن	۴/۹۰	۱۲/۲۶
۱،۴،۷،۱۰،۱۳،۱۶- هگزا اوکساسیکلوکتا	۷۳/۸۷	۲/۵۳
هپتادیکن	۶۰/۱۱	۲/۱۸
بورنئول	۲۳/۰۷	۵/۴۵
اسید بوتانوئیک	۲۴/۳۶	۵/۷۰

جدول ۳ : حداکثر لگاریتم درصد احتمال رشد (Log P٪) *استرپتوکوکوس اینیایی* در محیط آبگوشت قلب و مغز تحت تاثیر غلظت‌های مختلف اسانس رزماری و نیسین طی ۴۳ روز گرمخانه‌گذاری

دما(C^o)	اسانس رزماری(درصد)	نیسین	pH=۵/۵		pH=۷	
			روز	Log P%	روز	Log P%
۳۷	۰	۰	۱	۱/۰۹۹	۱	۳/۱۵
	۰/۰۰۲۵	۰	۱۱	۱/۰۹۹	۳	۲/۷۷۸
	۰/۰۰۵	۰	۱۹	-۳/۵۴۵	۱۱	۲/۱۰۰
	۰/۰۱۵	۰	۳۱	-۴	۱۵	۱/۴۵۴
	۰	۰/۲۵	۹	-۱/۲۴۱	۱	۳/۵۶۳
	۰/۰۰۲۵	۰/۲۵	۱۹	-۱/۲۴۱	۱۶	۰/۴۵۴
	۰/۰۰۵	۰/۲۵	۲۱	-۳/۲۴۰	۲۱	۰/۰۹۹
	۰/۰۱۵	۰/۲۵	۳۰	-۳/۲۴۰	۳۱	-۱/۲۴۱
	۰	۰/۷۵	۱۳	-۳/۵۴۵	۴	۲/۴۶
	۰/۰۰۲۵	۰/۷۵	>۴۳	-۴/۲۴۱	۱۹	۰/۴۵۴
	۰/۰۰۵	۰/۷۵	>۴۳	-۴/۲۴۱	>۴۳	-۴/۲۴۱
	۰/۰۱۵	۰/۷۵	>۴۳	-۴/۲۴۱	>۴۳	-۴/۲۴۱
۱۵	۰	۰	۲	۰/۴۵۴	۱	۲/۷۷۸
	۰/۰۰۲۵	۰	۱۱	-۲/۹۰۱	۱۰	-۱/۲۴۱
	۰/۰۰۵	۰	۱۹	-۴	۱۶	-۳/۲۴

Archive of SID

www.SID.ir

	۰/۰۱۵	۰	>۴۳	-۴/۲۴۱	۱۹	-۴
	۰	۰/۲۵	۵	-۲/۵۴۶	۵	۳/۵۶۳
	۰/۰۰۲۵	۰/۲۵	۱۵	-۳/۲۴۰	۱۹	۰/۴۵۴
	۰/۰۰۵	۰/۲۵	>۴۳	-۴/۲۴۱	۳۱	-۳/۵۴۵
	۰/۰۱۵	۰/۲۵	>۴۳	-۴/۲۴۱	>۴۳	-۴/۲۴۱
	۰	۰/۷۵	۱۱	-۲/۵۴۶	۶	۲/۴۶
	۰/۰۰۲۵	۰/۷۵	>۴۳	-۴/۲۴۱	>۴۳	-۴/۲۴۱
	۰/۰۰۵	۰/۷۵	>۴۳	-۴/۲۴۱	>۴۳	-۴/۲۴۱
	۰/۰۱۵	۰/۷۵	>۴۳	-۴/۲۴۱	>۴۳	-۴/۲۴۱
۴	۰	۰	۱۰	-۳/۵۴۵	۲۸	۰/۱۵
	۰/۰۰۲۵	۰	۳۳	-۳/۴۵۴	۱۹	-۱/۸۵
	۰/۰۰۵	۰	>۴۳	-۴/۲۴۱	>۴۳	-۴/۲۴۱
	۰/۰۱۵	۰	>۴۳	-۴/۲۴۱	>۴۳	-۴/۲۴۱
	۰	۰/۲۵	>۴۳	-۴/۲۴۱	۱۶	-۲/۸۵
	۰/۰۰۲۵	۰/۲۵	>۴۳	-۴/۲۴۱	۱۹	-۲/۸۵
	۰/۰۰۵	۰/۲۵	>۴۳	-۴/۲۴۱	>۴۳	-۴/۲۴۱
	۰/۰۱۵	۰/۲۵	>۴۳	-۴/۲۴۱	>۴۳	-۴/۲۴۱
	۰	۰/۷۵	>۴۳	-۴/۲۴۱	>۴۳	-۴/۲۴۱
	۰/۰۰۲۵	۰/۷۵	>۴۳	-۴/۲۴۱	>۴۳	-۴/۲۴۱
	۰/۰۰۵	۰/۷۵	>۴۳	-۴/۲۴۱	>۴۳	-۴/۲۴۱
	۰/۰۱۵	۰/۷۵	>۴۳	-۴/۲۴۱	>۴۳	-۴/۲۴۱

معنی‌دار آماری نداشت ($P<۰/۰۱$)، بطوریکه حداکثر لگاریتم درصد احتمال رشد باکتری در غلظت ۰/۰۰۲۵ درصد اسانس به تنهایی و در ترکیب با نیسین ۱/۸۵- و ۲/۸۵- بدست آمد.

با افزایش دما به ۱۵ درجه سلسیوس در هر دو pH غلظت ۰/۰۰۵ و ۰/۰۱۵ درصد اسانس با ۰/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نیسین و تمامی غلظت‌های اسانس با ۰/۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نیسین توانستند از رشد باکتری جلوگیری کنند و هیچ گونه کدورتی در لوله‌ها مشاهده نشد (Log P٪= -۴/۲۴۱).

در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در pH ۵/۵ غلظت‌های اسانس رزماری با غلظت ۰/۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نیسین توانستند جلوی رشد باکتری را بگیرند، اما در pH ۷ غلظت ۰/۰۰۵ و ۰/۰۱۵ درصد اسانس با ۰/۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نتایج مشابهی را در بر داشت. غلظت‌های نیسین در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نتوانستند تاثیر ضدباکتریایی داشته باشند، اما در کنترل باکتری تفاوت معنی دار آماری نشان دادند ($P<۰/۰۱$) بطوریکه حداکثر درصد احتمال رشد باکتری برای غلظت ۰/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر در روز اول و برای ۰/۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نیسین در روز چهارم به ترتیب ۳/۵۶۳ و ۲/۴۶ حاصل شد. غلظت ۰/۰۰۱۵ درصد اسانس با ۰/۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نیسین، دمای ۴ درجه سلسیوس و pH ۵/۵ توانستند در طی ۴۳ روز نگهداری کاملاً از رشد باکتری جلوگیری کنند.

بحث

یافته‌های مطالعات مختلف (۱۸-۱۶) تاثیر متفاوت اسانس‌های گیاهی را متذکر شده‌اند که به علت نوع روش کار، گونه باکتری، نوع گیاه، شرایط جغرافیایی، سن، فصل و روش و منبع استخراج اسانس از گیاه می باشد. اثر اسانس رزماری بر روی *لیستریا مونوسیتوژنز* بررسی و این نتیجه حاصل شد که آلفا- پینن (۱۴/۰۶درصد) و ۱و۸- سینئول (۱۳/۶۲درصد) بیشترین ترکیبات اسانس رزماری را به خود اختصاص دادند. در pH ۵ بیشترین تاثیر اسانس رزماری

Archive of SID
www.SID.ir

را علیه باکتری فوق بدست آمد (۱۹). اثر اسانس آویشن شیرازی بر روی احتمال رشد *ویبریوپاراهمولایتیکوس* در محیط آبگوشت قلب و مغز در دمای ۳۵ درجه سلسیوس مورد بررسی قرار گرفت و این نتیجه حاصل شد که با افزایش غلظت اسانس تا ۰/۰۳ درصد در لوله‌ها هیچ گونه رشدی مشاهده نشد (۲۰). اثرات چند فاکتور دما، نمک، pH و سوربات پتاسیم بر روی رشد *سالمونلاتیفی موریوم* در محیط براث انجام شد و این نتیجه به دست آمد که حداکثر درصد لگاریتم احتمال رشد باکتری تحت تاثیر معنی‌دار ($P<0/001$) فاکتورهای ذکر شده به جز نمک قرار دارد (۲۱).

اثر غلظت‌های متفاوت آویشن شیرازی و نیسین بر روی درصد احتمال رشد باکتری *باسیلوس سرئوس* در محیط براث در حضور دما و pH طی ۴۳ روز نگهداری مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان دادند که غلظت ۰/۰۴۵ درصد اسانس در دماهای ۲۰ درجه سلسیوس و کمتر در pH های (۷/۴، ۶/۵، ۶) مانع رشد باکتری شد، اما غلظت‌های پایین‌تر از ۰/۰۳ درصد اسانس در همین شرایط نتوانستند مانع رشد باکتری شوند. تاثیر بازدارندگی نیسین در دماهای پایین‌تر بیشتر بود. در غلظت ۰/۰۱۵ درصد آویشن و نیسین ۱/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر در دماهای پائین‌تر از ۳۰ درجه سلسیوس طی ۴۳ روز نگهداری بطور کامل رشد باکتری متوقف شد. در pH های پائین اثر سینرژیسم آویشن و نیسین محسوس‌تر بود. اثر بازدارندگی نیسین در دماهای پائین در تمامی pH های مورد مطالعه افزایش یافته بود (۲۲).

در مطالعه فعلی نیز pH و دما تاثیر چشمگیری در فعالیت اسانس و نیسین در بررسی مدل رشد باکتری *استرپتوکوکوس اینیه* نشان دادند. مطالعه حاضر نشان داد که pH نقش مهمی در اثر ضدباکتریایی نیسین و اسانس ایفا می‌کند، بطوری که در مقادیر کمتر آن (۵/۵) تاثیر بازدارندگی اسانس رزماری و نیسین بیشتر بود که با مطالعات ذکر شده همخوانی دارد. فعالیت ضدباکتریایی نیسین به علت پایداری کم در pH های بالا کم می‌شود. ترکیب نیسین با سایر نگهدارنده ها مانند اسانس‌ها می‌تواند بر محدودیت کاربرد نیسین غلبه کند، بخصوص در مواد غذایی، که نیسین با اجزاء مواد غذایی و آنزیم‌های موجود در آنها ترکیب می‌شود و از فعالیت آن کاسته می‌گردد. ترکیب نیسین و مواد موثر موجود در اسانس می‌تواند به این صورت بیان شود که مواد موثره ساختار غشاء باکتری را ناپایدار می‌کنند که نتیجه آن نفوذ بیشتر نیسین است. عملکرد اسانس سبب بهبود فعالیت نیسین از طریق افزایش تعداد سوراخهای ایجاد شده در غشاء سلولی یا افزایش اندازه سوراخها که باعث کاهش تعداد سلول‌های زنده می‌شود، می‌گردد. استفاده از چند مواد نگهدارنده در مقادیر کم نسبت به بکارگیری یک ماده در مقادیر زیاد تاثیر بیشتری هم از نظر اقتصادی و هم از نظر ایمنی غذایی و میکروبی دارد (۲۳).

در این مطالعه آنالیزهای آماری اثرات معنی‌دار اسانس رزماری، نیسین، دما و pH را بر روی حداکثر درصد احتمال رشد باکتری ثابت کردند. جدول ۳ اثر بازدارندگی بیشتر اسانس رزماری (محتوی ۷۸/۶۰ درصد ۱و۸- سینئول) و نیسین با هم بر روی باکتری *استرپتوکوکوس اینیه* را نسبت به بکارگیری تنهایی آنها نشان داد که می‌تواند به دلیل اثر مستقیم pH یا حل شدن بهتر اسانس با نیسین در فاز چربی غشاء باکتری توجیه شود (۲۴). سیستم ممانعتی بیشتر از ۶۰ ویژگی تاثیرگذار و ایمنی برای بهبود کیفیت و بهداشت غذاها دارد که استفاده از باکتریوسین‌ها همراه با اسانس‌ها یکی از آنهاست که به عمل‌آوران مواد غذایی کمک می‌کند تا محصولات با ایمنی کافی تولید کنند و این کار ابتدا از طریق تست‌های آزمایشگاهی اثبات می‌شود. خصوصیات ضدمیکروبی اسانس‌های گیاهی قبل از اینکه در مواد غذایی بکار گرفته شوند باید مورد مطالعه قرار گیرند (۲۵).

در مطالعه حاضر تاثیر ضدباکتریایی نیسین و اسانس رزماری به تنهایی و اثر سینرژیستیک آنها با هم ثابت گردید و نشان داده شد که در pH و دماهای پایین این تاثیر بیشتر بود.

تقدیر و تشکر

از ریاست محترم دانشکده دامپزشکی و معاونت پژوهشی دانشگاه تهران و به خصوص گروه بهداشت مواد غذایی تشکر ویژه و قدردانی می نماییم.

تعارض منافع

بین نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

Reference

1. Milani CJE, Aziz RK, Locke JB, Dahesh S, Nizet V, Buchanan JT. The novel polysaccharide deacetylase homologue Pdi contributes to virulence of the aquatic pathogen Streptococcus iniae. Microbiology Mic J. 2010; 156: 543-554.

2. Soltani M, Ghodratnama M, Ebrahimzadeh-Mosavi HA, Nikbakht-Brujeni G, Mohamadian S, Ghasemian M. Shirazi thyme (Zataria multiflora Boiss) and Rosemary (Rosmarinus officinalis) essential oils repress expression

Archive of SID
www.SID.ir

of sagA, a streptolysin S-related gene in Streptococcus iniae. Aquaculture. 2014; 430 (20): 248-252.

3. El- Aamri F, Caballero MJ, Real F, Acosta F, Deniz S, Roman L, Pasilla D. Streptococcus iniae in Gilthead Seabream (Sparus aurata, L.) and Red Porgy (Pagrus pagrus, L.). Veterinary Pathology. 2014;

4. Kim MS, Jin JW, Han HJ, Chio HS, Hong S, Cho JY. Genotype and virulence of Streptococcus iniae isolated from diseased olive flounder Paralichthys olivaceus in Korea. Fisheries Science. 2014; 80 (6): 1277-1284.

5. Mmanda FP, Zhou S, Zhang J, Zheng X, An Sh, Wang, G. Massive mortality associated with Streptococcus iniae infection in cage-cultured red drum (Sciaenops ocellatus) in Eastern China. Afr. J. Microbiol. Res. 2014; 8 (16): 1722-1729.

6. Fadaeifard F, Momtaz H, Rahimi E, Mirzakhani A. Detection of Streptococcus iniae and Lactococcus garvieae by multiplex polymerase chain reaction (PCR) in some rainbow trout farms of Iran. Afr. J. Biotech. 2014; 11 (2).

7. Wang YT, Huang HY, Tsai MA, Wang PC, Jiang BH, Chen SC. Phosphoglycerate kinase enhanced immunity of the whole cell of Streptococcus agalactiae in tilapia, Oreochromis niloticus. Fish Shellfish Immunol. 2014; 41 (2): 250-259.

8. Badzohreh Gh R, Soltani M, Shah Hoseini Gh R, Nafisi Bahabadi M. Effects of β-Glucan on the growth survival and the efficacy of anti- Streptococcus iniae vaccine in Rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). J Vet Res. 2012; 67 (1): 11-17.

9. Soltani M, Mohamadian S, Ebrahimzadeh-Mousavi HA, Mirzargar S, Taheri-Mirghaed A, Rouholahi Sh, Ghodratnama M. Shirazi thyme (Zataria multiflora) essential oil suppresses the expression of the epsD capsule gene in Lactococcus garvieae, the cause of lactococcosis in farmed fish. Aquaculture. 2014; 433 (20): 143-147.

10. Prudencio CV, Mantovani HC, Cecon PR, Vanetti MCD. Differences in the antibacterial activity of nisin and bovicin HC5 against Salmonella Typhimurium under different temperature and pH conditions. J Appl Microbiol. 2015; 118 (1): 18-26.

11. Liu H, Pei H, Han Z, Feng G, Li D. The antimicrobial effects and synergistic antibacterial mechanism of the combination of ε-Polylysine and nisin against Bacillus subtilis. Food Control. 2015; 47: 444-450.

12. Sacco C, Bellumori M, Santomauro F, Donato R, Capei R, Innocenti M, Mulinacci N. An in vitro evaluation of the antibacterial activity of the non-volatile phenolic fraction from rosemary leaves. Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters. 2014; DOI:10.1080/14786419.2014.986728.

13. da Silveira Sh M, Luciano FB, Fronza N, Jr AC, Scheuermann GN, Vieira CRW. Chemical composition and antibacterial activity of Laurus nobilis essential oil towards food-borne pathogens and its application in fresh Tuscan sausage stored at 7 °C. LWT. 2014; 59 (1): 86-93.

14. Teruel MR, Garrido MD, Espinosa MC, Linares MB. Effect of different format-solvent rosemary extracts (Rosmarinus officinalis) on frozen chicken nuggets quality. Food Chem. 2105; 172: 40-46.

15. Roomiani L. Study effect of Rosemary essential oil and nisin on growth of S.iniae in lab condition and fillets of Oncorhynchus mykiss. Thesis of Ph.D. Tehran Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. 2012; 149pp.

16. Bajpai V, Yoon JI, Bhardwai M, Kang SCh. Anti-listerial synergism of leaf essential oil of Metasequoia glyptostroboides with nisin in whole, low and skim milks. Asi Pacific J Tropic Medicine. 2014; 7 (8):602-608.

17. Abdollahzadeh E, Rezaei M, Hosseini H. 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. Food Control. 2014; 35 (1): 177-183.

18. Arancibia M, Gimenez B, Lopez-Caballero ME, Gomez-Guillen MC, and Montero P. Release of cinnamon essential oil from polysaccharide bilayer films and its use for microbial growth inhibition in chilled shrimps. Food

Archive of SID

www.SID.ir

Sci Technol 2014; 59 (2): 989-995.

19. Saei Dehkordi SS, Tajik H, Moradi M, Jafari Dehkordi A, Ghasemi M. Chemical Composition and Antibacterial Effects of Rosmarinus officinalis L essential oil with Lysozyme on Listeria monocytogenes. J YUMS. 2010; 14(3): 1-11.

20. Khanjari A, Akhondzadeh Basti A, Dahr Rokni N, Soltani M, Rezazadeh Behrad Radmehr SH, Partovi R, Cheraghi S, Esmaili H, Gholami F, Gholami H, Mohamadian MR, Yamrali A. Effect of Zataria multiflora Boiss. essential oil on log p% of Vibrio parahaemolyticus in BHI broth. JFSD. 2013; 8(28): 37-46.

21. Basti AA, Razavilar V. Growth response and modelling of the effects of selected factors on the time-to-detection and probability of growth initiation of Salmonella typhimurium. Food Microbiology. 2014; 21: 431–438.

22. Misaghi A, Akhondzadeh Basti A. Effects of Zataria multiflora Boiss. essential oil and nisin on Bacillus cereus ATCC 11778. Food Control. 2007; 18: 1043–1049.

23. Yamazaki K, Yamamoto T, Kawai Y, Inoue N. Enhancement of antilisterial activity of essential oil constituents by nisin and diglycerol fatty acid ester. Food Microbiol. 2004; 21: 283–289.

24. Periago PM, Moezelaar R. Combined effect of nisin and carvacrol at different pH and temperature levels on the viability of different strains of Bacillus cereus. Inter J Food Microbiol 2001; 68: 141–148.

25. Erkmen O, Barazi A. Modelling the effects of modified atmosphere on Salmonella typhimurium in packaged meat during storage in the refrigerator and at 12 oC. Ann Microbiol. 2008; 58 (1): 73-81.

Archive of SID

www.SID.ir