

تأثیر سینرژیستیک نیسین و اسانس زیره سبز (*Cuminum cyminum* L.) بر رشد *Streptococcus iniae* در فیله ماهی قزل آلائی رنگین کمان

منصوره قائمی^{۱*}، لاله رومیانی^۲

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اهواز، استادیار گروه شیلات، اهواز، ایران.

۲- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات خوزستان، استادیار گروه شیلات، خوزستان، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات: Mansoreh.ghaeni@gmail.com

(دریافت مقاله: ۹۲/۴/۶ پذیرش نهایی: ۹۲/۸/۱۵)

چکیده

استرپتوکوکوس اینیایی (*Streptococcus iniae*) به عنوان یک باکتری نوظهور و زئونوز تهدیدی برای مزارع پرورشی ماهی در سرتاسر جهان و سلامت انسان محسوب می‌شود. هدف این مطالعه، ارزیابی اثر اسانس زیره سبز (*Cuminum cyminum*) و نیسین بر روی رشد استرپتوکوکوس اینیایی بود. برای این منظور فیله ماهی قزل آلائی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با مقدار ۱۰^۳ عدد استرپتوکوکوس اینیایی در هر گرم تلقیح گردید و اثر اسانس زیره سبز با غلظت‌های ۰، ۰/۰۰۵، ۰/۱۳۵ و ۰/۴۰۵ درصد و نیسین با غلظت‌های ۰، ۰/۲۵ و ۰/۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر روی رشد این باکتری در دماهای ۴ و ۱۰ درجه سلسیوس طی مدت ۱۵ روز نگهداری بررسی شد. نتایج مطالعه نشان داد در نمونه‌های نگهداری شده در دمای ۴ درجه سلسیوس، رشد باکتری هنگام استفاده مجزای اسانس زیره یا نیسین تا روز نهم به تعویق می‌افتد. در حالی که حالت ترکیبی این دو ماده رشد باکتری را تا روز سوم به تأخیر می‌اندازد. در دمای ۱۰ درجه سلسیوس، نیسین تا روز سوم و اسانس زیره تا روز ششم و در ترکیب با هم تا روز ششم، توانستند مانع از رشد باکتری شوند. در دمای ۴ درجه سلسیوس بیشترین تأثیر سینرژسم در تیمار ۰/۴۰۵ درصد اسانس زیره سبز با ۰/۷۵ میکروگرم در میلی‌لیتر نیسین مشاهده شد. در حالی که این تأثیر در دمای ۱۰ درجه سلسیوس، در تیمارهای ۰/۱۳۵ و ۰/۴۰۵ درصد اسانس زیره سبز و ۰/۷۵ میکروگرم در میلی‌لیتر نیسین دیده شد. در مقایسه با گروه شاهد، غلظت‌های نیسین و اسانس زیره سبز تفاوت معنی‌داری در مهار رشد باکتری داشتند ($p < 0.05$). بنابراین می‌توان به این جمع‌بندی رسید که نیسین و اسانس زیره سبز به طور موثری رشد استرپتوکوکوس اینیایی را در فیله ماهی قزل آلا مهار می‌کنند.

واژه‌های کلیدی: استرپتوکوکوس اینیایی، زیره سبز، نیسین، قزل آلائی رنگین کمان

مقدمه

ترکیبات گیاهی به علت ارزان بودن، در دسترس بودن و آسانی رشد و کشت آن‌ها از نظر اقتصادی به‌صرفه‌تر هستند. آنها دوستدار محیط زیست بوده و در آبی‌پروری قابل استفاده می‌باشند (Costa et al., 2012).

امروزه مردم با توجه به اثرات مضر نگرده‌دارنده‌های شیمیایی و سنتتیک خواهان استفاده از نگرده‌دارنده‌های طبیعی مشتق شده از منابع گیاهی، حیوانی و میکروبی هستند تا علاوه بر افزایش زمان ماندگاری غذا از اثرات مضر نگرده‌دارنده‌های غذایی شیمیایی مصون باشند. برای کاهش یا جلوگیری از وابستگی صنعت آبی‌پروری به داروها و از آنجایی که هنوز ایمنی استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها مورد سوال است محصولات طبیعی برای کنترل باکتری‌ها به عنوان راه‌حل دیگر مورد توجه واقع شده‌اند. افزایش آگاهی عموم درباره اثرات منفی استفاده بیش از حد مواد شیمیایی مصنوعی، منجر به تحقیق درباره محلول‌های سبز (Green solutions)، مانند اسانس‌های گیاهی و بدون مواد شیمیایی گردیده است. هزینه بالا و در دسترس نبودن واکسن‌های تجاری منطقه‌ای و رعایت اصول ایمنی زیستی به منظور جلوگیری از ورود اولیه باکتری به مزارع سبب گردید که استفاده از اسانس‌های گیاهی مورد توجه واقع شوند (Hyldgaard et al., 2012).

بنابراین نظر متخصصان بهداشت مواد غذایی با بکارگیری سیستم تحقیقاتی جدید یعنی سیستم تکنولوژی ممانعتی (Hurdle Technology) 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 توأم با سایر

آبی‌پروری با تولید بیش از ۱۵۴ میلیون تن در سال ۲۰۱۱ به عنوان فعالیت اقتصادی مهم در بیشتر کشورها محسوب می‌شود (FAO, 2012)، اما شیوع بیماری همیشه به عنوان مانعی در تولید سودآور ماهیان و آبزیان دیگر عنوان می‌گردد. فسادپذیری ماهیان تازه به عنوان یک محصول با میزان پروتئین بالا بیشتر تحت تأثیر ترکیبات بیولوژیکی اتفاق می‌افتد که در این میان میکروارگانیزم‌های فاسدکننده از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند (Martin et al., 2000).

Streptococcus iniae یک عامل بیماری‌زا در ماهیان و انسان می‌باشد که یکی از پاتوژن‌های مهم نوظهور در چند دهه اخیر بوده است. این باکتری گرم مثبت، کوکسی شکل کپسول‌دار، بدون اسپور و غیرمتحرک است که اولین بار در سال ۱۹۷۶ از آبسه‌های زیر پوستی دلفین‌های آب شیرین جدا شد و سپس به سایر نقاط جهان گسترش یافت. در میان گونه‌های آب شیرین آلوده به این باکتری قزل‌آلای رنگین‌کمان و تیلاپیای نیل از اهمیت بیشتری برخوردارند. این باکتری به عنوان یک پاتوژن مشترک بین انسان و ماهی مطرح است (Wright et al., 2013) و حداقل ۲۵ مورد عفونت انسانی، ناشی از *Streptococcus iniae* در جهان از طریق مقالات علمی مختلف، گزارش شده است (Buchanan et al., 2008; Bowker et al., 2010).

محدودیت‌های قانونی، وجود مشکلات در دستورالعمل‌های تجویز، سختی کار و گران بودن داروها، تجمع آنها در محیط زیست و کاهش اثر داروها، محققان را بر آن داشت تا از ترکیبات گیاهی و محرک‌های ایمنی و غذایی استفاده کنند. استفاده از

آلای رنگین کمان) در دو دمای ۴ (مناسب یخچالی) و ۱۰ (نامناسب یخچالی) درجه سلسیوس می‌باشد.

مواد و روش‌ها

– تهیه باکتری

کشت لیوفیلیزه *Streptococcus iniae* (GQ850377) از گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران اخذ گردید. در ابتدا این کشت لیوفیلیزه 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 گلیسرین مخلوط شد و در قسمت‌های مساوی در لوله‌های میکروسانتریفیوژ اپندروف استریل در ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد (Soltani et al., 2009).

– آماده‌سازی 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. مقدار ۵۰ میلی‌لیتر 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 میلی‌گرم پودر نیسین را در ۵۰ میلی‌لیتر اسید آماده شده به خوبی حل کرده به طوری که در ظرف استریل دیگری این محلول از فیلتر ۰/۲ میکرومتری عبور داده شد و با استفاده از رابطه $N_1 V_1 = N_2 V_2$ مقدار مورد نظر از آن را برداشته و به ظروف دردار افزوده و پس از پخش شدن آن در آب، برش‌های ماهی‌های مورد نظر به آن اضافه گردید (Moosavy et al., 2008).

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 ضد میکروبی و در عین حال به کمترین اثر نامطلوب ارگانولپتیکی دست یافت (Fazlara et al., 2012).

زیره سبز از زمان‌های قدیم به عنوان ادویه و داروی طب سنتی به خوبی شناخته شده است. این گیاه به طور وحشی در نواحی وسیعی با آب و هوای مدیترانه‌ای می‌روید. بیشترین ترکیبات شناخته شده اسانس دانه زیره سبز، شامل کومین آلدئید، مشتقات منتون، گاما ترپینن و پاراسیمن می‌باشند، که مسئول بو و اثرات بیولوژیکی آن هستند (Lis-Balchin et al., 1998). اثرات ضد میکروبی اسانس زیره سبز بر روی پاتوژن‌های با منشاء غذایی از جمله لیستریا مونوسیتوژنز و اشریشیا کولای به خوبی نشان داده شده است (Gachkar et al., 2007).

نیسین یک نگه‌دارنده طبیعی و پلی‌پپتیدی است که توسط سویه‌های خاصی از لاکتوکوکوس‌ها در طول تخمیر ایجاد می‌گردد. نیسین اولین بار بوسیله سازمان خوار و بار جهانی در سال ۱۹۶۹ به عنوان نگه‌دارنده در غذا رواج پیدا کرد و از سال ۱۹۸۷ در غذاها و محصولات لبنی مورد استفاده واقع شد. نیسین سمی نیست و سریعاً به وسیله آنزیم‌های هضم کننده غیرفعال می‌شود (Hadad Kashani et al., 2012).

هدف از این مطالعه بررسی اثر اسانس زیره سبز و نیسین به صورت مجزا و توأم برای کنترل *Streptococcus iniae* در نمونه غذایی (فیله ماهی قزل

- تهیه اسانس و آنالیز آن

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 (Termostequest Finnigan) با ستون موئینه 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 هلیوم با سرعت ۱/۵ میلی‌متر در دقیقه بود. شناساگر (EI) با انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت و دمای منبع یونیزاسیون ۲۵۰ درجه فارنهایت بود (Fazlara et al., 2012).

- آماده‌سازی نمونه‌های ماهی

در این مطالعه از ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان 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 آن‌ها به فیله‌های ۲۵ گرمی با اندازه ۸×۳ سانتی‌متر مربع تقسیم شدند و با بسته‌بندی به صورت تکی در کیسه‌های فریزر همراه با یخ به سازمان انرژی اتمی فرستاده شده و تا حدود ۵ کیلوگرمی اشعه گاما به آن‌ها داده شد (Ekhtiarzadeh et al., 2012) تا از عدم وجود کلیه میکروارگانیسم‌ها اطمینان حاصل گردد. فیله‌ها در شیشه‌های بزرگ دردار که حاوی آب مقطر، دی‌متیل سولفوکساید (Dimethyl Sulfoxide)

(DMSO) ۵ درصد و آگار آگار ۱ درصد بود قرار داده و در دمای ۱۲۱/۱ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه استریل شدند. غلظت‌های مختلف اسانس زیره سبز (۰، ۰/۰۰۵، ۰/۱۳۵، ۰/۴۰۵ درصد) بر اساس می‌نیم غلظت بازدارنده اسانس (MIC) در آزمایشگاه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران انجام شد و نیسین (۰، ۰/۲۵، ۰/۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و ترکیب آن‌ها با همدیگر به شیشه‌های دردار استریل اضافه شدند. سپس فیله‌های ماهی را در زیر هود به ظروف دردار اضافه کرده و در یخچال با دمای ۴ درجه سلسیوس به آنها اجازه داده شد تا ۲۴ ساعت باقی بمانند و فیله‌های ماهی در این مدت مواد را به خوبی جذب کنند. پس از ۲۴ ساعت در زیر هود برش‌های ماهی توسط پنس استریل از ظروف دردار به پلیت‌های استریل منتقل گشته و تنظیم وزن آنها انجام شد و پس از مدت ۱۵ دقیقه نسبت به تلقیح دوز مورد اشاره باکتری به روش تلقیح نقطه‌ای بر روی آن‌ها اقدام گردید. سپس یک فیله از هر تیمار را داخل یک کیسه (Bag mixer) استریل قرار داده و روی آن برچسب زده درب آن را محکم بسته و در انکوباتور ۴ (مناسب یخچالی) و ۱۰ (نامناسب یخچالی) درجه سلسیوس قرار داده و سپس به مدت ۱۵ روز از نظر رشد باکتری و رسیدن به حد دوز مسمومیت زا یعنی $10^6 >$ بررسی شدند (Roomiani, 2012).

- روش شمارش میکروبی

برای این منظور از محتویات هر یک از لوله‌های تهیه رقت مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر برداشته و در دو پلیت محتوی آگار کشت (Merck, KGaA, Darmstadt, Germany) قرار داده شدند. سپس پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای

استفاده شد و در مواردی که بین میانگین‌ها اختلاف معنی‌داری وجود داشت جهت جدا کردن آنها از تست Tukey استفاده گردید. میانگین‌ها در سطح اعتماد ۹۵ درصد از نظر آماری متفاوت قلمداد شدند.

یافته‌ها

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 می‌گردد بیشترین ترکیب اسانس زیره سبز با ۲۷/۱۸ درصد مربوط به بنزالدهید است.

۳۳ درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری شدند. پلیت‌های استاندارد (حاوی ۳۰ تا ۳۰۰ پرگنه) انتخاب و پرگنه‌های کوکسی شکل جفت یا زنجیره‌ای، سفید رنگ با هاله یا بدون هاله در اطراف پرگنه انتخاب 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 *Streptococcus iniae* در هر میلی‌لیتر از نمونه گزارش گردید (Roomiani, 2012).

- تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های مربوط به نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS.20 مورد تجزیه و تحلیل توصیفی قرار گرفتند. ابتدا از تجزیه واریانس یکطرفه جهت مقایسه میانگین‌ها

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	

آماري بودند ($p < 0/05$). همچنین دو تیمار فوق نیز با هم در کنترل باکتری دارای تفاوت معنی‌دار آماری بودند ($p < 0/05$) که در روز ششم و نهم کشت کاملاً مشهود است. هر دو تیمار بکار گرفته شده نسیین در دمای ۴

جدول ۲ بیانگر لگاریتم رشد باکتری *Streptococcus iniae* در دمای ۴ درجه سلسیوس (دمای مناسب یخچالی) تحت غلظت‌های مختلف نسیین و اسانس زیره سبز است. غلظت‌های ۰/۲۵ و ۰/۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نسیین با تیمار شاهد دارای تفاوت معنی‌دار

گروه شاهد دارای تفاوت معنی دار بودند ($p < 0/05$). بیشترین اثر سینریژیسیم نیسین با اسانس در غلظت‌های ۰/۴۰۵ درصد اسانس با ۰/۷۵ میکروگرم بر لیتر نیسین مشاهده شد.

درجه سلسیوس تا روز نهم توانستند مانع از رشد باکتری تا حد مجاز 10^7 log cfu/ml شوند. طبق نتایج به دست آمده از جدول ۲ غلظت ۰/۱۳۵ و ۰/۴۰۵ درصد اسانس در کنترل باکتری، تفاوت معنی دار آماری نداشتند ($p > 0/05$) ولی با غلظت ۰/۰۰۵ درصد و

جدول ۲- لگاریتم تغییرات بار میکروبی (میانگین \pm انحراف معیار) در غلظت‌های مختلف نیسین و اسانس زیره سبز به تنهایی و توأم در روزهای مختلف کشت در دمای ۴ درجه سلسیوس در فیله قزل آلی رنگین کمان

اسانس زیره سبز (درصد)	نیسین $\mu\text{g/ml}$	روز صفر	سوم	روز ششم	روز نهم	روز پانزدهم
۰	۰	۵/۵۲ \pm ۰/۲۲ ^a	۴/۸۵ \pm ۰/۳۲ ^{a*}	۴/۱ \pm ۰/۲۵ ^b	۳/۷۴ \pm ۱/۲۲ ^b	۲/۲۲ \pm ۰/۲۱ ^c
۰	۰/۲۵	۴/۳۳ \pm ۰/۳۱ ^b	۳/۹۹ \pm ۰/۲۹ ^b	۳/۵۳ \pm ۰/۳۶ ^b	۳/۴۸ \pm ۰/۶۵ ^b	-
۰	۰/۷۵	۴/۵۷ \pm ۰/۳۲ ^a	۳/۹۷ \pm ۱/۴۵ ^b	۳/۴۱ \pm ۱/۴۷ ^b	۳/۱۹ \pm ۱/۷۸ ^d	-
۰/۰۰۵	۰	۴ \pm ۰/۲۲ ^b	۳/۵۲ \pm ۰/۱۵ ^b	۳/۱۹ \pm ۰/۱۶ ^d	۲/۸۱ \pm ۰/۲۱ ^d	-
۰/۱۳۵	۰	۳/۴۵ \pm ۰/۴۸ ^b	۳/۲۸ \pm ۰/۱۸ ^b	۲/۷۲ \pm ۰/۱۷ ^c	۲/۰۶ \pm ۰/۳۵ ^{ee}	-
۰/۴۰۵	۰	۳/۳۱ \pm ۰/۱۹ ^b	۳/۰۴ \pm ۰/۲۴ ^c	۲/۶۱ \pm ۰/۲۷ ^c	۲/۰۴ \pm ۰/۲۴ ^{ee}	-
۰/۰۰۵	۰/۲۵	۲/۳۰ \pm ۰/۲۵ ^c	۲/۹۳ \pm ۰/۴۴ ^d	۲/۴۹ \pm ۰/۱۳ ^c	-	-
۰/۱۳۵	۰/۲۵	۲/۹۱ \pm ۰/۳۱ ^d	۲/۸۶ \pm ۰/۲۱ ^d	۲/۰۸ \pm ۰/۲۹ ^e	-	-
۰/۴۰۵	۰/۲۵	۲/۸۸ \pm ۰/۱۶ ^d	-	-	-	-
۰/۰۰۵	۰/۷۵	۲/۸۹ \pm ۰/۳۱ ^d	۲/۲۲ \pm ۰/۳۵ ^c	-	-	-
۰/۱۳۵	۰/۷۵	۲/۷۹ \pm ۰/۲۹ ^d	۲/۰۰ \pm ۰/۶۸ ^e	-	-	-
۰/۴۰۵	۰/۷۵	۲/۵۱ \pm ۰/۳۲ ^d	-	-	-	-

*حروف غیر مشابه در هر ستون نمایانگر معنی دار بودن تفاوت بین میانگین‌ها می‌باشد ($p < 0/05$).

-: غیر قابل شمارش

در زیر حد مجاز نگه دارد. بیشترین اثر سینریژیسیم نیسین با اسانس در غلظت‌های ۰/۱۳۵ و ۰/۴۰۵ درصد اسانس با ۰/۷۵ میکروگرم بر میلی لیتر مشاهده شد که دارای تفاوت معنی دار آماری نبودند ($p > 0/05$).

نتایج بیانگر این واقعیت هستند که تأثیر اسانس زیره سبز در کنترل باکتری بیشتر از نیسین بوده است. نیسین و اسانس زیره توانستند به تنهایی تا روز نهم رشد باکتری را به تأخیر بیندازند ولی در ترکیب با هم تا روز سوم باعث کنترل رشد باکتری شدند. بیشترین تأثیر

در جدول ۳ نشان داده شده است که در دمای ۱۰ درجه سلسیوس (دمای نامناسب یخچالی) نیسین تا روز سوم توانست رشد باکتری را زیر حد مجاز نگه دارد اما از روز سوم به بعد نتوانست مانع رشد باکتری شود. غلظت ۰/۲۵ و ۰/۷۵ نیسین با گروه کنترل و با هم دارای تفاوت معنی دار آماری در کنترل رشد باکتری بودند ($p < 0/05$). تأثیر اسانس زیره سبز در این دما نیز بیشتر از نگه‌دارنده طبیعی نیسین بود چراکه تا روز ششم (بالاترین غلظت اسانس) توانست رشد باکتری را

سینرژیسیم بین دو ترکیب بکار برده شده در دمای ۴ درجه سلسیوس، در غلظت ۰/۷۵ میکروگرم بر لیتر و ۰/۴۰۵ درصد اسانس بدست آمد، که در روز صفر توانست با $2/51 \log \text{ cfu/ml}$ در کاهش رشد باکتری مؤثر واقع شود.

جدول ۳- لگاریتم تغییرات بار میکروبی (میانگین \pm انحراف معیار) در غلظت‌های مختلف نیسین و اسانس زیره سبز به تنهایی و توأم در روزهای مختلف کشت در دمای ۱۰ درجه سلسیوس در فیله قزل آلابی رنگین کمان

اسانس زیره سبز (درصد)	نیسین $\mu\text{g/ml}$	روز صفر	روز سوم	روز ششم	روز نهم	روز پانزدهم
۰	۰	$6/58 \pm 0/11^a$	$6/93 \pm 0/11^a$	-	-	-
۰	۰/۲۵	$6/22 \pm 0/53^a$	$5/49 \pm 0/16^b$	-	-	-
۰	۰/۷۵	$5/31 \pm 0/24^b$	$4/73 \pm 0/90^c$	-	-	-
۰/۰۰۵	۰	$5/00 \pm 0/35^b$	$4/18 \pm 0/77^d$	-	-	-
۰/۱۳۵	۰	$3/82 \pm 0/12^d$	$5/00 \pm 0/94^b$	-	-	-
۰/۴۰۵	۰	$3/72 \pm 0/87^d$	$4/00 \pm 0/28^e$	$6/65 \pm 0/15^a$	-	-
۰/۰۰۵	۰/۲۵	$2/99 \pm 0/38^d$	$4/84 \pm 0/27^d$	-	-	-
۰/۱۳۵	۰/۲۵	$2/67 \pm 0/68^d$	$3/14 \pm 0/17^d$	$5/38 \pm 0/61^b$	-	-
۰/۴۰۵	۰/۲۵	$2/53 \pm 0/86^d$	$3/11 \pm 0/81^d$	$5/16 \pm 0/44^b$	-	-
۰/۰۰۵	۰/۷۵	$2/41 \pm 0/46^d$	$4/63 \pm 0/11^c$	$6/00 \pm 0/23^a$	-	-
۰/۱۳۵	۰/۷۵	$2/38 \pm 0/58^d$	$3/30 \pm 0/80^d$	$4/23 \pm 0/30^e$	-	-
۰/۴۰۵	۰/۷۵	$2/23 \pm 0/14^f$	$2/16 \pm 0/45^f$	$4/19 \pm 0/11^e$	-	-

*حروف غیر مشابه در هر ستون نمایانگر معنی دار بودن میانگین‌ها می‌باشد. - غیر قابل شمارش

بحث و نتیجه‌گیری

از نیسین عمل کرد. در دمای ۴ درجه سلسیوس غلظت ۰/۷۵ میکروگرم بر میلی لیتر با ۰/۴۰۵ درصد اسانس از روز صفر به بعد توانست مانع رشد باکتری شود ($2/51 \log \text{ cfu/ml}$). اما در دمای ۱۰ درجه سلسیوس ترکیب غلظت‌های فوق تا روز ششم توانست رشد باکتری را به تأخیر بیندازد.

مطالعات متعددی به بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس‌های گیاهی در شرایط آزمایشگاهی و در مدل‌های مختلف مواد غذایی پرداخته‌اند اما در فیله ماهی بسیار کم انجام شده است و آنچه وجود دارد مطالعات بسیار جدیدی می‌باشند. در ماهیان سبک شور شده فیتوفاگ تأثیر اسانس آویشن شیرازی و نیسین بر

در استخرهای پرورش ماهی، *Streptococcus iniae* با ۳۰ تا ۵۰ درصد مرگ و میر همراه است. در چند دهه گذشته باکتری بیماری‌زای فوق سبب خسارات اقتصادی فراوانی در مزارع پرورش ماهی شده است. ضمن اینکه در مناطقی که ماهیان بصورت خام مصرف می‌شوند به عنوان یک عامل زئونوز شناخته شده است (Soltani et al., 2009).

همانطور که نتایج نشان دادند، در دمای ۴ و ۱۰ درجه سلسیوس اسانس زیره سبز و نیسین به صورت توأم توانستند تأثیر بیشتری در ممانعت رشد باکتری نسبت به گروه کنترل و به تنهایی شوند که اسانس زیره مؤثرتر

درجه سلسیوس بود. به لحاظ اثر گذاری آویشن بر روی رشد لاکتوکوکوس گارویه در تمامی غلظت‌های مورد نظر مورد تأیید واقع گردیده است اما با توجه به آزمون t در غلظت ۰/۴۰۵ درصد این اثرگذاری به میزان ۷۱/۹۱ درصد بیشترین اثرگذاری را بر رشد باکتری‌ها به همراه داشته است. هنگامی که نیسین و اسانس آویشن به صورت ترکیبی استفاده شدند نتایج حاصله نشان داد که استفاده توأم به صورت غلظت ۰/۴۰۵ درصد آویشن و ۰/۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نیسین به میزان ۱۴/۶۲ درصد دارای بیشترین اثر علیه *Lactococcus garvieae* بوده است.

تفاوت‌های موجود با بررسی حاضر می‌تواند به علت اختلاف در اسانس بکار گرفته شده باشد. اختلاف در ترکیبات روغن‌های فرار گیاهان می‌تواند 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 می‌توانند نقش کلیدی در ترکیبات اسانس داشته باشند. از طرفی نیسین و اسانس می‌توانند روی غشای سیتوپلاسم باکتری اثر بگذارند و در نهایت موجب افزایش تخریب ساختاری و عملکردی غشای باکتری‌ها شوند؛ اما نیسین در عملکرد با اسانس‌ها و شرایط محیط زیستی مختلف متفاوت عمل می‌کند (Guo et al., 2012).

رفتار رشد باکتری‌های ویبریو پاراهمولاتیکیوس و لیستریا مونوسیترنر در فیله ماهیان شور شده تحت تاثیر نیسین و اسانس آویشن شیرازی و ترکیب آنها با هم توسط Ekhtiarzadeh و همکاران در سال ۲۰۱۲ گزارش شد. برای باکتری لیستریا مونوسیترنر اثر

روی استافیلوکوکوس اورئوس توسط (Choobkar et al., 2012) مورد مطالعه قرار گرفت. آنها به این نتیجه رسیدند که غلظت‌های بالای اسانس آویشن و نیسین در کنترل باکتری فوق می‌توانند مؤثر واقع شوند. Roomiani (2012) تاثیر اسانس رزماری و نیسین را بر رفتار رشد باکتری استریپتوکوکوس اینیایی بررسی کرد و به این نتیجه رسید که در دمای ۴ درجه سلسیوس رشد باکتری در غلظت‌های 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 غلظت‌های نیسین و رزماری از روز سوم به بعد نگره‌دارنده‌ها نتوانستند مانع رشد باکتری شوند.

غلظت‌های مختلف رزماری و نیسین برای کنترل رشد باکتری مورد نظر در هر دو دما با گروه شاهد دارای اختلاف معنی‌دار آماری بودند ($p < 0/05$)، اما غلظت‌های بالای اسانس رزماری (۰/۱۳۵ و ۰/۴۰۵ درصد) تفاوت معنی‌دار نشان ندادند ($p > 0/05$).

Mahmoodi در سال ۲۰۱۲ تأثیر اسانس آویشن شیرازی در غلظت‌های ۰، ۰/۰۰۵، ۰/۰۱۵، ۰/۰۴۵، ۰/۱۳۵، ۰/۴۰۵ درصد و نیسین در غلظت‌های ۰، ۰/۲۵، ۰/۷۵، ۰/۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به تنهایی و به صورت ترکیبی با هم در مدل غذایی فیله قزل‌آلای رنگین کمان علیه *Lactococcus garvieae* در یک دوره ۹ روزه را مورد مطالعه قرار داد. نتایج حاصله نشان داد که نیسین در هر سه غلظت مورد اشاره علیه این باکتری مؤثر بوده است به طوری که با توجه به آزمون t در غلظت ۰/۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر این اثرگذاری به میزان ۶۵/۷۷ درصد بیشترین تأثیر بر روی رشد باکتری داشته است. این تأثیر در دمای ۴ درجه سلسیوس بیشتر از دمای ۸

محیط آزمایشگاه (براث) نسبت به مدل‌های غذایی قابلیت پاسخگویی بیشتر و بهتری دارد؛ چون شمارش عوامل بیماری‌زا در غذا با میکروفلور طبیعی موجود در آن مشکل است. هر چند مدل‌های پیشرفته در محیط‌های براث استریل شده همیشه از پیشگویی‌های قابل اعتمادی در مورد رشد میکروارگانیسم‌ها در غذاهای استریل نشده و غیریکنواخت برخوردار نیستند (Roomiani, 2012).

پیشنهاد می‌شود که روغن‌های فرار یا ترکیبات آنها بصورت بخشی از سیستم مانعیتی در نظر گرفته شوند و می‌توان از آنها به صورت ترکیبات ضد میکروبی در خلال سایر تکنیک‌های نگهداری مانند دمای کاهش یافته، pH کاهش یافته یا استفاده از اثر سینرژتیک روغن‌های فرار و ترکیبات آنها سود جست.

سپاسگزاری

در اینجا بر خود لازم می‌دانیم که از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز تشکر نمایم که فرصت اجرای چنین طرحی را به ما دادند.

بازدارندگی اسانس و در ترکیب با نیسین در دمای ۴ درجه سلسیوس مشاهده شد.

رشد باکتری ویرئو پاراهمولایتیکوس در ۸ درجه سلسیوس (گروه کنترل) در روز اول کشت متوقف گردید و به زیر $2 \log \text{ cfu/ml}$ رسید. بهترین اثر بازدارندگی اسانس در ترکیب با نیسین برای باکتری ویرئو پاراهمولایتیکوس در غلظت $0/405$ درصد اسانس و $0/75$ میکروگرم بر میلی‌لیتر نیسین (مشابه با مطالعه حاضر) و برای لیستریا مونوسیتوژنز $0/405$ درصد اسانس و $0/25$ میکروگرم بر میلی‌لیتر نیسین حاصل شد. نتایج مطالعه ثابت کرد که دما نقش مهمی در کنترل باکتری تحت تاثیر نگه‌دارنده‌های طبیعی ایفا می‌کند.

تاریخ مصرف محصولات شیلاتی یا ماندگاری آنها در یخ یا دمای یخچالی ۴ درجه سلسیوس، ۴ تا ۹ روز اعلام شده است. ثابت شده است که تیمار با اسانس‌های گیاهی در ترکیب با دمای یخچالی روش مؤثری برای افزایش تاریخ مصرف غذا است. مدل‌های ریاضی برای پیشگویی عوامل بیماری‌زای منتقله از طریق غذا در

منابع

- چوبکار، نسرین، آخوندزاده بستی، افشین، ساری، عباسعلی، گندمی، حسن. و امامی راد، امیر (۱۳۹۱). بررسی تأثیر اسانس آویشن شیرازی و نیسین بر کنترل کیفیت فیله‌های سبک شور ماهی کپور نقره‌ای. فصلنامه گیاهان دارویی. سال یازدهم، دوره دوم، شماره ۹، صفحه ۲۱۵-۲۰۵.
- رومیانی، لاله (۱۳۹۱). مطالعه تأثیر اسانس رزماری و نیسین بر رفتار رشد باکتری استریپتوکوکوس/ینیایی در شرایط آزمایشگاهی و بر روی فیله ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). پایان‌نامه دکتری شیلات. دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، صفحه ۱۶۰.

- فضل آرا، علی، صادقی، احسان. و رستمی سلیمانی، پگاه (۱۳۹۱). مطالعه تأثیر اسانس گیاه زیره سبز بر باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در پنیر سفید ایرانی. فصلنامه علوم و صنایع غذایی. شماره ۳۵، دوره نهم، صفحه ۴۴-۳۵.
- محمودی، آزاده (۱۳۹۱). مطالعه تأثیر آویشن شیرازی و نیسین بر رفتار رشد لاکتوکوکوس گارویه روی فیله ماهی قزل آلی رنگین کمان. پایان نامه دکتری شیلات. دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، صفحه ۱۱۷.
- Bowker, J.D., Ostland, V.E., Carty, D. and Bowman, M.P. (2010). Effectiveness of aquaflor (50% Florfenicol) to control mortality associated with *Streptococcus iniae* in freshwater-Reared Sub adult Sunshine Bass. Journal of aquatic animal health, 22(4): 254-265.
- Buchanan, J.T., K.M., Colvin, M.R., Vicknair, S.K., Patel, A., Timmer, M. and Nizet, V. (2008). Strain-associated virulence factors of *Streptococcus iniae* in hybrid-striped bass. Journal of veterinary microbiology, 131(1-2): 145-153.
- Choobkar, N., Akhondzadeh Basti, A., Sari, A., Gandomi, H. and Emami, A. (2012). Effect of *Zataria multiflora* essential oil and nisin on the quality control of *Staphylococcus aureus* in the light salted fillets of Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). Journal of medicine plants, 2(2): 205-215[In Farsi].
- Costa, G., Danz, H., Kataria, P. and Bromage, E. (2012). A holistic view of the dynamisms of teleost IgM: A case study of *Streptococcus iniae* vaccinated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of developmental and comparative immunology, 36: 298-305.
- Ekhtiarzadeh, H., Akhondzadeh Basti, A., Misaghi, A., Sari, A., Khanjari, A., Rokni, N., Abbaszadeh, S. and 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 safety, 32(3): 263-269.
- FAO. (2012). The state of world fisheries and aquaculture. www. FAO.org.
- Fazlara, A., Sadeghi, E. and Rostami Soleimani, P. (2012). Study on the antibacterial effects of *Cuminum cyminum* essential oil on *Listeria monocytogenes* in Iranian white cheese. Journal of food science and technology, 35(9): 35-44[In Farsi].
- Gachkar, L., Yadegari, D., Rezaei, M.B., Taghizadeh, M., Alipoor Astaneh, Sh. and Rasooli, I. (2007). Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. Journal of food chemistry, 102(3): 898-904.
- Guo, J.J., Kuo, C.M., Chuang, Y.C., Hong, J.W., Chou, R.L. and 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.
- Hadad Kashani, H., Nikzad, H., Mobaseri, S. and Hoseini, E.S. (2012). Synergism effect of nisin peptide in reducing chemical preservatives in food industry. Journal of life science, 9(1): 496-501.
- Hyldgaard, M., Mygind, T. and Meyer, R.L. (2012). Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies and interactions with food matrix components. Journal of frontiers in microbiology, 3(2): 24.
- Lis-Balchin, M., Deans, S.G. and Eaglesham, E. (1998). Relationship between bioactivity and chemical composition of commercial essential oils. Journal of flavor and fragrance, 13(2): 98-104.
- Martin, R.E., Carter, E.P., Jr, G.J.F. and Davis, L.M. (2000). Marine and fresh water products handbook. Technomic Publishing Company, Inc, pp. 983.
- Mahmoodi, A. (2012). A study on the effect of *Zataria multiflora* Boiss essential oil and Nisin on the growth of *Lactococcus garvieae* in the rainbow trout fillet (*Oncorhynchus mykiss*). A thesis submitted to the graduate studies office in the degree of Ph.D in fisheries science. Islamic azad university, science and research branch, pp. 117[In Farsi].
- Moosavy, M.H., Akhondzadeh Basti, A., Misaghi, A., Zahraei Salehi, T., Abbasifar, R., Ebrahimzadeh Mousavi, H.A., Alipoor, M., Emami Razavi, N., Gandomi, H. and 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. *Journal of food research international*, 41(10): 1050 – 1057.

- Roomiani, L. (2012). Study of effect *Rosmarinus officinalis* oil and nisin on the growth of *Streptococcus iniae* in lab conditions and fillets of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). A thesis submitted to the graduate studies office in the degree of *Ph.D* in fisheries science. Islamic azad university, science and research branch, pp. 160[In Farsi].
- Soltani, M., Ghodrathnema, M., Ahari, H., Ebrahimzadeh Mousavi, H.A., Atee, M., Dastmalchi, F. and Rahmánya, J. (2009). The inhibitory effect of silver nanoparticles on the bacterial fish pathogens, and *Streptococcus iniae* *Lactococcus garvieae*, *Yersinia ruckeri* *Aeromonas hydrophila*. *Journal of International of Veterinary Research*, 3(2): 137-142.
- Wright, E.E., Elliman, J.R. and Owens, L. (2013). Induction and characterization of lysogenic bacteriophages from *Streptococcus iniae*. *Journal of applied microbiology*, 114(6): 1616-1624.

Archive of SID

Synergistic effect of Nisin and *Cuminum cyminum* L. essential oil on the growth of *Streptococcus iniae* in fillets of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Ghaeni, M.^{*1}, Roomiani, L.²

1- Assistance Professor, Department of Fisheries, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran.

2- Assistance Professor, Department of Fisheries, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Khouzestan, Iran.

*Corresponding author email: Mansoreh.ghaeni@gmail.com

(Received: 2013/6/27 Accepted: 2013/11/6)

Abstract

Streptococcus iniae is an emerging zoonotic pathogen that represents a threat to the aquaculture industry worldwide and poses a risk to humans' health. The aim this study, was to evaluate the effect of cumin (*Cuminum cyminum*) essential oil and nisin on the growth of *S. iniae*. For this purpose, the fillets of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) were inoculated with 10^3 of *S. iniae* and afterwards were treated with the different concentrations of cumin essential oil (0, 0.005, 0.135 and 0.405%) as well as nisin (0, 0.25 and 0.75 $\mu\text{g/ml}$). The samples were stored at 4 and 10 °C for 15 days. Results revealed that in the samples stored at 4 °C the solo application of each of nisin and cumin essential oil could inhibit the growth of *S. iniae* until day 9; meanwhile, in combining form the inhibition of bacterial growth was occurred for 3 days. In the samples stored at 10 °C, nisin and cumin essential oil hindered the bacterial growth for 3 and 6 days, respectively. Moreover, combination of the two materials inhibited the bacterial growth until day 6. The highest synergistic effect was observed in 0.405% of cumin essential oil and 0.75 $\mu\text{g/ml}$ of nisin at 4 °C. However, at 10 °C, 0.135 and 0.405% of cumin essential oil together with 0.75 $\mu\text{g/ml}$ of nisin had the highest synergistic effect. As a significant ($P<0.05$) difference was observed between the treatment and control groups, it could be concluded that cumin essential oil and nisin could efficiently inhibit the growth of *S. iniae*.

Key words: *Streptococcus iniae*, *Cuminum cyminum* L., Nisin, *Oncorhynchus mykiss*