مطالعه تأثیر ضد باکتریایی اسانس گیاه زیره سبز بر باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در پنیر سفید ایرانی

علی فضل‌آرا [۱*]، احسان صادقی [۲]، پگاه رستمی سلیمانی [۳].

۱- دانشیار، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز

۲- استادیار، گروه تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

۳- دانش آموخته دکترای دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز

(تاریخ دریافت: ۸۹/۶/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۰/۲/۱۳)

چکیده

لیستریوزیس، یک بیماری عفونی است که در اثر خوردن مواد غذایی آلوده شده به وسیله‌ی باکتری لیستریا مونوسیتوژنز ایجاد می‌گردد و به عنوان یک معضل در سلامت عمومی تشخیص داده شده است. این بیماری بدواً زنان حامله، نوزادان و افراد دارای سیستم ایمنی ضعیف را درگیر می‌کند. در این بررسی با هدف استفاده از اسانس گیاهی به عنوان عوامل ضد میکروبی طبیعی، اثر اسانس زیره سبز (*Cuminum cyminum*) در غلظت‌های ۰/۰۲٪ و ۰/۰۴٪ بر روی باکتری لیستریا مونوسیتوژنز با میزان تلقیح 10^3 باکتری در هر سی‌سی شیر مصرفی جهت تهیه پنیر در یک مدل غذایی (پنیر سفید ایرانی) همراه با یک نمونه بدون افزودن اسانس به عنوان شاهد مورد مطالعه قرار گرفت. غلظت باکتری در پنیر حاوی غلظت ۰/۰۲٪ اسانس زیره‌ی سبز، پس از ۳۰ روز log۱ کاهش یافت و از این روز به بعد باکتری جدا نشد. همچنین در پنیر حاوی غلظت ۰/۰۴٪ اسانس پس از ۱۵ روز، باکتری log۱ کاهش یافت و از این روز به بعد، از این نمونه باکتری جدا نشد. در حالی که پنیر فاقد اسانس (شاهد) در تمام طول دوره حاوی باکتری بود. آنالیز آماری به وسیله‌ی نرم افزار۱۶ SPSS وآزمون Repeated Measures Define اختلافات معنی‌داری بین تمام گروه‌های تیمار نشان داد ($p<0.05$). همچنین آزمون One-way ANOVA نشان داد که میزان باکتری (لیستریا مونوسیتوژنز) از روز هفت نگهداری با سایر روزها اختلاف معنی‌داری پیدا کرد ($p<0.05$). نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان داد که اسانس زیره‌ی سبز دارای خواص ضد لیستریایی می‌باشد.

کلید واژگان: لیستریا مونوسیتوژنز، زیره‌ی سبز، پنیر

* مسؤل مکاتبات: Fazlara2000@yahoo.com

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-02-21]

۱- مقدمه

لیستریا مونوسیتوژنز[1] نوعی باکتری است که در سه دهه اخیر انتقال آن به وسیله غذا کاملاً اثبات شده است. این باکتری معروف به پاتوژن غذازاد بازپدید[2] می‌باشد و با توجه به مرگ و میر ناشی از آن به خصوص در بین نوزادان و افراد مسن و ضایعاتی که بر جا می‌گذارد به عنوان یک خطر جدی تلقی می‌شود [۱،۲].

مواد غذایی از راه های گوناگون در معرض این آلودگی قرار می‌گیرند. آلودگی غذاهایی مانند شیر، پنیر، بستنی، سبزیجاتی چون کلم، گوشت قرمز، ماکیان، ماهی و فرآورده‌های مختلف آن ها توسط محققین بسیاری از کشورهای مختلف گزارش شده است که در این میان شیر خام و فرآورده‌های دیگر آن به خصوص پنیر نقش اساسی در شیوع این آلودگی دارد [۳،۴]. به هر حال پس از چندین همه‌گیری ناشی از غذا و مرگ‌های متعدد به وسیله این باکتری بیماریزا در ایالات متحده و دیگر کشورها، بسیاری بر این باورند که لیستریا مونوسیتوژنز حقیقتاً یک میکروارگانیسم موذی است. پنیر آلوده به این باکتری عامل اصلی چندین همه‌گیری در ایالات متحده و کشورهای اروپایی از جمله سوئیس، کانادا و آلمان شناخته شده که اکثر این پنیرها از نوع نرم یا نیمه نرم بوده است[۴].

از سویی دیگر توجه عموم به سلامت نگهدارنده های شیمیایی و عکس العمل منفی مصرف کنندگان به نگهدارنده های مصنوعی و شیمیایی، باعث افزایش تمایل به استفاده از ترکیبات طبیعی تر شده است. در واقع نیاز جدی به جایگزین های سالم و موثر برای تیمارها و نگهدارنده های شیمیایی است. در این زمینه تمایل ویژه ای بر روی کاربرد بالقوه اسانس های گیاهی متمرکز شده وخصوصیات ضدمیکربی اسانس های گیاهی علیه طیف وسیعی از میکروارگانیسم ها، شامل باکتری ها، مخمرها و کپک ها تأیید شده است. اما اغلب این تحقیقات در محیط آزمایشگاهی انجام گرفته و بدین ترتیب مطالب کمی پیرامون تأثیر آن ها در زمان به کارگیری در مواد غذایی مختلف و با ترکیبات متفاوت، روشن شده است. لذا امروزه با توجه به عوارض جانبی نگهدارنده های شیمیایی، محققان توجه خاصی به استفاده مجدد از گیاهان دارویی و تحقیق در این زمینه از خود نشان داده‌اند که در این میان خاصیت طعم دهندگی برخی از این ترکیبات گیاهی نیز با استقبال مصرف کنندگان مواجه شده است و هر روزه اطلاعات جدید و نتایج سودمندی را در این زمینه به جامعه بشری عرضه می‌دارند که در پیشگیری و یا درمان بیماری ها کاربرد دارند.

زیره سبز یکی از همین گیاهان می‌باشد که به خاطر عطر و طعم آن، مورد توجه و علاقه بسیار است. لذا در مطالعه حاضر، در طی یک مدل غذایی (پنیر سفید ایرانی)، سعی به بررسی اثر ضد میکروبی غلظت های مختلف اسانس زیره سبز به عنوان یک طعم دهنده طبیعی بر روی باکتری لیستریا مونوسیتوژنز، در مراحل مختلف پنیرسازی شده است.

۲- مواد وروش‌ها

۲-۱- اسانس زیره سبز

پس از جمع آوری گیاه زیره سبز (*Cuminum cyminum*) از استان کرمان و تأیید نام علمی آن، تهیه اسانس گیاه به روش Steam distillation از سرشاخه های هوایی گیاه وآنالیز اسانس توسط دستگاه گاز کروماتوگراف متصل به طیف نگار جرمی (GC/MS) انجام شد. دستگاه GC/MS از نوع Thermoquest Finnigan با ستون مویینه به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۲۵۰ میکرومتر و ضخامت لایه داخلی ۰/۲۵ میکرومتر، با برنامه دمایی ۵۰ تا ۲۶۵ درجه سانتی گراد و همراه با افزایش تدریجی ۲/۵ درجه سانتی گراد در هر دقیقه و نگهداری ستون در ۲۶۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه استفاده شد. دمای اتاقک تزریق ۲۵۰ درجه سانتی گراد و گاز حاصل از مخزن هلیم با سرعت ۱/۵ میلی متر در دقیقه وارد ستون می شد. شناساگر EI با انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت و دمای منبع یونیزاسیون ۲۵۰ درجه سانتی گراد بود[۵].

پس از تهیه اسانس زیره سبز، با انجام یک مطالعه پایلوت مقدماتی بر روی محیط کشت، میزان حداقل غلظت مهارکننده[3] اسانس زیره سبز برای باکتری مورد مطالعه معادل ۰/۰۲ درصد تعیین گردید [۶]. همچنین نمونه پنیرهایی حاوی غلظت های مختلف اسانس زیره سبز تهیه و نسبت به ارزیابی ارگانولپتیک آن ها درشرایط آزمایشگاه اقدام گردید که پنیرهای تولیدی تا حداکثر حاوی ۰/۰۴ درصد اسانس زیره سبز مورد

1. *Listeria monocytogenes*
2. Emerging Foodborne Pathogene
3. Minimum Inhibitory Concentration

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-02-21]

پذیرش و تایید قرار گرفتند. لذا بر این مبنا انجام مطالعه حاضر براساس استفاده از غلظت اسانس زیره سبز معادل حداقل غلظت مهارکننده اسانس مذکور (۰/۰۲ درصد) و تا حداکثر درصد اسانس مورد پذیرش از نظر ارگانولپتیک (۰/۰۴)، مد نظر واقع گردید.

۲-۲- تهیه میزان تلقیح باکتریایی

باکتری لیستریا مونوسیتوژنز(ATCC ۷۶۴۴) از کلکسیون میکروبی آزمایشگاه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز تهیه شد. این باکتری درمحیط TSB[1] در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰-۱۸ ساعت (over night culture) حداقل ۲ مرتبه به طور متوالی کشت داده شد. سپس از کشت دوم به نسبت ۱ به ۵ با گلیسیرین استریل مخلوط و در حجم های ۵۰۰ میکرولیتری در میکروتیوب های اپندروف در ۲۰- درجه سا نتیگراد نگهداری و برای انجام تحقیق به کار گرفته شد [۷].

نظر به اینکه می‌باید 10^3 باکتری به هر میلی‌لیتر از شیر مصرفی جهت تولید پنیر اضافه می‌شد، لذا به منظور آماده‌سازی میزان تلقیح باکتریایی، ابتدا کشت نگهداری شده در ۲۰- درجه سا نتی در محیط TSB کشت داده شد. این محیط به مدت ۲۰ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت و پس از آن یک لوپ از این محیط به یک لوله دیگر حاوی محیط TSB انتقال داده شد. این لوله هم به مدت ۲۰ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت تا یک محیط حاوی باکتری تازه به دست آمد. سپس در لوله های کووت (Cuvett) استریل حاوی ۵ میلی لیتر برات TSB ابتدا برای بار اول مقادیر مختلفی از کشت آبگوشت ۲۰ ساعته دوم را اضافه نموده، و با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (USA و Milton Roy Company) در طول موج ۶۰۰ نانومتر جذب نوریشان خوانده شد. سپس از لوله های کووت اسپکت شده جهت شمارش تعداد باکتری ها در پلیت استفاده گردید. تا در نهایت، لوله کووت که دارای 2×10^6 باکتری در هر میلی لیتر بود مشخص گردید. بدین ترتیب در دفعات بعدی انجام آزمایش، در هر بار با مشخص شدن جذب نوری مورد نظر (۱= Absorbant و ۱۰٪= Transmitant) به طور تقریبی مقدار 2×10^6 باکتری در هر میلی لیتر مشخص گردید که بعداً با کشت بر روی آگار، شمارش باکتری مورد تأیید نهایی قرار می گرفت. از این لوله کووت حاوی مقدار 2×10^6 باکتری در هر میلی لیتر برای تلقیح به شیر مصرفی جهت تولید پنیر استفاده گردید و با افزودن ۰/۵ سی‌سی از این محیط TSB به ظروف حاوی یک لیتر شیر، در هر سی‌سی از شیر مصرفی معادل 10^3 باکتری لیستریا مونوسیتوژنز تلقیح گردید که بر اساس کشت در پلیت نیز به تأیید رسید.

۲-۳- تهیه پنیر

۲۴ ساعت قبل از شروع کار به منظور اطمینان از عدم آلودگی شیر به باکتری لیستریا مونوسیتوژنز یک مرحله کشت از شیر انجام شد و پس از اطمینان از منفی بودن کشت، در هر مرحله ۵ بشر استریل آماده شد و در هرکدام یک لیتر شیر ریخته و با استفاده از شعله و دماسنج دما به منظور پاستوریزاسیون به ۷۲±۲ درجه‌ی سانتیگراد رسانیده شد و ۱۵ ثانیه در این دما باقی ماند. قبل از شروع انجام مراحل مختلف پنیر سازی دمای شیر به ۳۵ درجه سانتیگراد رسانده شد. سپس میزان تلقیح باکتریایی مورد نظر(10^3باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در هر میلی‌لیتر) به شیر اضافه گردید و پس از آن استارتر (باکتری های لیوفیلیزه لاکتوباسیلوس بولگاریکوس و استرپتوکوکوس ترموفیلوس تهیه شده از شرکت ***CHR HANSEN***) به مقدار ۰/۵٪ (وزن به حجم) به شیر اضافه شد. پس از مدت نیم ساعت، مقدار ۰/۰۲٪ (وزن به حجم) از کلرید کلسیم که در ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل در دمای ۴۰ درجه‌ی سانتیگراد حل شده بود، به طور یکنواخت به شیر اضافه گردید و در همین زمان اسانس زیره سبز به میزان ۰/۲ میلی‌لیتر به ظرف ۰/۰۲٪ و ۰/۴ میلی‌لیتر به ظرف ۰/۰۴٪ اضافه شد. نهایتاً رنت (مایه پنیر قارچی تهیه شده از شرکت ***CHR HANSEN***) به مقدار ۰/۰۰۱٪ (وزن به حجم) پس از حل نمودن آن درآب مقطر استریل به شیر افزوده شد ظرف‌های حاوی پنیر به شکل زیر نام‌گذاری شدند.

۱- بشر ۰/۰۲ درصد: این بشر حاوی پنیر، باکتری و غلظت ۰/۰۲ درصد اسانس زیره سبز بود.

۲- بشر ۰/۰۴ درصد: این بشر حاوی پنیر، باکتری و غلظت ۰/۰۴ درصد اسانس زیره سبز بود.

۳- بشر صفر درصد: این بشر حاوی پنیر، باکتری و فاقد اسانس بود. از این نمونه در این تحقیق تحت عنوان شاهد فاقد اسانس و حاوی باکتری نام برده شده است.

1. Tryptic Soy Broth

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-02-21]

۴- بشر شاهد حاوی اسانس و فاقد باکتری: این بشر حاوی پنیر، ۰/۵ درصد اسانس و فاقد باکتری بود.
۵- بشر کنترل: این بشر تنها حاوی پنیر بود و هیچ گونه ماده اضافی نداشت.

به منظور کارایی بهتر رنت، دمای شیر در مدت زمان تشکیل لخته در حدود ۳۵ درجه‌ی سانتیگراد نگهداری شد. پس از گذشت مدت زمان یک ساعت، لخته تشکیل شده برش داده شد و طبق دستورالعمل ساخت پنیر سفید ایرانی جهت آب-گیری به مدت ۶ ساعت تحت فشار ده کیلوگرمی قرار گرفت. سپس پنیرهای برش خورده در ظرف‌های حاوی آب نمک ۱۸٪ استریل به مدت ۲۴ ساعت و پس از آن در ظرف‌های حاوی آب نمک ۸٪ استریل برای باقی دوره قرار گرفتند. تا روز پانزدهم دوره پنیرها در دمای ۱۵ درجه سانتیگراد قرار گرفتند (انبار سبز). در این روز آزمایش تعیین اسیدیته انجام شد و زمانی که pH به میزان ۴/۶ رسید، پنیرها به یخچال ۴ درجه سانتیگراد منتقل شدند.

۲-۴- انجام کشت در زمان‌های تعیین شده

به منظور شمارش لیستریا مونوسیتوژنز و اندازه‌گیری pH ، آزمایش‌های میکروبی و شیمیایی در مراحل زیر انجام پذیرفت:

- ✓ ساعت صفر (بلافاصله پس از تلقیح باکتری لیستریا مونوسیتوژنز)
- ✓ بعد از افزودن استارتر و ایجاد لخته (ساعت ۱)
- ✓ پس از آب‌گیری لخته (ساعت۷)
- ✓ روز ۷ (ساعت ۱۶۸)
- ✓ روز ۱۵ (متعاقب اتمام دوره رسیدن اولیه پنیر با دمای ۱۵ – ۱۴ درجه سانتی‌گراد یا ساعت ۳۶۰)
- ✓ روز ۳۰ (ساعت ۷۲۰)
- ✓ روز ۴۵ (ساعت ۱۰۸۰)
- ✓ روز ۶۰ (ساعت ۱۴۴۰)

برای کشت در هر بار نمونه‌برداری، ۵ گرم از هر نمونه پنیر تولیدی برداشته، توزین نموده و به وسیله هاون و بوته چینی استریل خرد و با ۴۵ سی‌سی آب پپتونه مخلوط می‌گردید و ۰/۱ سی‌سی از محلول به دست آمده به وسیله سمپلر به محیط پالکام[1] آگار انتقال داده و به روش کشت سطحی، کشت داده می‌شد. محیط‌های کشت داده شده به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار می‌گرفت و پس از آن کلنی-ها شمارش می‌شدند و با توجه به رقت مورد استفاده قرار گرفته، تعداد باکتری موجود در هرگرم محاسبه می‌شد. همچنین به منظور بررسی آلودگی‌های احتمالی متقاطع در هر مرحله از آزمایش از محیط آگار EMB[2] به روش پورپلیت برای جداسازی کلی‌فرم‌ها و از محیط آگار YGC[3] برای جداسازی کپک و مخمر استفاده شد که هیچگونه آلودگی کلی فرمی وقارچی در طی مطالعه ملاحظه نگردید.

۲-۵- روش شمارش میکروبی

جهت شمارش کلنی‌های لیستریا مونوسیتوژنز، پلیت‌های حاوی باکتری مورد بررسی قرار گرفتند و کلنی‌های کروی شکل، ریز، با رنگ سبز- خاکستری با حاشیه سیاه شمارش شدند و نسبت به محاسبه تعداد باکتری لیستریا در هر گرم از پنیر اقدام گردید. نظر به اینکه مراحل آماده‌سازی پنیر و کشت‌های مربوطه با ۳ بار تکرار انجام پذیرفت، لذا در هر مرحله از زمان‌های کشت، میانگین تعداد کلنی‌های شمارش شده در ۳ تکرار به عنوان تعداد لیستریا مونوسیتوژنز در هر گرم از نمونه گزارش گردید و نهایتاً نتایج حاصل با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS ۱۶ مورد بررسی و تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند.

۳- نتایج

نتایج حاصل از آنالیز اسانس زیره سبز توسط دستگاه گاز کروماتوگراف متصل به طیف نگار جرمی (GC/MS) شامل درصد و نوع ترکیبات و نیز زمان ماندگاری[4] آن ها در جدول ۱ ارائه شده است.

در این بررسی اثر غلظت‌های ۰/۰۲ و ۰/۰۴ اسانس زیره سبز بر باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در پنیر با استفاده از محیط پالکام آگار مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج حاصله از مطالعه حاضر با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS ۱۶ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. با بهره‌گیری از آزمون ANOVA

1. Palcam Listeria Agar
2. Eosin Methylene Blue Lactose Sucrose Agar
3. Yeasrt Extract Chloramphenicol Agar
4. Retention Time

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-02-21]

One_Way از روز هفتم به بعد اختلاف معنی‌داری از نظر تراکم باکتریایی لیستریا مونوسیتوژنز (Log cfu/g) در پنیرهای حاوی مقادیر مختلف اسانس زیره سبز (با غلظت ۰/۰۲ و ۰/۰۴ درصد) با حالت شاهد (پنیر فاقد اسانس) و همچنین بین پنیرهای حاوی غلظت‌های ۰/۰۲ و ۰/۰۴ درصد اسانس مذکور مشاهده شد که با استفاده از آزمون‌های تکمیلی Scheffe و Duncan نیز به تأیید رسیدند. ($P<0/05$)

همچنین با مقایسه تراکم باکتریایی لیستریا مونوسیتوژنز در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری و انجام کشت در هر سه نوع پنیر (دارای اسانس با غلظت‌های ۰/۰۲ و ۰/۰۴ و نیز فاقد اسانس) با استفاده از آزمون Repeated Measures Define اختلاف معنی‌داری ملاحظه گردید. ($P<0/05$)

نتایج اثر غلظت‌های مختلف اسانس زیره سبز بر روی باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در جدول ۲ و نمودار ۱ آورده شده است. در پنیر حاوی غلظت ۰/۰۲٪ اسانس زیره سبز و تعداد اولیه‌ی باکتری $۲/۶\times۱۰^{۳}$ در هر گرم پنیر، پس از ۳۰ روز تعداد باکتری با log۱ کاهش به حدود ۷×۱۰^{۲} باکتری در هر گرم رسید و از این روز به بعد باکتری ملاحظه نشد. در نمونه حاوی غلظت ۰/۰۴٪ اسانس و تعداد اولیه $۲/۲\times۱۰^{۳}$ باکتری، پس از گذشت ۱۵ روز تعداد باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در هر گرم از پنیر با log۱ کاهش به ۵×۱۰^{۲} عدد در هر گرم پنیر رسید و از این روز به بعد رشد باکتری متوقف شد.

اما در نمونه شاهد فاقد اسانس با تعداد اولیه $۲/۴\times۱۰^{۳}$ باکتری، پس از گذشت ۶۰ روز تعداد باکتری با یک کاهش جزئی به $۱/۸\times۱۰^{۳}$ عدد در هر گرم پنیر رسید. (جدول ۲).

با مقایسه اثرات ضد باکتریایی اسانس زیره سبز در غلظت‌های ۰/۰۲٪ و ۰/۰۴٪ می‌توان چنین اظهار داشت که تا پایان روز هفت تفاوتی بین این دو گروه و نیز گروه شاهد فاقد اسانس مشاهده نمی‌شود، اما از این روز به بعد یعنی در روز پانزدهم بین نمونه حاوی۰/۰۴٪ اسانس زیره سبز و نمونه‌های شاهد و ۰/۰۲٪ اسانس ، تفاوت‌ها به شکل تغییر در لگاریتم باکتری مشاهده می‌گردد اما تفاوتی بین نمونه‌ی ۰/۰۲٪ و شاهد فاقد اسانس وجود ندارد و هر دو در لگاریتم ۳ هستند. اما از روز ۳۰ به بعد بین هر سه گروه تفاوت وجود دارد (نمودار ۱). با بررسی نمودار ۱ می‌توان چنین نتیجه گرفت که اسانس زیره سبز دارای خواص ضد باکتریایی علیه لیستریا مونوسیتوژنز است. هر دو غلظت اسانس توانستند رشد باکتری را متوقف کنند که این تأثیر در مورد غلظت ۰/۰۴٪ سریعتر بود

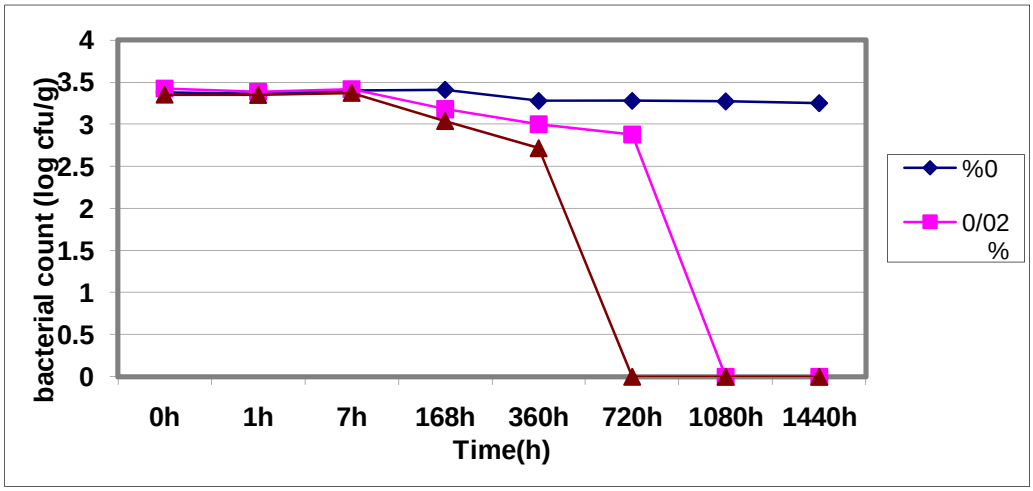
جدول ۱ نتایج GC/MS اسانس زیره سبز

Compound	Retention Time (Minute)	Percent
B pinene	13.07	7.11
Benzene 1 methyl	15.57	7.73
B phellandrene	15.69	1.01
Gama terpinene	17.36	12.56
Isopropylbicyclo	23.88	2.76
Benzaldehyde	26.46	27.18
Isopropylidene	28.11	3.77
Phenylpropanol	28.74	17.5
Benzenemethanol	28.99	10.82
Ethanediol	29.35	3.02
Sum		93.46

جدول ۲ میانگین شمارش لیستریا مونوسیتوژنز در زمان‌های مختلف تحت تأثیر غلظت‌های متفاوت اسانس زیره سبز در پنیر سفید ایرانی(cfu/g)

زمان / غلظت	ساعت صفر	ساعت یک	ساعت ۷	روز ۷	روز ۱۵	روز ۳۰	روز ۴۵	روز ۶۰
شاهد فاقد اسانس	$۲/۴\times۱۰^{۳}$	$۲/۳\times۱۰^{۳}$	$۲/۵\times۱۰^{۳}$	$۲/۵\times۱۰^{۳}$	$۱/۹\times۱۰^{۳}$	$۱/۹\times۱۰^{۳}$	$۱/۸\times۱۰^{۳}$	$۱/۸\times۱۰^{۳}$
٪۰/۰۲	$۲/۶\times۱۰^{۳}$	$۲/۴\times۱۰^{۳}$	$۲/۴\times۱۰^{۳}$	$۱/۵\times۱۰^{۳}$	۱×۱۰^{۳}	۷×۱۰^{۲}	ND	ND
٪۰/۰۴	$۲/۲\times۱۰^{۳}$	$۲/۲\times۱۰^{۳}$	$۲/۱\times۱۰^{۳}$	$۱/۱\times۱۰^{۳}$	۵×۱۰^{۲}	ND	ND	ND

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-02-21]



نمودار ۱مقایسه اثر سه گروه شاهد فاقد اسانس و حاوی اسانس زیره سبز با غلظت‌های ۰/۰۲٪ و ۰/۰۴٪ بر روی تراکم باکتری لیستریا مونوسیتژنز در پنیر سفید ایرانی

۴- بحث و نتیجه گیری

باکتری لیستریا مونوسیتوژنز می‌تواند عامل بسیاری از موارد تک گیر و همه گیر بیماری در انسان باشد که از طریق مواد غذایی منتقل می‌شود. مرگ و میر ناشی از ابتلا به لیستریوز باعث نگرانی در صنایع غذایی و سازمان‌های نظارتی شده است. انتقال این بیماری به انسان از اوایل دهه ۸۰ مورد توجه محققان قرار گرفت و تا کنون گزارش‌های متعددی از آلودگی مواد غذایی مختلف به این باکتری منتشر گردیده است [۸]. به دلیل گزارش‌های متعدد در ارتباط با آلودگی پنیر به این باکتری و همچنین ایجاد عفونت لیستریایی در اثر مصرف پنیر آلوده به لیستریا مونوسیتوژنز، در این مطالعه اثر اسانس زیره سبز بر این باکتری در مدل غذایی پنیر مورد بررسی آزمایشگاهی قرار گرفت.

اطمینان از سلامت غذا از نظر میکروبی و نیز اطمینان از مدت زمان نگهداری آن بستگی به کاهش آلودگی اولیه، جلوگیری و یا محدود نمودن رشد و یا نابودسازی جمعیت میکروبی دارد. با توجه به نگرانی مصرف‌کنندگان و متولیان بهداشتی در مورد استفاده از نگهدارنده‌های شیمیایی و مضرات آنها، در سال‌های اخیر تولدکنندگان مواد غذایی گرایش به استفاده از نگهدارنده-های طبیعی که فاقد عوارض احتمالی بوده و به غذا طعم و بوی مناسب می‌بخشد، پیدا نموده‌اند. لذا بررسی‌های مختلفی در مورد اثر اسانس‌های گیاهی مختلف بر روی پاتوژن‌های مهم غذایی در محیط کشت و غذا انجام گرفته است. اسانس‌های گیاهی از منابع بالقوه واجد ترکیبات ضد باکتریایی می‌باشند و برای این منظور بسیار مفید و مؤثر هستند. مطالعه روی خاصیت ضد میکروبی گیاهان و اسانس‌های آنها از مدت‌ها قبل توسط محققان در کشورهای مختلف صورت گرفته است و بر اساس فلور گیاهان بومی مناطق مختلف و نیز نوع ذائقه مردم از گونه‌های مختلف گیاهان در مطالعات استفاده شده است. مقایسه نتایج مشاهده شده در مورد خواص ضد باکتریایی عصاره‌های گیاهی مختلف بسیار مشکل می‌باشد که از دلایل آن می‌توان به تفاوت در روش‌های مختلف آزمایشگاهی بررسی خواص ضد باکتریایی اسانس‌ها، طرز تهیه اسانس ها، سویه و نوع گیاه و منابع تهیه آنها، مرحله رشد گیاه و نیز سویه‌های باکتریایی به کار برده شده، اشاره کرد. اسانس‌ها (روغن‌های فرار یا روغن‌های اتری) مایعات معطری هستند که از اجزای مختلف گیاه به دست می‌آیند. خواص ضد میکروبی اسانس‌ها سال‌هاست که شناخته شده است و امروزه رویکرد عمومی مردم و همچنین سایر سازمان‌های ملی و بین‌المللی مسؤول در زمینه بهداشت مواد غذایی در استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی مختلف به جای مواد شیمیایی منجر به تمایل بیشتر برای شناخت علمی این مواد شده است. اما اثرات ناخواسته احتمالی که اسانس‌ها بر طعم، مزه، بو و رنگ غذا می‌گذارند، استفاده از آنها را به تنهایی به عنوان یک نگهدارنده‌ی غذایی محدود می-سازد. بنابراین اثر ضد میکروبی اسانس‌های گیاهی در غلظت-های مختلف علیه باکتری‌های پاتوژن مهم غذازاد، ابتدا در

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-02-21]

محیط‌های کشت آزمایشگاهی و سپس در فرآورده‌های غذایی، در قالب مطالعات تلقیحی مورد استفاده قرار می‌گیرد که در نهایت می‌تواند به صورت مدل‌های پیشگویی کننده رشد میکروبی در مواد غذایی و جهت تأمین سلامتی انسان‌ها به کار برده شود[۹].

همان طور که در قسمت نتایج بیان گردید در مطالعه حاضر اسانس زیره سبز در غلظت ۰/۰۲ درصد و هم غلظت ۰/۰۴ درصد نه تنها باعث کاهش تعداد باکتری شد، بلکه پس از مدتی از رشد باکتری ممانعت نمود و لیستریا مونوسیتوژنز از نمونه‌ها محو شد که در صورت مقایسه این دو گروه با گروه شاهد فاقد اسانس که تا پایان زمان ۶۰ روز همچنان حاوی باکتری بود، می توان چنین نتیجه گرفت که اسانس زیره سبز دارای اثرات ضد باکتریایی قوی و مطمئنی بر علیه لیستریا مونوسیتوژنز است. کاهش جزئی در تعداد باکتری در گروه شاهد فاقد اسانس را نیز می توان ناشی از تغییرات pH در طی دوره رسیدن پنیر دانست. در واقع هر دو غلظت اسانس توانستند باکتری را در پنیر نابود کنند اما این اتفاق در نمونه حاوی ۰/۰۴٪ اسانس زیره سبز سریع تر رخ داد. در نتیجه در صورت استفاده از غلظت ۰/۰۴ درصد اسانس در پنیر سفید ایرانی، می‌توان پس از پایان روز ۱۵ که مرحله اتمام نگهداری در انبار سبز است پنیر را وارد بازار کرد که نسبت به غلظت ۰/۰۲ درصد ایمن‌تر است. از نظر ارگانولپتیک نیز با وجود آن که رایحه زیره در پنیر های دارای غلظت ۰/۰۴ درصد اسانس بیشتر از غلظت ۰/۰۲ درصد بود، با این حال همانطور که پیش تر بیان شد، هر دو نوع پنیر تولیدی از نظر ارگانولپتیک مورد پذیرش بودند.

تحقیقات متعددی به بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس های گیاهی مختلف در محیط های کشت و در مواردی در مدل های غذایی پرداخته اند. در پژوهشی، مشتاقی و همکاران (۲۰۰۸) اثر عصاره روغنی نعناع را در غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ درصد بر باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در پنیر نرم که به هر گرم آن 10^6 باکتری اضافه شده بود، در دماهای ۷ و ۱۵ درجه سانتیگراد و در یک دوره ۱۵ روزه مطالعه کردند. در دمای ۷ درجه سانتیگراد، لیستریا مونوسیتوزنز پس از ۱۵ روز در تمام غلظت-های به کار برده شده، کاهش ۲ و۳ لگاریتمی را در پی داشت، ولی در دمای ۱۵ درجه سانتیگراد عصاره مذکور با غلظت ۰/۵٪ تنها یک لگاریتم کاهش در تعداد باکتری نشان داد. اثر آنتی-لیستریایی عصاره ۱٪ و ۲٪ نعناع در ۱۵ درجه سانتیگراد بیشتر از ۷ درجه سانتیگراد بود، نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان داد که عصاره نعناع دارای خاصیت ضد لیستریایی می-باشد [۸] که می توان گفت نتایج مشابه به طرح حاضر بوده است. همچنین کریم و همکاران (۲۰۰۴) تاثیر ضد میکروبی روغن های فرار گیاهان نعناء، ترخون، زیره، پونه و آویشن بر باکتری اشریشیاکلی در پنیر سفید ایرانی را مورد مطالعه قرار دادند که در مطالعه آنان پس از آویشن که دارای بیشترین تاثیر ضد میکروبی بر باکتری اشریشیاکلی بود، نعناء، زیره و پونه تقریباً تاثیر مشابه داشته به طوری که پس از گذشت ۱۶۸ ساعت (۷ روز) در غلظت های ۰/۳ و ۰/۴ درصد به ترتیب منجر به کاهش ۲ و ۲/۵ لگاریتم از بار باکتریایی اشریشیاکلی نسبت به گروه شاهد شدند این محققین کمترین تاثیر را مربوط به گیاه ترخون اعلام داشتند[۱۰].

در پژوهش انجام شده توسط یانو و همکاران (۲۰۰۶) آثار ضد میکروبی اسانس زیره سبز بر رشد ویبریو پاراهمولیتیکوس بررسی شد و آثار بازدارندگی آن در غلظت ۲/۵٪ تأیید گردید. در این مطالعه ۱۸ نوع گیاه انتخاب شد و اثرات هر کدام از آن ها به طور جداگانه بر روی باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس در دو دمای ۵ و ۳۰ درجه سانتیگراد بررسی شد و مشخص گردید که زیره سبز در هر دو دما دارای اثرات ضد میکروبی است و باعث حداقل log۱ کاهش در جمعیت میکروبی گردید[۱۱]. ویریندا و همکاران (۲۰۰۶)، آثار ضد لیستریایی اسانس میخک در مدل‌های غذایی گوشت و پنیر را در دو دمای ۷ و ۳۰ درجه سانتیگراد بررسی کردند. غلظت ۱ درصد اسانس میخک سبب جلوگیری از رشد لیستریا مونوسیتژنز در هر دو دما و هر دو مدل غذایی گردید. بنابراین چنین نتیجه‌گیری شد که اسانس میخک دارای یک اثر بالقوه به عنوان یک نگهدارنده طبیعی در گوشت و پنیر است [۱۲].

موهان نیر و همکاران (۲۰۰۵) اثرات ضد میکروبی سیاه دانه را بر لیستریا مونوسیتوژنز در محیط کشت بررسی کردند. در این مطالعه log ۷ باکتری به محیط تلقیح شد و اثرات سیاه دانه و جنتامایسین به طور جداگانه بررسی شد و مشخص گردید که اثرات ضد میکروبی سیاه دانه بسیار قوی و حتی بیشتر از جنتامایسین بوده است [۱۳]. سالموکاس و همکاران (۲۰۰۸)، اثرات ضد میکروبی آویشن را بر لیستریا مونوسیتوژنز در گوشت‌هایی که در سردخانه نگهداری می‌شدند بررسی

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-02-21]

کردند. در این مطالعه اثـرات غلظـت ۰/۳، ۰/۶ و ۰/۹٪ عـصاره روغنی آویشن آزمایش شد. غلظت ۰/۳٪ آویـشن اثـرات ضـد میکروبی ضعیفی داشت ولی غلظت ۰/۶ اثـرات ضـدمیکروبی قوی و مؤثری داشت [۱۴].

سـینگ و همکـاران (۲۰۰۳)، بـر روی اثـرات ضـد لیـستریایی عصاره‌های روغنی آویشن، میخک، فلفل گینه، رزماری و مـریم گلی در محـیط آزمایـشگاه و یـک مـدل غـذایی (هـات داگ)، مطالعه کردند. آویشن بیشترین تأثیر را بـر سـویه‌هـای لیـستریا داشت. میخک و فلفل هم فعالیت‌های ضد باکتریـایی نـسبی از خود نشان دادند. اما رزماری و مریم‌گلی تأثیر چندانی نداشـتند [۱۵]. اوسالاه و همکاران (۲۰۰۷) آثار مهار کنندگی ۲۸ نوع اسانس گیاهی انتخـاب شـده را بـر روی رشـد چهـار بـاکتری پـاتوژن شـامل اشریـشیا کلـی، سـالمونلا تیفـی موریـوم، استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا مونوسیتوژنز بررسی کردند. اسانس ها به محیط BHI[1] تلقیح شدند و دیده شد کـه غلظـت ۰/۴٪ تمام گیاهان دارای اثرات ضد میکروبـی علیـه هـر چهـار میکروب بودند. [۱۶].

در پژوهشی دیگر که توسط عـروج‌علیـان و همکـاران (۲۰۰۹) انجام شد اثر عصاره روغنی زیره سبز بر روی چهار نوع باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، اشریـشیا کلـی و لیستریا مونوسیتوژنز بررسی شـد و حـداقل غلظـت مهـاری آن ۰/۳۷ تا ۳ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتـر بـرآورد شـد. [۱۷]. در پژوهش انجام شده توسط جلالـی و همکـاران (۲۰۰۶)، اثـرات ضد میکروبی عصاره هیدروالکلی تعـدادی از گیاهـان دارویـی علیه باکتری لیستریا مونوسیتوژنز بررسی شـد. در ایـن مطالعـه تجربی گیاهان آویشن، اکالیپتوس، مریم گلی، بابونه و رزمـاری جهت مطالعه انتخاب گردیدند. نتایج به دسـت آمـده نـشان داد که تنها عصاره هیدروالکلی اکـالیپتوس در هـر دو روش رقـت لوله ای و انتشار دیسک دارای اثـرات ضـد باکتریـایی بـر روی میکروب لیستریا مونوسیتوژنز است. حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره اکالیپتوس بر روی باکتری لیستریا مونوسـیتوژنز ۳۱/۲۵ میکروگرم در هر میلی‌لیتر و حداقل غلظـت کـشندگی عـصاره ایـن گیـاه ۵۰۰ میکروگـرم در هـر میلـی‌لیتـر بـود. از عـصاره هیدروالکلی دیگر گیاهان مورد آزمایش در ایـن تحقیـق، هـیچ گونه اثرات ضد میکروبی بر روی باکتری لیستریا مونوسـیتوژنز مشاهده نگردید[۱۸].

در پایان باید خاطر نشان ساخت کـه یافتـه‌هـای ایـن پـژوهش نشانگر اثرات بالقوه ضد لیستریایی اسانس زیـره سـبز در پنیـر سفید ایرانی است که قابل پذیرش مصرف کنندگان و سـازمان-های مسؤول ملی و بین‌المللی دخیل در امر بهداشت غذایی، در مقایسه با سایر ترکیبات افزودنی شیمیایی می‌باشد. در واقع این نتایج حاکی از آن است که غلظت اسانس زیره سبز تاثیر متقابل معنـی داری ($P<0/05$) در ممانعـت از رشـد بـاکتری لیـستریا مونوسیتوژنز در طی زمان نگهداری پنیرداشته است و لذا کاربرد غلظت ۰/۰۴ درصد اسانس زیره سبز در پنیر مـی‌توانـد ضـمن دستیابی به اثرات مفیـد ارگـانولپتیکی و کـاهش رشـد بـاکتری لیستریا مونوسیتوژنز، سبب ایمنی و سلامت این گونه پنیرها در مدت زمان کوتاه تر شود. لازم به ذکر است که انجام تحقیقـات بیشتر در این زمینه بخصوص استفاده توأم انـواع اسـانس هـای گیاهی، استفاده همزمان اسانس های گیاهی و پروبیوتیک هـا و نیز بهره گیری از فاکتورهای درون اثـر و بـرون اثرمحیطـی بـه منظور ممانعت از رشد پاتوژن ها در مدل های غذایی ضـروری می نماید.

۵- تقدیر و تشکر

مطالعه حاضر با اعتبارات پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز انجام گرفته است که بدین وسیله ازحوزه معاونت پژوهشی دانشگاه صمیمانه سپاسگزاری می گردد.

۶- منابع

[1] Monerro, J. 2000. Modern Food Microbiology. Translated by: Mortazavi, S.A., Motamedzadegan, A., Alami, M. and Gohari Ardabili, A. 2008. 6th Edition, Vol. 2, Mashhad University Publication. pp: 381-414.

[2] Rocourt, V. 1991. Human Listeriosis in 1989". Journal of Bulletin of WHO. 69: 488-489.

[3] Razavilar, V. 2008. Pathogenic Microorganisms in Foods and Epidemiology of Foodborne Intoxications. 3rd Edition. Tehran University Publications. pp: 2-7, 137-154.

[4] Skorgarrd, N. 1988. Listeriosis: A Foodbome Zoonotic Disease. Soand Dairy Industry. Vol. 1, pp: 6-8.

[1]. Brain Heart Infusion

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-02-21]

[5] Zargari, A. 1997. Handbook of Medical Plants. 6th Edition. Tehran University Publications. pp: 1-154.

[6] Bonyadian, M. and Karim, G. 2002. Study of the effects of some volatile oils of herbs (pennyroyal, peppermint, tarragon, caraway seed and thyme) against *E.coli* and *S.aureus* in broth media. Journal of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran. 67(4): 81-83.

[7] Moosavy, M.H., Basti, A.A., Misaghi, A., Karim, G., Zahraei Salehi, T. and Mostafavi, E. 2009. Effect of Nisin on the growth of *Staphylococcus aureus* in Commercial Barley Soup. Pharmaceutical Sciences. 15(3): 235-240.

[8] Moshtaghi, H. and Bonyadian, M. 2008. Anti Listerial effects of mint extract oil in a food model. Iranian Journal of Medical and Aromatic Plants. 24(3): 326-332.

[9] Mashak, Z., Moradi, B., Akhondzade, A., Abasifar, A. and Gandomi, H. 2008. Study the behavior of *Listeria monocytogenes* during the production process of Iranian white cheese under the influence of *Zataria multiflora Boiss* essential oil. Journal of Medicinal Plants. 29:114-122.

[10] Karim, G. and Bonyadian, M. 2004. Study on the antimicrobial effect of the volatile oils of some herbs on *E.coli* in Iranian white cheese. Iranian Journal of Food Science and Technology. 1(1): 17-24.

[11] Yano, Y., Satomi, M. and Oikawa, H. 2006. Antimicrobial effect of spices and herbs on *Vibrio parahaemolyticus*. International Journal of Food Microbiology. 111(1): 6-11.

[12] Virinda, H. and Giner, M. J. 2006. Effect of antimicrobial components of essential oils on growth of *Bacillus cereus* INRA L2104 in and the sensory qualities of carrot broth. International Journal of Food Microbiology. 106:90-94.

[13] Mohan Nair, M.K., Vasudevan, P. and Venkitanarayanan, K. 2005. Antibacterial effect of black seed oil on *Listeria monocytogenes*. Journal of Food Control. 16(5):395-398.

[14] Solomakos, N., Govaris, A., Koidis, P. and Bostosglou, N. 2008. The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin and their combination against *Listeria monocytogenes* in minced beef during refrigerated storage. International Journal of Food Microbiology. 25(1): 120-127.

[15] Singh, A., Singh, R.K., Bhunia, A.K. and Singh, N. 2003. Efficacy of plant essential oils as antimicrobial agents against *Listeria monocytogenes* in hotdogs. Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie, 36(8): 787-794.

[16] Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L. and Lacroix, M. 2007. 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*. Journal of Food Control. 18(5): 414-420.

[17] Oroojalian, F., Kasra-Kermanshahi, R., Azizi, M. and Bassami, M.R. 2009. Phytochemical composition of the essential oils from three Apiaceae species and their antibacterial effects on food-borne pathogens. International Journal of Food Microbiology. 120(3): 765-770.

[18] Jalali, M., Ghasemi dehkordi, N. and Chaharmahali, A. 2006. Antimicrobial effects of the hydroalchoholic extracts of some medicinal plants against *Listeria monocytogenes*. Veterinary Medicine Journal Shahrekord University 8(3): 25-33.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-02-21]

Study on the antibacterial effects of *Cuminum cyminum* essential oil on *Listeria monocytogenes* in Iranian white cheese

Fazlara, A.[1*], Sadeghi, E.[2], Rostami Soleimani, P.[3]

1- Associate Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran.
2- Assistant Professor, Department of Nutritional Science, Kermanshah University of Medical Science, Iran.
3- Graduated from Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran.
(Received:89/6/20 Accepted:90/2/13)

Listeriosis, an infectious disease caused by eating contaminated food with the bacterium *Listeria monocytogenes*, has been recognized as an important public health problem. The disease affects primarily pregnant women, newborns and adults with weakened immune system. With the aim of using plants essential oil as natural antibacteria, the effect of Cumin (*Cuminum cyminum*) essential oil (in 0/02% and 0/04% concentration) was studied on *Listeria monocytogenes* in Iranian white cheese as a food model inoculated with 10^3 cfu/ml in milk consumed for cheese making during 60 days storage period and compared with the blank sample which was not contained essential oil. According to results *Listeria monocytogenes* after 1 log reduction was not isolated from cheeses containing 0/02% and 0/04% Cumin essential oil after 30 and 15 days of storage time respectively. But in cheese without Cumin essential oil (0%), the bacterium was isolated during the period of study. Statistical analysis with Repeated Measures Define in SPSS 16 showed significant difference between all treatments ($p<0.05$). Also One-Way ANOVA showed that the difference of bacterial loads (*Listeria monocytogenes*) after 7th day of storage was statistically significant ($p<0.05$). These results showed that *Cuminum cyminum* essential oil has antibacterial effect on *Listeria monocytogenes*.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, *Cumin Cyminum*, Cheese

*Corresponding Author E-Mail address: Fazlara2000@yahoo.com

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-02-21]