بررسی اثر بازدارندگی اسانس زیره سبز و نیسین بر میزان رشد استرپتوکوکوس اینیایی در فیله ماهی قزل آلا با استفاده از تکنولوژی ترکیبی

لاله رومیانی[1*]، نوردهر رکنی[2]

١- گروه شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات خوزستان، اهواز، ایران
٢- گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ٩١/٨/١٦ تاریخ پذیرش: ٩٢/٣/٨)

چکیده

استرپتوکوکوس اینیایی یک پاتوژن زئونوز است که برای صنعت آبزی پروری خطری جدی محسوب می شود. این مطالعه به منظور ارزیابی اثرات ضدباکتریایی نیسین و اسانس زیره سبز (*Cuminum cyminum*) به تنهایی و توام در کنترل استرپتوکوکوس اینیایی (*Streptococcus iniae*) بر اساس تکنولوژی ترکیبی در فیله قزل آلای رنگین کمان در سال ١٣٩٢-١٣٩١ صورت گرفت. اثر غلظت های مختلف نیسین (٠، ٠/٢٥ و ٠/٧٥ میکروگرم بر میلی لیتر) و اسانس زیره سبز (٠، ٠/٠٠٥، ٠/١٣٥ و ٠/٤٠٥ درصد) بر رفتار رشد باکتری فوق در دمای $4\ ^{o}c$ طی ١٥ روز با استفاده از تکنولوژی ترکیبی بررسی گردید. نتایج نشان داد که رشد باکتری در غلظت های مختلف اسانس زیره و نیسین به تنهایی تا روز نهم و در ترکیب با هم تا روز سوم به تاخیر افتاد. همچنین تاثیر اسانس زیره سبز در کنترل باکتری مورد نظر بیشتر از نیسین و از اختلاف معنی دار برخوردار بود ($p<0.05$). غلظت های مختلف اسانس زیره سبز و نیسین برای کنترل رشد باکتری در دمای فوق با نمونه های شاهد دارای اختلاف معنی دار آماری بودند ($p<0.05$) ولی غلظت های بالای اسانس زیره (٠/١٣٥ و ٠/٤٠٥ درصد) در کنترل رشد باکتری از اختلاف معنی دار برخوردار نبودند ($p>0.05$) درحالیکه غلظت های نیسین بکار رفته در جلوگیری از رشد باکتری تفاوت معنی دار آماری نشان دادند ($p<0.05$). اثرات مناسب بازدارندگی برای رشد باکتری استرپتوکوکوس اینیایی در فیله قزل آلا در غلظت های ٠/١٣٥ و ٠/٤٠٥ درصد اسانس زیره سبز با ٠/٧٥ میکروگرم بر میلی لیتر نیسین مشاهده گردید.

کلید واژگان: استرپتوکوکوس اینیایی، اسانس زیره سبز، نیسین، قزل آلای رنگین کمان

* مسئول مکاتبات: L.roomiani@yahoo.com

۱- مقدمه

امروزه آبزی پروری فعالیت اقتصادی مهمی در بیشتر کشورها محسوب می شود اما شیوع بیماری همیشه بعنوان مانعی در تولید سودآور ماهیان و آبزیان دیگر عنوان می گردد. فسادپذیری ماهیان تازه بعنوان یک محصول با میزان پروتئین بالا بیشتر تحت تاثیر ترکیبات بیولوژیکی اتفاق می افتد که در این میان میکروارگانیسم های فاسد کننده از اهمیت ویژه ای برخوردارند. مرکز کنترل و پیشگیری بیماری ها در امریکا گزارش کرد که بیش از ۷۶ میلیون مورد از بیماری های منتقل شده از طریق غذا وجود دارند که سالانه موجب مرگ ۵۰۰۰ نفر می شوند [۱].

حداقل ۲۵ مورد عفونت انسانی ناشی از استرپتوکوکوس اینیایی در جهان از طریق مقالات علمی مختلف گزارش شده است. استرپتوکوکوس اینیایی عامل عفونی زای مشترک در ماهیان و انسان می باشد که یکی از پاتوژن های نوظهور مهم در چند دهه اخیر بوده است. این باکتری گرم مثبت ، کوکوسی شکل کپسول دار ، بدون اسپور و غیرمتحرک است که اولین بار در سال ۱۹۷۶ از آبسه های زیر پوستی دلفین های آب شیرین جدا شد [۲].

محدودیت های قانونی وجود مشکلات در دستورالعمل های 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 محرک های ایمنی و غذایی استفاده کنند. استفاده از ترکیبات گیاهی بعلت ارزان بودن ، در دسترس بودن و آسانی رشد و کشت آنها از نظر اقتصادی بصرفه تر هستند. آنها دوستدار محیط زیست بوده و در آبزی پروری قابل استفاده می باشند [۳].

امروزه مردم با توجه به اثرات مضر نگهدارنده های شیمیایی و سنتتیک خواهان استفاده از نگهدارنده های طبیعی مشتق شده از منابع گیاهی، حیوانی و میکروبی هستند تا علاوه بر افزایش زمان ماندگاری غذا از اثرات مضر نگهدارنده های غذایی شیمیایی مصون باشند. برای کاهش یا جلوگیری از وابستگی صنعت آبزی پروری به داروها و از آنجایی که هنوز ایمنی استفاده از آنتی بیوتیک ها مورد سوال است محصولات طبیعی برای کنترل باکتری ها بعنوان راه حل دیگر مورد توجه واقع شده اند. افزایش آگاهی عموم درباره اثرات منفی استفاده بیش از حد مواد شیمیایی مصنوعی منجر به تحقیق درباره محلول های سبز مانند اسانس های گیاهی و بدون مواد شیمیایی گردیده است. هزینه بالا و در دسترس نبودن واکسن های تجاری منطقه ای و رعایت اصول امنیت زیستی به منظور جلوگیری از ورود اولیه باکتری به مزارع سبب گردید که استفاده از اسانس های گیاهی مورد توجه واقع شوند [٤].

زیره سبز از زمان های قدیم به عنوان ادویه و داروی طب سنتی بخوبی شناخته شده است. این گیاه به طور وحشی در نواحی وسیعی با آب و هوای مدیترانه ای می روید. بیشترین ترکیبات شناخته شده اسانس دانه زیره سبز شامل کومین آلدهید، مشتقات منتون، گاما ترپینن و پاراسیمن می باشند که مسئول بو و اثرات بیولوژیکی آن هستند [۵]. اثرات ضد میکروبی اسانس زیره سبز بر روی پاتوژن های غذازاد از جمله لیستریا مونوسیتوژنز و اشریشیا کلی به خوبی نشان داده شده است [٦].

نیسین یک نگهدارنده طبیعی و پلی پپتیدی است که توسط سویه های خاصی از لاکتوکوکوس ها در طول تخمیر ایجاد می گردد. نیسین اولین بار بوسیله سازمان خوار و بار جهانی در سال ۱۹٦۹ به عنوان نگهدارنده در غذا رواج پیدا کرد و از سال ۱۹۸۷ در غذاها و محصولات لبنی مورد استفاده واقع شد [۷]. نیسین سمی نیست و سریعاً بوسیله آنزیم های هضم کننده غیر فعال می شود [۸].

نتایج مطالعات مختلف عملکرد اختصاصی اسانس ها در جلوگیری از رشد طیف وسیعی از میکروب ها را ثابت می کند [۹-۱۱]. به علت احتمال وجود مقاومت باکتری ها نسبت به مواد نگهدارنده مختلف و محدودیت غلظت مجاز این مواد در غذاها بکارگیری نگهدارنده های طبیعی با هم به عنوان تکنولوژی ترکیبی ابزار مناسبی برای کنترل پاتوژن های فاسد کننده مواد غذایی است. مزیت عمده ترکیب مواد مختلف نگهدارنده غیر فعال کردن میکروارگانیسم ها در غذا بدون نیاز به حرارت و بدون تخریب بافت و مزه غذا است [۱۲]. با توجه به این موضوع که اسانس های گیاهی می توانند موجب تغییر طعم و بوی غذا شوند بایستی در استفاده از غلظت مورد نیاز اسانس بیشتر دقت کرد تا بتوان در کنار حفظ ایمنی غذایی ویژگی های ارگانولپتیک غذا را در حد مطلوبی حفظ کرد و یا حتی ارتقا بخشید. انتخاب مناسب اسانس بر اساس ترکیبات شیمیایی آن برای اهداف ضد میکروبی خاص مهم است. ثابت

شده است که بین فعالیت ضد میکروبی روغن های فرار گیاه و انتخاب درون گونه ای آن رابطه مثبتی وجود دارد [١٣].

از آنجایی که بیماری ناشی از باکتری استرپتوکوکوس اینیایی(استرپتوکوکوزیس) بین انسان و ماهی مشترک است لذا همواره خطر انتقال بیماری از طریق مصرف ماهیان آلوده عرضه شده به بازار وجود دارد. با توجه به اینکه این بیماری در ایران عموماً ماهیان را در سنین بازاری درگیر می کند طبیعی است احتمال عرضه چنین ماهیانی عمداً یا غیر عمداً به بازار فروش وجود دارد. از طرف دیگر با توجه به درمان موقتی ماهیان بیمار در صورت یافتن راههای پیشگیری و کنترل می توان به ارتقاء بهداشت مزارع کمک کرد و از انتقال عامل بیماری زا به انسان جلوگیری کرد.

هدف از این مطالعه بررسی اثر اسانس زیره سبز و نیسین بصورت انفرادی و توام برای کنترل استرپتوکوکوس اینیایی در نمونه غذایی (فیله ماهی قزل آلای رنگین کمان) می باشد.

٢- مواد و روشها

٢-١- تهیه اسانس و آنالیز زیره سبز

اسانس گیاه زیره سبز (*Cuminum cyminum*) از پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی تهیه شد. اسانس گیاه به روش تقطیر با بخار (Steam distillation) با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگرافی مجهز به آشکارساز (GC/MS) به دست آمد. دستگاه (GC/MS) از نوع (TCD) با ستون مویینه به طول ٣٠ متر و قطر داخل ٢٥٠ میکرومتر و ضخامت لایه داخلی ٠/٢٥ میکرومتر با برنامه دمایی ٥٠ تا ٢٦٥ و همراه با افزایش تدریجی ٢/٥ در هر دقیقه و نگهداری ستون در ٢٦٥ به مدت ٣٠ دقیقه استفاده شد. دمای اتاقک تزریق ٢٥٠ درجه فارنهایت و گاز حاصل از هلیم با سرعت ١/٥ میلی متر در دقیق بود. شناساگر (EI) با انرژی یونیزاسیون ٧٠ الکترون ولت و دمای منبع یونیزاسیون ٢٥٠ درجه فارنهایت بود [١٤].

٢-٢- تهیه باکتری

کشت لیوفیلیزه استرپتوکوکوس اینیایی(GQ850377) از گروه بهداشت و بیماری های آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه شد. در ابتدا این کشت لیوفلیزه در محیط براث (BHI) در ^{o}c ٣٧ به مدت ١٨ ساعت دو مرتبه بطور متوالی تجدید کشت گردید. سپس کشت دوم به میزان ٥ به ١ با گلیسیرین مخلوط شد و در قسمت های مساوی در میکروتیوب های اپندروف استریل در ^{o}c ٢٠- نگهداری شد [١٥].

٣-٢- آماده سازی محلول نیسین

از پودر نیسین ٢/٥ درصد (Sigma 5764) استفاده شد. این ماده تا زمان استفاده بایستی در دمای ^{o}c ٢ تا ٨ نگهداری گردد. ٥٠ میلی لیتر آب مقطر استریل را با ٨٠ میکرولیتر اسید کلریدریک ٠/٠٢ نرمال حل کرده و در ظرف درداری که از قبل استریل شده بود مخلوط کرده (اسید به آب اضافه شد). سپس ٥٠٠ میلی گرم پودر نیسین را در ٥٠ میلی لیتر اسید آماده شده بخوبی حل کرده که تمامی موارد در زیر هود بیولوژیکی انجام شد بطوری که در ظرف استریل دیگری این محلول از فیلتر ٠/٢ میکرومتری عبور داده شد و با استفاده از رابطه $N_1V_1 = N_2V_2$ مقدار مورد نظر از آن را برداشته و به ظروف دردار افزوده و پس از پخش شدن آن در آب برش های ماهی های مورد نظر به آن اضافه گردید [١٦].

٣-٣- آماده سازی نمونه های ماهی

در این مطالعه از ماهی قزل آلای رنگین کمان ٢٥٠ گرمی استفاده شد. ماهیان مورد نظر از ماهی سرای کرج خریداری شدند که پس از سر و دم زنی و خارج کردن محتویات آنها به فیله های ٢٥ گرمی با اندازه ٣×٨ سانتی متر مربع تقسیم شدند و با بسته بندی بصورت تکی در کیسه های فریزر همراه با یخ به سازمان انرژی اتمی فرستاده شده و تحت تاثیر تیمار پرتودهی ٥ kGY اشعه گاما [١٧] قرار گرفتند تا از عدم وجود کلیه میکروارگانیسم ها اطمینان حاصل گردد. فیله ها را در شیشه های بزرگ دردار که شامل آب مقطر ، دی متیل سولفوکساید DMSO (Dimethyl Sulfoxide) ٥ درصد و آگار آگار ١ درصد بودند با هم مخلوط کرده و در دمای ^{o}c ١٢١/١ به مدت ١٥ دقیقه استریل شدند. سپس غلظت های مختلف اسانس زیره سبز (٠، ٠/٠٠٥، ٠/١٣٥، ٠/٤٠٥ درصد) (غلظت ها بر اساس میزان MIC اسانس در شرایط آزمایشگاه تعیین شدند) و نیسین (٠، ٠/٢٥، ٠/٧٥ میکروگرم بر میلی لیتر) و ترکیب غلظت های فوق با هم به شیشه های دردار استریل اضافه شد. سپس فیله های ماهی را در زیر هود به ظروف دردار اضافه کرده و در یخچال با دمای ^{o}c ٤ به آنها اجازه داده شد تا ٢٤ ساعت باقی بمانند تا فیله های ماهی در این مدت مواد را بخوبی در خود جذب کنند. پس از ٢٤ ساعت در زیر

هود برش های ماهی توسط پنس استریل از ظروف دردار به پلیت های استریل منتقل گشته و تنظیم وزن آنها انجام شد و پس از مدت ۱۵ دقیقه نسبت به تلقیح دوز مورد اشاره باکتری بر روی آنها اقدام گردید. برای این کار هر فیله را در زیر هود به روش تلقیح نقطه ای به این صورت که باکتری مورد نظر را در ۱۰ نقطه (جمعاً به میزان ۱۰۰ میکرولیتر) تلقیح می کنیم و آن را در حرارت اتاق ($۲۵c^o$) به مدت ۱ ساعت نگه می داریم تا خشک شود. 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 ٤^oc قرار داده و سپس طی ۱۵ روز از نظر رشد باکتری و رسیدن به حد دوز مسمومیت زا یعنی $۱۰^٦ <$ بررسی شدند [۱۸].

٤-۳- روش شمارش میکروبی

برای این منظور از محتویات هر یک از لوله های تهیه رقت مقدار ۰/۱ میلی لیتر برداشته و در سطح دو پلیت آگار کشت داده شد. سپس پلیت ها به مدت ٤۸ ساعت در دمای ^oc ۳۳ گرمخانه گذاری شدند. پلیت های استاندارد (حاوی ۳۰ تا ۳۰۰ پرگنه) انتخاب و پرگنه های کوکوسی شکل، جفت یا زنجیره ای ، سفید رنگ با هاله یا بدون هاله در اطراف پرگنه انتخاب شدند. میانگین پرگنه های 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 میلی لیتر از نمونه گزارش گردید [۱۸].

۵-۳- تجزیه و تحلیل آماری

داده های مربوط به نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS.20 مورد تجزیه و تحلیل توصیفی قرار گرفتند. ابتدا از تجزیه واریانس یک طرفه جهت مقایسه میانگین ها استفاده شد و در مواردی که بین میانگین ها اختلاف معنی داری وجود داشت از تست Tukey استفاده گردید. میانگین ها در سطح اعتماد ۹۵ درصد از نظر آماری متفاوت قلمداد شدند.

۳- نتایج

نتایج حاصل از آنالیز اسانس زیره سبز توسط دستگاه گاز کروماتوگراف مجهز به آشکارساز شامل درصد ، نوع ترکیبات و زمان نگهداری آنها در جدول ۱ ارائه شده است. همانطور که از جدول آشکار می گردد بیشترین ترکیب اسانس زیره سبز با ۲۷/۱۸ درصد مربوط به بنزالدهید است.

جدول ۱ ترکیب شیمیایی اسانس زیره سبز توسط GC/MS

ترکیب	درصد	زمان بازداری (دقیقه)
بتا پینن	۷/۱۱	۱۳/۰۷
بنزن ۱- متیل	۷/۷۳	۱۵/۵۷
بتا فلاندرن	۱/۰۱	۱۵/٦۹
گاما ترپینن	۱۲/۵٦	۱۷/۳٦
ایزوپروپیل دی سیکلو	۲/۷٦	۲۳/۸۸
بنزالدهید	۲۷/۱۸	۲٦/٤٦
ایزوپروپیلدن	۳/۷۷	۲۸/۱۱
فنیل پروپانول	۱۷/۵	۲۸/۷٤
بنزن ام اتانول	۱۰/۸۲	۲۸/۹۹
اتان ایدول	۳/۰۲	۲۹/۳۵
جمع	۹۳/٤٦	

لگاریتم رشد استرپتوکوکوس اینیایی در فیله قزل آلا تحت غلظت های مختلف اسانس زیره سبز و نیسین و ترکیب آنها در جداول (٤-۲) آورده شده است. با توجه به نتایج بدست آمده اسانس زیره سبز فعالیت ضدباکتریایی قوی تری نسبت به نیسین داشته است بطوریکه با استفاده از بیشترین غلظت نیسین (۰/۷۵ میکروگرم بر میلی لیتر) در روز صفر تعداد باکتری از ٤/۵۷ به ۳/٤۱ log cfu/g در روز ششم کشت رسید اما در بیشترین غلظت اسانس (۰/٤۰۵ درصد) تعداد باکتری در روز

صفر از ۳/۳۱ به log cfu/g ۲/۶۱ رسید. جدول ۲ نشان می دهد که مطابق با تجزیه و تحلیل آماری استفاده از غلظت های ۰/۲۵ و ۰/۷۵ میکروگرم بر میلی لیتر از نیسین در لگاریتم تعداد باکتری ها در نمونه های ماهی در دمای ^{o}c ٤ در مقایسه با گروه کنترل (نیسین صفر) از نظر آماری دارای اختلاف معنی دار می باشد($p<0.05$). همچنین استفاده از غلظت های مختلف نیسین در لگاریتم رشد داده ها اختلاف معنی داری را با هم نشان دادند($p<0.05$). بطوریکه در غلظت ۰/۷۵ میکروگرم در میلی لیتر نیسین لگاریتم رشد باکتری از ٤/۵۷ در روز صفر به log cfu/g ۳/۱۹ در روز نهم رسید اما در غلظت ۰/۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر نیسین لگاریتم رشد باکتری در روز صفر از ٤/۳۳ به ۳/٤۸ لوگ در روز نهم رسید.

جدول ۳ نشان می دهد گروه کنترل (اسانس صفر) از نظر آماری تفاوت معنی داری بر لگاریتم رشد استرپتوکوکوس اینیایی در فیله قزل آلا در مقایسه با تیمارهایی که غلظت اسانس در آنها بیشتر بود در دمای ^{o}c ٤ بوجود آورد ($p<0.05$). اما بین غلظت ۰/۱۳۵ با ۰/٤۰۵ اسانس زیره در کنترل استرپتوکوکوس اینیایی تفاوت معنی داری مشاهده نشد($p>0.05$).

لگاریتم رشد باکتری در دمای ^{o}c ٤ در گروه کنترل (غلظت صفر اسانس) از ٤/٦۲ در روز صفر به log cfu/g ۳/۵٦ در روز نهم رسید در حالیکه لگاریتم رشد باکتری در غلظت ۰/٤۰۵ درصد از ۳/۳۱ به log cfu/g ۲/۲٤ رسید. جدول ٤ نشان می دهد که در بررسی سینرژیست نیسین و اسانس زیره سبز با هم بر لگاریتم رشد استرپتوکوکوس اینیایی نسبت به تیمار کنترل نتایج از نظر آماری معنی دار می باشند($p<0.05$). در بررسی اثر سینرژیست نیسین و اسانس با هم بر لگاریتم رشد باکتری فوق نسبت به استفاده از نیسین به تنهایی نتایج معنی دار می باشد($p<0.05$). همچنین در بررسی تاثیر سینرژیست نیسین و اسانس با هم بر لگاریتم رشد باکتری ها نسبت به استفاده از اسانس به تنهایی نتایج معنی دار می باشند($p<0.05$). در دمای ^{o}c ٤ در غلظت های ترکیبی اسانس زیره سبز و نیسین در روز نهم و پانزدهم هیچ گونه رشدی از باکتری مشاهده نشد. در روز ششم از بیشترین غلظت اسانس (۰/٤۰۵ درصد) با غلظت نیسین (۰/۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر) و تا غلظت های بالاتر هیچ گونه رشدی مشاهده نگردید (جدول٤).

جدول۲ لگاریتم رشد باکتری ها ± SD در غلظت های مختلف نیسین در روزهای مختلف کشت در دمای ^{o}c ٤ در فیله قزل آلای رنگین کمان

اسانس زیره سبز(درصد)	نیسین (میکروگرم بر میلی لیتر)	روز اول	روز سوم	روز ششم	روز نهم	روز پانزدهم
۰	۰	۵/۵۲±۰/۲۲^{a}	٤/۸±۰/۳۲ ^{a}	٤/۱±۰/۲۵^{a}	۳/۷٤±۱/۲۲ ^{a}	۲/۲٦±۰/۲۱ ^{b}
۰	۰/۲۵	٤/۳۳±۰/۳۱^{a}	۳/۹۹±۰/۲۹ ^{b}	۳/۵۳±۰/۳٦^{b}	۳/٤۸±۰/٦۵ ^{b}	–
۰	۰/۷۵	٤/۵۷±۰/۳۲^{a}	۳/۹۷±۱/٤۵ ^{b}	۳/٤۱±۱/٤۷ ^{c}	۳/۱۹±۱/۷۸ ^{d}	–

جدول ۳ لگاریتم رشد باکتری ها ± SD در غلظت های مختلف اسانس زیره سبز در روزهای مختلف کشت در دمای ^{o}c ٤ در فیله قزل آلای رنگین کمان

اسانس زیره سبز(درصد)	نیسین (میکروگرم بر میلی لیتر)	روز اول	روز سوم	روز ششم	روز نهم	روز پانزدهم
۰	۰	٤/٦۲±۰/۳۳^{a}	٤/۲۱±۰/۲۱ ^{a}	۳/۸۰±۰/۲٦ ^{a}	۳/۵٦±۰/۲۹ ^{a}	۲/۳۱±۰/۱۲ ^{b}
۰/۰۰۵	۰	٤±۰/۲۲^{a}	۳/۵۲±۰/۱۵ ^{a}	۳/۱۹±۰/۱٦^{b}	۲/۸۱±۰/۲۱^{b}	–
۰/۱۳۵	۰	۳/٤۵±۰/٤۸ ^{b}	۳/۲۸±۰/۱۸ ^{b}	۲/۷۲±۰/۱۷ ^{c}	۲/٤٦±۰/۳۵ ^{c}	–
۰/٤۰۵	۰	۳/۳۱±۰/۱۹ ^{b}	۳/۰٤±۰/۲٤ ^{b}	۲/٦۱±۰/۲۷ ^{c}	۲/۲٤±۰/۲٤ ^{c}	–

٤- بحث و نتیجه گیری

بطور کلی بیشترین حد پیشنهاد شده برای شمارش کلی باکتری های زنده در ماهی log cfu/g ۷ است [۱۹]. اسپری کردن اسانس های گیاهی روی کل سطوح و حتی استفاده از آنها بعنوان پوشش در آبزیان در جلوگیری از رشد باکتری ها بسیار موثر بوده است [۲۰]. بر اساس مطالعه ای که عبداله زاده و همکاران (۱۳۹۰) بر روی تاثیر نیسین و اسانس آویشن شیرازی به تنهایی و توام با یکدیگر در گوشت ماهی چرخ شده فیتوفاگ علیه باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در طی ۱۲ روز انجام دادند به این نتیجه رسیدند که اسانس آویشن شیرازی در دو سطح ۰/۸ و ۱/۲ رصد اثر مهارکنندگی و باکتری کشی قوی علیه لیستریا مونوسیتوژنز دارد که به دلیل وجود تیمول و کارواکرول است. در پایان دوره افزایش جزیی در تعداد باکتری های لیستریا مونوسیتوژنز در تیمار آویشن ۰/٤ درصد مشاهده شد که احتمالاً به دلیل فرار بودن اسانس های گیاهی و کم شدن از غلظت های اولیه آنها یا حذف سایر باکتری های رقیب لیستریا بوده که حساسیت بیشتری نسبت به اسانس آویشن شیرازی داشتند. باکتریوسین نیسین اثر ضعیفی در مهارکنندگی باکتری فوق در سطح IU/g ۵۰۰ داشت و با گذشت زمان از میزان فعالیت آن کاسته شد که به دلیل ترکیب نیسین با پروتئین و چربی غذا بروز مقاومت میکروبی و یا بخاطر فعالیت آنزیم های موجود در گوشت است [۲۱]. تیمارهای ترکیبی این دو ماده باعث کاهش سریع تعداد باکتری ها شد که با مطالعه فعلی هم خوانی دارد.

جدول ٤ لگاریتم رشد باکتری ها ± SD در غلظت های مختلف نیسین و اسانس زیره سبز در روزهای مختلف کشت در دمای ٤ ^{o}c در فیله قزل آلای رنگین کمان

اسانس زیره سبز(درصد)	نیسین (میکروگرم بر میلی لیتر)	روز اول	روز سوم	روز ششم	روز نهم	روز پانزدهم
۰	۰	٤/۹٤±۰/۲۲^{a}	٤/۷۳±۰/۲۳^{a}	۳/٦٤±۰/۲۲^{a}	۲/۵٤±۰/۱٤ ^{a}	۲/۲۷±۰/۱۹ ^{a}
۰/۰۰۵	۰/۲۵	۲/۳۰±۰/۲۵^{b}	۲/۹۳±۰/٤٤^{b}	۲/٤۹±۰/۱۳^{b}	–	–
۰/۱۳۵	۰/۲۵	۲/۹۱±۰/۳۱^{b}	۲/۸٦±۰/۲۱^{c}	۲/۲۸±۰/۲۹ ^{c}	–	–
۰/٤۰۵	۰/۲۵	۲/۸۸±۰/۱٦^{d}	–	–	–	–
۰/۰۰۵	۰/۷۵	۲/۸۹±۰/۳۱^{d}	۲/۷۷±۰/۳۵ ^{d}	–	–	–
۰/۱۳۵	۰/۷۵	۲/۷۹±۰/۲۹ ^{d}	۲/٦۸±۰/٦۸ ^{d}	–	–	–
۰/٤۰۵	۰/۷۵	۲/۵۱±۰/۳۲^{d}	–	–	–	–

در جداول بالا اختلاف بین آن دسته از غلظت هایی که دارای حرف مشترک نیستند معنی دار می باشد($p<0.05$).

تاثیر اسانس آویشن شیرازی بر فیله های ماهی کپور نقره ای نگهداری شده در دمای ٤c^{o} توسط (Zakipour Rahimabadi and Divband, 2012) مورد بررسی قرار گرفت. اسانس گیاه فوق توانست از رشد میکروب ها در شرایط یخچالی جلوگیری کند. بهترین نتیجه با ۰/٤ درصد اسانس آویشن شیرازی بدست آمد. مقادیر بالای کارواکرول و تیمول علت این نتیجه بود [۲۲].

تاثیر نیسین و اسانس گیاه (*Allium sativum*) برای کنترل لیستریا مونوسیتوژنز بطور جداگانه و ترکیب با هم بررسی شد. بسته به گونه باکتری مورد نظر تاثیر نیسین در کنترل باکتری متفاوت است. آنها مشاهده کردند که عملکرد اسانس سبب بهبود فعالیت نیسین از طریق افزایش تعداد سوراخ های ایجاد شده در غشاء سلولی یا افزایش اندازه سوراخ ها که باعث کاهش تعداد سلول های زنده می شود می گردد [۲۳].

در مطالعه حاضر، تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان می‌دهد که نیسین در غلظت‌های مختلف و در روزهای مختلف اثر ممانعت کنندگی بر روی استرپتوکوکوس اینیایی داشته است، اما غلظت ۰/۷۵ میکروگرم در لیتر نیسین دارای بیشترین تاثیر بازدارندگی بر رشد باکتری بوده، که با سایر تیمارها تفاوت معنی دار آماری داشته است ($p<0.05$). رفتار رشد باکتری های ویبریو پاراهمولایتیکوس و لیستریا مونوسیتوژنز در فیله ماهیان شور شده تحت تاثیر نیسین و اسانس آویشن شیرازی و ترکیب آنها با هم توسط Ekhtiarzadeh *et al.*, (2012) بررسی شد. برای باکتری لیستریا اثر بازدارندگی اسانس و در

ترکیب با نیسین در دمای ٤ ^{o}c مشاهده شد. رشد باکتری ویبریو در ۸ ^{o}c (گروه کنترل) در روز اول کشت متوقف گردید و به زیر ۲ لوگ رسید. بهترین اثر بازدارندگی اسانس در ترکیب با نیسین برای باکتری ویبریو در غلظت ۰/٤۰۵ درصد اسانس و ۰/۷۵ میکروگرم بر میلی لیتر نیسین و برای لیستریا ۰/٤۰۵ درصد اسانس و ۰/۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر نیسین حاصل شد [۱۷].

تاثیر ضد میکروبی اسانس گیاه (*Origanum vulgare*) و نیسین و ترکیب آنها با هم علیه باکتری سالمونلا در گوشت چرخ شده در طی نگهداری در یخچال توسط Govaris *et al.*, (2010) مورد بررسی قرار گرفت. در دمای ٤ ^{o}c جمعیت اولیه سالمونلا در گروه کنترل در تمام دوره تفاوت معنی داری نشان نداد (٤/۱ log cfu/g) اما در دمای ۱۰ درجه سلسیوس جمعیت اولیه سالمونلا در گروه کنترل تفاوت معنی داری در انتهای دوره نشان داد و به ٦/۸۲ log cfu/g رسید. استفاده از ۵۰۰ و ۱۰۰۰ واحد بین المللی در گرم نیسین تفاوت معنی داری با گروه کنترل در هر دو دما نداشت. استفاده از ۰/٦ درصد اسانس در کاهش رشد باکتری موثر بود و تفاوت معنی داری با گروه کنترل و نیسین داشت اما تفاوت زمانی معنی دارتر شد که غلظت ۰/٦ درصد اسانس با ۵۰۰ واحد بین المللی در گرم نیسین در هر دو دما بکار رفت. آنها به این نتیجه رسیدند که استفاده از غلظت های نیسین در کاهش رشد باکتری تاثیر معنی داری ندارد و اسانس موجود و دما نقش مهمی در کاهش رشد باکتری سالمونلا بازی می کنند [٢٤]. در صورت بکارگیری نیسین به صورت ترکیبی با اسانس های گیاهی، طیف عملکردی نیسین به عنوان یک نگهدارنده غذایی وسیع تر می شود. از آنجا که هم اسانس و هم نیسین بر روی غشاء سیتوپلاسمی عمل می کنند، می توان اثر سینرژیستی یا افزایشی را از یک ترکیب ضد میکروبی طبیعی انتظار داشت و برای اثر ممانعت کنندگی آنها به غلظت کمتری از هر دو ترکیب نیاز خواهد بود.

ترکیب نیسین و کارواکرول در دما و pH های مختلف برای بازماندگی باکتری باسیلوس سرئوس مورد مطالعه قرار گرفت. در این مطالعه ثابت شد که نیسین به تنهایی در دمای ۸ ^{o}c نمی تواند از رشد باکتری جلوگیری کند و باید با کارواکرول یا در pH کمتر بکار رود. از آنجایی که زنجیره تشکیل هیدروکربن ها در دمای پایین تر صورت می گیرد پس سیالیت غشاء کاهش می یابد و تاثیر نیسین در این دما کم می شود. تغییرات در ویژگی های غشاء سیتوپلاسمیک یا پپتیدوگلیکان می تواند حساسیت نیسین را تعدیل کند. نیسین می تواند به لیپید II متصل گردد و از تشکیل دیواره سلولی جلوگیری کند. دما بر تشکیل لیپید II موثر است و این ترکیب می تواند بر تعداد مکان های هدف در غشاء و حساسیت باکتری به نیسین موثر باشد. مزیت عمده بکارگیری نیسین با سایر اسانس های گیاهی تحت شرایط دما و pH بدین صورت بیان می شود که آنها میکروارگانیسم ها را در غذا بدون نیاز به حرارت و گرما غیر فعال می کنند و بنابراین از آسیب بیشتر به بافت و در موارد کمتر به طعم مواد غذایی جلوگیری می کنند [۲۵].

Iacobellis و همکاران (۲۰۰٦) ثابت کردند که، اسانس زیره سبز بر روی اکثر باکتری های گرم مثبت و گرم منفی موثر واقع می شود [۲٦]. پژوهی و همکاران (۱۳۸۹) دریافتند، که اسانس دانه زیره سبز علیه باسیلوس سرئوس و باسیلوس سوبتیلیس موثر بوده است [۲۷]. استفاده از غلظت های تحت بازدارنده اسانس و نیسین مورد استفاده مطالعه حاضر باعث افزایش فاز کمون در رشد باکتری گردید که این موضوع در میکروبیولوژی مواد غذایی از اهمیت ویژه ای برخوردار است.

Choobkar و همکاران (۲۰۱۰) تاثیر آویشن شیرازی را بر رفتار رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در فیله های سبک شور شده ماهی فیتوفاگ بررسی کردند و پی بردند که غلظت های بالای اسانس (۰/۱۳۵ درصد) توانسته بود رشد باکتری را کاهش دهد. غلظت های کمتر اسانس تفاوت معنی داری در کاهش باکتری ها نشان ندادند (پایین تر از ۰/۰٤۵ درصد). غلظت های ۰/٤۰۵ و ۰/۸۱ درصد تا روز نهم و دوازدهم از رشد باکتری ها جلوگیری کردند [۲۸]. در مطالعه فعلی غلظت ۰/۱۳۵ و ۰/٤۰۵ درصد اسانس زیره سبز توانستند تا روز ششم در کنترل رشد باکتری (۲/٤٦ log cfu/g و ۲/۲٤) موثر باشند، ولی تفاوت معنی دار آماری با هم نداشتند ($p>0.05$).

نتیجه گیری نهایی مطالعه فوق بدین صورت بیان می شود که تاریخ مصرف محصولات شیلاتی یا ماندگاری آنها در یخ یا دمای یخچالی ٤ تا ۹ روز اعلام شده است [۱۹]. ثابت شده است که درمان با اسانس های گیاهی در ترکیب با دمای یخچالی روش موثری برای افزایش تاریخ مصرف غذا است. ترکیب عوامل ضد میکروبی به منظور توانمندتر ساختن آنها و کاهش دوز ممانعت کنندگی فرم ترکیبی در مقایسه با اثر هر

یک از آنها بصورت مجزا علیه میکروارگانیسم ها مصداقی از اصل هاردل (Hurdle Technology) یا اصل ایجاد موانع رشد و تکثیر باکتری می باشد. بنابراین هنوز هم به روش های جدید برای کاهش یا حذف باکتری های بیماری زا با خاستگاه غذایی و تا حد امکان ترکیب روش های جدید با روش های موجود مورد نیاز است.

٤- منابع

[1] 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. 983p.

[2] 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*). Developmental and Comparative Immunology. 36: 298–305.

[3] Shoemaker, C.A., Shoemaker, B.R. and Klesius, P.H. 2012. Bivalent vaccination of sex reversed hybrid tilapia against *Streptococcus iniae* and *Vibrio vulnificus*. doi:10.1016/j.aquaculture.04.033.

[4] Hyldgaard, M., Mygind , T. and Meyer, R.L. 2012. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies and interactions with food matrix componenets. Frontiersin Microbiology Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy, J. Vol 3. DOI: 10.3389/fmicb. 00012.

[5] Lis-Balchin, M., Deans, S.G. and Eaglesham, E. 1998. Relationship between bioactivity and chemical composition of commercial essential oils. Flavour Frag. 13: 98-104.

[6] 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. Food Chemistry. 102: 898–904.

[7] de Arauz L.J., Jozala, A.F., Pinheiro, G.S., Mazzola, P.G., Junior, A.P. and Penna, T.C.V. 2008. Nisin expression production from *Lactococcus lactis* in milk whey medium. Chem Technol Biotechnol. 83:325–328.

[8] Hadad Kashani, H., Nikzad, H., Mobaseri, S. and Hoseini, E.S. 2012. Synergism Effect of Nisin Peptide in Reducing Chemical Preservatives in Food Industry. Life Science. 9(1).

[9] Bassole, I.H.N., Lamien-Meda, A., Bayala, B., Obame, L.C., Ilboudo, A.J., Franz, C., Novak, J., Nebié, R.C. and Dicko, M.H. 2011. Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon giganteus* essential oils alone and in combination. Phytomedicine. 18: 1070– 1074.

[10] Harzallah, H.J., Kouidhi, B., Flamini, G., Bakhrouf, A. and Mahjoub, T. 2011. Chemical composition, antimicrobial potential against cariogenic bacteria and cytotoxic activity of Tunisian *Nigella sativa* essential oil and thymoquinone. Food Chemistry. 129: 1469–1474.

[11] Weerakkody, N.S., Caffin, N., Turner, M.S. and Dykes, G.A. 2010. In vitro antimicrobial activity of less-utilized spice and herb extracts against selected food-borne bacteria. Food Control. 21: 1408–1414.

[12] Akhondzadeh Basti, A., Misaghi, A. and Khaschabi, D. 2007. Growth response and modelling of the effects of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil, pH and temperature on *Salmonella Typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. LWT. 40: 973–981.

[13] Zaouali, Y., Bouzaine, T. and Boussaid, M. 2010. Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. Food and Chemical Toxicology. 48: 3144–3152.

[14] 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. JFST. 9 (35). 35-43 pp.

[15] Soltani, M., Jamshidi, S. and Sharifpour, I. 2005. Streptococcosis caused by *Streptococcus iniae* in farmed rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) in Iran: Biochemical characteristics and pathogenesis. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 25, 95-106.

[16] Moosavy, M.H., Akhondzadeh Basti, A., Misaghi, A., Zahraei Salehi, T., Abbasifar, R., Ebrahimzadeh Mousavi, H.A., Alipour, 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. Food Research International. 41: 1050–1057.

[17] Ekhtiarzadeh, H., Akhondzadeh Basti, A., Misaghi, A., Sari, A., Khanjar, 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. Food processing and preservation. DOI:10.1111/J.1745-4565.00376.X.

[18] Roomiani, L. 2012. Study of effect *Rosmarinus officinalis* and nisin on the growth of *Streptococcus iniae* in lab conditions and fillet of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Thesis of Fisheries. Islamic Azad University. Science and Research Branch of Tehran. 164 pp.

19- Villa, T.G. and Veiga-Crespo, P. 2014. Antimicrobial compounds. Publisher: Springer Berlin Heidelberg. 316p.

20- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. Food Microbiology. 94: 223– 253.

[21] Abdollahzadeh, E., Rezaei, M., Hosseini, H. and Safari, R. 2011. Effects of nisin and thyme essential oil, individually and in combination, on inoculated populations of *Listeria monocytogenes* in minced silver carp. JFST. 6(4). 13-20 pp.

[22]Zakipour Rahimabadi, E. and Divband, M. 2012. The Effects of Coating and *Zataria multiflora* Boiss Essential Oil on Chemical Attributes of Silver Carp Fillet Stored at 4ºC. International Food Research Journal. 19(2): 685-690.

[23] Razavi Rohani, S.M., Moradi, M., Mehdizadeh, T., Saei-Dehkordi, S.S. and Griffiths, M.W. 2011. The effect of nisin and garlic (*Allium sativum* L.) essential oil separately and in combination on the growth of *Listeria monocytogenes*. Food Science and Technology. 44: 2260-2265.

[24] Govaris, A., Solomakos, N., Pexara, A. and Chatzopoulou, P.S. 2010. The antimicrobial effect of oregano essential oil, nisin and their combination against *Salmonella* Enteritidis in minced sheep meat during refrigerated storage. International Journal of Food Microbiology. 137: 175–180.

[25] Periago, P.M. and Moezelaar, R. 2001. Combined effect of nisin and carvacrol at different pH and temperature levels on the viability of different strains of *Bacillus cereus*. International Journal of Food Microbiology. 68: 141–148.

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

[27] Paghohi, M.R., Tajik, H., Akhondzadeh, A., Gandomi, H., Ehsani, A. and Shekohi Sabet Jalali, F. 2010. Evaluation of chemical compounds and antimicrobial activity of essential oil of *Mentha longifolis* and *Cuminum cyminum* only and together with nisin. Medicine science of urmia. 21(4). 324-331 pp.

[28] Choobkar, N., Soltani, M., Ebrahimzadeh Mousavi, H.M., Akhonzadeh Basti, A. and 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(3) 352.

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

Roomiani, L.[1] *, Rokni, N.[2]

1. Department of Fisheries, Khouzestan Science and Research Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran.
2. Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran, Iran.

(Received: 91/8/16 Accepted: 92/3/8)

The aquatic zoonotic bacterial *Streptococcus iniae* represents a threat to the worldwide aquaculture industry. This study was carried out to evaluate the antibacterial activity *Cuminum cyminum* essential oil and nisin for control of *S.iniae* in fillets of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in 4 C° on basis hurdle technology between 2012 and 2013.The effect of different concentrations of nisin (0, 0.25 and 0.75 µg/ml) and *Cuminum cyminum* (0, 0.005, 0.135 and 0.405 %) were conducted on growth of *S.iniae* GQ850377 for 15 days. The results showed that growth of bacterial delayed in samples treated with nisin and essential oil singly to 9 days and together to 3 days. Samples treated with essential oil showed a significant decrease on the growth of the bacteria compared with nisin and control sample (P<0.05). No significant different was observed on the growth of *S.iniae* in samples treated with higher concentrations of *C.cyminum* (0.135 and 0.405 %) (p>0.05), but different concentrations of nisin was statistically significant (p<0.05). Synergistic effects were observed at concentration of 0.405% *C.cyminum* and 0.75 µg/mL nisin.

Keywords: *Streptococcus iniae*, Nisin, *Cuminum cyminum* L. essential oil, *Oncorhynchus mykiss*

* Corresponding Author E-Mail Address: L.roomiani@yahoo.com