

بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره رزماری در ترکیب با نایسین بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*

در گوشت چرخ کرده گاو در طول نگهداری در یخچال

ژیلا قاسمی^۱، پیمان مهستی^{۲*}، سکینه نوری سعیدلو^۳

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم و مهندسی صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲. گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم و مهندسی صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۳. مرکز تحقیقات سلامت مواد غذایی و آشامیدنی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران.

*نویسنده مسئول: pmahasti@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۰/۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۸/۲۶

چکیده

امروزه استفاده از روش‌های نوین نگهداری نظیر استفاده از ضد میکروب‌ها جایگاه ویژه‌ای در صنایع غذایی پیدا کرده‌اند. از طرف دیگر با توجه به نگرانی‌های موجود در مورد استفاده از نگهدارنده‌های شیمیایی و اثرات مضر احتمالی آنها گرایش به استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی افزایش یافته‌است. نایسین تنها باکتريوسینی است که اجازه استفاده بی‌خطر آن در مواد غذایی داده شده‌است. رزماری نیز از جمله گیاهان دارویی و منابع طبیعی ضد میکروبی است که در این تحقیق همراه با نایسین با هدف جلوگیری از فساد میکروبی ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* در گوشت چرخ کرده گاو انتخاب شده‌است. ساقه و برگ‌های گیاه رزماری پس از خشک شدن در سایه، با روش خیساندن در الکل عصاره‌گیری شدند. حداقل غلظت ممانعت‌کننده عصاره و نایسین بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به روش رقیق‌سازی در آگار تعیین گردید. تیمارهای استفاده همزمان از این دو ماده در غلظت‌های (۸ µg/ml نایسین + ۲ mg/ml عصاره) و (۷ µg/ml نایسین + ۱/۵ mg/ml عصاره) و همچنین تیمارهای عصاره رزماری (در دو غلظت ۳ و ۴ mg/ml) به تنهایی تهیه گردید و به مدت ۱۴ روز در دمای یخچال نگهداری شدند. شمارش کل باکتری‌ها و *استافیلوکوکوس اورئوس* در فواصل زمانی ۰، ۱، ۳، ۷ و ۱۴ روز انجام گرفت. بر اساس یافته‌های تحقیق عصاره رزماری در هر دو غلظت خاصیت ضد میکروبی بالایی از خود نشان داد، اما زمانی که با نایسین ترکیب گردید در مقادیر پایین‌تر، اثر ضد میکروبی بالاتری از خود نشان داد. تاثیر مقادیر مختلف عصاره و نایسین از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($P < 0.05$). همین‌طور نتایج نشان دهنده ارجحیت استفاده ترکیبی دو ماده نسبت به استفاده تکی مواد نگهدارنده بود.

واژگان کلیدی: عصاره رزماری، نایسین، *استافیلوکوکوس اورئوس*، گوشت چرخ کرده.

مقدمه

آنها گرایش به استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی افزایش یافته‌است (Huang et al., 2011). تحقیقات نشان داده‌است که استفاده از نگهدارنده‌های شیمیایی در طولانی مدت

در سال‌های اخیر با توجه به نگرانی‌های موجود در مورد استفاده از نگهدارنده‌های شیمیایی و اثرات مضر احتمالی

افزایش مدت نگهداری و حفظ کیفیت آن شد (Kim et al., 2012).

تحقیقات پیش رو در خصوص نگهدارنده‌های طبیعی مورد استفاده در غذا، تقریباً دو رویکرد اصلی پیش‌روی دارد؛ اول توسعه اطلاعات موجود در مورد مواد نگهدارنده طبیعی و رویکرد دوم استفاده از این مواد به صورت ترکیب با یکدیگر در روش‌های سنتی یا جدید فرآوری در جهت تعیین اثرات هم افزایی احتمالی این ترکیبات است (صفری و سعیدی اصل، ۱۳۹۰).

نگهدارنده‌های بیولوژیک که به منظور جلوگیری از فساد میکروبی استفاده می‌شوند به گروه‌های مختلفی تقسیم‌بندی می‌شوند. از جمله آنها می‌توان به متابولیت‌های تولید شده از باکتری‌های لاکتیک (باکتریوسین‌ها) اشاره کرد (شاملوفر، ۱۳۹۲). باکتری‌های لاکتیک طیف وسیعی از باکتریوسین‌ها را ترشح می‌کنند که می‌توان به نایسین اشاره کرد. نایسین پلی پپتیدی است که توسط سویه‌های خاصی از باکتری لاکتوکوس در طول تخمیر ایجاد می‌گردد. این ترکیب مانع رشد بسیاری از باکتری‌های گرم مثبت می‌گردد و تنها باکتریوسینی است که اجازه استفاده بی‌خطر آن در مواد غذایی داده شده است. تا کنون تحقیقات مختلفی روی نایسین انجام شده است و نشان داده‌اند که نایسین در برابر باکتری‌های گرم منفی غیر فعال است (Boualem et al., 2013). عصاره‌های گیاهی نیز به عنوان یک منبع ضد میکروبی طبیعی شناخته شده می‌باشند که دارای تاثیرات مثبتی نظیر محافظت در برابر بیماری‌های مزمن، سرطان، دیابت، بیماری‌های قلبی و جهش زایی هستند. ترکیب، ساختار و گروه‌های عاملی عصاره‌ها نقش مهمی در فعالیت ضد میکروبی آنها ایفا می‌کند و معمولاً ترکیباتی که دارای گروه‌های فنولی هستند دارای تاثیر بیشتری هستند (صفری و سعیدی اصل، ۱۳۹۰; Banerjee et al., 2012). رزماری با نام علمی *Rosmarinus officinalis* از خانواده

دارای عوارض متعددی از جمله اثر سرطانزایی بوده، به طوری که امروزه مصرف برخی از نگهدارنده‌های شیمیایی منسوخ گشته و یا به مقدار بسیار پایین مورد استفاده قرار می‌گیرند (Kim et al., 2012). یکی از راه‌های رفع این نقیصه استفاده از نگهدارنده‌های با منشأ طبیعی بوده که نه تنها دارای عوارض جانبی نیستند بلکه باعث بهبود بو، طعم و مزه ماده غذایی شده و زمان ماندگاری محصول را نیز افزایش می‌دهند (Zhou et al., 2010).

مصرف گوشت و محصولات گوشتی سابقه‌ای طولانی در اکثر فرهنگ‌ها دارد. گوشت منبع مهمی از مواد مغذی است و همچنین در برخی از کشورها به عنوان یک نشانه از ثروت است. در میان محصولات غذایی، گوشت یکی از حساس‌ترین مواد غذایی فسادپذیر به شمار می‌آید زیرا محیطی بسیار مساعد جهت فعالیت میکروب‌ها، مخمرها و کپک‌ها است (دباغ مقدم، ۱۳۸۴). در قسمت‌های مختلف جهان تکنیک‌های زیادی جهت محافظت از گوشت و افزایش مدت ماندگاری آن در طول قرن‌ها مورد استفاده قرار گرفته است. بنابراین گوشت و محصولات گوشتی و شرایط مطلوب نگهداری‌شان برای ما بسیار مهم است. فرآورده‌های گوشتی به طور معمول در طول نگهداری در یخچال به دلیل عمده فعالیت میکروبی فاسد می‌شوند (Kim et al., 2013). به همین خاطر یکی از مهم‌ترین نگرانی‌های صنعت غذا کنترل میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و عامل فساد می‌باشد (Bouhdid et al., 2009).

استافیلوکوکوس اورئوس یکی از عوامل پیش رو در ایجاد عفونت‌های باکتریایی در کشورهای در حال توسعه بوده و مسئول ایجاد طیف گسترده‌ای از بیماری‌ها در انسان و حیوان، از یک عفونت کوچک پوستی تا ذات‌الریه کشنده، است (Chambers and Delves., 2005; Turlej et al., 2011). در طول نگهداری گوشت، رشد میکروبی را می‌توان به وسیله کاربرد ضد میکروب‌ها به عقب انداخت و موجب

اثر در دمای ۱۰ درجه سانتی گراد بیشتر از ۴ درجه سانتی-گراد بود و این بهترین حالت در بین تیمارهای مختلف بود. Klancnik و همکاران (۲۰۰۹) به بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره رزماری پرداختند. نتایج نشان داد که خاصیت ضد میکروبی عصاره‌ها بستگی به محتوای ترکیبات فنولی آن‌ها دارد و عصاره با درصدهای مختلف از ترکیبات رزمارینیک اسید، کارنوزول و کارنوزیک اسید قدرت‌های متفاوتی بر میکروارگانیسم‌های مختلف دارند و هرچقدر محتوای کارنوزول و کارنوزیک اسید بالاتر باشد، قدرت ضد میکروبی عصاره‌ها بالاتر خواهد بود.

Golshani و diDawoo در سال ۲۰۱۳ خاصیت ضد میکروبی عصاره برگ‌های رزماری را علیه برخی از پاتوژن‌ها سنجیدند. در این بررسی اثر ضد میکروبی رزماری بر باکتری‌های مختلفی تعیین گردید. MIC^۲ در این تحقیق از حدود ۶/۲۵ تا ۱۰۰ mg/ml متفاوت بود. نتایج نشان داد که عصاره متانولی رزماری می‌تواند از رشد *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلی* و *سودوموناس اورژینوزا* ممانعت کند اما بر رشد *باسیلوس سرئوس* موثر نبود.

هدف این تحقیق بررسی و مقایسه خاصیت ضد میکروبی عصاره رزماری به صورت تکی و در ترکیب با ناپسین (به منظور کارایی بهتر نگهدارنده‌ها) به عنوان نگهدارنده‌های طبیعی بر آلودگی باکتریایی *استافیلوکوکوس اورئوس* در گوشت چرخ کرده گاو نگهداری شده در یخچال است.

مواد و روش کار

تهیه نمونه‌های گیاه رزماری و استخراج عصاره نمونه‌های خشک شده گیاه رزماری با نام علمی *Rosmarinus officinalis* از پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی تهیه گردید. جهت استخراج عصاره، نمونه‌های خشک شده در آسیاب برقی تبدیل به پودر نرم شد و موادی که از الک با مش ۸۰ گذشتند جمع آوری شد. حدود

نوعان گیاهی است بوته‌ای، چندساله و همیشه سبز که اکنون در سراسر ایران به صورت پرورشی وجود دارد. Moreno و همکاران گزارش دادند که گیاه رزماری منبعی از ترکیبات فنولیک است (Moreno et al., 2006)، که دارای خصوصیات بیولوژی مختلفی همانند خاصیت ضد میکروبی، ضد عفونی کننده، ضد اسپاسم و ضد التهاب است (Rozman and Jersek, 2009). در میان گیاهان دارویی، گیاه رزماری دارای خاصیت ضد میکروبی بالایی بوده و گزارشات مختلفی این اثر را در برابر هر دو گروه باکتری-های گرم مثبت و منفی ثابت کرده است (Tavassoli and Emamjomeh, 2012; Rozman and Jersek, 2009; Visentin et al., 2011). با توجه به خصوصیات شناسایی شده رزماری، عصاره این گیاه می‌تواند نقش معنی‌داری در جلوگیری از فعالیت میکروارگانیسم‌ها در گوشت ایفا کند و فعالیت ناپسین را در گوشت کامل کند.

Solomakos و همکاران در سال ۲۰۰۸ به بررسی اثر ضد میکروبی ناپسین و اسانس آویشن علیه باکتری *اشریشیا کلی* در گوشت چرخ شده گاو در طول نگهداری در یخچال پرداختند. غلظت‌های اسانس مورد استفاده برابر ۰/۳، ۰/۶ و ۰/۹ درصد بود و ناپسین در دوسطح ۵۰۰ و ۱۰۰۰ Iu/g استفاده شد. غلظت ۰/۳ درصد اسانس اثر ضعیفی بر روی پاتوژن داشت و غلظت ۰/۹ درصد هم از لحاظ ویژگی‌های ارگانولپتیکی قابل قبول نبود. تیمار نمونه‌های گوشت چرخ شده با ۰/۶ درصد اسانس دارای اثر مهارکنندگی بر روی میکروارگانیسم بود، اما این اثر مربوط به دمای ۱۰ درجه-سانتی‌گراد بود و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بی‌اثر بود. و تیمار گوشت چرخ شده با غلظت‌های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ Iu/g ناپسین هیچ اثر ضد میکروبی علیه *اشریشیا کلی* نشان نداد. اما ترکیب ناپسین در این دو سطح همراه با ۰/۶ درصد اسانس اثر قابل قبولی بر روی پاتوژن *E.coli* داشت و این

² Minimum Inhibitory Concentration

¹ Lamiaceae

و داروی ارومیه تهیه شد. جهت تهیه کشت مادر از باکتری مورد نظر بدین صورت عمل شد؛ بعد از اینکه کشت‌های شش ماهه از پودرهای لیوفیلیزه سوش میکروبی طبق دستورالعمل شرکت سازنده تهیه شد، به‌منظور استخراج نمونه‌های شش ماهه از حالت فریز، مدتی در دمای اتاق گذاشته شدند. سپس میکروارگانسیم مورد نظر روی محیط برد پارکراگار^۳ به‌روش سطحی کشت داده شد و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شد (دلفان، ۱۳۹۰).

آماده سازی گوشت

بعد از کشتار و در طی زمان جمود نعشی^۴، گوشت ماهیچه ران گاو تحت شرایط یخچال به آزمایشگاه منتقل شد. سطح بیرونی ماهیچه با غوطه ور کردن در اتانول ۹۶٪ (حجمی/حجمی) استریل گردید و سپس اتانول باقی مانده در سطح گوشت را مشتعل کرده و بعد از جداسازی سطح خارجی گوشت در شرایط اسپتیک، قسمت داخلی گوشت به‌وسیله چرخ گوشت استریل چرخ شد (Solomakos et al., 2008).

آماده‌سازی نمونه‌ها

نمونه‌های گوشت چرخ شده پس از افزودن غلظت‌های مختلف عصاره و نایسین (جدول ۱) و تلقیح (۳ میکرولیتر) باکتری از سوسپانسیون نیم مک فارلند، به‌صورت بسته‌های ۱۰۰ گرمی در داخل پلاستیک‌های پلی‌اتیلنی که قبلاً توسط اتوکلاو استریل شده بودند، بسته‌بندی گردید و سپس کیسه‌ها در دمای یخچال به‌مدت ۱۴ روز نگهداری شدند

۷ تا ۱۰ گرم از پودر گیاه با ۱۰۰ میلی‌لیتر از اتانول ۹۶ درصد، در دمای اتاق و در مکان نسبتاً تاریک در حالی که مدام همزده شد، به مدت ۴۸ ساعت در تماس قرار داده و عصاره‌گیری انجام شد. عصاره به‌دست آمده توسط کاغذ صافی فیلتر گردید. عصاره به‌دست آمده دوباره به‌وسیله صافی‌های ۰/۴۵ میکرونی جهت عاری شدن از میکروارگانسیم‌ها صاف گردید. به‌منظور جداسازی حلال، ماده صاف شده در اوپراتور چرخان تحت خلا در دمای ۴۵ درجه‌سانتی‌گراد تغلیظ شد. جهت اطمینان از جدا شدن الکل، عصاره در آن تحت خلا (۳۰ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۱/۵ ساعت قرار داده شد و بعد توزین گردید. عصاره‌ای که بعد از تبخیر محلول آلی به‌دست آمد به‌عنوان عصاره الکلی در دمای یخچال و در ظروف شیشه‌ای استریل، تمیز و تیره با درب مناسب نگهداری و در موقع لزوم استفاده شد (Kim et al., 2013; Huang et al., 2011; Emamjomeh and Tavassoli, 2012).

آماده‌سازی نایسین

در این تحقیق از نایسین ۲/۵ درصد (SIGMA، آمریکا) که حاوی ۱۰۰۰ Iu/mg نایسین در ماده خشک، ۷۵٪ کلرید سدیم و ۲۲/۵٪ شیر خشک می‌باشد، استفاده شد. پودر نایسین مورد استفاده تا زمان استفاده در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. جهت تهیه محلول ذخیره نایسین، نایسین در اسید کلریدریک ۰/۰۲ نرمال حل شد و سپس با استفاده از فیلترهایی با منفذ ۰/۲۵ میکرومتر استریل شد و مقدار مورد نظر آن‌را برداشته و به ظروف حاوی آب مقطر استریل افزوده و غلظت‌های مورد نظر تهیه شد. (شاملوفر، Solomakos et al., 2008; ۱۳۹۲)

سویه میکروبی مورد آزمون و آماده‌سازی آن

سویه میکروبی مورد آزمایش با نام *Staphylococcus aureus* و شماره استاندارد ATCC 6538 از آزمایشگاه مشترک مرکز تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی و معاونت غذا

³ Baird parker agar

⁴ Rigor mortis

جدول ۱- تیمارهای آزمایشی جهت بررسی تاثیر نایسین و رزماری بر زمان ماندگاری گوشت چرخ کرده در دمای یخچال

تیمارها	غلظت نایسین (µg/ml)	غلظت عصاره (mg/ml)	شرایط نگهداری
شاهد (۱)	-	-	نگهداری در دمای یخچال
۲	-	۳	نگهداری در دمای یخچال
۳	-	۴	نگهداری در دمای یخچال
۴	۷	۱/۵	نگهداری در دمای یخچال
۵	۸	۲	نگهداری در دمای یخچال

تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده عصاره و نایسین بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*

میکروارگانسیم به عنوان شاهد مثبت استفاده شد. سپس پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند. پلیت‌هایی که در آنها رشد میکروارگانسیم‌ها به شدت کاهش پیدا کرده بود به عنوان MIC عصاره برای میکروارگانسیم مربوطه در نظر گرفته شد (Saana et al., 2005; Griffin and Markham, 2011). برای تعیین حداقل غلظت بازدارنده نایسین بر روی میکروارگانسیم مربوطه همانند تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده عصاره بر میکروارگانسیم مربوطه از روش رقیق‌سازی در محیط آگار استفاده شد.

آزمون‌های میکروبی

آزمایشات میکروبی شامل شمارش کل باکتری‌ها و *استافیلوکوکوس اورئوس*، در بازه‌های زمانی صفر، ۲۴ ساعت، ۷۲ ساعت، یک هفته و دو هفته بعد از آماده‌سازی نمونه‌ها انجام گرفت. جهت شمارش‌های میکروبی تهیه رقت‌های اعشاری ضروری است. برای شمارش کل باکتری‌ها به روش کشت آمیختنی و به صورت دوتایی اقدام به کشت شد. سپس بعد از گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۳ درجه سانتی-گراد به مدت ۷۲ ساعت، اقدام به انتخاب پلیت‌های مناسب نموده و میزان بار میکروبی در یک گرم گوشت چرخ شده بیان شد (Zakipour Rahimabadi et al., 2013).

برای شمارش باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* پس از تهیه رقت‌های متوالی، کشت به روش سطحی در روی محیط

تعیین MIC^۵ عصاره با روش رقیق سازی بر روی محیط آگار^۶ به منظور بررسی اثر ضد میکروبی عصاره استخراج شده بر سویه استاندارد میکروبی *استافیلوکوکوس اورئوس* (6538 ATCC) انجام شد. بدین ترتیب که وزن‌های مورد نظر (۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵، ۳، ۳/۵، ۴، ۴/۵ و ۵ گرم) از عصاره تغلیظ شده با استفاده از ترازوی دیجیتالی حساس توزین شد. به منظور افزایش حلالیت، عصاره‌های توزین شده با ۵ میلی‌لیتر از محلول دی‌متیل‌سولفوکساید^۷ ۱۰٪ در داخل لوله‌های آزمایش استریل مخلوط شد. با استفاده از فیلترهای سرنگی ۰/۴۵ میکرون ۱ میلی‌لیتر از این مخلوط به ۱۹ میلی‌لیتر محیط کشت استریل مولر هینتون آگار^۸ با دمای حداکثر ۴۵ درجه سانتی‌گراد اضافه و خوب مخلوط شد. پس از انتقال مواد به درون پلیت و بسته شدن محیط کشت پلیت‌ها در انکوباتور با دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شدند. سپس از میکروارگانسیم‌های مورد نظر کشت‌های تازه تهیه و سوسپانسیون با غلظت نیم مک فارلند (۱۰^۸ × ۱/۵) تهیه شد و از آن ۳ میکرولیتر به مرکز پلیت‌های مذکور تلقیح شد. از پلیت‌های حاوی محیط کشت و دی‌متیل‌سولفوکساید بدون عصاره به عنوان کنترل منفی و پلیت‌های حاوی فقط محیط کشت و

^۵ Minimum Inhibitory Concentration

^۶ Agar dilution method

^۷ Dimethyl Sulphoxide

^۸ Muller hinton agar (MHA)

اورئوس در تیمار شاهد و تیمارهای حاوی عصاره به صورت جداگانه همواره به صورت افزایشی بود. اما بعد از لحظه صفر، بین غلظت‌های مختلف عصاره رزماری و نمونه شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ($P < 0/05$). زمانی که نگهدارندها (نایسین و عصاره رزماری) بصورت ترکیبی استفاده شدند، توانایی نگهدارنده در کنترل رشد میکروب شاخص تلقیحی افزایش یافت. به طوریکه در تیمارهای ترکیبی، مقدار باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در پایان روز سوم کاهش یافت و بعد تا پایان دوره افزایش اندکی مشاهده شد. در بین کلیه تیمارها، تیمار شاهد به صورت معنی‌داری ($P < 0/05$) همواره بالاترین مقدار باکتری را داشت و مقدار آن در پایان روز چهاردهم به $4/623 \text{ Log cfu/g}$ رسید. تیمار حاوی 2 mg/ml عصاره + $8 \mu\text{g/ml}$ نایسین در پایان دوره به-طور معنی‌داری دارای کمترین مقدار $1/50 \text{ Log cfu/g}$ باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بود.

در رابطه با شمارش کل باکتری‌ها نیز بهترین نتایج مربوط به تیمارهای ترکیبی بود. تعداد شمارش کلی در هر دو تیمار ترکیبی تا پایان روز سوم کاهش معنی‌دار داشت و بعد روند افزایشی تا پایان دوره طی کرد، اما بین دو تیمار ترکیبی همواره اختلاف معنی‌دار مشاهده گردید ($P < 0/05$). در پایان دوره بالاترین مقدار شمارش کل باکتری‌ها $9/871 \text{ Log cfu/g}$ مربوط به تیمار شاهد و بهترین نتایج $2/593 \text{ Log cfu/g}$ مربوط به تیمار 2 mg/ml عصاره + $8 \mu\text{g/ml}$ نایسین بود.

BPA⁹ انجام پذیرفت. آنگاه پلیت‌ها در گرمخانه ۳۷ درجه-سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شدند (Akhondzadeh Basti et al., 2007).

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌های حاصله با نرم افزار SPSS 16 انجام پذیرفت. به منظور تجزیه و تحلیل مقادیر کمی به-دست آمده از آزمایش‌های میکروبی پس از کنترل نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگراف-اسمیرنوف^{۱۰} از تجزیه واریانس دو طرفه در قالب طرح آماری فاکتوریل کاملاً تصادفی استفاده شد. همچنین برای تعیین تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها در تیمارهای مختلف از آزمون حداقل LSD) و برای بررسی تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها در زمان‌های مختلف برای یک تیمار از آزمون دانکن (Duncan) استفاده شد.

نتایج

نتایج حاصل از آزمون تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده نگهدارندها

نتایج آزمون‌های حداقل غلظت ممانعت (MIC^{۱۱}) عصاره رزماری، نایسین و ترکیب آن‌ها بر گونه باکتریایی *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 6538) که با روش رقت-سازی در محیط کشت جامد انجام شد، به ترتیب برابر 3 mg/ml ، $10 \mu\text{g/ml}$ و $1/5 \text{ mg/ml} + 7 \mu\text{g/ml}$ بود.

بررسی میکروبی

نتایج حاصل از آنالیزهای میکروبی در دو جدول (۲) و (۳) نشان داده شده‌است. روند تغییرات باکتری *استافیلوکوکوس*

⁹ Baird Parker Agar

¹⁰ Kolomogorav - Smirnov

¹¹ Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

جدول ۲- مقادیر میانگین باکتری استافیلوکوکوس اورئوس (Log cfu/g) در گوشت چرخ شده گاو در زمانهای مختلف

ردیف	تیمار	زمان نگهداری			
		صفر	۲۴ ساعت	۷۲ ساعت	یک هفته
۱	شاهد	۱/۱۳۲ ± ۰/۰۱۵*	۱/۹۸ ± ۰/۰۱۷	۲/۵۶۳ ± ۰/۰۲۵	۳/۵۹ ± ۰/۰۱
		a E	a D	a C	a B
۲	عصاره ۳ mg/ml	۱/۰۹ ± ۰/۰۱	۱/۴۱ ± ۰/۰۲	۱/۵۶۶ ± ۰/۰۰۵	۱/۹۹۶ ± ۰/۰۰۵
		abc E	b D	b C	b B
۳	عصاره ۴ mg/ml	۱/۰۶ ± ۰/۰۲	۱/۱۸۶ ± ۰/۰۱۵	۱/۴۹۳ ± ۰/۰۱۵	۱/۹۵۳ ± ۰/۰۱۱
		bcd E	f D	c C	c B
۴	عصاره ۱/۵ mg/ml	۱/۰۵۶ ± ۰/۰۲	۱/۱۶۳ ± ۰/۰۰۵	۱/۱۶ ± ۰/۰۱	۱/۲۹ ± ۰/۰۱
	عصاره ۱/۵ mg/ml + ۷ μg/ml نایسین	cd D	gh C	f C	e B
۵	عصاره ۲ mg/ml + ۸ μg/ml نایسین	۱/۰۲۶ ± ۰/۰۱۵	۱/۱۴۶ ± ۰/۰۰۵	۱/۱۳ ± ۰/۰۱	۱/۲۰۶ ± ۰/۰۰۵
		d E	h C	g D	g B

* میانگین هر تیمار ± انحراف معیار آن. حروف بزرگ متفاوت (در هر ردیف به صورت جداگانه) نشان دهنده اختلاف معنی دار ($P < 0.05$) در روزهای مختلف نمونه برداری برای یک تیمار مشخص می باشد. حروف کوچک متفاوت (در هر ستون به صورت جداگانه) نشان دهنده اختلاف معنی دار ($P < 0.05$) در یک روز برای تیمارهای مختلف می باشد.

جدول ۳- مقادیر میانگین شمارش کل باکتری ها (Log cfu/g) در گوشت چرخ شده در زمانهای مختلف

ردیف	تیمار	زمان نگهداری			
		صفر	۲۴ ساعت	۷۲ ساعت	یک هفته
۱	شاهد	۳/۹۳۰ ± ۰/۰۱*	۴/۱۷۱ ± ۰/۰۰۷	۵/۴۲۲ ± ۰/۰۰۲	۷/۲۰۰ ± ۰/۰۱
		a E	a D	a C	a B
۲	عصاره ۳ mg/ml	۳/۹۱۰ ± ۰/۰۱	۳/۸۹۶ ± ۰/۰۰۵	۴/۳۹۳ ± ۰/۰۰۵	۴/۹۰۸ ± ۰/۰۰۷
		b D	b D	b C	b B
۳	عصاره ۴ mg/ml	۳/۹۰۳ ± ۰/۰۰۵	۳/۷۴۵ ± ۰/۰۰۵	۴/۱۰۶ ± ۰/۰۰۲	۴/۴۵۰ ± ۰/۰۰۴
		b D	c E	c C	c B
۴	عصاره ۱/۵ mg/ml	۳/۸۷۳ ± ۰/۰۱	۲/۶۴۰ ± ۰/۰۲۶	۲/۳۲۶ ± ۰/۰۱	۲/۳۸۰ ± ۰/۰۱
	عصاره ۱/۵ mg/ml + ۷ μg/ml نایسین	d A	h B	g C	f C
۵	عصاره ۲ mg/ml + ۸ μg/ml نایسین	۳/۸۵۳ ± ۰/۰۱	۲/۴۰۸ ± ۰/۰۰۷	۲/۱۹۵ ± ۰/۰۰۵	۲/۳۰۰ ± ۰/۰۱
		e A	i I	h D	g C

* میانگین هر تیمار ± انحراف معیار آن. حروف بزرگ متفاوت (در هر ردیف به صورت جداگانه) نشان دهنده اختلاف معنی دار ($P < 0.05$) در روزهای مختلف نمونه برداری برای یک تیمار مشخص می باشد. حروف کوچک متفاوت (در هر ستون به صورت جداگانه) نشان دهنده اختلاف معنی دار ($P < 0.05$) در یک روز برای تیمارهای مختلف می باشد.

بحث

عبارت است از سنجیدن اثر غلظت های معین از یک عامل ضد میکروبی در مهار رشد یا نابود کردن باکتری های مورد آزمایش. در تعریف MIC می توان گفت: حداقل غلظتی از

به منظور ارزیابی اثرات عوامل ضد میکروبی می توان از روش های مختلف استفاده کرد، اما در همه روش ها اصول کار

تحت عنوان وابستگی خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی رزماری به محتوای فنلی آن، نشان دادند که بین خواص ضد باکتریایی رزماری و محتوای فنلی آن رابطه مستقیم وجود دارد و MIC آن بر باکتری‌های گرم مثبت بین ۲ تا ۴ $\mu\text{g/ml}$ ۱۵ متغیر و همین‌طور برای باکتری‌های گرم منفی بین ۲ تا ۶۰ $\mu\text{g/ml}$ بود. برای قارچ‌ها نیز برابر ۴ $\mu\text{g/ml}$ تعیین شد. این تحقیق نشان داد که عصاره آبی رزماری که دارای ۱۵ درصد رزمارینیک‌اسید است، فعالیت ضد میکروبی بسیار پایینی دارد، در حالی‌که عصاره متانولی که حاوی ۳۰ درصد کارنوزیک‌اسید بود از فعالیت ضد میکروبی بالایی برخوردار بود.

البته تحقیقاتی که توسط Angioni و همکارانش بر روی یک نمونه رزماری (*Sardinian rosemary*) انجام شد، نشان داد که این نمونه از رزماری اثرات بازدارندگی قابل توجهی بر روی باکتری‌های بیماری‌زا مانند *استافیلوکوکوس اورئوس*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و *اشرشیا کلی* نداشته است (Angioni et al., 2004). در صورتی‌که محققین دیگری اثرات بازدارنده نمونه دیگری از رزماری (*Argentinian rosemary*) را بر قارچ‌ها گزارش نمودند. همچنین Okoh و همکاران بر روی اثرات ضد باکتریایی گیاه رزماری مطالعاتی را انجام دادند و نتایج نشان داد که اسانس روغنی گیاه رزماری اثرات ضد میکروبی قابل ملاحظه‌ای بر روی باکترهای مورد آزمایش داشته است (Okoh et al., 2010). بر اساس نتایج به‌دست آمده از تحقیقات مختلف مذکور در بالا و همین‌طور متفاوت بودن نتیجه تحقیق حاضر با این پژوهش‌ها، همانند Moreno و همکاران می‌توان گفت که خاصیت ضد میکروبی عصاره رزماری بسته به نمونه رزماری، روش استخراج عصاره و درصد ترکیبات فنلی آن، گونه میکروبی مورد آزمایش و غیره متفاوت است (Moreno et al., 2006).

آنتی‌بیوتیک یا مهارکننده که مانع رشد میکروارگانیسم می‌شود (Tajkarimi et al., 2010). حداقل غلظت ممانعت‌کننده توسط اکثر محققین به‌عنوان معیاری برای تعیین فعالیت ضد میکروبی نگهدارنده‌ها ذکر شده است. سنجش فعالیت ضد میکروبی می‌تواند به‌روش‌های مختلفی مانند انتشار، رقیق سازی و ... صورت گیرد (Hammer et al., 1999 ; Abdollahzadeh et al., 2014). روش مورد استفاده در تحقیق حاضر جهت تعیین MIC عصاره رزماری و نایسین روش رقیق سازی در آگار^{۱۲} بود. در این روش نمونه مورد بررسی در حلال مناسب به‌صورت سوسپانسیون درمی‌آید، سپس با محیط کشت آگاردار مخلوط می‌شود. این روش سریع است و با استفاده از آن می‌توان مقدار MIC یک ترکیب را در برابر چند میکروارگانیسم به‌صورت همزمان تعیین کرد (Tajkarimi et al., 2010).

Emamjomeh و Tavassoli در سال ۲۰۱۲ فعالیت ضد- میکروبی عصاره رزماری را بر باکتری‌های *Leuconostoc mesentroides* و *Lactobacillus delbruekii* و بر روی قارچ‌های *Saccharomyces cervisia* و *Candida krusei* به‌وسیله تعیین حداقل غلظت ممانعت‌کننده به-روش رقیق سازی تعیین کردند. نتایج MIC به‌ترتیب برابر ۱/۵، ۱/۷۵، ۲/۲۵ و ۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. در تحقیقی دیگر فعالیت ضد میکروبی عصاره رزماری بر روی گونه‌های مختلف *لیستریا* سنجیده شد. MIC عصاره به‌روش دیسک دیفیوژن^{۱۳} تعیین گردید و نتایج آن مابین ۶۲۵ تا ۵۰۰ $\mu\text{g/ml}$ متغیر بود. توانایی سوش‌های مختلف *لیستریا* در برابر عصاره رزماری بسته به غلظت عصاره و نوع سوش انتخابی متفاوت بود، اما عصاره رزماری در کل توانایی بالایی در کنترل گونه‌های مورد آزمایش داشت (Rozman and Jersek, 2009). Moreno و همکاران (۲۰۰۶) در تحقیقی

¹² Agar dilution method

¹³ Disc diffusion method

بیشتر شد ($P < 0/05$). زمانی که غلظت نایسین از ۵ تا ۲۰ $\mu\text{g/ml}$ افزایش یافت تعداد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بعد از ۴۲ ساعت از ۴/۹۴ به $2/73 \log \text{cfu/ml}$ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد رسید. این نتایج در توافق با نتایج تحقیق حاضر بود. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که قرار گرفتن نمونه‌های گوشت چرخ کرده در معرض غلظت‌های بیشتر نایسین و عصاره هم به‌صورت جداگانه و هم در حالت ترکیبی، باعث ممانعت بیشتر رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌گردد که مشابه نتایج Lee و همکاران در سال ۲۰۰۲ بود.

بر طبق نتایج تحقیق حاضر تیمارهای ترکیبی به‌طور معنی‌داری میزان باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و مقدار شمارش کل باکتری کمتری از تیمارهای حاوی عصاره رزماری به‌صورت تکی داشتند. در تایید این نتایج که نشان‌دهنده اثر بهتر استفاده همزمان نایسین و عصاره نسبت به هر یک از آنها به‌صورت تکی است، می‌توان به نتایج Gorris و Leistner اشاره کرد که نشان دادند استفاده از چند نگهدارنده با مقادیر کم بر مصرف یک نگهدارنده به‌تنهایی با مقادیر زیاد، ارجحیت دارد که این موضوع هم از نظر ماندگاری و هم خواص ظاهری، ارزش تغذیه‌ای و هم از نظر اقتصادی بهتر است. (Gorris and Leistner, 1995)

نتیجه‌گیری

غلظت‌های مختلف عصاره رزماری تاثیر معنی‌داری بر روی رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* دارند، اما زمانی که عصاره رزماری توأم با نایسین استفاده شد، در غلظت‌های پایین‌تری بطور معنی‌داری اثر بهتری در کنترل رشد میکروبی داشت، این نشان‌دهنده ارجحیت استفاده ترکیبی دو ماده نسبت به استفاده تنهایی مواد نگهدارنده است. در پایان می‌توان این‌طور نتیجه گرفت که از عصاره رزماری و نایسین و ترکیب هر دو می‌توان به‌عنوان نگهدارنده در گوشت و محصولات گوشتی به‌منظور افزایش زمان ماندگاری

چوبکار و همکاران اثر غلظت‌های مختلف نایسین (۰/۱۵، ۰/۷۵، ۱/۵ و میکروگرم بر میلی‌لیتر) را بر رشد باکتری *استافیلوکوکوس* بررسی کردند، که کمترین میزان رشد باکتری در غلظت‌های ۱/۵ و ۰/۷۵ گزارش شد (چوبکار و همکاران، ۱۳۸۹). Hammou و همکاران (۲۰۱۱) اثر ضد-میکروبی اسانس مرزنجوش و نایسین را علیه باکتری *E. coli* در سوسیس تهیه شده با گوشت گوسفندی مورد بررسی قرار دادند و مشخص شد که ترکیب نایسین و اسانس اثر قوی‌تری بر میکروارگانیسم دارد و هنگامی که از یک اسانس با نایسین استفاده می‌شود، نایسین می‌تواند بر باکتری‌های گرم منفی *E. coli* نیز اثر بگذارد. تحقیقات مختلف دیگری بر افزایش کارایی نایسین در حالت ترکیبی با مواد دیگر همانند عصاره‌های گیاهی یا نمک‌ها و اسیدهای مختلف، اشاره کرده‌اند و علت آن را فراهم آوردن امکان نفوذ نایسین به درون باکتری‌ها توسط ترکیبات دیگر بیان کرده‌اند (شاملوف، ۱۳۹۲). Ranjan و همکاران در سال ۲۰۱۲ اثر چندین عصاره گیاهی (رزماری، آویشن و دارچین) به همراه نایسین را بر *لیستریا مونوسیتوژنز* بررسی کردند. نتایج نشان داد که بیشترین خاصیت ضد میکروبی در بین عصاره‌های گیاهی مربوط به آویشن بوده و بیشترین اثر هم بر روی باکتری، مربوط به حالت ترکیبی عصاره آویشن به همراه نایسین در غلظت ۰/۸٪ عصاره و ۱۰۰۰ Iu/g نایسین، بوده است. نتایج همه این تحقیقات در توافق با نتایج تحقیق حاضر بود و دلیلی دیگر بر تایید اثر بهتر نگهدارنده‌ها در ترکیب با یک‌دیگر می‌باشد.

Vongsawasdi و همکاران (۲۰۱۲) اثر ممانعتی نایسین را در غلظت ۵ تا ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (با غلظت تقریباً برابر $\log \text{cfu/ml}$ ۷) در کوفته ماهی‌اندازه‌گیری کردند. نتایج نشان داد که اثر ممانعتی نایسین بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* زمانی که غلظت نایسین و مدت زمان انکوباسیون افزایش یافت،

استفاده گردد.

استفاده شود. اما استفاده توأم عصاره رزماری و نایسین بسیار موثرتر می‌باشد، لذا توصیه می‌شود از ترکیب هر دو آنها

منابع

1. چوبکار، نسرین، آخوندزاده بستی، افشین، سلطانی، محمد، ساری، علی، ملکشاهی، علی، پرتوی، ریحانه. (۱۳۸۹). مطالعه رشد باکتری *Staphylococcus aureus* در فیله‌های ماهی کپور نقره‌ای فرآوری شده با نمک و نایسین. مجله تحقیقات دامپزشکی، سال دوم، شماره ۶. ص ۱۹۸ - ۱۹۳.
2. دباغ مقدم، آراسب، صادق زاده عراقی، عذرا. (۱۳۸۴). درسنامه بهداشت و بازرسی گوشت. چاپ اول، انتشارات مرز دانش، صفحات ۳، ۵، ۶، ۱۱ و ۱۳.
3. دلفان، فرهاد. (۱۳۹۰). بررسی خاصیت آنتی‌میکروبیال اسانس میخک در همبرگر. پایان نامه کارشناسی ارشد رشته مهندسی صنایع غذایی - علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران.
4. شاملوفر، مهشید. (۱۳۹۲). استفاده از نایسین ریزپوشانی شده و سیترات سدیم به منظور افزایش زمان ماندگاری فیله ماهی قزل آلابی رنگین کمان در بسته بندی با روش اتمسفر اصلاح شده MAP و تاثیر آن بر *استافیلوکوکوس اورئوس*. رشته شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران.
5. صفری، امید، سعیدی اصل، محمد. (۱۳۹۰). تاثیر نایسین A و بنزوات سدیم بر رفتار لیستریامونوستیوژنز و برخی از پارامترهای میکروبی و شیمیایی در فیله ماهی فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys molitrix*) نگهداری شده در دمای ۴ درجه سلسیوس. مجله بهداشت مواد غذایی، سال اول، شماره ۳، ص ۱۳-۱.
6. Abdollahzadeh, E., Rezaei, M. and Hosseini, H. 2014. Antibacterial activity of plant essential oil and extracts: the role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control *listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat. Food control. 35: 177-183.
7. 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-food Sci Technol. 40(6): 973-981.
8. Angioni, A., Barra, B., Cereti, E. and Arlorio, M. 2004. Chemical composition plant gentic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of rosemary. J Agr Food Chem. 52 (11): 35-41.
9. Banerjee, A.R., Verma, A.V., Das, A.K., Rajkumar, V. and Narkhede, H.P. 2012. Antioxidant effect of broccoli powder extract in goat meat nuggets. Meat Sci. 91: 179-184.
10. Bouhdid, S., Abrini, J., Amensour, M., Zhiri, A., Espuny, M.J. and Manresa, A. 2009. Functional and ultrastructural changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by

- Cinnamomum verum* essential oil. J Appl Microbiol. 109: 1139–1149.
11. Boualem, Kh. Subirad, M., Desjardins, Y. and Saucier, L. 2013. Development of encapsulation system for the protection and controlled release of antimicrobial nisin at meat cooking temperature. J Food Res. 2(3): 36-45.
 12. Chambers, H.F. and Deleo, F.R. 2009. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. Nat Rev Microbiol. 7: 629–641.
 13. Golshani, Z. and Dawoodi, V. 2013. In vitro study of antimicrobial effects of rosemary leaf extract against some pathogens. J Arak Univ Med Sci. 16 (77): 82- 89.
 14. Griffin, S.G. and Markham, J.L. 2011. An agar delution method for determination of the minimum inhibitory concentration of essential oils. J Essent. Oil. Res. 12: 249-255.
 15. Hammer, K.A., Carson, C.F. and Riley, T.V. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. J Appl Microbiol. 86(6): 985–990.
 16. Hammou, F., Skali, S.N., Idaomar, M and Abrini, J. 2011. The antimicrobial effect of *Origanum compactum* essential oil, nisin and their combination against *Escherichia coli* in tryptic soy broth (TSB) and in sheep natural sausage casings during storage at 25 and 7°C. Afr J Biotechnol. 10: 140-147.
 17. Huang, B., He, J., Ban, X., Zeng, H., Yao, X. and Wang, Y. 2011. Antioxidant activity of bovine and porcine meat treated with extracts from edible lotus rhizome knot and leaf. Meat Sci. 87: 46-53.
 18. Kim, H., Candwallader, K.R. and Watanabe, Y. 2012. Effect of addition of commercial rosemary extract on potent odorants in cooked beef. Meat Sci. 94: 170-176.
 19. Kim S. J., Cho, A.R. and Han, J. 2013. Antioxidant and antimicrobial activities of leafy green vegetable extracts and their application to meat product preservation. Food Control. 29: 112-120.
 20. Klancnik, A., Guzej, B., Kolar, M.H., Abramovic, H. and Mozina, S.S. 2009. In vitro antimicrobial and antioxidant activity of commercial rosemary extract formulations. J Food Protect. 72(8): 1744-1752.
 21. Leistner, L. and Gorris, L.M. 1995. Food preservation by hurdle technology. Trends Food Sci Tech. 6: 35-67.
 22. Moreno, S., Scheyer, T., Romano, C.S. and Vonjov, A. 2006. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. Free radical Res. 40(2): 223-231.
 23. Okoh, O.O., Sadimenko, A.P. and Afolayan, A.J. 2010. Comparative evaluation of the antimicrobial activities of the essential oils of rosemary. J Food Chem. 120: 308-312.
 24. Ranjan, S., Dasgupta, N., Saha, P., Rakshit, M. and Ramalingam, C. 2012. Comparative study of antibacterial activity of garlic and cinnamon at different temperature and its

- application on preservation of fish. Adv Appl Sci Res. 3: 495-501.
25. Rozman, T. and Jersek, B. 2009. Antimicrobial activity of rosemary extract against different species of *listeria*. Acta Agric Slov. 93: 51-58
26. Sanaa, O., Safi, Y.S.E.H.A., Ahmed, B. and El Magbol, A.Z. 2005. Antimicrobial activity of some medicinal plants against some Gram positive, Gram negative and fungi. J Food Sci. 18:151-159.
27. Solomakos, N., Govaris, A., Koidis, P. and Botsoglou, N. 2008. The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin and their combination against *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef during refrigerated storage. Meat Sci. 80: 159-166.
28. Tajkarimi, M.M., Ibrahim, S.A. and Cliver, D.O. 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. Food Control. 21: 1199-1218.
29. Tavassoli, S. and Emamjomeh, Z. 2012. Total phenols antioxidant potential and antimicrobial activity of methanol extract of rosemary. Global Vet. 7(4): 337-341.
30. Turlej, A., Hryniewicz, W. and Empel, J. 2011. *Stapylococcal* cassette chorosome mec classification and typing method. Pol J Microbiol. 60: 95-103.
31. Visentin, A., Rojo, S., Navarrete, A., Maestri, D. and Cocero, M.J. 2011. Precipitation and encapsulation of rosemary antioxidants by supercritical antisolvent process. J Food Eng. 109: 9-15.
32. Vongsawasdi, P., Nopharatana, M., Supanivatin, P. and Promchana, M. 2012. Effect of nisin on the survival of *Staphylococcus aureus* inoculated in fish balls. J Agr Food Ind Organ. 5(01): 52-60.
33. Zakipour Rahimabadi, E., Rigi, M. and Rahnema, M. 2013. Combined effects of *zataria multiflora boiss* essential oil and nisin on the shelf-life of refrigerated rainbow trout (*onchorynchus mykiss*) fillets. Iran J Fish Sci. 12(1): 115-126.
34. Zhou, G.H., Xu, X.L. and Liu, Y. 2010. Preservation technologies for fresh meat. Meat Sci. 87: 119-128.

Study on antibacterial effect of rosemary extract in combination with nisin against *staphylococcus aureus* in minced meat during refrigerated temperature

Ghasemi Zh¹, Mahasti P^{2*}, Nouri Saeedlou S¹

1. MSc. Student on food science and technology, science and research branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Department of Food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
3. Food and Beverages Safety Research Center, Urmia University of Medical Science, Urmia, Iran

*Corresponding author: pmahasti@yahoo.com

Received: 26 December 2015

Accepted: 17 November 2015

Abstract

Synthetic preservatives have been used as food additives to extend shelf life of foods, but they are strictly regulated due to toxicological concerns and some health problems. So it is increasingly attractive to find out effective and nontoxic measures (e.g. use of natural antimicrobial agent) to delay microbial spoilage. Nisin is a bacteriocin that it is the only bacteriocin permitted for use in foods. And rosemary is one of the medicinal plants. In this study the effect of antibacterial property of various concentration of rosemary extract alone (3 and 4 mg/ml), and with nisin (7 µg/ml nisin + 1.5 mg/ml RE and 8 µg/ml nisin + 2 mg/ml RE) against *Staphylococcus aureus* in minced meat were assessed throughout 14 days of storage at 4±1°C. Leaves and stems of rosemary after drying in the shade were soaking in pure ethanol and alcoholic extract was obtained. The minimum inhibitory concentration (MIC) of RE and nisin were determined against *S. aureus* using the agar dilution method. Assessment of microbial parameters (total plate count and *S. aureus* count) was carried out in 0, 1, 3, 7 and 14 days. The data were statistically significant (P<0.05). The results reveals that treatment with both concentrations of RE showed significantly lower microbial indexes in comparison with controls, but treatment with both preservative (nisin & RE) had better results and results were statistically significant (P<0.05). As a consequence, using of RE with nisin was better than of RE alone.

Keywords: Rosemary extract, nisin, *Staphylococcus aureus*, Minced beef