

## مطالعه اثر ضد میکروبی عصاره آبی رزماری و نایسین بر لیستریا مونوسایتوزنز در شیر

کیوان امین‌الرعایا<sup>۱\*</sup>، مهدی شریفی سلطانی<sup>۲</sup>، رضا حاج اسماعیلی<sup>۳</sup>

۱. گروه علوم دامی، دانشکده دامپزشکی، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران.

۲. گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد چالوس، دانشگاه آزاد اسلامی، چالوس، ایران.

۳. واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران.

\* نویسنده مسئول: keyvanaminoroaya@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۸/۱۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۶/۱۶

## چکیده

لیستریا مونوسایتوزنز یکی از عوامل بیماری‌زای غذایی است که در مواد غذایی خام وجود دارد و توانایی رشد در زمان نگهداری در سرما را دارد و می‌تواند باعث عفونت مصرف‌کنندگان شود. شیر خام یکی از شناخته شده‌ترین غذاهاست که آلودگی لیستریایی در آن یافت شده است. به دلیل افزایش تمایل مصرف‌کنندگان به مصرف شیر خام در سال‌های اخیر، عفونت‌های بازپدید لیستریایی مجدداً افزایش پیدا کرده است. هدف از این مطالعه ارزیابی خصوصیات ضد لیستریایی نایسین، عصاره رزماری و مخلوط توام آن‌ها با یکدیگر در شیر در دمای یخچالی ( $4 \pm 1$  درجه سانتی‌گراد) بود. در این تحقیق پنج تیمار شامل؛ نمونه شاهد بدون عصاره رزماری (A)، نمونه شیر حاوی ۰/۵ درصد عصاره رزماری (B)، نمونه شیر حاوی ۱ درصد عصاره رزماری (C)، نمونه شیر حاوی ۱۰۰۰ واحد بین‌المللی نایسین (D) و نمونه شیر حاوی ۰/۵ درصد عصاره رزماری + ۵۰۰ واحد بین‌المللی نایسین (E) آماده گردید و به تمام نمونه‌ها  $10^7$  کلنی در هر میلی‌لیتر لیستریا مونوسایتوزنز تلقیح گردید. تمام نمونه‌ها در روزهای ۰، ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ مورد آزمون شمارش لیستریا مونوسایتوزنز قرار گرفتند. براساس نتایج، عصاره رزماری و نایسین رشد لیستریا را کاهش دادند. بیشترین خصوصیت ضد لیستریایی به ترتیب در نمونه E، D و C دیده شد. خصوصیت ضد میکروبی عصاره رزماری در غلظت بالاتر به شکل معنی‌داری از غلظت پایین‌تر بیشتر بود ( $p < 0.05$ ). احتمالاً نایسین اثر سیرنژیستی بر ویژگی ضد میکروبی عصاره رزماری بر ضد لیستریا از خود نشان داد.

واژگان کلیدی: لیستریا مونوسایتوزنز، نایسین، عصاره رزماری، شیر.

## مقدمه

شیر ماده غذایی مقوی و کامل است و به دلیل فراوانی مواد مغذی موجود در آن شرایط برای رشد باکتری‌های عامل بیماری و فساد فراهم است. اخیراً تعداد بیماری‌های بازپدید<sup>۱</sup> و نوپدید<sup>۲</sup> که از مصرف شیر و فرآورده‌های بوجود آمده افزایش یافته است، یکی از این بیماری‌ها لیستریوزیس<sup>۳</sup> است که در نتیجه مصرف شیر آلوده به گونه‌های باکتری لیستریا به ویژه لیستریا مونوسایتوزنز ایجاد می‌گردد. لیستریا به خوبی در دمای یخچالی رشد و تکثیر می‌کند و به همین دلیل نمی‌توان از سرما برای کنترل رشد آن بهره برد. پراکندگی باکتری در طبیعت، دوز عفونی کم لیستریا، مقاومت و تکثیر در سرما و میزان مرگ و میر تا حدود ۲۰ درصد در افراد

سالم و ۷۵ درصد در افراد مستعد باعث شده تا لیستریوزیس از اهمیت ویژه‌ای در مجامع بهداشتی برخوردار باشد و کنترل باکتری در غذا از اهمیت بیشتری برخوردار باشد (Aguado et al., 2004). فرایندهای حرارتی مانند پاستوریزاسیون شیر قادرند لیستریا و سایر عوامل بیماری‌زای موجود در شیر را از بین ببرند ولی از آنجا که در سال‌های اخیر تمایل مصرف‌کنندگان به تهیه و مصرف شیر خام و فرآورده‌های خام و سنتی لبنی افزایش پیدا کرده است باید به دنبال راه‌هایی به منظور کاهش خطر عفونت غذایی در مصرف‌کنندگان بود به همین دلیل استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی اخیراً مورد توجه زیادی قرار گرفته است. نایسین یک باکتریوسین از جنس پلی‌پپتید است که توسط برخی سویه‌های جنس

1. Reemerging.
2. Emerging.
3. Listeriosis.

ضد میکروبی رزماری مدت زمان ماندگاری فیله ماهی افزایش پیدا کرده بود. در تحقیق دیگر جلالی و همکاران (۱۳۸۵) اثرات ضد میکروبی عصاره رزماری را مورد بررسی و تایید قرار دادند. صحرائیان و همکاران (۱۳۹۱) اثر عصاره‌های گیاهان دارویی از جمله رزماری را بر روی باسیلوس سرئوس مورد مطالعه قرار دادند و نشان دادند که عصاره آبی رزماری توانسته است در شرایط آزمایشگاهی از رشد باکتری جلوگیری کند. استفاده از نایسین در محصولات غذایی به عنوان نگهدارنده طبیعی مورد تایید قرار گرفته است ولی از آنجا که این ماده معمولاً در pH اسیدی حداکثر فعالیت خود را نشان می‌دهد و اثر بخشی خود را در ترکیب با اجزا غذا از دست می‌دهد نمی‌تواند به تنهایی در شیر مورد استفاده قرار گیرد دارد از طرف دیگر استفاده از اسانس و غلظت‌های بالای عصاره‌ها به دلیل ایجاد بوی قوی در فرآورده همواره با چالش همراه بوده است و غلظت‌های کم عصاره نیز اثر ضد میکروبی خوبی نشان نمی‌دهند به همین دلیل در این تحقیق بر آن شدیم تا با مطالعه افزودن نایسین و غلظت‌های مختلف عصاره رزماری ترکیب همزمان آنها با یکدیگر به فرمول مناسب نگهدارنده طبیعی برسیم تا با استفاده از آن در روزهای اولیه پس از دوشش شیر از رشد باکتری‌های بیماری‌زا مانند لیستریا مونوسیتوژنز جلوگیری کنیم، چرا که این باکتری با دوز کم قادر به ایجاد عفونت غذایی است و از طرف دیگر دمای سرد یخچالی قادر به توقف تکثیر و بقا باکتری نیست.

### روش کار

- استخراج عصاره

عصاره‌گیری به روش خیساندن در آب مقطر استریل انجام گرفت. برگ رزماری خریداری شده پس از تایید توسط کارشناسان زراعت دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد چالوس در انکوباتور ۴۰ درجه سانتی‌گراد و به دور از نور و حرارت مستقیم کاملاً خشک و سپس توسط آسیاب خرد گردید؛ ۵۰ گرم از

لاکتوباسیلوس تولید می‌شود، این ماده ضد میکروب قوی از سال ۱۹۶۹ میلادی توسط سازمان بهداشت جهانی مورد تایید سلامت قرار گرفته است و از آن زمان تا کنون در ۴۰ کشور مختلف از آن در مواد غذایی مانند: پنیر، سالاد، پویدنگ‌ها، سبزیجات و حتی نوشیدنی‌ها استفاده می‌شود (Oshima et al., 2014). خصوصیات ضد میکروبی وسیع‌الطیف نایسین از یک سو و ماهیت پپتیدینایسین از سوی دیگر که تحت تاثیر اسید و آنزیم‌های گوارشی تجزیه می‌شود باعث می‌شود که باکتری‌های فلور طبیعی روده نیز آسیبی نبینند لذا استفاده از نایسین در مواد غذایی مورد قبول قرار گرفته است، تحقیقات قبلی نیز موید اثر ضد میکروبی نایسین نایسین بوده است. در تحقیق گارسیا و همکاران (Garcia et al., 2010) اثرات ضد میکروبی نایسین بر روی طیف وسیعی از باکتری‌های موجود در غذا به اثبات رسیده است. در مطالعه موسوی و همکاران (۱۳۹۲) و عبداله‌زاده و همکاران (۱۳۹۰) نیز اثرات ضد میکروبی نایسین مورد مطالعه و تایید قرار گرفته است. ترکیب طبیعی ضد میکروب دیگر عصاره‌های گیاهی هستند؛ رزماری با نام علمی *رزماریوس افسینالیس*<sup>۱</sup> از خانواده نعنائیان<sup>۲</sup> می‌باشد که خصوصیات ضد میکروب آن قبلاً به اثبات رسیده است. این گیاه در سراسر ایران به صورت پرورشی وجود دارد. مهمترین مواد شیمیائی آن را ۱ و ۸ سینئول<sup>۳</sup>، بورنئول<sup>۴</sup>، کامفر<sup>۵</sup>، بورنیل استات<sup>۶</sup>، استات<sup>۷</sup>، آلفا و بتاپنین<sup>۷</sup> تشکیل می‌دهند که بسته به شرایط جغرافیائی محل کشت گیاه میزان و درصد هر یک از این مواد متغیر می‌باشد. وجود ترکیبات ضد میکروب متعدد رزماری را به یک ترکیب ضد میکروب و مقبول در مواد غذایی معرفی می‌کند. در تحقیق اعتمادی و همکاران (۱۳۸۷) با بهره‌گیری از ویژگی‌های

1. *Rosmarinus officinalis*.
2. Labiatae.
3. Cineol.
4. Borneol.
5. Campher.
6. Bornyl acetate.
7. Pinene.

به غلظت‌های پایین تر از آب مقطر استریل استفاده شد.

- آماده سازی لیستریا

باکتری لیستریا مونوسیتوژنز (ATCC 19115) به صورت لیوفیلیزه تهیه شد. برای آماده سازی لیستریا مونوسیتوژنز، باکتری توسط میکروتیوپ استریل به محیط آبگوشت قلب و مغز منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. به همین ترتیب کشت‌های دوم و سوم نیز از کشت اول تهیه گردید. برای تهیه رقت  $10^7$  (cfu/ml) از روش کدورت مک فارلند استفاده شد (Solomakos et al., 2008).

- آماده سازی تیمارها

در این مطالعه برای تهیه تیمارها از شیر استریلیزه تجاری استفاده شد و تیمارها مطابق جدول ۱ تهیه شدند.

گیاه خرد شده با ۴۵۰ میلی لیتر آب مقطر سترون در یک ارلن سترون مخلوط شد، این مخلوط طی ۷۲ ساعت بر روی شیکر (تکان دهنده) در دمای محیط خیسانده شد، مایع رویی توسط پمپ خلا جداسازی و درون پلیت‌های مختلف داخل انکوباتور ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا کاملاً خشک شد. عصاره خشک شده رزماری تا زمان مصرف در یک ظرف حاجب دریخچال ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

- آماده سازی نایسین

پودر تجاری نایسین با نام تجاری Nisapline تهیه شد. برای استفاده از نایسین مشابه روش سولوماکوس و همکاران (Solomakos et al., 2008) با اندکی تغییرات عمل شد به این شکل که محلول نایسین با حل نمودن ۰٫۸ گرم پودر نایسیندر ۱۰ میلی لیتر اسید هیدروکلریک ۰٫۰۱ نرمال به دست آمد (هر میلی گرم حاوی ۱۰۰۰ IU نایسین خالص است). جهت رسیدن

جدول ۱- روش تهیه تیمارهای مطالعه حاوی نایسین و عصاره رزماری.

تیمار	توضیحات
A	نمونه شیر استریل فاقد نایسین و عصاره رزماری
B	نمونه شیر استریل فاقد نایسین و حاوی ۰٫۵ درصد (وزنی/حجمی) عصاره رزماری
C	نمونه شیر استریل فاقد نایسین و حاوی ۱ درصد (وزنی/حجمی) عصاره رزماری
D	نمونه شیر استریل فاقد عصاره رزماری و حاوی ۱۰۰۰ IU نایسین
E	نمونه شیر استریل حاوی ۵۰۰ IU نایسین و ۰٫۵ درصد (وزنی/حجمی) عصاره رزماری

هر تیمار رقت‌های متوالی تهیه شد و از هر رقت شمارش به روش پورپلیت در محیط کشت پالکام آگار انجام شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه گذاری شدند و سپس شمارش شدند. طبق استاندارد بین المللی ISO 21148 تعداد باکتری لیستریا مونوسیتوژنز محاسبه (ISO 21148:2005) و نتایج به صورت Log cfu/ml بیان گردید (Bozariis et al., 2006).

آنالیز آماری

پس از تهیه تیمارها به تمامی نمونه‌های آماده شده سوسپانسیون باکتریایی لیستریا مونوسیتوژنز به مقدار  $10^7$  باکتری در هر میلی لیتر افزوده شد و تیمارهای آماده شده در دمای یخچال (۴ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفتند و آزمون میکروبی در روزهای ۰، ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ انجام شد.

- شمارش لیستریا

برای شمارش تعداد باکتری لیستریا مونوسیتوژنز تیمارهای مورد مطالعه در روزهای ۰، ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ مورد آزمون میکروبی قرار گرفتند برای این کار ابتدا از

روش آنالیز واریانس یکطرفه ANOVA و تست دانکن انجام شد.

نمودار توسط نرم افزار Exell طراحی گردید.

### نتایج

نتایج شمارش باکتری لیستریا مونوسایتوژنز در تیمارهای مختلف در طول مطالعه در جدول ۲ نشان داده شده است.

کلیه آزمون‌ها با سه بار تکرار انجام شد و نتایج آزمون میکروبی به صورت میانگین لگاریتم بدست آمده همراه با انحراف معیار گزارش گردید. همچنین وجود ارتباط معنی‌دار با سطح اطمینان ۹۵ درصد بین انواع غلظت‌های عصاره و شاهد در روزهای مختلف با استفاده از نرم افزار SPSS 17 و آنالیز مقایسه میانگین‌ها به

جدول ۲- میانگین و انحراف معیار تعداد باکتری لیستریا مونوسایتوژنز در شیر در روزهای مختلف مطالعه در تیمارهای مختلف حاوی نایسین و عصاره آبی رزماری نگهداری شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بر حسب Log cfu/ml

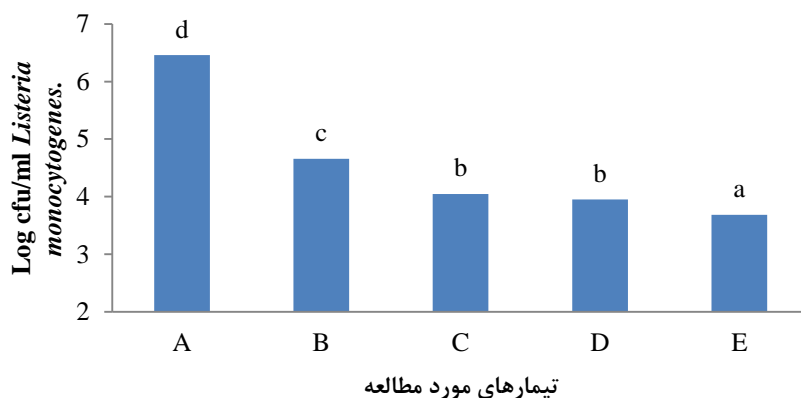
تیمار	روز	۰	۱	۲	۳	۴	۵
A		۶,۱۱ ± ۰,۰۴ <sup>Aa</sup>	۶,۱۴ ± ۰,۰۳ <sup>Ad</sup>	۶,۲۴ ± ۰,۰۹ <sup>Ac</sup>	۶,۴۱ ± ۰,۰۳ <sup>Bd</sup>	۶,۸۲ ± ۰,۱۱ <sup>Cc</sup>	۷,۱۲ ± ۰,۰۳ <sup>De</sup>
B		۶,۱۱ ± ۰,۰۴ <sup>Aa</sup>	۵,۰۳ ± ۰,۱۲ <sup>Dc</sup>	۲,۹۵ ± ۰,۰۶ <sup>Ab</sup>	۳,۸۱ ± ۰,۰۴ <sup>Bc</sup>	۴,۵۹ ± ۰,۱۵ <sup>Cb</sup>	۵,۱۸ ± ۰,۰۶ <sup>Dd</sup>
C		۶,۱۱ ± ۰,۰۴ <sup>Aa</sup>	۴,۸۲ ± ۰,۰۴ <sup>Dc</sup>	۲,۸۱ ± ۰,۰۴ <sup>Bb</sup>	۲,۴۶ ± ۰,۱۹ <sup>Ac</sup>	۴,۳۶ ± ۰,۱۲ <sup>Cb</sup>	۴,۴۵ ± ۰,۱۲ <sup>Cc</sup>
D		۶,۱۱ ± ۰,۰۴ <sup>Aa</sup>	۴,۴۳ ± ۰,۱۱ <sup>Cb</sup>	۲,۷۹ ± ۰,۱۴ <sup>Ab</sup>	۲,۸۷ ± ۰,۳۴ <sup>Ab</sup>	۳,۳۰ ± ۰,۰۵ <sup>Ba</sup>	۴,۲۰ ± ۰,۱۱ <sup>Cb</sup>
E		۶,۱۱ ± ۰,۰۴ <sup>Aa</sup>	۴,۰۴ ± ۰,۲۵ <sup>Ca</sup>	۲,۳۵ ± ۰,۱۲ <sup>Aa</sup>	۲,۳۶ ± ۰,۱۴ <sup>Aab</sup>	۳,۲۶ ± ۰,۰۷ <sup>Ba</sup>	۳,۸۷ ± ۰,۰۴ <sup>Ca</sup>

حروف کوچک متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف است ( $P < 0.05$ ).

حروف بزرگ متفاوت در هر سطر نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین روزهای مختلف است ( $P < 0.05$ ).

تیمار E به شکل معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) نسبت به سایر تیمارها بار میکروبی کمتری داشته است و بعد از آن به ترتیب تیمارهای D و C قرار داشتند و اختلاف معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) بین تیمار حاوی ۱ دصد عصاره رزماری و تیمار حاوی IU۱۰۰۰ نایسین دیده نشد.

بر اساس نتایج جدول ۲ مشخص است تیمار شاهد (A) بالاترین بار میکروبی را در طول مطالعه داشته است در حالی که تیمار حاوی نایسین و عصاره رزماری (E) کمترین تعداد باکتری لیستریا مونوسایتوژنز را در هر میلی‌لیتر از شیر داشتند. همچنین نتایج نشان داد که



نمودار ۱- ارتباط آماری بین تیمار و میانگین رشد باکتری لیستریا مونوسایتوژنز.

حروف لاتین متفاوت روی ستون‌ها (a,b,c,d) نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین ستون‌ها است

نمودار ۱ ارتباط آماری بین تیمار و میانگین رشد باکتری لیستریا مونوسایتوژنز را نشان می‌دهد که براساس آن بیشترین اثر و کمترین اثر ضد میکروبی بین تیمارهای مورد مطالعه در طول زمان نشان داده شده است.

## بحث

طوری که تقریباً در تمامی تیمارها ۲ لوگ از تعداد اولیه لیستریا مونوسایتوزنز کاسته شد. با این وجود نمونه شیر حاوی ۰٫۵ درصد رزماری و نایسین به شکل معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) از سایر تیمارها باکتری کمتری داشت ولی تفاوت معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) بین نمونه شیر حاوی ۰٫۵ درصد رزماری (بدون نایسین) و نمونه شیر حاوی ۱ درصد رزماری (بدون نایسین) و نمونه شیر حاوی نایسین (بدون رزماری) دیده نشد. از روز سوم مطالعه در تمامی تیمارها تعداد لیستریا مونوسایتوزنز رو به افزایش گذاشت که دلیل احتمالی آن بی‌تاثیر شدن خصوصیات ضد میکروبی نایسین و عصاره رزماری است. این وضعیت در تحقیقات قبلی نیز به اثبات رسیده بود (Yin et al., 2007) با این وجود در تیمار حاوی نایسین و عصاره رزماری خصوصیت ضد میکروبی بیشتری دیده شد. نتایج تحقیق پژوهی و همکاران (۱۳۸۹)، موسیو همکاران (۱۳۹۲) و سولوماکوس و همکاران (Solomakos et al., 2008) همانند نتایج تحقیق ما ثابت کردند که عصاره و نایسین بر هم اثر سینرژیستی دارند و موجب تقویت خصوصیات ضد میکروبی یکدیگر می‌شوند. پژوهی و همکاران (۱۳۸۹) اعلام کرده بود که در صورت بکارگیری نایسین به صورت ترکیبی با عصاره‌های گیاهی طیف عملکردی به عنوان یک محافظت‌کننده غذایی وسیع‌تر می‌شود. به نظر می‌رسد از آنجا که هر دو نوع ترکیب بر روی غشا سیتوپلاسمی عمل می‌کنند می‌توان یک اثر سینرژیستی یا افزایشی را از یک ترکیب ضد میکروبی طبیعی انتظار داشت و برای اثر ممانعت‌کنندگی آنها به غلظت کمتری از هر دو ترکیب نیاز خواهد بود.

بر اساس نتایج مشخص است که هیچ یک از تیمارها نتوانستند لیستریا مونوسایتوزنز را بطور کامل از بین ببرند ولی نسبت به نمونه شاهد حداقل ۲ لوگ کاهش جمعیت میکروبی مشخص است. نتایج نمودار ۲ نشان

رشد میکروبی پس از دوشش شیر همیشه یکی از معضلات صنعت لبنیات بوده است و در صورتی که آلودگی با باکتری بیماری‌زا باشد از نظر بهداشت و سلامت عمومی جامعه مشکل ساز خواهد بود. پاستوریزاسیون روش مناسبی برای حذف باکتری‌های بیماری‌زا است ولی به دلیل تمایل مصرف‌کنندگان به محصولات خام نظیر شیر خام در سالیان اخیر به نظر می‌رسد استفاده از نگهدارنده‌های ضد میکروب طبیعی یک راهکار هوشمندانه برای رفع معضل بهداشتی به حساب آید. با توجه به نتایج تحقیق که در جدول ۲ آمده است مشخص است که استفاده از غلظت‌های مختلف عصاره رزماری و نایسین در طول مطالعه اثرات ضد میکروبی خوبی داشته است و تفاوت تیمارها با نمونه شاهد از روز اول بصورت معنی‌داری ( $p < 0/05$ ) مشاهده شده است؛ در این روز بهترین خصوصیت ضد میکروبی مربوط به تیمار E و پس از آن تیمار D قرار دارد، خصوصیات ضد میکروبی عصاره رزماری در تحقیقات محققین قبلی نیز به اثبات رسیده است، در تحقیقات دیگر نیز مشخص شده بود که اثرات ضد میکروبی عصاره رزماری به دلیل وجود ترکیبات متعدد ضد میکروب در عصاره رزماری است و عصاره رزماری به دلیل داشتن ترکیبات متعدد مانند اسید رزماریک، کارنوسیک<sup>۱</sup> و کارنوسول<sup>۲</sup> بر روی طیف گسترده‌ای از میکروب‌ها و مخمرها اثر مهارکنندگی خوبی دارد (Moreno et al., 2006). در تحقیقی دیگر ثابت شد که ترکیبات فنولی گسترده‌ای در عصاره گیاه رزماری وجود دارد که مسئول ایجاد خصوصیات ضد میکروبی آن هستند. به نظر می‌رسد علت خصوصیات ضد میکروبی حاصل در تحقیق ما نیز همین ترکیبات فنولی بودند (Graber et al., 2010). در روز دوم مطالعه حداکثر فعالیت ضد میکروبی در تیمارها دیده شد به

1. Carnosic  
2. Carnisol

شرایط اسیدی می‌باشد، یکی دیگر از محدودیت‌های استفاده از نایسین این است که بسیاری از باکتری‌ها مثل برخی از سویه‌های لیستریا مونوسیتوژنز به آن مقاومت دارند (Bozaris et al., 2006)، نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که با ترکیب این دو می‌توان به مشکلات استفاده از نایسین و همچنین عصاره رزماری غلبه کرد.

با توجه به نمودار ۱ مشخص است که لیستریا مونوسیتوژنز در نمونه شاهد با گذشت زمان در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد روند افزایشی داشته است ولی در تمامی تیمارهای مورد مطالعه تعداد باکتری روند کاهشی داشته است و در روز دوم به حداقل مقدار خود رسیده است. ولی از روز سوم به بعد مجدداً روند افزایش تعداد باکتری به چشم می‌خورد که این احتمالاً به دلیل از بین رفتن اثر ضد میکروبی عصاره رزماری به مرور زمان در دمای یخچالی (۴ درجه سانتی‌گراد) است.

#### نتیجه‌گیری

استفاده از ترکیب ۵۰۰ واحد بین‌المللی نایسین همزمان با ۰/۵ درصد عصاره رزماری فرمول مناسب ضد لیستریایی در شیر است و پیشنهاد می‌گردد که اثر ضد میکروبی این فرمول در مورد سایر میکروب‌های بیماری‌زای شیر نیز مورد مطالعه قرار گیرد.

#### تشکر و قدردانی

شایان ذکر است کلیه اعتبار مالی طرح پژوهشی حاضر، توسط معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل تامین شده است.

#### منابع

۱. اعتمادی، حلیمه، رضایی، مسعود، عابدیان، عبدالمحمد. (۱۳۸۷). پتانسیل آنتی باکتریایی و آنتی اکسیدانی عصاره رزماری در افزایش عمر ماندگاری ماهی قزل آلا رنگین کمان. دوره ۵، شماره ۴، زمستان ۱۳۸۷، صفحات ۷۷-۶۷.
۲. پژوهی، محمدرضا، تاجیک، حسین، آخوندزاده، افشین، گندمی، حسن، احسانی، علی، شکوهی ثابت

می‌دهد بهترین اثر ضد میکروبی مربوط به تیمار حاوی نایسین و عصاره رزماری بود که به شکل معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) با تیمارهای دیگر متفاوت بود. همچنین مشخص شد که تفتات معنی‌داری بین تیمارهای حاوی ۱۰۰۰ واحد بین‌المللی نایسین و تیمار حاوی ۱ درصد عصاره رزماری وجود ندارد ( $p > 0.05$ ) و ضعیف‌ترین اثر ضد لیستریایی در تیمار حاوی ۰/۵ درصد عصاره رزماری دیده شد. علت کم بودن و بی اثر بودن عصاره رزماری در غلظت کم احتمالاً به دلیل کم شدن غلظت ترکیبات ضد میکروبی بوده است (عبداله زاده و همکاران، ۱۳۹۰).

در مطالعات دیگر نیز افزایش قدرت ضد میکروبی عصاره یا اسانس با افزایش غلظت آن دیده شده است که مشابه نتایج تحقیق ما بود. بر پایه نتایج می‌توان اینگونه نتیجه گرفت که استفاده از عصاره رزماری به تنهایی و به ویژه در غلظت‌های بالا می‌تواند اثر ضد لیستریایی در شیر داشته باشد و به منظور تقویت این اثر ضد میکروبی استفاده از نایسین یک راهکار مناسب است زیرا این ترکیب علاوه بر اثر سینرژیستی ضد میکروبی باعث کمتر مصرف کردن عصاره رزماری و در نتیجه آن بهبود خصوصیات حسی تیمار می‌گردد. بر اساس جدول ۲ بیشترین اثر ضد میکروبی در تیمار حاوی ۰/۵ درصد عصاره رزماری و ۵۰۰ واحد نایسین بوده است و بعد از آن به ترتیب تیمار حاوی ۱۰۰۰ واحد نایسین، تیمار حاوی ۱ درصد عصاره رزماری، تیمار حاوی ۰/۵ درصد عصاره رزماری و نهایتاً نمونه شاهد قرار داشته است. علت افزایش تأثیر عصاره رزماری و نایسین به هنگام استفاده همزمان، احتمالاً به دلیل افزایش میزان تشکیل حفرات دیواره سلولی است که در این حالت مرگ سلول سریع‌تر رخ می‌دهد (RazaviRohani et al., 2011). استفاده از عصاره رزماری به همراه نایسین سبب برطرف شدن محدودیت‌های استفاده از این ماده می‌شود، چرا که نایسین ترکیبی است که حلالیت کمی در آب داشته و همچنین بیشترین میزان تأثیر آن در

8. Boziaris, I.S., Nychas, G.J.E. 2006. Effect of nisin on growth boundaries of *Listeria monocytogenes* Scott A, at various temperatures, pH and water activities. *Food Microbiol.* 8: 779 - 84.
9. Garcia, P., Rodriguez, L., Rodriguez, A., Martinez, B. 2010. Food biopreservation: promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. *Trend. Food Sci. Technol.* 8(1): 373- 82.
10. Graber, M.F., Pérez-Correa, J.R., Verdugo, G., Del Valle, J.M., 2010. Agosin E. Spinning cone column isolation of rosemary essential oil. *Food Control.* 21: 615-619.
11. ISO 21148: 2005, Cosmetics – Microbiology – General instructions for microbiological examination.
12. Moreno, S., Scheyer, T., Romano, C.S., Vojnov, A.A. 2006. Antioxidant and antimicrobial activities of rosmery extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radic Res.* 40(2): 223-31.
13. Oshima, S., Hirano, A., Kamikado, H., Nishimura, J., Kawai, Y., Saito, T. 2014. Nisin A extends the shelf life of high-fat chilled dairy dessert, a milk-based pudding. *Journal of Applied Microbiolog.* 116, 1218-1228.
14. Razavi Rohani, S.M., Moradi, M., Mehdizadeh, T., Saei-Dehkordi, S.S., 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*. *LWT-Food Sci. Technol.* 10: 2260 - 5.
15. Solomakos, N., Govaris, A., Koidis, P., Botsoglou, N. 2008. The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin, and their combination against *Listeria monocytogenes* in minced beef during refrigerated storage. *Food Microbiol.* 25 (1):114-27.
16. Yin, L., Jiang, S.T. 2007. Biopreservative effect of pediocin ACCEL on refrigerated seafood. *Fisheries Sci.* 73 (4):907-12.
- جلالی، فرنود. (۱۳۸۹). ارزیابی ترکیبات شیمیایی و فعالیت ضد میکروبی اسانس پونه کوهی و دانه زیره سبز به تنهایی و توأم با نایسین. مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و یکم، شماره چهارم، پاییز ۱۳۸۹، صفحات ۳۳۱-۳۲۴.
۳. جلالی، محمد، عابدی، داریوش، قاسمی دهکردی، نصراله، چهارمحالی، امیر. (۱۳۸۵). بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره هیدروالکلی تعدادی از گیاهان دارویی بر ضد باکتری لیستریا مونوسیتوژنز. مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، دوره ۸، شماره ۳، صفحات ۲۵-۳۳.
۴. صحرائیان، بهاره، نقی ور، فریبا، طباطبایی یزدی، فریده. (۱۳۹۱). بررسی و مقایسه‌ی اثر عصاره‌ی متانولی و آبی گیاه نعناع، رزماری و اسطوخودوس بر رشد اشرشیاکلی و باسیلوس سرئوس. مجله‌ی نوآوری در علوم و فناوری غذایی، سال چهارم، شماره‌ی چهارم، زمستان ۱۳۹۱، صفحات ۱-۶.
۵. عبدالله‌زاده، اسماعیل، رضائی، مسعود، حسینی، هدایت، صفری، رضا. (۱۳۹۰). تأثیر نایسین و اسانس آویشن شیرازی به تنهایی و توأم با یکدیگر بر جمعیت لیستریا مونوسیتوژن تلقیح شده در گوشت چرخ شده ماهی فیتوفاگ. مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران. سال ششم، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۰، صفحات ۲۰-۱۳.
۶. موسوی، میرحسن، محمودی، رزاق، داودی، سمیرا، شایسی، نسیم. (۱۳۹۲). اثر ضد میکروبی اسانس نعناع و نایسین به صورت ترکیبی بر روی لیستریا مونوسیتوژنز. فصلنامه گیاهان دارویی، سال دوازدهم، دوره چهارم، شماره مسلسل چهل و هشتم، پاییز ۱۳۹۲، صفحات ۱۰۴-۱۱۶.
7. Aguado, V., Vitas, A.I, Garcia-Jalon, I. 2004. Characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from a vegetable processing plant by RAPD and REA. *Int J Food Microbiol.* 90(3): 341-7.

## Study on antimicrobial effect aquatic extract of rosemary and nisin against *Listeria monocynogenes* in milk

Aminoroaya K<sup>1\*</sup>, Sharifi Soltani<sup>2</sup> M, Hajesmaili R<sup>3</sup>

1. Department of Animal Science, Faculty of Veterinary Medicine, Babol Branch, Islamic Azad University, Babol, Iran.

2. Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Chalous Branch, Islamic Azad University, Chalous, Iran.

3. Babol Branch, Islamic Azad University, Babol, Iran.

**Corresponding author:** [keyvanaminoroaya@yahoo.com](mailto:keyvanaminoroaya@yahoo.com)

Received: 7 September 2017

Accepted: 7 November 2017

### Abstract

*Listeria monosytogenes* is one of food borne pathogens that presence in raw foods and capable of growth during cold storage and cause infection in consumers. Raw milk is one of the most particular foods associated with listeria contamination. Reemerging listerial infection increased because of increase the consumer interest to consume of raw milk in last years. This study was conducted to evaluate the anti-listerial effect of nisin, rosemary extract and mixed of them in milk at refrigerator temperature ( $4\pm 1^\circ\text{C}$ ). Five treatments of milk were prepared; control sample with no nisin and rosemary extract (A), milk contain 0.5% rosemary extract (B), milk contain 1% rosemary extract (C), milk contain 1000 IU nisin (D) and milk contain 0.5% rosemary extract + 500 IU nisin (E).  $10^7$  cfu/ml *Listeria monosytogenes* was inoculated in each sample. All samples were exanimate for *Listeria monosytogenes* count on day 0, 1, 2, 3, 4 and 5. Based on results; rosemary extract and nisin reduced the listerial growth. Highest anti-listerial activity was shown in sample E, D and C respectively. The antimicrobial effect of rosemary extract at high concentration significantly ( $p < 0.05$ ) was higher than low concentration. Nisin had synergist effect on anti-listerial properties of rosemary extract.

**Keywords:** *Listeria monosytogenes*, Nisin, Rosemarry extract, Milk.