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

منصوره قائنی[1*]، لاله رومیانی[2]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اهواز، استادیار گروه شیلات، اهواز، ایران.
۲- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات خوزستان، استادیار گروه شیلات، خوزستان، ایران.
*نویسنده مسئول مکاتبات: Mansoreh.ghaeni@gmail.com
(دریافت مقاله: ۹۲/۴/۶ پذیرش نهایی: ۹۲/۸/۱۵)

چکیده

استرپتوکوکوس اینیایی (*Streptococcus iniae*) به عنوان یک باکتری نوظهور و زئونوز تهدیدی برای مزارع پرورشی ماهی در سرتاسر جهان و سلامت انسان محسوب می‌شود. هدف این مطالعه، ارزیابی اثر اسانس زیره سبز (*Cuminum cyminum*) و نیسین بر روی رشد استرپتوکوکوس اینیایی بود. برای این منظور فیله ماهی قزل آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با مقدار 10^3 عدد استرپتوکوکوس اینیایی در هر گرم تلقیح گردید و اثر اسانس زیره سبز با غلظت‌های ۰، ۰/۰۰۵، ۰/۱۳۵ و ۰/۴۰۵ درصد و نیسین با غلظت‌های ۰، ۰/۲۵ و ۰/۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر روی رشد این باکتری در دماهای ٤ و ۱۰ درجه سلسیوس طی مدت ۱۵ روز نگهداری بررسی شد. نتایج مطالعه نشان داد در نمونه‌های نگهداری شده در دمای ٤ درجه سلسیوس، رشد باکتری هنگام استفاده مجزای اسانس زیره یا نیسین تا روز نهم به تعویق می‌افتد. در حالی که حالت ترکیبی این دو ماده رشد باکتری را تا روز سوم به تأخیر می‌اندازد. در دمای ۱۰ درجه سلسیوس، نیسین تا روز سوم و اسانس زیره تا روز ششم و در ترکیب با هم تا روز ششم، توانستند مانع از رشد باکتری شوند. در دمای ٤ درجه سلسیوس بیشترین تأثیر سینرژیسم در تیمار ۰/۴۰۵ درصد اسانس زیره سبز با ۰/۷۵ میکروگرم در میلی‌لیتر نیسین مشاهده شد. در حالی که این تأثیر در دمای ۱۰ درجه سلسیوس، در تیمارهای ۰/۱۳۵ و ۰/۴۰۵ درصد اسانس زیره سبز و ۰/۷۵ میکروگرم در میلی‌لیتر نیسین دیده شد. در مقایسه با گروه شاهد، غلظت‌های نیسین و اسانس زیره سبز تفاوت معنی‌داری در مهار رشد باکتری داشتند ($p<0/05$). بنابراین می‌توان به این جمع‌بندی رسید که نیسین و اسانس زیره سبز به طور موثری رشد استرپتوکوکوس اینیایی را در فیله ماهی قزل آلا مهار می‌کنند.

واژه‌های کلیدی: *استرپتوکوکوس اینیایی*، زیره سبز، نیسین، قزل آلای رنگین‌کمان

مقدمه

آبزی‌پروری با تولید بیش از ۱۵٤ میلیون تن در سال ۲۰۱۱ به عنوان فعالیت اقتصادی مهم در بیشتر کشورها محسوب می‌شود (FAO, 2012)، اما شیوع بیماری همیشه به عنوان مانعی در تولید سودآور ماهیان و آبزیان دیگر عنوان می‌گردد. فسادپذیری ماهیان تازه به عنوان یک محصول با میزان پروتئین بالا بیشتر تحت تأثیر ترکیبات بیولوژیکی اتفاق می‌افتد که در این میان میکروارگانیسم‌های فاسدکننده از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند (Martin et al., 2000).

Streptococcus iniae یک عامل بیماری‌زا در ماهیان و انسان می‌باشد که یکی از پاتوژن‌های مهم نوظهور در چند دهه اخیر بوده است. این باکتری گرم مثبت، کوکسی شکل کپسول‌دار، بدون اسپور و غیرمتحرک است که اولین بار در سال ۱۹۷٦ از آبسه‌های زیر پوستی دلفین‌های آب شیرین جدا شد و سپس به سایر نقاط جهان گسترش یافت. در میان گونه‌های آب شیرین آلوده به این باکتری قزل آلای رنگین‌کمان و تیلاپیای نیل از اهمیت بیشتری برخوردارند. این باکتری به عنوان یک پاتوژن مشترک بین انسان و ماهی مطرح است (Wright et al., 2013) و حداقل ۲۵ مورد عفونت انسانی، ناشی از *Streptococcus iniae* در جهان از طریق مقالات علمی مختلف، گزارش شده است (Buchanan et al., 2008; Bowker et al., 2010).

محدودیت‌های قانونی، وجود مشکلات در دستورالعمل‌های تجویز، سختی کار و گران بودن داروها، تجمع آنها در محیط زیست و کاهش اثر داروها، محققان را بر آن داشت تا از ترکیبات گیاهی و محرک‌های ایمنی و غذایی استفاده کنند. استفاده از ترکیبات گیاهی به علت ارزان بودن، در دسترس بودن و آسانی رشد و کشت آن‌ها از نظر اقتصادی به‌صرفه‌تر هستند. آنها دوستدار محیط زیست بوده و در آبزی‌پروری قابل استفاده می‌باشند (Costa et al., 2012).

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

بنابراین نظر متخصصان بهداشت مواد غذایی با بکارگیری سیستم تحقیقاتی جدید یعنی سیستم تکنولوژی ممانعتی (Hurdle Technology) ابتدا در مدل‌های آزمایشگاهی و سپس در مدل‌های اصلی یعنی ابتدا در محیط مایع و سپس جامد سعی در بکارگیری اسانس‌های گیاهی به تنهایی و توام با سایر

نگه‌دارنده‌های طبیعی دیگر در غلظت‌ها و درجات ترکیبی مختلف با اثر بر روی باکتری‌های بیماری‌زای مهم با منشاء غذایی نموده‌اند تا بتوان به ترکیب سینرژیستی مطمئن و مناسبی از نگه‌دارنده‌های طبیعی با بیشترین اثر ضدمیکروبی و در عین حال به کمترین اثر نامطلوب ارگانولپتیکی دست یافت (Fazlara et al., 2012).

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

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

هدف از این مطالعه بررسی اثر اسانس زیره سبز و نیسین به صورت مجزا و توام برای کنترل *Streptococcus iniae* در نمونه غذایی (فیله ماهی قزل آلای رنگین کمان) در دو دمای ٤ (مناسب یخچالی) و ۱۰ (نامناسب یخچالی) درجه سلسیوس می‌باشد.

مواد و روش‌ها

- تهیه باکتری

کشت لیوفیلیزه *Streptococcus iniae* (GQ850377) از گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران اخذ گردید. در ابتدا این کشت لیوفلیزه در عصاره قلب و مغز (BHI) در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۱۸ ساعت دو مرتبه بطور متوالی تجدید کشت گردید. سپس کشت دوم به میزان ۵ به ۱ با گلیسیرین مخلوط شد و در قسمت‌های مساوی در لوله‌های میکروسانتریفیوژ اپندروف استریل در ۲۰- درجه سلسیوس نگه‌داری شد (Soltani et al., 2009).

- آماده‌سازی محلول نیسین

در مطالعه حاضر، از پودر نیسین ۲/۵ درصد (Sigma 5764) استفاده شد. این ماده تا زمان استفاده بایستی در دمای ۲ تا ۸ درجه سلسیوس نگه‌داری شود. مقدار۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل را با ۸۰ میکرولیتر اسید کلریدریک ۰/۰۲ نرمال حل کرده و در ظرف درداری، که از قبل استریل شده بود، مخلوط شد (اسید به آب اضافه شد). سپس ۵۰۰ میلی‌گرم پودر نیسین را در ۵۰ میلی‌لیتر اسید آماده شده به خوبی حل کرده به طوری که در ظرف استریل دیگری این محلول از فیلتر ۰/۲ میکرومتری عبور داده شد و با استفاده از رابطه $N_1V_1 = N_2V_2$ مقدار مورد نظر از آن را برداشته و به ظروف دردار افزوده و پس از پخش شدن آن در آب، برش‌های ماهی‌های مورد نظر به آن اضافه گردید (Moosavy et al., 2008).

- تهیه اسانس و آنالیز آن

اسانس گیاه زیره سبز (*Cuminum cyminum*) از پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی تهیه شد. به این ترتیب که اسانس گیاه به روش تقطیر با بخار (Steam distillation) با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگراف متصل به طیف نگار جرمی (GC/MS) به دست آمد.

دستگاه (GC/MS) از نوع (Termoquest Finnigan) با ستون مویینه به طول ۳۰ متر و قطر داخل ۲۵۰ میکرومتر و ضخامت لایه داخلی ۰/۲۵ میکرومتر با برنامه دمایی ۵۰ تا ۲٦۵ و همراه با افزایش تدریجی ۲/۵ در هر دقیقه و نگه‌داری ستون در ۲٦۵ به مدت ۳۰ دقیقه استفاده شد. دمای اتاقک تزریق ۲۵۰ درجه فارنهایت و گاز حاصل از هلیم با سرعت ۱/۵ میلی‌متر در دقیق بود. شناساگر (EI) با انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت و دمای منبع یونیزاسیون ۲۵۰ درجه فارنهایت بود (Fazlara et al., 2012).

- آماده‌سازی نمونه‌های ماهی

در این مطالعه از ماهی قزل آلای رنگین‌کمان ۲۵۰ گرمی استفاده شد. ماهیان مورد نظر از ماهی سرای کرج خریداری شدند که پس از جدا کردن سر و دم و خارج کردن محتویات آن‌ها به فیله‌های ۲۵ گرمی با اندازه ۸×۳ سانتی‌مترمربع تقسیم شدند و با بسته‌بندی به صورت تکی در کیسه‌های فریزر همراه با یخ به سازمان انرژی اتمی فرستاده شده و تا حدود ۵ کیلوگری اشعه گاما به آن ها داده شد (Ekhtiarzadeh et al., 2012) تا از عدم وجود کلیه میکروارگانیسم‌ها اطمینان حاصل گردد. فیله‌ها در شیشه‌های بزرگ دردار که حاوی آب مقطر، دی متیل سولفوکساید (Dimethyl Sulfoxide) (DMSO) ۵ درصد و آگار آگار ۱ درصد بود قرار داده و در دمای ۱۲۱/۱ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه استریل شدند. غلظت‌های مختلف اسانس زیره سبز (۰، ۰/۰۰۵، ۰/۱۳۵، ۰/٤۰۵ درصد) بر اساس می‌نیمم غلظت بازدارنده اسانس (MIC) در آزمایشگاه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران انجام شد و نیسین (۰، ۰/۲۵، ۰/۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و ترکیب آن‌ها با همدیگر به شیشه‌های دردار استریل اضافه شدند. سپس فیله‌های ماهی را در زیر هود به ظروف دردار اضافه کرده و در یخچال با دمای ٤ درجه سلسیوس به آنها اجازه داده شد تا ۲٤ ساعت باقی بمانند و فیله‌های ماهی در این مدت مواد را به خوبی جذب کنند. پس از ۲٤ ساعت در زیر هود برش‌های ماهی توسط پنس استریل از ظروف دردار به پلیت‌های استریل منتقل گشته و تنظیم وزن آنها انجام شد و پس از مدت ۱۵ دقیقه نسبت به تلقیح دوز مورد اشاره باکتری به روش تلقیح نقطه‌ای بر روی آن ها اقدام گردید. سپس یک فیله از هر تیمار را داخل یک کیسه (Bag mixer) استریل قرار داده و روی آن برچسب زده درب آن را محکم بسته و در انکوباتور ٤ (مناسب یخچالی) و ۱۰ (نامناسب یخچالی) درجه سلسیوس قرار داده و سپس به مدت ۱۵ روز از نظر رشد باکتری و رسیدن به حد دوز مسمومیت زا یعنی $10^6 <$ بررسی شدند (Roomiani, 2012).

- روش شمارش میکروبی

برای این منظور از محتویات هر یک از لوله‌های تهیه رقت مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر برداشته و در دو پلیت محتوی آگار کشت (Merck, KGaA, Darmstadt, Germany) داده شدند. سپس پلیت‌ها به مدت ٤۸ ساعت در دمای

۳۳ درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری شدند. پلیت‌های استاندارد (حاوی ۳۰ تا ۳۰۰ پرگنه) انتخاب و پرگنه‌های کوکسی شکل جفت یا زنجیره‌ای، سفید رنگ با هاله یا بدون هاله در اطراف پرگنه انتخاب شدند. میانگین پرگنه‌های شمارش شده در دو پلیت برای رقت مربوطه در نظر گرفته شد و حاصل ضرب تعداد باکتری در فاکتور رقت به عنوان تعداد *Streptococcus iniae* در هر میلی‌لیتر از نمونه گزارش گردید (Roomiani, 2012).

- تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های مربوط به نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS.20 مورد تجزیه و تحلیل توصیفی قرار گرفتند. ابتدا از تجزیه واریانس یکطرفه جهت مقایسه میانگین‌ها استفاده شد و در مواردی که بین میانگین‌ها اختلاف معنی‌داری وجود داشت جهت جدا کردن آنها از تست Tukey استفاده گردید. میانگین‌ها در سطح اعتماد ۹۵ درصد از نظر آماری متفاوت قلمداد شدند.

یافته‌ها

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

جدول ۱- ترکیب شیمیایی اسانس زیره سبز توسط GC/MS

ترکیب	درصد	زمان نگه‌داری (دقیقه)
B pinene	۷/۱۱	۱۳/۰۷
Benzene 1 methyl	۷/۷۳	۱۵/۵۷
B phellandrene	۱/۰۱	۱۵/۶۹
Gama terpinene	۱۲/۵۶	۱۷/۳۶
Isopropylbicyclo	۲/۷۶	۲۳/۸۸
Benzaldehyde	۲۷/۱۸	۲۶/۴۶
Isopropylidene	۳/۷۷	۲۸/۱۱
Phenylpropanol	۱۷/۵	۲۸/۷۴
Benzenemethanol	۱۰/۸۲	۲۸/۹۹
Ethanediol	۳/۰۲	۲۹/۳۵
جمع	۹۳/۴۶	

جدول ۲ بیانگر لگاریتم رشد باکتری *Streptococcus iniae* در دمای ۴ درجه سلسیوس (دمای مناسب یخچالی) تحت غلظت‌های مختلف نیسین و اسانس زیره سبز است. غلظت‌های ۰/۲۵ و ۰/۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نیسین با تیمار شاهد دارای تفاوت معنی‌دار آماری بودند ($p<0/05$). همچنین دو تیمار فوق نیز با هم در کنترل باکتری دارای تفاوت معنی دار آماری بودند ($p<0/05$) که در روز ششم و نهم کشت کاملاً مشهود است. هر دو تیمار بکار گرفته شده نیسین در دمای ۴

درجه سلسیوس تا روز نهم توانستند مانع از رشد باکتری تا حد مجاز 10^{7} log cfu/ml شوند.

طبق نتایج به دست آمده از جدول ۲ غلظت ۰/۱۳۵ و ۰/٤۰۵ درصد اسانس در کنترل باکتری، تفاوت معنی‌دار آماری نداشتند ($p>0/05$) ولی با غلظت ۰/۰۰۵ درصد و گروه شاهد دارای تفاوت معنی‌دار بودند ($p<0/05$). بیشترین اثر سینرژیسم نیسین با اسانس در غلظت‌های ۰/٤۰۵ درصد اسانس با ۰/۷۵ میکروگرم بر لیتر نیسین مشاهده شد.

جدول ۲- لگاریتم تغییرات بار میکروبی (میانگین± انحراف معیار) در غلظت‌های مختلف نیسین و اسانس زیره سبز به تنهایی و توام در روزهای مختلف کشت در دمای ۴ درجه سلسیوس در فیله قزل آلای رنگین‌کمان

اسانس زیره سبز(درصد)	نیسین µg/ml	روز صفر	سوم	روز ششم	روز نهم	روز پانزدهم
۰	۰	۵/۵۲±۰/۲۲[a]	٤/۸±۰/۳۲ [a*]	٤/۱±۰/۲۵ [b]	۳/۷٤±۱/۲۲ [b]	۲/۲۲±۰/۲۱ [c]
۰	۰/۲۵	٤/۳۳±۰/۳۱ [b]	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 [b]	۳/۱۹±۱/۷۸ [d]	–
۰/۰۰۵	۰	٤±۰/۲۲ [b]	۳/۵۲±۰/۱۵ [b]	۳/۱۹±۰/۱٦ [d]	۲/۸۱±۰/۲۱ [d]	–
۰/۱۳۵	۰	۳/٤۵±۰/٤۸[b]	۳/۲۸±۰/۱۸ [b]	۲/۷۲±۰/۱۷ [c]	۲/۰٦±۰/۳۵ [ce]	–
۰/٤۰۵	۰	۳/۳۱±۰/۱۹ [b]	۳/۰٤±۰/۲٤ [c]	۲/٦۱±۰/۲۷ [c]	۲/۰٤±۰/۲٤ [ce]	–
۰/۰۰۵	۰/۲۵	۲/۳۰±۰/۲۵ [c]	۲/۹۳±۰/٤٤ [d]	۲/٤۹±۰/۱۳ [c]	–	–
۰/۱۳۵	۰/۲۵	۲/۹۱±۰/۳۱ [d]	۲/۸٦±۰/۲۱ [d]	۲/۰۸±۰/۲۹ [e]	–	–
۰/٤۰۵	۰/۲۵	۲/۸۸±۰/۱٦ [d]	–	–	–	–
۰/۰۰۵	۰/۷۵	۲/۸۹±۰/۳۱ [d]	۲/۲۲±۰/۳۵ [c]	–	–	–
۰/۱۳۵	۰/۷۵	۲/۷۹±۰/۲۹ [d]	۲/۰۰±۰/٦۸ [e]	–	–	–
۰/٤۰۵	۰/۷۵	۲/۵۱±۰/۳۲ [d]	–	–	–	–

*:حروف غیر مشابه در هر ستون نمایانگر معنی دار بودن تفوت بین میانگین ها می‌باشد($p<0/05$).

-: غیر قابل شمارش

در جدول ۳ نشان داده شده است که در دمای ۱۰ درجه سلسیوس (دمای نامناسب یخچالی) نیسین تا روز سوم توانست رشد باکتری را زیر حد مجاز نگه دارد اما از روز سوم به بعد نتوانست مانع رشد باکتری شود. غلظت ۰/۲۵ و ۰/۷۵ نیسین با گروه کنترل و با هم دارای تفاوت معنی‌دار آماری در کنترل رشد باکتری بودند ($p<0/05$). تاثیر اسانس زیره سبز در این دما نیز بیشتر از نگه‌دارنده طبیعی نیسین بود چراکه تا روز ششم (بالاترین غلظت اسانس) توانست رشد باکتری را در زیر حد مجاز نگه دارد. بیشترین اثر سینرژیسم نیسین با اسانس در غلظت‌های ۰/۱۳۵ و ۰/٤۰۵ درصد اسانس با ۰/۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد که دارای تفاوت معنی‌دار آماری نبودند ($p>0/05$).

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

سینرژیسم بین دو ترکیب بکار برده شده در دمای ٤ درجه سلسیوس، در غلظت ۰/۷۵ میکروگرم بر لیتر و ۰/٤۰۵ درصد اسانس بدست آمد، که در روز صفر توانست با ۲/۵۱ log cfu/ml در کاهش رشد باکتری مؤثر واقع شود.

جدول ۳- لگاریتم تغییرات بار میکروبی (میانگین± انحراف معیار) در غلظت‌های مختلف نیسین و اسانس زیره سبز به تنهایی و توام در روزهای مختلف کشت در دمای ۱۰ درجه سلسیوس در فیله قزل آلای رنگین‌کمان

اسانس زیره سبز(درصد)	نیسین µg/ml	روز صفر	روز سوم	روز ششم	روز نهم	روز پانزدهم
۰	۰	٦/٥٨±۰/۱۱ [a*]	٦/۹۳±۰/۱۱ [a]	–	–	–
۰	۰/۲۵	٦/۲۲±۰/۵۳ [a]	۵/٤۹±۰/۱٦ [b]	–	–	–
۰	۰/۷۵	۵/۳۱±۰/۲٤ [b]	٤/۷۳±۰/۹۰ [c]	–	–	–
۰/۰۰۵	۰	۵/۰۰±۰/۳۵ [b]	٤/۱۸±۰/۷۷ [d]	–	–	–
۰/۱۳۵	۰	۳/۸۲±۰/۱۲ [d]	۵/۰۰±۰/ ۹٤ [b]	–	–	–
۰/٤۰۵	۰	۳/۷۲±۰/۸۷ [d]	٤/۰۰±۰/۲۸ [e]	٦/٦۵±۰/۱۵ [a]	–	–
۰/۰۰۵	۰/۲۵	۲/۹۹±۰/۳۸ [d]	٤/۸٤±۰/۲۷ [d]	–	–	–
۰/۱۳۵	۰/۲۵	۲/٦۷±۰/٦۸ [d]	۳/۱٤±۰/۱۷ [d]	۵/۳۸±۰/٦۱ [b]	–	–
۰/٤۰۵	۰/۲۵	۲/۵۳±۰/۸٦ [d]	۳/۱۱±۰/۸۱ [d]	۵/۱٦±۰/٤٤ [b]	–	–
۰/۰۰۵	۰/۷۵	۲/٤۱±۰/٤٦ [d]	٤/٦۳±۰/۱۱ [c]	٦/۰۰±۰/۲۳ [a]	–	–
۰/۱۳۵	۰/۷۵	۲/۳۸±۰/۵۸ [d]	۳/۳۰±۰/۸۰ [d]	٤/۲۳±۰/۳۰ [e]	–	–
۰/٤۰۵	۰/۷۵	۲/۲۳±۰/۱٤ [f]	۲/۱٦±۰/٤۵ [f]	٤/۱۹±۰/۱۱ [e]	–	–

*حروف غیر مشابه در هر ستون نمایانگر معنی دار بودن میانگین ها می باشد. – غیر قابل شمارش

بحث و نتیجه‌گیری

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

همانطور که نتایج نشان دادند، در دمای ٤ و ۱۰ درجه سلسیوس اسانس زیره سبز و نیسین به صورت توام توانستند تأثیر بیشتری در ممانعت رشد باکتری نسبت به گروه کنترل و به تنهایی شوند که اسانس زیره مؤثرتر از نیسین عمل کرد. در دمای ٤ درجه سلسیوس غلظت ۰/۷۵ میکروگرم بر میلی لیتر با ۰/٤۰۵ درصد اسانس از روز صفر به بعد توانست مانع رشد باکتری شود (log ۲/۵۱cfu/ml). اما در دمای ۱۰ درجه سلسیوس ترکیب غلظت‌های فوق تا روز ششم توانست رشد باکتری را به تأخیر بیندازد.

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

روی *استافیلوکوکوس اورئوس* توسط (Choobkar et al., 2012) مورد مطالعه قرار گرفت. آنها به این نتیجه رسیدند که غلظت‌های بالای اسانس آویشن و نیسین در کنترل باکتری فوق می‌توانند مؤثر واقع شوند. Roomiani (2012) تاثیر اسانس رزماری و نیسین را بر رفتار رشد باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* بررسی کرد و به این نتیجه رسید که در دمای ٤ درجه سلسیوس رشد باکتری در غلظت‌های مختلف نیسین و رزماری به تنهایی تا روز نهم و در ترکیب با هم تا روز سوم به تأخیر افتاد. در دمای ۸ درجه سلسیوس در تمام غلظت‌های نیسین و رزماری از روز سوم به بعد نگه‌دارنده‌ها نتوانستند مانع رشد باکتری شوند.

غلظت‌های مختلف رزماری و نیسین برای کنترل رشد باکتری مورد نظر در هر دو دما با گروه شاهد دارای اختلاف معنی‌دار آماری بودند ($p<۰/۰۵$)، اما غلظت‌های بالای اسانس رزماری (۰/۱۳۵ و ۰/٤۰۵ درصد) تفاوت معنی‌دار نشان ندادند ($p>۰/۰۵$).

Mahmoodi در سال ۲۰۱۲ تأثیر اسانس آویشن شیرازی در غلظت‌های ۰، ۰/۰۰۵، ۰/۰۱۵، ۰/۰٤۵، ۰/۱۳۵، ۰/٤۰۵ درصد و نیسین در غلظت‌های ۰، ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به تنهایی و به صورت ترکیبی با هم در مدل غذایی فیله قزل‌آلای رنگین کمان علیه *Lactococcus garvieae* در یک دوره ۹ روزه را مورد مطالعه قرار داد. نتایج حاصله نشان داد که نیسین در هر سه غلظت مورد اشاره علیه این باکتری مؤثر بوده است به طوریکه با توجه به آزمون t در غلظت ۰/۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر این اثرگذاری به میزان ٦۵/۷۷ درصد بیشترین تأثیر بر روی رشد باکتری داشته است. این تأثیر در دمای ٤ درجه سلسیوس بیشتر از دمای ۸ درجه سلسیوس بود. به لحاظ اثر گذاری آویشن بر روی رشد لاکتوکوکوس گارویه در تمامی غلظت‌های مورد نظر مورد تأیید واقع گردیده است اما با توجه به آزمون t در غلظت ۰/٤۰۵ درصد این اثرگذاری به میزان ۷۱/۹۱ درصد بیشترین اثرگذاری را بر رشد باکتری‌ها به همراه داشته است. هنگامی‌که نیسین و اسانس آویشن به صورت ترکیبی استفاده شدند نتایج حاصله نشان داد که استفاده توام به صورت غلظت ۰/٤۰۵ درصد آویشن و ۰/۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نیسین به میزان ۱٤/٦۲ درصد دارای بیشترین اثر علیه *Lactococcus garvieae* بوده است.

تفاوت‌های موجود با بررسی حاضر می تواند به علت اختلاف در اسانس بکار گرفته شده باشد. اختلاف در ترکیبات روغن‌های فرار گیاهان می‌تواند مربوط به تغییرات فصلی و دوره رویشی گیاه باشد. ضمن اینکه فاکتورهای محیط زیستی مانند دما، شرایط جغرافیایی، طول مدت روز، مواد مغذی در دسترس گیاه می‌توانند نقش کلیدی در ترکیبات اسانس داشته باشند. از طرفی نیسین و اسانس می‌توانند روی غشای سیتوپلاسم باکتری اثر بگذارند و در نهایت موجب افزایش تخریب ساختاری و عملکردی غشای باکتری‌ها شوند؛ اما نیسین در عملکرد با اسانس‌ها و شرایط محیط زیستی مختلف متفاوت عمل می‌کند (Guo et al., 2012).

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

بازدارندگی اسانس و در ترکیب با نیسین در دمای ٤ درجه سلسیوس مشاهده شد.

رشد باکتری *ویبریو پاراهمولا یتیکوس* در ۸ درجه سلسیوس (گروه کنترل) در روز اول کشت متوقف گردید و به زیر log cfu/ml ۲ رسید. بهترین اثر بازدارندگی اسانس در ترکیب با نیسین برای باکتری *ویبریو پاراهمولا یتیکوس* در غلظت ۰/٤۰۵ درصد اسانس و ۰/۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نیسین (مشابه با مطالعه حاضر) و برای *لیستریا مونوسیتوژنز* ۰/٤۰۵ درصد اسانس و ۰/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نیسین حاصل شد. نتایج مطالعه ثابت کرد که دما نقش مهمی در کنترل باکتری تحت تاثیر نگه‌دارنده‌های طبیعی ایفا می‌کند.

تاریخ مصرف محصولات شیلاتی یا ماندگاری آنها در یخ یا دمای یخچالی ٤ درجه سلسیوس، ٤ تا ۹ روز اعلام شده است. ثابت شده است که تیمار با اسانس‌های گیاهی در ترکیب با دمای یخچالی روش مؤثری برای افزایش تاریخ مصرف غذا است. مدل‌های ریاضی برای پیشگویی عوامل بیماری‌زای منتقله از طریق غذا در محیط آزمایشگاه (براث) نسبت به مدل‌های غذایی قابلیت پاسخگویی بیشتر و بهتری دارد؛ چون شمارش عوامل بیماری‌زا در غذا با میکروفلور طبیعی موجود در آن مشکل است. هر چند مدل‌های پیشرفته در محیط‌های براث استریل شده همیشه از پیشگویی‌های قابل اعتمادی در مورد رشد میکروارگانیسم‌ها در غذاهای استریل نشده و غیریکنواخت برخوردار نیستند (Roomiani, 2012).

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

سپاسگزاری

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

منابع

- چوبکار، نسرین.، آخوندزاده بستی، افشین.، ساری، عباسعلی.، گندمی، حسن. و امامی راد، امیر (۱۳۹۱). بررسی تأثیر اسانس آویشن شیرازی و نیسین بر کنترل کیفیت فیله‌های سبک شور ماهی کپور نقره‌ای. فصلنامه گیاهان دارویی. سال یازدهم، دوره دوم، شماره۹، صفحه ۲۱۵-۲۰۵.
- رومیانی، لاله (۱۳۹۱). مطالعه تأثیر اسانس رزماری و نیسین بر رفتار رشد باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* در شرایط آزمایشگاهی و بر روی فیله ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). پایان‌نامه دکتری شیلات. دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، صفحه ۱٦۰.

- فضل آرا، علی.، صادقی، احسان. و رستمی سلیمانی، پگاه (۱۳۹۱). مطالعه تأثیر اسانس گیاه زیره سبز بر باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* در پنیر سفید ایرانی. فصلنامه علوم و صنایع غذایی. شماره ۳۵، دوره نهم، صفحه ٤٤-۳۵.
- محمودی، آزاده (۱۳۹۱). مطالعه تأثیر آویشن شیرازی و نیسین بر رفتار رشد *لاکتوکوکوس گارویه* روی فیله ماهی قـزل آلای رنگین کمان. پایان‌نامه دکتری شیلات. دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، صفحه۱۱۷.

- Bowker, J.D., Ostland, V.E., Carty, D. and Bowman, M.P. (2010). Effectiveness of aquaflor (50% Florfenicol) to control mortality associated with *Streptococcus iniae* in freshwater-Reared Sub adult Sunshine Bass. Journal of aquatic animal health, 22(4): 254–265.
- Buchanan, J.T., K.M., Colvin, M.R., Vicknair, S.K., Patel, A., Timmer, M. and Nizet, V. (2008). Strain-associated virulence factors of *Streptococcus iniae* in hybrid-striped bass. Journal of veterinary microbiology, 131(1-2): 145–153.
- Choobkar, N., Akhondzadeh Basti, A., Sari, A., Gandomi, H. and Emami, A. (2012). Effect of Zataria multiflora essential oil and nisin on the quality control of *Staphylococcus aureus* in the light salted fillets of Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). Journal of medicine plants, 2(2): 205-215[In Farsi].
- Costa, G., Danz, H., Kataria, P. and Bromage, E. (2012). A holistic view of the dynamisms of teleost IgM: A case study of *Streptococcus iniae* vaccinated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of developmental and comparative immunology, 36: 298–305.
- Ekhtiarzadeh, H., Akhondzadeh Basti, A., Misaghi, A., Sari, A., Khanjari, A., Rokni, N., Abbaszadeh, S. and Partovi, R. (2012). Growth response of *Vibrio parahemolyticus* and *Listeria monocytogenes* in salted fish fillets as affected by *Zataria multiflora* Boiss. Essential oil, nisin and their combination. Journal of food safety, 32(3): 263-269.
- FAO. (2012). The state of world fisheries and aquaculture. www. FAO.org.
- Fazlara, A., Sadeghi, E. and Rostami Soleimani, P. (2012). Study on the antibacterial effects of *Cuminum cyminum* essential oil on *Listeria monocytogenes* in Iranian white cheese. Journal of food science and technology, 35(9): 35-44[In Farsi].
- Gachkar, L., Yadegari, D., Rezaei, M.B., Taghizadeh, M., Alipoor Astaneh, Sh. and Rasooli, I. (2007). Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. Journal of food chemistry, 102(3): 898–904.
- Guo, J.J., Kuo, C.M., Chuang, Y.C., Hong, J.W., Chou, R.L. and Chen, T.I., (2012). The effects of garlic-supplemented diets on antibacterial activity against *Streptococcus iniae* and on growth in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. Journal of aquaculture, 364-365: 33-38.
- Hadad Kashani, H., Nikzad, H., Mobaseri, S. and Hoseini, E.S. (2012). Synergism effect of nisin peptide in reducing chemical preservatives in food industry. Journal of life science, 9(1): 496-501.
- Hyldgaard, M., Mygind, T. and Meyer, R.L. (2012). Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies and interactions with food matrix components. Journal of frontiers in microbiology, 3(2): 24.
- Lis-Balchin, M., Deans, S.G. and Eaglesham, E. (1998). Relationship between bioactivity and chemical composition of commercial essential oils. Journal of flavor and fragrance, 13(2): 98-104.
- Martin, R.E., Carter, E.P., Jr, G.J.F. and Davis, L.M. (2000). Marine and fresh water products handbook. Technomic Publishing Company, Inc, pp. 983.
- Mahmoodi, A. (2012). A study on the effect of *Zataria multiflora* Bioss essential oil and Nisin on the growth of *Lactococcus garvieae* in the rainbow trout fillet (*Oncorhynchus mykiss*). A thesis submitted to the graduate studies office in the degree of *Ph.D* in fisheries science. Islamic azad university, science and research branch, pp. 117[In Farsi].
- Moosavy, M.H., Akhondzadeh Basti, A., Misaghi, A., Zahraei Salehi, T., Abbasifar, R., Ebrahimzadeh Mousavi, H.A., 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. Journal of food research international, 41(10): 1050 – 1057.

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