"Research article" DOI: 10.30495/JFH.2022.1944454.1332

Antimicrobial effect of nisin and garlic alcoholic extract on *Staphylococcus aureus* ATCC 1113 inoculated in Tilapia minced meat at 4 °C

Pishadast S.[1], Rahnama M.[2], Alipuor Eskandani M.[3*], Saadati D.[4], Noori Jangi A.[5] Heidarzadi, M.[6]

1. Graduated of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran
2. Associate Professor, Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran
3. Associate Professor, Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran
4. Associate Professor, Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran
5. MSc Graduate of Fisheries Products Processing, Zahak fisheries office, Zahak, Iran
6. MSc Graduate of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran

[*]Corresponding author: Eskandani@live.com
(Received: 2021/10/7 Accepted: 2022/2/20)

Abstract

Staphylococcus aureus causes food poisoning and various infections in humans. Therefore, it is a serious threat to the food industry. This study was conducted to evaluate the antibacterial effect of alcoholic extract of garlic (*Allium sativum*) alone and in combination with nisin on inhibition of *S. aureus* in minced meat of the tilapia fish. Garlic Extract was prepared by a vacuum evaporation method using the rotary device. The effects of different concentrations of garlic alcoholic extract (0, 1, 2.5, 3.5, 5%) and nisin (0, 0.5 and 2.5 µg/g) and the combinations of nisin (micrograms per gram) and Extract (%) (0.25+3.5), (0.25+5), (0.5+1), (0.5+2.5), (2.5+1), (2.5+2.5) were studied on the growth of the *S. aureus* at 4 ° C for 21 days. The results showed that the bacterial growth was stopped at 3.5% and 5% concentrations of garlic extract on days 12 and 9, respectively. It was stopped at 0.5, and 2.5 µg/g of nisin on days 9 and 6, respectively. Low concentrations of garlic extract (1 and 2.5%) did not inhibit the growth of bacteria. Combined treatments of extract and nisin stopped bacterial growth from day 6 onwards. Garlic extract and nisin had an inhibitory effect on the growth of S. aureus and could be introduced as a natural preservative in food. It was concluded that a combination of nisin and garlic alcoholic extract has a synergistic effect on the inhibition of *S. aureus*.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: *Tilapia fish, Staphylococcus aureus, Garlic, Nisin, Alcohol extract*

«مقاله پژوهشی» DOI:10.30495/JFH.2022.1944454.1332

مطالعه اثر ضدمیکروبی نیسین و عصاره الکلی سیر بر *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 1113 تلقیح شده در فیله چرخ شده ماهی تیلاپیا در ٤ درجه سلسیوس

سارا پیشادست[۱]، محمد رهنما[۲]، مجید علیپور اسکندانی[۳*]، داریوش سعادتی[٤]، افسانه نوری جنگی[٥]

محمدامین حیدرزادی[٦]

۱. دانش‌آموخته دکتری حرفه‌ای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

۲. دانشیار گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

۳. دانشیار گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

٤. دانشیار گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

٥. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد فراوری محصولات شیلاتی، اداره شیلات شهرستان زهک، زهک، ایران

٦. دانش‌آموخته بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

*نویسنده مسئول مکاتبات: Eskandani@live.com

(دریافت مقاله: ۱٤۰۰/۸/۱۹ پذیرش نهایی: ۱٤۰۰/۱۲/۱)

چکیده

استافیلوکوکوس اورئوس علاوه بر مسمومیت غذایی عامل ایجاد بسیاری از عفونت‌ها در انسان است و برای صنعت غذایی خطری جدی محسوب می‌شود. این مطالعه به‌منظور ارزیابی عصاره الکلی سیر (*Allium sativum*) و اثرات ضدباکتریایی آن در مهار باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌تنهایی و توأم با نیسین در گوشت چرخ شده ماهی تیلاپیا انجام گردید. استخراج عصاره الکلی سیر با روش تبخیر در خلأ و توسط دستگاه روتاری صورت پذیرفت. اثر غلظت‌های مختلف عصاره الکلی سیر (۰، ۱، ۲/۵، ۳/۵، ۵ درصد) و نیسین (۰، ۰/۵، ۲/۵ میکروگرم برگرم) و ترکیب مقادیر مختلف نیسین (میکروگرم برگرم) و عصاره (درصد) (۳/۵+۰/۲۵)، (۵+۰/۲۵)، (۱+۰/۵)، (۲/۵+۰/۵)، (۱+۲/۵)، (۲/۵+۲/۵) بر رفتار رشد باکتری مذکور در دمای ٤ درجه سلسیوس طی ۲۱ روز بررسی گردید. نتایج نشان داد که رشد باکتری در غلظت‌های ۳/۵ و ۵ درصد عصاره سیر به‌ترتیب از روزهای ۱۲ و ۹ به بعد و نیسین ۰/۵، ۲/۵ به‌ترتیب از روزهای ۹ و ٦ به بعد متوقف شد. غلظت‌های پایین عصاره سیر (۱ و ۲/۵ درصد) باکتری را مهار نکرد. تیمارهای ترکیبی عصاره به‌همراه نیسین توانستند از روز ٦ به بعد رشد باکتری را متوقف نمایند. با توجه به یافته‌های این تحقیق می‌توان گفت عصاره سیر و باکتریوسین نیسین به‌تنهایی دارای خاصیت مهارکنندگی بوده و به‌عنوان یک نگه‌دارنده طبیعی مواد غذایی معرفی می‌شوند. به‌کارگیری توأم این ترکیبات اثرات سینرژیست آن‌ها را در کنار هم به اثبات رساند.

واژه‌های کلیدی: ماهی تیلاپیا، استافیلوکوکوس اورئوس، سیر، نیسین، عصاره الکلی

مقدمه

فساد مواد غذایی در سراسر جهان از جدی‌ترین و پرهزینه‌ترین نگرانی‌ها برای سلامت عمومی می‌باشد (Abdollahzadeh *et al.*, 2014). با توجه به رویکرد مردم به مصرف محصولات غذایی فاقد مواد نگهدارنده و یا دارای مواد نگهدارنده طبیعی، امروزه استفاده از عصاره‌های گیاهی به عنوان نگهدارنده مواد غذایی به جای مواد شیمیایی رونق یافته است. با توجه به‌ضرورت به‌کارگیری مواد نگه‌دارنده سالم و بی‌خطر برای مصرف‌کنندگان و از طرفی فسادپذیری بالای برخی فرآورده‌های غذایی نظیر گوشت ماهی، یافتن مواد نگه‌دارنده‌ی مفید برای کاهش بار میکروبی و به تعویق انداختن فساد در این‌گونه فراورده‌ها، یکی از ضرورت‌های امروزی، به جهت ارتقاء سطح بهداشت مواد غذایی در جوامع محسوب می‌شود (Chobkar *et al*, 2009).

استافیلوکوکوس ارئوس یک باکتری گرم مثبت، کاتالاز مثبت، فاقد اسپور، فاقد کپسول و به‌صورت سلول‌های کروی بوده که معمولاً خوشه‌های نامنظمی شبیه به انگور تشکیل می‌دهد. این باکتری به‌راحتی روی انواع محیط‌های کشت رشد کرده و کربوهیدرات‌ها را تخمیر می‌کند، انواع بیماری‌زای آن کواگولاز مثبت می‌باشند (Normanno *et al.*, 2005; Jay 2000). *استافیلوکوکوس ارئوس* مواد خارج سلولی تولید می‌کند که از میان آن‌ها انتروتوکسین‌ها عامل بروز علائم مسمومیت غذایی استافیلوکوکی هستند (Levinson and Jawetz, 2000).

نیسین یک آنتی‌بیوتیک پلی پپتیدی (polypeptide) است که به‌عنوان نگه‌دارنده مواد غذایی کاربرد دارد. مطالعات مروری متعددی با پوشش جنبه های عملی و شیمیایی نیسین منتشرشده‌اند (Hurst, 1981). نیسین حاوی ۳٤ اسیدآمینه است و به‌وسیله سویه های معینی از *لاکتوکوکوس لاکتیس* (*Lactococcus lactis*) تولید می‌شود (Mulders *et al.*, 1991). نیسین روی باکتری‌های گرم مثبت بیماری‌زا و فسادزای غذایی به‌خصوص باکتری‌های اسیدلاکتیک که از مهم‌ترین عوامل فساد در محصولات گوشتی پخته، وکیوم شده و یا MAP (Modified atmosphere packaging) هستند اثر مهاری دارد ولی بر رشد باکتری‌های گرم منفی، کپک‌ها و مخمرها تأثیری ندارد (Holley, 1997: Samelis *et al.*, 2000; Véronique, 2008; Thomas *et al.*, 2000).

مهم‌ترین علت استفاده از نیسین به‌عنوان نگه‌دارنده طبیعی این است که این ماده کاملاً بی‌ضرر است، توسط پروتئازهای دستگاه گوارش به اسیدهای آمینه تشکیل‌دهنده آن تجزیه می‌شود و تغییری در خواص ارگانولپتیک (organoleptic) مواد غذایی ایجاد نمی‌کند (Guerra *et al.*, 2007). نگرانی‌های مربوط به استفاده از مواد غذایی ناسالم سبب شده است که عصاره‌های استخراج‌شده از گیاهان به دلیل داشتن ترکیبات پلی فنولیک، به‌جای ضدمیکروب‌های سنتتیک موردتوجه قرار گیرند (Gómez-Guillén *et al.*, 2009).

ماهی تیلاپیا ازجمله آبزیانی است که به دلیل سهولت در تکثیر و پرورش و همچنان بازارپسندی مطلوب، در سراسر دنیا طرفداران زیادی دارد. این ماهی به دلیل تحمل شرایط نامساعد محیطی، مانند دما، شوری، pH، قدرت

تولیدمثل بالا و دسترسی آسان به منابع غذایی و همچنین به‌عنوان تأمین‌کننده بخشی از نیازهای غذایی انسان، شناخته می‌شود (El_Sayed, 2000).

سیر (*Allium sativum*) از دسته سبزی‌های پیازی است و گیاهی است متعلق به خانواده لیلیاسه (liliaceae) که بومی آسیای میانه می‌باشد و ازلحاظ غذایی و دارویی اهمیت زیادی دارد؛ سیر دارای ترکیبات آلی گوگرددار است که بسیار واکنش‌پذیرند و خاصیت ضد میکروبی وسیع بر روی باکتری‌ها حتی در غلظت‌های بسیار پایین دارند. آلیسین یا دی آلیل دی سولفید اکسید مهم‌ترین ترکیب گوگردی سیر با فعالیت ضد میکروبی است (Sivam *et al.*, 1997; Baghalian *et al.*,2002). ترکیبات سولفوره‌دار سیر هم مسئول بوی تند آن و هم مسئول اثرات دارویی آن می‌باشند. پودر سیر حدوداً حاوی یک درصد آلسین است (Amagase *et al.*, 2001). هدف از مطالعه حاضر تعیین تاثیر عصاره الکلی سیر و نیسین به تنهایی و توامان بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در گوشت چرخ شده ماهی تیلاپیا می‌باشد.

مواد و روش‌ها

-تهیه عصاره

گیاه سیر از پژوهشکده کشاورزی دانشگاه زابل تهیه شد. سپس قطعه‌قطعه و خشک گردید و جهت تهیه عصاره الکلی سیر میزان ۲۰ گرم از گیاه پودر شده با ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درصد مخلوط گردید و به مدت ۷۲ ساعت مداوم هم زده شد و سپس توسط کاغذ واتمن صاف گردید. خارج کردن اتانول از محلول عصاره با روش تبخیر در خلأ و توسط دستگاه روتاری صورت پذیرفت. جهت اطمینان از استریل بودن عصاره، عصاره در محیط کشت مولر هینتون آگار (مرک آلمان) کشت داده شد و عدم رشد میکروارگانیسم نشان‌دهنده استریل و مورد تأیید بودن عصاره اتانولی سیر بود (Alizadeh Behbahani *et al.*, 2013).

-آماده‌سازی و محاسبه میزان تلقیح باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*

کشت لیوفلیزه *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 1113 تهیه‌شده از بخش بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه زابل جهت این بررسی مورداستفاده قرار گرفت. در ابتدا این کشت لیوفلیزه در محیط براث BHI(Merck, Germany) در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۱۸ ساعت، دومرتبه به‌طور متوالی تجدید کشت گردید. سپس کشت دوم به میزان پنج به یک با گلیسرین استریل مخلوط شد و در قسمت‌های مساوی در لوله‌های میکروسانتریفیوژ اپندورف استریل در ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. در ادامه، باکتری نگهداری شده در لوله‌های اپندورف دو بار متوالی در محیط آبگوشت BHI به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس تجدید کشت شد و به‌منظور محاسبه میزان باکتری لازم (۱×۱۰^{۳} CFU/g) جهت تلقیح در گوشت چرخ شده ماهی از دستگاه اسپکتروفتومتر (Pharmacia, England) در طول‌موج ۶۰۰ نانومتر با استفاده از منحنی استاندارد و به دست آوردن فاز

سکون رشد باکتری از طریق شمارش باکتریایی به کمک کشت سطحی، استفاده گردید (Basti *et al*., 2007).

-تهیه ماهی و تیمارها

یک کیلوگرم فیله ماهی تیلاپیا خریداری گردید و جهت استریل سازی، فیله‌ها به سازمان انرژی اتمی ایران ارسال و با اشعه گاما با دوز ۱۰ کیلوگری استریل گردید (J, 1993). جهت اطمینان از استریل بودن نمونه‌ها از روش کشت سطحی و محیط BHI(Merck, Germany) استفاده شد. فیله‌ها در شرایط استریل چرخ شد و در وزن ٤٠ گرم در داخل کیسه‌های استریل استومیکر توزیع شد. برای بررسی نمونه‌ها ازنظر میزان باکتری زنده از روش رقت‌سازی دهدهی و آزمون کشت سطحی بهره گرفته شد. ازاین‌رو هرکدام از ۱۳ تیمار مورد آزمایش،٤٠ گرم گوشت داخل کیسه‌های استومیکر به همراه غلظت‌های موردنظر عصاره الکلی سیر (۰، ۱، ۲٫۵، ۳٫۵، ۵) و نیسین (۰، ۰٫۵، ۲٫۵) و دوز تعیین‌شده باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (1×10^3CFU/g)، در شرایط کاملاً استریل توسط دستگاه استومیکر (Interscience, France) به مدت ۲ دقیقه در دمای اتاق به‌منظور توزیع یکنواخت عصاره، نیسین و باکتری در گوشت، کاملاً هموژن گردید (nouri Oroojalian *et al*., 2009; *et al*.,2011). از گوشت تلقیح شده برای تهیه همه تیمارهای مورد آزمایش استفاده شد.

تیمارهای این تحقیق شامل شاهد (گوشت چرخ شده)، گوشت تلقیح شده با نیسین (µg/g) و عصاره (درصد)، (۰+۰)، (۰+۱)، (۰+۲٫۵)، (۰+۳٫۵)، (۰+۵)، (۰٫۲۵+۳٫۵)، (۰٫۲۵+۵)، (۰٫۵+۰)، (۰٫۵+۱)، (۰٫۵+۲٫۵)، (۲٫۵+۰)، (۲٫۵+۱)، (۲٫۵+۲٫۵) می‌باشد. برای هر تیمار سه نمونه مورد آزمایش قرار گرفت. همه تیمارها در کیسه‌ها در طول دوره‌ی آزمایش در یخچال و دمای ٤ درجه سلسیوس نگهداری شدند و شمارش باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در روزهای ۰، ۱، ۳، ٦، ۹، ۱۲،۱۵، ۱۸ و ۲۱ صورت گرفت.

-تجزیه‌وتحلیل آماری

به جهت آنکه رشد باکتری‌ها در طی زمان به‌صورت تصاعدی و نمایی (Exponential growth) است؛ لذا برای نرمال کردن داده‌ها، از لگاریتم تعداد باکتری استفاده شد. برای مقایسه تیمارهای مختلف از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (One way Anova) و آزمون تکمیلی Tukey استفاده شد. تغییرات تعداد باکتری در طی مدت‌زمان آزمایش با استفاده از آزمون آماری آنالیز واریانس با اندازه گیری های مکرر (Repeated Measures) بررسی شد. تجزیه‌وتحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۳ و نرم افزار GraphPad Prism نسخه ۹ انجام شد. سطح معنی‌داری $P<0/05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج جدول (۱) نشان می‌دهد که لگاریتم تعداد سلول‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* تحت تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره سیر در گوشت چرخ شده ماهی تیلاپیا در روز صفر 1×10^3 CFU/g بود که با گذر زمان تعداد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در گروه شاهد افزایش یافت.

جدول (۱)- میانگین و انحراف معیار(Mean±SD) لگاریتم تعداد باکتری در گوشت چرخ شده ماهی با غلظت‌های مختلف عصاره سیر در طی مدت آزمایش.

مقدار عصاره (٪)	مدت زمان نگهداری (روز)								
	۰	۱	۳	٦	۹	۱۲	۱۵	۱۸	۲۱
۰	۳/۰±۰ ^{A}	۳٫۲۸±۰٫۰۱ ^{dB}	۵٫٦۳±۰٫۰۱ ^{eC}	٦٫۳٦±۰٫۰۱ ^{dD}	٦٫٤٦±۰٫۰۱ ^{dE}	٦٫۵۰±۰٫۰۱ ^{cE}	۷٫٦۱±۰٫۰۱ ^{dF}	۷٫۷۵±۰٫۰۱ ^{dG}	۷٫۷۸±۰٫۰۱ ^{dG}
۱	۳/۰±۰A	۳٫۲۱±۰٫۰۱ ^{cB}	۵٫٤۵±۰٫۰۱ ^{d}C	٦٫۳۸±۰٫۰۱ ^{dD}	٦٫٤٤±۰٫۰۱ ^{dDE}	٦٫۵۰±۰٫۰۰ ^{cE}	۷٫۵۳±۰٫۰۲ ^{cF}	۷٫٦۲±۰٫۰۱ ^{cF}	۷٫۷۱±۰٫۰۱ ^{cG}
۲٫۵	۳/۰±۰ ^{A}	۳٫۱۸±۰٫۰۰۵ ^{bB}	٤٫۷٦±۰٫۰۱ ^{cC}	۵٫۹۵±۰٫۰۲ ^{cD}	٦٫۳۳±۰٫۰۱ ^{cE}	٦٫۳۸±۰٫۰۱ ^{bE}	۷٫٤۸±۰٫۰۱ ^{bF}	۷٫۵۳±۰٫۰۱ ^{bG}	۷٫٦۱±۰٫۰۱ ^{bH}
۳٫۵	۳/۰±۰ ^{B}	۳٫۱۸±۰٫۰۱ ^{bC}	٤٫۰٦±۰٫۰۱ ^{bE}	۳/۹۹±۰٫۰۱ ^{bD}	۳/۰۰±۰٫۰۱ ^{bB}	۰±۰ ^{aA}	۰±۰ ^{aA}	۰±۰ ^{aA}	۰±۰ ^{aA}
۵	۳/۰±۰ ^{B}	۳٫۱۰±۰/۰۱ ^{aC}	۳٫۳۷±۰٫۰۱ ^{aE}	۳٫۳۰±۰٫۰۲ ^{aD}	۰±۰ ^{aA}	۰±۰ ^{aA}	۰±۰ ^{aA}	۰±۰ ^{aA}	۰±۰ ^{aA}

a,b,c: در هر ستون حروف کوچک انگلیسی نامتشابه اختلاف آماری معنی‌دار را بین تیمارها نشان می‌دهد.

A,B,C: در هر ردیف حروف بزرگ انگلیسی نامتشابه اختلاف آماری معنی‌دار را بین زمان ها نشان می‌دهد (P<۰٫۰۰۱).

آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه نشـــان داد که از روز ۱ تـا روز ۲۱، میـانگین لگاریتم تعداد باکتری در بین تیمارهای حاوی عصـــاره ســـیر، تفاوت آماری معنی‌داری دارد.

غلظت ۳٫۵ درصد عصاره سیر از روز دوازدهم و غلظت ۰٫۵٪ آن از روز نهم نگهداری تا روز آخر به‌طور کامل رشـد باکتری را متوقف نمود.

همچنین آزمون آمـاری آنـالیز واریانس با اندازه‌گیری های مکرر نشـــان داد کـه میـانگین لگاریتم تعداد باکتری‌ها در تیمـارهای حاوی عصـــاره ســـیر در طول مدت آزمایش تغییرات معنی‌داری دارد.

جدول (۲) میانگین لگاریتم تعداد باکتری در طول مدت آزمایش در تیمارهایی که فقط حاوی نیسین بودند را نشان می دهد.

جدول (۲)- میانگین و انحراف معیار (Mean±SD) لگاریتم تعداد باکتری در گوشت چرخ شده ماهی با غلظت‌های مختلف نیسین در طی مدت آزمایش

مقدارنیسین (µg/g)	مدت زمان نگهداری (روز)								
	۰	۱	۳	٦	۹	۱۲	۱۵	۱۸	۲۱
۰	۳/۰±۰ ^{A}	۳٫۲۸±۰٫۰۱ ^{cB}	۵٫٦۳±۰٫۰۱ ^{cC}	٦٫۳٦±۰٫۰۱ ^{cD}	٦٫٤٦±۰٫۰۱ ^{bE}	٦٫۵۰±۰٫۰۱ ^{bE}	۷٫٦۱±۰٫۰۱ ^{bF}	۷٫۷۵±۰٫۰۱ ^{bG}	۷٫۷۸±۰٫۰۱ ^{bG}
۰٫۵	۳/۰±۰ ^{CD}	۳٫۰۵±۰٫۰۱ ^{bD}	۳٫۸۰±۰٫۰۲ ^{bE}	۲٫۲۹±۰٫۰۱ ^{bB}	۰±۰ ^{aA}	۰±۰ ^{aA}	۰±۰ ^{aA}	۰±۰ ^{aA}	۰±۰ ^{aA}
۲٫۵	۳/۰±۰ ^{D}	۲٫۹۰±۰٫۰۲ ^{aC}	۲٫۸۳±۰٫۰۱ ^{aB}	۰±۰ ^{aA}	۰±۰ ^{aA}	۰±۰ ^{aA}	۰±۰ ^{aA}	۰±۰ ^{aA}	۰±۰ ^{aA}

a,b,c: در هر ستون حروف کوچک انگلیسی نا متشابه اختلاف آماری معنی‌دار را بین تیمارها نشان می‌دهد.

A,B,C: در هر ردیف حروف بزرگ انگلیسی نا متشابه اختلاف آماری معنی‌دار را بین زمان ها نشان می‌دهد (P<۰/۰۰۱).

آزمون آماری نشان داد که از روز ۱ تا ۲۱، میانگین لگاریتم تعداد باکتری در بین تیمارهای حاوی نیسین، تفاوت آماری معنی‌داری دارد.

نتایج جدول شماره (۲) نشان می‌دهد که میانگین تعداد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در گوشت چرخ شده ماهی تیلاپیا در روز صفر 1×10^3 CFU/g بود. با گذر زمان تعداد باکتری در نمونه شاهد فاقد نیسین افزایش رشد داشتند. در روز اول نگهداری تعداد باکتری‌های تیمارهای حاوی نیسین نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری داشت. تیمارهای ۰٫۵ و ۲٫۵ میکروگرم بر گرم نیسین به ترتیب از روز نهم و ششم تا آخرین روز دوره نگهداری رشد باکتری را به‌طور کامل متوقف نمودند.

همچنین آزمون آماری آنالیز واریانس با اندازه‌گیری‌های مکرر نشان داد که میانگین لگاریتم تعداد باکتری‌ها در تیمارهای حاوی نیسین در طول مدت آزمایش تغییرات معنی‌داری دارد.

جدول (۳)- میانگین و انحراف معیار (Mean±SD) لگاریتم تعداد باکتری در گوشت چرخ شده ماهی با غلظت‌های مختلف عصاره سیر و نیسین در طی مدت آزمایش

مقدار نیسین	مقدار عصاره	مدت زمان نگهداری (روز)								
(µg/g)	(درصد)	۰	۱	۳	٦	۹	۱۲	۱۵	۱۸	۲۱
۰	۰	۳/۰±۰^{A}	۳٫۲۸±۰٫۰۱^{eB}	۵٫۶۳±۰٫۰۱^{gC}	٦٫۳٦±۰٫۰۱^{cD}	٦٫٤٦±۰٫۰۱^{bE}	٦٫۵۰±۰٫۰۱^{bE}	۷٫٦۱±۰٫۰۱^{bF}	۷٫۷۵±۰٫۰۱^{bG}	۷٫۷۸±۰٫۰۱^{bG}
۰٫۲۵	۳٫۵	۳/۰±۰^{D}	۲٫۷٤±۰٫۰۱^{bC}	۲٫٤۸±۰٫۰۱^{bB}	۰±۰^{aA}	۰±۰^{a}A	۰±۰^{aA}	۰±۰^{aA}	۰±۰^{aA}	۰±۰^{aA}
	۵	۳/۰±۰^{D}	۲٫۳۱±۰٫۰۱^{aC}	۲٫۲۹±۰٫۰۱^{aB}	۰±۰^{aA}	۰±۰^{a}A	۰±۰^{aA}	۰±۰^{aA}	۰±۰^{aA}	۰±۰^{aA}
۰٫۵	۱	۳/۰±۰^{B}	۳٫۰۷±۰٫۰۱^{dC}	۳٫٦٤±۰٫۰۱^{fE}	۳٫۲۹±۰٫۰۱^{bD}	۰±۰^{aA}	۰±۰^{aA}	۰±۰^{aA}	۰±۰^{aA}	۰±۰^{aA}
	۲٫۵	۳/۰±۰^{B}	۳/۰۵±۰٫۰۱^{dB}	۲/۹۸±۰٫۰۱^{eB}	۰±۰^{aA}	۰±۰^{aA}	۰±۰^{aA}	۰±۰^{aA}	۰±۰^{aA}	۰±۰^{aA}
۲٫۵	۱	۳/۰±۰^{C}	۲/۹۹±۰/۰۱^{cBC}	۲/۸۹±۰٫۰۱^{dB}	۰±۰^{aA}	۰±۰^{a}A	۰±۰^{aA}	۰±۰^{aA}	۰±۰^{aA}	۰±۰^{aA}
	۲٫۵	۳/۰±۰^{C}	۲/۹٦±۰٫۰۱^{cC}	۲٫۷٦±۰٫۱^{cB}	۰±۰^{aA}	۰±۰^{a}A	۰±۰^{aA}	۰±۰^{aA}	۰±۰^{aA}	۰±۰^{aA}

a,b,c: در هر ستون حروف کوچک انگلیسی نا متشابه اختلاف آماری معنی‌دار را بین تیمارها نشان می‌دهد.

A,B,C: در هر ردیف حروف بزرگ انگلیسی نا متشابه اختلاف آماری معنی‌دار را بین زمان ها نشان می‌دهد (P<۰٫۰۰۱).

نتایج جدول (۳) نشان می‌دهد که میانگین تعداد کلی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در گوشت چرخ شده ماهی تیلاپیا در روز صفر 1×10^3 CFU/g بود. در روز اول تعداد باکتری در تیمارهای دارای نیسین و سیر نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی‌داری داشتند و آزمون آماری آنوا نشان داد که از روز یک تا روز ۲۱، میانگین لگاریتم تعداد باکتری در بین تیمارهای ذکرشده در جدول (۳)، تفاوت آماری معنی‌داری دارد. در تمام‌روزها (P<۰٫۰۰۱) بود. از روز ششم به بعد تعداد باکتری در تمامی تیمارهای حاوی عصاره و نیسین به صفر رسید.

همچنین آزمون آماری آنالیز واریانس با اندازه‌گیری‌های مکرر نشـــان داد کـه میـانگین لگاریتم تعداد باکتری‌ها در تـیـمـارهـای ترکیبی در طول مـدت آزمـایش تغییرات معنی‌داری دارد (P<۰/۰۰۱).

بحث و نتیجه‌گیری

اسـتفاده از چند نگه‌دارنده با مقادیر کم بر مصرف یک نگه‌دارنده به‌تنهایی با مقادیر زیاد ارجحیت دارد که این موضـــوع ازنظر ماندگاری، حفظ خواص ظاهری، ارزش تغذیه‌ای و هم ازنظر اقتصادی بهتر است (Leistner and Gorris, 1995).

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که عصاره الکلی سیر در غلظت ۳/۵ و ۵ و نیسین در غلظت‌های ۰/۵ و ۲/۵ اثر مهارکنندگی و باکتری‌کشی علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در گوشت چرخ‌شده ماهی تیلاپیا دارند و تیمارهای ترکیبی عصاره به همراه نیسین از روز ٦ به بعد رشد باکتری را مهار کردند.

در مطالعه انجام‌گرفته در سـال ۲۰۱۵ بر روی اثر ضـد میکروبی عصـــاره اتـانولی ســیر بر روی ســویـه‌هـای *اســتـافیلوکوکوس اورئوس* مقـاوم بـه آنتی‌بیوتیـک‌هـای مختلف، مشـــاهـده کردنـد که عصـــاره گیاهی ســیر در غلظت۱/۲۵ mg/ml دارای بیشـترین اثر مهاری روی رشـد اسـتافیلوکوکوس *اورئوس* اسـت که در این میان غلظت ۵ و۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دارای بیشـــترین اثر کشـــندگی می‌باشـد (Bakaian *et al*., 2015)، که با مطالعات حاصل از این تحقیق هم‌خوانی دارد.در مطـالعه‌ای در ســـال ۲۰۱۳ بر روی، بررسـی اثر ضد میکروبی عصاره سیر بر باکتری‌های *اسـتافیلوکوکوس اورئوس* و *اشـرشـیاکلی* در مدل غذایی گوشـت مرغ آماده طبخ مشـاهده کردند که عصاره سیر اثر ضد میکروبی قابل‌توجهی بر روی باکتری‌های موردبررسی دارد به‌گونه‌ای که حداقل غلظت مهاری (MIC)، مربوط به باکتری‌های *اسـتافیلوکوکوس اورئوس* و *اشـرشـیاکلی* در محیط آزمایشگاهی در مورد عصاره سیر۷ mg/ml می‌باشد (Ranjbar *et al*, 2013)؛ که با نتایج حاصـل از این مطالعه در خصوص تأثیر عصاره ضدمیکروبی سیر مشابه است.

در مطالعه دیگری که در سال ۲۰۱۵ بر روی بررسی اثر ضـد میکروبی و ضـد اکسیداسیونی عصاره ترکیبی سیر و لیمو به میزان ۱/۵ درصـد بر کیفیت و ماندگاری فیله ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بسـته‌بندی‌شده در خلأ طی نگهداری در یخچال مشـــاهده کردند که اســـتفاده از ترکیب آنتی باکتریایی و آنتی‌اکسـیدانی طبیعی عصـاره ترکیبی سـیر و لیمو قادراسـت فسـاد اکسیداسیونی و فعالیت باکتری‌های موجود بر سطح فیله ماهی قزل‌آلا را کم و آن را به تعویق انـدازد و درنتیجـه موجـب افزایش ماندگاری آن گردد (Mirsadeghi *et al*.,2015). نتایج حاصـــل از این پژوهش گویای این واقعیت اسـت که عصـاره الکلی گیاه سـیر مانع از رشد عوامل پاتوژنی در ماهی تیلاپیا می‌باشد.

در مطالعه‌ای دیگر در سـال ۲۰۰۵ مشـاهده شـد که اسـتفاده از ۵-۲/۵ mg/ml نیسـین در محصولات تخم‌مرغ (تخم‌مرغ کامل، سـفید و زرده) از رشـد دو باکتری گرم مثبت *باسـیلوس سرئوس* و *لیستریا مونوسیتوژنز* جلوگیری می‌کند (Delves, 2005).

در یک مطالعه در سال ۲۰۱۱ اثر نیسین را بر روی سوسیس تهیه‌شده از گوشت گوسفندی نگهداری شده در دمای ۷ ^{o}c را بررسی کردند که نتیجه این تحقیق نشان داد در تیمارهای حاوی نیسین روند رشد میکروبی تا روز پنجم کاهشی و از روز پنجم به بعد روند رشد به‌آرامی افزایشی بوده است (Hammou *et al.* 2011).

در مطالعه دیگر در سال ۲۰۰۸ به تأثیر نیسین بر روی *لیستریا مونوسیتوژنز* در گوشت گاو چرخ شده پرداخته شد؛ که درنتیجه این تحقیق تیمارهای حاوی نیسین تا روز دوم روند کاهش بار میکروبی از خودشان نشان دادند و از روز دوم تا پایان دوره ماندگاری (۱۶ روز) روند افزایشی بار میکروبی مشاهده‌شده است ولی این روند افزایش هم کمتر از نمونه شاهد گزارش گردیده است با بیشتر شدن غلظت نیسین نیز بار میکروبی نمونه افزایش‌یافته است (Solomakos *et al.* 2008). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که عصاره الکلی سیر در غلظت ۳٫۵ و ۵ نیسین اثر آنتی باکتریالی و ترکیب تیمار عصاره به همراه نیسین علیه باکتری *استافیلوکوکوس* اثر مهارکننده دارد.

مطالعه گروهی از محققین در سال ۱۹۹۷ نشان دادند که عصاره کلروفرمی سیر از رشد *هلیکوباکتری پیلوری* جلوگیری می‌کند (Sivam *et al.*, 1997). نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره الکلی سیر تأثیرات زیادی بر عدم رشد و نابودی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* دارد.

در مطالعه‌ای دیگر غلظت ۱۰۰ درصد عصاره سیر کمترین اثر مهاری بر روی سروتایپ O_1 باکتری *اشرشیاکلی* داشت (۱۸ mm) و همین غلظت بیشترین اثر مهارکنندگی را روی سروتایپ O_{22} و O_{25} باکتری *اشرشیاکلی* داشت (۳۰ mm)(Indu *et al*, 2006).

در مطالعه دیگری نتایج نشان داد، عصاره گیاهی سیر دارای اثر ضد میکروبی بالایی علیه *اشرشیاکلی* با قطر مهاری (۳۵–۱۷ mm) و *استافیلوکوکوس اورئوس* با قطر هاله مهاری (۳۰–۱۶ mm) است، همچنین حداقل غلظت مهارکنندگی برای *E. coli* =30 mg/ml و برای *S. aureus* = 50 mg/ml است (Afamefuna, 2010).

در این تحقیق خواص ضدمیکروبی عصاره الکلی سیر و نیسین به‌صورت تنها و توأم در رشد *باکتری استافیلوکوکوس ارئوس* در گوشت چرخ شده‌ی ماهی تیلاپیا موردبررسی قرار گرفت نتایج این مطالعه نشان داد غلظت‌های پایین عصاره ۱ و ۲/۵ درصد نمی‌تواند باکتری را به‌طور کامل مهار کند ولی با افزایش غلظت عصاره۳/۵ و ۵ درصد و افزودن نیسین ۰/۵ و ۲/۵ میکروگرم به‌تنهایی و ترکیب نیسین و عصاره به‌صورت: (۳/۵+۰/۲۵)، (۵+۰/۲۵)، (۱+۰/۵)، (۲/۵+۰/۵)، (۱+۲/۵)، (۲/۵+۲/۵) دارای اثرات ممانعت کنندگی بر رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* بوده است. بنابراین با توجه به نتایج به‌دست‌آمده می‌توان گفت که از عصاره سیر و نیسین می‌توان به‌عنوان یک نگه‌دارنده طبیعی در کنترل باکتری *استافیلوکوکوس ارئوس* استفاده نمود.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی برای اعلام ندارند.

منابع

- Abdollahzadeh, E., Rezaei, M. and Hosseini, H. (2014). Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control Listeria monocytogenes inoculated in minced fish meat. Food Control, 35(1): 177-183.
- Afamefuna, L. (2010). In vitro determination of bactericidal effects of garlic (Allium sativum) on Staphylococcus aureus and Escherichi coli. Journal of Technology and Education In Nijeria, 3(1), 152-156.
- Alizadeh Behbahani, B., Tabatabaei Yazdi, F., Shahidi, F., Mohebbi, M.(2013). Antifungal effect of edible film (CMC) containing aqueousand ethanolic mangrove plant extract oncitrus pathogens in vitro. Agricultural Advances, 2(1): 47-52.
- Amagase, H., Petesch, BL., Matasuura, H., Kasuga, S. and Itakura, Y.,(2001). Recent advances on the nutritional effects associated with the use of garlic as a supplement: Intake of garlic and its bioactive componants. Journal of Nutrition, 131(Suppl. 3): 955-962.
- Bakaian, M., Farazmand, R., Ki Ghobadi, S. & Saeedi, S. (2015). Antimicrobial effect of garlic ethanolic extract (Allium Sativum) on strains of Staphylococcus aureus resistant to various antibiotics. Journal of Plant Research, 28(1): 34-41.
- Baqalian, K., Ziaei, S, A., Naghavi, M, R. And NaqdiBadi, H,A. (2003). Pre-culture evaluation of Iranian garlic ecotypes in terms of allicin content and botanical characteristics, Journal of Medicinal Plants, 1(1): 59-50.
- Basti, A. A., Misaghi, A. and Khaschabi, D.(2007). Growth response and modelling of the effect of Zataria multi flora Boiss. Essential oil, pH and temperature on Salmonella typhimurium and Staphylococcus aureus. LWT- Food Science and Technology, 40(6): 973-981.
- Choobkar, N., AkhundzadehBasti, A., Soltani, M., Sari, A., Malekshahi, A., Nemati, G. And Partovi, R. (2009). Study of Staphylococcus aureus growth in processed silver carp fillets of Banmak and Nisin. Journal of Veterinary Research, 65(3): 198-193.[Is Persian]
- Delves-broughton, J. (2005). Nisin as a food preservative. Food Australia, 57(12): 525-527.
- Gómez-Guillén, M. C., Pérez-Mateos, M., Gómez-Estaca, J., López-Caballero, E., Giménez, B. and Montero, P.(2009). Fish gelatin: a renewable material for developing active biodegradable films. Trends in Food Science Technology, 20(1): 3-16.
- Guerra, N. P., Agrasar, A. T., Macías, C. L., Bernárdez, P. F. and Castro, L. P.(2007). Dynamic mathematical models to describe the growth and nisin production by Lactococcus lactis subsp. lactis CECT 539 in both batch and re-alkalized fed-batch cultures. Journal of Food Engineering, 82(2): 103-113.

- Hammou, M. B., Skali, S. N., Idaomar, S. N. and Abrini, J.(2011). The antimicrobial effect of riganum 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. African Journal of Biotechnology, 10(71): 15998-16005.
- Holley, R. A.(1997). Asymmetric distribution and growth of bacteria in sliced vacuum-packaged ham and bologna. Journal of Food Protection, 60(5): 510-519.
- Hurst, A. (1981). Nisin. Advances in Applied Microbiology, 60(27): 85-123.
- Indu, M. N., Hatha, A. A. M., Abirosh, C., Harsha, U., & Vivekanandan, G.(2006). Antimicrobial activity of some of the south-Indian spices against serotypes of Escherichia coli, Salmonella, Listeria monocytogenes and Aeromonas hydrophila. Brazilian Journal of Microbiology, 37(2): 153-158.
- Jay, J. M.(2000). Staphylococcal gastroenteritis, Bayan M. Abu-Ghazaleh (Editors), Modern Food Microbiology, 6th Edition, New York, pp. 288-340
- Leistner, L. and Gorris, L. G.(1995). Food preservation by hurdle technology. Trends in Food Science & Technology, 6(2): 41-46.
- Levinson, W. E. and Jawetz, E.(2000).Faculty leadership through self-assessment. S.Srividhya , P. Viji(Editors), Medical Microbiology and Immunology Examination and Board Review,5 th Edition, New York, pp. 18-21.
- Mirsadeghi, H., AaliShahi, A., Shabanpour, B, and Ajagh, S M. (2015). Effect of garlic and lemon extract on the quality and shelf life of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) fillet closed in a vacuum during refrigeration. Journal of Aquatic Exploitation and Breeding, 4(2): 79-92.
- Mulders, J. W., Boerrigter, I. J., Rolema, H. S., Sizen, R. J., and VOS, W. M.(1991). Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z., a natural nisin variant. Europan Journal of Biochemistry, 201(3): 581-584.
- Normanno, G., Firinu, A., Virgilio, S., Mula, G., Dambrosio, A., Poggiu, A. and Di Giannatale, E. (2005). Coagulase-positive Staphylococci and Staphylococcus aureus in food products marketed in Italy. International Journal of Food Microbiology, 98(1): 73-79.
- Nouri, N., Rokni, N., Akhondzadeh, Afshin., Misaghi, Ali., Torian, Fahimeh. (2011). Antimicrobial effect of Zataria multiflora on E.coli O157: H7 in minced beef during refrigeration. Journal of Food Hygiene, 1(1):1-8.
- Oroojalian, F., Kasra-Kermanshahi, K., Azizi, M., and M.R. Bassami. (2009). Phytochemical composition of the essential oils from three Apiaceae species and their antibacterial effects on food-borne pathogens. Food Chemistry, 120(3):765-770.
- Ranjbar, M., Sharifan, A., Shabani, Sh. And AminAfshar, M. (2013). Antimicrobial effect of garlic extract on Staphylococous aureus and Escherichia coli in ready-to-eat chicken meat model. Journal of Food Science and Nutrition, 11(4): 57-66.
- Samelis, J., Kakouri, A., and Rementzis, J.(2000). The spoilage microflora of cured, cooked turkey breasts prepared commercially with or without smoking. International Journal of Food Microbiology, 56(2): 133-143.
- Sivam, G. P., Lampe, J. W., Ulness, B., Swanzy, S. R., and Potter, J. D. (1997). Helicobacter pylori—in vitro susceptibility to garlic (Allium sativum) extract. Nutrition and Cancer, 27(2): 118-121.

- Solomakos, N., Govaris, A., Koidis, P. and Botsoglou, N. (2008). The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin, and their combination against Listeria monocytogenes in minced beef during refrigerated storage. Food microbiology, 25(1): 120-127.
- Thomas, L. V., Clarkson, M. R. and Delves-Broughton, J.(2000). Nisin. In Natural Food Antimicrobial Systems, Naidu, A. S., E. D., CRC press, Boca Raton, Florida, pp. 463-524.
- Véronique, C. O. M. A. (2008). Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat- based products. Meat science, 78(1): 90-103.
- El_Sayed A.F.M.(2006).*Tilapia* culture in salt water: environmental requirements, Nutritional Implications and Economic Potentials, 29(2): 95-106.
- J.H. M. (1993). Food irradiation-lessons and prospects for world food preservation and trade, Development of Food Science and Technology in South East Asia (O.B. Liang, A. Buchanan, and D. Fardiaz, eds.), IPB Press, Bogor, p. 86.