Downloaded from jmp.ir at 22:57 +0330 on Saturday February 17th 2018

اثر اسانس آویشن شیرازی بر رفتار لیستریا منوسایتوژنز (*Listeria momocytogenes*) در ماهی شور

حسن اختیارزاده[۱]، افشین آخوندزاده بستی[۲]*، علی میثاقی[۳]، حسینعلی ابراهیم‌زاده موسوی[۲]، سعید بکایی[۲]، پگاه طاهرخانی[۱]، سپیده عباس‌زاده[۵]، علی خنجری[٤]، غزال نعمتی[۱]، سمیه صادقی[٦]

۱- دستیار تخصصی، گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران
۲- استاد، گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران
۳- دانشیار، گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران
٤- استادیار، گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران
۵- گروه تغذیه و بهداشت مواد غذایی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، تهران
٦- دکترای حرفه‌ای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران
* آدرس مکاتبه: تهران، خیابان آزادی، نبش خیابان قریب، دانشکده دامپزشکی، گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی
صندوق‌پستی: ٦٤٥٣- ١٤١٥٥، تلفن: ٦٦٩٢٣٥١٠ (٠٢١)، نمابر: ٦٦٩٣٣٢٢٢ (٠٢١)
پست الکترونیک: aakhnod@ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۸/٤/۲۰ **تاریخ تصویب:** ۹۰/۳/۱۷

چکیده

مقدمه: گیاه آویشن شیرازی (*Zataria multiflora* Boiss.) از دسته گیاهان دارویی بوده و بررسی اثرات ضدمیکروبی آن در مواد غذایی ضروری به نظر می‌رسد.

هدف: بررسی اثر اسانس آویشن شیرازی بر رشد باکتری لیستریا منوسایتوژنز در ماهی شور در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد بود.

روش بررسی: فیله‌های ماهی کپور نقره‌ای به وزن ۲۵ گرم تهیه و در معرض اشعه گاما به میزان ۵ کیلوگری قرار گرفتند. پس از انتقال فیله‌ها به آزمایشگاه، فیله‌ها در غلظت ٤ درصد آب نمک و غلظت‌های متفاوت اسانس آویشن شیرازی (۰، ۰/۰٤۵، ۰/۱۳۵، ۰/٤۰۵، ۰/۸۱۰ درصد) و ۰/۲ درصد آگارآگار و ۱ درصد لیسیتین به مدت ۲ ± ۲٤ ساعت و در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد نگهداشته شدند. سپس به فیله‌های ۲۵ گرمی به نحوی که در هر گرم از فیله‌ها $۱۰^{۳}$ ×۱ باکتری لیستریا منوسایتوژنز باشد، باکتری تلقیح شد. فیله‌های تلقیح شده در دمای۱۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری و شمارش باکتری در روزهای صفر، ۱، ۲، ۳، ٦، ۹، ۱۲، ۱۵، ۱۸ و ۲۱ صورت گرفت.

نتایج: اسانس مورد مطالعه دارای اثری معنی‌دار در ممانعت از رشد لیستریا منوسایتوژنز در ماهی شور در طول نگهداری بود. با افزایش غلظت تا ۰/٤۰۵ درصد این اثر بازدارندگی به طور معنی‌دار افزایش پیدا کرد ($p<$ ۰/۰۵) ولی بین غلظت ۰/٤۰۵ و ۰/۸۱۰ درصد اختلاف معنی‌داری در ممانعت از رشد مشاهده نشد ($p>$ ۰/۰۵). بررسی‌های ارگانولپتیک نشان داد که اسانس تا غلظت ۰/٤۰۵ سبب بهبود طعم ماهی شد.

نتیجه‌گیری: اسانس آویشن شیرازی می‌تواند به عنوان یک نگهدارنده طبیعی در ماهی شور مدنظر قرار گیرد.

گل‌واژگان: آویشن شیرازی، لیستریا منوسایتوژنز، ماهی شور، اسانس گیاهی

Downloaded from jmp.ir at 22:57 +0330 on Saturday February 17th 2018

مقدمه

اسانس‌های گیاهی (Essential oils) را روغن‌های اتری یا فرّار نیز می‌گویند که از مهم‌ترین نگهدارنده‌های طبیعی محسوب می‌شوند. حدود ۳۰۰ نوع اسانس گیاهی شناخته شده وجود دارد که تقریباً ۳۰ نوع از آنها اهمیت تجاری دارند [۱]. همچنین این اسانس‌ها و اجزای تشکیل‌دهنده آنها دارای اثرات ضدباکتریایی شناخته شده‌ای هستند [۲] و همراه ادویه‌جات به عنوان طعم‌دهنده و معطرکننده در سراسر دنیا استفاده می‌شوند و اثرات ضدمیکروبی آنها از قرون وسطی شناخته شده است [۳،٤] به طور عمده ترکیبات فنلی مسئول خواص ضدمیکروبی اسانس‌ها هستند [۱]. بنابراین هرچه مقادیر مواد فنولیک در اسانس بالاتر باشد، خواص ضدمیکروبی آن بالاتر خواهد بود از این مواد می‌توان به کارواکرول (Carvacrol)، تیمول (Thymol) و اوژنول (Eugenol) اشاره کرد [۵، ۱]. به طور کلی غلظت‌های بالای اسانس گیاهی در غذا نسبت به محیط‌های آزمایشگاهی به منظور اثربخشی اثرات ضدباکتریایی آنها لازم است [٦،۷،۸].

لیستریا منوسایتوژنز، یک باکتری گرم مثبت، فاقد توانایی تشکیل هاگ (Spore) و میله‌ای غیراسیدفست (Nonacid fast) است. این باکتری کاتالاز مثبت بوده و قادر به تخمیر گلوکز و تولید اسید لاکتیک است [۹،۱۰]. شاخص‌ترین عامل بیماری‌زایی لیستریا منوسایتوژنز، لیستریولایزین O (Listeriolysin O) می‌باشد [۹].

این باکتری برای بعضی گروه‌ها شامل نوزادان، زنان باردار، افراد مسن، گیرندگان پیوند عضو که دفاع ایمنی آنها تضعیف شده، سایر بیماران با ضعف سیستم دفاع ایمنی با واسطه سلولی، افرادی که دیالیز خون می‌شوند، افراد دیابتی و بیماران مبتلا به ایدز (AIDS) عامل مهمی برای به خطر انداختن زندگی آنها باشد و می‌تواند موجب، سپتی سمی (Septicemia)، مننگو آنسفالیت (Meningo encephalitis)، مننژیت (Meningitis)، سقط جنین، تولد زودرس یا تولد جنین مرده شود [١٤ – ۹]. در افراد سالم مصرف غذای آلوده با لیستریا منوسایتوژنز معمولاً منجر به بیماری معدی – روده‌ای خود به خود محدود شونده (Self limiting gastrointestinal disease) همراه با تب، تهوع، استفراغ و اسهال می‌شود [۱۲، ۹]. این باکتری در طیف گسترده‌ای از مواد غذایی خام و فرآوری شده از قبیل شیر و فرآورده‌های لبنی، انواع گوشت و فرآورده‌های گوشتی مانند گوشت گاو، خوک، سوسیس تخمیری، ماهی و اغذیه دریایی (Sea food) و میوه‌ها و سبزی‌ها یافت می‌شود [۱۵، ۱۱، ۹]. لیستریا به طور کلی قادر به تکثیر در محدوده دمای بین ۱ تا ٤٥ درجه سانتی‌گراد است و دمای ایده‌آل رشد آن بین ۳۰ تا ۳۷ درجه سانتی‌گراد می‌باشد [۱۰]. این باکتری به عنوان باکتری سرماگرا بیماری‌زای منتقل شده از مواد غذایی شناخته می‌شود و گستردگی انتشار آن به همراه توانایی زنده ماندن و تکثیر در شرایط یخچالی، لیستریا منوسایتوژنز را جز باکتری‌های مهم بیماری زا منتقله از مواد غذایی مطرح کرده است [۹،۱۰].

علی‌رغم پیشرفت‌های جدید در بهداشت و فناوری تولید غذا، اهمیت سلامت غذا به طور فزاینده‌ای در بهداشت عمومی افزایش یافته است [۱].

سازمان بهداشت جهانی تخمین زده است که سالانه ۳۰ درصد جمعیت کشورهای صنعتی از بیماری‌های منتقل شده از طریق غذا رنج می‌برند و در سال ۲۰۰۰ میلادی در سراسر جهان حداقل ۲ میلیون نفر از بیماری اسهال مرده‌اند [١٦].

بسیاری از مواد غذایی فسادپذیر هستند و لازم است که از فساد آنها در طی فرآوری، آماده‌سازی، نگهداری و توزیع پیشگیری نمود. از سویی تجارت مواد غذایی و انتقال این مواد به مناطق دوردست اهمیت ایجاد شرایط مناسب برای پیشگیری از فساد آنها را، افزایش داده است. این امر با کمک کاهش دمای نگهداری، بسته‌بندی، بسته‌بندی با استفاده از اتمسفر اصلاح شده (Modified atmosphere packaging) (MAP)، استفاده از مواد نگهدارنده و سایر روش‌ها امکان‌پذیر است. به علت افزایش آگاهی مصرف‌کنندگان و نگرانی از مصرف افزودنی‌های شیمیایی و ساختگی، تمایل به مصرف غذاها با افزودنی‌های طبیعی افزایش یافته است [۸].

Downloaded from jmp.ir at 22:57 +0330 on Saturday February 17th 2018

گیاه آویشن شیرازی گیاهی است که به خانواده نعناع (Lamiaceae) تعلق دارد که در ایران، پاکستان و افغانستان رشد می‌نماید [۱۷]. این گیاه به عنوان طعم‌دهنده غذا در ایران استفاده می‌شود [۱۸، ۱۷].

مواد و روش‌ها

فرضیات

بررسی اثر اسانس آویشن شیرازی بر رفتار (رشد) باکتری لیستریا منوسایتوژنز در ماهی شور در حضور غلظت‌های مختلف (۰، ۰/۰۴۵، ۰/۱۳۵، ۰/۴۰۵، ۰/۸۱۰ درصد) در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد (درجه حرارت یخچالی نامطلوب).

تهیه اسانس و ترکیب آن

گیاه آویشن شیرازی در فصل تابستان ۱۳۸۶ از استان فارس جمع‌آوری شد و توسط پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی نام علمی آن تایید شد. اسانس از سرشاخه‌های گیاه به روش تقطیر با آب تهیه و توسط دستگاه گاز کروماتوگراف متصل به طیف نگار جرمی (GC – MS) (Gas chromatography- Mass spectrometry) مورد استفاده از نوع Thermoquest finnigan با ستون مویینه به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۲۵۰ میکرومتر و ضخامت لایه داخلی ۰/۲۵ میکرومتر با برنامه دمایی ۵۰ تا ۲۶۵ درجه سانتی‌گراد با افزایش تدریجی ۲/۵ درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه و نگهداری ستون در ۲۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه بود. دمای محفظه تزریق ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد، سرعت گاز هلیم ۱/۵ میلی‌لیتر در دقیقه، انرژی یونیزاسیون شناساگر EI ۷۰ الکترون ولت و دمای منبع یونیزاسیون ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد بود.

باکتری مورد مطالعه

باکتری مورد استفاده در این بررسی، لیستریا منوسایتوژنز ATCC 19118 بود که کشت لیوفیلیزه آن بعد از انتقال به محیط آبگوشت قلب و مغز در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت، دو مرتبه به طور متوالی گرم‌خانه گذاری شد، سپس از کشت دوم به نسبت ۱ به ۵ با گلیسیرین استریل مخلوط و در حجم‌های ۵۰۰ میکرولیتری در میکروتیوپ‌های اپندورف در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

تهیه میزان تلقیح باکتری

برای تعیین میزان تلقیح باکتری مورد بررسی، با انتقال کشت نگهداری شده در لوله‌های اپندورف در ۲۰- درجه سانتی‌گراد به محیط آبگوشت قلب و مغز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت صورت گرفت. سپس به لوله‌های استریل کووت (Cuvett) ۵ میلی‌لیتر از محیط آبگوشت استریل قلب و مغز اضافه شد و از کشت ۱۸ ساعته دوم مقادیر مختلفی به لوله‌های کووت اضافه شد و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری (Milton Roy Company, USA, Spectrophotometer) جذب نواری آنها در طول موج ۶۰۰ نانومتر تعیین شد. همزمان با عمل فوق با نمونه‌برداری از محتویات لوله‌های کووت شمارش باکتریایی انجام شد و لوله کووتی که حاوی ۱×۱۰^{۷}CFU باکتری در هر میلی‌لیتر بود، مشخص شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از محتویات این لوله کووت به ۳۹ میلی‌لیتر رقیق‌کننده (diluent) استریل موجود در شیشه‌های زیمکس (Zimex) افزوده می‌شد تا در نهایت در هر ۱۰۰ میکرولیتر از محتویات شیشه زیمکس $۲/۵ \times ۱۰^{۴}$ باکتری مورد بررسی موجود باشد (که با کشت بر روی آگار شمارش تایید می‌شد). حال در زمان تلقیح فیله‌های ماهی شور از ۱۰۰ میکرولیتر محتویات شیشه زیمکس استفاده می‌شد تا در هر گرم از فیله ماهی ۱×۱۰^{۳} باکتری تلقیح شود.

آماده‌سازی ماهی

ماهی کپور نقره‌ای (Silver carp) یا فیتوفاگ با نام علمی هیپوفتالمیکتیس مولیتریکس (Hypophthalmichthys molitrix) از یک مزرعه پرورش ماهی با وزن متوسط ۲ کیلوگرم تهیه شد و پس از صید، ماهی در دمای صفر تا ۲ درجه سانتی‌گراد در مجاورت یخ نگهداری و در کیسه‌های پلی اتیلنی به محل فیله‌گیری منتقل شد. در محل مذکور بلافاصله پوست کنی، تخلیه اندرونی و جداکردن سر و

Downloaded from jmp.ir at 22:57 +0330 on Saturday February 17th 2018

آبشش‌های ماهی‌ها انجام گرفت. سپس فیله کردن ماهی به قطعات ۸ × ۳ سانتی‌متر مربع صورت گرفت به طوری که وزن متوسط قطعات حدود ۲۵ گرم بود. تعداد ۱۲ قطعه فیله ماهی در داخل کیسه‌های پلی اتیلنی استریل قرار داده شد و مجدداً در مجاورت یخ و دمای صفر تا ۲ درجه سانتی‌گراد به سازمان انرژی اتمی منتقل و فیله‌ها در معرض اشعه گاما به میزان ۵ کیلوگری (Kilo Gray) قرار گرفتند. پس از این مرحله فیله‌های اشعه دیده در مجاورت یخ و در دمای صفر تا ۲ درجه به آزمایشگاه منتقل شد.

از فیله‌های فوق به طور اتفاقی (Random) نمونه‌برداری و پس از تهیه رقت کشت داده شد، که در محیط کشت به روش Pour plate باکتری رشد نکرد. سپس فیله‌ها در غلظت ٤ درصد آب نمک (Brining) استریل (سبک شور) و غلظت‌های متفاوت اسانس آویشن شیرازی (۰، ۰/۰٤٥، ۰/۱۳٥، ۰/٤۰٥، ۰/۸۱۰ درصد) و ۰/۲ درصد آگارآگار و ۱ درصد لیسیتین به مدت ۲ ± ۲٤ ساعت و در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد نگهداشته شدند. بعد از آن و پس از خروج فیله‌ها از محلول در شرایط استریل و در زیر هود به مدت یک دقیقه در ظرف استریل خشک قرار داده شدند تا آب اضافی آنها گرفته شود و در شرایط استریل و داخل پلیت استریل وزن آنها به ۲۵ گرم رسانده شد و سپس باکتری مورد بررسی به صورت کشت نقطه‌ای (Spot inoculation) در ده نقطه (جمعاً ۱۰ قطره) و هر قطره ۱۰ میکرولیتر (جمعاً ۱۰۰ میکرولیتر) از محتویات شیشه زیمکس آماده شده که در هر ۱۰۰ میکرولیتر از محتویات آن $۲/۵ \times ۱۰^{٤}$ باکتری مورد بررسی بود (که با کشت تایید می‌شد) تلقیح باکتری صورت گرفت. با این روش در هر گرم از فیله تلقیح شده ۱×۱۰^{۳} باکتری لیستریا منوسایتوژنز موجود بود. فلیه‌های تلقیح شده به مدت یک ساعت در حرارت اتاق (۲۵ درجه سانتی‌گراد) در زیر هود بیولوژیک (Biosafety Cabinet) باقی ماندند تا خشک شوند سپس فیله‌ها با حفظ شرایط استریل در کیسه‌های استریل استوموکر (Stomacher) قرار داده شدند و به گرمخانه ۱۰ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

کشت فیله‌های تلقیح شده و شمارش باکتری مورد بررسی در روزهای صفر، ۱، ۲، ۳، ٦، ۹، ۱۲، ۱۵، ۱۸ و ۲۱ صورت گرفت. لازم به ذکر است که کلیه آزمایش‌ها با ۳ تکرار انجام پذیرفت.

تحلیل آماری

اثرات غلظت‌های اسانس آویشن شیرازی بر روی شمارش لیستریا منوسایتوژنز با استفاده از روش آنالیز واریانس سه طرفه و به کمک برنامه SPSS Version 15 انجام گرفت. اختلافات شاخص توسط آزمون Tukey در سطح α =۰/۰۵ ضمن استفاده از همین برنامه انجام پذیرفت.

نتایج

جدول شماره ۱ نتیجه آنالیز ترکیبات اسانس آویشن شیرازی مورد استفاده در این بررسی را با استفاده از دستگاه GC-MS نشان می‌دهد. بیشترین ترکیب موجود در این اسانس کارواکرول با ۷۱/۱۲ درصد است.

تاثیر اسانس بر روی رشد (شمارش باکتریایی) در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. اسانس در غلظت‌های مورد مطالعه، اثر معنی‌دار در ممانعت از رشد لیستریا منوسایتوژنز در ماهی شور در طول نگهداری داشت.

با افزایش غلظت اسانس تا ۰/٤۰٥ درصد این اثر بازدارندگی به طور معنی‌دار افزایش پیدا کرد ($p<۰/۰۵$) ولی در غلظت ۰/٤۰٥ درصد مورد مطالعه با غلظت ۰/۸۱۰ درصد اختلاف معنی‌داری در ممانعت از رشد مشاهده نشد ($p<۰/۰۵$) (جدول شماره ۲).

بررسی‌های ارگانولیتیک نشان داد که به کارگیری اسانس تا غلظت ۰/٤۰٥ درصد نه تنها اثر نامطلوبی در طعم فرآورده ندارد بلکه موجب بهبود طعم و بوی آن نیز می‌شود.

بحث

اسانس‌های گیاهی به عنوان ترکیبات ضدمیکروبی یکی از منابع بالقوه مفید به عنوان ماده بازدارنده از رشد میکروب‌ها می‌باشند [۲۰،۱،۲]. در سال‌های اخیر با توجه به نگرانی‌های موجود در مورد استفاده از نگهدارنده‌های شیمیایی و اثرات

Downloaded from jmp.ir at 22:57 +0330 on Saturday February 17th 2018

جدول شماره ۱- نتایج آنالیز اسانس آویشن شیرازی مورد بررسی با استفاده از GC – MS

نام ترکیب	اندیس بازدارنده	درصد
Thujene	۹۳۰	/۱۹
Alpha – pinene	۹۳۷	٤/۲٦
Beta - pinene	۹۷٦	۰/٤۳
Beta – Myrcene	۹۸٥	۰/۸٥
Eucaliptol	۱۰۲٤	۳/۳۷
Gama - Terprinene	۱۰٥٥	۷/۳٤
Linalool	۱۰۹۰	۰/٦۸
Thymol methyl ether	۱۲۳٦	۰/٤۷
Carvacrol methyl ether	۱۲٤۳	۰/٤٦
Carvacrol	۱۲۹۹	۷۱/۱۲
Trans - Caryophyllen	۱٤۱۸	۰/٤۱
Globulol	۱٥۸۲	۲/۳۲
جمع		**۹۱/۹۰**

جدول شماره ۲- میزان رشد (میانگین لگاریتم ± انحراف معیار) باکتری لیستریا منوسایتوژنز در ماهی سبک شور (٤ درصد نمک) متأثر از غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی در طی ۲۱ روز نگهداری در ۱۰ درجه سانتی‌گراد

غلظت اسانس آویشن شیرازی (درصد)	میزان رشد (Mean Log N ± SD)									
	روز									
	۰	۱	۲	۳	٦	۹	۱۲	۱٥	۱۸	۲۱
۰	۲/۹۹±۰/۰٤۳	۳/٤۳±۰/۰۱٦	٤/۲۰±/۰۲٤	٥/۷٦±۰/۰۰۳	۸/۱۰±۰/۰۰۰	>۸	>۸	>۸	>۸	>۸
۰/۰٤٥	۲/۹٥±۰/۰۲٤	۳/٤٤±۰/۰۰۷	٤/۳±۰/۰۰۸	٥/٥±۰/۰۰٦	۷/۹±۰/۰۰۲	۸/۳٤±۰/۰۰۱	>۸	>۸	>۸	>۸
۰/۱۳٥	۲/۹٥±۰/۰۲٤	۳/۲٥±۰/۰۱۲	٤/۱۷±۰/۰۲۹	٥/۲۲±۰/۰۲٥	٦/۹۰±۰/۰٥٤	۷/۹۷±۰/۰۰۲	>۸	>۸	>۸	>۸
۰/٤۰٥	۲/۹٥±۰/۰٤۸	۲/٥٤±۰/۰۱۲	۲/۹۹±۰/۰٤۳	۳/٦۹±۰/۰۰۸	٥/۸۷±۰/۰۰٥	٦/۹٦±۰/۰۰٤	۷/۰۷±۰/۰۰۳	>۸	>۸	>۸
۰/۸۱۰	٤/۸٤±۰/۰٦۲	۲/٥۹±۰/۰٥٤	۲/۲۹±۰/۱۱۱	۲/۹۹±۰/۰٤۳	٥/٥٦±۰/۰۱۱	۷/۲۷±۰/۰۱۱	۷/۹۷±۰/۰۰۱	>۸	>۸	>۸

مضر احتمالی آنها، گرایش به استفاده از اسانس‌های گیاهی افزایش یافته است [۱۷، ٦، ۱]. تحقیقات آتی درخصوص مواد ضدمیکروبی مورد استفاده در غذا تقریباً دو رویکرد اصلی پیش روی دارد. اول توسعه اطلاعات روی مواد ضدمیکروبی طبیعی و رویکرد دوم استفاده از مواد ضدمیکروبی طبیعی به صورت ترکیب با یکدیگر و یا روش‌های سنتی یا جدید فرآوری در جهت تعیین اثرات سینرژیستیک احتمالی این ترکیبات است [۲]. از این رو بررسی اثر اسانس‌های گیاهی یا ترکیبات آنها به تنهایی و با هم بر روی تعدادی از میکروب‌های بیماری‌زا منتقل شده از طریق غذا از قبیل لیستریا منوسایتوژنز، استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*)، اشریشیاکولای (*Escherichia coli*)، سالمونلا (*Salmonella*)، شیگلا (*Shigella*)، کلستریدیوم پرفرینجنس (*Clostridium perfringenes*) و باسیلوس سرئوس (*Bacillus cereus*) انجام شده است که همگی بیانگر تلاش محققین برای دستیابی به نگهدارنده‌های گیاهی و جایگزین نمودن آنها به جای نگهدارنده شیمیایی است [۱۹، ۷ – ۱].

Downloaded from jmp.ir at 22:57 +0330 on Saturday February 17th 2018

مونور (Munoz) و همکاران در سال ۲۰۰۹ با مطالعه روی خواص ضدمیکروبی عصاره مرزنجوش (Oregano)، رزماری (Rose mary) و برگ بو (Laurel) بر میزان رشد و قدرت زنده ماندن لیستریا منوسایتوژنز در محیط آزمایشگاهی و عصاره کلم براکلی (Broccdi) نشان دادند که ترکیب این سه عصاره موجب ممانعت از رشد لیستریا منوسایتوژنز در محیط‌های فوق‌الذکر می‌شوند [۲۰]. سینق (Singh) و همکاران در سال ۲۰۰۳ میلادی اثرات اسانس‌های آویشن (Thyme)، میخک (Clove) و فلفل سیاه (Pimenta) را در محیط آزمایشگاهی آب پپتونه و مدل غذایی هات داگ با غلظت‌های ۱، ۵ و ۱۰ میلی‌لیتر در لیتر بر روی لیستریا منوسایتوژنز بررسی کردند و مشخص نمودند که اسانس میخک و آویشن به طور معنی‌دار موجب کاهش جمعیت باکتری مذکور در محیط آب پپتونه (peptone water) و هات داگ (hotdogs) شد همچنین ایشان اعلام نمودند که اسانس میخک در غلظت ۱ میلی‌لیتر در لیتر نسبت به غلظت ۵ میلی‌لیتر در لیتر اسانس آویشن مؤثرتر بوده است از سویی اثر اسانس‌های مذکور با غلظت برابر در محیط آب پپتونه بیشتر از اثر آنها در هات داگ بوده است [۲۲]. در پژوهش انجام شده توسط پاپارلا (Paparella) و همکاران در سال ۲۰۰۸ میلادی اثرات ضدمیکروبی اسانس مرزنجوش، آویشن و دارچین (Cinnamon) علیه لیستریا منوسایتوژنز ATCC 19114 در حضور مقادیر مختلف نمک تعیین شد. ایشان نشان دادند که با افزایش غلظت نمک اثرات ضدمیکروبی این اسانس‌های گیاهی تقویت می‌یابد، همچنین مشخص شد که اسانس مرزنجوش و آویشن از دارچین در این مورد مؤثرتر بود [۲۱].

در بررسی دیگری که توسط سولماکوس (Solomakas) و همکاران در سال ۲۰۰۷ میلادی با استفاده از اسانس آویشن، نیسین (Nisin) و ترکیب این دو علیه لیستریا منوسایتوژنز بر روی محیط ((Tryptic soy broth (TSB) و گوشت چرخ کرده گاوی انجام گرفت اثرات ضدمیکروبی اسانس آویشن با غلظت‌های ۰/۳، ۰/۶ و ۰/۹ درصد بر روی محیط TSB و گوشت چرخ کرده گاوی علیه لیستریا منوسایتوژنز نشان داد که با افزایش غلظت اسانس، اثرات ضدمیکروبی افزایش یافت اما از نظر خصوصیات ارگانولپتیکی غلظت ۰/۹ درصد قابل قبول نبود و براساس این تحقیق میزان ۰/۶ درصد اسانس از نظر اثرات ضدباکتری لیستریا منوسایتوژنز و تاثیرات قابل قبول ارگانولپتیکی تایید شد [۲٤].

در پژوهش دیگری توسط سینق و همکاران در سال ۲۰۰۱ صورت گرفت، اثرات سینرژیستیک عصاره سیر و نیسین به صورت تغییرات حداقل غلظت نگهدارنده (Minimum Inhibitory Concentration) (MIC) بر روی ٦ سویه لیستریا منوسایتوژنز در یک مدل محیط کشت آبگوشت Triptose phosphate بررسی شد و در استفاده هر دو ماده بر روی ممانعت از رشد این باکتری اثر سینرژیستیک مشاهده شد [۲].

سیوروپلو (Sivropoulou) و همکاران در سال ۱۹۹٦ و کارمن (Karman) و همکاران در سال ۲۰۰۱ چنین گزارش نمودند که اسانس‌های گیاهی غنی از ترکیبات فنولیک (کارواکرول و تیمول) از فعالیت ضدمیکروبی بالایی برخوردارند [۲۳، ۱۸].

بدین‌ترتیب بررسی متون نشان می‌دهد که تاکنون بررسی‌های زیادی بر روی اثرات ضدمیکروبی اسانس‌های گیاهی مختلف و اثر ممانعت از رشد این اسانس‌ها بر روی باکتری‌های بیماری‌زای منتقل شده از طریق مواد غذایی صورت پذیرفته است که اکثریت این بررسی‌ها در محیط‌های کشت آزمایشگاهی بوده است از سویی پژوهش‌های محدودی که در همین مورد و با استفاده از مدل‌های غذایی مانند گوشت چرخ‌کرده گاو، هات داگ و پنیر انجام شده است مؤید این نکته می‌باشد که اثرات ضدمیکروبی اسانس‌های گیاهی در محیط‌های آزمایشگاهی بیشتر از مدل‌های غذایی است و از سویی افزایش غلظت اسانس‌ها موجب افزایش اثر ضدمیکروبی آنها می‌شود که با این تحقیق که بر روی ماهی شور انجام گرفته همخوانی دارد. ترکیبات موجود اسانس‌های گیاهی به منطقه جغرافیایی، تنوع و سن گیاه و روش خشک کردن و اسانس‌گیری گیاه بستگی دارد [۵]. کارواکرول و تیمول از ترکیبات مهم موجود در اسانس آویشن شیرازی هستند که در شرایط آزمایشگاهی اثرات مهاری بر لیستریا مونوسیتوژن از خود نشان داده است [۲٤]. در مطالعات شفیعی و جوادنیا، ترکیبات اصلی آویشن شیرازی چیده شده از استان یزد را ترکیب فنولی کارواکرول (۶۱/۲۹ درصد) و تیمول (۲۵/۱۸

Downloaded from jmp.ir at 22:57 +0330 on Saturday February 17th 2018

درصد) عنوان کردند [۲۵]. اما در این پژوهش، همان طور که در جدول شماره ۱ مشاهده می‌شود، اسانس آنالیز شده که گیاه آن از استان فارس جمع‌آوری شد، حاوی ۷۱/۱۲ درصد کارواکرول و مقادیر اندک (۰/۴۷ درصد) تیمول می‌باشد که این تفاوت در آنالیز اسانس، کار مقایسه را تا حدودی دشوار می‌کند. ذکر این نکته لازم است که افزایش غلظت اسانس تا حدی که موجب اثرات ارگانو لپتیک نامطلوب نشود قابل توجیه بوده ولی در صورت بروز این اثرات، استفاده در غلظت‌های بالا قابل توصیه و توجیه نمی‌باشد.

در این تحقیق با افزایش غلظت اسانس آویشن شیرازی تا ۰/۴۰۵ درصد اثرات ممانعت از رشد آن بر روی باکتری لیستریا منوسایتوژنز افزایش یافت اما تفاوت معنی‌داری بین غلظت ۰/۴۰۵ درصد با ۰/۸۱۰ درصد مشاهده نشد. در غلظت‌های بالای اسانس آویشن شیرازی (در غلظت ۰/۸۱۰ درصد)، همانطور که در جدول شماره ۲ مشاهده می شود، اسانس علاوه بر ممانعت باکتری از رشد، تا حدودی اثر کشندگی بر باکتری لیستریا منوسیتوژن اعمال کرده است و مقادیر باکتری را در روزهای اولیه از مقدار دوز تلقیح پایین‌تر آورده است، اما غلظت ۰/۸۱۰ درصد موجب اثرات ارگانولپتیک غیرقابل قبول شد در حالی که میزان ۰/۴۰۵ درصد اسانس موجبات بهبود طعم و مزه فرآورده را فراهم آورد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از همکاری آقای دکتر طاهری در آماده‌سازی نمونه‌های ماهی تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. Burt S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods- a review. International *J. Food Microbiol*. 2004; 3: 223 - 53.

2. Bhurinder S,Bernadette F, Martin R. Synergistic inhibition of *Listeria monocytogenes* by nisin and garlic extract. *Food Microbiol.* 2001; 18: 133 - 9.

3. Fazeli MR, Amin G, Ahmadian Attari MM, Ashliani H. Jamalifar H and samadi N. Antimicrobial activities of Iranian sumac and avishan- e shirazi (Zataria *multiflora*) against some food- born bacteria. *Food Control* 2007; 6: 646 - 9.

4. Juneja Vijay K, Xuetong F, Pena Ramos A, Diaz – Cinco M and Pacheco - Aguilar R. The effect of grapefruit extract and temperature abuse on growth of *Clostridium perfringens* from spore inocula in marinated Sous- vide chichen products. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 2006; 7: 100 - 6.

5. Bagambula CF, Ultendaele M, Debevere J. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, Carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-Cymene Towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiol.* 2004; 21: 33 - 42.

6. Chi-zhang Y,Yam K L and chikindas M L. Effective control of *Listeria monocytogenes* by Combination of nisin formulated and slowly released into a broth system. *Inter. J. Food Microbiol*. 2004: 90; 15 - 22.

7. Etlayebi K, Yamani J El, Rossi- Hassani BD. Synergistic effects of nisin and thymol on antimicrobial activities in *Listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Letters* 2000; 18: 131 - 5.

8. Holley R A, Pated D. Improvement in shelf – life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiol.* 2005; 22: 272 - 92.

9. Jey J M, Loessner M J Golden D A. Modern Food Microbiology. Seventh Edition. springer science and Business media 2005, pp: 591 - 617.

10. Pouch D P, Ito K. Compendium of Methods for the Microbiological Examinaion of

Downloaded from jmp.ir at 22:57 +0330 on Saturday February 17th 2018

Foods.Fourth Edition American Health Association,Washington D. C. 2001, pp: 343 - 53.

11. Gondhi M and Chikindas M L. *Listeria*:A Foodborne pathogen that knows low to survive. *Inter. J. Food Microbiol*. 2007; 113: 1 - 15.

12. Daganany M, Listeriosis: Clinical presentation. *FEMS Immunology and Medical Microbiol*. 2003; 35: 173 - 5.

13. Rocourt J, Jacquet ch, Reilly A. Epidemiology of human listeriosis and seafoods, *Inter. J. Food Microbiol*. 2000; 6: 197 – 209.

14. Gasanov U, Hughes D, Hansbro P M. Methods for the isolation and identification of *listeria spp*. and *Listeria monocytogenes* – a review. *FEMS Microbiol. Rev*. 2005; 29: 851 - 75.

15. Karunasager I, Karunasagar I. Listeria in tropical fish and fishery products. *Inter. J. Food Microbiol*. 2000; 62: 177 - 81.

16. WHO 2002. Food safety and Foodborne Illness. World Health Organization. Fact sheet 237, revised January 2002 – Geneva.

17. Hosseinzadeh H, Ramezani M, Salmani A. Antinociceptive anti – inflammatory and acute toxicity effects of *Zataria multiflora* Boiss. Extracts in mice and rats. *J. Ethanopharmacol.* 2000; 73: 379 - 85.

18. Karaman S, Digrak M, Ravid U, Ilcim A. Antimibacterial and antifungal activity of essential oils of thymus revolutus celak from Turkey. *J. Ethopharmacol.* 2001; 76: 183 - 6.

19. Misaghi A and Akhandzadeh Basti A. Effects of *Zataria multiflora* Boiss. Essential oil and nisin on *Bacillus cereus* ATCC 11778. *Food Control* 2007; 18: 1043 – 9.

20. Munoz M, Guevara L, Palop A, Jabera J, Fernandez PS. Determination of the effect of plant essential oils obtained by supercritical fluid extraction on the growth and viability of *Listeria momocytogenes* in broth and food systems using flow cytometry. *LWT Food Science and Technol*. 2009; 42: 220 - 7.

21. Paparella A, Taccogna L, Aguzzi I. Claves-gopez C, Serio A. Marsilio F. Suzzi G. Flow cytometic assessmentof the antimicrobial axtivity of essential oils against *Listeria monocytogenes*. *Food Control* 2008; 19: 1147 – 82.

22. Singh A, Singh R H, Bhunia A K, singh N. Efficacy of plant essential oils as antimicrobial agents against *Listeria monocytogenes in* hotdogs. *lebensm – wiss Technol* . 2003; 36: 787 - 94.

23. Sivropoulou A, Papinkolaou E, Nikolaou C, Kokkini S, Lanaras T, Arsenakis M. Antimicrobial and Cytotoxic activities of *Oreganum* essential oils. *J. Agriculture and Food Chem*. 1996; 4: 1202 - 5.

24. Sollomakos N, Govaris A, koidis P, Botsogloun N. The antimicrobial effect of thyme essential oil nisin and their combination against *Listeria monocytogenes* in minced beef during refrigerated storage. *Food Microbiol*. 2008; 80: 159 - 66.

25. Shaffiee A and Javidnia K. Composition of essential oil of Zataria *multiflora*, *Planta Medicine* 1997; 63: 371 – 2.