نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۰، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۳، ص. ۱۲۸-۱۲۲

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 10, No. 2, Suumer 2014, p. 122-128

اثر بازدارندگی اسانس زیره سیاه بر رشد باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در محیط‌های مدل شبیه سازی شده و گوشت ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus frisii kutum*)

ثنا ربیعی[۱]- هدایت حسینی[۲*]- مسعود رضائی[۳]

تاریخ دریافت:۱۳۹۱/۱۲/۱۱
تاریخ پذیرش:۱۳۹۲/۷/۱۷

چکیده

ممانعت از رشد باکتری‌های بیماریزا و افزایش زمان ماندگاری ماهی بعنوان یک ماده غذایی فساد پذیر با استفاده از روش‌های ایمن از جمله موضوعاتی است که از دیر باز توجه محققین صنایع غذایی و شیلات را به خود معطوف ساخته است. هدف از تحقیق حاضر بررسی اثر بازدارندگی اسانس زیره سیاه بر رشد باکتری *لیستریا مونویستوژنز* PTCC 1298 تلقیح شده در محیط‌های مدل شبیه سازی شده و گوشت ماهی سفید بود. اسانس زیره سیاه در سطوح ۰/۰۵، ۰/۲ و ۰/۴ درصد به محیط عصاره پپتون ماهی و عصاره ماهی سفید که قبل از اضافه کردن اسانس به هر میلی لیتر از آن‌ها 10^4 باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* تلقیح شده بود، اضافه شد و طی مدت ۱۲ روز در دمای ۴°C فعالیت ضدلیستریایی آن در مقایسه با تیمار شاهد مورد مطالعه قرار گرفت. در ادامه اثر اسانس زیره سیاه در سطوح ۰/۲ و ۰/۴ درصد بر رشد *لیستریا مونوسیتوژنز* تلقیح شده به گوشت ماهی سفید مورد ارزیابی قرار گرفت. اسانس زیره سیاه در محیط عصاره پپتون ماهی اثر باکتری کشی قوی بر علیه *لیستریا مونوسیتوژنز* نشان داد. این اثر به طور معنی‌داری در عصاره ماهی سفید کاهش یافت. تأثیر بازدارندگی اسانس زیره سیاه در گوشت ماهی سفید به طور چشمگیری کمتر از محیط‌های مدل شبیه سازی شده ماهی بود.

واژه‌های کلیدی: اسانس زیره سیاه، محیط شبیه سازی شده، عصاره پپتون ماهی، لیستریا مونوسیتوژنز

مقدمه

لیستریا مونوسیتوژنز به عنوان پاتوژن منتقل شده از مواد غذایی مساله ساز و کشنده در سراسر جهان به حساب می‌آید (Nair *et al.*, 2005). این ارگانیسم عامل سببی لیستریوزیس، بیماری تهاجمی شدید با نرخ مرگ و میر بالا تا ۳۰ درصد می‌باشد (Ye *et al.*, 2008). توانایی این پاتوژن برای رشد در دمای یخچال، تحمل شرایط اسیدی و غلظت بالای کلرید سدیم، تشکیل بیوفیلم در سطح تجهیزات کارخانه‌های فرآوری و مقاومت نسبت به شستشو و ضدعفونی سطحی سبب می‌شود به راحتی سبب آلودگی، بقا و رشد در مواد غذایی شود (Feldhusen, 2000؛ Souza *et al.*, 2008؛ Nair *et al.*, 2005). تاکنون گزارش‌های متعددی در ارتباط با آلودگی انواع ماهیان تازه و دودی (Basti *et al.*, 2006 ؛ Souza *et al.*, 2008؛ Modaresi *et al.*, 2011) و ایجاد عفونت لیستریایی در اثر مصرف آن‌ها گزارش شده است (Lennon *et al.*, 1984 ؛ Miettinen *et al.*, 1999 ؛ Cruz *et al.*, 2008).

انواعی از ترکیبات شیمیایی از قبیل نیترات سدیم و لاکتات سدیم به منظور کنترل این پاتوژن در مواد غذایی به کار می‌روند. نگرانی‌های موجود ناشی از اثرات سرطان زایی و سمیت احتمالی این ترکیبات زمینه تحقیقات گسترده‌ای را در خصوص جایگزین کردن آن‌ها با ترکیبات طبیعی فراهم آورده است (Singh *et al.*, 2003؛ Yoon *et al.*, 2011). در این میان اسانس‌های گیاهی به دلیل پذیرش بالا توسط مصرف کنندگان، قرار گرفتن جزو ترکیبات GRAS[۴] و دارا بودن طیف وسیعی از فعالیت آنتی میکروبی توجه

۱ و ۳- دانشجوی کارشناسی ارشد و دانشیار گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، مازندران، نور
۲- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران
(*- نویسنده مسئول: Email: hedayat@sbmu.ac.ir)

4- Generally recognized as safe

ویژه‌ای را به خود اختصاص داده‌اند (Burt, 2004؛ Gutierrez *et al.*, 2009). زیره سیاه (زیره ایرانی یا زیره کوهی) با نام علمی *Bunium persicum*، بومی خاورمیانه به ویژه جنوب شرقی ایران می‌باشد. زیره سیاه در طب سنتی به عنوان عامل ضد نفخ، ضد اسهال و اختلالات گوارشی کاربرد دارد. عصاره زیره سیاه در کاهش قند خون و جلوگیری از دیابت و چاقی نیز مفید است. زیره سیاه به صورت گسترده به عنوان چاشنی و طعم دهنده در مواد غذایی استفاده می‌شود. بذرهای رسیده گیاه حاوی ۵-۱۴ درصد روغن فرار هستند که می‌تواند برای مقابله با میکروب‌های بیماریزا و جایگزینی بی‌ضرر برای افزودنی‌های شیمیایی به کار رود (Zargari, 1998؛ Sofi *et al.*, 2009؛ Oroojalian *et al.*, 2010).

در سال‌های اخیر مطالعاتی در رابطه با استفاده از محیط‌های کشت شبیه سازی شده به منظور ارزیابی اثر ضدمیکروبی اسانس‌های گیاهی انجام شده است (Sakaguchi and Wendakoon, 1993؛ Gutierrez *et al.*, 2009؛ Oliveira *et al.*, 2010؛ Reis *et al.*, 2011). نتایج به دست آمده در این نوع محیطها نسبت به نتایج به دست آمده در محیط‌های آزمایشگاهی استاندارد، قبل از انجام مطالعات بعدی با استفاده از مواد غذایی کاربردی‌تر می‌باشد، این مدل‌ها منعکس کننده ترکیب ماده غذایی هستند و می‌توانند در تعیین غلظت اپتیمم اسانس به کار روند. این مدل‌ها همچنین می‌توانند به منظور مطالعه اثر سینرژیستی اسانس‌ها بایکدیگر سایر ترکیبات ضد میکروب طبیعی به منظور دستیابی به فعالیت ضدمیکروب مؤثر در حداکثر غلظت فاقد اثرات نامطلوب حسی به کار روند (Gutierrez *et al.*, 2009؛ Souza *et al.*, 2008).

هدف از تحقیق حاضر بررسی خصوصیات بازدارندگی اسانس زیره سیاه بر رشد *لیستریا مونوسیتوژنز* در محیط‌های شبیه سازی شده و گوشت ماهی سفید می‌باشد.

مواد و روش ها

اسانس زیره سیاه

اسانس دانه زیره سیاه از شرکت گل‌قطره (مشهد، ایران) خریداری شده و پیش از آزمایش درون بطری تیره رنگ در دمای یخچال نگهداری شد.

شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس زیره سیاه

به منظور شناسایی ترکیبات تشکیل دهنده اسانس زیره سیاه، اسانس به دستگاه گاز کروماتوگراف متصل به طیف سنج جرمی Gas Chromatography/Mass Spectrophotometer (GC/MS) تزریق شد. بدین منظور دستگاه GC/MS مدل Agilent 5975 با ستون مویینه HB-5MS به طول ۳۰m و قطر داخلی mm ۰/۲۵ و ضخامت لایه داخلی µm ۰/۲۵ استفاده شد. برنامه دمایی ستون به شرح زیر تنظیم شد: دمای ابتدایی آون ۵۰°C توقف در این دما ۵ دقیقه، دمای انتهایی آون °C ۲۴۰ توقف در این دما ۳ دقیقه و گرادیان حرارتی ۷ درجه سانتیگراد بر دقیقه بود. دمای اتاقک تزریق °C ۲۸۰ بود و از گاز هلیوم به عنوان گاز حامل با سرعت جریان ۰/۸ میلی‌لیتر در دقیقه استفاده شد. ظرفیت الکتریکی شناساگر IE ۷۰ eV بود. شناسایی طیف‌ها به کمک شاخص بازداری آن‌ها و مقایسه آن با شاخص‌های موجود در کتب مرجع و مقالات و با استفاده از اطلاعات موجود در کتابخانه کامپیوتری صورت گرفت (Adams, 2001).

تهیه ماهی

۱۵ کیلوگرم ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*) از بازار ماهی فروشان شهرستان نور تهیه گردید و همراه با یخ به آزمایشگاه فرآوری دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس منتقل شد.

آماده سازی باکتری لیستریا مونوسیتوژنز برای تلقیح

سویه استاندارد و لیوفیلیزه باکتری *Listeria monocytogenes* PTCC 1298 از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. آمپول لیوفیلیزه ابتدا در شرایط استریل باز شده و به محیط کشت مایع BHI (Brain Heart Infusion broth) انتقال یافت و به مدت ۲۴ ساعت در دمای °C ۳۷ انکوبه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از آن به محیط Fish peptone broth (FPB- حاوی ۱ درصد کلرید سدیم، ۳/۴ درصد پپتون ماهی و ۰/۵ درصد عصاره مخمر) انتقال داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای °C ۳۷ انکوبه شد. سپس محیط کشت حاوی باکتری به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شده و با محلول پپتون نمکی استریل (محلول کلرید سدیم ۰/۸۵ درصد و پپتون باکتریولوژی ۰/۱ درصد) جایگزین شد. تعداد باکتری‌ها در محلول با روش کدورت سنجی در طول موج ۵۷۰ نانومتر به دست آمد به طوری که جذب نوری ۰/۰۸ تا ۰/۱ تقریبا معادل 10^8 باکتری در هر میلی‌لیتر در نظر گرفته شد (Abdollahzadeh و همکاران، ۲۰۱۱). برای به دست آوردن این محدوده جذب نوری رقیق سازی با محلول پپتون نمکی استریل صورت گرفت. سپس رقت‌های سریالی از آن تهیه شد تا دوز تلقیح باکتری به دست آید. به منظور تأیید نتایج شمارش باکتریایی به روش کشت سطحی روی محیط PALCAM listeria selective agar و گرمخانه گذاری به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ صورت پذیرفت.

آماده سازی محیطهای مدل شبیه سازی شده ماهی، تلقیح باکتری و تیمار بندی

عصاره ماهی سفید بر اساس روش Nilsson و همکاران (۱۹۹۸) تهیه شد. ابتدا قطعات ماهی با آب مقطر به نسبت ۲:۱ (وزنی/حجمی)

به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شده و سپس با استفاده از فیلتر قهوه فیلتر شدند. عصاره حاصل با افزودن ۵/۹۸ گرم بر لیتر KH_2PO_4 و ۹/۷۵ گرم بر لیتر K_2HPO_4 بافری شده و pH آن با استفاده از اسیدکلریدریک ۱ مولار روی ۶/۲ ثابت شد. عصاره پپتون ماهی نیز با افزودن ۳/۴ درصد پپتون ماهی و ۰/۵ درصد عصاره مخمر به آب مقطر تهیه شد. به منظور حل شدن اسانس در محیط براث از ۰/۱۵ درصد (وزنی/حجمی) آگار باکتریولوژی استفاده شد. عصاره‌های آماده شده با مقادیر ۹/۹ میلی‌لیتر در لوله‌های آزمایش توزیع شده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ °C درجه استریل و ۲۴ ساعت پیش از تلقیح در دمای ۴ °C نگهداری شد. به منظور تلقیح باکتری ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی محتوی 10^6 باکتری در هر میلی‌لیتر به هر کدام از لوله‌های آزمایش اضافه شد به طوری که تعداد باکتری در هر لوله 10^4 CFU/ml بود. اسانس زیره سیاه در سطوح ۰، ۰/۰۵، ۰/۲ و ۰/۴ درصد بلافاصله پس از تلقیح باکتری به هر کدام از لوله‌های آزمایش افزوده شد.

آماده سازی مدل گوشت ماهی سفید، تلقیح باکتری و تیمار بندی

فیله ماهی سفید به قطعات یکسان (۳×۳×۱ cm) تقسیم و درون کیسه پلاستیکی به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ °C اتوکلاو شد. قطعات ماهی به صورت جداگانه به مدت یک دقیقه در ۵۰ میلی‌لیتر محلول سرم فیزیولوژی حاوی 10^4 باکتری در هر میلی‌لیتر غوطه‌ور شدند، به منظور اطمینان از تلقیح کامل از همزن شیشه‌ای برای مخلوط کردن استفاده شد. سپس قطعات ماهی به مدت ۳۰ دقیقه زیر هود بیولوژیک خشک شدند. برای هر تیمار ۴ قطعه گوشت در نظر گرفته شد. تیمار کنترل در محلول ۰/۲ درصد آگار و تیمارهای حاوی اسانس در محلول ۰/۲ درصد آگار حاوی غلظت‌های ۰/۲ و ۰/۴ درصد اسانس زیره سیاه به مدت ۳۰ ثانیه غوطه‌ور شدند. سپس درون کیسه‌های پلاستیکی استریل بسته بندی و در طول ۱۲ روز دوره آزمایش در دمای یخچال (۴ °C) نگهداری شدند (Souza *et al.*, 2009).

شمارش جمعیت باکتری لیستریا مونوسیتوژنز

به منظور شمارش جمعیت باکتری لیستریا مونوسیتوژنز از محیط کشت انتخابی PALCAM Listeria Selective Agar و مکمل PALCAM Listeria Selective Supplement استفاده شد (Reis *et al.*, 2011). شمارش میکروبی در فواصل زمانی صفر، ۴، ۸ و ۱۲ روز صورت پذیرفت. جهت شمارش باکتری در تیمارهای گوشت ماهی سفید در هر نمونه گیری، قطعات ماهی ابتدا وزن شده وبه ازای هر یک گرم نمونه ماهی ۹ ml محلول سرم فیزیولوژی به آن‌ها اضافه شد به طوری که رقت اولیه یک دهم به دست آمد، سپس هموژن شده و رقت‌های سریالی (۱:۱۰) از آن‌ها تهیه شده و ۱ ml از رقت‌های مورد نظر با استفاده از روش کشت آمیخته کشت داده شد (Abdollahzadeh و همکاران، ۲۰۱۱). به منظور شمارش باکتری در محیط‌های شبیه سازی شده ماهی در هر بار زمان نمونه گیری ۱ میلی لیتر از عصاره مورد نظر به طور سریالی رقیق شده و با روش کشت آمیخته کشت داده شد. پلیت‌های حاصل به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷°C گرمخانه گذاری شدند. باکتری لیستریا مونوسیتوژنز بر روی این محیط کلنی‌هایی به رنگ سفید با هاله مشکی تشکیل داد.

تجزیه و تحلیل آماری

کلیه آزمایش‌ها در ۳ تکرار صورت پذیرفت. آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار $spss_{16}$ صورت گرفت. پس از کنترل نرمال بودن داده‌ها توسط آزمون آماری کلموگروف اسمیرنف از تجزیه واریانس یک طرفه به منظور تعیین اختلاف معنی‌دار بین تیمارها و از آزمون دانکن برای مقایسه میانگین‌ها استفاده شد.

نتایج

ترکیبات شناسایی شده از اسانس زیره سیاه، زمان استخراج و درصد کمی ترکیبات که با استفاده از روش کروماتوگرافی گازی – طیف نگار به دست آمد در جدول ۱ نشان داده شده است. در این روش ۱۱ نوع ترکیب مختلف از اسانس زیره سیاه شناسایی شد که ۸۲/۵۱ درصد از اسانس را تشکیل می‌دادند. عمده ترین ترکیب موجود کومین آلدهید به میزان ۲۲/۳۷ درصد بود. سایر ترکیبات شامل گاماترپینن (۱۹/۳۶ درصد)، گاماترپینن-۷-آل (۱۱/۸۵ درصد)، آلفاترپینن (۷/۳ درصد) و پاراسیمن (۶/۵۶ درصد) بود.

اثر بازدارنگی اسانس زیره سیاه بر رشد باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در محیط‌های مدل شبیه سازی شده ماهی

با توجه به جدول ۲ جمعیت باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در تیمار شاهد با تعداد اولیه ۴/۱ log CFU/ml در طول دوره آزمایش افزایش یافته و در پایان دوره آزمایش به ۸/۱ log CFU/ml رسید. در تیمار حاوی غلظت ۰/۰۵ درصد اسانس در طول دوره آزمایش اثر باکتریواستاتیک مشاهده شد و تعداد باکتری در این تیمار در روزهای ۴، ۸ و ۱۲ تغییر معنی‌داری نداشت ($P>0/05$).

جدول ۱- درصد ترکیبات شناسایی شده از اسانس زیره سیاه توسط دستگاه GC/MS

شماره	نام ترکیب	درصد	زمان استخراج (دقیقه)
۱	پاراسیمن	۶/۵۶	۱۳/۵۵
۲	ال-لیمونن	۳/۰۱	۱۳/۶۸۸
۳	گاماترپینن	۱۹/۳۶	۱۵/۲۵۸
۴	سیکلوهگزانون	۱/۰۳	۲۱/۸۵۳
۵	کومین آلدهید	۲۲/۳۷۵	۲۴/۱۰۴
۶	۲-کارن-۱۰-آل	۴/۵	۲۶/۰۳۲
۷	سیس-اپوکسی-اوسیمن	۰/۶	۲۸/۲۱۶
۸	آلفاترپینن	۷/۳	۳۴/۳۲۳
۹	۸-آلیل-۲-آمینو-۶-متیل ایمیدازول	۳/۸	۳۶/۶۴۸
۱۰	گاماترپیین-۷-آل	۱۱/۸۴	۵۷/۵۵۸
۱۱	آلفا توجنن	۲/۱۴	۷۳/۳۲۱
	جمع	۸۲/۵۱	

در تیمارهای حاوی غلظت ۰/۲ و ۰/۴ درصد اسانس جمعیت باکتری بلافاصله پس از تلقیح به طور معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) کاهش یافته و پس از گذشت ۱۲ روز با ۳/۲ log CFU/ml کاهش به log ۰/۴ CFU/ml رسید. در پایان دوره آزمایش تفاوت معنی‌داری بین تعداد نهایی باکتری در تیمارهای حاوی غلظت ۰/۲ و ۰/۴ درصد اسانس وجود نداشت ($P>۰/۰۵$).

اثر بازدارندگی اسانس زیره سیاه در سه سطح ۰/۰۵، ۰/۲ و ۰/۴ درصد علیه لیستریا مونوسیتوژنز در عصاره ماهی سفید در جدول ۳ نشان داده شده است. با گذشت ۱۲ روز در دمای ۴°C جمعیت *لیستریا مونوسیتوژنز* در تیمار شاهد افزایش یافته و در پایان دوره آزمایش به ۷/۶ log CFU/ml رسید. در تیمار حاوی غلظت ۰/۰۵ درصد اسانس جمعیت باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* با ۱/۷ log CFU/ml افزایش به ۵/۹ log CFU/ml رسید. جمعیت نهایی باکتری در این تیمار نسبت به تیمار شاهد log CFU/ml ۱ کمتر بود. در تیمارهای حاوی غلظت ۰/۲ و ۰/۴ درصد اسانس نیز پس از گذشت ۱۲ روز کاهش معنی‌داری (۰/۲ log CFU/ml) در تعداد اولیه باکتری ایجاد شد ($P<۰/۰۵$). در پایان دوره آزمایش تفاوت معنی‌داری بین تعداد نهایی باکتری در تیمارهای حاوی غلظت ۰/۲ و ۰/۴ درصد اسانس وجود نداشت ($P>۰/۰۵$). تعداد نهایی باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* در این تیمارها نسبت به تیمار کنترل ۳/۲ log CFU/ml کمتر بود.

اثر بازدارنگی اسانس زیره سیاه بر رشد لیستریا مونوسیتوژنز در گوشت ماهی سفید

تأثیر اسانس زیره سیاه بر رشد باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* در مدل گوشت ماهی سفید در جدول ۳ نشان داده شده است. اسانس زیره سیاه درغلظت‌های ۰/۲ و ۰/۴ درصد بلافاصله پس از تلقیح جمعیت باکتری را نسبت به تیمار شاهد به طور معناداری کاهش داد ($P<۰/۰۵$). جمعیت باکتری در تیمار حاوی غلظت ۰/۴ درصد اسانس زیره سیاه در طول دوره آزمایش به طور معناداری کمتر از تیمار شاهد بود ($P<۰/۰۵$).

جدول ۲- تعداد لیستریا بر حسب log CFU/ml در محیط عصاره پپتون ماهی در حضور غلظت‌های مختلف اسانس زیره سیاه طی ۱۲ روز نگهداری در دمای ٤°C

تیمار	روز			
	۰	٤	۸	۱۲
شاهد	۴/۱۸±۰/۰۲^{Da}	۴/۷۸±۰/۱۲^{Ca}	۶/۴۹±۰/۰۷^{Ba}	۸/۱۱±۰/۱۴^{Aa}
زیره سیاه ۰/۰۵٪	۴/۲۴±۰/۰۲^{Ba}	۴/۱۷±۰/۰۰^{Bb}	۴/۲۲±۰/۰۷^{Bc}	۴/۳۷±۰/۰۳^{Ac}
زیره سیاه ۰/۲٪	۳/۹۵±۰/۰۰^{Aa}	۳/۶۸±۰/۰۶^{Ac}	۲/۹۹±۰/۰۵^{Bd}	۰/۴۸±۰/۴۳^{Ce}
زیره سیاه ۰/۴٪	۳/۷۵±۰/۱۴^{Aa}	۳/۴۵±۰/۰۰^{Bc}	۲/۷۷±۰/۱۲^{Ce}	۰/۴۸±۰/۱۵^{De}

حروف کوچک (a، b، c) در هر روز، نشان دهنده اختلاف معنی دار بین تیمارهای مختلف در سطح P<۰/۰۵

حروف بزرگ (A، B، C) نشان دهنده اختلاف معنی دار در طول دوره برای هر تیمار در سطح P<۰/۰۵

جدول ۳- تعداد لیستریا بر حسب log CFU/ml در محیط عصاره ماهی سفید در حضور غلظت‌های مختلف اسانس زیره سیاه و نمک در طی ۱۲ روز نگهداری در دمای ٤°C

تیمار	روز			
	۰	٤	۸	۱۲
شاهد	۴/۲۵±۰/۰۰^{Da}	۴/۴۹±۰/۰۳^{Cb}	۵/۸۳±۰/۱۲ ^{Ba}	۷/۰۶±۰/۰۱^{Aa}
زیره سیاه ٪۰/۰۵	۴/۲±۰/۰۲^{Da}	۴/۳۳±۰/۰۳^{Cc}	۵/۱۵±۰/۰۴^{Bb}	۵/۹۵±۰/۰۹^{Ab}
زیره سیاه ٪۰/۲	۴/۱۶±۰/۰۲^{Aa}	۴/۱۳±۰/۱^{ABe}	۴/۰۹±۰/۰۱^{ABd}	۳/۹۲±۰/۰۳^{Ce}
زیره سیاه ٪۰/۴	۴/۱۳±۰/۰۵^{Aa}	۴/۰۴±۰/۳^{Af}	۴/۰۳±۰/۰۳^{Ad}	۳/۸۶±۰/۰۸^{Be}

جدول ٤- تعداد لیستریا بر حسب log CFU/g در گوشت ماهی سفید در حضور غلظت‌های مختلف اسانس زیره سیاه در طی ۱۲ روز نگهداری در دمای ٤°C

تیمار	روز			
	۰	٤	۸	۱۲
شاهد	۳/۷۷±۰/۰۴^{Da}	۶/۵۰±۰/۰۵^{Ca}	۷/۳۱±۰/۱۱^{Ba}	۸/۸۵±۰/۱۴^{Aa}
زیره سیاه ٪ ۰/۲	۲/۰۲±۰/۰۱^{Db}	۵/۴±۰/۰۷^{Cb}	۷/۰۸±۰/۰۵^{Bb}	۸/۷۳±۰/۱۱^{Aab}
زیره سیاه ٪۰/۴	۲/۱۵±۰/۰۸^{Db}	۵/۳۸±۰/۱۲^{Cb}	۶/۸۸±۰/۰۰^{Bb}	۸/۵۴±۰/۰۵^{Ab}

در روز چهارم و دوازدهم آزمایش جمعیت باکتری در تیمار حاوی غلظت ۰/۲ درصد اسانس تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد نداشت ($P<0/05$) ولی در روز هشتم آزمایش به طور معنی‌داری کمتر بود ($P<0/05$).

بحث

اجزای سازنده اسانس‌های گیاهی گروه متنوعی از ترکیبات آلی با وزن مولکولی پایین ولی در عین حال دارای فعالیت ضدمیکروبی متفاوت می‌باشند (Hyldgaard *et al.*, 2012). در مطالعه صورت گرفته توسط Mazidi و همکاران (۲۰۱۲) ترکیبات اصلی شناسایی شده برای اسانس زیره سیاه شامل گاماترپینن (۳۱/۱۳-۲۸/۱۶ درصد)، کومین آلدهید (۲۹/۲۰-۲۴/۵۸) و پاراسیمن (۱۶/۵۰-۱۴/۶۷) بودند. در مطالعه Oorojalian و همکاران (۲۰۱۰) گاماترپینن (۴۴/۲ درصد)، کومین آلدهید (۱۶/۹ درصد)، گاماترپینن-۷-آل (۱۰/۵ درصد) و پاراسیمن (۸ درصد) به عنوان ترکیبات اصلی این اسانس گزارش شدند. در مطالعه حاضر کومین آلدهید (۲۲/۳۷ درصد)، گاماترپینن (۱۹/۳۶ درصد)، گاماترپینن-۷-آل (۱۱/۸۵ درصد)، آلفاترپینن (۷/۳ درصد) و پاراسیمن (۶/۵۶ درصد) بیشترین درصد ترکیبات اسانس را تشکیل می‌دادند و ترکیبات اصلی شناسایی شده مطابق سایر مطالعات صورت گرفته بود. اختلافات موجود در کمیت و کیفیت ترکیبات شناسایی شده در مطالعات مختلف می‌تواند ناشی از اختلافات ژنتیکی، مناطق جغرافیایی محل رشد، سن گیاه، قسمت مورد استفاده گیاه، روش اسانس گیری و نوع حلال به کار رفته باشد (Nostro *et al.*, 2000؛ Azizi *et al.*, 2009؛ Zargari, 1998). در مطالعات مختلف به منظور بررسی اثرات ضدباکتریایی و نگهدارندگی اسانس‌های گیاهی از مدل‌های مختلفی استفاده شده است. در مطالعه حاضر از محیط عصاره پپتون ماهی، عصاره ماهی سفید و مدل گوشت ماهی سفید به منظور بررسی اثر بازدارندگی اسانس زیره سیاه بر رشد باکتری لیستریا مونوسیتوژنز استفاده شد. با توجه به نتایج طی دوره نگهداری در دمای یخچال، جمعیت *لیستریا مونوسیتوژنز* تلقیح شده به عصاره پپتون ماهی افزایش یافته و به ۸/۱ log CFU/ml رسید که نشان دهنده سرمادوست بودن باکتری مذکور است. اسانس زیره سیاه با غلظت ۰/۰۵ درصد در عصاره پپتون ماهی اثر باکتریواستاتیک نشان داد و جمعیت باکتری در طول دوره آزمایش تغییر معنی‌داری نداشت. در مطالعه Oroojalian و همکاران (۲۰۱۰) حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) اسانس زیره سیاه بر علیه لیستریا مونوسیتوژنز در محیط کشت مایع Muller Hinton Broth (MHB) ۰/۰۷۵ درصد بود. اسانس زیره سیاه با غلظت‌های ۰/۲ و ۰/۴ درصد اثر باکتری کشی قوی در عصاره پپتون ماهی نشان داده و جمعیت باکتری را به میزان ۳/۲ log CFU/ml کاهش داد.

با توجه به نتایج حاصل از دستگاه GS/MS کومین آلدهید به عنوان ترکیب اصلی اسانس زیره سیاه شناسایی شد، Sekine و همکاران (۲۰۰۷) در مطالعه ای بر روی اثرات ضدقارچی ۵۰ نوع گیاه مختلف بیان کردند که اسانس زیره سیاه بیشترین فعالیت را نشان می‌دهد بعلاوه در میان ۷ ترکیب شناسایی شده از اسانس این گیاه کومین آلدهید بیشترین فعالیت رادارا می‌باشد. پاراسیمن و گاماترپینن ترکیبات دیگر اسانس، سبب تورم غشای سلولی باکتری می‌شود با این حال سبب نشت مواد درون سلولی نمی‌شود. پاراسیمن به تنهایی

فاقد فعالیت ضدمیکروبی قابل توجه است ولی در ترکیب با سایر ترکیبات فنولی فعالیت قابل توجهی نشان می‌دهد. پاراسیمن یک مولکول هیدروفوبیک است که با ورود به بخش لیپیدی غشای سلولی باکتری سبب تسهیل ورود منوترپن‌های اسانس از غشای سلولی باکتری می‌شود (Goudarzi *et al*., 2011).

با توجه به نتایج، اثر بازدارندگی اسانس زیره سیاه در محیط عصاره ماهی سفید به طور معنی‌داری کاهش یافت به طوری که در تیمار حاوی غلظت ۰/۰۵ درصد اسانس جمعیت باکتری به طور معنی داری افزایش یافت و در عصاره‌های حاوی غلظت ۰/۲ و ۰/۴ درصد اسانس جمعیت باکتری به میزان log CFU/ml ۰/۲ کاهش یافت. به طور کلی فعالیت ترکیبات ضد میکروب طبیعی در محیط‌های مدل غذایی نسبت به محیط‌های کشت آزمایشگاهی به طور قابل توجهی کاهش می‌یابد (Gutierrez *et al*., 2009). علت این موضوع را می‌توان چنین بیان کرد که وجود مواد مغذی بیشتر در مدل‌های غذایی باکتری‌ها را قادر می‌سازد که آسیب‌های وارده را سریعتر ترمیم کنند، همچنین میزان بالای چربی و پروتئین در این محیط‌ها، باکتری را از تأثیر بازدارندگی اسانس مصون نگه می‌دارد چرا که وقتی اسانس در فاز چربی ماده غذایی حل می‌گردد میزان کمتری از آن جهت ممانعت از رشد باکتری موجود در فاز آبی در دسترس خواهد بود (Gill *et al*., 2002؛ Burt, 2004). به جهت اینکه غلظت ۰/۰۵ درصد اسانس زیره سیاه در محیط عصاره ماهی سفید قادر به کاهش تعداد اولیه باکتری لیستریا مونوسیتوژنز تلقیح شده نبود در گوشت ماهی سفید دو غلظت ۰/۲ و ۰/۴درصد اسانس مورد مطالعه قرار گرفت. با توجه به نتایج جمعیت باکتری لیستریا در تیمارهای مدل گوشت ماهی سفید افزایش یافته و در پایان دوره آزمایش به بیش از log CFU/ml ۸ رسید. هرچند جمعیت نهایی باکتری در تیمار حاوی غلظت ۰/۴ درصد اسانس به طور معنی‌داری کمتر از تیمار شاهد بود.

اثر بازدارندگی اسانس زیره سیاه در مدل گوشت ماهی سفید نسبت به عصاره ماهی به طور قابل توجهی کاهش یافت که با مطالعات Oliveira و همکاران (۲۰۱۰) و Souza و همکاران (۲۰۰۹) در عصاره و مدل گوشت همخوانی داشت. در توجیه این پدیده می‌توان بیان کرد که ترکیبات نیتروژنی و چربی موجود در گوشت از طریق تشکیل ترکیبات کمپلکس با اجزای فنولی اسانس سبب کاهش فعالیت آن می‌شوند. بعلاوه میزان پایین آب در گوشت نسبت به عصاره آن باعث می‌شود ماده ضدمیکروب به راحتی نتواند به نواحی هدف در سلول باکتری نزدیک شود. به طور کلی محققان دریافته‌اند که غلظت بیشتری از اسانس‌های گیاهی برای رسیدن به کارایی ضد باکتریایی مؤثر در محصولات غذایی در مقایسه با محیط‌های کشت آزمایشگاهی نیاز است این نسبت حدود ۲ برابر در شیر کم چرب (Juven *et al*., 1994)، ۱۰ برابر در سوسیس گوشت خوک (Pandit and Shelef 1994)، ۵۰ برابر در سوپ (Smid and Ultee, 2000) و ۲۵ تا ۱۰۰ برابر در پنیر نرم (Mendoza-Yepez *et al*., 1997) متغیر است.

نتیجه گیری

استفاده از اسانس زیره سیاه در عصاره ماهی سفید بطور معنی‌داری از رشد باکتری لیستریا مونوسیتوژنز جلوگیری نمود هرچند در مدل گوشت ماهی سفید نتوانست رشد پاتوژن را به میزان قابل قبولی کاهش دهد. از آنجایی که استفاده از غلظت‌های بالاتر اسانس نیز ممکن است سبب ایجاد اثرات نامطلوب حسی گشته و مورد پذیرش مصرف کنندگان نباشد توصیه می‌گردد که از تکنولوژی تلفیقی نظیر استفاده توأم از اسانس‌های گیاهی و سایر ترکیبات ضدمیکروب طبیعی همانند ترکیبات موجود در دود چوب، کلرید سدیم، نایسین و اسیدهای خوراکی، همچنین تکنولوژی‌های نوین نظیر بسته بندی خلاء یا اتمسفر اصلاح شده، میکروکپسوله کردن اسانس‌های گیاهی و فشارهیدرواستاتیک بالا استفاده شود.

منابع

Abdollahzadeh, E., Rezaei, M., Hosseini, H., Safari, R., 2011, Effects of nisin and thyme essential oil, individually and in combination, on inoculated populations of *Listeria monocytogenes* in minced silver carp. Iran J Nutr Sci Food Technol. 4,13-20

Adams, R. P., 2001, Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Quadra pole Mass Spectroscopy, Carol Stream, IL, Allured. 51-367.

Basti, A., Misaghi, A., Salehi, T. Z., Kamkar, A., 2006, Bacterial pathogens in fresh, smoked and salted Iranian fish. Food Cont. 17, 183–188.

Azizi, M., Davareenejad, G., Bos, R., Woerdenbag, H. J., Kayser, O., 2009, Essential oil content and constituents of Black zira (*Bunium persicum* [Boiss.] B. Fedtsch.) from Iran during field cultivation (domestication). J. Essent Oil Res. 21, 78-82.

Burt, S., 2004, Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. Int. J. Food Microbiol. 94, 223– 253.

Cruz, C. D., Silvestre, F. A., Kinoshita, E. M., Landgraf, M., Franco, B. D. G. M., Destro, M. T., 2008,

Epidemiological survey of *Listeria monocytogenes* in a gravlax salmon processing line. Braz. J. Microbiol. 39, 375-383.

Feldhusen, F., 2000, The role of seafood in bacterial foodborne diseases. Microb Infect. 2, 1651−1660.

Gill, A. O., Delaquis, P., Russo, P., Holley, R. A., 2002, Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. Int. J. Food Microbiol 73, 83–92.

Goudarzi, G. R., Saharkhiz, M. J., Sattari, M., Zomorodian, K., 2011, Antibacterial Activity and Chemical Composition of Ajowan (*Carum copticum* Benth. & Hook) Essential Oil. J. Med. Plant. Res 13, 203-208.

Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., Bourke, P., 2009, Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components. Food Microbiol. 26, 142–150.

Hyldgaard, M., Mygind, T., LouiseMeyer, R., 2012, Essential oils in food preservation: modeofaction,synergies,and interactions with food matrix components. Front Microbiol. 3, 1-24.

Juven, B. J., Kanner, J., Schved, F., Weisslowicz, H., 1994, Factors that interact with the antimicrobial action of thyme essential oil and its active constituents. J. Appl. Bacteriol . 76, 623-631.

Lennon, D., Lewis, B., Mantell, C., Becroft, D., Dove, K., Farmer, S., Tonkin, S., Yeates, N., Stamp, R., Mickleson, K., 1984, Epidemic perinatal listeriosis. Pediatr. Infect. Dis. 3, 30–34.

Mazidi, S., Rezaei, K., Golmakani, M. T., Sharifan, A., Rezazadeh, S., 2012, Antioxidant Activity of Essential Oil from Black Zira (*Bunium persicum* Boiss.) Obtained by Microwave-assisted Hydrodistillation. J. Agric. Sci. Technol 14, 1013-1022.

Miettinen, M. K., Siitonen, A., Heiskanen, P., Haajanen, H., Bjo¨rkroth, K. J., Korkeala, H. J., 1999, Molecular epidemiology of an outbreak of febrile gastroenteritis caused by *Listeria monocytogenes* in cold-smoked rainbow trout. J. Clin Microbiol. 37, 2358–2360.

Modaresi, R., Mardani, K., Tukmechi, A., Owanagh, A., 2011, Prevalence of Listeria spp. in fish obtained from Urmia fish markets African Journal of Microbiology Research. 5, 5398-5401.

Mendoza-Yepez, M. J., Sanchez-Hidalgo, L. E., Maertens, G., Marin-Iniesta, F., 1997, Inhibition of *Listeria monocytogenes* and other bacteria by plant essential oil (DMS) on Spanish soft cheese. J. Food Saf. 17,47-55.

Nair, M. K. M., Vasudevan, P., Venkitanarayanan, K., 2005, Antibacterial effect of black seed oil on *Listeria monocytogenes*. Food Cont;16:395–8.

Nilsson, L., Gram, L., Huss, H. H., 1998, Growth Control of *Listeria monocytogenes* on Cold-Smoked Salmon Using a Competitive Lactic Acid Bacteria Flora. J. Food Prot. 62, 336–342.

Nostro, A., Germano, M. P., Angelo, V. A., Connatelli, M. A., 2000, Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. Lett. Appl. Microbiol. 30, 289 - 294.

Oliveira, C. E. V. D., Stamford, T. L. M., Neto, N. J. G., Souza, E. L. D., 2010, Inhibition of *Staphylococcus aureus* in broth and meat broth using synergies of phenolics and organic acids. Int. J. Food Microbiol. 137, 312–316.

Oroojalian, F., Kasra-Kermanshahi, R., Azizi, M., Bassami, M. R., 2010, Phytochemical composition of the essential oils from three Apiaceae species and their antibacterial effects on food-borne pathogens. Food Chem. 120, 765–770.

Pandit, V. A., Shelef, L. A., 1994, Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*). Food Microbiol . 11: 57-63.

Reis, F. B. D., Souza, V. M. D., Thomaz, M. R. S., Fernandes, L. P., Oliveira, W. P. D., Martinis, E. C. P. D., 2011, Use of *Carnobacterium maltaromaticum* cultures and hydroalcoholic extract of *Lippia sidoides* Cham. against *Listeria monocytogenes* in fish model systems. Int. J. Food Microbiol. 146, 228–234.

Singh, A., Singh, R., Bhuniaa, A., Singh, N., 2003, Efficacy of plant essential oils as antimicrobial agents against Listeria monocytogenes in hotdogs. LWT - Food Science and Technology. 36, 787-794.

Sofi, P. A., Zeerak, N. A., Singh, P., 2009, Kala zeera (*Bunium persicum* Bioss.): a Kashmirian high value crop. Turk J Biol. 33, 249-258.

Souza, V. M., Alves, V. F., Destro, M. T., De Martinis, E. C. P., 2008, Quantitative evaluation of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed Surubim fish (pseudoplatystoma sp). Braz. J. Microbiol. 38, 527-528.

Ultee, A., Smid, E. J., 2001, Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *Int. J. Food Microbiol.* 64,373–378.

Wendakoon, C. N., Sakaguchi, M., 1993, Combined effect of sodium chloride and clove on growth and biogenic amine formation of Enterobacter aerogenes in mackerel muscle extract. J. Food Prot. 56, 410– 413.

Yoon, J. I., Bajpai, V. K., Kang, S. C., 2011, Synergistic effect of nisin and cone essential oil of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu against Listeria monocytogenes in milk samples. Food Chem. Toxicol 49.

Ye, M., Neetoo, H., Chen, H., Effectiveness of chitosan-coated plastic films incorporating antimicrobials in inhibition of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon. Int J Food Microbiol.127,235–40

Zargari, A., 1988, Medicinal plants (Vol. 2). Tehran, Iran, Tehran University Publications.