ارزیابی ترکیبات شیمیایی و فعالیت ضدمیکروبی اسانس پونه کوهی (.Mentha longifolia L) و دانه زیره سبز (.Cuminum cyminum L) به تنهایی و توأم با نیسین

دکتر محمدرضا پژوهی[۱]، دکتر حسین تاجیک*[۲]، دکتر افشین آخوندزاده[۳]، دکتر حسن گندمی[٤]، دکتر علی احسانی[٥]، دکتر فرنود شکوهی ثابت جلالی[٦]

تاریخ دریافت: ۸۸/٦/۳، تاریخ پذیرش: ۸۹/۷/۲٤

چکیده

پیش زمینه و هدف: گیاه پونه کوهی و دانه زیره سبز از زمان‌های قدیم به‌عنوان ادویه و داروی طب سنتی به‌خوبی شناخته شده‌اند. هدف از این مطالعه ارزیابی ترکیب شیمیایی اسانس گیاهان پونه کوهی و دانه زیره سبز و فعالیت ضدمیکروبی آن‌ها روی فرم‌های رویشی باکتری‌های باسیلوس سرئوس و باسیلوس سوبتیلیس به تنهایی و در ترکیب با نیسین بوده است.

مواد و روش کار: استخراج اسانس گیاهان مورد مطالعه با استفاده از روش تقطیر با بخار آب و به کمک دستگاه کلونجر صورت پذیرفت و به کمک دستگاه گازکروماتوگرافی-طیف نگار جرمی ترکیب شیمیایی آن‌ها آنالیز شد. به منظور تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی اسانس‌ها و نیسین از روش Broth microdilution susceptibility assay استفاده شد.

یافته‌ها: بیشترین ترکیب تشکیل دهنده اسانس پونه کوهی و زیره سبز به ترتیب پولگون با ۳۱/۵۴درصد و کومین آلدهید با ۲۹/۰۲ درصد بود. نتایج ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی نشان داد که اسانس پونه کوهی، زیره سبز و نیسین هر کدام به تنهایی به ترتیب در غلظت‌های µg/ml ۰/۲۵٪، ۰/۲۵٪ و ۱۰ بر روی باسیلوس سرئوس و در غلظت‌های µg/ml ۰/۲۵٪، ۰/۱۲۵٪ و ۰/۲۵ بر روی باسیلوس سوبتیلیس موثر بودند.

بحث و نتیجه گیری: با توجه به نتایج بدست آمده تأثیر ضدمیکروبی اسانس دانه زیره سبز به تنهایی و توام با نیسین بیشتر از اسانس پونه کوهی می‌باشد. با توجه به فعالیت ضدمیکروبی این ترکیبات می‌توان فعالیت آن‌ها را بر روی دیگر پاتوژن‌های بیماری‌زا بررسی و به راهکار مناسبی برای غلبه بر آن‌ها دست یافت.

کلید واژه‌ها: پونه کوهی، زیره سبز، اثر ضدمیکروبی، نیسین

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و یکم، شماره چهارم، ص ۳۳۱-۳۲۴، آذر و دی ۱۳۸۹

آدرس مکاتبه: ارومیه، پردیس نازلو، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، تلفن: ۰۴۴۱۲۷۷۰۵۰۸

E-mail: h.tajik@urmia.ac.ir

مقدمه

مسمومیت‌های غذایی در انسان به واسطه مصرف غذاهای حاوی مقادیر قابل توجه میکروارگانیسم‌های توکسین زا ایجاد می‌شود که در این میان باکتری‌ها، مهم‌ترین عوامل میکروبی بیماری‌های غذازاد محسوب می‌شوند. محققان، تولیدکنندگان مواد غذایی و موسسات ناظر بهداشتی پیوسته نگران رشد و افزایش تعداد موارد شیوع بیماری‌های ایجاد شده بوسیله میکروارگانیسم‌های فسادزا و پاتوژن در مواد غذایی می‌باشند.

[۱] دستیار بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

[۲] دانشیار بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه (نویسنده مسئول)

[۳] استاد بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

[٤] استادیار بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

[٥] استادیار بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

[٦] استادیار علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

باسیلوس‌ها باکتری‌های گرم مثبت، میله ای اسپورزا با گسترش همه جایی می‌باشند. باسیلوس سرئوس از جمله پاتوژن‌های غذازاد بوده که علاوه بر مسمومیت غذایی عامل فساد مواد غذایی نیز می‌باشد (۱). این باکتری انواع مختلفی توکسین تولید می‌کند که همراه با دو سندرم اسهال زا و استفراغ آور است (۲). باسیلوس سوبتیلیس به‌عنوان یک ارگانیسم فسادزا در مواد غذایی، همچون باسیلوس سرئوس می‌تواند توکسین مقاوم به حرارتی تولید کند که علایم مشابه سندرم استفراغ آور باسیلوس سرئوس دارد. بیشترین غذاهای آلوده به باسیلوس‌ها شامل ادویه‌ها، آرد، غلات، فراورده‌های گیاهی، گوشت و محصولات برنج می‌باشد (۳). در سال‌های اخیر بروز بیماری‌های غذازاد علی‌رغم بهبود شرایط بهداشتی رو به افزایش می‌باشد. بنابراین در جهت اطمینان از بهداشت و سلامت مواد غذایی توجه بیشتری برای کنترل آلودگی ناشی از این ارگانیسم‌ها ضروری به‌نظر می‌رسد. به منظور جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌های پاتوژن و فسادزا در مواد غذایی از افرودنی‌های شیمیایی مختلف استفاده می‌شود که امروزه به‌دلیل اثرات نامطلوب شان از جمله سرطان‌زایی، سمیت و ایجاد مقاومت در میکروارگانیسم‌ها، اکثر مصرف کنندگان مواد غذایی خواستار استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی مشتق از منابع گیاهی، حیوانی و میکروبی هستند تا علاوه بر افزایش زمان ماندگاری غذا از اثرات زیان بار نگهدارنده‌های شیمیایی مصون باشند (۴). از جمله ترکیبات طبیعی که امروزه به‌طور فزاینده ای در مواد غذایی مورد بررسی و استفاده قرار گرفته، اسانس ادویه‌ها و گیاهان می‌باشد که نه تنها مانع رشد میکروارگانیسم‌ها می‌شود بلکه به‌عنوان طعم دهنده در مواد غذایی کاربرد فراوانی دارد (۶،۵). گیاه پونه کوهی[1] از جنس .Mentha L در خانواده Laminaceae قرار دارد. اساساً به‌صورت وحشی در مکان‌های مرطوب مانند حاشیه رودخانه‌ها روییده و در سراسر مناطق معتدله نواحی مرکزی و جنوب اروپا، جنوب غربی آسیا و استرالیا رشد می‌کند. برگ، گل و ساقه گونه‌های پونه در چای‌های گیاهی یا به‌عنوان افزودنی در مخلوط‌های ادویه‌های تجارتی برای طعم دادن به غذاها استفاده می‌شود. این گیاه در طب سنتی برای درمان تهوع، برونشیت، نفخ و بی اشتهایی بکار گرفته می‌شود (۷). مطالعات متعددی به منظور ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی اسانس این گیاه صورت گرفته است (۹،۸). دانه زیره سبز[2] از زمان‌های قدیم به‌عنوان ادویه و داروی طب سنتی بخوبی شناخته شده است. گیاه زیره سبز به‌طور وحشی در نواحی وسیعی با آب و هوای مدیترانه ای می‌روید. بیشترین ترکیبات شناخته شده اسانس دانه زیره سبز شامل کومین آلدهید، مشتقات منتون، گاما ترپینن و پارا سیمن می‌باشند که مسئول بو و اثرات بیولوژیکی آن هستند (۱۰). فعالیت ضدمیکروبی اسانس زیره سبز بر روی پاتوژن‌های غذازاد از جمله لیستریا مونوسیتوژنز و اشرشیاکلی به خوبی نشان داده شده است (۱۱). در رابطه با فعالیت ضدمیکروبی اسانس‌ها و کارایی آن‌ها بر علیه انواع میکروارگانیسم‌ها به تنهایی و یا در ترکیب با سایر مواد و روش‌های محافظت مواد غذایی مطالعات متعددی صورت گرفته است (۱۴-۱۲). کاربرد صنعتی و تکنولوژیکی اسانس‌ها در مواد غذایی مستلزم استفاده از غلظت‌های بالاتری از اسانس‌های گیاهی در مقایسه با محیط کشت آزمایشگاهی می‌باشد. درحالی‌که استفاده از این غلظت‌ها علاوه بر عدم صرفه اقتصادی، ممکن است اثرات نامطلوبی بر روی طعم ماده غذایی داشته باشد. بنابراین برای کاهش خطرات و معضلات ناشی از ارگانیسم‌های پاتوژن و فسادزا تعیین میزان فعالیت ضدمیکروبی اسانس‌ها در ترکیب با دیگر مواد ضدمیکروبی، به‌منظور کاهش میزان غلظت مورد استفاده از آن‌ها و همچنین اجتناب از تغییرات طعمی‌در مواد غذایی ضروری می‌باشد (۱۳). یکی دیگر از ترکیبات ضدمیکروبی طبیعی که به‌طور وسیعی در صنعت مواد غذایی کاربرد پیدا کرده، نیسین است. نیسین، باکتریوسین پلی پپتیدی مقاوم به حرارت تولید شده به‌وسیله سویه‌های معینی از لاکتوکوکوس لاکتیس تحت گونه لاکتیس می‌باشد که مورد تأیید سازمان جهانی سلامت (WHO) به‌عنوان یک ترکیب محافظت کننده ضدمیکروبی طبیعی در موادغذایی قلمداد شده و در بیش از ۵۰ کشور از آن به‌عنوان افزودنی غذایی استفاده می‌شود (۱۵). اهداف این مطالعه شامل ارزیابی ترکیب شیمیایی اسانس‌های دانه زیره سبز و پونه کوهی و ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی آن‌ها بر علیه سلول‌های رویشی باسیلوس سرئوس و باسیلوس سوبتیلیس در محیط آزمایشگاهی و همچنین بررسی تأثیر اسانس‌های مورد مطالعه در ترکیب با نیسین بر علیه باکتری‌های ذکر شده می‌باشد.

مواد و روش کار

استخراج اسانس

روغن فرار گیاه خشک شده پونه کوهی و دانه زیره سبز پس از تأیید نام علمی توسط گیاه شناس پژوهشکده گیاهان دارویی تهران وابسته به جهاد دانشگاهی، به روش تقطیر با آب[3] و با استفاده از دستگاه کلونجر استخراج شد.

[1] Mentha longifolia L
[2] Cuminum cyminum L
[3] Hydro-distillation

آنالیز گاز کروماتوگرافی اسانس

برای ارزیابی و شناسایی ترکیبات شیمیایی و غلظت آن‌ها در اسانس‌های مورد مطالعه از دستگاه گاز کروماتوگرافی مدل Agilent 6890 متصل به طیف نگار جرمی از نوع Agilent 5973 (GC/MS) استفاده شد.

نیسین

پودر نیسین استفاده شده در این مطالعه حاوی ۲.۵ درصد نیسین فعال، از شرکت SIGMA–ALDRICH (United Kingdom, EC 215-807-5) خریداری شد. جهت آماده سازی نیسین از اسید کلریدریک ۰/۰۲ مول در لیتر (با pH حدود ۱/۶) استفاده گردید. غلظت‌های نیسین در این مطالعه به‌صورت نیسین فعال بیان می‌شود.

تهیه سوسپانسیون باکتریایی

در این مطالعه باکتری‌های Bacillus cereus ATCC 11778 و Bacillus subtilis ATCC 6633 تهیه شده از گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی دانشکده دامپزشکی تهران مورد استفاده قرار گرفت. به منظور تهیه و محاسبه میزان تلقیح باکتری‌های مورد مطالعه از روش اسپکتروفوتومتری استفاده شد. بدین ترتیب که یک کلونی از کشت باکتری‌های مورد مطالعه به محیط آبگوشت BHI انتقال داده و به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه گذاری شد این کار حداقل برای دو بار متوالی انجام گردید. برای این منظور از سوسپانسیون کشت‌های باکتریایی رقت‌های مختلف تهیه شده و بعد از قرائت جذب نوری آن‌ها به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر (Pharmacia LKB-Nova Spacell England) در طول موج ۶۰۰ نانومتر، شمارش باکتریایی به روش کشت سطحی(Spread Plate Count) در محیط آگار صورت گرفته و جذب نوری معادل 10^7 CFU/ml محاسبه گردید. بدین ترتیب در هر بار انجام آزمایش سوسپانسیون باکتریایی با جذب نوری محاسبه شده، تهیه و جهت تلقیح استفاده گردید.

ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی

برای تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی (MIC) اسانس‌ها و نیسین از روش Broth microdilution susceptibility assay در پلیت‌های میکروتیتر ۹۶ چاهکی (Sarsted, inc. USA) استفاده شد. برای افزایش حلالیت و گسترش یکنواخت اسانس‌ها در محیط کشت از دی متیل سولفوکساید ۵ درصد به‌عنوان امولسیفایر و آگار آگار به میزان ۰/۰۵ درصد (به‌عنوان پایدار کننده) استفاده گردید. غلظت‌های مورد مطالعه نیسین از ۰/۰۱۶ تا ۲۰ میکروگرم در میلی لیتر و غلظت‌های اسانس‌های مورد مطالعه از ۰/۰۳۲ تا ۱درصد (به‌صورت رقت‌های سریالی) بود. به‌طور خلاصه در هر چاهک ۸۰ میکرولیتر محیط آبگوشت BHI استریل، ۵۰ میکرولیتر از رقت‌های متوالی اسانس‌های مورد مطالعه و ۵۰ میکرولیتر از رقت‌های متوالی نیسین و در نهایت ۲۰ میکرولیتر کشت باکتریایی (حاوی حدود 5×10^6 CFU ml^{-1}) در هر چاهک اضافه گردید. کنترل مثبت (چاهک حاوی باکتری + آبگوشت BHI بدون ترکیب ضدمیکروبی) و کنترل منفی (ترکیب ضدمیکروبی + آبگوشت BHI بدون باکتری) نیز در هر مرحله آزمایش در نظر گرفته شد. پس از افزودن غلظت‌های مورد نظر از ترکیبات ضد میکروبی و باکتری‌های مورد مطالعه، پلیت‌های میکروتیتر به مدت ۲۴ ساعت در دمای تقریبی ۳۷ درجه سانتی‌گراد با دور ۳۰۰ rpm در دستگاه ترموشیکر میکروپلیت (PST- 60HL PLUS, BOECO, Germany) برای مخلوط شدن و گرم‌خانه گذاری قرار داده شدند. بعد از طی شدن زمان گرم‌خانه گذاری برای تعیین MIC، چاهک‌ها برای وجود کدورت به طریق چشمی بررسی شدند. حداقل غلظتی که ایجاد حالت عدم رشد یا عدم کدورت مشهود در مقایسه با گروه کنترل کند به‌عنوان MIC تعیین گردید.

ارزیابی اثر ترکیبی اسانس‌های مورد مطالعه و نیسین

برای تعیین اثر متقابل اسانس‌های مورد مطالعه و نیسین از شاخصی به نام FIC Index استفاده گردید که از فرمول زیر محاسبه می‌شود.

$$\text{شاخص FIC} = \frac{\text{MIC اسانس در حالت توام با نیسین}}{\text{MIC اسانس به تنهایی}} + \frac{\text{MIC نیسین در حالت توام با نیسین}}{\text{MIC نیسین به تنهایی}}$$

بنابراین در صورتی که شاخص FIC ترکیبات ضدمیکروبی کوچکتر از یک باشد اثر متقابل ترکیبات ضدمیکروبی سینرژیستی، اگر برابر یک باشد برهم کنش افزایشی و در صورتی که بزرگ‌تر از یک باشد آنتاگونیستی است (۱۶).

ارزیابی منحنی رشد

تأثیر متقابل غلظت‌های تحت بازدارنده (subMIC) ترکیب اسانس‌های مورد مطالعه به همراه نیسین بر علیه فرم رویشی باکتری‌های باسیلوس سرئوس و باسیلوس سوبتیلیس به‌وسیله ارزیابی رشد آن‌ها در محیط آبگوشت BHI بررسی گردید. بدین ترتیب که فلاسک‌های حاوی آبگوشت BHI استریل تهیه و غلظت‌های subMIC از اسانس‌های مورد مطالعه و نیسین به صورت تنها و ترکیبی به فلاسک‌ها اضافه شد. سپس از هر باکتری به میزان تقریبی 5×10^6 CFU ml^{-1} به هر فلاسک تلقیح و به مدت شش ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری

گردید. به منظور ارزیابی رشد باکتری‌ها هر ساعت یک بار (ساعت ۰،۱،۲،۳،۴،۵و ۶) از فلاسک‌ها شمارش کلونی یه روش کشت سطحی صورت گرفت.

یافته‌ها

نتایج آنالیز ترکیبات شیمیایی اسانس پونه کوهی و دانه زیره سبز به‌وسیله دستگاه GC/MS به ترتیب در جداول شماره ۱ و ۲ نشان داده شده است. میزان بازده استخراج اسانس پونه کوهی ۲/۷درصد و دانه زیره سبز ۲/۵ درصد بر اساس وزن خشک نمونه بود. بیشترین ترکیبات اسانس پونه کوهی را پولگون (۳۱/۵۴درصد)، ۱و ۸ سینئول (۱۵/۸۹درصد)، منتوفوران (۱۱/۱۸درصد) و سیس ایزو پولگون (۹/۷۴درصد) و در مورد دانه زیره سبز کومین آلدهید (۲۹/۰۲درصد)، آلفا ترپینن ۷ آل (۲۰/۷درصد)، گاما ترپینن (۱۲/۹۴درصد)، گاما ترپینن ۷ آل (۸/۹۰درصد)، پارا سیمن (۸/۵۵درصد) و بتا پینن (۷/۷۲درصد) تشکیل دادند. مقدار MIC اسانس پونه کوهی، دانه زیره سبز و نیسین به تنهایی و در حالت ترکیبی بر روی باکتری‌های مورد مطالعه در جدول شماره ۳ نشان داده شده است.

نیسین به تنهایی در غلظت ۱۰ و ۰/۲۵ میکروگرم در هر میلی‌لیتر به ترتیب سبب مهار باسیلوس سرئوس و باسیلوس سوبتیلیس شد. میزان MIC پونه کوهی بر علیه باکتری‌های مورد مطالعه یکسان بود درحالی‌که دانه زیره سبز و نیسین به ترتیب در غلظت ۰/۱۲۵درصد و ۰/۲۵ میکروگرم در هر میلی لیتر مانع رشد باکتری باسیلوس سوبتیلیس شدند. نتایج محاسبه شاخص FIC اسانس پونه کوهی، دانه زیره سبز و نیسین، برای ارزیابی اثر متقابل‌شان بر روی هم نشان داد که ترکیب پونه کوهی با نیسین و دانه زیره سبز به همراه نیسین، اثر سینرژیستی برعلیه باکتری‌های باسیلوس سرئوس و باسیلوس سوبتیلیس دارد. مقدار شاخص FIC ترکیب اسانس‌های مورد مطالعه با نیسین کوچکتر از یک بود. اثر ترکیبی غلظت‌های تحت بازدارنده اسانس‌های مورد مطالعه و نیسین بر روی منحنی رشد باکتری‌های باسیلوس سرئوس و سوبتیلیس در جداول شماره ۴ و ۵ نشان داده شده است.

همان‌طور که در جداول نشان داده شده نیسین به‌صورت سینرژیستی تأثیر هر دو اسانس را بر علیه باکتری‌های مورد مطالعه افزایش داده است. از طرف دیگر غلظت تحت بازدارنده نیسین بیشتر از هر دو اسانس موجب کاهش لگاریتم باکتری‌های باقیمانده شده است. بکارگیری توأم اسانس دانه زیره سبز و نیسین نسبت به ترکیب اسانس پونه کوهی و نیسین، بیشترین تأثیر را در کاهش تعداد سلول‌های فرم رویشی هر دو باکتری داشت.

جدول شماره(۱): ترکیب شیمیایی اسانس پونه کوهی شناسایی شده به‌وسیله دستگاه GC/MS

ترکیب	شاخص بازداری	درصد
آلفا پینن	۹۳۹	۱/۸۶
۲ بتا پینن	۹۸۰	۳/۰۷
۱و۸ سینئول	۱۰۳۱	۱۵/۸۹
ایزوپنتیل ۲ منتیل بوتانوات	۱۰۹۹	۰/۹۱
پارامنت ۳ ان ۸ ال	۱۱۴۹	۷
منتوفوران	۱۱۶۳	۱۱/۱۸
سیس ایزو پولگون	۱۱۷۵	۹/۷۴
بورنئول	۱۱۹۰	۱/۰۱
نئو ایزو دی هیدروکاروئول	۱۲۲۰	۱/۷۸
پولگون	۱۲۴۵	۳۱/۵۴
۲ سیکلوهگزان ۱وان	۱۳۴۲	۳/۸۰
۱دسن	۱۳۵۰	۱/۵۸
کاریوفیلن اکساید	۱۵۸۰	۱/۶۰
جمع کل		۹۰/۹۶

جدول شماره (۲): ترکیب شیمیایی اسانس دانه زیره سبز شناسایی شده بوسیله دستگاه GC/MS

ترکیب	شاخص بازداری	درصد
آلفا پینن	۹۳۹	۰/۶۸
بتا پینن	۹۸۰	۷/۷۲
میرسن	۹۹۱	۱/۱
آلفافلاندرن	۱۰۰۳	۰/۷۹
پاراسیمن	۱۰۲۷	۸/۵۵
بتافلاندرن	۱۰۳۳	۰/۸۴
گاماترپینن	۱۰۶۱	۱۲/۹۴
سس دیهیدرو کارون	۱۱۹۵	۴/۴۵
کومین آلدهید	۱۲۴۷	۲۹/۰۲
آلفا ترپینن ۷ آل	۱۲۸۹	۲۰/۷۰
گاما ترپینن ۷ آل	۱۳۰۴	۸/۹۰
جمع کل		۹۵/۶۹

جدول شماره (۳): حداقل غلظت ممانعت کنندگی اسانس پونه کوهی، دانه زیره سبز (درصد) و نیسین (µg/ml) به تنهایی و در ترکیب

سویه‌های باکتری	نیسین	پونه کوهی	دانه زیره سبز	پونه کوهی + نیسین	دانه زیره سبز + نیسین
باسیلوس سرئوس ATCC 11778	۱۰	۰/۲۵	۰/۲۵	۱/۲۵+۰/۰۶۲	۱/۲۵ + ۰/۰۳۱ ۲/۵ +۰/۰۱۵
باسیلوس سوبتیلیس ATCC 6633	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۱۲۵	۰/۰۶۳ + ۰/۱۲۵ ۰/۱۲۵+ ۰/۰۶۲	۰/۰۶۳+ ۰/۰۶۲ ۰/۱۲۵ +۰/۰۳۱

جدول شماره(۴): لگاریتم تعداد سلول‌های رویشی باسیلوس سرئوس تحت تأثیر نیسین (۵ µg/ml)، پونه کوهی (۰/۱۲۵درصد)، زیره سبز (۰/۱۲۵درصد) و اثر ترکیبی آن‌ها در مدت ۶ ساعت گرمخانه گذاری

تیمارها	میانگین لگاریتم تعداد سلول‌های باسیلوس سرئوس± انحراف استاندارد						
	ساعت۰	ساعت ۱	ساعت ۲	ساعت ۳	ساعت ۴	ساعت ۵	ساعت ۶
کنترل	۵/۱۷±۰/۰۲	۵/۲۴±۰/۰۱	۵/۵۶±۰/۰۱	۵/۷۵±۰/۱۱	۶/۲۳±۰/۰۲	۶/۵۴±۰/۰۰	۶/۸۰±۰/۰۳
نیسین	۵/۰۲±۰/۰۱	۴/۶۵±۰/۰۱	۴/۳۷±۰/۰۴	۴/۳۰±۰/۰۳	۴/۲۵±۰/۰۱	۴/۱۸±۰/۰۲	۴/۰۷±۰/۰۱
پونه کوهی	۵/۰۴±۰/۰۵	۴/۸۳±۰/۰۲	۴/۶۶±۰/۰۰	۴/۷۷±۰/۰۲	۴/۸۰±۰/۰۴	۴/۹۰±۰/۰۱	۴/۹۲±۰/۰۰
زیره سبز	۴/۹۷±۰/۰۳	۴/۸۰±۰/۰۰	۴/۵۸±۰/۱۰	۴/۶۰±۰/۰۱	۴/۷۰±۰/۰۱	۴/۷۴±۰/۰۱	۴/۸۰±۰/۰۱
نیسین + پونه کوهی	۵/۱۴±۰/۰۰	۴/۲۱±۰/۰۴	۳/۷۷±۰/۰۲	۳/۶۴±۰/۰۰	۳/۳۵±۰/۰۱	۳/۲۷±۰/۰۳	۳/۱۶±۰/۰۲
نیسین + زیره سبز	۴/۹۵±۰/۰۲	۳/۸۶±۰/۰۱	۳/۴۱±۰/۰۱	۳/۲۰±۰/۰۱	۲/۹۸±۰/۰۳	۲/۸۴±۰/۰۱	۲/۷۰±۰/۰۱

جدول شماره (۵): لگاریتم تعداد سلول‌های رویشی باسیلوس سوبتیلیس تحت تأثیر نیسین (۰/۱۲۵µg/ml)، پونه کوهی (۰/۱۲۵درصد)، زیره سبز (۰/۰۷۵درصد) و اثر ترکیبی آن‌ها در مدت ۶ ساعت گرمخانه گذاری

تیمارها	میانگین لگاریتم تعداد سلول‌های باسیلوس سوبتیلیس± انحراف استاندارد						
	ساعت۰	ساعت ۱	ساعت ۲	ساعت ۳	ساعت ۴	ساعت ۵	ساعت ۶
کنترل	۵/۱۱±۰/۱۰	۵/۲۳±۰/۰۱	۵/۳۷±۰/۰۲	۵/۷۸±۰/۰۱	۶/۱۶±۰/۰۱	۶/۳۱±۰/۰۳	۶/۴۰±۰/۰۰
نیسین	۴/۹۶±۰/۰۱	۴/۷۷±۰/۰۳	۴/۵۵±۰/۰۱	۴/۴۵±۰/۰۲	۴/۵۱±۰/۰۱	۴/۵۶±۰/۰۴	۴/۵۰±۰/۰۰
پونه کوهی	۵/۰۷±۰/۰۴	۵/۰۰±۰/۰۳	۴/۸۴±۰/۰۲	۴/۹۰±۰/۰۰	۵/۰۴±۰/۰۰	۵/۲۰±۰/۰۱	۵/۲۷±۰/۰۳
زیره سبز	۵/۰۰±۰/۰۱	۴/۸۵±۰/۰۱	۴/۷۶±۰/۰۰	۴/۷۴±۰/۰۵	۴/۸۵±۰/۰۲	۵/۰۰±۰/۰۲	۵/۱۰±۰/۰۰
نیسین + پونه کوهی	۵/۰۴±۰/۰۴	۴/۶۲±۰/۰۳	۴/۲۵±۰/۰۲	۴/۱۱±۰/۰۱	۳/۹۲±۰/۱۲	۳/۸۵±۰/۰۱	۳/۷۶±۰/۰۲
نیسین + زیره سبز	۵/۰۰±۰/۰۱	۴/۴۸±۰/۱۰	۴/۱۷±۰/۰۳	۳/۸۰±۰/۰۶	۳/۷۲±۰/۰۲	۳/۵۷±۰/۰۰	۳/۴۸±۰/۰۱

بحث و نتیجه گیری

با توجه به نگرانی مصرف کنندگان و متولیان بهداشتی در رابطه با استفاده از نگهدارنده‌های شیمیایی و مضرات آن‌ها، در سال‌های اخیر گرایش به استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی به‌ویژه اسانس گیاهان و ادویه‌ها و شناسایی ترکیبات آن‌ها افزایش یافته و نتایج مثبتی بر علیه پاتوژن‌های غذایی به همراه داشته است (۱۸،۱۷). نتایج آنالیز ترکیب اسانس پونه کوهی و دانه زیره سبز توسط GC/MS نشان داد که بیشترین ترکیب اسانس پونه کوهی را پولگون و ۱و۸ سینئول تشکیل می‌دهد، در حالی‌که کومین آلدهید و آلفا ترپینن ۷ آل بیشترین درصد را در اسانس دانه زیره سبز دارا بودند. در مطالعه Gulluce و همکاران (۲۰۰۷) نشان داده شد که بیشترین ترکیبات اسانس پونه کوهی از سیس پیپریتون اپوکساید (۱۸/۴درصد) و پولگون (۱۵/۵درصد) تشکیل شده است. در مطالعه Iacobellis و همکاران (۱۹) بیشترین ترکیبات اسانس زیره سبز شامل کومین آلدهید، پارا منت ۱، گاما ترپینن بود. ترکیب تشکیل دهنده اسانس یک گونه از گیاهان نسبت به همان گونه در شرایط منطقه ای مختلف ممکن است اختلاف داشته باشد و این اختلافات می‌تواند ناشی از تفاوت در فصل برداشت، زمان

استخراج اسانس، مناطق مختلف جغرافیایی و حتی بخش‌های مختلف گیاه باشد (۱۷). نتایج این مطالعه نشان داد که اسانس پونه کوهی و دانه زیره سبز بر علیه سلول‌های رویشی باسیلوس سرئوس و سوبتیلیس موثر می‌باشند. در این میان تأثیر ضدمیکروبی اسانس دانه زیره سبز بیشتر مشهود بود. در ارتباط با اثر اسانس‌های مختلف بر باکتریهای مذکور در این مطالعه بررسی‌های مختلفی صورت گرفته است. از جمله در مطالعه Jirovetz و همکاران (۲۰) نشان داده شد اسانس زیره سبز بیشترین فعالیت ضدمیکروبی را در بین قارچ‌های مورد ارزیابی بر علیه آسپرژیلوس نایجر و در بین باکتری‌های گرم مثبت بیشترین تأثیر را بر باکتری باسیلوس سوبتیلیس دارد. در مطالعه حاضر نیز باسیلوس سوبتیلیس نسبت به باسیلوس سرئوس در برابر اسانس زیره سبز حساستر بود. همچنین Iacobellis و همکاران (۱۹) نشان دادند که اسانس زیره سبز بر روی اکثر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی موثر واقع می‌شود اما تأثیر کمی بر روی گونه‌های باکتری پزودوموناس دارد. همچنین در ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی عصاره متانولی و اسانس پونه کوهی توسط Gulluce و همکاران (۸) نشان داده شد که تأثیر ضدمیکروبی اسانس پونه کوهی بیشتر از عصاره متانولی آن می‌باشد. در مطالعه حاضر در صورت استفاده توأم اسانس‌های مورد مطالعه به همراه نیسین فعالیت آن‌ها به‌طور سینرژیستی افزایش می‌یابد و در نتیجه می‌توان با غلظت کم‌تری از هر دو نوع ترکیب ضدمیکروبی بر باکتری‌های مورد مطالعه فائق آمد. در همین رابطه، Pol و همکاران (۲۱) به ارتباط سینرژیستی بین نیسین و کارواکرول (یکی از اجزاء اسانس مرزنجوش و آویشن) بر علیه سلول‌های رویشی باسیلوس سرئوس پی بردند. در مطالعه دیگری نشان داده شد که تأثیر ضدمیکروبی نیسین تولید شده به‌وسیله لاکتوکوکوس لاکتیس KE3 به‌طور فزاینده ای در ترکیب با غلظت‌های تحت بازدارنده تیمول بر روی باسیلوس سوبتیلیس موثر بوده و با افزایش غلظت تیمول این اثر بیشتر نمایان می‌شود (۲۲). همچنین Solomakos و همکاران (۲۳) اثر ضد میکروبی اسانس آویشن، نیسین و ترکیب آن‌ها بر علیه لیستریا مونوسیتوژنز در گوشت چرخ شده گاو در دمای پایین را مورد بررسی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که تیمار گوشت چرخ شده گاو با غلظت ۰/۶درصد اسانس آویشن در ترکیب با غلظت‌های ۵۰۰ یا ۱۰۰۰ واحد نیسین در هر گرم، فعالیت سینرژیستی قوی بر علیه باکتری لیستریا مونوسیتوژنز دارد. به‌طور کلی مطالعات بر روی عملکرد اسانس‌ها از یک مکانیسم واحد تبعیت می‌کند که مربوط به عمل تخریبی آن‌ها روی غشای سلولی می‌باشد (۲۴). در صورت بکارگیری نیسین به‌صورت ترکیبی با اسانس‌های گیاهی طیف عملکردی نیسین به‌عنوان یک محافظت کننده غذایی وسیع تر می‌شود. از آنجا که هر دو نوع ترکیب بر روی غشا سیتوپلاسمی عمل می‌کنند می‌توان یک اثر سینرژیستی یا افزایشی را از یک ترکیب ضدمیکروبی طبیعی انتظار داشت و برای اثر ممانعت کنندگی آن‌ها به غلظت کم‌تری از هر دو ترکیب نیاز خواهد بود. با توجه به این که غلظت‌های مورد نیاز اسانس پونه کوهی و دانه زیره سبز برای غیرفعال کردن فرم رویشی باسیلوس سرئوس و باسیلوس سوبتیلیس موجب تغییرات طعمی در ماده غذایی می‌شود، استفاده از نیسین به‌طور سینرژیستی در مقادیری کمتر به همراه غلظت‌هایی از اسانس‌ها با پذیرش طعمی مناسب، می‌تواند کاربرد عملی در صنعت غذایی داشته باشد بویژه در مواد غذایی که با وجود اعمال تیمار حرارتی احتمال حضور باکتری‌های فسادزا و پاتوژن در آن‌ها می‌باشد. استفاده از غلظت‌های تحت بازدارنده اسانس و نیسین مورد استفاده در این مطالعه باعث افزایش فاز کمون در منحنی رشد باکتری گردید که این موضوع در میکروبیولوژی مواد غذایی از اهمیت ویژه ای برخوردار است. به‌طور کلی نتایج این مطالعه مبین اثر ضدمیکروبی اسانسهای پونه و دانه زیره سبز و نیسین بخصوص بصورت توأم با یکدیگر می‌باشد. اما با وجود این جهت کاربرد عملی این ترکیبات، بایستی اثر آن‌ها بر روی دیگر پاتوژن‌ها و عوامل فساد، در مدل‌های غذایی مختلف مطالعه شود.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از معاونت محترم تحصیلات تکمیلی دانشگاه ارومیه به دلیل مساعدت در تأمین هزینه‌های این پروژه و کارشناس محترم آزمایشگاه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، جناب آقای‌هادی قاسم مهدی به خاطر همکاری‌های بی‌دریغشان در انجام این تحقیق تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

References

1. Varnam AH, Evans MG. Food poisoning: medical and microbiological overview; Bacillus. In: Varnam AH, Evans MG, Editors. Foodborne pathogens, an illustrated text. London: Mosby Year Book; 1991. P.9-19.
2. Schoeni JL, Wong AC. Bacillus cereus food poisoning and its toxins. J Food Prot 2005; 68: 636-48.

3. Granum PE. Bacillus cereus. In: Doyle M, Beuchat L, Editors. Food microbiology: fundaments and frontiers. 3rd Ed. Washington, D.C.: ASM Press; 2007. P. 445-56.
4. Roller S. The quest for natural antimicrobials as novel means of food preservation: status report on European research project. Int Biodeter Biodegr 1995; 36:333-45.
5. Ultee A, Bennik HJ, Moezelaar R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen Bacillus cereus. Appl Environ Microb 2002; 68: 1561-8.
6. Tajik T, Shokouhi Sabetjalali F, Sobhani A, Shahbazi Y, Soleimanzadeh M. In vitro assessment of antimicrobial efficacy of alcoholic extract of Achillea millefolium in comparison with Penicillin derivatives. J Anim Vet Adv 2008; 7(4): 508-11.
7. Iscan G, Kirimer N, Kurkcuoglu M, Baser KH, Demirci F. Antimicrobial screening of Mentha piperita essential oils. J Agric Food Chem 2002; 50: 3943-6.
8. Gulluce M, Sahin F, Sokmen M, Ozer H, Daferera D, Sokme A, et al. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from Mentha longifolia L. ssp. Longifolia. Food Chem 2007; 103: 1449-56.
9. Oyedeji AO, Afolayan AJ. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil isolated from South African Mentha longifolia (L.) L. subsp. capensis (Thunb.) Briq. J Essent Oil Res 2006; 18: 57-9.
10. Lis-Balchin M, Deans SG, Eaglesham E. Relationship between bioactivity and chemical composition of commercial essential oils. Flavour Frag J 1998; 13: 98-104.
11. Gachkar L, Yadegari D, Rezaei MB, Taghizadeh M, Astaneh SA, Rasooli I. Chemical and biological characteristics of Cuminum cyminum and Rosmarinus officinalis essential oils. Food Chem 2007; 102:898-904.
12. Misaghi A, Akhondzadeh Basti A. Effects of Zataria multiflora Boiss. Essential oil and nisin on Bacillus cereus ATCC 11778. Food Control 2007; 8(9): 1043-9.
13. Moosavi MH, Akhondzadeh Basti A, Misaghi A, Zahraei Salehi T, Abbasifar R, Mousavi HA, et al. 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. Food Res Int 2008; 41: 1050-7.
14. Shan B, Cai YZ, Brooks JD, Corke H. The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. Int J Food Microb 2007; 117: 112-19.
15. Delves-Broughton J. Nisin and its uses as a food preservative. Food Technol 1990; 44: 100-12.
16. Parish ME, Davidson PM. Methods for evaluation. In: Davidson PM, Branen AL, Editors. Antimicrobials in foods. 2nd Ed. New York: Marcel Dekker; 1993. P.597–615.
17. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential application in foods-a review. Int J Food Microb 2004; 94: 223-53.
18. Tajik H, Shokouhi F. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of aqueous and alcoholic extracts of yarrow against pathogenic microorganisms. Urmia Med J 2009; 19(4): 358 (Persian).
19. Iacobellis NS, Cantore PL, Capasso F, Senatore F. Antibacterial activity of Cuminum cyminum L. and Carum carvi L. Essent Oils J Agric Food Chem 2006; 53: 57-61.
20. Jirovetz L, Buchbauer G, Stoyanova AS, Georgiev EV, Damianova ST. Composition, quality control and antimicrobial activity of the essential oil of cumin (Cuminum cyminum L.) seeds from

Bulgaria that had been stored for up to 36 years. Int J Food Sci Tech 2005; 40: 305-10.

21. Pol IE, Krommer J, Smid EJ. Bioenergetic consequences of nisin combined with carvacrol towards Bacillus cereus. Innov Food Sci Emerging Technol 2002; 3: 55-61.
22. Ettayebi K, Yamani JE, Rossi-Hassan BD. Synergistic effects of nisin and thymol on antimicrobial activities in Listeria monocytogenes and Bacillus subtilis. FEMS Microbiol Lett 2000; 183: 191-5.
23. Solomakos N, Govaris A, Koidis P, Botsoglou N. The antimicrobial effect of thyme essential oil against Listeria monocytogenes in minced beef during refrigerated storage. Food Microbiol 2008; 25: 120-7.
24. Tassou C, Koutsoumanis K, Nychas GJE. Inhibition of Salmonella enteritidis and Staphylococcus aureus in nutrient broth by mint essential oil. Food Res Int 2000; 33: 273-80.