**مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران**
**سال هشتم، شماره 2، تابستان 1392، صفحات 80-71**

# بررسی اثر بازدارندگی اسانس زنیان بر رشد باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* در محیط عصاره و گوشت ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus frisii kutum*)

ثنا ربیعی[1]، هدایت حسینی[2]، مسعود رضایی[3] ، طناز موسوی[4]

1- دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی منابع طبیعی- فراوری محصولات شیلاتی، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران
2- 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، ایران، پست الکترونیکی: hedayat@sbmu.ac.ir
3- دانشیار گروه فراوری محصولات شیلاتی، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران
4- استادیار گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار، گرمسار، ایران

تاریخ دریافت: 91/9/15 تاریخ پذیرش: 91/12/22

## چکیده

**سابقه و هدف:** به دلیل نگرانی‌های ناشی از اثرات نامطلوب نگهدارنده‌های شیمیایی و هم‌چنین افزایش مقاومت سویه‌های باکتریایی نسبت به ترکیبات ضدباکتری متداول، پژوهش در زمینه‌ی جایگزینی آن‌ها به وسیله‌ی ترکیبات طبیعی ضروری است. هدف از تحقیق حاضر، بررسی اثر بازدارندگی اسانس زنیان بر رشد *لیستریا مونوسیتوژنز* تلقیح شده در مدل عصاره و گوشت ماهی سفید بود.

**مواد و روش‌ها:** ابتدا غلظت حداکثری اسانس زنیان که فاقد تأثیر معنی‌دار بر ویژگی‌های حسی ماهی سفید بود، تعیین شد. در ادامه اثر بازدارندگی اسانس زنیان در سه سطح 0/05، 0/15 و 0/3 درصد و نمک طعام در دو سطح صفر و 4 درصد بر رشد *لیستریا مونوسیتوژنز* تلقیح شده به محیط عصاره ماهی سفید ارزیابی شد. در مرحله بعد اثر اسانس زنیان در سطوح 0/15 و 0/3 درصد به منظور مهار *لیستریا مونوسیتوژنز* تلقیح شده به گوشت ماهی سفید مورد ارزیابی قرار گرفت. نمونه‌ها به مدت 12 روز در دمای 4°C نگهداری شدند و شمارش میکروبی با فواصل زمانی 4 روز صورت پذیرفت.

**یافته‌ها:** در عصاره‌ی ماهی سفید، غلظت 0/15 درصد اسانس زنیان اثر باکتریواستاتیک و غلظت 0/3 درصد آن اثر باکتری‌کشی علیه *لیستریامونوسیتوژنز* نشان داد. افزودن 4 درصد نمک به عصاره‌ی ماهی سفید فعالیت ضدباکتریایی اسانس زنیان را به طور معنی‌داری افزایش داد. استفاده از غلظت‌های 0/15 و 0/3 درصد اسانس در گوشت ماهی سفید رشد باکتری را در مقایسه با تیمار شاهد به طور معنی‌داری کاهش داد.

**نتیجه‌گیری:** استفاده از اسانس زنیان به طور معنی‌داری از رشد باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* جلوگیری کرد. این تأثیر در محیط عصاره‌ی ماهی سفید در مقایسه با گوشت ماهی سفید چشمگیرتر بود.

**واژگان کلیدی:** *لیستریا مونوسیتوژنز*، اسانس زنیان، عصاره‌ی ماهی سفید، نمک طعام، ویژگی‌های حسی

## • مقدمه

جلوگیری از رشد باکتری‌های بیماری‌زا و افزایش زمان ماندگاری ماهی به عنوان یک ماده‌ی غذایی فسادپذیر و حمایت‌کننده از رشد باکتری‌ها با استفاده از روش‌های ایمن از دیرباز توجه محققان ایمنی و کیفیت محصولات شیلاتی را به خود جلب ساخته است. *لیستریا مونوسیتوژنز* یک باکتری گرم مثبت، هوازی تا بی‌هوازی اختیاری و میله‌ای شکل است که باعث بیماری لیستریوزیس می‌شود. این بیماری به دلیل شدت زیاد و ماهیت غیرگوارشی بیماری غیرمعمولی است که یکی از مشکلات سلامت عمومی محسوب می‌شود (3-1). علائم بالینی بارز این بیماری در انسان شامل سپتی‌سمی، انسفالیت (التهاب مغز) و مننژیت است. هم‌چنین، این بیماری ممکن است موجب سقط جنین، بروز مننژیت یا عفونت خونی در نوزادان شود (6-4). هرچند شیوع لیستریوزیس ناشی از مواد غذایی پایین است (0/1 تا 11/1

[ Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-09-13 ]

درصد به ازای هر یک میلیون نفر) نرخ مرگ و میر ناشی از آن به ویژه در افراد در معرض خطر بالاست. این بیماری مسئول 28% موارد مرگ و میر ایجاد شده در ایالت متحده آمریکا اعلام شده است (5).

با توجه به تحقیقات انجام شده در کشور آلودگی به *لیستریا مونوسیتوژنز* در انواع ماهی تازه و دودی گزارش شده است. در مطالعه‌ی *Basti* و همکاران در سال 2006 میزان آلودگی در ماهی فیتوفاگ دودی و کفال نمک‌سود خریداری شده از بازار گیلان به ترتیب 20 و 10 درصد بود (7). مطالعه‌ی *Modaresi* و همکاران در سال 2011 نشان داد که 12/3 درصد از ماهیان خریداری شده از بازار ارومیه آلوده به جنس لیستریا بودند (8).

انواع مختلفی از ترکیبات شیمیایی و سنتزی می‌توانند به منظور مهار این باکتری بیماری‌زا در مواد غذایی به کار روند. نگرانی‌های موجود ناشی از اثرات سرطان‌زایی و سمیت احتمالی این ترکیبات زمینه‌ی تحقیقات گسترده‌ای را در خصوص جایگزین کردن آن‌ها با ترکیبات طبیعی فراهم آورده است (10، 9). ادویه‌ها و گیاهان معطر بخش مهمی از رژیم غذایی انسان را تشکیل می‌دهند و علاوه بر بهبود طعم و بوی مواد غذایی به دلیل داشتن خواص درمانی و محافظت‌کنندگی از دیر باز مورد استفاده قرار گرفته‌اند (11). زنیان با نام علمی *Carum copticum* گیاهی علفی از خانواده‌ی چتریان است که در ایران، هند، پاکستان و مصر رشد می‌کند. در طب بومی ایران میوه‌ی این گیاه به عنوان عامل ضدنفخ، ضدتهوع و ادرار آور به کار می‌رود. دانه‌های رسیده‌ی این گیاه 2 تا 4 درصد اسانس دارند. اسانس این گیاه غنی از مونوترپن‌ها مثل تیمول است و به صورت گسترده به عنوان عامل ضد باکتری تجویز می‌شود. این اسانس در ترکیب داروها نیز به کار می‌رود (13، 12). تاکنون، مطالعات متعددی به منظور ارزیابی ویژگی‌های ضدمیکروبی این اسانس در محیط‌های کشت آزمایشگاهی انجام شده است (15، 14، 12) اما کارایی آن در سیستم‌های غذایی ارزیابی نشده است. با توجه به حضور لیستریا در انواع ماهی و به منظور پاسخ‌گویی هر چه بهتر به علاقه‌ی روزافزون مصرف‌کنندگان مواد غذایی برای حذف نگهدارنده‌های شیمیایی و جایگزینی آن‌ها با انواع طبیعی مثل اسانس‌های گیاهی در پژوهش حاضر اثر مهارکنندگی اسانس زنیان بر رشد *لیستریا مونوسیتوژنز* در مدل عصاره و گوشت ماهی سفید بررسی شد.

## • مواد و روش‌ها

**اسانس زنیان:** اسانس دانه‌ی زنیان از شرکت *گل‌قطره* (مشهد، ایران) خریداری شد و پیش از آزمایش درون ظرف شیشه‌ای تیره و دربسته در دمای یخچال نگهداری شد.

**شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس زنیان:** برای شناسایی ترکیبات تشکیل‌دهنده‌ی اسانس زنیان، اسانس به دستگاه گاز کروماتوگراف متصل به طیف‌سنج جرمی GC/MS (Gas Chromatography/Mass Spectrophotometer) تزریق شد. دستگاه GC/MS ، مدل Agilent 5975 با ستون مویینه‌ی HB-5MS به طول 30m و قطر داخلی 0/25 mm و ضخامت لایه‌ی داخلی 0/25 mm بود. برنامه‌ی دمایی ستون به این شرح تنظیم شد: دمای ابتدایی آون 50°C توقف در این دما 5 دقیقه، دمای انتهایی آون 240°C توقف در این دما 3 دقیقه و گرادیان حرارتی 7°C بر دقیقه بود. دمای اتاقک تزریق 280°C بود و از گاز هلیوم به عنوان گاز حامل با سرعت جریان 0/8 میلی‌لیتر در دقیقه استفاده شد. ظرفیت الکتریکی شناساگر IE 70 eV بود. شناسایی طیف‌ها به کمک شاخص بازداری آن‌ها و مقایسه‌ی آن با شاخص‌های موجود در کتاب‌های مرجع و مقالات و با استفاده از اطلاعات موجود در حافظه دستگاه GC/MS صورت گرفت (16).

**تهیه‌ی ماهی:** 15 کیلوگرم ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*) از بازار ماهی‌فروشان شهرستان نور تهیه شد و همراه با یخ به *آزمایشگاه فراوری دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس* منتقل شد.

**ارزیابی حسی:** ابتدا فیله‌ی ماهی سفید تهیه و به قطعات 40 گرمی تقسیم شد. تیمار شاهد در 80 میلی‌لیتر محلول 0/2 درصد آگار و تیمارهای حاوی اسانس در 80 میلی‌لیتر محلول 0/2 درصد آگار حاوی غلظت‌های 0/15، 0/3 و 0/45 درصد اسانس زنیان به مدت 15 دقیقه در دمای اتاق غوطه‌ور شدند. به منظور انحلال اسانس در آب مقطر از آگار به میزان 0/2 درصد (وزنی/ حجمی) استفاده شد. قطعات ماهی درون کیسه‌های پلاستیکی قرار داده شد و به مدت 24 ساعت در دمای یخچال نگهداری شد. نمونه‌های ماهی به مدت 10 تا 15 دقیقه توسط دستگاه بخارپز خانگی (90±2°C) پخته شد و به صورت گرم درون ظروف کدگذاری شده به گروه ارزیابی حسی ارائه شد. ارزیابی توسط یک گروه هفت نفره‌ی آموزش دیده به روش رتبه‌دهی صورت گرفت. از هریک از اعضا خواسته شد تا بو و طعم

[ Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-09-13 ]

نمونه‌ها را با در نظر گرفتن یک رتبه‌بندی 9 امتیازی ارزیابی کنند. قابلیت پذیرش بر اساس داشتن رتبه‌ی بالای 6 تعیین شد (17).

**آماده‌سازی باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* برای تلقیح:** سویه‌ی استاندارد و لیوفیلیزه‌ی باکتری PTCC 1298 *Listeria monocytogenes* از *سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران* تهیه شد. ویال لیوفیلیزه ابتدا در شرایط استریل باز شد و به محیط کشت مایع BHI ( Brain Heart Infusion Broth) انتقال یافت و به مدت 24 ساعت در دمای 37 °C گرمخانه‌گذاری شد. سپس 100 میکرولیتر از آن به محیط FPB (Fish Peptone Broth) حاوی 1 درصد کلرید سدیم، 3/4 درصد پپتون ماهی و 0/5 درصد عصاره مخمر) انتقال داده شده و به مدت 24 ساعت در دمای 37°C نگهداری شد. محیط کشت حاوی باکتری به مدت 5 دقیقه سانتریفوژ شد و با محلول پپتون نمکی استریل (محلول کلرید سدیم 0/85 درصد و پپتون باکتریولوژی 0/1 درصد) جایگزین شد. تعداد باکتری‌ها در محلول با روش کدورت‌سنجی در طول موج 570 نانومتر به دست آمد. به طوری که جذب نوری 0/08 تا 0/1 تقریبا معادل $10^8$ باکتری در هر میلی‌لیتر در نظر گرفته شد. برای به دست آوردن این محدوده‌ی جذب نوری رقیق‌سازی با محلول پپتون نمکی استریل صورت گرفت. سپس رقت‌های متوالی از آن تهیه شد تا سوسپانسیون باکتری با غلظت $10^6$CFU/ml برای انجام آزمایشات به دست آمد. برای تأیید نتایج، شمارش باکتریایی به روش کشت سطحی روی محیط PALCAM Listeria Selective Agar و گرمخانه‌گذاری به مدت 48 ساعت در دمای 37°C انجام شد (1).

**آماده‌سازی محیط عصاره‌ی ماهی سفید، تیماربندی و شمارش باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز*:** عصاره‌ی ماهی سفید بر اساس روش *Nilsson* و همکاران (1998) تهیه شد (18). به این ترتیب که ابتدا قطعات ماهی با آب مقطر به نسبت 2:1 (وزنی/ حجمی) به مدت 10 دقیقه جوشانده شده و سپس با استفاده از صافی قهوه فیلتر شد. عصاره‌ی حاصل با افزودن 5/98 گرم بر لیتر $KH_2PO_4$ و 9/75 گرم بر لیتر $K_2HPO_4$ بافری شده و pH آن با استفاده از اسیدکلریدریک 1 مولار روی6/2 ثابت شد. به منظور حل شدن اسانس در محیط عصاره از 0/15 درصد (وزنی/ حجمی) آگار باکتری‌شناسی استفاده شد. عصاره‌ی ماهی سفید در دو سطح با غلظت نمک طعام صفر و 4 درصد آماده شد. عصاره‌های تهیه شده با حجم 9/9 میلی‌لیتر در لوله‌های آزمایش توزیع و به مدت 15 دقیقه در دمای 121°C استریل و 24 ساعت پیش از تلقیح در دمای 4°C نگهداری شد. به منظور تلقیح باکتری 100 میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی حاوی $10^6$ باکتری در هر میلی‌لیتر به هر یک از لوله‌های آزمایش افزوده شد تا تعداد باکتری در هر لوله به $10^4$ CFU/ml برسد. اسانس زنیان هم در سه سطح که غلظت آن بر اساس ارزیابی حسی تعیین شد، به لوله‌های آزمایش افزوده شد. لوله‌ها در طول دوره‌ی آزمایش در دمای 4°C نگهداری شد. کشت میکروبی با فواصل زمانی 4 روز صورت گرفت. به منظور شمارش باکتری از محیط انتخابی PALCAM Listeria Selective Agar و مکمل آن Listeria Selective Supplement PALCAM استفاده شد. به این ترتیب که ابتدا رقت‌های متوالی از هر لوله تهیه شد و 1 میلی‌لیتر از رقت‌های مورد نظر به روش پور پلیت کشت داده شد و به مدت 48 ساعت در دمای 37°C گرمخانه گذاری شد. باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* روی این محیط، کلنی‌هایی به رنگ سفید با هاله‌ی مشکی تشکیل داد.

**آماده سازی گوشت، تیماربندی و شمارش باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز*:** فیله‌ی ماهی سفید به قطعات یکسان (3×3×1 cm) تقسیم شد. قطعات ماهی به مدت 15 دقیقه در دمای 121°C اتوکلاو شده و سپس به صورت جداگانه به مدت یک دقیقه در 50 میلی‌لیتر محلول پپتون نمکی حاوی $10^4$ باکتری در هر میلی‌لیتر غوطه ور شد. به منظور اطمینان از تلقیح کامل از همزن شیشه‌ای برای مخلوط کردن استفاده شد. قطعات ماهی به مدت 30 دقیقه زیر هود بیولوژیک (Biosafety Cabinet) در دمای اتاق (25±2°C) خشک شد. برای هر تیمار 4 قطعه گوشت در نظر گرفته شد. تیمار شاهد در محلول 0/2 درصد آگار و تیمارهای حاوی اسانس در محلول 0/2 درصد آگار حاوی غلظت‌های 0/15 و 0/3 درصد اسانس زنیان به مدت 30 ثانیه غوطه‌ور شدند. سپس در کیسه‌های پلاستیکی استریل بسته‌بندی و در طول دوره‌ی 12 روزه‌ی آزمایش در دمای 4°C نگهداری شدند. شمارش میکروبی با فواصل زمانی 4 روز با استفاده از محیط Palcam Listeria Selective Agar صورت گرفت (19).

**تجزیه و تحلیل آماری:** همه‌ی آزمایش‌ها در 3 تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS16 صورت گرفت. پس از کنترل نرمال بودن داده‌ها

[ Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-09-13 ]

توسط آزمون آماری کلموگروف اسمیرنف، تجزیه‌ی واریانس یک طرفه به منظور تعیین اختلاف معنی‌دار بین تیمارها و آزمون دانکن برای مقایسه‌ی میانگین‌ها به کار رفت. برای آنالیز داده‌های ارزیابی حسی از تجزیه‌ی واریانس یک طرفه و آزمون t یک نمونه‌ای استفاده شد (17).

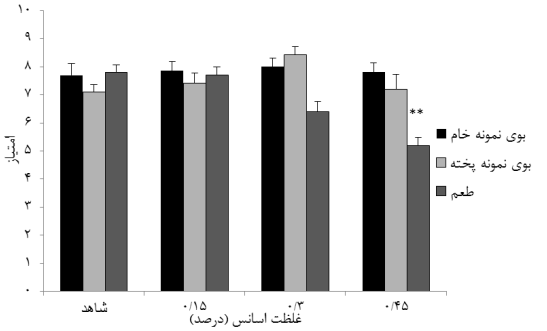
## • یافته‌ها

**نتایج شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس زنیان:** ترکیبات شناسایی شده از اسانس زنیان، زمان استخراج و مقدار ترکیبات که با استفاده از روش کروماتوگرافی گازی-طیف نگار به دست آمد، در جدول 1 نشان داده شده است. در این روش 16 نوع ترکیب مختلف از اسانس زنیان شناسایی شد که 98/8 درصد از اسانس را تشکیل می‌دادند. عمده‌ترین ترکیب تیمول به میزان 57/18 درصد بود. سایر ترکیبات شامل پاراسیمن (22/55 درصد)، گاماترپینن (13/07درصد) و ترانس آنتول (1/7 درصد) بود.

**جدول 1.** درصد ترکیبات شناسایی شده از اسانس زنیان توسط دستگاه GC/MS

| شماره | نام ترکیب | درصد | زمان استخراج (دقیقه) |
|---|---|---|---|
| 1 | آلفاپینن | 0/29 | 11/35 |
| 2 | بتاپینن | 0/43 | 13/45 |
| 3 | بتامیرسین | 0/34 | 14/28 |
| 4 | آلفافلاندرن | 0/065 | 14/89 |
| 5 | آلفا ترپینن | 0/311 | 15/54 |
| 6 | پاراسیمن | 22/55 | 16/21 |
| 7 | بتا فلاندرن | 0/541 | 16/29 |
| 8 | گاما ترپینن | 13/07 | 17/93 |
| 9 | آلفا ترپینولن | 0/095 | 19/18 |
| 10 | آلفاترپینئول | 0/155 | 24/92 |
| 11 | ال-کارون | 0/908 | 27/97 |
| 12 | ترانس آنتول | 1/7 | 28/68 |
| 13 | تیمول | 57/18 | 29/73 |
| 14 | کارواکرول | 0/524 | 29/84 |
| 15 | 3-دودسن-1-آل | 0/161 | 36/51 |
| 16 | آپیول | 0/566 | 42/73 |

**ارزیابی حسی اسانس زنیان در فیله‌ی ماهی سفید:** نتایج ارزیابی حسی نمونه‌های تلقیح شده با اسانس زنیان در نمودار1 نشان داده شده است. ویژگی‌های ارگانولپتیکی نمونه‌های تلقیح شده با اسانس زنیان تا سطح 0/3 درصد مورد پذیرش واقع شد. طعم نمونه‌های تلقیح شده با غلظت بالاتر اسانس، امتیاز کمتر از 6 گرفت و چنین نتیجه‌گیری شد که در غلظت‌های بالاتر به دلیل بو و طعم اسانس، ممکن است ماهی مورد پذیرش مصرف‌کنندگان واقع نشود. اعضای گروه ارزیابی حسی تفاوت معنی‌داری بین بوی نمونه‌ی شاهد و نمونه‌های تلقیح شده با اسانس زنیان تا غلظت 0/3 درصد حس نکردند.



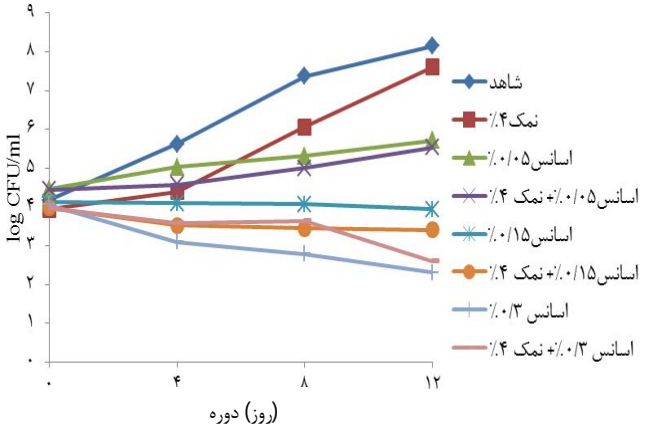

**نمودار 1.** نتایج اثرات حسی اسانس زنیان در فیله ماهی سفید

**اثر بازدارنگی اسانس زنیان بر رشد *لیستریا مونوسیتوژنز* در محیط عصاره‌ی ماهی سفید:** اثر اسانس زنیان در 3 سطح 0/05، 0/15 و 0/3 درصد بر رشد *لیستریا مونوسیتوژنز* در محیط عصاره‌ی ماهی سفید در نمودار 2 نشان داده شده است. تعداد اولیه‌ی باکتری *لیستریا* در تیمار شاهد 4/1 log CFU/ml بود که در طول دوره‌ی آزمایش افزایش یافت و در پایان دوره به 8/1 log CFU/ml رسید. در تیمار حاوی غلظت 0/05 درصد اسانس نیز با 1/2 log CFU/ml افزایش به 5/7 log CFU/ml در پایان دوره‌ی آزمایش رسید. تعداد نهایی باکتری در این تیمار نسبت به تیمار شاهد 2/4 log CFU/ml کمتر بود ($P<0/05$). در تیمار حاوی غلظت 0/15 درصد اسانس تعداد باکتری در طول دوره آزمایش تغییر معنی‌داری نشان نداد ($P>0/05$). در تیمار حاوی غلظت 0/3 درصد اسانس تعداد باکتری در طول دوره‌ی آزمایش به طور معنی‌داری کاهش یافت و در پایان دوره به 2/3 log CFU/ml رسید ($P<0/05$). با توجه به تصویر1 فعالیت ضد لیستریایی اسانس زنیان در عصاره‌ی ماهی سفید حاوی 4 درصد نمک به طور معنی‌داری بهبود یافت ($P<0/05$). به طوری که در تیمار حاوی غلظت 0/15 درصد اسانس و 4 درصد نمک پس از گذشت 12 روز کاهش معنی‌داری (0/5 log) در تعداد باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* مشاهده شد. در عصاره‌ی ماهی سفید حاوی غلظت 0/05 درصد اسانس و 4 درصد نمک تعداد باکتری لیستریا در طول دوره‌ی آزمایش به طور معنی‌داری

[ Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-09-13 ]

(P<0/05) کمتر از عصاره‌ی حاوی غلظت 0/05 درصد اسانس بود هر چند این تفاوت در روز دوازدهم معنی‌دار نبود (P>0/05). تعداد باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* در عصاره‌ی ماهی سفید حاوی4 درصد نمک در پایان دوره‌ی آزمایش به 7/6 log CFU/ml رسید که به طور معنی‌داری کمتر از عصاره‌ی فاقد نمک بود (P<0/05).

**اثر بازدارنگی اسانس زنیان بر رشد *لیستریا مونوسیتوژنز* در گوشت ماهی سفید:** تأثیر اسانس زنیان بر رشد باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* تلقیح شده در گوشت ماهی سفید در جدول 2 نشان داده شده است. با توجه به جدول در طول دوره‌ی آزمایش جمعیت باکتری در هر سه تیمار به طور معنی‌داری افزایش یافت (P<0/05) هرچند جمعیت باکتری در تیمارهای حاوی اسانس بلافاصله پس از تلقیح و در طول دوره آزمایش به طور معنی‌داری کمتر از تیمار شاهد بود (P<0/05). در طول دوره‌ی آزمایش، تفاوت معنی‌داری بین تعداد باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* در تیمارهای تلقیح شده با غلظت‌های 0/15 و 0/3درصد اسانس مشاهده نشد. در روز هشتم تعداد باکتری در تیمار حاوی غلظت 0/3 درصد اسانس به طور معنی‌داری کمتر از تیمار حاوی غلظت 0/15 درصد اسانس بود (P<0/05).




**نمودار 2.** تغییرات تعداد باکتری لیستریا بر حسب log CFU/ml در حضور سه سطح 0/05، 0/15 و 0/3 درصد اسانس زنیان (v/v) و دو سطح صفر و 4 درصد نمک طعام (v/w) در محیط عصاره‌ی ماهی سفید طی 12 روز نگهداری در دمای 4 °C

**جدول 2.** تغییرات تعداد باکتری لیستریا بر حسب log CFU/ml در حضور دو سطح 0/15 و 0/3 درصد (v/v) اسانس زنیان در گوشت ماهی سفید طی 12 روز نگهداری در دمای 4 °C

| تیمار | روز | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 0 | 4 | 8 | 12 |
| شاهد | 3/77±0/04$^{Da}$ | 6/50±0/05$^{Ca}$ | 7/31±0/11$^{Ba}$ | 8/85±0/14$^{Aa}$ |
| زنیان 0/15% | 2/46±0/08$^{Db}$ | 5/28±0/03$^{Cb}$ | 7/07±0/03$^{Bb}$ | 8/49±0/02$^{Aab}$ |
| زنیان 0/3% | 2/51±0/04$^{Db}$ | 5/31±0/18$^{Cb}$ | 6/67±0/04$^{Bc}$ | 8/39±0/03$^{Ab}$ |

*میانگین ± SE (Log CFU/g)

حروف کوچک (a، b، c) در هر روز، نشان‌دهنده‌ی اختلاف معن دار بین تیمارهای مختلف در سطح p<0/05

حروف بزرگ (A، B، C) نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار در طول دوره برای هر تیمار در سطح p<0/05

[ Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-09-13 ]

## • بحث

اجزای سازنده‌ی اسانس‌های گیاهی گروه متنوعی از ترکیبات آلی با وزن ملکولی پایین ولی در عین حال دارای فعالیت ضدمیکروبی متفاوت هستند (20). در مطالعه‌ی *Khajeh* و همکاران (2004) درباره‌ی اجزای تشکیل‌دهنده‌ی اسانس زنیان، تیمول (49 درصد)، گاماترپینن (30/8 درصد) و پاراسیمن (15/7 درصد) بالاترین درصد مواد بودند (14). در مطالعه‌ی *Goudarzi* و همکاران (2011) ترکیبات اصلی شامل تیمول (36/7 درصد)، گاماترپینن (36/5 درصد) و پاراسیمن (21/1 درصد) بود (12). در پژوهش حاضر تیمول (57/18 درصد)، پاراسیمن (22/55 درصد) و گاماترپینن (13/07درصد) بیشترین درصد ترکیبات اسانس را تشکیل دادند که مطابق سایر مطالعات صورت گرفته، در مطالعه حاضر نیز تیمول ترکیب اصلی شناسایی شده در اسانس زنیان بود و در مقایسه با سایر مطالعات درصد بیشتری را به خود اختصاص داد. 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 استفاده‌ی گیاه، روش اسانس‌گیری و نوع حلال به کار رفته باشد (22، 21).

در مطالعات مختلف به منظور بررسی اثرات ضدباکتریایی و نگهدارندگی اسانس‌های گیاهی از مدل‌های مختلفی استفاده شده است. در سال‌های اخیر، مطالعاتی در زمینه‌ی استفاده از محیط‌های کشت مشابه‌سازی شده به منظور ارزیابی اثر ضدمیکروبی اسانس‌های گیاهی علیه پاتوژن‌های عامل فساد و بیماری‌زای مواد غذایی شامل گوشت، سبزیجات و شیر انجام شده است (25-23). 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 است. این مدل‌های مشابه‌سازی شده، منعکس‌کننده‌ی ترکیب ماده غذایی هستند و می‌توانند در تعیین غلظت بهینه‌ی مواد ضدمیکروب مفید باشند. این مدل‌ها می‌توانند به منظور مطالعه‌ی اثر هم‌افزایی اسانس‌ها با یکدیگر و سایر ترکیبات ضدمیکروب برای رسیدن به کارایی ضدمیکروبی مؤثر در حداکثر غلظتی به کار روند که اثرات نامطلوب حسی نداشته باشند (24).

در پژوهش حاضر ابتدا با استفاده از روش ارزیابی حسی، غلظت 0/3 درصد اسانس زنیان به عنوان حداکثر غلظتی که فاقد تأثیرات نامطلوب بر ویژگی‌های حسی فیله ماهی سفید بود تعیین شد و اسانس زنیان در سه سطح 0/05، 0/15 و 0/3 درصد به محیط عصاره ماهی سفید افزوده شد. با توجه به نتایج جمعیت باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* در تیمار شاهد (عصاره‌ی ماهی فاقد نمک و اسانس) با تعداد اولیه 4/1 log CFU/ml درطول دوره‌ی آزمایش افزایش یافت و در پایان دوره به 8/1 log CFU/ml رسید که نشان‌دهنده سرمادوست بودن این باکتری است. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که اسانس زنیان در سطح 0/3 درصد بدون تأثیر بر ویژگی‌های حسی، اثر مهارکنندگی و باکتری‌کشی علیه *لیستریا مونوسیتوژنز* در محیط عصاره‌ی ماهی سفید دارد. نشان داده شده است که اسانس‌های دارای ترکیبات فنلی مانند تیمول، کارواکرول، گاماترپینن و پاراسیمن فعالیت ضدمیکروبی فراوانی دارند (26). تیمول به عنوان مهم‌ترین جزء اسانس با اختلال در لیپیدهای غشای سلولی باکتری سبب افزایش نفوذپذیری سلول و در نتیجه نشت مواد درون سلولی می‌شود (20). با توجه به نتایج غلظت 0/15 درصد، اسانس زنیان در عصاره‌ی ماهی سفید اثر باکتریواستاتیک نشان داد و تعداد باکتری در طول دوره‌ی آزمایش تغییر معنی‌داری نداشت. در عصاره‌ی حاوی غلظت 0/05 درصد اسانس نیز جمعیت باکتری در طول دوره آزمایش به طور معنی‌داری افزایش یافت، در حالی که در مطالعه‌ی *Oorojalian* و همکاران (2010) حداقل غلظت بازدارندگی اسانس زنیان علیه *لیستریا مونوسیتوژنز* در محیط کشت آزمایشگاهی 0/02 درصد (v/v) برآورد شد (15). به طور کلی، فعالیت ترکیبات ضدمیکروب طبیعی در محیط‌های مدل غذایی نسبت به محیط‌های کشت آزمایشگاهی به طور قابل توجهی کاهش می‌یابد. به دلیل وجود مواد مغذی بیشتر در مدل‌های غذایی، باکتری‌ها می‌توانند آسیب‌های وارده را سریع‌تر ترمیم کنند هم‌چنین، میزان بالای چربی و پروتئین در این محیط‌ها باکتری را از تأثیر بازدارندگی

[ Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-09-13 ]

اسانس مصون نگه می‌دارد، زیرا وقتی اسانس در فاز چربی ماده غذایی حل می‌شود، به میزان کمتری برای جلوگیری از رشد باکتری موجود در فاز آبی در دسترس خواهد بود (28، 27).

در پژوهش حاضر افزودن 4 درصد نمک به محیط عصاره‌ی ماهی سفید فعالیت ضد لیستریایی اسانس زنیان را به طور معنی‌داری بهبود بخشید. علت این موضوع را می‌توان چنین بیان کرد که تیمول موجود در اسانس زنیان با اثر روی بخش لیپیدی غشای سلول باکتری سبب افزایش نفوذپذیری آن می‌شود در نتیجه، نمک آسان‌تر وارد سلول باکتری شده و با اثر روی آنزیم‌های داخل سلولی سبب اختلال در عملکرد سلول و مرگ آن می‌شود. به علاوه، گزارش شده است که با افزایش غلظت نمک در ماده‌ی غذایی خاصیت هیدروفوبیستی غشای سلول باکتری افزایش یافته و در نتیجه، ترکیبات ضدمیکروب آسان‌تر در آن حل می‌شوند (29، 12). با توجه به این که غلظت نمک در ماهی نمک‌سود شده‌ی سبک حدود 4 تا 6 درصد است، در پژوهش حاضر از غلظت 4 درصد نمک استفاده شد (30).

اثر هم‌افزایی بین اسانس‌های گیاهی و نمک در سایر مطالعات نیز مشاهده شده است. در مطالعه‌ی *Wendakoon* و همکاران (1993) استفاده توأم از پودر میخک و نمک در عصاره‌ی ماهیچه ماهی ماکرل رشد و تولید هیستامین توسط *انتروباکترآئروجینس* را به طور کلی محدود ساخت (23). در مطالعه‌ی *Tassou* و همکاران (1995) اسانس نعناع و نمک علیه *لیستریا مونوسیتوژنز* و *سالمونلا اینترتیدیس* در خوراک تخم ماهی اثر هم‌افزایی نشان دادند (31). در مطالعه‌ی *Razavi Rohani* و همکاران (2011) افزودن نمک به محیط کشت BHI سبب بهبود فعالیت ضدلیستریایی اسانس سیر شد (32). در تحقیق حاضر جمعیت *لیستریا مونوسیتوژنز* در محیط عصاره‌ی ماهی سفیدِ حاوی 4 درصد نمک به طور معنی‌داری کمتر از جمعیت آن در محیط عصاره‌ی فاقد نمک بود که با یافته‌های *Neunlist* و همکاران (2005) روی فیله ماهی سالمون مطابقت دارد (33). چون غلظت 0/05 درصد اسانس زنیان در محیط عصاره‌ی ماهی سفید قادر به کاهش تعداد اولیه باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* تلقیح شده نبود، در گوشت ماهی سفید دو غلظت 0/15 و 0/3درصد اسانس استفاده شد که هر دو غلظت رشد باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* را نسبت به تیمار شاهد به طور معنی‌داری کاهش دادند.

اثر بازدارندگی اسانس زنیان در گوشت ماهی سفید به طور قابل توجهی کمتر از محیط عصاره‌ی ماهی سفید بود. در محیط عصاره‌ی ماهی سفید حاوی غلظت 0/3 درصد اسانس جمعیت نهایی باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* نسبت به تیمار شاهد log CFU/ml 5/8 کمتر بود، در حالی که در گوشت ماهی سفید تلقیح شده با غلظت 0/3 درصد اسانس جمعیت نهایی باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* نسبت به تیمار شاهد log CFU/ml 0/46کمتر بود. در مطالعات انجام شده توسط *Oliveira* و همکاران (2010) و Souza و همکاران (2009) فعالیت مهارکنندگی ترکیبات ضدمیکروب طبیعی در گوشت کمتر از محیط عصاره گوشت بود (25، 19). برای توجیه این پدیده می‌توان بیان کرد که ترکیبات نیتروژنی و چربی موجود در گوشت از طریق تشکیل ترکیبات کمپلکس با اجزای فنلی اسانس فعالیت آن را کاهش می‌دهند به علاوه، میزان پایین آب فعال در گوشت نسبت به محیط عصاره باعث می‌شود ماده‌ی ضدمیکروب به راحتی نتواند به نواحی هدف در سلول باکتری نزدیک شود (19). با توجه به این نکته که استفاده از اسانس‌های گیاهی تا حدی که موجب اثرات نامطلوب حسی نشود، توجیه‌پذیر است، به منظور دستیابی به فعالیت ضدمیکروبی مؤثر در گوشت ماهی سفید می‌توان از تکنولوژی تلفیقی همانند استفاده توأم از اسانس زنیان، نمک و سایر ترکیبات ضدمیکروب طبیعی همانند نایسین و اسیدهای خوراکی استفاده کرد.

[ Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-09-13 ]

## References


1. Abdollahzadeh E, Rezaei M, Hosseini H, Safari R. 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 2011;4:13-20.
2. Apostolidis E, Kwon YI, Shetty K. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by oregano, cranberry and sodium lactate combination in broth and cooked ground beef systems and likely mode of action through proline metabolism. Int J Food Microbiol 2008;128:317–24.
3. Campos CA, Castro MP, Gliemmo MF, Schelegueda LI. Use of natural antimicrobials for the control of *Listeria monocytogenes* in foods. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances 2011:1112-23.
4. Orsi RH, Bakker HCd, Wiedmann M. *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. Int J Food Microbiol 2011;301(2):79-96.
5. Elliot EL, Kvenberg JE. Risk assessment used to evaluate the US position on *Listeria monocytogenes* in seafood. Int J Food Microbiol 2000;62:253-60.
6. Rocourt J, Jacquet C, Reilly A. Epidemiology of human listeriosis and seafoods. Int J Food Microbiol 2000;62:197-209.
7. Basti AA, Misaghi A, Salehi TZ, Kamkar A. Bacterial pathogens in fresh, smoked and salted Iranian fish. Food Cont 2006;17:183-8.
8. Modaresi R, Mardani K, Tukmechi A, Owanagh A. Prevalence of Listeria spp. in fish obtained from Urmia fish markets. Afr J Microbiol Res 2011;5:5398-401.
9. Singh A, Singh R, Bhuniaa A, Singh N. Efficacy of plant essential oils as antimicrobial agents against *Listeria monocytogenes* in hotdogs. LWT - Food Sci Tech 2003; 36:787-94.
10. Ojagh SM, Rezaei M, Razavi SH, Hosseini SMH. Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trou. J. Food Chemistry 2010; 120: 193-98.
11. Souza ELD, Stamford TLM, Lima EO, Tarajano VN, Filho JBM. Antimicrobial effectiveness of spices: an approach for use in food conservation system. Braz Arch Biol Technol 2005;48(4):1516-8913.
12. Goudarzi GR, Saharkhiz MJ, Sattari M, Zomorodian K. Antibacterial Activity and Chemical Composition of Ajowan (*Carum copticum* Benth. & Hook) Essential Oil. J Med Plant Res 2011;13:203-8.
13. Oskuee RK, Behravan J, Ramezani M. Chemical composition, antimicrobial activity and antiviral activity of essential oil of *Carum copticum* from Iran. Avicenna J Phytomed 2011;1:83-90.
14. Khajeh M, Yamini Y, Sefidkon F, Bahramifar N. Comparison of essential oil composition of Carum copticum obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods. Food Chem 2004;86:587-91.
15. Oroojalian F, Kasra-Kermanshahi R, Azizi M, Bassami MR. Phytochemical composition of the essential oils from three Apiaceae species and their antibacterial effects on food-borne pathogens. Food Chem. 2010;120:765-70.
16. Adams RP. Identification of essential oils components by gas chromatography/quadra pole mass spectroscopy. Carol Stream: Illinois Allured Publication Corporation; 2001. p .456.
17. Mahmoud BSM, Yamazaki K, Miyashita K, Il-Shik S, Dong-Suk C, Suzuki T. Bacterial microflora of carp (*Cyprinus carpio*) and its shelf-life extension by essential oil compounds. Food Microbiol 2004;21:657–66.
18. Nilsson L, Gram L, Huss HH. Growth Control of *Listeria monocytogenes* on Cold-Smoked Salmon Using a Competitive Lactic Acid Bacteria Flora. J Food Prot 1998;62:336-42.
19. Souza ELd, Barros JCd, Conceição MLd, Neto NJG, Costa ACVd. Combined application of *Origanum vulgare* L. essential oil and acetic acid for controlling the growth of *Staphylococcus aureus* in foods. Braz j Microbiol 2009;40:387-93.
20. Hyldgaard M, Mygind T, LouiseMeyer R. Essential oils in food preservation: modeofaction, synergies, and interactions with food matrix components. Front Microbiol 2012;3:1-24.
21. Nostro A, Germano MP, Angelo VA, Connatelli MA. Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. Lett Appl Microbiol 2000;30(5):289-94.
22. Azizi M, Davareenejad G, Bos R, Woerdenbag HJ, Kayser O. Essential oil content and constituents of Black zira (*Bunium persicum* [Boiss.] B. Fedtsch.) from Iran during field cultivation (domestication). J Essent Oil Res 2009;21:78-82.


[ Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-09-13 ]

23. Wendakoon CN, Sakaguchi M. Combined effect of sodium chloride and clove on growth and biogenic amine formation of *Enterobacter aerogenes* in mackerel muscle extract. J Food Prot 1993;56(5):410– 3.

24. Gutierrez J, Barry-Ryan C, Bourke P. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: efficacy, synergistic potential and interactions with food components. Food Microbiol 2009;26:142–50.

25. Oliveira CEVd, Stamford TLM, Neto NJG, Souza ELd. Inhibition of *Staphylococcus aureus* in broth and meat broth using synergies of phenolics and organic acids. Int J Food Microbiol 2010;137:312–6.

26. Marino M, Bersani C, Comi G. Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* L. measured using a bioimpedometric Method. J Food Prot 1999;62:1017-23.

27. Gill AO, Delaquis P, Russo P, Holley RA. Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. Int J Food Microbiol 2002;73:83–92.

28. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. Int J Food Microbiol 2004;94:223– 53.

29. Angienda PO, Hill DJ. The Effect of sodium chloride and pH on the antimicrobial effectiveness of essential oils against pathogenic and food spoilage bacteria: implications in food Safety. World Acad Sci Eng Tech 2011;57:1033-8.

30. Venugopal V. Seafood processing: adding value through quick freezing, retortable packaging and cook-chilling.USA: CRC Press; 2005.

31. Tassou C, Drosinos EH, Nychas G-JE. Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4 C and 10 C. J Appl Bacteriol 1995;78:593– 600.

32. Razavi Rohani SM, Moradi M, Mehdizadeh T, Saei-Dehkordi SS, Griffiths MW. The effect of nisin and garlic (*Allium sativum* L.) essential oil separately and in combination on the growth of *Listeria monocytogenes*. Lwt - Food Sci Technol 2011;44(10):2260-5.

33. Neunlist MR, Ralazamahaleo M, Cappelier J-M, Besnard V, Federighi M, Leroi F. Effect of salting and cold-smoking process on the culturability, viability, and Virulence of *Listeria monocytogenes* strain Scott A. J Food Prot 2005;68:85-91.

[ Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-09-13 ]

# Inhibitory effects of Ajowan essential oil on growth of *Listeria monocytogenes* in *Rutilus frissi kutum* broth medium and fillet

*Rabiei S[1], Hosseini H*[2], Rezaei M [3], Mousavi T[4]*

*1- M.Sc Student in Seafood Science and Technology, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor,Iran*

*2-*Corresponding author: Associate prof, Dept. of Food Science and Technology, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. Email: hedayat@sbmu.ac.ir*

*3-Associate Prof., Dept. of Seafood Science and Technology , Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran*

*4- Asistant Prof, Dept. of Food Hygiene, Islamic Azad University, Garmsar Branch, Garmsar, Iran*

**Received 5 Dec, 2012** **Accepted 12 May, 2013**

**Background and objective:** Due to consumers' concerns regarding the adverse side effects of chemical preservatives and increased bacterial strains' resistance to commonly used antibacterial agents, research to find natural compounds to replace these agents seems warranted. The main aim of this study was to assess the inhibitory effects of Ajowan essential oil on growthb of *Listeria monocytogenes* in both kutum broth and kutum flesh models.

**Materials and Methods:** In the first step, the highest concentration of Ajowan essential oil with no significant changes on sensory properties of kutum was detemined. Then effects of the oil at concentrations of 0.05, 0.15 and 0.3% and salt at concentations of 0% and 4% on growth of *Listeria monocytogenes* inoculated in a kutum broth were assessed, followed by assessing the effects of the oil at a concentration of 0.15% and 0.3% on growth of *Listeria monocytogenes* in the kutum flesh model. The samples were stored at 4° C for 12 days, bacterial counting being performed at 4-day intervals.

**Results:** In the kutum broth, Ajowan oil at a concentration of 0.15% demonstrated a bacteriostatic effect; a concentration of 0.3% was needed to be effective against *Listeria monocytogenes.* Addition of 4% salt to fish broth significantly improved the antibacterial activity of the oil. Further analysis of the data showed that in kutum flesh a concentration of 0.15 and 0.3% Ajowan oil significantly reduced bacterial growth as compaed with the control value.

**Conclusion:** The use of Ajowan oil can significantly prevent the growth of *Listeria monocytogenes*. The effect is more pronounced in the fish broth medium than in the kutum fillets**.**

**Keywords:** *Listeria monocytogenes*, Ajowan essential oil, Kutum broth, salt, Sensory properties

[ Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-09-13 ]