

برهم کنش ضد میکروبی بین روغن فرار چای کوهی با نیسین و گلايسين و اثرات آن بر میکروآگانیسم‌های بیماری‌زای غذازاد و مولد فساد در مواد غذایی

سید سیاوش ساعی دهکردی^{۱*}، عزیزاله فلاح^۱، حمدالله مشتاقی^۲، سمیرا ملانوری شمسی^۳، سعید کریمی دهکردی^۴

- ۱- استادیار، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، پژوهشکده بیماری‌های مشترک انسان و دام، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد - ایران.
- ۲- دانشیار، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد - ایران.
- ۳- دانشجو، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد - ایران.
- ۴- دانشجوی دکتری تخصصی تغذیه دام، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران - ایران.

چکیده

ترکیب عوامل ضد میکروبی می‌تواند میزان مهار ارگانیسم‌های بیماری‌زا و فسادزای غذایی را افزایش دهد. هدف مطالعه، بررسی ویژگی‌های ضد میکروبی اسانس گیاه چای کوهی در ترکیب با نیسین و گلايسين به منظور یافتن سینرژیسم، عدم تأثیر یا آنتاگونیسم بین عوامل یاد شده می‌باشد. روغن فرار گیاه با دستگاه کلونجر استحصال و ترکیب آن با گاز کروماتوگراف و گاز کروماتوگراف/طیف سنج جرمی مشخص شد. خصوصیات ضد میکروبی روغن، نیسین و گلايسين به روش میکرودايلوشن بررسی و برهم کنش با روش چکربورد با هدف محاسبه‌ی شاخص‌های مربوط به غلظت‌های مهاري مشترک (FIC) انجام شد. از ۹۸/۷ درصد ترکیبات روغن گیاه در حدود ۲۹/۲ درصد به ماده‌ی ضد میکروب لینالول مربوط بود. مخمرها حساس‌ترین و باکتری‌های گرم منفی مقاوم‌ترین در برابر روغن فرار گیاه و گلايسين بودند. لیستریا مونوسیتوزن، حساس‌ترین ارگانیسم در برابر نیسین بود. باکتری‌های گرم منفی و کاندیدا/آلبیکنس دارای بالاترین مقاومت بودند. ترکیب نیسین و روغن فرار عمدتاً، سبب بروز سینرژیسم و ترکیب روغن با گلايسين عمدتاً ۳ حالت عدم تأثیر، افزایشی یا آنتاگونیسم را در پی داشت. نتایج نشان داد، برهم کنش ضد میکروبی بین روغن فرار به ویژه با نیسین و تا حدی با گلايسين سبب کاهش حداقل غلظت‌های مهاري در حالت ترکیبی می‌گردد که به‌خصوص علیه باکتری‌های گرم منفی و مخمرها اهمیت بیشتری دارد. کاهش حداقل غلظت‌های مهاري به معنای سینرژیسم نیست و می‌تواند دال بر یکی از دو حالت عدم تفاوت یا اثر افزایشی باشد. واژه‌های کلیدی: برهم کنش ضد میکروبی، روغن فرار استاکیس، نیسین، گلايسين، حداقل غلظت مهار کننده مشترک

مقدمه

گونه‌های گوناگون سالمونلا، لیستریا مونوسیتوزن و غیره به عنوان عواملی همه جایی، همواره سبب ایجاد واگیری و مرگ و میر در جوامع انسانی بوده و هستند. به عنوان مثال بر اساس تخمین‌های ثبت شده، سالانه بیش از ۱/۳ بلیون مورد سالمونلوز انسانی و سه میلیون مورد مرگ و میر ناشی از آن در سراسر جهان گزارش شده است (۱۷).

مخمرها در همه جای دنیا گسترش یافته‌اند و قادر به ایجاد فساد در بسیاری از مواد غذایی از جمله پنیر، انواع آب‌میوه‌ها و

کیفیت و سلامت غذا هدفی بسیار مهم در صنایع غذایی محسوب می‌گردد و اقبال جامعه مصرف کننده همواره به سوی استفاده از غذاهایی است که علاوه بر تازگی و سالم بودن، کمترین فرآوری یا افزودنی‌های شیمیایی در آن‌ها به کار گرفته شده باشد. از این حیث، آلودگی میکروبی غذا به عنوان یک نگرانی تهدید کننده‌ی سلامت انسان‌ها محسوب می‌گردد (۱۶). عوامل بیماری‌زای غذازاد از قبیل/شریشیاکلی،



هدف از مطالعه‌ی حاضر اولاً بررسی اثرات منفرد نیسین، گلايسين و روغن فرار گیاه استاکیس، یافتن ترکیب شیمیایی روغن فرار گیاه مذکور که بازتاب دهنده‌ی انواع خواص بیولوژیکی و از جمله ضد میکروبی این روغن تلقی می‌گردد ثانیاً بررسی برهم کنش‌های ضد میکروبی به شکل یکی از چهار حالت احتمالی هم‌افزایی (Synergistic)، افزایشی (Additive)، عدم تأثیر (Indifferent) و یا کاهش اثر (Antagonistic) بین عوامل یاد شده می‌باشد. بدیهی است تلاش برای استفاده از ترکیبات طبیعی جایگزین نگه‌دارنده‌های زیان‌بار شیمیایی در صنایع غذایی و همچنین افزایش قدرت ضد میکروبی این مواد علیه ارگانیسم‌های بیماری‌زای غذازاد یا مولد فساد در مواد غذایی که می‌تواند شمه‌ای از تکنولوژی هاردل باشد تبعات مثبتی را در بر خواهد داشت. این گونه مطالعات در گام اول در برون تن (مشابه با مقاله‌ی پیش روی)، سپس تعمیم در سیستم‌های مدل غذایی و در صورت نتایج مفید و مثبت، در نهایت به شکل کاربردی در صنعت غذا قابل اجرا می‌باشند.

مواد و روش کار

مطالعه‌ی پیش روی، در سال ۱۳۸۹ در دانشگاه شهرکرد انجام شده است. در ابتدا گیاه استاکیس در اواسط فصل بهار از کوهپایه‌های اطراف شهرکرد جمع‌آوری و جنس و گونه‌ی آن تحت عنوان *استاکیس لاواندولی فولیا* به تأیید رسید، سپس بخش‌های هوایی در سایه خشک و به پودر تبدیل شد. روغن فرار (اسانس) گیاه با استفاده از سیستمی موسوم به کلونجر (Clevenger) بر اساس روش تقطیر توسط آب (Hydrodistillation) به مدت سه و نیم ساعت استخراج گردید. روغن به دست آمده در ابتدا توسط پودر سولفات سدیم کاملاً آب‌گیری شد و سپس از طریق میکروفیلترهای ۰/۲۲ میکرومتری استریل و به ظروف تیره و تا حد امکان غیرقابل نفوذ در برابر هوا انتقال و در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد تا زمان انجام آزمون نگه‌داری شد.

به منظور شناسایی ترکیبات شیمیایی گیاه، در

نوشیدنی‌ها، سرکه، گوشت، میوه‌جات و غیره می‌گردند و اثرات این فساد شامل بد طعمی، ایجاد رنگ‌ها و بوهای نامطلوب و غیرطبیعی شدن بافت مواد غذایی است (۱۹). جنس‌هایی از مخمرها نظیر کاندیدا، پیشیا، ردوتورولا، ساکارومایسس، تریکوسپورون، هانسولا و غیره به عنوان برخی از مهم‌ترین مخمرهای فسادزا در مواد غذایی به شمار می‌روند (۲۳). فساد میکروبی نه تنها بر روی دسترس پذیری مواد غذایی تأثیر سوء می‌گذارد، بلکه به لحاظ اقتصادی و هزینه‌های تحمیل شده، زیان‌بار است (۲۲).

نیسین در واقع باکتریوسینی (Bacteriocin) است که توسط لاکتوکوکوس لاکتیس تحت گونه‌ی لاکتیس تولید می‌شود و طیف ضد میکروبی آن عمدتاً علیه باکتری‌های گرم مثبت است و مطالعات نشان‌گر این است که بر روی باکتری‌های گرم منفی، قارچ‌ها و مخمرها بی‌تأثیر است یا تأثیر بسیار نامحسوسی دارد (۲). نیسین تنها باکتریوسینی است که به عنوان نگهدارنده از سوی سازمان بهداشت جهانی در صنایع غذایی به تصویب رسیده است (۶).

جنس استاکیس (Stachys) دارای بیش از ۲۷۰ گونه است و به عنوان بزرگترین جنس گیاهی در تیره‌ی لابیاته (Labiatae) به شمار می‌رود (۱۴). نام فارسی این گیاه چای کوهی است و در استان چهارمحال و بختیاری، لولو پشمی نامیده می‌شود و در طب سنتی این استان برخی از خواص درمانی را برای آن متصور شده‌اند (۹).

در میان اسیدهای آمینه، گلايسين به عنوان ساده‌ترین اسید آمینه به شمار می‌رود، و به دلیل آن‌که از آن به عنوان یک عامل ضد میکروبی یاد می‌شود و از سمیت بسیار پایینی برخوردار است می‌توان از آن استفاده نمود. باید خاطر نشان کرد که مصرف گلايسين به میزان زیاد، می‌تواند برای انسان سمی باشد (۷ و ۱۰). گلايسين سبب ممانعت از سنتز یک جزء از پپتیدوگلیکان موجود در دیواره‌ی سلولی باکتری می‌گردد (۱۱). به نظر می‌رسد، حساسیت باکتری‌های گرم منفی در مقایسه با گرم مثبت‌ها در برابر گلايسين، کمتر باشد (۲۱).

۳۰۰، ۴۵۰، ۶۰۰، ۹۰۰، ۱۲۰۰، ۱۸۰۰ و ۲۴۰۰ میکروگرم به ازای هر میلی لیتر در محیط برات بودند. لازم به ذکر است به علت محلول بودن کامل گلايسن در آب، محیط کشت برات برای حل کردن آن استفاده شد.

برای بررسی حساسیت باکتری‌های گرم مثبت: لیستریا مونوسیتوزن و استافیلوکوکوکوس/اورئوس، باکتری‌های گرم منفی: اشریشیا کولای H7:O157 و مخمرهای کاندیدا/آلبیکانس و رودوتورولا موسیلاژینوزا از روش رقت‌سازی میکروبراث بر اساس مطالعه‌ی قبلی، جهت تعیین حداقل غلظت‌های ممانعت کننده در مورد باکتری‌ها و مخمرها (MIC)، حداقل غلظت کشندگی (MBC) برای باکتری‌ها و حداقل غلظت کشندگی برای قارچ‌ها (MFC) بهره گرفته شد (۲۰).

به منظور بررسی بر هم‌کنش ضد میکروبی روغن فرار، نیسین و گلايسین از روشی موسوم به تیتراسیون چکربورد (Checkerboard titration) استفاده گردید. نتایج حاصل از این آزمون به صورت غلظت ممانعت کننده‌ی سهمی یا مشترک Fractional Inhibitory Concentration (FIC) بیان شد (۴).

برای بررسی خاصیت ضد میکروبی در حالت ترکیبی، روغن فرار گیاه استاکیس یک بار با نیسین و بار دیگر با گلايسین مورد آزمایش قرار گرفت. FIC هر ترکیب ضد میکروب از طریق رابطه زیر محاسبه گردید:

$$FIC = \frac{MIC \text{ ماده مورد نظر در حالت ترکیب}}{MIC \text{ ماده مورد نظر به تنهایی}}$$

(ماده ضد میکروب مورد نظر)

پس از محاسبه‌ی مجموع FIC هر دو ماده با یکدیگر، نتایج براساس روش گونی و همکاران در سال ۲۰۰۹ به صورت زیر تفسیر گردید (۸):

در صورتی که مجموع FIC ها یا شاخص FIC (FICI) کوچک‌تر یا مساوی با ۰/۵ بود، سینرژیسم یا هم‌افزایی ($\sum FICI \leq 0.5$)، چنان‌چه بزرگ‌تر از ۰/۵ و کوچک‌تر و مساوی با ۰/۷۵ افزایشی ($0.5 < \sum FICI \leq 0.75$)، بین

ابتدا به دستگاه کروماتوگرافی گازی (Agilent ۶۸۹۰) مجهز به آشکارساز یونی با استفاده از شعله (Gas Chromatograph/Flame Ionization Detector, GC/FID) تزریق گردید و بهترین برنامه‌ریزی حرارتی ستون برای جدا سازی ترکیبات منفرد در اسانس به دست آمد. ستون دستگاه از نوع HP-۵ به طول ۳۰ متر و ضخامت ۲۵ میلی‌متر بود. دمای آشکارساز ۲۸۰ درجه‌ی سانتی‌گراد بود و از گاز هلیوم به عنوان حامل با سرعت جریان ۰/۸ میلی‌لیتر در دقیقه استفاده شد. سپس برای یافتن طیف جرمی ترکیبات به دست آمده، نمونه‌ی اسانس به دستگاه گازکروماتوگراف متصل به طیف‌سنج جرمی (Gas Chromatography/Mass Spectrometry, GC/MS Hewlett-Packard 5890) تزریق گردید. لازم به ذکر است که بر اساس زمان‌های بازداری (Retention Times, RTs) و نیز اطلاعات به دست آمده از روی منحنی نرمال آلکان (C6-C17)، اندیس‌های کوتاس (Kovats index) برای هر ترکیب منفرد محاسبه گردید. شناسایی نهایی ترکیبات با مقایسه‌ی شاخص‌های بازداری (کوتاس) با کمک کتابخانه نرم افزاری دستگاه و کتاب مرجع صورت پذیرفت.

پودر نیسین (دارای فعالیت معادل با ۱۰^۶ واحد بین‌المللی به ازای هر میلی‌لیتر) در محلول اسید کلریدریک ۰/۰۲ نرمال حل شد (از حداقل ۱۳۶ تا حداکثر ۲۱۷۶ واحد بین‌المللی به ازای هر میلی‌لیتر) تا غلظت‌های ۳/۴، ۵/۱، ۶/۸، ۱۰/۲، ۱۳/۶، ۲۰/۴، ۲۷/۲ و ۴۰/۸ میکروگرم به ازای هر میلی‌لیتر در محیط تریپتیک سوی برات به دست آید.

همچنین غلظت‌های روغن فرار به ترتیب از ۸۷ تا ۱۲۴۸ میکروگرم به ازای هر میلی‌لیتر در محیط تریپتیک سوی برات تهیه شد. به منظور پخش یکنواخت ریز ذرات روغن در محیط مایع از حلال دی‌متیل سولفوکساید به نسبت پنج درصد استفاده شد.

پودر گلايسین مورد استفاده دارای درجه‌ی خلوص ۹۹ درصد بود. غلظت‌های به کار گرفته شده شامل ۱۵۰، ۲۲۵،

۰/۷۶ تا ۲ ($\Sigma FIC: 0.76-2$) عدم تأثیر و اگر مساوی یا بزرگ‌تر از ۲ باشد، ناهم‌سازی یا آنتاگونیسم دارند. لازم به ذکر است در خصوص مواد ضد میکروبی که MIC آن‌ها در بررسی خاصیت ضد میکروبی به شکل منفرد، از بالاترین غلظت انتخاب شده (در بین غلظت‌های تهیه شده) بیشتر بود، همان غلظت نهایی تهیه شده، به عنوان MIC منفرد در نظر گرفته شد. بدیهی است که هر قدر عدد مربوط به MIC منفرد بزرگ‌تر شود، FIC حاصله نیز از لحاظ عددی کوچک‌تر خواهد شد.

آزمون‌ها در سه تکرار انجام شدند و میانگین داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از بسته نرم افزاری GraphPad statistical package ۳ InStat ارائه شده است.

نتایج

نتایج مربوط به آنالیز اسانس گیاه استاکیس در جدول شماره ۱ ارائه شده است. بر اساس این نتایج، ۹۸/۷ درصد ترکیبات این اسانس شناسایی شده است. از میان ۴۳ جزء شناسایی شده در ترکیب کلی اسانس بیشترین مقادیر به لینالول (۲۹/۲ درصد)، آلفا پینن (۱۰ درصد)، ترانس (ای)-کاریوفالین (۶/۶ درصد)، بتا پینن (۶/۴ درصد)، مایرسن (۵/۳ درصد)، بتا فلاندرین (۴/۷ درصد)، آلفا کوپائن (۴/۶ درصد) و گرماسرن دی (۴/۵ درصد) مربوط بودند. بقیه‌ی ترکیبات مقادیر پایین‌تر از ۵ درصد را به خود اختصاص دادند.

حداقل غلظت‌های ممانعت کننده و کشنده‌ی نیسین، گلیاسین و روغن فرار گیاه استاکیس بر روی باکتری‌ها و مخمرها در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. همان‌گونه که در جدول شماره ۲ مشاهده می‌شود، بیشترین قدرت ممانعت کنندگی و کشندگی روغن فرار (کمترین میزان مربوط به حداقل غلظت‌های مهار یا کشنده) بر روی رودوتورولا موسیلاژینوزا مشاهده شد. پس از رودوتورولا، ترتیب از بیشترین قدرت به کمترین قدرت مهار کنندگی و کشندگی برای لیستریا مونوسیتوزنز، باسیلوس سرئوس، کاندیدا آلبیکنس، سالمونلا تایفی موریوم و اشیریشیا کولای

H7:O157 می‌باشد. همچنین پس از محاسبه‌ی حداقل غلظت‌های ممانعت کننده‌ی نیسین، لیستریا مونوسیتوزنز حساس‌ترین ارگانیسم و سالمونلا تایفی موریوم، اشیریشیا کولای H7:O157 و کاندیدا آلبیکنس مقاوم‌ترین ارگانیسم‌ها بودند. در مقایسه با ارگانیسم‌های آزمون، حساسیت باسیلوس سرئوس و رودوتورولا موسیلاژینوزا در برابر نیسین، به ترتیب متوسط و نسبتاً مقاوم می‌باشند. نتایج مطالعه نشان می‌دهد که گلیاسین دارای بیشترین اثر ضد میکروبی، علیه مخمرها است و باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی از این لحاظ در رتبه‌های بعدی قرار می‌گیرند. بدین ترتیب حساس‌ترین ارگانیسم رودوتورولا موسیلاژینوزا و مقاوم‌ترین سالمونلا تایفی موریوم می‌باشند (جدول شماره ۲).

یافته‌های مربوط به برهم‌کنش‌های مواد ضد میکروبی و اثرات نهایی این برهم‌کنش‌ها بر روی عوامل بیماری‌زای غذازاد و القا کننده‌ی فساد در مواد غذایی، در جدول شماره ۳ نشان داده شده است. پایین‌ترین کمیت‌های مربوط به حداقل غلظت ممانعت کننده‌ی روغن فرار در مؤثرترین حالت ترکیبی (مشترک) با نیسین بر روی لیستریا مونوسیتوزنز و کاندیدا آلبیکنس (هر دو ۰/۱۲) مشاهده شد. همچنین با توجه به میزان حداقل غلظت ممانعت کننده‌ی (مشترک) محاسبه شده برای ترکیب نیسین با روغن فرار استاکیس، بیشترین اثر هم‌افزایی علیه سالمونلا تایفی موریوم، اشیریشیا کولای، کاندیدا آلبیکنس و رودوتورولا موسیلاژینوزا (۰/۱۲) مشاهده شد. کمترین شاخص غلظت ممانعت کننده‌ی مشترک مربوط به اثر روغن فرار استاکیس با نیسین علیه کاندیدا آلبیکنس بود (۰/۲۴) که به قوی‌ترین خاصیت هم‌افزایی مربوط است. این در حالی است که مقدار کمی (۰/۶۲) شاخص یاد شده، بیان‌گر بروز حالت افزایشی بین روغن فرار استاکیس و نیسین بر ضد لیستریا مونوسیتوزنز است. همچنین به استثنای اثر هم‌افزایی مشترک گلیاسین و روغن فرار استاکیس علیه کاندیدا آلبیکنس، اثر این دو ماده بر ضد سایر میکروارگانیسم‌ها یا به شکل عدم تأثیر یا خاصیت پادکرداری است (جدول شماره ۳).

جدول شماره ۱- ترکیب شیمیایی روغن فرار گیاه استاکیس

ردیف	نام ترکیب	شاخص کواتس	درصد	ردیف	نام ترکیب	شاخص کواتس	درصد
۱	(E)-2-Hexenal	۸۵۲	۰/۲	۳۴	(E)-Nerolidol	۱۵۶۵	۱/۱
۲	α -Thujene	۹۳۰	۰/۵	۳۵	Spathulenol	۱۵۷۶	۰/۶
۳	α -Pinene	۹۳۴	۱۰	۳۶	Caryophyllene oxide	۱۵۸۲	۱/۷
۴	Benzaldehyde	۹۵۸	۱/۵	۳۷	Torreyol	۱۶۴۳	۰/۳
۵	Verbenene	۹۶۶	۰/۱	۳۸	α -Cadinol	۱۶۵۴	۰/۵
۶	β -Pinene	۹۸۱	۶/۴	۳۹	β -Bisabolol	۱۶۷۳	۱/۳
۷	Myrcene	۹۹۳	۵/۳	۴۰	Farnesol	۱۷۱۲	۰/۱
۸	p-Cymene	۱۰۲۲	۰/۴	۴۱	6,10,14-Trimethyl pentadecan-2-one	۱۸۴۳	۰/۳
۹	β -Phellandrene	۱۰۳۲	۴/۷	۴۲	Pimaradiene	۱۹۴۰	۰/۲
۱۰	Terpinolene	۱۰۸۶	۰/۵	۴۳	13-epi-Manoyl oxide	۲۰۱۲	۰/۷
۱۱	Linalool	۱۰۹۶	۲۹/۲	۴۴	trans-phytol	۲۱۱۴	۱/۲
۱۲	Campho	۱۱۴۳	۰/۴	۴۵	Tricosane	۲۲۹۵	۰/۲
۱۳	Terpinen-4-ol	۱۱۷۳	۰/۳	مجموع			
۱۴	α -Terpineol	۱۱۸۷	۰/۲				
۱۵	β -Cyclocitral	۱۲۱۸	۰/۵				
۱۶	Dihydroedulan	۱۲۸۵	۱/۲				
۱۷	Thymol	۱۲۸۹	۰/۳				
۱۸	Undecanal	۱۳۰۳	۰/۶				
۱۹	α -Cubebene	۱۳۴۷	۱/۱				
۲۰	Longicyclene	۱۳۷۴	۰/۹				
۲۱	α -Copaene	۱۳۷۶	۴/۶				
۲۲	β -Bourbonene	۱۳۸۰	۱/۱				
۲۳	β -Elemene	۱۳۹۰	۱/۴				
۲۴	(E)-Caryophyllene	۱۴۱۶	۶/۶				
۲۵	trans- α -Bergamotene	۱۴۳۳	۱/۵				
۲۶	β -Farnesene	۱۴۴۶	۰/۹				
۲۷	Murolene- Gamma	۱۴۷۵	۰/۶				
۲۸	Germacrene D	۱۴۸۱	۴/۵				
۲۹	Bicyclgermacrene	۱۴۹۳	۱				
۳۰	α -Zingiberene	۱۴۹۵	۰/۲				
۳۱	α -Murolene	۱۴۹۸	۱/۱				
۳۲	Cadinene - Gamma	۱۵۱۲	۱/۳				
۳۳	δ -Cadinene	۱۵۲۲	۲/۴				

بحث

نتایج این پژوهش بیان گر آن است که به کارگیری روغن فرار استاکیس در ترکیب با نیسین می تواند به عنوان یک رهیافت یا رویکرد مؤثر برای کنترل ارگانیسم های بیماری زای غذازاد و القا کننده ی فساد در مواد غذایی به کار گرفته شود. مطالعات دیگر نشان داده است که به کارگیری نیسین به عنوان یک نگهدارنده ی غذایی نمی تواند به تنهایی بر روی باکتری های گرم منفی، مانند /شریشیا کولای H7:O157 تأثیر ممانعت کننده ی خاصی داشته باشد (۱). ناتوانی نیسین علیه باکتری های گرم منفی در نتایج ارائه شده در جدول شماره ۲ کاملاً مشاهده می شود. بر اساس نتایج، نیسین به تنهایی حتی در بالاترین غلظت به کار گرفته شده ۵۴/۴ میکروگرم به ازای هر میلی لیتر، هیچ گونه ممانعتی بر روی باکتری های گرم منفی و همچنین مخمر کاندیدا آلبیکنس ایجاد ننمود، هر چند تنها در بالاترین غلظت یاد شده توانست از رشد رودوتورولا موسیلاژینوزا ممانعت کند. همان گونه که در جدول شماره ۱ مشاهده می گردد، از

جدول شماره ۲ - حداقل غلظت های معانت کننده و کشنده (میکروگرم/میلی لیتر) باکتری ها و مخمرهای بیماری زای غذازاد یا فسادزا در مواد غذایی

ماده ضد میکروب	شریشیا کولای H7:O157		سالمونلا تیفی موربونم		باسیلیوس سرئوس		لیستریا مونوسیتوجنز		کلادیدیا آلبریکس		روئوتوکسولا مونوسیتوزنزا	
	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC
روغن فرار استاکیس	۶۲۴	۹۲۶	۶۲۴	۶۲۴	۴۶۸	۳۱۲	۲۳۴	۳۱۲	۴۶۸	۴۶۸	۴۶۸	۱۱۷
نیسین	>۵۴/۴	>۵۴/۴	>۵۴/۴	>۵۴/۴	۵۴/۴	۴۰/۸	۵/۱	۶/۸	>۵۴/۴	>۵۴/۴	>۵۴/۴	>۵۴/۴
گلایسین	>۲۴۰۰	>۲۴۰۰	>۲۴۰۰	>۲۴۰۰	۲۴۰۰	۱۲۰۰	۹۰۰	۱۸۰۰	۹۰۰	۱۲۰۰	۴۵۰	۹۰۰



جدول شماره ۳ - غلظت های ممانعت کننده مشترک روغن قرار استاکیس، و شاخص های غلظت های ممانعت کننده

روغن قرار + گلايسين					روغن قرار + نيسين					ارگانيسم
FIC ⁱ	FIC ^j	FIC ^h	MIC ^e	MIC ^f	FIC ^e	FIC ^d	FIC ^c	MIC ^b	MIC ^a	
۲	۱	۱	۲۴۰۰	۶۲۴	۰/۳۷	۰/۱۲	۰/۳۵	۶/۸	۱۵۶	اشرشيا کولاي H7O157
۱/۲۵	۰/۲۵	۱	۶۰۰	۶۲۴	۰/۳۷	۰/۱۲	۰/۲۵	۶/۸	۱۵۶	سالمونيلا تايجي موريزوم
۱	۰/۱۵	۰/۱۵	۶۰۰	۱۵۶	۰/۱۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۱۰/۲	۷۸	باسيلوس سرپويس
۰/۲۵	۰/۱۵	۰/۲۵	۴۵۰	۵۸/۵	۰/۶۲	۰/۱۵	۰/۱۲	۷/۵۵	۲۹/۲۵	ليستريا مونوسيتوزنز
۰/۱۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۲۲۵	۱۱۷	۰/۲۴	۰/۱۲	۰/۱۲	۶/۸	۵۸/۵	کانديدا آلبیکانس
۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۱۵	۱۱۲/۵	۵۸/۵	۰/۳۷	۰/۱۲	۰/۲۵	۶/۸	۲۹/۲۵	رودتورولا موسيلارزينز

a حداقل غلظت ممانعت کننده روغن قرار استاکیس در مؤثرترین ترکیب روغن قرار و نیسین
b حداقل غلظت ممانعت کننده سبھی نیسین در ترکیب با روغن قرار استاکیس
c غلظت ممانعت کننده سبھی روغن قرار استاکیس در ترکیب با نیسین
d غلظت ممانعت کننده سبھی نیسین در ترکیب با روغن قرار استاکیس
e FIC_N + FIC_O حداقل غلظت ممانعت کننده سبھی مریوط به ترکیب روغن قرار و نیسین
f حداقل غلظت ممانعت کننده روغن قرار استاکیس در مؤثرترین ترکیب روغن قرار و گلاسیسین
g حداقل غلظت ممانعت کننده گلاسیسین در مؤثرترین ترکیب گلاسیسین و روغن قرار استاکیس
h غلظت ممانعت کننده سبھی روغن قرار استاکیس در ترکیب با گلاسیسین
i FIC_G + FIC_O (شاخص حداقل غلظت ممانعت کننده سبھی مریوط به ترکیب روغن قرار و گلاسیسین)
j FIC_G + FIC_O (شاخص حداقل غلظت ممانعت کننده سبھی مریوط به ترکیب روغن قرار و گلاسیسین)

(به استثنای لیستریا مونوسیتوژنز) می‌باشد. شاخص FIC در مورد لیستریا مونوسیتوژنز بیانگر عدم وجود هم‌افزایی بین نیسین و روغن فرار گیاه است، چرا که شاخص یاد شده ۰/۶۲ می‌باشد که دلالت بر یک برهم‌کنش از نوع افزایشی دارد. باید خاطر نشان ساخت که اگرچه در مورد پنج میکروارگانیزم دیگر، شاخص یاد شده از ۰/۵ پایین‌تر و دلالت بر برهم‌کنش سینرژیستی دارد اما شدت این برهم‌کنش متفاوت است. بدیهی است مؤثرترین برهم‌کنش (بیشترین میزان سینرژیسم) در مورد *کاندیدا آلبیکنس* رخ داده است چرا که از پایین‌ترین شاخص غلظت‌های ممانعت‌کننده‌ی سهمی یا مشترک برخوردار است.

در یک مطالعه، اثرات ضد میکروبی نیسین با دو ترکیب تیمول (Thymol) و کارواکرول (Carvacrol) بر روی سلول‌های رویشی *باسیلوس سرئوس* مورد مطالعه قرار گرفت و مشخص گردید که استفاده هم‌زمان از نیسین با تیمول یا کارواکرول، از زمانی که هر یک از ترکیبات یاد شده به تنهایی استفاده می‌شدند، علیه *باسیلوس سرئوس* مؤثرتر بود (۱۸). در بررسی Ettayebi و همکاران در سال ۲۰۰۰ در مورد اثر ترکیبی تیمول و نیسین علیه لیستریا مونوسیتوژنز و *باسیلوس سرئوس*، مشخص گردید که به کارگیری ترکیب تیمول با نیسین به شکل چشم‌گیری میزان نیسین مورد نیاز برای مهار ارگانیزم‌های یاد شده را کاهش داد. لازم به ذکر است که در صورت استفاده نیسین در دوزهای بالا خطر ایجاد و گسترش سویه‌های مقاوم در برابر این باکتریوسین وجود دارد (۵). باید یادآور شد تیمول و کارواکرول دو ترکیب مهم در بسیاری از روغن‌های فرار استحصال شده از گیاهان گوناگون می‌باشند. نتایج نشان می‌دهد ترکیب نیسین با روغن فرار استاکیس، انتخابی مناسب برای مهار ارگانیزم‌های مورد آزمایش در این مطالعه می‌باشد.

نتایج مربوط به برهم‌کنش ضد میکروبی بین روغن فرار استاکیس و گلايسين نشان می‌دهد که تنها مورد سینرژیسم در مورد *کاندیدا آلبیکنس* اتفاق افتاده است. آنتاگونیسم بین این دو ترکیب به باکتری *شریشیا کولای* H7:O157 مربوط

۹۸/۷ درصد ترکیبات شناسایی شده در روغن فرار استاکیس، نزدیک به یک سوم (۲۹/۲ درصد) مربوط به لینالول می‌باشد. بر اساس مطالعه‌ی انجام شده توسط Knobloch و همکاران در سال ۱۹۸۴، لینالول جزو ترکیبات ترپن الکلی (terpene alcohol) می‌باشد (۱۳). بنابراین می‌توان اذعان نمود که در صد بالای لینالول موجود در ترکیبات شناسایی شده، قطع یقین در خواص ضد میکروبی مشاهده شده در این مطالعه نقش به‌سزایی را داراست. در مطالعه‌ای که Ebrahimabadi و همکاران در سال ۲۰۱۰ بر روی گونه‌ای دیگر از جنس استاکیس انجام دادند، دو ترکیب لینالول و آلفا ترپینئول (α -Terpineol) دارای درصد بالایی از لحاظ کمی بودند و خاصیت ضد میکروبی قابل توجهی به دو ترکیب یاد شده نسبت داده شد (۳). مطالعه‌ی قبلی ما بر روی روغن فرار آویشن شیرازی نشان داد که هم‌افزایی ضد میکروبی به دنبال برهم‌کنش تک تک اجزای کم‌مقدار و پرمقدار موجود در ترکیب کلی یک روغن فرار است (۲۰).

نقش گلايسين، جلوگیری از سنتز اجزای سازنده‌ی پپتیدوگلیگان در دیواره‌ی سلولی ارگانیزم‌هاست و باید متذکر شد که باکتری‌های گرم مثبت مقاومت کمتری در برابر این ماده دارند (۱۵). نتایج موجود در جدول شماره ۲ بیان‌گر بی‌اثر بودن گلايسين علیه *سالمونلا تایفی* موریوم می‌باشد. همچنین لیستریا مونوسیتوژنز و *باسیلوس سرئوس* در غلظت‌های پایین‌تری در مقایسه با *شریشیا کولای* H7:O157 از رشدشان ممانعت شد. مطالعه‌ی Kim و همکاران در سال ۲۰۰۶، نشان داد که یک پپتید غنی از گلايسين، موسوم به تنسین-۳ (Tenecin-۳) قادر است از طریق مکانیسمی خاص به سرعت وارد سیتوپلاسم سلولی *کاندیدا آلبیکنس* گردد و خاصیت کاندیسیدالی (کاندیدا کشی) را از خود بروز دهد (۱۲).

بررسی شاخص غلظت‌های سهمی ممانعت‌کننده‌ی روغن فرار و استاکیس و نیسین در جدول شماره ۳، بیان‌گر بروز یک برهم‌کنش سینرژیستی (هم‌افزایی) بین نیسین و روغن فرار استاکیس بر روی میکروارگانیزم‌های مورد آزمون

Williams Wilkins Co., Baltimore; 1996; pp: 330-396.

- 5- Ettayebi, K; Yamani, J.E. and Rossi-Hassani, B; Synergistic effects of nisin and thymol on antimicrobial activities in *Listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis*. FEMS Microbiol. Lett; 2000; 183: 191-195.
- 6- Gallo, L.I; Pilosof, A.M.R. and Jagus, R.J; Effective control of *Listeria innocua* by combination of nisin, pH and low temperature in liquid cheese whey. Food Control; 2007; 18: 1086-1092.
- 7- Gillissen, G.M; Schumacher D. and Breuer-Werle, M; Modulation of antimicrobial effects of beta-lactams by amino acids in vitro. Zentbl. Bakteriologie. Parasitenkd. Infektkrankh. Hyg; 1991; 275:223-232.
- 8- Goni, P; Lopez, P; Sanchez, C; Gomez-Lus, R; Becerril, R. and Nerin, C; Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. Food Chem; 2009; 116: 982-989.
- 9- Jafarzadeh, L; Asgari, A; Golshan-Iranpoor, F; Kheiri, S; Parvin, N. and Rafeian, M; Abortifacient effects of *Stachys lavandulifolia* Vahl in mice. J. Shahrekord Uni. Med. Sci; 2010; 11(4): 26-31.
- 10- Hammes, W; Schleifer, K.H. and Kandler, O; Mode of action of glycine on the biosynthesis of peptidoglycan. J. Bacteriol; 1973; 116: 1029-1053.
- 11- Hishinuma, F; Izaki, K. and Takahashi, H; Effects of glycine and D-amino acids on

است. در مورد لیستریا مونوسیتوژنز و رودوتورولا موسیلاژینوزا بر هم کنشی افزایشی و البته نزدیک به مرز برهم کنش از نوع عدم تأثیر ایجاد شده است. برهم کنش ایجاد شده بین گلايسين و روغن فرار استاکيس عليه باسيلوس سرئوس و سالمونلا تایفی موریوم از نوع عدم تأثیر می باشد. پس می توان اذعان نمود که ترکیب روغن فرار با گلايسين، نمی تواند به عنوان یک انتخاب مناسب تلقی گردد. بر اساس مروری که در مقالات در دسترس به عمل آمد، متأسفانه اطلاعاتی در مورد برهم کنش ضد میکروبی گلايسين با روغن های فرار به منظور بحث و مقایسه یافت نشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاری دانشگاه شهرکرد برای تأمین هزینه های این مطالعه تقدیر و تشکر می گردد.

منابع

- 1- Cleveland, J; Montville, T; Nes, J.I.F. and Chikindas, M.L; Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. Int. J. Food Microbiol; 2001; 71: 1-20.
- 2- Delves-Broughton, J; Blackburn, P; Evans, R.J. and Hugenholtz, J; Applications of the bacteriocin nisin. Antonie van Leeuwenhoek; 1996; 69: 193-202.
- 3- Ebrahimabadi, A.H; Ebrahimabadi, E.H; Djafari-Bidgoli, Z; Kashi, F; Mazoochi, A. and Batooli, H; Composition and antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and extracts of *Stachys inflata* Benth from Iran. Food Chem; 2010; 119: 452-458.
- 4- Eliopoulos, G.M. and Moellering, R.C; Antimicrobial combinations, in Antibiotics in Laboratory Medicine, Lorain, V., 4 Ed.,

- 19- Ray, B; Fundamental food microbiology. 3th ed.; Boca Raton: CRC Press; 1996; pp: 131-132.
- 20- Saei-Dehkordi, S.S; Tajk, H; Moradi, M. and Khalighi-Sigaroodi, F; Chemical composition of essential oils in *Zataria multiflora* Boiss. from different parts of Iran and their radical scavenging and antimicrobial activity. Food Chem. Toxicol; 2010; 48: 1562-1567.
- 21- Schwartz, A.C; Quecke, W. and Brenschede, G; Inhibition by glycine of the catabolic reduction of proline in *Clostridium sticklandii*: evidence on the regulation of amino acid reduction. Zeitschrift. Allgem. Microbiol; 1979; 19: 211-220.
- 22- Walker, S.J; Major spoilage microorganisms in milk and dairy products. J. Soci. Dairy Technol; 1988; 41: 91-92.
- 23- Wojtatowicz, M; Chrzanowska, J; Juskekyk, P; Skib, A. and Gdula, A. Identification and biochemical characteristics of yeast mycoflora of Rokpol cheese. Int. J. Food Microbiol; 2002; 69: 135-140.
- growth of various microorganism. Agri. Biol. Chem; 1969; 33:1577-1586.
- 12- Kim, D.H; Lee, Y.T; Lee, Y.J; Chung, J.H; Lee, B.L; Choi, B.S. and Lee, Y; Bacterial expression of tenecin 3, an insect antifungal protein isolated from *Tenebrio molitor*, and its efficient purification. Mol. Cell; 1998; 8: 786-789.
- 13- Knobloch, E; Pauli, A; Iberl, B; Wies, N. and Weigand, H; Mode of action of essential oil components on whole cells of bacteria and fungi in plate tests; Bioflavour; 1987; 21: 287-299.
- 14- Mabberley, D.J; The Plant-Book. Cambridge: Cambridge University Press; 1997; pp: 73-74.
- 15- Minami, M; Ando, T; Hashikawa, S; Torii, K; Hasegawa, T. and Isral, D.A; Effect of Glycine on *Helicobacter pylori* In Vitro. Antimicrob. Age. Chemoth; 2004; 3782-3788.
- 16- Ouattara, B; Simard, R.E; Piette, G; Begin, A. and Holley, R.A; Diffusion of acetic and propionic acids from chitosan-based antimicrobial packaging films. J. Food Sci; 2000; 65 (5): 768-773.
- 17- Pang, T; Bhutta, A.Z.A; Finlay, B.B. and Altwegg, M; Typhoid fever and other salmonellosis: A continuing challenge. Trends Microbiol; 1995; 3: 253-255.
- 18- Periago, P.M; Palop, A. and Fernandez, P.S; Combined effect of nisin, carvacrol and thymol on the viability of *Bacillus cereus* heat-treated vegetative cells. Food Sci. Technol. Int; 2001; 7: 487-492.

Antimicrobial interactions between essential oil of *Stachys lavandulifolia* Vahl., with nisin and glycine on foodborne pathogens and food spoilage organisms

Saei-Dehkordi, S.S.¹; Fallah, A.A.¹; Moshtaghi, H.²;
Molanouri-Shamsi, S.³; Karimi-Dehkordi, S.⁴

1- Assistant Professor, Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord-Iran.

2- Associate Professor, Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord-Iran.

3- Student, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord-Iran

4- Student, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modarres University, Tehran-Iran.

Summary

Combination of antimicrobial agents can enhance the inhibition of foodborne pathogens and food spoilage organisms. The aim of the study was to evaluate the antimicrobial activity of *Stachys lavandulifolia* Vahl. essential oil in combination with nisin or glycine, in order to find synergism, indifferent or antagonism interactions. The essential oil of plant was obtained by a cleverger-type apparatus. In order to determine chemical composition, the volatile oil was injected to a GC followed by GC/MS. Antimicrobial properties of the oil, nisin and glycine were determined by a microbroth dilution method, separately. Antimicrobial interactions were carried out using a Checkerboard titration and Fractional Inhibitory Concentration Indices (FICI) were calculated, consequently. Linalool was the most abundant constituent among the oil constituents. The gram negative bacteria and the yeasts were the most resistant and sensitive against glycine and essential oil, respectively. *Listeria monocytogenes* was the most sensitive and *Candida albicans* and gram negatives were the most resistant against nisin. Nisin and oil combination resulted in a synergism effect, but the glycine and oil combination led to antagonism, indifferent or additive effects. Antimicrobial interaction of essential oil of *Stachys* with nisin or glycine resulted in decrease of minimum inhibitory concentrations that was more important for gram negative bacteria and yeasts inhibition. However, minimizing the minimum inhibitory concentrations lonely isn't equal to a synergism effect and may conclude additive, indifferent or antagonism effects.

Keywords: Antimicrobial interactions, *Stachys lavandulifolia* essential oil, Nisin, Glycine, Fractional Inhibitory Concentration