مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۸، دوره ۷۴، شماره ۲، ۲۱۸-۲۰۹
Original Article
DOI: 10.22059/jvr.2018.239101.2678

تأثیر سینرژیستیک نایسین و اسانس دارچین (*Cinnamomum verum*) بر رشد لاکتو کوکوس گارویه (*Lactococcus garvieae*) در فیله قزل‌آلای رنگین‌کمان

آیلا نادی، لاله رومیانی*، منصوره قائنی
گروه شیلات، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران

(دریافت مقاله: ۱۴ آذر ماه ۱۳۹۷، پذیرش نهایی: ۷ اسفند ماه ۱۳۹۷)

چکیده

زمینه مطالعه: بیماری لاکتوکوکوزیس به علت لاکتو کوکوس گارویه در مزارع پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، یکی از مهم‌ترین باکتری‌های بیماریزای مشترک بین ماهی و انسان به حساب می‌آید.

هدف: هدف این مطالعه، ارزیابی اثر اسانس دارچین (*Cinnamomum verum*) و نایسین در کنترل رشد لاکتو کوکوس گارویه (*Lactococcus garvieae*) بود.

روش کار: در این بررسی، اسانس گیاه دارچین به روش تقطیر با بخار با دستگاه کلونجر تهیه شد. جهت آماده‌سازی نایسین از اسید کلریدریک ۰/۰۲ نرمال استفاده شد. غلظت‌های (۰، ۰/۴ و ۰/۸ درصد) اسانس دارچین و (۰، ۰/۲۵ و ۰/۷۵ µg/mL) نایسین و ترکیب غلظت‌های فوق با هم به فیله‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان اضافه شد. شمارش باکتری‌ها به ازای هر گرم در روزهای ۰، ۳، ۶، ۹، ۱۲ و ۱۵ پس از تلقیح صورت پذیرفت.

نتایج: در نمونه‌های نگهداری شده در دما ۴°C، رشد باکتری هنگام استفاده اسانس دارچین یا نایسین به تنهایی تا روز پانزدهم به تعویق افتاد و در مورد دارچین میزان رشد باکتری در دو روز نهم و پانزدهم به زیر ۲ log cfu/g رسید. ترکیب ۰/۸ µg/mL نایسین و ۰/۷۵ درصد اسانس دارچین توانست در روز سوم رشد را به تعویق بیاندازد. در دمای ۸ درجه سانتی‌گراد، نایسین و اسانس دارچین به حالت مجزا و در حال ترکیب (مشابه ۴°C) تا روز ششم توانستند جلوی رشد باکتری را بگیرند. همچنین نتایج نشان داد ترکیب نایسین و اسانس دارچین به شکل معنی‌داری ($P<0/05$) عملکرد بالاتری در مقایسه با حالت منفرد آن‌ها داشت.

نتیجه‌گیری نهایی: نایسین و اسانس دارچین رشد لاکتو کوکوس گارویه را به خصوص در غلظت ۰/۸ درصد اسانس و ۰/۷۵ µg/mL نیسین در فیله قزل‌آلای رنگین کمان مهار کردند.

واژه‌های کلیدی: لاکتو کوکوس گارویه، اسانس دارچین، نایسین، قزل‌آلای رنگین کمان، دما

کپی رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله تحقیقات دامپزشکی محفوظ است.

*) نویسنده مسئول: تلفن: ۰۶۱-۳۳۳۴۸۳۶۱، نمابر: ۰۶۱-۳۳۳۴۸۳۶۱ Email: l.roomiani@yahoo.com

How to Cite This Article
Roomiani, L., Roomiani, L., ghaeni, M. (2019). Synergistic Effect of Nisin and Cinnamon Essential Oil (*Cinnamomum verum*) on the Growth of *Lactococcus garvieae* in Fish Fillets of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). J Vet Res, 74(2), 209-218. doi: 10.22059/jvr.2018.239101.2678

مقدمه

یکی از مهمترین معضلات بهداشتی در خصوص مصرف دام‌ها و آبزیان، وجود بیماری‌های است که بین انسان و حیوان مشترک هستند. از جمله این عوامل بیماریزای بسیار خطرناک مشترک بین انسان و آبزیان، لاکتو کوکوس گاروییه است. این باکتری گرم مثبت، بدون‌هاگ، غیرمتحرک، بی هوازی اختیاری و دارای زنجیره‌های کوتاه، باعث بروز تلفات زیادی در ماهیان قزل آلا شده و پس از انتقال به انسان قادر به بروز عوارضی مانند منتژیت در افراد سالم با سیستم ایمنی ضعیف می‌شود (۱). یکی از راه حل‌هایی که سال‌ها برای جلوگیری از انتقال این عوامل بیماری زا به انسان در پیش گرفته شده است، استفاده از انواع مختلفی از آنتی بیوتیک‌ها در درمان آبزیان است. برای کاهش یا جلوگیری از وابستگی صنعت آبزی پروری به داروها و از آنجایی که هنوز ایمنی استفاده از آنتی بیوتیک‌ها مورد سوال است، محصولات طبیعی برای کنترل باکتری‌ها به عنوان راه حل دیگر مورد توجه واقع شده اند. افزایش آگاهی عموم درباره اثرات منفی استفاده بیش از حد از مواد شیمیائی مصنوعی منجر به تحقیق درباره محلول‌های سبز مانند اسانس‌های گیاهی و بدون مواد شیمیایی گردیده است (۲). هزینه بالا و در دسترس نبودن واکسن‌های تجاری منطقه‌ای و رعایت اصول امنیت زیستی به منظور جلوگیری از ورود اولیه باکتری به مزارع، سبب گردید که استفاده از اسانس‌های گیاهی مورد توجه واقع شوند. اسانس‌های گیاهی روغن‌های فراری هستند که اثرات ضد میکروبی آن‌ها شناخته شده است و از بخش‌های مختلف گیاه به دست می‌آیند. این اسانس‌ها مایع، خالص و بندرت رنگی هستند و از طریق ناپایدار ساختن لایه فسفولیپیدی غشاء سلولی، سیستم آنزیمی و مواد ژنتیکی باکتری نقش ضد باکتریایی خود را ایفا می‌کنند(۳). ترکیب اسانس‌های گیاهی با نایسین تأثیرات سینرژیکی بر روی کاهش ATP برون سلولی میکروارگانیسم‌ها دارد. نکته قابل توجه این است که اگر مواد نگهدارنده طبیعی به جای مواد شیمیایی در مواد غذایی استفاده شوند لازم است که ارزیابی فعالیت ضد میکروبی آن‌ها در آزمایشگاه و سپس در مدل‌های غذایی صورت گیرد. بنابراین امروزه به پیشرفت تکنیک‌های جدید برای حذف یا کاهش عوامل بیماریزای مواد غذایی از طریق ترکیب شیوه‌های نوین با روش‌های جدید نیاز است (۶).

با توجه به اینکه سلامت غذا یک موضوع مهم چه از دیدگاه مصرف کننده مواد غذایی و چه از دیدگاه صاحبان صنایع غذایی بوده است و موارد متعددی از عفونت‌های حاصل از مواد غذایی آلوده دیده شده است، لذا توجه به سلامت مواد غذایی و ارائه راهکارهایی جهت حفظ و نگهداری مواد غذایی در حال گسترش است. همچنین به دلیل اثرات منفی استفاده از نگهدارنده‌های شیمیایی و روش‌ها و سیستم‌های کنترلی وقت‌گیر و گران، استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی توصیه می‌گردد (۸). از جمله مطالعات انجام شده در زمینه استفاده از عصاره‌های گیاهی می‌توان به مطالعه Roomiani و Rokni در سال ۲۰۱۵، بر روی اثر بازدارندگی اسانس زیره سبز و نایسین بر میزان رشد استرپتوکوکوس اینیایی در فیله ماهی قزل‌آلا (۹)، Pajohi و همکاران در سال ۲۰۱۱، تأثیر سینرژیسم نایسین همراه با اسانس دارچین علیه باسیلوس سرئوس و باسیلوس سابتیلوس (۱۰) و نیز Ekhtiarzadeh و همکاران در سال ۲۰۱۲، رفتار رشد ویبریو پاراهمولایتیکوس و لیستریا مونوسیتوژنز در فیله ماهیان شور شده تحت تأثیر نایسین و اسانس آویشن شیرازی را مورد بررسی قرار دادند (۱۱)، که همگی تأثیرات مثبت اسانس‌های گیاهی بر روی حفظ مواد غذایی را تأیید می‌کنند. اغلب تحقیقات در خصوص اثرات ممانعت‌کنندگی اسانس دارچین و نیسین در محیط آزمایشگاهی انجام شده است، اما مطالعات معدودی در خصوص تأثیریات بازدارندگی این اسانس و ماده طبیعی نیسین در ماده غذایی نظیر فیله ماهی انجام شده است. هدف اصلی این تحقیق، مطالعه و تعیین دوزهای مؤثر گیاه دارچین و نیسین به صورت انفرادی و ترکیبی در کنترل باکتری زئونوز لاکتو کوکوس گاروییه که عامل بیماریزایی مهمی برای دامنه وسیعی از عفونت‌های انسانی و حیوانی است (۱۲) در فیله ماهی قزل آلای رنگین‌کمان می‌باشد. در این تحقیق کوشش شده است که اثر غلظت‌های مختلف اسانس دارچین، نیسین، درجه حرارت نگهداری و طول مدت نگهداری روی رفتار رشد باکتری لاکتو کوکوس گاروییه بررسی گردد.

مواد و روش کار

آنالیز اسانس دارچین: گیاه دارچین، در سال ۱۳۹۵ از استان البرز جمع آوری شد. اسانس به روش تقطیر با بخار تهیه شد. جهت انجام این کار، ۱۰۰ گرم از پودر گیاه خشک در یک بالن ته گرد ۱ L ریخته شده و دو سوم بالن با آب پر شد. بالن به دستگاه کلونجر متصل و عمل تقطیر به مدت ۴ ساعت انجام شد. برای شناسایی ترکیبات اسانس از گاز کروماتوگرافی متصل شده به طیف سنج جرمی استفاده شد. دستگاه از نوع Termoquest Finnigan با ستون مویینه به طول ۳۰ m و قطر داخل ۲۵۰ µm و ضخامت لایه داخل ۰/۲۵ µ با برنامه دمایی ۵۰ °C تا ۲۶۵ و همراه با افزایش تدریجی ۲/۵ min و نگهداری ستون در ۲۶۵ به مدت ۳۰ min استفاده شد.

آماده‌سازی محلول نایسین: از پودر نایسین ۲/۵ درصد (Sigma ۵۷۶۴) استفاده شد. به منظور استفاده، این ماده در اسید کلریدریک ۰/۰۲ N حل شد. سپس ۵۰۰ mL پودر نایسین را در ۵۰ mL اسید آماده شده در زیر هود بیولوژیکی حل شد، بطوریکه در ظرف استریل دیگری این محلول از فیلتر ۰/۲ µm عبور داده م شد و با استفاده از رابطه $N_1V_1 = N_2V_2$ مقدار مورد نظر از آن را برداشته و به ظروف دربدار افزوده و پس از پخش شدن آن در آب، برش‌های ماهی‌های مورد نظر به آن اضافه می‌گردید (۱۳).

آماده‌سازی نمونه‌های ماهی: در این مطالعه از قزل‌آلای رنگین‌کمان g ۲۵۰ استفاده شد. ماهیان خریداری و پس از دمزنی و خارج کردن محتویات

آن‌ها، به فیله‌های g ۲۵ تقسیم و در دمای مناسب (۲ °C) در کیسه‌های زیپ‌دار و همراه با یخ به منظور استریل به سازمان انرژی اتمی جهت تابش اشعه گاما تا حدود kGy ۵ ارسال و مجدداً در مجاورت یخ به آزمایشگاه منتقل شدند (۹). سپس غلظت‌های مختلف اسانس دارچین (۰، ۰/۴ و ۰/۸ درصد) و نایسین (۰، ۰/۲۵ و ۰/۷۵ µg/mL) و ترکیب غلظت‌های فوق با هم به شیشه‌های دربدار استریل اضافه شد.

تهیه باکتری و تعیین بار میکروبی: کشت لیوفلیزه لاکتو کوکوس گارویه (*Lactococcus garvieae* ۱۷۰A-Ir) (۸۵۶bp) از گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه شد (۱۴). جهت کشت متوالی، از محیط براث BHI و در °C ۳۷ به مدت h ۱۸ استفاده شد. سپس کشت حاصله، به میزان ۵ به ۱ با گلیسیرین مخلوط و در لوله‌های میکروسانتریفیوژ در °C ۲۰- نگهداری شد. جهت تعیین بار میکروبی، باکتری در زیر هود به صورت تلقیح نقطه‌ای در ۱۰ نقطه و جمعاً µm ۱۰۰ به فیله‌ها تلقیح و به دو دمای °C ۴ و ۸ منتقل شدند. بدین ترتیب در هر بار انجام آزمایش (در شرایط مواد غذایی) 10^3 باکتری در mL با مشخص شدن جذب نوری که تقریباً معادل ۱۰۵ باکتری در mL بود (که بعد با کشت Pour Plate، کشت مخلوط نیز تایید می‌شد) لوله کووت حاوی تقریباً 10^5 باکتری mL مشخص گردید. سپس mL ۱ از این کووت را برداشته و در شیشه زیمکس، mL ۳۹ از آب پپتونه استریل به آن افزوده گردید تا در نهایت در هر µL ۱۰۰ از محتویات شیشه زیمکس $10^8 \times 1/4$ باکتری موجود باشد (با کشت بر روی آگار این تعداد تایید می‌شود). در زمان تلقیح برش‌های ماهی از µL ۱۰۰ محتویات شیشه زیمکس استفاده می‌شد تا در cm^2 از برش ماهی $10^3 \times 1$ باکتری موجود باشد. شمارش باکتری‌ها در روزهای ۰، ۳، ۶، ۹، ۱۲ و ۱۵ پس از تلقیح صورت پذیرفت (۱۴).

تجزیه و تحلیل آماری: داده‌های مربوط به نتایج مربوطه با استفاده از نرم افزار SPSS ۲۰/۰ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. از تجزیه واریانس یک طرفه جهت مقایسه میانگین‌ها استفاده شد و در مواردی که بین میانگین‌ها اختلاف معنی‌دار ($P<0/05$) وجود داشت جهت جداکردن آن‌ها از تست توکی استفاده شد.

نتایج

نتایج آنالیز GC-MS: آنالیز اسانس دارچین نشان داد که E-سینامالدهید با ۸۵/۲۴ درصد و آلفا-کوپائین با ۲/۳۰ درصد بیشترین ترکیبات اسانس دارچین را بخود اختصاص داده‌اند (جدول ۱).

نتایج آزمون میکروبی: لگاریتم رشد باکتری در غلظت‌های مختلف نایسین در °C ۴ در فیله قزل‌آلای رنگین‌کمان در جدول ۲، نشان داده شده است. بر اساس نتایج این جدول، در غلظت‌های µg/mL ۰/۲۵ و ۰/۷۵ با افزایش روز، لگاریتم رشد باکتری تحت تأثیر نایسین به شکل معنی‌داری کاهش یافت ($P<0/05$) و در بیشترین غلظت نایسین (۰/۷۵ µg/mL) تعداد باکتری از ۴/۰۰±۰/۰۰ log cfu/g به ۲/۸۸±۰/۰۲ log cfu/g باکتری رسید. همچنین غلظت‌های µg/mL ۰/۲۵ و ۰/۷۵ از نایسین در دمای °C ۴ در فیله ماهی با نتایج لگاریتم تعداد باکتری در گروه کنترل اختلاف معنی‌دار داشتند ($P<0/05$) اما دو گروه µg/mL ۰/۲۵ و ۰/۷۵ نایسین به جز روز پانزدهم در سایر روزها با یکدیگر اختلاف معنی‌دار نداشتند ($P>0/05$).

لگاریتم رشد باکتری در غلظت‌های مختلف اسانس دارچین در دمای °C ۴ در فیله قزل‌آلای رنگین‌کمان در جدول ۳، نشان داده شده است. بر اساس نتایج این جدول، در غلظت‌های ۰/۴ و ۰/۸ درصد با افزایش روز نگهداری، لگاریتم رشد باکتری تحت تأثیر اسانس دارچین به شکل معنی‌داری کاهش یافت ($P<0/05$) و در دو غلظت اسانس دارچین (۰/۴ و ۰/۸ درصد) تعداد باکتری به کمتر از log cfu/g ۲ باکتری رسید. غلظت‌های ۰/۴ و ۰/۸ درصد از اسانس دارچین در دمای °C ۴ در فیله ماهی با نتایج لگاریتم تعداد باکتری در گروه کنترل اختلاف معنی‌دار داشتند ($P<0/05$) اما دو گروه ۰/۴ و ۰/۸ درصد به جز در روز ۶، با یکدیگر اختلاف معنی‌دار نداشتند ($P>0/05$).

جدول ۴، نشان می‌دهد که در بررسی سینرژیسم نایسین و اسانس دارچین با هم بر لگاریتم رشد لاکتو کوکوس گارویه (L.garviea) نسبت به تیمار کنترل، نتایج از نظر آماری اختلاف معنی‌دار داشتند ($P<0/05$). همچنین مقایسه لگاریتم رشد باکتری نشان می‌دهد که استفاده توام از دو ماده در مقایسه با استفاده منفرد از این مواد، به شکل معنی‌داری مانع رشد باکتری شد ($P<0/05$). سطح µg/mL ۰/۸ نایسین و ۰/۷۵درصد اسانس دارچین، بهترین کارکرد را داشت و از روز سوم رشد باکتری در این تیمار مشاهده نشد. مطابق این جدول، بین غلظت‌های مختلف استفاده شده، با افزایش سطح نایسین و اسانس دارچین به شکل معنی‌داری رشد لگاریتمی لاکتو کوکوس گارویه کاهش یافت ($P<0/05$).

لگاریتم رشد باکتری در غلظت‌های مختلف نایسین در دمای °C ۸ در فیله قزل‌آلای رنگین‌کمان در جدول ۵، نشان داده شده است. بر اساس نتایج این جدول، در غلظت-های µg/mL ۰/۲۵ و ۰/۷۵ با افزایش روز، لگاریتم رشد باکتری تحت تأثیر نایسین به شکل معنی‌داری افزایش یافت ($P<0/05$) و در بیشترین غلظت نایسین (۰/۷۵ µg/mL) تعداد باکتری از ۵/۴۰±۰/۰۰ log cfu/g به ۵/۶۲±۰/۰۷ log cfu/g باکتری رسید ولی در روزهای نهم و پانزدهم رشد بسیار زیاد بود. همچنین غلظت‌های µg/mL ۰/۲۵ و ۰/۷۵ نایسین در دمای °C ۸ در فیله ماهی با نتایج لگاریتم تعداد باکتری در گروه کنترل اختلاف معنی‌دار داشتند ($P<0/05$). همچنین دو گروه µg/mL ۰/۲۵ و ۰/۷۵ نایسین در روز سوم و ششم نیز با یکدیگر اختلاف معنی‌دار داشتند ($P<0/05$). مطابق جدول ۵، در گروه کنترل رشد زیاد باکتری از روز ششم و در دو تیمار ۰/۲۵ و ۰/۷۵درصد نایسین، از روز نهم رشد زیاد باکتری مشاهد شد.

جدول ۱. آنالیز GC-MS ترکیبات شیمیایی اسانس دارچین.

ترکیب شیمیایی	زمان جداسازی	درصد
Benzaldehyde	۱۳/۷۶	۰/۵۰
bornrol	۲۴/۳۵	۰/۱۷
Z-Cinnamaldehyde	۲۶/۹۰	۰/۶۲
E-Cinnamaldehyde	۲۹/۸۲	۸۵/۲۴
cyclosativene	۳۳/۲۲	۰/۱۲
α-Copaene	۳۳/۵۰	۲/۳۰
¥-Muurolene	۳۷/۷۹	۰/۴۳
ar-Curcumene	۳۸	۰/۲۱
α-Amorphene	۳۸/۷۹	۱/۲۷
□-Cadinene	۳۹/۴۲	۰/۱۶
□-Cadinene	۳۹/۵۶	۰/۹۸
trans-Calamenene	۳۹/۸۱	۰/۹۷
α-Calacorene	۴۰/۳۴	۰/۱۴
p-methoxy-Cinnamaldehyde	۴۰/۵۴	۱/۲۵
ß-Calacorene	۴۰/۶۴	۰/۲۸
Caryophyllenyl alcohol	۴۲/۰۸	۰/۱۷
Gleenol	۴۲/۴۲	۰/۱۰
ß-Oploenone	۴۳/۱۱	۰/۲۲
di-epi-Cubenol-۱,۱۰	۴۳/۳۸	۰/۲۰
epi-Cubenol- ۱	۴۴/۰۵	۰/۵۱
epi-α- Muurool	۴۴/۶۹	۰/۸۳
Calacorene-ß	۴۴/۷۷	۰/۴۱
α-Muurool	۴۵/۱۳	۰/۱۷
Cadinol	۴۵/۸۹	۰/۷۴
epi-α-Bisabolol	۴۶/۲۳	۰/۱۵

جدول ۲. لگاریتم رشد باکتری در غلظت‌های مختلف نایسین در روزهای مختلف نگهداری در دمای ۴ °C در فیله قزل‌آلای رنگین کمان. مقادیر با حروف کوچک متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار است ($P<۰/۰۵$).

نایسین (µg/mL)	دارچین(درصد)	روز صفر	روز سوم	روز ششم	روز نهم	روز پانزدهم
۰	۰	۴/۰۰± ۰/۰۰ [a]	۴/۶۰± ۰/۰۲ [a]	۵/۹۳± ۰/۰۶ [a]	۶/۱۲± ۰/۰۵ [a]	۶/۲۴± ۰/۰۲ [a]
۰/۲۵	۰	۴/۰۰± ۰/۰۰ [a]	۳/۵۰± ۰/۲۱ [b]	۴/۱۹± ۰/۲۰ [a]	۳/۷۴± ۰/۱۵ [b]	۳/۱۱±۰/۱۱ [c]
۰/۷۵	۰	۴/۰۰± ۰/۰۰ [a]	۳/۹۶± ۱/۴۴ [b]	۳/۳۶± ۱/۵۷ [c]	۳/۱۷± ۱/۸۸ [d]	۲/۸۸±۰/۰۲ [d]

لگاریتم رشد باکتری در غلظت‌های مختلف اسانس دارچین در دمای ۸ °C در فیله قزل‌آلای رنگین‌کمان در جدول ۶، نشان داده شده است. بر اساس نتایج این جدول، در غلظت‌های ۰/۴ و ۰/۸ درصد اسانس دارچین با افزایش روز نگهداری، لگاریتم رشد باکتری تحت تأثیر اسانس دارچین به شکل معنی‌داری افزایش یافت ($P<۰/۰۵$) و در بیشترین غلظت دارچین (۰/۸ درصد) تعداد باکتری از ۰/۱۵ ±۴/۹۹ log cfu/g به ۰/۰۰ ±۵/۸۲ log cfu/g باکتری رسید، ولی در روزهای نهم و پانزدهم رشد باکتری بسیار زیاد بود. غلظت‌های ۰/۴ µg/mL و ۰/۸ اسانس دارچین در فیله ماهی با گروه کنترل اختلاف معنی‌دار داشتند ($P<۰/۰۵$)، همچنین دو گروه µg/ ۰/۴ mL و ۰/۸ اسانس در روز سوم و ششم با یکدیگر اختلاف معنی‌دار داشتند ($P<۰/۰۵$). مطابق جدول ۶، در گروه کنترل رشد زیاد باکتری از روز ششم و در دو تیمار ۰/۴ و ۰/۸ درصد دارچین، از روز نهم رشد بالای باکتری مشاهد شد.

جدول ۷، نشان می‌دهد که در بررسی سینرژیسم نایسین و اسانس دارچین با هم بر لگاریتم رشد لاکتو کوکوس گارویه نسبت به تیمار کنترل، نتایج از نظر آماری اختلاف معنی‌دار داشتند ($P<۰/۰۵$). با افزایش روز نگهداری، لگاریتم رشد باکتری افزایش معنی‌داری نشان داد. به جز تیمار ۰/۴ µg/mL نایسین و ۰/۲۵ درصد اسانس دارچین، سایر تیمارهای دارای

جدول ۳. لگاریتم رشد باکتری در غلظت‌های مختلف اسانس دارچین در روزهای مختلف نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در فیله قزل‌آلای رنگین‌کمان. مقادیر با حروف کوچک متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار است ($P<۰/۰۵$).

نایسین (µg/mL)	دارچین(درصد)	روز صفر	روز سوم	روز ششم	روز نهم	روز پانزدهم
۰	۰	۴/۹۰± ۰/۰۰ a	۴/۱۷± ۰/۲۲ a	۴/۷۹± ۰/۱۶ a	۳/۵۵± ۰/۳۹ a	۳/۳۲± ۰/۱۱ b
۰	۰/۴	۴/۹۰± ۰/۰۰ a	۳/۴۷± ۰/۱۲ a	۳/۵۵± ۰/۱۱ b	۲>	۲>
۰	۰/۸	۴/۹۰± ۰/۰۰ a	۳/۲۹± ۰/۱۹ b	۲/۶۲± ۰/۱۵ c	۲>	۲>

جدول ۴. لگاریتم رشد باکتری در غلظت‌های مختلف نایسین و اسانس دارچین در روزهای مختلف نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در فیله قزل‌آلای رنگین‌کمان. مقادیر با حروف کوچک متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار است ($P<۰/۰۵$).

نایسین (µg/mL)	دارچین(درصد)	روز صفر	روز سوم	روز ششم	روز نهم	روز پانزدهم
۰	۰	۴/۹۰±۰/۰۰ a	۵/۲۳±۰/۲۱ a	۴/۲۴±۰/۲۵ a	۳/۳۴±۰/۳۴ a	۳/۲۵±۰/۱۶ a
۰/۴	۰/۲۵	۴/۹۰±۰/۰۰ a	۳/۳۳±۰/۳۴ b	۴/۳۴±۰/۴۳ a	۳/۵۵±۰/۰۲ b	۳/۱۵±۰/۰۲ c
۰/۸	۰/۲۵	۴/۹۰±۰/۰۰ a	۲/۷۶±۰/۲۲ b	۲/۲۶±۰/۱۹ c	-	-
۰/۴	۰/۷۵	۴/۹۰±۰/۰۰ a	۲/۲۳±۰/۰۶ b	-	-	-
۰/۸	۰/۷۵	۴/۹۰±۰/۰۰ a	-	-	-	-

جدول ۵. لگاریتم رشد باکتری در غلظت‌های مختلف نایسین در روزهای مختلف کشت در دمای ۸ °C در فیله قزل‌آلای رنگین کمان. مقادیر با حروف کوچک متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار است ($P<۰/۰۵$).

نایسین (µg/mL)	دارچین (درصد)	روز صفر	روز سوم	روز ششم	روز نهم	روز پانزدهم
۰	۰	۰	۵/۴۰± ۰/۰۰ a	۶/۶۰± ۰/۰۱ a	-	-
۰/۲۵	۰	۰	۵/۴۰± ۰/۰۰ a	۵/۸۰± ۰/۱۱ b	۵/۹۸± ۰/۰۲ b	-
۰/۷۵	۰	۰	۵/۴۰± ۰/۰۰ a	۵/۵۰± ۰/۰۴ b	۵/۶۲± ۰/۰۷ c	-

هر دو ترکیب تا روز ششم توانستند جلوی رشد باکتری را بگیرند، اما از روز نهم رشد بالای باکتری مشاهده شد. مقایسه بین تیمارها در روز ششم نشان داد تیمار ۰/۸ µg/mL نایسین و ۰/۷۵ درصد اسانس دارچین به طور معنی‌داری کمترین رشد باکتری را داشت ($P<۰/۰۵$).

بحث

سرعت بالای فسادپذیری و اکسیداسیون در ماهی سبب می‌شود تا دوره ماندگاری این محصول بخصوص در دمای یخچال بسیار محدود باشد. برای افزایش ماندگاری این گونه محصولات از مواد مختلفی به عنوان نگهدارنده استفاده می‌شود. این مواد نگهدارنده می‌توانند طبیعی و یا شیمیایی باشند (۱۵). اما آن دسته از مواد نگهدارنده که امروز مورد توجه هستند، نگهدارنده‌های طبیعی هستند، از جمله نایسین و انواع اسانس‌های گیاهی نظیر دارچین که در تحقیق حاضر مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد، نایسین و اسانس دارچین دارای اثرات ضدباکتری بر روی لاکتو کوکوس گاروییه در فیله قزل‌آلای رنگین‌کمان در دمای ۴ °C و ۸ بودند. نتایج نشان داد که با افزایش سطح اسانس دارچین و نایسین قدرت باکتری‌کشی افزایش یافت. در مورد اسانس دارچین در هر دو دما، تیمار ۰/۸ درصد بالاترین عملکرد را داشت، هر چند تیمار ۰/۴ درصد هم در مقایسه با شاهد با اختلاف معنی‌دار قدرت بازدارندگی بیشتری را نشان داد، که در مجموع نشان دهنده قدرت باکتری‌کشی اسانس دارچین بر باکتری لاکتو کوکوس گاروییه است.

Quattara و همکاران در سال ۱۹۹۷ فعالیت ضد میکروبی دارچین را مرتبط با فعالیت سینامالدهید برای جلوگیری از دکربوکسیلاز آمینواسیدها دانستند (۱۸). همچنین Wendakoon و Sakaguchi در سال ۱۹۹۵ که سینامالدهید با الکترونگاتیوی بالا در سیستم‌های بیولوژیکی میکروارگانیسم‌ها تداخل ایجاد کرده و با ایجاد واکنش با ترکیبات نیتروژن‌دار همانند پروتئین از رشد میکروارگانیزم‌ها جلوگیری می‌کند (۱۹). علاوه بر سینامالدهید (۱۷،۲۷)، بنزوویک اسید، بنزآلدهید و سینومیک اسید و اوگنول (۲۲) علاوه بر خاصیت قارچ‌کشی، خاصیت میکروبی اسانس را نیز تقویت می‌کند (۵). همچنین اضافه کردن اسانس به محیط دارای نیسین باعث افزایش ناحیه بازداری اطراف محیط می‌شود (۳۲).

تجزیه اسانس دارچین نشان داد که سینامالدهید با ۸۵/۲۴ درصد بیشترین ترکیب را به خود اختصاص داد (۱۳). در پژوهش Taghizadeh Andavari و Rezaei (۲۰۱۲) اثر پوشش ژلاتین همراه با اسانس دارچین (۱/۵ درصد اسانس) بر دوره ماندگاری فیله قزآلای رنگین‌کمان در دمای یخچال را مورد بررسی قرار دادند (۳۱). نتایج آن‌ها نشان داد که تعداد باکتری‌های سرمادوست برای تیمار شاهد و پوشش ژلاتینی به صورت معنی‌داری بالاتر از تیمار دارای اسانس دارچین بود و آن‌ها عنوان کردند که با استفاده از پوشش ژلاتینی حاوی اسانس دارچین می‌توان از رشد باکتری در فیله‌های تازه ماهی جلوگیری کرد. در مورد نایسین نیز همانند اسانس

جدول ۶. لگاریتم رشد باکتری در غلظت‌های مختلف اسانس دارچین در روزهای مختلف کشت در دمای ۸ درجه سانتی‌گراد در فیله قزل‌آلای رنگین‌کمان. مقادیر با حروف کوچک متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار است ($P<0/05$).

نایسین (µg/mL)	دارچین(درصد)	روز صفر	روز سوم	روز ششم	روز نهم	روز پانزدهم
۰	۰	۴/۹۹± ۰/۰۰ a	۶/۰۰± ۰/۱۲ b	-	-	-
۰	۰/۴	۴/۹۹± ۰/۰۰ a	۵/۸۷± ۰/۰۲ b	۶/۳۵± ۰/۰۱ c	-	-
۰	۰/۸	۴/۹۹± ۰/۰۰ a	۵/۲۹± ۰/۱۹ b	۵/۸۲± ۰/۱۵ c	-	-

جدول ۷. لگاریتم رشد باکتری در غلظت‌های مختلف نایسین و اسانس دارچین در روزهای مختلف نگهدری در دمای ۸ °C در فیله قزل‌آلای رنگین‌کمان. مقادیر با حروف کوچک متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار است ($P<0/05$).

نایسین (µg/mL)	دارچین(درصد)	روز صفر	روز سوم	روز ششم	روز نهم	روز پانزدهم
۰	۰	۴/۱۵±۰/۰۰ a	-	-	-	-
۰/۲۵	۰/۴	۳/۹±۰/۰۰ a	۵/۳۳±۰/۳۴ b	-	-	-
۰/۲۵	۰/۸	۳/۹±۰/۰۰ a	۴/۷۶±۰/۲۲ b	۵/۹±۰/۱۹ c	-	-
۰/۷۵	۰/۴	۳/۴۴±۰/۰۰ a	۴/۲۳±۰/۰۶ b	۵/۷۴±۰/۲۲ c	-	-
۰/۷۵	۰/۸	۲/۸۴±۰/۰۰ a	۳/۳۳±۰/۰۱ b	۴/۹۹±۰/۰۹ c	-	-

دارچین، فعالیت باکتری‌کشی علیه لاکتوکوکوس گاروییه مشاهده شد و بالاترین سطح نایسین یعنی ۰/۷۵ µg/mL با اختلاف معنی‌دار ($P<0/05$)، بهترین عملکرد را در جلوگیری از رشد لاکتوکوکوس گاروییه نشان داد. هر چند سطح ۰/۲۵ µg/mL نیز در مقایسه با شاهد با اختلاف معنی‌دار قدرت باکتری کشی بالاتری را نشان داد.

محل اثر نایسین، غشا سیتوپلاسمی باکتری است که با ایجاد منافذی در غشا، ترکیبات ضروری مانند یون‌های پتاسیم و اسیدهای آمینه را خارج کرده و فرآیند بیوسنتزی سلول را متوقف و سلول باکتری را از بین می‌برد (۲۱). نتایج مشابه این تحقیق در کار Mobaseri و همکاران (۲۰۰۹) بر روی تأثیر نایسین در کاهش استافیلوکوکوس ائوس و لیستریا منوسایتوژنز دیده شد و عنوان کردند که نایسین می‌تواند به عنوان یک نگهدارنده بی‌ضرر در مواد غذایی استفاده شده و غلظت نگهدارنده‌های شیمیایی را کاهش دهد(۲۴). Mirshekari و همکاران (۲۰۱۶) تأثیرات آنتی‌باکتریایی و آنتی‌اکسیدانی نایسین (سطح ۰/۰۲درصد) را بر روی فیله ماهی سفید در ۴ °C مورد بررسی قرار دادند (۱۳). بعد از ۱۶ روز، مقادیر باکتری‌های اسیدلاکتیکی در تمامی تیمارها در محدوده قابل قبول قرار داشتند. نتایج آنالیز شیمیایی و میکروبی نشان دادند که نایسین سبب افزایش ماندگاری فیله و کاهش بار میکروبی فیله ماهی سفید در طول دوره نگهداری شد، که مشابه یافته‌های تحقیق حاضر است. در مطالعه Moosavy و همکاران (۲۰۱۵)، بر روی خواص ضد لیستریایی نایسین، نتایج نشان داد در هر دو غلظت ۸۰ IU/ml و ۱۶۰ IU/ml دارای اثر ضدباکتری بوده و غلظت بالاتر کاهش بیشتر در بار باکتری را به همراه داشت ($P<0/05$) (۱۶). همچنین آن‌ها در مطالعه‌ای که به بررسی اثر ضد میکروبی اسانس نعناع و نایسین به صورت ترکیبی بر روی لیستریا (۱۵) انجام دادند عنوان کردند که غلظت‌های ترکیبی مورد استفاده به صورت معنی‌داری سبب کاهش میزان باکتری لیستریا مونوسیتوژنز شدند. علت این امر را نیز تأثیر ترکیبی آن‌ها را در افزایش میزان تشکیل حفرات دانستند که در این حالت مرگ سلول سریع‌تر رخ می‌دهد (۲۳). همچنین عنوان شده است که استفاده از اسانس‌ها به همراه نایسین سبب بر طرف شدن محدودیت‌های استفاده از این ماده می‌شود زیرا نایسین حلالیت کمی در آب داشته و بیشترین میزان تأثیر آن در شرایط اسیدی است (۴).

کمیته بین‌المللی تعیین ویژگی‌های میکروبیولوژی مواد غذایی یا ICMSF، Log CFU/g ۷ را حد مجاز برای میزان بار باکتریایی کل در ماهی خام تعیین کرده است. که بررسی داده‌های بدست آمده نشان می‌دهد در طول دوره مورد بررسی (به غیر از روزهایی با رشد بالای لاکتوکوکوس گاروییه در دمای ۸ °C)، بار میکروبی کمتر از حد مجاز بود که نشان‌دهنده تأثیر فعالیت ضدباکتریایی نایسین و دارچین است. در پژوهش Taghizadeh Andavari و Rezaei (۲۰۱۲) میزان بار باکتریایی برای نمونه‌های شاهد و دارای پوشش ژلاتین در روز ۱۵ به ۷/۴۴ log cfu/g و ۷/۸۸ log cfu/g رسید که فراتر از حد مجاز بوده ولی در تیمار اسانس دارچین مقدار باکتری از حد مجاز کمتر بود و آن‌ها این امر را ناشی از تأثیر ضدمیکروبی پوشش ژلاتینی حاوی اسانس دارچین دانستند (۲۳).

ترکیب دو ماده نایسین و دارچین، در هر دو دمای ۴ °C و ۸ نتیجه بهتری در مقایسه با نتایج بررسی قدرت باکتری کشی لاکتوکوکوس گاروییه در حالت انفرادی داشت و بهترین عملکرد در حالت ترکیب و در بالاترین سطح آن‌ها یعنی در مورد دارچین ۰/۷۵ درصد و در مورد نایسین µg/mL ۰/۸ مشاهده شد. در این حالت، اثرات ضد باکتریایی آن‌ها با یکدیگر ترکیب و در نتیجه تشدید اثر تخریب‌کنندگی آن‌ها بر غشای باکتری بیشتر می‌شود (۲۸). Qasemi و همکاران (۲۰۱۵)، اثرات ضد میکروبی عصاره رزماری در ترکیب با نایسین بر باکتری استافیلوکوکوس ائوس موجود در گوشت چرخ کرده گاو را در یخچال مورد بررسی قرار دادند و عنوان کردند زمانی که رزماری با نایسین ترکیب گردید، در مقادیر پایین‌تر اثرات ضدمیکروبی

بالاتـری از خـود نشـان داد (۲۹).Ghaeni و Roomiani (۲۰۱۳)، تأثیر سینرژیستیک نایسین و اسانس زیره سبز (*Cuminum cyminum* L) بر روی رشـد *Streptococcus iniae* در فیله قزل‌آلای رنگین‌کمان را مورد بررسـی قرار دادند (۷). نتایج آن‌ها نشـان داد که ترکیب این دو ماده رشـد باکتری را تا روز سوم به تأخیر انداخت، در حالی که استفاده مجزای اسانس زیره یا نایسین توانست رشد باکتری را به ترتیب تا روز ششم و روز سـوم به تعویق بیاندازد. همچنین Ghasemi و همکاران (۲۰۱۵) عنوان کردند که تیمارهای اسـتفاده همزمان از نایسین و عصاره رزماری خاصیت ضدمیکروبی بالایی داشته و زمانی که نایسین و اسانس با یکدیگر ترکیب شـوند اثر ضد میکروبی بالاتری را از خود نشـان می‌دهند که با یافته‌های تحقیق حاضر هم‌خوانی دارد. مطالعات مختلف نشان‌دهنده افزایش کارایی نایسین در حالت ترکیبی با مواد دیگر همانند عصاره‌های گیاهی اشاره داد و علت آن را فراهم آوردن امکان نفوذ نایسـین به دورن باکتری‌ها توسـط ترکیبات دیگر بیان کرده‌اند (۲۶). برخی محققان اظهار می‌کنند که نایسین و اسانس‌های گیاهی می‌توانند روی غشای سیتوپلاسمی باکتری اثر بگذارد و در نهایت موجب افزایش تخریب ساختاری و عملکردی غشای باکتری‌ها شوند که با یافته‌های تحقیق حاضر هم‌خوانی دارد (۳۰).

مقایسه عملکرد دارچین و نایسین در دمای ۴ °C و ۸ نشان داد، دارچین عملکرد بهتری را نسبت به نایسین نشان داده است. در مطالعات Ghaeni و Roomiani (۲۰۱۳) نیز زیره سبز در مقایسه با نایسین عملکرد بالاتری داشـت. Roomiani (۲۰۱۲) در بررسی تأثیر اسانس رزماری و نایسین بر رفتار رشد *استرپتوکوکوس اینیایی* عنوان شد که در دمای ۴ °C رشد باکتری در غلظت‌های مختلف نایسین و رزماری به تنهایی تا روز نهم و در ترکیب با هم تا روز سوم به تأخیر افتاد (۲۴). در دمای ۸ °C در تمام غلظت‌های نایسین و رزماری از روز سوم به بعد نگهدارنده‌ها نتوانستند مانع رشد باکتری شوند، که دقیقا روندی مشابه پژوهش حاضر دارد. عمده نقش باکتری‌ها در فساد ماهـی به خصوص در دمای بالا، آمین‌زدایی اسـیدهای آمینه آزاد و تولید ترکیبات نیتروژنی فرار می‌باشد که علاوه بر کاستن از ارزش غذایی ماهی، بو و طعم نامطبوعی به آن می‌دهد (۳۲).

نتیجه‌گیری: اسـتفاده از مواد نگهدارنده بـه دلیل اینکه قادر به حفظ کیفیت ماهی بوده و دیگر نیازی به منجمد کردن که بازار پسندی را کاهش می‌دهد ندارد، می‌تواند مفید باشـد. همچنین مدت ماندگاری محصول در دمای یخچال که ۴ تا ۹ روز اعلام شـده اسـت را افزایش می‌دهد. در این پژوهش، نایسین و اسانس دارچین هر دو بر روی کاهش بار میکروبی فیله ماهی در هر دو دما مؤثر بودند. اما نتایج نشان داد عملکرد اسانس دارچین بخصوص در دمای ۴ °C بالاتر از نایسین بود. اما در حالت ترکیب عملکرد باکتری‌کشـی اسانس دارچین و نایسین در هر دو دمای ۴ °C و ۸ افزایش نشـان داد که با افزایش دما از ۴ °C به ۸، رشـد باکتری‌ها غالب شده و در دمای ۸ °C، فرآورده ماهی از روز ۹ از چرخه مصرف خارج شد، در حالی که در دمای ۴ °C تا روز ۱۵ بار میکروبی در تیمار شاهد و غلظت‌های متفاوت نایسـین و اسـانس دارچین در حد مطلوب بود. با توجه به نتایج ذکر شـده می‌توان گفت که با اسـتفاده از اسـانس دارچین و نایسین ماندگاری فیله قزل‌آلا افزایش پیدا می‌کند.

تشکر و قدردانی

در اینجـا بر خود لازم می‌دانیـم از حوزه معاونـت پژوهش و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز تشکر نماییم.

تعارض در منافع

بین نویسندگان هیچ گونه تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Bassole, I., Juliani, H. (2012). Essential oils in combination and their antimicrobial properties. Molecules, 17, 3989- 4006. PMID: 22469594
2. Booth, I., Kroll, R. (2006). The preservation of foods by low pH. In: Mechanisms of Action of Food Preservation Procedures. Gould, GW. (ed.) Elsevier. London, USA. p. 226-227.
3. Bowker, J.D., Ostland, V.E., Carty, D., Bowman, M.P. (2010). Effectiveness of Aquaflor (50% Florfenicol) to Control Mortality Associated with *Streptococcus iniae* in Freshwater-Reared Subadult Sunshine Bass. J Aquat Anim Health, 22, 254-265. PMID: 21413510
4. Boziaris, I.S., Nychas, GJE. (2006). Effect of nisin on growth boundaries of *Listeria monocytogenes* Scott A, at various temperatures, pH and water activities. Food Microbiol, 8, 779 - 84. PMID: 16943082
5. Cowan, M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. J Clin Microbiol, 12, 564- 582. PMID: 10515903
6. Ghaeni, M., Roomiani, L. (2013). Synergistic effect of Nisin and *Cuminum cyminum* L. essential oil on the growth of *Streptococcus iniae* in fillets of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Food Safety, 3, p. 65-76. (In persian)
7. Ghasemi, Z.h., Mahasti, P., Nouri Saeedlou, S. (2015). Study on antibacterial effect of rosemary extract in combination with nisin against *Staphylococcus aureus* in minced meat during refriger-

ated temperature. J Food Microbiol, 6, 37-49.
8. Bashir, K.M.I., Kim, J.S., An, J.H., Sohn, J.H., Choi, J.S. (2017). Natural Food Additives and Preservatives for Fish-Paste Products: A Review of the Past, Present, and Future States of Research. Food Quality. p. 31. https://doi.org/10.1155/2017/9675469
9. Guo, J, Kuo, C, Chuang, Y, Hong, J, Chou, R, Chen, T. (2012). The effects of garlic-supplemented diets on antibacterial activity against Streptococcus iniae and on growth in orange-spotted grouper, Epinephelus coioides. Aquaculture. 364, 33-38.
10. Hyldgaard, M., Mygind, T., Meyer, R.L. (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies and interactions with food matrix componenets. Frontiersin Microbiol Antimicrob Resist Chemother, 3, 1-24. https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00012
11. Izci, L., Bilgin S., Günlü, A. (2011). Production of fish finger from sand smelt (Atherina boyeri, RISSO 1810) and determination of quality changes. Afr J Biotechnol, 21, 4464-4469.
12. Koplay, Z., Sezer, C. (2013). The effect of nisin and clove essential oil on shelf life of beef. Atatürk universitesi Vet Bil Derg, 8, 9-19.
13. Mirshekari, S., Safari, R., Adel, M., Motalebi Moghanjoghi, AA., Khalili, E., Bonyadian, M. (2016). Antimicrobial and antioxidant effects of nisin Z and sodium benzoate in vacuum packed Caspian Kutum (*Rutilus frisiicutom*) fillet stored at 4◦C. Iran J Fish Sci, 15, 789-801.
14. Mobaseri, P., Malek Zadeh, F., Ali Babai, A., Jandaghi, C. (2009). Assessing the effect of nicin on reducing the concentration of chemical preservatives. Medic Sci J Islamic Azad Uni, 19: 200-197.(In persian)
15. Moosavy, M., Akhondzadeh Basti, A., Misaghi, A., Zahraei Salehi, T., Abbasifar, R., Ebrahimzadeh Mousavi, H.A., Alipour, M., Emami Razavi, N., Gandomi, H., Noori, N. (2008). 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 41, 1050-1057. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.07.018
16. Moosavym, M., Shaveisi, N. (2015). Effect of temperature, NaCl concentration and pH on anti-listerial activity of nisin. Iran Food Sci Technol Res J, 11, 211-217.
17. Ojagh, S. M., Rezaei, M., Razavi, S. H., Hosseini, S. M. H. (2010). Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. Food Chem, 120(1), 193-198.
18. Pajohi, M., Tajik, H., Farshid, A., Hadian, M. (2011). Synergistic antibacterial activity of the essential oil of *Cuminum cyminum* L. seed and nisin in a food model. Appl Microbiol, 4, 943-951. 2012. PMID: 21226797
19. Pereira, F., Ravelo, A., Toranzo, J., Romalde, B. (2004). *Lactococcus garvieae*, an emerging pathogen for the Portuguese trout culture. Bull-Eur Assoc Fish Pathol J, 24, 274-9.
20. Qasemi, J., Mahasti, P. (2015). Nouri Saeidlu S. Antimicrobial effects of rosemary extract in combination with nisin on *Staphylococcus aureus* bacteria in cow's minced meat during storage in a refrigerator. International J Food Microbiol, 6, 49-37.(In persian)
21. Quattara, B., Simard, R.E., Holley, R.A., Piette, G.J.P., Be´gin, A. (1997). Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. Int J Food Microbiol, 37, 155-162.
22. Ranasinghe, L., Jayawardena, B., Abeywickrama, K. (2002). Fungicidal activity of essential oils of *Cinnamomum zeylanicum* (L.) and *Syzygium aromaticum* (L.) Merret L.M. Perry against crown rot and anthracnose pathogens isolated from banana. Lett Appl Microbiol, 35, 208-211. https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2002.01165.x
23. Razavi Rohani, S.M., Moradi, M., Mehdizadeh, T., Saei-Dehkordi, S.S., Griffiths, M.W. (2011). 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, 10, 2260-2265. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.07.020

24. Roomiani, L., Soltani, M., Akhondzadeh Basti, F. (2012). Effect of Rosmarinus officinalis essential oil and nisin on probability of growth of Streptococcus iniae in BHI broth. J Medical Micro, 10, 1-9.
25. Roomiani, L., Rokni, N. (2015). Effect of inhibitory effect of cumin and nisin essential oil on growth rate of *Streptococcus inii* in salmon fillet using hybrid technology. J Food Sci Technol, 12, 46-37.
26. Shamloofar, M., Ghiasvand, Z., Kamali, M., Bai, F.(2017). Antibacterial potential of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essence and nisin on silver carps (*Hypophthalmichthys molitrix*) fillet at temperature of 4ºC. Antibacterial potential of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential and nisin on silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) fillet at temperature of 4ºC. Aquat Physiol Bio, 5, 87-105.
27. Shan, B., Cai, Y., Brooks, J.D., Corke, H. (2007). Antibacterial properties and major bioactive components of cinnamon stick (*Cinnamomum burmannii*): Activity against food borne pathogenic bacteria. J Agric Food Chem, 55, 5484-5490. PMID: 17567030
28. Snoussi, M., Noumi, E., Trabelsi, N., Flamini, G., Papetti, A., Feo, V. (2015). Mentha spicata Essential Oil: chemical composition, antioxidant and antibacterial activities against planktonic and biofilm cultures of *Vibrio* spp. Strains, 20, 14402-14424. https://doi.org/10.3390/molecules200814402
29. Soltani, M., Jamshidi, S., Sharifpour, I. (2005). Streptococcosis caused by *Streptococcus iniae* in farmed rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) in Iran: Biophysical characteristics and pathogenesis. Bull- Eur Assoc Fish Pathol J, 25, 95-106.
30. Soltani, M., Mohamadian, S., Ebrahimzadeh-Mousavi, H.A., Mirzargar, S., Taheri-Mirghaed, A., Rouholahi, S.H., Ghodratnama, M. (2014). Shirazi thyme (*Zataria multiflora*) essential oil suppresses the expression of the epsD capsule gene in *Lactococcus garvieae*, the cause of lactococcosis in farmed fish. Aquaculture, 433 (20), 143-147. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.05.024
31. Taghizadeh Andavari, G., Rezaei, M. (2012). The effect of gelatin coverage with cinnamon essential oil on the period of persistence of rainbow trout fillet (*Oncorhynchus mykiss*) at Beterchal temperature. Iran J Fish Sci,1, 13-24. (In persian)
32. Wendakoon, C., Sakaguchi, M. (1995). Inhibition of amino acid decarboxylase activity of Enterobacter aerogenes by active components of spices. J Food Prot, 58, 280-283.

Synergistic Effect of Nisin and Cinnamon Essential Oil (*Cinnamomum verum*) on the Growth of *Lactococcus garvieae* in Fish Fillets of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Ayla Nadi, Laleh Roomiani, Mansoreh Qaeni

Department of Fisheries, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran

(Received 5 December 2018, Accepted 26 February 2019)

Abstract:

BACKGROUND: Lactococcusis disease due to *Lactococcus garvieae*, one of the most important zoonotic bacterial diseases.

OBJECTIVES: The purpose of this study was to evaluate the effect of Cinnamon essential oil and Nisin on the growth of *Lactococcus garvieae*.

METHODS: The effect of cinnamon essential oil with concentrations of 0, 0.25 and 0.75%, and Nisin 0, 0.4 and 0.8 µg/mL on growth of this bacteria at 4 and 8 °C during 0, 3, 6, 9, 12, 15 days of storage was investigated.

RESULTS: The results of this study showed that on samples kept at 4 °C, bacterial growth was delayed until the fifteenth day using cinnamon essential oil or Nisin, and in the case of cinnamon, the growth rate of bacteria in the ninth and fifteenth days was below 2 log cfu/g. While the combination of 0.8 µg/ml Nicin and 0.75% essential oil of cinnamon postponed growth on the third day. At 8 °C, Nisin, the cinnamon essential oil alone and in combination (similar to 4 ºC) until the sixth day prevented bacterial growth. Compared to the control treatment, the concentration of Nisin and cinnamon essential oil had a significant difference in inhibitory bacterial growth (P<0.05). The results also showed that the combination of Nisin and cinnamon essential oil, had a significantly higher effect than their single state.

CONCLUSIONS: Results indicate that Nisin and cinnamon essential oil effectively inhibit the growth of *Lactococcus garvieae* in the rainbow trout fillet.

Keyword:

Lactococcus garvieae, Cinnamon essential oil, Nisin, Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Temperature

Figure Legends and Table Captions

Table 1. GC-MS analysis of chemical composition of cinnamon essential oil (Cinnamomum verum).

Table 2. Logarithmic growth of bacteria in different concentrations of nisin in different days of storage at 4 °C in rainbow trout.

Table 3. Logarithmic growth of bacteria in different concentrations of cinnamon essential oil in different days of storage at 4 °C in rainbow trout.

Table 4. Logarithmic growth of bacteria in different concentrations of nisin and cinnamon essential oil in different days of storage at 4 °C in rainbow trout.

Table 5. Logarithmic bacterial growth at different concentrations of nisin in different days of storage at 8 °C in rainbow trout.

Table 6. Logarithmic growth of bacteria in different concentrations of cinnamon essential oil in different days of storage at 8 °C in rainbow trout.

Table 7. Logarithm growth of bacteria in different concentrations of cinnamon essential oil and nisin in different days of storage at 8 °C in rainbow trout.

***Corresponding author's email: l.roomiani@yahoo.com, Tel: 621-33348361, Fax: 061-33348361**