# بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره رزماری در ترکیب با نایسین بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در گوشت چرخ کرده گاو در طول نگهداری در یخچال

**ژیلا قاسمی[1]، پیمان مهستی[2*]، سکینه نوری سعیدلو[3]**

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم و مهندسی صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲. گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم و مهندسی صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۳. مرکز تحقیقات سلامت مواد غذایی و آشامیدنی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران.

**[*]نویسنده مسئول:** *pmahasti@yahoo.com*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۸/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۰/۵

## چکیده

امروزه استفاده از روش‌های نوین نگهداری نظیر استفاده از ضدمیکروب‌ها جایگاه ویژه‌ای در صنایع غذایی پیدا کرده‌اند. از طرف دیگر با توجه به نگرانی‌های موجود در مورد استفاده از نگهدارنده‌های شیمیایی و اثرات مضر احتمالی آنها گرایش به استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی افزایش یافته‌است. نایسین تنها باکتریوسینی است که اجازه استفاده بی‌خطر آن در مواد غذایی داده‌شده‌است. رزماری نیز از جمله گیاهان دارویی و منابع طبیعی ضدمیکروبی است که در این تحقیق همراه با نایسین با هدف جلوگیری از فساد میکروبی ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* در گوشت چرخ‌کرده گاو انتخاب شده‌است. ساقه و برگ‌های گیاه رزماری پس از خشک شدن در سایه، با روش خیساندن در الکل عصاره‌گیری شدند. حداقل غلظت ممانعت‌کننده عصاره و نایسین بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به روش رقیق‌سازی در آگار تعیین‌گردید. تیمارهای استفاده همزمان از این دو ماده در غلظت‌های (۸ µg/ml نایسین + ۲ mg/ml عصاره) و (۷ µg/ml نایسین + ۱/۵ mg/ml عصاره) و همچنین تیمارهای عصاره رزماری (در دو غلظت ۳ و ۴ mg/ml) به تنهایی تهیه‌گردید و به مدت ۱۴ روز در دمای یخچال نگهداری شدند. شمارش کل باکتری‌ها و *استافیلوکوکوس اورئوس* در فواصل زمانی ۰، ۱، ۳، ۷ و ۱۴ روز انجام‌گرفت. بر اساس یافته‌های تحقیق عصاره رزماری در هر دو غلظت خاصیت ضدمیکروبی بالایی از خود نشان داد، اما زمانی‌که با نایسین ترکیب‌گردید در مقادیر پایین‌تر، اثر ضدمیکروبی بالاتری از خود نشان‌داد. تاثیر مقادیر مختلف عصاره و نایسین از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($P < ۰/۰۵$). همین‌طور نتایج نشان دهنده ارجحیت استفاده ترکیبی دو ماده نسبت به استفاده تکی مواد نگهدارنده بود.

**واژگان کلیدی**: عصاره رزماری، نایسین، *استافیلوکوکوس اورئوس*، گوشت چرخ کرده.

## مقدمه

در سال‌های اخیر با توجه به نگرانی‌های موجود در مورد استفاده از نگهدارنده‌های شیمیایی و اثرات مضر احتمالی آنها گرایش به استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی افزایش یافته است (Huang et al., 2011). تحقیقات نشان داده‌است که استفاده از نگهدارنده‌های شیمیایی در طولانی مدت

دارای عوارض متعددی از جمله اثر سرطانزائی بوده، به‌طوریکه امروزه مصرف برخی از نگهدارنده‌های شیمیایی منسوخ گشته و یا به‌مقدار بسیار پایین مورد استفاده قرار می‌گیرند (Kim et al., 2012). یکی از راه‌های رفع این نقیصه استفاده از نگهدارنده‌های با منشاء طبیعی بوده که نه تنها دارای عوارض جانبی نیستند بلکه باعث بهبود بو، طعم و مزه ماده غذایی شده و زمان ماندگاری محصول را نیز افزایش می‌دهند (Zhou et al., 2010).

مصرف گوشت ومحصولات گوشتی سابقه‌ای طولانی در اکثر فرهنگ‌ها دارد. گوشت منبع مهمی‌از مواد مغذی است و هم‌چنین در برخی از کشورها به‌عنوان یک نشانه از ثروت است. در میان محصولات غذایی، گوشت یکی از حساس‌ترین مواد غذایی فسادپذیر به‌شمار می‌آید زیرا محیطی بسیار مساعد جهت فعالیت میکروب‌ها، مخمرها و کپک‌ها است (دباغ مقدم، ۱۳۸۴). در قسمت‌های مختلف جهان تکنیک‌های زیادی جهت محافظت از گوشت و افزایش مدت ماندگاری آن در طول قرن‌ها مورد استفاده قرار گرفته است. بنابراین گوشت و محصولات گوشتی و شرایط مطلوب نگهداری‌شان برای ما بسیار مهم است. فرآورده‌های گوشتی به طور معمول در طول نگهداری در یخچال به دلیل عمده فعالیت میکروبی فاسد می‌شوند (Kim et al., 2013). به‌همین خاطر یکی از مهم‌ترین نگرانی‌های صنعت غذا کنترل میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و عامل فساد می‌باشد (Bouhdid et al., 2009).

*استافیلوکوکوس اورئوس* یکی از عوامل پیش رو در ایجاد عفونت‌های باکتریایی در کشورهای در حال توسعه بوده و مسئول ایجاد طیف گسترده‌ای از بیماری‌ها در انسان و حیوان، از یک عفونت کوچک پوستی تا ذات‌الریه کشنده، است (Chambers and Delves., 2005; Turlej et al., 2011). در طول نگهداری گوشت، رشد میکروبی را می‌توان به‌وسیله کاربرد ضدمیکروب‌ها به‌عقب انداخت و موجب افزایش مدت نگهداری و حفظ کیفیت آن شد (Kim et al., 2012).

تحقیقات پیش رو در خصوص نگهدارنده‌های طبیعی مورد استفاده در غذا، تقریبا دو رویکرد اصلی پیش‌روی دارد؛ اول توسعه اطلاعات موجود در مورد مواد نگهدارنده طبیعی و رویکرد دوم استفاده از این مواد به‌صورت ترکیب با یکدیگر در روش‌های سنتی یا جدید فرآوری در جهت تعیین اثرات هم افزائی احتمالی این ترکیبات است (صفری و سعیدی اصل، ۱۳۹۰).

نگهدارنده‌های بیولوژیک که به‌منظور جلوگیری از فساد میکروبی استفاده می‌شوند به گروه‌های مختلفی تقسیم‌بندی می‌شوند. از جمله آنها می‌توان به متابولیت‌های تولید شده از باکتری‌های لاکتیک (باکتریوسین‌ها) اشاره کرد (شاملوفر، ۱۳۹۲). باکتری‌های لاکتیک طیف وسیعی از باکتریوسین‌ها را ترشح می‌کنند که می‌توان به نایسین اشاره کرد. نایسین پلی پپتیدی است که توسط سویه‌های خاصی از باکتری لاکتوکوس در طول تخمیر ایجاد می‌گردد. این ترکیب مانع رشد بسیاری از باکتری‌های گرم مثبت می‌گردد و تنها باکتریوسینی است که اجازه استفاده بی‌خطر آن در مواد غذایی داده شده است. تا کنون تحقیقات مختلفی روی نایسین انجام شده است و نشان داده‌اند که نایسین در برابر باکتری‌های گرم منفی غیر فعال است (Boualem et al., 2013). عصاره‌های گیاهی نیز به‌عنوان یک منبع ضدمیکروبی طبیعی شناخته شده می‌باشند که دارای تاثیرات مثبتی نظیر محافظت در برابر بیماری‌های مزمن، سرطان، دیابت، بیماری‌های قلبی و جهش زایی هستند. ترکیب، ساختار و گروه‌های عاملی عصاره‌ها نقش مهمی‌در فعالیت ضدمیکروبی آنها ایفا می‌کند و معمولا ترکیباتی که دارای گروه‌های فنولی هستند دارای تاثیر بیشتری هستند (صفری و سعیدی اصل، ۱۳۹۰ ;Banerjee et al., 2012). رزماری با نام علمی*Rosmarinus officinalis* از خانواده

نعناعیان[1] گیاهی است بوته‌ای، چندساله و همیشه سبز که اکنون در سراسر ایران به‌صورت پرورشی وجود دارد. Moreno و همکاران گزارش دادند که گیاه رزماری منبعی از ترکیبات فنولیک است (Moreno et al., 2006)، که دارای خصوصیات بیولوژی مختلفی همانند خاصیت ضدمیکروبی، ضد عفونی کننده، ضد اسپاسم و ضد التهاب است (Rozman and Jersek, 2009). در میان گیاهان دارویی، گیاه رزماری دارای خاصیت ضدمیکروبی بالایی بوده و گزارشات مختلفی این اثر را در برابر هر دو گروه باکتری‌های گرم مثبت ومنفی ثابت کرده است (Tavassoli and Emamjomeh , 2012; Rozman and Jersek , 2009; Visentin et al., 2011). با توجه به خصوصیات شناسایی شده رزماری، عصاره این گیاه می‌تواند نقش معنی‌داری در جلوگیری از فعالیت میکروب‌ها در گوشت ایفا کند و فعالیت نایسین را در گوشت کامل کند.

Solomakos و همکاران در سال ۲۰۰۸ به بررسی اثر ضدمیکروبی نایسین و اسانس آویشن علیه باکتری *اشریشیا کلی* در گوشت چرخ شده گاو در طول نگهداری در یخچال پرداختند. غلظت‌های اسانس مورد استفاده برابر ۰/۳، ۰/۶ و ۰/۹ درصد بود و نایسین در دوسطح ۵۰۰ و ۱۰۰۰ Iu/g استفاده شد. غلظت ۰/۳ درصد اسانس اثر ضعیفی بر روی پاتوژن داشت و غلظت ۰/۹ درصد هم از لحاظ ویژگی‌های ارگانولپتیکی قابل قبول نبود. تیمار نمونه‌های گوشت چرخ شده با ۰/۶ درصد اسانس دارای اثر مهارکنندگی بر روی میکروارگانیسم بود، اما این اثر مربوط به دمای ۱۰ درجه‌سانتی‌گراد بود و در دمای ۴ درجه‌سانتی‌گراد بی‌اثر بود. و تیمار گوشت چرخ شده با غلظت‌های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ Iu/g نایسین هیچ اثر ضد میکروبی علیه *اشریشیا کلی* نشان نداد. اما ترکیب نایسین در این دو سطح همراه با ۰/۶ درصد اسانس اثر قابل قبولی بر روی پاتوژن *E.coli* داشت و این اثر در دمای ۱۰ درجه‌سانتی‌گراد بیشتر از ۴ درجه‌سانتی‌گراد بود و این بهترین حالت در بین تیمارهای مختلف بود.

Klancnik و همکاران (۲۰۰۹) به بررسی فعالیت ضدمیکروبی عصاره رزماری پرداختند. نتایج نشان داد که خاصیت ضد میکروبی عصاره‌ها بستگی به محتوای ترکیبات فنولی آن‌ها دارد و عصاره با درصدهای مختلف از ترکیبات رزمارینیک‌اسید، کارنوزول و کارنوزیک‌اسید قدرت‌های متفاوتی بر میکروارگانیسم‌های مختلف دارند و هرچقدر محتوای کارنوزول و کارنوزیک اسید بالاتر باشد، قدرت ضد میکروبی عصاره‌ها بالاتر خواهد بود.

Golshani و diDawoo در سال ۲۰۱۳ خاصیت ضدمیکروبی عصاره برگ‌های رزماری را علیه برخی از پاتوژن‌ها سنجیدند. در این بررسی اثر ضدمیکروبی رزماری بر باکتری‌های مختلفی تعیین گردید. MIC[2] در این تحقیق از حدود ۶/۲۵ تا ۱۰۰ mg/ml متفاوت بود. نتایج نشان داد که عصاره متانولی رزماری می‌تواد از رشد *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلی* و *سودوموناس اروژینوزا* ممانعت کند اما بر رشد *باسیلوس سرئوس* موثر نبود.

هدف این تحقیق بررسی و مقایسه خاصیت ضدمیکروبی عصاره رزماری به‌صورت تکی و در ترکیب با نایسین( به‌منظور کارایی بهتر نگهدارنده‌ها) به‌عنوان نگهدارنده‌های طبیعی بر آلودگی باکتریایی *استافیلوکوکوس اورئوس* در گوشت چرخ کرده گاو نگهداری شده در یخچال است.

## مواد و روش کار

تهیه نمونه‌های گیاه رزماری و استخراج عصاره

نمونه‌های خشک شده گیاه رزماری با نام علمی *Rosmarinus officinalis* از پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی تهیه گردید. جهت استخراج عصاره، نمونه‌های خشک شده در آسیاب برقی تبدیل به پودر نرم شد و موادی که از الک با مش ۸۰ گذشتند جمع آوری شد. حدود

[1] Lamiaceae

[2] Minimum Inhibitory Concentration

۷ تا ۱۰ گرم از پودر گیاه با ۱۰۰ میلی‌لیتر از اتانول ۹۶ درصد، در دمای اتاق و در مکان نسبتا تاریک در حالی‌که مدام همزده شد، به مدت ۴۸ ساعت در تماس قرار داده و عصاره‌گیری انجام شد. عصاره بدست آمده توسط کاغذ صافی فیلتر گردید. عصاره به‌دست آمده دوباره به‌وسیله صافی‌های ۰/۴۵ میکرونی جهت عاری شدن از میکروارگانیسم‌ها صاف گردید. به‌منظور جداسازی حلال، ماده صاف شده در اواپراتور چرخان تحت خلا در دمای ۴۵ درجه‌سانتی‌گراد تغلیظ شد. جهت اطمینان از جدا شدن الکل، عصاره در آون تحت خلا (۳۰ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۱/۵ ساعت قرار داده شد و بعد توزین گردید. عصاره‌ای که بعد از تبخیر محلول آلی به‌دست آمد به‌عنوان عصاره الکلی در دمای یخچال و در ظروف شیشه‌ای استریل، تمیز و تیره با درب مناسب نگهداری و در موقع لزوم استفاده شد (Kim et al., 2013; Huang et al., 2011; Emamjomeh and Tavassoli, 2012).

آماده‌سازی نایسین

در این تحقیق از نایسین ۲/۵ درصد (SIGMA، آمریکا) که حاوی ۱۰۰۰ Iu/mg نایسین در ماده خشک، ۷۵ ٪ کلرید سدیم و ۲۲/۵ ٪ شیر خشک می‌باشد، استفاده شد. پودر نایسین مورد استفاده تا زمان استفاده در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. جهت تهیه محلول ذخیره نایسین، نایسین در اسید کلریدریک ۰/۰۲ نرمال حل شد و سپس با استفاده از فیلترهایی با منفذ ۰/۲۵ میکرومتر استریل شد و مقدار مورد نظر آن‌را برداشته و به ظروف حاوی آب مقطر استریل افزوده و غلظت‌های مورد نظر تهیه شد. (شاملوفر، ۱۳۹۲؛ Solomakos et al., 2008)

سویه میکروبی مورد آزمون و آماده‌سازی آن

سویه میکروبی مورد آزمایش با نام *Staphylococcus aureus* و شماره استاندارد ATCC 6538 از آزمایشگاه مشترک مرکز تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی و معاونت غذا و داروی ارومیه تهیه شد. جهت تهیه کشت مادر از باکتری مورد نظر بدین صورت عمل شد ؛ بعد از اینکه کشت‌های شش ماهه از پودرهای لیوفیلیزه سوش میکروبی طبق دستورالعمل شرکت سازنده تهیه شد، به‌منظور استخراج نمونه‌های شش ماهه از حالت فریز، مدتی در دمای اتاق گذاشته شدند. سپس میکروارگانیسم مورد نظر روی محیط برد پارکرآگار[3] به‌روش سطحی کشت داده شد و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شد (دلفان، ۱۳۹۰).

آماده سازی گوشت

بعد از کشتار و در طی زمان جمود نعشی[4]، گوشت ماهیچه ران گاو تحت شرایط یخچال به آزمایشگاه منتقل شد. سطح بیرونی ماهیچه با غوطه ور کردن در اتانول ۹۶٪ (حجمی/حجمی) استریل گردید و سپس اتانول باقی مانده در سطح گوشت را مشتعل کرده و بعد از جداسازی سطح خارجی گوشت در شرایط اسپتیک، قسمت داخلی گوشت به‌وسیله چرخ گوشت استریل چرخ شد (Solomakos et al., 2008).

آماده‌سازی نمونه‌ها

نمونه‌های گوشت چرخ شده پس از افزودن غلظت‌های مختلف عصاره و نایسین (جدول ۱) و تلقیح (۳ میکرولیتر) باکتری از سوسپانسیون نیم مک فارلند، به‌صورت بسته‌های ۱۰۰ گرمی‌در داخل پلاستیک‌های پلی‌اتیلنی که قبلا توسط اتوکلاو استریل شده بودند، بسته‌بندی گردید و سپس کیسه‌ها در دمای یخچال به‌مدت ۱۴ روز نگهداری شدند

.

[3] Baird parker agar
[4] Rigor mortis

جدول ۱- تیمارهای آزمایشی جهت بررسی تاثیر نایسین و رزماری بر زمان ماندگاری گوشت چرخ کرده در دمای یخچال

| تیمارها | غلظت نایسین (µg/ml) | غلظت عصاره (mg/ml) | شرایط نگهداری |
|---|---|---|---|
| شاهد (۱) | - | - | نگهداری در دمای یخچال |
| ۲ | - | ۳ | نگهداری در دمای یخچال |
| ۳ | - | ۴ | نگهداری در دمای یخچال |
| ۴ | ۷ | ۱/۵ | نگهداری در دمای یخچال |
| ۵ | ۸ | ۲ | نگهداری در دمای یخچال |

تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده عصاره و نایسین بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*

تعیین MIC[5] عصاره با روش رقیق سازی بر روی محیط آگار[6] به‌منظور بررسی اثر ضد میکروبی عصاره استخراج شده بر سویه استاندارد میکروبی *استافیلوکوکوس اورئوس* (6538 ATCC) انجام شد. بدین ترتیب که وزن‌های مورد نظر (۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵، ۳، ۳/۵، ۴، ۴/۵ و ۵ گرم) از عصاره تغلیظ شده با استفاده از ترازوی دیجیتالی حساس توزین شد. به‌منظور افزایش حلالیت، عصاره‌های توزین شده با ۵ میلی‌لیتر از محلول دی‌متیل‌سولفوکساید[7] ۱۰ ٪ در داخل لوله‌های آزمایش استریل مخلوط شد. با استفاده از فیلترهای سرنگی ۰/۴۵ میکرون ۱ میلی‌لیتر از این مخلوط به ۱۹ میلی‌لیتر محیط کشت استریل مولر هینتون آگار[8] با دمای حداکثر ۴۵ درجه‌سانتی‌گراد اضافه و خوب مخلوط شد. پس از انتقال مواد به درون پلیت و بسته شدن محیط کشت پلیت‌ها در انکوباتور با دمای ۳۵ درجه‌سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شدند. سپس از میکروارگانیسم‌های مورد نظر کشت‌های تازه تهیه و سوسپانسیونی با غلظت نیم مک فارلند ($۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ cfu/ml) تهیه شد و از آن ۳ میکرولیتر به مرکز پلیت‌های مذکور تلقیح شد. از پلیت‌های حاوی محیط کشت و دی‌متیل‌سولفوکساید بدون عصاره به‌عنوان کنترل منفی و پلیت‌های حاوی فقط محیط کشت و میکروارگانیسم به‌عنوان شاهد مثبت استفاده شد. سپس پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند. پلیت‌هایی که در آنها رشد میکروارگانیسم‌ها به‌شدت کاهش پیدا کرده بود به‌عنوان MIC عصاره برای میکروارگانیسم مربوطه در نظر گرفته شد (Saana et al., 2005; Griffin and Markham, 2011).

برای تعیین حداقل غلظت بازدارنده نایسین بر روی میکروارگانیسم مربوطه همانند تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده عصاره بر میکروارگانیسم مربوطه از روش رقیق‌سازی در محیط آگار استفاده شد.

آزمون‌های میکروبی

آزمایشات میکروبی شامل شمارش کل باکتری‌ها و *استافیلوکوکوس اورئوس*، در بازه‌های زمانی صفر، ۲۴ ساعت،۷۲ ساعت، یک هفته و دو هفته بعد از آماده‌سازی نمونه‌ها انجام گرفت. جهت شمارش‌های میکروبی تهیه رقت‌های اعشاری ضروری است. برای شمارش کل باکتری‌ها به‌روش کشت آمیختنی و به‌صورت دوتایی اقدام به کشت شد. سپس بعد از گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۳ درجه‌سانتی-گراد به‌مدت ۷۲ ساعت، اقدام به انتخاب پلیت‌های مناسب نموده و میزان بار میکروبی در یک گرم گوشت چرخ شده بیان شد (Zakipour Rahimabadi et al., 2013).

برای شمارش باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* پس از تهیه رقت‌های متوالی، کشت به‌روش سطحی در روی محیط

[5] Minimum Inhibitory Concentration
[6] Agar dilution method
[7] Dimethyl Sulphoxide
[8] Muller hinton agar (MHA)

BPA[9] انجام پذیرفت. آنگاه پلیت‌ها در گرمخانه ۳۷ درجه-سانتی‌گراد به‌مدت ۴۸ ساعت قرار داده شدند (Akhondzadeh Basti et al., 2007).

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌های حاصله با نرم افزار SPSS 16 انجام پذیرفت. به‌منظور تجزیه و تحلیل مقادیر کمی به-دست آمده از آزمایش‌های میکروبی پس از کنترل نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگراف-اسمیرنوف[10] از تجزیه واریانس دو طرفه در قالب طرح آماری فاکتوریل کاملا تصادفی استفاده شد. همچنین برای تعیین تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها در تیمارهای مختلف از آزمون حداقل (LSD) و برای بررسی تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها در زمان‌های مختلف برای یک تیمار از آزمون دانکن (Duncan) استفاده شد.

## نتایج

نتایج حاصل از آزمون تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده نگهدارنده‌ها

نتایج آزمون‌های حداقل غلظت ممانعت (MIC[11]) عصاره رزماری، نایسین و ترکیب آن‌ها بر گونه باکتریایی *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 6538) که با روش رقت-سازی در محیط کشت جامد انجام شد، به‌ترتیب برابر ۳ mg/ml، ۱۰ µg/ml و (۱/۵ mg/ml + ۷ µg/ml) بود.

بررسی میکروبی

نتایج حاصل از آنالیزهای میکروبی در دو جدول (۲) و (۳) نشان داده شده‌است. روند تغییرات باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در تیمار شاهد و تیمارهای حاوی عصاره به‌صورت جداگانه همواره به‌صورت افزایشی بود. اما بعد از لحظه صفر، بین غلظت‌های مختلف عصاره رزماری و نمونه شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (P< ۰/۰۵). زمانی‌که نگهدارندها (نایسین و عصاره رزماری) بصورت ترکیبی استفاده شدند، توانایی نگهدارنده در کنترل رشد میکروب شاخص تلقیحی افزایش یافت. به‌طوریکه در تیمارهای ترکیبی، مقدار باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در پایان روز سوم کاهش یافت و بعد تا پایان دوره افزایش اندکی مشاهده شد. در بین کلیه تیمارها، تیمار شاهد به‌صورت معنی‌داری (P< ۰/۰۵) همواره بالاترین مقدار باکتری را داشت و مقدار آن در پایان روز چهاردهم به (۴/۶۲۳ Log cfu/g) رسید. تیمار حاوی (۲ mg/ml عصاره + ۸ µg/ml نایسین) در پایان دوره به-طور معنی‌داری دارای کمترین مقدار (۱/۵۰ Log cfu/g) باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بود.

در رابطه با شمارش کل باکتری‌ها نیز بهترین نتایج مربوط به تیمارهای ترکیبی بود. تعداد شمارش کلی در هر دو تیمار ترکیبی تا پایان روز سوم کاهش معنی‌دار داشت و بعد روند افزایشی تا پایان دروه طی کرد، اما بین دو تیمار ترکیبی همواره اختلاف معنی‌دار مشاهده گردید (P< ۰/۰۵). در پایان دوره بالاترین مقدار شمارش کل باکتری‌ها ( Log cfu/g ۹/۸۷۱) مربوط به تیمار شاهد و بهترین نتایج ( Log cfu/g ۲/۵۹۳) مربوط به تیمار (۲ mg/ml عصاره + µg/ml ۸ نایسین) بود.

[9] Baird Parker Agar
[10] Kolomogorav - Smirnov
[11] Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

جدول ۲- مقادیر میانگین باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (Log cfu/g) در گوشت چرخ شده گاو در زمانهای مختلف

| ردیف | تیمار | زمان نگهداری | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | صفر | ۲۴ ساعت | ۷۲ ساعت | یک هفته | دو هفته |
| ۱ | شاهد | ۱/۱۳۲ ± ۰/۰۱۵* a E | ۱/۹۸ ± ۰/۰۱۷ a D | ۲/۵۶۳ ± ۰/۰۲۵ a C | ۳/۵۹ ± ۰/۰۱ a B | ۴/۶۲۳ ± ۰/۰۳ a A |
| ۲ | ۳ mg/ml عصاره | ۱/۰۹ ± ۰/۰۱ abc E | ۱/۴۱ ± ۰/۰۲ b D | ۱/۵۶۶ ± ۰/۰۰۵ b C | ۱/۹۹۶ ± ۰/۰۰۵ b B | ۲/۴۶۳ ± ۰/۰۰۵ b A |
| ۳ | ۴ mg/ml عصاره | ۱/۰۶ ± ۰/۰۲ bcd E | ۱/۱۸۶ ± ۰/۰۱۵ f D | ۱/۴۹۳± ۰/۰۱۵ c C | ۱/۹۵۳ ± ۰/۰۱۱ c B | ۲/۱۷۳ ± ۰/۰۰۵ c A |
| ۴ | ۱/۵ mg/ml عصاره + ۷ µg/ml نایسین | ۱/۰۵۶ ± ۰/۰۲ cd D | ۱/۱۶۳ ± ۰/۰۰۵ gh C | ۱/۱۶ ± ۰/۰۱ f C | ۱/۲۹ ± ۰/۰۱ e B | ۱/۵۹۳ ± ۰/۰۰۵ e A |
| ۵ | ۲ mg/ml عصاره + ۸ µg/ml نایسین | ۱/۰۲۶ ± ۰/۰۱۵ d E | ۱/۱۴۶ ± ۰/۰۰۵ h C | ۱/۱۳ ± ۰/۰۱ g D | ۱/۲۰۶ ± ۰/۰۰۵ g B | ۱/۵۰ ± ۰/۰۱ f A |

*میانگین هر تیمار ± انحراف معیار آن. حروف بزرگ متفاوت (در هر ردیف به‌صورت جداگانه) نشان دهنده اختلاف معنی دار ($P < ۰/۰۵$) در روزهای مختلف نمونه برداری برای یک تیمار مشخص می‌باشد. حروف کوچک متفاوت (در هر ستون به‌صورت جداگانه) نشان دهنده اختلاف معنی دار ($P < ۰/۰۵$) در یک روز برای تیمارهای مختلف می‌باشد.

جدول ۳- مقادیر میانگین شمارش کل باکتری‌ها (Log cfu/g) در گوشت چرخ شده در زمان‌های مختلف

| ردیف | تیمار | زمان نگهداری | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | صفر | ۲۴ ساعت | ۷۲ ساعت | یک هفته | دو هفته |
| ۱ | شاهد | ۳/۹۳۰ ± ۰/۰۱* a E | ۴/۱۷۱ ± ۰/۰۰۷ a D | ۵/۴۲۲ ± ۰/۰۰۲ a C | ۷/۲۰۰ ± ۰/۰۱ a B | ۹/۸۷۱ ± ۰/۰۱ a A |
| ۲ | ۳ mg/ml عصاره | ۳/۹۱۰ ± ۰/۰۱ b D | ۳/۸۹۶ ± ۰/۰۰۵ b D | ۴/۳۹۳ ± ۰/۰۰۵ b C | ۴/۹۰۸ ± ۰/۰۰۷ b B | ۵/۵۰۰ ± ۰/۰۱ b A |
| ۳ | ۴ mg/ml عصاره | ۳/۹۰۳ ± ۰/۰۰۵ b D | ۳/۷۴۵ ± ۰/۰۰۵ c E | ۴/۱۰۶ ± ۰/۰۲ c C | ۴/۴۵۰ ± ۰/۰۴ c B | ۴/۶۱۰ ± ۰/۰۱ c A |
| ۴ | ۱/۵ mg/ml عصاره + ۷ µg/ml نایسین | ۳/۸۷۳ ± ۰/۰۱ d A | ۲/۶۴۰ ± ۰/۰۲۶ h B | ۲/۳۲۶ ± ۰/۰۱ g C | ۲/۳۸۰ /۰۱ f C | ۲/۷۲۰ ± ۰/۰۱ f B |
| ۵ | ۲ mg/ml عصاره + ۸ µg/ml نایسین | ۳/۸۵۳ ± ۰/۰۱ e A | ۲/۴۰۸ ± ۰/۰۷ i I | ۲/۱۹۵ ± ۰/۰۰۵ h D | ۲/۳۰۰ ± ۰/۰۱ g C | ۲/۵۹۳ ± ۰/۰۱ g B |

*میانگین هر تیمار ± انحراف معیار آن. حروف بزرگ متفاوت (در هر ردیف به‌صورت جداگانه) نشان دهنده اختلاف معنی دار ($P < ۰/۰۵$) در روزهای مختلف نمونه برداری برای یک تیمار مشخص می‌باشد. حروف کوچک متفاوت (در هر ستون به‌صورت جداگانه) نشان دهنده اختلاف معنی دار ($P < ۰/۰۵$) در یک روز برای تیمارهای مختلف می‌باشد.

## بحث

به‌منظور ارزیابی اثرات عوامل ضدمیکروبی می‌توان از روش‌های مختلف استفاده کرد، اما در همه روش‌ها اصول کار عبارت است از سنجیدن اثر غلظت‌های معین از یک عامل ضدمیکروبی در مهار رشد یا نابود کردن باکتری‌های مورد آزمایش. در تعریف MIC می‌توان گفت: حداقل غلظتی از

آنتی‌بیوتیک یا مهارکننده که مانع رشد میکروارگانیسم می‌شود (Tajkarimi et al., 2010). حداقل غلظت ممانعت‌کننده توسط اکثر محققین به‌عنوان معیاری برای تعیین فعالیت ضدمیکروبی نگهدارنده‌ها ذکر شده است. سنجش فعالیت ضدمیکروبی می‌تواند به‌روش‌های مختلفی مانند انتشار، رقیق سازی و ... صورت گیرد (Hammer et al., 1999 ; Abdollahzadeh et al., 2014). روش مورد استفاده در تحقیق حاضر جهت تعیین MIC عصاره رزماری و نایسین روش رقیق سازی در آگار[12] بود. در این روش نمونه مورد بررسی در حلال مناسب به‌صورت سوسپانسیون درمی‌آید، سپس با محیط کشت آگاردار مخلوط می‌شود. این روش سریع است و با استفاده از آن می‌توان مقدار MIC یک ترکیب را در برابر چند میکروارگانیسم به‌صورت همزمان تعیین کرد (Tajkarimi et al., 2010).

Emamjomeh و Tavassoli در سال ۲۰۱۲ فعالیت ضد-میکروبی عصاره رزماری را بر باکتری‌های *Leuconostoc mesentroides* و *Lactobacillus delbruekii* و بر روی قارچ‌های *Saccharomyces cervisia* و *Candida krusei* به‌وسیله تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده به-روش رقیق سازی تعیین کردند. نتایج MIC به‌ترتیب برابر ۱/۵، ۱/۷۵، ۲/۲۵ و ۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. در تحقیقی دیگر فعالیت ضدمیکروبی عصاره رزماری بر روی گونه‌های مختلف *لیستریا* سنجیده شد. MIC عصاره به‌روش دیسک دیفیوژن[13] تعیین گردید و نتایج آن مابین ۶۲۵ تا ۵۰۰ µg/ml متغییر بود. توانایی سوش‌های مختلف *لیستریا* در برابر عصاره رزماری بسته به غلظت عصاره و نوع سوش انتخابی متفاوت بود، اما عصاره رزماری در کل توانایی بالایی در کنترل گونه‌های مورد آزمایش داشت (Rozman and Jersek, 2009). Moreno و همکاران (۲۰۰۶) در تحقیقی تحت عنوان وابستگی خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی رزماری به محتوای فنلی آن، نشان دادند که بین خواص ضد باکتریایی رزماری و محتوای فنلی آن رابطه مستقیم وجود دارد و MIC آن بر باکتری‌های گرم مثبت بین ۲ تا µg/ml ۱۵ متغییر و همین‌طور برای باکتری‌های گرم منفی بین ۲ تا µg/ml ۶۰ بود. برای قارچ‌ها نیز برابر µg/ml ۴ تعیین شد. این تحقیق نشان داد که عصاره آبی رزماری که دارای ۱۵ درصد رزمارینیک‌اسید است، فعالیت ضد میکربی بسیار پایینی دارد، در حالی‌که عصاره متانولی که حاوی ۳۰ درصد کارنوزیک‌اسید بود از فعالیت ضدمیکروبی بالایی برخوردار بود.

البته تحقیقاتی که توسط Angioni و همکارانش بر روی یک نمونه رزماری (*Sardinian rosemary*) انجام شد، نشان داد که این نمونه از رزماری اثرات بازدارندگی قابل توجهی بر روی باکتری‌های بیماری‌زا مانند *استافیلوکوکوس اورئوس*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و *اشرشیا کلی* نداشته است (Angioni et al., 2004). در صورتی‌که محققین دیگری اثرات بازدارنده نمونه دیگری از رزماری (*Argentian rosemary*) را بر قارچ‌ها گزارش نمودند. همچنین Okoh و همکاران بر روی اثرات ضد باکتریایی گیاه رزماری مطالعاتی را انجام دادند و نتایج نشان داد که اسانس روغنی گیاه رزماری اثرات ضدمیکروبی قابل ملاحظه‌ای بر روی باکترهای مورد آزمایش داشته است (Okoh et al., 2010). بر اساس نتایج به‌دست آمده از تحقیقات مختلف مذکور در بالا و همین‌طور متفاوت بودن نتیجه تحقیق حاضر با این پژوهش-ها، همانند Moreno و همکاران می‌توان گفت که خاصیت ضد میکروبی عصاره رزماری بسته به نمونه رزماری، روش استخراج عصاره و درصد ترکیبات فنلی آن، گونه میکروبی مورد آزمایش و غیره متفاوت است (Moreno et al., 2006).

[12] Agar dilution method
[13] Disc diffusion method

چوبکار و همکاران اثر غلظت‌های مختلف نایسین (۰/۱۵، ۰/۲۵، ۰/۷۵ و ۱/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) را بر رشد باکتری *استافیلوکوکوس* بررسی کردند، که کمترین میزان رشد باکتری در غلظت‌های ۱/۵ و ۰/۷۵ گزارش شد (چوبکار و همکاران، ۱۳۸۹). Hammou و همکاران (۲۰۱۱) اثر ضد-میکروبی اسانس مرزنجوش و نایسین را علیه باکتری *E. coli* در سوسیس تهیه شده با گوشت گوسفندی مورد بررسی قرار دادند و مشخص شد که ترکیب نایسین و اسانس اثر قوی‌تری بر میکروارگانیسم دارد و هنگامی‌که از یک اسانس با نایسین استفاده می‌شود، نایسین می‌تواند بر باکتری‌های گرم منفی *E. coli* نیز اثر بگذارد. تحقیقات مختلف دیگری بر افزایش کارایی نایسین در حالت ترکیبی با مواد دیگر همانند عصاره‌های گیاهی یا نمک‌ها و اسیدهای مختلف، اشاره کرده‌اند و علت آن را فراهم آوردن امکان نفوذ نایسین به درون باکتری‌ها توسط ترکیبات دیگر بیان کرده‌اند (شاملوفر، ۱۳۹۲). Ranjan و همکاران در سال ۲۰۱۲ اثر چندین عصاره گیاهی (رزماری، آویشن و دارچین) به همراه نایسین را بر *لیستریا مونوسیتوژنز* بررسی کردند. نتایج نشان داد که بیشترین خاصیت ضد میکروبی در بین عصاره‌های گیاهی مربوط به آویشن بوده و بیشترین اثر هم بر روی باکتری، مربوط به حالت ترکیبی عصاره آویشن به همراه نایسین در غلظت ۰/۸ ٪ عصاره و ۱۰۰۰ Iu/g نایسین، بوده است. نتایج همه این تحقیقات در توافق با نتایج تحقیق حاضر بود و دلیلی دیگر بر تایید اثر بهتر نگهدارنده‌ها در ترکیب با یک‌دیگر می‌باشد.

Vongsawasdi و همکاران (۲۰۱۲) اثر ممانعتی نایسین را در غلظت ۵ تا ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (با غلظت تقریبا برابر log cfu/ml ۷) در کوفته ماهی‌اندازه‌گیری کردند. نتایج نشان داد که اثر ممانعتی نایسین بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* زمانی که غلظت نایسین و مدت زمان انکوباسیون افزایش یافت، بیشتر شد ($P< ۰/۰۵$). زمانی که غلظت نایسین از ۵ تا ۲۰ µg/ml افزایش یافت تعداد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بعد از ۴۲ ساعت از ۴/۹۴ به ۲/۷۳ log cfu/ml در دمای ۴ درجه‌سانتی‌گراد رسید. این نتایج در توافق با نتایج تحقیق حاضر بود. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که قرار گرفتن نمونه‌های گوشت چرخ کرده در معرض غلظت‌های بیشتر نایسین و عصاره هم به‌صورت جداگانه و هم در حالت ترکیبی، باعث ممانعت بیشتر رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌گردد که مشابه نتایج Lee و همکاران در سال ۲۰۰۲ بود.

بر طبق نتایج تحقیق حاضر تیمارهای ترکیبی به‌طور معنی-داری میزان باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و مقدار شمارش کل باکتری کمتری از تیمارهای حاوی عصاره رزماری به‌صورت تکی داشتند. در تایید این نتایج که نشان-دهنده اثر بهتر استفاده همزمان نایسین و عصاره نسبت به هر یک از آنها به‌صورت تکی است، می‌توان به نتایج Leistner و Gorris اشاره کرد که نشان دادند استفاده از چند نگهدارنده با مقادیر کم بر مصرف یک نگهدارنده به-تنهایی با مقادیر زیاد، ارجحیت دارد که این موضوع هم از نظر ماندگاری و هم خواص ظاهری، ارزش تغذیه ای و هم از نظر اقتصادی بهتر است. (Gorris and Leistner, 1995)

## نتیجه‌گیری

غلظت‌های مختلف عصاره رزماری تاثیر معنی‌داری بر روی رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* دارند، اما زمانی‌که عصاره رزماری توام با نایسن استفاده شد، در غلظت‌های پایین‌تری بطور معنی‌داری اثر بهتری در کنترل رشد میکروبی داشت، این نشان‌دهنده ارجحیت استفاده ترکیبی دو ماده نسبت به استفاده تنهایی مواد نگهدارنده است. در پایان می‌توان این‌طور نتیجه گرفت که از عصاره رزماری و نایسین و ترکیب هر دو می‌توان به‌عنوان نگهدارنده در گوشت و محصولات گوشتی به‌منظور افزایش زمان ماندگاری

استفاده شود. اما استفاده توام عصاره رزماری و نایسین بسیار موثرتر می‌باشد، لذا توصیه می‌شود از ترکیب هر دو آنها استفاده گردد.

## منابع


۱. چوبکار، نسرین.، آخوندزاده بستی، افشین.، سلطانی، محمد.، ساری، علی.، ملکشاهی، علی.، پرتوی، ریحانه. (۱۳۸۹). مطالعه رشد باکتری *Staphylococcus aureus* در فیله‌های ماهی کپور نقره ای فرآوری شده با نمک و نیسین. مجله تحقیقات دامپزشکی، سال دوم، شماره ۶. ص ۱۹۸ – ۱۹۳.

۲. دباغ مقدم، آراسب.، صادق زاده عراقی، عذرا. (۱۳۸۴). درسنامه بهداشت و بازرسی گوشت. چاپ اول، انتشارات مرز دانش، صفحات ۳، ۵، ۶، ۱۱ و ۱۳.

۳. دلفان، فرهاد. (۱۳۹۰). بررسی خاصیت آنتی‌میکروبیال اسانس میخک در همبرگر. پایان نامه کارشناسی ارشد رشته مهندسی صنایع غذایی- علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران.

۴. شاملوفر، مهشید. (۱۳۹۲). استفاده از نایسین ریزپوشانی شده و سیترات سدیم به منظور افزایش زمان ماندگاری فیله ماهی قزل آلای رنگین کمان در بسته بندی با روش اتمسفر اصلاح شده MAP و تاثیر آن بر *استافیلوکوکوس اورئوس*. رشته شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی‌واحد علوم تحقیقات تهران.

۵. صفری، امید.، سعیدی اصل، محمد. (۱۳۹۰). تاثیر نایسین Aو بنزوات سدیم بر رفتار *لیستریامونوستیوژنز* و برخی از پارامترهای میکروبی و شیمیایی در فیله ماهی فیتوفاگ (*Hypophtalmichtys molitrix*)نگهداری شده در دمای ۴ درجه سلسیوس. مجله بهداشت مواد غذایی، سال اول، شماره ۳، ص ۱۳-۱.

6. Abdollahzadeh, E., Rezaei, M. and Hosseini, H. 2014. Antibacterial activity of plant essential oil and extracts: the role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control *listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat. Food control. 35: 177-183.

7. Akhondzadeh Basti, A., Misaghi, A. and Khaschabi, D. 2007. Growth response and modelling of the effects of *zataria multifiora boiss*. Essential oil, pH and temperature on *salmonella typhimurium* and *staphylococcus aureus*. LWT-food Sci Technol. 40(6): 973-981.

8. Angioni, A., Barra, B., Cereti, E. and Arlorio, M. 2004. Chemical composition plant gentic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of rosemary. J Agr Food Chem. 52 (11): 35-41.

9. Banerjee, A.R., Verma, A.V., Das, A.K., Rajkumar, V. and Narkhede, H.P. 2012. Antioxidant effect of broccoli powder extract in goat meat nuggets. Meat Sci. 91: 179-184.

*10.* Bouhdid, S., Abrini, J., Amensour, M., Zhiri, A., Espuny, M.J. and Manresa, A. 2009. Functional and ultrastructural changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by

*Cinnamomum verum* essential oil. J Appl Microbiol. 109: 1139–1149.

11. Boualem, Kh. Subirad, M., Desjardins, Y. and Saucier, L. 2013. Development of encapsulation system for the protection and controlled release of antimicrobial nisin at meat cooking temperature. J Food Res. 2(3): 36-45.
12. Chambers, H.F. and Deleo, F.R. 2009. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. Nat Rev Microbiol. 7: 629–641.
13. Golshani, Z. and Dawoodi, V. 2013. In vitro study of antimicrobial effects of rosemary leaf extract against some pathogens. J Arak Univ Med Sci. 16 (77): 82- 89.
14. Griffin, S.G. and Markham, J.L. 2011. An agar delution method for determination of the minimum inhibitory concentration of essential oils. J Essent. Oil. Res. 12: 249-255.
15. Hammer, K.A., Carson, C.F. and Riley, T.V. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. J Appl Microbiol. 86(6): 985–990.
16. Hammou, F., Skali,S.N., Idaomar,M and Abrini, J. 2011. The antimicrobial effect of *Origanum compactum* essential oil, nisin and their combination against *Escherichia coli* in tryptic soy broth (TSB) and in sheep natural sausage casings during storage at 25 and 7°C. Afr J Biotechnol.10: 140-147.
17. Huang, B., He, J., Ban, X., Zeng, H., Yao, X. and Wang, Y. 2011. Antioxidant activity of bovine and porcine meat treated with extracts from edible lotus rhizome knot and leaf. Meat Sci. 87: 46-53.
18. Kim, H., Candwallader, K.R. and Watanabe, Y. 2012. Effect of addition of commercial rosemary extract on potent odorants in cooked beef. Meat Sci. 94: 170-176.
19. Kim S. J., Cho, A.R. and Han, J. 2013. Antioxidant and antimicrobial activities of leafy green vegetable extracts and their application to meat product preservation. Food Control. 29: 112-120.
20. Klancnik, A., Guzej, B., Kolar, M.H., Abramovic, H. and Mozina, S.S. 2009. In vitro antimicrobial and antioxidant activity of commercial rosemary extract formulations. J Food Protect. 72(8): 1744-1752.
21. Leistner, L. and Gorris, L.M. 1995. Food preservation by hurdle technology. Trends Food Sci Tech. 6: 35-67.
22. Moreno, S., Scheyer, T., Romano, C.S. and Vonjov, A. 2006. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. Free radical Res. 40(2): 223-231.
23. Okoh, O.O., Sadimenko, A.P. and Afolayan, A.J. 2010. Comparative evaluation of the antimicrobial activities of the essential oils of rosemary. J Food Chem. 120: 308-312.
24. Ranjan, S., Dasgupta, N., Saha, P., Rakshit, M. and Ramalingam, C. 2012. Comparative study of antibacterial activity of garlic and cinnamon at different temperature and its

application on preservation of fish. Adv Appl Sci Res. 3: 495-501.

25. Rozman, T. and Jersek, B. 2009. Antimicrobial activity of rosemary extract against different species of *listeria*. Acta Agric Slov. 93: 51-58
26. Sanaa, O., Safi, Y.S.E.H.A., Ahmed, B. and El Magbol, A.Z. 2005. Antimicrobial activity of some medicinal plants against some Gram positive, Gram negative and fungi. J Food Sci. 18:151-159.
27. Solomakos, N., Govaris, A., Koidis, P. and Botsoglou, N. 2008. The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin and their combination against *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef during refrigerated storage. Meat Sci. 80: 159-166.
28. Tajkarimi, M.M., Ibrahim, S.A. and Cliver, D.O. 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. Food Control. 21: 1199-1218.
29. Tavassoli, S. and Emamjomeh, Z. 2012. Total phenols antioxidant potential and antimicrobial activity of methanol extract of rosemary. Global Vet. 7(4): 337-341.
30. Turlej, A., Hryniewicz, W. and Empel, J. 2011. *Stapylococcal* cassette choromosome mec classification and typing method. Pol J Microbiol. 60: 95-103.
31. Visentin, A., Rojo, S., Navarrete, A., Maestri, D. and Cocero, M.J. 2011. Precipitation and encapsulation of rosemary antioxidants by supercritical antisolvent process. J Food Eng. 109: 9-15.
32. Vongsawasdi, P., Nopharatana, M., Supanivatin, P. and Promchana, M. 2012. Effect of nisin on the survival of *Staphylococcus aureus* inoculated in fish balls. J Agr Food Ind Organ. 5(01): 52-60.
33. Zakipour Rahimabadi, E., Rigi, M. and Rahnama, M. 2013. Combined effects of *zataria multiflora boiss* essential oil and nisin on the shelf-life of refrigerated rainbow trout (*onchorynchus mykiss*) fillets. Iran J Fish Sci. 12(1): 115-126.
34. Zhou, G.H., Xu, X.L. and Liu, Y. 2010. Preservation technologies for fresh meat. Meat Sci. 87: 119-128.

# Study on antibacterial effect of rosemary extract in combination with nisin against *staphylococcus aureus* in minced meat during refrigerated temperature

**Ghasemi Zh[1], Mahasti P[2*], Nouri Saeedlou S[1]**

1. MSc. Student on food science and technology, science and research branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2. Department of Food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

3. Food and Beverages Safety Research Center, Urmia University of Medical Science, Urmia, Iran

[*]**Corresponding author:** *pmahasti@yahoo.com*

Received: 26 December 2015 Accepted: 17 November 2015

## Abstract

Synthetic preservatives have been used as food additives to extend shelf life of foods, but they are strictly regulated due to toxicological concerns and some health problems. So it is increasingly attractive to find out effective and nontoxic measures (e.g. use of natural antimicrobial agent) to delay microbial spoilage. Nisin is a bacteriocin that it is the only bacteriocin permitted for use in foods. And rosemary is one of the medicinal plants. In this study the effect of antibacterial property of various concentration of rosemary extract alone (3 and 4 mg/ml), and with nisin (7 µg/ml nisin + 1.5 mg/ml RE and 8 µg/ml nisin + 2 mg/ml RE) against *Staphylococcus aureus* in minced meat were assessed throughout 14 days of storage at 4±1˚C. Leaves and stems of rosemary after drying in the shade were soaking in pure ethanol and alcoholic extract was obtained. The minimum inhibitory concentration (MIC) of RE and nisin were determined against *S. aureus* using the agar dilution method. Assessment of microbial parameters (total plate count and *S. aureus* count) was carried out in 0, 1, 3, 7 and 14 days. The data were statistically significant ($P<0.05$). The results reveals that treatment with both concentrations of RE showed significantly lower microbial indexes in comparison with controls, but treatment with both preservative (nisin & RE) had better results and results were statistically significant ($P<0.05$). As a consequence, using of RE with nisin was better than of RE alone.

**Keywords:** Rosemary extract, nisin, *Staphylococcus aureus*, Minced beef