ارزیابی تغییرات رشد سودوموناس فلورسانس (*Pseudomonas fluorescens*) در گوشت چرخ شده ماهی کیلکا (*Clupeonella delicatula*) حاوی نگهدارنده‌های بیولوژیک

رضا صفری*[۱]– زینب رفتنی امیری [۲] – زهرا یعقوب زاده [۱]– شبنم حقیقت خواجوی [۳]

۱- پژوهشکده اکولوژی دریای خزر- موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

۲- دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری- دانشکده مهندسی علوم زراعی- گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی

۳- دانشگاه آزاد اسلامی تهران - واحد علوم و تحقیقات- دانشکده علوم و مهندسی صنایع غذایی

چکیده

عصاره‌های گیاهی و متابولیت‌های میکروبی بواسطه داشتن اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی و همچنین عدم عوارض جانبی، به مرور، جایگزین نگهدارنده‌های شیمیایی در مواد غذایی می‌گردند. هدف از تحقیق حاضر، بررسی استفاده از عصاره پونه کوهی و نایسین Z به تنهایی و توأم با یکدیگر جهت مهار رشد باکتری سودوموناس فلورسانس (یکی از باکتریهای شاخص مولد فساد در مواد غذایی) در گوشت چرخ شده ماهی کیلکا معمولی بوده است.

بدین منظور به نمونه‌های گوشت چرخ شده ماهی میزان ۲/۱×۱۰۳ CFU/g باکتری سودوموناس فلورسانس تلقیح شد و تیمارهای نایسین Z در دو سطح ۵۰۰ و ۱۰۰۰ واحد بین المللی بر گرم گوشت و تیمارهای پونه کوهی در سه سطح ۰/۵، ۱ و ۱/۵ درصد به تنهایی و توأم با یکدیگر تهیه شدند. تمامی تیمارها و گروه شاهد به مدت ۱۵ روز در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. تعداد باکتری سودوموناس فلورسانس هر سه روز یک بار توسط کشت سطحی بر روی محیط سودوموناس اف آگار شمارش گردید.

نتایج حاصل از تحقیق نشان داد که روند افزایشی باکتری در تمامی تیمارها خصوصاً تیمار کنترل مشاهده شده ولی با این وجود در تیمارهای ترکیبی، عصاره منفرد و نایسین Z روند رشد باکتری کندتر بوده است. با افزایش غلظت عصاره و همچنین نایسین، رشد باکتری نیز روند کاهشی بیشتری داشته است. عصاره پونه کوهی به‌واسطه داشتن انواع ترکیبات ضدمیکروبی دارای اثرات مهار کننده بر باکتری سودوموناس فلورسانس بوده و این ویژگی به هنگام استفاده ترکیبی با نایسین بارزتر می باشد. غلظت‌های بالاتر پونه کوهی و نایسین، دارای اثرات بیشتری بر روند رشد باکتری سودوموناس فلورسانس در گوشت چرخ شده ماهی کیلکا معمولی داشتند.

کلمات کلیدی: سودوموناس فلورسانس ، نایسینZ ، عصاره پونه کوهی، ماهی کیلکا

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)

مقدمه

فساد باکتریایی ماهی نگهداری شده در یخچال تحت شرایط هوازی توسط میکروارگانیسم‌های گرم منفی سرما دوست مثل سودوموناس، آلترموناس، شوانلا و گونه‌های مختلف فلاوباکتریوم اتفاق می‌افتد (Ojagh *et al.*, 2010). سودوموناس یکی از مهمترین باکتری‌های گرم منفی است که عامل فساد در انواع مواد غذایی از جمله محصولات شیلاتی است. این باکتری جزء باکتری‌های سرما دوست بوده و قادر به رشد در دمای یخچال (۴درجه‌ی سانتیگراد) بوده و به‌واسطه‌ی ترشح انواع آنزیم‌های پروتئولتیک و لیپولیتیک باعث بروز فساد در مواد غذایی می‌شود (El-Nagar *et al.*, 2010). گونه‌های مختلفی از باکتری-های جنس سودوموناس نظیر سودوموناس فلورسانس و سودوموناس آئروجینوزا در محیط و روده ماهیان وجود داشته و از طریق روش‌های مختلف به ماده‌ی غذایی انتقال یافته و پس از نامناسب شدن شرایط برای سایر باکتری‌ها، غالب شده و به واسطه‌ی تولید متابولیت‌های مختلف به سرعت رشد و تکثیر نموده و در نتیجه باعث شروع شدن فرآیند فساد می‌شوند (Al-Dughaym, 2000). وجود این باکتری‌ها در مواد غذایی حاکی از کیفیت پایین آن ماده بوده که خود نشان دهنده‌ی وجود سایر باکتری‌های بیماریزای و عامل فساد می‌باشد. بنابراین ارائه روش‌های نوین به منظور به تأخیر انداختن فساد ناشی از این گونه از باکتری سودوموناس یکی از نکات اصلی در افزایش زمان ماندگاری محصولات شیلاتی نگهداری شده در دمای یخچال می‌باشد. بدین منظور روش‌های متعددی برای جلوگیری از رشد و یا از بین بردن باکتری‌های عامل فساد و پاتوژن‌های بیماری‌زا و همچنین افزایش کیفیت و امنیت غذاهای نگهداری شده در یخچال ارائه شده است که از جمله آنها می توان به استفاده از عصاره و اسانس‌های گیاهی به شکل میکروکپسوله و ریزپوشانی شده اشاره نمود (Ojagh *et al.*, 2010).

در صنایع غذایی حفظ کیفیت به همراه افزایش زمان ماندگاری از طریق کاهش، حذف و یا کنترل عوامل میکروبی بیماری‌زا یا عامل فساد مواد غذایی صورت می‌گیرد. با توجه به اثبات بسیاری از اثرات زیان بار نگهدارنده‌های شیمیایی و نگرانی عمومی در این خصوص، بحث جایگزینی آنها با انواع ترکیبات طبیعی نظیر اسانس‌های گیاهی و آنتی بیوتیک‌های طبیعی افزایش یافته است و انجام این مطالعات ابتدا در مدل‌های آزمایشگاهی و سپس در مدل‌های غذایی در این رابطه لازم و ضروری به نظر می‌رسد.

جنس منتا (Mentha) یکی از پر مصرف‌ترین و مهم‌ترین گیاهان متعلق به خانواده نعنائیان می‌باشند و قدمت استفاده از گونه‌های آن به دو هزار سال قبل بر می‌گردد. در ایران ۶ گونه از این جنس گزارش شده است. یکی ازاین گونه‌ها منتا ولگارا (Origanum vulgare) با نام پونه کوهی است که اثرات آنتی‌اکسیدانی، کشندگی و یا بازدارندگی آن بر روی باکتری‌ها و مخمرها (حجتی، ۱۳۹۱) و نیز اثرات ضد قارچی آنها مشخص شده است (فیروزی و همکاران، ۱۳۹۰). ویژگی‌های ضدمیکروبی عصاره پونه کوهی بر علیه باکتری در مقیاس آزمایشگاهی به خوبی شناخته شده است (حجتی، ۱۳۹۱).

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)

ماهی کیلکا از جمله گونه‌های با ارزش دریای خزر بوده و به‌واسطه داشتن ارزش غذایی بالا خصوصاً اسیدهای چرب غیر اشباع امگا- ۳ حائز اهمیت می‌باشد. صید کیلکا ماهیان دریای خزر در سال ۱۳۹۳، بالغ بر ۲۴۰۰۰ تن بوده است. بررسی میزان صید در سال‌های ۱۳۹۰ تا ۱۳۹۳ نشان میدهد که از ۸۲۱۲۸ تن ماهی کیلکای صیده شده در این سال‌ها، ۷۵۱۲۴ ، ۳۴۱۳ ، ۲۷۸۵ ، ۸۶۱ تن به ترتیب بصورت پودر ماهی، بسته بندی، کنسروی و تازه خوری مورد استفاده قرار گرفته است (سالنامه آماری شیلات، ۱۳۹۳).

باکتریوسین‌ها ترکیبات بیواکتیو پپتیدی هستند که توسط باکتری‌ها تولید می‌شوند. باکتریوسین‌ها اغلب به عنوان ابزارهای بیولوژیکی با ارزش برای ارتقاء ایمنی غذا و کاهش شیوع بیماری‌های ناشی از غذاهای فاسد مطرح هستند.

از آنجاییکه برخی باکتریوسین‌ها می‌توانند هم در pH پایین و هم در دمای پایین فعالیت کنند بنابراین جهت استفاده در غذاهای اسیدی و محصولات فرآوری شده که در دمای پایین نگهداری مناسب هستند. یکی از باکتریوسین‌های با ارزش که در صنایع غذایی کاربرد فراوان پیدا کرده است نایسین می‌باشد. نایسین طیف مهارکنندگی وسیعی علیه باکتری‌های گرم مثبت دارد. همچنین علیه اسپورهای مقاوم به گرمای باکتری‌های گرم مثبت دارای فعالیت بازدارندگی است (Davidson *et al*., 2005; Deegan *et al*., 2006).

مطالعات نشان می‌دهد برخی ترکیبات وقتی که با نایسین بکار برده می‌شوند، دارای خواص سینرژیسمی هستند. از این ترکیبات می‌توان به عصاره و اسانس‌های گیاهی، اسیدهای آلی، لیزوزیم، باکتریوسین‌های دیگر و ... اشاره نمود.

امروزه استفاده از روش‌های نوین نگهداری نظیر استفاده از باکتریوسین‌ها و اسانس‌های گیاهی جایگاه ویژه‌ای در صنایع غذایی پیدا کرده‌اند(Davidson *et al*., 2005). هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر نایسین Z و عصاره پونه کوهی به تنهایی و توأم با یکدیگر بر رفتار باکتری سودوموناس فلورسانس (*Pseudomonas fluorescens*)در گوشت چرخ شده ماهی کیلکای معمولی است.

مواد و روش کار

آماده سازی نایسین

پودر تجاری Nisapline از شرکت (شرکت SERVA ، آمریکا) تهیه شد. محلول استوک نایسین با حل کردن Nisapline در هیدروکلریک اسید ۰/۰۲ نرمال (HCl 0.02 N) و سپس فیلتراسیون استریل با فیلتر ۰/۲۲ میکرومتری تهیه گردید. در مرحله بعد، محلول استوک نایسین در آب مقطر استریل رقیق شد تا به غلظت IU/ml ۲۵۰۰۰ رسید. محلول نایسین حاصل در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. انجمادزدایی در دمای محیط صورت گرفت و برای رسیدن به غلظت‌های پایین تر از آب مقطر استریل استفاده شد (Jamuna *et al*., 2005).

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)

تهیه عصاره الکلی پونه کوهی

پس از جمع آوری گیاه پونه کوهی از رویشگاه‌های طبیعی استان مازندران، در محیط خشک و تاریک، به دور از نور خورشید و در جریان هوا خشک شده و سپس آسیاب و به صورت پودر در آمد. پودر به دست آمده در بالن یک لیتری و با نسبت ۱ به ۵ با الکل اتیلیک ۸۰٪ مخلوط شد و به مدت ۴۸ ساعت بر روی دستگاه شیکر (شرکت فن آزما گستر مدل TM52E) به آرامی مخلوط گردید. سپس مخلوط به دست آمده توسط صافی و قیف بوخنر صاف شد. عصاره اولیه به دست آمده وارد دستگاه تقطیر دوار گردید و در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد و به مدت ۴ ساعت الکل پرانی صورت گرفت و عصاره تغلیظ شده به دست آمده تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شد (Sivam, 2001).

تهیه نمونه ماهی کیلکا

ماهی کیلکا مورد استفاده در این تحقیق از نوع معمولی (*Clupeonella delicatula*) بود که از سواحل بندر بابلسر به صورت تازه صید شد و بعد از توزین به سرعت کنار یخ به آزمایشگاه میکروبیولوژی ارسال گردید. در ابتدا ماهی کیلکا با آب شسته و به صورت دستی سر و امعاء و احشاء جدا شده و پس از چرخ کردن با دستگاه مخلوط کن (شرکت میهن آزما)، گوشت بدست آمده به ظروف پلاستیک ۱۰۰ میلی لیتر استریل شده با اشعه گاما انتقال یافته و در یخچال ۴ درجه سانتیگراد قرار گرفت.

آماده‌سازی باکتری سودوموناس فلورسانس جهت تلقیح

سویه استاندارد و لیوفیلیزه باکتری سودوموناس فلورسانس (PTCC 1181) از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. آمپول‌های لیوفیلیزه باکتری ابتدا در شرایط استریل باز و به محیط کشت مایع TSB (Tryptic Soy Broth) (مرک، آلمان) انتقال و به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد گرمخانه‌گذاری شد(شرکت ژاال تجهیز، ایران). پس از رشد باکتری، محیط کشت حاوی باکتری به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ (مدل Kokosan ، ژاپن) و به رسوب حاصله سرم فیزیولوژی اضافه شد و سانتریفوژ در ۳ مرحله متوالی با دور ۵۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. به رسوب حاصله مقداری سرم فیزیولوژی اضافه شد و با مقایسه با لوله ۰/۵ مک فارلند مقدار تقریبی باکتری در یک میلی‌لیتر بر حسب CFU/ml تعیین گردید (Abdollahzadeh *et al*., 2011).

تهیه تیمارهای مورد نظر

تیمارهای مورد استفاده در این مطالعه شامل تیمار شاهد (فاقد ماده نگهدارنده)، عصاره پونه کوهی (۰/۵، ۱ و ۱/۵ درصد) ، نایسین Z (۵۰۰ و ۱۰۰۰IU/g) و تیمارهای ترکیبی ۰/۵+ ۵۰۰، ۰/۵+ ۱۰۰۰، ۱+۵۰۰، ۱+ ۱۰۰۰، ۱/۵+ ۵۰۰ و ۱/۵+ ۱۰۰۰ (درصد+ IU/g) بوده است. تیمارهای مذکور در قالب نمونه‌های ۲۵ گرمی به ظروف استریل انتقال داده شده و سوسپانسیون باکتری سودوموناس فلورسانس با تعداد ۲/۱×۱۰۳CFU/g به هریک از تیمارها اضافه شده و کاملاً با نمونه

Journal of Aquatic Caspain Sea (J.A.C.S)

مخلوط گردید. پس از تلقیح باکتری، نمونه‌ها در در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شده و تغییرات رشد سودوموناس در زمان‌های صفر، ۳، ۶، ۹، ۱۲ و ۱۵ مورد بررسی قرار گرفت. با در نظر گرفتن ۱۲ تیمار، ۳ تکرار برای هر تیمار و ۶ زمان، در مجموع ۲۱۶ نمونه مورد آزمایش قرار گرفت.

شمارش باکتری سودوموناس فلورسانس

ابتدا در شرایط استریل، سوسپانسیونی از ۵ گرم از گوشت چرخ شده ماهی کیلکا و ۴۵ میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل ۰/۸۵٪ تهیه شده و به مدت ۶۰ ثانیه در یک مخلوط کن آزمایشگاهی هموژن شد. برای شمارش باکتری سودوموناس فلورسانس از محیط کشت سودوموناس اف آگار (Pseudomonas F agar) (مرک، آلمان) استفاده شده و نمونه‌ها پس از کشت در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شده و با استفاده از تابش لامپ UV ، کلنی های سبز- زرد شمارش شده و در عکس رقت مورد استفاده ضرب شده و تعداد باکتری‌های سودوموناس برای هر گروه در هر گرم از گوشت چرخ شده کیلکا تعیین گردید (Jamuna *et al*., 2005).

آنالیز آماری

جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS 18 استفاده شده و به منظور بررسی نرمال بودن داده‌ها از آزمون کولموگراف- اسمیرنوف و جهت ارزیابی تغییرات سودوموناس در زمان‌های مختلف از تجزیه واریانس یک طرفه (one-way analysis of varianc) استفاده گردید. مقایسه میانگین‌ها نیز بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن (Multiple- range test Duncans) در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفت ($P\leq 0.05$).

نتایج و بحث

تغییرات رشد سودوموناس در تیمارهای حاوی عصاره پونه کوهی:

مطابق جدول ۱ میانگین تعداد باکتری سودوموناس فلورسانس با گذشت زمان در گروه شاهد افزایش داشته ولی در تیمارهای حاوی پونه کوهی روند افزایش کندتر بوده و این تغییر در تیمار حاوی ۱/۵ درصد عصاره مشهودتر بوده است. نتایج تغییرات از زمان صفر تا ۱۵ روز در تمامی تیمارها بجز زمان ۹ و ۱۲ تیمار دارای ۱/۵ درصد پونه، معنی دار بوده است ($P < ۰/۰۵$).

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)

جدول ۱- تغییرات رفتار باکتری سودوموناس فلورسانس در گوشت چرخ شده ماهی کیلکای معمولی حاوی غلظت‌های مختلف عصاره پونه کوهی طی ۱۵ روز نگهداری در دمای ۴ درجه سانتیگراد

روز / تیمار	صفر	۳	۶	۹	۱۲	۱۵
شاهد	۳/۴۵± ۰/۰۲fB	۵/۸۵±۰/۰۶eA	۶/۶۷±۰/۰۴dA	۷/۴۵±۰/۱۸cA	۸/۲۱±۰/۱۱bA	۹/۲۲±۰/۲۸aA
۰/۵	۳/۲۵± ۰/۰۳fC	۴/۶۰±۰/۱۲eB	۵/۷۰ ± ۰/۰۵dB	۶/۴۵ ± ۰/۰۳cB	۷/۱۱ ±۰/۰۹bB	۷/۸۲ ±۰/۰۳aB
۱	۳/۲۷± ۰/۰۲fD	۴/۵۵±۰/۰۵eB	۵/۳۵ ± ۰/۰۸dC	۶/۱۴ ± ۰/۰۶cC	۶/۷۱ ± ۰/۱۶bC	۷/۳۱± ۰/۱۱aC
۱/۵	۳/۶۵± ۰/۰۱eA	۴/۱۲ ± ۰/۰۳dC	۴/۶۵ ± ۰/۰۴cD	۵/۲۲ ± ۰/۱۱bD	۵/۳۵±۰/۰۵bD	۶/۲۵± ۰/۰۹aD

حروف بزرگ و کوچک متفاوت به ترتیب در ستون و ردیف حاکی از اختلاف معنی‌دار مابین داده‌ها می باشد

تغییرات رشد سودوموناس در تیمارهای حاوی نایسین:

نتایج جدول ۲ نشان می دهد که نایسین در دو غلظت IU ۵۰۰ و ۱۰۰۰ نسبت به عصاره پونه کوهی دارای اثرات ضعیف‌تری بر رشد باکتری سودوموناس فلورسانس بوده هر چند که در روز ۱۵ نگهداری، باعث کاهش یک لوگی باکتری نسبت به نمونه شاهد شده است.

جدول ۲ – تغییرات رفتار باکتری سودوموناس فلورسانس در گوشت چرخ شده ماهی کیلکای معمولی حاوی دو غلظت از نایسین Z طی ۱۵ روز نگهداری در دمای ۴ درجه سانتیگراد

روز / تیمار	صفر	۳	۶	۹	۱۲	۱۵
شاهد	۳/۴۵± ۰/۰۲fA	۵/۸۵±۰/۰۶eA	۶/۶۷±۰/۰۴dA	۷/۴۵±۰/۱۸cA	۸/۲۱±۰/۱۱bA	۹/۲۲±۰/۲۸aA
نایسین ۵۰۰IU	۳/۲۵± ۰/۰۴fA	۵/۱۱± ۰/۱۵eB	۶/۲۷ ± ۰/۰۳dB	۷/۲۱ ±۰/۲۲cB	۷/۸۶ ±۰/۱bB	۸/۶۱± ۰/۰۵aB
نایسین۱۰۰۰ IU	۳/۳۲± ۰/۰۲fA	۴/۵۷± ۰/۰۴eC	۵/۶۴±۰/۱۱dC	۶/۳۵±۰/۰۵cC	۷/۲۱±۰/۱۷bC	۸/۳۲±۰/۱۱aC

حروف بزرگ و کوچک متفاوت به ترتیب در ستون و ردیف حاکی از اختلاف معنی‌دار مابین داده‌ها می باشد

تغییرات رشد سودوموناس در تیمارهای حاوی نایسین و پونه کوهی:

اثر هم افزایی عصاره پونه با نایسین جهت مهار باکتری سودوموناس فلورسانس در جدول ۳ آمده است. نتایج حاصل از تحقیق حاکی از وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای ترکیبی و انفرادی و شاهد بود ($P < ۰/۰۵$). نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که تیمار ترکیبی پونه در سطح ۱/۵ درصد و نایسین IU ۱۰۰۰ اثر مهار کنندگی قوی علیه باکتری سودوموناس فلورسانس در گوشت چرخ شده ماهی کیلکا داشته است.

Journal of Aquatic Caspain Sea (J.A.C.S)

جدول ۳ - تغییرات رفتار باکتری سودوموناس فلورسانس در گوشت چرخ شده ماهی کیلکای معمولی حاوی غلظت‌های مختلف پونه کوهی و نایسین Z طی ۱۵ روز نگهداری در دمای ۴ درجه سانتیگراد

تیمار	روز	صفر	۳	۶	۹	۱۲	۱۵
شاهد		۳/۴۵± ۰/۰۲fA	۵/۸۵±۰/۰۶eA	۶/۶۷±۰/۰۴dA	۷/۴۵±۰/۱۸cA	۸/۲۱±۰/۱۱bA	۹/۲۲±۰/۲۸aA
ترکیب پونه ۰/۵ + نایسین IU ۵۰۰		۳/۳۱± ۰/۰۱fA	۴/۲۵±۰/۰۲eB	۵/۲۱ ± ۰/۰۲dB	۵/۸۵ ± ۰/۰۷cB	۶/۴۵ ±۰/۰۶bB	۷/۱۱ ±۰/۰۵aB
ترکیب پونه ۱ + نایسین IU ۵۰۰		۳/۲۲± ۰/۰۳fA	۴/۱۷±۰/۰۸eB	۴/۵۶ ± ۰/۰۵dC	۵/۳۲ ± ۰/۱۳cC	۶/۱۲ ± ۰/۱۲bB	۶/۵۶± ۰/۰۵aC
ترکیب پونه ۱/۵ + نایسین IU ۵۰۰		۳/۲۵± ۰/۰۸eA	۳/۴۵ ± ۰/۰۵dC	۴/۲۲ ± ۰/۰۹cD	۴/۸۲ ± ۰/۰۶bD	۵/۲۵±۰/۰۷bC	۵/۷۲± ۰/۰۲aC
ترکیب پونه ۰/۵ + نایسین IU ۱۰۰۰		۳/۲۷± ۰/۰۴fA	۴/۱۱±۰/۰۷eB	۵/۱۵ ± ۰/۰۴dB	۵/۵۱ ± ۰/۱۲cC	۶/۲۳ ±۰/۰۴bB	۶/۷۵ ±۰/۰۶aC
ترکیب پونه ۱ + نایسین IU ۱۰۰۰		۳/۲۱± ۰/۰۶fA	۳/۲۴±۰/۰۴eC	۳/۶۲ ± ۰/۰۴dD	۴/۴۳ ± ۰/۰۷cD	۴/۸۵ ± ۰/۰۸bD	۵/۲۱± ۰/۰۴aC
ترکیب پونه ۱/۵ + نایسین IU ۱۰۰۰		۳/۶۵± ۰/۰۱eA	۴/۱۲ ± ۰/۰۳dB	۴/۶۵ ± ۰/۰۴cC	۵/۲۲ ± ۰/۱۱bC	۵/۳۵±۰/۰۵bC	۶/۲۵± ۰/۰۹aD

حروف بزرگ و کوچک متفاوت به ترتیب در ستون و ردیف حاکی از اختلاف معنی‌دار مابین داده‌ها می باشد

با توجه به نتایج آنالیز مشخص گردید که بین تعداد شمارش شده باکتری در روزهای پایانی نگهداری نسبت به روزهای ابتدایی نگهداری ارتباط معنی‌دار بیشتری وجود داشت.

محققین مختلفی به بررسی اثرات اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی یا اشکال ترکیبی آنها بر روی تعدادی از میکروب‌های بیماریزا منتقل شده از طریق غذا از قبیل باکتری‌های سودوموناس فلورسانس، لیستریا مونوسیتوژنز، استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیا کلی، سالمونلا، شیگلا و ... پرداخته‌اند، که همگی این تحقیقات با هدف دستیابی به نگهدارنده‌های گیاهی جایگزین ترکیبات شیمیایی مضر صورت گرفته است (Arques *et al*., 2005).

تعداد باکتری سودوموناس فلورسانس در تمامی تیمارهای مورد بررسی، روندی افزایشی داشته هر چند که در تیمارهای ترکیبی (نایسین و عصاره پونه) این روند کندتر بوده است. مشابه مطالعه حاضر، رومیانی (۱۳۹۲) به بررسی اثرات ضد باکتریایی غلظت‌های مختلف اسانس زیره سبز و نایسین در فیله ماهی قزل‌آلای رنگین کمان پرورشی به منظور مهار باکتری استرپتوکوکوس اینیایی در دمای ۸ درجه سانتیگراد پرداخت. نتایج نشان داد که استفاده توأم از اسانس زیره سبز و نایسین تأثیر معنی‌داری در کنترل و کاهش باکتری فوق در فیله ماهی قزل‌آلای رنگین کمان پرورشی داشته است. همچنین با نتایج Choobkar و همکاران (۱۳۸۹) بر روی میزان رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در فیله های ماهی کپور نقره‌ای فرآوری

Journal of Aquatic Caspain Sea (J.A.C.S)

شده با نمک و نایسین و رومیانی (۱۳۹۱) بر روی میزان رشد باکتری استرپتوکوکوس اینیایی در فیله‌های ماهی قزل‌آلای رنگین کمان فرآوری شده با رزماری و نایسین همخوانی دارد زیرا نتایج آنها نشان داد که در تمامی تیمارهای مختلف رزماری و نایسین میزان رشد باکتری استرپتوکوکوس اینیایی در طول زمان آزمایشات روند افزایشی داشته هر چند که در تیمارهای ترکیبی این روند آهسته تر بوده است.

نتایج مطالعه حاضر نشان میدهد که غلظت ۱/۵ درصد پونه کوهی باعث کاهش معنی‌دار روند رشد باکتری سودوموناس شده و این اثر به هنگام استفاده از نایسین در غلظت ۱۰۰۰ واحد بین المللی بیشتر می‌شود. این در حالیست که به هنگام استفاده از نایسین به تنهایی این پدیده رخ نمی‌دهد. علت آن وجود ترکیبات مهارکننده رشدی است که در عصاره پونه کوهی وجود دارد. این ترکیبات با تأثیر بر دیواره و غشای سلولی به ترتیب باعث اختلال در تبادل پتاسیم و افزایش نفوذپذیری شده غشاء شده (Bouhdid *et a*l., 2009) و باعث کاهش پایداری و قوام سلولی شده که این تغییرات، باعث افزایش تأثیرات مهارکننده نایسین بر دیواره و غشاء شده و در نتیجه روند رشد سودوموناس را کاهش میدهد. بعبارت دیگر این دو ترکیب به‌صورت سینرژیسم عمل کرده و به هنگام استفاده ترکیبی، اثرات بهتری را بهمراه دارند. در برخی از مطالعات استفاده از اسانس و یا عصاره پونه کوهی در غلظت‌های پائین، تأثیر چندانی بر رفتار باکتری‌های مورد استفاده نداشته است. مطالعه Ting و همکاران (۱۹۹۲) نشان داد که غلظت یک درصد اسانس پونه کوهی تأثیر معنی‌داری در کاهش تعداد باکتری لیستریا مونوسیتوژنز تلقیح شده به نمونه‌های گوشت در دماهای ۴ و ۲۴ درجه سانتیگراد نداشت. نتایج مشابهی دیگری نیز در هنگام استفاده از اسانس پونه کوهی توسط Ouattar و همکاران (۱۹۹۷) گزارش شده که این اسانس تأثیر معنی‌داری بر روی کاهش باکتری-های عامل مولد فساد در گوشت نداشته است. اختلافات مشاهده شده در این مطالعات ممکن است به دلیل مختلف بودن غلظت‌های اسانس یا عصاره‌های گیاهی مورد استفاده و یا نوع متفاوت میکروارگانیسم مورد مطالعه باشد. رشد و بقاء باکتری‌ها در مواد غذایی به عوامل متعدد بیرونی مانند فلور باکتریایی، دما، pH، افزودنی‌هایی که در پروسه تهیه مواد غذایی استفاده می‌شود و نیز عوامل داخلی ترکیبات غذایی بستگی دارد (Juven *et al*., 1994). در مطالعه انجام شده توسط Özkalp و همکاران (۲۰۱۰) مشخص گردید که اسانس پونه کوهی باعث مهار رشد انواع باکتری‌های بیماریزا و مولد فساد مثل سودوموناس، استافیلوکوکوس، کلبسیلا، اشرشیا، استرپتوکوکوس، سالمونلا، باسیلوس و میکروکوکوس در شرایط آزمایشگاهی شده که درصد کاهش به نوع میکروارگانیسم و غلظت اسانس بستگی داشته است. نتایج مطالعات Mexis و همکاران (۲۰۰۹) نشان داد که در نمونه‌های ماهی قزل آلای رنگین کمان پرورشی حاوی اسانس پونه با غلظت ۰/۴ درصد، زمان ماندگاری فیله بین ۸-۷ روز بوده و در صورتی‌که نمونه‌های فیله حاوی پونه در حضور جاذب اکسیژن قرار داده شوند باعث افزایش زمان ماندگاری ماهی به ۱۴-۱۳ روز می‌شوند. بنابراین پونه کوهی به هنگام استفاده با سایر تیمارها نتایج بهتری را بهمراه خواهد داشت. مطالعات Lamber و همکاران (۲۰۰۱) در خصوص ارزیابی کمترین غلظت مهار کننده تیمول، کارواکل

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)

و اسانس پونه کوهی نشان داد که استفاده ترکیب از مواد فوق باعث اثرات مهار کننده بهتر می‌شود. تیمول و کارواکل باعث تغییر در تراوایی غشای سلولی شده و اثرات مهار کننده پونه را تسهیل می‌کنند. Chaudhry و همکاران (۲۰۰۷) تأثیر عصاره آبی پونه کوهی را بر ۱۱ باسیل گرم منفی با روش ژل دیفوژن بر روی محیط آگاردار مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که به جز باکتری‌های کلبسیلا، سیتروباکتر و انتروباکتر بقیه باکتری‌های مورد بررسی از جمله اشرشیا، سودوموناس، سالمونلا، سراشیا ، شیگلا نسبت به عصاره آبی مقاوم بوه که این امر به نوع عصاره‌گیری پونه کوهی بستگی داشته و عصاره الکی (مطالعه حاضر) و یا هیدروالکی دارای تأثیرات مهار کننده بهتری نسبت به عصاره آبی می‌باشد زیرا مواد موثره بیشتری در روش‌های اخیر جدا میشوند. بایستی توجه نمود که اثرات مهارکننده پونه کوهی و یا هر عصاره گیاهی دیگر در شرایط آزمایشگاهی بالطبع متفاوت با ماده غذایی می‌باشد.

نایسین دارای اثر مهارکننده بر باکتری‌های منسوب به باکتری‌های لاکتیک و برخی از باکتری‌های گرم مثبت از جمله کلستریدیوم و لیستریا می‌باشد. نتایج این مطالعه نشان داده که به هنگام استفاده ترکیبی نایسین و پونه کوهی خصوصا در دوز بالاتر، تغییرات معنی‌داری در روند رشد سودوموناس در مقایسه با تیمار شاهد و تیمارهای منفرد مشاهده گردید. نتایج مطالعه Jamuna و همکاران (۲۰۰۵) نشان داد که به هنگام استفاده ترکیبی نایسین و سایر باکتریوسین‌ها، اثر مهارکننده آنها بر برخی از باکتری‌ها از جمله سودوموناس افزایش یافته این در حالیست که در استفاده منفرد نایسین این اثر مشهود نبوده و فقط قادر به مهار رشد باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا مونوسیتوژنز بوده است. نتایج این تحقیق دقیقا مطالعه حاضر را تأئید می کند. به نظر می‌رسد ماده مکمل که در کنار نایسین مورد استفاده قرار می‌گیرد باعث تأثیر نسبی بر دیواره یا غشای باکتری شده و شرایط را برای اثرات مخرب نایسین فراهم می کند. در مطالعه انجام شده توسط Soltanian و همکاران (۲۰۱۱) در خصوص تأثیر نایسین بر زمان ماندگاری ماهی قزل‌آلای رنگین کمان پرورشی وکیوم شده مشخص گردید که نایسین در غلظت بالاتر (۰/۲ درصد) باعث کاهش پارامترهای فساد شیمیایی و میکروبی (شمارش کلی باکتری‌های مزوفیل، سرماگرا و باکتری‌های لاکتیک) شده بطوریکه تمامی فاکتورهای مورد بررسی در دامنه استاندارد قرار داشتند. فلور باکتری‌های سرماگرا شامل برخی از باکتری‌های گرم مثبت (میکروکوکوس‌ها) و گرم مثبت (عمدتا سودوموناس‌ها) بوده که تأثیر مهارکننده نایسین، بیشتر بر باکتری‌های گرم مثبت بوده هرچند که در غلظت‌های بالاتر قادر به کاهش روند رشد باکتری‌های گرم منفی نیز می‌شود. نتایج تحقیق حاضر تأئید کننده آن است که غلظت بالاتر نایسین باعث کند شدن رشد باکتری سودوموناس فلورسانس می‌شود.

Lua و همکاران (۲۰۱۰) به تأثیر نایسین و اسانس دارچین در پوشش آلژینات سدیم بر زمان ماندگاری فیله ماهی Snakehead اشاره کرده و گزارش کردند که در تیمارهای حاوی دارچین بصورت منفرد و ترکیب دارچین و نایسین در غلظت IU ۲۰۰۰ اثرات بهتری مشاهده شده و روند فساد پارامترهای شیمیایی و میکروبی کندتر از تیمارهای منفرد نایسین،

Journal of Aquatic Caspian Sea (JACS)

پوشش آلژینات سدیم بدون ماده نگهدارنده بوده است. نتایج تحقیق مذکور با تحقیق حاضر کاملاً همخوانی داشته و به هنگام استفاده از نایسین در غلظت IU ۱۵۰۰ به همراه پونه کوهی، روند رشد باکتری سودوموناس فلورسانس کندتر بوده است.

در مطالعه انجام شده توسط Ekhtiarzadeh و همکاران (۲۰۱۲) مشخص گردید که به هنگام استفاده از اسانس آویشن و نایسین با غلظت بالاتر در فیله ماهی نمک سود شده، روند رشد باکتری‌های لیستریا مونوسیتوژنز و ویبریو پاراهمولیتیکوس بطور معنی‌داری کاهش می‌یابد. نتایج این مطالعه حاکی از آن است استفاده ترکیبی اسانس آویشن و فرآیند نمک سود کردن به همراه نایسین تأثیرات بهتری را بهمراه داشته که با مطالعه حاضر همخوانی دارد.

نتیجه‌گیری که از مطالعه انجام شده حاصل میشود آن است که عصاره پونه کوهی بواسطه داشتن انواع ترکیبات ضدمیکروبی دارای اثرات مهار کننده بر باکتری سودوموناس فلورسانس بوده و این ویژگی به هنگام استفاده ترکیبی با نایسین بارزتر می باشد. غلظت‌های بالاتر پونه کوهی و نایسین، دارای اثرات بیشتری بر روند رشد باکتری سودوموناس فلورسانس در گوشت چرخ شده ماهی کیلکا داشتند. با انتخاب بهترین غلظت از نایسین و پونه کوهی به فرم ترکیبی و انجام آزمایشات تکمیلی نظیر ویژگی های حسی، میتوان از آنها بعنوان نگهدارنده های شاخص بیولوژیک در محصولات شیلاتی استفاده نمود.

منابع

سالنامه آماری شیلات ایران. ۱۳۹۳. موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور. تهران. صفحه ۶۴.

حجتی م. ۱۳۹۱. اثر اسانس‌های پونه و نعناع بر رشد باکتری‌های سالمونلا و اشرشیاکلی در مقایسه با آنتی بیوتیک کلرامفنیکل. همایش ملی فرآورده‌های طبیعی و گیاهان دارویی. بجنورد. صفحه ۳۲.

رومیانی، ل. ۱۳۹۱. مطالعه تأثیر اسانس رزماری و نایسین بر رفتار رشد باکتری استرپتوکوکوس اینیایی در شرایط آزمایشگاهی و بر روی فیله ماهی قزل‌آلای رنگین کمان. پایان نامه دکتری شیلات. دانشگاه آزاد اسلامی. واحد علوم و تحقیقات تهران. ۱۶۰ صفحه.

رومیانی، ل. ۱۳۹۲. فعالیت ضد باکتریایی اسانس زیره سبز و نایسین در مهار باکتری *Streptococcus iniae* در محیط آزمایشگاه و فیله ماهی. مجله علمی شیلات ایران. ۲۲(۳): ۵۹-۵۰.

Abdollahzadeh, E., Rezaei, M., Hosseini, H., Safari, R., 2011. Effects of nisin and thyme essential oil, individually and in combination, on inoculated populations of *Listeria monocytogenes* in minced silver carp. Iran J Nutr Sci Food Technol. 4,13-20.

Arques J.L., Rodriquez E., Gaya P., Medina M. and Nunez M. 2005. Effect of combinations of high pressure Treatment and bacteriocin producing lactic acid bacteria on survival of *Listeria monocytogenes* in raw milk cheese. International Dairy Journal, 15: 898-900.

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)

Al-Dughaym, A.M. 2000. Recovery and antibiogram studies of *A. hydrophila* and *P. fluorescens* from naturally and experimentally infected Tilapia fishes. Pakistan Journal of Biological Sciences 3: 2185-7.

Bouhdid, S. Abrini, J. Amensour, M. Zhiri, A. Espuny, M.J. 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.

Microbiol. 109: 1139–1149. Chaudhry, N.M. Saeed, A. Tariq, P. 2007. Antibacterial effects of oregano *(Origanum vulgare)* against gram negative bacilli. Pak. J. Bot., 39,2, 609-613.

Choobkar N. Soltani M. Ebrahimzadeh Mousavi H. A. Akhonzadeh Basti A. Matinfar A.2010. Effect of *Zataria multiflora boiss* essential oil on the growth of *Staphylococcus aureus* in the light salted fillets of silver carp *(Hypophthalmichthys molitrix)*. Iranian Journal of Fisheries Sciences. 9(3) 352-359.

Davidson P. M., Sofos J. N., Branen A. L., 2005: Antimicrobials in food, CRC Press, 706 P.

Deegan L.H., Cotter P.D., Hill C., Ross P., 2006: Bacteriocins: biological tools for bio- preservation and shelf-life extension, International Dairy Journal, Vol. 16:1058-1071.

El-Nagar, R.M.A. 2010. Bacteriological studies on Pseudomonas microorganisms in cultured. M.V.Sc. thesis, Faculty of Veterinary Medicine, Zagreb University. 123 p.

Ekhtiarzadeh, H. Basti, A A. Misaghi, A. Sari, A. Khanjari, A. Rokni, N. Abbaszadeh, S. Partovi. R. 2012. Growth response of *Vibrio parahaemolyticus* and *Listeria monocytogenes* in salted fish fillets as affected by *Zataria multiflora boiss*. essential oil, nisin, and their combination. Journal of Food Safety, 32: 263–269.

Jamuna, M. Babusha, S.T. Jeevaratnam, K. 2005. Inhibitory efficacy of nisin and bacteriocins from Lactobacillus isolates against food spoilage and pathogenic organisms in model and food systems. Food Microbiology 22, 449–454

Juven, BJ. Kanner, J. Schved, F. Weisslowicz, H. 1994. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. J Appl Bacteriol, 76(6):626-3.

Lua F, DingacY, Yeb X, Liub D. 2010. Cinnamon and nisin in alginate–calcium coating maintain quality of fresh northern snakehead fish fillets. LWT - Food Science and Technology, 43: 1331–1335.

Lambert, R.J.W Skandamis, P.N. Coote, P.J. A. Nychas, G.J. 2001. Study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. Journal of Applied Microbiology, 91, 453- 462.

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)

Mexis, S.F. Chouliara, E. Kontominas, M.G. 2009. Combined effect of an oxygen absorber and oregano essential oil on shelf life extension of rainbow trout fillets stored at 4° C. Food Microbiology, 26, 598–605.

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 Chemistry 120 : 193–198.

Ouattara B, Simard RE, Holey RA, Piette GJ, Begin A. 1997. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. International Journal of Food Microbiol, 37: 155-162.

Özkalp, B. Sevgi, F. Ozcan, M. 2010. The antibacterial activity of essential oil of oregano *(Origanum vulgare* L.*)*. Journal of Food, Agriculture & Environment.8, 2. 272 – 274.

Sivam, G.P. 2001. Recent advances on the nutritional effects associated with the use of garlic as supplement. American Society of Nutrition Sciences. 131: 1106 -1108.

Soltanian, S. Behnam, S. Rezai, M. Safari, R Anvari, M. 2011. Nisin as preservative for rainbow trout *(Onchorynchus mykis)*. Online Journal of Veterinary Research, 15 (4): 354-365.

Ting EWT, Deibel KE. 1992. Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to spices at two temperatures. Journal of Food Safety, 12: 129-137.

Juven, BJ. Kanner, J. Schved, F. Weisslowicz, H. 1994. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. J Appl Bacteriol, 76(6):626-3.

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)