

تاثیر نایسین A و بنزوات سدیم بر رفتار لیستریامونوستیوژنز و برخی از پارامترهای میکروبی و شیمیایی در فیله ماهی فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys molitrix*) نگهداری شده در دمای ۴ درجه سلسیوس

رضا صفری^{۱*}، محمد رضا سعیدی اصل^۲

۱- پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، ساری، ایران.

۲- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سبزوار، گروه علوم و صنایع غذایی، سبزوار، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات: Safari1351@gmail.com

(دریافت مقاله: ۹۰/۳/۳۱ پذیرش نهایی: ۹۰/۹/۲۵)

چکیده

در این مطالعه تاثیر نایسین A و بنزوات سدیم بر تعداد لیستریامونوستیوژنز، برخی پارامترهای میکروبی (باکتری‌های مزوفیل، باکتری‌های سرماگرا و باکتری‌های لاکتیک) و پارامترهای شیمیایی (عدد پراکسید و TVN) در فیله ماهی فیتوفاگ نگهداری شده در دمای ۴ درجه سلسیوس در زمان‌های صفر، ۳، ۶، ۹ و ۱۲ روز مورد ارزیابی قرار گرفت. به نسبت وزن اولیه فیله، مقدار تلقیح اولیه باکتری مشخص شده (۴ واحد لگاریتمی) و پس از اسپری نمودن سوسپانسیون باکتریایی و جذب آن به سطح فیله، نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در محلول بنزوات سدیم ۲٪ قرار داده شده و بعد از قرار گرفتن در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه، محلول نایسین A با غلظت ۰/۱۵ گرم بر کیلوگرم ماهی بر روی نمونه‌ها اسپری گردید. نتایج نشان داد که در نمونه دارای ترکیب نایسین A و بنزوات سدیم تعداد لیستریا مونوستیوژنز از ۴/۱۲ به ۳/۶۶ واحد لگاریتمی کاهش یافت. این در حالیست که در نمونه‌های فاقد ماده نگهدارنده تعداد لیستریا مونوستیوژنز تلقیح شده از ۴/۴۳ به ۵/۱۴ واحد لگاریتمی افزایش داشته است. جمعیت باکتری‌های مزوفیل در نمونه‌های حاوی ماده نگهدارنده (بصورت ترکیبی) و نمونه‌های فاقد نگهدارنده به ترتیب از ۴/۳۹ به ۶/۷۹ و از ۴/۴۸ به ۷/۹۳ واحد لگاریتمی افزایش داشته است. جمعیت باکتری‌های سرماگرا در نمونه‌های حاوی ماده نگهدارنده و نمونه‌های فاقد ماده نگهدارنده از ۴/۱۶ به ۶/۷۲ و از ۴/۳۴ به ۷/۹۲ واحد لگاریتمی و جمعیت باکتری‌های لاکتیک نیز در تیمارهای ذکر شده به ترتیب از ۲/۷۴ به ۴/۰۸ و ۲/۹ به ۴/۷۸ واحد لگاریتمی افزایش داشته است. افزایش مقدار عدد پراکسید و TVN در تیمار نایسین و بنزوات سدیم در مقایسه با نمونه‌های تیمار تفاوت نشان داد. نتیجه‌گیری کلی نشان می‌دهد که اگرچه مواد نگهدارنده مورد استفاده در این تحقیق به هنگام استفاده در محیط کشت آزمایشگاهی، جمعیت لیستریا مونوستیوژنز را به صفر می‌رسانند ولی به هنگام تلقیح باکتری در بافت ماهی، پارامترهای مختلف بر اثرات ضد میکروبی مواد نگهدارنده تأثیر گذار می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: نایسین A، بنزوات سدیم، لیستریامونوستیوژنز، ماهی فیتوفاگ

مقدمه

قابلیت فساد پذیری بالای ماهیان سبب شده تا حفظ کیفیت ماهی تازه، یکی از مسائل مهم مورد توجه صنعت ماهی و مصرف کنندگان باشد. ماهی فیتوفاگ با نام علمی *Hypophthalmichthys molitrix* یکی از مهمترین ماهیان پرورشی کشور می باشد که به علت استفاده از رژیم غذایی کم هزینه و سطوح بالای زنجیره غذایی به مقدار زیاد پرورش می یابد. از نظر تولید بالای سالیانه و قابلیت دسترسی برای مصرف کننده و پراکنش مناسب از اهمیت زیادی بین پرورش دهندگان برخوردار است و اغلب به صورت ماهی کامل از مغازه های خرده فروشی، و یا به صورت فیله شده قابل تهیه است. روش نگهداری برای تمامی مواد غذایی اهمیت داشته و برای ماهی نیز با توجه به فساد پذیری بیشتر آن نسبت به سایر مواد غذایی ضروری است (Esmailzadeh and Sahari, 2004). نگهداری ماهی در یخچال سبب کاهش سرعت فعالیت های آنزیمی و شیمیایی و فعالیت موجودات ذره بینی خواهد شد اما به دلیل عدم توانایی دمای یخچال (۴ درجه سلسیوس) برای کاهش دمای ماهی به مقدار لازم، تغییرات نامطلوبی از جمله اکسیداسیون و هیدرولیز چربی به آرامی صورت گرفته و باعث کاهش کیفیت محصولات می گردد (Rezaei et al., 2003; Perez-Alonso and Auborg, 2003). از طرفی برخی از باکتری های سرماگرا نظیر جنس های سودوموناس، لیستریا، کلستریدیوم و یرسینیا قادر به رشد در چنین دمایی بوده و باعث فساد و متعاقب آن مسمومیت غذایی در

انسان می گردند. بنابراین استفاده از موادی مناسب با فعالیت آنتی باکتریایی و آنتی اکسیدانی به منظور بهبود کیفیت، افزایش عمر ماندگاری گوشت و در عین حال جلوگیری از ضررهای اقتصادی، ضروری و مفید به نظر می رسد (Vescovo et al., 2006).

به منظور افزایش زمان ماندگاری محصولات غذایی از مواد نگه دارنده شیمیایی استفاده می شود. این مواد دارای عوارض جانبی بوده و استفاده از برخی از آنها بدلیل سرطانزا و موتاژن بودن توسط برخی از کشورها ممنوع شده است. نگه دارنده بیولوژیک که شامل ارگانسیم های مفید، متابولیت های میکروبی و اسانس یا عصاره های گیاهی می شود جزو آن دسته از موادی هستند که نه تنها عوارضی بدنبال ندارند بلکه باعث بهبود طعم و مزه مواد غذایی شده و زمان ماندگاری را آنها بطور نسبی افزایش می دهند. مطالعات نشان داده که اگر نگه دارنده بیولوژیک بصورت ترکیبی با نگه دارنده های شیمیایی (با غلظت پائین تر) مورد استفاده قرار گیرد نتایج بسیار مطلوبی در پی خواهد داشت (Tome et al., 2006; Vescovo et al., 2006).

باکتریوسین ها یکی از مهمترین متابولیت های باکتری های گروه لاکتیک بوده که اغلب به عنوان ابزارهای بیولوژیک با ارزش برای ارتقاء ایمنی غذا و کاهش شیوع بیماری های ناشی از غذاهای فاسد مطرح هستند. باکتریوسین نایسین، نیز ترکیب بیواکتیو و پپتیدی است که توسط برخی لاکتوکوکوس لاکتیس زیر گونه لاکتیس تولید می شود (Castellano et al., 2008; De et al., 2009).

درصد از ماهیانی صید شده از سطح استخرهای پرورش ماهیان گرم‌آبی (کپور نقره‌ای و کپور معمولی) آلوده به لیستریا مونوسیتوژنز بودند (Akhondzadeh et al., 2003).

برای افراد سالم بیشترین میزان قابل قبول باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در غذا ۱۰۰ سلول در هر گرم است (Gudbjornsdóttir et al., 2004; Huss et al., 2000). تعداد این باکتری در غذاهای یخچالی طی یک دوره ۳-۴ هفته‌ای (دوره نگه‌داری اکثر غذاها) می‌تواند به بیش از ۱۰۰ هزار سلول در هر گرم غذا برسد (Gudbjornsdottir et al., 2004). در بیماری لیستریوزیس علائمی مشابه آنفلونزا، عفونت خون و مننژیت ایجاد می‌کند. معمولاً افراد بزرگسال سالم به این بیماری مقاوم هستند. اما نوزادان، افراد سالخورده و کسانی که سیستم ایمنی آنها توسط دارو تضعیف شده است و همچنین زنان باردار در معرض خطر هستند (Duffes et al., 1999). این بیماری ممکن است موجب سقط جنین، بروز مننژیت یا عفونت خونی در نوزادان گردد (Martins and Pedro, 2011; Wadud et al., 2010).

هدف از این مطالعه بررسی اثر باکتریوسین نایسین A و بنزوات سدیم بر رفتار لیستریا مونوسیتوژنز در فیله ماهی فیتوفاگ نگه‌داری شده در دمای ۴ درجه سلسیوس می‌باشد.

از مهمترین نمک اسیدهای آلی که به عنوان نگه‌دارنده شیمیایی مورد استفاده قرار می‌گیرد می‌توان به بنزوات سدیم اشاره نمود. این ماده بیشتر بعنوان ماده نگه‌دارنده در انواع نوشیدنی‌ها مورد استفاده قرار گرفته و کمتر در فرآورده‌های شیلاتی مورد استفاده قرار می‌گیرد، ولی متابولیت‌های آن مثل متیل پارابن در برخی از فرآورده‌های شیلاتی کاربرد دارد. توانایی بنزوات سدیم در جلوگیری از رشد میکروب‌های ناخواسته ممکن است بدلیل تأثیر آن بر کاهش pH یا جذب یون‌های فلزی مورد نیاز باکتری‌ها (بخصوص Ca^{++}) باشد (Savvaidis et al., 2002; Solomakos et al., 2008).

لیستریا مونوسیتوژنز باکتری گرم مثبت، هوازی تا بی‌هوازی اختیاری و میله‌ای شکل است که باعث بیماری لیستریوزیس در انسان می‌شود (Chen et al., 2010; Dykes and Moorhead 2002; Inoue et al., 2010; Neetooet al., 2008; Wadud et al., 2010). اگرچه تعداد مسمومیت غذایی ناشی از لیستریا مونوسیتوژنز نسبت به مسمومیت با سالمونلا، کلستریدیوم، کمپیلوباکترها و استافیلوکوکوس آریوس کمتر است اما به جرأت می‌توان گفت که از نظر نقش تهدیدکنندگی، لیستریوزیس خطرناک‌ترین نوع مسمومیت غذایی است (Chen et al., 2010).

بر طبق مطالعه انجام شده در ایران مشخص شده که شیوع لیستریا مونوسیتوژنز در سطح خرده فروشی‌های ماهی قزل‌آلای رنگین کمان ۱۲/۵ درصد و در کپور نقره‌ای و کپور معمولی به ترتیب ۱۰ و ۱۷/۵ درصد بوده است. همچنین نتایج نشان داده که ۸/۵

مواد و روش‌ها

آماده سازی باکتری لیستریا مونوسیژنوز جهت تلقیح

سویه استاندارد و لیوفیلیزه باکتری *Listeria monocytogenes PTCC 1163* 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) انتقال و به مدت ۴۸ ساعت در ۳۰ درجه سلسیوس انکوبه شد. سپس محیط کشت حاوی باکتری سانتریفیوژ شده (۱۵ دقیقه در دور ۷۰۰۰ دور در رقیقه) و پس از ریختن مایع رویی، رسوب حاصله سه مرتبه با رینگر شستشو داده شده و هر بار عمل سانتریفیوژ تکرار گردید. تعداد باکتری‌ها در رسوب نهایی، با ریختن مقداری رینگر، با استفاده از روش کدورت سنجی در طول موج ۵۷۰ نانومتر تعیین گردید (Hegde et al., 2007; Martins and Pedro, 2011).

آماده سازی نمونه

ماهی کپور نقره‌ای با میانگین وزن ۷۰۰-۹۰۰ گرم از یکی از مزارع پرورش ماهی واقع در شهرستان ساری تهیه شده و در جعبه‌های یونولیتی به همراه یخ به آزمایشگاه پژوهشکده اکولوژی دریای خزر انتقال داده شدند. ماهی را ابتدا شسته و سپس فیله نموده و در پایان عمل فیله کردن نیز، مجدداً فیله‌ها مورد شستشو قرار گرفتند. به نسبت وزن فیله، مقدار تلقیح اولیه باکتری مشخص شده (\log ۴) و پس از اسپری نمودن سوسپانسیون باکتریایی (با استفاده از سرنگ‌های استریل) و جذب آن به سطح فیله، نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در محلول بنزوات سدیم ۲٪ قرار داده شده

و بعد از قرار گرفتن در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه، محلول نایسین A (ServaUSA) با غلظت ۰/۱۵ گرم بر کیلوگرم ماهی بر روی نمونه‌ها اسپری گردید. استاندارد نایسین و بنزوات سدیم در فرآورده‌های دریایی به ترتیب ۰/۲-۰/۱ گرم بر کیلوگرم و ۲/۵-۱/۵ درصد می‌باشد (Samelis et al., 2005). در نمونه‌های حاوی نایسین A، بنزوات سدیم به تنهایی، هر یک از مواد مذکور بطور جداگانه اضافه گردید. در نمونه شاهد فقط لیستریا اضافه گردید (فاقد نگهدارنده). تمامی نمونه‌ها با استفاده از دستگاه وکیوم (BOSSN84) در شرایط خلاء بسته‌بندی شده و در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند و در روزهای ۰، ۳، ۶، ۹ و ۱۲ روز از نظر پارامترهای کیفی (شیمیایی و میکروبی) مورد آزمایش قرار گرفتند (با در نظر گرفتن ۳ تکرار برای هر نمونه)، (Samelis et al., 2005; Dykes and Moorhead 2002; Solomakos et al., 2008). لازم به ذکر است برای نگهداری کوتاه مدت فرآورده‌های شیلاتی از دماهای پائین استفاده شده تا ماهی تازگی خود را حفظ نماید. در دمای انجماد، با طولانی شدن زمان نگهداری، واکنش‌های شیمیایی باعث فساد فرآورده شده و علاوه بر این ماهی تازگی خود را از دست می‌دهد.

آزمون‌های شیمیایی و میکروبی

عدد پراکسید به روش Egan و همکاران (۱۹۹۷)، مقدار کل بازهای نیتروژنی فرار (TVB-N) به روش AOAC محاسبه و تعیین گردید (AOAC, 2005). جهت شمارش کل باکتری‌ها (TVC) و باکتری‌های سرمادوست (PTC) در نمونه‌های تهیه شده، از

سلسیوس به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت استفاده شد (Hegde et al., 2007).

آنالیزهای آماری

برای مقایسه میانگین‌ها در زمان‌های مختلف برای یک تیمار از آزمون آنالیز واریانس تکراری و در ادامه از آزمون آماری تی وابسته و برای مقایسه میانگین‌ها بین تیمارهای مختلف در زمان‌های متفاوت از آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی دانکن (Duncan) در سطح $\alpha=0/05$ استفاده گردید (Egan et al., 1997).

یافته‌ها

آنالیزهای شیمیایی

عدد پراکسید

میزان پراکسید در تمامی تیمارها روند افزایشی داشته ولی میزان آن در نمونه‌های حاوی ترکیب نایسین و بنزوات سدیم از ۰/۴۳ به ۷/۶۷ mqO₂/g بوده در صورتیکه در نمونه‌های شاهد از ۰/۴۷ به ۱۲/۰۹ mqO₂/g رسید (جدول ۱).

محیط تریپتیک سویا آگار (Tryptic Soy Agar) به روش کشت سطحی، استفاده شد (AOAC, 2005; Gimenez et al., 2002). پلیت‌های کشت داده شده مربوط به کل باکتری‌ها بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و پلیت‌های مربوط به باکتری‌های سرما دوست بعد از ۱۰ روز انکوباسیون در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد شمارش شدند (AOAC, 2005; Gimenez et al., 2002; McMeekin et al., 1993). برای شمارش باکتری‌های اسید لاکتیک از محیط کشت DeManRogosa and Sharpe (MRS) agar استفاده شد. نمونه‌های اخیر در جار بی‌هوای حاوی گازپیک C قرار داده شده و در انکوباتور ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۳-۲ روز نگهداری شدند (Jones et al., 2008). به منظور شمارش لیستریا مونوسیتوژنز از محیط انتخابی CHROMagar™ Listeria (محیط کشت کروموزنیک، شرکت میکروبیولوژی کروم آگار فرانسه) و مکمل آن (CHROMagar Listeria supplement) با انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه

جدول ۱: نتایج عدد پراکسید در فیله ماهی فیتوفاگ نگهداری شده در دمای ۴ درجه سلسیوس در زمان‌های مختلف

زمان تیمار	پس از ۳ روز	پس از ۶ روز	پس از ۹ روز	پس از ۱۲ روز
لیستریا+بنزوات+ نایسین A	c ۰/۴۳۵ ± ۰/۰۰۵	b ۱/۸۵ ± ۰/۰۳	a ۵/۰۹ ± ۰/۰۲	a* ۷/۶۷ ± ۰/۰۳
بنزوات سدیم	c ۰/۴۱ ± ۰/۰۱	b ۱/۶۵ ± ۰/۰۱	a ۵/۲۱ ± ۰/۰۱	a ۷/۸۸ ± ۰/۲۱
نایسین A	c ۰/۴۷ ± ۰/۰۴	b ۲/۱۹ ± ۰/۰۵	a ۶/۱۸ ± ۰/۰۵	a ۸/۸۷ ± ۰/۰۳
شاهد دارای لیستریا (بدون ماده نگهدارنده)	d ۰/۴۷ ± ۰/۰۱	c ۳/۱۴ ± ۰/۰۹	b ۸/۲۸ ± ۰/۰۱	a ۱۲/۰۹ ± ۰/۵۹

*حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده تفاوت معنی‌دار ما بین داده‌ها می‌باشد.

مقدار کل بازهای نیتروژنی فرار (TVB-N)

شاهد از ۷/۴۴ به ۳۵/۶۰ mg N/100g افزایش داشته است (جدول ۲).

میزان TVB-N در تیمار ترکیب مواد نگه‌دارنده، از ۷/۲۳ به ۲۶/۷۶ افزایش داشته در صورتیکه در نمونه

جدول ۲: نتایج TVB-N در فیله ماهی فیتوفاگ نگه‌داری شده در دمای ۴ درجه سلسیوس در زمان‌های مختلف

زمان تیمار	پس از ۳ روز	پس از ۶ روز	پس از ۹ روز	پس از ۱۲ روز
لیستریا+بنزوات+ نایسین A	c۷/۲ ± ۰/۱۴	b۱۲/۸۱ ± ۰/۱۳	a۱۸/۳۷ ± ۰/۵	a۲۶/۷۶ ± ۰/۷
بنزوات سدیم	c۷/۳۴ ± ۰/۰۱	b۱۲/۱۵ ± ۰/۰۵	a۱۷/۴۸ ± ۰/۳۲	a۲۹/۰۳ ± ۰/۱۴
نایسین A	c۷/۶۲ ± ۰/۰۲	b۱۳/۸۴ ± ۰/۲۶	a۱۹/۴۲ ± ۰/۰۹	a۲۹/۳۴ ± ۰/۲۲
شاهد دارای لیستریا (بدون ماده نگه‌دارنده)	d۷/۴۴ ± ۰/۰۳	c۱۴/۷۱ ± ۰/۰۷	b۲۰/۶۲ ± ۰/۰۹	a۳۵/۶۰ ± ۱/۹۸

*حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده ارتباط معنی‌دارها بین داده‌ها می‌باشد.

آنالیزهای میکروبی**لیستریا مونوسیتوژنز**

رشد لیستریا نیز کاهشی بوده ولی با این وجود نتایج مربوط به تیمار دارای نایسین به تنهایی بهتر از بنزوات سدیم بوده است. نتایج آنالیز آماری تیمارهای مختلف حاکی از ارتباط معنی‌دار مابین تیمار مخلوط و بنزوات (P=۰/۰۰۷)، نایسین و نمونه کنترل (P=۰/۰۴۰) و بنزوات و نمونه کنترل (P=۰/۰۴۱) بوده است.

تعداد لیستریا در تیمارهای حاوی مواد نگه‌دارنده روند کاهشی داشته بطوریکه در نمونه دارای ترکیب نایسین A و بنزوات سدیم تعداد باکتری از ۴/۱۲ به ۳/۶۶ واحد لگاریتمی کاهش داشته است. این در حالیست که در نمونه‌های فاقد ماده نگه‌دارنده تعداد لیستریای تلقیح شده از ۴/۴۳ به ۵/۱۴ واحد لگاریتمی افزایش نشان داد (جدول ۳). در سایر تیمارها روند

جدول ۳: نتایج شمارش لیستریا (CFU/g) در فیله ماهی فیتوفاگ نگه‌داری شده در دمای ۴ درجه سلسیوس در زمان‌های مختلف

زمان تیمار	پس از ۳ روز	پس از ۶ روز	پس از ۹ روز	پس از ۱۲ روز
لیستریا+بنزوات+ نایسین A	a۴/۱۱ ± ۰/۰۵	a۴/۰۱ ± ۰/۰۲	b۳/۸۱ ± ۰/۱	c۳/۶۴ ± ۰/۱۵
بنزوات سدیم	a۴/۱۵ ± ۰/۰۵	a۴/۰۶ ± ۰/۰۲	b۳/۸۷ ± ۰/۰۷	b۳/۷۲ ± ۰/۱۲
نایسین A	a۴/۰۹ ± ۰/۰۲	a۴/۰۴ ± ۰/۰۲	b۳/۸۴ ± ۰/۰۷	c۳/۵۸ ± ۰/۰۳
شاهد دارای لیستریا (بدون ماده نگه‌دارنده)	c۴/۴۳ ± ۰/۰۶	b۴/۷۱ ± ۰/۰۷	a۴/۹۴ ± ۰/۳	a۵/۱۳ ± ۰/۱۱

*حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده تفاوت معنی‌دارها بین داده‌ها می‌باشد.

باکتری‌های سرماگرا

تعداد PTC ابتدایی در مطالعه حاضر در تیمارهای شاهد و تیمار دارای نایسین روند افزایشی چشمگیری داشته و در روز ۱۲ از دامنه استاندارد خارج شده است. در سایر تیمارها (ترکیب نایسین و بنزوات و بنزوات سدیم بصورت منفرد) روند رشد باکتری‌های سرماگرا کندتر بوده بطوریکه در روز ۱۲ نگه‌داری،

دارای دامنه قابل قبولی از باکتری‌ها بوده است (جدول ۴). نتایج آنالیز آماری تیمارهای مختلف حاکی از ارتباط معنی‌دار مابین تیمار مخلوط و کنترل ($P=0/037$) و نایسین و نمونه کنترل ($P=0/039$) بوده است.

جدول ۴: نتایج شمارش باکتری‌های سرماگرا در فیله ماهی فیتوفاگ نگه‌داری شده در دمای ۴ درجه سلسیوس در زمان‌های مختلف (log CFU/g)

زمان تیمار	پس از ۳ روز	پس از ۶ روز	پس از ۹ روز	پس از ۱۲ روز
لیستریا+بنزوات+ نایسین A	c۴/۱۵ ± ۰/۰۸	b۴/۳۴ ± ۰/۱۵	a۵/۶۵ ± ۰/۰۳	a۶/۷۱ ± ۰/۰۴
بنزوات سدیم	c۴/۲۵ ± ۰/۱۱	b۴/۶۳ ± ۰/۱۷	a۶/۱۶ ± ۰/۵۴	a۶/۸۷ ± ۰/۰۳
نایسین A	c۴/۰۸ ± ۰/۰۸	b۴/۷۵ ± ۰/۰۶	b۵/۹۵ ± ۰/۰۴	a۷/۴۸ ± ۰/۰۶
شاهد دارای لیستریا (بدون ماده نگه‌دارنده)	d۴/۳۳ ± ۰/۰۴	c۵/۷۷ ± ۰/۰۹	b۶/۹۳ ± ۰/۰۴	a۷/۹۳ ± ۰/۰۶

*حروف متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار ما بین داده‌ها می‌باشد.

باکتری‌های مزوفیل

تعداد باکتری‌های مزوفیل در مطالعه حاضر در تیمارهای شاهد و تیمار دارای نایسین (مشابه باکتری-های سرماگرا) روند افزایشی داشته و در روز ۱۲ از دامنه استاندارد خارج شده است. در سایر تیمارها (ترکیب نایسین و بنزوات و بنزوات سدیم بصورت

منفرد) روند رشد باکتری‌های مزوفیل کندتر بوده بطوریکه در روز ۱۲ نگه‌داری، دارای دامنه قابل قبولی از باکتری‌ها بوده است (جدول ۵). نتایج آنالیز آماری تیمارهای مختلف حاکی از ارتباط معنی‌دار مابین تیمار نایسین و مخلوط ($P=0/04$) بوده است.

جدول ۵: نتایج شمارش باکتری‌های مزوفیل در فیله ماهی فیتوفاگ نگه‌داری شده در دمای ۴ درجه سلسیوس در زمان‌های مختلف (log CFU/g)

زمان تیمار	پس از ۳ روز	پس از ۶ روز	پس از ۹ روز	پس از ۱۲ روز
لیستریا+بنزوات+ نایسین A	b۴/۳۸ ± ۰/۱۳	b۵/۰۸ ± ۰/۰۸	a۶/۴۵ ± ۰/۰۵	a۶/۷۹ ± ۰/۰۴
بنزوات سدیم	b۴/۴۶ ± ۰/۰۷	b۴/۵۱ ± ۰/۰۶۷	a۶/۲۷ ± ۰/۶۱	a۶/۹ ± ۰/۰۲
نایسین A	c۴/۵ ± ۰/۰۷	b۵/۵۵ ± ۰/۰۹	a۶/۹۱ ± ۰/۰۱	a۷/۵۶ ± ۰/۰۷
شاهد دارای لیستریا (بدون ماده نگه‌دارنده)	d۴/۴۸ ± ۰/۰۵	c۶/۸۸ ± ۰/۰۵	b۸/۰۷ ± ۰/۰۳	a۸/۹۲ ± ۰/۰۴

*حروف متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده ارتباط معنی‌دار ما بین داده‌ها می‌باشد.

باکتری‌های لاکتیک

بوده است (جدول ۶). نتایج آنالیز آماری تیمارهای مختلف حاکی از ارتباط معنی‌دار مابین تیمار مخلوط و نایسین ($P=0/013$)، مخلوط و نمونه کنترل ($P=0/02$) و بنزوات و نمونه کنترل ($P=0/013$) بوده است.

جمعیت باکتری‌های گروه اسید لاکتیک (LAB) در تمامی تیمارهای مورد استفاده در دامنه استاندارد قرار داشته است ($\log CFU/g$) ولی روند رشد باکتری‌های لاکتیک در تیمارهای شاهد و تیمار دارای بنزوات سدیم بصورت منفرد سریع‌تر از تیمارهای دارای مواد نگه‌دارنده ترکیبی و تیمار نایسین به تنهایی

جدول ۶: نتایج شمارش باکتری‌های لاکتیک (CFU/g) در فیله ماهی فیتوفاگ نگه‌داری شده در دمای ۴ درجه سلسیوس در زمان‌های مختلف (log CFU/g)

زمان تیمار	پس از ۳ روز	پس از ۶ روز	پس از ۹ روز	پس از ۱۲ روز
لیستریا+بنزوات+ نایسین A	$d2/71 \pm 0/15$	$c3/76 \pm 0/18$	$b3/85 \pm 0/04$	$a4/08 \pm 0/1$
بنزوات سدیم	$b2/83 \pm 0/09$	$a3/76 \pm 0/1$	$a4/01 \pm 0/06$	$a4/38 \pm 0/03$
نایسین A	$b2/84 \pm 0/05$	$a3/87 \pm 0/03$	$a4/03 \pm 0/03$	$a4/22 \pm 0/06$
شاهد دارای لیستریا (بدون ماده نگه‌دارنده)	$c2/9 \pm 0/05$	$b4/16 \pm 0/04$	$a4/34 \pm 0/04$	$a4/78 \pm 0/05$

*حروف متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار ما بین داده‌ها می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

کیلوگرم چربی) توسط (Huss 1995) می‌باشد. روند صعودی تغییرات عدد پراکسید در تیمار شاهد در زمان‌های مختلف معنی‌دار بوده ($P < 0/05$) ولی این روند در تیمارهای دارای مواد نگه‌دارنده، در برخی از موارد معنی‌دار بوده است. نتایج حاصل از این تحقیق با نتایج گزارش شده توسط Pacheco-Aguilar و همکاران (۲۰۰۰) بر روی ساردین و Ozogul و همکاران (۲۰۰۵) در مارماهی اروپایی مطابقت دارد. اکسیداسیون چربی توسط واکنش‌های متنوع غیر آنزیمی و آنزیمی (آنزیم‌های باکتریایی، بین سلولی، هضم کننده) کنترل می‌شود که این واکنش‌ها به طور اساسی به گونه ماهی و دمای نگه‌داری بستگی دارد (Huss, 1995).

جهت تعیین هیدروپراکسیدها به عنوان محصول اولیه اکسیداسیون چربی در ماهیان، از شاخص پراکسید استفاده می‌شود (Olafsdottir et al., 1997). تغییرات عدد پراکسید در تیمار شاهد نسبت به تیمارهای دیگر با سرعت بیشتر رو به افزایش بوده (از $0/47$ به $12/09 \text{mqO}_2/\text{g}$) که دلیل این امر می‌تواند ناشی از تأثیر نایسین و یا بنزوات سدیم بر کاهش جمعیت باکتری‌های لیپولیتیک (مثل برخی از گونه‌های سودوموناس و برخی از باکتری‌های گرم مثبت) و همچنین واکنش‌های آنزیمی باکتریایی مرتبط با اکسیداسیون چربی در ماهیان باشد (حد قابل قبول پیشنهادی (۲۰-۱۰ میلی اکی والان پراکسید بر

چربی غذا و یا به خاطر فعالیت آنزیم‌های موجود در گوشت است (Duffes et al., 1999).

Pawar و همکاران (۲۰۰۰) تحقیقی بر روی مهار باکتری لیستریا مونوسیژنوز در گوشت چرخ شده بوفالو در دمای یخچال انجام دادند که نتایج حاصل از این مطالعه بیان کرد که با افزایش غلظت نایسین از ۴۰۰ به ۸۰۰ IU/g فعالیت ضد لیستریایی آن در گوشت چرخ شده تقویت می‌شود.

Yin و همکاران، نایسین و پدیوسین را در سطوح مختلف بین ۳۷۵ IU/g تا ۷۵۰۰ IU/g در کوفته ماهی بکار بردند. که نتایج حاصل از تحقیق مذکور بیانگر محدود شدن فعالیت ضد لیستریایی این باکتریوسین‌ها در دو هفته اول مطالعه بود. علاوه بر این در مطالعه Yin و همکارانش نایسین در غلظت ۱۵۰۰ IU/g حتی در روزهای اول نیز قادر به کاهش لیستریا به زیر حد نسبتاً قابل قبول (۱۰۰) باکتری در هر گرم غذا برای افراد سالم) نبود.

روند رشد باکتری‌های سرماگرا در تیمار شاهد رشد مثبت و معنی‌دار داشته است ($P < 0/05$). روند تغییرات در تیمارهای حاوی نایسین و بنزوات (بطور ترکیبی و یا منفرد) در برخی از موارد معنی‌دار بوده است ($P < 0/05$). این امر احتمالاً بدلیل باکتریواستاتیک بودن نایسین باشد. بیشترین حد پیشنهاد شده برای PTC در ماهی $\log CFU/g$ است (ICMSF1986). بالا بودن مقادیر PTC در ابتدای دوره احتمالاً بدلیل گونه ماهی و همچنین دستکاری‌های صورت گرفته در حین تخلیه شکمی و فیله کردن می‌باشد. باکتری‌های گرم منفی سرمدوست،

در طی زمان نگه‌داری، مقدار TVB-N فقط در نمونه شاهد به بالاتر از حد قابل قبول پیشنهادی بر اساس گزارش اتحادیه اروپا (EU) و گزارش Gimenez و همکاران (۲۰۰۲) ($25\text{mgN}/100\text{g}$) رسید. روند صعودی تغییرات TVB-N در نمونه شاهد در زمان‌های مختلف معنی‌دار بوده ($P < 0/05$) ولی این روند در تیمارهای دارای مواد نگه‌دارنده، در برخی از موارد معنی‌دار بوده است. شاخص TVB-N دامنه وسیعی از ترکیبات فرار بازی همانند متیل آمین، دی متیل آمین، تری متیل آمین و آمونیاک را در بر می‌گیرد (Rodriquez et al., 2008). در مطالعه حاضر، میزان بازهای نیتروژنی با افزایش زمان ماندگاری افزایش داشته ولی با این وجود در تیمارهای حاوی مواد نگه‌دارنده این روند کندتر بوده و در تیمار شاهد میزان TVB-N افزایش معنی‌داری داشته است ($P < 0/05$).

تعداد لیستریا در تیمارهای دارای مواد نگه‌دارنده روند نزولی داشته ولی تعداد آن در تیمار شاهد افزایش داشته است. روند تغییرات لیستریا در تیمار شاهد و تیمارهای حاوی نایسین و بنزوات (بطور ترکیبی و یا منفرد) در برخی از موارد معنی‌دار بوده است ($P < 0/05$). نتایج حاصل از این تحقیق با سایر یافته‌های محققین که بیانگر کاسته شدن تعداد لیستریا در گوشت حاوی نایسین مطابقت دارد (Solomakos et al., 2008; Yin et al., 2007). کاهش نسبی فعالیت ضد لیستریایی نایسین در طول زمان احتمالاً به دلیل ترکیب نایسین با پروتئین و

است. روند تغییرات باکتری‌های لاکتیک در نمونه شاهد معنی‌دار بوده است ($P < 0/05$). ولی با این وجود روند رشد در تیمارهای حاوی نایسین و بنزوات (بطور ترکیبی و یا منفرد) در برخی از موارد دارای ارتباط معنی‌دار بوده است ($P < 0/05$). علت این امر تأثیر باکتروسیایدی نایسین بر علیه اکثر باکتری‌های گروه لاکتیک می‌باشد. همچنین روند کاهش باکتری‌های گروه لاکتیک را می‌توان به تأثیر مهارکننده بنزوات سدیم نسبت داد (Castellano et al., 2008).

نتیجه‌گیری کلی نشان می‌دهد که اگرچه مواد نگه‌دارنده مورد استفاده در این تحقیق به هنگام استفاده در محیط کشت آزمایشگاهی (مطالعات انجام شده)، جمعیت لیستریا را به صفر می‌رساند ولی به هنگام تلقیح باکتری در بافت ماهی، پارامترهای مختلف بر اثرات ضدمیکروبی مواد نگه‌دارنده تأثیرگذار می‌باشند. از مهمترین این پارامترها می‌توان به غلظت باکتروسیسین و بنزوات سدیم مورد استفاده، روش استفاده از باکتروسیسین، زمان غوطه‌وری، گونه ماهی، نوع محصول، درجه آلودگی میکروبی و وضعیت نگه‌داری اشاره نمود. استفاده از نایسین A ($0/15\%$) و بنزوات سدیم ($2\text{g}/100\text{ml}$) (بصورت ترکیبی) در نمونه‌های مورد آزمایش، رشد میکروبی و تغییرات شیمیایی را بطور معنی‌داری به تأخیر انداخته ولی با این وجود قادر به کاهش لیستریا به حد دامنه استاندارد و قابل قبول نبوده است.

میکروارگانیزم‌های اصلی مسئول فساد ماهیان تازه نگه‌داری شده به صورت سرد هستند (Gram and Huss, 1996; Gram et al., 1987). تعیین عمر ماندگاری تیمارهای مختلف توسط آنالیزهای باکتریایی بر مبنای زمان رسیدن تیمارها به حد مجاز قابل قبول $7 \log \text{CFU/g}$ برای باکتری‌های سرمادوست قرار دارد.

باکتری‌های مزوفیل

نتایج آنالیز باکتری‌های مزوفیل شبیه به باکتری‌های سرماگرا بوده است. روند تغییرات باکتری‌های مزوفیل در تیمار شاهد روندی صعودی بوده است ($P < 0/05$). روند تغییرات در تیمارهای حاوی نایسین و بنزوات (بطور ترکیبی و یا منفرد) در برخی از موارد معنی‌دار بوده است ($P < 0/05$). محققین مقدار TVC ابتدایی $2-6 \log \text{CFU/g}$ را برای گونه‌های مختلف آب شیرین (تیلاپیا، باس راه راه، قزل‌آلای رنگین‌کمان، سوف نقره‌ای) پیشنهاد داده‌اند (Gonzalez et al., 2001; Savvaidis et al., 2002). باکتری‌های مزوفیل (TVC) جزو آن دسته از باکتری‌هایی هستند که در دمای بالاتر قادر به رشد بوده و زمانی که دمای نگه‌داری دارای نوسان شود این گروه از باکتری‌ها شروع به تکثیر می‌نمایند (Inoue et al., 2000).

باکتری‌های لاکتیک

روند رشد باکتری‌های لاکتیک در نمونه شاهد روند صعودی داشته و در تیمارهای انتخاب روند نزولی داشته که بسته به نوع ماده نگه‌دارنده متفاوت بوده

منابع

- Akhondzadeh, A., ZahraieSalehi, T. and Misaghi, A. (2003). The survey of *Listeria monocytogenes* in fresh and smoked fish and ice used in fish markets for retaining the freshness of the fish in Tehran and Gilan. *Journal of Veterinary Research*, 57(4): 9-12.
- AOAC. (2005). *Official Method of Analysis*. 17th edition, Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists, pp. 716-725.
- Castellano, P., Belfiore, C. and Fadda, S. (2008). A review of *bacteriocinogenic lactic acid* bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. *Meat Science*, 79: 483-499.
- Chen, B.Y., Rajkumar, P., Tae-Jo, K., Juan, L.S. and Yean-Sung, J. (2010). Prevalence and contamination patterns of *Listeria monocytogenes* in catfish processing environment and fresh fillets. *Food Microbiology*, 27(5): 645-652.
- Dykes, G.A. and Moorhead, S.M. (2002). Combined antimicrobial effect of nisin and a listeriophage against *Listeria monocytogenes* in broth but not in buffer or on raw beef. *International Journal of Food Microbiology*, 73(1): 71-81.
- De Arauz, L.J., Jozala, A.F., Gava Mazzola, P. and Vessoni Penna, T.C. (2009). Nisin biotechnological production and application: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 20(3-4): 146-154.
- Duffes, F., Françoise, L., Patrick, B. and Xavier, D. (1999). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium spp.* strains in a simulated cold smoked fish system stored at 4°C. *International Journal of Food Microbiology*, 47(1-2): 33-42.
- Egan, H., Krik, R.S. and Sawyer, R. (1997). *Pearsons Chemical Analysis of Foods*. 9th edition, 609-634.
- Esmaeilzadeh, R. and Sahari, M. (2004). Compare of proximate factors of kutum (*Rutilusfrisiikutum*) and *Ctenopharyngodonidella* and production fo marinade from these fish. *Iranian Scientific Fisheries*, 4: 13-28 [In Farsi].
- Gimenez, B., Roncales, P. and Beltran, J.A. (2002). Modified atmospherepackaging of filleted rainbow trout. *Journal of the Sciece of Food and Agriculture*, 84,1154-1159.
- Geims, M. (2006). *Modern Food Microbiology*. 2th edition, translated by Mortazavi, E., Motamedzadegan, E. and Gohari, A. Ferdosi Publication, pp. 662.
- Gonzalez-Rodriguez, M.N., Sanz, J.J., Santos, J.A., Otero, A. and Garcia-Lopez, M.L. (2001). Bacteriological quality of aquaculture freshwater fish portions in prepackaged trays stored at 3°C. *Journal of Food Protection*, 64: 1399-1404.
- Gram, L., and Huss, H.H. (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. *InternationalJournal of Food Microbiology*, 33: 121-137.
- Gram, L., Trolle, G. and Huss, H.H. (1987). Detection of specific spoilage bacteria from fish stored at low (0 °C) and high (20 °C) temperatures. *International Journal of Food Microbiology*, 4: 65-72.
- Gudbjornsdottir, B., Suihko, M.L., Gustavsson, P., Thorkelsson, G., Salo, S., Sjoberg, A.M., Niclasen, O. and Bredholt, S. (2004). The incidence of *Listeria monocytogenes* in meat, poultry and seafood plants in the Nordic countries. *Food Microbiology*, 21(2): 217-225.
- Hegde, V., Leon-Velarde, C.G., Stam, C.M., Jaykus, L.A. and Odumeru, J.A. (2007). Evaluation of BBL CHROMagar *Listeria* agar for the isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from food and environmental samples. *Journalof Microbiological Methods*, 68(1): 82-87.
- Huss, H.H., Jorgensen, L.V. and Vogel, B.F. (2000). Control options for *Listeria monocytogenes* in seafoods. *International Journal of Food Microbiology*, 62(3): 267-274.

- Huss, H.H. (1995). Quality and quality changes in fresh fish. FAO Fisheries Technical Paper No. 348, Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations, Rome, Italy.
- Inoue, S., Nakama, A., Arai, Y., Kokubo, Y., Maruyama, T. and Saito, A. (2000). Prevalence and contamination levels of *Listeria monocytogenes* in retail foods in Japan. International Journal of Food Microbiology, 59(1-2): 73-77.
- ICMSF "International Commission on Microbiological Specification for Foods". (1986). Microorganisms in foods. 2nd edition, Sampling for microbiological analysis: principle and specific applications. 2nd edition, Buffalo, N.Y: University of Toronto Press, pp. 211-215.
- Jones, R., Hussein, H.M. and Zagorec, M. (2008). Isolation of lactic acid bacteria with inhibitory activity against pathogens and spoilage organisms associated with fresh meat. Food Microbiology, 25: 228-234.
- McMeekin, T.A., Olley, J.N., Roos, T. and Ratkowsky, D.A. (1993). Predictive microbiology. Theory and Application. Resaerch Studies Press Taunton, England, pp. 199-200.
- Martins, E.A. and Pedro, M.L.G. (2011). *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat, sliced, cooked ham and salami products, marketed in the city of Sao Paulo, Brazil: Occurrence, quantification, and serotyping. Food Control, 22(2): 297-302.
- Neetoo, H., Mu, Y. and Haiqiang, C. (2008). Potential antimicrobials to control *Listeria monocytogenes* in vacuum-packaged cold-smoked salmon pate and fillets. International Journal of Food Microbiology, 123(3): 220-227.
- Olafsdottir, G., Martinsdottir, E., Oehlenschlager, J., Dalgaard, P., Jensen, B. and Undeland, I. (1997). Methods to evaluate fish freshness in research and industry. Trends in Food Science and Technology, 8: 258-265.
- Ozogul, Y., Ozyurt, G., Ozogul, F., Kuley, E. and Polat, A. (2005). Freshness assessment of European eel (*Anguilla anguilla*) by sensory, chemical and microbiological methods. Food Chemistry, 92: 745-751.
- Pacheco-Aquilar, R., Lugo-Sanchez, M.E. and Robles-Burgueno, M.R. (2000). Post mortem biochemical and functional characteristic of Monterey sardine muscle stored at 0°C. Journal of Food Science, 65(1): 40-47.
- Pawar, D.D., Malik, S.V.S., Bhilegaonkar, K.N. and Barbuddhe, S.B. (2000). Effect of nisin and its combination with sodium chloride on the survival of *Listeria monocytogenes* added to raw buffalo meat mince. Meat Science, 56(3): 215-219.
- Perez-Alonso, F.C. and Auborg S.P. (2003). Lipid deterioration during cold storage of Atlantic pomfret (*Bramabrama*). Journal of Lipid Science and Technology, 105: 661-667.
- Rezaei, M., Sahari, M., Moeini, S. and Safari, M. (2003). Compare of fat quality in *Clupeonella engrauliformis* in two handling systems. Iranian Scientific Fisheries, 3: 97-107 [In Farsi].
- Rodriguez, A., Carriles, N., Cruz, J. and P.Auborg, S. (2008). Changes in the flesh of cooked farmed salmon (*oncorhynchuskisutch*) with previous storage in slurry ice (-1.5 °C). Food Science and Technology, 41: 1726-1732.
- Samelis, J., Bedie, G.K., Sofos, J.N., Belk, K.E., Scanga, J.A and Smith, G.C. (2005). Combinations of nisin with organic acids or salts to control *Listeria monocytogenes* on sliced pork bologna stored at 4°C in vacuum packages. Swiss Society of Food Science and Technology, 38: 21-28
- Savvaidis, I.N., Skandamis, P.N., Riganakos, K.A., Panagiotakis, N. and Kontominas, M.G. (2002). Control of natural microbial flora and *Listeria monocytogenes* in vacuum packaged trout at 4 and 10°C using irradiation. Journal of Food Protection, 65: 515-522.

- Solomakos, N., Govaris, A., Koidis, P. and Botsoglou, N. (2008). The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin, and their combination against *Listeria monocytogenes* in minced beef during refrigerated storage. *Food Microbiology*, 25(1): 120-127.
- Tome, E., Teixeira, P.A. and Gibbs, P. (2006). Anti-listerial inhibitory lactic acid bacteria isolated from commercial cold smoked salmon. *Food Microbiology*, 23: 399-405
- Vescovo, M., Scolari, G. and Zacconi, C. (2006). Inhibition of listeria innocua growth by antimicrobial-producing lactic acid culture in vacuum-packed cold smoked salmon. *Food Microbiology*, 23: 689-693.
- Wadud, S., Carlos, G.L., Nathan, L. and Joseph, A.O. (2010). Evaluation of immunomagnetic separation in combination with ALOA *Listeria* chromogenic agar for the isolation and identification of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *Journal of Microbiological Methods*, 81(2): 153-159.
- Yin, L.J., Wu, C.W. and Jiang, S.T. (2007). Biopreservative effect of pediocin ACCEL on refrigerated seafood. *Fisheries Science*, 73(4): 907-912.

Archive of SID