Arc JFM ID

اثر ضدمیکروبی عصاره هیدروالکلی ماکروجلبک کلپ چمنی (*Ulva intestinalis*) روی گوشت چرخ شده فیل‌ماهی پرورشی (*Huso huso*) نگهداری شده در یخچال

میترا دانشور قربانی[1]، سید پژمان حسینی شکرابی[2*]، سید ابراهیم حسینی[1]

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

۲. گروه شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران.

***نویسنده مسئول:** *hosseini@srbiau.ac.ir*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۴/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۷/۲۸

چکیده

تحقیق حاضر به منظور بررسی امکان استفاده از عصاره ماکروجلبک *Ulva intestinalis* به عنوان یک آنتی‌باکتریال طبیعی در گوشت چرخ شده فیل‌ماهی انجام شد. بدین منظور در ابتدا حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) عصاره هیدروالکلی این جلبک در شرایط آزمایشگاهی و به روش میکروچاهک علیه پاتوژن لیستریا مونوسیتوژنز تعیین گردید. سپس، غلظت‌های شاهد (بدون هیچ افزودنی)، BHT (آنتی‌اکسیدان سنتتیک)، MIC، دو و سه برابر غلظت MIC تهیه، با گوشت چرخ کرده ماهی مخلوط و در یخچال نگهداری شدند. در روزهای ۰، ۴، ۸ و ۱۲ روز نمونه‌برداری انجام و خصوصیات میکروبی شامل باکتری‌های سرماگرا، مزوفیل، سودوموناس و انتروباکتریاسه اندازه‌گیری گردید. مطابق نتایج، MIC برابر ۱۲/۵ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر بدست آمد. نتایج مؤید این بود که تیمارهای واجد عصاره جلبک در مقایسه با تیمارهای شاهد و BHT از بارمیکروبی کمتری برخودار بودند ($p<۰/۰۱$). همچنین در بین غلظت‌های مختلف عصاره، تیمار سه برابر غلظت MIC، بیشترین اثر ضدباکتریایی را نشان داد به‌طوری که در پایان روز دوازدهم مقدار باکتری‌های هوازی مزوفیل (۶/۲۷ log cfu/g)، سرماگرا (۹/۰۸ log cfu/g)، سودوموناس (۶/۶ log cfu/g) و انتروباکتریاسه (۶/۲۱ log cfu/g) در این تیمار کمتر از شاهد و سایر تیمارها بود. به طور کلی نتایج بیانگر این بود که ماکروجلبک کلپ چمنی، گونه مناسبی برای استفاده به منزله یک نگهدارنده طبیعی بوده و گوشت چرخ شده ماهی واجد سه برابر غلظت MIC در مقایسه با سایر تیمارها از فساد باکتریایی کمتری در طول دوره نگهداری در یخچال برخودار بود.

واژگان کلیدی: ماکروجلبک، کلپ‌چمنی، گوشت چرخ شده، MIC، فیل ماهی، ماندگاری.

مقدمه

فرآورده‌های غذاهایی شیلاتی منبع خوبی از اسیدهای آمینه ضروری، اسیدهای چرب امگا-۳، ویتامین‌ها و مواد معدنی هستند و برای سلامتی مصرف‌کننده‌گان از اهمیت قابل توجهی برخودار هستند. با این وجود محققان بخش سلامت مواد غذایی و نهادهای ناظر، همواره نگران شیوع مسمومیت‌های غذایی مرتبط با برخی از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا منجمله باکتری‌ها یبوده و آلودگی فرآوردهای غذایی با باکتری‌های مزوفیل، سرماگرا، سودوموناس‌ها، انتروباکترها و باکتری‌های اسیدلاکتیک از دلایل اصلی فساد در فرآورده‌های گوشتی تلقی می‌شوند (Elbashir et al., 2018).

قابلیت فسادپذیری بالای ماهیان به دلیل ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی خاص آنها سبب شده تا حفظ کیفیت محصولات شیلاتی، یکی از مسائل مهم و مورد توجه صنعت و مصرف‌کنندگان باشد (افسرسنگری و همکاران، ۱۳۹۶). در این رابطه توجه به زمان ماندگاری محصول مهم بوده و بدین منظور از نگهدارنده‌های شیمیایی و طبیعی متفاوتی برای افزایش زمان ماندگاری محصولات شیلاتی و حفظ کیفیت ماهی استفاده شده است (Hasson and Coban, 2017). با توجه به اثرات سوء نگهدارنده‌های شیمیایی و افزایش سطح آگاهی مردم، استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی از جمله عصاره جلبک‌های طبیعی بیش از پیش مورد

www.SID.ir

Archive of SID

توجه محققین قرار گرفته است (جوادیان و همکاران، ۱۳۹۴).

ماکروجلبک‌های دریایی منبع غنی از آنتی‌اکسیدان‌های مختلف مثل خانواده پلی‌فنول‌ها بوده که می‌تواند علاوه بر اثرات ضدمیکروبی، نقش مهمی در پیشگیری از اکسیداسیون چربی‌ها نیز در مواد غذایی داشته باشد (طاهری و همکاران، ۱۳۹۶). یکی از انواع ماکروجلبک‌ها، کلپ چمنی با نام علمی *Ulva intestinalis* متعلق به خانواده Ulvacea است که از لحاظ ریخت‌شناسی واجد رشته‌های برگی شکل سبز رنگ، ریسه‌ای، لبه‌های چین‌خورده و منبع غنی از کارتنوئیدها هستند (حیدری و همکاران، ۱۳۹۲)، در چین و برخی کشورهای آسیایی در صنعت دارو و غذا به مقدار زیاد از این جلبک به دلیل داشتن ترکیبات زیست فعال استفاده می‌شود (Akkoz et al., 2010; Li et al., 2018). خاصیت آنتی‌باکتریال جلبک‌های دریایی به ترکیباتی از قبیل مشتقات کلرین، آکریلن اسید، ترکیبات آلفاتیک و فنولی نسبت داده شده است (Ibrahim and Lim, 2015). تحقیقات متعددی خاصیت ضدباکتریایی گونه‌های مختلف ماکروجلبک‌های دریایی را علیه باکتری‌های پاتوژن مثل *لیستریا مونوسیتوژنز* (خضری‌احمدآباد و همکاران، ۱۳۹۵)، *اشرشیا کلی* (Abd El Mageid et al., 2009)، *استرپتوکوکوس پیوژنز*، *کاندیدا آلبیکنز* (Sahnouni et al., 2016)، *استرپتوکوکوس لاکتیس*، *پروتئوس ولگاریس* و *باسیلوس مگاتریوم* (Kumar et al., 2009) گزارش کرده‌اند. در رابطه با خاصیت ضدباکتریایی ماکروجلبک کلپ چمنی، Ibrahim و Lim (۲۰۱۵) خاصیت آنتی‌باکتریال این جلبک را بر علیه باکتری‌های *باسیلوس سرئوس*، *باسیلوس سابتیلیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* گزارش کردند. پاتوژن *Listeria monocytogenes* یک باکتری گرم مثبت، غیر اسپورزا و هوازی تا بی‌هوازی اختیاری است که از طیف وسیعی از مواد غذایی خام و فرآوری شده مثل شیر و فرآورده های لبنی، سالاد، سبزیجات و فرآورده‌های شیلاتی آلوده جدا شده و باعث بیماری لیستریوزیس در انسان می‌شود (Weagant et al., 1988). اگرچه تعداد مسمومیت‌های غذایی ناشی از آلودگی به این عامل بیماری‌زا نسبت به مسمومیت با سالمونلا، کلستریدیوم، کمپلوباکترها و استافیلوکوکوس اورئوس کمتر است، اما از نظر نقش تهدیدکنندگی سلامت مصرف کننده، لیستریوزیس جزء خطرناک‌ترین نوع مسمومیت‌های غذایی بوده و حتی می‌تواند در مواردی منجر به مرگ و میر ۲۰-۳۰ درصد از افراد مبتلا نیز بشود (Di Pinto et al., 2010).

فیل‌ماهی یا بلوگا (*Huso huso*)، از خانواده تاس‌ماهیان و یکی از گونه‌های بسیار با ارزش به لحاظ تولید گوشت و بالاخص خاویار ممتاز است. به دلایل مختلف مانند فعالیت‌های انسانی، عوامل زیستی و غیره، ذخایر طبیعی این ماهیان در معرض خطر انقراض قرار گرفته و تلاش‌ها جهت تولید آنها در شرایط پرورش محیا است (احمدی و همکاران، ۱۳۹۶). در این بین محصولات شیلاتی، گوشت چرخ شده به عنوان یک پایه جهت تولید محصولات متنوعی از قبیل برگر، ناگت، کباب لقمه، سوریمی، سوسیس، کالباس و غیره از اهمیت خاصی برخودار است (جعفرپور و نیک‌بخش، ۱۳۹۴). لذا این تحقیق با هدف استفاده از عصاره ماکروجلبک سبز کلپ چمنی برای پیشگیری و یا کاهش نرخ فساد میکروبی در گوشت چرخ کرده فیل‌ماهی برای مدت ۱۲ روز در شرایط نگهداری در یخچال انجام شد.

روش کار

تهیه مواد اولیه

ماکرو جلبک کلپ چمنی از منطقه ساحلی استان بوشهر جمع آوری شدند. شست‌شوی نمونه‌ها نخست با آب دریا و سپس با آب شیرین به مدت ۲ ساعت صورت گرفت تا گل و لای و اپی‌فیت‌های متصل به آن‌ها زدوده شود. پس از آن نمونه‌ها در سایه و در دمای ۱۶-۱۴

www.SID.ir

Arc JFM ID

درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ روز خشک شدند تا رطوبت آن‌ها به زیر ۱۰ درصد برسد. مقدار ۱۲۵۰ گرم جلبک خشک شده با خردکن به صورت پودر درآمده و در کیسه‌های غیرقابل نفوذ نگهداری شدند و به آزمایشگاه میکروبیولوژی مواد غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات منتقل شدند. مقدار ۴ کیلوگرم فیل ماهی پرورشی از مزرعه پرورش ماهی شرکت آبزی اکسیر کوثر (احمدآباد مستوفی، تهران) بصورت تازه تهیه شد. ماهیان پس از شست و شو با آب شیرین، درون جعبه‌های یونیلیت حاوی یخ (نسبت ۳ به ۱ وزنی/وزنی یخ: ماهی) قرار گرفتند و سریعاً به آزمایشگاه منتقل شدند.

تهیه عصاره

عصاره هیدروالکلی جلبک به روش خیساندن پودر خشک شده جلبک در الکل ۷۰ درصد به مدت ۴۸ ساعت در یخچال، فیلتراسیون و حلال‌پرانی تهیه شد (Salehi et al., 2005). سپس مقدار ۲۵۰ گرم عصاره تهیه شده به درون ظروف درب دار منتقل و تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شدند.

تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی (MIC)

تعیین MIC عصاره جلبک به روش میکرودایلوشن با استفاده از چاهک‌های ۹۶ تایی ته گرد و با حجم ۳۰۰ میکرولیتر انجام شد. غلظت‌های متوالی از عصاره (۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) در محیط آبگوشت قلب و مغز (BHI) حاوی ۵ درصد دی‌متیل سولفواکسید (DMSO) تهیه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره به هر چاهک انتقال داده و در نهایت ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی *L. monocytogenes* (غلظت نهایی باکتری 5×10^5 ml/cfu) تهیه شد. سپس جذب نوری با استفاده از الایزا در طول موج ۶۳۰ نانومتر خوانده شد. پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند و بعد از اتمام گرمخانه‌گذاری کدورت یا عدم کدروت در چاهک‌ها به صورت چشمی مشاهده و جذب نوری توسط الایزا خوانده شد. سویه استاندارد و لیوفیلیزه باکتری PTCC L. ۱۲۹۵ *monocytogenes* از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. آمپول لیوفیلیزه ابتدا در شرایط استریل باز شد و به محیط کشت BHI انتقال یافت و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد (حیدری و همکاران، ۱۳۹۲).

آماده‌سازی نمونه‌ها

در آزمایشگاه ماهیان با رعایت شرایط بهداشتی و زنجیره سرد بصورت دستی تخلیه شکم، سرزنی و فیله شدند و توسط آب مقطر سرد شست و شو شدند. در ادامه فیله ماهیان توسط چرخ گوشت (پارس‌خزر، ایران) با مش ۳ میلی‌متر یک بار چرخ شدند. نمونه‌های چرخ شده در ظرف‌های استریل جدا ریخته و عصاره جلبک در غلظت‌های مختلف شامل گوشت چرخ شده واجد مقدار غلظت بدست آمده MIC، گوشت چرخ شده واجد دو برابر مقدار غلظت بدست آمده MIC (2MIC)، گوشت چرخ شده واجد سه برابر مقدار غلظت بدست آمده MIC (3MIC) به آن افزوده و کاملاً هموژن شدند. همچنین یک تیمار شاهد فاقد هرگونه مواد افزودنی افزودنی (Control) و یک تیمار حاوی ۰/۲ گرم/کیلوگرم آنتی‌اکسیدان سنتتیک بوتیل هیدروکسی تولوئن (BHT) در نظر گرفته شد. عصاره‌ها و BHT در میزان معین آب مقطر (نسبت حجمی آب به گوشت چرخ شده برابر ۱ به ۱۰ حجمی/وزنی) حل شدند و تیمار فاقد افزودنی نیز به میزان مشابه سایر تیمارها آب مقطر افزوده شد (Maqsood and Benjakul, 2010). سپس نمونه‌ها در ظروف استریل پلی‌اتیلنی استریل درب دار قرار گرفته و برای انجام آزمایشات زما در د ماندگاری در دمای یخچالی (۱±۴ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند.

تمامی حلال‌ها و مواد شیمیایی مصرفی مورد استفاده در این تحقیق، از شرکت مرک آلمان تهیه گردیدند.

www.SID.ir

Archive of SID

آنالیز میکروبی

برای آزمایش‌های میکروبی، ۱۰ گرم از نمونه‌های مختلف گوشت چرخ شده ماهی در شرایط استریل با ۹۰ میلی‌لیتر محلول نمک طعام ۰/۸۵ درصد مخلوط و هموژن شد و متعاقب آن رقت‌های مورد نیاز (در پنج رقت 10^{-1} تا 10^{-5}) تهیه گردید. سپس ۱ میلی‌لیتر از هر رقت برای کشت باکتری‌ها به روش پورپلیت مورد استفاده قرار گرفت (Sallam, 2007).

جهت تشخیص تغییرات بار باکتریایی کل گوشت آزمون‌های شمارش کل باکتری‌ها (TVC) و شمارش کل باکتری‌های هوازی سرماگرا در محیط کشت پلیت کانت آگار پس از انکوباسیون به ترتیب در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ روز و ۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ روز انجام شد (Sallam, 2007).

باکتری‌های سودوموناس در محیط کشت اختصاصی باکتری‌های سودوموناس برپایه آگار (CFC Agar, Merck) در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت براساس روش APHA شمارش گردیدند (McFeeters et al., 2001).

تعداد کل انتروباکترها در محیط کشت هوازی وی آر بی دی-آگار (VRBD-Agar) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت شمارش شدند (Ojagh et al., 2010).

بطورکلی، ظروف محیط کشت با محتویات ۳۰ تا ۳۰۰ عدد تک کلنی شمارش شدند و داده‌های حاصل از شمارش باکتری‌ها به صورت لگاریتم‌های تعداد واحدهای ایجادکننده کلنی در گرم ماده غذایی (CFU/g) گزارش گردید. (McFeeters et al., 2001).

تجزیه و تحلیل آماری

تمامی‌اندازه‌گیری‌ها در سه تکرار انجام شد و داده‌ها به صورت میانگین انحراف معیار گزارش گردید. در ابتدا نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون‌های آماری کمولوگراف– اسمینورف و همچنین همگن بودن واریانس‌ها توسط آزمون لون بررسی شد. جهت بررسی اثر همزمان دو عامل زمان و غلظت‌های مختلف عصاره ماکروجلبک سبز کلپ چمنی روی شاخص‌های میکروبی در تیمارهای مورد نظر و بررسی وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار آماری از آنالیز واریانس دوطرفه استفاده شد. برای مقایسه میانگین‌ها در زمان‌های مشابه، آزمون آماری دانکن به‌کار رفت. لازم به ذکر است که در تمامی مراحل تجزیه و تحلیل، خطای مجاز برای رد فرضیه صفر میزان ۹۹ درصد در نظر گرفته شد.

نتایج

تعیین MIC

حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره ماکرو جلبک کلپ چمنی، ۱۲/۵ میکروگرم در هر میلی‌لیتر علیه باکتری پاتوژن لیستریا مونوسایتوژنز محاسبه شد.

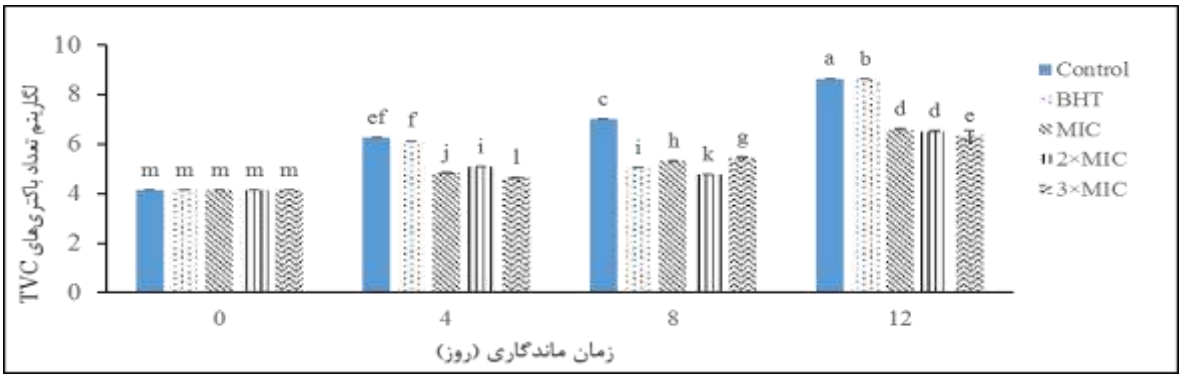
خصوصیات ضدمیکروبی

باکتری‌های مزوفیل (TVC): نتایج بیانگر روند افزایشی تعداد کل باکتری‌ها در طول دوره نگهداری بود. همچنین نتایج مؤید این بود که بین تیمارهای واجد عصاره جلبک در مقایسه با تیمارهای فاقد عصاره، اختلاف معناداری وجود داشته و کمترین میزان باکتری‌های مزوفیل مربوط به تیمارهای واجد عصاره جلبک بود ($P<0/01$). نتایج حاصل از بررسی اثر متقابل زمان و غلظت بیانگر این بود که در روز چهارم و پایانی آزمایش، تیمار واجد سه برابر غلظت MIC (۶/۲۷ ± ۰/۱۹ Log CFU/g) کمترین مقدار TVC را به خود اختصاص داده بود (نمودار ۱).

باکتری‌های سرمادوست (PTC): نتایج حاصل شمارش باکتری‌های سرمادوست در تمامی تیمارها، در روز دوازدهم بیشترین و در روز صفر کمترین بود و بین زمان‌های مختلف آزمایش در همه تیمارهای از نظر آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید ($p<0/01$).

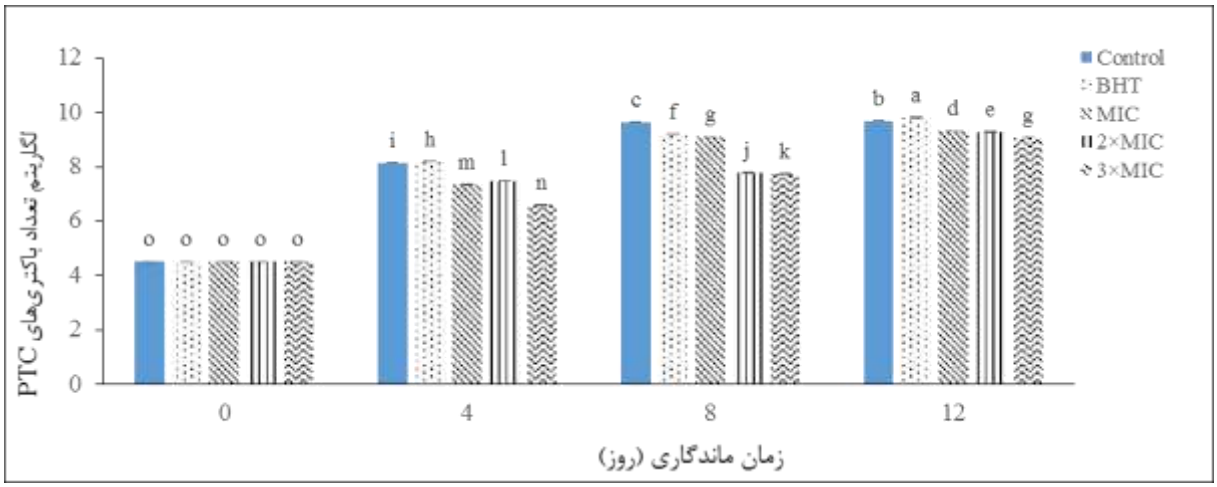
www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۱- نمودار تغییرات جمعیت (لگاریتم تعداد کلنی تک در گرم) باکتری‌های مزوفیل در گوشت چرخ شده فیل‌ماهی واجد مقادیر مختلف عصاره ماکروجلبک کلپ چمنی طی ۱۲ روز نگهداری در شرایط یخچال. آنتنک‌ها نشان دهنده انحراف معیار و حروف غیرمشابه نشان‌دهنده وجود اختلاف آماری است (n=3 ،P<۰/۰۱).

مقایسه بین تیمارهای دارای عصاره جلبک در مقایسه با تیمارهای شاهد، حاکی از اختلاف معنادار آماری بین آن‌ها بود (p<۰/۰۱). در بازه پایانی آزمایش، تیمار BHT (۹/۸ ± ۰/۰۱۷ Log CFU/g) و تیمار واجد سه برابر غلظت MIC (۹/۰۸ ± ۰/۰۳ Log CFU/g) به ترتیب بیشترین و کمترین مقدار باکتری‌های سرمادوست را به خود اختصاص داده بودند (نمودار ۲) (P<۰/۰۱).

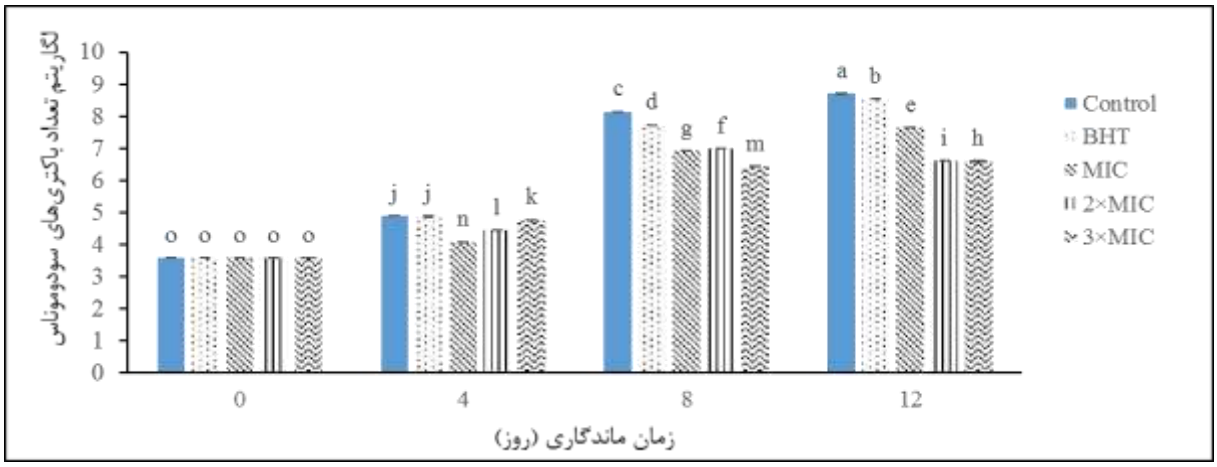


نمودار ۲- نمودار تغییرات جمعیت (لگاریتم تعداد کلنی تک در گرم) باکتری‌های سرماگرا در گوشت چرخ شده فیل‌ماهی واجد مقادیر مختلف عصاره ماکروجلبک کلپ چمنی طی ۱۲ روز نگهداری در شرایط یخچال. آنتنک‌ها نشان دهنده انحراف معیار و حروف غیرمشابه وجود اختلاف آماری است (n=3 ،P<۰/۰۱).

باکتری‌های *سودوموناس*: روند تغییرات باکتری‌ها در گروه شاهد از روز آغازین آزمایش تا روز دوازدهم نگهداری در یخچال همزمان با افزایش مدت ماندگاری افزایش یافت به گونه‌ای که در روز دوازدهم، کمترین و بیشترین مقدار باکتری‌های *سودوموناس*، به‌ترتیب مربوط به تیمارهای شاهد (۸/۷ ± ۰/۰۰۲ Log cfu/g) و سه برابر غلظت MIC (۶/۶ ± ۰/۰۰۵ Log cfu/g) بود (نمودار ۳). بین مقادیر باکتری سودوموناس در نمونه‌های واجد عصاره جلبک با نمونه‌های شاهد، در طول دوره نگهداری اختلاف معناداری وجود داشت و مقدار این باکتری در نمونه‌های تیمار شده با عصاره به‌طور معنی‌داری کمتر از نمونه‌های شاهد بود (p<۰/۰۱).

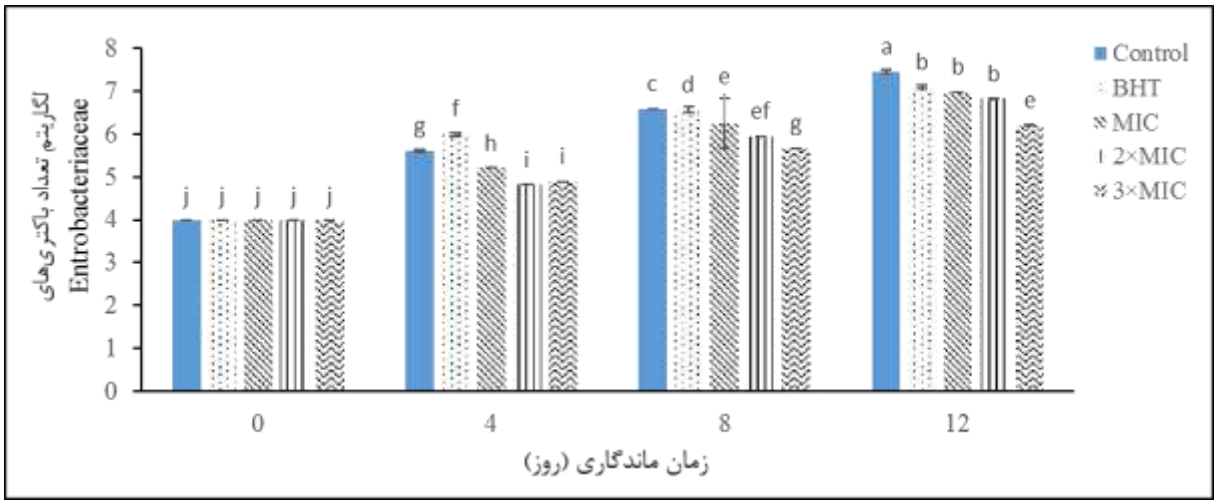
www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۳- نمودار تغییرات جمعیت (لگاریتم تعداد کلنی تک در گرم) باکتری‌های مزوفیل در گوشت چرخ شده فیل‌ماهی واجد مقادیر مختلف عصاره ماکروجلبک کلپ چمنی طی ۱۲ روز نگهداری در شرایط یخچال. آنتنک‌ها نشان دهنده انحراف معیار و حروف غیرمشابه نشان‌دهنده وجود اختلاف آماری است (P<۰/۰۱، n= 3).

باکتری‌های انتروباکتریاسه: نتایج مربوط به اندازه‌گیری باکتری‌های انتروباکتریاسه در نمودار ۴ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که جمعیت باکتری‌های مذکور در تمامی نمونه‌ها در طول ۱۲ روز نگهداری افزایش یافته بود. نتایج مقایسه میانگین‌های باکتریاسه در نمونه‌های شاهد و طی روزهای مختلف نگهداری، بیانگر اختلاف معنادار آماری بین تیمارهای واجد عصاره در مقایسه با تیمارهای شاهد بود (P<۰/۰۱) به‌طوری که در پایان روز دوازدهم، کمترین و بیشترین مقدار باکتری‌های انتروباکتریاسه به‌ترتیب مربوط به تیمارهای سه برابر غلظت MIC (۶/۲۱ ± ۰/۰۰۴ Log cfu/g) و شاهد (۷/۴۶ ± ۰/۰۰۳ Log cfu/g) بود.



نمودار ۴- نمودار تغییرات جمعیت (لگاریتم تعداد کلنی تک در گرم) انتروباکتریاسه در گوشت چرخ شده فیل‌ماهی واجد مقادیر مختلف عصاره ماکروجلبک کلپ چمنی طی ۱۲ روز نگهداری در شرایط یخچال. آنتنک‌ها نشان دهنده انحراف معیار و حروف غیرمشابه نشان‌دهنده وجود اختلاف آماری است (P<۰/۰۱، n= 3).

www.SID.ir

ArcJFM ID

بحث

بار کل باکتریایی ایمن برای گونه‌های مختلف ماهیان شیرین در محدوده ۲-۷ log cfu/g پیشنهاد شده است (Gimenez et al., 2002). متفاوت بودن بار میکروبی کل ماهیان آب شیرین به عواملی مثل شرایط بهداشتی، کیفیت آب و دمای محیط پرورش بستگی داشته که می‌تواند وضعیت میکروبی محصول خام را نیز تحت تأثیر قرار دهد (حمزه و رضائی، ۱۳۹۰).

حد مجاز باکتری‌های مزوفیل در فرآورده‌های شیلاتی، حداکثر ۷ log cfu/g در نظر گرفته شده است (Jarvis, 2000). مطابق نتایج بدست آمده، در روز دوازدهم آزمایش، فقط تیمار 3MIC قابل مصرف بود؛ نتایج حاصل از یافته‌های ما با نتایج حاصل از یافته‌های امیرشریفی و همکاران (۱۳۹۵) مبنی بر خاصیت آنتی‌باکتریال عصاره ماکروجلبک سارگاسوم (*Sargassum glaucescen*) بر علیه باکتری‌های مزوفیل و همچنین یافته‌های حیدری و همکاران (۱۳۹۲) مبنی بر خاصیت ضدباکتریایی عصاره هیدروالکلی ماکروجلبک *U. intestinalis* بر علیه باکتری‌های *لیستریا مونوسیتوژنز* و *اشرشیاکلای* همسویی داشت. یکی از دلایل اصلی کمتر بودن باکتری‌های مزوفیل در تیمارهای حاوی عصاره جلبک سبز کلپ چمنی در مقایسه با تیمارهای شاهد، مربوط به خاصیت ضدباکتریایی ترکیبات فنولی موجود در عصاره این ماکروجلبک می‌باشد (Soltani and Khoshrooei, 2014). اثر اصلی فعالیت ضدباکتریایی ترکیبات فنلی موجود در عصاره جلبک به این صورت می‌باشد که این ترکیبات اولاً در غشاء دو لایه فسفولیپیدی سلول اختلال ایجاد کرده و موجب افزایش نفوذپذیری و از بین رفتن برخی از اجزاء سلولی می‌شوند؛ دوماً باعث تخریب آنزیم‌های دخیل در تولید انرژی و سنتز ترکیبات ساختاری می‌شوند و ثالثاً این ترکیبات، موجب تخریب مواد ژنتیکی سلول می‌گردند (Kim et al., 1995). این بخش از یافته‌های ما مبنی بر تأثیر بیشتر غلظت عصاره سه برابر MIC در مهار رشد باکتری‌ها، با نتایج Ibrahim و Lim (۲۰۱۵) مبنی بر این که غلظت‌های بیشتر عصاره متانولی کلپ چمنی تأثیر بیشتری روی رشد باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی دارد، مطابقت داشت که این تأثیر احتمالاً به دلیل دخالت ترکیبات زیست فعال موجود در عصاره این جلبک می‌باشد.

باکتری‌های سرمادوست گرم منفی، میکروارگانیسم‌های مسؤل فساد محصولات شیلاتی نگه‌داری شده به صورت سرد هستند و این باکتری‌ها ترکیبات متابولیکی مختلفی مانند کتون آلدهید (حاصل از تجزیه لیپید)، سولفیدهای فرار و آمین‌های بیوژنیک تولید می‌کنند (Safari and Yosefian, 2006). نتایج حاصل از این تحقیق، مؤید افزایش معنی‌دار باکتری‌های سرماگرا در تیمارهای شاهد در مقایسه با تیمارهای واجد عصاره ماکروجلبک کلپ چمنی بود. بطور مشابه؛ میرصادقی و همکارن (۱۳۹۴) کاهش جمعیت باکتری‌های سرماگرا در تیمارهای واجد عصاره سیر و لیمو در مقایسه با شاهد در فیله ماهی قزل‌آلای رنگین کمان طی نگهداری در یخچال گزارش کردند. همچنین نتایج حاصل از یافته‌های ما با نتایج اعتمادی و همکاران (۱۳۸۷) مبنی بر کاهش باکتری‌های سرماگرا در تیمارهای حاوی عصاره رزماری در فیله ماهی قزل‌آلای رنگین کمان نگهداری شده در یخچال همسویی داشت. به‌طور کلی، الگوی تغییرات PTC مشابه با تغییرات TVC بوده و در برخی از موارد PTC مقادیر بالاتری از TVC داشت که در این پژوهش این روند به طور معنی-داری مشهود بود. یکی از دلایل اصلی افزایش بارمیکروبی PTC، را می‌توان به شرایط نگهداری فرآورده در دمای یخچال دانست، زیرا نگهداری در دمای یخچال، رشد باکتری‌های مزوفیل، که جمعیت زیادی از میکروفلور داخلی بدن ماهی را تشکیل می‌دهند را کاهش می‌دهد و به باکتری‌های سرماگرا این اجازه را می‌دهد که در طول دوره نگهداری در یخچال رشد کرده و میکروارگانیسم‌های غالب باشند، همچنین عوامل دیگری از قبیل درجه آلودگی میکروبی و وضعیت نگهداری، از جمله عوامل

www.SID.ir

Archive of SID

تأثیرگذار روی افزایش باکتری‌های PTC در طی دوره نگهداری می‌باشند (Shirazinejad et al., 2010). یکی از دلایل عدم خاصیت ضدباکتریایی و ممانعت‌کنندگی جلبک سبز روی باکتری‌های سرماگرا احتمالاً به حساسیت این باکتری‌ها مربوط است. چرا که حساسیت باکتری‌های گرم مثبت به عصاره جلبک سبز بیشتر از باکتری‌های گرم منفی بود و این اختلاف و تفاوت به دلیل ساختار متفاوت دیواره سلولی و ترکیب آن است (Ibrahim and Lim, 2015).

در باکتری‌های گرم منفی اعضاء خارجی به عنوان یک سد در مقابل تعداد زیادی اجسام خارجی مانند آنتی‌بیوتیک عمل می‌کنند. باکتری‌های گرم منفی به دلیل داشتن لایه لیپوپلی ساکاریدی غشاء خارجی و همچنین داشتن کانال‌های درگیر در حمل و نقل مواد، ذاتاً نسبت به مواد سمی و رنگ‌های آبدوست و آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت بیشتری دارند (حیدری و همکاران، ۱۳۹۴). همچنین نتایج یافته‌های ما با نتایج خضری احمدآباد و همکاران (۱۳۹۵) مبنی بر خاصیت ضدباکتریایی جلبک سبز کلپ چمنی مطابقت داشت. این محققان گزارش کردند عصاره‌های (هگزانی، متانولی و آبی) استخراج شده از این ماکروجلبک تأثیرات ضدباکتریایی معنی‌داری را نسبت به میکروارگانیسم‌های گرم مثبت (شامل: *Lactococcus lactis*، *Listeria monocytogenes* و *Bacillus subtilis*) و گرم منفی (*Escherichia coli*) دارند.

باکتری‌های سودوموناس جزء میکروارگانیسم‌های سرمادوست عمده عامل فساد مواد غذایی محسوب شده و می‌توانند در دمای یخچال رشد کنند (Soltani and Khoshrooei, 2014). در این تحقیق شمارش باکتری‌های سودوموناس در طول دوازده روز نگهداری، تنها تیمارهای 2MIC و 3MIC حاوی عصاره جلبک سبز کلپ چمنی در حد مجاز بودند (کمتر از ۷ Log cfu/g). به طور کلی آهنگ تغییرات بار باکتریایی این گروه از باکتری‌ها از روز آغازین آزمایش تا روز ۱۲ نگهداری افزایش یافته و به حداکثر مقدار خود در تیمار شاهد رسید. نتایج حاصل از یافته‌های این مطالعه با نتایج رضائیان و همکاران (۱۳۹۵) مبنی بر کاهش باکتری‌های سودوموناس در تیمارهای واجد عصاره خیار دریایی روی فیله ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در شرایط یخچال در مقایسه با تیمارهای بدون عصاره و همچنین یافته‌های Soltani و Khoshrooei (۲۰۱۴) در رابطه با خاصیت آنتی‌باکتریال عصاره ماکروجلبک‌های *Enteromorpha intestinalis* و *Cladophora glomerata* بر علیه باکتری‌های سودوموناس، همسویی داشت.

بسیاری از گونه‌های انتروباکتریاسه در فساد گوشت و فرآورده‌های خام ماهی نگهداری شده در شرایط سرد مشارکت دارند و شامل خانواده باکتری‌های گرم منفی از جمله بسیاری از باکتری‌های بیماری‌زا مثل سالمونلا، اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس است. فساد انتروباکتریاسه ماهی در نتیجه آلودگی آب، آلودگی احتمالی در مراحل مختلفزنجیره غذایی ماهی از مرحله صید تا فرآوری و یا تأخیر در سردسازی پس از صید نیز رخ می‌دهد (Das et al., 2013). در این پژوهش در طی دوازده روز نگهداری گوشت چرخ شده ماهی در یخچال، تیمارهای شاهد از حد مجاز ذکر شده عبور کردند اما میانگین تعداد باکتری‌های انتروباکتریاسه در تیمارهای واجد عصاره جلبک سبز کلپ چمنی کمتر از حد مجاز بود که بیانگر خاصیت ضد باکتریایی قوی عصاره جلبک سبز کلپ چمنی بوده که با یافته‌های خضری احمدآباد و همکاران (۱۳۹۵) مبنی بر خاصیت آنتی‌باکتریال عصاره‌های جلبک سبز کلپ چمنی، مطابقت داشت.

نتایج این تحقیق نشان داد که عصاره ماکروجلبک کلپ چمنی باعث ایجاد خواص ضدمیکروبی در گوشت چرخ شده فیل‌ماهی در مقایسه با تیمار شاهد می‌شود و در بین تیمارهای واجد عصاره جلبک، تیمار واجد سه برابر حداقل غلظت مهارکنندگی (۳۶/۵ میلی‌گرم عصاره جلبک در کیلوگرم گوشت چرخ شده ماهی)، بهترین تیمار بود و ماندگاری گوشت چرخ شده فیل‌ماهی را در شرایط یخچال به‌طور قابل توجهی نسبت به سایر تیمارها افزایش داده بود

www.SID.ir

Arc JFM ID

و توانست دوره نگهداری فیل‌ماهی را تا ۱۲ روز افزایش دهد. البته تحقیقات تکمیلی در خصوص اثرات آنتی اکسیدانی عصاره این جلبک در فرآورده‌های غذایی بویژه ماهیان پیشنهاد می‌شود.

منابع

۱. احمدی، علی.، عالیشاهی، علیرضا.، اجاق، سید مهدی و میرصادقی، حجت. ۱۳۹۶. بررسی جایگزینی استات سدیم به وسیله کیتوزان‌های مختلف در فیله فیل‌ماهی (*Huso huso*) طی نگهداری در یخچال. بهره‌برداری و پرورش آبزیان، دوره ۶، شماره ۴، صفحات ۱۲-۱.

۲. افسرسنگری، مریم.، عبدالله‌پور، حمید.، کوچکیان صبور، انوشه و نامی خسمخی، الناز. ۱۳۹۶. تغییرات شیمیایی و زمان ماندگاری سوریمی ماهی کاراس (*Carassius carassius gibelio*) طی نگهداری تحت دمای فوق سرما و انجماد. بهداشت مواد غذایی، دوره ۷، شماره ۲، صفحات ۳۰-۱۵.

۳. امیرشریفی، مریم.، جمیلی، شهلا.، لاریجانی، کامبیز.، ماشینچیان مرادی، علی و امینی، کیومرث. ۱۳۹۵. بررسی فعالیت ضدباکتریایی و ضدقارچی عصاره جلبک دریایی (*Sargassum glaucescen*). مجله علمی شیلات ایران، دوره ۲۵، شماره ۳، صفحات ۱۲۱-۱۱۳.

۴. اعتمادی، حلیمه.، رضایی، مسعود و عابدیان کناری، عبدالمحمد. ۱۳۸۷. پتانسیل آنتی باکتریایی و آنتی اکسیدانی عصاره رزماری *(Rosmarinus officinalis)* در افزایش عمرماندگاری ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله علوم و صنایع غذایی، دوره ۵، شماره ۴ صفحات ۷۷-۶۷.

۵. جعفری، شیما.، مباشر، محمد علی.، نجفی پور، سهراب.، قاسمی، یونس.، مباشر، نازنین.، نقی زاده، محمد مهدی و ابراهیمی، محمد علی. ۱۳۹۴. بررسی اثر بازدارندگی عصاره ریز جلبک کلرلا ولگاریس بر رشد، تکثیر و تشکیل بیوفیلم توسط *استرپتوکوکوس موتانس* و ارزیابی سمیت آن. مجله دانشگاه علوم پزشکی فسا، دوره ۵، شماره ۳، صفحات ۳۹۶-۳۸۷.

۶. جوادیان، سیدروح اله.، غریبی، فاطمه و بهرام، سمیه. ۱۳۹۴. اثرات ضداکسیداسیونی و ضدباکتریایی پوشش آلژینات سدیم با عصاره جلبک (*Entromorpha sp.*) بر افزایش زمان ماندگاری فیله ماهی کپور معمولی نگهداری شده در یخچال. آبزیان و سیلات، دوره ۶، شماره ۲۱، صفحات ۲۳-۳۵.

۷. حسینی، سیدولی.، طاهری، علی و اوجی فرد، امین. ۱۳۹۲. بررسی تأثیر پرتودهی با اشعه گاما بر بار میکروبی فیله ماهی کفال طلایی (*Liza aurata*) طی دوره نگهداری در یخچال. نشریه شیلات، مجله منابع طبیعی ایران، دوره ۶۶، شماره ۱، صفحات ۳۹-۲۷.

۸. حمزه، علی و رضایی، مسعود. ۱۳۹۰. اثرات ضداکسیداسیونی و ضدباکتریایی پوشش آلژینات سدیم به همراه اسانس آویشن بر فیل ماهی قزل آلای رنگین کمان نگهداری شده در یخچال. مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران، دوره ۶، شماره ۳، صفحات ۱۱-۲۰.

۹. حیدری، محسن.، ذوالقرنین، حسین.، سخایی، نسرین.، میرزایی، علی و موحدی نیا، عبدالعلی. ۱۳۹۴. مقایسه قدرت ضد رادیکالی و ضدباکتریایی ماکروجلبک‌ها در سواحل شمالی خلیج فارس. مجله علمی شیلات ایران، دوره ۲۴، شماره ۲، صفحات ۶۴-۵۳.

۱۰. حیدریان، محمدتقی.، جبلی، جوان، اشکان و جوکار، مریم. ۱۳۹۴. بررسی تأثیر آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی عصاره رزماری بر کیفیت و زمان ماندگاری گوشت مرغ نگهداری شده در دمای یخچال. نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی، دوره ۴، شماره ۲، صفحات ۱۴۲-۱۳۱.

۱۱. احمدآباد، محمد. خضری.، رضائی، مسعود. و ذوالفقاری، مهدی. ۱۳۹۵. مطالعه امکان استفاده از عصاره جلبک *Enteromorpha intestinalis* به منظور کنترل برخی از پاتوژن‌های غذایی. فصلنامه علوم و صنایع غذایی، دوره ۵۸، شماره ۱۳، صفحات ۹۱-۸۱.

۱۲. رضائیان، حنانه.، حسینی، سیدولی.، مطلبی، عباسعلی. و میرواقفی، علیرضا. ۱۳۹۳. اثر عصاره خیار دریایی

www.SID.ir

Archive of SID

(*Holothuria leucospilota*) بر کیفیت شیمیایی فیله‌ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) طی نگهداری در یخچال. بهره‌برداری و پرورش آبزیان، دوره ۳، شماره ۳، صفحات ۳۷-۲۷.

۱۳. طاهری، علی.، غفاری، مصطفی.، باقرپور، نرگس سادات و عطاران فریمان، گیلان. ۱۳۹۶. بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های جلبک دریایی *Cystoseira trinodis* از سواحل چابهار. مجله علمی و پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، دوره ۲۵، شماره ۸، صفحات ۶۶۹-۶۵۸.

۱۴. میرصادقی، حجت.، عالی‌شاهی، علیرضا.، شعبان‌پور، بهاره و اجاق، سید مهدی. ۱۳۹۴. اثر عصاره سیر و لیمو بر کیفیت و ماندگاری فیله‌ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) بسته‌بندی شده در خلاء در طی نگهداری در یخچال. مجله بهره‌برداری و پرورش آبزیان، جلد ۴، شماره ۲، صفحات ۹۲-۷۹.

15. Abd El Mageid, M.M., Salama, N.A., Saleh, M.A.M., and Abo Taleb, H.M. 2009. Antioxidant and antimicrobial characteristics of red and brown algae extracts. 4th Conference on Recent Technologies in Agriculture. Cairo, Egypt.

16. Akköz, C., Arslan, D., Ünver, A., Özcan, M.M., and Yilmaz, B. 2011. Chemical composition, total phenolic and mineral contents of *Enteromorpha intestinalis* and *Cladophora glomerata* Seaweeds. J Food Biochem. 35: 513-523.

17. Das, S., Borah, M., and Ahmed, S. 2013. Antibacterial activity of the ethanolic extract of leaves of *Citrus maxima* on *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. Asian J Pharm Clin Res. 6: 136-139.

18. Di Pinto, A., Novello, L., Montemurro, F., Bonerba, E., and Tantillo, G. 2010. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods from supermarkets in Southern Italy. New Microbiologica. 33: 249-252.

19. Elbashir, S., Parveen, S., Schwarz, J., Rippen, T., Jahncke, M., and DePaola, A. 2018. Seafood pathogens and information on antimicrobial resistance: A review. Food Microbiol. 70: 85-93.

20. Hassoun, A., and Çoban, Ö.E. 2017. Essential oils for antimicrobial and antioxidant applications in fish and other seafood products. Trends Food Sci Technol. 68: 26-36.

21. Ibrahim, D., and Lim, S.H. 2015. *In vitro* antimicrobial activities of methanolic extract from marine alga *Enteromorpha intestinalis*. Asian Pac J Trop Biomed. 5: 785-788.

22. Jarvis, B. 2000. Sampling for microbiological analysis. Academic Press, UK.

23. Gimenez, B., Roncales, P., and Beltran, J.A. 2002. Modified atmosphere packaging of filleted rainbow trout. J Sci Food Agric. 84: 1154–1159.

24. Kim, J., Marshall, M.R., and Wei, C.I. 1995. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. J Agric Food Chem. 43: 2839-2845.

25. Kumar, K. S., Ganesan, K., and Rao, P.S. 2008. Antioxidant potential of solvent extracts of *Kappaphycus alvarezii* an edible seaweed. Food Chem. 107: 289-295.

26. Li, X., Xiong, F., Liu, Y., Liu, F., Hao, Z., and Chen, H. 2018. Total fractionation and characterization of the water-soluble polysaccharides isolated from *Enteromorpha intestinalis*. Int J Biol Macromol. 111: 319-325.

27. McFeeters, R.F., Hankin, L., Lacy, G.H., Downes, F.P., and Ito, K. 2001. Pectinolytic and pectolytic microorganisms. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. American Public Health Association, Washington, USA.

28. Ojagh, S.M., Rezaei, M., Razavi, S.H., and Hosseini, S.M.H. 2010. Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. Food Chem. 120: 193-198.

29. Safari, R., and Yosefian, M. 2006. Changes in TVN (Total Volatile Nitrogen) and psycrotrophic bacteria in Persian sturgeon Caviar (*Acipenser persicus*) during processing and cold storage. J Appl Ichthyol. 22: 416-418.

www.SID.ir

33. Shirazinejad, A.R., Noryati, I., Rosma, A., and Darah, I. 2010. Inhibitory effect of lactic acid and nisin on bacterial spoilage of chilled shrimp. World Acad Sci Eng Technol. 41: 242-246.
34. Soltani, S., and Khoshrooei, R. 2014. Evaluation of antibacterial activities in *Cladophora glomerata* and *Enteromorpha intestinalis*. Int Mol Clin Microbiol. 1: 371-376.
35. Weagant, S.D., Sado, P.N., Colburn, K.G., Torkelson, J.D., Stanley, F.A., Krane, M.H., Sheilds, S.C., and Thayer, C.F. 1988. The incidence of *Listeria* species in frozen seafood products. J Food Prot. 51: 655-657.
30. Sahnouni, F., Benattouche, Z., Matallah-Boutiba, A., Benchohra, M., Moumen Chentouf, W., Bouhadi, D., and Boutiba, Z. 2016. Antimicrobial activity of two marine algae *Ulva rigida* and *Ulva intestinalis* collected from Arzew gulf (Western Algeria). J Appl Environ Biol Sci. 6: 242-248.
31. Sallam, K.I. 2007. Antimicrobial and antioxidant effects of sodium acetate, sodium lactate, and sodium citrate in refrigerated sliced salmon. Food Control. 18: 566-575.
32. Sallam, K.I., Ishioroshi, M., and Samejima, K. 2004. Antioxidant and antimicrobial effects of garlic in chicken sausage. LWT-Food Sci Technol. 37: 849-855.

www.SID.ir

Archive of SID

Antimicrobial activity of grass kelp macroalgae (*Ulva intestinalis*) hydro-alcoholic extract on cultured Beluga (*Huso huso*) minced fish during refrigerated storage

Daneshvar Ghorbani M[1], Hosseini Shekarabi SP [2*], Hosseini SE[1]

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

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

***Corresponding author:** *hosseini@srbiau.ac.ir*

Received: 19 July 2018 Accepted: 20 October 2018

Abstract

This study was carried out to investigate the possibility of using *Ulva intestinalis* macroalgae extract as a natural antibacterial agent in Beluga minced meat. For this purpose, the minimum of inhibitory concentration (MIC) of the hydroalcoholic extract of the algae was determined *in vitro* by micro-well dilution method against *Listeria monocytogenes* pathogen. Then, the concentrations of controls (without any additive), BHT (as a synthetic antioxidant), MIC, 2 fold of the MIC (2MIC) and 3 fold of the MIC (3MIC) concentrations, were mixed with minced meat and refrigerated. Microbial properties of the samples including psychrophilic bacteria count, mesophilic bacteria count, Pseudomonas count and Enterobacteriaceae count were measured at 0, 4, 8, and 12 days. According to the results, the MIC was 12.5 mg/mL. The result of this study showed that the samples with the algae extract had less microbial load in comparison with control and BHT groups ($p < 0.01$). Also, 3MIC showed the most antibacterial effect among other algae extract treatments by the lowest amount of mesophilic bacteria (6.27 Log cfu/g), cold (09.08 Log cfu/g) Pseudomonas (6.6 Log cfu/g) and Enterobacteriaceae (6.21 Log cfu/g) population size at the end of storage period. The results indicated that grass kelp macroalgae is a suitable species for use as a natural preservative, and the minced fish with three fold of the MIC concentration had less bacterial spoilage during the storage period in a refrigerator.

Keywords: Macroalgae, Grass kelp, Minced meat, MIC, Beluga fish, Shelf-life.

www.SID.ir