Archive of SID

بازدارندگی رشد لیستریا منوسیتوژنز با باکتری های اسید لاکتیک در قطعات سترون گوشت ماهی سفید دودی(*Rurtillus frisii kutum*)

مهدی قنبری[1]، مسعود رضائی[2]*، مهدی سلطانی[3]، غلامرضا شاه حسینی[4]

1-دانش آموخته مقطع کارشناسی ارشد شیلات دانشگاه تربیت مدرس،مازندران، نور
2-استادیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، مازندران، نور،
3- استاد گروه بیماری های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران،
4- استادیار پژوهشکده کشاورزی، پزشکی و صنعتی- پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای- سازمان انرژی اتمی ایران

چکیده

هدف از این **مطالعه توصیفی** تعیین ظرفیت بازدارندگی دو سویه از لاکوباسیل های جدا شده از محتویات روده تاس ماهی ایرانی بر علیه لیستریا منوسیتوژنز در فرآورده دودی ماهی سفید بود. سویه های باکتریایی مورد آزمایش در این مطالعه شامل لاکتوباسیلوس کازئی جدایه AP 8 و لاکتوباسیلوس پلانتارم جدایه AP 12 بودند. نتایج حاصل از بررسی اثر بازدارندگی سویه های باکتریایی بر لیستریا منوسیتوژنز با روش دیسک نشان داد که هر دو سویه لاکتوباسیل توانایی بازدارندگی از رشد لیستریا منوسیتوژنز را در محیط آزمایشگاه دارند. در بین سویه های باکتریایی بیشترین میزان بازدارندگی متعلق به سویه، لاکتوباسیلوس کازئی بود. ظرفیت بازدارندگی و پتانسیل فساد سویه های باکتریایی در محیط سترون گوشت با تلقیح سویه های باکتریایی به میزان 10^4 باکتری در گرم (CFU/g) و لیستریا منوسیتوژنز به میزان 10^2 باکتری در گرم در طول 40 روز نگه داری در دماهای 4 و 20 درجه سانتیگراد بررسی شد. در طول دوره نگه داری، سویه های تلقیح شده به گوشت اثرات منفی را بر کیفیت ماهی سفید دودی از خود نشان ندادند (عدم تولید TVBN، عدم اسیدی کردن محیط گوشت). در بین سویه های تلقیح شده به گوشت، سویه لاکتوباسیلوس کازئی از رشد نسبتا بالاتری و همچنین ظرفیت بازدارندگی بیشتری برخوردار بود به طوری که میزان لیستریا منوسیتوژنز را در پایان40 روز نگه داری در دماهای 4 و 20 درجه سانتیگراد در میزان کمتر از 50 باکتری در گرم نگه داشت. به عنوان نتیجه گیری کلی می توان بیان کرد که نگهدارندگی زیستی ماهی سفید دودی با کشت های باکتریایی نظیر لاکتوباسیلوس کازئی یک روش قابل اطمینان برای جلوگیری از رشد لیستریا منوسیتوژنز در این فرآورده با حداقل تاثیر بر خصوصیات کیفی محصول در پایان دوره نگه داری می باشد.

کلید واژگان: ماهی سفید دودی، لیستریا منوسیتوژنز، نگهدارنده زیستی، لاکتوباسیلوس کازئی، لاکتوباسیلوس پلانتارم

1- مقدمه

از قدیمی ترین روش های نگه داری مواد غذایی می توان به دودی کردن آنها اشاره کرد [1]. ماهی دودی به دلیل عدم وجود مواد اضافه شونده ای مانند تثبیت کننده ها و آنتی اکسیدانها محصولی با خطرات بالای آلودگی میکربی می باشد [2]. علاوه بر آن، تقاضای مشتری برای محصولاتی با مزه بهتر، که با کاهش مدت زمان نمک سود کردن، خشک کردن و دودی کردن مواد خام اولیه همراه است موجب افزایش خطرات میکروبی مانند آلودگی آن با میکروارگانیزم های بیماریزا، خصوصاً لیستریا منوسیتوژنز در محصول نهایی می شود [3].

* مسئول مکاتبات: rezai_ma@modares.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

شیوع بالای لیستریا منوسیتوژنز در ماهیان دودی در دنیا [4، 5، 6، 7] و همچنین در ایران گزارش شده است [8، 9]. این پاتوژن سبب ایجاد بیماری لیستریوزیس (یک بیماری حاد با مرگ و میر بالا،40-30 درصد) می شود که پیامدهای ناشی از این بیماری شامل سقط جنین در زنان حامله، بروز ورم و آماس معده و روده در افراد خردسال و مسن به جهت ضعیف بودن سیستم ایمنی می باشد[8]. در واقع مراحل اصلی دودی کردن ماهی (شامل نمک سود کردن و دوددهی) فاقد کارایی لازم برای حذف این میکروارگانیزم از محصول نهایی می باشند [10]. علاوه بر آن امکان رشد این باکتری در محصول نگه داری شده در یخچال در دمای 4 درجه سانتیگراد نیز وجود دارد[7]. متاسفانه بسیاری از روشهای مورد استفاده برای جلوگیری از رشد لیستریا منوسیتوژنز در محصولاتی نظیر ماهی دودی، هم چون استفاده از روشهایی نظیر اشعه گاما ، ترکیبات ضد میکروبی، لاکتات سدیم، کلرید سدیم، نیتریت سدیم و لاکتوپرکسیداز تاثیرات منفی بر روی کیفیت[طعم ،مزه ، بو] فرآورده نهایی می گذارند. از اینرو اتخاذ شیوه مناسب جهت کنترل رشد این باکتری در ماهی دودی در طول دوره نگه داری ضروری می باشد [11].

با توجه به تحقیقات انجام شده در کشور سطح آلودگی به لیستریا منوسیتوژنز در فرآورده ماهی دودی بالاتر از حد مجاز تعریف شده در کشورهای اروپایی (باکتری در گرم 10^2>) می باشد که می تواند سبب بروز مسمومیت باکتریایی ناشی از میکروارگانیزم هایی نظیرلیستریا منوسیتوژنز در افراد مصرف کننده شود [9]. این باکتری منجر به بیماری لیستریوزیز در انسان بویژه در افرادی که ایمنی ضعیفی دارند نظیر دیابتی ها، افراد سالخورده، بیماران سرطانی، زنان حامله و جنین آنها می شود که از عوارض مهم آن می توان به ورم مغز و ورم روده اشاره کرد. در این راستا با توجه به استفاده رایج از ماهی سفید دودی در کشور و بویژه در استانهای شمالی، مطالعه روشهایی جهت کاهش و یا حذف پاتوژن لیستریا منوسیتوژنز در این محصول ضروری به نظر می رسد.

امروزه با پیشرفت علم بیوتکنولوژی در زمینه های مختلف توجه محققین به استفاده از متابولیت هایی که به طور طبیعی توسط باکتری های انتخاب شده تولید و از رشد میکروب های ناخواسته جلوگیری می کنند متمرکز گردیده است. این بازدارنده های طبیعی می توانند جایگزین مواد نگهدارنده شیمیایی که اکثرا عوارض جانبی به دنبال دارد نظیر بنزوات ها، نیتریت و نیترات گردند[7]. در حال حاضر استفاده از باکتریهای اسید لاکتیک، با عنوان نگهدارنده های طبیعی از اهمیت تجاری خاصی بر خوردار است. اثر نگهدارندگی این باکتری ها در طول فرایند ذخیره سازی مواد غذایی، اختصاصاً ناشی از ایجاد شرایط اسیدی در نتیجه تبدیل کربوهیدرات ها به اسید های آلی و در نهایت کاهش pH مواد غذایی است که منجر به افزایش زمان نگهداری و ایمنی فراورده نهایی می گردد[4]. توانایی باکتریهای اسید لاکتیک در جلوگیری از رشد میکروبهای ناخواسته ممکن است ناشی از عوامل متعدد از قبیل تولید اسیدهای آلی شامل اسیدهای لاکتیک، یا اسیدهای چرب آزاد، پراکسید هیدروژن و بالاخص سنتز آنتی بیوتیکها و باکتریوسین ها باشد که همه این مواد به عنوان آنتی بیوسیس[1] تعریف می شوند[12].

فصلی بودن صید ماهی سفید دریای خزر و تقاضای مصرف سبب می‌گردد تا این ماهی به شیوه های مختلف فرآوری گردد، با توجه به ارزش غذایی این ماهی و اهمیت آن در تغذیه، دستیابی به شرایطی که حداقل تغییرات ممکن را در حالت نگهداری به حالت دودی ایجاد نماید مهم می‌باشد. هدف از این مطالعه توصیفی، بررسی فعالیت آنتاگونیستی دو سویه از باکتری های جدا شده از محتویات روده تاس ماهی ایرانی با نامهای لاکتوباسیلوس کازئی جدایه AP 8 و لاکتوباسیلوس پلانتارم جدایه AP 12 در محیط آزمایشگاه و محیط سترون گوشت ماهی سفید دودی بر علیه لیستریا منوسیتوژنز می باشد.

2- مواد و روش کار

2-1 سویه های باکتریایی و شرایط کشت

سویه های باکتریایی مورد استفاده در این تحقیق عبارت بودند از لاکتوباسیلوس کازئی جدایه AP 8 و لاکتوباسیلوس پلانتارم جدایه AP 12. دو سویه لاکتوباسیل از فلور روده تاس ماهی ایرانی در مطالعات قبلی جداسازی شده بودند[13].کشت لیوفیلیزه لیستریا منوسیتوژنز با شماره ATCC[2] 11915 از مرکز پژوهش

1. Antibiosis
2. American Type Cultur Collection

www.SID.ir

Archive of SID

های علمی و صنعتی تهیه شد. کلیه سویه ها تا زمان استفاده در محیط کشت خود و در ترکیب با 20% گلیسرول در دمای 20- درجه سانتیگراد قرار گرفتند.

2-2 فعالیت آنتی میکربی سویه های باکتریایی در محیط آزمایشگاه

بررسی فعالیت بازدارندگی سویه های باکتریایی و همچنین تولید مواد بازدارنده توسط آنها بر علیه لیستریا منوسیتوژنز به روش دیسک[1] مورد بررسی قرار گرفت[14]. سویه های باکتریایی در محیط کشت MRS (Merck، آلمان) تحت تکان دهی در دمای 30 درجه سانتیگراد قرار داده شدند. میزان رشد با استفاده از اندازه گیری شاخص دانسیته نوری (دستگاه اسپکتروفتومتر ساخت شرکت ملتون روی[2] آمریکا) تحت طول موج 600 نانومتر[10] در فاصله های زمانی معین اندازه گیری می شد. پس از رسیدن باکتری ها به مرحله توقف رشد (Stationary phase) که برای هر یک از سویه ها متفاوت بود، مایع رویی حاصل از کشت باکتری ها بوسیله سانتریفیوژ (سرعت rpm 8000) به مدت 5 دقیقه در دمای 4 درجه سانتیگراد جداسازی شد. برای تولید مایع عاری از سلول، مایع رویی به دست آمده از فیلتر های 0/22 میکرون (Sigma، انگلیس) عبور داده و تا زمان استفاده در دمای 4 درجه سانتیگراد در ظروف استریل نگه داری شد. در مرحله بعد برای سنجش فعالیت آنتاگونیستی باکتری ها، میزان 20 میکرولیتر از مایع عاری از سلول به دست آمده بر روی دیسک های 6 میلی متری(Sigma، انگلیس) آغشته و در پلت های حاوی آگار BHI[3] تلقیح شده با لیستریا منوسیتوژنز قرار داده شدند. سپس پلیت ها در دمای 30 درجه سانتیگراد به مدت 24 ساعت نگه داری و پس از آن به جهت تشکیل هاله بازدارنده به عنوان معیار فعالیت آنتاگونیستی مورد بررسی قرار گرفتند.

3-2 فعالیت آنتی میکربی سویه های باکتریایی در گوشت سترون ماهی سفید دودی

2-3- 1 تهیه ماهیان سفید دودی

ماهیان سفید به طور تازه از صید پره در سواحل جنوبی دریای خزر صید تهیه شدند. پس از شستشو این ماهیان تخلیه شکمی شده و جهت انجام عملیات دودی کردن به دودخانه منتقل شدند. عملیات دودی کردن بر طبق روش رایج در استانهای شمالی کشور مورد استفاده قرار گرفت. ماهیان به مدت 3 روز در وانهای حاوی نمک اشباع (100-90%) قرار گرفتند. پس از این مدت، نمونه ها به مدت 5-4 روز دود دهی شدند. درجه حرارت ایجاد شده در اتاق دود حدود 40-30 درجه سانتیگراد بود. پس از اتمام عملیات دود دهی نمونه ها بلافاصله به آزمایشگاه شیلات دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس منتقل شدند. در ادامه ماهیان دودی، چرخ شده و به بسته های40 گرمی تقسیم شدند و سپس در دمای 80- درجه سانتیگراد قرار گرفتند. در این مطالعه به جهت بررسی دقیق اثرات متقابل کشت های باکتریایی و بیماریزای لیستریا منوسیتوژنز از سیستم سترون کردن قطعات گوشت استفاده شد.

2-3-2- سترون کردن قطعات گوشت

جهت سترون کردن نمونه ها، قطعات گوشت جهت پرتو دهی به مرکز تحقیقات پزشکی، کشاورزی و هسته ای کرج منتقل شدند و تحت پرتودهی با پرتو دهنده کبالت 60 (Gamma cell, Px-30, dose rate = 0.55 Gy/s,) قرار گرفتند. میزان اشعه اعمال شده بر روی نمونه های گوشت 1/5 کیلوگری بود[10]. پس از پرتودهی قطعات گوشت سترون به آزمایشگاه تخصصی آبزیان در دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران منتقل شدند و تا زمان تلقیح سویه های باکتریایی در دمای 20-درجه سانتیگراد قرار داده شدند.

2-3-3 آماده سازی باکتری ها و تلقیح به نمونه های گوشت

سویه های باکتریایی به مدت 24 ساعت در دمای 30 درجه سانتیگراد در محیط کشت MRS کشت داده و سپس به مدت 10 دقیقه با سرعت 3000 دور سانتریفیوژ شدند. در ادامه سلولهای به دست آمده بوسیله سرم فیزیولوژی استریل(نمک، 0/85%) شسته شدند و سوسپانسیون سلولی به دست آمده بلافاصله برای تلقیح نمونه ها مورد استفاده قرار گرفت. سویه لیستریا منوسیتوژنز نیز به عنوان سویه باکتریایی شاخص در این آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. آماده سازی میزان مورد نیاز برای تلقیح این سویه ، با دو کشت متوالی به مدت 24 ساعت در

1. Disk diffusion agar assay
2. Melton Roy, U.S.A
3. Rain hear infusion

www.SID.ir

Archive of SID

محیط کشت TSB[1] در دمای 37 درجه سانتیگراد و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (ساخت شرکت ملتون روی آمریکا)، در طول موج 600 نانومتر انجام گرفت. میزان تلقیح لیستریا به نمونه های سترون گوشت به میزان 10^2 باکتری در گرم و برای سویه های باکتریایی نیز به میزان 10^4 باکتری در گرم بود[10]. کلیه سویه های باکتری به طور خالص و همچنین در ترکیب با لیستریا به نمونه های 40 گرمی گوشت، توزیع شده در ظروف پلی اتیلنی، تلقیح شدند. نمونه های کنترل گوشت نیز با میزان مشابهی از سرم فیزیولوژی استریل تلقیح گردیدند. بعد از جذب، قطعات گوشت در شرائط خلا(Vacuum packed) بسته بندی شدندو به مدت 40 روز در درجه حرارت 4 و 20 درجه سانتیگراد به ترتیب زیر قرار داده شدند. (10 روز در دمای 4 درجه و 30 روز در دمای 20 درجه).

2-3-4- آنالیز های میکربی

آنالیز های میکروبی هر 10 روز و در سه تکرار انجام می گرفت. در روز نمونه برداری، بسته های 40 گرمی گوشت در 120 میلی لیتر سرم فیزیولوژی(نمک، 0/85 درصد) استریل ریخته و به خوبی توسط استوماکر یکنواخت می شدند. سپس رقت های سریال[2] از نمونه های مورد مطالعه تهیه و بر روی محیط های کشت مناسب کشت داده شدند. از محیط کشت MRS در دمای 30 درجه سانتیگراد و به مدت 48 ساعت و در شرایط بی هوازی برای جدا سازی لاکتوباسیل ها استفاده شد. برای جداسازی لیستریا منوسیتوژنز از محیط کشت آگارBHI (Merck، آلمان) در دمای 30 درجه سانتیگراد و به مدت 48 ساعت استفاده شد.

2-3-5-آنالیزهای شیمیایی

آنالیزهای شیمیایی مورد استفاده در این تحقیق شامل اندازه گیری میزان کل بازهای فرار (TVB-N) و سنجش میزان pH بود که با روشهای استاندارد انجام گرفت[15]. همچنین در روز اول نمونه برداری و در زمان صفر مقادیر چربی، ماده خشک و میزان نمک موجود در ماهیان سفید دودی مطابق روش AOAC [15] مورد سنجش قرار گرفت.

2-3-6-آنالیز های آماری

برای آنالیز های آماری از نرم افزار آماری SPSS و برای رسم نمودار ها از نرم افزار EXCEL استفاده شد. تاثیر سویه های مختلف باکتریایی بر لیستریا منوسیتوژنز در محیط گوشت سترون ماهی دودی با روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA مورد مطالعه قرار گرفت. مقایسه میانگین ها نیز با روش حداقل تفاوت آماری(LSD) و در سطح 0/05 انجام گرفت.

3- نتایج

3-1- فعالیت آنتی لیستریایی سویه های باکتریایی در محیط آزمایشگاه

بررسی فعالیت آنتاگونیستی لاکتوباسیل های جدا شده از محتویات روده تاس ماهی ایرانی بر علیه لیستریا منوسیتوژنز در محیط آزمایشگاه نشان داد که هر دو سویه باکتریایی توانایی بازدارندگی از رشد لیستریا منوسیتوژنز را در محیط آزمایشگاه دارند(جدول 1). همانطور که در جدول ملاحظه می گردد، متوسط میزان بازدارندگی سویه های لاکتوباسیل بر علیه لیستریامنوسیتوژنز تفاوتی را با یکدیگر نشان ندادند.

3-2-رشد سویه های لاکتوباسیل و لیستریا منوسیتوژنز در قطعات گوشت سترون ماهی سفید دودی

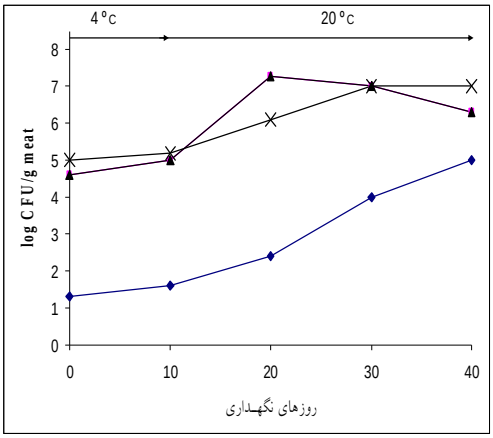
میزان نمک، ماده خشک و چربی نمونه های ماهی سفید دودی مورد مطالعه، به ترتیب 9%، 36/9% و 2% بود. نتایج حاصل از بررسی رشد لیستریا منوسیتوژنز نشان داد که محیط گوشت ماهی سفید دودی محیط مناسبی جهت رشد این پاتوژن می باشد، به طوری که میزان آن از 10^2باکتری در گرم در ابتدای نگه داری به 10^5 باکتری در گرم در انتهای زمان نگه داری رسید (شکل 1). همچنین نتایج نشان داد که هر دو سویه باکتریایی تلقیح شده به نمونه گوشت نیز به خوبی رشد نموده و قادر به کلونیزه شدن در محیط گوشت بودند (شکل 1). تفاوت معناداری در میزان رشد سویه های لاکتوباسیل تلقیح شده، در محیط گوشت مشاهده نشد($p = 0/08$). در میان سویه های لاکتوباسیل تلقیح شده، رشد

1. Tryptone Soya Broth
2. Serial dilution

www.SID.ir

Archive of SID

سویه لاکتوباسیلوس کازئی دارای سرعت نسبتا بیشتری بود. این سویه از میزان 5×10^3 باکتری در گرم در ابتدای تزریق، به میزان 10^4 باکتری در گرم در روز دهم نگه داری رسید که تفاوت معنا داری را در میزان رشد در طی این مدت شاهد بودیم($p<0/05$). با تغییر درجه حرارت به 20 درجه سانتیگراد رشد این سویه نیز افزایش پیدا کرد بطوریکه بعد از 20 روز نگه داری در این دما به بالاترین میزان خود 10^7 باکتری در گرم رسید. رشد سویه های لاکتوباسیلوس پلانتارم از سرعت رشد کمتری نسبت به لاکتوباسیلوس کازئی برخوردار بود (شکل 1). سویه لاکتوباسیلوس پلانتارم در انتهای زمان نگه داری به میزان 10^7 باکتری در گرم افزایش رشد را از خود نشان داد. همچنین آزمایشات نشان داد که حضور پاتوژن لیستریا منوسیتوژنز در محیط گوشت تاثیری بر میزان رشد و تکثیر سایر سویه ها ندارد.



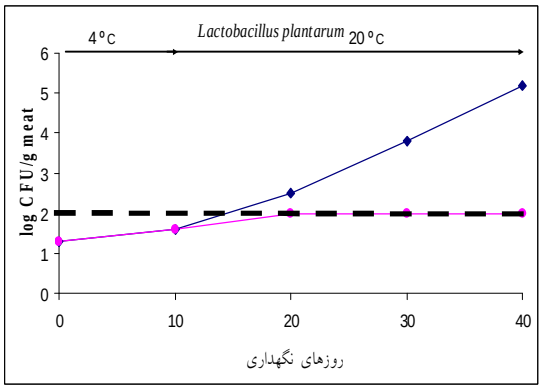
شکل1 رشد سویه های باکتریایی تلقیح شده به گوشت استریل ماهی سفید دودی در درجات حرارت 4 و 20 درجه سانتیگراد. (×) لاکتوباسیلوی کازه ای، (▲) لاکتوباسیلوس پلانتارم، (♦) لیستریا منوسیتوژنز

3-3- تاثیر سویه های لاکتوباسیل برخصوصیات کیفی قطعات سترون گوشت

بررسی آنالیزهای شیمیایی در طول دوره رشد سه سویه باکتریایی تلقیح شده نشان داد که تولید بازهای فرار (TVBN) در گوشت های سترون تلقیح شده و نمونه های کنترل تغییر معناداری درطی دوره پیدا نکرد($p=0/09$) . میزان اولیه TVN برابر با 0/9±15 (میلی گرم نیتروژن در 100 گرم گوشت) بود و در انتهای دوره نگه داری میزان آن به 1/7± 17 (میلی گرم نیتروژن در 100 گرم گوشت) رسید. میزان pH در طول دوره نگه داری در دامنه 6/03- 5/95 بود و تفاوت معناداری در طول دوره نگه داری بین نمونه های تلقیح شده و کنترل وجود نداشت($p=0/07$) .

3-4- فعالیت بازدارندگی سویه های لاکتوباسیل در محیط سترون گوشت

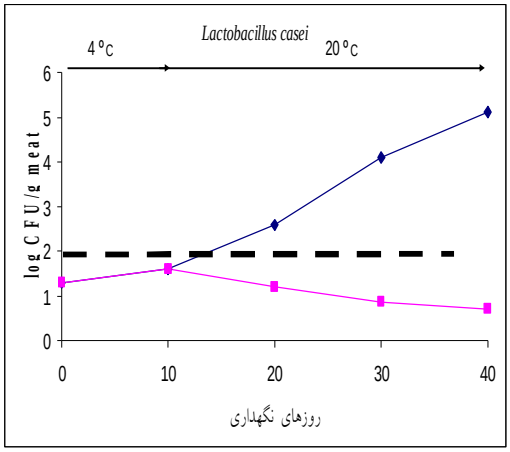
نتایج بررسی میزان رشد و تکثیر لیستریا منوسیتوژنز در ترکیب با سویه های باکتریایی نشان داد که مشابه با محیط آزمایشگاه، درنمونه گوشت نیز سویه های باکتریایی تلقیح شده، توانایی بازدارندگی رشد لیستریا منوسیتوژنز را دارند(شکل 2، 3). اثر بازدارندگی سویه لاکتوباسیلوس پلانتارم بر علیه لیستریا منوسیتوژنز در طول 40 روز نگه داری نسبت به نمونه های شاهد معنی دار بود($p<0/05$) . این سویه میزان لیستریا منوسیتوژنز را از روز دهم نگهداری تا انتهای دوره نگهداری در میزان 10^2 باکتری در گرم (شکل 2) نگه داشت. قویترین اثر بازدارندگی بر لیستریا منوسیتوژنز، مربوط به سویه لاکتوباسیلوس کازئی بود (شکل 3). اثر باکتری کشی این سویه بر علیه لیستریا منوسیتوژنز از روز دهم نگه داری شروع شد و در انتهای دوره نگه داری میزان لیستریا را در زیر حد 50 باکتری در گرم نگه داشت.



شکل2 رشد لیستریا منوسیتوژنز به تنهایی در گوشت استریل ماهی سفید دودی[♦] و رشد لیستریا منوسیتوژنز در ترکیب با لاکتوباسیلوس پلانتارم در درجات حرارت 4 و 20 درجه سانتیگراد در محیط استریل گوشت(●)

www.SID.ir

Archive of SID



شکل3 رشد لیستریا منوسیتوژنز به تنهایی در گوشت استریل ماهی سفید دودی[♦] و رشد لیستریا منوسیتوژنز در ترکیب با لاکتوباسیلوس کازه ای در درجات حرارت 4 و 20 درجه سانتیگراد در محیط استریل گوشت(■)

4- بحث و نتیجه گیری کلی

نتایج فعالیت آنتاگونیستی مایع رویی حاصل از کشت سویه های باکتریایی بر روی لیستریا منوسیتوژنز در محیط آزمایشگاه حاکی از فعالیت بازدارندگی کلیه لاکتوباسیل ها بر علیه این پاتوژن بود (جدول 1). بررسی ماهیت مواد بازدارنده تولیدی توسط لاکتوباسیلوس کازئی جدایه AP 8 و لاکتوباسیلوس پلانتارم جدایه AP 12 احتمالاً نشان دهنده تولید یک باکتریوسین متعلق به کلاس II، توسط این دو سویه از باکتری بود که فعالیت آنتاگونیستی وسیعی را بر علیه پاتوژن های گرم مثبت نشان دادند (گزارش نشده). نتایج حاصل از اثر بازدارندگی باکتری های اسید لاکتیک بر لیستریا منوسیتوژنز با یافته های برایلت و همکاران [16] در این زمینه مطابقت داشت. این محققین نشان دادند که باکتریوسین های متعلق به کلاس II ، دارای اثر بازدارندگی بر علیه سویه های متفاوتی از لیستریا منوسیتوژنز بودند. بر طبق چندین مطالعه انجام شده فعالیت بالای باکتریوسین های متعلق به کلاس II ، ناشی از وجود پل های دی سولفیدی در ساختمان این ترکیبات می باشد که تفاوت در تعداد این پل ها، یکی از مهمترین علل تفاوت در میزان بازدارندگی باکتریوسین ها می باشد[17، 18]. البته مقایسه دقیق فعالیت باکتریوسین ها نیازمند خالص سازی کامل هر کدام از پپتید ها می باشد.

در دهه های اخیر به دلیل افزایش مسمومیت های حاصل از حضور لیستریا در ماهی دودی توجه زیادی برای استفاده از سیستم هایی جهت کاهش میزان یا حذف این پاتوژن از محصول نهایی انجام شد و در اولین قدم استفاده از نگهدارنده های شیمیایی نظیر نیتریت و نیترات در این فرآورده مورد توجه قرار گرفت[10]. اما به دلیل تمایل مصرف کنندگان به کاهش استفاده از افزودنی های شیمیایی، کاربرد استفاده از سیستم های بیولوژیکی به عنوان ابزاری جهت کنترل طبیعی ارگانیسم های عامل فساد و بیماریزا (خصوصاً جنس لیستریا) که منشا غذایی دارند مورد توجه قرار گرفت [16].

تحقیق حاضر نشان داد که لیستریا توانایی رشد خوبی را در محیط گوشت ماهی سفید دارد و این امر حتی در زمانی که سطح آلودگی اولیه پایین(باکتری در گرم 10^2) نیز باشد، اتفاق می افتد. از مهمترین عوامل تاثیرگذار بر میزان حضور لیستریا میزان نمک موجود در محصول است. در ماهیان مورد آزمایش میزان نمک بین 8-9% بود و مطابق با مطالعه سایر محققین، لیستریا منوسیتوژنز در این میزان از نمک، به خوبی قادر به رشد و ادامه حیات بود [3]. دمای نگه داری فرآورده نیز از عوامل مهم در رشد لیستریا در محصول می باشد. در این مطالعه لیستریا منوسیتوژنز رشد زیادی را در محصول از روز دهم تا انتهای دوره آزمایش از خود نشان داد که این امر به دمای بالا نگه داری (20 درجه سانتیگراد) در طول این مدت مربوط می شود. چنین برآورد می شود که در صورت بروز آلودگی با لیستریا منوسیتوژنز در ماهی سفید در پروسه تولید و پس از آن، چنانچه فرآورده در درجات حرارت بالا (بالاتر از 4 درجه سانتیگراد) نگه داشته شود محیط مناسبی برای رشد لیستریا و رسیدن آن به میزان بالاتر از حد استاندارد(باکتری در گرم 10^2) فراهم می شود که این امر می تواند خطرات حاصل از بروز مسمومیت را در افراد مصرف کننده به همراه داشته باشد [8، 19].

در این تحقیق رشد سویه های باکتریایی تلقیح شده در محیط گوشت، نشان دهنده توانایی آنها برای کلونیزه کردن محیط، در درجات حرارت پایین و همچنین میزان بالای نمک بود. بررسی فعالیت آنتاگونیستی سویه های باکتریایی در محیط گوشت نشان دهنده توانایی سویه های لاکتوباسیل تلقیح شده برای بازدارندگی رشد لیستریا در محیط گوشت بود که این امر قبلاً نیز برای سویه

www.SID.ir

Archive of SID

های لاکتوباسیل در بازدارندگی لیستریا اینوکوا[1] مشاهده گردید[20]. میزان فعالیت بازدارندگی لاکتوباسیلوس پلانتارم نسبت به سویه لاکتوباسیلوس کازئی بر علیه لیستریا منوسیتوژنز در محیط گوشت کمتر بود(شکل 2، 3)، در صورتی که در محیط آزمایشگاه تفاوتی در میزان بازدارندگی مایع رویی حاصل از کشت این باکتریها بر روی لیستریا مشاهده نشد(جدول 1). گانزل و همکاران [21] نشان دادند که خصوصیات طبیعی گوشت (فرآورده) می تواند بر کاهش فعالیت باکتریوسین ها از طریق ایجاد پیوند های غیر اختصاصی ترکیباتی مانند لیپیدها با ترکیبات باکتریوسین، موثر باشد. از سوی دیگر همانطور که در بالا ذکر شد تفاوت در پیوند های دی سولفیدی نیز می تواند یکی از دلایل مهم این امر باشد و نیاز به تحقیقات تکمیلی در این زمینه دارد. فعالیت بازدارندگی لاکتوباسیلوس پلانتارم بر علیه لیستریا منوسیتوژنز یک اثرمهار کننده رشد باکتری[2] به شمار می رود در حالیکه فعالیت بازدارندگی سویه لاکتوباسیلوس کازئی یک اثر باکتری کشی است (شکل 2، 3). در حضور لاکتوباسیلوس کازئی تعداد لیستریا منوسیتوژنز از روز بیستم تا انتهای دوره نگه داری به حدود 50 عدد باکتری در گرم رسید که این میزان از حد مجاز حضور لیستریا (باکتری در گرم 10^2) در محصولات با فرآوری کم نظیر ماهی دودی[10] نیز کمتر است. در طول دوره رشد سویه های لاکتوباسیل تلقیح شده به گوشت سترون ماهی سفید دودی، تغییر معناداری در میزان pH گوشت رخ نداد، که این امر تولید اسید های آلی را به عنوان عامل اصلی بازدارندگی در فعالیت این سویه ها رد می کند. همچنین در طول دوره نگه داری، تغییر معناداری در میزان بازهای فرار (TVBN) به عنوان یکی از شاخص های مهم کیفیتی در ماهی دودی [22] ملاحظه نشد($p = 0/09$).

به عنوان یک نتیجه کلی در بین سویه های باکتریایی تلقیح شده به گوشت، سویه لاکتوباسیلوس کازئی جدایه AP 8 خصوصیات جالب و قابل اعتمادی را به عنوان یک کاندیدای نگهدارندگی زیستی از خود نشان داد. این سویه قادر به رشد در این فرآورده در سطوح بالا و همچنین بروز اثر بازدارندگی بر لیستریا منوسیتوژنز در طول مدت نگه داری می باشد، بدون آنکه تغییر معنی داری را در خصوصیات کیفی محصول ایجاد نماید. استفاده از این سویه به عنوان نگهدارنده زیستی و تاثیر آن بر خصوصیات میکروبی، شیمیایی و حسی ماهیان دودی غیر سترون در طول دوره نگهداری از تحقیقات تکمیلی در این زمینه می باشد. در اینجا ذکر این مطلب ضروری است که استفاده از نگهدارنده های زیستی نمی تواند به تنهایی جایگزین تمامی فاکتورها (نگه داری در درجه حرارت پایین، توجه به میزان نمک و فنل فرآورده و ...) برای جلوگیری از رشد لیستریا و ارگانیسم های عامل فساد و بیماریزا در ماهی دودی باشد بلکه می تواند به عنوان یک تکنیک ترکیبی موثر در کنار این عوامل، نقش مهمی را برای حذف خطر بروز لیستریوزیس و مسمومیت های غذائی در این فرآورده داشته باشد.

جدول1 میزان فعالیت بازدارندگی سویه ها باکتریایی بر لیستریا منوسیتوژنز در محیط آزمایشگاه با روش دیسک

Bacteria strain	میزان فعالیت بازدارندگی مایع روئی [mm]
Lactobacillus casei	20
Lactobacillus plantarum	20

5- تشکر و قدردانی

نگارندگان بر خود لازم می دانند از زحمات آقای مهندس باقری کارشناس محترم آزمایشگاه تخصصی آبزیان دانشکده دامپزشکی، از آقایان مهندس محمد قنبری و مهدی نقدی همچنین خانم منصوره جامی به جهت همکاری صمیمانه در این تحقیق نهایت تشکر و قدردانی را به عمل آورند.

5- منابع

[1]Cardinal, M., Gunnlaugsdottir, H., Bjoernevik, M., Ouisse, A.,Vallet, J.L., Leroi, F., 2004. Sensory characteristics of coldsmoked Atlantic salmon *Salmo salar* from European market and relationships with chemical, physical and microbiological

1. *Listeria innocua*
2. Bacteriostatic

www.SID.ir

Archive of SID

[12] Chen, H., & Hoover, D. G. 2003. Bacteriocins and their food application. Comperhensive Review in Food Science and Food Safety, 2: 82-100.

[13] Ghanbari M., Rezaei, M., Jami, M., and Nazari, R. M., 2007. Isolationand charecterization of lactobacili from intestinal microflora of two species of sturgeon fishes, persian sturgeon (*Acipenser persicus*) & Bluga (*Huso huso*). The 1st national Iranian Conference of Applieid Microbilogy. Alzahra University, Tehran.

[14] Campus, A.c., Rodriguez, O., CaloMata, P., Prado, M., Barros-Velazquez, J. 2006. Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (*Psetta maxima*). Food Research International 39; 356-364

[15] AOAC, 2002. AOAC, Official methods of Analysis No. 18031, Association of Official Analytical Chemists, Washington DC (2002).

[16] Brillet, A., Pilet, M. F., Prevost, H., Cardinal, M., Bouttefroy, A., Leroi, F. 2004. Biodiversity of listreia monocytogenes sensitivity to bacteriocin- producing Carnobactreium strains and application in strile cold-smoked salmon. Journal of Applied Microbiology 97[5]: 1029-1037

[17] Fimland, G., Johnsen, L., Axelsson, L., Brurberg, M.B., Nes, I.F., Eijsink, V.G. and Nissen-Meyer, J. 2000. A C-terminal disulfide bridge in pediocin-like bacteriocins renders bacteriocin activity less temperature dependent and is a major determinant of the antimicrobial spectrum. Journal of Bacteriology 182, 2643-2648.

[18] Guyonnet, D., Fremaux, C., Cenatiempo, Y. and Berjeaud, J.M. 2000. Method for rapid purification of class IIa bacteriocins and comparison of their activities. Applied and Environmental Microbiology 66, 1744-1748.

[19] Nilsson, L., Gram, L. and Huss, H.H.1999. Growth control of listreia monocytogenes on cold-smoked salmon using a competitive lactic acid bacteria flora. Journal of Food Protection 62 : 336-342

[20] Vescovo, M., Scolari, G. and Zacconi C. 2006. Inhibition of listreia innocua growth by antimicrobial – producing lactic acid culture in measurements. Food Research International 37, 181–193.

[2] Martin, A. M. 1994. Fisheries Processing. Chapman& Hall Publishing, London. 494 page.

[3] Norton, D., M.Scarlett, J., Horton, K., Sue, D., Thimothe, J., J.Boor, K. and Wiedmann, M. 2001. Characterization and Pathogenic Potential of *Listeria monocytogenes* Isolates from the Smoked Fish Industry. Applied and Environmental Microbiology 67(2) : 646-653

[4] Ben Embarek, P. K., 1994. Presence, detection and growth of *Listeria monocytogenes* in sea food: a review . International Journal of Food Microbiology 23 : 17-34

[5] Farber. J.M., 2000. Present situation in Canada regarding *Listeria mocytogenes* and ready to eat seafood products. International Journal of Food Microbiology 62: 247-251.

[6] Nakamura, H., Hatanakaa M., Ochia K., Nagaoa M., Ogasawarab J., Haseb A., Kitaseb T., Harukib K., Nishikawaa Y.2004. *Listeria mocytogenes* isolated from cold-smoked fish products in Osaka City, Japan. International Journal of Food Microbiology 94 : 323– 328

[7] Vaz-Velho, M., Todorov, S., Ribeiro, J., Gibbs, P. 2005. Growth control of listreia innocua 2030c during processing and storage of cold-smoked salmon – trout by Carnobacterium divergens V41 culture and supernatant. Food Control, 16: 541-549

[8] Amirkhanloo, P., 2005. Comparision of Listeria flora of whole and gutted Silver carp in cold smoking process, Islamic Azad University of Lahijan, lahijan. P: 68

[9] Akhondzadeh.Basti, A., Misaghi, A., Z.Salehi, T., Kamkar, A. 2006. Bacterial pathogen in fresh , smoked and salted Iranian fish. Food Control 17: 183-188

[10] Brillet, A., Pilet, M. F., Prevost, H., Cardinal, M., Leroi, F. 2005. Effect on inculation of Carnobacterium divergens V41, a biopreservation strain against *Listeria mocytogenes* risk, on the microbiological, chemical and sensory quality of cold-smoked salmon. International Journal of Food Microbiology, 104: 309-324

[1] Razavi-Sherazi, H,. 2001. Seafood technology: Principles of storage and processing. Naghshe Mehr Press. P: 292

www.SID.ir

Archive of SID

vacuum – packed cold smoked salmon . Food Microbiology 23 : 689-693

[21] Gänzle, M.G., Weber, S. and Hammes, W.P. 1999 Effect of ecological factors on the inhibitory spectrum and activity of bacteriocins. International Journal of Food Microbiology 46, 207-217.

[22] Leroi, F., Joffraud, J.J., Chevalier, F., Cardinal, M., 2001. Research of quality indices for cold-smoked salmon using a stepwise multiple regression of microbiological counts and physicochemical parameters. Journal of Applied Microbiology 90, 578– 587.

www.SID.ir