DOI: 10.22092/vj.2020.128535.1656
شماره ۱۳۰ بهار ۱۴۰۰
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

بررسی تاثیر تلقیح *Lactobacillus Casei*، به عنوان نگهدارنده زیستی بر کیفیت میکروبی و شیمیایی ماهی شیر *(Scomberomorus commerson)*

• **فاطمه غلامی (نویسنده مسئول)**
دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه ازاد واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران
• **صولت اسلامی**
علوم پزشکی البرز دانشکده پزشکی البرز، ایران
• **سید ابوالحسن علوی**
دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه ازاد واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران
تاریخ دریافت: ۱۳۹۸-۰۹-۰۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸-۱۲-۰۳
Email: fatemeh65gho@gmail.com

چکیده

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که به راحتی در بدن میزبان رشد کرده و سلامتی را به میزبان خود اعطاء می‌کنند. تعادل مطلوب میکروارگانیسم‌ها در دستگاه گوارش به خصوص روده بسیار مهم بوده و باکتری‌های خاصی، مانند لاکتوباسیلوس کازئی به حفظ چنین تعادل مطلوبی کمک می‌کنند. امروزه افزایش تقاضا در توسعه روش ایمن و جدید نگهداری مواد غذایی وجود دارد. هدف این مطالعه بررسی تاثیر تلقیح *Lactobacillus Casei*، به عنوان نگهدارنده زیستی بر کیفیت میکروبی و شیمیایی ماهی شیر بود. پس از تهیه ماهی از بازار و انتقال به آزمایشگاه، نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد (دمای یخچال) تا زمان انجام آزمایش نگهداری شد. در روزهای اول، سوم و هفتم و پانزدهم و سی‌ام مورد بررسی آزمون‌های شیمیایی TVN و pH میکروبی شمارش توتال میکروبی انجام شد. استفاده از پروبیوتیک در ماهی شیر جهت ممانعت از تغییرات میکروبی و شیمیایی ماهی شیر بررسی شد. نتایج نشان داد که باکتری Lactobacillus Casei در بازدارندگی از فساد ماهی موثر است. نتایج نشان داد که سویه Lactobacillus Casei کاندیدای مناسبی جهت استفاده بعنوان نگهدارنده ماهی شیر می‌باشد. سویه Lactobacillus Casei در مواد غذایی براحتی رشد می‌کند و تلقیح آن در حفظ خصوصیات شیمیایی و میکروبی فیله ماهی شیر در طول نگهداری بسیار موثراست.

کلمات کلیدی: *Lactobacillus Casei*، نگهدارنده زیستی، تغییرات میکروبی و شیمیایی، ماهی شیر

Veterinary Researches & Biological Products No 130 pp: 131-139

The effect of Lactobacillus casei inoculation as a biological preservative on the microbial and chemical quality of Scomberomorus Commerson Fish

By: GHolami, F.,(Corresponding Author), Department of Chemical Engineering, Azad University, Research Branch. Tehran, Iran. Eslami, S., Department of Medicin, Alborz, Iran and Alavi, A., Department of Chemical Engineering, Azad University, Tehran, Iran

Received: 2019-11-26 **Accepted: 2020-02-22**

Email: fatemeh65gho@gmail.com

Probiotics are living microorganisms that grow easily in the host's body and provide health to their host. The optimal balance of microorganisms in the gastrointestinal tract, especially the intestine, is very important and certain bacteria such as Lactobacillus casei help maintain such balance. There is a growing demand today for the development of a safe and novel way of preserving food. The aim of this study was to investigate the effect of Lactobacillus Casei inoculation as a biological preservative on the microbial and chemical quality of Scomberomorus commerson. After preparing the fish from the market and transferring to the Median laboratory, the samples were kept at 4 ° C (refrigerator temperature) until the test. The first, third, seventh, fifteenth and thirty days of the study were followed by TVN and microbial pH tests. The use of probiotics in S.Commerson fish to prevent microbial and chemical changes in S.Commerson fish was investigated. Lactobacillus Casei showed positive results in inhibiting fish spoilage. In the first, third, seventh, fifteenth, and thirty days of the studied samples for chemical (pH and TVN) and microbial tests (total microbial count for Staphylococcus aureus, E-coli and Salmonella) and inoculation and control Was. The results showed that Lactobacillus Casei strain is a suitable candidate for use as a preservative of S.Commerson fish. The Lactobacillus Casei strain was able to grow in food and its inoculation significantly altered the chemical and microbial properties of S.Commerson fish fillet during storage.

Keyword: Lactobacillus Casei, Biology, Microbial and Chemical Quality, Scomberomorus Commerson Fish

مقدمه

ماهی و دیگر آبزیان از تولیدات اقتصادی مهم بسیاری از کشورها، از جمله ایران می‌باشند. تخمین زده می‌شود که بین ۱۵ تا ۲۰ ٪ از پروتئین‌های حیوانی از منابع آبی تأمین می‌شود (۱۶). ماهی‌ها به دلیل داشتن مقادیر زیاد چربی‌های غیر اشباع و کلسترول کم (۲) و پروتئین‌های با ارزش غذایی بالا، اهمیت زیادی در رژیم غذایی انسان دارند. صید سالانه جهانی ماهی حدود ۱۳۵ میلیون تن است، اما فقط حدود ۷۰ میلیون تن توسط انسان به عنوان غذا مصرف می‌شود (۱). تقریباً ٪ ۳۵ از این مقدار به صورت ماهی تازه مصرف می‌شود، در حالی که بخش باقیمانده با استفاده از تکنیک‌های رایج نگهداری مواد غذایی از قبیل انجماد، نمک زدن (شور کردن)، خشک کردن، دودی کردن، یا کنسرو کردن فرآوری می‌شود (۷).

قابلیت فساد پذیری بالای ماهیان (۶) سبب شده تا حفظ کیفیت ماهی تازه در صنایع شیلاتی یکی از با اهمیت‌ترین موضوعات باشد، به ویژه در کشورهای در حال توسعه صیادان به اهمیت کیفیت صید پی برده و می‌دانند که می‌بایست محصول مناسب را به ساحل برسانند. ماهی تازه صید شده از آب‌های گرم بسیار مستعد فساد بوده و عمر ماندگاری ماهی با میزان رشد میکروارگانسیم‌های بدن آن در ارتباط می‌باشد. تقاضا برای ماهی با کیفیت بالا، بسیار افزایش یافته و این بر مسئولیت صیادان برای ارائه ماهی با کیفیت می‌افزاید. هم‌چنین ماهی تازه نسبت به ماهی منجمد متقاضی بیش‌تری داشته و ماهی با کیفیت خوب می‌تواند این تقاضا را برآورده نماید (۹).

تازگی ماهی اغلب مهم‌ترین و تنها ملاک اساسی برای قضاوت کیفیت ماهی و محصولات شیلاتی است. کیفیت ماهی تازه مهم‌ترین نگرانی برای صنعت و مصرف‌کنندگان است (۱۹). با توجه به فسادپذیری خاص ماهی و دیگر فرآورده‌های دریایی و سرعت تغییرات کیفی در اختصاصات خوراکی آن‌ها، بی شک مهم‌ترین موضوع در عمل‌آوری یا عرضه محصولات به صورت تازه، جلوگیری از بروز تغییرات یا کاهش سرعت آن‌هاست که این خود مستلزم آگاهی از حدود و نحوه پیشرفت و شدت تأثیر تغییرات بر فاکتورهای کیفی محصول است (۸).

در ایران امکان انجماد بلافاصله پس از صید بر روی عرشه وجود ندارد. بنابراین، انتخاب بهترین شیوه ممکن برای حمل ماهیان صید شده به محل

فـروش یا فرآوری امری منطقی است. استفاده از یخ آسان‌ترین و ارزان ترین روش کارآمد کاهش درجه حرارت ماهی بوده و شیوه‌ی مناسبی در حمل و نگهداری موقت ماهی است (۴, ۱۸).

نظر به ارزش اقتصادی و غذایی این ماهیان و استفاده از یخ که به میزان گسترده برای حمل و نقل ماهی در کشور استفاده می‌شود، بررسی تغییراتی که به واسطه قرارگیری ماهی شیر در یخ بروز می‌نماید و از آن جایی که کیفیت مهم‌ترین فاکتور در یک ماده‌ی غذایی است ضرورت دارد تا روند این تغییرات و استفاده از روش‌های دیگر مطالعه شود و علاوه بر حصول به اطلاعات پایه‌ای و ارزشمند، اطمینان و اعتماد لازم از حیث مصرف فراهم شود. در این تحقیق تاثیر استفاده از باکتری لاکتوباسیلوس بر کیفیت و ماندگاری ماهی شیر مورد بررسی قرار می‌گیرد (۵) (۷).

شایع‌ترین گونه بیماری‌زای استافیلوکوکوسی گونه استافیلوکوکوس طلائی است. این باکتری گرم مثبت و مزوفیل است یعنی در ۲۵ تا ۳۹ درجه سانتی‌گراد به خوبی رشد می کند. اما، به طور کلی از ۶ درجه سانتی‌گراد تا ۴۸ درجه سانتی‌گراد قادر به رشد است. با افزودن NaCl در دمای بالاتر از ۴۴ درجه سانتی‌گراد هم قادر به رشد می‌باشد. در pH ۴/۲ تا ۹/۳ رشد می‌کند اما pH مطلوب رشد ۷ تا ۷/۵ است. به خشک کردن مقاوم بوده و تا ۲۵ ٪ نمک هم رشد می‌کند در غیاب اکسیژن هم می‌توانند رشد کنند (۹).

اشریشیاکلی باسیل گرم منفی از خانواده انتروباکتریاسه‌است که بطور شایع در روده جانوران خونگرم وجود دارد. بیشتر سویه‌های اشریشیاکلی، بی‌آزار هستند اما برخی از سروتیپ‌هامانند O۱۵۷: H۷ موجب مسمویت غذایی و اسهال می‌شوند و این سویه‌های بی‌آزار، بخشی از فلور عادی روده هستند (۱۵).

باکتری سالمونلا باسیل گرم منفی است که در فرآورده‌های ماکیان به فراوانی وجود دارد. سالمونلا عامل یکی از شایع‌ترین مسمومیت‌های غذایی است که می‌تواند پرندگان را آلوده کند و قبل از تخم‌گذاری پرنده، وارد تخم‌مرغ شود. گاهی هنگام تخم گذاردن پرنده به پوسته تخم‌مرغ نفوذ می‌کند. باکتری سالمونلا با حرارت از بین می‌رود، ولی در غذاهایی که حاوی تخم‌مرغ خام هستند (مانند سس مایونز) مشکل‌ساز است (۱۵).

مکانیسم‌های اصلی فعالیت ضد باکتریایی سویه‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس به نظر می‌رسد چند منظوره است و شامل کاهش pH و تولید اسید لاکتیک و ترکیبات ضد باکتریایی، از جمله باکتریوسین‌ها و غیر باکتریوسین‌ها، مولکول‌های اسید غیر لاکتیک است (۵). به طور کلی انجام این پژوهش جهت مطالعه نگهداری ماهی صید شده شیر ماهی با استفاده از اسیدهای آلی با وزن مولکولی پایین است به طوری که بتوان علاوه بر کمتر کردن هزینه نگهداری این نوع از ماهی، کیفیت و ماندگاری آن را نیز افزایش داد. امروزه نگه‌داری ماهی با استفاده از اسیدهای آلی با وزن مولکولی پایین به دلیل دسترسی آسان و قیمت مناسب مورد توجه قرار گرفته است. در این تحقیق تاثیر استفاده از باکتری لاکتوباسیلوس بر کیفیت و ماندگاری ماهی شیر مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه ماهی شیر

ماهی شیر از بازار ماهی فروشان تهران تهیه شد و پس از خریداری اقدام به خرد کردن به قطعات کوچک تبدیل شده و در مجاورت یخ به آزمایشگاه انتقال یافت. پس از شستشوی اولیه، سر و دم زنی، خارج کردن امعاء و مجددا شستشو شده و تعداد ۳۰ تکه ماهی به وزن ۵۰ گرم تهیه و جهت انتخاب تیمارها آماده‌سازی شد.

سپس نمونه‌ها را بلافاصله به آزمایشگاه تخصصی کنترل مواد غذایی ماد (آزمایشگاه همکار وزارت بهداشت در حوزه کنترل مواد غذایی) منتقل شد. تحت شرایط استریل فیله شدند. کلیه قطعات ماهی به تعداد ۶ نمونه در هر گروه به میزان gr۱۰ در بطری‌های درب پیچدار استریل توزین و توزیع گردید. سهمی از نمونه را برای زمان اول، تعدادی برای آزمایش شیمیایی pH و تعدادی برای آزمایشات میکروبی برداشته که در همان لحظه، آزمایشات بر روی نمونه‌ها صورت گرفت.

باقیمانده فیله‌ها در بطری‌های مخصوص و استریل برای روزهای ۳ و۷ و ۱۵ و ۳۰ قرار گرفت. اطلاعات مربوط به هر بطری که شامل نوع آزمون (شیمیایی یا میکروبی) با شرایط نگهداری در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد و روز آزمون روی بطری‌ها نوشته شد و سپس بطری‌ها به یخچال منتقل شدند.

سوش میکروبی مورد نیاز ارگانیسم لاکتوباسیلوس کازئی (PTCC ۱۶۰۸) را از بانک میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه گردید و در فریزر نگهداری شد. ۴۸ ساعت قبل از زمان تلقیح لاکتوباسیلوس را که به صورت منجمد بوده از فریزر خارج نموده و در دمای محیط قرارگرفت.

میکروارگانیسم را در زیر هود لامینار کلاس II روی محیط کشت MRS آگار کشت داده و در روز اول در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه گردیده در روز اول از محیط کشت پپتون واتر و جهت ساخت میکروارگانیسم در حد غلظت نیم مک فارلند استفاده گردید. (مطابق با استاندارد ۸۹۲۳). از سوسپانسیون به دست آمده مقدار یک میلی‌لیتر که حاوی 10^6 Cfu /ml باکتری لاکتوباسیلوس کازئی بوده برداشته و به هر کدام از بطری‌ها حاوی ۱۰ gr نمونه ماهی اضافه شد. (به غیر از نمونه‌های کنترل زمان اول) میزان تلقیح سویه برابر ۱۰۶ باکتری در هر ۱۰ gr نمونه است (۶). نمونه‌های یخچالی را به یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد منتقل نموده تا در روز مقرر استفاده شود و آزمون‌های زیر روی آنها انجام گردد.

آزمون شیمیایی pH، بر روی کلیه نمونه‌ها از قبیل نمونه‌های کنترل و نمونه‌های تیمار آزمون‌های میکروبی که برای نمونه‌های کنترل شامل شمارش کلی میکروبی، وجود Staphylococcus aureus، وجود E-coli و Salmonella می‌باشد. برای نمونه‌های تیمار آزمون‌های ذکر شده به علاوه آزمون شمارش باکتری‌های لاکتوباسیلوس کازئی است.

آزمون شمارش کلی میکروبی

از آن‌جایی که بار میکروبی نمونه ماهی به طور کلی بالا می‌باشد بنابراین از رقت‌های بالا مثل ۱۰۳، ۱۰۴، ۱۰۵ استفاده شد(طبق استاندارد ملی ایران شماره ۵۲۷۱ و شماره۵۲۷۲). پس از تهیه رقت از سوسپانسیون اولیه به مقدار ml ۱برداشته و در ml ۹ محلول رینگر یا پپتون واتر اضافه گردید و سپس با شیکر به مدت حداقل ۳۰ ثانیه محلول را مخلوط و همگن نموده که این رقت، غلظت 10^2 بوده و بدین ترتیب سریال

دایلوشن تهیه گردید.
لازم به ذکر است که سوسپانسیون اولیه شامل ۱۰ gr نمونه و ۹۰ ml محلول رینگر می‌باشد و فقط غلظت 10^{-1} را تشکیل می‌دهد. رقت‌های تهیه شده به ترتیب 10^{-2}، 10^{-3}، 10^{-4} می‌باشد. پس از تهیه رقت‌های مورد نظر مقدار ۱ ml از لوله (رقت مورد نظر 10^{-4} CFu/g می‌باشد که میزان 10^{-3} CFu/g در هر ۱۰ gr نمونه است) به پلیت استریل اضافه نموده و سپس جهت شمارش توتال کانت از تکنیک Plate Count Agar استفاده شد که برای تهیه Pure Plate در آگار با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد نمونه‌ها را داخل پلیت ریخته و تکان داده به‌طوریکه محتویات آن به خوبی در سطح پلیت و محیط کشت پخش گردید و سپس پلیت را در انکوباتور در ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت انکوبه شد. بعد از این مدت در کنار چراغ مطالعه یا کلنی کانتر تعداد کلنی‌های رشد کرده شمارش شد.

شمارش باکتری‌های لاکتوباسیلوس کازئی

برای شمارش باکتری‌های لاکتوباسیلوس کازئی در نمونه‌های کنترل و تیمار بعد از گذشت روز سوم و هفتم و پانزدهم و سی‌ام نیز رقت مورد نظر را تهیه کرده با این تفاوت که از محیط MRS Agar استفاده شد و پس از میکس کردن و بسته شدن محیط پلیت‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه نموده و بعد از ۴۸ ساعت پلیت را خارج نموده کلنی‌های رشد کرده شمارش گردید (۶).
جهت شناسایی باکتری E-coli (اشرشیا کلی) از آزمون کشت در محیط Peptone water با افزودن چند قطره معرف کوواکس به سطح محیط Peptone water و تشکیل حلقه قرمز آلبالویی رنگ نشانه وجود E-coli می‌باشد.
آزمون شناسایی استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از لوپ و کشت آن روی محیط کشت Mannitol Salt Agar به صورت خطی و گرمخانه گذاری برای مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد زرد شدن محیط کشت بعلت حضور کلنی‌های شفاف محدب احتمال وجود استافیلوکوکوس اورئوس است.
کشت برای باکتری سالمونلا در محیط اولیه لاکتوز براث بوده که در همان ابتدای نمونه‌گیری استفاده شد (مطابق با استاندارد شماره ۱۸۱۰) به طوری که در روز اول ۱۰ gr از فیله ماهی را به ۲۲۵ ml محیط منتقل نمود. همچنین ۱۰ ml آب همراه با ماهی که با پوست ماهی در ارتباط بوده را در ۹۰ ml محیط غنی کننده آبگوشت لاکتوز ریخته شد و ۲۴ ساعت انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد (۲۱).

کشت در محیط غنی‌کننده انتخابی

برای این منظور سلنیت سیستین استفاده شد. ۱ میلی‌لیتر از محیط لاکتوز به ۱۰ ml از محیط سلنیت سیستین افزوده شده به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

کشت در محیط جامد انتخابی

برای این منظور از محیط سالمونلا شیگلا آگار (SSA) استفاده گردید با استفاده از لوپ از محیط سلنیت سیستین برداشته و به صورت خطی روی محیط (SSA) کشت داده شده و به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. از آنجایی که سالمونلا اغلب لاکتوز منفی است کلنی‌های آن روی محیط بی‌رنگ یا زرد با مرکز سیاه می‌باشد. آزمون‌های شیمیایی شامل آزمون اندازه‌گیری pH و سنجش مجموع بازهای نیتروژنی فرار TVN است.

آنالیزهای آماری

برای تجزیه و تحلیل آماری و رسم نمودارها از نرم‌افزار Graphpad Prism ورژن شماره ۸ و Microsoft Excel ۲۰۱۳ استفاده شد.

نتایج

نتایج این مطالعه نشان داد که تاثیر تلقیح باکتری لاکتوباسیلوس کازئی، به عنوان یك نگهدارنده بیولوژیک بر کیفیت میکروبی و شیمیایی در ماهی شیر مورد مطالعه بسیار حائز اهمیت و موثر بود. تاکنون مطالعات گسترده‌ای در زمینه‌ی تولید غذاهای پروبیوتیك انجام شده و نتایج حاکی از مناسب بودن پروبیوتیک‌ها برای محصولات لبنی مانند ماست و سایر مایعات غذایی نظیر آب میوه‌ها جهت نگهداری و حضور موثر پروبیوتیکی است (۸).

نتایج آزمون‌های میکروبی

از جمله راه‌هایی که برای افزایش مدت نگهداری ماهی استفاده می‌شود، قرار دادن ماهی تحت شرایط سرد در یخچال است. نگهداری ماهی در یخچال سبب کاهش سرعت فعالیت‌های شیمیایی و آنزیمی شده، البته فساد ماهی متوقف نشده و تغییرات نامطلوب مانند اکسیداسیون و هیدرولیز چربی به آرامی رخ می‌دهد که سرانجام سبب از دست رفتن کیفیت ماهی خواهد شد(۲). بنابراین نتایج حاصل از آزمایشات باکتریایی، شیمیایی و آزمایش‌های مرتبط با تلقیح باکتری‌های لاکتوباسیلوس کازئی به گوشت شیر ماهی مناسب و کارآمد ارزیابی شد (جدول‌های ۱ تا ۵).

نتایج آزمون‌های شیمیایی

بررسی تغییرات شمارش کل باکتری‌ها

تفسیر شکل ۱ روند تغییرات کل باکتری‌های زنده Total Viable Count در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در گروه کنترل و گروه تیمار شده با باکتری لاکتوباسیلوس کازئی در بازه زمانی ۳۰ روزه را نشان می‌دهد. متوسط TVC در هر دو گروه در طول دوره نگهداری صعودی بوده و متوسط TVC در طول دوره مطالعه در گروه تیمار شده در روزهای ۷، ۱۵ و ۳۰ به طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل بود (P=۰,۲۴). نکته خیره‌کننده در این آزمایش این است که شمارش کلی میکروبی نمونه‌های کنترل یخچالی در روز سوم با مقدار $10^{6/3}$ CFu/g از نمونه‌های کنترل در روز سی‌ام با مقدار $10^{6/2}$ CFu/g بیشتر است. چرا که در روزهای اول و مراحل نخست رشد پروبیوتیک به حداکثر خود نرسیده و نتوانسته تا شرایط ایده آل را جهت محافظت فراهم نماید. بنابراین پس از گذشت زمان مناسب و رشد حداکثری باکتری پروبیوتیک قدرت محافظت از ماده غذایی را کسب کرده و اجازه تخریب به بافت‌های موجود را نمی‌دهد. در نتیجه این تحقیق و استفاده از مواد بیولوژیک بسیار کارآمد و مفید الفایده خواهد

بـود. تعداد بیشتر باکتری‌های کل در نمونه تیمار شده می‌تواند به خاطر تلقیح باکتری لاکتوباسیلوس کازئی باشد که در روز اول انجام گردیده است (نمودار ۱).

در شکل ۲ ستاره (*) بیانگر اختلاف معنی‌دار میزان لاکتوباسیلوس کازئی در روزهای ۱ و ۳ در مقایسه با روزهای ۷، ۱۵ و ۳۰ می‌باشد. به دلیل وجود سویه لاکتوباسیلوس کازئی به طور معنی‌داری ($P \geq ۰,۰۵$) تعداد ارگانیسم‌های شاخص میکروبیولوژیکی از نظر عملی پایین‌تر بود و عمر فیله‌های ماهی شیر بسته‌بندی شده با خلاء در یخچال نسبت به تلقیح باکتری با انجام خلا فشار باعث افزایش عمر مفید آنها تا ۵ روز شد (نمودار ۲). علاوه بر این، لاکتوباسیلوس کازئی توانایی آنتی‌اکسیدانی نیز از خود نشان داد که می‌تواند اکسیداسیون لیپیدها را در ماهی مهار کند.

بحث

ماهی شیر یکی از مهم‌ترین گونه‌های ماهیان از نظر محبوبیت طعم در کشور ایران بوده که نقش مهمی را در جیره غذایی مردم و مصرف رستوران‌ها دارد. با توجه به موقعیت جغرافیایی محل زندگی این گونه ماهی و چگونگی و نحوه حمل و نقل این ماهی به سرتاسر کشور توسط شرکت‌های حمل و نقل و صنایع بسته‌بندی شیلات، مسئله جدید و سلامت این ماده غذایی حائز اهمیت می‌باشد (۸). گزارش‌های حاصل از همکاران در تحقیقی نشان داد که در صورت عدم بکارگیری مواد بیولوژیک پروبیوتیکی و وجود مواردی دال بر بروز آلودگی در ماهیان،

جدول ۱ - نتایج حاصل از رشد باکتری‌های زیر در درمای ۴ درجه سانتی‌گراد.

نام آزمون	اشریشیاکلی	استافیلوکوکوس اورئوس	سالمونلا
روز ۱	مثبت +	منفی	منفی
روز ۳ نمونه کنترل	مثبت +	منفی	منفی
روز ۳ نمونه کنترل	مثبت +	منفی	منفی
روز ۷ نمونه کنترل	مثبت +	منفی	منفی
روز ۷ نمونه تیمار	مثبت +	منفی	منفی
روز ۱۵ نمونه کنترل	مثبت +	منفی	منفی
روز ۱۵ نمونه تیمار	مثبت +	منفی	منفی

جدول ۲- شمارش کلی میکروبی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد.

زمان نگهداری(روز)	روز یک	روز ۳	روز ۷	روز ۱۵	روز ۳۰
شمارش کلی میکروبی در نمونه‌های کنترل Cfu/g	$۲/۷\times۱۰^{۵}$	$۳/۱\times۱۰^{۵}$	$۳/۹\times۱۰^{۵}$	$۴/۶\times۱۰^{۵}$	$۱/۴\times۱۰^{۶}$
شمارش کلی میکروبی در نمونه‌های تیمار Cfu/g	$۲/۷\times۱۰^{۵}$	$۲/۱\times۱۰^{۶}$	$۱/۳\times۱۰^{۷}$	$۹/۰\times۱۰^{۶}$	$۲/۰\times۱۰^{۷}$

جدول ۳- میزان لاکتوباسیلوس کازئی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد.

زمان نگهداری(روز)	روز یک	روز ۳	روز ۷	روز ۱۵	روز ۳۰
لاکتوباسیلوس کازئی در نمونه تیمار Cfu/g	۱۰>	$۳/۰\times۱۰^{۵}$	$۱/۴\times۱۰^{۴}$	$۱/۹\times۱۰^{۴}$	$۲/۰\times۱۰^{۴}$

استفاده از ترکیبات ضد میکروبی را در این زمینه، از اهمیت خاصی برخوردار کرده است (۳).

باکتری‌های پروبیوتیک میکروارگانیسم‌های زنده و فعالی هستند که با استقرار در بخش‌های مختلف بدن (اساساً روده) و عمدتاً از طریق حفظ و توازن فلور میکروبی روده در برگیرنده خواص مفید برای میزبان هستند. باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس از جمله باکتری‌های پروبیوتیک می‌باشد که برای اولین بار در سال ۱۹۰۰ از مدفوع نوزادان جداسازی شد (۱۳). این باکتری گرم مثبت دارای خصوصیات فوق‌العاده بوده که بیشتر در محصولات لبنی مانند ماست، شیر، پنیر و بخش‌هایی از دستگاه گوارش پستانداران نظیر روده انسان و همچنین حفره دهانی دیده می‌شود. باکتری مزبور از جمله باکتری‌های هموفرمنتاتیو بوده که از تخمیر قند، تنها اسید لاکتیک تولید می‌کند (۱۳).

در این مطالعه استفاده از باکتری پروبیوتیک در طول دوره نگهداری به سرعت رشد کرده و به باکتری‌های غالب گوشت ماهی تبدیل می گردد که ماهی را از فساد میکروبی محفوظ می‌دارد. نتایج بدست آمده از این پژوهش با عملکرد سایر محققین در این خصوص مطابقت دارد (۳). ماهیان و محصولات منجمد شده سایر آبزیان دریایی به علت دستکاری‌های بیش از حد، حمل و نقل طولانی مدت یا پختن ماهی در عرشه می‌تواند منابع اصلی انتقال آلودگی میکروبی باشد. دما و pH دو فاکتور محدودکننده رشد باکتری‌ها در محصولات غذایی دریایی به شمار می‌روند (۲۱).

گزارش‌های متعددی وجود دارند مبتنی بر اینکه اسید لاکتیک سبب افزایش مدت زمان نگهداری فیله ماهی شده است. اسید لاکتیک سبب مهار رشد باکتری‌های صنعتی می‌شود که عامل فساد ماهی هستند (۳) استفاده بیش از حد اسید لاکتیک سبب هضم ماهی توسط اسید شده و منجر به ایجاد خصوصیات حسی و فیزیکی نامطلوب می‌شود (۱۴) همچنین استفاده از اسید لاکتیک در غذا، سبب ممانعت از ایجاد مسمومیت حاد و مزمن می‌گردد (۱۰).

از جمله راه‌هایی که برای افزایش مدت نگهداری ماهی استفاده می‌شود، قرار دادن آن تحت شرایط سرما در یخچال است. نگهداری ماهی در یخچال سبب کاهش سرعت فعالیت‌های شیمیایی و آنزیمی خواهد شد، البته فساد ماهی متوقف نشده و تغییرات نامطلوب مانند اکسیداسیون و هیدرولیز چربی به آرامی رخ می‌دهد که سرانجام سبب از دست رفتن کیفیت ماهی خواهد شد (۱۲).

خیاری و میسون (۲۰۱۸) به مقایسه دینامیکی هیدرولیز ماهی از طریق روش‌های شیمیایی و میکروبی پرداختند. آن‌ها در مطالعه خود هیدرولیز شدن پروتئین ماهی توسط تخمیر میکروبی با استفاده از Lactobacillus plantarum و Pediococcus acidilactici را مورد بررسی قرار داده و آن را با هیدرولیز متداول شیمیایی با استفاده از اسید فرمیک مقایسه کردند. همچنین آنها اثرات روش پردازش شیمیایی و میکروبی، دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و ۳۷ درجه سانتی‌گراد، غلظت لاکتوز ۵٪ و ۱۰٪ و مدت ۹-۱ روز بر دینامیک پروتئولیز و سینتیک تخمیر مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها نشان دادند که برای تمام نمونه‌ها، ماده خشک باقی مانده پس از ۳ روز پردازش به سطح ثابت رسیده و نشان‌دهنده مایع شدن سریع زیست توده ماهی است. صرف نظر از روش پردازش، درجه هیدرولیز به سرعت در ۳ روز اول افزایش یافت و پس از آن تثبیت شد و به بیش از ۴۰٪

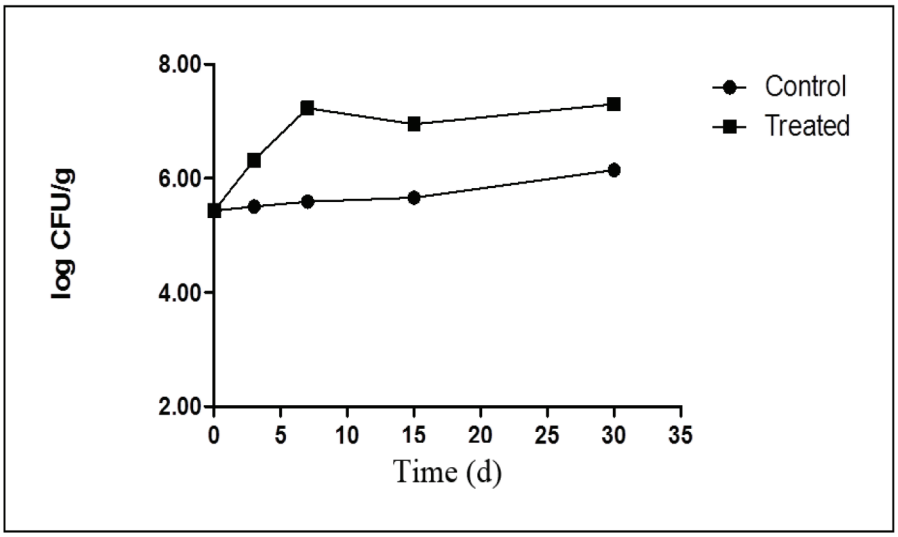
جدول ۴ - بررسی تغییرات pH در دو نمونه‌ی تیمار و کنترل در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد.

زمان نگهداری(روز)	روز یک	روز ۳	روز ۷	روز ۱۵	روز ۳۰
pH نمونه‌های کنترل	۶/۶۰	۶/۶۴	۶/۶۷	۷/۵۲	۸/۳۶
pH نمونه‌های تیمار	۶/۶۰	۶/۶۳	۶/۶۶	۷/۸۴	۸/۴۹

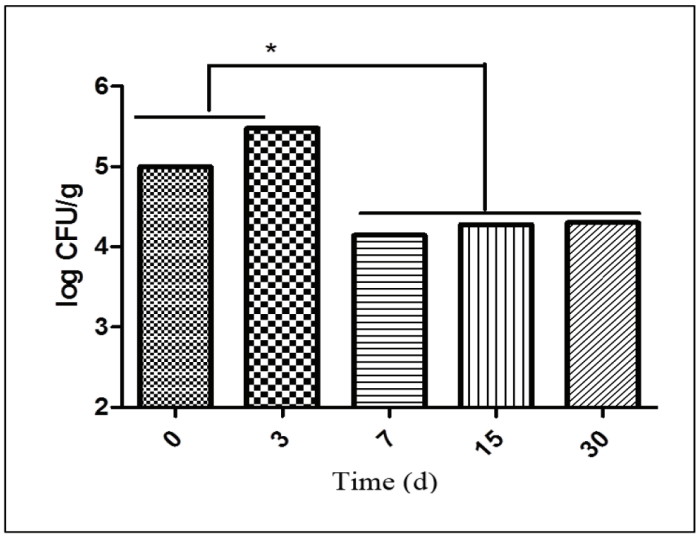
جدول ۵- بررسی تغییرات $\left(\frac{(mgN)}{100gmeat}\right)$ TVN در نمونه‌های ماهی شیر در دو گروه کنترل و تلقیح شده با لاکتوباسیلوس کازئی در طول نگهداری در درجه حرارت ۴ درجه سانتی‌گراد.

ماهی شیر	روز ۱	روز ۳	روز ۵	روز ۷	روز ۱۰
نمونه کنترل	۸/۳۷±۰/۷	۱۶/۳۷±۰/۲	۲۳/۸۸±۰/۰۱	۲۶/۲۸±۱/۲	۴۲/۵۷
نمونه تیمار	۸/۳۷±۰/۷	۱۳/۶۵±۰/۰۷	۲۰/۰۴±۰/۰۳	۱۹/۲۹±۰/۱	۲۸/۴۴

(± خطای استاندارد)



شکل ۱ - نمودار میزان تغییرات شمارش کل باکتریها در روزهای نگهداری مختلف در گروه کنترل و گروه تیمار شده با لاکتوباسیلوس کازئی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد.



شکل ۲- نمودار تغییرات زنده مانی باکتری‌های لاکتوباسیلوس کازئی طی ۳۰ روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در ۱ gr فیله ماهی شیر.

رسید (۱۱). نتیجه حاصله از این پژوهش آنکه در روز سوم تیمار بیشترین میزان آلودگی به باکتری‌های مولد فســاد در فیله ماهی شیر مشاهده شد در حالی‌که در روز هفتم تیمار کمترین میزان آلودگی به باکتری‌های مولد فساد و رشد آن‌ها قابل رویت بود.

جیاپنگ و همکاران (۲۰۱۸) به بررسی همکاری باکتری‌های اسید لاکتیک تنظیم شده توسط سیستم AILuxS-۲ که به عنوان محافظ بیولوژیکی میگو سرد شده است، پرداختند. آن‌ها در این مطالعه همکاری میان گونه‌های باکتری اسید لاکتیک Lactobacillus Plantar um AB-۱ (LAB) و Lactobacillus Casei را توسط LuxS / AI-۲ تنظیم شده در دو فضای متفاوت محیط کشت و میگو مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها نشان دادند که فعالیت ضد میکروبی Lactobacillus Plantarum AB -۱ به طور قابل توجهی در کشت همبستگی نسبت به کشت جداگانه در شرایط آزمایشگاهی افزایش یافت و رونویسی ژن LuxS حساسیت نور و اپرون‌های کنترل کننده باکتریوسین (plnB و plnC) در Lactobacillus -۱ Plantarum AB نیز به طور قابل ملاحظه‌ای در کشت افزایش یافت($p < ۰/۰۵$)، که نشان‌دهنده عملکرد آن است (۱۷).

نتایج به دست آمده در آزمایش‌های میگو نشان داد که ارگانیسم‌های از بین رفته در نمونه‌های میگو به طور قابل توجهی پس از اتصال با Lactobacillus Plantarum AB -۱ و Lactobacillus Casei مهار شدند و مقدار کل نیتروژن پایه فرار (TVN) و مقدار پروتئین خام در تیمارهای هموسیکلوره نیز به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد ($p < ۰/۰۵$). علاوه بر این، فعالیت‌های AI-۲ در میگو مخلوط شده در طی ذخیره یخچال به طور معنی‌داری بیشتر بود. در نهایت آن‌ها بیان کردند که نتایج حاصله یک راهبرد موثر برای حفاظت بیولوژیک میگو را نشان می‌دهد (۲۰). در حالی‌که نتیجه حاصله از این پژوهش نشان داد که در روز سوم تیمار بیشترین میزان آلودگی به باکتری‌های مولد فساد در فیله ماهی شیر مشاهده شد در حالی‌که در روز هفتم تیمار کمترین میزان آلودگی به باکتری‌های مولد فساد و رشد آنها قابل رویت بود.

به دلیل وجود هر دو سویه باکتری به طور معنی‌داری ($P \geq ۰/۰۵$) تعداد ارگانیسم‌های شاخص میکروبیولوژیکی از نظر میکروب‌شناسی پایین‌تر بود عمر فیله‌های قزل آلا بسته‌بندی شده با خلاء نگهداری شده در یخچال، زیرا تلقیح با این فشار باعث افزایش عمر مفید ۵ روز شد. علاوه بر این، این سویه توانایی آنتی‌اکسیدانی را نشان داد که می‌تواند اکسیداسیون لیپیدها را در ماهی مهار کند. نتیجه حاصله آنکه در روز سوم تیمار بیشترین میزان آلودگی به باکتریهای مولد فساد در فیله ماهی شیر مشاهده شد در حالی‌که در روز هفتم تیمار کمترین میزان آلودگی به باکتری‌های مولد فساد و رشد آنها قابل رویت بود و نگهداری نمونه‌های به ترتیب زیر کمترین میزان آلودگی را نشان دادند: روز هفتم < روز پانزدهم < روز سی ام < روز اول < روز سوم

نتیجه‌گیری

در این مطالعه نشان داد که تلقیح باکتری لاکتوباسیلوس کازئی، به عنوان یك نگهدارنده زیستی بر کیفیت میکروبی و شیمیایی ماهی شیر مورد مطالعه تاثیرگذار است. تاکنون مطالعات گسترده‌ای در زمینه‌ی تولید غذاهای پروبیوتیك انجام شده و نتایج حاکی از مناسب بودن وضعیت پروبیوتیکی برای لبنیات‌ها مانند ماست و آب میوه‌ها وغیره است. به دلیل کم بودن مطالعات در زمینه تلقیح باکتری لاکتوباسیلوس کازئی بر ماهی شیر، این مطالعه جهت بررسی کیفیت میکروبی و شیمیایی به عنوان یك نگهدارنده زیستی انتخاب شد. با توجه به اینکه فرآیند نگهداری و سردسازی ماهی‌ها همانطور که گفته شد دارای پیچیدگی‌ها و هزینه‌های بسیاری است این پژوهش می‌تواند علاوه بر افزایش کیفیت ماهی شیر پس از صید هزینه نگهداری ماهی را نیز کاهش دهد.

اما در کنار این هدف کلی با انجام این تحقیق، مقاصد علمی دیگری را نیز می‌توان دنبال کرد که از آن‌ها می‌توان افزایش زمان نگهداری ماهی شیر، بررسی اثر دمای یخچال بر روی گروه تیمار و کنترل گوشت ماهی شیر با گذشت زمان، بررسی اثر باکتری لاکتوباسیلوس کازئی بر زمان نگهداری ماهی شیر و شاخص‌های شیمیایی فساد باکتریایی و بررسی آلودگی باکتریایی بیماری زا برای انسان در گونه ماهی شیر را نام برد.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر مطالعه‌ای در زمینه بیوتکنولوژی میکروبی است که از پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد اقتباس شده است. بدینوسیله از آزمایشگاه تخصصی کنترل مواد غذایی ماد (آزمایشگاه همکار وزارت بهداشت در حوزه کنترل مواد غذایی) و بویژه کارشناس ارشد میکروبیولوژی آقای مهندس مجید صادق‌پور و کلیه عزیزانی که در انجام این فعالیت علمی راهنمایی مفید و ارزنده داشتند قدردانی و تشکر می‌گردد.

منابع مورد استفاده

1- Aberoumand, a., n. s. ziae, f. baesi and z. kolyaie. 2017. effects of freezing storage on fat oxidation of fishes pampus argenteus and sparidentex hasta.

2- Ackman, R. and C. McLeod. 1988. Total lipids and nutritionally important fatty acids of some Nova Scotia fish and shellfish food products. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal* 21: 390-398.

3- Ali, n. s., s. khanzadi, a. fazlara, v. h. najafzadeh and m. azizzadeh. 2017. effect of lactic acid on microbiological and chemical indices of common carp fillets during storage at 4oc.

4- Balachandran, S., M. Porosnicu and G. N. Barber. 2001. Oncolytic activity of vesicular stomatitis virus is effective against tumors exhibiting aberrant p53, Ras, or myc function and involves the induction of apoptosis. *Journal of virology* 75: 3474-3479.

5- Danza, A., A. Lucera, P. Lavermicocca, S. Lonigro, A. Bavaro, A. Mentana, D. Centonze, A. Conte and M. Del Nobile. 2018. Tuna Burgers Preserved by the Selected Lactobacillus paracasei IMPC 4.1 Strain. *Food and bioprocess technology* 11: 1651-1661.

6- Gebremariam, T. W. 2003. Development of a Quality Index Method (QIM) scheme and its implementation in a shelf-life study of kingklip (Genypterus capensis). University of Cape Town

7- Gram, L. and H. H. Huss. Section. 2000. Fresh and processed

fish and shellfish. 472-506. The microbiological safety and quality of food. *Aspen Publishers*;

8- Hamidiyan, N., A. Salehi-Abargouei, Z. Rezaei, R. Dehghani-Tafti and F. Akrami-Mohajeri. 2018. The prevalence of Listeria spp. food contamination in Iran: A systematic review and meta-analysis. *Food Research International* 107: 437-450.

9- Hassan, M., C. Lemaire, C. Fauvelot and F. Bonhomme. 2002. Seventeen new exon□primed intron□crossing polymerase chain reaction amplifiable introns in fish. *Molecular Ecology Notes* 2: 334-340.

10- Hassan, S., R. Romero, I. Hendler, R. Gomez, N. Khalek, J. Espinoza, J. K. Nien, S. M. Berry, E. Bujold and N. Camacho. 2006. A sonographic short cervix as the only clinical manifestation of intra-amniotic infection. *Journal of perinatal medicine* 34: 13-19.

11- Khiari, Z. and B. Mason. 2018. Comparative dynamics of fish by-catch hydrolysis through chemical and microbial methods. LWT 97: 135-143.

12- Leroi, F., J. Joffraud, F. Chevalier and M. Cardinal. 2001. Research of quality indices for cold□smoked salmon using a stepwise multiple regression of microbiological counts and physico□chemical parameters. *Journal of Applied Microbiology* 90: 578-587.

13- Lv, X., H. Ma, M. Sun, Y. Lin, F. Bai, J. Li and B. Zhang. 2018. A novel bacteriocin DY4-2 produced by Lactobacillus plantarum from cutlassfish and its application as bio-preservative for the control of Pseudomonas fluorescens in fresh turbot (Scophthalmus maximus) fillets. *Food Control* 89: 22-31.

14- Magalhães, L. and M. Nitschke. 2013. Antimicrobial activity of rhamnolipids against Listeria monocytogenes and their synergistic interaction with nisin. *Food Control* 29: 138-142.

15- Mahon, C. R., D. C. Lehman and G. Manuselis. 2018. Textbook of diagnostic microbiology-e-book. *Elsevier Health Sciences*.

16- Morrison, J. and A. Sarris. 2007. Determining the appropriate level of import protection consistent with agriculture-led development in the advancement of poverty reduction and improved food security. WTO rules for agriculture compatible with development: 13-58.

17- Oktaviana, A. Y., I. I. Arief and I. Batubara. 2018. Potensi Yogurt Rosella Probiotik Lactobacillus plantarum IIA-1A5 atau Lactobacillus fermentum B111K dalam Mengasimilasi Kolesterol. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan* 7.

18- Özyurt, G., E. Kuley, S. Özkütük and F. Özogul. 2009. Sensory, microbiological and chemical assessment of the freshness of red mullet (Mullus barbatus) and goldband goatfish (Upeneus moluccensis) during storage in ice. *Food chemistry* 114: 505-510.

19- Rubio-Rodríguez, N., S. De-Diego, S. Beltrán, I. Jaime, M. Sanz and J. Rovira. 2009. SFE of fish oil from fish by-products: A comparison with other production processes. 9th International Symposium on SuperCritical Fluids 2009 New trends on supercritical.

20- Tian, Y., J. Liimatainen, A. Puganen, H.-L. Alakomi, J. Sinkkonen and B. Yang. 2018. Sephadex LH-20 fractionation and bioactivities of phenolic compounds from extracts of Finnish berry plants. *Food research international* 113: 115-130.

21- Varnam, A. H. and M. G. Evans. 1991. Foodborne pathogens: an illustrated text. 842-856.