تاثیر عصاره جلبک *Sargassum tenerrimum*، نایسین Z و آنتی‌بیوتیک آئرومایسین روی رشد باکتریایی میگو وانامی (*Litopenaeus vannamei*) طی نگهداری در یخ

شقایق کهنمویی[۱]، **معظمه کردجزی**[۱*]، مهدی ذوالفقاری[۱]، محمد خضری[۲]

[۱] گروه عمل‌آوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گرگان، ایران.
[۲] گروه عمل‌آوری محصولات شیلاتی، مرکز تحقیقات آرتمیای کشور ، ارومیه، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۰۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۰۸

چکیده

با توجه به فسادپذیری بالای آبزیان هر ساله بخش زیادی از این تولیدات فاسد می‌شود که باعث تحمیل خسارت‌های قابل توجه اقتصادی به جامعه می‌شود. در پژوهش حاضر، اثر نگهدارندگی یخ پودری در چهار حالت یخ خالص و یا یخ حاوی عصاره جلبک سارگاسوم تنریموم، آنتی‌بیوتیک آئرومایسین و نایسین Z بر افزایش زمان ماندگاری میگوهای وانامی (*Litopenaeus vannamei*) طی ۱۲ روز نگهداری ارزیابی شد. میگوها از مرکز پرورش گمیشان تهیه شده و تمامی آزمایشات در دانشکده شیلات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. نمونه‌های یخ‌گذاری شده به فاصله هر سه روز یکبار از نظر بارباکتریایی عامل فساد متداول (CSB)، باکتری‌های سرمادوست (PVC)، باکتری‌های اسیدلاکتیک (LAB) و باکتری‌های انتروباکتریاسه (EB) ارزیابی شدند. سریع‌ترین روند فساد در تمامی آنالیزهای باکتریایی در تیمار شاهد و عصاره جلبک مشاهده شد و این دو تیمار بالاترین میزان افزایش بار میکروبی را در پایان زمان نگهداری نشان دادند ($p<۰/۰۵$). تیمار حاوی نایسین Z بر بارباکتریایی عامل فساد متداول (CSB)، باکتری‌های سرمادوست (PBS)، باکتری‌های اسیدلاکتیک(LAB) اثر نگهدارندگی نسبتا مناسبی را نشان داد ($p<0.05$)، اما در برابر باکتری‌های انتروباکتریاسه (EB) بی‌اثر بود ($p>0.05$). آنتی‌بیوتیک آئرومایسین اثر نگهدارندگی قابل‌توجهی را بر علیه باکتری‌های مورد مطالعه نشان داد به‌طوری که مقادیر بار باکتریایی عامل فساد متداول و باکتری‌های سرمادوست در این تیمار حتی با گذشت زمان نگهداری روند کاهشی را نشان دادند و رشد باکتری‌های انتروباکتریاسه و اسیدلاکتیک طی دوره نگهداری متوقف شد ($p<0.05$).

واژگان کلیدی: میگو، یخ، عصاره جلبک، آنتی‌بیوتیک، نایسین Z

* kordjazi@gau.ac.ir

مقدمه

آبزیان از منابع عمده تامین پروتئین حیوانی برای انسان بوده و در حدود ٪۲۰-۱۵ پروتئین حیوانی مصرفی انسان را تامین می‌کنند (۱). آبزیان خام و فراورده‌های حاصل از آن ها به‌عنوان فراورده‌های با ارزش بالای تغذیه ای شناخته می‌شوند بخصوص، اسیدهای چرب امگا ۳ (EPA و DHA) موجود در آبزیان اثرات مثبتی بر ارتقا سلامتی و پیشگیری از بیماری‌های شایعی نظیر مشکلات قلب و عروق و آلزایمر دارند که بر جذابیت استفاده از آن ها برای مصرف‌کنندگان افزوده است (۲).

میگوی وانامی (*Litopenaeus vannamei*) گونه اصلی مورد استفاده در صنعت پرورش میگو در ایران و همچنین از مهم‌ترین گونه‌های پرورشی میگو در جهان است به‌طوری‌که طبق گزارشات از سال ۲۰۰۳ به بعد رتبه اول تولید در بین گونه‌های پرورشی را به خود اختصاص داده‌است (۳). میگو همانند دیگر فراورده‌های دریایی نسبت به فساد حساس بوده و تحت تاثیر فعالیت‌های تخریبی میکروبی، شیمیایی و آنزیمی قرار می‌گیرد (۴). مسئول اصلی فسادپذیری شدید آبزیان در طول نگهداری سرد، میکروارگانیسم‌ها می‌باشند (۵) و در این رابطه جنس هایی از قبیل سودوموناس‌ها، موراکسلا، ویبریو و شیوانلا از فلور میکربی غالب ماهیان آب‌های معتدل می‌باشند (۶). فرایند جابجایی و عرضه میگو عمدتاً در یخ انجام می‌شود. هر چند روند فساد و افت تغییرات کیفی طی فرایند نگهداری در یخ کند می‌شود، اما این تغییرات همچنان ادامه یافته و بدین سبب زیان‌های کلان اقتصادی را در پی دارد. در این رابطه اتخاذ استراتژی‌های مناسب جهت به تاخیرانداختن روند فساد و کاهش کیفیت طی فرایند سردسازی و زمان نگهداری در یخ ضروری است. افزودن ترکیبات ضداکسیدان و ضدباکتری مختلف مانند نیترات سدیم به داخل ترکیب یخ از جمله استراتژی‌های موثر جهت کمک به عملکرد یخ و حفظ بهتر کیفیت محصول می‌باشد. کنترل فساد ماهی نگهداری شده بوسیله آنتی بیوتیک‌هایی مانند کلروتتراسایکلین (CTC) و اکسی تتراسایکلین (OTC) و مصرف بدون خطر این ماهی‌ها نیز گزارش شده است که یکی از دلایل این امر حساس بودن این آنتی بیوتیک‌ها به حرارت و زایل شدن آن‌ها طی فرایند پخت می‌باشد (۷). آنتی بیوتیک‌ها از جمله مواد شیمیایی کاربردی در آبزی پروری هستند و گروهی از ترکیبات طبیعی یا مصنوعی هستند که با کشتن یا مهار رشد عوامل بیماری‌زا فعالیت می‌کنند. آنتی بیوتیک‌ها را می‌توان برای افزایش رشد و همچنین درمان و پیشگیری از بیماری‌ها استفاده کرد. آنتی‌بیوتیک ها از دهه ۱۹۴۰ در پزشکی حیوانات و بیش از ۵۰ سال در آبزی‌پروری مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۸). باوجود مزایای مختلف استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها؛ افزایش نگرانی‌ها درباره عوارض و اثرات جانبی منفی نگهدارنده‌های سنتزی برای سلامتی انسان، باعث افزایش گرایش و تمایل به استفاده از ترکیبات آلی و طبیعی (اصطلاحا مصرف سبز) شده است (۹). از طرفی، استفاده بیش از حد از سولفیت در نگهداری میگو توسط شرکت‌های فراوری مواد غذایی یک نگرانی عمده است. علاوه بر این، مصرف‌کنندگان نگرانی‌هایی در مورد تأثیر مواد افزودنی شیمیایی مصنوعی مانند آسم یا اثرات آسیب شناختی بر بدن انسان دارند. بنابراین، توسعه تکنیک‌های جایگزین که خطر سلامتی عمومی را به حداقل می رسانند، ضروری است (۱۰). با این وجود، توجه و علاقه نسبت به استفاده از ترکیبات زیستی، به‌ویژه ترکیبات استخراج شده از ماکروجلبک‌های دریایی به عنوان جایگزینی برای مواد سنتزی شیمیایی مطرح است (۱۱). جلبک‌های دریایی به دلایل داشتن خواص ضدباکتری، ضدقارچ و ضد ویروس و همچنین داشتن ترکیبات زیست‌فعال مانند کاروتنوئیدها، پلی‌ساکاریدها، پروتئین‌ها، اسیدهای چرب ضروری، ویتامین‌ها و مواد معدنی می‌توانند علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مقابله کنند. امروزه در زمینه‌های مختلف تحقیقاتی، توجه زیادی به خواص ضدمیکروبی ماکروجلبک‌ها شده است (۱۲). نایسین نیز می‌تواند به‌عنوان یکی از بهترین نگهدارنده‌های طبیعی در محصولات غذایی، جایگزین

ترکیبات شیمیایی شود. نایسین مشهورترین پپتید باکتریوسین و یک ماده کاتیونی آبگریز است که دارای اثرات ضد میکروب و ضداکسیدانی می‌باشد. این پپتید روی طیف وسیعی از باکتری‌ها موثر می‌باشد. استفاده از نایسین به تنهایی و در ترکیب با سایر روش‌های نگهداری مواد غذایی توانسته است به‌طور موثر از فعالیت میکروارگانیسم‌های عامل فساد و بیماری‌زا جلوگیری کرده و همچنین فعالیت موثری را نیز بر علیه فساد اکسیداسیونی نشان دهد (۱۳). با توجه به اینکه بلافاصله بعد از صید، روند افت کیفیت و فساد میگو شروع می‌شود به نظر می‌رسد که یخ‌گذاری مناسب و حفظ زنجیره سرد از لحظه صید، حین حمل و نقل و عرضه در بازار خرده فروشی و یا انتقال به مراکز فراوری ضروری می‌باشد. در این راستا، با توجه به مرور مطالعات انجام گرفته و نگرانی‌های مصرف‌کنندگان نسبت به عوارض و اثرات جانبی نگهدارنده‌های شیمیایی و مصنوعی، استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی در ترکیب یخ مورد استفاده برای یخ‌گذاری بتواند اثربخشی آن را افزایش دهد.

مواد و روش‌ها

گونه جلبک

جلبک *سارگاسوم تنریموم* (*Sargassum tenerrimum*) از منطقه بین جزر و مدی سواحل دریای عمان و خلیج فارس در زمان حداکثر جزر از سواحل خلیج فارس، جمع‌آوری شد و نمونه‌ها پس از شناسایی گونه توسط کارشناسان مربوطه، برای حذف گل و لای و دیگر مواد زائد شستشو و خشک شد. نمونه‌ها بعد از خشک کردن در آون، توسط آسیاب برقی به حالت پودری تبدیل شدند. در نهایت به صورت جداگانه داخل ظروف استریل بسته‌بندی و تا شروع آزمایش‌ها در فریزر با دمای ۲۰- °C نگهداری شدند (۱۴).

تهیه عصاره جلبک

مقدار ۵۰ gr پودر جلبک با ۱ lit آب مقطر مخلوط شد (نسبت ۱ به ۲۰). این سوسپانسیون در دمای ۲۵ °C با دور ۲۰۰ rpm به مدت ۲۴ h انکوبه و در مرحله بعد با دور ۳۵۰۰rpm به مدت ۱۰ min در دمای ۴ °C سانتریفیوژ شد. مایع‌رویی (عصاره) به وسیله کاغذ واتمن شماره ۱ فیلتر و توسط دستگاه فریزدرایر به پودر تبدیل شد. ماده ته‌نشین شده خشک و وزن شد. مرحله استخراج دوبار تکرار و عصاره‌های به‌دست آمده از مراحل فوق در دمای ۲۰- °C تا زمان آزمایش نگهداری شدند (۱۵).

بررسی اثر تیمارهای مختلف یخ بر حفظ کیفیت و افزایش ماندگاری میگو

میگوی وانامی (*Litopenaeus vannamei*) از استخرهای ۱/۸ هکتاری در مزرعه پرورشی سایت گمیشان واقع در استان گلستان از بین میگوهایی با اندازه و وزن یکسان تهیه شدند. در مرحله بعد پس از صید و شستشو میگوهای پرورشی در مزرعه به مدت ۲ دقیقه در محلول آب سرد (۱ °C تا ۱-) غوطه‌ور، سپس در مرحله بعد به تیمارهای مختلف از روش‌های نگهداری شامل تیمار A (نگهداری در یخ پودری (شاهد) با نسبت ۱/۱، یک لایه یخ و یک لایه میگو)، تیمار B (نگهداری در یخ پودری حاوی نایسین Z با غلظت ppm ۵)، تیمار C (نگهداری در یخ پودری حاوی آنتی بیوتیک آئرومایسین با غلظت ppm ۵) و تیمار D (نگهداری در یخ پودری حاوی عصاره جلبک با غلظت ppm ۵) در جعبه‌های یونولیتی تقسیم بندی شده و در یخچال با دمای ۴ °C به مدت ۱۲ روز نگهداری شدند. به منظور بررسی اثر نگهدارنده تیمارهای مختلف بر رشد باکتریایی؛ نمونه‌ها هر سه روز یکبار از جنبه شاخص‌های باکتریایی زیر ارزیابی شدند.

بررسی میزان بار میکروبی

نخست میزان ۵ gr از نمونه گوشت میگو تحت شرایط استریل با ۴۵ ml محلول سرم فیزیولوژی مخلوط و سپس همگن شد. در ادامه رقت‌های سریالی مورد نیاز تهیه و میزان ۱ ml از هرکدام از رقت‌ها جهت کشت و بررسی تعداد باکتری‌های موردنظر به شرح زیر استفاده شد.

باکتری‌های عامل فساد متداول (شوانلا و سودوموناس)

جهت کشت و بررسی بار باکتریایی عامل فساد متداول[1] از روش پور پلیت در محیط‌های کشت Muller Hinton agar استفاده شد. شمارش کلنی‌های باکتری پس از نگهداری در دمای ۳۰ °C به مدت ۲ روز انجام شد (۱۶).

بار باکتریایی سرمادوست

شمارش و ارزیابی بار باکتریایی سرمادوست در محیط‌های کشت Plate Count Agar انجام شد. پس از نگهداری پلیت‌ها در دمای ۷ °C به مدت ۱۰ روز انجام شد. شمارش کلنی‌های تشکیل شده انجام شد و تعداد کلنی‌ها در معکوس غلظت ضرب شد و در نهایت لگاریتم حاصل ضرب به‌عنوان داده نهایی گزارش شد (۱۶).

باکتری‌های لاکتیک اسید

بررسی باکتری‌های لاکتیک اسید به روش پور پلیت در محیط کشت MRS Agar انجام شد. شمارش کلنی‌ها پس از نگهداری در دمای ۳۷ °C به مدت ۲ روز انجام شد (۱۶).

باکتری‌های انتروباکتریاسه

ارزیابی باکتری‌های تیره انتروباکتریاسه[2] به روش پورپلیت در محیط‌های کشت Violet Red Bile glucose Agar انجام شد. کلنی‌های انتروباکتریاسه پس ازنگهداری پلیت‌ها در دمای ۳۰ °C به مدت ۲ روز شمارش و گزارش شدند (۵).

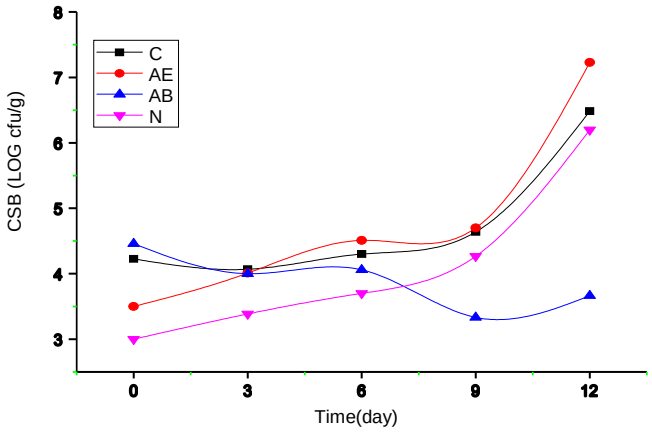
تجزیه وتحلیل آماری

تجزیه وتحلیل مقادیر کمی به‌دست آمده از آنالیزهای میکروبی با استفاده از تجزیه واریانس دوطرفه (Two-way ANOVA) توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۳ انجام شد. مقایسه‌های آماری در سطح اطمینان ۹۵٪ انجام شدند.

نتایج

بررسی بار باکتریایی عامل فساد متداول

در شکل ۱ نتایج مرتبط با آنالیز واریانس دو طرفه و شمارش بار باکتریایی عامل فساد متداول (CSB) میگوهای یخ‌گذاری شده تحت تیمارهای مختلف طی ۱۲ روز نگهداری در یخ ارائه شده‌است.



شکل ۱. مقادیر شمارش بارباکتریایی عامل فساد متداول (CSB) تیمارشاهد (C)، تیمار یخ حاوی عصاره جلبک (AE)، یخ حاوی آنتی‌بیوتیک آئرومایسین (AB)، یخ حاوی نایسین (N) طی ۱۲ روز نگهداری

[1] Common spoilage bacteria

[2] Enterobacteriaceae

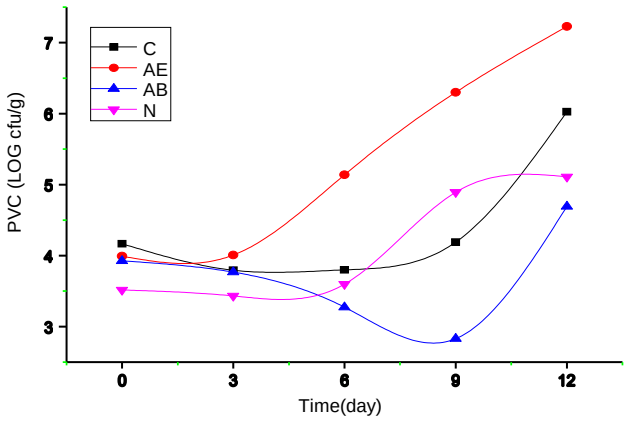
نتایج حاصل از تجزیه واریانس دوطرفه تیمارهای مختلف نشان داد که اثر زمان و تیمارهای مختلف و همچنین اثر متقابل زمان – تیمار بر تعداد باکتری‌های شمارش شده معنی‌دار است (p <0.05). این شاخص باکتریایی به منظور بررسی اثر تیمارهای مختلف بر رشد متداول‌ترین گروه‌های باکتری موجود در میگو نظیر Pseudomonas، Shewanella و Acinetobacter ارزیابی شد.

بررسی بار باکتریایی سرمادوست

در شکل ۲، اطلاعات مرتبط با شمارش باکتری های سرمادوست[1] (PVC) تیمارهای مختلف طی مدت ۱۲ روز نگهداری در یخ ارائه شده است. نتایج حاصل از تجزیه واریانس دوطرفه تیمارهای مختلف نشان داد اثر زمان و تیمارهای مختلف و همچنین اثر متقابل زمان–تیمار بر تعداد باکتری‌های شمارش شده معنی‌دار است (p< 0.01). در روز صفر اختلاف کمی بین تیمارهای مختلف وجود داشت به‌طوری‌که کمترین میزان این شاخص در تیمار حاوی نایسین Z و در حدود Log_{10} cfu/g ۳/۵۳ مشاهده شد.

بررسی تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک

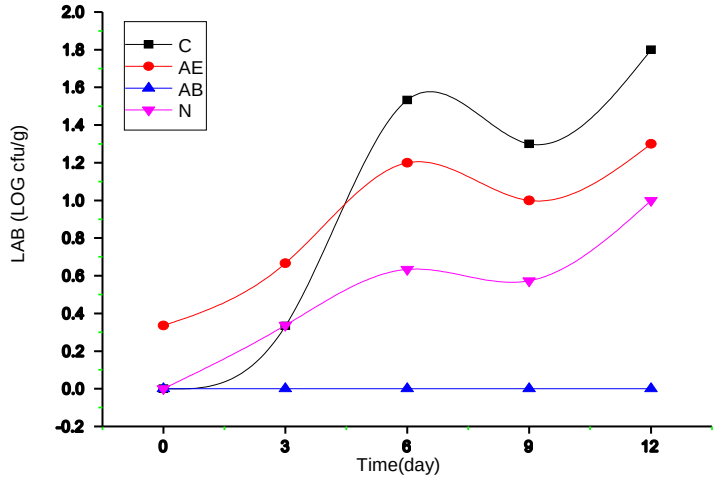
آنالیز آماری و همچنین نمودار منعکس کننده آهنگ رشد باکتری‌های لاکتیک اسید[2] (LAB) تیمارهای مختلف طی ۱۲ روز نگهداری در شکل ۳ نشان داده شده است. نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که اثر زمان و تیمارهای مختلف و همچنین اثر متقابل زمان–تیمار بر تعداد باکتری های شمارش‌شده معنی‌دار است و p-value در مقادیر بسیار پایین و شاخص F میزان بالایی را نشان داد (p < 0.05). در روز صفر اختلاف چشمگیری بین تیمارهای مختلف مشاهده شده‌است. سه تیمار شاهد، نمونه‌های حاوی آنتی بیوتیک و نایسن z در این روز کلنی تشکیل نداده و در میزان صفر مشاهده شدند. تیمار حاوی عصاره جلبک در روز صفر Log_{10} cfu/g ۰/۳۳ مشاهد شد. با طی شدن روزهای نگهداری مقادیر تیمارهای مختلف رو تغییر کرد و در این روند تیمارهای مختلف با یکدیگر اختلاف نشان دادند.



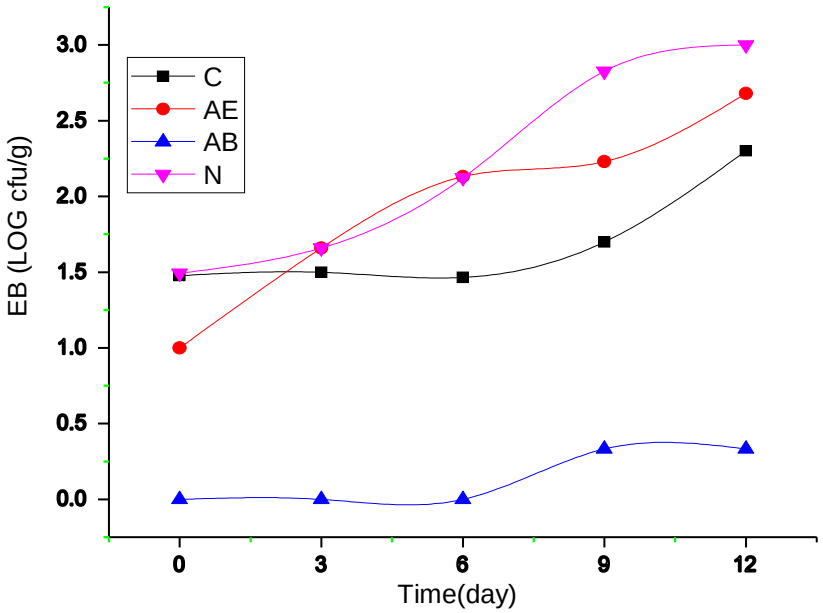
شکل ۲. مقادیر شمارش باکتری‌های سرمادوست (PVC) تیمار شاهد (C)، تیمار یخ حاوی عصاره جلبک (AE)، یخ حاوی آنتی‌بیوتیک آئرومایسین (AB)، یخ حاوی نایسین (N) طی ۱۲ روز نگهداری

[1] psychrophilic viable count

[2] Lactic acid bacteria



شکل ۳. مقادیر شمارش باکتری‌های اسیدلاکتیک (LAB) تیمار شاهد (C)، یخ حاوی عصاره جلبک (AE)، یخ حاوی آنتی‌بیوتیک آئرومایسین (AB)، یخ حاوی نایسین (N) طی ۱۲ روز نگهداری



شکل ٤. مقادیر شمارش انتروباکترهای (Enterobacteriaceae (EB)) تیمار شاهد (C)، یخ حاوی عصاره جلبک (AE)، یخ حاوی آنتی‌بیوتیک آئرومایسین (AB)، یخ حاوی نایسین (N) طی ۱۲ روز نگهداری

بررسی تعداد باکتری‌های انتروباکتریاسه

نتایج مرتبط با بررسی میزان انتروباکترهای شمارش شده از میگوهای نگهداری شده تحت اثر تیمارهای مختلف طی روزهای مختلف نگهداری در شکل ۴ نشان داده شده است.

بحث

در شکل ۱نتایج مرتبط با آنالیز واریانس دو طرفه و شمارش بار باکتریایی عامل فساد متداول (CSB) میگوهای یخ‌گذاری شده تحت تیمارهای مختلف طی ۱۲ روز نگهداری در یخ ارائه شده‌است. نتایج حاصل از تجزیه واریانس دوطرفه تیمارهای مختلف نشان داد که اثر زمان و تیمارهای مختلف و همچنین اثر متقابل زمان – تیمار بر تعداد باکتری‌های شمارش شده معنی‌دار است ($p < ۰/۰۵$).

این شاخص باکتریایی به منظور بررسی اثر تیمارهای مختلف بر رشد متداول‌ترین گروه‌های باکتری موجود در میگو نظیر *Pseudomonas*، *Shewanella* و *Acinetobacter* ارزیابی شد. شیوانلا و سودوموناس دوگروه باکتریایی گرم مثبت می‌باشند که نقش عمده‌ای در فساد فراورده‌های دریایی بازی می‌کنند (۱۷). در روز صفر اختلاف قابل ملاحظه‌ای بین تیمارهای مختلف مشاهده شد به‌طوری که تیمار شاهد و حاوی آنتی‌بیوتیک آئرومایسین نسبت به دو تیمار نایسین و عصاره جلبک دارای مقادیر بالاتری از این شاخص باکتریایی بودند. در طول زمان، روند تغییرات تیمارهای مختلف به شکل‌های متفاوت پیش رفت به طوری که تیمار حاوی آنتی‌بیوتیک به‌طورکلی روند کاهشی نشان داد و از ۴/۴۶ Log_{10} cfu/g در روز صفر به کمترین میزان خود (۳/۶۶ Log_{10} cfu/g) در روز ۱۲ رسید. این شاخص در سه تیمار دیگر روند افزایشی نشان داد و در هر سه تیمار در روز ۱۲ به بالاترین میزان خود رسید. در بررسی جزئی‌تر مشهود است که نایسن Z در مقایسه با تیمار شاهد روند افزایش شمار باکتری را در طول زمان کاهش داده و تا حدودی اثر نگهدارندگی نشان داد. یخ پودری حاوی عصاره جلبک در این رابطه تاثیر قابل ملاحظه‌ای نشان نداد و روندی تقریبا مشابه با تیمار شاهد داشت و در روز ۱۲ نگهداری به بالاتر از میزان مجاز تعیین شده (۷ log CFU/g) برای آبزیان رسید (۱۸). در این رابطه Sharifian و همکاران (۲۰۱۹) نتایج متفاوتی در رابطه با بررسی اثر عصاره جلبک گونه *Sargassum tenerimum* حاوی ماده فلورانتین در غلظت‌های مختلف بر رشد باکتری‌های مزوفیل و سرمادوست میگو ارائه دادند. در این مطالعه آهنگ افزایش باکتری‌های مزوفیل میگوی‌های تیمارشده با غلظت ۵٪ از عصاره جلبک کاهش یافت. به‌طورکلی مکانیسم عمل عصاره‌های حاصل از ماکروجلبک‌های دریایی بر باکتری‌ها ناشناخته است. این تفاوت احتمالا می تواند منشاءگونه جلبک مورد استفاده در پژوهش و همچنین روش و شرایط گوناگون مورد استفاده در استخراج عصاره جلبک نیز مرتبط باشد (۱۹). Zhao و همکاران(۲۰۲۰) اثر مثبت نایسین بر جلوگیری از رشد باکتری *L. monocytogenes* تلقیح شده بر میگوی وانامی (*Litopenaeus vannamei*) را گزارش کردند. در این مطالعه اثر نگهدارندگی نایسین بر تاثیر آن بر اسیدهای چرب فسفولیپیدهای غشا، و تشکیل منافذ در آن نسبت داده شده است. در پژوهش حاضر نیز تیمار نایسین در مقایسه با تیمار شاهد میزان باکتری‌های متداول عامل فساد کمتری داشت و با توجه به اینکه این باکتری‌ها عمدتا گرم مثبت می‌باشند می‌توان نتایج پژوهش حاضر را همسو با یکدیگر دانست (۲۰).

در شکل ۲، اطلاعات مرتبط با شمارش باکتری‌های سرمادوست (PVC) تیمارهای مختلف طی مدت ۱۲ روز نگهداری در یخ ارائه شده است. نتایج حاصل از تجزیه واریانس دوطرفه تیمارهای مختلف نشان داد اثر زمان و تیمارهای مختلف و همچنین اثر متقابل زمان–تیمار بر تعداد باکتری‌های شمارش شده معنی‌دار است ($p<0.01$). در روز صفر اختلاف کمی بین تیمارهای مختلف وجود

داشت به طوری‌که کمترین میزان این شاخص در تیمار حاوی نایسین Z و در حدود ۳/۵۳ Log_{10} cfu/g مشاهده شد. در طول زمان روند تغییرات تیمارهای مختلف به شکل‌های متفاوت پیش رفت؛ به نحوی که طبق انتظار تیمار حاوی آنتی‌بیوتیک تا روز نهم روند کاهشی شدید نشان داد و به کمترین میزان خود رسید. از روز نهم به بعد این تیمار افزایش نشان داد و در نهایت به Log10 cfu/g ۴/۶۹ در روز ۱۲ رسید. این نتایج حاکی از اثر نگهدارنده قوی و پایدار این آنتی‌بیوتیک برکنترل میزان رشد باکتری های سرمادوست دارد. این شاخص در سه تیمار دیگر به طورکلی روند افزایشی نشان داد. بالاترین میزان شیب افزایش در تیمار حاوی عصاره جلبک مشاهده شد به طوری که این شاخص از روز سوم به بعد به شکل چشم گیری افزایش یافت و به بالاترین حد خود و همچنین بیشترین میزان در قیاس با دیگر تیمارها (Log_{10} cfu/g ۷/۲۲) در روز ۱۲ نگهداری رسید که این نتیجه حکایت از فقدان توانایی عصاره این نوع از ماکروجلبک بر کنترل روند رشد باکتری‌های سرمادوست در میگوی وانامی (*Litopenaeus vannamei*) دارد.افزایش تعداد این شاخص باکتریایی در محصولات گوشتی نگهداری‌شده در شرایط سرد به رشد باکتری‌های سرمادوستی نظیر *Pseudomonas spp*. و *Carnobacterium spp* نسبت داده می‌شود (۲۱). نتایج مطالعه حاضر مبنی بر عدم اثربخشی یخ حاوی عصاره جلبک سارگاسوم بر مهار باکتری‌های سرمادوست با نتایج مطالعه Sharifian و همکاران (۲۰۱۹) که تاثیر گذاری این جلبک‌ها را گزارش کردند، متناقض می‌باشد (۲۰۱۹). دلیل این امر را می‌توان به غلظت پایین عصاره مورد استفاده در پژوهش حاضر و نیز تفاوت در روش عصاره‌گیری، ترکیب شیمیایی متفاوت گونه جلبکی بسته به فصل، منطقه جغرافیایی نسبت داد. با توجه به شکل ۲، تیمار حاوی نایسن Z در مقایسه با شاهد روند افزایش شمار باکتری را تا روز ۹ نگهداری کاهش داده و تا حدودی اثر نگهدارندگی نشان داد. در زمان‌های پایانی نگهداری (از روز ۹ به بعد) از اثر نایسین Z کاسته شده و تعداد باکتری های سرمادوست میگوهای این تیمار افزایش یافت و روندی مشابه با تیمار شاهد نشان داد. در این رابطه نتایج مشابهی توسط Lu و همکاران (۲۰۱۰)گزارش شد که اثر پوشش آلژینات-کلسیم حاوی نایسین را بر افزایش ماندگاری فیله تازه ماهی سرماری (*northern snakehead fish*) گزارش کردند (۲۲).

با توجه به شکل ۳، در تیمار حاوی آنتی‌بیوتیک تا پایان زمان نگهداری مطلقا اثری از رشد این نوع از باکتری مشاهده نشد که نشان از تاثیر قابل توجه و معنی دار این آنتی‌بیوتیک بر رشد این کلاس از باکتری‌ها دارد. تندترین شیب افزایش در تیمار شاهد مشاهده شد به گونه‌ای که پس از بروز شیب کاهشی ناچیز مابین روزهای ۶ و ۹ به بالاترین حد خود و همچنین بالاترین میزان در قیاس با دیگر تیمارهای در روز ۱۲ رسید (۱/۸۴ Log_{10} cfu/g). دو تیمار نایسین z و عصاره جلبک در طی زمان نگهداری با حالتی کاملا مشابه و با اختلافی در حدود ۰/۴ Log_{10} cfu/g نسبت به یکدیگر افزایش یافتند و پس از دوازده روز به ترتیب به حدود Log_{10} ۱/۳۳ cfu/g و ۱ Log_{10} cfu/g رسیدند. نکته جالب و قابل ملاحظه در این تست شیب منفی مشاهده شده در روند رشد باکتری مابین روزهای ۶ و ۹ می‌باشد. این فرایند در تمامی تیمارهای شاهد، نایسین z و عصاره جلبک مشاهده شد. این پدیده را به نوعی می‌توان تغییرات پدیدار شده در محیط کشت باکتری طی زمان رشد نسبت داد. بدین شکل که احتمالا در طی روزهای نگهداری؛ باکتری‌ها با ترشح لاکتیک اسید و متعاقبا کاهش pH محیط و همچنین ترشح باکتریوسین‌ها؛ محیط رشد را نامساعد و رقابتی کرده و و بدین‌وسیله شرایط را به نفع تیمارهای نگهدارنده تغییر داده‌اند و سبب کاهش آهنگ رشد باکتری شده‌اند. در این رابطه نقش نگهدارندهگی باکتری‌های لاکتیک‌اسید در فراورده‌های دریایی مورد ارزیابی و تایید قرارگرفته است (۲۳). اما در

مورد گروه انتروباکتریاسه بعنوان یک شاخص بهداشتی در مواد غذایی و همچنین بخشی از فلور میکروبی عامل فساد در آبزیان پرورشی و دستکاری شده توسط انسان مطرح هستند (۱۶). بررسی وجود این باکتری‌ها در موادغذایی از جمله فراورده‌های شیلاتی حیاتی است، چرا که این خانواده بسیاری از باکتری‌های بیماری‌زا نظیر سالمونلا را در بر می‌گیرد که در صورت مصرف موادغذایی آلوده به آن سلامتی فرد مصرف‌کننده به طور جدی در معرض خطر قرار می‌گیرد. محققان دلیل حضور این نوع از باکتری ها را در آبزیان با عواملی نظیر صید از مناطق آلوده، تاخیر در یخ گذاری آبزیان صید شده و همچنین شرایط بهداشتی نامناسب پس از صید و زمان نگهداری مرتبط دانسته‌اند (۲۴). در واقع پتانسیل ایجاد فساد توسط این باکتری ها بویژه در موارد آب آلوده و یا به تاخیر افتادن سردسازی آبزیان پس از صید می‌بایست مدنظر قرار گیرد. این باکتری‌ها در زمان نگهداری ترکیباتی مانند تری‌متیل‌آمین، سولفیدهیدروژن، کتون‌ها، استرها، آلدهیدها، هیپوگزانتین و اسید تولید می‌کنند (۲۶و۱۸). با توجه به شکل ۴، پایین بودن این شاخص در بررسی روز صفر تیمارهای مختلف نشان دهنده کیفیت مناسب بهداشتی فیله‌ها در اثر کیفیت مناسب زنجیره انتقال و نگهداری میگو است. تیمار حاوی آنتی‌بیوتیک طبق انتظار و مشابه شاخص‌های باکتریایی قبل، کمترین میزان را در روز صفر و همچنین طی دوران نگهداری نشان داد. این پدیده نشان از تاثیر قوی و کارآمد این ترکیب بر ممانعت از رشد این کلاس از باکتری دارد. در این تیمار شاخص باکتریایی انتروباکتریاسه تا روز ششم نگهداری در میزان صفر حفظ شده و پس از آن تا روز ۱۲ به حدود Log_{10} ۰/۳۳ cfu/g رسید. سه تیمار شاهد، نایسین z و عصاره جلبک میزان بالاتری را در روز صفر نگهداری نشان دادند. آهنگ افزایش این شاخص باکتریایی در ادامه روزهای نگهداری در این تیمارها به شکل متفاوت دنبال شد به نحوی که در روز نهایی نگهداری بالاترین مقدار در تیمار حاوی نایسین z و عصاره جلبک و به ترتیب در حدود Log_{10} cfu/g ۳/۰۱ و Log_{10} cfu/g ۲/۶۸ مشاهده شد. این مقادیر به شکل معنی دار نسبت به تیمار شاهد بیشتر بودند که بیان کننده عدم تاثیر مثبت این تیمارها بر کند کردن آهنگ رشد این کلاس از باکتری در میگوهای نگهداری شده در شرایط یخ‌گذاری و نگهداری سرد می‌باشد.

در مجموع می‌توان عنوان کرد نتایج مطالعه حاضر نشان داد که اثر نگهدارندگی آنتی‌بیوتیک آئرومایسن بر شاخص‌های میکروبی اندازه‌گیری شده به طور قابل ملاحظه‌ای بیشتر از دیگر تیمارهای اعمال شده بود و نایسین نیز اثرات نسبی بر کاهش بار باکتریایی نشان داد، اما عصاره جلبک فاقد تاثیر ضدباکتریایی بود. گزارش شده است که آنتی‌بیوتیک‌های کلروتتراسایکلین و اکسی کلروتتراسایکلین در مقابل حرارت حساس هستند و حین فرایندهای حرارتی پخت و پز مواد غذایی، تقریبا بی اثر می‌شوند. بنابراین میزان انتشار آنتی بیوتیک‌ها طی نگهداری در یخ به داخل بافت آبزیان و همچنین میزان پایداری آنها در مقابل حرارت، شرایط نگهداری و فراوری در فراورده‌های گوشتی و به خصوص گوشت آبزیان مهم تلقی می‌شود. در صورت خنثی شدن این آنتی بیوتیک طی شرایط پخت و پز و فراوری، استفاده از آئرومایسین در ترکیب یخ برای حمل و نگهداری آبزیان به ویژه میگو توصیه شود.

نتیجه‌گیری

نتایج آزمون‌های مختلف میکروبی نشان داد که اعمال یخ‌گذاری با یخ پودری حاوی عصاره جلبک سارگاسوم در مقایسه با یخ پودری خالص تاثیر چندانی از جنبه افزایش مدت ماندگاری و کنترل عوامل فساد میکروبی نداشت. یخ پودری حاوی نایسین Z توانست روند رشد باکتری‌ها طی زمان نگهداری را تا حدود زیادی

کنترل کرده و مدت ماندگاری میگوها را تا حد قابل قبولی افزایش دهد. موثرترین تیمار در این آزمایش یخ پودری حاوی آنتی‌بیوتیک آئرومایسین بود که روند فساد در تمامی موارد را به مقدار چشم‌گیری کاهش داد و آنها را تا پایان دوره نگهداری تقریبا در حدود صفر نگه داشت. طبق نتایج موثرترین تیمار طبیعی جهت نگهداری و حفظ کیفیت میگو را می‌توان یخ پودری حاوی نایسین Z عنوان کرد. بنابراین فرضیه اول و دوم پذیرفته شده، اما فرضیه سوم و چهارم رد می‌شود.

منابع

1-FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture -Meeting the sustainable development goals. 2018.

2-Tocher DR, Betancor MB, Sprague M, Olsen RE, Napier JA. Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids, EPA and DHA: bridging the gap between supply and demand. Nutrients. 2019; 11(1):89.

3-Perashideh N, Alizadeh Doughikolaei A, Mohammadi M. The effect of freezing time on the quality of farmed Vanami shrimp. Journal of Food Science and Industry. 2015; 12(8):1-12.

4-Vatandoost A. Corruption control and shrimp storage methods. The first national conference of new technologies in science and food industries and tourism in Iran. 2017.

5-Gómez-Estaca J, López de Lacey A, López-Caballero ME, Gómez-Guillén MC, Montero P. Biodegradable gelatin-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. Food Microbiology. 2010. 27:889–896.

6-Salgado PR, López-Caballero ME, Gómez-Guillén MC, Mauri AN, Montero MP. Sunflower protein films incorporated with clove essential oil have potential application for the preservation of fish patties. Food Hydrocolloids. 2013; 33(1):74-84.

7-Chari ST. Use of aureomycin in fish preservation and effect of heat on the antibiotic-treated fish. InProceedings of the Indian Academy of Sciences-Section B. Springer India. 1961; 53(4):173-181.

8-Lulijwa R, Rupia EJ, Alfaro AC. Antibiotic use in aquaculture, policies and regulation, health and environmental risks: a review of the top 15 major producers. Reviews in Aquaculture. 2020; 12(2):640-663.

9-Arafat A, Samad SA, Masum SM, Moniruzzaman M. Preparation and characterization of chitosan from shrimp shell waste. International journal of scientific & engineering research. 2015; 6(5):538-541.

10-Liang ZR, Hsiao HI, Jhang DJ. Synergistic antibacterial effect of nisin, ethylenediaminetetraacetic acid, and sulfite on native microflora of fresh white shrimp during ice storage. Journal of Food Safety. 2020; 40(4):e12794.

11-Al-Haj NA, Mashan NI, Shamsudin MN, Mohamad H, Vairappan CS, Sekawi Z. Antibacterial activity in marine algae Eucheuma denticulatum against Staphylococcus aureus and Streptococcus pyogenes. Research Journal of Biological Sciences 2009; 4(4):519-524.

12-Ahmad B, Shah M, Choi S. Oceans as a source of immunotherapy. Marine druges. 2019; 17(5):282.

13-Abdollahzadeh E, Rezaei M, Hosseini H. Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control Listeria monocytogenes inoculated in minced fish meat. Food control. 2014; 35(1):177-183.

14-Sánchez-Machado DI, López-Cervantes J, Lopez-Hernandez J, Paseiro-Losada P. Fatty acids, total lipid, protein and ash contents of processed edible seaweeds. Food chemistry. 2004; 85(3): 439-444.

15-Fleurence J, Le Coeur C. Influence of mineralization methods on the determination of the mineral content of the brown seaweed Undaria pinnatifida by atomic absorption spectrophotometry. Hydrobiologia. 1993; 260(1):531-534.

16-Jouki M, Yazdi FT, Mortazavi SA, Koocheki A. Quince seed mucilage films incorporated with oregano essential oil: Physical, thermal, barrier, antioxidant and antibacterial properties. Food Hydrocolloids. 2014; 36:9–19.

17-Cen S, Fang Q, Tong L, Yang W, Zhang J, Lou Q, Huang T. Effects of chitosan-sodium alginate-nisin preservatives on the quality and spoilage microbiota of Penaeus vannamei shrimp during cold storage. International Journal of Food Microbiology, 349, 109227.

18-Ibrahim Sallam K. Antimicrobial and antioxidant effects of sodium acetate, sodium lactate, and sodium citrate in refrigerated sliced salmon. Food Control. 2007; 18(5):566–575.

19-Sharifian S, Shabanpour B, Taheri A, Kordjazi M. Effect of phlorotannins on melanosis and quality changes of Pacific white shrimp (Litopenaeus vannamei) during iced storage. Food Chemistry. 2019; 298:124980.

20-Zhao X, Chen L, Zhao L, He Y, Yang H. Antimicrobial kinetics of nisin and grape seed extract against inoculated Listeria monocytogenes on cooked shrimps: Survival and residual effects. In Food Control. 2020; 115:107278.

21-Xiong Y, Chen M, Warner RD, Fang Z. Incorporating nisin and grape seed extract in chitosan-gelatine edible coating and its effect on cold storage of fresh pork. Food Control. 2020; 110:107018.
22-Lu F, Ding Y, Ye X, Liu D. Cinnamon and nisin in alginate-calcium coating maintain quality of fresh northern snakehead fish fillets. LWT - Food Science and Technology. 2010; 43(9):1331–1335.
23-Caglak E, Cakli S, Kilinc B. Microbiological, chemical and sensory assessment of mussels (Mytilus galloprovincialis) stored under modified atmosphere packaging. In European Food Research and Technology. 2008; 226(6):1293–1299.
24-Jeevanandam K, Kakatkar A, Doke SN, Bongirwar DR, Venugopal V. Influence of salting and gamma irradiation on the shelf-life extension of threadfin bream in ice. Food Research International. 2001; 34(8):739–746.
25-Papadopoulos V, Chouliara I, Badeka A, Savvaidis IN, Kontominas MG. Effect of gutting on microbiological, chemical, and sensory properties of aquacultured sea bass (Dicentrarchus labrax) stored in ice. Food Microbiology. 2003; 20(4):411–420.
26.Gram L, Huss HH. Microbiological spoilage of fish and fish products. International Journal of Food Microbiology. 1996; 33(1):121–137

Effect of *Sargassum tenerrimum* extract, nisin z and aureomycin antibiotic on bacterial growth of *Litopenaeus vannamei* during ice storage

Shaghayegh kahnamuee[1], **Moazameh Kordjazi[1*]**, Mehdi Zolfaghari[1], Mohammad Khezri[2]

[1]Faculty of Fisheries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran.
[2]National Artemia Research Center, Orumieh, Iran.

Abstract

Seafood due to high water activity, neutral pH, high ratio of free amino acids are involved in microbial spoilage and consequently their quality and shelf life are reduced. In this study, the preservative effect of powdered ice in four forms of pure and combined with Sargassum tenerrimmum algae extract, aeromycin antibiotic and nisin-z on increasing the shelf life of Vanami shrimp during 12 days of storage in refrigeration was evaluated. Shrimps were prepared from Gomishan Breeding Center and all experiments were performed in the Faculty of Fisheries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources. Shrimp covered with ice were evaluated every 3 days by measuring the microbiological characteristics of Common spoilage bacteria (CSB), Psychrophilic bacteria (PSB), Lactic acid bacteria (LAB) and Enterobacteriaceae (EB). The fastest deterioration trend of all bacterial analyzes was observed in the control and algae extract samples and these two treatments showed the highest increase at the end of storage time (p <0.05). Ice containing nisin z had a relatively good preservative effect on CSB, LAB, and PSB, but was ineffective against EB. The antibiotic aeromycin showed a significant inhibitory effect, so that the growth of EB and LAB during the storage time was close to zero. CSB and PSB had also similar conditions in this treatment and even decreased during storage.

KeyWords: Shrimp, Ice, Seaweed extract, Antibiotic, Nisin-z

* kordjazi@gau.ac.ir