



# کاربرد وزیکول‌های پروبیوتیک *Bacillus licheniformis* به عنوان عامل ضدباکتریایی طبیعی جهت افزایش کیفیت فیله ماهی قزل‌آلای رنگین کمان

مجید طاهرپور<sup>۱</sup>، لاله رومیانی<sup>۲\*</sup>، هومن رجبی‌اسلامی<sup>۳</sup>، مهدی شمسایی مهرجان<sup>۳</sup>

۱. دانشجوی دکتری شیلات، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲. دانشیار گروه شیلات، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران

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

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۴/۱۰

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۲۸

## چکیده

در این مطالعه کاربرد وزیکول‌های خارج سلولی پروبیوتیک *Bacillus licheniformis* جهت افزایش کیفیت فیله ماهی قزل‌آلای رنگین کمان مورد بررسی قرار گرفت. وزیکول‌های پروبیوتیک با استفاده از روش اولتراسانتریفیوژ جداسازی شدند. تفاوت معنی‌داری در تعداد وزیکول‌های مشتق شده از پروبیوتیک بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون وجود داشت، به شکلی که ۱۶ ساعت بعد از انکوباسیون، تعداد سلول‌ها تا  $8/09 \times 10^8$  Log CFU/mL افزایش پیدا کرد، سپس روند تقریباً ثابتی داشت ( $P < 0/05$ ). نتایج نشان داد که pH تا ۲۴ ساعت روند کاهشی داشت و به ۴/۰۰۲ رسید. وزیکول‌های پروبیوتیک *B. licheniformis* به‌منظور تأیید فعالیت ضد باکتریایی با غلظت‌های  $10^{11}$  -  $10^7$  وزیکول در هر میلی‌لیتر، در معرض باکتری *Shewanella putrefaciens* قرار گرفتند و  $10^{11}$  وزیکول در هر میلی‌لیتر، با ۴۴/۳۴ درصد بالاترین قدرت مهار رشد باکتری را داشت. فیله ماهی بعد از پوشش دادن با وزیکول‌های مشتق شده از پروبیوتیک و سدیم اریتورات ۰/۵ درصد به مدت ۵ روز نگهداری و سپس شاخص‌های فرمزی و شاخص‌های کیفیت فیله آن مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که شاخص‌های کیفیت ماهی شامل پراکسید (PV)، بازهای نیتروژنی آزاد فرار کل (TVBN)، باکتری‌های کل فیله (TVC) و تیوباربتیوریک اسید (TBA) در دو گروه دریافت‌کننده وزیکول‌های مشتق شده از پروبیوتیک با دوزها یا میزان بالا ( $10^{11}$  وزیکول در هر میلی‌لیتر) و متوسط ( $10^{10}$  وزیکول در هر میلی‌لیتر) مقادیر پایین‌تری در مقایسه با گروه شاهد و گروه با دوز پایین ( $10^9$  وزیکول در هر میلی‌لیتر) داشت. با توجه به نتایج این مطالعه وزیکول‌های غشایی جدا شده از پروبیوتیک *B. licheniformis* می‌توانند به عنوان یک عامل ضد باکتریایی برای افزایش ماندگاری فیله ماهی مطرح باشند.

واژگان کلیدی: *Bacillus licheniformis*، وزیکول خارج سلولی، *Shewanella putrefaciens*، فیله قزل‌آلای رنگین کمان، ماندگاری



## Application of *Bacillus licheniformis* probiotic vesicles as a natural antibacterial to improve the quality and safety of rainbow trout fillets

Majid Taherpour<sup>1</sup>, Laleh Roomiani<sup>2\*</sup>, Housman Rajabi Islami<sup>3</sup>, Mehdi Shamsaie Mehrgan<sup>3</sup>

1. Ph.D. Student, Department of Fisheries, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2. Associate Professor, Department of Fisheries, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran

3. Associate Professor, Department of Fisheries, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received: 19-Jul-2022

Accepted: 01-Jul-2023

### Abstract

Bacteria release membrane vesicles into the extracellular environment but their activity is unknown. In this study, the use of extracellular vesicles isolated from the probiotic *Bacillus licheniformis* to protect rainbow trout fillets against spoilage and reduce of fillet quality was investigated. The probiotic *B. licheniformis* was isolated from edible fish. Probiotic vesicles were also made using the ultracentrifuge protocol. There was a significant difference in the size of probiotic-derived vesicles after 8, 24 and 48 hours of incubation. The results showed that after incubation until 16 hours, the number of cells increased to  $8.09 \times 10^8$  CFU / ml. The pH reduced and reached to 4.002 at 24:00, which was the best incubation time for the bacterial growth. The vesicles derived from the probiotic *B. licheniformis* were collected and exposed to *Shewanella putrefaciens* at a concentration of  $10^{11}$ - $10^7$  vesicles per ml to confirm the antibacterial activity at  $10^{11}$ - $10^6$  vesicles per ml. MI, with 44.34% had the highest inhibitory power of bacterial growth. Finally, rainbow trout stored at 4 ° C after covering with vesicles derived from probiotics and 0.5% sodium erythorbate were stored for 5 days, followed by red markers and Fillet quality indicators were examined. The results showed that the freshness and quality indicators of fish including peroxide, TVBN, total count of fillet bacteria and thiobarbituric acid in the group receiving probiotic-derived vesicles were lower than control group and the low-dose vesicle-derived group. Of probiotics. According to the results of this study, membrane vesicles isolated from the probiotic *B. licheniformis* have the potential for use in the food and storage industries while maintaining the appearance of fillets, and this new substance is a beneficial antibacterial agent for a long time and increase the longevity of fish fillets.

**Keywords:** *Bacillus licheniformis*, Extracellular vesicles, *Shewanella putrefaciens*, Rainbow trout fillet, Shelf life

## ۱. مقدمه

یا اتمسفر کنترل شده است که هر چند ماندگاری فیله را افزایش می‌دهند، اما به نظر می‌رسد این تأثیر کوتاه باشد (Hamre et al., 2022). باکتری‌های عامل فساد کیفیت فیله ماهی را کاهش داده و سبب تولید هیستامین و تغییر رنگ می‌شوند. مطالعات نشان می‌دهد که باکتری‌های *Enterobacter aerogenes* (Lee et al., 2012) و *Raoultella ornithinolytica* (Lin et al., 2016) و *Hafnia alveli* (Kung et al., 2009) میزان تولید هیستامین را در ماهی افزایش می‌دهند. فساد ماهی با تولید تری‌متیل آمین عمدتاً توسط *Shewanella putrefaciens* ایجاد می‌شود (Gram and Huss, 2000) که یکی از باکتری‌های مهم در جریان فساد ماهی است. *Shewanella* یک باسیل گرم منفی بی‌هوازی و ساپروفیت است که با بروز عفونت‌های فرصت‌طلب در ارتباط است. بیشتر گزارش‌های مرتبط با عفونت با منشأ این بیماری به مصرف‌کنندگان غذاهای دریایی مرتبط‌اند. اخیراً، گزارش‌های مرتبط با عفونت *Shewanella* به‌خصوص در نواحی آسیا و تایلند در حال افزایش است (Gram and Huss, 2000). از این‌رو با توجه به اهمیت افزایش ماندگاری فرآورده‌های گوشتی و نیز ضرورت افزایش مقاومت این مواد غذایی به رشد باکتری‌های عفونت‌زا، این مطالعه به‌عنوان کاری جدید و با هدف، ارزیابی ایمنی توسط وزیکول‌های مشتق‌شده از پروبیوتیک *Bacillus licheniformis* در برابر فساد و کاهش کیفیت فیله قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) انجام شده است.

## ۲. مواد و روش‌ها

### ۲.۱. جداسازی پروبیوتیک *B. licheniformis*

پروبیوتیک *B. licheniformis* به‌صورت پودر خشک و از شرکت پروتکسین آکواتک تهیه شد. این پروبیوتیک حاوی ۱۰<sup>۱۰</sup> واحد تشکیل‌دهنده کلنی بر گرم است و براساس روش توصیه‌شده این شرکت با استفاده از شوک

وزیکول‌های خارج سلولی (EVs<sup>۱</sup>) ساختارهایی مبتنی بر غشاء هستند که اندازه آن‌ها بین ۳۰ تا ۱۰۰۰ نانومتر است (Zhao et al., 2021) و می‌توانند انواع مختلفی از اجزاء سلولی شامل لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک را حمل کنند (Johnstone, 2005). به‌دلیل اینکه این وزیکول‌ها حاوی مولکول‌های زیستی هستند، بعد از رسیدن به سلول‌های هدف موجب تغییرات در سرنوشت و عملکرد آن سلول‌ها می‌شوند. اخیراً، مشخص شده است که این وزیکول‌ها توانایی محافظت از دستگاه گوارش (Liao and Lonnerdal, 2017)، تنظیم سلول‌های روده (Mu et al., 2014) و ارتقاء سلامت فیزیولوژیک (Otsuka et al., 2018) را نیز دارند. باسیلوس‌ها باکتری‌های ساپروفیت گرم‌مثبت، غیربیماری‌زا هستند که با تحریک سیستم ایمنی ترشح ایمونوگلوبولین A را افزایش داده و به‌عنوان یک عامل میتوزنیک عمل می‌کنند (Green et al., 1999). *Bacillus licheniformis* سویه پروبیوتیک دارای آندواسپور است که از طریق تولید لیپوپپتید حلقوی، فعالیت ضدباکتریایی دارد (Lin et al., 2019; Horng et al., 2019). همچنین این باکتری نرخ رشد سلول را از طریق افزایش محتوی ریزوبیوم‌ها افزایش می‌دهد (Kwon et al., 2021). سورفاکتین مشتق شده از این پروبیوتیک، لیپوپپتید ضد باکتریایی است (Thaniyavam et al., 2019). محصولات تخمیری ناشی از این پروبیوتیک به‌علت سورفاکتین از بیماری و فساد جلوگیری کرده و عملکرد رشد در جوجه‌های گوشتی را بهبود داده‌اند (Yu et al., 2020).

قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) یک گونه با اهمیت اقتصادی بالا در سراسر دنیا است که به‌دلیل تغییرات شیمیایی و میکروبی در طول نگهداری ماندگاری کمی دارد (Lutfi et al., 2022). روش‌های معمول افزایش ماندگاری برای این ماهی شامل انجماد و

<sup>1</sup>Extracellular vesicles

حرارتی با آب جوش و سرد کردن فعال گردید.

## ۲.۲. تهیه و زیکول‌های پروبیوتیک

### *B. licheniformis*

وزیکول پروبیوتیک *B. licheniformis* با استفاده از پروتکول اولتراسانتریفیوژ (Yu et al., 2017) ساخته شد. پروبیوتیک برای رسیدن به فاز پایداری کشت داده شد و سلول‌های باکتریایی با استفاده از سانتریفیوژ با دور  $3000 \times g$  برای ۱۵ دقیقه جداسازی و سپس با دور  $3500 \times g$  برای ۶۰ دقیقه به شکل متوالی و به‌منظور حذف بقایایی بزرگ باکتریایی و اندامک‌های دست نخورده، سانتریفیوژ شد. مایع رویی با استفاده از اولتراسانتریفیوژ با دور  $20000 \times g$  برای ۶۰ دقیقه جداسازی و سپس با استفاده از فیلتر  $0.22 \mu m$  میکرو مترعبور داده تا وزیکول‌های خالص پروبیوتیک تهیه شد. تعداد وزیکول‌ها و اندازه آنها با استفاده از Nano-ZS 90 dynamic light scattering شناسایی شد. وزیکول‌ها با استفاده از میکروسکوپ TEM (Transmission Electron Microscopy) عکسبرداری شدند. همچنین ویژگی‌های فیزیکی-شیمیایی وزیکول به‌وسیله روش آنالیز تراکینگ نانوپارتیکل مورد بررسی قرار گرفت.

## ۲.۳. تعیین درصد بازدارندگی باکتری

### *S. putrefaciens* توسط وزیکول‌های پروبیوتیک

### *B. licheniformis*

*Shewanella putrefaciens* (مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران، کرج) در محیط کشت Trypticase soy broth در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. باکتری *S. putrefaciens* در غلظت‌های مختلف ( $10^7$ ،  $10^8$ ،  $10^9$ ،  $10^{10}$ ،  $10^{11}$  وزیکول در هر میلی‌لیتر) از محیط مورد بررسی، در لوله‌های ۱/۵ میلی‌لیتر کشت داده و هاله عدم رشد اندازه‌گیری شد (Lee et al., 2019). سوسپانسیون باکتریایی از چاه‌ها روی محیط کشت Trypticase soy broth منتقل و

به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. فعالیت ضد باکتریایی *B. licheniformis* و سدیم اریتروبات به‌عنوان حداقل غلظتی که هیچ کلنی باکتری *S. putrefaciens* رشد نمی‌کند، شناخته شد. غلظت اولیه تلقیح  $10^7 CFU/mL$  بود. درصد رشد در غلظت با استفاده از معادله زیر تعیین گردید:

$$\text{درصد بازدارندگی از رشد باکتری} = \{OD_{600 \times 100} \text{ رشد در محیط برات} - 1\}$$

## ۲.۴. انتقال وزیکول‌های پروبیوتیک

### *B. licheniformis* به فیله قزل‌آلای رنگین‌کمان

هر قطعه فیله قزل‌آلای رنگین‌کمان ( $15 \times 10$  سانتی‌متر)، درون ۱۰ میلی‌لیتر محلول آماده شده با غلظت‌های پروبیوتیک ( $10^6$  (دوز پایین)،  $10^{10}$  (دوز متوسط) و  $10^{11}$  (دوز بالا) وزیکول/میلی‌لیتر) منتقل گردید تا زمانی که فیله‌ها همه محلول را جذب کرده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد برای ۵ روز ذخیره شدند. آنتی‌اکسیدان سدیم اریتوربات (sodium erythorbate) به‌عنوان گروه کنترل مثبت انتخاب و فیله‌های ماهی درون محلول ۰/۵ درصد سدیم اریتوربات غوطه‌ور شدند (Lee et al., 2021). تیمارها شامل: شاهد، سدیم اریتوربات ۰/۵ درصد (کنترل مثبت)، A: دوز پایین وزیکول‌های مشتق شده از باکتری *B. licheniformis* ( $10^6$  وزیکول در هر میلی‌لیتر)، B: دوز متوسط وزیکول‌های مشتق شده از باکتری *B. licheniformis* ( $10^{10}$  وزیکول در هر میلی‌لیتر) و C: دوز بالای وزیکول‌های مشتق شده از باکتری *B. licheniformis* ( $10^{11}$  وزیکول در هر میلی‌لیتر) بودند.

## ۲.۵. تعیین میزان وزیکول‌های پروبیوتیک

### *B. licheniformis*

فیله قزل‌آلای رنگین‌کمان دارای پروبیوتیک، با استفاده از محلول شوری ۰/۸۵ درصد استریل در کیسه‌های استومیکر (BagMixer 400VM, Interscience, )

## ۲.۹. تعیین مقدار پراکسید (PV)

در ابتدا ۱۰ گرم فیله ماهی توسط دستگاه چرخ گوشت، چرخ شده و ۵۰ گرم از آن با ۵۰ سی‌سی کلروفرم و ۱۰۰ سی‌سی متانول به‌صورت هم‌زمان با همزن برقی در ۳ دقیقه با دور تند هم‌زده شد. مخلوط در دکانتور ریخته شد تا روغن از گوشت جدا شود. روغن و حلال توسط قیف دارای کاغذ صافی شماره ۴ وارد بالن شیشه‌ای دستگاه روتاویپور با دمای آب ۵۰ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد شد. سپس حلال از روغن جدا شد. برای اندازه‌گیری پراکسید، ۳ گرم روغن به ظرف ۲۵۰ میلی‌لیتر منتقل شد و سپس مقدار ۱۰ میلی‌لیتر مخلوط کلروفرم و اسیداستیک به آن اضافه شد. سپس یک میلی‌لیتر از محلول یدیدپتاسیم اشباع به مخلوط اضافه و برای مدت ۵ دقیقه در شرایط تاریک نگهداری شد. ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر به مخلوط اضافه و با استفاده از تیوسولفات سدیم ۱ درصد نرمال تا مرحله ناپدید شدن رنگ زرد تیترا گردید. یک میلی‌لیتر محلول نشاسته ۱/۵ درصد به مخلوط اضافه شد و تیتراسیون ادامه یافت تا رنگ آبی تیره از بین برود. نمونه شاهد فاقد روغن ماهی بود. میزان پراکسید بر حسب میلی‌اکی‌والان در ۱۰۰۰ گرم براساس معادله ۲ محاسبه شد (AOAC, 2005).

$$1000 (V_1 - V_2)N/W$$

$V_1$ : مقدار تیوسولفات سدیم با نرمالیت N بر حسب میلی‌لیتر،  $V_2$ : مقدار تیوسولفات سدیم مورد استفاده برای آزمایش کنترل، W: وزن (گرم) نمونه مورد استفاده و N: نرمالیت تیوسولفات سدیم مصرفی بود.

## ۲.۱۰. اندازه‌گیری بار میکروبی

فیله‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان در هر گروه به شکل مجزا با محلول نمکی ۰/۸۵ درصد استریل در کیسه استومیکر (BagMixer400 VW, Interscience, ) SaintNorm-La-Breteche, France هم‌وزنیزه و در محیط PCA کشت داده شد. این پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند.

هم‌وزنیزه شده در محیط MRS Broth پخش شد و میزان کل بار باکتریایی بعد از انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، شمارش شد (Lee et al., 2021).

## ۲.۶. رنگ‌سنجی فیله ماهی

میزان رنگ در تیمارهای فیله قزل‌آلای رنگین‌کمان دارای پروبیوتیک طی ۵ روز در ۴ درجه سانتی‌گراد با استفاده از دستگاه (CR-13, Komica Minola Inc, ) (Japan) اندازه‌گیری شد. شاخص قرمزی از رابطه  $a^*/b^*$  به دست آمد (Chen et al., 1997).

## ۲.۷. تعیین مقدار بازهای نیتروژنی فرار (TVBN)

۵ گرم فیله ماهی در ۸ میلی‌لیتر بافر تری‌کلرواستیک اسید (TCA) ۴ درصد به مدت ۳۰ دقیقه هم‌وزنیزه شد. پس از فیلتر کردن بافت هم‌وزنیزه شده، مقدار نهایی با استفاده از محلول TCA به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسید. میزان TVBN فیله ماهی با استفاده از روش Conway تعیین گردید (Conway and Byrne, 1933). میزان TVBN نمونه به‌وسیله بوریس اسید جذب و سپس با HCL ۰/۰۲ نرمال تیترا شد. میزان این شاخص پس از محاسبه، بر حسب میلی‌گرم/۱۰۰ گرم نمونه گزارش شد.

## ۲.۸. تعیین مقدار تیوباریتوریک اسید (TBA)

غلظت مالون‌دی‌آلدئید (MDA) یکی از محصولات پراکسیدسیون چربی، به‌وسیله روش Lee و همکاران (۲۰۱۲) تعیین شد. در ابتدا، فیله ماهی با استفاده از بافر Tris-HCL (۲۰ mM، pH ۷/۴) هم‌وزنیزه و پس از فیلتر شدن با TCA سرد (۷۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) مخلوط شد تا پروتئین‌ها رسوب کنند. محلول بالای با TBA (۸ میلی‌گرم بر لیتر) در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۴۵ دقیقه انکوبه شد. محصول پراکسیداسیون لیپید براساس غلظت MDA در نمونه تعیین گردید. محصول پراکسیداسیون لیپید در ۵۳۰ نانومتر قرائت شد.

ساعت ۲۴ مجدداً کاهش یافت و به ۴/۰۰۲ رسید و سپس تا انتهای دوره روند ثابت داشت که نشان می‌دهد ۲۴ ساعت بهترین زمان انکوباسیون برای رشد باکتری و تولید زیست توده سلولی است.

اندازه و ارزیابی وزیکول‌های *B. licheniformis* در نمودار شکل ۲ الف نشان داده شده است. میانگین اندازه وزیکول‌های *B. licheniformis*،  $1 \pm 209/2$  نانومتر (۸ ساعت)،  $222 \pm 4/5$  نانومتر (۲۴ ساعت) و  $227 \pm 3/11$  نانومتر (۴۸ ساعت) بعد از کشت بود. در نمودار شکل ۲ ب، مورفولوژی وزیکول‌ها نشان می‌دهد که به وسیله لایه لیپیدی (فلش روی عکس) پوشیده شده‌اند.

### ۳.۲. تأثیر وزیکول‌های باکتری

#### *S. putrefaciens* بر مهار باکتری *B. licheniformis*

یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که قزل‌آلای رنگین کمان پوشیده شده با باکتری *B. licheniformis* با میزان  $10^{11}$  وزیکول در هر میلی‌لیتر، با ۴۴/۳۴ درصد بالاترین قدرت بازدارندگی و مهار رشد باکتری را دارد (شکل ۳).

### ۲.۱۱. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

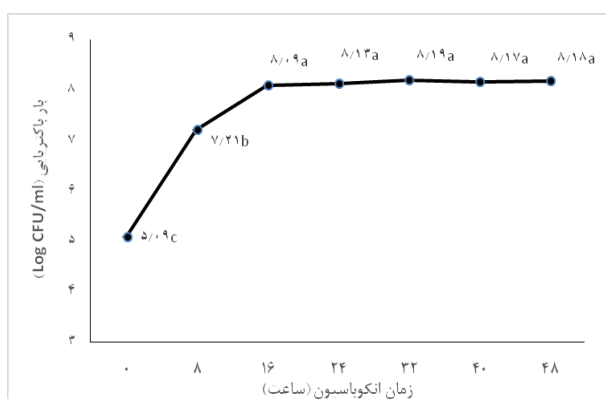
همه داده‌ها به شکل میانگین  $\pm$  انحراف معیار گزارش شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از تجزیه واریانس یک‌طرفه (Ony-way ANOVA) انجام شد. تعیین سطح معنی‌داری (۰/۰۵ درصد) در بین میانگین‌های تیمارها، با استفاده از تست دانکن و در محیط نرم‌افزار SPSS23 انجام شد.

### ۳. نتایج

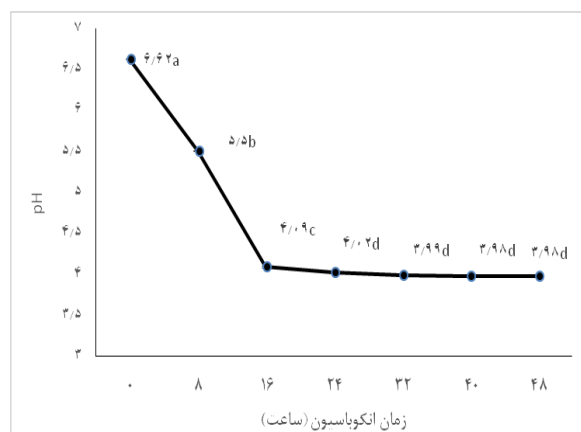
#### ۳.۱. ویژگی‌های فیزیکی-شیمیایی وزیکول‌های

##### پروبیوتیک *B. licheniformis*

برای تعیین تغییرات رشد و pH، *B. licheniformis* در محیط MRS در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای ۴۸ ساعت، انکوبه شد که نتایج آن در نمودار شکل ۱، نشان داده شده است. بعد از انکوباسیون تا ساعت ۱۶ تعداد سلول‌ها تا  $8/09 \times 10^8$  Log CFU/ml افزایش پیدا کرد و سپس روند ثابت را تا ۴۸ ساعت داشت. میزان pH پس از ۱۶ ساعت از ۶/۶۲ به ۴/۰۹ رسید و سپس از ساعت ۱۶ تا



(ب)

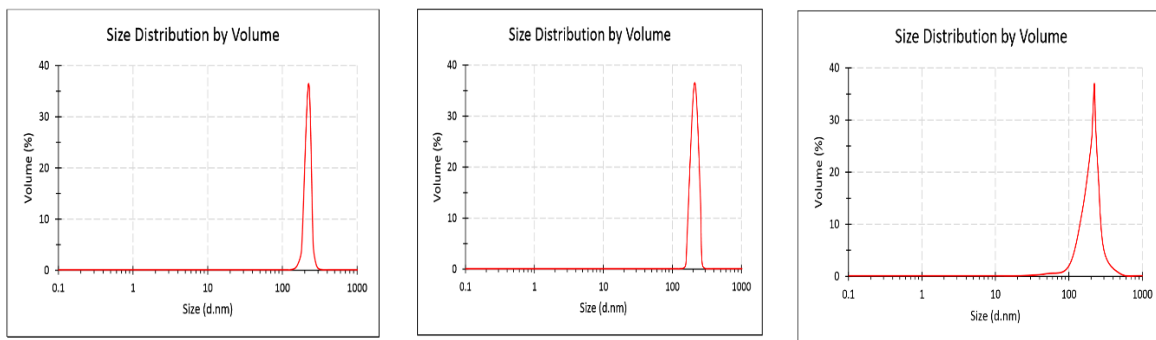


(الف)

شکل ۱- نمودارهای تغییرات میزان باکتری *B. licheniformis* و pH در طول انکوباسیون در محیط MRS برای ۸، ۲۴ و ۴۸ ساعت.

الف- رشد *B. licheniformis* - ب- تغییرات pH در جریان رشد *B. licheniformis*.

اطلاعات به شکل میانگین  $\pm$  انحراف معیار (n=3) نشان داده شده است.

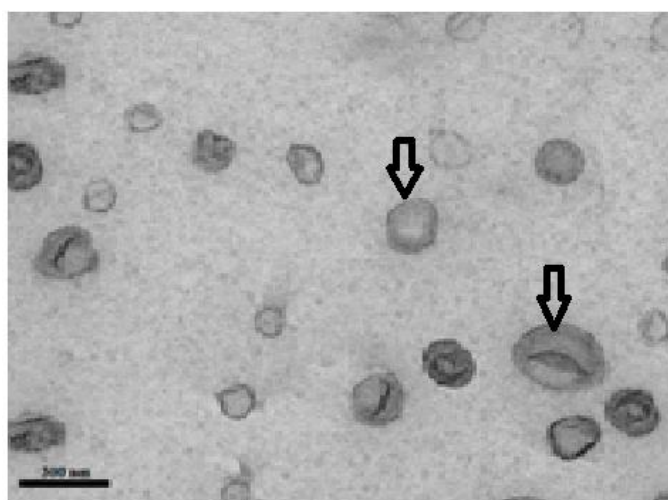


۴۸ ساعت

۸ ساعت

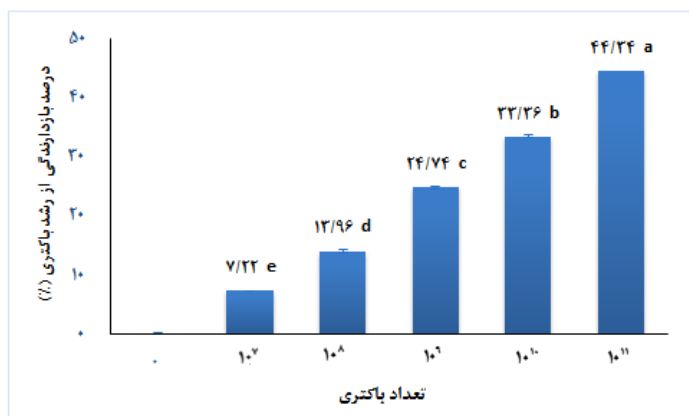
۲۴ ساعت

(الف)



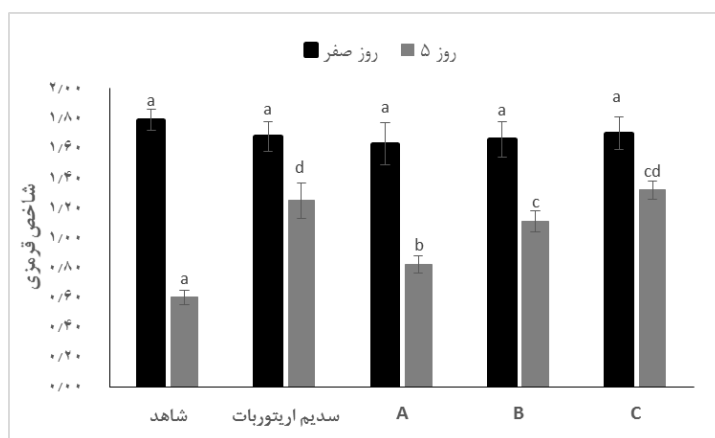
(ب)

شکل ۲- نمودار الف- ویژگی های وزیکول های خارج سلولی باکتری *B. licheniformis* نمودار الف- غلظت و گستره اندازه وزیکول ها در طول رشد برای ۸، ۲۴ و ۴۸ ساعت. نمودار ب- شکل مورفولوژی وزیکول های *B. licheniformis* توسط میکروسکوپ TEM.



شکل ۳- نمودار نتایج آزمایش توانایی مهار باکتری *S. putrefaciens* توسط وزیکول های *B. licheniformis* بعد از رشد در محیط Trypticase Soy Broth حاوی 10<sup>7</sup> تا 10<sup>11</sup> وزیکول در هر میلی لیتر. نتایج حاصل از میانگین حداقل سه آزمایش مستقل هستند. ناحیه منع کنندگی رشد 1/5 میلی متر برای گروه 10<sup>7</sup> وزیکول در هر میلی لیتر، 2/5 میلی متر برای گروه 10<sup>8</sup> وزیکول در هر میلی لیتر، 4/5 میلی متر برای گروه 10<sup>9</sup> وزیکول در هر میلی لیتر، 5/4 میلی متر برای گروه 10<sup>10</sup> وزیکول در هر میلی لیتر و 7/2 میلی متر برای گروه 10<sup>11</sup> وزیکول در هر میلی لیتر تعیین شدند.

تیمار A با دوز پایین وزیکول پروبیوتیک و تیمار B با دوز متوسط ( $10^{11}$  وزیکول در هر میلی‌متر) وزیکول پروبیوتیک، در مقایسه با شاهد، شاخص قرمزی بالاتری داشت اما در مقایسه با تیمار سدیم اریتوربات، قرمزی کمتری نشان داد. سطح بالای وزیکول‌های مشتق شده از پروبیوتیک (C) در مقایسه با سایر تیمارها بالاترین میزان شاخص قرمزی را داشت.



شکل ۴- نمودار تغییرات ظاهری رنگ فیله قزل‌آلای رنگین‌کمان دارای وزیکول‌های *B. licheniformis* برای ۵ روز در تیمارهای مختلف. اطلاعات به شکل میانگین  $\pm$  انحراف معیار ( $n=3$ ). حروف کوچک متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.

است که این متابولیت‌ها باعث ایجاد ویژگی‌های حسی نامطلوبی در محصولات دریایی شده است (Ruiz-Capillas and Moral, 2005; Lee et al., 2012; Lin et al., 2019). وزیکول‌های خارج سلولی بیشتر باکتری‌های گرم‌مثبت و گرم‌منفی می‌توانند عملکرد فیزیولوژیک یا پاتولوژیک داشته باشند. در سال‌های اخیر، ویژگی‌های زیست‌فعال وزیکول‌های باکتری گزارش شده است، به‌طور مثال وزیکول‌های مشتق‌شده از باکتری *Lactobacillus plantarum*، بسته به محتویات، خواص محافظتی در برابر باکتری *Caenorhabditis elegans* و سلول‌های انسانی در برابر عفونت باکتریایی *Enterococcus faecium* نشان داده‌اند (Li et al., 2017). وزیکول‌های باکتری *Lactobacillus rhamnosus* توانستند از تکثیر سلول‌های سرطانی جلوگیری کنند (Behzadi et al., 2017). در مطالعه‌ای نشان داده شد که

### ۳.۳. تأثیر وزیکول‌های *B. licheniformis* بر

#### کیفیت فیله قزل‌آلای رنگین‌کمان

تغییرات ظاهری رنگ فیله قزل‌آلای رنگین‌کمان تحت تأثیر وزیکول‌های پروبیوتیک در شکل ۴ نشان داده شده است. براساس نتایج، در روز صفر بین تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ( $P > 0.05$ ) ( $P > 0.05$ ). در روز ۵،

شاخص‌های کیفیت لاشه شامل TBA، PV، TVBN و بار باکتریایی کل در فیله قزل‌آلای رنگین‌کمان بعد از تیمار با وزیکول‌های پروبیوتیک در شکل ۵ نشان داده شده است. در هر ۴ شاخص، گروه‌های با دوز متوسط ( $10^{11}$  وزیکول در هر میلی‌لیتر) و بالا ( $10^{11}$  وزیکول در هر میلی‌لیتر) کمترین میزان و تیمار شاهد بالاترین میزان این شاخص‌ها را داشت. مقایسه بین گروه‌ها نشان داد که گروه سدیم اریتوربات در مقایسه با گروه با دوز پایین وزیکول مشتق شده از باکتری، عملکرد بالاتری در کاهش مقدار شاخص‌های TBA، PV، TVBN و بار باکتریایی کل داشت ( $P < 0.05$ ).

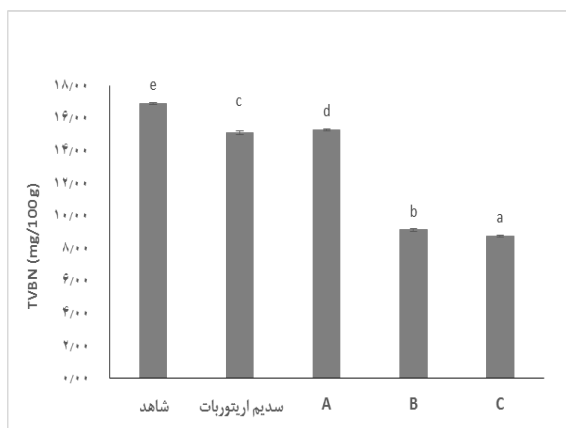
### ۴. بحث و نتیجه‌گیری نهایی

در مطالعات مختلف، ارتباط بین متابولیت‌های میکروبی مشتق شده از هیدرولیز پروتئین و فساد فیله گزارش شده

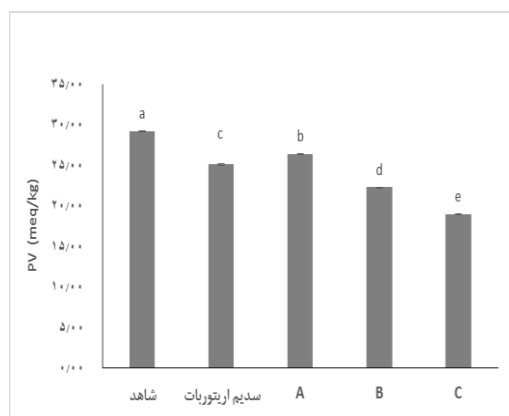


وزیکول‌ها همچنان مهار رشد *Shewanella putrefaciens* را در محیط برات در غلظت  $10^{11}$ - $10^7$  در میلی‌لیتر نشان دادند (Lee et al., 2021).

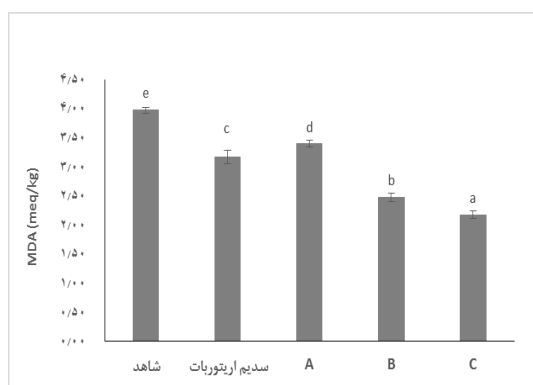
وزیکول‌های جدا شده از باکتری *L. casei* BL23 حامل RNA/DNA پروتئین هستند، دارای خواص پروبیوتیکی هستند (Dominguez-Rubio et al., 2017).



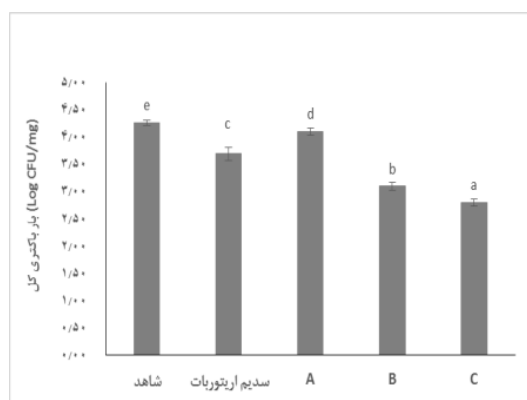
ب



الف



ج



د

شکل ۵- نمودارهای مقدار الف- پراکسید، ب- بازهای نیتروژنی فرار، ج- تیوباربیبتوریک اسید و د- بار باکتری کل (TVC) در فیله قزل‌آلای رنگین‌کمان نگهداری شده به مدت ۵ روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد. اطلاعات به شکل میانگین  $\pm$  انحراف معیار (n=۳). حروف کوچک متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ درصد است.

Yuan و همکاران (۲۰۱۶) گزارش کردند که افزایش سطح TVBN با فساد شیمیایی و میکروبی ارتباط دارد. در مطالعه Samiullah و همکاران (۲۰۲۲) گزارش کردند که استفاده از پروبیوتیک *L. plantarum* در فرآیند بسته‌بندی، ماندگاری فیله ماهی تیلپیا با کاهش و کنترل رشد باکتری‌های عامل فساد افزایش پیدا می‌کند. همچنین نتایج این مطالعه نشان داد که افزایش TVBN در فیله قزل‌آلای رنگین‌کمان در شاهد و گروه

Kim و همکاران (۲۰۱۶) گزارش کردند که وزیکول‌های پروتئینی پروبیوتیک *L. plantarum* از طریق سرکوب بیان سلولی، اثرات آلرژی‌زایی *Bifidobacterium longum* را کاهش می‌دهند. همچنین وزیکول‌های *L. plantarum* در مقابل اثرات سمی دفع شده از *Staphylococcus aureus* مؤثر بودند (Kim et al., 2018). میزان TVBN در غذاهای دریایی شاخص مهمی برای کیفیت و تازگی ماهی است، زیرا در جریان هیدرولیز پروتئین تولید می‌شوند.

استتافیلوکوکوس و لیستریا هستند. اما استفاده از پروبیوتیک‌ها در بسته‌بندی‌های مختلف توانست ماندگاری فیله ماهیان را افزایش دهد. فیلم پلی‌وینیل همراه با *B. bifidum* و (Ceylan et al., 2018) *L. rhamnosus* Mozaffarzogh et al., همراه با کربوکسی متیل سلولز (Mozaffarzogh et al., 2020) از اکسیداسیون و تخریب مواد غذایی تازه جلوگیری کرد.

این نتایج نشان می‌دهد که با توسعه بیشتر وزیکول‌های مشتق شده از پروبیوتیک‌ها، می‌توان کیفیت غذاهای دریایی را بهبود بخشید. علاوه بر این، وزیکول خارج سلولی برای تعامل بین باکتری-باکتری و باکتری-میزبان نقش کلیدی دارند، زیرا آن‌ها ترکیبات بسیار متنوعی را حمل می‌کنند که می‌توانند مسیرهای مختلف سیگنالینگ را تعدیل کنند (Hamre et al., 2022). از این رو ورود آن‌ها از طریق مصرف فیله ماهی به انسان، می‌تواند به عنوان عامل ارتقاء دهنده سلامت عمل کند.

### نتیجه‌گیری نهایی

این مطالعه، اطلاعات علمی در مورد ویژگی‌های وزیکول‌های غشایی با اندازه نانو آزاد شده از پروبیوتیک‌ها را ارائه داد. همچنین فعالیت ضدباکتری وزیکول‌های *B. licheniformis* بر مهار رشد *S. putrefaciens* در این مطالعه نشان داده شد. به عنوان یک نتیجه‌گیری کلی می‌توان بیان کرد که فیله ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تیمار شده با وزیکول‌های پروبیوتیک *B. licheniformis* می‌تواند ایمنی غذایی و کیفیت فیله را بهبود بخشد.

دوز پایین (۱۰<sup>۹</sup> وزیکول در هر میلی‌متر) وزیکول‌های مشتق شده از باکتری در مقایسه با سایر گروه‌ها افزایش معنی‌دار داشت و گروه‌هایی با دوز متوسط و بالا توانستند میزان این شاخص را در سطح پایین‌تری پس از ۵ روز نگه دارند. در این مطالعه اکسیداسیون چربی در فیله ماهی به وسیله PV و TBA ارزیابی شد، که نتایج نشان داد هم دوز متوسط (۱۰<sup>۱۰</sup> وزیکول در هر میلی‌متر) و هم بالا (۱۰<sup>۱۱</sup> وزیکول در هر میلی‌متر) توانستند این دو شاخص را در مقایسه با شاهد و گروه با دوز پایین کاهش دهند. Hua و همکاران (۲۰۲۲) در بررسی تأثیر پوشش‌دهی فیله ماهی سالمون با پروبیوتیک *L. plantarum*، کاهش میزان TBA و TVBN را گزارش و عنوان کردند که استفاده از پروبیوتیک ماندگاری فیله را در طول نگهداری در یخچال افزایش خواهد داد که با روند مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد.

علاوه بر این، مطالعات نشان داد که اکسیداسیون لیپید توسط *Pseudomonas spp.* به دلیل فعالیت لیپاز و فسفولیپاز است (Nirmal and Benjakul, 2011). همچنین باکتری Psychrophilic با فساد ماهی تازه در طول نگهداری در دمای پایین ارتباط دارد (Raesi et al., 2015). نتایج حاکی از آن است که وزیکول‌های پروبیوتیک *B. licheniformis* به کمک آنزیم تخریب‌کننده پپتیدوگلیکان دیواره سلولی، از رشد باکتری‌های عامل فساد جلوگیری کرده و روند فساد را کند می‌کنند (Sheikpour et al., 2017) و می‌توانند ماندگاری و کیفیت ظاهری فیله ماهی را افزایش دهند. Li و همکاران (۲۰۱۹) نشان دادند که فیله خام و پخته نشده کپور نقره‌ای، ناقل مهم عوامل پاتوژن‌زا مانند ویبریو، سالمونلا،

### ۵. منابع

### References

- Arashisar, S., Hisar, O., Kaya, M., Yanik, T., 2004. Effects of modified atmosphere and vacuum packaging on microbiological and chemical properties of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) filets. *International Journal of Food Microbiology* 97(2), 209-214. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.05.024

- Behzadi, E., Hosseini, H.M., Imani-Fooladi, A.A., 2017. The inhibitory impacts of *Lactobacillus rhamnosus* GG-derived extracellular vesicles on the growth of hepatic cancer cells. *Microbial Pathogenesis* 110(1), 1-6. DOI: 10.1016/j.micpath.2017.06.016
- Ceylan, Z., Meral, R., Karakas, C.Y., Dertli, E., Yilmaz, M.T., 2018. A novel strategy for probiotic bacteria: ensuring microbial stability of fish fillets using characterized probiotic bacteria-loaded nanofibers. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 48(3), 212-218. DOI: 10.1016/j.ifset.2018.07.002
- Chen, H.H., Chiu, E.M., Huang, J.R., 1997. Color and gel-forming properties of horse mackerel (*Trachurus japonicus*) as related to washing conditions. *Journal of Food Science* 62(1), 985-991. DOI: 10.1111/J.1365-2621.1997.TB15021.X
- Conway, E.J., Byrne, A., 1933. An absorption apparatus for the micro-determination of certain volatile substances I the micro-determination of ammonia. *Biochemistry Journal* 27(2), 419-429. DOI: 10.1042/bj0300716
- Dominguez-Rubio, A.P., Martinez, J.H., Martinez, D.C., Coluccio-Leskow, F., Piuri, M., Perez, O.E., 2017. *Lactobacillus casei* BL23 produces micro-vesicles carrying proteins that have been associated with its probiotic effect. *Frontiers in Microbiology* 20(8), 1783. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01783
- Gram, L., Huss, H.H., 2000. Fresh and processed fish and shell fish. In: Lund, A.C., Baird-Parker, G.W., Gould (Vol.Eds.), *The Micro biological Safety and Quality of Food (2)* 472-506. Gaithersburg, Maryland: Aspen Publisher (chapter 21).
- Green, D., Wakeley, P.R., Page, A., Barnes, A., Baccigalupi, L., Rica, E., Cutting, S., 1999. Characterization of two *Bacillus* probiotics. *Applied and Environmental Microbiology* 65(9), 4288-4291. DOI: 10.1128/aem.65.9.4288-4291.1999
- Hamre, K., Micallef, G., Marie Hillestad Johansen, J., Remø, S., Zhang, W., Ødegård, E., Araujo, P., Prabhu Philip, A., Waagbø, R., 2022. Changes in daylength and temperature from April until August for Atlantic salmon (*Salmo salar*) reared in sea cages, increase growth, and may cause consumption of antioxidants, onset of cataracts and increased oxidation of fillet astaxanthin. *Aquaculture* 551(737950), 1-10. DOI: org/10.1016/j.aquaculture.2022.737950
- Heikhpour, M., Barani, L., Kasaeian, A., 2017. Biomimetics in drug delivery systems: A critical review. *Journal of Controlled Release* 253, 97-109. DOI: 10.1016/j.jconrel.2017.03.026
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Stanley, J.T., William, S.T., 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore 786-788.
- Hong, Y.B., Yu, Y.H., Dybus, A., Hsiao, F.S., Cheng, Y.H., 2019. Antibacterial activity of *Bacillus* species-derived surfactin on *Brachyspira hyodysenteriae* and *Clostridium perfringens*. *AMB Express* 9(1), 188-193. DOI: 10.1186/s13568-019-0914-2
- Hua, O., Wong, C.H., Li, Dan., 2022. Postbiotics enhance the functionality of a probiotic edible coating for salmon fillets and the probiotic stability during simulated digestion. *Food Packaging and Shelf Life* 34(100954). DOI: 10.1016/j.fpsl.2022.100954
- Johnstone, R.M., 2005. Revisiting the road to the discovery of exosomes. *Blood Cells, Molecules and Disease* 34(3), 214-219. DOI: 10.1016/j.bcmd.2005.03.002
- Kim, J.H., Jeun, E.J., Hong, C.P., Kim, S.H., Jang, M.S., Lee, E.J., 2016. Extracellular vesicle-derived protein from *Bifidobacterium longum* alleviates food allergy through mast cell suppression. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 137(2), 507-516. DOI: 10.1016/j.jaci.2015.08.016
- Kim, M.H., Choi, S.J., Choi, H.I., Choi, J.P., Park, H.K., Kim, E.K., 2018. *Lactobacillus plantarum*-derived extra cellular vesicles protect atopic dermatitis induced by *Staphylococcus aureus*-derived extracellular vesicles. *Allergy Asthma and Immunology Research* 10 (5), 516-532. DOI: 10.4168/aaair.2018.10.5.516

- Kung, H.F., Wang, T.Y., Huang, Y.R., Lin, C.S., Wu, W.S., Lin, C.M., 2009. Isolation and identification of histamine-forming bacteria in tuna sandwiches. *Food Control* 20(11), 1013-1017. DOI: 10.1016/j.foodcont.2008.12.001
- Kwon, J.H., Won, S.J., Moon, J. H., Lee, U., Park, Y., Maung, C.E.H., Ajuna, H.B., Ahn, Y.S., 2021. *Bacillus licheniformis* PR2 controls fungal diseases and increases production of Jujube fruit under field conditions. *Horticulture* 7(49). DOI: 10.3390/horticulturae7030049
- Lee, B.H., Chen, B.R., Huang, C.T., Lin, C.H., 2019. The immuneactivity of PT peptide derived from anti-lipopolsaccharide factor of the swimming crab *Portunus trituberculatus* is enhanced when encapsulated in milk-derived extracellular vesicles. *Marine Drugs* 17 (5), 248 -253. DOI: 10.3390/md17050248
- Lee, B.H., Huang, Y.Y., Duh, P.D., Wu, S.C., 2012. Hepatoprotection of emodin and *Polygonum multiflorum* against CCl4-induced liver injury. *Pharmaceutical Biology* 50(3), 351-359. DOI: org/10.3109/13880209.2011.604335
- Lee, B.H., Wu, S.C., Shen, T., Hsu, Y., Chen, C.H., Hsu, W., 2021. The applications of *Lactobacillus plantarum*-derived extracellular vesicles as a novel natural antibacterial agent for improving quality and safety in tuna fish. *Food Chemistry* 15(340), 128104. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.128104
- Li, M., Lee, K., Hsu, M., Nau, G., Mylonakis, E., Ramratnam, B., 2017. *Lactobacillus* derived extracellular vesicles enhance host immune responses against vancomycin resistant enterococci. *BMC Microbiology*, 17, 66. DOI: 10.1186/s12866-017-0977-7
- Li, Y., Pei, X., Yan, J., Liu, D., Zhang, H., Yu, B., Li, N., Yang, D., 2019. Prevalence of foodborne pathogens isolated from retail freshwater fish and shellfish in China. *Food Control* 99, 131-136. DOI: org/10.1016/j.foodcont.2018.12.024
- Liao, Y., Du, X., Lonnerdal, B., 2017. Human milk exosomes and their microRNAs survive digestion in vitro and are taken up by human intestinal cells. *Molecular Nutrition and Food Research* 61(11). DOI:org/10.1002/mnfr.201700082.
- Lin, C.M., Kung, H.F., Huang, Y.L., Huang, C.Y., Su, Y.C., Tsai, Y.H. 2016. Histamine production by *Raoultella ornithinolytica* in canned tuna fish at various storage temperatures. *Food and Drug Analysis* 24(2), 305-310. DOI: 10.1016/j.jfda.2014.06.010
- Lin, E.R., Cheng, Y.H., Hsiao, F.S.H., Proskura, W.S., Dybus, A., Yu, Y.H., 2019. Optimization of solid-state fermentation conditions of *Bacillus licheniformis* and its effects on *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis in broilers. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 48, e20170298-20170396. DOI: org/10.1590/rbz4820170298
- Lutfi, E., Berge, G.M., Baevefjord, G., Sigholti, T., Bou, M., Larsson, T., Mqrkqre, T., Evenesen, Q., Sissener, N.H., Rosenlund, G., Sveen, L., Qstbye, T., Ruyter, B., 2022. Increasing dietary levels of the n-3 long-chain PUFA, EPA and DHA, improves the growth, welfare, robustness and fillet quality of Atlantic salmon in sea cages. *British Journal of Nutrition* 3(129), 1-48. DOI: 10.1017/S0007114522000642
- Mozaffarzogh, M., Misaghi, A., Shahbazi, Y., Kamkar, A., 2020. Evaluation of probiotic carboxymethyl cellulose-sodium caseinate films and their application in extending shelf life quality of fresh trout fillets. *LWT*, 126, 109305. DOI: 10.1016/j.lwt.2020.109305
- Mu, J., Zhuang, X., Wang, Q., Jiang, H., Deng, Z.B., Wang, B., 2014. Interspecies communication between plant and mouse gut host cells through edible plant derived exosome-like nanoparticles. *Molecular Nutrition and Food Research* 58(7), 1561-1573. DOI: 10.1002/mnfr.201300729
- Nirmal, N.P., Benjakul, S., 2011. Retardation of quality changes of Pacific white shrimp by green tea extract treatment and modified atmosphere packaging during refrigerated storage. *International Journal of Food Microbiology* 149(3), 247-253. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.002

- Otsuka, K., Yamamoto, Y., Matsuoka, R., Ochiya, T., 2018. Maintaining good miRNAs in the body keeps the doctor away?: Perspectives on the relationship between food derived natural products and microRNAs in relation to exosomes/extracellular vesicles. *Molecular Nutrition and Food Research* 62(1). DOI: 10.1002/mnfr.201700080
- Raeisi, M., Tajik, H., Aliakbarlu, J., Mirhosseini, S.H., Hosseini, S.M.H., 2015. Effect of carboxy methyl cellulose-based coatings incorporated with *Zataria multiflora* Boiss. Essential oil and grape seed extraction the shelf life of rainbow trout fillets. *LWT– Food Science and Technology* 64(2), 898-904. DOI: 10.1016/j.lwt.2015.06.010
- Ruiz-Capillas, C., Moral, A., 2005. Sensory and biochemical aspects of quality of whole bigeye tuna (*Thunnus obesus*) during bulk storage in controlled atmospheres. *Food Chemistry* 89(3), 347-354. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.02.041
- Samiullah, K., Mehroz, R., Yasin, R., Hussain, S., 2020. Combined effect of probiotics on prolonging the shelf life of GIFT tilapia fillets. *Aquaculture Research* 51(12), 1-11. DOI: 10.1111/are.14853
- Thaniyavarn, J., Roongsawang, N., Kameyama, T., Haruki, M., Imanaka, T., Morikawa, M., Kanaya, S., 2003. Production and characterization of biosurfactant from *Bacillus licheniformis* F2.2. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 67(6), 1239-1244. DOI: 10.1271/bbb.67.1239
- Yu, S., Zhao, Z., Sun, L.M., Li, P., 2017. Fermentation results in quantitative changes in milk-derived exosomes and different effects on cell growth and survival. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 15(6), 1220-1228. DOI: 10.1021/acs.jafc.6b05002
- Yu, Y., Hsu, T., Chen, W., Horng, Y., Cheng, Y., 2020. The Effect of *Bacillus licheniformis*-Fermented Products and Postpartum Dysgalactia Syndrome on Litter Performance Traits, Milk Composition, and Fecal Microbiota in Sows. *Animals* 10(11), 1-13. DOI: 10.3390/ani10112044
- Yuan, G., Lv, H., Tang, W., Zhang, X., Sun, H., 2016. Effect of chitosan coating combined with pomegranate peel extract on the quality of Pacific white shrimp during iced storage. *Food Control* 59, 818-823. DOI: 10.3390/ani10112044
- Zhao, N., Deng, Q., Zhu, C., Zhang, B., 2021. Application of Extracellular Vesicles in Aquatic Animals: A Review of the Latest Decade. *Reviews in Fisheries Science and Aquaculture* 12, 23-29. DOI:10.1080/23308249.2021.1985429

