

## اثر دما، pH و اسانس نارنج بر کاهش جمعیت لیستریا مونوسیتوژنز در فیله کپور نقره‌ای دودی شده به روش گرم و سرد

بهنوش شکرچی قطب‌آبادی<sup>۱</sup>، لاله رومیانی<sup>۲\*</sup>

۱- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران

۲- گروه شیلات، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۹/۰۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۱/۲۹

### چکیده

این مطالعه با هدف بررسی تاثیرات دما، pH و اسانس میوه نارنج روی کاهش میزان رشد *Listeria monocytogenes* مورد بررسی قرار گرفت. متغیرهای مورد بررسی شامل دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد (برای ۱۴۴ ساعت)، ۵۰ درجه سانتی‌گراد (برای ۷۲ ساعت)، ۵۵ درجه سانتی‌گراد (برای ۶ ساعت)، سه سطح pH (۴، ۵، ۶) و اسانس نارنج (*Citrus aurantium L.*) در سطوح ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۶ بود که روی میزان رشد باکتری در فیله کپور نقره‌ای دودی شده به روش سرد و گرم انجام شد. نتایج نشان داد که با افزایش pH در دماهای مورد بررسی تعداد باکتری افزایش می‌یابد ( $P < 0/05$ ) و بین تعداد باکتری و سطح pH عدم همبستگی مشاهده شد. افزایش دما به شکل معنی‌داری توانست تعداد باکتری فیله کپور نقره‌ای دودی شده سرد و گرم را کاهش دهد، به شکلی که کمترین تعداد باکتری در هر دو روش سرد و گرم در تیمار دمایی ۵۵ درجه سانتی‌گراد شمارش شد. بررسی همبستگی بین تعداد باکتری و دما نیز این موضوع را تایید کرد. در مورد میزان تاثیرگذاری اسانس نارنج روی تعداد باکتری، نتایج نشان داد در شرایط pH و دمای ثابت، با افزایش درصد اسانس نارنج، تعداد باکتری کاهش دارد و این کاهش بخصوص در تیمار ۰/۶ درصد اسانس نارنج به شکل معنی‌داری بیشتر بود. همچنین در دما و pH یکسان، دودی کردن گرم در مقایسه با دودی کردن سرد کارایی بالاتری در کاهش تعداد باکتری داشت. با توجه به اینکه تعداد باکتری شمارش شده در هر دو روش دودی کردن در دماها و pHهای مختلف، از استاندارد  $10^6$  Log cfu/g بالاتر نبود، می‌توان عنوان کرد که دودی کردن روشی مطمئن برای افزایش ماندگاری فیله کپور نقره‌ای است. در این پژوهش، بهترین شرایط دودی کردن در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد، pH برابر با ۴ و سطح اسانس ۰/۶ درصد به مدت ۶ ساعت به دست آمد.

**واژگان کلیدی:** اسانس نارنج، pH، دما، *L. monocytogenes*، فیله دودی سرد و گرم.

## ۱. مقدمه

امروزه مصرف آبزیان به دلیل کالری و پروتئین زیاد که قابلیت هضم ۹۶ درصدی دارد و همچنین به دلیل دارا بودن اسیدهای چرب امگا-۳ رو به افزایش است (Adeli, 2013). مدت‌های بسیار طولانی است که از دودی کردن به عنوان روشی جهت افزایش زمان نگهداری ماهی استفاده می‌شود. ماهیان پرورشی یا دریایی دودی قابلیت نگهداری در خارج از دستگاه‌های خنک کننده را دارند (Akhondzadeh Basti et al., 2006). بر حسب دمای بکار گرفته شده، فرآیند دودی کردن به روش‌های گرم و سرد انجام می‌شود و به دلیل اینکه این ماهی‌ها به صورت خام یا نیم پز مصرف می‌شوند، لذا آلودگی این فرآورده‌های با ارزش به پاتوژن‌هایی چون *Listeria monocytogenes* می‌تواند خطر بالقوه‌ای را برای مصرف کنندگان به همراه داشته باشد (Rahimi et al., 2015). گونه‌های لیستریا از جمله باکتری‌هایی هستند که در میکروبیولوژی پزشکی و مواد غذایی اهمیت زیادی دارد. در بین گونه‌های مختلف لیستریا، *L. monocytogenes* مهم‌ترین عامل بیماری‌زایی محسوب می‌شود (Stavru et al., 2011). باکتری *L. monocytogenes* یک باکتری با منشأ غذایی است که در انواع متنوعی از غذاها شامل سبزیجات، گوشت و شیر جدا شده و نسبت به حرارت‌دهی مقاوم است (Brandt et al., 1990). استراتژی‌ها برای کنترل *L. monocytogenes* در غذاهای آماده مانند فیش‌برگر، فیش‌فینگر، سوریمی و فرآورده‌های دریایی مانند آبزیان نمک سود و دودی شده نیازمند کاهش جدی پاتوژن‌های غذایی است. مطالعات اخیر *L. monocytogenes* را در میان ۵ پاتوژن اول بیماری‌زا که زندگی انسان‌ها را تهدید می‌کند، قرار دادند (Hoffmann et al., 2012). در مطالعه‌ای در داخل ایران شیوع *L. monocytogenes* در سطح خرده فروشی‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان، کپور نقره‌ای و کپور معمولی به ترتیب ۱۲/۵، ۱۰ و ۱۷/۵ درصد و میزان شیوع این باکتری در سطح استخرهای پرورش ماهی گرمابی ۸/۵ درصد گزارش شد

(Akhondzadeh et al., 2011). طبق آمار سازمان بهداشت جهانی در سال ۲۰۱۰، تعداد ۲۳۱۵۰ نفر در اثر این باکتری بیمار شدند که ۲۳/۶ درصد از آنها (۵۴۶۳ نفر) فوت کردند (De Noordhout et al., 2014; Bialvaei et al., 2018). همچنین در اتحادیه اروپا ۲۱۹۴ مورد ابتلا به این باکتری در سال ۲۰۱۴ گزارش شده است، که معادل ۰/۶ در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر است (European Centre for Disease Prevention and Control, 2016; Bialvaei et al., 2018). از این رو لیستریوزیس انسانی با اینکه شیوع کمی دارد، ولی در عفونت‌های جدی عامل مرگ و میر ۲۰-۳۰ بیمارانی به شمار می‌آید.

امروزه مردم با توجه به اثرات مضر نگهدارنده‌های شیمیایی و سنتتیک خواهان استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی مشتق شده از منابع گیاهی، حیوانی و میکروبی هستند تا علاوه بر افزایش زمان ماندگاری غذا از اثرات مضر نگهدارنده‌های غذایی شیمیایی مصون باشند (Nasser Al-Jabri and Amzad Hossain, 2014). در این میان انواع مختلفی از اسانس‌های گیاهی مورد آزمایش قرار گرفتند. اسانس نارنج دارای ۳۳ ترکیب است که ۲۷/۵ درصد آن لیمون، ۱۷/۵ درصد آن E-نرولیدول و ۱۴ درصد آن آلفا ترپینول است (Ammar et al., 2012). در مطالعات مختلف از جمله Hsouna و همکاران (۲۰۱۳) و Essadik و همکاران (۲۰۱۵) فعالیت آنتی باکتریایی اسانس *Citrus aurantium* بررسی شده است و فعالیت ضد باکتریایی این اسانس مورد تایید قرار گرفته است. از طرفی دما و pH جز عوامل تاثیرگذار بر جمعیت *L. monocytogenes* محسوب می‌شوند (Juneja and Eblen, 1999). مدل‌های پیش بینی غذایی امکان بررسی رفتار میکروارگانیسم‌ها را به وسیله برهم کنش بین دو یا چند عامل را فراهم می‌سازد. این مدل‌ها به درک و تعیین عواملی که روی تعداد میکروبی غذاها موثر هستند کمک می‌کند (Buchanan, et al., 1993). از جمله مطالعات انجام شده در این زمینه می‌توان به Li و

کندن به قطعات کوچک بریده شدند. اسانس آنها به روش تقطیر با آب و به کمک دستگاه کلونجر به مدت ۳ ساعت استخراج و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. آنالیز اسانس توسط دستگاه کروماتوگراف متصل به طیف نگار جرمی (GC/MS) مدل Agilent 5973 با ستون BPX5 به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میکرومتر با برنامه دمایی ۵۰ تا ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای شناسایی ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس، نمونه که توسط n - هگزان رقیق شده بود به مقدار یک میکرولیتر به دستگاه GC/MS تزریق شد (Essadik and Habsaoui, 2015).

### ۳.۲. دودی کردن گرم

تعدادی فیله خام کپور نقره‌ای به قطعات مساوی بریده و در حمام آب ۶۳ درجه سانتی‌گراد و برای ۳۰ دقیقه برای غیرفعال کردن میکروب‌ها پخته شد. فیله پخته شده با استفاده از قاشق‌های استریل تکه‌تکه و به مدت ۷ روز در معرض دود با دمای ۱۰۴-۸۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. دود از سوختن ناقص مخلوطی از خاک اره چوب‌های درختان ممرز و راش تولید شد (Alipour et al., 2009).

### ۴.۲. دودی کردن سرد

به میزان کافی فیله ماهی به قطعات مساوی بریده و پس از شستشو در آب نمک اشباع شور شده و پس از خروج آب اضافی به سالن دودخانه منتقل و در مرحله اول به مدت ۳ ساعت در معرض هوای گرم بدون دود در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند تا نیم‌پز و برای دریافت دود آماده شوند. در مرحله بعد نمونه‌ها در معرض دود در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. برای حفظ دما و اطمینان از خشک شدن یکنواخت محصول و رنگ مطلوب، دود دادن کامل در کمتر از ۲۴ ساعت متوقف شد. محصولات دودی به مدت ۳۰ روز در دمای یخچال (برابر ۴ درجه سانتی‌گراد) نگهداری

همکاران (۲۰۱۷)، اشاره کرد که در مطالعه‌ای تاثیر دما (۶۵-۵۷/۷ درجه سانتی‌گراد) و نمک (۴/۵-۰ درصد) را روی غیرفعال کردن *L. monocytogenes* فیله ماهی سالمون بررسی کردند و مشخص شد که سالمون‌های دودی شده حدود  $10^5-10^6$  cfu/g *L. monocytogenes* داشتند. تعداد کمی از لیستریوزیس انسانی شناسایی شده مربوط به ماهیان دودی سرد بودند. تکنولوژی‌ها برای کنترل *L. monocytogenes* در سالمون‌های دودی شده شامل روش‌هایی است که اثرات کشندگی یا متوقف‌کنندگی باکتری را دارند. از این رو هدف از این تحقیق بررسی تاثیرات دما، pH و اسانس نارنج به عنوان یک سیستم Hurdle روی میزان رشد *L. monocytogenes* در فیله کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) بود.

## ۲. مواد و روش‌ها

### ۱.۲. طراحی آزمایش

در این آزمایش از فاکتوریل (۳×۳×۳) برای نمونه‌های فیله کپور نقره‌ای دودی‌شده گرم و سرد، برای بررسی تمام جنبه‌های مطالعه استفاده شد که شامل تیمار دمایی (۴۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱۴۴ ساعت، ۵۰ درجه سانتی‌گراد برای ۷۲ ساعت، ۵۵ درجه سانتی‌گراد برای ۶ ساعت) (Sung, et al., 2000) و تیمار pH (۴، ۵، ۶) بود. برای بدست آوردن pH مطلوب مقادیر ۱۰ میلی‌مول اسید استیک و ۱۰ میلی‌مول استات سدیم بکار رفت و با دستگاه pH متر اندازه‌گیری شد (Sung et al., 2000). لازم به ذکر است تمامی تیمارها دارای سه تکرار بودند.

### ۲.۲. استخراج اسانس نارنج (*L. Citrus aurantium*)

در بهار ۱۳۹۶، میوه گیاه نارنج از مرکز تحقیقات کشاورزی صفی‌آباد در شهر دزفول تهیه شد، سپس به جهاد دانشگاهی دانشگاه تهران جهت تأیید گونه ارسال شد. نارنج‌ها چندین بار با آب تمیز شسته و پس از پوست

شدند (Hedayati Fard et al., 2016).

۱۰۰ g/۰/۸۵) به آن اضافه شد. بعد از هموژنیزه کردن به مدت ۱ دقیقه با استفاده از دستگاه استومیکر رقتی از ۱۰+ تا ۱۰- تهیه شد. شمارش میکروبی در محیط کشت کانت آگار در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد انجام و تعداد باکتری به صورت Log cfu/g در ساعات ۶، ۷۲ و ۱۴۴ رشد بیان شد (APHA, 2001).

### ۸.۲. تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های حاصل از این پژوهش با استفاده از نرم‌افزار SPSS<sup>23</sup> مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. جهت تجزیه و تحلیل آماری نتایج حاصل از ارزیابی نمونه‌ها، از آزمون فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سطح اطمینان ۹۹ درصد و نیز آزمون واریانس دو طرفه استفاده شد. پیش از شروع آنالیز نرمال بودن داده‌های با استفاده از آزمون K-S مورد بررسی قرار گرفت. تمامی نمودارها با استفاده از نرم‌افزار اکسل ۲۰۱۵ رسم گردید.

### ۳. نتایج

نتایج حاصل از آنالیز اسانس نارنج نشان داد که بیشترین ترکیب موجود در اسانس ترکیبات کارن (۳۴/۶۸ درصد) و آلفا ترپینئول (۷/۵۳ درصد) بودند (جدول و شکل ۱). تغییرات *L. monocytogenes* در فیله کپور نقره‌ای در جدول ۲ نشان داد که تعداد باکتری با افزایش میزان pH در هر سه تیمار دارای اسانس نارنج روند افزایشی دارد. همچنین در pH یکسان، تیمار دارای درصد اسانس نارنج بالاتر (۰/۶ درصد)، میزان باکتری کمتری را نشان داد. فیله کپورنقره‌ای دودی شده به روش گرم میزان رشد این باکتری در تمام غلظت‌های اسانس نارنج با افزایش pH، افزایش و در تمام تیمارها بالاترین تعداد باکتریایی در pH = ۶ اندازه‌گیری شد. همچنین با افزایش درصد اسانس نارنج در هر سه سطح pH مورد بررسی، تعداد باکتری کاهش یافت. کمترین تعداد باکتری در تیمار ۰/۶ درصد اسانس نارنج و pH=۴ (Log CFU/ g)  $3/57 \pm 0/1$  و

### ۵.۲. کشت لیستریا مونوسیٹوژنز (*L. monocytogenes*)

نمونه لیوفلیزه باکتری *L. monocytogenes* (ATCC 19114) از گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران جهت این بررسی مورد استفاده قرار گرفت. در ابتدا این کشت لیوفلیزه در ۱۰ میلی‌لیتر محیط براث (BHI) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ ساعت، دو مرتبه بطور متوالی تجدید کشت شد. سپس کشت دوم به میزان ۵ به ۱ با گلیسرین مخلوط و در قسمت‌های مساوی در لوله‌های میکروسانتریفیوژ اپندروف استریل در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Sung et al., 2000).

### ۶.۲. آلوده کردن با ماهی به باکتری

#### *L. monocytogenes* و اضافه کردن اسانس نارنج

برای تهیه میزان دوز تلقیح باکتری مورد آزمایش، با انتقال باکتری از لوله میکروسانتریفیوژ اپندروف به محیط آبگوشت قلب و مغز (مرک، آلمان) و نگهداری به مدت ۲۴ ساعت در ۳۳ درجه سانتی‌گراد و کشت دومی از این کشت‌های ۲۴ ساعته در براث دیگر انجام گرفت. سپس لوله‌های کووت حاوی ۵ میلی‌لیتر آبگوشت قلب و مغز (مرک، آلمان) استریل تهیه شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از این کووت برداشت شد و در شیشه زیمکس، به ۳۹ میلی‌لیتر از آب پپتونه استریل افزوده شد. در زمان تلقیح باکتری به ماهی‌های دودی از ۱۰۰ میکرولیتر محتویات شیشه زیمکس استفاده شد تا در هر سانتیمتر مربع از فرآورده‌های شیلاتی  $1 \times 10^3$  باکتری موجود باشد (APHA, 2001). سپس سه سطح ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۶ درصد اسانس نارنج به ماهی‌های دودی اضافه شد.

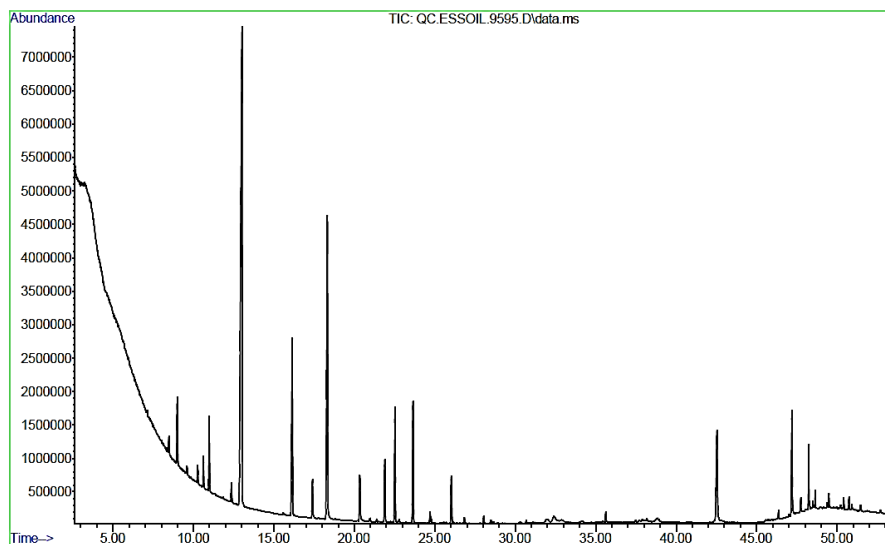
### ۷.۲. اندازه‌گیری میزان رشد میکروبی

۱۰ گرم نمونه ماهی در یک کیسه استومیکر قرار گرفت و سپس ۹۰ میلی‌لیتر محلول نمک استریل (mL)

بالاترین تعداد باکتری در تیمار ۰/۲ درصد اسانس نارنج و pH=۶ (Log CFU/ g)  $4/35 \pm 0/04$  اندازه گیری شد.

جدول ۱- ترکیبات شیمیایی اسانس نارنج (*Citrus aurantium L*) با استفاده از GC-MS.

ترکیبات	درصد	زمان جداسازی (دقیقه)
beta.-Myrcene 1,6-Octadiene, 7-methyl-3-methylene- (CAS) Myrcene	۲/۰۳۲	۹
Ethyl 2-(N-Benzylamino)-4-chloro-3,3-dimethylbutanoate	۰/۳۰۴	۹/۶۱
1, 3, 6-Octatriene, 3,7-dimethyl-, (E)- (CAS).BETA. OCIMENE Y (E)-Ocimene	۲/۳۲۴	۱۰/۹۹
DELTA.3-Carene Bicyclo[4.1.0]hept-3-ene, 3,7,7-trimethyl- (CAS)	۳۴/۶۸	۱۳/۰۲
3-Cyclohexene-1-methanol, .alpHa...alpHa.,4-trimethyl-, (S)- (CAS) Terpeneol	۷/۵۳۰	۱۶/۱۴
DELTA.3-Carene Bicyclo[4.1.0]hept-3-ene, 3,7,7-trimethyl- (CAS)	۱/۶۰۷	۱۷/۴۰
DELTA.3-Carene Bicyclo[4.1.0]hept-3-ene, 3,7,7-trimethyl- (CAS)	۱۴/۷۵	۱۸/۳۳
2-Methoxy-4-vinylphenol PHenol, 4-ethenyl-2-methoxy- p-Vinylguaicol	۱/۸۲۲	۲۰/۳۴
DELTA.3-Carene Bicyclo[4.1.0]hept-3-ene, 3,7,7-trimethyl- (CAS)	۲/۲۲۲	۲۱/۸۹
DELTA.3-Carene Bicyclo[4.1.0]hept-3-ene, 3,7,7-trimethyl- (CAS)	۴/۱۸۴	۲۲/۵۳
Caryophyllene.beta.-Caryophyllen.beta.-Caryophyllene	۴/۵۸۴	۲۳/۶۵
Bicyclogermacrene -Lepidozene	۱/۸۲۳	۲۶/۰۴
Neophtadiene 7,11,15-Trimethyl,3-Methylene-1-Hexadecene	۵/۷۳۰	۳۸/۸۱
1,2-Benzenedicarboxylic acid, diisooctyl ester Diisooctyl pThalate DIOP	۴/۳۶۱	۴۷/۰۳
1,2-Benzenedicarboxylic acid, mono(2-ethylhexyl) ester Mehp	۱/۸۱۶	۴۷/۷۴



شکل ۱- نمودار کروماتوگرافی اسانس نارنج.

تعداد باکتری با افزایش درصد اسانس نارنج در دو pH ۴ و ۶ به شکل معنی داری قابل مشاهده بود ( $P < 0/05$ ). همچنین روند افزایش رشد باکتری به شکل معنی داری

در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد، تغییرات رشد *L. monocytogenes* در فیله کیپورنقره‌ای دودی شده به روش سرد در جدول ۳ نشان داده شده است. روند کاهش

شد. در فیله کیپورنقره‌ای دودی شده به روش گرم در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد در تیمار ۰/۲ و ۰/۴ درصد اسانس نارنج، افزایش رشد باکتری با افزایش pH قابل مشاهده بود، اما بین دو pH ۵ و ۶ اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ).

در تیمارهای ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۶ اسانس با افزایش pH اتفاق افتاد ( $P < 0.05$ ). کمترین تعداد باکتری در تیمار ۰/۶ درصد اسانس نارنج و  $pH=4$  ( $3/19 \pm 0.03 \text{ Log CFU/g}$ ) و بالاترین تعداد باکتری در تیمار ۰/۲ درصد اسانس نارنج و  $pH=6$  ( $3/69 \pm 0.02 \text{ Log CFU/g}$ ) اندازه‌گیری

جدول ۲- تعداد *L. monocytogenes* (Log CFU/g) در فیله کیپورنقره‌ای دودی شده به روش سرد و گرم در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱۴۴ ساعت در غلظت‌های مختلف اسانس نارنج و pH.

دودی سرد			
غلظت	pH	۴	۵
۰/۲ درصد		۴/۱۸±۰/۱۰ <sup>Aa</sup>	۴/۲۶±۰/۰۶ <sup>Ab</sup>
۰/۴ درصد		۳/۹۹±۰/۱۶ <sup>Aa</sup>	۴/۲۱±۰/۰۲ <sup>Bc</sup>
۰/۶ درصد		۳/۶۶±۰/۱۴ <sup>Ba</sup>	۳/۸۸±۰/۰۵ <sup>Ca</sup>
اسانس نارنج			
غلظت	pH	۴	۵
۰/۲ درصد		۴/۰۹±۰/۰۴ <sup>Aa</sup>	۴/۱۶±۰/۰۲ <sup>Ab</sup>
۰/۴ درصد		۳/۸۲±۰/۰۳ <sup>Ba</sup>	۴/۲۰±۰/۰۳ <sup>Bc</sup>
۰/۶ درصد		۳/۵۷±۰/۰۱ <sup>Ca</sup>	۳/۸۲±۰/۰۱ <sup>Cc</sup>

حروف کوچک به معنی اختلاف معنی‌دار بین ستون‌ها در سطح ۰/۰۵ است.  
حروف بزرگ به معنی اختلاف معنی‌دار بین ردیف‌ها در سطح ۰/۰۵ است.

جدول ۳- مقایسه میانگین تعداد *L. monocytogenes* (LogCFU/g) در فیله کیپورنقره‌ای دودی شده به روش سرد در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد برای ۷۲ ساعت در غلظت‌های مختلف اسانس نارنج و pH

دودی سرد			
غلظت	pH	۴	۵
۰/۲ درصد		۳/۴۸±۰/۰۴ <sup>Aa</sup>	۳/۵۶±۰/۰۶ <sup>Aa</sup>
۰/۴ درصد		۳/۳۲±۰/۰۲ <sup>Ba</sup>	۳/۴۹±۰/۰۵ <sup>Ab</sup>
۰/۶ درصد		۳/۱۹±۰/۰۳ <sup>Ca</sup>	۳/۴±۰/۰۴ <sup>Ab</sup>
اسانس نارنج			
غلظت	pH	۴	۵
۰/۲ درصد		۳/۴۱±۰/۰۰۷ <sup>Aa</sup>	۳/۵۰±۰/۰۰۶ <sup>Ab</sup>
۰/۴ درصد		۳/۳۰±۰/۰۲ <sup>Ba</sup>	۳/۴۹±۰/۰۲ <sup>Ab</sup>
۰/۶ درصد		۳/۱۶±۰/۰۲ <sup>Ca</sup>	۳/۳۴±۰/۰۱ <sup>Cc</sup>

حروف کوچک به معنی اختلاف معنی‌دار بین ستون‌ها در سطح ۰/۰۵ است.  
حروف بزرگ به معنی اختلاف معنی‌دار بین ردیف‌ها در سطح ۰/۰۵ است.

باکتری در pH=۶ به ترتیب با مقادیر  $3/39 \pm 0/01$ ،  $3/35 \pm 0/01$  و  $3/31 \pm 0/01$  در مقایسه با دو pH، ۴ و ۵ رشد باکتری بالاتری را نشان دادند.

در تیمار ۰/۶ درصد اسانس نارنج روند افزایش رشد باکتری با افزایش pH معنی دار بود ( $P < 0/05$ ). نتایج بررسی رشد *L. monocytogenes* در جدول ۴ نشان داد که در تیمار ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۶ درصد اسانس نارنج رشد

جدول ۴- تغییرات *L. monocytogenes* (Log CFU/ g) در فیله کپورنقره‌ای دودی شده به روش سرد و گرم در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد برای ۶ ساعت در غلظت‌های مختلف اسانس نارنج و pH

دودی سرد			
غلظت	pH		
	۶	۵	۴
۰/۲ درصد	$3/39 \pm 0/01^{Ac}$	$3/35 \pm 0/01^{Ab}$	$3/23 \pm 0/02^{Aa}$
۰/۴ درصد	$3/35 \pm 0/01^{Bc}$	$3/32 \pm 0/01^{Bb}$	$3/19 \pm 0/02^{Ba}$
۰/۶ درصد	$3/31 \pm 0/01^{Cc}$	$3/26 \pm 0/01^{Cb}$	$3/14 \pm 0/02^{Ca}$
دودی گرم			
۰/۲ درصد	$3/34 \pm 0/01^{Bc}$	$3/33 \pm 0/01^{Ab}$	$3/19 \pm 0/02^{Aa}$
۰/۴ درصد	$3/26 \pm 0/02^{Ab}$	$3/28 \pm 0/01^{Bb}$	$3/16 \pm 0/01^{Ba}$
۰/۶ درصد	$3/24 \pm 0/03^{Ab}$	$3/2 \pm 0/02^{Cb}$	$3/11 \pm 0/02^{Ca}$

حروف کوچک به معنی اختلاف معنی دار بین ستون‌ها در سطح ۰/۰۵ است  
حروف بزرگ به معنی اختلاف معنی دار بین ردیف‌ها است

کمترین تعداد باکتریایی در تیمار ۰/۶ درصد اسانس نارنج و pH=۴ ( $3/11 \pm 0/01$  Log CFU/ g) و بالاترین تعداد باکتریایی در تیمار ۰/۲ درصد اسانس نارنج و pH=۶ ( $3/34 \pm 0/01$  Log CFU/ g) اندازه‌گیری شد.

با توجه به جدول ۵ در فیله کپورنقره‌ای دودی سرد و گرم همبستگی منفی بین دما و تعداد باکتری و نیز غلظت اسانس و تعداد باکتری به ترتیب در سطح ۰/۰۱ و ۰/۰۵ درصد مشاهده شد.

همچنین نتایج نشان داد با افزایش سطح اسانس نارنج از ۰/۲ درصد به ۰/۶ درصد میزان رشد باکتری کاهش دارد. تغییرات رشد *L. monocytogenes* در فیله کپورنقره‌ای دودی شده به روش گرم نشان داد که با افزایش درصد اسانس نارنج استفاده شده در فیله کپورنقره‌ای رشد باکتری در هر سه pH ۴، ۵ و ۶ کاهش می‌یابد. از طرفی در هر سه تیمار اسانس نارنج افزایش pH سبب افزایش رشد باکتری *L. monocytogenes* شد.

جدول ۵- همبستگی بین دما، pH و تعداد باکتری فیله کپورنقره‌ای دودی سرد و گرم.

غلظت اسانس	درجه حرارت	pH	
$-0/235^*$	$-0/869^{**}$	۰/۲۳۸	دودی سرد
$-0/147^*$	$-0/589^{**}$	۰/۱۰۶	دودی گرم

\*\* همبستگی در سطح ۰/۰۱، \* همبستگی در سطح ۰/۰۵

#### ۴. بحث و نتیجه گیری

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که دما و pH هر دو عامل موثری در کنترل *L. monocytogenes* در کپورنقره‌ای دودی گرم و سرد بودند. با افزایش pH در تمام دماهای مورد بررسی تعداد باکتریایی افزایش یافت، هر چند در دماهای مختلف این اختلاف معنی‌دار بود ( $P < 0.05$ ). در واقع باکتری‌ها به دلیل تولید ترکیبات قلیایی از قبیل آمونیاک، تری‌متیل‌آمین و غیره pH محیط را افزایش داده و شرایط مساعدی را برای رشد خود فراهم می‌کنند (Goulas and Kontominas, 2004).

همبستگی بین تعداد باکتری *L. monocytogenes* با pH وجود نداشت. Singh و همکاران (۲۰۰۱)، در بررسی اثرات عصاره سیر و نیسین بر سویه‌های لیستریا، نشان دادند که با افزایش pH تاثیر دو ماده نیسین و سیر کاهش یافت و این امر به معنی افزایش تعداد باکتری بود که با یافته‌های تحقیق حاضر هم‌خوانی دارد. همچنین با افزایش pH محیط، شرایط برای رشد باکتری‌ها بهبود پیدا می‌کنند (Singh et al., 2001). Sung و همکاران (۲۰۰۰) تاثیر pH روی غیرفعال کردن *Mycobacterium avium* موجود در پنیر را مورد بررسی قرار دادند و عنوان کردند که با کاهش این عامل تعداد باکتری کاهش دارد. همچنین Glass و همکاران (۱۹۹۸) گزارش کردند که جمعیت *L. monocytogenes* در pH  $6/5 - 5/84$  به حدود  $6 \log_{10} \text{CFU/g}$  رسید. با توجه به اینکه pH بهینه برای رشد باکتری‌ها محدوده بین  $5/7 - 5/6$  است و در واقع باکتری‌ها محیط‌های اسیدی را برای رشد ترجیح می‌دهند (Glass et al., 1998; Sung, et al., 2000). بنابراین، این فاکتور یکی از عوامل اصلی مورد توجه در ساخت مواد ضدباکتریایی محسوب می‌شود (Pourbaghi et al., 2013). ولی افزایش مشاهده شده در رشد باکتری‌ها با افزایش pH در برخی پژوهش‌ها دیده شده است که با پژوهش حاضر مطابقت دارد.

افزایش دما به شکل معنی‌داری توانست تعداد باکتری فیله کپور نقره‌ای دودی شده سرد و گرم را کاهش دهد،

به شکلی که کمترین تعداد باکتری در هر دو فیله کپور نقره‌ای سرد و گرم در تیمار دمایی ۵۵ درجه سانتی‌گراد به دست آمد. بررسی همبستگی بین تعداد باکتری و دما نیز این موضوع را تایید کرد. Rotariu و همکاران (۲۰۱۴)، در بررسی هایشان روی تعداد *L. monocytogenes* در ماهی سالمون، عنوان کردند در ماهیان دودی بین میزان شیوع بالا یا پایین لیستریا با دما ارتباط معنی‌داری وجود ندارد که با یافته‌های تحقیق حاضر مغایرت دارد. Hwang و همکاران (۲۰۰۹)، تاثیر نمک، ترکیبات دودی و دما روی بقای *L. monocytogenes* موجود در سالمون دودی را مورد بررسی قرار دادند. آنها عنوان کردند که در دماهای ۴۰، ۴۵، ۵۰ و ۵۵ درجه سانتی‌گراد (دودی کردن سرد و گرم)، جمعیت *L. monocytogenes* را تحت تاثیر قرار می‌دهند و در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد میزان غیر فعال شدن باکتری به کمتر از  $10 \log \text{CFU/h}$  رسید.

در پژوهش حاضر در دماهای ۴۵، ۵۰ و ۵۵ میزان رشد باکتری به ترتیب به  $0/1$  تا  $0/3$ ،  $0/15$  تا  $0/30$  و  $2/8$  تا  $3/5 \log \text{CFU/h}$  رسید که با روند تحقیقات Hwang و همکاران (۲۰۰۹) هم‌خوانی دارد. همچنین عنوان شد که دما کارآمدترین عامل برای غیرفعال‌سازی *L. monocytogenes* است. همچنین Li و همکاران (۲۰۱۷)، تاثیر دما و نمک را برای غیرفعال‌سازی *L. monocytogenes* در فیله ماهی سالمون مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد با افزایش دما از  $57/5$  تا  $65$  درجه سانتی‌گراد تعداد باکتری‌های لیستریا کاهش خطی را نشان می‌دهد که با یافته‌های تحقیق حاضر هم‌خوانی دارد. البته بررسی‌ها نشان می‌دهد که میزان مقاومت باکتری به دما، نژاد، و عوامل دیگری نیز بستگی دارد (Stavru, et al., 2011; Li, et al., 2017; Juneja and Eblen, 1999).

بیماری لیستریوزیس در نتیجه مصرف فرآورده‌های آلوده به باکتری *L. monocytogenes* در افراد مستعد ایجاد می‌شود. استفاده از نگهدارنده‌های شیمیایی در صنایع غذایی از بروز این بیماری جلوگیری می‌کنند، اما



شدید ATP داخل سلولی و در نهایت مرگ سلول خواهد شد (Burt, 2004). اثرات سمی روی ساختار و عملکرد غشاء به طور کلی توجیه‌کننده عملکرد ضد میکروبی اسانس‌های گیاهی و ترکیبات مونوترپنیدهای آنها است. همچنین عامل دیگری که در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفت، شیوه دودی کردن سرد و گرم بود. نتایج نشان داد در دما و pH یکسان، دودی کردن گرم در مقایسه با دودی کردن سرد کارایی بالاتری در کاهش تعداد باکتری *L. monocytogenes* دارد. همچنین با توجه به اینکه تعداد باکتری شمارش شده در هر دو روش دودی کردن و در دماها و pHهای مختلف، از استاندارد  $10^7$  Log cfu/g بالاتر نبود. می‌توان عنوان کرد که دودی کردن روشی مطمئن برای حذف باکتری‌ها در فیله و افزایش ماندگاری آن است. در مطالعه Hedayati Fard و همکاران (۲۰۱۶)، که روی اثر فرآیند دودی سرد روی تعداد باکتری *Cyprinus carpio* انجام شد، تعداد باکتری در ماهی دودی سرد  $2/8 \times 10^3$  Log cfu/g بود که در مقایسه با نتایج پژوهش حاضر مقدار کمتری را نشان داد. البته این امر به دمای دودی کردن نیز بستگی دارد. آنها عنوان کردند که به محض دودی کردن، تعداد باکتری‌های ماهی کاهش دارد که با نتایج تحقیق حاضر هم سو است. از دیگر دلایل موثرتر بودن دودی گرم روی تعداد باکتری *L. monocytogenes* را می‌توان به گستره دمایی تحمل (۴۰-۴) درجه سانتی‌گراد) این پاتوژن اشاره کرد. زیرا در فرآیند دودی کردن قطعات ماهی پیش از دودی کردن در حمام آب گرم (در تحقیق حاضر ۶۳ درجه سانتی‌گراد) قرار می‌گیرند و در واقع زمان پخت در فیله ماهی دودی گرم بیشتر از دودی سرد است. این کار تعداد باکتری را در مقایسه با روش دودی سرد بسیار کاهش می‌دهد. در پژوهش Anderson و همکاران (۱۹۹۱)، که روی غیرفعال کردن *L. monocytogenes* تحت تاثیر دما و نمک انجام شد، دما به عنوان یک عامل بازدارنده موثر روی جلوگیری از رشد این باکتری معرفی شد.

با توجه به یافته‌های تحقیق حاضر، نشان داده شد که

به دلیل خطرات سرطان‌زایی و عدم تمایل مردم به مصرف غذاهای دارای نگهدارنده شیمیایی، گرایش به سمت استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی افزایش یافته است. مطالعات مختلف (Jam Zad et al., 1994; Vazquez-Boland et al., 2001; Hamon et al., 2005; Nguefack et al., 2009) نشان داده است که عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی سرشار از مواد آنتی-کسیدانی و آنتی‌باکتریال هستند که این موضوع این مواد را به یک نگه‌دارنده مناسب تبدیل کرده است. در پژوهش حاضر در مورد میزان تاثیرگذاری اسانس نارنج روی تعداد باکتری، نتایج نشان داد در شرایط pH و دمای ثابت، با افزایش درصد اسانس نارنج، میزان *L. monocytogenes* کاهش دارد و این کاهش بخصوص در تیمار ۰/۶ درصد اسانس نارنج به شکل معنی‌داری بیشتر بود ( $P < 0/05$ ). Essadik و همکاران (۲۰۱۵)، در بررسی ای که روی فعالیت ضد میکروبی عصاره نارنج (*Citrus aurantium*) انجام دادند، به این نتیجه رسیدند که ۵۰ ترکیب موجود در عصاره نارنج ۹۹/۸۶ درصد از کل اسانس نارنج را تشکیل می‌دهند. در میان آنها لیمون با ۹۰/۹۰ درصد، لینالول ۲/۵۲ درصد، میرسین ۱/۵۱ درصد و بتاپینین ۱/۴۱ درصد بیشترین فراوانی را داشتند. در مطالعه Barakat و همکاران (۲۰۰۶) که روی تعداد باکتری فیله *Cyprinus capia* تحت تاثیر اسانس‌های گیاهی با نیم درصد کاروکرول و نیم درصد تیمول انجام شد، ثابت گردید که با کاهش تعداد باکتری ماندگاری ماهی افزایش دارد که با یافته‌های تحقیق حاضر هم‌خوانی دارد. زیرا اسانس نارنج دارای درصد بالایی از این ترکیبات است و این موضوع خاصیت ضدباکتریایی این اسانس را تایید می‌کند. از جمله مکانسیم‌های ضد میکروبی اسانس‌ها را می‌توان به اثر آنها بر ساختار دیواره سلولی باکتری‌ها ارتباط داد. ویژگی آبگریزی اسانس‌ها سبب نفوذ آنها در لپید غشاء سلولی و افزایش نفوذپذیری آنها می‌گردد که این امر سبب اختلال در کلیه فعالیت‌های حیاتی وابسته به غشاء سلولی، خروج یون‌ها، ترکیبات حیاتی، کاهش

۵۵ درجه سانتی‌گراد برای ۶ ساعت کاهش دهد. لذا، از دو روش دودی گرم و سرد می‌توان به عنوان استراتژی‌های مناسب جهت کاهش تعداد *L. monocytogenes* در فیله کپور نقره‌ای دودی استفاده کرد.

دمای عمل‌آوری عامل موثری در کاهش تعداد باکتری است و فیله‌های تولید شده به روش دودی گرم بار باکتریایی کمتری داشتند. علاوه بر این عامل افزودن اسانس نارنج به میزان ۰/۶ درصد به عنوان ماده‌ای با خاصیت ضد میکروبی توانست تعداد باکتری را در دمای

## ۵. منابع

- Adeli, A., 2013. Marketing and Packaging of Aquaculture. Publishing Binahayat, 204 p.
- Akhondzadeh Basti, A., Misaghi, A., Zahraei Salehi, T., Kamkar, A. 2006. Bacterial pathogens in fresh smoked and salted Iranian fish. *Food Control* 17(3), 183-188.
- Akhondzadeh, A., Zahraie Salehi, T., Misaghi, A., 2003. The survey of *Listeria monocytogenes* in fresh and smoked fish and ice used in fish markets for retaining the freshness of the fish in Tehran and Gilan. *Iranian Journal of Veterinary Research* 57(4), 9-12 (in Persian).
- Alipour, G.H., Shabanpour, B., Shabani, A., Imanpour, M., 2009 Effects of Concentration and Temperature of Salt on the Quality of Whitefish (*Rutilus frisii Kutum*) Smoked by the Traditional Method. *Journal of Agricultural Science and Natural Resources* 210 p. (in Persian).
- Ammar, A., Bouajil, J., Lebrhi, A., Mathieu, F., Romdhane, M., Zagrouba, F. 2012. Chemical composition and in vitro antimicrobial and antioxidant activities of Citrus aurantium l. flowers essential oil (Neroli oil). *Pakistan Journal of Biological Sciences* 15(21), 1034-1040.
- Anderson, W.A, Hedges, N.D., Jones, M.V., Cole, M.B., 1991. Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* studied by differential scanning calorimetry. *Journal of General Microbiology* 137, 1419-1424.
- APHA., 2001. Compendium of methods for the microbiological examination. Forth ed. Washington. *American public Health Association*. Pp.105-119,325-367, 371-415, 637-658.
- Barakat, S.M., Mahmoud, M., Yamazaki, K., Miyashita, K., Shin, L., Suzuki, T., 2006. A new technology for fish preservation by combined treatment with electrolyzed NaCl solutions and essential oil compounds. *Food Chemistry* 99, 656-662.
- Bialvaei, A.Z., Sheikhalizadeh, V., Mojtahedi, A., Irajian, G., 2018. Epidemiological burden of *Listeria monocytogenes* in Iran. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 21, 770-780.
- Brandt, A.L., Castillo, A., Harris, K.B., Keeton, J.T., Hardin, M.D., Taylor, T.M., 2010. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by food antimicrobials applied singly and in combination. *Journal Food Science* 75(9), 557-563.
- Buchanan, R.L., Golden, M.H., Whiting, R.C., 1993. Differentiation of the effects of pH and lactic or acetic acid concentration on the kinetics of *Listeria monocytogenes* inactivation. *Journal Food Protection* 56, 474-478.
- Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology* 94, 223-253.
- De Noordhout, C.M., Devleeschauwer, B., Angulo, F.J., Verbeke, G., Haagsma, J., Kirk, M., 2014. The global burden of listeriosis: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases* 14, 1073-1082.
- Essadik, F.Z., Haida, S., Kribi, A., Kribi, A.R., Ounine, K., Habsaoui, A., 2015. Antioxidant activity of *Citrus aurantium* L. var. *amara* Peel from western of Morocco, identification of volatile compounds of its essential oil by GC-MS and a preliminary study of their antibacterial activity. *International Journal of Innovation and Scientific Research* 16, 425-432.
- European Centre for Disease Prevention and Control., 2016. *Isteriosis*. Stockholm: ECDC.

- Glass, K.A., Kaufman, K.M., Johnson, E.A., 1998. Survival of bacterial pathogens in pasteurized process cheese slices stored at 30°C. *Journal Food Protection* 61, 290–294.
- Goulas, A.E., Kontominas, M.G., 2004. Effect of salting and smoking-method on the keeping quality of chub mackerel (*Scomber japonicus*): biochemical and sensory attributes. *Journal of Food Chemistry* 93, 511-520.
- Hamon, M., Bierne, H., Cossart, P., 2006. *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. *Nature Reviews Microbiology* 4, 423–434.
- Hedayati Fard, M., Ariaei, P., Hosni Moghadam, U., 2016. The effect of cold smoked process on the production of aromatic polycyclic hydrocarbons, qualitative, microbial and omega-3 fatty acids changes of *Cyprinus carpio*. *Journal of Fisheries Science and Technology* 3, 93-73 (in Persian).
- Hsouna, A., Hamdi, N., Ben Halima, N., Abdelkafi, S., 2013. Characterization of essential oil from *Citrus aurantium* L. flowers: antimicrobial and antioxidant activities. *Journal of Oleo Science* 62 (10), 763-772.
- Hwang, C.A., Sheen, S., Juneja, K., 2009. Effect of Salt, Smoke Compound, and Temperature on the Survival of *Listeria monocytogenes* in Salmon during Simulated Smoking Processes. *Food Microbiology and Safety* 74, 522-529.
- Jam Zad, M., 1994. Carvacrol Zataria Multiflora Boiss Shirazi Avishan Southern Regions of Iran. Avishan Research Institute of Forests and Rangelands. Tehran. pp. 1-7.
- Juneja, V., Eblen, B., 1999. Predictive Thermal Inactivation Model for *Listeria monocytogenes* with Temperature, pH, NaCl, and Sodium Pyrophosphate as Controlling Factors. *Journal of Food Protection* 62, 986–993.
- Li, C., Hung, L., Hwang, C.A., 2017. Effect of temperature and salt on thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in salmon roe. *Food Control* 73, 406-410.
- Mason, P., 2007. *Dietary supplements*. Pharm Press. London, 278 p.
- Nasser, A., Amzad, N., Hossain, M., 2014. Comparative chemical composition and antimicrobial activity study of essential oils from two imported lemon fruits samples against pathogenic bacteria. Bwni-suff University. *Journal of Basic and Applied sciences* 3, 247-253.
- Nguefack, J., Lekagne Dongmo, J.B., Dakole, C.D., Leth, V., Vismer, H.F., 2009. Food preservative potential of essential oils and fractions from *Cymbopogon 75itrates*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against mycotoxigenic fungi. *International Journal of Food Microbiology* 131, 151–156.
- Pourbaghi, A., Issa Zadeh, J., Anvari, M., Director, L., Theory, R., 2013. Effect of Environmental Factors on Antagonistic Activity of *Pumilus Bacillus* Isolated Culture Extract. *Journal of Cellular Biotechnology and Molecular* 66-61 (in Persian)
- Rahimi, A., Safarpour, Dehkordi, F., Yahaghi, A., Khorvardi Darian, A. 2015. Antimicrobial prevalence and resistance of *Listeria* species isolated from smoked fish and salt. *Iranian Journal of Microbiology* 3, 37-31 (in Persian)
- Rezaei, A., 2016. The role of heavy metals on human health. Second International Conference on Recent Findings in Chemistry and Chemical Engineering, Tehran, International Confederation of Inventions World (IFIA). University of Applied Science.
- Rotariu, O., Thomas, D.J., Goodburn, K.E., Hutchison, M., Strachan, N.J.C., 2014. Smoked salmon industry practices and their association with *Listeria monocytogenes*. *Food Control* 35, 284-292.
- Singh, B.F., Bernadette, M., Adams, M.R., 2001. Synergistic inhibition of *Listeria monocytogenes* by Niasin and Garlic extract. *Journal Food Microbiology* 18, 133-139.
- Stavru, F., Archambaud, C., Cossart, P., 2011. Cell biology and immunology of *Listeria monocytogenes* infections: novel insights. *Immunology Review* 240 (1), 160-184.
- Sung, N., Collins, M., 2000. Effect of Three Factors in Cheese Production (pH, Salt, and Heat) on *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Viability. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 1334–1339.
- Vazquez-Boland, J.A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Dominguez-Bernal, G., Goebel, W., 2001. *Listeria pathogenesis* and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Reviews* 14, 584–640.

