

مقاله پژوهشی

بررسی تاثیر سویه‌های پروبیوتیکی *Lactobacillus brevis*، *Lactobacillus reuteri* و *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* روی کیفیت میکروبی فیله ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) پرورشی

مینا سیف‌زاده<sup>۱</sup>، محمد ربانی<sup>۲\*</sup>، رسول شفیعی<sup>۴</sup>

تاریخ دریافت: آذر ۹۷

تاریخ پذیرش: خرداد ۹۸

چکیده

سویه‌های پروبیوتیکی *Lactobacillus* قابلیت استفاده به عنوان نگهدارنده غذایی را دارند. پژوهش حاضر با هدف بررسی استفاده از *L. reuteri* (PTCC *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (PTCC 1737) و *L. brevis* CD0817، 1655) و ترکیب باکتری‌های *Lactobacillus* روی کیفیت میکروبی فیله قزل‌آلای رنگین‌کمان در یخچال و انجماد انجام شد. تیمارها شامل فیله‌های غوطه‌ور شده در سوسپانسیون *L. reuteri*، *L. delbrueckii*، *L. brevis* و ترکیب آن‌ها بودند. فیله‌های غوطه‌ور شده در اسید لاکتیک ۲ درصد و فیله‌های بدون افزودنی به عنوان تیمارهای شاهد در نظر گرفته شدند. تیمارها به مدت ۵ روز در یخچال و شش ماه در انجماد نگهداری شدند. *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus* در تیمارهای آزمایشی و شاهد مشاهده نشدند. *L. delbrueckii* قادر به بقا تحت شرایط انجماد نبود. تعداد *Lactobacillus* ها در تیمارهای ترکیبی طی مدت زمان نگهداری در شرایط انجماد کاهش داشت ( $1/34 \log CFU/g$ ). در *L. brevis* اسیدهای چرب اشباع ۲۳/۹۱ درصد و غیراشباع ۷۷ درصد و در تیمار *L. reuteri* اسیدهای چرب اشباع ۲۷/۱۲ درصد و غیراشباع ۷۲/۸۸ درصد بود ( $P < 0/05$ ). افزایش معنی‌دار در نسبت اسیدهای چرب غیراشباع به اشباع در *L. brevis* در مقایسه با *L. reuteri* و عدم تفاوت معنی‌دار در تعداد *L. brevis* طی مدت زمان نگهداری در دمای انجماد سبب شد که *L. brevis* به عنوان محافظ غذایی برای نگهداری فیله قزل‌آلای رنگین‌کمان پرورشی در یخچال و انجماد پیشنهاد شود.

**واژگان کلیدی:** پروبیوتیک، قزل‌آلای رنگین‌کمان پرورشی، *Lactobacillus brevis*، محافظ غذایی.

۱- دانشجوی دکتری میکروبیولوژی، گروه زیست‌شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فن‌آوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.

۲- مربی پژوهشی پژوهشکده آبی‌پروری آب‌های داخلی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، انزلی، ایران.

۳- دانشیار گروه زیست‌شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فن‌آوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.

۴- استادیار گروه زیست‌شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فن‌آوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.

\* نویسنده مسئول: [m.rabbani@biol.ui.ac.ir](mailto:m.rabbani@biol.ui.ac.ir)

## مقدمه

داده می‌شود (Altieriet al., 2005). قزل‌آلای رنگین‌کمان با اختصاص ۲۵ درصد از کل تولید آزادماهیان پرورشی در جهان، نقش مهمی را در تامین غذا و افزایش مصرف ماهی دارد (Gram and Dalgaard, 2002). در ایران پرورش این ماهی پیشرفت چشمگیری داشته، در اغلب مناطق از بازارپسندی مناسبی برخوردار است.

هم‌اکنون فرآورده‌های متعددی از ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مانند ماهی کامل شکم خالی منجمد، ماهی‌دودی و غیره در بازار وجود دارد. اما فیله بسته‌بندی شده تازه این ماهی تاکنون تولید نشده است. مدت زمان ماندگاری فرآورده‌های تازه ماهی به شرایط نگهداری و نیز کیفیت میکروبی مواد اولیه بستگی دارد. آلودگی با میکروارگانیسم‌ها مدت زمان ماندگاری فرآورده‌های تازه ماهی را محدود می‌کند (Dalgaard, 1995). به این دلیل ماهی تازه به شدت فسادپذیر است. کیفیت بهداشتی ماهی و فرآورده‌های ماهی تحت تاثیر آلودگی متقاطع با سایر منابع به شدت کاهش پیدا می‌کند (Gram and Huss, 1996).

سیر رو به رشد تقاضا برای افزایش کیفیت، سهولت مصرف، امنیت، ظاهر تازه و مدت زمان

ماهی به عنوان یکی از غذاهای اصلی انسان به شمار می‌رود و هنوز بخش مهمی از رژیم غذایی انسان را در بسیاری از کشورها تشکیل می‌دهد. این منبع پروتئینی به دلیل داشتن اسیدهای آمینه لازم و عوامل محرک رشد اثر مهمی در ترمیم بافت‌ها، سلامتی و شادابی انسان و به طور کلی رشد بدن دارد. کمبود این منبع پروتئینی عدم تعادل دستگاه عصبی، عقب‌ماندگی فکری، رنجوری و ضعف جسمانی را در انسان پدید می‌آورد و همچنین مقاومت بدن را در برابر بیماری‌های عفونی کاهش می‌دهد (Lopez de Lacey et al., 2014). از سایر مزایای ماهی هضم آسان و ارزش تغذیه‌ای بالای آن است.

با توجه به این‌که قسمت اعظم کره زمین با آب پوشیده شده است، بنابراین گونه‌های زیادی از ماهی وجود دارد. قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) یکی از گونه‌های با ارزش تجاری است که با توجه به طعم و کیفیت مناسب گوشت، مصرف‌کنندگان زیادی را به خود اختصاص داده است. این ماهی در بین آزادماهیان تنها گونه‌ای است که به علت توانایی سازگاری خوب با شرایط پرورشی هم‌اکنون در اغلب نقاط دنیا پرورش

ماندگاری فرآورده‌های ماهی سبب ارائه فن‌آوری‌های نگهداری غیرحرارتی مانند حفاظت طبیعی شد. اخیراً به طور محسوس، جوامع علمی روی پروبیوتیک‌ها به عنوان تقویت‌کننده‌های سلامتی تمرکز کرده‌اند (et al., 2013 Abedi). حفاظت زیستی توسط ترکیبات ضد میکروبی، میکروب‌های کنترل شده و طبیعی به عنوان یک رویکرد بی‌ضرر و زیست‌محیطی برای حل مشکل نگهداری غذا در سالیان اخیر مورد توجه زیادی قرار گرفته است. ثابت شده است که محافظت کننده‌های زیستی مانند بعضی از باکتری‌های اسید لاکتیک دارای خواص ضد میکروبی بوده، رشد باکتری‌های هوازی مولد فساد را متوقف می‌کنند و سبب افزایش امنیت غذا و مدت زمان ماندگاری فرآورده‌های غذایی می‌شوند (Kim and Hearnberger, 1994).

از مطالعات انجام شده در مورد تاثیر باکتری‌های اسید لاکتیک روی فیله ماهی می‌توان به مطالعات Kim و Hearnberger (۱۹۹۴) روی باکتری‌های گرم منفی در فیله‌های گربه‌ماهی کانالی، Altieri و همکاران (۲۰۰۵) برای افزایش مدت زمان ماندگاری فیله‌های ماهی پهن (*Pleuronectes platessa*) تازه با استفاده از باکتری

*Bifidobacterium bifidum* و تیمول، Katikou و همکاران (۲۰۰۷) روی کیفیت میکروبی فیله‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان بسته‌بندی شده به روش وکیوم توسط *Lactobacillus sakei* CECT 4808 و Lopez de *L. curvatus* CECT 904T Lacey و همکاران (۲۰۱۴) روی تعداد کلی باکتری‌ها در ماهی هیک (*Merluccius merluccius*) با استفاده از فیلم‌های آگار شامل عصاره چای سبز و باکتری‌های پروبیوتیک *Lactobacillus paracasei* L26 و Rong *Bifidobacterium lactis* B94 و همکاران (۲۰۱۵) برای حفظ تازگی فیله‌های ماهی تیلاپیا (*Oreochromis niloticus*) توسط باکتری پروبیوتیک *Lactobacillus plantarum* 1.19 اشاره کرد. مطالعات انجام شده در مورد تاثیر باکتری‌های اسید لاکتیک روی فیله آبزیان نشان دادند که تعداد کلی باکتری‌ها، باکتری‌های گرم منفی، *Staphylococcus* و *Enterobacteriaceae* در فیله عمل‌آوری شده با باکتری‌های اسید لاکتیک کاهش یافتند. همچنین این پژوهشگران افزایش زمان ماندگاری فیله‌های عمل‌آوری شده با باکتری‌های اسید لاکتیک را در شرایط یخچال گزارش کردند.

محیط هر باکتری به ارلن ۵۰۰ میلی‌لیتری حاوی محیط کشت MRS مایع انتقال داده شد. ارلن‌ها به مدت ۱۲ ساعت در گرمخانه شیکردار (فن‌آزما گستر، ایران) ۳۷ درجه سلسیوس با دور ۱۰۶g قرار داده شدند. بعد از طی این مدت زمان ۴-۵ میلی‌لیتر از هر محیط کشت به ارلن حاوی ۵۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت جدید انتقال داده شد. این محیط‌ها نیز در گرمخانه شیکردار ۳۷ درجه سلسیوس با دور ۱۰۶g به مدت ۱۲ ساعت قرار داده شدند. سپس چگالی نوری ۵۰۰ میکرولیتر از هر سوسپانسیون باکتریایی با استفاده از اسپکتروفوتومتر (Eppendorf، آلمان) فرابنفش و طول موج ۶۰۰ نانومتر در راس هر ساعت خوانده و برای رسم منحنی رشد استفاده شد.

#### تهیه سوسپانسیون باکتریایی برای عمل‌آوری

##### فیله ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان

سوسپانسیون باکتریایی در فاز لگاریتمی تعیین شده، از گرمخانه خارج شد. بعد از سانتریفوژ (فن‌آزما گستر، ایران) در ۹۸۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه، مایع رویی حذف شد و رسوب باکتریایی دو بار با سرم فیزیولوژی شسته شد. برای عمل‌آوری فیله‌های ماهی با هر یک از باکتری‌ها، رسوب باکتری با استفاده از سرم

مطالعه حاضر با هدف بررسی امکان استفاده از پوشش پروبیوتیکی *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (PTCC 1737)، *L. reuteri* (PTCC 1655) و *L. brevis* CD0817 روی کیفیت میکروبی فیله ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پرورشی در دمای یخچال و انجماد انجام شد.

#### مواد و روش‌ها

##### نمونه‌برداری

مقدار ۱۵ کیلوگرم ماهی نر قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) پرورشی در وزن ۷۰۰-۵۰۰ گرم از استخر پرورش ماهی خریداری و سر، دم، باله‌ها و امعا و احشای آن‌ها حذف شد.

##### تعیین منحنی رشد

برای تهیه فاز لگاریتمی باکتری‌های *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* و *L. reuteri*، *L. brevis* منحنی رشد این باکتری‌ها رسم شد. برای رسم این منحنی، گونه‌های باکتری (*Lactobacillus* روی محیط کشت MRS آگار (Q-LAB، کانادا) کشت داده شدند. محیط‌های کشت به مدت یک شبانه روز در گرمخانه ۳۷ درجه سلسیوس گذاشته شدند. سپس یک آنس از

ماهی به مدت ۵ دقیقه در داخل این محلول قرار داده شد. سایر مراحل همانند بسته‌بندی نمونه‌های آزمایشی انجام شد. تیمارهای آزمایشی و شاهد به مدت ۵ روز در دمای یخچال و شش ماه در دمای انجماد قرار گرفتند. در شرایط یخچال نمونه‌برداری در زمان‌های ۲ ساعت، ۱، ۳ و ۵ روز بعد از عمل‌آوری انجام شد. در دمای انجماد در زمان‌های ۲ ساعت، ۱ روز، ۳ و ۶ ماه بعد از عمل‌آوری نمونه‌برداری شد.

#### آزمایش‌های میکروبی

برای آزمایش‌های میکروبی تعداد کلی باکتری‌ها، باکتری‌های *Staphylococcus* کلی‌فرم‌ها، *Escherichia coli* و باکتری‌های اسید لاکتیک شمارش شد. کلی باکتری‌ها و باکتری‌های *Staphylococcus* به روش‌های کشت پورپلیت و سطحی کشت شدند. باکتری‌های کلی‌فرم و *E. coli* به روش پور-پلیت دو لایه و سطحی کشت شدند. برای تعیین تعداد کلی باکتری‌ها، باکتری‌های *Staphylococcus* کلی‌فرم‌ها و *E. coli* از محیط‌های کشت پلیت کانت آگار، مانیتول سالت آگار، مک‌کانکی آگار و مک‌کانکی سوربیتول، سفکسیم و تلوریت آگار (-CT

فیزیولوژی به حجم اولیه سوسپانسیون میکروبی رسانده شد. یک میلی‌لیتر از هر سوسپانسیون باکتریایی برای تهیه سوسپانسیون ترکیبی باکتری‌های *Lactobacillus* استفاده شد.

#### عمل‌آوری تیمارهای آزمایشی

برای اجرای این پژوهش ۴ تیمار آزمایشی و ۲ تیمار شاهد در نظر گرفته شد. تیمارهای آزمایشی شامل فیله ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پرورشی غوطه‌ور شده در هر یک از سوسپانسیون‌های *L. delbrueckii* subsp. *L. reuteri* bulgaricus (PTCC 1737) (PTCC 1655)، *L. brevis* CD0817 به طور جداگانه و ترکیب هر سه باکتری، بودند. میزان باکتری‌ها در هر تیمار  $1 \times 10^8$  CFU/mL بود. فیله‌های ماهی به مدت ۵ دقیقه در هر یک از این سوسپانسیون‌ها قرار داده شدند. فیله‌ها بعد از خارج کردن از سوسپانسیون به مدت ۱۰ دقیقه در آبکش قرار داده شدند و سپس در پلاستیک‌های زیپ‌کیپ بسته‌بندی شدند. دو تیمار شاهد نیز شامل فیله ماهی بدون افزودنی و فیله ماهی عمل‌آوری شده با اسید لاکتیک ۲ درصد بود. برای تهیه نمونه شاهد با پوشش اسید لاکتیک ۲ درصد، فیله

فاکتور کلامپینگ و کوآگولاز استفاده شد. برای بررسی بیوشیمیایی کلی‌فرم‌ها از تخمیر قندهای سالیسین، ساکارز، مانیتول، گزیلوز، رافینوز، مانوز، ملیزیتوز، مالتوز، لاکتوز، کاتالاز، سلوبیوز، آرابینوز و احیای نیترات استفاده شد (Goodfellow et al., 2009).

برای شناسایی شیمیایی باکتری *L. brevis* از بررسی شکل کلنی، رنگ‌آمیزی گرم، شکل میکروسکوپی، آزمایش‌های بیوشیمیایی شامل تخمیر قندهای آرابینوز، سلیبوز، فروکتوز، گالاکتوز، لاکتوز، مانوز، مالتوز، مانیتول، ملیزیتوز، ملیبوز، رافینوز، رامنوز، ساکارز، ترهالوز، گزیلوز، توانایی رشد در غلظت‌های ۲، ۳، ۴ و ۶/۵ درصد نمک، توانایی رشد در دماهای ۱۵ و ۴۵ درجه سلسیوس، تولید گاز از گلوکز و توانایی رشد در pH ۴/۵ و ۶/۵، کاتالاز، اکسیداز، اندول، متیل رد، VP و سیمون سترات و آزمایش‌های مولکولی استفاده شد.

#### آزمایش‌های مولکولی

برای شناسایی مولکولی باکتری *L. brevis* و تایید حضور باکتری‌های کلی‌فرم و *Staphylococcus capitis* از آغازگرهای RW01 و DG74 (Teng et al., 2004)

، Oxoid، SMAC (انگلستان) استفاده شد. برای کشت تعداد کلی باکتری‌ها، باکتری‌های *Staphylococcus* کلی‌فرم‌ها و باکتری‌های اسید لاکتیک، مقدار ۲۵ گرم از هر یک از تیمارهای آزمایشی و شاهد با ۲۲۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی به همراه ۰/۱ درصد پپتون واتر هموژنیزه شد (رقت  $10^{-1}$ ). برای تهیه رقت  $10^{-2}$  مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از رقت  $10^{-1}$  با ۹۰ میلی‌لیتر رقیق کننده مخلوط شد و برای تهیه رقت  $10^{-3}$  مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از رقت  $10^{-2}$  با ۹۰ میلی‌لیتر رقیق کننده مخلوط شد. برای باکتری *E. coli* مقدار ۵۰ گرم از هر یک از تیمارهای آزمایشی و شاهد با ۴۵۰ میلی‌لیتر رقیق کننده مخلوط شد. برای کشت این باکتر صرفاً از رقت  $10^{-1}$  استفاده شد. شناسایی گونه باکتری با استفاده از تکثیر و تعیین توالی ژن rRNA ۱۶s انجام شد.

#### آزمایش‌های بیوشیمیایی

برای بررسی بیوشیمیایی باکتری *Staphylococcus* از آزمایش‌های ریبوز، سالیسین، ساکارز، تورانوز، مانیتول، گزیلوز، گزیلیتول، رافینوز، مانوز، ملیزیتوز، مالتوز، لاکتوز، کاتالاز، فروکتوز، گالاکتوز، سلوبیوز، آرابینوز، احیای نیترات، همولیز، بتا گلوکوزیداز،

خاصیت پروبیوتیکی باکتری *L. brevis* از آزمایش‌های هیدرولیز آرژنین، همولیز ۷ درصد خون گوسفند، صفرای ۰/۳ درصد، توانایی رشد در pH ۴ و ۲/۵ طی مدت زمان ۳ و ۴ ساعت، دیسک آنتی‌بیوتیک شامل دیسک‌های جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، کلرامفنیکال (۳۰ میکروگرم)، سفالوتین (۳۰ میکروگرم)، پنی‌سیلین (۱۰ میکروگرم)، آموکسی‌سیلین (۲۵ میکروگرم)، تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم)، آزیترومایسین (۱۵ میکروگرم)، ونکومایسین (۳۰ میکروگرم)، استریتومایسین (۱۰ میکروگرم)، اریترومایسین (۱۵ میکروگرم) کشت سلول برای تعیین تهاجم و چسبندگی به رده سلولی و توانایی رشد در حضور پپسین و تریپسین بر اساس استاندارد ملی ایران استفاده شد (استاندارد ملی ایران شماره ۱۳۹۲، ۱۹۴۵۹).

توسط PCR (Master Cycler Gradient X50, Eppendorf, آلمان) بر اساس جدول ۱ استفاده شد. برای باکتری *E. coli* آغازگرهای Tufa مستقیم (F) و معکوس (R) استفاده شد (Furano, 1977). برای شناسایی *S. aureus* آغازگر SAS2 به عنوان رشته‌های مستقیم و معکوس استفاده شد (Manav et al., 2018). محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز آغازگرهای DG74 و RWo1 (۳۷۰ جفت باز طول) توسط توالی‌یابی سانگر (سوند) تعیین توالی شدند. برای سایر آغازگرها روی ژل PCR باند تشکیل نشد.

#### آزمایش‌های پروبیوتیکی

پروبیوتیک‌های *Lactobacillus reuteri* و *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران خریداری شدند. در این پژوهش برای بررسی

جدول ۱: آغازگرهای استفاده شده برای ارزیابی مولکولی

شرایط PCR					توالی	آغازگر
گسترش نهایی	گسترش	داناتوراسیون جایگزینی	داناتوراسیون اولیه	توالی		
۷۲°C	۷۴°C	۵۴°C	۹۴°C	۹۵°C	5' AGGAGGTGATCCAACCGCA 3'	DG74
Δmin	۴۵min	۳۰s	۴۵s	Δmin		
۷۲°C	۷۴°C	۵۴°C	۹۴°C	۹۵°C	5' AACTGGAGGAAGGTGGGGAT 3'	RWo1
Δmin	۴۵min	۳۰s	۴۵s	Δmin		
۷۲°C	۷۲°C	۵۱°C	۹۴°C	۹۵°C	F: 5TNACATCHGTWGTWCKNACATARAAYTG-3'	Tufa

Ymin	۴۵s	۳۰s	۳۰s	Δmin	R: 5'TGGGTDGAHAADATTTWYNMNYTRATGR-3'	
۷۲°C	۷۲°C	۵۷°C	۹۴°C	۹۴°C	F: 5'-AGCGAGTCTGAATAGGGCGTTT-3'	SAS2
۱۰min	۳۰s	۴۵s	۳۰s	۱۰min	R: 5'-CCCATCACAGCTCAGCCTTAAC-3'	

باکتری‌ها با استفاده از رابطه ۱ محاسبه شد (Nithya and Halami, 2013).

رابطه ۱:

$$Ad (\%) = [(A_0 - A) / A_0] \times 100$$

$A_0$ : جذب قبل از استخراج با حلال آلی؛  $A$ : جذب بعد از استخراج با حلال آلی.

آزمایش تهاجم به کشت سلولی با روش Rowan و همکاران (۲۰۰۱) انجام شد. برای بررسی کشت سلولی از رده سلولی HT-29 و محیط کشت RPMI 1640 (Sigma، آمریکا) غنی شده با ۱۰ درصد سرم جنین گاو استفاده شد. سلول‌های تک لایه در ۹۶ چاهک پخش شدند و با سوسپانسیون استریل کشت ۱۸ ساعته باکتری *L. brevis* در محیط BHI (Sigma، آمریکا) آغشته شدند. سلول‌های تک لایه تحت تیمار حرارتی ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه با ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون فوق مجاور شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و فضای دارای ۵ درصد دی‌اکسید کربن گرمخانه‌گذاری شدند. بعد از طی این مدت زمان، سوسپانسیون هر چاهک دور ریخته شد و ۲۵ میکرولیتر از

چسبندگی میکروبی با روش Nithya و Halami (۲۰۱۳) انجام شد. به طور خلاصه، کشت یک شبانه روز از هر باکتری با سرعت ۶۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. بعد از حذف مایع رویی، رسوب باکتری با بافر نمک فسفات شسته شد. رسوب شسته شده با استفاده از بافر نمک فسفات به حجم اولیه سوسپانسیون میکروبی رسانده شد. جذب نوری توسط اسپکتروفتومتر فرابنفش در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون با حجم مساوی از اتیل استات به عنوان حلال قطبی، زایلن به عنوان حلال غیرقطبی و کلروفرم به عنوان حلال اسیدی مخلوط شد. این مخلوط بعد از مخلوط شدن به مدت ۲ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری شد. سپس مجدداً به مدت ۲ دقیقه توسط دست تکان داده شد. بعد از قرار دادن به مدت زمان ۲۰ دقیقه در دمای محیط، جذب نوری فاز آبی در طول موج ۶۰۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر فرابنفش اندازه‌گیری شد. چسبندگی (Ad)



پروفایل اسیدهای چرب تیمارهای عمل‌آوری شده با *L. delbrueckii* و *L. reuteri* توسط کروماتوگرافی گازی (6890N، Agilent، آمریکا) با ستون موئینه ۶۰ میلی‌متری و دکتور یونی شعله‌ای بر اساس استاندارد ملی ایران انجام شد. به این ترتیب که ۵۰ میلی‌گرم نمونه به ظرف حجمی نشانه‌دار منتقل شد. چند عدد سنگ جوش و ۲ میلی‌لیتر محلول سدیم متوکسید در متانول (۰/۲ مولار) به آن اضافه شد. سپس سرد کننده برگردان به آن متصل شد و نمونه بعد از جوشیدن تا زمان شفاف شدن مخلوط شد. بعد از قطع حرارت و توقف هم‌زدن، ۲ میلی‌لیتر محلول متانولی فنل فتالین به آن اضافه شد. برای بی‌رنگ شدن محلول اسید سولفوریک در متانول (۱ مولار) به آن اضافه و ۵ دقیقه جوشانده شد. در مرحله بعدی برای خنک شدن زیر جریان آب سرد قرار گرفت و با ۴ میلی‌لیتر محلول کلرید سدیم ۴۰ درصد مخلوط شد. سپس ۱ میلی‌لیتر ایزواکتان به آن اضافه و به مدت ۱۵ ثانیه به شدت هم‌زده شد. محلول تا زمان تبدیل به دو فاز در دمای محیط قرار گرفت. برای رسیدن فاز آبی به انتهای پایینی گردن ظرف، مجدداً محلول کلرید سدیم اضافه شد و فاز روئی شامل

محیط کاملاً تازه شامل محیط کشت RPMI 1640 غنی شده با ۱۰ درصد سرم جنین گاو به همراه ۰/۰۰۴ گرم در میلی‌لیتر عامل MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-bis(4-methylphenyl)-tetrazolium bromide (Sigma، آمریکا) افزوده شد. نمونه‌ها به مدت ۳ ساعت در گرمخانه دی‌اکسید کربن و دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفتند. چگالی نوری سلول‌ها در ۵۴۰ نانومتر با استفاده از الیزا ریدر (Biotek، آمریکا) اندازه‌گیری شد. سمیت سلولی (درصد سلول‌های مرده، CT) از طریق رابطه ۲ محاسبه شد (Rowan et al., 2001).

رابطه ۲:

$$CT (\%) = [1 - (OD_s / OD_c)] \times 100$$

OD<sub>s</sub>: چگالی نوری نمونه آزمایشی؛ OD<sub>c</sub>: چگالی نوری نمونه شاهد منفی.

به عنوان شاهد مثبت پروبیوتیک از باکتری *Bacillus coagulans* (IBRC-M 10807) ، شاهد بیماری‌زای مثبت از باکتری *Listeria monocytogenes* (IBRC-M 10671) و به عنوان شاهد منفی از بافر فسفات نمکی به جای سوسپانسیون سلولی استفاده شد.

اندازه‌گیری پروفایل اسیدهای چرب

سطح اطمینان ۹۵ درصد در نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۷ استفاده شد. نتایج نیز به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار ارائه شدند.

### نتایج

میانگین تعداد کلی باکتری‌ها، باکتری *Staphylococcus* و باکتری‌های کلی‌فرم در هر گرم فیله قزل‌آلای رنگین‌کمان قبل از عمل‌آوری به ترتیب  $۳/۱۲ \pm ۱/۱۲$ ،  $۲/۲۳ \pm ۰/۶۸$  و  $۱/۴۷ \pm ۰/۲۵ \log CFU/g$  بود. تعداد کلی باکتری‌ها در هر گرم فیله قزل‌آلای رنگین‌کمان بعد از عمل‌آوری با *L. delbrueckii* subsp. *L. brevis* و *L. reuteri*, *bulgaricus* ترکیب سه سویه طی مدت زمان نگهداری (از روز اول تا پنجم) در شرایط یخچال بدون تغییر بود ( $۸ \pm ۰/۳۹ \log CFU/g$ ). میانگین تعداد باکتری‌های *Staphylococcus* در هر گرم فیله قزل‌آلای رنگین‌کمان بعد از عمل‌آوری با *L. delbrueckii*, *L. reuteri*, *L. brevis* و *subsp. bulgaricus* ترکیب سه سویه طی مدت زمان نگهداری (از روز اول تا پنجم) در شرایط یخچال به ترتیب  $۲/۲۱ \pm ۰/۳۸$ ،  $۲/۲۰ \pm ۰/۸۷$ ،  $۲/۳۴ \pm ۰/۹۷$  و  $۱/۸۰ \pm ۰/۷۹ \log CFU/g$  بود. میانگین تعداد

ایزواکتان از سایر فازها برای اندازه‌گیری پروفایل اسیدهای چرب جدا شد (استاندارد ملی ایران شماره ۲-۱۳۱۲۶، ۱۳۹۴).

### اندازه‌گیری مقدار اسیدهای آلی آزاد

مقدار اسیدهای آلی در باکتری‌های *Lactobacillus* بعد از کشت آن‌ها در محیط MRS مایع و گذاشتن به مدت ۴۸ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سلسیوس اندازه‌گیری شد. به این ترتیب که ۱ میلی‌لیتر از این محیط کشت توسط سود ۱ نرمال تا pH ۷ خنثی شد. سپس با توجه به حجم مصرفی سود مقدار کل اسیدهای آلی ( $OA_T$ ) از رابطه ۳ به دست آمد (Hoque et al., 2010).

رابطه ۳:

$$OA_T(\%) = V \times N \times D$$

V: حجم سود؛ N: نرمالیتته سود؛ D: ضریب رقت.

### تجزیه و تحلیل آماری

برای تجزیه و تحلیل داده‌های به دست آمده از فیله‌های عمل‌آوری شده با سویه‌های باکتری *Lactobacillus* و تیمارهای شاهد در شرایط یخچال و انجماد از آزمون‌های T-test و تحلیل واریانس (ANOVA) یک‌طرفه و دوطرفه به همراه پس‌آزمون توکی (Tukey) با

*bulgaricus* و ترکیب سه سویه طی مدت زمان نگهداری (از روز اول تا ماه ششم) در شرایط انجماد  $۱/۳ \pm ۰/۵۴$ ،  $۰/۷۸ \pm ۰/۳۴$ ،  $۱/۵۵ \pm ۰/۶۹$  و  $۱/۵۹ \pm ۰/۸۱$  logCFU/g بود. میانگین تعداد باکتری‌های کلی‌فرم در هر گرم فیله قزل‌آلای رنگین‌کمان بعد از عمل‌آوری با *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* طی مدت زمان نگهداری (از روز اول تا ماه ششم) در شرایط انجماد  $۰/۵۰ \pm ۰/۲۳$  logCFU/g بود و در سایر تیمارهای آزمایشی این باکتری مشاهده نشد. میانگین تعداد *Lactobacillus*ها در هر گرم فیله قزل‌آلای رنگین‌کمان بعد از عمل‌آوری با *L. brevis*، *L. reuteri*، *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* و ترکیب سه سویه طی مدت زمان نگهداری (از روز اول تا ماه ششم) در شرایط انجماد  $۵/۵ \pm ۰/۹۱$ ،  $۷/۷۵ \pm ۰/۹۸$  و  $۶/۶۶ \pm ۰/۷۵$  logCFU/g بود.

میانگین تعداد کلی باکتری‌ها و باکتری‌های *Staphylococcus* در نمونه شاهد عمل‌آوری شده با اسید لاکتیک ۲ درصد در شرایط یخچال به ترتیب  $۳/۵۵ \pm ۰/۹۸$  و  $۲/۷۱ \pm ۱/۱۶$  logCFU/g و در شرایط انجماد

باکتری‌های کلی‌فرم در هر گرم فیله قزل‌آلای رنگین‌کمان بعد از عمل‌آوری با *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* طی مدت زمان نگهداری (از روز اول تا پنجم) در شرایط یخچال  $۱/۱۸ \pm ۰/۵۹$  logCFU/g بود و در سایر تیمارهای آزمایشی این باکتری‌ها مشاهده نشدند. تعداد *Lactobacillus*ها در هر گرم فیله قزل‌آلای رنگین‌کمان بعد از عمل‌آوری با *L. brevis*، *L. reuteri*، *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* و ترکیب سه سویه طی زمان نگهداری (از روز اول تا پنجم) در شرایط یخچال بدون تغییر بود ( $۸ \pm ۰/۵۶$  logCFU/g).

میانگین تعداد کلی باکتری‌ها در هر گرم فیله قزل‌آلای رنگین‌کمان بعد از عمل‌آوری با *L. brevis*، *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* و ترکیب سه سویه طی مدت زمان نگهداری (از روز اول تا ماه ششم) در شرایط انجماد  $۴/۵۰ \pm ۱/۵۶$ ،  $۷/۷۵ \pm ۱/۷۶$  و  $۶/۰۵ \pm ۱/۹۷$  logCFU/g بود.

میانگین تعداد باکتری‌های *Staphylococcus* در هر گرم فیله قزل‌آلای رنگین‌کمان بعد از عمل‌آوری با *L. brevis*، *L. reuteri*، *L. delbrueckii* subsp.

افزایش معنی‌داری را نشان داد ( $P < 0.05$ ). تعداد این باکتری در فیله قزل‌آلای رنگین‌کمان عمل‌آوری شده با *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* طی مدت زمان نگهداری در یخچال افزایش معنی‌داری را نشان نداد ( $P > 0.05$ ). این باکتری در تیمار عمل‌آوری شده با ترکیب *Lactobacillus* طی مدت زمان نگهداری کاهش معنی‌داری را نشان داد ( $P < 0.05$ ). تیمارهای آزمایشی در تعداد باکتری‌های *Staphylococcus* تفاوت معنی‌داری را با هم نشان ندادند ( $P < 0.05$ ). باکتری‌های کلی‌فرم در تیمارهای عمل‌آوری شده با *L. brevis*، *L. reuteri*، ترکیب *Lactobacillus* ها و اسیدلاکتیک مشاهده نشد. این باکتری در تیمار *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* طی مدت زمان نگهداری افزایش معنی‌داری را نشان نداد ( $P < 0.05$ ). باکتری‌های کلی‌فرم در تیمار *L. delbrueckii* در مقایسه با سایر تیمارها کاهش معنی‌داری را نشان داد ( $P < 0.05$ ). بر اساس جدول ۲ تعداد باکتری‌های *Staphylococcus* در تیمارهای عمل‌آوری شده با *L. brevis*، *L. reuteri*، شاهد بدون لاکتیک طی مدت زمان نگهداری در یخچال -

۲/۱۳±۱/۱۸ و  $1/82 \pm 0/97 \log CFU/g$  بود. باکتری کلی‌فرم در این نمونه‌ها مشاهده نشد. میانگین تعداد کلی باکتری‌ها، باکتری‌های بدون افزودنی در شرایط یخچال به ترتیب  $4/76 \pm 1/35$  و  $2/56 \pm 1/46$  و  $1/55 \pm 0/99 \log CFU/g$  در انجماد  $2/57 \pm 1/41$  و  $1/40 \pm 0/96$  و  $0/73 \pm 0/29 \log CFU/g$  بود. مقدار اسیدهای آلی آزاد در فیله ماهی قزل‌آلای عمل‌آوری شده با *Lactobacillus* *delbrueckii* subsp. *brevis* و *bulgaricus* و *L. reuteri* به ترتیب  $0/75 \pm 0/64$ ،  $1/64 \pm 0/74$ ،  $1/53 \pm 0/87$  و  $0/75 \pm 0/64$  درصد بود. مقادیر این اسیدها در تیمار *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* در مقایسه با تیمار *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* تفاوت معنی‌داری نداشت ( $P > 0.05$ ). اما در تیمار *L. reuteri* در مقایسه با سایر تیمارها کاهش معنی‌داری را نشان داد ( $P < 0.05$ ).

باکتری‌های *Lactobacillus* در تیمارهای *L. reuteri*، *bulgaricus* و ترکیب *Lactobacillus* طی مدت زمان نگهداری در یخچال تفاوت معنی‌داری را نشان نداد ( $P > 0.05$ ). اما این عامل در تیمارهای شاهد بدون افزودنی و عمل‌آوری شده با اسید لاکتیک، طی مدت زمان نگهداری در یخچال افزایش معنی‌داری را نشان داد ( $P < 0.05$ ).

باکتری‌های *Lactobacillus* در تیمارهای *L. delbrueckii* subsp. *L. brevis* و ترکیب *L. reuteri*، *bulgaricus* در یخچال تفاوت معنی‌داری را نشان ندادند ( $P > 0.05$ ).

جدول ۲: تعداد باکتری‌ها در فیله ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پرورشی در تیمارهای مختلف طی مدت زمان نگهداری به مدت ۵ روز در دمای یخچال (میانگین  $\pm$  انحراف معیار)

زمان نمونه‌برداری (روز)				تیمار	باکتری
۵	۳	۱	۰		
۲/۴۶ $\pm$ ۰/۴۳ <sup>b</sup>	۲/۳۲ $\pm$ ۰/۶۵ <sup>ab</sup>	۲/۱۲ $\pm$ ۰/۹۷ <sup>a</sup>	۱/۹۴ $\pm$ ۰/۹۵ <sup>aA</sup>	<i>L. brevis</i>	تعداد <i>Staphylococcus</i> (logCFU/g)
۲/۲۷ $\pm$ ۰/۸۹ <sup>a</sup>	۲/۲۱ $\pm$ ۰/۲۴ <sup>a</sup>	۲/۱۶ $\pm$ ۰/۲۷ <sup>a</sup>	۱/۹۸ $\pm$ ۰/۳۴ <sup>aA</sup>	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	
۲/۵۲ $\pm$ ۰/۲۸ <sup>b</sup>	۲/۳۸ $\pm$ ۰/۳۹ <sup>ab</sup>	۲/۲۵ $\pm$ ۰/۴۵ <sup>a</sup>	۲/۱۳ $\pm$ ۰/۲۹ <sup>aA</sup>	<i>L. reuteri</i>	
۱/۵۱ $\pm$ ۰/۵۴ <sup>b</sup>	۱/۷۷ $\pm$ ۰/۵۷ <sup>ab</sup>	۱/۸۹ $\pm$ ۰/۵۶ <sup>a</sup>	۲/۰۵ $\pm$ ۰/۴۹ <sup>aA</sup>	ترکیبی	شاهد بدون افزودنی
۲/۹۴ $\pm$ ۰/۷۱ <sup>b</sup>	۲/۶۹ $\pm$ ۰/۶۶ <sup>ab</sup>	۲/۳۸ $\pm$ ۰/۶۱ <sup>a</sup>	۲/۲۳ $\pm$ ۰/۶۸ <sup>aA</sup>	شاهد بدون افزودنی	
۳/۸۴ $\pm$ ۰/۷۵ <sup>b</sup>	۲/۶۹ $\pm$ ۰/۶۹ <sup>b</sup>	۲/۳۷ $\pm$ ۰/۱۰ <sup>ab</sup>	۱/۹۵ $\pm$ ۰/۷۳ <sup>aA</sup>	شاهد اسیدلاکتیک	
-	-	-	-	<i>L. brevis</i>	تعداد کلی فرم‌ها (logCFU/g)
۱/۳۷ $\pm$ ۰/۵۶ <sup>a</sup>	۱/۳۷ $\pm$ ۰/۳۹ <sup>a</sup>	۱/۰۰ $\pm$ ۰/۱۶ <sup>a</sup>	۱/۰۰ $\pm$ ۰/۱۷ <sup>Aa</sup>	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	
-	-	-	-	<i>L. reuteri</i>	
-	-	-	-	ترکیبی	شاهد بدون افزودنی
۱/۶۹ $\pm$ ۰/۳۵ <sup>a</sup>	۱/۶۰ $\pm$ ۰/۳۲ <sup>a</sup>	۱/۴۷ $\pm$ ۰/۲۶ <sup>a</sup>	۱/۴۷ $\pm$ ۰/۲۵ <sup>aB</sup>	شاهد بدون افزودنی	
-	-	-	-	شاهد اسیدلاکتیک	
۸/۰۰ $\pm$ ۰/۱۲ <sup>a</sup>	۸/۰۰ $\pm$ ۰/۱۱ <sup>a</sup>	۸/۰۰ $\pm$ ۰/۹۹ <sup>a</sup>	۸/۰۰ $\pm$ ۰/۴۵ <sup>aC</sup>	<i>L. brevis</i>	تعداد کلی باکتری‌ها (logCFU/g)
۸/۰۰ $\pm$ ۰/۹۹ <sup>a</sup>	۸/۰۰ $\pm$ ۰/۹۵ <sup>a</sup>	۸/۰۰ $\pm$ ۰/۱۲ <sup>a</sup>	۸/۰۰ $\pm$ ۰/۹۸ <sup>aC</sup>	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	
۸/۰۰ $\pm$ ۰/۸۵ <sup>a</sup>	۸/۰۰ $\pm$ ۰/۸۹ <sup>a</sup>	۸/۰۰ $\pm$ ۰/۱۳ <sup>a</sup>	۸/۰۰ $\pm$ ۰/۹۱ <sup>aC</sup>	<i>Lactobacillus reuteri</i>	
۸/۰۰ $\pm$ ۰/۹۷ <sup>a</sup>	۸/۰۰ $\pm$ ۰/۹۵ <sup>b</sup>	۸/۰۰ $\pm$ ۰/۱۲ <sup>b</sup>	۸/۰۰ $\pm$ ۰/۱۱ <sup>bB</sup>	ترکیبی	شاهد بدون افزودنی
۶/۹۸ $\pm$ ۱/۱۹ <sup>d</sup>	۵/۲۳ $\pm$ ۰/۹۹ <sup>c</sup>	۳/۷۴ $\pm$ ۱/۱۳ <sup>b</sup>	۳/۱۲ $\pm$ ۱/۱۲ <sup>aA</sup>	شاهد بدون افزودنی	
۳/۹۰ $\pm$ ۰/۹۱ <sup>b</sup>	۳/۷۸ $\pm$ ۰/۸۹ <sup>b</sup>	۳/۳۵ $\pm$ ۰/۹۹ <sup>ab</sup>	۳/۱۸ $\pm$ ۰/۹۸ <sup>aA</sup>	شاهد اسیدلاکتیک	
۸/۰۰ $\pm$ ۰/۲۴ <sup>a</sup>	۸/۰۰ $\pm$ ۰/۱۴ <sup>a</sup>	۸/۰۰ $\pm$ ۰/۱۲ <sup>a</sup>	۸/۰۰ $\pm$ ۰/۱۷ <sup>aA</sup>	<i>L. brevis</i>	تعداد <i>Lactobacillus</i> در تیمارهای آزمایشی (logCFU/g)
۸/۰۰ $\pm$ ۰/۲۹ <sup>a</sup>	۸/۰۰ $\pm$ ۰/۳۴ <sup>a</sup>	۸/۰۰ $\pm$ ۰/۲۴ <sup>a</sup>	۸/۰۰ $\pm$ ۰/۱۶ <sup>aA</sup>	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	
۸/۰۰ $\pm$ ۰/۹۸ <sup>a</sup>	۸/۰۰ $\pm$ ۰/۳۹ <sup>a</sup>	۸/۰۰ $\pm$ ۰/۱۵ <sup>a</sup>	۸/۰۰ $\pm$ ۰/۱۷ <sup>aA</sup>	<i>L. reuteri</i>	
۸/۰۰ $\pm$ ۰/۹۲ <sup>a</sup>	۸/۰۰ $\pm$ ۰/۹۳ <sup>a</sup>	۸/۰۰ $\pm$ ۰/۹۷ <sup>a</sup>	۸/۰۰ $\pm$ ۰/۹۹ <sup>aA</sup>	ترکیبی	

حروف کوچک متفاوت در یک ردیف و حروف بزرگ متفاوت در یک ستون نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

افزودنی کاهش معنی‌داری را نشان داد ( $P < 0/05$ ). در این تیمارها، باکتری‌های کلی-فرم طی فازهای سوم و چهارم نمونه‌برداری تفاوت معنی‌داری را نشان ندادند ( $P > 0/05$ ). تعداد کلی باکتری‌ها و باکتری‌های *Lactobacillus* در تیمار *L. brevis* طی مدت زمان نگهداری در انجماد تفاوت معنی‌داری را نشان نداد ( $P > 0/05$ ). اما این عوامل در تیمارهای عمل‌آوری شده با *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ترکیب *Lactobacillus reuteri* شاهد بدون افزودنی و شاهد اسید لاکتیک طی مدت زمان نگهداری در انجماد کاهش معنی‌داری را نشان دادند ( $P < 0/05$ ). تعداد کلی باکتری‌ها و باکتری‌های *Lactobacillus* در تیمار *L. reuteri* تا فاز سوم نمونه‌برداری تفاوت معنی‌داری را نشان نداد ( $P > 0/05$ ). تعداد کلی باکتری‌ها در تیمارهای آزمایشی در مقایسه با تیمارهای شاهد افزایش معنی‌داری را نشان داد ( $P < 0/05$ ). علاوه بر این، تعداد کلی باکتری‌ها، باکتری‌های *Staphylococcus* و کلی‌فرم در تیمار شاهد بدون افزودنی در مقایسه با تیمار شاهد اسید لاکتیک افزایش معنی‌داری را نشان داد ( $P < 0/05$ ).

بر اساس جدول ۳ تعداد باکتری‌های *Staphylococcus* در تیمارهای عمل‌آوری شده با *L. brevis*، *L. reuteri* و پوشش ترکیبی طی مدت زمان نگهداری در انجماد کاهش معنی‌داری را نشان نداد ( $P > 0/05$ ). اما در تیمار عمل‌آوری شده با *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* کاهش معنی‌داری را نشان داد ( $P < 0/05$ ). باکتری‌های *Staphylococcus* در تیمارهای شاهد بدون افزودنی و عمل‌آوری شده با اسید لاکتیک طی مدت زمان نگهداری در انجماد کاهش معنی‌داری را نشان داد ( $P < 0/05$ ). باکتری‌های *Staphylococcus* در تیمارهای آزمایشی در مقایسه با تیمارهای شاهد کاهش معنی‌داری را نشان دادند ( $P < 0/05$ ). باکتری‌های کلی‌فرم در تیمارهای ترکیبی *Lactobacillus*، شاهد عمل‌آوری شده با اسید لاکتیک، *L. brevis* و *L. reuteri* مشاهده نشد. این باکتری در تیمارهای عمل‌آوری شده با *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* و شاهد بدون افزودنی در فازهای اول و دوم نمونه‌برداری تفاوت معنی‌داری را نشان نداد ( $P > 0/05$ ). باکتری‌های کلی‌فرم در تیمار عمل‌آوری شده با *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* در مقایسه با شاهد بدون

جدول ۳: تعداد باکتری‌ها در فیله ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پرورشی در تیمارهای مختلف طی مدت زمان نگهداری به مدت شش ماه در دمای انجماد (میانگین  $\pm$  انحراف معیار)

زمان نمونه‌برداری بعد از انجماد				تیمار	باکتری
۶ ماه	۳ ماه	۱ روز	۲ ساعت		
۱/۱۹ $\pm$ ۰/۳۶ <sup>a</sup>	۱/۲۹ $\pm$ ۰/۷۵ <sup>a</sup>	۱/۴۲ $\pm$ ۰/۱۳ <sup>a</sup>	۱/۴۴ $\pm$ ۰/۶۵ <sup>aA</sup>	<i>L. brevis</i>	تعداد <i>Staphylococcus</i> (logCFU/g)
-	-	۱/۵۶ $\pm$ ۰/۱۵ <sup>a</sup>	۱/۵۷ $\pm$ ۰/۲۱ <sup>aA</sup>	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	
۱/۴۶ $\pm$ ۱/۱۱ <sup>a</sup>	۱/۵۱ $\pm$ ۰/۹۵ <sup>a</sup>	۱/۶۱ $\pm$ ۰/۸۹ <sup>a</sup>	۱/۶۵ $\pm$ ۰/۱۹ <sup>aA</sup>	<i>L. reuteri</i>	
۱/۳۸ $\pm$ ۰/۴۱ <sup>a</sup>	۱/۵۵ $\pm$ ۰/۴۵ <sup>a</sup>	۱/۷۰ $\pm$ ۰/۳۴ <sup>a</sup>	۱/۷۲ $\pm$ ۰/۴۹ <sup>aA</sup>	ترکیبی	
-	۱/۱۲ $\pm$ ۱/۱۶ <sup>b</sup>	۱/۶۵ $\pm$ ۱/۱۲ <sup>c</sup>	۲/۸۶ $\pm$ ۰/۶۸ <sup>dA</sup>	شاهد بدون افزودنی	
-	۱/۹۰ $\pm$ ۰/۸۹ <sup>b</sup>	۲/۶۷ $\pm$ ۱/۱۵ <sup>c</sup>	۲/۷۳ $\pm$ ۰/۷۳ <sup>cA</sup>	شاهد اسیدلاکتیک	
-	-	-	-	<i>L. brevis</i>	تعداد کلی فرم‌ها (logCFU/g)
-	-	۱/۰۰ $\pm$ ۰/۱۲ <sup>a</sup>	۱/۰۰ $\pm$ ۰/۱۷ <sup>aA</sup>	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	
-	-	-	-	<i>L. reuteri</i>	
-	-	-	-	ترکیبی	
-	-	۱/۴۷ $\pm$ ۰/۱۷ <sup>a</sup>	۱/۴۸ $\pm$ ۰/۵۰ <sup>aA</sup>	شاهد بدون افزودنی	
-	-	-	-	شاهد اسیدلاکتیک	
۸/۰۰ $\pm$ ۱/۱۸ <sup>a</sup>	۸/۰۰ $\pm$ ۱/۱۲ <sup>a</sup>	۸/۰۰ $\pm$ ۱/۱۰ <sup>a</sup>	۸/۰۰ $\pm$ ۰/۴۵ <sup>aD</sup>	<i>L. brevis</i>	تعداد کلی باکتری‌ها (logCFU/g)
۱/۰۰ $\pm$ ۱/۸۹ <sup>a</sup>	۳/۰۰ $\pm$ ۱/۴۵ <sup>b</sup>	۶/۰۰ $\pm$ ۱/۱۹ <sup>c</sup>	۸/۰۰ $\pm$ ۰/۹۸ <sup>dD</sup>	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	
۷/۰۰ $\pm$ ۱/۴۱ <sup>a</sup>	۸/۰۰ $\pm$ ۱/۲۲ <sup>b</sup>	۸/۰۰ $\pm$ ۱/۱۲ <sup>b</sup>	۸/۰۰ $\pm$ ۰/۹۱ <sup>bC</sup>	<i>L. reuteri</i>	
۲/۰۰ $\pm$ ۱/۱۲ <sup>a</sup>	۶/۱۷ $\pm$ ۱/۱۲ <sup>b</sup>	۸/۰۰ $\pm$ ۱/۱۲ <sup>c</sup>	۸/۰۰ $\pm$ ۱/۱۱ <sup>dB</sup>	ترکیبی	
۱/۸۴ $\pm$ ۰/۹۶ <sup>a</sup>	۲/۳۷ $\pm$ ۰/۹۸ <sup>b</sup>	۲/۹۸ $\pm$ ۱/۱۳ <sup>c</sup>	۳/۱۲ $\pm$ ۱/۱۲ <sup>cA</sup>	شاهد بدون افزودنی	
-	۲/۲۵ $\pm$ ۱/۱۶ <sup>a</sup>	۳/۱۱ $\pm$ ۰/۹۹ <sup>b</sup>	۳/۱۸ $\pm$ ۰/۹۸ <sup>bA</sup>	شاهد اسیدلاکتیک	
۸/۰۰ $\pm$ ۱/۲۷ <sup>a</sup>	۸/۰۰ $\pm$ ۱/۲۶ <sup>a</sup>	۸/۰۰ $\pm$ ۱/۲۴ <sup>a</sup>	۸/۰۰ $\pm$ ۰/۱۷ <sup>aA</sup>	<i>L. brevis</i>	تعداد <i>Lactobacillus</i> در تیمارهای آزمایشی (logCFU/g)
۲/۰۰ $\pm$ ۱/۱۶ <sup>a</sup>	۴/۰۰ $\pm$ ۱/۳۴ <sup>b</sup>	۸/۰۰ $\pm$ ۱/۱۳ <sup>c</sup>	۸/۰۰ $\pm$ ۱/۱۶ <sup>cA</sup>	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	
۷/۰۰ $\pm$ ۱/۲۹ <sup>a</sup>	۸/۰۰ $\pm$ ۱/۲۳ <sup>b</sup>	۸/۰۰ $\pm$ ۱/۱۴ <sup>b</sup>	۸/۰۰ $\pm$ ۱/۱۷ <sup>bA</sup>	<i>L. reuteri</i>	
۴/۰۰ $\pm$ ۱/۶۷ <sup>a</sup>	۶/۶۷ $\pm$ ۱/۴۴ <sup>b</sup>	۸/۰۰ $\pm$ ۱/۲۹ <sup>c</sup>	۸/۰۰ $\pm$ ۰/۹۹ <sup>cA</sup>	ترکیبی	

حروف کوچک متفاوت در یک ردیف و حروف بزرگ متفاوت در یک ستون نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار است (P<۰/۰۵).



مانوز، کاتالاز، فروکتوز و احیای نیترات مثبت، *Staphylococcus capitis* subsp. *urealyticus* بود.

#### نتایج بررسی خصوصیات بیوشیمیایی باکتری *Lactobacillus brevis*

این باکتری کلنی‌های براق مایل به سفید یا قهوه‌ای را روی محیط MRS آگار بعد از ۵ روز رشد در شرایط بی‌هوازی نشان داد. *L. brevis* آرابینوز، لاکتوز، مالتوز، ملیبیوز، رافینوز، تولید گاز از گلوکز، ساکارز و گزیلوز مثبت بود. همچنین در pH ۴/۵ و ۶/۵ قادر به رشد بود. قادر به رشد در ۲، ۳ و ۴ درصد نمک نیز بود. در دمای ۱۵ درجه سلسیوس توانایی رشد داشت. اما این باکتری قادر به تخمیر قندهای سلوبیوز، فروکتوز، گالاکتوز، مانیتول، مانوز، ملیزیتوز، رامنوز و ترهالوز نبود. در نمک ۶/۵ درصد قادر به رشد نبود. در دمای ۴۵ درجه سلسیوس توانایی رشد نداشت. کاتالاز، اکسیداز، اندول، متیل رد، VP و سیمون سیترات منفی بود. گرم مثبت میله‌ای شکل کوتاه با انتهای گرد، انفرادی یا زنجیره‌ای کوتاه و بدون اسپور بود. این باکتری از نظر آزمایش‌های شیمیایی *L. brevis* بود.

تعداد کلی باکتری‌ها و باکتری‌های *Lactobacillus* به استثنای تیمار عمل‌آوری شده با *L. brevis*، در سایر تیمارهای آزمایشی در شرایط انجماد در مقایسه با شرایط یخچال کاهش معنی‌داری را نشان داد ( $P < 0.05$ ).

#### آنالیز بیوشیمیایی باکتری‌های جدا شده از فیله ماهی

باکتری کلی‌فرم جدایه از محیط کشت مک‌کانکی آگار با مشخصات اندول، حرکت، متیل‌رد و دی‌سولفید هیدروژن منفی و محیط آگار آهن سه قندی اسید/اسید، سالیسین، ساکارز، ترهالوز، سیترات، رشد در سیانید پتاسیم، داشتن کپسول، سالیسن، مانیتول، گزیلوز، رافینوز، مانوز، ملیزیتوز، گزیلبتول، مالتوز، لاکتوز، فروکتوز، کاتالاز، سلوبیوز، آرابینوز، احیای نیترات، همولیز، هیدرولیز اسکولین و ملیبیوز مثبت به عنوان باکتری *Klebsiella pneumoniae* تایید شد.

باکتری *Staphylococcus* جدایه از محیط کشت مانیتول سالت آگار با مشخصات کوآگولاز، سالیسین، ترهالوز، گزیلوز، رافینوز، مالتوز، مقاومت به نوبیسین، لاکتوز، سلوبیوز، آرابیتور، فاکتور کلامپینگ، بتاگلوکوزیداز و همولیز منفی، اما تورانوز، مانیتول، ساکارز،

شاخص‌ها در مقایسه با شاهد بیماری‌زای مثبت کاهش معنی‌داری را نشان دادند ( $P < 0.05$ ). بر اساس جدول‌های ۴، ۵ و ۶ باکتری *L. brevis* پروبیوتیک است.

#### بررسی مولکولی

نتایج تعیین توالی محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) با نرم‌افزار Bioedit تجزیه و تحلیل شد. توالی‌های فستا (Fasta) با استفاده از کلاستال ایکس (Clustal-X) مرتب شدند. سپس نتایج به دست آمده از PCR برای تعیین همولوژی توالی در بین توالی‌های مرجع منتشر شده از طریق مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI) بررسی شد. همولوژی بیشتر از ۹۹ درصد برای تعیین سوش قابل قبول بود.

#### نتایج بررسی خصوصیات پروبیوتیکی باکتری *Lactobacillus brevis*

همان طوری که جدول ۴ نشان می‌دهد *L. brevis* قادر به رشد در حضور نمک‌های صفراوی، شیره معده (پپسین و تریپسین) و اسیدیته پایین بود و در هیچ مورد تعداد باکتری‌ها از  $1 \times 10^6$  CFU/mL کمتر نبود. همچنین این باکتری فعالیت همولیز نداشت و قادر به هیدرولیز آرژنین نبود.

همان طوری که جدول ۵ نشان می‌دهد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری *L. brevis* مشاهده نشد.

بر اساس جدول ۶ شاخص‌های تهاجم به رده سلولی و چسبندگی در باکتری *L. brevis* در مقایسه با شاهد پروبیوتیک مثبت کاهش معنی‌داری را نشان ندادند ( $P > 0.05$ ). اما این

جدول ۴: بررسی خاصیت پروبیوتیکی باکتری *Lactobacillus brevis* (میانگین  $\pm$  انحراف معیار)

شاخص	تعداد باکتری (CFU/mL)
شیره معده	$1 \times 10^8 \pm 2/80 \times 10^5$
تریپسین	$1 \times 10^8 \pm 3/88 \times 10^4$
پپسین	$1 \times 10^8 \pm 1/32 \times 10^6$
pH	$1 \times 10^8 \pm 3/48 \times 10^4$
۴	۳ ساعت
۲/۵	۳ ساعت
	۴ ساعت
	$1 \times 10^8 \pm 3/41 \times 10^7$
صفرا	$1 \times 10^8 \pm 2/78 \times 10^4$

جدول ۵: قطر هاله عدم رشد دیسک‌های آنتی‌بیوتیک بر باکتری *Lactobacillus brevis* (میانگین  $\pm$  انحراف معیار)

قطر هاله (میلی‌متر)	دیسک باکتری
۳۹ $\pm$ ۲/۶	آموکسی سیلین
۳۷ $\pm$ ۲/۶	پنی سیلین
۳۵ $\pm$ ۲/۸	سفالوتین
۲۱ $\pm$ ۱/۸	جنتامایسین
۲۷ $\pm$ ۱/۶	تتراسایکلین
۳۰ $\pm$ ۳/۴	اریترومایسین
۲۵ $\pm$ ۲/۸	استرپتومایسین
۲۷ $\pm$ ۱/۴	آزیترومایسین
۲۱ $\pm$ ۲/۳	ونکومایسین

جدول ۶: نتایج کشت سلولی باکتری *Lactobacillus brevis* (میانگین  $\pm$  انحراف معیار)

آزمایش	شاخص	تهاجم (درصد)	چسبندگی (درصد)
بافر نمک فسفات (شاهد منفی)		.	.
<i>Lactobacillus brevis</i>		۰/۰۱ $\pm$ ۰/۰۰۰۱ <sup>a</sup>	۰/۵۹ $\pm$ ۰/۰۱ <sup>a</sup>
<i>Bacillus coagulans</i> (IBRC-M 10807) (شاهد پروبیوتیک مثبت)		۰/۰۹ $\pm$ ۰/۰۳ <sup>a</sup>	۱/۱۰ $\pm$ ۰/۰۹ <sup>b</sup>
<i>L. monocytogenes</i> (IBRC-M 10671) (شاهد بیماری‌زای مثبت)		۳۵/۲۰ $\pm$ ۱/۲۰ <sup>b</sup>	۲/۳۰ $\pm$ ۰/۱۱ <sup>c</sup>

حروف کوچک متفاوت در یک ستون نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار است ( $P < 0.05$ ).

توالی‌های محصولات PCR بعد از تعیین توالی و بلاست با مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی از حیث مولکولی با ۱۰۰ درصد شباهت به *Klebsiella pneumoniae*، *Staphylococcus capitis* subsp. *urealyticus* و *Lactobacillus brevis* سویه CD0817 متعلق بودند. باکتری‌های *E. coli* و *S. aureus* در نمونه‌های آزمایشی و شاهد مشاهده نشدند.

### پروفایل اسیدهای چرب

با توجه به کاهش تعداد باکتری‌های *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*، این باکتری برای پوشش‌دار کردن و محافظت فیله ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در شرایط انجماد مناسب نبود. بنابراین پروفایل اسیدهای چرب در این باکتری اندازه‌گیری نشد. بر اساس جدول ۷ پروفایل اسیدهای چرب در *L. brevis* با *L. reuteri* تفاوت معنی‌داری را نشان داد. اسیدهای چرب C4:0، C13:0، C12:0 و C14:1n-5 در فرآورده تهیه شده از *L. reuteri* مشاهده نشد. C4:0 (بوتیریک اسید)، C12:0 (لوریک اسید)، C13:0 (تری‌دسیل اسید) و C14:1n-5 (میریسستولئیک اسید) در *L. brevis* به ترتیب ۰/۰۱، ۰/۰۴، ۰/۰۱ و ۰/۰۵ درصد بود. C23:0، C22:2n-6، C24:0، C22:6n-3، C14:0، C16:1n-7، Trans-C18:1n-9، C17:0، C18:2n-6، Trans-C 18:2n-6، C18:3n-6 و C20:3n-6 در نمونه‌های تیمار شده با *L. brevis* در مقایسه با *L. reuteri* افزایش معنی‌داری را نشان داد. اسیدهای چرب C16:0، C15:0، C14:0، C24:0، C23:0، C17:0، C18:0، C21:0، C22:0، C4:0

C12:0، C13:0 و C14:0 از اسیدهای چرب اشباع بودند که در این آزمایش استخراج شدند. در *L. brevis* مجموع اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع به ترتیب ۲۳/۹۱ و ۷۷ درصد بود. در *L. reuteri* مجموع اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع به ترتیب ۲۷/۱۲ و ۷۲/۸۸ درصد بود.

### بحث

باکتری‌های مرتبط با غذا، از جمله باکتری‌های مورد استفاده در بیوتکنولوژی، باکتری‌های دخیل در فساد غذا و باکتری‌های بیماری‌زای مواد غذایی، قادر به بقا در سرما هستند. باکتری‌ها با تغییر شرایط محیطی طی مراحل تولید و نگهداری مواد غذایی مواجه می‌شوند و مکانیسم‌هایی را برای مقابله با استرس و سازش با محیط جدید ایجاد می‌کنند. در تولید مواد غذایی جدید یکی از عناصر کلیدی برای حفظ ایمنی مواد غذایی سرما است. در دمای سرد بسیاری از باکتری‌ها، افزایش ترکیب اسیدهای چرب حلقوی و غیراشباع را به عنوان یک واکنش به کاهش سریع دما (شوک سرما) تولید می‌کنند (Tsakalidou and Papadimitriou, 2011).

جدول ۷: پروفایل اسیدهای چرب در فیله ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان عمل‌آوری شده با باکتری‌های *Lactobacillus reuteri* و *Lactobacillus brevis*

محصول پوشش شده با <i>Lactobacillus</i>		پروفایل اسید چرب
<i>L. brevis</i>	<i>L. reuteri</i>	
۰/۲۳ <sup>a</sup>	۰/۲۸ <sup>b</sup>	(Eicosatrienoic Acid Methyl Ester) C20:3n-3
۰/۸۸ <sup>b</sup>	۰/۵۹ <sup>a</sup>	(Tricosylic Acid) C23:0
۰/۰۳ <sup>a</sup>	۰/۰۵ <sup>b</sup>	(Arachidonic Acid) C20:4n-6
۰/۰۹ <sup>b</sup>	۰/۰۸ <sup>a</sup>	(Docosadienoic Acid) C22:2n-6
۰/۴۱ <sup>b</sup>	۰/۳۷ <sup>a</sup>	(Lignoceric Acid) C24:0
۰/۰۸ <sup>a</sup>	۰/۰۸ <sup>a</sup>	(Eicosapentaenoic Acid) C20:5n-3
۰/۱۳ <sup>a</sup>	۰/۱۴ <sup>b</sup>	(Nervonic Acid) C24:1n-9
۲/۲۴ <sup>b</sup>	۱/۹۹ <sup>a</sup>	(Docosahexaenoic Acid) C22:6n-3
۱/۱۳ <sup>b</sup>	۱/۰۵ <sup>a</sup>	(Myristic Acid) C14:0
۰/۱۸ <sup>a</sup>	۰/۲۳ <sup>b</sup>	(Pentadecanoic) C15:0
۱۵/۰۵ <sup>a</sup>	۱۵/۷۶ <sup>b</sup>	(Palmitic Acid) C16:0
۲/۷۹ <sup>b</sup>	۲/۱۴ <sup>a</sup>	(Palmitoleic Acid) C16:1n-7
۰/۳۵ <sup>b</sup>	۰/۳۴ <sup>a</sup>	(Margaric Acid) C17:0
۰/۱۸ <sup>a</sup>	۰/۱۸ <sup>a</sup>	(Heptadecenoic Acid) C17:1n-7
۴/۵۲ <sup>a</sup>	۸/۱۹ <sup>b</sup>	(Stearic Acid) C18:0
۰/۱۷ <sup>b</sup>	۰/۱۱ <sup>a</sup>	(Elaidic Acid) Trans-C18:1n-9
۳۸/۸۱ <sup>a</sup>	۴۰/۲۳ <sup>b</sup>	(Oleic Acid) C18:1n-9
۰/۱۱ <sup>b</sup>	۰/۰۶ <sup>a</sup>	(Linolelaidic Acid) Trans-C 18:2n-6
۲۴/۷۳ <sup>b</sup>	۲۱/۲۵ <sup>a</sup>	(Linoleic Acid) C18:2n-6
۰/۳۲ <sup>a</sup>	۰/۳۹ <sup>b</sup>	(Lignoceric Acid) C20:0
۰/۸۱ <sup>b</sup>	۰/۵۸ <sup>a</sup>	(Gamma Linoleic Acid) C18:3n-6
۲/۹۲ <sup>b</sup>	۲/۶۲ <sup>a</sup>	(Alpha Linolenic Acid) C18:3
۱/۴۴ <sup>a</sup>	۱/۴۸ <sup>b</sup>	(Methyl Icosanate) C20:1n-9
۰/۰۴ <sup>b</sup>	۰/۰۲ <sup>a</sup>	(Hrniecosanoic Acid) C21:0
۱/۰۴ <sup>b</sup>	۰/۹۵ <sup>a</sup>	(Ecosadenoic Acid) C20:2n-6
۰/۲۳ <sup>b</sup>	۰/۱۸ <sup>a</sup>	(Behnic Acid) C22:0
۰/۹۷ <sup>b</sup>	۰/۶۶ <sup>a</sup>	(Dyhumagamma Linolenic Acid) C20:3n-6

حروف کوچک متفاوت در یک ردیف نشان دهنده وجود تفاوت معنی‌دار است ( $P < 0.05$ ).

بر اساس جدول ۲ تعداد کلی باکتری‌ها و باکتری‌های *Lactobacillus* در تیمارهای عمل‌آوری شده با ترکیب *Lactobacillus*‌ها، *L. brevis*، *L. reuteri* و *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* در یخچال تفاوت معنی‌داری نداشت. باکتری‌های *Staphylococcus* در این تیمارها افزایش نشان دادند. عدم مشاهده تفاوت معنی‌دار در تعداد *Lactobacillus*‌ها طی مدت زمان نگهداری در دمای یخچال به دلیل توانایی بقای باکتری‌های *Lactobacillus* در این تیمارها به دلیل توانایی این باکتری‌ها برای رشد در شرایط یخچال و عدم توانایی باکتری‌های *Lactobacillus* برای جلوگیری از رشد این باکتری‌ها است. باکتری‌های کلی‌فرم در تیمارهای عمل‌آوری شده با ترکیب *Lactobacillus*‌ها، *L. brevis*، *L. reuteri* و *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* در شرایط یخچال مشاهده نشدند و در مقایسه با تیمار شاهد بدون افزودنی، کاهش داشتند که به دلیل تاثیر آنتاگونیستی باکتری‌های *Lactobacillus* برای جلوگیری از رشد این باکتری است (Abedi et al., 2013).

بر اساس جدول ۳ *L. delbrueckii* بر اساس جدول ۳ بر اساس مقایسه با سایر *Lactobacillus*‌ها کمترین توانایی و باکتری *L. brevis* بیشترین توانایی را برای بقا در شرایط انجماد داشتند. همچنین در تعداد کلی باکتری‌ها، باکتری‌های کلی‌فرم و *Staphylococcus* در تیمارهای عمل‌آوری شده با *Lactobacillus*‌ها کاهش مشاهده شد. در مورد تاثیر باکتری *Lactobacillus* روی فیله ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پرورشی در شرایط انجماد تاکنون مطالعه‌ای انجام نشده است. عدم بقای باکتری *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* و کاهش در جمعیت باکتری‌های کلی‌فرم و *Staphylococcus* را می‌توان به دلیل عدم توانایی این باکتری‌ها برای تحمل سرمای زیر صفر درجه سلسیوس و تاثیر آن بر تشکیل کریستال‌های یخ در این باکتری‌ها دانست (Kest and Marth, 1992).

بر اساس جدول ۳ با توجه به بقای باکتری‌های *L. brevis* و *L. reuteri* در شرایط انجماد و کاهش باکتری‌های *Staphylococcus* در تیمارهای عمل‌آوری شده با ترکیب *Lactobacillus*‌ها، *L. brevis* و *L. reuteri* بر اساس این‌که باکتری‌های *Lactobacillus* در شرایط انجماد قادر به

مقایسه با شرایط انجماد افزایش معنی‌دار مشاهده شد. تعداد کلی باکتری‌ها در تیمارهای آزمایشی در مقایسه با تیمارهای شاهد افزایش داشت. تعداد باکتری‌های *Staphylococcus* در تیمارهای آزمایشی در مقایسه با تیمارهای شاهد کاهش داشت. افزایش عوامل مورد بررسی در تیمارهای آزمایشی در شرایط دمایی یخچال در مقایسه با انجماد با توجه به افزایش سرما و کاهش دما در شرایط انجماد و تاثیر آن بر کاهش باکتری‌ها قابل توجیه است. افزایش تعداد کلی باکتری‌ها در تیمارهای آزمایشی در مقایسه با تیمارهای شاهد به دلیل استفاده از یک پوشش حاوی باکتری روی فیله ماهی است. کاهش تعداد باکتری‌های *Staphylococcus* در تیمارهای آزمایشی در مقایسه با تیمارهای شاهد به دلیل رقابت باکتری‌های پروبیوتیک با باکتری‌های *Staphylococcus* برای چسبندگی به سطح فیله است (Adams and Moss, 2000).

Kim و Hearnberger در سال ۱۹۹۴ تاثیر سدیم استات یا پتاسیم سوربات را در ترکیب با *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* ATCC 192.57 بر باکتری‌های گرم منفی در فیله گربه‌ماهی طی مدت زمان نگهداری در دمای یخچال بررسی کردند. تیمار

تولید ترکیبات ضد میکروبی نیستند و همچنین با در نظر گرفتن تاثیر سرما و تشکیل کریستال‌های یخ در باکتری *Staphylococcus* طی انجمادگذاری، نقش پوششی باکتری‌های *Lactobacillus* روی فیله ماهی (Rong et al., 2015) سبب بقای باکتری‌های *Staphylococcus* طی مدت زمان نگهداری در فیله ماهی قزل‌آلای رنگین کمان پرورشی شد (Chakrabarti and Choudhury, 1988). در این تیمارها باکتری کلی‌فرم مشاهده نشد که به دلیل تاثیر آنتاگونیستی باکتری‌های *Lactobacillus* برای جلوگیری از رشد این باکتری است (Abedi et al., 2013). همچنین کاهش تعداد *Lactobacillus*‌ها در تیمار عمل‌آوری شده با پوشش ترکیبی *Lactobacillus*‌ها و کاهش تعداد کلی باکتری‌ها در تیمارهای آزمایشی به استثنای تیمار *L. brevis* به دلیل عدم توانایی *L. delbrueckii* subsp. برای تحمل سرما *L. reuteri* و *bulgaricus* است.

همچنین بر اساس جدول‌های ۲ و ۳ در تعداد کلی باکتری‌ها، باکتری‌های *Staphylococcus* و کلی‌فرم در تیمارهای آزمایشی نگهداری شده در شرایط یخچال در

Altieri و همکاران در سال ۲۰۰۵ تاثیر باکتری *Bifidobacterium bifidum* و تیمول را برای افزایش مدت زمان ماندگاری فیله ماهی پهن تازه بسته‌بندی شده به سه روش هوازی، وکیوم و اتمسفر تغییر یافته در دماهای ۴ و ۱۲ درجه سلسیوس بررسی کردند و دریافتند که این باکتری اثرات سینرژیستی موثری با تیمول برای کنترل باکتری‌ها دارد. نتایج مطالعه حاضر با نتایج به دست آمده توسط Altieri و همکاران (۲۰۰۵) مطابقت دارد.

مطالعه Lopez de Lacey و همکاران در سال ۲۰۱۴ بر تاثیر فیلم‌های آگار شامل عصاره چای سبز و باکتری‌های پروبیوتیک *Bifidobacterium lactis* subsp B94 و *Lactobacillus paracasei* subsp L26 روی کیفیت و مدت زمان ماندگاری ماهی هیک طی ۱۵ روز ذخیره در دمای یخچال نشان داد که تعداد کلی باکتری‌ها در تیمارهای عمل‌آوری شده با فیلم‌های آگار در مقایسه با شاهد (ماهی هیک بدون افزودنی) طی مدت زمان ۱۵ روز ذخیره پایین‌تر از محدوده مجاز قابل پذیرش بود. در پژوهش حاضر نیز طی مدت زمان ۵ روز ذخیره بار میکروبی پایین‌تر از حد مجاز بود. نتایج به دست آمده از مطالعه Lopez de Lacey و همکاران (۲۰۱۴) با

ترکیبی از استات سدیم، پتاسیم سوربات با ۵/۲ درصد سوسپانسیون باکتری‌های اسید لاکتیک از رشد باکتری‌های گرم منفی به مدت حداقل ۶ روز ممانعت کرد. در این مطالعه *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* سبب کاهش در تعداد باکتری‌های کلی‌فرم شد (Kim and Hearnberger, 1994). نتایج مطالعات Kim و Hearnberger (۱۹۹۴) با نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر همسو است.

Katikou و همکاران در سال ۲۰۰۷ با بررسی اثر کشت‌های *Lactobacillus sakei* CECT 4808 و *L. curvatus* CECT 904T بر روی کیفیت میکروبی فیله ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بسته‌بندی شده به روش وکیوم طی مدت ۲۰ روز نگهداری در دمای یخچال مشاهده کردند که باکتری‌های خانواده Enterobacteriaceae و باکتری‌های اسید لاکتیک در نمونه‌های تلقیح شده با *L. sakei* CECT 4808 و همچنین ترکیبی از دو سویه در مقایسه با نمونه‌های تلقیح شده با *L. curvatus* CECT 904T و نمونه شاهد کاهش معنی‌داری را نشان دادند. نتایج پژوهش حاضر با نتایج به دست آمده توسط Katikou و همکاران (۲۰۰۷) مطابقت دارد.



پژوهش حاضر همسو است. Rong و همکاران در سال ۲۰۱۵ پتانسیل استفاده از باکتری‌های *Lactobacillus plantarum* 1.19 را برای حفظ تازگی فیله‌های ماهی تیلاپیا بررسی کردند و کاهش باکتری *Staphylococcus* در تیمار آزمایشی را در مقایسه با تیمار شاهد گزارش دادند. نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر با نتایج به دست آمده از پژوهش Rong و همکاران (۲۰۱۵) مطابقت دارد.

مقادیر اسیدهای آلی در *Lactobacillus* های مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری را نشان داد. این تفاوت در تولید اسیدهای آلی به تفاوت در محیط زیست این باکتری‌ها و منشا جداسازی آن‌ها مرتبط است (Hoque et al., 2010).

بر اساس جدول ۷ پروفایل اسیدهای چرب در *L. brevis* با *L. reuteri* تفاوت معنی‌داری را نشان داد. به دلیل افزایش وجود اسیدهای چرب غیراشباع در غشای *L. brevis* غشای این باکتری در مقایسه با *L. reuteri* از سیالیت بالاتری برخوردار است و در مقایسه با *L. reuteri* توانایی بیشتری برای مقاومت و بقا در دمای زیر صفر درجه سلسیوس دارد.

افزایش معنی‌دار در نسبت اسیدهای چرب غیراشباع به اشباع در *L. brevis* در مقایسه با

Chen و همکاران در سال ۲۰۱۷ تاثیر خشک کردن در انجماد را روی باکتری *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* بررسی کردند و دریافتند این باکتری به انجماد مقاوم نیست که با نتایج این مطالعه حاضر مطابقت دارد.

بعضی از *Lactobacillus* ها مانند *L. brevis* گیاهی هستند (Tanizawa et al., 2015). باکتری‌های پروبیوتیک باید قادر به مهار موجودات بیماری‌زا و تحمل شرایط خشن روده انسان مانند کربوهیدرات‌های مختلف، نمک بالا، pH پایین، غلظت زیاد نمک‌های صفراوی و شیره معده باشند. همچنین باید توانایی چسبندگی به سلول‌های بدن انسان را داشته باشند، اما قادر به تهاجم و نفوذ به

یخچال و انجماد مناسب نیست. نمونه‌های پوشش شده با *L. delbrueckii* subsp. تا پایان مدت زمان نگهداری در یخچال و نمونه‌های پوشش شده با *L. reuteri bulgaricus* و *L. brevis* تا پایان مدت زمان نگهداری در انجماد کیفیت خود را حفظ کردند. بر اساس تفاوت معنی‌دار در تعداد *L. reuteri* در مقایسه با تیمار *L. brevis* طی مدت زمان نگهداری در انجماد، *L. brevis* قابلیت استفاده به عنوان محافظ غذایی در دماهای یخچال و انجماد را دارد و به عنوان محافظ غذایی برای نگهداری فیله ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پرورشی در شرایط یخچال و انجماد پیشنهاد می‌شود.

*L. reuteri* و عدم تفاوت معنی‌دار در تعداد *L. brevis* طی مدت زمان نگهداری در دمای انجماد نشان دهنده اهمیت اسیدهای چرب غیراشباع برای بقای باکتری *L. brevis* در شرایط انجماد است. بنابراین می‌توان بیان کرد که *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* به دلیل عدم افزایش اسیدهای چرب غیراشباع نسبت به اشباع در غشای باکتری و تشکیل کریستال‌های یخ قادر به بقا در دمای انجماد نبود.

بقای *Lactobacillus*‌ها در دماهای پایین را باید به پروفایل اسیدهای چرب ارتباط داد. با توجه به نتایج آزمایش‌های پوشش ترکیبی *Lactobacillus*‌ها برای نگهداری فیله ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پرورشی در دماهای

## منابع

- استاندارد ملی ایران. ۱۳۹۴. استاندارد ملی ایران شماره ۲-۱۳۱۲۶: روغن‌ها و چربی‌های گیاهی - کروماتوگرافی گازی متیل استرهای اسیدهای چرب، قسمت ۲: تهیه متیل استرهای اسیدهای چرب. موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران.
- استاندارد ملی ایران. ۱۳۹۲. استاندارد ملی ایران شماره ۱۹۴۵۹: باکتری‌های پروبیوتیک، ویژگی‌ها و متدهای آزمایشگاهی، ICS: 07.100.30. موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران.
- Abedi D., Feizizadeh S., Akbari V. and Jafarian-Dehkordi A. 2013.** In vitro anti-bacterial and anti-adherence effects of *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* on *Escherichia coli*. Research Pharmaceutical Science, 8(2): 260–268.
- Adams M.R. and Moss M.O. 2000.** Food Microbiology. Royal Society of Chemistry, United Kingdom. 479P.
- Altieri C., Speranza B., Del Nobile M.A. and Sinigaglia M. 2005.** Suitability of bifidobacteria and thymol as biopreservatives in extending the shelf life of fresh packed plaice fillets. Journal of Applied Microbiology, 99(6): 1294–1302.
- Chakrabarti R. and Choudhury D.R. 1988.** Effect of nitrogen liqid freezing and subsequent storage on survival of *Staphylococcus aureus* and *Strptococcus pyogenes* in treated prawn meat. Fishery Technology, 25(1): 61 –63.
- Chen H., Huang J., Shi X., Li Y. and Liu Y. 2017.** Effects of six substances on the growth and freeze-drying of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria 16(4): 403–412.
- Dalgaard P. 1995.** Modelling of microbial activity and prediction of shelf life for packed fresh fish. International Journal Food Microbiology, 26(1): 305–317.
- Furano A.V. 1977.** The elongation factor Tu coded by the *tufA* gene of *Escherichia coli* K-12 is almost identical to that coded by the *tufB* gene. The Journal of Biological Chemistry, 252: 2154–2157.
- Goodfellow M., Kampfer P., Chairman V., De Vos P., Rainey F.A., Schleifer K.H. and Whitman W.B. 2009.** Bergys Manual of Systematic Bacteriology. Springer, USA. 1450P.

- Gram L. and Dalgaard P.J.C.O.I.B. 2002.** Fish spoilage bacteria-problems and solutions. *Current Opinion Biotechnology*, 13 (3): 262–266.
- Gram L. and Huss H.H. 1996.** Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal Food Microbiology*, 33(2): 121–137.
- Hoque M.Z., Akter F., Hossain K.M., Rahman M.S.M., Billah M.M. and Islam K.M.D. 2010.** Isolation, identification and analysis of probiotic properties of *Lactobacillus* spp. from selective regional yoghurts. *World Journal Dairy Food Science*, 5(1): 39–46.
- Katikou P., Ambrosiadis I., Georgantelis D., Koidis P. and Georgakis S.A. 2007.** Effect of *Lactobacillus* cultures on microbiological, chemical and odour changes during storage of rainbow trout fillets. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(4): 477–484.
- Kest S. and Marth E. 1992.** Freezing of *Listeria monocytogenes* and other microorganisms: A review. *Journal of Food Protection*, 55(8): 639–648.
- Kim C.R. and Hearnberger J.O. 1994.** Gram negative bacteria inhibition by lactic acid culture and food preservatives on catfish fillets during refrigerated storage. *Journal Food Science*, 59(1): 513–516.
- Lopez de Lacey A.M., Lopez-Caballero M.E. and Montero P. 2014.** Agar films containing green tea extract and probiotic bacteria for extending fish shelf-life. *LWT-Food Science and Technology*, 55(2): 559–564.
- Manav M.C., Beljantseva J., Bojer M.S., Tenson T., Ingmer H., Hauryliuk V. and Brodersen D.E. 2018.** Structural basis for (p)ppGpp synthesis by the *Staphylococcus aureus* small alarmone synthetase RelP. *Journal of Biological Chemistry*, 293(9): 1–18.
- Nahar Islam K., Akbar T., Akther F. and Naher Islam N. 2016.** Characterization and confirmation of *Lactobacillus* spp. from selective regional yoghurts for probiotic and interference with pathogenic bacterial growth. *Asian Journal of Biological Sciences*, 9(1): 1–9.
- Nithya V. and Halami P.M. 2013.** Evaluation of the probiotic characteristics of *Bacillus* species isolated from different food sources. *Annals of Microbiology*, 63(2): 129–137.
- Rong C., Qi L., Shengjun C., Xianqing Y. and Laihao L. 2015.** Application of lactic acid bacteria (LAB) in freshness keeping of tilapia fillets as sashimi. *Journal of*

Ocean University of China, 14(1): 675–680.

**Rowan N.J., Deans K., Anderson J.G., Gemmell C.G., Hunter I.S. and Chaithong T. 2001.** Putative virulence factor expression by clinical and food isolates of *Bacillus* spp. after growth in reconstituted infant milk formulae. *Applied Environmental Microbiology*, 67(2): 3873–3881.

**Tanizawa Y., Tohno M., Kaminuma E., Nakamura Y. and Arita M. 2015.** Complete genome sequence and analysis of *Lactobacillus hokkaidonensis* LOOC260(T), a psychrotrophic

lactic acid bacterium isolated from silage. *BMC Genomics*, 16: 1–11 (240).

**Teng L.J., Hsueh P.R., Huang Y.H. and Tsai J.C. 2004.** Identification of bacteroides thetaiotaomicron on the basis of an unexpected specific amplicon of universal 16S ribosomal DNA PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(4): 1727–1730.

**Tsakalidou E. and Papadimitriou K. 2011.** *Stress Responses of Lactic Acid Bacteria*. Springer Science Business Media, USA. 510P.



Research Paper

**Effects of using probiotic strains of *Lactobacillus reuteri*,  
*Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*  
on the microbial quality of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus  
mykiss*) fillet**

Mina Seifzadeh<sup>1,2</sup>, Mohammad Rabbani<sup>3\*</sup>, Rasoul Shafiei<sup>4</sup>

Received: December 2018

Accepted: June 2019

**Abstract**

Probiotic strains of *Lactobacillus* can be used as food preservatives. The purpose of this study was to investigate the use of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (PTCC1737), *L. reuteri* (1655 PTCC), *L. brevis* CD0817 and the combination of *Lactobacillus* on microbial quality of rainbow trout fillet in refrigeration and freezing temperature. Treatments were immersing fillets in suspensions of *L. reuteri*, *L. brevis*, *L. delbrueckii* and the combination of *Lactobacillus*. The control treatments consisted of additive-free fillet and fillet processed with 2% solution of lactic acid. The control and test treatments were refrigerated (five days) and frozen (six months). *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* were not observed in test and control treatments. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* was not observed in frozen storage. The number of *Lactobacillus* showed a decrease in combination treatments during freezing (1.34logCFU/g). In *L. brevis*, total saturated and unsaturated fatty acids were 23.91% and 77%, respectively. In *L. reuteri*, total saturated and unsaturated fatty acids were 27.12% and 72.88%, respectively (P<0.05). Significant increase in ratio of unsaturated to saturated fatty acids in *L. brevis* compared to *L. reuteri* and no significant difference in *L. brevis* number during storage at freezing temperature caused that *L. brevis* is recommended for preserving farmed rainbow trout fillet under refrigeration and at freezing temperatures.

**Key words:** Probiotic, Farmed Rainbow Trout, *Lactobacillus brevis*, Food Preservative.

1- Ph.D. Student in Microbiology, Department of Cellular and Molecular Biology and Microbiology, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran.

2- Scientific Member in National Inland Water Aquaculture Institute, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Anzali, Iran.

3- Associate Professor in Department of Cellular and Molecular Biology and Microbiology, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran.

4- Assistant Professor in Department of Cellular and Molecular Biology and Microbiology, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran.

\*Corresponding Author: [m.rabbani@biol.ui.ac.ir](mailto:m.rabbani@biol.ui.ac.ir)