نشریه فن‌آوری‌های نوین در توسعه آبزی‌پروری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد آزادشهر/ ISSN: 2008-0026 سال دهم، شماره چهارم، زمستان ۹۵ / صفحات: ۷۲-۵۹

تاثیر عصاره آزاد و ریزپوشانی شده پونه کوهی (*Origanum vulgare*) بر تغییرات شیمیایی، میکروبی و رفتار باکتری سودوموناس فلورسانس در گوشت چرخ شده ماهی کیلکا معمولی (*Clupeonella cultriventris*)

فاطمه ستونه[۱]، محمدتقی بایی*[۲] و مهشید شاملوفر[۱]

[۱]گروه شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد آزادشهر، آزادشهر، ایران.

[۲]گروه شیلات، دنشگاه آزاد اسلامی، واحد آزادشهر، آزادشهر، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۵/۲/۲۵ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۵/٤/١٤

چکیده

به‌منظور ارزیابی برخی از پارامترهای میکروبی (شمارش کلی باکتری‌های مزوفیل و باکتری‌های سرماگرا)، فاکتورهای شیمیایی (عدد پراکسید و pH) و همچنین رفتار باکتری *Pseudomonas fluorescens* در حضور نگهدارنده طبیعی پونه کوهی به فرم معمولی و ریزپوشانی شده، پس از آماده‌سازی گوشت چرخ شده ماهی کیلکا معمولی، دو غلظت از عصاره آزاد (۰/۳، ۰/۵ درصد) و همچنین دو غلظت ازعصاره پونه کوهی (۰/۳، ۰/۵ درصد) به فرم ریزپوشانی شده به گوشت ماهی کیلکا معمولی آلوده به سودوموناس فلورسانس اضافه شد و در دمای یخچال به‌مدت ۲۰ روز نگهداری و مورد بررسی قرار گرفت و تغییرات مذکور در فواصل زمانی ۰، ٤، ۸، ۱۲، ١٦ و ۲۰ روز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که عصاره پونه کوهی مخصوصاً فرم ریزپوشانی شده آن، به‌ویژه در غلظت ۰/۵ درصد موثرتر از فرم معمولی آن بوده است و منجر به کندتر شدن تغییرات عدد پراکسید، باکتری‌های مزوفیل و سرماگرا سودوموناس فلورسانس در گوشت چرخ شده ماهی کیلکا معمولی گردید و تفاوت معنی‌داری بین این تیمارها با تیمار دارای فرم معمولی (غلظت ۰/۳ درصد) مشاهده شد. نتیجه‌گیری کلی که از این تحقیق حاصل می‌شود آن است که فرم انکپسوله پونه کوهی با غلظت ۰/۵ درصد نسبت به سایر غلظت‌ها نتایج بهتری رادر کنترل رشد باکتری سودوموناس به همراه داشته است.

واژه‌های کلیدی: پونه کوهی، سودوموناس فلورسانس، ریزپوشانی کردن، ماهی کیلکا

مقدمه

فساد اکسیداتیو باعث ایجاد بوی نامطبوع، تغییرات نامطلوب در طعم در نهایت تغییر در ساختمان مواد مغذی و کاهش ارزش غذایی محصول می‌شود در حالی که فساد و آلودگی میکروبی منجر به ایجاد خطرات جدی در سلامت غذایی مصرف کننده می‌شود. بنابراین بکار بردن موادی مناسب با فعالیت آنتی باکتریایی و آنتی‌اکسیدانی به منظور بهبود کیفیت و افزایش عمر ماندگاری گوشت در عین حال جلوگیری از ضررهای اقتصادی ضروری و مفید می‌باشد (Yin و Cheng، ۲۰۰۳). اکسیداسیون چربی را به عنوان یکی از دلایل اصلی کاهش و یکی از بزرگترین نگرانی‌ها در مورد گوشت، ماهی و فرآورده‌های دریایی منجمد می‌دانند (Ruberto و Baratta، ۲۰۰۰). چربی ماهیان به‌دلیل داشتن مقدار قابل توجهی از اسیدهای چرب با چند پیوند دوگانه در مقابل اکسیداسیون بسیار حساس بوده و آسیب‌پذیر

*مسئول مکاتبه: baei52@yahoo.com

می‌باشد. این امر سبب ایجاد بو، طعم نامطلوب، تغییر رنگ، تغییر بافت، افزایش آبچک، کاهش ارزش غذایی و تولید ترکیباتی که احتمالاً سمی می‌باشند، می‌شوند (Kose، ۲۰۰۱).

فساد باکتریایی ماهی نگهداری شده در یخچال تحت شرایط هوازی توسط میکروارگانیزم‌های گرم منفی سرما دوست مثل سودوموناس[1]، آلترموناس[2]، شوانلا[3] و گونه‌های مختلف فلاوباکتریوم[4] اتفاق می‌افتد (Ojagh، ۲۰۱۰). سودوموناس یکی از مهمترین باکتری‌های گرم منفی است که عامل فساد در انواع مواد غذایی از جمله محصولات شیلاتی است. این باکتری جزء باکتری‌های سرما دوست بوده و قادر به رشد در دمای یخچال (٤ درجه سانتی‌گراد) بوده و بواسطه ترشح انواع آنزیم‌های پروتئولتیک و لیپولیتیک باعث بروز فساد در مواد غذایی می‌شود (El-Nagar، ۲۰۱۰). گونه‌های مختلفی از جنس سودوموناس نظیر سودوموناس فلورسانس و سودوموناس آئروجینوزا در محیط و روده ماهیان وجود داشته و از طریق روش‌های مختلف به ماده‌ی غذایی انتقال یافته و پس از نامناسب شدن شرایط برای سایر باکتری‌ها، غالب شده و به واسطه تولید متابولیت‌های مختلف به سرعت رشد و تکثیر نموده و در نتیجه باعث شروع شدن فرایند فساد می‌شوند (Dughaym، ۲۰۰۰). بنابراین ارایه روش‌های نوین به‌منظور به تاخیر انداختن فساد ناشی از این گونه از سودوموناس یکی از نکات اصلی در افزایش زمان ماندگاری محصولات شیلاتی نگهداری شده در دمای یخچال می‌باشد. بدین‌منظور روش‌های متعددی برای جلوگیری از رشد یا از بین بردن باکتری‌های عامل فساد و پاتوژن‌های بیماری زا و همچنین افزایش کیفیت و امنیت غذاهای نگهداری شده در یخچال ارایه شده است که از جمله آنها می‌توان به استفاده از عصاره و اسانس‌های گیاهی به شکل میکروکپسوله و ریزپوشانی شده اشاره نمود (Ojagh، ۲۰۱۰).

ریزپوشانی کردن عصاره و اسانس‌های گیاهی به علت خصوصیات مهمی که این فنآوری در این مواد ریزپوشانی شده ایجاد می‌کند رو به افزایش است، که از جمله این موارد می‌توان به: افزایش پایداری مواد ریزپوشانی شده بوسیله محافظت آنها از تغییرات محیطی، آنزیمی و شیمیایی (بهبود در شناوری مواد)، فراهم کردن حالت بافری در برابر تغییرات pH، مقابله با تغییرات حرارتی و تغییرات یونی (ایجاد ثبات اجزایی)، محافظت در برابر طعم‌ها و بوهای ناخوشایند، آزادشدن کنترل شده ماده ریزپوشانی شده و مخلوط شدن کامل مواد غیر قابل ترکیب اشاره داشت (Zuidam و Nedovic، ۲۰۱۰).

جنس پونه کوهی (*Origanum vulgare*) یکی از پر مصرف‌ترین و مهم‌ترین گیاهان متعلق به خانواده نعنائیان می‌باشند و قدمت استفاده از گونه‌های آن به دو هزار سال قبل بر می‌گردد. در ایران ٦ گونه از این جنس گزارش شده است. یکی ازاین گونه‌ها پونه کوهی است که اثرات آنتی‌اکسیدانی، کشندگی یا بازدارندگی آن بر روی باکتری‌ها و مخمرها (حجتی، ۱۳۹۱) و نیز اثرات ضدقارچی آن‌ها مشخص شده است (فیروزی و همکاران، ۱۳۹۰). ویژگی‌های ضدمیکروبی عصاره پونه کوهی بر علیه باکتری در مقیاس آزمایشگاهی به خوبی شناخته شده است (حجتی، ۱۳۹۱).

ماهی کیلکا از جمله گونه‌های با ارزش دریای خزر بوده و بواسطه داشتن ارزش غذایی بالا خصوصا اسیدهای چرب غیر اشباع امگا-۳ حائز اهمیت می‌باشد (Anonymous، ۱۹۷۸). نانو انکپسوله کردن از واکنش‌های شیمیایی نامطلوب عناصر مفید غذاها با

1. Pseudomonas
2. Alteromonas
3. Shewanella
4. Flavobacterium

سایر ترکیبات جلوگیری می‌کند و نیز توانایی کنترل رهاسازی این عناصر را در زمان‌های معین دارا می‌باشد. بنابراین با انکپسوله کردن عصاره گیاهی می‌توان انتظار داشت که زمان ماندگاری ماده غذایی از جمله ماهی افزایش معنی‌دار پیدا کند. تکنولوژی‌های مختلف انکپسولاسیون در صنعت غذا استفاده می‌شود. امروزه مصرف کنندگان با توجه به اثرات مضر نگهدارنده‌های شیمیایی و سنتتیک خواهان استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی از منابع گیاهی، حیوانی و میکروبی هستند تا علاوه بر افزایش ماندگاری غذا از اثرات مضر نگهدارنده‌های غذایی شیمیایی مصون باشند (Arashisar، ۲۰۰٤). در این تحقیق رفتار باکتری سودوموناس فلورسانس (به‌عنوان باکتری مولد فساد در سرما) در گوشت چرخ شده ماهی کیلکا معمولی در حضور نگهدارنده طبیعی پونه کوهی به فرم معمولی و ریزپوشانی شده در فواصل زمانی ۰، ٤، ۸، ۱۲، ۱٦ و ۲۰ روز بعد از نگهداری در دمای یخچال مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش کار

تهیه عصاره الکلی پونه کوهی: در این بررسی گیاه پونه کوهی پس از جمع آوری از رویشگاه‌های طبیعی استان مازندران، در محیط خشک و تاریک، به دور از نور خورشید و در جریان هوا خشک شد و سپس آسیاب و به صورت پودر در آمد. پودر به دست آمده در بالن یک لیتری و با نسبت ۱ به ۵ با الکل اتیلیک ۸۰ درصد مخلوط شد و به‌مدت ٤۸ ساعت بر روی دستگاه شیکر به آرامی مخلوط گردید. سپس مخلوط به‌دست آمده توسط صافی و قیف بوخنر صاف شد. عصاره اولیه به‌دست آمده وارد دستگاه تقطیر دوار گردید و در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد و به‌مدت ٤ ساعت الکل پرانی صورت گرفت و عصاره تغلیظ شده به‌دست آمده تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شد (Smith-palmer، ۱۹۹۸)

آماده سازی پونه کوهی ریزپوشانی شده در مالتودکسترین: ماده‌ای که برای ریزپوشانی کردن پونه کوهی مورد استفاده قرار گرفت، مالتودکسترین بود که به شکل تجاری تهیه و ابتدا به‌مدت ۳۰ دقیقه در دما ٤۰ درجه شیک شد. پس از اتمام زمان انکوباسیون، پونه کوهی به مالتودکسترین به نسبت ٤ به ۱ اضافه شده و به‌مدت ۲ ساعت در دمای محیط شیک گردید. سپس مخلوط مذکور در دستگاه اولتراسوند به‌مدت ۱۵ دقیقه با فرکانس ٤۰ کیلوهرتز سونیکه شد. نمونه حاصله در دستگاه اسپری درایر OPH, Lab-plant (UK Ltd YO14، انگلستان) با سرعت ۵/۲٦ میلی‌لیتر بر دقیقه با ۱۰۰ درصد هوادهی، دمای ورودی ۱۰۵ درجه و دمای خروجی ٦۸ درجه خشک گردید (Beyki، ۲۰۱٤).

تهیه نمونه ماهی کیلکا: ماهی کیلکا مورد استفاده در این تحقیق از نوع معمولی بود که از سواحل بندر بابلسر به‌صورت تازه صید شد و بعد از توزین به سرعت کنار یخ به ازمایشگاه میکروبیولوژی ارسال گردید. در ابتدا ماهی کیلکا با آب شسته و به صورت دستی سر و امعاء و احشاء جدا شده و پس از چرخ کردن با دستگاه مولینکس گوشت به‌دست آمده به ظرفی انتقال یافته و در یخچال ٤ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس گوشت چرخ شده در ظروف درب دار پلاستیکی ۲۵ گرمی قرار گرفت (از هر نمونه ۳ تکرار) و طبق تیمارهای تعریف شده، عصاره پونه کوهی به فرم آزاد و با دو غلظت ۰/۳ و ۰/۵ درصد و فرم نانوکپسوله با غلظت‌های ۰/۳ و ۰/۵ درصد مخلوط کرده و در یخچال نگهداری شده است.

آماده‌سازی باکتری سودوموناس فلورسانس جهت تلقیح: سویه استاندارد و لیوفیلیزه باکتری سودوموناس فلورسانس (PTCC 1181) از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. آمپول‌های لیوفیلیزه باکتری ابتدا در شرایط استریل باز و به محیط کشت مایع TSB[1] انتقال و به‌مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرم خانه‌گذاری شد. پس از رشد باکتری، محیط کشت حاوی باکتری به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ و به رسوب حاصله سرم فیزیولوژی اضافه شد و سانتریفوژ در ۳ مرحله متوالی با دور ۵۰۰۰rpm به‌مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. به رسوب حاصله مقداری سرم فیزیولوژی اضافه شد و با مقایسه با لوله ۰/۵ مک فارلند مقدار تقریبی باکتری در یک میلی‌لیتر بر حسب CFU/ml تعیین گردید (Abdollahzadeh، ۲۰۱۱).

تهیه تیمارهای آزمایشی مورد مطالعه: پس از آماده سازی نمونه‌ها، دو غلظت از عصاره در فرم آزاد پونه کوهی (۰/۳، ۰/۵ درصد) و همچنین دو غلظت ازعصاره به فرم ریزپوشانی شده (۰/۳، ۰/۵ درصد) به گوشت چرخ شده ماهی کیلکای آلوده به سودوموناس فلورسانس اضافه شد و یک نمونه نیز به عنوان شاهد فاقد هر گونه ماده نگهدارنده بود. مقدار هر نمونه ۲۵ گرم و غلظت اضافه شده سودوموناس فلورسانس 10^4CFU/gr بود. نمونه‌ها در دمای یخچال (٤ درجه سانتی‌گراد) و به مدت ۲۰ روز نگهداری شد و در فواصل زمانی ۰، ٤، ۸، ۱۲، ۱٦ و ۲۰ از نظر عدد پراکسید و pH و شمارش باکتری‌های مزوفیل، سرماگراها و همچنین تعداد سودوموناس فلورسانس مورد بررسی قرار گرفتند. تیمارهای تهیه شده در این تحقیق عبارت بودند از:

تیمار ۱ (شاهد): ماهی کیلکا چرخ شده آلوده به باکتری سودوموناس فلورسانس فاقد هر گونه ماده نگهدارنده.

تیمار ۲: نمونه ماهی کیلکا چرخ شده آلوده به باکتری سودوموناس فلورسانس حاوی عصاره پونه کوهی به فرم آزاد با غلظت ۰/۳

تیمار ۳: نمونه ماهی کیلکا چرخ شده آلوده به باکتری سودوموناس فلورسانس حاوی عصاره پونه کوهی به فرم آزاد با غلظت ۰/۵

تیمار ٤: نمونه ماهی کیلکا چرخ شده آلوده به باکتری سودوموناس فلورسانس حاوی عصاره پونه کوهی انکپسوله شده با غلظت ۰/۳

تیمار ۵: نمونه ماهی کیلکا چرخ شده آلوده به باکتری سودوموناس فلورسانس حاوی عصاره پونه کوهی انکپسوله شده با غلظت ۰/۵

نمونه معمولی حاوی عصاره پونه کوهی به فرم ازاد با M و ریزپوشانی شده با EN در جدول مشخص شده است.

شمارش باکتری‌های مزوفیل، سرماگرا و سودوموناس فلورسانس: ابتدا در شرایط استریل، سوسپانسیونی از ۱۰ گرم از گوشت چرخ شده ماهی کیلکا و ۹۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل ۰/۸۵٪ تهیه شده و به مدت ٦۰ ثانیه در یک مخلوط کن آزمایشگاهی هموژن شد. جهت شمارش باکتریهای مزوفیل و سرماگرا از محیط تریپتیک سویا آگار و انکوباسیون به ترتیب در دمای ۳۵ و ٤ درجه برای ٤۸ ساعت و ۱۰ روز استفاده گردید (McFaddin، ۲۰۰۰). جهت شمارش سودوموناس فلورسانس از محیط کشت ستریمید آگار[2]، دمای ۳۰ و دمای انکوباسیون ٤۸ ساعت استفاده شد (Ozyurt، ۲۰۰۹). کلنی‌های شمارش شده در محیط کشت تریپتیک سویا آگار و سودوموناس فلورسانس در ستریمید آگار

1. Tryptic Soy Broth

2. Cetrimide agar

(کلنی‌های سبز-زرد) در عکس رقت مورد استفاده ضرب شده و تعداد باکتری‌ها برای هر گروه در هر گرم از گوشت چرخ شده کیلکا مشخص شد (Austion و Stobie، ۲۰۰۷).

آزمایشات شیمیایی: برای اندازه‌گیری عدد پراکسید از روش Egan و همکاران (۱۹۹۷) برای اندازه‌گیری pH نیز از دستگاه pH متر استفاده گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 18 انجام پذیرفت. ابتدا بررسی نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگراف-اسمیرنوف و به‌منظور ارزیابی تغییرات شیمیایی و میکروبی در زمان‌های مختلف با استفاده از تجزیه واریانس یک طرفه[1] صورت گرفت. مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن[2] در سطح احتمال ۵ درصد تعیین گردید ($P\leq$۰/۰۵).

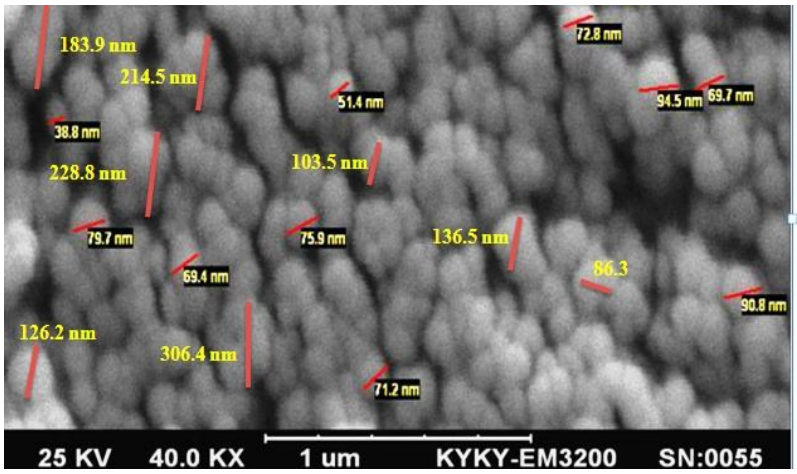
نتایج

به‌منظور عکس‌برداری از ذرات ریزپوشانی شده پونه از میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) استفاده شد (شکل ۱). همان‌طور که در اشکال نشان داده شده است، ذرات ریزپوشانی شده پونه با اندازه مشخص توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره عکس برداری شده است. نکته قابل تامل در مورد این شکل آن است که جهت عکس‌برداری غلظت نهایی ذرات انکپسوله پونه کاهش یافته است یا به عبارت دیگر رقیق شده است (۱۰۰ برابر) تا بتوان به وضوح تک تک ذرات انکپسوله شده را از هم تفکیک نمود، در غیر این‌صورت در شکل توده انبوهی از ذرات انکپسوله بر روی هم دیده می‌شدند (شکل ۱). در مطالعه حاضر متوسط اندازه ذرات ریزپوشانی شده پونه کوهی توسط دستگاه تعیین کننده اندازه ذرات[3] (*Particle size analysis*) تعیین شد. براساس نتایج مشاهده شده متوسط اندازه ذرات ریزپوشانی شده پونه کوهی۱٤۲/۷ نانومتر و تراکم اندازه ذرات ۸٦/۸ درصد بود.

میانگین ۳ تکرار ± انحراف معیار از ۳ تکرار. حروف بزرگ متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P<$۰/۰۵) یک تیمار در روزهای مختلف می‌باشد. حروف کوچک متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P<$۰/۰۵) در یک روز برای تیمارهای مختلف می‌باشد.

در ابتدای دوره میزان عدد پراکسید در تیمارهای مختلف با هم تفاوت معنی‌داری را نشان ندادند ($P>$۰/۰۵). مطابق جدول ۱، میزان عدد پراکسید در تمامی تیمارهای این آزمایش با افزایش زمان روندی افزایشی داشته، به‌طوری‌که در روز ۱۲ در بیشترین میزان و در روز صفر در کمترین میزان خود بود و بین زمانهای مختلف آزمایش در همه تیمارها از نظر آماری اختلاف معنی‌دار مشاهده شد ($P<$۰/۰۵). در طی دوره نگهداری مقادیرPV در همه تیمارها افزایش معنی‌داری ($P<$۰/۰۵) داشت، ولی این افزایش در تیمارهای ریزپوشانی شده پونه ۰/۵ روند کندتری نسبت به سایر تیمارها، به ویژه با تیمار شاهد داشت و در روزهای ۱٦ و ۲۰ کاهش داشته است ($P<$۰/۰۵).

1. One-way analysis of varianc
2. Duncans Multiple- range test
3. Particle Size Analysis



شکل ۱- عکس تهیه شده از ذرات ریز پوشانی شده پونه با استفاد از میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM).

جدول ۱ - تاثی اشکال معمولی و ریز پوشانی شده گیاه پونه بر شاخص PV (میلی‌اکی والان پراکسید بر کیلوگرم چربی) در تیمارهای مختلف گوشت چرخ شده ماهی کیلکا در طی نگهداری در یخچال.

روز	شاهد	فرم M عصاره ۰/۳	فرم M عصاره ۰/۵	فرم EN عصاره ۰/۳	فرم EN عصاره ۰/۵
۰	۰/۸۹±۰/۰۲۱^{aE}	۰/۹۱±۰/۰۳^{aE}	۰/۸٦±۰/۰٤^{aE}	۰/۹۲±۰/۰۲^{aF}	۰/۸٤±۰/۰۳^{aD}
٤	۲/۵۵±۰/۳۲^{aD}	۲/۱۷±۰/۰۱۷^{aD}	۲/۱۱± ۰/۱٤^{aD}	۱/۹٤± ۰/۱٤^{bD}	۱/۹۵± ۰/۱۲^{bC}
۸	٤/٦٦±۰/۰۵۸^{aC}	۳/۵۷±۰/۰٦۹^{aC}	۳/٤۰±۰/۰۸۲^{aC}	۳/۵۵±۰/۰۷۸^{bC}	۳/٤۱±۰/۰۱۰^{bB}
۱۲	٦/٦۵±۰/۰۲۷^{aA}	۵/٦٦±۰/۳۹^{aA}	۵/٤۳±۰/۳۱^{aA}	۵/٤۷±۰/۱٦^{bB}	۵/۳۲±۰/۱۸^{cA}
۱٦	۵/۲۵±۰/ ۰۲۲^{aB}	۵/۱٦±۰/۱۸^{aB}	۵/۱۱±۰/٤۲^{aB}	۵/۱٦±۰/٤۹^{bA}	۵/۱٤±۰/۷٦^{cA}
۲۰	۵/۲۰±۰/ ۱۱^{aB}	۵/۱۱±۰/۲۵^{aB}	۵/۱۳±۰/۳۳^{aB}	۵/۱٤±۰/۲٤^{bA}	۵/۱۰±۰/۱٤^{cA}

جدول ۲- تاثیر اشکال معمولی و ریز پوشانی شده گیاه پونه بر pH در تیمارهای مختلف گوشت چرخ شده ماهی کیلکا در طی نگهداری در یخچال

روز	شاهد	فرم M عصاره ۰/۳	فرم M عصاره ۰/۵	فرم EN عصاره ۰/۳	فرم EN عصاره ۰/۵
۰	۵/۹٦±۰/۱۲^{aC}	٦/۲۲±۰/۱۷^{aC}	٦/۱۸±۰/۱۱^{aE}	٦/۱۱±۰/۰۵^{aA}	٦/۱۳±۰/۰٦^{aD}
٤	٦/۲۹±۰/۰٦^{aB}	٦/۲۱±۰/۱۲^{aC}	٦/۲۳± ۰/۲۱^{aD}	٦/۱۵± ۰/۱۷^{aA}	٦/۲۱± ۰/۱۳^{aC}
۸	٦/۳۲±۰/۱٤^{aB}	٦/۲٦±۰/۲۲^{aC}	٦/۳۱±۰/۱۷^{aC}	٦/۱۱±۰/۰٦^{bA}	٦/۲۳±۰/۲۱^{aB}
۱۲	٦/۷۷±۰/۱۸^{aA}	٦/٤۸±۰/۲۱^{bB}	٦/٤٤±۰/۳۱^{cB}	۵/۳٦±۰/۱۱^{cC}	٦/۳٤±۰/۱٦^{cA}
۱٦	٦/۸۰±۰/۱۳^{aA}	٦/٦۱±۰/۰۷^{bA}	٦/٤۵±۰/۳۸^{cB}	۵/٤۲±۰/۲۱^{dB}	۵/٤۳±۰/۱۹^{eE}
۲۰	٦/۸۵±۰/۱۵^{aA}	٦/٦۵±۰/۲۲^{cA}	٦/۵۱±۰/۲٦^{dA}	۵/۷۲±۰/۳٤^{bB}	۵/۲٦±۰/۲۳^{eF}

میانگین ۳ تکرار± انحراف معیار از ۳ تکرار. حروف بزرگ متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵) یک تیمار در روزهای مختلف می‌باشد. حروف کوچک متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵) در یک روز برای تیمارهای مختلف می‌باشد.

در ابتدای دوره میزان pH در تیمارهای مختلف با هم تفاوت معنی‌داری را نشان ندادند (P>۰/۰۵). مطابق جدول ۲، میزان pH در تیمارهای شاهد و عصاره‌های آزاد پونه روندی افزایشی داشته ولی در عصاره ریزپوشانی شده با مالتو دکسترین در روزهای

پایانی، روند تغییرات pH کاهشی بوده است ($P<۰/۰۵$). شمارش کلی مزوفیل و سرماگرا در تیمارهای مختلف ماهی کیلکا در طی نگهداری در یخچال در جدول‌های ۳ و ٤ نشان داده شده است.

جدول ۳- تاثیر اشکال معمولی و ریز پوشانی شده پونه بر شاخص TVC (برحسب logCFU/g) در تیمارهای مختلف گوشت چرخ شده ماهی کیلکا در طی نگهداری در یخچال

روز	شاهد	فرم M عصاره ۰/۳	فرم M عصاره ۰/۵	فرم EN عصاره ۰/۳	فرم EN عصاره ۰/۵
۰	۳/۳٦±۰/۱^{aE}	۳/۳۹±۰/۰۲^{aE}	۳/۳۸±۰/۰٤^{aE}	۳/۲۳±۰/۰٦^{aE}	۳/۳۸±۰/۰٤^{aE}
٤	٤/٦۸±۰/۱۸^{aD}	٤/۲۸±۰/۱۰^{bD}	٤/۱۸± ۰/۰٤^{bD}	٤/۲٦± ۰/۰٥^{bD}	٤/۱۳± ۰/۰٦^{bD}
۸	٦/۸۱±۰/۰۹^{aC}	٦/۱۸±۰/۱۲^{aC}	٥/۱٦± ۰/۰۷^{bC}	٥/۳۱±۰/۰٥^{bC}	٥/۱۹±۰/۱۰^{bC}
۱۲	۸/۳±۰/۰۷^{aB}	۷/۳±۰/۰٤^{bB}	٦/٥۱±۰/۰۹^{cB}	۷/۱۸±۰/۰۹^{bB}	٦/۳۱±۰/۰٥^{cB}
۱٦	۹/۳٤±۰/۱۳^{aA}	۸/٤٥±۰/۱۰^{bA}	۷/٦۲±۰/۰٥^{cA}	۸/٤±۰/۰۷^{bA}	۷/۳۸±۰/۰٥^{cA}
۲۰	۱۰/٤٥±۰/۲٤^{aA}	۹/۱۱±۰/٤٥^{bA}	۸/۲۳±۰/۱۱^{cA}	۸/۸۷±۰/۲۱^{bA}	۸/۱۷±۰/۱۷^{cA}

میانگین ۳ تکرار± انحراف معیار از ۳ تکرار. حروف بزرگ متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) یک تیمار در روزهای مختلف می‌باشد. حروف کوچک متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) در یک روز برای تیمارهای مختلف می‌باشد.

طبق نتایج حاصله، شمارش باکتری‌های مزوفیل در تمامی تیمارها روندی افزایشی داشته ولی این روند افزایشی در تیمار ریزپوشانی شده با غلظت ۰/۵ درصد پونه کندتر از تیمارهای دارای فرم آزاد و شاهد بوده است ($P<۰/۰۵$). نتایج آنالیز واریانس نشان می‌دهد که تغییرات TVC در تیمارهای مختلف از روز صفر تا ۲۰ روز دارای اختلاف معنی‌داری است ($P<۰/۰۵$) و مقایسه بین تیمارهای مختلف طی مدت نگهداری نشان داد که روند افزایش در تیمارهای ریزپوشانی شده با پونه ۰/۵ درصد نسبت به تیمارهای دیگر کندتر بود ($P<۰/۰۵$).

جدول ٤- تاثیر اشکال معمولی و ریز پوشانی شده پونه بر PTC (برحسب logCFU/g) در تیمارهای مختلف گوشت چرخ شده ماهی کیلکا در طی نگهداری در یخچال.

روز	شاهد	فرم M عصاره ۰/۳	فرم M عصاره ۰/۵	فرم EN عصاره ۰/۳	فرم EN عصاره ۰/۵
۰	۳/۵۹±۰/۰۲^{Ae}	۳/۵۰±۰/۰٦^{aE}	۳/۵٦±۰/۰۸^{aE}	۳/۵٦±۰/۱۳^{aE}	۳/٤۸±۰/۰۹^{aE}
٤	٥/۲٦±۰/۰۷^{aD}	٤/٥٤±۰/۰۳^{bD}	٤/٦۱± ۰/۰٦^{bD}	٤/٤± ۰/۰٤^{bD}	٤/۳± ۰/۰۷^{bD}
۸	۷/۲٥±۰/۱٤^{aC}	٦/۳۸±۰/۰٥^{aC}	٥/۲۹± ۰/۰٦^{bC}	٥/٥۱±۰/۰۸^{bC}	٥/۳۱±۰/۱۲^{bC}
۱۲	۸/٥۲±۰/۱۳^{aB}	۷/٤۸±۰/۰۹^{bB}	٦/۷٥±۰/۰۷^{cB}	۷/۳۰±۰/۰۹^{bB}	٦/٤۳±۰/۰۸^{cB}
۱٦	۹/۷۷±۰/۱۰^{aA}	۸/٥٦±۰/۱۲^{bA}	۷/۷٦±۰/۱٦^{cA}	۸/٥۹±۰/۰٦^{bA}	۷/٦۱±۰/۰۳^{cA}
۲۰	۱۰/۷۹±۰/۳٥^{aA}	۹/٤٥±۰/۱٦^{bA}	۸/٥٦±۰/۲٥^{cA}	۹/۱۷±۰/۳٦^{bA}	۸/۳٤±۰/٥۱^{cA}

میانگین ۳ تکرار ± انحراف معیار از ۳ تکرار. حروف بزرگ متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) یک تیمار در روزهای مختلف می‌باشد. حروف کوچک متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) در یک روز برای تیمارهای مختلف می‌باشد.

در مطالعه حاضر، الگوی افزایش مقادیر PTC (برحسب logCFU/g) همه تیمارها مشابه با الگوی

تغییرات TVC بوده است. با توجه به جدول٤ می‌توان مشاهده کرد که شاخص PTC در طی دوره نگهداری برای همه تیمارها افزایش معنی‌داری ($P<$۰/۰۵) داشت. مطابق نتایج به‌دست آمده، مقدار PTC در تمامی تیمارهای این آزمایش در روز ۲۰ در بیشترین میزان و در روز صفر در کمترین میزان خود بوده است و بین زمان‌های مختلف آزمایش در همه تیمارها (به جز در زمان صفر)، از نظر آماری اختلاف معنی‌دار مشاهده شد ($P<$۰/۰۵). همچنین، مقایسه بین تیمارهای مختلف نشان داد که روند افزایش شاخص PTC در تیمارهای ریزپوشانی شده با ۰/۵ درصد پونه نسبت به تیمارهای دیگر به ویژه تیمار شاهد کندتر بود و اختلاف معنی اداری مشاهده شد ($P<$۰/۰۵). تغییرات باکتری‌های مزوفیل اولیه در این تحقیق در تمامی تیمارها تقریبا برابر ۳/۲٦±۰/۱۲ logCFU/g بود که می‌تواند نشانه تازگی ماهی باشد. محدوده حداکثر پیشنهادی (MRL) برای باکتری‌های مزوفیل در ماهی ۷ logCFU/g است (ICMSF، ۱۹۸٦). با توجه به نتایج جدول ۳، میزان باکتری یا مزوفیل در طی دوره نگهداری در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد در همه تیمارها افزایش پیدا کرده است ولی روند افزایش در تیمارهای ریزپوشانی شده در غلظت ۰/۵ درصد کندتر بوده، به‌طوری‌که در تفاوت بین تیمارهای ریزپوشانی شده پونه کوهی به‌ویژه در غلظت ۰/۵ درصد با سایر تیمارها (بجز عصاره آزاد ۰/۵ درصد) در اکثر مراحل نمونه‌گیری (به جز در روز صفر) معنادار بوده است ($P<$۰/۰۵) که به علت خاصیت ضد میکروبی گیاه پونه کوهی بر جمعیت باکتریایی و حضور روکش غذایی (ریزپوشانی شده) به عنوان سینرژیست با عصاره گیاهی می‌باشد.

در مطالعه حاضر الگوی افزایش مقادیر PTC همه تیمارها مشابه با الگوی تغییرات TVC بوده است. میزان ابتدایی PTC در گوشت چرخ شده ماهی کیلکا در فرم معمولی و ریزپوشانی شده پونه کوهی در غلظت ۰/۵ درصد تقریباً یکسان بوده و تفاوت معناداری بین تیمارهای مختلف مشاهده نشد.

جدول ۵- تغییرات تعداد باکتری سودوموناس فلورسانس در تیمارهای مختلف گوشت چرخ شده ماهی کیلکا معمولی در زمان‌های مختلف نگهداری در یخچال.

روز	شاهد	فرم M عصاره ۰/۳	فرم M عصاره ۰/۵	فرمEN عصاره ۰/۳	فرم EN عصاره ۰/۵
۰	٤/۲۵±۰/۱۲^{aE}	٤/۱٦±۰/۱۸^{aC}	٤/۲۲±۰/۱۵^{aC}	٤/۱۹±۰/۱۱^{aC}	٤/۲۳±۰/۱۲^{aC}
٤	۵/۵۱±۰/۲۸^{aD}	۵/٦٤±۰/۳٦^{aB}	۵/۳۸±۰/۳۲^{aB}	۵/۳٦±۰/٤۱^{aB}	۵/۲۷±۰/۲۵^{aB}
۸	٦/۲٤±۰/٦۸^{aC}	۵/۵۷±۰/٤۵^{bB}	۵/۳۸±۰/۵۲^{bB}	٤/۹۳±۰/۲۸^{bB}	٤/۸۲±۰/۳٦^{bC}
۱۲	۷/۷۰±۰/۳۲^{aB}	۵/۹۷±۰/۱۸^{bB}	۵/۵۸±۰/۲۲^{bcB}	۵/۵۷±۰/۲۸^{bcB}	۵/۲۱±۰/۱۹^{cB}
۱٦	۸/۵۰±۰/۵٦^{aA}	٦/٦۸±۰/۳۲^{bA}	٦/۲٤±۰/۲٦^{bA}	۵/۸۹±۰/۲۰^{bcA}	۵/۳٦±۰/۱٤^{cB}
۲۰	۸/۸۰±۰/۷۸^{aA}	٦/۸۷±۰/۵۵^{bA}	٦/۷۰±۰/٤۳^{bA}	٦/٤۹±۰/۳۵^{bA}	٦/۱٦±۰/۳۰^{cA}

حروف کوچک متفاوت در هر سطر نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P<$۰/۰۵) در روزهای مختلف نمونه برداری برای یک تیمار مشخص و حروف بزرگ متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P<$۰/۰۵) در یک روز برای تیمارهای مختلف می باشد.

تعداد باکتری سودوموناس فلورسانس در تمامی تیمارهای در طی آزمایش روندی افزایشی داشته (جدول ۵) به‌طوری‌که بین زمان‌های مختلف آزمایش در بیشتر تیمارها از نظر آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ($P<$۰/۰۵). تعداد باکتری سودوموناس فلورسانس در کلیه تیمارها در زمان‌های صفر و ٤ تفاوت معنی‌داری با هم نداشت ($P>$۰/۰۵).

نتایج حاصل نشان‌دهنده آن است که روند افزایش تعداد باکتری سودوموناس فلورسانس در تمامی تیمارها بود ولی این روند افزایشی در تیمارهای

ریزپوشانی شده پونه کوهی به‌ویژه در غلظت ۰/۵ درصد نسبت به سایر تیمارها به‌ویژه تیمار شاهد بطئی تر بود ($P<۰/۰۵$).

بحث

محققین مختلفی به بررسی اثرات اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی یا اشکال ترکیبی آنها بر روی تعدادی از میکروب‌های بیماری‌زا منتقل شده از طریق غذا از قبیل سودوموناس فلورسانس، لیستریا مونوسیتوژنز، استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیا کلی، سالمونلا، شیگلا و... پرداخته‌اند، که همگی این تحقیقات با هدف دستیابی به نگهدارنده‌های گیاهی جایگزین ترکیبات شیمیایی مضرر صورت گرفته شده است (Arques، ۲۰۰۵). شمارش کلی باکتری‌ها معیاری برای پی بردن به کیفیت بهداشتی یک محصول است که غیر قابل مصرف بودن محصول را بیان می‌کند (سعیدی اصل، ۱۳۸۸). از آنجایی که بار میکروبی اولیه ماهیان آب شیرین بسته به وضعیت آب و دما تغییر می کند، محققین مقدار ابتدایی آنها را ۲-٦ logCFU/g برای گونه‌های مختلف آب شیرین پیشنهاد دادند (Savvaidis، ۲۰۰۲).

تعداد باکتری سودوموناس فلورسانس در تمامی تیمارهای در طی آزمایش روندی افزایشی داشته به طوری‌که بین زمان‌های مختلف آزمایش در بیشتر تیمارها از نظر آماری اختلاف معنی‌دار مشاهده شد ($P<۰/۰۵$) که با نتایج مشاهده شده توسط Chobkar و همکاران (۲۰۱۰) که اثرات غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی را بر روی میزان رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در فیله‌های ماهی فرآوری شده کپور نقره‌ای مورد بررسی قرار دادند، مطابقت دارد. نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان‌دهنده آن است که روند افزایش تعداد باکتری سودوموناس فلورسانس در تیمارهای ریزپوشانی شده پونه کوهی نسبت به فرم آزاد آن، بطئی‌تر بوده است. مشابه مطالعه حاضر، رومیانی (۱۳۹۲) به بررسی اثرات ضد باکتریایی غلظت‌های مختلف اسانس زیره سبز و نایسین در فیله قزل‌آلای رنگین‌کمان به‌منظور مهار باکتری استرپتوکوکوس اینیایی در دمای ۸ درجه سانتی‌گراد پرداخت. نتایج نشان داد که استفاده توام از اسانس زیره سبز و نایسین تاثیر معناداری در کنترل و کاهش باکتری فوق در فیله قزل‌آلای رنگین کمان داشته است. مطابق نتایج ذکر شده در جدول ۵، مقدار باکتری باکتری سودوموناس فلورسانس در تمامی تیمارهای این آزمایش در روز ۲۰ بیشترین میزان و در روز صفر کمترین میزان بود و بین زمانهای مختلف آزمایش در بیشتر تیمارها از نظر آماری اختلاف معنی‌دار مشاهده شد ($P>۰/۰۵$). این نتایج نیز با نتایج کلی Chobkar و همکاران (۱۳۸۹) بر روی میزان رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در فیله‌های ماهی کپور نقره ای فرآوری شده با نمک و نایسین، نتایج رومیانی (۱۳۹۱) و رومیانی (۱۳۹۲) بر روی میزان رشد باکتری استرپتوکوکوس اینیایی در فیله‌های ماهی قزل‌آلای رنگین کمان فرآوری شده با زیره سبز و نیسین و رزماری و نیسین همخوانی دارد زیرا نتایج آنها نشان داد که در تمامی تیمارهای مختلف زیره سبز و نایسین و رزماری و نایسین میزان رشد باکتری استرپتوکوکوس اینیایی همواره در طول زمان آزمایشات روند افزایشی داشته است.

اعتمادی و همکاران (۱۳۸۷) بیان نمودند که PTC ماهی قزل‌آلای بسته بندی شده در خلا در روز ١٤ به محدوده حداکثر پیشنهاد شده رسیدند، در حالیکه نمونه‌های تیمار شده با عصاره رزماری (دارای ترکیبات فنولیک) تا پایان دوره (۱۸روز) در دمای ۱±۲ درجه سانتی‌گراد به محدوده حداکثر پیشنهاد شده نرسیدند Frangos و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که باکتری‌های سرماگرا در فیله‌های قزل‌آلای

رنگین کمان تیمار شده با ترکیب نمک سود و بسته بندی شده تحت خلا و اسانس پونه کوهی ۰/٤ و ۰/۲ درصد، فیله‌های نمک سود شده و بسته‌بندی شده تحت خلا، طی ۱۸ روز نگهداری در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به محدوده حداکثر پیشنهاد شده نرسیدند، در حالیکه فیله‌های بسته بندی شده با هوا و نمک سود شده در روز ۹ به ۸/۳۸ logCFU/g و فیله‌های بسته بندی شده با هوا بدون نمک سود در روز ۹ به ۸/۹۷ logCFU/g رسیدند که نشان دهنده ویژگی ضد میکروبی اسانس پونه کوهی می‌باشد.

با توجه به نتایج حاصله در روز ۲۰ تیمار ریزپوشانی شده پونه کوهی با غلظت ۰/۵ درصد بیشترین توان را در کاهش تعداد باکتری و تیمار فرم آزاد پونه کوهی با غلظت ۰/۳ درصد کمترین توان را در کاهش تعداد باکتری سودوموناس فلورسانس دارا بود. مطالعه فیروزی و همکاران (۱۳۹۰) نشان داد که استفاده از عصاره‌های گیاهی پونه کوهی و جوز هندی منجر به کاهش تعداد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در جوجه کباب آماده طبق می‌شود که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد. نتایج رومیانی (۱۳۹۱) و رومیانی (۱۳۹۲) موید تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای روزماری و نایسین و زیره سبز و نایسین (مخصوصا در غلظت‌های بیشتر) در کاهش رشد باکتری استرپتوکوکوس اینایی در مقایسه با تیمار شاهد در فیله قزل‌آلای رنگین کمان در طی مدت ۱۵ روز نگهداری در دمای ۸ درجه سانتی‌گراد بود. گزارشات رومیانی (۱۳۹۱) و رومیانی (۱۳۹۲) در طول ۱۵ روز آزمایش نشان داد هر چه غلظت اسانس‌های گیاهی و نایسین در تیمارها افزایش پیدا کرد کاهش معنی‌دار بیشتری در میزان رشد باکتری استرپتوکوکوس اینایی مشاهده شد ($P<۰/۰۵$)، که با نتیاج مطالعه حاضر همسو می‌باشد، به‌طوری‌که غلظت‌های ۰/۵ درصد پونه کوهی در هر دو فرم معمولی و ریزپوشانی شده قدرت بیشتری در کاهش تعداد باکتری سودوموناس فلورسانس در مقایسه با غلظت ۰/۳ درصد از خود نشان دادند. در نقطه مقابل مطالعه Ting و همکاران (۱۹۹۲) نشان داد که غلظت ۱ درصد اسانس پونه کوهی تاثیر معناداری در کاهش تعداد باکتری لیستریا مونوسیتوژنز تلقیح شده به نمونه‌های گوشت در دمای ٤ و ۲٤ درجه سانتی‌گراد نداشت. نتایج مشابهی دیگری نیز در هنگام استفاده از اسانس پونه کوهی توسط Ouattar و همکاران (۱۹۹۷) گزارش شده که این اسانس تاثیر معناداری بر روی کاهش باکتری‌های عامل مولد فساد در گوشت نداشته است. اختلافات مشاهده شده در این مطالعات ممکن است به‌دلیل مختلف بودن غلظت‌های اسانس یا عصاره‌های گیاهی مورد استفاده یا نوع متفاوت میکروارگانیسم مورد مطالعه باشد.رشد و بقاء باکتری‌ها در مواد غذایی به عوامل متعدد بیرونی مانند فلور باکتریایی، درجه حرارت، pH، افزودنی‌هایی که در پروسه تهیه مواد غذایی استفاده می‌شود و نیز عوامل داخلی ترکیبات غذایی بستگی دارد (Juven، ۱۹۹٤).

میزان قابل قبول پراکساید ۱۰-۲ میلی‌اکی والان پراکسید بر کیلوگرم چربی، پیشنهاد گردیده است (Huss، ۱۹۹۵) که در این مطالعه، در هیچکدام از تیمارها از حد پیشنهادی به میزان ۱۰ میلی‌اکی والان پراکسید بر کیلوگرم چربی تجاوز نکرد. بیشترین ترکیبات موجود در عصاره پونه کوهی شامل پولگون، سینئول، منتوفوران و ایزوپولگون بوده که به گیاه توانایی آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی می‌دهد (Pajohi، ۲۰۱۰). براساس نتایج تحقیق حاضر تیمار ریزپوشانی شده پونه کوهی ۰/۳ درصد نسبت به دیگر تیمارها کمترین میزان افزایش را داشت که احتمالا به دلیل آزادسازی تدریجی عصاره پونه کوهی در مدت زمان طولانی تر بوده است. مطالعات محققین دیگر نیز

نشان‌دهنده آن است که استفاده از عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی مختلف منجر به کند شدن روند اکسیداسیون لیپیدها می‌گردد، به‌طور مثال، Ojagh و همکاران (۱۳۸۳) گزارش کردند که اگر چه در همه ماهی‌های کیلکای شاهد و تیمارشده با پلی فنول چای، بتاکاروتن و اسیداسکوربیک با گذشت زمان مقادیر عدد پراکساید به شکل معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) افزایش یافت، اما در نمونه‌های حاوی آنتی‌اکسیدانهای طبیعی در مقایسه با نمونه شاهد در طی زمان نگهداری در یخ عدد پراکسید کمتری داشتند. Ojagh و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که عدد پراکساید در همه تیمارهای قزل‌آلای رنگین‌کمان در مدت نگهداری افزایش یافت اما میزان افزایش این اندیس در تیمارهای کیتوزان و ترکیب کیتوزان و اسانس دارچین مقادیر کمتری نسبت به فیله‌های شاهد قزل‌آلای رنگین‌کمان در مدت نگهداری در یخچال داشته است. Maxis و همکاران (۲۰۰۹) گزارش نمودند که میزان افزایش پراکساید در فیله‌های قزل‌آلای رنگین کمان تیمار شده با ترکیب اسانس پونه کوهی و جاذب اکسیژن نسبت به فیله‌های دارای جاذب اکسیژن و فیله بسته بندی شده در هوا کمتر بود. در خصوص اثرات آنتی اکسیدانی و همچنین ضد میکروبی عصاره‌ها بایستی اشاره نمود که این ویژگی در شرایط آزمایشگاهی و ماده غذایی کاملا متفاوت بوده و به پارامترهایی نظیر بافت، pH، ارکیبات ماده غذایی و... بستگی داشته که بر روند تغییرات حاصله تاثیر خواهند داشت.

در مطالعه حاضر هر دو فرم ریزپوشانی شده و معمولی پونه توانستند که تا انتهای آزمایش تعداد باکتری سودوموناس فلورسانس را کمتر از محدوده استاندارد (۷ log CFU/g) نگهدارند. چنین نتایج مشابهی نیز به هنگام استفاده از رزماری و زیره جهت مهار باکتری استرپتوکوکوس اینیایی در فیله قزل‌آلای رنگین کمان مشاهده شده که تا روز ۹ تعداد باکتری استرپتوکوکوس اینیایی در محدوده استاندارد خود قرار داشت (رومیانی، ۱۳۹۱).

نتایج محققان از جمله Ojagh و همکاران (۲۰۱۰) نیز نشان‌دهنده افزایش شاخص TVC در طول دوره نگهداری ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در دمای یخچال است. Pantazi و همکاران (۲۰۰۸) در مطالعه بر شمشیر ماهی دریای مدیترانه[1] تحت خلاء پس از ۹ روز نگهداری در یخچال Lyhs و همکاران (۲۰۰۱) در مطالعه بر روی ماهی قزل‌آلای بسته بندی شده در خلا (در دمای ۳ درجه سانتی‌گراد) بعد از ۲۰ روز، اعتمادی و همکاران (۱۳۸۷) در مطالعه بر روی ماهی قزل‌آلای بسته بندی شده در خلا در دمای ۱±۲ درجه سانتی‌گراد بعد از ۱۶ تا ۱۷ روز، Savvaidis و همکاران (۲۰۰۲) در مطالعه بر روی قزل‌آلای رنگین کمان بسته‌بندی شده تحت خلاء پس از ۸ روز نگهداری در یخچال، به محدوده حداکثر پیشنهاد شده برای باکتری‌های مزوفیل رسیدند، در مطالعه حاضر تعداد این باکتری‌ها در تیمار شاهد، عصاره معمولی و ریز پوشانی شده با غلظت ۰/۳ درصد پس از گذشت ۱۲ روز نگهداری در یخچال و در تیمارهای حاوی عصاره آزاد و ریزپوشانی شده در غلظت ۰/۵ درصد پس از ۱۲ روز نگهداری در یخچال از محدوده استاندارد خود خارج شدند، که نشان‌دهنده تاثیر مثبت گیاه پونه کوهی در غلظت بالاتر در کاهش بار میکروبی گوشت چرخ شده ماهی کیلکا بوده است. در مطالعه انجام شده توسط Gulluce و همکاران در سال ۲۰۰۷ مشخص گردید که عصاره متانولی گیاه پونه کوهی دارای اثرات آنتی اکسدانی و ضدمیکروبی بالایی می باشد.

Ojagh و همکاران (۲۰۱۰) گزارش نمودند که میزان ابتدایی PTC در فیله‌های قزل‌آلای تیمار شده با

1. Xiphias gladius.

ترکیب روکش غذایی و اسانس دارچین logCFU/g ۲/۸۸ و در فیله‌های شاهد logCFU/g ۳/۸۵ بوده است، که نزدیک به نتایج مطالعه حاضر می‌باشد.استفاده از مواد ضدمیکروبی طبیعی برای به تعویق انداختن زمان رسیدن باکتری‌های سرماگرا به محدوده حداکثر پیشنهاد شده در مطالعات محققین زیر گزارش گردیده است، که نتایج گزارش شده توسط محققین ذیل با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد.

Ojagh و همکاران (۲۰۱۰) بالاترین میزان PTC را در فیله‌های شاهد قزل‌آلای رنگین‌کمان logCFU/g ۸/۴۳ و در ادامه فیله‌های روکش دار شده با کیتوزان logCFU/g ٦/۷۹ و کمترین میزان را مربوط به فیله‌های روکش دار شده با ترکیب کیتوزان و اسانس‌دار چین logCFU/g ٦/۸٦ در روز ١٦ نگهداری گزارش نمودند.

نتیجه‌گیری

نتیجه‌گیری کلی که از این تحقیق حاصل می‌شود آن است که هر چند فرم ریزپوشانی شده پونه کوهی در غلظت ۰/۵ درصد نسبت به سایر غلظت‌ها نتایج بهتری را به همراه داشته ولی برای دستیابی به نتایج بهتر و افزایش فعالیت ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی پونه کوهی در ماهی کیلکا معمولی نیاز به استفاده از غلظت‌های بالاتر پونه کوهی و ارزیابی کامل پارامترهای میکروبی و شیمیایی می‌باشد. البته لازم است که قبل استفاده از این گیاه به‌عنوان نگهدارنده غذایی، مطالعات بیشتری جهت شناسایی ترکیبات موثره آن و خصوصیات ضدمیکروبی آن بر روی سایر میکروب‌های بیماریزای غذایی صورت پذیرد.

منابع

اعتمادی، ح.، رضایی، م.، عابدیان، ع.، ۱۳۸۷.پتانسیل آنتی باکتریایی وآنتی اکسیدانی عصاره رزماری *Rosmarinus officinalis* در افزایش عمر ماندگاری ماهی قزل آلای رنگین کمان *Oncorhynchus mykiss*. فصلنامه علوم وصنایع غذایی، شماره ٤، صفحات ٦٧ تا ٧٧.

چوبکار، ن.، آخوندزاده بستی، ا.، سلطانی، م.، ساری، ع.، ملکشاهی، ع.، نعمتی، غ و پرتوی، ر.، ۱۳۸۹. مطالعه رشد باکتری *Staphylococcus aureus* در فیله‌های ماهی کپور نقره ای فرآوری شده با نمک و نیسین. مجله تحقیقات دامپزشکی، دوره ٦٥، صفحات ۱۹۳ تا ۱۹۸.

حجتی م.، ۱۳۹۱. اثر اسانس‌های پونه و نعناع بر رشد سالمونلا و اشرشیاکلی در مقایسه با آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل. همایش ملی فرآورده‌های طبیعی و گیاهان دارویی، بجنورد، صفحه ۳۲.

رومیانی، ل.، ۱۳۹۱. مطالعه تاثیر اسانس رزماری و نیسین بر رفتار رشد باکتری استرپتوکوکوس اینیایی در شرایط آزمایشگاهی و بر روی فیله ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان. پایان‌نامه دکتری شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، ١٦٠ صفحه.

رومیانی، ل.، ۱۳۹۲. فعالیت ضدباکتریایی اسانس زیره سبز و نایسین در مهار باکتری *Streptococcus iniae* در محیط آزمایشگاه و فیله ماهی. مجله علمی شیلات ایران، جلد بیست و دوم، دوره سوم، صفحات ۵۰ تا ۵۹.

سالنامه آماری شیلات ایران. ۱۳۹۳. موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور. تهران، صفحه ٦٤.

سعیدی اصل، م.، صفری، ر.، ۱۳۸۸. مقدمه‌ای بر میکروب‌شناسی عمومی و غذایی آزمایشگاهی. انتشارات بیهق، صفحه ٤٠٦.

ساری، ع.، آخوند زاده بستی، ا.، رکنی، ن.، ابراهیم زاده، ح.، سلطانی، م.، گندمی، ح.، چوبکار، ن.، خنجری، ع.، عباس‌زاده، س.، پرتوی، د.، ملکشاهی، ع.، و ذبیحی، ع.، ۱۳۸۹. ارزیابی اثر ضدمیکروبی اسانس آویشن شیرازی بر باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس در ماهی کپور نقره‌ای شور. فصلنامه گیاهان دارویی، سال بیست و ششم، دوره ۹، صفحات ۱۲۱ تا ۱۲۹.

فیروزی ر.، شکرفروش، س‌ش.، ملک‌زاده، م.، ۱۳۹۰. بررسی اثر عصاره‌های پونه کوهی و جوز هندی بر رشد و بقاء استافیلوکوکوس ارئوس در جوجه کباب آماده پخت. فصل نامه علوم و صنایع غذایی، دوره دوم، صفحات ۳۵ تا ۴۱.

Abdollahzadeh, E., Rezaei, M., Hosseini, H. and Safari, R., 2011, Effects of nisin and thyme essential oil, individually and in combination, on inoculated populations of *Listeria monocytogenes* in minced silver carp. Iran. J. Nut. Sci. Food Technol. 4, 13-20.

Arashisar, S., Hisar, O., Kaya, M. and Yanik, T., 2004. Effects of modified atmosphere and vacuum packaging *onmicrobiological* and chemical properties of rainbow trout (*Oncorynchus mykiss*) fillets. International Journal of Food Microbiology 97, 209–214.

Arques J.L., Rodriquez E., Gaya P., Medina M. and Nunez, M., 2005. Effect of combinations of high pressure Treatment and *bacteriocin* producing lactic acid bacteria on survival of *listeria monocytogenes* in raw milk cheese. International Dairy Journal 15, 898-900.

Al-Dughaym, A.M., 2000. Recovery and *antibiogram* studies of A. *hydrophila* and P. *fluorescens* from naturally and experimentally infected Tilapia fishes. Pakistan Journal of Biological Sciences 3, 2185-7.

Anonymous, M., 1978. Kasp NIRKH (*Caspian Fisheries Research Institute*), Ecological features of the Caspian Sea (*Genus Clupeonella*) 1, 15-26.

Austion, B. and Stobie, D.A., 2007. Bacterial and Pathogens Disease in Farmed and Wild Fish. Ellis Harwood chichester, (4nd ed.) pp: 226-299.

Al-Dughaym, A.M., 2000. Recovery and *antibiogram* studies of *A. hydrophila* and *P. fluorescens* from naturally and experimentally infected Tilapia fishes. Pakistan Journal of Biological Sciences 3, 2185-7.

Beyki M., Zhaveh S., Khalili ST., Rahmani-Cherati T., Abollahi A., Tabatabaei M. and Mohsenifar A., 2014. Encapsulation of *Mentha piperita* essential oils in *chitosan–cinnamicacid nanogel* with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. Industrial Crop Product 54(1), 310–319.

Choobkar, N., Soltani, M., Ebrahimzadeh Mousavi, H.A., Akhonzadeh Basti, A. and Matinfar A., 2010. Effect of *Zataria multiflora Boiss* essential oil on the growth of *Staphylococcus aureus* in the light salted fillets of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). Iranian Journal of Fisheries Sciences 9(3), 352-359.

El-Nagar, R.M.A., 2010. Bacteriological studies on *Pseudomonas microorganisms* in cultured. M.V.Sc. thesis, Faculty of Veterinary Medicine, Zagreb University. 123 p.

Egan, H., Krik, R.S. and Sawyer, R., 1997. *Pearsons* Chemical Analysis of Foods .9(Edn), pp. 609-634.

Frangos, L., Pyrgotou, N., Giatrakou, V., Ntzimani, A. and Savvaidis, I.N., 2010. Combined effects of salting, oregano oil and *vacuum-packaging* on the shelf-life of refrigerated trout fillets. Food Microbiology 27, 115–121.

Gulluce, M., Sahin, F., Sokmen, M., Ozer, H., Daferera, D. and Sokmen, A., 2007. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *mentha longifolia* L. ssp. Longifolia Food Chem. 103, 1449-56.

Huss, H.H., (Ed.) 1995. Quality and quality changes in fresh's. FAO Fisheries Technical Paper No. 348, Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations, Rome, Italy.

Juven, B.J., Kanner, J., Schved, F. and Weisslowicz, H., 1994. Factors that interact with antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. Journal of Applied Bacteriology 76, 626-631.

Kose, S., Karacam, H., Kutlu, S. and Boran, M., 2001. Investigating the shelf- life of the anchovy dish called .Hamsikusu. In frozen storage at -18±1ºC .Turk. J. Vet. Anim. Sci. 25, 651-656.

Lyhs, U., Lahtinenb, J. and Schelvis-Smit, R., 2007. Microbiological quality of matjes herring stored in air and under modified atmosphere at 4 and 10°C. Food Microbiol. 24, 508-516.

McFaddin, Jean F., 2000. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria, 7nd Ed., Baltimore, Williams and Wilkins.

Mexis, S.F., Chouliara, E. and Kontominas, M.G., 2009. Combined effect of an *oxygen* absorber and oregano essential oil on shelf *lifeextension* of rainbow trout fillets stored at 4°C. Food Microbiology 26, 598–605.

Ojagh, S.M., Rezaei, M., Razavi, S.H. and Hosseini, S.M.H., 2010. Effect of *chitosan* coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. Food Chemistry 120, 193–198.

Ouattara, B., Simard, R.E., Holey, R.A., Piette, G.J. and Begin, A., 1997. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. International Journal of Food Microbiol. 37, 155-162.

Ojagh, S.M., Rezaei, M., Razavi, S.H. and Hosseini, S.M.H., 2010. Effect of *chitosan* coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. Food Chemistry 120, 193–198.

Ouattara, B., Simard, R.E., Holey, R.A., Piette, G.J. and Begin, A., 1997. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. International Journal of Food Microbiol. 37, 155-162.

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

Pajohi, M., Tajik, H., Akhondzade, A., Gandomi, H., Ehsani, A. and Shokohi Sabet Jalali, F., 2010. Evaluation of chemical composition and antibacterial efficacy of *Cuminum cyminum* L. and *Mentha longiflia* L. alone and combined with *nisin Urmia* Medical Journal 21(4), 324-331.

Pantazi, D., Papavergou, A., Pournis, N., Kontominas, M.G. and Savvaidis, I.N., 2008. Shelf-life of chilled fresh Mediterranean swordfish *(Xiphias gladius*) stored under various packaging conditions: *Microbiological,* biochemical and sensory attributes. Food Microbiology 25, 136–143.

Ruberto, G. and Baratta, M.M.T., 2000. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. Food Chem. 69, 167-71.

Savvaidis, I.N., Skandamis, P.N., Riganakos, K.A., Panagiotakis, N. and Kontominas, M.G., 2002. Control of natural microbial flora and *Listeriamonocytogenes* in vacuum packaged trout at 4 and 10°C using irradiation. J. Food Prot. 65, 515–522.

Sivam, G.P., 2001. Recent advances on the nutritional effects associated with the use of garlic as supplement. American Society of Nutrition Sciences 131, 1106-1108.

Smith-Palmer, A., Stewart, J. and Fyfe, L., 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. Letters in Food Microbiology 26, 118-122.

Ting, E.W.T., and Deibel, K.E., 1992. Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to spices at two temperatures. Journal of Food Safety 12, 129-137.

Yin, M.C. and Cheng, W.S., 2003. Antioxidant and antimicrobial effects of four garlic-derived *organosulfur* compounds in ground beef. Meat Sci. 63, 23–28.

Zuidam N.J. and Nedovic, V., 2010. *Encapsulation* technology for active food ingredients and food processing. http://www.springer.com/978-1-4419-1007-3.