بررسی ترکیبات ضد باکتریایی عصاره آبی و الکلی ریزجلبک کلرلا ولگاریس بر ماندگاری پودر ماهی

عبدالمجید نورایی[۱]
پیمان مهستی شتربانی[۲*]
افشین آخوند زاده بستی[۲]
سعید تمدنی جهرمی[۴]
مریم طلا[۵]

۱. دانشجوی دکترای بهداشت مواد غذایی دانشگاه ازاد اسلامی واحد بین الملل قشم، قشم، ایران.
۲. گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران.
۳. گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
۴. گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندر عباس، ایران.
۵. گروه شیلات، دانشگاه ازاد اسلامی، واحد قشم، قشم، ایران.

***مسئول مکاتبات:**
pmahasti@yahoo.com

کد مقاله: ۱۴۰۱۰۳۰۹۲۷
تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۱۵
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۲۲
این مقاله پژوهشی و برگرفته از پایان نامه دکتری است.

چکیده

این تحقیق باهدف بررسی ترکیبات ضد باکتریایی عصاره آبی و الکلی به‌دست‌آمده از ریز جلبک کلرلا ولگاریس (*Clorella vulgaris*) بر ماندگاری پودر ماهی انجام گردید. جلبک موردبررسی در طی انجام یک سری روش‌های غربالگری (شمارش سلول‌ها با استفاده از لام هموسایتومتر و نیز استفاده از روش‌های استاندارد پلیت با استفاده از محیط کشت های ترکیبی) از سواحل خلیج‌فارس جداسازی شد. به دنبال جداسازی و تشخیص ریز جلبک، کشت ریز جلبک و همچنین شمارش سلولی و درنهایت تهیه توده زیستی ریز جلبک انجام گرفت. در مرحله بعد عصاره‌های آبی و متانولی از ریز جلبک‌های تهیه‌شده انجام گرفت. برای شمارش کلی باکتری‌ها (سالمونلا، باسیلوس سرئوس، استافیلوکوکوس اورئوس) از روش پورپلیت و از محیط کشت نوترینت آگار استفاده گردید. برای تجزیه‌وتحلیل داده‌ها در این تحقیق از نرم‌افزار آماری SPSS استفاده گردید. نتایج نشان دادند که در هر دو عصاره آبی و الکلی عوامل میکروبی موردمطالعه مانند اشریشیا کلی، سالمونلا، کپک و مخمر و همچنین میزان عوامل شیمیایی موردبررسی در پودر ماهی مانند پراکسید، اسیدهای چرب آزاد، هیستامین و نیتروژن فرار کل (Total Volatile Nitrogen) با افزایش زمان افزایش‌یافته است. در همین ارتباط نتایج نشان دادند که در عصاره آبی روند تغییرات فراوانی سالمونلا نیز نسبتاً مشابه اشرشیا کولی بوده به‌طوری‌که با افزایش غلظت فراوانی آن از یک‌روند نسبتاً کاهشی برخوردار بوده است. بررسی نتایج نشان داد که مابین عوامل میکروبی موردمطالعه در عصاره آبی مانند اشرشیا کولی، سالمونلا، کپک، مخمر و تغییرات مربوط به میزان پراکسید و کل نیتروژن فرار یک همگرایی مثبت و قوی و در ارتباط با میزان هیستامین یک همگرایی مثبت در حد متوسط وجود داشته است؛ که این خود ناشی از اندرکنش‌های عوامل میکروبی و اثرگذاری این عوامل بر روی برخی از عوامل شیمیایی موردمطالعه و تأثیرات متقابل آن‌ها بر کیفیت پودر ماهی در عصاره آبی بوده است.

واژگان کلیدی: کلرلا ولگاریس، اشرشیا کلی، سالمونلا، پودر ماهی، عصاره آبی و الکلی.

مقدمه

بیش از ۴۰۰۰۰ گونه از موجودات مختلف اعم از میکروارگانیسم‌ها، علف‌های دریایی، جلبک‌ها، مرجان‌ها و جانوران در محیط‌های دریایی حضور دارند. این تنوع بی‌نظیر نقشی حیاتی در اکتشاف و مطالعه ترکیبات طبیعی از منابع دریایی ایفا می‌نماید (Mincer *et al*., 2005). ریز جلبک‌ها میکروارگانیسم‌های فتوسنتزی هستند که از انرژی نور و CO_2 برای تولید ترکیبات باارزش استفاده می‌کنند. آن‌ها منابع بیولوژیکی مهمی می‌باشند

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]

که طیف گسترده‌ای از برنامه‌های کاربردی زیست‌فناوری را به خود اختصاص داده‌اند. تعداد گونه‌های جلبک‌ها که اکثر آن‌ها میکرو جلبک‌ها هستند، یک تا ده میلیون تخمین زده‌شده است (Chu, 2012).

در ارتباط بااهمیت جلبک‌ها در اکوسیستم آبی می‌توان به این نکته اشاره کرد که ریز جلبک‌ها گروهی بسیار متنوع از گیاهان آبزی را شامل می‌شوند که امروزه طیف کاربردی گسترده‌ای در علم فناوری زیستی داشته و می‌توان گفت که این فتوسنتز کنندگان میکروسکوپی، علی‌رغم نقش مؤثری که در تولید اکسیژن درروی کره زمین ایفا می‌کنند، به دلیل پراکنش و فراوانی بالایی که دارند تقریباً در تمام آب‌های روی زمین یافت می‌شوند. (آخوندیان و همکاران، ۱۳۹۶). ارزش بالای تغذیه‌ای و نیز پتانسیل این گیاهان میکروسکوپی در تولید ترکیبات فعال زیستی با کاربردهای متنوع دارویی و غذایی، هم‌چنین کاربری به‌عنوان مواد اولیه خام جهت استخراج سوخت‌های زیستیِ سازگار با محیط‌زیست از دیگر مزایای این گیاهان دریایی می‌باشد. اگرچه کاربرد تجاری ریز جلبک‌ها تاکنون محدود بوده است ولی در دهه اخیر استفاده از جلبک‌ها در صنایع غذایی و دارویی از اهمیت فراوانی برخوردار شده است. مطالعات گسترده‌ای در جهت استفاده از جلبک‌ها در علم پزشکی برای محققین انگیزه و اشتیاق فراوانی در کشورهای مختلف جهت انجام مطالعات گسترده در مورد مطالعات ریخت‌شناسی و اجزاء مختلف این میکروارگانیسم‌ها را فراهم آورده است (Vasconcelos *et al*., 2014). در سال‌های اخیر درزمینه‌ی تحقیق درباره ترکیبات فعال زیستی با منشأ گیاهی علاقه زیادی به مطالعه درباره جلبک‌ها به وجود آمده است (Pratt *et al*., 1944). در بررسی‌های مختلف معین گردیده است که عصاره جلبک‌ها دارای خواص ضد قارچی، ضد باکتریال، ضدویروس و ضد سرطان می‌باشند (Peymani *et al*., 2014). این جلبک‌ها معمولاً در لوازم‌آرایشی و بهداشتی، مواد غذایی و دارویی و همچنین در تولید خوراک و فرآیندهای زیست پالایشگاهی استفاده می‌شوند. علاقه رو به رشد به تحقیق درباره استخراج متابولیت‌های جلبک‌ها به کشف بسیاری از ترکیبات مهم در فعالیت‌های بیولوژیکی امیدوارکننده و مفید منجر شده است (Beena and Krishnika, 2011).

کلرلا ولگاریس (*Clorella vulgaris*) یک جلبک سبز تک‌سلولی است که به سبزتباران تعلق دارد. شکل آن کروی است و حدود ۲ الی ۱۰ میکرون قطر دارد و فاقد تاژک است. کلرلا حاوی رنگ‌دانه‌های فتوسنتز سبز کلروفیل a و b در کلروپلاست است. از طریق فتوسنتز، به‌سرعت زیاد می‌شود و برای تکثیر تنها به دی‌اکسید کربن، آب، نور خورشید و مقدار کمی از مواد معدنی نیاز دارد (Scheffler, 2007). بسیاری از مردم معتقدند کلرلا می‌تواند به‌عنوان یک منبع بالقوه غذایی و انرژی باشد، که این موضوع به دلیل کارایی فتوسنتزی آن در تئوری است که می‌تواند به ۸ درصد برسد و بیشتر از دیگر محصولات بسیار کارآمد مانند نیشکر است (Zelitch, 1971). ریز جلبک کلرلا با توجه به میزان پروتئین (۵۱-۵۸ درصد وزن خشک)، کارتنوئیدها و طیف گسترده‌ای از ویتامین‌ها دارای ارزش غذایی بالایی است. این میکرو جلبک دارای تأثیرات مفید دیگر در مهار رادیکال‌های آزاد و کاهش چربی خون است. محصولات اضافی کلرلا «فاکتور رشد کلرلا» نامیده می‌شود و به‌منزله عامل بهبود رشد باکتری‌های لاکتیکی توزیع‌شده است. همچنین کلرلا ولگاریس دارای خواص دارویی ازجمله ضد باکتری، ضد قارچ و ضد سرطان است (Chu, 2012). مطالعات انجام‌شده در سال‌های اخیر نشان می‌دهد که نقش آن‌ها در ایمنی و نیز به‌عنوان یک مکمل غذایی تأییدشده است. توجه به این نکته ضروری است که زمانی که این میکروارگانیسم‌ها در شرایط محیطی شدید قرار می‌گیرند می‌توانند در شرایط طبیعی مانند شوری نور، تابش، دما یا مواد مغذی موجود زنده بمانند. بقای آن‌ها با توجه به توانایی آن‌ها برای سنتز ساختار شیمیایی با خواص ویژه (جهت تولید ترکیبات فعال زیستی) تعیین می‌شود (Hernandez-Ledesma *et al*., 2014). بنابراین این اکوسیستم دریایی به‌عنوان یک منبع وسیع اکتشاف شده از ترکیبات فعال زیستی بالقوه مفید درزمینه‌ی های مختلف، مانند داروسازی، آرایشی و بهداشتی و علوم غذایی در نظر گرفته می‌شود. شواهدی وجود دارد که زیست‌توده ریز جلبک می‌تواند منبع ترکیبات نگه‌دارنده طبیعی باشد. این ترکیبات دارای ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی، ضد قارچی، ضدالتهابی و ضد توموری هستند و ترکیبات فنلی نشان‌دهنده اکثریت مولکول‌های زیستی با فعالیت عملکردی در برابر فرآیند تخریب هستند

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]

(Scaglioni *et al*., 2017). مطالعات نشان داده است که کمپلکس‌های لیپیدی و کربوهیدراتی حاوی ریز جلبک‌های کلرلا ولگاریس فعالیت ضد باکتریایی دارند و از رشد سویه‌های گرم *B. subtilis*، *B. pumilus* جلوگیری می‌کنند (Sukhikh *et al*., 2022).

پودر ماهی به دلیل داشتن اسیدهای آمینه ضروری و تعادل مناسب بین آن‌ها از اقلام گران‌قیمت در تغذیه دام و طیور به شمار می‌رود. در مطالعات مشان داده است که گنجاندن (۲/۵ –۱۰ درصد از رژیم غذایی) جلبک‌ها در جیره غذایی ماهی باعث افزایش عملکرد رشد، راندمان استفاده از خوراک، میکروبیوتای روده، کیفیت لاشه و فعالیت فیزیولوژیکی می‌شود (Hernandez, 2014). تجزیه‌وتحلیل محتوای اسیدآمینه جلبک *C. vulgaris* نشان داده است که اگرچه تنوع قابل‌توجهی در محتوای پروتئین کل (۸ تا ۵۰ درصد وزن خشک) وجود دارد (Fleurence, 1999). آن‌ها به‌طورکلی حاوی تمام اسیدهای آمینه ضروری هستند و جلبک‌های موردمطالعه نیز غنی از اسیدهای چرب غیراشباع با زنجیره بلند n-3 (LC-PUFA)هستند (Dawczynski *et al*., 2007 ؛Ortiz *et al*., 2006). در همین ارتباط مطالعات Karapanagiotidis و همکاران (۲۰۲۲) نشان دادند که جایگزینی پودر ماهی توسط *C. vulgaris* سطوح اسیدهای چرب غیراشباع ۱۸:۲ n-6 و ۱۸:۳ n-3 را در ماهیچه ماهی سیم سر طلایی (*Gilthead seabream*) افزایش داد، درحالی‌که سطوح EPA و DHA به‌طور قابل‌توجهی کاهش پیدا نکرد زیرا روغن ماهی رژیمی رسوب خود را حفظ کرد. استفاده از آرد ماهی اگرچه بخش عمده‌ای از نیازمندی‌های گونه‌های پرورشی به پروتئین انرژی و دیگر مواد معدنی را تأمین می‌نماید لیکن فسادپذیری این مواد نیز به دلیل دربرداشتن عناصر مغذی بالاست این مواد محیط بسیار مناسبی برای رشد و تکثیر انواع میکروارگانیسم‌ها بوده که درنتیجه رشد و تکثیر آن‌ها، کیفیت محصولات به‌شدت کاهش می‌یابد و چنانچه میزان رشد میکروارگانیسم‌ها و یا سمومی که توسط آن‌ها ترشح می‌گردد از حد معینی تجاوز نماید، مصرف آن‌ها در خوراک آبزیان باعث ایجاد مسمومیت‌های شدید و بعضاً کشنده می‌گردد و درنهایت ناگزیر به معدوم نمودن محصولاتی می‌باشند که به این درجه از فساد رسیده‌اند و هرساله لطمات جبران‌ناپذیری از این طریق به واحدهای تولیدکننده این قبیل محصولات و در معیار کلان به اقتصاد صنایع وارد می‌گردد. لذا توجه به حفظ کیفیت این گروه از مواد مصرفی ضروری است. این مطالعه باهدف بررسی ترکیبات ضد باکتریایی عصاره‌های عصاره آبی و الکلی به‌دست‌آمده از ریز جلبک کلرلا ولگاریس بر میزان ماندگاری پودر ماهی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

ریز جلبک موردبررسی، در طی انجام یک سری روش‌های غربالگری، از نمونه خاک جمع‌آوری‌شده از بستر سواحل خلیج‌فارس (منطقه قشم در تابستان ۱۴۰۰) جداسازی شد. ابتدا نمونه خاک با افزودن حجم مشخصی از آب مقطر به آن، به‌صورت سوسپانسیون درآمد. در محیط مایع BG-11 مواد موردنیاز را جهت تهیه ۴/۵ لیتر محیط کشت، توزین نموده و محیط کشت طبق روش ذکرشده، تهیه و استریل گردید سپس مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر از مایع رویی به محیط کشت جامد BG-11 منتقل گردید و به‌صورت دورانی پخش شد. سپس پلیت در اتاق کشت نگهداری شد تا سلول‌ها در آن رشد نموده و کلونی تشکیل دهند (Ghasemi *et al*., 2007). پس از گذشت ۱۰ روز، تعدادی کلونی با شکل‌ها و رنگ‌های متفاوت در پلیت‌ها ظاهر شدند. پس از رشد کلونی‌ها، کشت های خالصی از نمونه‌های زنده توسط روش Subculturing و با استفاده از روش آگار– پلیت در محیط کشت BG-11 تهیه گردید (Richmond, 2008). پس از ایجاد تک کلونی‌های خالص بر روی محیط کشت جامد، از تک کلونی‌ها، توسط نیدل برداشته و در فلاسک مخروطی شکل ۵۰ میلی‌لیتری در محیط کشت مایع BG-11، تلقیح و تحت شرایط وجود دی‌اکسید کربن نامحدود انکوبه شدند روشنایی دائمی با شدت نور ۱۸۶۰ لوکس با استفاده از لامپ‌های فلورسنت سفید فراهم شد. شناسایی ریز جلبک جداشده با استفاده از مطالعات مورفولوژی انجام می‌گردد (John *et al*., 2002). به‌منظور کشت ریز جلبک کلرلا (*Chlorella sp*.). در این راستا شمارش سلول‌ها، با استفاده از لام هموسایتومتر انجام شد. جهت تهیه عصاره آبی و اتانولی جلبک‌ها نمونه‌های خشک‌شده با استفاده از

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]

دستگاه خردکن، به شکل پودر درآورده می‌شوند، سپس ۱۰ گرم پودر جلبک با ۱۰۰ میلی‌لیتر آب و نیز دو بار تقطیر (و یا اتانول جهت تهیه عصاره الکلی) در داخل ارلن مایر ۵۰۰ میلی‌لیتر همراه با مگنت، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد روی هیتر حرارت داده می‌شود. سپس محلول حاصل به مدت ۲۵ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ خواهد می‌شود و محلول رویی با استفاده از کاغذ صافی واتمن (شماره ۱) فیلتر خواهد شد. عصاره به‌دست‌آمده برای استفاده‌های بعدی در یخچال (۴- درجه سانتی‌گراد) نگهداری شد. پس از تهیه‌ی پودر ماهی (از شرکت صبا واقع در شهر سوزا، جزیره قشم)، ۱۰ تیمار به ترتیب تیمارهایی ۰ درصد (نمونه‌ی شاهد)، ۱/۵، ۲، ۲/۵ و ۳ درصد از عصاره‌های آبی و اتانولی به پودر ماهی اضافه شد و نمونه‌ها را در دمای محیط نگهداری و شاخص‌هایی از قبیل شمارش کلی باکتری‌ها، شمارش سالمونلا، شمارش استافیلوکوکوس اورئوس، شمارش باسیلوس سرئوس و نیز شمارش کپک و مخمرها در زمان‌های ۱۰ روز، ۲۰ روز، ۳۰ روز، ۴۰ روز، ۵۰ روز و ۶۰ روز اندازه‌گیری شد. برای شمارش کلی باکتری‌ها از روش پورپلیت و از محیط کشت نوترینت آگار استفاده شد (Tompkins *et al*., 1995). پس از تهیه رقت‌های مختلف از هرکدام از تیمارها از مناسب‌ترین رقت جهت کشت پورپلیت استفاده شد. کشت ها در سه تکرار انجام و میانگین گزارش گردید. محیط کشت انتخابی برای باکتری سالمونلا SS AGAR و Bismut sulphit agar بودند که برای تعیین تعداد باکتری سالمونلا در هرکدام از تیمارها از این محیطها استفاده شد و میزان باکتری سالمونلا را در گرم نمونه محاسبه گردید. جهت کشت مقدار ۱ الی ۲ سی‌سی از غلظت ۰/۰۱ نمونه را روی محیط‌های آگاردار برده به شکل سطحی کشت داده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گذاری شد. محیط کشت انتخابی برای باکتری باسیلوس سرئوس پلی میکسین، زرده تخم‌مرغ، مانیتول، فنل رد آگار بود که برای تعیین تعداد باکتری باسیلوس سرئوس در هرکدام از تیمارها از این محیط استفاده و میزان باکتری باسیلوس سرئوس را در هر گرم نمونه محاسبه گردید. محیط کشت انتخابی برای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس Baird Parker Agar می‌باشد که برای تعیین تعداد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در هرکدام از تیمارها از این محیط‌ها می استفاده نموده و میزان باکتری استافیلوکوکوس اورئوس را در گرم نمونه محاسبه گردید. جهت شمارش و تعیین میزان کپک و مخمرها در نمونه‌ها و تیمارهای موجود از محیط کشت YGC استفاده و از رقیق‌ترین رقت تهیه و به شکل سطحی روی محیط کشت داده و پس از ۲۴ ساعت انکوبه گذاری در دمای ۲۵ درجه شمارش گردید.

برای تجزیه‌وتحلیل داده‌ها در این تحقیق از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۸ استفاده گردید. نتایج حاصل از آزمون کولموگروف – اسمیرنوف حاکی از توزیع نامناسب داده‌ها جهت انجام تحلیل واریانس‌ها بود؛ بنابراین با توجه به عدم نرمال بودن داده‌ها بر اساس نتایج سطح معنی‌دار دو آزمون ($P<۰/۰۵$) جهت مقایسه تیمارها از آزمون کروسکال والیس معادل آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و کولموگروف – اسمیرنوف معادل آزمون‌های T test استفاده گردید.

نتایج

نتایج مربوط به مقایسه دو عصاره آبی و الکلی جلبک کلرلاولگاریس بر کیفیت میکروبی و شیمیایی صرف‌نظر از اثرات دو تیمار زمان و غلظت‌های انتخابی که در جدول‌های ۱، ۲ و شکل‌های ۱ و ۲ آمده است نشان داد که میانگین تمامی متغیرهای موردبررسی در عصاره آبی به‌مراتب بیشتر از عصاره الکلی بوده است. نتایج آزمون کولموگروف – اسمیرنوف (جدول ۳) نشان داد که مابین دو عصاره آبی و الکلی برای تمامی متغیرهای موردمطالعه اختلاف معنی‌داری وجود نداشته است ($P>۰/۰۵$).

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]

جدول ۱: بررسی توزیع داده‌ها با آزمون‌های شفیرو–ویلک و کولموگروف – اسمیرنوف.

Tests of Normality						
	Kolmogorov-Smirnov[a]			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
ایریشیا کولی	۰/۳۰۳	۶۰	۰/۰۰۰	۰/۸۷۵	۶۰	۰/۰۰۰
سالمونلا	۰/۲۲۰	۶۰	۰/۰۰۰	۰/۸۷۴	۶۰	۰/۰۰۰
کپک	۰/۱۹۱	۶۰	۰/۰۰۰	۰/۹۱۰	۶۰	۰/۰۰۰
کپک	۰/۲۹۲	۶۰	۰/۰۰۰	۰/۸۵۰	۶۰	۰/۰۰۰
پراکسید	۰/۲۹۸	۶۰	۰/۰۰۰	۰/۷۹۱	۶۰	۰/۰۰۰
هیستامین	۰/۳۲۴	۶۰	۰/۰۰۰	۰/۷۱۳	۶۰	۰/۰۰۰
نیتروژن فرار	۰/۲۹۰	۶۰	۰/۰۰۰	۰/۸۴۴	۶۰	۰/۰۰۰
اسید های چرب	۰/۲۸۶	۶۰	۰/۰۰۰	۰/۸۳۴	۶۰	۰/۰۰۰

جدول ۲: برخی از آماره‌های محاسبه‌شده در دو عصاره آبی و الکلی.

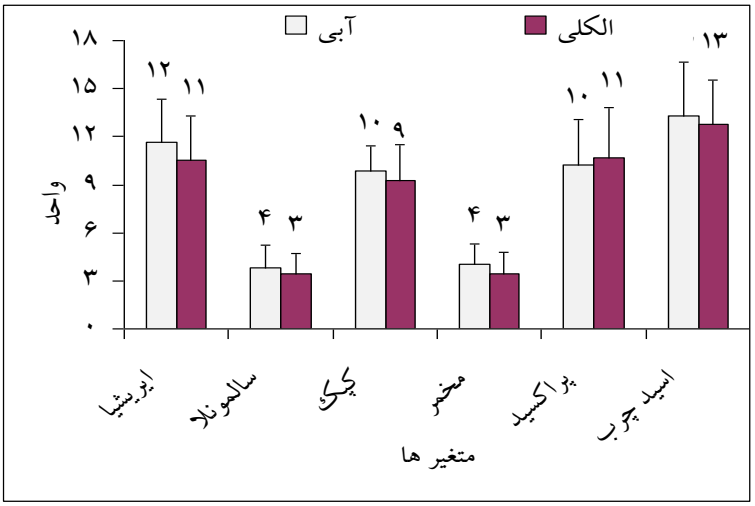
	نوع عصاره	حداقل	حداکثر	فراوانی کل	میانگین	معیارخطا	انحراف معیار
آبی	ایریشیا کولی	۹	۱۷	۳۴۹	۱۲[a]	۰	۳
	سالمونلا	۲	۶	۱۱۴	۴[a]	۰	۱
	کپک	۸	۱۲	۲۹۶	۱۰[a]	۰	۲
	کپک	۳	۶	۱۲۲	۴[a]	۰	۱
	پراکسید	۸	۱۷	–	۱۰[a]	۱	۳
	هیستامین	۴۰۸	۶۲۵	–	۴۷۲[a]	۹.۲	۵۰.۲
	نیتروژن فرار	۱۲۵	۲۵۵	–	۱۶۷.۵[a]	۷.۸	۴۲.۸
	اسید های چرب	۱۰	۲۰.۲	–	۱۳.۳[a]	.۶	۳.۴
الکلی	اشرشیا کولی	۶	۱۶	۳۱۶	۱۱[a]	۱	۳
	سالمونلا	۲	۶	۱۰۲	۳[a]	۰	۱
	کپک	۵	۱۳	۲۷۸	۹[a]	۰	۲
	کپک	۲	۶	۱۰۴	۳[a]	۰	۱
	پراکسید	۸	۱۷	–	۱۰.۷[a]	.۶	۳.۱
	هیستامین	۳۷۵	۷۵۵	–	۴۹۶.۸[a]	۱۸.۹	۱۰۳.۴
	نیتروژن فرار	۱۰۰	۲۰۸	–	۱۴۵.۸[a]	۴.۶	۲۵.۰
	اسید های چرب	۷	۱۹	–	۱۲.۸[a]	.۵	۲.۸
					St.E: معیارخطا		St.D: انحراف معیار

*مقایسه آماری (کولموگروف– اسمیرنوف) هر متغیر مابین دو عصاره با حروف نشان داده شده است. حروف نامتشابه نشانه معنی دار بودن هر متغیر مابین دو عصاره مورد نظر می باشد (P< ۰/۰۵).

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]

جدول ۳: مقایسه دو عصاره آبی و الکلی با استفاده از آزمون کولموگروف – اسمیرنوف.

Test Statistics [a]: Two-Sample Kolmogorov-Smirnov Test								
Tvbn	histamine	FFA	peroxide	yeast	mold	Salmonella	E.coli	
۱۰/۱۶۲	۰/۷۷۵	۰/۵۱۶	۰/۵۱۶	۰/۹۰۴	۱۰/۰۳۳	۰/۵۱۶	۰/۹۰۴	Kolmogorov-Smirnov Z
۰/۱۳۴	۰/۵۸۶	۰/۹۵۲	۰/۹۵۲	۰/۳۸۸	۰/۲۳۶	۰/۹۵۲	۰/۳۸۸	Asymp. Sig. (2-tailed)
a. Grouping Variable: عصاره								



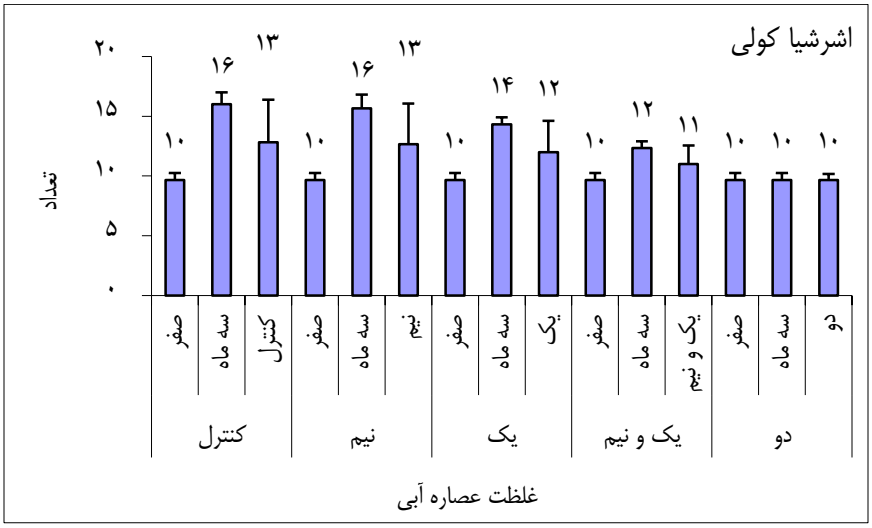
شکل ۱: مقایسه متغیرهای اشرشیا کولی (تعداد)، سالمونلا (تعداد در گرم)، کپک (تعداد در گرم)، مخمر (تعداد در گرم)، پراکسید (میلی‌اکی‌والان گرم) و اسیدهای چرب آزاد (درصد) مابین دو عصاره آبی و الکلی.

شکل ۲: مقایسه متغیرهای هیستامین (میلی‌گرم بر گرم) و کل نیتروژن فرار (میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم) مابین دو عصاره آبی و الکلی.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]

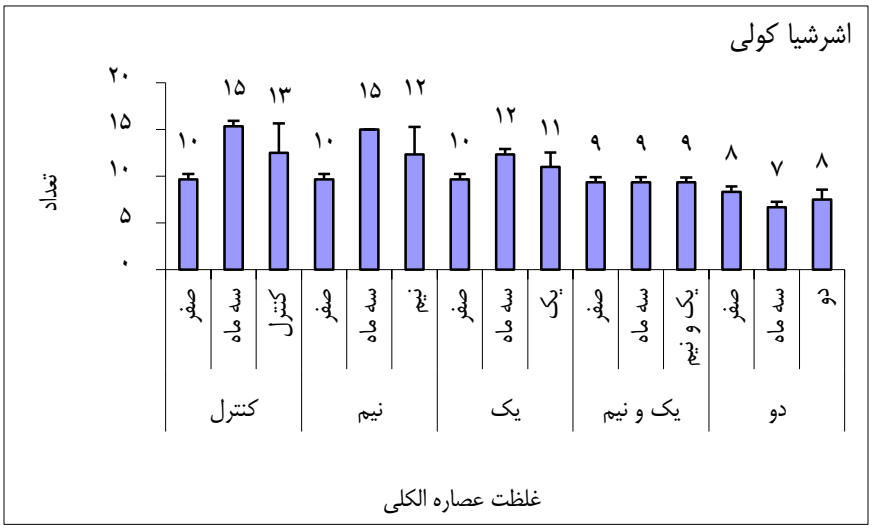
بررسی و مقایسه اثرات زمان و غلظت‌های مختلف از دو عصاره آبی و الکلی جلبک کلرلاولگاریس بر تغییرات فراوانی اشرشیا کولی در پودر ماهی در شکل‌های ۳ و ۴ گردیده است. بیشترین فراوانی شمارش‌شده مربوط به باکتری اشرشیا کولی در عصاره آبی مربوط به دو تیمار کنترل و تیمار غلظتی نیم (۱۶ عدد) بوده و کمترین آن مربوط به تیمار غلظتی ۲ میلی‌گرمی از غلظت عصاره آبی (۱۰ عدد) بوده است. در عصاره الکلی نیز بیشترین فراوانی مشاهده‌شده در دو تیمار کنترل و نیم (۱۵ عدد) و کمترین تعداد مربوط به تیمار غلظتی ۲ بوده است. نتایج آزمون دانت نشان داد که فقط در عصاره الکلی مابین دو تیمار کنترل و تیمار غلظتی ۲ (تیمار غلظتی ۲< تیمار کنترل) اختلاف معنی‌داری وجود داشته است ($P<0/05$). بایستی اظهار نمود که بر اساس آزمون کولموگروف – اسمیرنوف در هیچ‌کدام از تیمارهای غلظتی مابین دو تیمار زمانی (درزمان صفر، پس از گذشت سه ماه) موردنظر اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید.

نتایج آزمون کولموگروف – اسمیرنوف نشان داد که در هر دو عصاره انتخابی صرف‌نظر از غلظت‌های انتخابی بین دو تیمار زمانی صفر و سه‌ماهه ازنظر فراوانی‌های شمارش‌شده اختلاف معنی‌داری وجود داشته و به‌طورکلی فراوانی باکتری اشرشیا کولی در تیمار زمانی سه‌ماهه به‌مراتب بیشتر از زمان صفر بوده است.



شکل ۳: مقایسه اثرات دو تیمار زمان و غلظت‌های مختلف عصاره آبی بر تغییرات مربوط اشرشیاکولی در پودر ماهی.

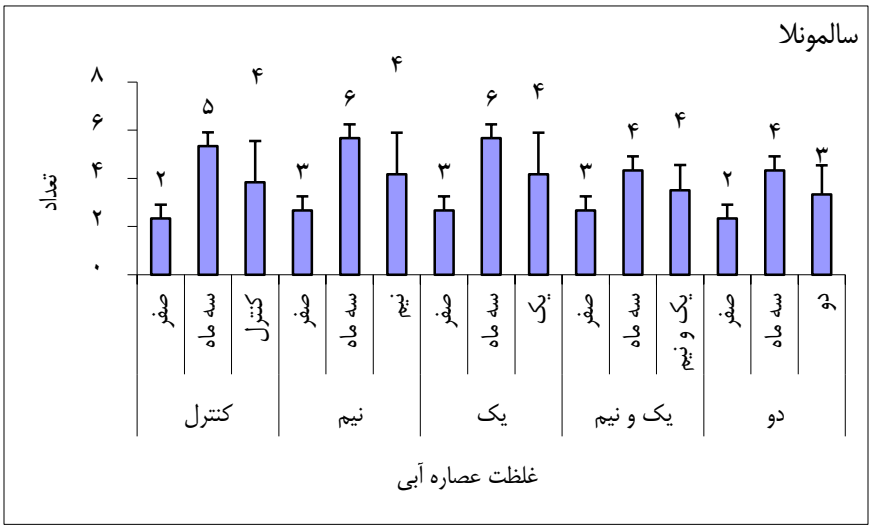
[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]



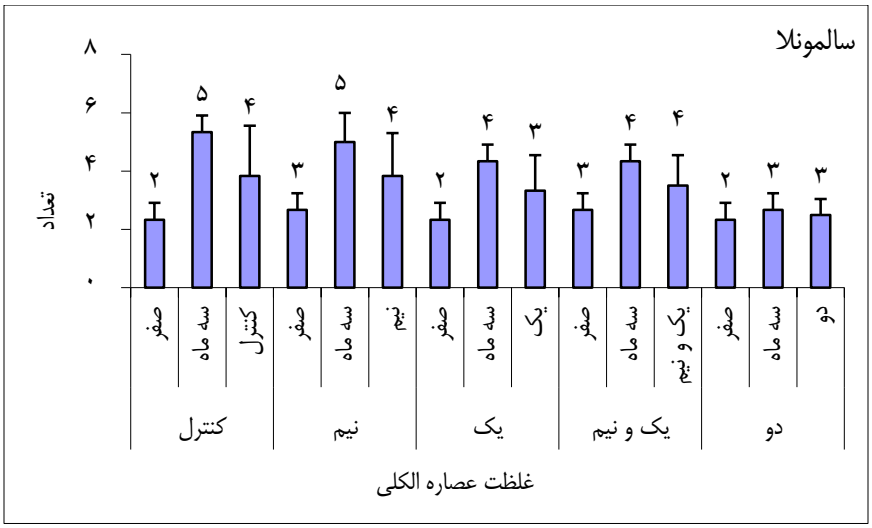
شکل ۴: مقایسه اثرات دو تیمار زمان و غلظت‌های مختلف عصاره الکلی بر تغییرات مربوط اشرشیاکولی در پودر ماهی.

بررسی و مقایسه اثرات زمان و غلظت‌های مختلف از دو عصاره آبی و الکلی جلبک کلرلاولگاریس بر تغییرات فراوانی اشرشیا سالمونلا در پودر ماهی در شکل‌های ۵ و ۶ گردیده است. حداکثر فراوانی شمارش‌شده سالمونلا در عصاره آبی و الکی برابر ۶ عدد بوده است. فراوانی کل محاسبه‌شده برای سالمونلا در دو عصاره آبی و الکلی به ترتیب معادل ۱۱۴ و ۱۰۲ عدد بوده است. ازنظر مقایسه فراوانی‌های شمارش‌شده، بر اساس آزمون کولموگروف- اسمیرنوف مابین این دو عصاره اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید. نتایج مربوط به بررسی اثرات زمان‌بر تغییرات فراوانی سالمونلا معنی‌دار بوده است. به‌طورکلی در تمامی تیمارهای غلظتی فراوانی‌های شمارش‌شده در تیمار زمانی دوم (سه ماه) نسبت به تیمار صفر بیشتر بوده و صرف‌نظر از تیمارهای غلظتی در هر دو عصاره آبی و الکلی مابین دو تیمار زمانی بر اساس آزمون کولموگروف اسمیرنوف اختلاف معنی‌داری وجود داشته است. بایستی اظهار نمود که بر اساس آزمون کولموگروف – اسمیرنوف در هیچ‌کدام از تیمارهای غلظتی مابین دو تیمار زمانی (درزمان صفر، پس از گذشت سه ماه) اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]



شکل ۵: مقایسه اثرات دو تیمار زمان و غلظت‌های مختلف عصاره آبی بر تغییرات مربوط سالمونلا در پودر ماهی.



شکل ۶: مقایسه اثرات دو تیمار زمان و غلظت‌های مختلف عصاره الکلی بر تغییرات مربوط سالمونلا در پودر ماهی.

بحث و نتیجه‌گیری

با بررسی نتایج این تحقیق می‌توان دریافت که در هر دو عصاره آبی و الکلی فراوانی مربوط به پارامترهای میکروبی موردمطالعه مانند اشرشیا کولی، سالمونلا، کپک و مخمر و همچنین میزان عوامل شیمیایی موردبررسی در پودر ماهی مانند پراکسید، اسیدهای چرب آزاد، هیستامین و کل نیتروژن فرار با افزایش زمان افزایش‌یافته، به طوری که نتایج آزمون کولموگروف – اسمیرنوف حاکی از اختلاف معنی‌دار بین دو زمان انتخابی یعنی زمان صفر و ۳ ماهه بوده است (P<۰/۰۵). همچنین نتایج آزمون کولموگروف – اسمیرنوف نشان داد که فراوانی مربوط به عوامل میکروبی موردبررسی و همچنین میزان مربوط به عوامل شیمیایی اندازه‌گیری شده مابین دو عصاره الکلی و آبی تفاوت معنی‌داری وجود نداشته است (P>۰/۰۵). بر طبق نظر *Najdenski* و همکاران (۲۰۱۳)، عصاره‌های اتانولی، Scenedesmus oblique's، *Chlorella sp.* و *Nostoc*

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]

sp. پتانسیل ضد باکتری در برابر *S. aureus* نشان دادند .به همین ترتیب، طبق مطالعات Danyal و همکاران (۲۰۱۳)، عصاره اتانولی *Pithophora oedogonium* در مهار رشد *S. aureus* مؤثر بود. همچنین طبق گفته Guedes و همکاران (۲۰۱۱) عصاره‌های متانولی و استونی *Scenedesmus spp*. فعالیت ضد باکتریایی علیه *S. aureus* به نمایش گذاشت. علاوه بر این *Ishaq* و همکاران (۲۰۱۶) گزارش کردند که عصاره استون (۰/۳۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر – ۳/۴۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) *Scenedesmus spp* فعالیت مهاری قابل‌توجهی برابر استافیلوکوکوس اورئوس از را از خود نشان دادند (ATCC 25923). عصاره‌های متانولی از *Nostoc spp.*، *Microcystis spp.*، *Scenedesmus spp.*، *Oscillatoria geminate* و *Chlorella vulgaris* دارای پتانسیل ضد میکروبی بالایی در برابر *S. aureus* و *B. subtilis*با قطر منطقه مهار بین ۱۶ و ۱۸ میلی‌متر بودند. شناسایی ترکیباتی که به‌طور مستقیم مسئول پتانسیل آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی جلبک‌ها هستند، هنوز هم یک زمینه تحقیقاتی نسبتاً اولیه است و عمدتاً به دلیل شناسایی انواع جدید ترکیبات موجود در سال‌های اخیر می‌باشد (Amaro *et al*., 2016). بررسی نتایج مربوط به روند تغییرات اشرشیا کلی از تیمار کنترل به تیمار غلظتی دو میلی‌گرمی حاکی از این است که با افزایش غلظت در هر دو عصاره آبی و الکلی، فراوانی مربوط به اشرشیا کولی از یک‌روند کاهشی برخوردار بوده است (شکل‌های ۳ و ۴). طبق مطالعات Al-Saif و همکاران (۲۰۱۴) که به بررسی پتانسیل ضد میکروبی چندین سویه جلبکی علیه اشرشیا کلی (ATCC 25322)، سودوموناس آئروژینوزا (ATCC 27853)، استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 29213) و انتروکوک فکالیس (ATCC 29212) پرداختند به این نتیجه رسیدند که این پتانسیل به‌طور مستقیم با میزان پروتئین‌های با وزن مولکولی بیشتر که در آن‌ها شناسایی شدند در ارتباط می‌باشد. در همین ارتباط می‌توان گفت که لکتین ها دسته‌ای از پروتئین‌های شناسایی کننده کربوهیدرات هستند به سلول‌ها متصل می‌شود، باعث افزایش هماگلوتیناسیون و اثرات ضد میکروبی می‌شود. در مطالعه‌ای باهدف ارزیابی اثرات ۲ درصد بیوماس کلرلا ولگاریس (*C. vulgaris*) بر وضعیت سلامت و نیز بر پاسخ التهابی لارو ماهی سیم سرطلایی (*Gilthead seabream*) توسط Reis و همکاران (۲۰۲۲) انجام شد مشخص گردید که پس از ۲ هفته تغذیه لاروها با ۲ درصد بیوماس کلرلا ولگاریس، نوتروفیل‌های در گردش بیشتری نسبت به ماهی‌های دریایی تغذیه‌شده با نمونه کنترل حاوی پودر ماهی معمولی نشان دادند. در این حال این درمان‌های غذایی اثرات مثبتی بر عملکردهای ایمنی ذاتی و آنتی‌اکسیدانی لارو *ماهی* سیم سر طلایی که به مدت ۲ هفته تغذیه‌شده بودند، ایجاد کرد که می‌توان این تأثیر را به اثر مکمل *C. vulgaris* چه به شکل زیست‌توده یا عصاره نسبت داد.

پیشرفت‌های اخیر در بیوتکنولوژی ریز جلبک‌ها ثابت کرده است که این میکروارگانیسم‌ها حاوی تعدادی مولکول فعال زیستی هستند که می‌توانند به‌عنوان افزودنی‌های غذایی برای جلوگیری از بیماری استفاده شوند .ریز جلبک سبز کلرلا ولگاریس دارای چندین مولکول زیستی مانند لوتئین و آستاگزانتین با ظرفیت آنتی‌اکسیدانی است که می‌تواند نقش محافظتی در بافت ها داشته باشد. (Dantas *et al*., 2021). در مطالعه دیگری که توسط Pradhan و همکاران در سال ۲۰۲۱ انجام شد مشخص گردید که *C. vulgaris* دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی امیدوارکننده به دلیل حضور فنولیک و فلاونوئیدها بوده که این خصوصیت با از بین بردن رادیکال‌های DPPH، هیدروکسیل، H2O2 و سوپراکسید مشهود است. علاوه بر این، از طریق تعدیل SOD (superoxide dismutase) و CAT (catalase) فعالیت ضد میکروبی را علیه *E. coli* حفظ می‌کند.

این مطالعه مسیری را برای کشف یک عامل درمانی بهتر در برابر پاتوژن های باکتریایی ایجادکننده بیماری ایجاد کرد. درعین‌حال این مطالعات به پتانسیل پری بیوتیک جلبک‌ها اشاره می‌کند که می‌توانند به‌عنوان مواد ضد میکروبی بالقوه در غذا و نیز مانند آنتی‌بیوتیک‌ها در بدن عمل کنند. در مطالعه انجام‌شده در اکثر متغیرهای موردمطالعه مربوط به کیفیت پودر ماهی، با افزایش زمان، میزان هر یک از متغیرها افزایش‌یافته است. با توجه به عدم معنی‌دار بودن هر یک از متغیرها در بین دو عصاره آبی الکلی، به نظر می‌رسد افزایش زمان‌بر تغییرات کیفیت پودر ماهی بسیار مؤثر بوده باشد. از طرفی در برخی از موارد مشاهده گردید که در تیمار دو میلی‌گرمی، غلظت یا تعداد برخی از عوامل موردبررسی با افزایش زمان، نسبت به زمان صفر نسبتاً کاهش‌یافته است. بر این اساس احتمال می‌رود که افزایش غلظت‌ها در هر دو عصاره آبی یا الکلی می‌تواند باعث کاهش اثرات

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]

مربوط به زمان در افزایش میزان برخی از خصوصیات شیمیایی و فراوانی جمعیت میکروبی موجود در پودر ماهی گردد. به‌عبارتی‌دیگر این احتمال وجود دارد که افزایش غلظت در دو عصاره آبی الکلی و افزایش زمان می‌تواند باعث کاهش کیفیت پودر ماهی ازنظر خصوصیات میکروبی و شیمیایی گردد. به عبارت ساده‌تر انتخاب غلظت‌های پایین‌تر و انتخاب حداقل زمان ممکن می‌تواند باعث افزایش کیفیت پودر ماهی در هر دو عصاره آبی و الکلی گردد.

منابع

آخوندیان، م. و میرحسن نیا، س. د.، ۱۳۹۶. تنوع زیستی ریز جلبک‌ها، ظرفیتی بالقوه در فناوری‌های زیستی و محیط. انسان و محیط‌زیست، ۱۵ (۲): صفحات ۳۹-۷.

Abd El-Hack, M. E., Abdelnourm, S., Alagawany, M., Abdo, M., Sakr, M. A., Khafaga, A. F., Mahgoub, S. A., Elnesr, S. S. and Gebriel, M. G., 2019. Microalgae in modern cancer therapy: Current knowledge. Biomedicine Pharmacotherapy, 111: 42–50.

Al-Saif, S. S. A., Abdel-Raouf, N., El-Wazanani, H. A. and Aref, I. A., 2014. Antibacterial substances from marine algae isolated from Jeddah coast of Red sea, Saudi Arabia. Saudi Journal of Biological Sciences, 21(1): 57–64

Amaro, H. M., Guedes, A. C. and Malcata, F. X., 2011. Science against microbial pathogens: Communicating current research and technological advances. In A.Méndez-Vilas (Ed.), Antimicrobial activities of microalgae: An invited review, pp. 1272–1280.

Beena, B. and Nair Krishnika, A., 2011. Antibacterial activity of freshwater microalga (Sc enedesmus sp.) against three bacterial strains. Journal of Bio_Science Research, 2(4): 160-165.

Chu, W. L., 2012. Biotechnological applications of microalgae. Journal of Research in Medical Sciences, 6: 24–37.

Dantas, D. M., Cahú, T. B., Oliveira, C. Y. B., Abadie-Guedes, R., Roberto, N. A., Santana, W. M., Gálvez, A. O., Guedes, R. C. and Bezerra, R. S., 2021. Chlorella vulgaris functional alcoholic beverage: Effect on propagation of cortical spreading depression and functional properties. Plos one, 16(8): p.e 0255996.

Dawczynski, C., Schubert, R. and Jahreis, G., 2007. Amino acids, fatty acids, and dietary fibre in eible seaweed products. Food Chem., 103: 891–899.

Danyal, A., Mubeen, U. and Malik, K. A., 2013. Investigating two native algal species to determine antibiotic susceptibility against some pathogens. Current Research Journal of Biological Sciences, 5: 70–74.

Fleurence, J., 1999. Seaweed proteins: Biochemical, nutritional aspects and potential uses. Trends Food Science Technology, 10: 25–28.

Ghasemi, Y., Faramarzi, M. A., Arjmand-Inalou, M., Mohagheghzadeh, A., Shokravi, S. and Morowvat, M., 2007. Side-chain cleavage and C-20 ketone reduction of hydrocortisone by a natural isolate of Chroococcus dispersus. Annals of Microbiology, 57(4): 577-581.

Guedes, C., Barbosa, A., Amaro, C. R., Pereira, H. M. and Malcata, X., 2011. Microalgal food pathogens. International Journal of Food Science and Technology, 46(4): 862–870.

Hernandez-Ledesma, B. and Herrero, M., 2014. Bioactive Compounds from Marine Foods. Chichester-UK: Wiley Blackwell.

Hejazi, M. A, Holwerda, E. and Wijffels, R. H., 2004. Milking microalga Dunaliella salina for β-carotene production in two-phase bioreactors. Biotechnology and Bioengineering, 85: 475–481.

Ishaq, A. G., Matias-Peralta, H. M. and Basri, H., 2016. Bioactive compounds from green microalga – scenedesmus and its potential applications: A brief review.Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science, 39(1): 1–16.

John, D. M., Whitton, B. A. and Brook, A. J., 2002. The Freshwater Algal Flora of the British Isles: An Identification Guide to Freshwater and Terrestrial Algae. The Natural History Museum. Cambridge. pp.702.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]

Karapanagiotidis, I. T., Metsoviti, M. N., Gkalogianni, E. Z., Psofakis, P., Asimaki, A., Katsoulas, N., Papapolymerou, G. and Zarkadas, I., 2022. The effects of replacing fishmeal by Chlorella vulgaris and fish oil by Schizochytrium sp. and Microchloropsis gaditana blend on growth performance, feed efficiency, muscle fatty acid composition and liver histology of gilthead seabream (Sparus aurata). *Aquaculture*, 561: 738709.

Little, S. M., Senhorinho, G. N., Saleh, M., Basiliko, N. and Scott, J. A., 2021. Antibacterial compounds in green microalgae from extreme environments: a review. Algae, 36(1): 61-72.

Mincer, T. J., Jensen, P. R.., Kauffman, C. A., Fenical, W., 2002. Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. Applied and Environmental Microbiology, 68: 5005–5011.

Najdenski, H. M., Gigova, L. G., Iliev, I. I., Pilarski, P. S., Lukavsky, J., Tsvetkova, I. V. and Kussovski, V. K., 2013. Antibacterial and antifungal activities of selected microalgae and cyanobacteria. International Journal of Food Science and Technology, 48: 1533–1540.

Ortiz, J., Romero, N.,Robert, P., Araya, J., Lopez-Hernández, J., Bozzo, C., Navarretea, E., Osorioa, A. and Riosa, A., 2006. Dietary fiber, amino acid, fatty acid and tocopherol contents of the edible seaweeds Ulva lactuca and Durvillaea antarctica. Food Chem, 99: 98–104.

Pradhan, B., Patra, S., Dash, S. R., Nayak, R., Behera, C. and Jena, M., 2021. Evaluation of the anti-bacterial activity of methanolic extract of Chlorella vulgaris Beyerinck [Beijerinck] with special reference to antioxidant modulation. Future Journal of Pharmaceutical Sciences, 7(1): 1-11.

Peymani, J., Gharaei, A., Ghaffari, M. and Taheri, A., 2014. Evaluation of antibacterial and antifungal effects of marine algae (Gracilaria arcuata) of Chabahar Coasts, Iran. Qom University of Medical Science Journal, 22 (4): 13-20.

Reis, B., Ramos-Pinto, L., Cunha, S. A., Pintado, M., da Silva, J. L., Dias, J., Conceição, L., Matos, E. and Costas, B., 2022. Chlorella vulgaris Extracts as Modulators of the Health Status and the Inflammatory Response of Gilthead Seabream Juveniles (Sparus aurata). Marine Drugs, 20(7): 407.

Richmond, A., 2004. Biological principles of mass cultivation.Handbook of micro algal culture: Biotechnology and Applied Phycology, 125-177 (53 pages)

Scaglioni, P.T. and Badiale-Furlong, E., 2017. Can microalgae act as source of preservatives in food chain. *Journal of Food Science and Engineering*, *7*(6): 283-296.

Sukhikh, S., Prosekov, A., Ivanova, S., Maslennikov, P., Andreeva, A., Budenkova, E., Kashirskikh, E., Tcibulnikova, A., Zemliakova, E., Samusev, I. and Babich, O., 2022. Identification of Metabolites with Antibacterial Activities by Analyzing the FTIR Spectra of Microalgae. Life, 12(9): 1395.

Szwarc, K., Szwarc, D. and Zieliński, M., 2020. Removal of biogenic compounds from the post-fermentation effluent in a culture of Chlorella vulgaris. Environmental Science and Pollution Research, 27(1): 111-117.

Scheffler, J., 2007. "Underwater Habitats". Illumin. 9 (4).

Tompkins, J., Deville M. M., Day J. G., Turner M. F., 1995. The culture collection of algae and protozoa. Ambleside: Institute of Freshwater Ecology;. Culture collection of algae and protozoa. Catalogue of Strains, p. 204.

Vasconcelos Fernandes T., Shrestha, R., Sui, Y., Papini, G., Zeeman, G., Vet, L. E. M., Wijffels, R. H. and Lamerz, P. P., 2015. Closing domestic nutrient cycles using microalgae. Environmental Science and Technology, 49 (20): 12450–12456.

Zielinski, D., Fraczyk, J., Debowski, M., Zielinski, M., Kaminski, Z. J., Kregiel, D., Jacob, C. and Kolesinska, B., 2020. Biological Activity of Hydrophilic Extract of Chlorella vulgaris Grown on Post-Fermentation Leachate from a Biogas Plant Supplied with Stillage and Maize Silage. Molecules (Basel, Switzerland), 25(8): 1790.

Zelitch, I., 1971. Photosynthesis, Photorespiration and Plant Productivity. Academic Press. p. 275.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]