

تأثیر دما، pH، نمک، اسانس برگ نارنج و بسته‌بندی اتمسفر تغییر یافته در کنترل باکتری *Salmonella typhimurium* در برگر کپور نقره‌ای

لاله رومیانی^{*}، مهرنوش تدینی^۲

*l.roomiani@yahoo.com

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

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

تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۹۷

تاریخ پذیرش: تیر ۱۳۹۸

چکیده

این پژوهش با هدف تأثیر دما، pH، نمک، اسانس نارنج (*Citrus aurantium* L.) و بسته‌بندی اتمسفر تغییر یافته (۵۰ درصد دی اکسید کربن، ۴۵ درصد نیتروژن و ۵ درصد اکسیژن) در کنترل باکتری *Salmonella typhimurium* در برگر کپور نقره‌ای در سال ۹۷-۱۳۹۶ انجام شد. در این پژوهش pH در سطوح ۵/۵، ۶ و ۷/۵، دما در سه سطح ۴، ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد، نمک در سه سطح ۰، ۱/۵ و ۳ درصد و اسانس نارنج در سطوح ۰، ۰/۰۲۵ و ۰/۰۵ درصد در نظر گرفته شد. روند رشد این گونه در برگر در pH ۵/۵، ۶ و ۷/۵ در دماهای ۴، ۳۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد طی ۱۲ روز نگهداری افزایش یافت. در pH ۷/۵ با نمک ۱/۵ درصد و ۳ درصد و اسانس نارنج ۰/۰۲۵ درصد و ۰/۰۵ درصد در دماهای ۴، ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد در روزهای ششم، هشتم، دهم و دوازدهم رشد باکتری *S. typhimurium* افزایش یافت. همچنین در pH ۶ با نمک ۱/۵ درصد و اسانس نارنج ۰/۰۲۵ درصد در روزهای هشتم، دهم و دوازدهم در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد رشد این باکتری زیاد بود. در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در pH ۵/۵ با نمک ۱/۵ درصد و اسانس نارنج ۰/۰۵ درصد، pH ۵/۵ با نمک ۳ درصد و اسانس نارنج ۰/۰۵ درصد، pH ۵/۵ با نمک ۳ درصد و اسانس نارنج ۰/۰۲۵ درصد در روزهای هشتم، دهم و دوازدهم عدم رشد باکتری *S. typhimurium* مشاهده گردید. اسانس گیاه نارنج در سطح ۰/۰۵ درصد در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، نمک ۳ درصد و pH ۵/۵ قدرت کنترل رشد باکتری *S. typhimurium* را در برگر ماهی داشت.

واژگان کلیدی: برگر ماهی، اتمسفر تغییر یافته، اسانس نارنج (*Citrus aurantium* L.)، *Salmonella typhimurium*

*نویسنده مسئول

مقدمه

ماهی یکی از فسادپذیرترین مواد غذایی بشمار می‌آید و از گوشت قرمز قابلیت فسادپذیری بیشتری دارد (رضوی شیرازی، ۱۳۸۰). بالا بودن میزان آب، بالا بودن میزان اسیدآمین‌های آزاد، کمتر بودن بافت‌های پیوندی، داشتن مقدار بیشتر اسیدهای چرب غیراشباع و فعالیت‌های آنزیمی بیشتر، از جمله عوامل موثر در فساد سریع‌تر ماهی در مقایسه با سایر غذاهای گوشتی است (فهیم دژبان، ۱۳۸۷). چنانچه بلافاصله پس از صید و مرگ ماهی به صورت مناسبی نگهداری آنها صورت نگیرد، به دلیل تغییرات سریع بیوشیمیایی و آنزیمی در ماهیچه‌های آنها و فعالیت‌های میکروبی سرعت تجزیه و فساد در آنها گسترش می‌یابد (Rohbein & Oehlenschlager, 2009; Van Haute et al., 2016).

بیماری‌های شایع از طریق غذا حدود ۲۵۰ نوع می‌باشند. باکتری‌ها مسئول ۳۰ درصد بیماری‌های منتقله از طریق غذا هستند و ۷۲ درصد آنها منجر به مرگ می‌شوند. لیستریا مونوسیتوژنز (۲۸ درصد)، اشریشیاکلای (۳ درصد) و گونه‌های سالمونلا (۳۱ درصد) مسئول بیشترین تعداد بیماری‌های مذکور هستند (Ross et al., 2000; Meira et al., 2017). در سراسر جهان، بیماری‌های قابل انتقال از طریق غذا و بویژه بیماری‌های دستگاه گوارش مهم‌ترین عوامل مرگ و میر بشمار می‌آیند (Rozman & Jersek, 2009; Cai et al., 2015). در سال‌های اخیر، اپیدمیولوژی بیماری‌های انتقالی از طریق غذا به صورت عوامل عفونی جدیدی که ظهور می‌کنند، تغییر یافته است. بیماری‌های نوظهور^۱ آن دسته از بیماری‌هایی هستند که در دهه‌های اخیر یا در آینده نزدیک شیوع آنها افزایش می‌یابد (Sobrinho-Lopez & Martin-Belloso, 2008).

هرچند باکتری‌های بیماری‌زای ذاتی در محصولات شیلاتی تازه در سطوح کم یافت می‌شوند و زمانی که این محصولات قبل از مصرف پخته شوند و آلودگی اتفاق نیفتد، خطرات امنیت غذایی ناچیز می‌شوند، اما احتمال رشد سطوح بالای چنین باکتری‌هایی می‌تواند سبب بیماری در انسان شود (Tauxe, 2002). افزایش شیوع بیماری‌های منتقل شده از طریق غذا، سبب افزایش توجه و نگرانی در مورد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و فاسدکننده غذا شد. رشد میکروب‌ها در ماهیان تازه

می‌تواند بهداشت انسان‌ها را به مخاطره اندازد (WHO, 2002). فاکتور مهمی که به ارگانیسم‌های بیماری‌زای منتقله از طریق غذا نسبت داده می‌شود، رشد آنها در دمای یخچال است (Winkler et al., 2010). غذاهای دریایی یکی از ۴ گروه عمده مواد غذایی هستند که مسئول خطرات عمده بیماری‌های انتقال یافته از طریق مواد غذایی می‌باشند (Liu et al., 2016).

به طور کلی، نگهدارنده‌ها و ضد میکروب‌های طبیعی فرصت بسیار مطلوبی برای ترکیب با سایر سیستم‌های نگهدارنده را بوجود آورده‌اند. برای مثال، اسانس پونه کوهی در ترکیب با بسته‌بندی اتمسفر تغییر یافته، تولید یک سیستم مانع‌تری ترکیبی در نگهداری گوشت و طولانی شدن ماندگاری آن در مقایسه با بسته‌بندی به تنهایی کرده است (Zhou et al., 2010). این روش زمانی موثرتر است که ترکیبات ضد میکروبی طبیعی با نگهدارنده‌های غذایی مرسوم برای کاهش استفاده از مواد شیمیایی در واکنش به تقاضای مصرف‌کننده‌ها مورد استفاده قرار گیرند. اثر ترکیبات مختلف اسانس‌ها یا اجزای فعال آنها با سایر مواد ضد میکروبی مورد بررسی قرار گرفته است (Vernam & Evans, 1991).

گیاهان با پتانسیل دارویی و ارزش‌های درمانی، به طور موفقیت‌آمیزی برای بیماری‌های منتقل شده از طریق غذا بکار می‌روند. این پتانسیل به طور عمده به وجود ترکیبات فوتوشیمیایی (بیواکتیو) است. بعضی از مزایای استفاده از ترکیبات گیاهی شامل وابستگی کمتر به آنتی‌بیوتیک‌ها، کاهش مقاومت دارویی میکروارگانیسم‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها، کنترل آلودگی‌های ناشی از میکروارگانیسم‌های منتقله از طریق غذا، بهبود تکنولوژی‌های نگهداری غذا و تقویت سیستم ایمنی انسان می‌باشند (Zaouali et al., 2010; Hwanhlem et al., 2015). محصولات ثانویه گیاهان مانند روغن‌های فرار و فلاونوئیدها برای انجام فعالیت‌های ضد قارچ، ضد باکتری و سیتوتوکسیک به طور گسترده‌ای مورد مطالعه قرار می‌گیرند. ویژگی آنتی‌اکسیدان روغن‌های فرار گیاهان دارویی از طریق روش‌های فیزیکی - شیمیایی مورد توجه قرار گرفته است تا کاربرد آن‌ها را به عنوان نگهدارنده‌های طبیعی غذا ترویج دهند (Tajkarimi et al., 2010; Fournomiti et al., 2015).

¹ Emerging diseases

اجاق و همکاران (۱۳۹۵) کارایی اسانس پونه کوهی (*Origanum vulgare*)، مرزنجوش (*Origanum majorana*) و شوید (*Anethum graveolens*) را جهت کنترل گونه *Listeria monocytogenes* در گوشت چرخ شده کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) بررسی کردند. تأثیر اسانس زنیان (*Carum copticum*) بر رشد *Staphylococcus aureus* در سوریمی ماهی کیلکا (*Clupeonella cultriventris caspia*) نشان داد که اسانس زنیان ترکیب موثری جهت کاهش سرعت رشد *Staphylococcus aureus* و کاهش تولید انترتوکسین‌های ناشی از آن در سوریمی ماهی کیلکا می‌باشد (عزیزخانی و توریان، ۱۳۹۵). تأثیر اسانس‌های گیاهی گل میخک، زیره و زیتون بر تغییرات میکروبی فیله ماهی توربوت (*Scophthalmus maximus*) منجمد نشان داد که فیله‌های گروه شاهد نشانه‌هایی از فساد به میزان آستانه برای همه پارامترهای ارزیابی شده بود (Cai et al., 2015). Van Haute و همکاران (۲۰۱۶) تأثیرات ضد میکروبی اسانس دارچین، پونه کوهی و آویشن در ماریناد ماهی و گوشت قرمز را بررسی کردند. رشد کپک‌ها و مخمرها بوسیله اسانس دارچین مهار شد. اسانس‌های گیاهی مورد مطالعه سبب ممانعت رشد میکروبی در فرآورده‌های ماهی شد. اسانس اسطوخودوس (*Allium ascalonicum*) و زنیان (*Trachyspermum ammi*) در فیله سرخ شده قزل‌آلا (*Oncorhynchus mykiss*) توانستند به عنوان نگهدارنده‌های طبیعی برای افزایش ماندگاری محصولات شیلاتی استفاده شوند (Raeisi et al., 2016). همچنین Meira و همکاران (۲۰۱۷) توانستند با استفاده از ترکیب اسانس‌های گیاهی رشد اشیریشیاکلای در سوسپس‌های تخمیری خشک شده ماهی را کنترل کنند. ارزیابی لیستریا مونوسیتوزنز تحت بسته‌بندی اتمسفر تغییر یافته و باکتری اسیدلاکتیک در محصولات گوشتی دودی شده انجام شد و به این نتیجه رسیدند که ترکیب باکتری اسیدلاکتیک با بسته‌بندی اثر قوی بر کاهش رشد باکتری داشت (Mahgoub et al., 2019). استفاده از بسته‌بندی اتمسفر تغییر یافته و اسانس آویشن به همراه دمای سرد جهت غیرفعال کردن باکتری لیستریا مونوسیتوزنز در گوشت بوقلمون آماده مصرف مورد مطالعه قرار گرفت و ثابت شد که در دمای ۵- تا ۰- درجه

سانتی‌گراد بسته‌بندی به همراه اسانس توانست رشد باکتری را کنترل کند (Mahgoub et al., 2019). هادی زاده و همکاران (۱۳۹۳) اثر نمک سودکردن را بر زمان ماندگاری ماهی سارم دهان بزرگ مطالعه کردند و به این نتیجه رسیدند که در طول دوره آزمایش، میزان پراکسید کاهش و مقدار TVB-N افزایش یافت، ولی در مجموع نتایج آنالیز حسی امتیاز بالایی (۶/۶) را به فیله‌های نمک سود شده نسبت به تیمار شاهد (۴/۸) داد. لطیفی و همکاران (۱۳۹۸) تغییرات فیزیکوشیمیایی، میکروبی و حسی بر فیله‌های فیل ماهی دودی شده با آب نمک و سس را مورد مطالعه قرار دادند. آنها با این روش توانستند ۲۰ روز ماندگاری فیله‌ها را افزایش دهند.

اثر عصاره آویشن شیرازی بر ماندگاری فیله قزل‌آلای رنگین‌کمان شور و بسته‌بندی شده در خلاء در شرایط یخچال مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد عصاره در ترکیب با بسته‌بندی توانست ۵ روز ماندگاری را نسبت به تیمار بدون عصاره افزایش دهد (شعبانپور و همکاران، ۱۳۹۰). در گوشت‌های بسته‌بندی شده فاکتورهای موثر و ضروری در رفتار رشد باکتری لیستریا مونوسیتوزنز دما، pH، نوع بافت (کم‌چرب یا پرچرب) می‌باشند (Grau & Vanderlinde, 1990a, b). در این مطالعه سعی بر آن شد که با توجه به فاکتورهای موثر در رشد باکتری و استفاده از راه‌حل‌های مناسب برای کنترل آن مانند بسته‌بندی اتمسفر تغییر یافته در ترکیب با اسانس بتوان ماندگاری و ایمنی محصولات شیلاتی را افزایش داد. از اینرو، این تحقیق با هدف تأثیر دما، pH، نمک، اسانس برگ نارنج و بسته‌بندی اتمسفر تغییر یافته در کنترل باکتری *Salmonella typhimurium* در برگر کپور نقره‌ای انجام شد.

روش کار

نمونه‌های برگ نارنج در سال ۹۷-۹۶ از استان خوزستان شهرستان دزفول جمع‌آوری و توسط پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی تایید شدند. به منظور استخراج اسانس برگ نارنج، بخش‌های خشک شده گیاه کاملاً آسیاب و با استفاده از یک دستگاه کلونجر (مدل ۱۰-۸۵۰۰ ساخت ایران) به مدت ۳ ساعت روغن فرار آن به روش تقطیر توسط آب استخراج گردید. پس از آبیگری توسط سولفات سدیم خشک، تا هنگام تعیین خواص ضد باکتریایی و همچنین تشخیص و تعیین ترکیب‌های

تشکیل دهنده، اسانس در ظروف شیشه‌ای تیره و در یخچال نگهداری شد (Sparkman, 2005). جهت سنجش و شناسایی ترکیبات اسانس برگ نارنج از دستگاه کروماتوگراف گازی (مدل Agilent-6890 ساخت شرکت Agilent آمریکا)، مجهز به درجه تزریق کاپیلاری، ستون کاپیلاری ویژه تجزیه اسانس‌ها و روغن‌ها، دتکتور یونش شعله‌ای استفاده گردید. دمای آشکارساز و محل تزریق بترتیب بر ۱۶۰ و ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. ۱ میکرولیتر از نمونه اسانس با استفاده از سرنگ میکرولیتری به دستگاه کروماتوگراف تزریق شد. دمای اولیه ستون روی ۱۶۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم گردید. بعد از مدت ۱۰ دقیقه، دمای ستون با سرعت ۲ درجه سانتی‌گراد در دقیقه به دمای ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد رسانده شد و به مدت ۷۵ دقیقه دما در این درجه باقی ماند. در این روش از گاز هلیوم با خلوص ۹۹/۹۹ درصد به عنوان گاز حامل و گاز هیدروژن به عنوان سوخت، ازت با خلوص ۹۹/۹۹ درصد به عنوان گاز کمکی و هوای خشک استفاده شد. از مقایسه زمان بازداری کروماتوگرام‌های نمونه مجهول با کروماتوگرام‌های بدست آمده از محلول استاندارد اسانس‌های موجود در برگ گیاه نارنج شناسایی شدند و نتایج به صورت درصد گزارش گردید (Mileski et al., 2014).

در این پژوهش انتخاب تیمارها بر اساس تجربیات نتایج مطالعات گذشته بود. pH در سطوح ۵/۵، ۶ و ۷/۵، دما در سه سطح ۲۵، ۳۷ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد، نمک در سه سطح ۰، ۱/۵ و ۳ درصد و اسانس نارنج در سطوح ۰، ۰/۲۵ و ۰/۵۰ درصد در برگر کپور نقره‌ای در نظر گرفته شد. برای تهیه برگر، پس از تهیه ماهیان، قطع سر و تخلیه امعاء و احشاء انجام و شستشوی آنها چندین بار صورت گرفت. گوشت ماهی با استفاده از دستگاه استخوان‌گیر (مدل s1000 ساخت ایران)، از پوست و استخوان جدا شد. برای کاهش بو و طعم، گوشت ماهی با محلول آب نمک ۰/۳ درصد سرد به نسبت ۴:۱ (چهار قسمت آب و یک قسمت ماهی) شستشو گردید. فیله ماهی با دستگاه چرخ گوشت با منافذی به قطر ۳ میلی‌متر چرخ شد. برای تولید این محصول خمیر ماهی را با مواد افزودنی لازم در دستگاه برش یا مخلوط‌کن مخلوط نموده، سپس خمیر فرآوری شده به شکل گرد خارج شد. ضخامت برگر معمولاً در حدود نیم سانتی‌متر و قطر آن کمتر از ۱۰ سانتی‌متر بدست آمد. سپس با استفاده از

دستگاه قالب‌زنی دستی به ضخامت ۱ سانتی‌متر و قطر ۸ سانتی‌متر برگرها تهیه شدند. در ترکیب تمامی برگرها ۷۵ گرم گوشت ماهی، ۶ گرم پیاز، ۰/۱ گرم پودر سیر، ۲ گرم سفیده تخم‌مرغ، ۰/۵ گرم روغن، ۵ گرم سویا، ۱/۵ یا ۳ گرم نمک و ادویه، ۳/۲۵ گرم رب گوجه فرنگی، ۰/۱۵ گرم آبلیمو و ۶/۵ گرم پودر نان استفاده شد (علیزاده و رومیانی، ۱۳۹۶). برگرها به مدت ۱ دقیقه در دمای اتاق در محلول‌های اسانس گیاه نارنج غوطه‌ور شدند. سپس آنها را از محلول خارج کرده و به مدت ۳۰ ثانیه اجازه داده شد تا آبچک شوند و بعد از آن به مدت ۳۰ ثانیه در محلول ۲ درصد کلرید کلسیم در دمای اتاق غوطه‌ور شدند (Rojas-Grau et al., 2007). جهت بسته‌بندی از روش بسته‌بندی اتمسفر تغییر یافته (۵۰ درصد دی‌اکسیدکربن، ۴۵ درصد نیتروژن و ۵ درصد اکسیژن) توسط دستگاه بسته‌بندی هنکلمن مدل A200 ساخت کشور هلند با ترکیب گازی مشخص شده انجام شد. ظروف بسته‌بندی ۵ لایه بوده که شامل ۲ لایه پلی‌اتیلن، دو لایه پلی‌آمید و ۱ لایه چسب با ضخامت ۸۰ میکرون بودند. برای سنجش و کنترل pH مقدار ۵ گرم از هر یک از نمونه‌ها پس از آماده شدن به همراه ۴۵ میلی لیتر آب مقطر در یک بشر ۲۵۰ میلی لیتری توسط همزن برقی به طور کامل هموژن گردید و سپس pH نمونه‌ها با دستگاه pH متر دیجیتالی مدل 713 Metrohm اندازه‌گیری شد (Fan et al., 2009). نمونه‌های برگر برای کنترل دما در دستگاه اتوکلاو در سه دمای ۴، ۲۵ و ۲۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (پاسبانی و امیری، ۱۳۹۶). سویه استاندارد و لیوفیلیزه باکتری سالمونلا تیفی‌موریوم از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شدند. محیط کشت افتراقی سالمونلا تیفی‌موریوم TSI (Triple Sugar Iron Agar) بود. آمپول لیوفیلیزه باکتری ابتدا در شرایط استریل باز و سپس به محیط کشت مایع TSB انتقال و به مدت ۴۸ ساعت در ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس محیط کشت حاوی باکتری به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی با محلول رینگر جایگزین گردید. به منظور جداسازی کامل محیط کشت از باکتری محلول حاصل دوباره به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. تعداد باکتری‌ها در مایع زیرین توسط روش کدورت‌سنجی در طول موج ۵۷۰ نانومتر بدست آمد بطوریکه جذب نوری ۰/۱-۰/۰۸ تقریباً معادل 1×10^4 باکتری در هر میلی‌لیتر در نظر گرفته شد. به نمونه‌های

نتایج

ترکیبات تشکیل دهنده اسانس برگ گیاه نارنج (*Citrus aurantium*) در جدول ۱ معرفی شده‌اند. بررسی رشد باکتری *Salmonella typhimurium* در برگ ماهی تحت تأثیر pH، نمک، دما و اسانس برگ نارنج در جدول ۲ ارائه شده است. مقادیر چولگی و کشیدگی و نتایج حاصل از آزمون کولموگراف-اسمیرنف نشان داد که داده‌های رشد باکتری *S. typhimurium* در برگ ماهی نرمال بودند. در نمونه‌های برگ با ۱/۵ درصد نمک در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۰/۰۲۵ Log cfu/g اسانس برگ نارنج و pH=۵/۵ در روز دوازدهم تعداد شد. در روز دهم در pH ۶ و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، Log cfu/g ۷/۰۹±۰/۰۸ بود. در روزهای صفر، دوم و چهارم در تمامی نمونه‌های برگ در سطوح مختلف اسانس نارنج (۰/۰۲۵ و ۰/۰۵ درصد)، دما (۴، ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد)، نمک (۱/۵ و ۳ درصد) و pH (۵/۵، ۶ و ۷/۵) سالمونلا تیفی‌موریوم شمارش شد. در نمونه‌های برگ با ۳ درصد نمک در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۰/۰۲۵ درصد اسانس برگ نارنج و pH ۶ در روز دوازدهم Log cfu/g ۶/۸۴±۰/۵۴ مشاهده شد. در روز صفر بیشترین باکتری شمارش شده در pH ۵/۵ با ۱/۵ درصد نمک، ۰/۰۲۵ درصد اسانس برگ نارنج در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد Log cfu/g ۲/۳۴±۰/۰۲۲ بود. در روز دوم در pH ۷/۵ با ۱/۵ درصد نمک، ۰/۰۲۵ درصد اسانس برگ نارنج در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد Log cfu/g ۶/۱۶±۰/۱۵ بود. تعداد باکتری سالمونلا تیفی‌موریوم شمارش شده در pH ۵/۵، ۶ و ۷/۵ با غلظت ۱/۵ و ۳ درصد نمک و مقادیر ۰/۰۲۵ و ۰/۰۵ درصد اسانس برگ نارنج در روزهای ۰، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰ و ۱۲ اختلاف معنی‌داری داشت ($P<0.05$)، اما تعداد باکتری در روز ۰ در pH ۵/۵، ۶ و ۷/۵ با غلظت ۱/۵ و ۳ درصد نمک و مقادیر ۰/۰۲۵ و ۰/۰۵ درصد اسانس برگ نارنج اختلاف معنی‌داری نداشت ($p>0.05$) (جدول ۳).

مورد نظر از محصولات میزان 1×10^4 CFU/g از باکتری مورد نظر تلقیح شد. برای تعیین حداقل غلظت مهار اسانس از روش براث میکروداپلیشن در پلیت‌های میکروتیتر ۹۶ چاهکی با حجم ۳۰۰ میکرولیتری استریل (اکستراژن، امریکا) استفاده شد. در هر چاهک ۱۶۰ میکرولیتر محیط آگوشت قلب و مغز استریل، ۲۰ میکرولیتر از هر کدام از رقت‌های متوالی اسانس مورد مطالعه و ۲۰ میکرولیتر کشت باکتریایی اضافه گردید. سپس پلیت‌های میکرولیتر به مدت ۳۰ ثانیه با دور ۲۵۰ rpm برای مخلوط شدن در همزن قرار داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در انکوباتور، به منظور تعیین حداقل غلظت مهاری، چاهک‌ها برای وجود کدورت به طریق چشمی بررسی و حداقل غلظتی که ایجاد حالت عدم رشد یا عدم کدورت مشهود با گروه کنترل به عنوان غلظت مهاری حداقل تعیین گردید. سپس ۲۰ میکرولیتر از نمونه در محیط آگار قلب و مغز، کشت داده و پس از طی ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس عدم رشد تایید شد. پس از تعیین حداقل غلظت مهاری اسانس، دو غلظت پایین‌تر از آن برای بررسی اثر اسانس گیاه نارنج بر رشد باکتری در دما، pH و غلظت‌های مختلف نمک مورد بررسی قرار گرفت (Hashemi et al., 2013). برای شمارش باکتری از محتویات هر یک از لوله‌های تهیه رقت مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر برداشته و در سطح دو پلت بررسی شدند. به منظور ارزیابی رشد باکتری‌ها شمارش کلونی به روش کشت سطحی در محیط آگار انجام شد. در این مطالعه از شاخص DP استفاده گردید.

$$\text{Log DP} = \log N / N_0 = \log (N) - \log (N_0)$$

در این پژوهش همه آزمایش‌ها با ۴ تکرار انجام شد. نتایج حاصل از این تحقیق با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS20 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. میانگین داده‌ها به منظور مقایسه اختلاف معنی‌دار با ضریب اطمینان ۹۵ درصد ($P=0.05$) با استفاده از آنالیز واریانس چندطرفه (ANOVA) و آزمون دانکن (Duncan test) انجام شد. نرمال بودن داده‌ها به کمک آزمون کولموگراف - اسمیرنف بررسی شدند. همچنین جهت رسم جداول و نمودارها از نرم‌افزار Excel 2007 استفاده گردید.

جدول ۱: ترکیبات تشکیل دهنده اسانس برگ نارنج (*Citrus aurantium*)Table 1: Compounds of leaf of citrus essential oil (*Citrus aurantium*)

ترکیبات	درصد	زمان جداسازی (دقیقه)
2-BETA.-PINENE Bicyclo[3.1.1]heptane, 6,6-dimethyl-2-methylene-	۰/۴۹۲	۸/۴۸
beta.-Myrcene 1,6-Octadiene, 7-methyl-3-methylene- (CAS) Myrcene	۲/۰۳۲	۹
Ethyl 2-(N-Benzylamino)-4-chloro-3,3-dimethylbutanoate	۰/۳۰۴	۹/۶۱
dl-Limonene Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethenyl)- (CAS) Nesol	۰/۶۲۹	۱۰/۲۶
Cis-Ocimene 1,3,7-Octatriene, 3,7-Dimethyl-, (E)- (CAS)	۰/۹۸۵	۱۰/۶۳
1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl-, (E)- (CAS).BETA. OCIMENE Y (E)-Ocimene	۲/۳۲۴	۱۰/۹۹
Alpha.-Terpinolene Cyclohexene, 1-Methyl-4-(1-Methylethylidene)	۰/۶۸۹	۱۲/۳۷
DELTA.3-Carene Bicyclo[4.1.0]hept-3-ene, 3,7,7-trimethyl- (CAS)	۳۴/۶۸۸	۱۳/۰۲
Benzeneethanamine PHenethylamine.beta.-Aminoethylbenzene	۰/۱۱۵	۱۳/۱۰
1-Isopropylidene-3-methyl-3-vinylcyclobutane	۰/۰۸۹	۱۵/۵۸
3-Cyclohexene-1-methanol, .alpHa.,.alpHa.,4-trimethyl-, (S)- (CAS) Terpeneol	۷/۵۳۰	۱۶/۱۴
DELTA.3-Carene Bicyclo[4.1.0]hept-3-ene, 3,7,7-trimethyl- (CAS)	۱/۶۰۷	۱۷/۴۰
DELTA.3-Carene Bicyclo[4.1.0]hept-3-ene, 3,7,7-trimethyl- (CAS)	۱۴/۷۵۷	۱۸/۳۳
2-Methoxy-4-vinylpHenol PHenol, 4-ethenyl-2-methoxy- p-Vinylguaicol	۱/۸۲۲	۲۰/۳۴
DELTA.3-Carene Bicyclo[4.1.0]hept-3-ene, 3,7,7-trimethyl- (CAS)	۲/۲۲۲	۲۱/۸۹
DELTA.3-Carene Bicyclo[4.1.0]hept-3-ene, 3,7,7-trimethyl- (CAS)	۴/۱۸۴	۲۲/۵۳
CaryopHyllene.beta.-CaryopHyllen.beta.-CaryopHyllene	۴/۵۸۴	۲۳/۶۵
1,4,7,-Cycloundecatriene, 1,5,9,9-tetramethyl-, Z,Z,Z	۰/۴۵۲	۲۴/۷۱
Trans.-Beta.-Farnesene (E)-.Beta.-Farnesene Beta-Farnesene	۰/۱۳۳	۲۴/۷۹
Bicyclogermacrene -Lepidozene	۱/۸۲۳	۲۶/۰۴
Alpha.-Muurolene.Alpha.-Muurolen Alpha-Muurolene	۰/۰۸۵	۲۶/۱۵
Beta.-Cadinene (-).Beta.-Cadinene (-)Beta-CadineneCadinene	۰/۱۹۰	۲۶/۸۳
Ethyl N-allyl-N-pHenylcarbamate	۰/۱۳۱	۲۸/۰۴
Delta.-Cadinene (Cas) (+)-.Delta.-Cadinene Cadina-1(10),4-Diene (Cas)	۰/۱۴۱	۲۸/۴۹
9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, methyl ester Linoleic acid, methyl ester	۰/۵۴۹	۳۰/۶۹
9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester Oleic acid, methyl ester Emery	۰/۶۶۰	۳۲
2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl- Hexahydrofarnesyl acetone	۰/۴۰۶	۳۲/۴۱
1-Heptadecene Hexahydroaplotaxene	۰/۵۸۷	۳۵/۶۲
NeopHytdiene 7,11,15-Trimethyl,3-Methylene-1-Hexadecene	۵/۷۳۰	۳۸/۸۱
Tetracosane (CAS) n-Tetracosane n - tetracosane	۰/۳۴۳	۴۲/۵۳
2,4,6-TripHenyl-1-hexene	۰/۱۴۴	۴۶/۳۷
1,2-Benzenedicarboxylic acid, diisooctyl ester DiisooctylpHthalate DIOP	۴/۳۶۱	۴۷/۰۳
Cyclopropaneoctanal, 2-octyl- 8-(2-Octylcyclopropyl)octanal	۰/۰۵۷	۴۷/۲۰
Pentacosane (CAS) n-Pentacosane n - pentacosane n - pentacosanene	۰/۴۷۹	۴۷/۴۵
1,2-Benzenedicarboxylic acid, mono(2-ethylhexyl) ester Mehp	۱/۸۱۶	۴۷/۷۴
2,15-Hexadecanedione	۰/۳۰۲	۴۸/۲۳
Heneicosane (CAS) n-HeneicosaneHenicosane n - heneicosanene	۰/۴۸۰	۴۸/۵۱
IsopHthalic acid, octyl 3-pentyl ester	۰/۱۹۴	۴۸/۶۵
Eicosane (CAS) n-EicosaneIcosane n - eicosane n - icosane	۰/۳۴۳	۴۹/۳۹
Octacosane (CAS) n-Octacosane n - octacosane n - octacosanene	۰/۳۳۷	۴۹/۴۹
Squalene 2,6,10,14,18,22-Tetracosahexaene, 2,6,10,15,19,23-hexamethyl	۰/۴۲۳	۵۰/۴۲
HC 20-511 Ketotifen Hc20-511	۰/۲۱۲	۵۰/۷۴
Nonacosane n-Nonacosane	۰/۳۰۷	۵۰/۹۲

جدول ۲: پارامترهای آماری رشد *Salmonella typhimurium* (Log cfu/g) تحت تاثیر pH، نمک، دما و اسانس برگ نارنج در برگر ماهی طی ۱۲ روز نگهداری

Table 2: Statistical parameters of *Salmonella typhimurium* (Log cfu/g) under the influence of pH, salt, temperature and citrus essential oil in fish burger during 12 days of storage

pH	نمک (%)	اسانس نارنج (%)	دما (°C)	میانگین	انحراف معیار	خطای استاندارد
			۴	۴/۰۳	۱/۵۳	۰/۳۸
۵/۵	۱/۵	۰/۰۲۵	۲۵	۴/۵۵	۱/۶۲	۰/۵۶
			۳۷	۵/۱۲	۱/۲۷	۰/۲۸
			۴	۳/۹۰	۱/۲۵	۰/۲۹
۶	۱/۵	۰/۰۲۵	۲۵	۴/۱۲	۱/۴۰	۰/۴۸
			۳۷	۴/۴۹	۱/۸۹	۰/۷۰
			۴	۴/۵۱	۱/۲۳	۰/۷۸
۷/۵	۱/۵	۰/۰۲۵	۲۵	۵/۱۰	۱/۴۸	۰/۴۹
			۳۷	۵/۳۱	۱/۵۰	۰/۵۲
			۴	۳/۴۵	۱/۷۰	۰/۴۰
۵/۵	۱/۵	۰/۰۵	۲۵	۳/۹۱	۱/۹۸	۰/۳۲
			۳۷	۵/۳۳	۱/۶۳	۰/۱۸
			۴	۳/۵۴	۱/۲۸	۰/۶۳
۶	۱/۵	۰/۰۵	۲۵	۴/۰۹	۱/۷۰	۰/۴۶
			۳۷	۴/۷۴	۱/۴۰	۰/۴۸
			۴	۳/۸۱	۱/۳۱	۰/۶۶
۷/۵	۱/۵	۰/۰۵	۲۵	۴/۲۹	۱/۴۹	۰/۵۶
			۳۷	۵/۱۷	۱/۲۵	۰/۷۲
			۴	۳/۴۲	۱/۳۷	۰/۶۰
۵/۵	۳	۰/۰۲۵	۲۵	۴/۲۳	۱/۶۰	۰/۶۳
			۳۷	۴/۸۶	۱/۷۲	۰/۳۳
			۴	۳/۶۴	۱/۶۰	۰/۳۱
۶	۳	۰/۰۲۵	۲۵	۴/۶۶	۱/۴۱	۰/۵۵
			۳۷	۵/۲۴	۱/۷۰	۰/۳۲
			۴	۴/۰۶	۱/۰۷	۰/۱۴
۷/۵	۳	۰/۰۲۵	۲۵	۴/۶۹	۱/۹۵	۰/۱۷
			۳۷	۶/۰۸	۱/۲۴	۰/۴۷
			۴	۳/۰۳	۱/۳۵	۰/۵۵
۵/۵	۳	۰/۰۵	۲۵	۴/۶۲	۱/۶۸	۰/۷۷
			۳۷	۵/۱۲	۱/۹۵	۰/۱۹
			۴	۴/۰۴	۱/۶۷	۰/۵۶
۶	۳	۰/۰۵	۲۵	۴/۴۴	۱/۴۱	۰/۴۹
			۳۷	۵/۱۱	۱/۲۲	۰/۳۵
			۴	۳/۶۴	۱/۵۰	۰/۳۹
۷/۵	۳	۰/۰۵	۲۵	۴/۲۰	۱/۲۶	۰/۴۰
			۳۷	۵/۰۴	۱/۶۹	۰/۲۹

جدول ۳: اثر pH، نمک، اسانس برگ نارنج و دما بر رشد *Salmonella typhimurium* (Log cfu/g) در برگر ماهی طی ۱۲ روز نگهداری (mean±SD)

Table 3: Effect of pH, salt, citrus essential oil and temperature on *Salmonella typhimurium* (Log cfu/g) in fish burger during 12 days of storage (mean±SD)

pH	نمک (درصد)	اسانس نارنج (درصد)	دما (درجه سانتی‌گراد)	۰	۲	۴	۶	۸	۱۰	۱۲
۵/۵	۱/۵	۰/۰۲۵	۴	۱/۴۳±۰/۱۹ ^a	۴/۷۳±۰/۰۷ ^b	۴/۰۳±۰/۰۶ ^b	۴/۴۴±۰/۰۹ ^b	۵/۰۹±۰/۰۸ ^c	۵/۴۰±۰/۰۷ ^c	۵/۷۹±۰/۰۱ ^c
۶	۱/۵	۰/۰۲۵	۲۵	۲/۲۷±۰/۱۷ ^a	۴/۱۳±۰/۱۱ ^b	۴/۵۵±۰/۰۳ ^b	۵/۳۳±۰/۰۱ ^c	۵/۶۳±۰/۰۹ ^c	۶/۱۳±۰/۰۱ ^c	۶/۵۵±۰/۰۷ ^c
۷/۵	۱/۵	۰/۰۲۵	۳۷	۲/۳۴±۰/۲۳ ^a	۴/۴۹±۰/۱۲ ^b	۵/۱۲±۰/۱۱ ^b	۵/۷۲±۰/۰۵ ^b	۶/۱۰±۰/۰۱ ^c	۶/۵۴±۰/۰۸ ^c	۷/۱۸±۰/۰۳ ^d
۵/۵	۱/۵	۰/۰۲۵	۴	۱/۴۴±۰/۲۱ ^a	۳/۹۰±۰/۰۴ ^b	۴/۶۶±۰/۱۸ ^b	۵/۱۷±۰/۰۵ ^c	۶/۲۳±۰/۰۳ ^c	۷/۰۹±۰/۰۸ ^d	رشد زیاد
۶	۱/۵	۰/۰۲۵	۲۵	۱/۸۷±۰/۱۳ ^a	۴/۱۲±۰/۰۱ ^b	۴/۹۵±۰/۰۵ ^b	۵/۷۸±۰/۱۵ ^c	رشد زیاد	رشد زیاد	رشد زیاد
۷/۵	۱/۵	۰/۰۲۵	۳۷	۱/۹۰±۰/۲۵ ^a	۴/۴۹±۰/۱۴ ^b	۵/۵۱±۰/۱۱ ^c	۶/۱۴±۰/۱۲ ^c	رشد زیاد	رشد زیاد	رشد زیاد
۵/۵	۱/۵	۰/۰۲۵	۴	۱/۸۲±۰/۲۰ ^a	۴/۵۱±۰/۲۳ ^b	۴/۸۳±۰/۰۶ ^b	رشد زیاد	رشد زیاد	رشد زیاد	رشد زیاد
۶	۱/۵	۰/۰۲۵	۲۵	۱/۵۳±۰/۰۹ ^a	۵/۱۰±۰/۰۱ ^b	۵/۴۵±۰/۱۵ ^b	رشد زیاد	رشد زیاد	رشد زیاد	رشد زیاد
۷/۵	۱/۵	۰/۰۲۵	۳۷	۱/۹۶±۰/۱۵ ^a	۵/۳۱±۰/۰۸ ^b	۶/۱۶±۰/۱۵ ^b	رشد زیاد	رشد زیاد	رشد زیاد	رشد زیاد
۵/۵	۱/۵	۰/۰۵	۴	۱/۴۴±۰/۱۹ ^a	۳/۴۵±۰/۰۶ ^b	۳/۸۴±۰/۰۷ ^b	۴/۴۸±۰/۱۱ ^b	۴/۲۸±۰/۰۳ ^b	عدم رشد	عدم رشد
۶	۱/۵	۰/۰۵	۲۵	۲/۳۳±۰/۲۵ ^a	۳/۸۳±۰/۰۶ ^a	۳/۹۱±۰/۰۱ ^a	۴/۷۲±۰/۰۵ ^b	۵/۲۹±۰/۰۳ ^c	۵/۹۱±۰/۰۹ ^c	۶/۳۶±۰/۰۷ ^c
۷/۵	۱/۵	۰/۰۵	۳۷	۱/۶۵±۰/۲۰ ^a	۴/۱۳±۰/۱۱ ^b	۴/۲۲±۰/۰۷ ^b	۵/۳۳±۰/۰۹ ^c	۵/۸۳±۰/۱۳ ^c	۶/۲۲±۰/۰۵ ^c	۷/۰۳±۰/۰۶ ^d
۵/۵	۱/۵	۰/۰۵	۴	۲/۰۸±۰/۰۷ ^a	۳/۵۴±۰/۰۶ ^a	۳/۹۰±۰/۰۴ ^a	۴/۱۶±۰/۰۴ ^b	۴/۹۳±۰/۰۵ ^b	۵/۵۲±۰/۰۷ ^c	۵/۹۰±۰/۰۱ ^c
۶	۱/۵	۰/۰۵	۲۵	۱/۸۴±۰/۱۷ ^a	۳/۸۶±۰/۰۴ ^b	۴/۰۹±۰/۰۸ ^b	۴/۵۳±۰/۰۸ ^b	۵/۲۷±۰/۱۴ ^c	۵/۷۸±۰/۰۷ ^c	۶/۳۹±۰/۱۶ ^c
۷/۵	۱/۵	۰/۰۵	۳۷	۱/۶۸±۰/۲۸ ^a	۴±۰/۱۱ ^b	۴/۲۸±۰/۰۵ ^b	۴/۷۴±۰/۰۸ ^b	۵/۴۴±۰/۱۳ ^c	۶/۰۳±۰/۱۵ ^c	۶/۷۰±۰/۰۲ ^c
۵/۵	۱/۵	۰/۰۵	۴	۱/۵۱±۰/۱۱ ^a	۳/۸۱±۰/۱۲ ^b	۴/۲۴±۰/۱۳ ^b	۴/۹۳±۰/۱۵ ^b	رشد زیاد	رشد زیاد	رشد زیاد
۶	۱/۵	۰/۰۵	۲۵	۱/۹۹±۰/۱۱ ^a	۴/۲۹±۰/۰۶ ^b	۴/۹۲±۰/۰۶ ^b	۵/۵۳±۰/۰۹ ^c	رشد زیاد	رشد زیاد	رشد زیاد
۷/۵	۱/۵	۰/۰۵	۳۷	۱/۶۴±۰/۱۶ ^a	۵/۱۷±۰/۰۴ ^b	۵/۶۵±۰/۱۲ ^b	۶/۰۹±۰/۲۵ ^c	رشد زیاد	رشد زیاد	رشد زیاد
۵/۵	۳	۰/۰۲۵	۴	۲/۱۶±۰/۰۵ ^a	۳/۴۲±۰/۱۷ ^a	۳/۸۶±۰/۰۷ ^a	۴/۴۹±۰/۱۶ ^b	۴/۸۳±۰/۰۷ ^b	عدم رشد	عدم رشد
۶	۳	۰/۰۲۵	۲۵	۱/۷۰±۰/۲۵ ^a	۳/۵۹±۰/۰۷ ^b	۴/۲۳±۰/۰۷ ^b	۴/۸۶±۰/۱۱ ^b	۵/۳۰±۰/۲۴ ^c	۶/۱۱±۰/۰۱ ^c	۶/۴۰±۰/۱۴ ^c
۷/۵	۳	۰/۰۲۵	۳۷	۲/۱۲±۰/۱۱ ^a	۴/۱۱±۰/۰۱ ^b	۴/۸۶±۰/۰۴ ^b	۵/۴۶±۰/۲۳ ^c	۵/۷۴±۰/۱۴ ^c	۶/۴۴±۰/۰۱ ^c	۶/۹۳±۰/۰۶ ^c
۵/۵	۳	۰/۰۲۵	۴	۱/۵۲±۰/۰۹ ^a	۳/۶۴±۰/۰۵ ^b	۴/۲۵±۰/۰۶ ^b	۴/۷۴±۰/۰۵ ^b	۵/۱۴±۰/۰۶ ^c	۵/۷۴±۰/۰۸ ^c	۶/۱۸±۰/۰۴ ^c
۶	۳	۰/۰۲۵	۲۵	۱/۴۹±۰/۲۸ ^a	۳/۷۴±۰/۰۵ ^b	۴/۶۶±۰/۰۴ ^b	۵/۱۴±۰/۰۴ ^c	۵/۵۶±۰/۱۳ ^c	۵/۹۰±۰/۰۱ ^c	۶/۵۳±۰/۱۷ ^c
۷/۵	۳	۰/۰۲۵	۳۷	۲/۱۶±۰/۰۶ ^a	۳/۸۴±۰/۰۵ ^a	۵±۰/۱۱ ^b	۵/۲۴±۰/۰۴ ^b	۵/۸۴±۰/۰۵ ^b	۶/۳۲±۰/۰۹ ^c	۶/۸۴±۰/۰۵ ^c
۵/۵	۳	۰/۰۲۵	۴	۱/۶۱±۰/۰۸ ^a	۴/۰۶±۰/۱۱ ^b	۴/۶۵±۰/۰۷ ^b	۵/۰۹±۰/۰۸ ^c	رشد زیاد	رشد زیاد	رشد زیاد
۶	۳	۰/۰۲۵	۲۵	۱/۷۱±۰/۲۴ ^a	۴/۶۹±۰/۱۲ ^b	۵/۰۹±۰/۰۸ ^c	۵/۵۰±۰/۰۹ ^c	رشد زیاد	رشد زیاد	رشد زیاد
۷/۵	۳	۰/۰۲۵	۳۷	۱/۷۹±۰/۲۷ ^a	۵/۲۳±۰/۰۶ ^b	۶/۰۸±۰/۰۷ ^c	۶/۲۳±۰/۰۳ ^c	رشد زیاد	رشد زیاد	رشد زیاد
۵/۵	۳	۰/۰۵	۴	۱/۸۵±۰/۱۶ ^a	۳±۰/۱۳ ^b	۳/۷۳±۰/۱۰ ^b	۴/۲۷±۰/۰۶ ^b	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد
۶	۳	۰/۰۵	۲۵	۲/۰۳±۰/۰۶ ^a	۳/۳۹±۰/۱۰ ^a	۴/۰۶±۰/۱۲ ^b	۴/۶۲±۰/۰۹ ^b	۵/۱۲±۰/۱۱ ^c	۵/۶۹±۰/۱۳ ^c	۶/۲۰±۰/۰۹ ^c
۷/۵	۳	۰/۰۵	۳۷	۱/۷۷±۰/۲۰ ^a	۳/۹۲±۰/۰۶ ^b	۴/۷۷±۰/۱۹ ^b	۵/۱۲±۰/۱۱ ^c	۵/۶۵±۰/۱۳ ^c	۵/۹۳±۰/۰۶ ^c	۶/۶۶±۰/۱۱ ^c
۵/۵	۳	۰/۰۵	۴	۱/۹۹±۰/۱۳ ^a	۳/۴۲±۰/۱۰ ^b	۴/۰۴±۰/۰۶ ^b	۴/۵۶±۰/۰۶ ^b	۴/۸۹±۰/۰۸ ^b	عدم رشد	عدم رشد
۶	۳	۰/۰۵	۲۵	۱/۸۸±۰/۲۳ ^a	۳/۶۱±۰/۰۸ ^b	۴/۴۴±۰/۰۹ ^b	۴/۸۹±۰/۰۲ ^b	۵/۱۶±۰/۰۴ ^b	۵/۵۵±۰/۰۸ ^b	۶/۱۸±۰/۱۶ ^c
۷/۵	۳	۰/۰۵	۳۷	۱/۹۶±۰/۱۵ ^a	۳/۸۴±۰/۲۵ ^b	۳/۷۶±۰/۰۶ ^b	۳/۸۸±۰/۰۶ ^b	۴/۶۷±۰/۱۱ ^b	۵/۹۳±۰/۲۱ ^c	۶/۲۴±۰/۱۴ ^c
۵/۵	۳	۰/۰۵	۴	۱/۲۷±۰/۰۶ ^a	۳/۶۴±۰/۰۵ ^b	۴/۱۲±۰/۰۱ ^b	۴/۶۲±۰/۰۷ ^b	۵/۲۴±۰/۲۱ ^c	رشد زیاد	رشد زیاد
۶	۳	۰/۰۵	۲۵	۱/۴۱±۰/۲۰ ^a	۴/۲۰±۰/۲۶ ^b	۴/۴۹±۰/۰۲ ^b	۴/۸۹±۰/۰۹ ^b	۵/۴۳±۰/۱۵ ^c	رشد زیاد	رشد زیاد
۷/۵	۳	۰/۰۵	۳۷	۱/۷۷±۰/۲۰ ^a	۵/۰۴±۰/۰۶ ^b	۵/۴۰±۰/۱۹ ^b	۵/۷۲±۰/۱۵ ^b	۶/۱۷±۰/۱۵ ^c	رشد زیاد	رشد زیاد

حروف متفاوت (a, b, c, d, e, f) در هر ردیف اختلاف معنی‌دار را نشان می‌دهد (P<0.05)

بحث

روند رشد باکتری *S. typhimurium* در برگر ماهی در pH ۵/۵، ۶ و ۷/۵ در دماهای ۴، ۳۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد طی ۱۲ روز نگهداری افزایش داشت. در برگر ماهی بین تعداد *S. typhimurium* شمارش شده در pH ۵/۵، ۶ و ۷/۵ در دماهای ۴، ۳۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد و نمک ۱/۵ و ۳ درصد طی ۱۲ روز نگهداری اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($P < 0.05$). در pH ۷/۵ با نمک ۱/۵ درصد و ۳ درصد و اسانس نارنج ۰/۰۲۵ درصد و ۰/۰۵ درصد در دماهای ۴، ۳۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد در روزهای ششم، هشتم، دهم و دوازدهم رشد زیاد *S. typhimurium* مشاهده شد. همچنین در pH ۶ با نمک ۱/۵ درصد و اسانس نارنج ۰/۰۲۵ درصد در روزهای هشتم، دهم و دوازدهم در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد رشد زیاد این باکتری وجود داشت. در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در pH ۵/۵ با نمک ۱/۵ درصد و اسانس نارنج ۰/۰۵ درصد، pH ۵/۵ و ۶ با نمک ۳ درصد و اسانس نارنج ۰/۰۵ درصد، pH ۵/۵ با نمک ۳ درصد و اسانس نارنج ۰/۰۲۵ درصد در روزهای هشتم، دهم و دوازدهم عدم رشد *S. typhimurium* مشاهده شد. در نمونه‌های برگر با ۳ درصد نمک رشد *S. typhimurium* پایین‌تر از نمونه‌های با ۱/۵ درصد نمک بود. به عبارت دیگر، ۳ درصد نمک در برگر ماهی می‌تواند رشد باکتری *S. typhimurium* را محدود کند، بنابراین، با توجه به نتایج بدست آمده افزایش مقادیر نمک در نمونه‌های برگر ماهی می‌تواند از رشد میکروبی ممانعت کند. نمک با اتصال به آب آن را از اختیار میکروارگانیسم‌ها خارج می‌کند. به همین علت می‌توان از طریق افزودن نمک به ماده غذایی و در نتیجه کاهش آب فعال، اثر تخریبی باکتری‌ها را کاهش داد. نمک قادر است از طریق فشار اسمزی، رطوبت را از بافت ماهی خارج نموده و مقدار آب در دسترس را کاهش دهد که این خود نشانه کاهش فعالیت آب خواهد بود (هادی زاده و همکاران، ۱۳۹۳؛ Rodrigues et al., 2003). به عبارت دیگر، بنظر می‌رسد خروج آب رشد باکتری‌ها و فعالیت آنزیم‌ها را محدود نموده و از این طریق ماندگاری محصول را افزایش می‌دهد (سلیمانی و همکاران، ۱۳۹۱؛ Lakshmanan et al., 2002).

با توجه به نتایج بدست آمده مشاهده می‌شود که هرچه pH نمونه‌های برگر پایین‌تر باشد، رشد *S. typhimurium* محدودتر شده است. برای مثال، در pH ۵/۵ با ۰/۰۲۵ و ۰/۰۵ درصد اسانس نارنج در نمونه‌های برگر عدم رشد باکتری مشاهده شد،

اما در pH ۶ و ۷/۵ رشد بیش از معمول باکتری اتفاق افتاد. در فیله کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) به همراه اسانس آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) تغییر چندانی در میزان pH در تیمارهای مورد مطالعه و در طول روزهای مختلف نمونه‌برداری گزارش نشد. فاکتور pH بتدریج تغییر می‌کند و فاکتور مناسبی برای نشان دادن فساد گوشت نمی‌باشد (چوبکار و همکاران، ۱۳۹۱). کاهش pH ممکن است به دلیل عدم حلالیت دی‌اکسیدکربن در ماهی باشد. به عبارت دیگر، افزایش تجمع دی‌اکسیدکربن، سبب کاهش pH می‌گردد (Fan et al., 2008). نتایج برخی تحقیقات نشان داد که میزان pH در فیله قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در برخی روزها افزایش و در برخی روزها کاهش یافت (رضاییان و همکاران، ۱۳۹۳؛ Etemadi et al., 2008). افزایش pH گوشت ماهی در برخی روزهای نگهداری ممکن است به دلیل تولید ترکیبات بازی مانند آمونیاک، تری‌متیل‌آمین‌ها و سایر آمین‌های بیوژنی باشد که توسط باکتری‌های عامل فساد در ماهی تولید می‌شود (Tassou et al., 2000).

نتایج نشان داد که اسانس گیاه نارنج قدرت کنترل رشد باکتری *S. typhimurium* را داشت. بنظر می‌رسد حضور اسانس نارنج نفوذپذیری به گاز دی‌اکسیدکربن را کاهش داده و متعاقباً سبب افزایش غلظت گاز دی‌اکسیدکربن در بسته شده است که این افزایش غلظت گاز با کاهش pH همراه است که بنوبه خود می‌تواند بر کاهش فلور میکروبی گوشت نیز موثر باشد (Majnooni et al., 2012). اسانس‌های گیاهی به عنوان ترکیبات ضد میکروبی یکی از منابع بالقوه بازدارنده رشد میکروب می‌باشند (چوبکار و همکاران، ۱۳۹۱؛ Kirbaslar et al., 2009). تحقیقات متعدد نشان می‌دهد برخی ترکیبات استخراج شده از اسانس پوست و برگ نارنج دارای فعالیت ضد اکسیدان، ضد میکروب، ضد قارچ، ضد انگل و ضد التهابی می‌باشد (Sonbol et al., 1992; Wei & Shibamoto, 2010). Boskovic و همکاران (۲۰۱۷) اثر بازدارندگی اسانس آویشن بر باکتری سالمونلا و تاثیر آن بر ویژگی‌های میکروبی و حسی گوشت خوک چرخ شده بسته‌بندی شده در شرایط خلاء و اتمسفر اصلاح شده را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج نشان داد که طی دوره آزمایش میزان باکتری ۴/۰۵-۱/۶۹ لوگ کاهش داشت. تیمار ۰/۳ درصد اسانس از نظر داوران بهترین نتیجه را در بخش ارزیابی حسی بخود اختصاص داد. بر اساس بررسی منابع خواص ضد میکروبی اسانس‌های روغنی و عصاره گیاهان

دارویی بر میکروارگانیسم‌های متفاوت در مناطق مختلف گزارش شده است (چوبکار و همکاران، ۱۳۹۱؛ علیزاده و همکاران، ۱۳۹۲؛ بهنام و همکاران، ۱۳۹۶). برخی از محققین ارتباط بین ساختارهای شیمیایی برخی از اجزای غالب موجود در اسانس‌ها را با فعالیت ضد میکروبی آنها گزارش نمودند. اسانس‌هایی که دارای ترکیب‌های کریزانتنیل استات، پارسیمن و آلفا بیزابولول اکسید هستند، خاصیت ضد میکروبی شدید آنها گزارش شده است (ایزدی و همکاران، ۱۳۹۲؛ Fabry et al., 2007). Sarrou و همکاران (۲۰۱۳) ترکیبات فرار موجود در اسانس پوست، گل و برگ‌های پیر و جوان نارنج‌های یونانی را شناسایی کرده و از نظر فعالیت ضد اکسیدانی مورد ارزیابی قرار داده و بالاترین فعالیت ضد اکسیدانی را در اسانس استخراج شده از برگ‌های پیر مشاهده کردند. Ellouze و همکاران (۲۰۱۲) زمان برداشت برگ نارنج در فصول مختلف را عاملی موثر بر ترکیب شیمیایی و ویژگی‌های زیستی اسانس دانسته و فصل تابستان را بهترین زمان برداشت برگ نارنج جهت تهیه اسانس گزارش نمودند. Trabelsi و همکاران (۲۰۱۴) فعالیت ضدباکتریایی و ضد اکسیداسیون اسانس گل، برگ و پوست نارنج شمال تونس را بررسی و نشان دادند که اسانس حاصل از همه قسمت‌های مورد بررسی دارای فعالیت ضد اکسیداسیون و ضدباکتریایی می‌باشند. شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد اسانس‌ها اثر ضد میکروبی خود را از طریق تغییر ساختار و عمل غشاء سلولی اعمال می‌کنند. بررسی‌های صورت گرفته در خصوص مکانیزم عمل اسانس‌ها اثبات نموده که این ترکیب‌ها نفوذپذیری غشاء را افزایش می‌دهند. اجزای اسانس با نفوذ در غشاء منجر به متورم شدن غشاء شده و فعالیت آن را کاهش و در نهایت منجر به مرگ سلول خواهد شد (ایزدی و همکاران، ۱۳۹۲؛ Bezic & Skobibunic, 2002). فعالیت ضد میکروبی اسانس‌های گیاهی از مکانیسم مشابهی برخوردار نیست. با این وجود در اغلب موارد تأثیر اسانس‌های گیاهی بر ساختار دیواره سلولی تأیید شده است. ویژگی آبرگریزی اسانس‌ها سبب نفوذ آنها در لیپید غشاء سلولی و افزایش نفوذپذیری آن می‌گردد که این امر سبب اختلال در کلیه فعالیت‌های حیاتی وابسته به غشاء سلولی، خروج یون‌ها، ترکیبات حیاتی و در نهایت مرگ سلول خواهد شد (Palmer et al., 2001; Burt, 2004).

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر نتایج آزمایش نشان داد که ترکیب نگهدارنده‌ها و بسته‌بندی توانست رشد باکتری S.

typhimurium را کنترل کند. pH اسیدی، درصد بالای نمک و بالاترین غلظت اسانس توانست از روز هشتم نگهداری برگ‌ها رشد باکتری را متوقف کند که در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نیز این روند مشاهده گردید. نتایج این تحقیق می‌تواند هنگامی که کنترل دما طی فرآوری، انتقال، خرده‌فروشی مواد غذایی با مشکل مواجه می‌شود، بکار گرفته شود.

قدردانی

این مقاله از طرح پژوهشی درون دانشگاهی تحت عنوان "مطالعه تأثیر دما، pH، نمک، اسانس نارنج، آرد بلوط و بسته بندی اتمسفر تغییر یافته در کنترل عوامل بیماری‌زای فرآورده های گوشتی و شیلاتی" استخراج شده و هزینه های آن توسط دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز تأمین گردیده است که بدین وسیله قدردانی می‌گردد.

منابع

- اجاق، س.م.، عبدالله زاده، ا.، شعبانپور، ب.، کردجری، م. و خسروی قلعه، ر.، ۱۳۹۵. کارآیی مواد زیست‌فعال تولیدی از باکتری *Lactococcus lactis* همراه با اسانس‌های گیاهی، نمک و اسید استیک جهت کنترل *Listeria monocytogenes* در مدل مایع و گوشت چرخ شده *Hypophthalmichthys molitrix*. نشریه فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان، ۴ (۴): ۱۱۰-۸۹.
- ایزدی، ز.، مدرس ثانوی، س.م.ع.، سروش زاده، ع.، اثنی عشری، م. و داوودی، پ.، ۱۳۹۲. اثر ضد میکروبی اسانس گیاهان دارویی بابونه آلمانی و بابونه کبیر. مجله ارمان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، ۱۸ (۱): ۴۳-۳۱.
- بهنام، خ.، محمدی ثانی، ع. و اسماعیل پور، م.، ۱۳۹۶. تعیین ترکیبات شیمیایی و خاصیت ضد میکروبی اسانس ریشه شلغم شیرازی در شرایط آزمایشگاهی. مجله میکروب شناسی مواد غذایی، ۳ (۳): ۴۰-۳۱.
- پاسبانی، ا. و امیری، ص.، ۱۳۹۶. بررسی تأثیر پوشش خوراکی عصاره آلوئه‌ورا همراه با نانو ذرات چربی جامد حاوی اسانس روغنی زنیان بر عمر نگهداری گوشت تازه گاو. مجله علوم و صنایع غذایی ایران، ۱۲ (۲): ۸۶-۷۵.
- چوبکار، ن.، آخوندزاده بستی، ا.، ساری، ع.، گندمی، ح. و امامی راد، ا.م.، ۱۳۹۱. بررسی تأثیر اسانس آویشن شیرازی (*Zataria multiflora* Boiss) و نیسین بر کنترل کیفیت

فیزیکوشیمیایی، میکروبی و حسی فیله‌های فیل ماهی دودی طعم دهی شده با آب نمک و سس به مدت ۳۰ روز در یخچال. مجله علمی شیلات ایران. ۲۸ (۴): ۱-۱۲. DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119397

هادی زاده، ز.، مورکی، ن. و معینی، س.، ۱۳۹۳. اثر نمک سود کردن بر روی زمان ماندگاری ماهی سارم دهان بزرگ (*Scomberoides commersonianus*). مجله علمی شیلات ایران. ۲۳ (۳): ۱۳۹-۱۲۹.

Bezic, N., Skocibusić, M., Dunkić, V. and Radonić, A., 2002. Composition and antimicrobial activity of *Tanacetum parthenium* L.essential oil. *Journal of Ethnopharmacology*, 74(1): 123-134. DOI: 10.1002/ptr.1290.

Boskovic, M., Djordjevic, J., Ivanovic, J., Janjic, J., Zdravkovic, N., Glisic, M., Glamoclija, N., Baltic, B., Djordjevic, V. and Baltic, M., 2017. Inhibition of *Salmonella* by thyme essential oil and its effect on microbiological and sensory properties of minced pork meat packaged under vacuum and modified atmosphere. *International Journal of Food Microbiology*, 258: 58-67. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.07.011.

Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94 (3): 223-253. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022

Cai, L., Cao, A., Li, T., Wu, X., Xu, Y. and Li, J., 2015. Effect of the fumigating with essential oils on the microbiological characteristics and quality changes of refrigerated turbot *Scophthalmus maximus* fillets. *Food Bioprocess Technology*, 8: 844-853. DOI: 10.1007/s11947-014-1453-0

Ellouze, I., Abderrabba, M., Sabaou, N., Mathieu, F., Lebrihi, A. and Bouajila, J., 2012. Season's variation impact on Citrus aurantium leaves essential oil: chemical composition and biological activities. *Journal*

فیله‌های سبک شور ماهی کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*). فصلنامه گیاهان دارویی، ۱۱ (۲): ۲۰۵-۲۱۵.

رضاییان، ح.، حسینی، س.و.، مطلبی مغانجویی، ع.ع. و میرواقفی، ع.ر.، ۱۳۹۳. اثر عصاره خیار دریایی (*Holothuria leucospilota*) بر کیفیت شیمیایی فیله ماهی قزل آلائی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) طی نگهداری در یخچال (± 4 درجه سانتیگراد). مجله بهره برداری و پرورش آبزیان، ۳ (۳): ۳۶-۲۷.

رضوی شیرازی، ح.، ۱۳۸۰. تکنولوژی فرآورده‌های دریایی (علم فرآوری جلد دوم). انتشارات نقش مهر، چاپ اول. ۲۹۲ صفحه.

سلیمانی، ع.، وریدی، م.ج.، صادقی ماهونک، ع. و نصیری محلاتی، م.، ۱۳۹۱. بررسی ترکیبات شیمیایی ماهی پوزانک و ارزیابی تغییرات رطوبت و نمک بافت آن طی روش های نمک زنی و خشک کردن. فصلنامه علوم و صنایع غذایی ایران، ۸ (۲): ۱۲۰-۱۱۵.

شعبانپور، ب.، ذوالفقاری، م.، فلاح زاده، س. و علی پور، غ.، ۱۳۹۰. اثر عصاره آویشن شیرازی بر ماندگاری فیله قزل آلائی رنگین کمان شور و بسته بندی شده در خلاء در شرایط یخچال. علوم و صنایع غذایی، ۲۳ (۱): ۱۱-۱.

عزیزخانی، ف. و توریان، ف.، ۱۳۹۵. بررسی تأثیر اسانس زنیان (*Carum Copticum*) بر رشد و بیان ژنی انتروتوکسین های A و C *Staphylococcus aureus* در سوریمی ماهی کیلکا (*Clupeonella cultriventris caspia*). مجله علوم و فنون شیلات، ۵ (۱): ۱۵۲-۱۴۱.

علیزاده، ش. و رومیانی، ل.، ۱۳۹۶. ارزیابی شاخص های شیمیایی، میکروبی و زمان ماندگاری برگر تلفیقی (کپور نقره ای - گوشت مرغ) در طول مدت نگهداری در شرایط انجماد. مجله میکروب شناسی مواد غذایی، ۳ (۳): ۲۹-۱۹.

علیزاده، ه.، قیامی راد، م. و ابراهیمی اصل، س.، ۱۳۹۲. اثر ضدباکتریایی عصاره الکلی شلغم بر روی تعدادی از باکتری های بیماری زا. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز، ۳۵ (۶): ۷۹-۷۴.

فهیم دژبان، ی.، ۱۳۸۷. فرآوری محصولات شیلاتی. انتشارات مهر النبی. چاپ اول. قائمشهر. ۲۹۱ صفحه.

لطیفی، ب.، ابوالقاسمی، س.ج.، شویک لو، ا.ر.، احمدی، م.، اعتمادیان، ی. و قائمی، و.، ۱۳۹۸. مقایسه تغییرات

- Food Science*, 77(9): 173-180. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2012.02846.x
- Etemadi, H., Rezaei, M. and Abediyan, A., 2008.** Anti-bacterial and antioxidant potential of extracts of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) on the shelf-life of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal Food Science*, 5: 67-77.
- Fabry, W., Hames, E. and Locatell, J., 2007.** Antimicrobial activities of methanol extracts of *Matricaria chamomilla*, depending on location and seasonal variation. *Food Chemical*, 100: 559-564.
- Fan, W., Chi, Y. and Zhang, S., 2008.** The use of a tea polyphenol dip to extend the shelf life of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) during storage in ice. *Food Chemistry*, 108:148-153. DOI: org/10.1016/j.foodchem.2007.10.057
- Fan, W., Sun, J., Chen, Y., Qiu, J., Zhang, Y., Chi, Y., 2009.** Effects of chitosan coating on quality and shelf-life of silver carp during frozen storage. *Food Chemistry*, 115: 66-70. DOI: org/10.1016/j.foodchem.2008.11.060
- Fournomiti, M., Kimbaris, A., Mantzourani, I., Plessas, S., Theodoridou, I., Papaemmanouil, V., Kapsiotis, I., Panopoulou, M., Stavropoulou, E., Bezirtzoglou, E.E. and Alexopoulos, A., 2015.** Antimicrobial activity of essential oils of cultivated oregano (*Origanum vulgare*), sage (*Salvia officinalis*), and thyme (*Thymus vulgaris*) against clinical isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, and *Klebsiella pneumoniae*. *Microbial Ecology in Health Disease*, 26: 23289. DOI: 10.3402/mehd.v26.23289.
- Grau, F.H. and Vanderlinde, P.B., 1990a.** Growth of *Listeria monocytogenes* vacuum packaged beef. *Journal of Food Protection*, 53:739-741. DOI: 10.4315/0362-028X-53.9.739
- Grau F.H. and Vanderlinde, P.B., 1990b.** Growth of *Listeria monocytogenes* on vacuum packaged beef. *Journal of Food Protection*, 53(9):739-741. DOI: 10.4315/0362-028X-53.9.739
- Hashemi, M., Ehsani, A., Jazani, N.H., Aliakbarlu, J. and Mahmoudi, R., 2013.** Chemical composition and in vitro antibacterial activity of essential oil and methanol extract of *Echinophora platyloba* DC against some of food borne pathogenic bacteria. *Veterinary Research Forum*, 4 (2): 123-127.
- Hwanhlem, N., Jaffres, E., Dousset, X., Pillot, G., Choiset, Y., Haertle, T., Kittikun, A. and Ghobert, J.M., 2015.** Application of a nisin Zproducing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KT2W2L isolated from brackish water for biopreservation in cooked, peeled and ionized tropical shrimps during storage at 8°C under modified atmosphere packaging. *European Food Research and Technology*, 240 (6): 1259-1269. DOI: 10.1007/s00217-015-2428-8
- Kirbaslar, F.G., Tavman, A., Dulger, B. and Turker, G., 2009.** Antimicrobial activity of Turkish Citrus peel oils. *Pakistan Journal of Botany*, 41: 3207-3212. DOI: abs/10.1002/ffj.2730010409
- Lakshmanan, R., Shakila, R.J. and Jeyasekaran, G., 2002.** Changes in the halophilic amine forming bacterial flora during salt-drying of sardines (*Sardinella gibbosa*). *Food Research International*, 35: 541-546. DOI: 10.1016/S0963-9969(01)00154-5
- Liu, Ch., Mou, J. and Su, Y., 2016.** Behavior of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in raw Yellowfin tuna during cold storage. *Foods*, 5:2-9. DOI:10.3390/foods5010016.
- Mahgoub, S.A., El-Mekkawy, R.M., El-Hack, M.E.A., El-Ghareeb, W.R., Suliman, G.M., Alowaimer, A.N. and Swelum, A.A., 2019.**

- Inactivation of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat smoked turkey meat by combination with packaging atmosphere, oregano essential oil and cold temperature. *AMB Express*, 9:1-9. DOI: 10.1186/s13568-019-0775-8
- Majnooni, M.B., Mansouri, K., Gholivand, M.B., Mostafaie, A., Mohammadi-Motlagh, H.R., Afnanzade, N.S., Abolghasemi, M.M. and Piriyaie, M., 2012.** Chemical composition, cytotoxicity and antioxidant activities of the essential oil from the leaves of *Citrus aurantium* L. *African Journal of Biothecnology*, 11(2): 498-503. DOI: 10.5897/AJB11.1449
- Meira, N.V.B., Holley, R.A., Bordina, K., deMacedo, R.E.F. and Luciano, F.B., 2017.** Combination of essential oil compounds and phenol acids against *Escherichia coli* O₁₅₇:H₇ in vitro and in dry-fermented sausage production. *International Journal of Food Microbiology*, 260: 59-64. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.08.010
- Mileski, K., Dzamic, A., Ciric, A., Grujic, S., Ristic, M., Matevski V. and Marin, P., 2014.** Radical scavenging and antimicrobial activity of essential oil and extracts of *Echinophora sibthorpiana* Guss from Macedonia. *Archives of Biological Sciences*, 66(1): 401-413. DOI: 10.2298/ABS1401401M
- Palmer, A.S., Steward, J. and Fyfe, L. 2001.** The potential application of plant essential oils as natural preservatives in soft cheese. *Food Microbiology*, 18: 463-470. DOI: 10.1006/fmic.2001.0415
- Raeisi, S., Sharifi-Rad, M., Young Quek, S., Shabanpour, B. and Sharifi-Rad, J., 2016.** Evaluation of antioxidant and antimicrobial effects of shallot (*Allium ascalonicum* L.) fruit and ajwain (*Trachyspermum ammi* (L.) Sprague) seed extracts in semi-fried coated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets for shelf-life extension. *LWT - Food Science and Technology*, 65: 112-121. DOI: 10.1016/j.lwt.2015.07.064
- Rodrigues, M.J., Ho, P., Lpez-Caballero, M.E., Vaz-Pires, P. and Nunes, M.L., 2003.** Characterization and identification of microflora from soaked cod and respective salted raw materials. *Food Microbiology*, 20: 471-481. Doi: org/10.1016/S0740-0020(02)00086-2
- Rohbein, H. and Oehlenschläger, J., 2009.** Fishery Products. Wiley-Blackwell Pub. 477 P. DOI: SH335.5.Q35F58
- Rojas-Grau, M.A., Tapia, M.S., Rodriguez, F.J., Carmona, A.J., and Martin-Belloso, O., 2007.** Alginate and gellan-based edible coatings as carriers of antibrowning. *Food Hydrocolloids*, 21: 118-27. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2006.03.001
- Ross, T., Dalgaard, P. and Tienungoon, S., 2000.** Predictive modelling of the growth and survival of *Listeria* in fishery products. *International Journal of Food Microbiology*, 62: 231-245. DOI: 10.1016/S0168-1605(00)00340-8
- Rozman, T. and Jersek, B., 2009.** Antimicrobial activity of rosemary extracts (*Rosmarinus officinalis* L.) against different species of *Listeria*. *Acta Agriculture Slovenica*, 93 (1): 51-58. DOI: 10.2478/v10014-009-0007-z
- Sarrou, E., Chatzopoulou, P., Dimassi-Theriou, K. and Therios, I., 2013.** Volatile constituents and antioxidant activity of peel, flowers and leaf oils of *Citrus aurantium* L. growing in Greece. *Molecules Journal*, 18: 10639-10647. DOI: org/10.3390/molecules180910639
- Sobrinho-Lopez, A. and Martin-Belloso, A., 2008.** Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products. *International*

- Dairy Journal*, 18: 329–343. DOI: 10.1016/j.idairyj.2007.11.009
- Sonbol, F., Ibrahim, S.M. and Mohamed, B.M., 1992.** Antimicrobial activity of oil of bitter orange. *Alexandria Journal of Pharmaceutical Science*, 9: 107–109.
- Sparkman, O.D., 2005.** Identification of essential oil components by gaschromatography /quadrupole mass spectroscopy. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 16(11): 1902-1903.
- Tajkarimi, M.M., Ibrahim, S.A. and Cliver, D.O., 2010.** Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21: 1199–1218. DOI: 10.1016/j.foodcont.2010.02.003
- Tassou, C., Koutsoumanis, K. and Nychas, G.J.E., 2000.** Inhibition of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* in nutrient broth by mintessential oil. *International Journal of Food Research*, 33: 273-380. DOI: 10.1016/S0963-9969(00)00047-8
- Tauxe, R.V., 2002.** Emerging foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 78: 3–41. DOI: 10.1016/S0168-1605(02)00232-5
- Trabelsi, D., Ammar, A.H., Bouabdallah, F. and Zagrouba, F., 2014.** Antioxidant and antimicrobial activities of essential oils and metabolic extracts of Tunisian *Citrus aurantium* L. *Journal Environmental Science Toxicology and Food Technology*, 8(5): 18-27.
- Van Haute, S., Raes, K., Van der Meeren, P. and Sampers, I., 2016.** The effect of cinnamon, oregano and thyme essentialoils in marinade on the microbial shelf life of fish andmeat products. *Food Control*, 68: 30-39. DOI: 10.1016/j.foodcont.2016.03.025
- Vernam, A.H. and Evans, M.G., 1991.** Foodborne Pathogens. Wolf Pub Lth., pp: 235-265.
- Wei, A. and Shibamoto, T., 2010.** Antioxidant/lipoxygenase inhibitory activities and chemical compositions of selected essential oils. *Journal of Agriculturaland Food Chemistry*, 58: 7218-7225. DOI: 10.1021/jf101077s
- Winkler, K., Wackers, F.L., Termorshuizen, A.J. and Lenteren, J.C., 2010.** Assessing risks and benefits of floral supplements in conservation biological control. *Bio-Control*, 55: 719–727. DOI: 10.1007/s10526-010-9296-8
- World Health Organization (WHO), 2002.** WHO Traditional Medicine Strategy 2002–2005. World Health Organization Geneva.
- Zaouali, Y., Bouzaine, T. and Boussaid, M., 2010.** Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. *Food and Chemical Toxicology*, 48: 3144–3152. DOI: 10.1016/j.fct.2010.08.010
- Zhou, G.H., Xu, X.L. and Liu, Y., 2010.** Preservation technologies for fresh meat: A review. *Meat Science*, 86: 119–128. DOI: 10.1016/j.meatsci.2010.04.033

Effect of temperature, pH, salt, leaf citrus essential oil and modified atmosphere packaging in control of *Salmonella typhimurium* in Burger fish

Roomiani L.^{1*}; Tadayoni M.²

*l.roomiani@yahoo.com

1- Department of Fisheries, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran

2- Department of Food Science and Technology, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran

Abstract

The aim of this study was to determine the effect of temperature, pH, salt, *Citrus aurantium* essential oil and modified atmosphere packaging (50% carbon dioxide, 45% nitrogen and 5% oxygen) on control of *Salmonella typhimurium* was carried out in 1996-97. In this research, pH was adjusted at 5.5, 6 and 7.5, temperature at 4, 25 and 37°C, salt at three levels 0, 1.5 and 3 %, and citrus essential oil at 0, 0.025 and 0.05%. *S. typhimurium* growth was increased in fish burger at pH 5.5, 6 and 7.5 at 4, 25 and 37°C, during 12 days of storage. Bacterial growth was increased at pH 7.5 with 1.5% and 3% salt and 0.025% and 0.05% citrus essential oil at 4, 25 and 37°C, respectively, on days 6, 8, 10 and 12. Growth was also observed at pH 6 with 1.5% salt and 0.025% citrus essential oil on days 8, 10 and 12 at 25 and 37°C. At 4°C at pH 5.5 with 1.5% salt and citrus oil 0.05%, pH 5.5 and 6 with 3% salt and citrus oil 0.05%, pH 5.5 with salt 3% and 0.025% citrus essential oil were not observed of growth of bacterial on the 8th, 10th and 12th days. Citrus essential oil at 0.05% level at 4°C, 3% salt and pH 5.5 had the ability to control *Salmonella typhimurium* growth in fish burger.

Keywords: Fish burger, Modified atmosphere packaging, *Citrus aurantium* L., *Salmonella typhimurium*

*Corresponding author