

(مقاله کوتاه پژوهشی)

## آلودگی باکتریایی پنیرهای سنتی شهرستان ماکو با استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز مثبت

فاطمه رضایی درزیکلا<sup>۱</sup>، امیر توکمه چی<sup>۲</sup>، مریم جعفرزاده مقدم<sup>۳\*</sup>

۱- کارشناس آزمایشگاه میکروبیولوژی، واحد ماکو، دانشگاه آزاد اسلامی، ماکو، ایران.

۲- دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

۳- دانش آموخته دکترای تکنوژی مواد غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۱۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۱/۰۱

### چکیده

محصولات لبنی در تغذیه و سلامتی مردم نقش مهمی دارند و پنیر منبع غنی از پروتئین، چربی و مواد معدنی است که به خاطر اهمیت بالای آن جایگاه ویژه‌ای در رژیم غذایی مردم دارا است. با این وجود آلودگی آن به میکرواورگانسیم‌های پاتوژنی مثل استافیلوکوکوس می‌تواند سلامت انسان را به خطر بیندازد. در این پژوهش ۴۶ نمونه پنیر سنتی تهیه‌شده از شیر گوسفند شامل ۲۳ نمونه پنیر آب نمکی و ۲۳ نمونه پنیر کوزه‌ای (کوپه) از مناطق مختلف شهرستان ماکو جمع‌آوری و میزان فراوانی استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز مثبت با روش کشت مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی نشان داد که ۲۸/۲٪ پنیرهای سنتی دارای استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز مثبت بودند، بطوریکه ۱۷/۳٪ آنها پنیر آب نمکی و ۱۰/۹٪ آنها پنیر کوزه‌ای بود. نتایج شمارش به شیوه محتمل‌ترین تعداد نشان داد که ۱۹/۵٪ پنیرهای سنتی مورد بررسی دارای بیش از ۱۱۰ کلونی در هر گرم پنیر بود بطوریکه ۶/۵٪ از پنیرهای کوزه‌ای و ۱۳٪ از پنیرهای آب نمکی دارای میزان آلودگی بیش از ۱۱۰ کلونی در هر گرم پنیر بود.

**واژه های کلیدی:** پنیر سنتی؛ استافیلوکوکوس اورئوس؛ کواگولاز مثبت؛ ماکو

\*مسئول مکاتبات: [mjafarzadeh@tabrizu.ac.ir](mailto:mjafarzadeh@tabrizu.ac.ir)

## ۱- مقدمه

پنیر از مهم‌ترین فرآورده‌های لبنی است که در تغذیه بشر، سهم بسزایی دارد و ضمن تأمین مواد لازم جهت رشد، در مطبوع ساختن رژیم غذایی روزانه موثر است. این محصول دارای پروتئین مرغوب بوده و از نظر اسیدهای آمینه ضروری بسیار غنی می‌باشد. براساس آمارهای موجود حدود ۲۰٪ شیر تولیدی در کشور در بخش صنایع لبنی به پنیر تبدیل می‌شود. از این مقدار سهم تولید پنیر سنتی بیشترین مقدار (حدود ۸۰٪) را تشکیل می‌دهد (۳). در ایران انواع مختلفی از پنیرها به طریق سنتی تولید می‌شود به عنوان مثال در نواحی غربی کشور پنیر ليقوان و پنیر کوزه و در نواحی شرقی نیز پنیر پوستی به دلیل عطر و طعم خاص و مطلوب خود از معروفترین و پرطرفدارترین محصولات می‌باشند. کوزه سفالی به دلیل سهولت ساخت و در دسترس بودن، ارزانی، خاصیت تراوایی مناسب و در نتیجه حفظ و بهبود ویژگی‌های ارگانولپتیکی، فیزیکی و شیمیایی پنیر، مورد توجه و استفاده تولیدکنندگان سنتی پنیر می‌باشد. کوزه مورد استفاده بدین منظور باید بدون هر گونه لعاب یا رنگ باشد تا منافذ ریز موجود در آن مسدود نشده و خاصیت اسمزی خود را حفظ نماید. در منطقه شمالغرب ایران، شیر مورد استفاده برای تولید این نوع پنیر شامل شیر گوسفندی، شیر گاوی، شیر گاو میش و شیر بز می‌باشد. برای تولید این پنیر به روش سنتی، شیر به صورت خام و غیر پاستوریزه و نیز بدون افزودن استارتر استفاده می‌گردد (۲۰). ابتدا شیر گرم می‌شود و سپس در دمای حدود  $30 \pm 3$  °C مایه قارچی به آن افزوده می‌شود. پس از گذشت حدود ۱/۵-۱ ساعت، دلمه منعقد می‌شود. در برخی مناطق قبل از انعقاد کامل دلمه به آن گیاهانی مثل زیره، پونه، گنگر، ریحان، کاکوتی و... اضافه می‌نمایند. در برخی از مناطق دلمه‌ها را بریده و به مدت ۳-۴ هفته در داخل آب نمک قرار می‌دهند و بعد آن‌ها را خارج می‌کنند. در مناطقی دیگر پس از انعقاد لخته، دلمه بریده نمی‌شود بلکه با ملاقه بر روی پارچه‌های کتان سه‌گوش ریخته می‌شود. ۲۴ ساعت پس از

آبگیری اولیه پنیرهای تولیدی به مدت ۱۵ روز در کیسه‌های بزرگ کتان قرار گرفته و به مقدار لازم نمک خشک بروی آن‌ها پاشیده می‌شود، یک وزنه مسطح از جنس سنگ به وزن تقریبی نصف وزن پنیر روی کیسه پنیر قرار داده می‌شود. پس از این مدت، دلمه‌ها را خارج کرده و شستشو می‌دهند و به مدت ۲۴ ساعت داخل یک ظرف توری قرار می‌دهند تا آب آن کاملاً خارج گردد. کوزه‌ها را نیز با دستمال خشک تمیز می‌کنند. دلمه‌های پنیر را به طور سنتی به وسیله دست، هاون، وردنه یا تخماق یا به صورت امروزی‌تر با چرخ گوشت خرد می‌کنند. خرده پنیرها را محکم و به صورت فشرده با مشت بسته داخل کوزه پر می‌کنند تا هوای محبوس آن کاملاً خارج گردد. کتان تمیزی که حاوی برگ مو، سنگریزه، پشم شسته‌شده یا آرد باشد در قسمت سر کوزه قرار می‌دهند و در برخی مناطق سر کوزه را گل می‌گیرند. کوزه‌ها را به صورت وارونه داخل زمین به عمق حدود ۱/۵-۱ متر چال کرده و اطراف آن خاک تازه می‌ریزند. محل چال کردن کوزه‌ها باید سایه و دور از نور آفتاب باشد. برای حفظ طراوت و جلوگیری از خشک شدن این خاک، روزانه مقدار اندکی خاک را آبیاری می‌کنند. پس از ۳-۲ ماه کوزه‌ها را از داخل خاک خارج می‌کنند و پنیر را استفاده می‌کنند (۴). برای تولید پنیر آب نمکی از انواع شیر شامل شیر گوسفندی، شیر گاوی، شیر گاو میش و شیر بز به روش سنتی، به صورت خام و غیر پاستوریزه و نیز بدون افزودن استارتر استفاده می‌شود (۱۹). ابتدا شیر تا حدود  $40^{\circ}\text{C}$  گرم می‌شود و سپس در دمای حدود  $30 \pm 5$  °C مایه قارچی میتو به میزان ۱٪ وزنی به آن افزوده می‌شود. دلمه حاصل بعد از یک ساعت بریده شده و در داخل پارچه های کرباس ریخته‌شده سپس به وسیله جسم سنگینی مثل سنگ تحت فشار قرار می‌گیرد، بعد از ۲ تا ۳ ساعت از پارچه خارج شده و برش زده می‌شود و در آب نمکی که بصورت دستی آماده شده قرار می‌گیرد. پس از ۲ ماه پنیر رسیده و قابل استفاده می‌باشد. علی‌رغم برتری‌های حسی پنیرهای سنتی به پنیرهای صنعتی، مسئله مهم در تولید این

تهیه شدند و نمونه‌های پنیر آب نمکی از روستاهای خرمن یری، کهریز، سنگر، طلیم‌خان، قره تپه، شادلوی سفلی، شادلوی علیا، جگن کرد، عظیم کندی، کندال، بابور، تازه کند، فسل، شوربلاغ، آداغان، حاسار، جگن عجم، خلیج کرد، تکمه کرد، تکمه عجم، بلجک، دیزج عجم و دیزج کرد تهیه شدند. نمونه‌های پنیر با دستکش استریل برداشته شد و در داخل شیشه‌هایی که از قبل استریل شده بود قرارداد شد و در شرایط استریل به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ماکو منتقل شد.

### ۲-۲-۲- آماده سازی نمونه‌ها

ابتدا نمونه‌های پنیر، شماره گذاری شد به طوری که شماره‌های ۱ تا ۲۳ مربوط به پنیرهای کوزه ای و شماره‌های ۲۴ تا ۴۶ مربوط به نمونه‌های پنیر آب نمکی بود. سپس سطح میز کار با الکل اتیلیک ۷۰ درصد استریل شد. در مرحله بعد با استفاده از قاشق استریل به اندازه ۱ گرم پنیر توزین شد و به کسبه استومیکر حاوی ۹ میلی لیتر تری سترات سدیم انتقال داده شد و سپس توسط استومیکر همگن سازی شد (۱۵).

### ۲-۲-۳- روش آزمون‌های بیوشیمیایی افتراقی: کاتالاز و

#### کوآگولاز

#### ۲-۲-۳-۱- روش انجام آزمون کاتالاز

برای انجام این آزمایش، یک قطره آب اکسیژنه ۳٪ روی یک لام تمیز ریخته و سپس بوسیله لوب یک کلونی از محیط کشت بردپارکر آگار برداشته و با آب اکسیژنه مخلوط شد؛ در صورتی که حباب تشکیل شود نتیجه مثبت می‌باشد و در غیر اینصورت منفی می‌باشد (۲۳).

#### ۲-۲-۳-۲- روش انجام آزمون کوآگولاز

در نمونه‌هایی که آزمون کاتالاز، مثبت بود آزمون کوآگولاز انجام شد. یک قطره از پلاسمای سترات خروگوش را روی لام ریخته سپس یک کلونی باکتری از محیط بردپارکر آگار

محصولات بالا بودن بار میکروبی آنها در اثر استفاده از شیرخام می‌باشد و احتمال آلودگی پنیرهای تولید شده از این شیر به انواع میکروب‌های بیماریزا وجود دارد. از این رو با توجه به مصرف بالای پنیر سنتی در کشور، اندازه‌گیری و شناسایی آلودگی میکروبی آن جهت بهبود کیفیت و سلامت این محصول امری ضروری است. هدف از این پژوهش بررسی و تعیین میزان آلودگی پنیرهای سنتی نگهداری شده در آب نمک و کوزه‌ای (کوپه) مصرفی در شهرستان ماکو به استافیلوکوک‌های کوآگولاز مثبت می‌باشد.

### ۲- مواد و روش‌ها

#### ۲-۱- مواد

میکروارگانسیم مورد استفاده جهت تلقیح نمونه شاهد سوش میکروبی استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 6538) بود که از مجموعه میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه گردید. محیط‌های کشت مورد استفاده: شامل محیط کشت آبگوشت اصلاح شده جیولیتی و کانتونی<sup>۱</sup> و محیط کشت بردپارکر آگار<sup>۲</sup> هر دو ساخت کارخانه مرک آلمان بودند.

#### ۲-۲- روش‌ها

#### ۲-۲-۱- روش نمونه برداری

در این تحقیق ۴۶ نمونه پنیرتهیه شده از شیر گوسفند شامل ۲۳ نمونه پنیر آب نمکی و ۲۳ نمونه پنیر کوپه‌ای به طور تصادفی از ۳۹ روستای شهرستان ماکو جمع‌آوری شد. نمونه‌های پنیر کوزه‌ای از روستاهای قلعه جوق، باغچه جوق، بلجک، طلیم خان، آغ بلاغ، انالوی، حصار، شوربلاغ، شمش تپه، خرمن یری، آبارا باشی، هاسون، ترکمه، بابالو، کندال، بابور، باشکند، گجوت، کهریز، خلیج عجم، علی‌آباد، بیانجولی و رند

1- Modified Giolitti and Cantoni Broth

2- Baird Parker Agar

برداشته شد و با پلاسمای خرگوش مخلوط شد در صورتی که آگلوتینه گردد کوآگولاز مثبت می‌باشد.

**۲-۳-۳- شمارش استافیلوکوکوس های کوآگولاز مثبت (روش استفاده از محیط کشت بردپارکر آگار)**  
طبق استاندارد ملی ایران به شماره ۱- ۶۸۰۶ و جستجو، شناسایی و شمارش به شیوه محتمل‌ترین تعداد ( شمارش استافیلوکوکوس های کوآگولاز مثبت) طبق استاندارد ملی ایران به شماره ۳- ۶۸۰۶ انجام شد (۱۰ و ۱۱).

### ۲-۳- تجزیه و تحلیل آماری

متغیر اصلی در این تحقیق وجود یا عدم وجود باکتری استافیلوکوکوس کوآگولاز مثبت، تعداد کلونی‌های موجود در یک گرم نمونه و نیز در صد فراوانی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز مثبت در نمونه‌های پنی ستنی جمع‌آوری شده از روستاهای شهرستان ماکو است.

### ۳- نتایج و بحث

نتایج حاصل از آزمون‌های کشت میکروبی در جدول ۱ ارائه شده است. اهداف مورد نظر این تحقیق عبارتند از جستجو و شمارش کلونی‌های استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز مثبت در ۴۶ نمونه از پنی‌های سنتی تهیه شده از شیر گوسفند و عرضه شده در نقاط مختلف شهرستان ماکو. نتایج جدول ۱ نشان داد که از بین ۴۶ نمونه پنی سنتی مورد بررسی در این تحقیق تعداد ۲۴ نمونه پنی سنتی (۵۲/۱۷٪) از نظر آزمون کاتالاز، مثبت بودند. از نظر تفکیک نوع پنی سنتی نیز در بین ۴۶ نمونه پنی سنتی مورد بررسی ۱۳ نمونه از نمونه‌های پنی آب نمکی و ۱۱ نمونه از نمونه‌های پنی کوزه‌ای از نظر آزمون کاتالاز، مثبت بودند. در مورد وجود و رشد استافیلوکوکوس اورئوس در انواع مختلف پنی‌های تولید شده در کشورهای مختلف جهان مطالعات زیادی شده است و این مطالعات حاکی از بروز تهدیدی بر سلامت عمومی است که ناشی از

وجود احتمالی استافیلوکوکوس اورئوس در پنی می‌باشد (۱۳). گایا و همکاران (۱۹۸۸) اثرات تلقیح استارتر لاکتیک، حرارت دهی لخته و دمای رسیدن پنی بر رفتار استافیلوکوکوس اورئوس در پنی محلی اسپانیایی به نام مانچگو را بررسی نمودند. نتایج نشان داد در انتهای ۶۰ روز رسیدگی در پنی‌های حاوی استرپتوکوکوس لاکتیس ۱ درصد، کاهش ۵/۸ برابری در تعداد استافیلوکوکوس اورئوس مشاهده شد. طبق نتایج این مطالعه در پنی‌ری که برای دلمه بستن آن دمای ۳۰ درجه سانتیگراد اعمال شده بود، استافیلوکوکوس اورئوس ۴-۵ برابر کمتر از پنی‌ری بود که برای دلمه بستن آن از دمای ۴۰-۳۶ درجه سانتیگراد استفاده شده بود. همچنین این محققان تاکید کردند که شمارش استافیلوکوکوس اورئوس در پنی‌ری که در ۱۰ و ۲۰ درجه سانتیگراد رسیده بود به ترتیب ده و صد برابر کمتر از پنی‌ری بود که در ۵ درجه سانتیگراد رسیده بود (۱۶).

### ۳-۱- نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی افتراقی: کاتالاز و کوآگولاز

همانگونه که نتایج جدول ۱ نشان می‌دهد از بین ۲۴ نمونه پنی‌ری که از نظر آزمون کاتالاز مثبت بودند تعداد ۱۳ نمونه پنی از نظر آزمون کوآگولاز نیز مثبت شدند و در نتیجه از بین ۴۶ نمونه پنی مورد بررسی در این تحقیق ۱۳ نمونه کوآگولاز مثبت تشخیص داده شد و به عبارتی ۲۸/۲٪ از کل پنی‌های نمونه برداری شده از روستاهای شهرستان ماکو دارای استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز مثبت بودند. نتایج این تحقیق مشابه با یافته‌های صالحی و همکاران (۱۳۹۲) است که آلودگی پنی‌های سنتی لیقوان به استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز مثبت را در شهر تهران مورد بررسی قرار دادند و طبق گزارش آنها از مجموع ۲۵ نمونه، ۲۲ نمونه (۸۸٪) به استافیلوکوکوس آلودگی داشتند و ۱۴ نمونه (۶۳/۶٪) بیش از حد استاندارد به استافیلوکوکوس آلودگی داشتند (۶). همچنین ۵ نمونه (۲۲/۷٪) به استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز مثبت

حاصل از شیر خام، شیر پاستوریزه و پنیر فتا، کارکنان و تجهیزات دیگر متعلق به چهار شرکت ترکیه‌ای، گونه‌های استافیلوکوکوس را شناسایی نمودند. همچنین گزارش نمودند که استافیلوکوکوس اورئوس و اینترمیدیوس گونه‌های غالب استافیلوکوکوس جدا شده بود که در بین آنها ۱۴۴ نمونه کوآگولاز مثبت و ۱۸۱ نمونه کوآگولاز منفی بود (۱۷). یوسل و آیل (۲۰۱۱) فراوانی استافیلوکوکوس‌های کوآگولاز مثبت و کوآگولاز منفی و مقاومت ضد میکروبی این گونه‌ها را در نمونه‌های شیر خام و پنیر تهیه شده از شرکت‌های مختلف و فروشندگان محصولات لبنی در آنکارا تعیین نمودند. از بین نمونه‌های شیر خام و پنیر مورد آزمایش، ۲۳۶ نمونه کوآگولاز مثبت و ۹۴ نمونه کوآگولاز منفی بودند و در کل ۳۳۰ استافیلوکوکوس جدا شد (۲۶). محققین وجود استافیلوکوکوس اورئوس را در پنیر خرده فروشی بررسی نمودند و بدین منظور ۴۵ نمونه از سه منطقه کوزوو آزمایش شد. استافیلوکوکوس اورئوس در برد پارکر آگار جداسازی شد و کلونی‌های دارای مشخصات استافیلوکوکوس اورئوس و کلونی‌های نامشخص همگی انتخاب شده، مورد آزمون کوآگولاز قرار گرفتند و از نظر خصوصیات بیوشیمیایی شناسایی شدند. نتایج نشان داد از بین ۴۵ نمونه پنیر خرده فروشی مورد مطالعه ۱۸ نمونه (۴۰ درصد نمونه‌ها) آلوده به استافیلوکوکوس اورئوس بود و از بین ۱۸ نمونه آلوده به استافیلوکوکوس ۱۰ نمونه (۵۵/۵ درصد) کوآگولاز مثبت بود یا به عبارتی دیگر ۲۲ درصد از کل نمونه‌های مورد بررسی کوآگولاز مثبت بودند. حضور این میکروارگانیسم پاتوژن بیانگر خطر سلامتی بالقوه برای افراد مصرف کننده پنیرهای خرده فروشی تهیه شده از این نواحی بود (۲۵). مطالعه دیگری در مورد شمارش گونه‌های استافیلوکوکوس در لخته دو نوع پنیر عرضه شده در برزیل انجام شد و وجود ژن (mec A) جهت شناسایی ایزوله‌های مقاوم به متیسیلین در ایزوله‌های حاصل ارزیابی شد و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌هایی که از نظر ژن (mec A) مثبت بودند، تعیین شد. بدین منظور

آلودگی داشتند. این محققان رعایت شرایط بهداشتی را در حین تولید و ضرورت استفاده از شیر پاستوریزه را در تهیه پنیر توصیه نمودند (۶). همچنین نتایج این تحقیق مشابه با یافته‌های میرزایی و همکاران (۱۳۹۱) است که تعداد ۱۰۰ نمونه از پنیر سفید سنتی و ۱۵۰ نمونه کره محلی را از مناطق مختلف سطح شهر تبریز جمع‌آوری و آنها را از نظر آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز مثبت به روش کشت مورد ارزیابی قرار داده و سپس ایزوله‌های حاصل را بر اساس واکنش زنجیره‌ای پلیمرز<sup>۱</sup> ارزیابی نمودند. نتایج تحقیق این محققان نشان داد از مجموع ۲۶ ایزوله مربوط به نمونه‌های پنیر و ۲۴ ایزوله مربوط به نمونه‌های کره که در تست‌های بیوشیمیایی به عنوان استافیلوکوکوس اورئوس تشخیص داده شده بودند به ترتیب ۱۹ ایزوله (۷۳٪) و ۱۱ ایزوله (۴۶٪) بر اساس واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به عنوان استافیلوکوکوس اورئوس مورد تایید قرار گرفتند (۹). یافته‌های محققین در شهرستان جهرم نیز نشان داده بود که از مجموع ۲۰۰ نمونه پنیر، ۱۰۱ نمونه (۵۰/۵ درصد) با استافیلوکوکوس اورئوس آلوده بود (۵). از نظر تفکیک نوع پنیر سنتی نیز طبق نتایج بدست آمده تعداد ۸ نمونه از ۲۳ پنیر آب نمکی (۳۴/۸٪) و تعداد ۵ نمونه از ۲۳ پنیر کوزه‌ای (۲۱/۷٪) آلوده به استافیلوکوکوس کوآگولاز مثبت بودند. آلودگی بالای پنیرهای آب نمکی در مقایسه با پنیرهای کوزه‌ای می‌تواند به این دلیل باشد که باکتری استافیلوکوکوس جزئی باکتری‌های نمک‌دوست است بنابراین پنیرهای آب نمکی بیشتر از پنیرهای کوزه‌ای آلوده به استافیلوکوکوس کوآگولاز مثبت می‌باشند. در مطالعه‌ای گوگمن و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که ۴۰ نمونه (۲۶/۶۶٪) از حدود ۱۵۰ نوع پنیر مختلف فروخته شده در استانبول از نظر استافیلوکوکوس اورئوس مثبت بودند. همچنین در ۲۵ نمونه از نمونه‌های جمع‌آوری شده، انتروتوکسین وجود داشت. این محققان در ۶۴۰ نمونه

می تواند به عنوان خطر سلامت عمومی در نظر گرفته شود. این ایزوله ها به پنسیلین، اکساسیلین و اریترومايسين مقاومت نشان دادند. این مطالعه اولین گزارش از شناسایی گونه های استافیلوکوکوس مقاوم به متیسیلین در محصولات لبنی حرارت دهی شده در برزیل بود. نتایج این مطالعه هشدار برای مسئولین بهداشت عمومی در جهت کنترل گونه های استافیلوکوکوس چند مقاومتی به داروها در دامپزشکی و پزشکی بود (۲۱).

مجموعه ای از ۲۰۰ نمونه از این محصولات لبنی حرارت دهی شده مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشانگر شمارش پایین گونه های استافیلوکوکوس در این محصولات لبنی بود. با استفاده از آزمایش کوآگولاز و واکنش زنجیره ای پلیمرز، همه ایزوله ها به عنوان گونه های کوآگولاز منفی تعیین شدند؛ هر چند گونه های استافیلوکوکوس مقاوم به متیسیلین، کوآگولاز منفی نیز در این محصولات لبنی شناسایی شد که

جدول ۱- نتایج آزمون های بیوشیمیایی افتراقی: کاتالاز و کوآگولاز در پنیهای کوزه ای و آب نمکی

آزمون		شماره نمونه پنیر آب نمکی	آزمون		شماره نمونه پنیر کوزه ای
کوآگولاز	کاتالاز		کوآگولاز	کاتالاز	
-	-	۲۴	+	+	۱
-	+	۲۵	-	-	۲
-	-	۲۶	+	+	۳
+	+	۲۷	-	+	۴
-	+	۲۸	-	-	۵
-	-	۲۹	-	-	۶
+	+	۳۰	-	-	۷
-	-	۳۱	-	+	۸
-	-	۳۲	-	+	۹
+	+	۳۳	-	-	۱۰
+	+	۳۴	-	-	۱۱
-	-	۳۵	-	+	۱۲
-	+	۳۶	+	+	۱۳
-	+	۳۷	-	-	۱۴
+	+	۳۸	-	-	۱۵
-	-	۳۹	-	-	۱۶
+	+	۴۰	-	-	۱۷
+	+	۴۱	-	-	۱۸
-	-	۴۲	-	+	۱۹
-	-	۴۳	+	+	۲۰
-	+	۴۴	-	-	۲۱
-	-	۴۵	+	+	۲۲
+	+	۴۶	-	+	۲۳

نتایج گویای آلوده بودن پنی‌های سنتی نگهداری شده در آب نمک و کوزه‌ای مصرفی ماکو به استافیلوکوک‌های کواگولاز مثبت می‌باشد هرچند میزان فراوانی استافیلوکوک‌های کواگولاز مثبت در این دو نوع پنی سنتی متفاوت می‌باشد. بنابراین این نمونه‌ها مورد شمارش به شیوه محتمل‌ترین تعداد قرار گرفتند.

استافیلوکوکوس اورئوس گرم مثبت، غیر اسپورزا، فاقد کپسول، غیرمتحرک، هوازی تا بی‌هوازی اختیاری و قادر به تحمل مقادیر زیاد نمک (تا ۱۵٪) می‌باشد. از اینرو مواد غذایی حاوی نمک، حیط مناسبی را برای رشد باکتری مهیا می‌سازد (۱۸). شکل ۱ میزان آلودگی پنی‌های سنتی شهرستان ماکو را به استافیلوکوکوس کواگولاز مثبت نشان می‌دهد.



شکل ۱- آلودگی پنی‌های سنتی به استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز مثبت

ملکان و میاندوآب را مورد مطالعه قرار دادند. از تعداد ۱۰۳ عدد نمونه پنی مورد بررسی ۴۳ عدد در محیط کشت بردپارکر آگار از نظر رشد باکتری منفی بوده که از این تعداد ۱۴ نوع گوسفندی، ۱۲ نوع گاوی، ۸ نوع بز، ۵ نوع گاومیشی و ۴ نوع مخلوط (شیر گاو + گوسفند) بود و رشد باکتری با شمارش بالا در ۶۰ نمونه در محیط کشت بردپارکر آگار مثبت بود که کلونی‌های سیاه در محیط کشت ظاهر شده بود. شیر این نمونه‌ها شامل ۲۱ نوع گوسفندی، ۱۵ نوع گاوی، ۴ نوع گاومیشی، ۱۱ نوع بز و ۹ نوع مخلوط (گوسفندی + گاوی) بود. بر اساس تشخیص باکتری‌های رشد یافته ۱۱/۶٪ از نمونه‌ها آلوده به استافیلوکوکوس اورئوس بودند (۷).

جاهد خانیکی و همکاران (۱۳۸۳) میزان شیوع استافیلوکوکوس کواگولاز مثبت در ۸۴ نمونه شیر ترکیبی و ۱۲ نمونه شیر فله داخل تانکر را در مرکز جمع‌آوری شیر شهرستان گرمسار مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که میانگین شمارش استافیلوکوکوس کواگولاز مثبت در شیر ترکیبی  $10^5 \times 5/4$  باکتری در هر میلی‌لیتر می‌باشد و در شیر فله (تانکر) نیز میانگین شمارش استافیلوکوکوس اورئوس  $10^5 \times 3/2$  باکتری در هر میلی‌لیتر بود. بنابراین با بالا بودن این میکروارگانیسم احتمال خطر بهداشتی حاصل از وجود انتروتوکسین استافیلوکوک‌ها در فرآورده‌های شیر وجود داشت (۲). قدرتی و همکاران (۱۳۹۰) میزان شیوع استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز مثبت در پنی‌های سنتی روستاهای اطراف

### ۳-۲- نتایج شمارش استافیلوکوکوس کوآگولاز مثبت به شیوه محتمل ترین تعداد

برای شمارش تعداد کلونی‌های پنیرهای آلوده به استافیلوکوکوس کوآگولاز مثبت از روش محتمل ترین تعداد ۹ لوله‌ای استفاده شد. نتایج شمارش به شیوه محتمل ترین تعداد (جدول ۲) نشان داد که از ۱۳ نمونه پنیر آلوده به استافیلوکوکوس کوآگولاز مثبت در ۹ نمونه پنیر تعداد کلونی‌های شمارش شده بیش از ۱۱۰ کلونی بود. طبق نتایج شمارش استافیلوکوکوس کوآگولاز مثبت به شیوه محتمل ترین تعداد، ۱۹/۵٪ پنیرهای سنتی مورد بررسی دارای بیش از ۱۱۰ کلونی در هر گرم پنیر بود به طوری که ۶/۵٪ مربوط به پنیر کوزه‌ای و ۱۳٪ مربوط به پنیر آب نمکی بود. بر اساس نتایج شمارش به شیوه محتمل ترین تعداد ۳ نمونه از ۲۳ نمونه پنیر کوزه‌ای و ۶ نمونه از ۲۳ نمونه پنیر آب نمکی دارای میزان آلودگی بیش از ۱۱۰ کلونی در هر گرم پنیر بود و به عبارتی دیگر ۱۳٪ از کل پنیرهای کوزه‌ای و ۲۶٪ از کل پنیرهای آب نمکی دارای میزان آلودگی بیش از ۱۱۰ کلونی در هر گرم پنیر بود. طبق نتایج بدست آمده از شمارش استافیلوکوکوس کوآگولاز مثبت به شیوه محتمل ترین تعداد (جدول ۲) کلیه نمونه‌های پنیر آلوده به باکتری استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز مثبت دارای بیش از ۱۰ واحد تشکیل دهنده کلونی در هر گرم می‌باشند. با توجه به این مطلب که وقتی تعداد استافیلوکوکوس اورئوس در مواد غذایی (پنیر یا آب پنیر) به بیشتر از  $10^6$  برسد توکسینها آزاد می‌شوند (۱۳ و ۲۲)، لذا نمونه پنیرهایی که بیش از ۱۰ واحد تشکیل دهنده کلونی این میکروارگانیسم را در هر گرم داشته باشند می‌توانند دارای سم انتروتوکسین بوده و از لحاظ مسمومیت غذایی حائز اهمیت باشند، بنابراین تعداد نمونه‌هایی که در این محدوده قرار دارند، بایستی مورد توجه بیشتری قرار گیرند. این نتایج مشابه با یافته‌های اسلامی و همکاران (۱۳۹۴) است که نشان دادند ۱۰۰٪ از ۸۰ نمونه پنیر گوسفندی سنتی عرضه شده در شهرستان مرند آلوده به این میکروارگانیسم

بود، به طوری که ۶/۲۵٪ نمونه‌ها حاوی بیش از  $10^5$  باکتری در هر گرم و ۱۶/۲۵٪ هم دارای تعداد باکتری بین  $10^4$  تا  $10^5$  باکتری در هر گرم بودند (۱). محصولات لبنی به خاطر مقدار زیاد ترکیبات مغذی، حاملین سوبسترای مناسب برای افزایش استافیلوکوکوس اورئوس هستند. دلایل اصلی برای اینکه چنین محصولاتی سبب بیماری‌های با منشاء غذایی می‌شوند عبارتند از وجود استافیلوکوکوس‌های کوآگولاز مثبت در شیر خام، آلودگی مستقیم در فرایند تولید، آلودگی ثانویه پس از تولید (۲۴). همان گونه که در جدول ۲ نشان داده شده است میزان آلودگی نمونه‌های شماره‌های (۲۲، ۲۰، ۱۳، ۳، ۱) که همگی مربوط به پنیرهای کوزه‌ای هستند، بیش از ۱۰ واحد تشکیل دهنده کلونی در هر گرم پنیر می‌باشد. همچنین در نمونه‌های شماره‌های (۴۶، ۴۱، ۴۰، ۳۸، ۳۴، ۳۳، ۳۰، ۲۷) که همگی مربوط به پنیرهای آب نمکی هستند میزان آلودگی به استافیلوکوکوس بیش از ۱۰ واحد تشکیل دهنده کلونی در هر گرم می‌باشد. شکل ۲ نتایج شمارش استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز مثبت به شیوه محتمل ترین تعداد را به تفکیک نمونه‌های پنیر کوزه‌ای و آب نمکی نشان می‌دهد. نمونه‌های پنیر سنتی که دارای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز مثبت به میزان بیش از ۱۰ واحد تشکیل دهنده کلونی در هر گرم می‌باشند می‌توانند دارای توکسین انتروتوکسین استافیلوکوکی باشند. با توجه به بالا بودن تعداد این میکروارگانیسم، احتمال خطر بهداشتی حاصل از وجود انتروتوکسین استافیلوکوکی در فرآورده‌های شیر برای مصرف کننده وجود دارد. شیر ماده‌ی اولیه مناسبتی جهت رشد استافیلوکوکوس اورئوس بوده و فرآورده‌های شیری منبع شناخته شده‌ای برای مسمومیت‌های استافیلوکوکی می‌باشند. در مناطق روستایی و عشایری به علت عدم وجود سردخانه جهت نگهداری شیر و همینطور طعم مطبوع پنیرهای سنتی، ساخت و مصرف پنیرهای سنتی متداول می‌باشد و مصرف این نوع پنیرها می‌تواند به عنوان یکی از عوامل ایجادکننده مسمومیت‌های استافیلوکوکی مطرح باشد. مسمومیت غذایی



استافیلوکوکی یکی از رایج‌ترین بیماری‌های با منشأ غذایی در سراسر جهان است که حاصل از هضم انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی تشکیل شده در غذا است که توسط گونه‌های استافیلوکوکسی کواگولاز مثبت مولد انتروتوکسین بویژه استافیلوکوکوس اورئوس تولید شده‌اند. این ارگانسیم علت معمول ماستیدیس در دامهاست و می‌تواند از زخم پستان دام‌ها یا از دست‌ها و ترشحات بینی کشاورزان و کارکنان شیربندی‌ها و لبنیاتی‌ها وارد شیر شود (۱۴). پاتوژن بودن استافیلوکوکوس اساساً به ترکیبی از شیوع همراه با توکسین، ظرفیت مهاجمی و مقاومت آن به آنتی‌بیوتیک مربوط است (۱۲). محمدی ثانی (۱۳۸۸) تعداد ۴۴۴ نمونه پنیر شامل پنیرهای تهیه شده به روش سنتی، نیمه صنعتی و صنعتی را از سطح توزیع شهرستان‌های مشهد و قوچان جمع‌آوری و از نظر آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس مورد ارزیابی قرار داد. نتایج نشان داد میزان آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس ۹/۴٪ بود. آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس در پنیر سنتی بیشتر از پنیر صنعتی بود (۳/۴٪ در پنیر سنتی در مقایسه با ۰/۵٪ در پنیر صنعتی) و اختلاف معنی داری را با پنیر صنعتی نشان داد (۸).

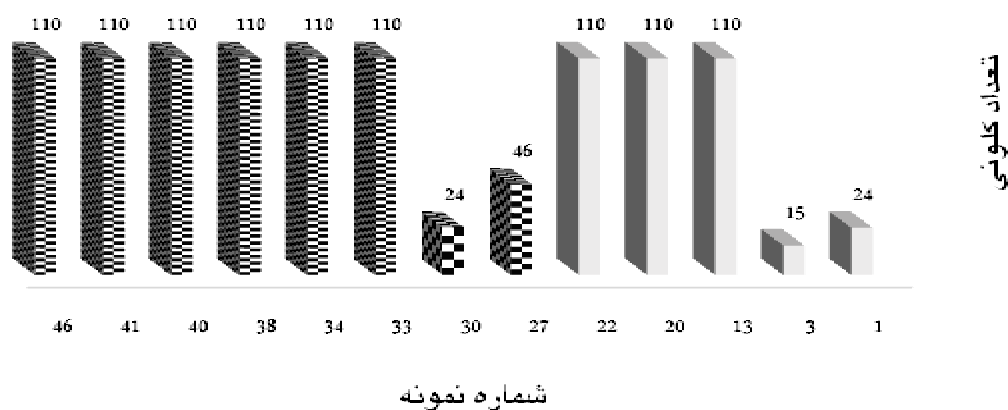
#### ۴- نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج این تحقیق ۲۸/۲٪ پنیرهای سنتی دارای استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز مثبت بودند. آلودگی با استافیلوکوکوس در پنیرهای آب نمکی بیشتر از پنیرهای کوزه‌ای بود. ۱۹/۵٪ پنیرهای سنتی مورد بررسی دارای بیش از ۱۱۰ کلونی در هر گرم پنیر بود بطوریکه ۶/۵٪ آن مربوط به پنیرهای کوزه‌ای و ۱۳/۵٪ آن مربوط به پنیرهای آب نمکی بود. با توجه به روش‌های تهیه‌ی پنیرهای سنتی از شیرخام و راه‌های مختلف ورود استافیلوکوکوس اورئوس به شیر، بررسی و آگاهی از وجود آلودگی پنیر به این باکتری، می‌تواند به کاهش مسمومیت غذایی ناشی از این میکروارگانسیم کمک نماید تا با نظارت بهداشتی بیشتر بر واحدهای سنتی تولیدی و تبدیلی محصولات لبنی بتوان تا حد امکان از مصرف پنیرهای غیر بهداشتی خودداری نمود. برای کاهش آلودگی استافیلوکوکی در شیر، درمان و کنترل ورم پستان در دامداری‌ها همچنین رعایت بهداشت در تولید، حمل و نقل و ذخیره‌سازی شیر ضروری به نظر می‌رسد.

جدول ۲- نتایج شمارش استافیلوکوکوس کواگولاز مثبت به شیوه محتمل‌ترین تعداد

شماره لوله	تعداد کلونی در هر گرم پنیر
شماره نمونه	
۱	۲۴ کلونی
۳	۱۵ کلونی
۱۳	بیش از ۱۱۰ کلونی
۲۰	بیش از ۱۱۰ کلونی
۲۲	بیش از ۱۱۰ کلونی
۲۷	۴۶ کلونی
۳۰	۲۴ کلونی
۳۳	بیش از ۱۱۰ کلونی
۳۴	بیش از ۱۱۰ کلونی
۳۸	بیش از ۱۱۰ کلونی
۴۰	بیش از ۱۱۰ کلونی
۴۱	بیش از ۱۱۰ کلونی
۴۶	بیش از ۱۱۰ کلونی

شمارش استافیلوکوکوس کوآگولاز مثبت به روش MPN



شکل ۲- نتایج شمارش استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز مثبت، به تفکیک نمونه‌های پنیر کوزه‌ای (۲۲-۱) و آب نمکی (۴۶-۲۷)

## ۵- سپاسگزاری

بدین وسیله از جناب آقای دکتر عباس جلیل زاده معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ماکو که با حمایت و مساعدت خود نویسندگان مقاله را یاری نمودند قدردانی می‌شود.

## ۶- منابع

- اسلامی، م.، کاظم کوهی، م.، زاده هاشم، ا.، خدیری، ب. و کشاورز، ح. ۱۳۹۴. بررسی حضور استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز مثبت در پنیرهای سنتی گوسفند عرضه شده در شهرستان مرند. فصلنامه علوم و صنایع غذایی، شماره ۴۶، ۲۱۸-۲۱۱.
- جاهد خانیکی، غ.، کامکار، ا. و تهرانی، ا. م. ۱۳۸۳. بررسی میزان شیوع استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز مثبت در شیر دریافتی مرکز جمع آوری شیر شهرستان گرمسار. مجله دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، شماره ۳، ۷۵-۶۷.
- حسامی راد، ر. و نژاد رزمجوی اخگر، ر. ۱۳۸۷. مطالعه وضعیت جمعیت میکروبی و کلی فرمی پنیر آب نمکی (

نوع گوسفندی) در شرایط تولید سنتی. مجموعه مقالات هجدهمین کنگره ملی علوم و صنایع غذایی مشهد مقدس. ۴. حسامی راد، ر.، نژاد رزمجوی اخگر، ر. و خسروشاهی اصل، ا. ۱۳۸۵. میزان ماندگاری اشرفیاکلی در پنیر کوزه‌ای آذربایجان غربی. مجموعه مقالات شانزدهمین کنگره صنایع غذایی ایران، گرگان.

- دانشمند، ع. ا.، رسولی، م.، کارگر، م. و کیانی، س. ۱۳۸۶. بررسی میزان آلودگی پنیرهای سنتی تازه با گونه های سالمونلا و استافیلوکوکوس اورئوس در شهرستان چهارم- استان فارس. طب جنوب، شماره ۱، ۲۶-۱۹.
- صالحی، ع.، دهقانی فرد، ع. و علیمحمدی، م. ۱۳۹۲. بررسی آلودگی پنیرهای سنتی ليقوان به استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز مثبت توزیع شده در شهر تهران. مجله مهندسی بهداشت محیط، شماره ۲، ۱۳۶-۱۳۰.
- قدرتی آروق، س.، تنومند، ا. و قدرتی آروق، ح. ۱۳۹۰. مطالعه میزان شیوع استافیلوکوکوس اورئوس در پنیرهای سنتی ملکان و میاندوآب. اولین کنگره بین المللی میکروبیشناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تبریز.

16. Gaya, P., Medina, M., Bautista, L. and Nuñez, M. 1988. Influence of lactic starter inoculation, curd heating and ripening temperature on *Staphylococcus aureus* behaviour in Manchego cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 6 (3): 249-257
17. Gökmen, M., Gürbüz, Ü., Torlak, E. and İnal, M. 2013. Identification of *Staphylococcus* spp. isolated in different production stages of white cheese and detection of enterotoxin. *Kocatepe Veterinary Journal*, 6 (2): 7-11
18. Le Loir, Y., Baron, F. and Gautier, M. 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetic Molecular Research*, 2(1):63-76
19. Mirzaei, H. 2011. Microbiological changes in Lighvan cheese throughout its manufacture and ripening. *African Journal of Microbiology Research*, 5:1609-1614
20. Mirzaei, H., Karim, G. and Ghiasi Khosroshahi, A. 2008. The microbiological and chemical quality of traditional Lighvan cheese (white cheese in brine) produced in Tabriz, Iran. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 8: 1594-99
21. Oliveira Hachiya, J., Marques Rossi, GA., Ribeiro, LF., Akira Sato, R., Silva, HO. and Centola Vidal, AM. et al. 2017. Methicillin-resistant *Staphylococcus* spp. isolated from curd cheese "requeijão" and "especialidade láctea type requeijão" sold in Brazil. *Journal of Microbiology*. 47:07:1-6
22. pshldawsey, R.K. 2002. Case studies in food microbiology for food safety and quality. *Royal Society of Chemistry, (RSC)*
23. Reiner, K. 2010. Catalase Test Protocol. Available at: <https://www.asm.org/getattachment/72a871fc-ba92-4128-a194-6f1bab5c3ab7/Catalase-Test-Protocol.pdf> (accessed: Nov. 2007)
24. Spanu, V., Spanu, C., Viridis, S., Cossu, F., Scarano, C. and De Santis, E.P.L. 2012. Virulence factors and genetic variability of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw sheep's milk cheese. *International Journal of Food Microbiol*, 153 (1): 53-57
25. Sylejmani, D., Hamidi, A. and Robaj, A. 2015. Occurrence of *Staphylococcus aureus* and coagulase positive staph. aureus in artisanal cheese in KOSOVO. *Journal of International Scientific Publications*, 3:253-256.
۸. محمدی ثانی، ع.، ۱۳۸۸. بررسی آلودگی پنیرهای موجود در سطح توزیع شهرستان مشهد و قوچان به پاتوژن‌های لیستریا منوسیتوزنز، استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی. مجموعه مقالات دوازدهمین همایش ملی بهداشت محیط، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران.
۹. میرزایی، ح.، جوادی، ا.، فرجلی، م.، شاه محمدی، ا. ر.، منادی سفیدان، ع. و برزگری، ا. ۱۳۹۱. شیوع استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس مقاوم به متی‌سیلین در پنیر و کره محلی: یک مطالعه میدانی در تبریز. مجله تحقیقات دامپزشکی، شماره ۱، ۷۰ - ۶۵.
۱۰. موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، ۱۳۸۴. میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام - شمارش استافیلوکوکوس های کواگولاز مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس و سایر گونه ها) روش استفاده از محیط کشت بردپارکر آگار. استاندارد ملی ایران، شماره ۶۸۰۶-۱.
۱۱. موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، ۱۳۸۶. میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام روش جامع برای شمارش استافیلوکوکوس های کواگولاز مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس و سایر گونه ها)، جستجو، شناسایی و شمارش به شیوه MPN برای تعداد کم میکروارگانیسم. استاندارد ملی ایران، شماره ۶۸۰۶-۳.
12. Argudin, M. A., Mendoza, M. C. and Rodicio, M. R. 2010. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Journal of Toxins*, 2: 1751-1773
13. Baran, A., Erdogan. A., Turgut. T. and Adiguzel, M. C. 2017. A review on the presence of *Staphylococcus* in cheese. *Turkish Journal of nature and science*, 6(2): 100-105
14. Balaban, N., Rasooly, A. *Staphylococcal enterotoxins*, 2000. *International Journal of Food Microbiol*, 61(1): 1-10.
15. Capurro, A., Aspán, A., Ericsson Unnerstad, H., Persson Waller, K. and Artursson, K. 2010. Identification of potential sources of *Staphylococcus aureus* in herds with mastitis problems. *Journal of Dairy Science*, 93:180-191

Staphylococci isolated from raw milk and cheese samples. *Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology*, 68 (2): 73-78.

26. Yücel, N. and Anıl, Y. 2011. Identification and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and coagulase negative

(Short Research Article)

## Bacterial Contamination of Traditional Cheeses of Maku City with *Coagulase-Positive Staphylococci*

Fatemeh Rezaei Darzikola<sup>1</sup>, Amir Tukmechi<sup>2</sup>, Maryam Jafarzadeh Moghaddam<sup>3\*</sup>

1- Expert of Microbiology Laboratory, Maku Branch, Islamic Azad University, Maku, Iran.

2- Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.

3-Ph.D Graduated of Food Technology, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

Received: 21/01/2019

Accepted:10/03/2019

### Abstract

Dairy products play an important role in the nutrition and health of people and cheese is a source of protein, fat, and minerals. Due to its high importance, it has a special position in the diet of the people. However, its contamination with pathogenic microorganisms such as *staphylococci* can endanger human health. In this study, 46 traditional kinds of cheese including 23 samples of salt water cheese and 23 samples of pot (Kope) cheese were prepared from different regions of the city of Maku and the rate of *Staphylococcus aureus coagulase* positive was evaluated by culture method. The results of biochemical tests showed that 28.2 % of the traditional cheeses had *Staphylococcus aureus coagulase* which 17.3 % of them were salted cheese and 10.9 % of them were pot (Kope) cheese. The results of most probable number test showed that 19.5 % of traditional cheeses had more than 110 colonies per gram of cheese. It was found that 6.5 % of pot (Kope) cheese and 13 % of salt water cheeses had an infection rate of more than 110 colonies per gram of cheese. Regarding the high prevalence of *Staphylococcus aureus* infection in these traditional cheeses, milk heating and compliance with hygienic conditions are essential for the preparation of these cheese.

**Keywords:** *Coagulase* positive, *Staphylococcus aureus*, Traditional cheeses, Maku

---

\*Corresponding Author: [mjafarzadeh@tabrizu.ac.ir](mailto:mjafarzadeh@tabrizu.ac.ir)