مجله میکروب شناسی مواد غذائی

اثر ضد میکروبی بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول (BHA) بر روی *سالمونلا تیفی موریوم* و *لیستریا مونوسیتوژنز* در محیط کشت و پنیر سفید ایرانی

علی احسانی[1]، مجتبی رئیسی[2*]، علیجان تبرایی[3]، فرهاد نیک نژاد[4]، حسین نقیلی[1]، مجید امین زارع[1]

1. گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه ارومیه، ایران.
2. دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گلستان، ایران.
3. دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان گلستان، ایران.
4. مرکز تحقیقات علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان گلستان، ایران.

***نویسنده مسئول:** *Raeisi.mojtaba@yahoo.com*

چکیده

هدف از این مطالعه بررسی خاصیت ضد میکروبی بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول بصورت تنها و توأم با اتیلن دی آمین ترا استیک اسید بر باکتریهای *سالمونلا تیفی موریوم* و *لیستریا مونوسیتوژنز* در محیط کشت و در پنیر سفید ایرانی بود. در مرحله اول مطالعه، حداقل غلظت ممانعت کنندگی *بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول* بر روی باکتریهای مورد مطالعه اندازه گیری شد. نمونه های پنیر تهیه شده از شیر پاستوریزه در یک گروه شاهد و سه گروه تیمار بص ورت تجربی با *سالمونلا تیفی موریوم* و *لیستریا مونوسیتوژنز* آلوده شدند . نمونههای تیمارها دارای مقادیر 2500، 5000 و 10000 میکروگرم در میلیلیتر از بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول به تنهایی و مقادیر 2500، 5000 و 10000 میکروگرم در میلیلیتر از بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول توام با اتیلن دی آمین ترا استیک اسید بودند. در مرحله بعد باکتریهای مورد نظر در روزهای مختلف شمارش شدند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد در صورت استفاده از بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول توام با اتیلن دی آمین ترا استیک اسید ، تعداد باکتریهای *سالمونلا تیفی موریوم* و *لیستریا مونوسیتوژنز* موجود در محیط کشت و همچ ن ین در مدل پ نیر سفید ایرانی به مقدار قابل توجهی کاهش میابد . نتایج این مطالعه نشان داد که میتوان از بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول برای افزایش مدت زمان ماندگاری پنیر سفید ایرانی استفاده نمود.

واژگان کلیدی: بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول، *لیستریا مونوسیتوژنز*، *سالمونلا تیفی موریوم*، پنیر سفید ایرانی.

مقدمه

با افزایش روز افزون جمعیت ، تهیه غذای کافی و سالم یکی از موضوعات قابل توجه و بسیار مهم به شمار میرود. از طرف دیگر، نیاز به افزایش عمر ماندگاری مواد غذایی موجب توسعه و بهبود روشهای مؤثر در حفاظت و نگهداری مواد غذایی شده است. اگرچه امروزه شرایط بهداشتی مربوط به تولید و نگهداری مواد غذایی بهبود یافته است، اما هنوز روش-های کنترل میکروارگانیسمها در مواد غذایی نتوانسته بیماریهای با منشاء مواد غذایی را به طور کامل محدود نماید (Kabara, 1981). کنترل میکروارگانیسمها در مواد غذایی یکی از مسائل مورد توجه میکروب شناسان مواد غذایی میباشد و این کنترل برای جلوگیری یا کاهش فساد مواد غذایی و

همچنین کاهش و حذف عوامل بیماری-زا ضروری میباشد. فر آوردههای لبنی به دلیل غنی بودن از مواد غذایی مانند لاکتوز، چربی، پروتئینهای کازئین و پروتئینهای آب پنیر از فساد پذیری بالایی برخوردار میباشند (Mortazavi et al., 2007). پنیر سفید ایرانی جزو پنیرهای نرم میباشد که در آب نمک نگهداری شده و دوره رسیدن را طی میکند. این پنیرها دارای طعم نمکی، کمی اسیدی و دارای خصوصیات مطبوع ارگانولپتیکی هستند و بیشتر در ایران و برخی از کشورهای آسیایی تولید میشوند (Karim, 2000). بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول (BHA)[1] و بوتیلیتید هیدروکسی تولوئن (BHT)[2] از دسته آنتیاکسیدانهای ساختگی هستند که به‌دلیل وجود گروههای فنلی دارای اثر ضد میکروبی نیز میباشند. فعالیت ضد میکروبی آنتیاکسیدانها وابسته به حضور یک گروه هیدروکسیل بر روی آن و قابلیت حل شدن در چربی میباشد. غلظت م ؤثر آنتیاکسیدانهای فنلی دارای اثر ضد میکروبی، 300 تا 1000 میکروگرم در میلیلیتر میباشد و اثر ضد میکروبی آنتیاکسیدانهای فنلی به-واسطه اثر بر روی عمل و ساختمان غشاء سلولی، تشکیل ژنوم، پروتئین و چربی و فعالیت میتوکندری می-باشد. این ترکیبات دارای وزن مولکولی پائین بوده و ترکیب فنلی آنها حاوی 1 تا 3 گروه هیدروکسیل میباشد (Ayaz et al., 1980). لازم به ذکر است که فعالیت بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول با افزایش درجه حرارت، انجماد، مواد اسیدی کننده و مواد شلاته کننده مانند اتیلن دی آمین ترا استیک اسید (EDTA)[3] به دلیل اینکه میزان دسترسی بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول به غشاء سیتوپلاسمی افزایش مییابد (Al khayat et al., 1987). اتیلن دی آمین ترا استیک اسید شلاته کننده مواد غذایی محسوب میشود که ت أثیر نگهدارندههایی مانند بوتیلیتد

[1] Butylated Hydroxy Anisole
[2] Butylated Hydroxy Toluene
[3] Ethylen Diamine Tetra Acetic acid

هیدروکسی آنیزول را قوت میبخشد و به عنوان بازدارنده اکسیداسیون عمل میکند . همچنین حساسیت باکتریهای گرم منفی به آنتی - بیوتیکهایی مانند نایسین و ریفامپین را افزایش میدهد (Mclay, 2002). عوامل میکروبی زیادی در مواد غذایی یافت میشوند که *سالمونلا تیفی موریوم*[1] و *لیستریا مونوسیتوژنز*[2] از جمله مهمترین آنها میباشند. *سالمونلا* قادر به رشد در تمام مواد غذایی است و البته گوشت قرمز، ماهی، تخم مرغ و بهویژه فرآوردههای حاصل از شیر را بیشتر آلوده میکند (Jay, 2000; Razavi Rohani and Griffiths, 1994). *لیستریا مونوسیتوژنز* بطور وسیعی در طبیعت انتشار دارد و بر روی گیاهان، خاک، مدفوع حیوانات، فاضلاب و آب یافت میشود. این ارگانیسم معمولاً در شیر خام، پنیر نرم، گوشت تازه و منجمد و فر آوردههای دریایی قادر به رشد و ایجاد بیماری می - باشد. از مهمترین این بیماریها مننژیت، سپتی سمی و سقط جنین و همچنین گاستروآنتریت را میتوان نام برد (Baron et al., 1994). پیش از این مطالعاتی در زمینه استفاده از بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول علیه برخی از باکتریهای گرم منفی و مثبت صورت پذیرفته است (Davidson and Branen, 1993; Erickson and Tompkin, 1997). اثر ضدمیکروبی بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول بر برخی از باکتریهای گرم منفی مانند *اشریشیا کلی* و *سالمونلا تیفی موریوم* و گرم مثبت مانند *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا مونوسیتوژنز* قبلا مورد مطالعه قرار گرفته است (Brannen et al., 1994). مطالعه حاضر با هدف مطالعه اثر ممانعت کنندگی بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول به صورت تنها و توام با اتیلن دی آمین ترا استیک اسید بر روی باکتریهای *سالمونلا تیفی موریوم* و *لیستریا منوسایتوژنز* در محیط کشت و همچنین در مدل پنیر سفید ایرانی انجام پذیرفت.

مواد و روش کار

این مطالعه تجربی در سال 1389 در بخش بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه در دو مرحله مورد انجام قرار گرفت. در مرحله اول، اثر ضد میکروبی بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول و اتیلن دی آمین ترا استیک اسید بر روی باکتریهای *سالمونلا تیفی موریوم* و *لیستریا منوسایتوژنز* در محیط کشت آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. در مرحله دوم، پس از تهیه پنیر سفید ایرانی، اثر ضد میکروبی موارد فوق بر روی *سالمونلا تیفی موریوم* و *لیستریا منوسایتوژنز* بررسی شد. بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول و اتیلن دی آمین ترا استیک اسید استفاده شده، ساخت شرکت سیگما بود و محلول پایه آنها بوسیله حل کردن بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول در الکل اتیلیک و اتیلن دی آمین ترا استیک اسید در آب مقطر تهیه گردید. مایه پنیر مورد استفاده با منشاء میکروبی و ساخت کشور ژاپن بوده و برای تولید پنیر، از 3 لیتر شیر و میزان 15 میلیلیتر مایه پنیر پس از حل شدن در آب مقطراستفاده شد. میکروارگانیسم

[1] *Salmonella typhimurium*
[2] *Listeria monocytogens*

های مورد استفاده، *سالمونلا تیفی موریوم* (ATCC1730) و *لیستری مونوسایتوژنز* (ATCC 19118) بود که به منظور شناسایی و کشت آنها از محیط‌های کشت *سالمونلا شیگلا آگار*[1] برای *سالمونلا تیفی موریوم* و *لیستری کروم آگار*[2] (مرک، آلمان) برای *لیستری مونوسیتوژنز* استفاده شد. در مرحله اول مطالعه، اثر بوتیل‌تد هیدروکسی آنیزول و اتیلن دی آمین ترا استیک اسید به‌صورت آزمایشگاهی روی باکتریهای مورد نظر، بررسی شد. بدین منظور پس از تهیه دو سری 6 تایی لوله‌های حاوی محیط مایع قلب مغز[3]، میزان 100، 200، 400، 800، 1600و 3200 میکروگرم در میلی‌لیتر، بوتیل‌تد هیدروکسی آنیزول به آنها اضافه شد و پس از آن به هر سری 6 تایی از لوله‌های حاوی محیط مایع قلب مغز، 0/1 میلی‌لیتر از کشت 24 ساعته باکتریهای فوق به صورت مجزا تلقیح گردید. پس از 24 ساعت گرم-خانه گذاری، حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد ضد میکروبی تعیین گردید. برای بررسی اثر توام بوتیل‌تد هیدروکسی آنیزول و اتیلن دی آمین ترا استیک اسید بر روی باکتریهای مورد اشاره، همانند روش ذکر شده در بالا، میزان 100، 200، 400، 800، 1600 و 3200 میکروگرم در میلی‌لیتر از هر یک از بوتیل‌تد هیدروکسی آنیزول و اتیلن دی آمین ترا استیک اسید به طور مساوی، در سری لوله‌های حاوی محیط مایع قلب مغز اضافه گردید و پس از اضافه نمودن باکتریهای فوق و گرمخانه گذاری 24 ساعته، میزان حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد تعیین گردید. لازم به ذکر است که در یک لوله که بعنوان شاهد در نظر گرفته شد، فقط باکتریهای مورد نظر تلقیح گردید و از بوتیل‌تد هیدروکسی آنیزول و اتیلن دی آمین ترا استیک اسید در آن استفاده نشد. در مرحله دوم مطالعه اثر ضد میکروبی بوتیل‌تد هیدروکسی آنیزول و اتیلن دی آمین ترا استیک اسید بر روی باکتریهای مورد مطالعه در پنیر سفید ایرانی مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور برای تهیه پنیر سفید ایرانی، پس از پاستوریزاسیون شیر میزان 1/5 گرم کلرور کلسیم پس از حل شدن در سرم فیزیولوژی به شیر اضافه گردید و سپس

[1] Salmonella Shigella Agar
[2] Listeria Chrome Agar
[3] BHI Broth

برای بررسی اثر ضد میکروبی بوتیلی‌تد هیدروکسی آنی‌زول و اتیلن دی آمین ترا استیک اسید ، 7 بشر برای هر باکتری در نظر گرفته شد که در مرحله اول میزان 200 میلی‌لیتر از شیر پاستوریزه در هر یک از بشرها ریخته شد، بدین صورت که بشر شماره 1 بعنوان کنترل در نظر گرفته شد و در آن هیچ ماده ضد میکروبی اضافه نگردید و در بشرهای شماره 2 تا 4 به ترتیب میزان 2500، 5000 و 10000 میکروگرم در میلیلیتر از بوتیلی‌تد هیدروکسی آنی‌زول و در بشرهای شماره 5 تا 7 به ترتیب میزان 2500، 5000 و 10000 میکروگرم در میلیلیتر از بوتیلی‌تد هیدروکسی آنی‌زول و اتیلن دی آمین ترا استیک اسید به‌صورت توام اضافه گردید. در مرحله بعد در همه 7 بشر در نظر گرفته شده برای هر کدام از باکتریها، میزان 1 میلی لیتر از رقت 10^7 باکتریها بصورت مجزا تلقیح گردید و در مرحله بعد مایه پنیر به میزان 0/3 درصد به هر بشر اضافه شد. پس از انعقاد شیر و تولید لخته، محتویات هر کدام از بشرها آبگیری شد و لخته-های تشکیل شده تحت فشار قرار گرفتند. در نهایت پس از شماره گذاری، نمونه‌ها در دمای 4 درجه سانتیگراد قرار داده شدند و در روزهای 0، 1، 3، 5، 7 و 9 نمونه برداری و شمارش کلنی باکتریهای مورد نظر با استفاده از محیط‌های کشت اختصاصی صورت پذیرفت. لازم به ذکر است که هر یک از آزمایشات انجام شده در این مطالعه در 3 تکرار انجام گرفت.

نتایج

در این مطالعه در مرحله‌ی اول اثر ضد میکروبی بوتیلی‌تد هیدروکسی آنی‌زول و اتیلن دی آمین ترا استیک اسید در محیط آزمایشگاهی مورد مطالعه قرار گرفت. حداقل غلظت ممانعت از رشد بوتیلی‌تد هیدروکسی آنی‌زول بر روی باکتریهای *سالمونلا تیفی موریوم* و *لیستریا منوسایتوژنز* به ترتیب، 3200 و 800 میکروگرم در میلی‌لیتر بدست آمد. همچنین حداقل غلظت ممانعت از رشد بوتیلی‌تد هیدروکسی آنی‌زول و اتیلن دی آمین ترا استیک اسید بر باکتریهای *سالمونلا تیفی موریوم* و *لیستریا منوسایتوژنز* به ترتیب 1600 و 200 میکروگرم در میلیلیتر تعیین گردید. در مرحله‌ی دوم اثر ضد میکروبی بوتیلی‌تد هیدروکسی آنی‌زول و اتیلن دی آمین ترا استیک اسید بر روی باکتریهای مورد مطالعه در پنیر سفید ایرانی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بررسی در جداول 1 تا 4 درج شده است. بر اساس نتایج، بوتیلی‌تد هیدروکسی آنی‌زول به صورت تنها اثر کمی در مهار رشد سالمونلا دارد ولی همراه با اتیلن دی آمین ترا استیک اسید اثر ضد میکروبی آن به طور معنی داری افزایش می‌یابد. همچنین با افزایش غلظت بوتیلی‌تد هیدروکسی آنی‌زول و اتیلن دی آمین ترا استیک اسید اثر ضد میکروبی آنها به طور معنی داری افزایش می‌یابد ($P<0.05$).

بحث

هدف از این مطالعه ارزیابی اثر ضد میکروبی این ماده در محیط کشت و پنیر سفید ایرانی بود. بوتیلی‌تد هیدروکسی آنی‌زول آنتی-اکسیدان فنلی می‌باشد که دلیل

استفاده از آن در مواد غذایی به تاخیر انداختن اکسیداسیون چربی-های غیر اشباع میباشد. بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول این عمل را با دادن اتم هیدروژن به رادیکال آزاد و به تعویق انداختن واکنش-های زنجیره ای لیپیدها انجام می-دهد (Al khayat et al., 1987). در مطالعه حاضر مشخص گردید که بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول اثر ضد میکروبی نسبتاً مناسبی بر روی باکتری گرم مثبت مورد آزمایش دارد بهطوریکه حداقل غلظت ممانعت از رشد آن برای *لیستری/ مونوسیتوژنز* 800 میکروگرم در میلی لیتر بهدست آمد. این در حالی است که اثر آن بر روی باکتری گرم منفی مورد مطالعه محدود بوده و این نتیجه با سایر مطالعات همخوانی دارد. در مطالعهای که در سال 1980 صورت گرفت، حداقل غلظت ممانعت کنندگی بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول بر باکتریهای گرم مثبت در حدود 250 تا 500 میکروگرم در میلیلیتر بوده درحالیکه برای باکتریهای گرم منفی در حدود 2000 تا 5000 میکروگرم در میلیلیتر عنوان شده است (Kabara, 1980). در مطالعه دیگری که در سال 1997 انجام گرفت مشخص گردید بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول و بوتیلیتید هیدروکسی تولوئن در مقدار بین 100 تا 400 میکروگرم در میلیلیتر به طور معنی داری میزان کلی فرم مدفوعی موجود در گوشت گاو سرد شده را کاهش میدهد در حالیکه میزان فلور باکتریهای عامل فساد توسط آن کاهش نمییابد. بر اساس این مطالعه، هر چه میکروارگانیسم های عامل فساد بیشتر از سویه های گرم منفی باشند حساسیت کمتری به آنتیاکسیدانهای فنلی نشان میدهند که این اثر بر اساس سویه و تعداد باکتریها متفاوت میباشد (Erickson and Tompkin, 1997). همانطور که ذکر گردید حداقل غلظت ممانعت از رشد بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول بر روی باکتری سالمونلا تیفی موریوم 3200 میکروگرم در میلیلیتر تعیین گردید. علت اثر کمتر آن بر روی باکتریهای گرم منفی وجود لایه لیپوپلیساکاریدی در دیواره سلولی باکتریهای گرم منفی عنوان شده است. این لایه باعث میشود بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول به تنهایی نتواند اثر مناسبی بر روی باکتریهای گرم منفی ایجاد نماید. برخی گزارشات *استافیلوکوکوس اورئوس* را بهعنوان حساسترین باکتری به بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول معرفی نمودهاند و عنوان شده که برای ممانعت از رشد باکتریهای گرم منفی غلظت بیشتری از بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول نیاز میباشد (Brannen et al., 2000). در بررسی دیگری در سال 1993 مشخص شد که برخی از باکتریهای گرم منفی مانند *ویبریو پارا همولیتیکوس* و *سودوموناس فلورسنس* ممکن است حساسیت بیشتری را به بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول نشان دهند (Davidson and Branen, 1993). در مطالعه حاضر زمانیکه از اتیلن دی آمین ترا استیک اسید بهصورت توام با بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول استفاده گردید، اثر ضد میکروبی آن بر روی باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* بهصورت معنی داری افزایش یافت. علت اثر بیشتر بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول در زمان استفاده توام با اتیلن دی آمین ترا استیک

اسید، اثر شلاته کنندگی آن می‌باشد که باعث می‌شود که با کاتیون‌های ارتباط دهنده که بین لایه لیپوپلی ساکاریدی و پپتیدوگلیکان وجود دارند ترکیب شده و این اتصالات محکم را از بین برده و منجر به سست شدن لایه لیپوپلی‌ساکاریدی که در غشاء خارجی باکتریهای گرم منفی وجود دارد می‌شود. این امر در نهایت با افزایش نفوذپذیری آن دسترسی بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول را به غشاء سیتوپلاسمی آسان می‌سازد. لازم به ذکر است که حداقل غلظت ممانعت از رشد *لیستری/ مونوسیتوژنز* نیز در زمان همراه نمودن اتیلن دی آمین ترا استیک اسید با بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول کاهش یافت. در مطالعه‌ی حاضر همچنین اثر ممانعت کنندگی بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول به تنهایی و به همراه اتیلن دی آمین ترا استیک اسید در شیر پاستوریزه تلقیح شده با باکتری‌های *سالمونلا* و *لیستری/ مونوسیتوژنز* مورد بررسی قرار گرفت که نتایج نشان دهنده اثر ناکافی بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول بهصورت تنها در مهار رشد سالمونلا و اثر مناسب آن در مهار رشد *لیستری/ مونوسیتوژنز* می‌باشد و این در حالیاست که استفاده‌ی توام از بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول و اتیلن دی آمین ترا استیک اسید باعث ایجاد اثر مناسب در مهار رشد *سالمونلا* و *لیستری/ مونوسیتوژنز* شده است. این افزایش اثر در مورد سالمونلا به صورت چشمگیر و معنی دار بوده است. نکته دیگر این است که زمانیکه آنتی‌اکسیدان‌های فنلی در حداقل غلظت‌های ممانعت کنندگی به کار می‌روند حضور چربی در غذا اثر این آنتیاکسیدان‌ها را به میزان قابل توجه‌ی کاهش می‌دهد. لذا اثر بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول در جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌ها در محصولات کم چرب موثرتر از محصولات پرچرب می‌باشد. در مطالعه‌ای که در سال 1998 صورت گرفت، عنوان گردید جمعیت اولیه 3 نوع سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* در پنیر با استفاده از مصرف بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول با غلظت 200 میکروگرم در میلیلیتر

کاهش چشمگیری نیافت و این‌گونه نتیجه گیری شد که چربی غذا باعث کاهش خاصیت ضد میکروبی آنتی-اکسیدان‌های فنلی شده باشد (Paradu et al.,1998). با توجه به اینکه وسعت عمل مواد نگهدارنده مجاز به تنهایی محدود بوده و استفاده از مقادیر بالاتر نیز خالی از خطر نیست، استفاده توام از بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول با مواد ضد میکروبی دیگر مانند اتیلن دی آمین ترا استیک اسید به منظور افزایش قدرت ضد میکروبی و همچنین کاهش میزان مورد استفاده از هر کدام میتواند بسیار مهم و تأثیر گذار باشد. این مطالعه نشان داد که میتوان از بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول به همراه اتیلن دی آمین ترا استیک اسید جهت کاهش رشد باکتریهای پاتوژن و افزایش طول عمر نگهداری پنیر سفید ایرانی استفاده نمود.

جدول 1- جمعیت *سالمونلا تیفی موریوم* (Log_{10} CFU/g) در طی 9 روز نگهداری پنیر سفید ایرانی در شرایط وجود BHA در دمای یخچال

	مدت زمان نگهداری پنیر(روز)					
BHA	0	1	3	5	7	9
کنترل	57±0/15^{CD} 7/	/8±0/10^{BCD} 9	/37±0/25^{BCD} 10	/77±0/06^{BCD} 10	/17±0/12^{BCD} 11	/27±0/15^{BCD} 12
2500	7/13±0/15	/67±0/12^{CD} 8	/43±0/15^{ACD} 9	9/8±0/10^{ACD}	9/9±0/20^{ACD}	/1±0/10^{ACD} 11
5000	/03±0/06^{A} 7	/57±0/15^{AD} 8	/43±0/12^{ABD} 8	/77±0/12^{ABD} 7	/67±0/12^{ABD} 7	8/6±0/10^{ABD}
10000	/73±0/06^{A} 6	03±0/06^{ABC} 8/	/37±0/15^{ABC} 7	/07±0/21^{ABC} 7	6/8±0/10^{ABC}	/63±0/12^{ABC} 7

حرف A نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار با گروه کنترل میباشد ($P<0/05$).
حرف B نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار با گروه دارای 2500 میکروگرم در میلی لیتر بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول میباشد ($P<0/05$).
حرف C نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار با گروه دارای 5000 میکروگرم در میلی لیتر بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول میباشد ($P<0/05$).
حرف D نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار با گروه دارای 10000 میکروگرم در میلی لیتر بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول میباشد ($P<0/05$).

جدول 2- جمعیت *سالمونلا تیفی موریوم* (Log_{10} CFU/g) در طی 9 روز نگهداری پنیر سفید ایرانی در شرایط همراهی بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول و EDTA در دمای 4 درجه سانتی گراد

	مدت زمان نگهداری پنیر (روز)					
BHA+EDTA	0	1	3	5	7	9
کنترل	57±0/15^{BCD} 7/	/8±0/10^{BCD} 9	/37±0/25^{BCD} 10	/77±0/06^{BCD} 10	/17±0/12^{BCD} 11	/27±0/15^{BCD} 12
2500	97±0/06^{AD} 6/	/2±0/10^{AD} 7	/27±0/12^{AD} 7	/10±0/17^{ACD} 7	6/9±0/17^{AD}	/67±0/21^{ACD} 6
5000	/93±0/12^{A} 6	07±0/15^{AD} 7/	/87±0/15^{AD} 6	6/7±0/10^{ABD}	6/33±0/06^{A}	/03±0/12^{AB} 6
10000	/57±0/21^{AB} 6	13±0/12^{ABC} 6/	/03±0/10^{ABC} 6	6±0/15^{ABC}	5/8±0/17^{AB}	/63±0/21^{AB} 5

حرف A نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار با گروه کنترل میباشد (P<0/05).
حرف B نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار با گروه دارای 2500 میکروگرم در میلی لیتر بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول و EDTA میباشد (P<0/05).
حرف C نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار با گروه دارای 5000 میکروگرم در میلی لیتر BHA و EDTA میباشد (P<0/05).
حرف D نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار با گروه دارای 10000 میکروگرم در میلی لیتر بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول و EDTA میباشد (P<0/05)

جدول3- رفتار رشد *لیستریا مونوسیتوژنز* (Log_{10} CFU/g) در طی 9 روز نگهداری پنیر سفید ایرانی در شرایط وجود BHA در دمای یخچال

	مدت زمان نگهداری پنیر(روز)					
BHA	0	1	3	5	7	9
کنترل	$7/23\pm0/15^{D}$	$7/9\pm0/12^{BCD}$	$8/7\pm0/20^{BCD}$	$9/13\pm0/12^{BCD}$	$10/17\pm0/21^{BCD}$	$10/77\pm0/15^{BCD}$
2500	$7/1\pm0/10$	$7\pm0/10^{AD}$	$6/9\pm0/40^{AD}$	$6/8\pm0/10^{AD}$	$6/85\pm0/12^{ACD}$	$6/57\pm0/06^{ACD}$
5000	$7/03\pm0/15$	$6/83\pm0/06^{AD}$	$6/63\pm0/12^{AD}$	$6/2\pm0/20^{A}$	$6\pm0/20^{AB}$	$5/9\pm0/15^{AB}$
10000	$6/75\pm0/21^{A}$	$6/35\pm0/06^{ABC}$	$5/93\pm0/06^{ABC}$	$5/9\pm0/17^{AB}$	$5/65\pm0/06^{AB}$	$5/47\pm0/15^{AB}$

حرف A نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار با گروه کنترل میباشد (P<0/05).
حرف B نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار با گروه دارای 2500 میکروگرم در میلی لیتر بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول میباشد (P<0/05).
حرف C نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار با گروه دارای 5000 میکروگرم در میلی لیتر بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول میباشد (P<0/05).
حرف D نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار با گروه دارای 10000 میکروگرم در میلی لیتر بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول میباشد (P<0/05).

جدول 4- رشد *لیستریا مونوسیتوژنز* (Log_{10} CFU/g) در طی 9 روز نگهداری پنیر سفید در شرایط همراهی BHA و EDTA در دمای یخچال

	مدت زمان نگهداری پنیر(روز)					
BHA+EDTA	0	1	3	5	7	9
کنترل	$/23\pm0/15^{BCD}$ 7	$/9\pm0/12^{BCD}$ 7	$8/7\pm0/2^{BCD}$	$/13\pm0/12^{BCD}$ 9	$/17\pm0/21^{BCD}$ 10	$/77\pm0/15^{BCD}$ 10
2500	$/67\pm0/10^{ACD}$ 6	$/17\pm0/10^{AD}$ 6	$6\pm0/40^{AD}$	$5/8\pm0/10^{ACD}$	$5/7\pm0/12^{AD}$	$6/65\pm0/06^{ACD}$
5000	$6/25\pm0/15^{AB}$	$5/85\pm0/06^{A}$	$5/7\pm0/12^{A}$	$5/3\pm0/20^{AB}$	$5/25\pm0/20^{AD}$	$5/1\pm0/15^{ABD}$
10000	$5/95\pm0/21^{AB}$	$/75\pm0/06^{AB}$ 5	$/33\pm0/06^{AB}$ 5	$5/1\pm0/17^{AB}$	$4/65\pm0/06^{AB}$	$4/2\pm0/15^{ABC}$

حرف A نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار با گروه کنترل میباشد (P<0/05).
حرف B نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار با گروه دارای 2500 میکروگرم در میلی لیتر بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول و EDTA میباشد (P<0/05).
حرف C نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار با گروه دارای 5000 میکروگرم در میلی لیتر BHA و EDTA میباشد (P<0/05).
حرف D نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار با گروه دارای 10000 میکروگرم در میلی لیتر بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول و EDTA میباشد (P<0/05).

References

1. Al khayat, M.A., Blank, G., and Biliaderis, C. 1987. Germination and outgrowth of *Bacillus suibtilis* spores in the presence of selected antioxidants. J Food Protect. 8: 50-57.
2. Ayaz, M., Luedecke, L.O., and Branen, A.L. 1980. Antimicrobial effect of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. J Food Protect. 4: 43-47.
3. Baron, E.J.O., Peterson, L.R., and Finegold, S.M. 1994. Baily and Scotts Microbiology, Toronto, Mosby, p: 168-176.
4. Brannen, A.L., Davidson, P.M., and Katz, B. 2000. Antimicrobial properties of phenolic antioxidants and lipids. Food Technol. 934: 42-45.
5. Davidson, P.M., and Branen, A.L. 1993. Antimicrobial in foods. 2ed Ed. Marcel Dekker, USA, New York, p: 272-278.
6. Erickson, D.K., and Tompkin, RB. 1997. Antimicrobial and antirancidity agents. Environ Microbiol. 44: 604-617.
7. Jay, M.J. 2000. Modern Food Microbiology, 2ed Ed, Aspen Publishers, New York, p: 11-19.
8. Kabara, J.J. 1980. Grass antimicrobial agents for cosmetic products. Cosmetic Chem. 37: 65-70.
9. Kabara, J.J. 1981. Food grade chemicals for use in designing food preservatives. J Food Protect. 44: 633-647.
10. Karim, G. 2000. Milk and milk products, Jahade Daneshgahi Publisher Co, Tehran, pp: 620.
11. 10. Mclay, J.K. 2002. The effect of monolourin and lactoproxidase on *E.coli* O157:H7. Int J Food Microbiol. 73: 11-19.
12. Mortazavi, S.A., Dezyani, M., Ezzati, R., and Arab, H. 2007. Production and use of whey protein in food industry, Parivar Publisher Co, Tehran, pp: 485.
13. Paradu, J.L., Chirife, J., and Magrimi, R.C. 1998. Effect of BHA and BHT and Potassium sorbate on growth of Staphylococcus aureus in a model system and process cheese. J Food Protect. 45: 1108-1111.
14. Razavi Rohani, S.M., and Griffiths, M.W. 1994. The effect of mono and polyglycerol laurate in spoilage and pathogenic bacteria association with foods. Food Microbiol. 16: 59-74.

Comment [z1]: 1 مساوی نیستند. اگر سمت چپی خط بیشتر شد طوری نیست ولی سمت راستی اصلا نباید بزرگتر باشد

Antibacterial effect of Butylated Hydroxy Anisole (BHA) on *Salmonella typhymurium* and *Listeria monocytogens* in Culture media and Iranian White Cheese

Ehsani A[1], Raeisi M[2*], Tabarraei A[3], Nik Nezhad F[4], Naghili H[1], Aminzare M[1]

1. Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.
2. Faculty of Health, Golestan University of Medical Sciences, Golestan, Iran
3. Faculty of Medical Sciences, Golestan University Of Medical Sciences, Golestan, Iran.
4. Laboratory Science Research Center, Golestan University of Medical Sciences, Golestan, Iran.

[*]**Corresponding author:** *raeisi.mojtaba@yahoo.com*

Abstract

The aim of this study is to evaluate antimicrobial effect of Butylated Hydroxy Anisole alone and in combination with EDTA against *S. typhimurium* and *L. monocytogenes* in culture media and Iranian white cheese. At first phase, Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) of Butylated Hydroxy Anisole and EDTA against bacteria were measured. The samples of cheese made from pasteurized milk where infected experimentally with *S. typhimurium* and *L. monocytogenes*. They were divided as a control and other samples that have values of 2500, 5000 and 10000 µg/ml of BHA, and combination of 2500, 5000 and 10000 µg/ml of BHA and EDTA. In the next phase of the study, bacteria were counted at different days. The results obtained from this study showed that using combination of BHA and EDTA can properly reduce number of *S.typhimurium and L. monocytogenes* in culture media and Iranian white cheese.This study demonstrated that BHA can be used for increase shelf life of Iranian white cheese.

Keywords: BHA, *Salmonella typhymurium*, *Listeria monocytogens*, Iranian White Cheese.