مطالعه اثر غلظت‌های مختلف نمک بر بقای *مایکوباکتریوم اویوم* زیرگونه *پاراتوبرکلوزیس* در پنیر سفید فراپالایشی ایرانی

شهرام حنیفیان[۱*]، حسین جدیری[۲]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز، گروه علوم و صنایع غذایی، تبریز، ایران.
۲- شرکت شیر پاستوریزه پگاه آذربایجان شرقی، بخش تحقیق و توسعه، تبریز، ایران.
* نویسنده مسئول مکاتبات: hanifian@iaut.ac.ir
(دریافت مقاله: ۹۲/۴/۱۱ پذیرش نهایی: ۹۲/۷/۲۳)

چکیده

مایکوباکتریوم اویوم زیرگونه *پاراتوبرکلوزیس* (*مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس*) به دلیل ارتباط احتمالی با بیماری کرون (Crohn's disease) در انسان به عنوان یک مخاطره بهداشتی برای سلامتی عمومی محسوب می‌گردد. هدف این مطالعه بررسی اثر غلظت‌های مختلف نمک بر بقای *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* طی دوره رسیدن و نگه‌داری پنیر سفید فراپالایشی ایرانی است. شیر پاستوریزه گاوی متعاقب فرآیند فراپالایش با تعداد ۲ واحد لگاریتمی در هر گرم (Log cfu/g) *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* تلقیح و سپس نمونه‌های پنیر حاوی مقادیر ۲٪، ۳٪ و ٤٪ نمک از آن تهیه گردید. تعداد *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* طی دوره رسیدن و نگه‌داری با استفاده از روش‌های *F57*-Quantitative Real-Time PCR (*F57*-qPCR) و کشت ارزیابی شد. به موازات آن، جمعیت باکتری‌های لاکتیکی کشت آغازگر و خصوصیات فیزیکوشیمیایی در نمونه‌های پنیر تعیین گردید. بر اساس نتایج مطالعه، کاهش تعداد *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* در نیمه اول دوره نگه‌داری (روز ۱ تا روز ۳۰) در تمامی نمونه‌ها آهسته و غیرمعنی‌دار (p>۰/۰۵) بود. اما با پیشرفت این دوره (از روز ۳۰ تا روز ٦۰)، روند کاهش تعداد *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* سریع و به لحاظ آماری معنی‌دار (p<۰/۰۱) گردید. هم‌چنین، در پایان دوره نگه‌داری (روز ٦۰) تفاوت تعداد *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* در نمونه‌های پنیر دارای ٤٪ نمک، به طور معنی‌داری (p<۰/۰۱) کمتر از نمونه‌های تهیه شده با ۲٪ و ۳ ٪ نمک بود. با این حال در تمامی نمونه‌ها *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* بقای خود را تا انتهای دوره نگه‌داری حفظ نمود. به نظر می‌رسد استفاده از غلظت‌های بالاتر نمک روند کاهش *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* را تسریع می‌کند. به علاوه، با توجه به اثر زمان بر روند از بین رفتن *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس*، نگه‌داری پنیر سفید فراپالایشی تا اواخر دوره موجب غیرفعال شدن تعداد بیشتری از *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: پنیر سفید فراپالایشی ایرانی، *مایکوباکتریوم اویوم* زیرگونه *پاراتوبرکلوزیس*، نمک، *F57*-Real-Time PCR

مقدمه

پنیر سفید فراپالایشی ایرانی (Iranian ultra-filtrate white cheese) از شیر پاستوریزه (۷۲ درجه سلسیوس و ۱۵ ثانیه) گاو و متعاقب فرآیند فراپالایش تولید می‌گردد. این پنیر با افزودن رنت و باکتری‌های آغازگر لاکتیکی مزوفیل (mesophilic lactic acid bacteria) تهیه می‌شود. از دیگر خصوصیات پنیر سفید فراپالایشی دارا بودن حداقل میزان ۳٤ درصد (وزنی-وزنی) ماده خشک و حداقل pH بین ٤/٦ تا ٤/٨ می‌باشد. در این نوع پنیر، نمک به مقدار ۲ تا ٤ درصد و به صورت خشک (dry salting) به لخته اضافه می‌شود (Karami et al., 2009). طبق دستورالعمل تهیه پنیر سفید فراپالایشی ایرانی، این نوع پنیر پس از طی دوره رسیدن (Ripening) کوتاه مدت (در دمای ۲۷ درجه سلسیوس به مدت ۱ روز) و دوره نگه‌داری (در دمای ۸ درجه سلسیوس به مدت ۱ تا ۲ هفته) به بازار عرضه می‌گردد (Karami et al., 2009).

مایکوباکتریوم اویوم زیرگونه *پاراتوبرکلوزیس* (*مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس*) عامل بیماری یون (John's disease) در نشخوارکنندگان اهلی و وحشی است (Botsaris et al., 2010). به دلیل ماهیت مزمن این بیماری، علایم بالینی معمولاً ۲ تا ۵ سال بعد از آلوده شدن دام بروز می‌یابد. این در حالی است که دام‌های آلوده ۱۸ ماه قبل از شروع علایم بیماری، باکتری را از طریق مدفوع و شیر دفع می‌کنند (Slana et al., 2008). به ویژه آن که اسهال مزمن و مقاوم به درمان از علایم بارز این بیماری است و می‌تواند موجب آلودگی شیر و محیط دامداری گردد. مطالعات انجام یافته نیز حاکی از افزایش احتمال آلودگی ثانویه شیر هنگام شیردوشی دستی می‌باشند (Grant and Rees, 2010; Hanifian et al., 2013).

از سال ۱۹۳۲ فرضیه *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* به عنوان عامل احتمالی بیماری کرون (Crohn's disease) در انسان مطرح شد (Rodr□guez-Lázaro et al., 2005). چرا که در بسیاری از مطالعات انجام یافته این باکتری از بیماران مبتلا به کرون جداسازی گردید. در مقابل در تعدادی دیگر از بررسی‌ها، *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* و شواهد حضور آن از جمله وجود آنتی‌بادی اختصاصی و DNA باکتری در مبتلایان به کرون گزارش نشده است (Harris and Barletta, 2001). به رغم یافته‌های متناقض در این باره، شباهت‌های علایم بالینی و کالبدگشایی بیماری یون و کرون احتمال نقش *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* در بیماری کرون را قوت می‌بخشد. به همین دلیل این باکتری به عنوان یک مخاطره بهداشتی برای سلامتی عمومی مطرح شده است (Klanicova et al., 2012). در همین راستا مطالعات متعددی با هدف ردیابی و جداسازی *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* انجام یافته است (Eltholth et al., 2009). نتیجه این بررسی‌ها در سرتاسر جهان حاکی از شیوع بالای این باکتری در بین گله‌های گاو شیرده و شیر تولیدی آن‌هاست (Okura et al., 2012). در ایران نیز شیوع بالای *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* در شیرهای خام و پاستوریزه گزارش گردیده است (Fathi et al., 2011; Anzabi and Hanifian, 2012; Hanifian et al., 2013).

به رغم شواهد موجود در ارتباط با آلودگی بالای شیرهای خام با *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* و پیامدهای آن برای سلامت مصرف کنندگان شیر و

فرآورده‌های آن، بررسی‌های محدودی در مورد بقای این باکتری در مواد غذایی و از آن جمله در انواع مختلف پنیر صورت پذیرفته است (Spahr and Schafroth, 2001; Donaghy et al., 2004). این مطالعه با هدف بررسی رفتار *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* و ارزیابی غلظت‌های مختلف نمک بر بقای آن طی دوره رسیدن و نگه‌داری پنیر سفید فراپالایشی ایرانی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

- تهیه مقدار تلقیح *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس*

در این مطالعه *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* سویه DSM ٤٤١٣٣ (German Collection of Microorganisms and Cell, Germany) برای تلقیح در پنیر سفید فراپالایشی مورد استفاده قرار گرفت. برای این منظور ابتدا باکتری در محیط اختصاصی Middlebrook 7H9 broth (Fluka, Switzerland) کشت و به مدت ٤٥ روز در ۳۷ درجه سلسیوس به صورت هوازی گرمخانه‌گذاری گردید. سپس سلول‌های میکروبی با استفاده از سانتریفیوژ با شتاب ٤٠٠٠ ×g و مدت ۲۰ دقیقه جداسازی شد. سلول‌های میکروبی در ۲/۵ میلی‌لیتر محلول استریل فسفات‌بافرنمکی (PBS) حاوی ۰/۰۵ درصد (حجمی-حجمی) توین ۲۰ (PBS-T) (Merck, Germany) با pH معادل ۷/٤ به طور کامل مخلوط گردید تا سوسپانسیون یکنواختی به دست آید (Donaghy et al., 2004). یکنواختی پراکندگی سلول‌های باکتریایی و هم‌چنین تعداد تقریبی آن در سوسپانسیون با استفاده از لام Thoma ارزیابی گردید. سپس تعداد دقیق *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* در سوسپانسیون با روش (*F57*-qPCR) *F57*-quantitative real time PCR تعیین شد (Hanifian et al., 2013). قبل از تلقیح باکتری، سوسپانسیون باکتری با استفاده از محلول استریل PBS-T رقیق گردید تا تعداد آن به ۲ واحد لگاریتمی در هر گرم (Log cfu/g) از شیر فراپالایش شده برسد.

- تهیه پنیر سفید فراپالایشی ایرانی

نمونه‌های پنیر در کارخانه شیر پاستوریزه پگاه آذربایجان‌شرقی و طبق دستورالعمل تهیه پنیر سفید فراپالایشی تهیه گردیدند (Bylund, 1995). برای این منظور ابتدا شیر گاو تا دمای ۷۲ درجه سلسیوس و مدت ۱۵ ثانیه پاستوریزه شد. سپس طی فرآیند فراپالایش مقدار ۵/۱ کیلوگرم شیر به ۱ کیلوگرم شیر فراپالایش شده (Retentate) تغلیظ شد و این بار در دمای ۷۸ درجه سلسیوس به مدت ٦٠ ثانیه پاستوریزه گردید. شیر تغلیظ شده ابتدا تا ۳۵ درجه سلسیوس خنک‌سازی و با تعداد Log cfu/g ۲ از *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* تلقیح شد. سپس کشت آغازگر متشکل از باکتری‌های لاکتیکی هوموفرمانتاتیو (FD-DVS FRC-65) (Chr. Hansen, Denmark) به مقدار ۱۰۰ گرم به ازای ۵۰۰۰ کیلوگرم شیر فراپالایش شده اضافه گردید و به ظروف مخصوص پنیر که قبلاً به ماده ضدچسبندگی (۱۵ ppm) آغشته شده بود (Danapak, Denmark) انتقال داده شد. در نهایت رنت (Chr. Hansens, Denmark) به مقدار ۰/۰۰۲ درصد (وزنی-وزنی) و ماده ضدکف (۱۰ ppm) به مخلوط اضافه گردید. مرحله لخته شدن پنیر در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و مدت ۲۰ دقیقه انجام گرفت. سطح لخته با کاغذ مخصوص (Parchment paper) پوشانده شد و

پس از افزودن مقادیر ۲، ۳ و ٤ درصد نمک بر روی نمونه‌های مختلف پنیر، درب ظروف با فویل آلومینیمی مسدود گردید. نمونه‌های پنیر برای طی دوره رسیدن به مدت ۱ روز (یعنی تا هنگام نزول pH نمونه‌ها به حدود ۰/۱ ± ٤/۷) در گرمخانه ۲۷ درجه سلسیوس قرار گرفتند. در نهایت نمونه‌ها به مدت ۲ ماه در سردخانه ۸ درجه سلسیوس نگه‌داری شدند (Karami et al., 2009).

- طرح مطالعه

سه نوع پنیر سفید فراپالایشی (با در نظر گرفتن غلظت‌های ۲، ۳ و ٤ درصد نمک) و به تعداد ۸ نمونه از هر نوع پنیر تهیه شد. آزمون‌های میکروبی (شمارش *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* و شمارش باکتری‌های کشت آغازگر) و شیمیایی (pH، درصد رطوبت و درصد نمک) بر روی نمونه‌های پنیر در یک دوره ٦۰ روزه و طی مراحل زیر انجام گرفت: ۱- زمان تهیه پنیر (روز صفر)؛ ۲- متعاقب رسیدن (Ripening) در ۲۷ درجه سلسیوس به مدت ۱ روز (روز ۱)؛ ۳- طی دوره نگه‌داری در دمای ۸ درجه سلسیوس (روزهای ۱۰، ۲۰، ۳۰، ٤۰، ۵۰ و ٦۰).

- آماده‌سازی نمونه‌های پنیر برای آزمایش

مقدار ۱۰ گرم از هر نمونه پنیر با ۹۰ میلی‌لیتر محلول رقیق‌کننده پنیر مخلوط گردید. ترکیب محلول رقیق‌کننده از سیترات سدیم (۲ درصد)، کازیتون (۱ درصد) و کلریدسدیم (۰/۵ درصد) (Merck, Germany) تشکیل شده بود (Hanifian and Khani, 2012). مخلوط پنیر و رقیق‌کننده به مدت ٤۵ دقیقه در بن‌ماری ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفت تا سوسپانسیون کاملاً یکنواخت به دست آید. دو مقدار ۵۰ میلی‌لیتری از هر سوسپانسیون به دو فالکون استریل انتقال یافت و در شتاب g× ٤۰۰۰ و مدت ۳۰ دقیقه رسوب داده شد. مایع رویی فالکون‌ها حذف و هر یک از رسوب‌ها در ۲ میلی‌لیتر PBS-T حل و به میکروتیوب استریل انتقال داده شد. محتویات میکروتیوب با شتاب g× ۱٦۰۹۹ رسوب داده شد و مایع رویی حذف گردید (Hanifian and Khani, 2012). رسوب‌های حاصل از هر نمونه پنیر برای استخراج DNA و آزمایش کشت میکروبی مورد استفاده قرار گرفت.

- استخراج DNA و شمارش *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* با روش Quantitative Real-Time PCR

برای استخراج DNA ژنومی *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* از روش (Hanifian et al., 2013) استفاده گردید. به منظور کنترل صحت فرآیند استخراج مقدار ٤ میکرولیتر از Internal DNA Extraction Control به هر لوله استخراج DNA اضافه شد (PrimerDesign LTD, UK). غلظت DNA استخراج شده (نانوگرم در هر میکرولیتر) با (Thermo Scientific, USA) Nanodrop 1000 و در طول موج ۲٦۰ نانومتر بررسی شد. به علاوه، جهت ارزیابی خلوص DNA از نسبت طول موج‌های ۲٦۰/۲۸۰ استفاده گردید.

برای جستجوی اختصاصی و هم‌چنین تعیین کمیت *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* از ژن اختصاصی *F57* (با طول ۱٤۷ جفت باز) استفاده گردید (Grant and Rees, 2010). ترکیب واکنش از ۱۰ میکرولیتر 2× Precision MasterMix (PrimerDesign LTD, UK)، ۱ میکرولیتر مخلوط پرایمر و پروب Internal Extraction Control، ۱ میکرولیتر مخلوط پرایمرها و

پروب TaqMan® (FAM labeled, BHQ quenched)، و ۵ میکرولیتر DNA الگو تشکیل شده بود. حجم نهایی مخلوط واکنش با افزودن آب یون‌زدایی شده (deionized) (CinnaGen, Iran) به ۲۰ میکرولیتر رسید. منحنی استاندارد حاوی توالی کامل ژن *F57* با تهیه رقت‌های سریال از $۱۰^{۶}$ × ۱/۰۰ تا $۱۰^{۱}$ × ۱/۰۰ طبق دستورالعمل سازنده کیت (PrimerDesign LTD, UK) ترسیم گردید.

واکنش *F57*-qPCR در ترمال‌سایکلر (Bio-Rad, USA) با یک سیکل دمایی ۹۵ درجه سلسیوس و مدت ۱۰ دقیقه جهت فعال‌سازی آنزیم آغاز گردید. سپس ۵۰ سیکل دمایی ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ ثانیه و ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه تکرار گردید. جهت تخمین تعداد قطعی (Absolute quantification) ژن *F57*، سیکل آستانه (Cycle of threshold = Ct) به دست آمده برای هر نمونه در نرم‌افزار Bio-Rad iQ5 با منحنی استاندارد مقایسه گردید و تعداد قطعی ژن برآورد گردید. تمامی نمونه‌ها و هم‌چنین نمونه‌های شاهد مثبت (واکنش حاوی ژن *F57*) و منفی (واکنش حاوی آب یون‌زدایی شده به جای DNA الگو) در دو تکرار ارزیابی گردید.

- شمارش *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* با روش کشت

رسوب حاصل از میکروتیوب دوم هر نمونه برای آزمایش کشت مورد استفاده قرار گرفت. برای جلوگیری از رشد میکروب‌های ناخواسته موجود در نمونه‌های پنیر (از جمله باکتری‌های کشت آغازگر و باکتری‌های آلوده‌کننده) در طی دوره طولانی گرمخانه‌گذاری، نمونه‌ها قبل از کشت در محیط اختصاصی آلودگی‌زدایی (decontamination) گردید. برای این کار رسوب‌ها پس از انتقال به فالکون استریل، مقدار ۱۵ میلی‌لیتر محلول استریل و تازه تهیه شده هگزادسیل‌پریدینیوم کلراید (hexadecylpyridinium chloride) (Merck, Germany) ۰/۷۵ درصد (وزنی-وزنی) بر روی آن‌ها اضافه شد و به مدت ۵ ساعت در دمای آزمایشگاه (حدود ۲۵ درجه سلسیوس) نگه‌داری گردید (Dundee et al., 2001). رسوب فالکون با شتاب g× ۴۰۰۰ و مدت ۱۵ دقیقه جداسازی شد و با ۲/۵ میلی‌لیتر محلول استریل PBS-T مخلوط گردید. از سوسپانسیون در پنج فلاسک کشت بافت حاوی محیط اختصاصی (مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر در هر محیط) کشت داده شد. برای کشت از محیط پایه (Sigma-Aldrich, USA) Middlebrook 7H11 agar حاوی مکمل رشد OADC (Fluka, Switzerland)، فاکتور جذب آهن مایکوباکتین (۲ میکروگرم در میلی‌لیتر)، کاربینیسیلین (۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر)، تری‌متوپریم (۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر)، پلی‌میکسین B (۲۰۰ واحد در میلی‌لیتر) و آمفوتریسین B (۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) (Sigma–Aldrich, USA) استفاده گردید. محیط‌های کشت در شرایط هوازی، دمای ۳۷ درجه سلسیوس و مدت ۱۶ هفته گرمخانه‌گذاری گردید (Whittington et al., 1999).

- آزمایش‌های میکروبی و فیزیکوشیمیایی

شمارش لاکتوکوکوس‌های کشت آغازگر در محیط M17 agar (Merck, Germany) در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و مدت ۳ روز صورت پذیرفت (Domig et al., 2003) و لاکتوباسیلوس‌ها در محیط (Merck, Germany) Rogosa agar در دمای ۳۷ درجه سلسیوس

و مدت ۳ روز شمارش گردید. برای تأمین شرایط اتمسفری لازم جهت رشد لاکتوباسیلوس‌ها از گازپک نوع C (Merck, Germany) و جار بی‌هوازی استفاده شد (Gardiner et al., 1998; Østlie et al., 2004).

میزان pH نمونه‌های پنیر با pH متر دیجیتال مجهز به پروب دمایی (Hanna Instruments, USA) تعیین گردید. هم‌چنین اندازه‌گیری درصد رطوبت با روش خشک کردن در آون (دمای ۲ ± ۱۰۲درجه سلسیوس) (Hanifian and Khani, 2012) و درصد نمک با روش ولهارد (Volhard) صورت پذیرفت (Rajković et al., 2010).

- تجزیه و تحلیل آماری

این مطالعه چهار بار و طی روزهای مجزا تکرار گردید. ابتدا نتایج حاصل از شمارش *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* و باکتری‌های کشت آغازگر به مقیاس لگاریتمی تبدیل شد. نرمال بودن توزیع داده‌ها با آزمون‌های Skewness و Kurtosis بررسی شد. پس از انجام آمار توصیفی (میانگین و انحراف معیار) بر روی داده‌های مطالعه، تغییرات آن‌ها در طی مراحل مختلف تهیه، رسیدن و نگه‌داری پنیر با آنالیز واریانس (ANOVA) و آزمون دانکن (Duncan's test) مقایسه گردید (SPSS, Version 17).

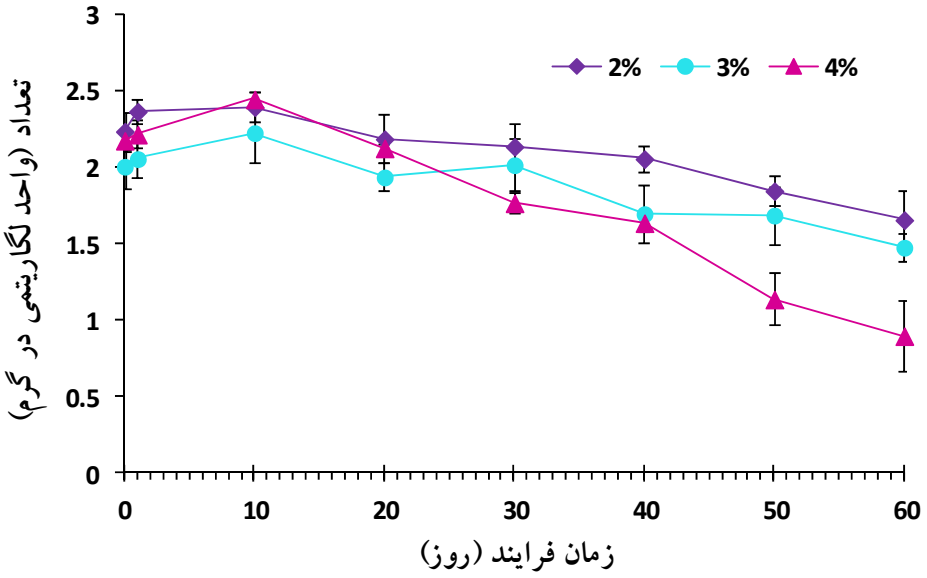
یافته‌ها

در اغلب نتایج کشت، کلونی‌های قابل شمارش پس از ٦ تا ۸ هفته گرمخانه‌گذاری ظاهر گردید و ادامه گرمخانه‌گذاری منجر به رشد کلونی‌های بیشتر نشد. حتی در برخی مواقع، گرمخانه‌گذاری طولانی‌تر (۸ تا ١٦ هفته) منجر به رشد میکروب‌های آلوده‌کننده- که اغلب متعلق به استرپتومایسس‌ها و جنس‌های مختلف کپکی بودند - گردید. در مواردی نیز نتیجه کشت در پایان دوره گرمخانه‌گذاری منفی بود که موجب بروز تفاوت زیاد در برآورد نتایج شمارش *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* با روش کشت و *F57*-qPCR می‌گردید. به عبارتی تعداد کلونی‌های شمارش شده کمتر از تعدادی بود که در *F57*-qPCR در نمونه‌های مشابه تعیین گردیده بود. لذا در این مطالعه، تحلیل‌های آماری و هم‌چنین بحث و نتیجه‌گیری بر اساس داده‌های مستخرج از روش *F57*-qPCR انجام گرفت.

تغییرات تعداد *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* شمارش شده با روش *F57*-qPCR در نمونه‌های پنیر با درصد نمک متفاوت در نمودار (۱) نشان داده شده است. بر اساس نتایج مطالعه، میانگین تعداد *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* در روز ۱۰ نسبت به زمان تلقیح باکتری افزایش مختصری داشته است که از نظر آماری غیرمعنی‌دار ($p>۰/۰۵$) بود. اما از روز ۱۰ دوره نگه‌داری تا روز ٦۰ کاهش تدریجی در تعداد *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* مشاهده گردید. با این تفاوت که در ابتدای دوره (روز ۱ تا روز ۳۰) میزان کاهش تعداد باکتری کم و غیرمعنی‌دار ($p>۰/۰۵$) و در اواخر دوره به ویژه از روز ٤۰ تا ٦۰ کاهش از نظر آماری معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) بود. با این حال *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* در انتهای ٦۰ روز نگه‌داری در تمامی نمونه‌ها ردیابی گردید.

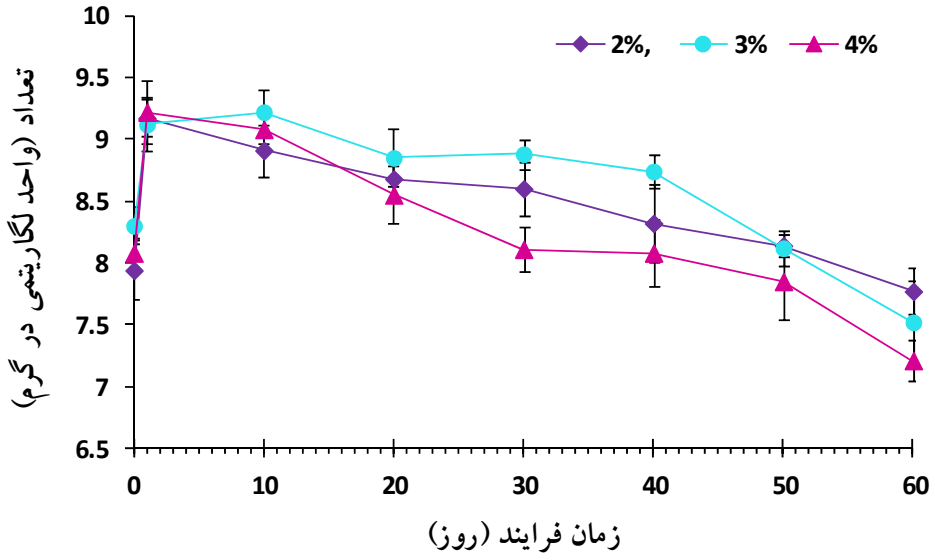
نتایج مطالعه نشان داد تعداد *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* در نمونه‌های دارای ۲ و ۳ درصد نمک تفاوت معنی‌داری ($p>۰/۰۵$) ندارند. به این معنی که در پایان ٦۰ روز نگه‌داری تعداد باکتری در این نمونه‌ها به

ترتیب ۱/۵٦ و ۱/٤۸ Log cfu/g بود. در مقابل، تعداد *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* در نمونه‌های حاوی ٤ درصد نمک در انتهای دوره نگه‌داری به Log cfu/g ۰/۹ رسید که از نظر آماری معنی‌دار (p<۰/۰۱) بود.



نمودار ۱- تغییرات تعداد (میانگین ± انحراف معیار) *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* در نمونه‌های پنیر با درصد نمک متفاوت طی فرآیند تولید، رسیدن و نگه‌داری

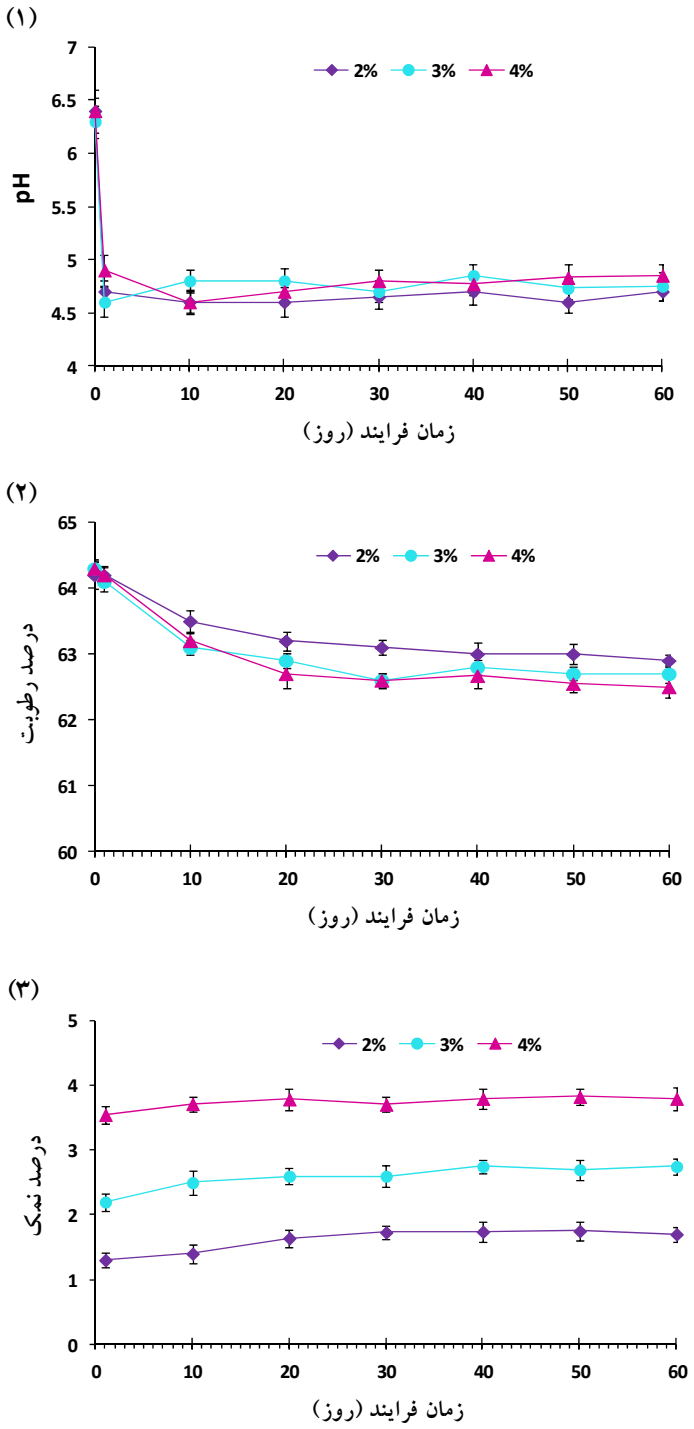
در نمودار (۲) میانگین تعداد باکتری‌های کشت آغازگر در نمونه‌های مختلف پنیر نشان داده شده است. در این مطالعه برای تهیه نمونه‌های پنیر، نسبت مساوی از لاکتوباسیلوس‌ها و لاکتوکوکوس‌های به عنوان کشت آغازگر استفاده گردید. با توجه به غیرمعنی‌دار (p>۰/۰۵) بودن تفاوت تعداد لاکتوباسیلوس‌ها و لاکتوکوکوس‌ها در مراحل مختلف تهیه، رسیدن و نگه‌داری پنیر، میانگین تعداد این دو گروه از باکتری‌ها مد نظر قرار گرفت. طبق این نتایج، تعداد باکتری‌های کشت آغازگر طی دوره رسیدن (روز ۱) افزایش معنی‌داری (p<۰/۰۱) نشان داد. سپس به تدریج جمعیت این باکتری‌ها تا انتهای دوره نگه‌داری کاهش پیدا کرد. طبق نتایج مطالعه، تفاوت تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک در نمونه‌های پنیر با درصدهای مختلف نمک به لحاظ آماری معنی‌دار (p>۰/۰۵) نبود.



نمودار ۲- تغییرات تعداد (میانگین ± انحراف معیار) باکتری‌های لاکتیکی کشت آغازگر در نمونه‌های پنیر با درصد نمک متفاوت طی فرآیند تولید، رسیدن و نگه‌داری

خصوصیات شیمیایی نمونه‌های پنیر در نمودار (۳) نشان داده شده است. بر اساس این نتایج، میانگین pH از ٦/٤ در زمان تلقیح به حدود ٤/٧ در انتهای زمان رسیدن (روز ۱) کاهش پیدا کرد که این مقدار کاهش از نظر آماری معنی‌داری (p<۰/۰۱) بود (نمودار ۳-۱). اما در دوره نگه‌داری (روز ۱ تا روز ٦۰) یک روند تقریباً ثابت مشاهده گردید. در ضمن تغییرات pH در نمونه‌های با درصد نمک ۲، ۳ و ٤ در طی فرآیند تهیه، رسیدن و نگه‌داری نمونه‌های پنیر تفاوت معنی‌داری (p>۰/۰۵) نداشتند.

در نمودار (۳-۲) و (۳-۳) به ترتیب درصد رطوبت و درصد نمک در نمونه‌های مختلف پنیر نشان داده شده است. آن‌چه از این دو نمودار مشهود است تغییرات بسیار مختصر در درصد رطوبت و نمک تا پایان دوره نگه‌داری است. به نحوی که میانگین رطوبت به میزان ۱/۵۵ درصد کاهش و میانگین نمک به میزان ۰/٤ درصد افزایش یافته است. در ضمن طبق یافته‌های مطالعه، درصد رطوبت بین نمونه‌های پنیر با درصدهای مختلف نمک تفاوت معنی‌داری (p>۰/۰۵) نشان نداد.



نمودار ۳- تغییرات شیمیایی (میانگین ± انحراف معیار) در نمونه‌های پنیر با درصد نمک متفاوت طی فرآیند تولید، رسیدن و نگه‌داری. ۱- pH؛ ۲- درصد رطوبت؛ ۳- درصد نمک

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعات مختلف برای ردیابی *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* از ژن‌های متعددی نظیر *loci251* و *loci255*، *IS900*، *hspX* و *F57* استفاده می‌شود. ژنوم *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* به دلیل دارا بودن ۱۴ تا ۲۰ کپی از ژن *IS900* برای ردیابی با حساسیت بالای این باکتری مناسب می‌باشد (Grant and Rees, 2010). اما با توجه به حضور توالی‌های مشابه *IS900* در گونه‌هایی نظیر *مایکوباکتریوم پورسینوم* (*M. porcinum*)، *مایکوباکتریوم اویوم* (*M. avium*) جداسازی شده از بیماران مبتلا به ایدز، *مایکوباکتریوم اسکروفولاسئوم* (*M. scrofulaceum*) و *مایکوباکتریوم کوکی* (*M. cookie*) ویژگی این ژن بسیار کم است. هم‌چنین با توجه به مشخص نبودن تعداد دقیق کپی‌های *IS900* در ژنوم *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* امکان تخمین دقیق تعداد این باکتری با روش qPCR وجود ندارد (Grant and Rees, 2010; Hanifian et al., 2013). اما در مقابل ژن *F57* مختص گونه *پاراتوبرکلوزیس* است و به تعداد یک کپی در ژنوم این باکتری وجود دارد. لذا ردیابی این ژن نه تنها ویژگی بالایی خواهد داشت، بلکه امکان تخمین دقیق تعداد آن را فراهم می‌آورد (Slana et al., 2008; Grant and Rees, 2010). بر همین اساس، در این مطالعه از ژن *F57* برای شمارش قطعی (Absolute quantification) تعداد *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* استفاده گردید.

برای پایش تغییرات *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* علاوه بر روش *F57*-qPCR از روش کشت نیز استفاده گردید. مقایسه داده‌های حاصل نشانگر پایین بودن برآورد تعداد باکتری هنگام استفاده از روش کشت بود. در مطالعات متعدد دلیل این تفاوت را حساسیت کمتر روش کشت در ردیابی *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* مطرح نموده‌اند (Anzabi and Hanifian, 2012; Okura et al., 2012; Hanifian et al., 2013). وجود تعداد کم باکتری در نمونه‌های مورد آزمایش (کمتر از Log ۲cfu/g) و هم‌چنین اثر منفی عوامل آسیب‌رسان موجب عدم رشد باکتری‌ها و در نتیجه عدم موفقیت در حصول کلونی *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* می‌گردد. عقیده بر این است مواد شیمیایی مورد استفاده برای آلودگی‌زادیی نمونه‌ها می‌تواند تعدادی از سلول‌های *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* را غیرفعال نماید و در نتیجه حساسیت روش کشت را کاهش دهد (Dundee et al., 2001). از سوی دیگر طولانی بودن دوره گرمخانه‌گذاری تحت شرایط هوازی باعث تبخیر آب و خشک شدن محیط کشت می‌گردد که پیامد آن عدم موفقیت در جداسازی باکتری است. در این مطالعه برای جلوگیری از اثرات منفی عوامل فوق، اولاً تمامی نمونه‌ها با محلول ۰/۷۵ درصد هگزادسیل‌پریدینیوم کلراید به مدت ۵ ساعت آلودگی‌زدایی شد. طبق بررسی‌های انجام یافته، استفاده از هگزادسیل‌پریدینیوم کلراید مطلوب‌ترین روش آلودگی‌زدایی محسوب می‌گردد (Dundee et al., 2001). ثانیاً، محیط کشت در فلاسک‌های کشت بافت (Tissue culture flask) توزیع و در شرایط اتمسفری اشباع شده با بخار آب گرمخانه‌گذاری گردید تا خشک شدن محیط کشت به حداقل برسد. با این حال نتایج حاصل از روش کشت حتی در زمان تلقیح باکتری تفاوت زیادی با نتایج *F57*-qPCR نشان داد. به همین دلیل، در این مطالعه از نتایج کشت صرفاً جهت تأیید زنده بودن *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* استفاده گردید

و تحلیل‌های آماری بر اساس روش *F57*-qPCR صورت پذیرفت.

با توجه به نتایج نمودار (۱) تعداد *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* طی دوره رسیدن (از زمان تلقیح تا روز ۱) تغییر محسوسی نداشت. اما در روز ۱۰ نگه‌داری میانگین تعداد *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* در تمامی تیمارها به میزان ۰/۱۲ Log cfu/g افزایش یافت. با توجه به این که رشد *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* وابسته به مایکوباکتین (عامل شلاته کننده آهن) می‌باشد، امکان رشد آن در خارج از سلول میزبان (شرایط *in vitro*) وجود ندارد (Spahr and Schafroth, 2001)، لذا افزایش مختصر تعداد آن در طی دوره رسیدن می‌تواند در نتیجه خروج آب از بافت پنیر (Syneresis) و اثر تغلیظی آن بر جمعیت باکتریایی باشد. کاهش ۱ درصدی رطوبت در نمونه‌های پنیر طی همین دوره (نمودار ۳-۲) مؤید این فرضیه می‌باشد.

طبق یافته‌های این مطالعه، میانگین تعداد باکتری‌های کشت آغازگر در پایان دوره رسیدن (روز ۱) به حدود ۹/۱۷ Log cfu/g (نمودار ۲) و میانگین میزان pH به ٤/۷۳ رسید (نمودار ۳-۱). در برخی از مطالعات انجام یافته نتایج مشابهی به دست آمده است که پیامد آن کاهش قابل ملاحظه تعداد باکتری‌های بیماری‌زای تلقیح شده متعاقب دوره رسیدن پنیر بود (Mohammadi et al., 2011; Hanifian and Khani, 2012,). در اغلب این مطالعات، افت شدید pH، رقابت برای به دست آوردن مواد مغذی و هم‌چنین تولید متابولیت‌هایی با اثر آنتاگونیستی توسط باکتری‌های لاکتیکی، عامل اصلی کاهش جمعیت میکروب‌های بیماری‌زا نظیر *اشریشیا کولای* O157: H7 و *یرسینیا انتروکولیتیکا* معرفی شده است (Mohammadi et al., 2011; Hanifian and Khani, 2012,). اما بر خلاف این نتایج، در مطالعه اخیر تعداد *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* در پایان دوره رسیدن کاهش پیدا نکرد (نمودار ۱). به نظر می‌رسد مقاومت زیاد مایکوباکتریوم‌ها در قیاس با سایر جنس‌های باکتریایی نسبت به شرایط نامساعد محیطی مهمترین عامل مقاومت *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* در طی دوره رسیدن باشد.

نتایج مطالعه نشان داد، با گذشت زمان نگه‌داری تعداد *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* کاهش می‌یابد. این روند کاهش در مراحل انتهایی دوره (روز ٤۰ تا روز ٦۰) چشمگیرتر است (نمودار ۱). احتمالاً قرارگیری طولانی مدت باکتری در معرض عوامل نامساعد نظیر pH اسیدی، ترکیبات ضدمیکروبی تولید شده توسط کشت آغازگر و حضور نمک موجب از بین رفتن سلول‌های حساس میکروبی گردیده است. نتایج مطالعات مشابه نیز حاکی از مقاومت بالای *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* و کاهش آرام و تدریجی این باکتری در طی دوره رسیدن و نگه‌داری پنیر سخت و نیمه‌سخت سوئیسی (Spahr and Schafroth, 2001) و پنیر چدار (Donaghy et al., 2004) می‌باشد.

با مقایسه تعداد *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* در نمونه‌های تهیه شده با درصدهای مختلف نمک مشخص گردید در نمونه‌هایی دارای ٤ درصد نمک روند کاهش باکتری نسبت به نمونه‌های ۲ و ۳ درصد نمک معنی‌دار ($p<۰/۰۱$) بود (نمودار ۳-۳). در مطالعه مشابهی استفاده از غلظت‌های بالاتر نمک موجب تسریع غیرفعال شدن *یرسینیا انتروکولیتیکا* در پنیر سفید ایرانی گردید. هر چند استفاده از درصدهای بالاتر نمک

موجب حذف کامل باکتری از پنیر نشد (Hanifian and Karim, 2006). تفاوت رفتار *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* و بسیاری از باکتری‌های بیماری‌زا نسبت به شرایط نامساعد ایجاد شده در نتیجه افزودن نمک را می‌توان به مقاومت و دوام بالای مایکوباکتریوم‌ها و از آن جمله *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* نسبت داد (Sung and Collins, 2000).

بررسی‌های میکروسکوپیکی نشان داده است، *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* تشکیل توده‌هایی (Clump) متشکل از ده‌ها سلول میکروبی را می‌دهند که به صورت دوره‌ای از مدفوع دام‌های مبتلا به یون دفع می‌شوند (Lund et al, 2002). *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* در آرایش توده‌ای در مقایسه با سلول‌های منفرد این باکتری پایداری بیشتری در مقابل عوامل نامساعد و از آن جمله تیمارهای حرارتی دارد (Rowe et al., 2000). از آن جایی که بخش عمده آلودگی در شیر خام به صورت ثانویه و از طریق آلودگی مدفوعی است، لذا حضور فرم‌های توده‌ای *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* در شیر خام به ویژه زمانی که شیردوشی به صورت دستی انجام می‌پذیرد، بسیار محتمل است (Hanifian et al., 2013). وجود اشکال توده‌ای *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* در شیر خام امکان بقای آن را پس از پاستوریزاسیون افزایش می‌دهد (Rowe et al., 2000). هر چند احتمال آلودگی ثانویه متعاقب پاستوریزاسیون و در نتیجه تماس با سطوح آلوده محل بسته‌بندی نیز وجود دارد (Lund et al., 2002).

در مطالعه اخیر، بقای *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* در تمامی نمونه‌های پنیر با درصدهای متفاوت نمک تا پایان دوره نگه‌داری حفظ گردید. احتمالاً به‌کارگیری غلظت‌های بالاتر نمک بتواند اثر مهاری بیشتری اعمال نماید. اما استفاده از غلظت‌های زیادتر نمک علاوه بر اثرات منفی بر کیفیت حسی (Organoleptic) محصول، از سوی ارگان‌های بهداشتی محدود شده است. هم‌چنین، با عنایت به این که حداکثر زمان نگه‌داری پنیر سفید فراپالایشی ۶۰ تا ۷۵ روز می‌باشد، لذا امکان نگه‌داری طولانی‌تر آن با هدف غیرفعال نمودن تعداد بیشتر *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* منتفی است. بنابراین تنها راه عملی برای مواجهه با مخاطره *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* در پنیر سفید فراپالایشی انتخاب شیرهای غیرآلوده برای تولید پنیر و هم‌چنین اعمال تیمارهای حرارتی موثرتر از تیمارهای فعلی (۷۲ درجه سلسیوس و ۱۵ ثانیه) و جلوگیری از آلودگی ثانویه می‌باشد. به علاوه، می‌توان برای تهیه پنیر سفید فراپالایشی از کشت‌های آغازگر با قابلیت تولید باکتریوسین‌ها جهت کمک به سایر عوامل ضدمیکروبی موجود در پنیر و تسریع روند غیرفعال شدن باکتری‌های بیماری‌زا استفاده نمود.

سپاسگزاری

بودجه این مطالعه در قالب طرح تحقیقاتی مصوب توسط معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی تبریز تأمین شده است. هم‌چنین از کارکنان بخش تحقیق و توسعه کارخانه شیر پاستوریزه پگاه آذربایجان‌شرقی به دلیل همکاری در انجام بخشی از مطالعه قدردانی می‌گردد.

منابع

- حنیفیان، شهرام و کریم، گیتی (۱۳۸۵). مطالعه اثر متقابل *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* و *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* بر بقای *یرسینیا انتروکولیتیکا* در طی تهیه و رسیدن پنیر سفید ایرانی. مجله علوم دامپزشکی ایران، شماره ۳، صفحه ۴۹۲-۴۸۵.
- محمدی، خسرو.، کریم، گیتی.، حنیفیان، شهرام.، تاری‌نژاد، علی‌رضا و قاسم‌نژاد.، رضا (۱۳۹۰). مطالعه تأثیر اسانس گیاه آویشن شیرازی بر باکتری *Escherichia coli* O157:H7 در پنیر سفید آب‌نمکی طی فرآیند تولید و نگه‌داری. مجله بهداشت مواد غذایی، شماره ۲، صفحه ۷۹-۶۹.

- Anzabi, Y. and Hanifian, S. (2012). Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in pasteurized milk by *IS900* PCR and culture method. African Journal Microbiology Research, 6: 1453–1456.
- Botsaris, G., Slana, I., Liapi, M., Dodd, C., Economides, C., Rees, C. and Pavlik, I. (2010). Rapid detection methods for viable *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in milk and cheese. International Journal of Food Microbiology, 141: S87–S90.
- Bylund, G. (1995). Dairy processing handbook. Tetra Pak processing systems AB. Sweden: Lund, pp. 320–328.
- Domig, K.J., Mayer, H.K. and Kneifel, W. (2003). Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of Enterococcus spp.: 1. Media for isolation and enumeration. International Journal of Food Microbiology, 88: 147–164.
- Donaghy, J.A., Totton, N.L. and Rowe, M.T. (2004). Persistence of *Mycobacterium paratuberculosis* during manufacture and ripening of cheddar cheese. Applied and Environmental Microbiology, 70: 4899–4905.
- Dundee, L., Grant, I.R., Ball, H.J. and Rowe, M.T. (2001). Comparative evaluation of four decontamination protocols for the isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from milk. Letters in Applied Microbiology, 33: 173–177.
- Eltholth, M.M., Marsh, V.R., Van Winden, S. and Guitian, F.J. (2009). Contamination of food products with *Mycobacterium avium paratuberculosis*: a systematic review. Applied and Environmental Microbiology, 107: 1061–1071.
- Fathi, R., Sarkarati, F., Eslami, M., Rezavand, B. and Nourizadeh, A. (2011). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cow milk using culture and PCR methods. Archives of Razi Institute, 66: 95–100.
- Gardiner, G., Ross, R.P., Collins, J.K., Fitzgerald, G. and Stanton, C. (1998). Development of a probiotic cheddar cheese containing human-derived *Lactobacillus paracasei* strains. Applied and Environmental Microbiology, 64: 2192–2199.
- Grant, I.R. and Rees, C.E.D. (2010). Mycobacterium. In: Liu, D., (Ed.), Molecular detection of foodborne pathogens. CRC Press, New South Wales, pp. 229–243.
- Hanifian, S. and Karim, G. (2006). A study on the effect of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* on survival of *Yersinia enterocolitica* during manufacture and storage of Iranian white cheese. Iranian Journal of Veterinary Sciences, 3: 485–492 [In Farsi].
- Hanifian, S. and Khani, S. (2012). Fate of *Yersinia enterocolitica* during manufacture, ripening and storage of Lighvan cheese. International Journal of Food Microbiology, 156: 141–146.
- Hanifian, S., Khani, S., Barzegari, A. and Shayegh, J. (2013). Quantitative real-time PCR and culture examination of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* at farm level. Veterinary Microbiology, 162: 160–165.

- Harris, N.B. and Barletta, R.G. (2001). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in veterinary medicine. Clinical Microbiology Reviews, 14: 489–512.
- Karami, M., Ehsani, M.R., Mousavi, S.M., Rezaei, K. and Safari, M. (2009). Changes in the rheological properties of Iranian UF-Feta cheese during ripening. Food Chemistry, 112: 539–544.
- Klanicova, B., Slana, I., Roubal, P., Pavlik, I. and Kralik, P. (2012). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* survival during fermentation of soured milk products detected by culture and quantitative real time PCR methods. International Journal of Food Microbiology, 157: 150–155.
- Lund, B.M., Gould, G.W. and Rampling, A.M. (2002). Pasteurization of milk and the heat resistance of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a critical review of the data. International Journal of Food Microbiology, 77: 135–145.
- Mohammadi, Kh., Karim, G., Hanifian, Sh., Tarinejad, A. and Gasemnezhad, R. (2011). Antimicrobial effect of *Zataria multiflora Boiss*. essential oil on *Escherichia coli* O157:H7 during manufacture and ripening of white brined cheese. Journal of Food Hygiene, 2: 69–79 [In Farsi].
- Okura, H., Toft, N. and Nielsen, S.S. (2012). Occurrence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk at dairy cattle farms: A systematic review and meta-analysis. Veterinary Microbiology, 157: 253–263.
- Østlie, H.M, Eliassen, L., Florvaag, A. and Skeie, S. (2004). Phenotypic and PCR-based characterization of the microflora in Norvegia cheese during ripening. International Journal of Food Microbiology, 94: 287–299.
- Rajković, M.B., Sredović, I.D. and Miloradović, Z.N. (2010). Comparison of different methods for determination of sodium chloride in cheese. Journal of Agricultural Sciences, 55: 65–77.
- Rodr guez-Lazaro, D., D'Agostino, M., Herrewegh, A., Pla, M., Cook, N. and Ikonomopoulos, J. (2005). Real-time PCR-based methods for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in water and milk. International Journal of Food Microbiology, 101: 93–104.
- Rowe, M.T., Grant, I.R., Dundee, L. and Ball H.J. (2000). Heat resistance of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. Irish Journal of Agriculture and Food Research, 39: 203–208.
- Slana, I., Kralik, P., Kralova, A. and Pavlik, I. (2008). On-farm spread of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in raw milk studied by *IS900* and *F57* competitive real time quantitative PCR and culture examination. International Journal of Food Microbiology, 128: 250–257.
- Spahr, U. and Schafroth, K. (2001). Fate of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Swiss hard and semihard cheese manufactured from raw milk. Applied and Environmental Microbiology, 67: 4199–4205.
- Sung, N. and Collins, M.T. (2000). Effect of three factors in cheese production (pH, salt, and heat) on *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* viability. Applied and Environmental Microbiology, 66: 1334–1339.
- Whittington, R.J., Marsh, I., McAllister, S., Turner, M.J., Marshall, D.J. and Fraser, C.A. (1999). Evaluation of modified BACTEC 12B radiometric medium and solid media for culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from sheep. Journal of Clinical Microbiology, 37: 1077–1083.

Impact of salt concentration on persistence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Iranian UF white cheese

Hanifian, S.[1*], Jodeiri, H.[2]

1- Assistant Professor of Food Science and Technology Department, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
2- Research and Development Section, Eastern-Azarbaijan Pegah Dairy Processing Establishment, Tabriz, Iran.
[*] Corresponding author email: hanifian@iaut.ac.ir
(Received: 2013/7/2 Accepted: 2013/10/15)

Abstract

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (*Mycobacterium paratuberculosis*) is considered as a potential significant public health threat due to its possible association with Crohn's disease in humans. This is a study aimed to investigate the effect of different salt concentrations on survival of *Mycobacterium paratuberculosis* during ripening and storage of Iranian ultra-filtrate-white cheese (IUFWC). For this purpose, retentate was inoculated with 2 Log cfu/g of *Mycobacterium paratuberculosis*. Afterwards, model cheeses were prepared with 2%, 3% and 4% of salt. Quantity of *Mycobacterium paratuberculosis* was estimated throughout the ripening and storage of IUFWC using *F57*-quantitative real time PCR (*F57*-qPCR) and culture assay. Along with, the populations of lactic acid bacteria as well as physicochemical properties of cheese samples were determined. According to the results, at the early stage of storage period (1 to 30 days) the number of *Mycobacterium paratuberculosis* was almost constant; however, it was decreased significantly ($p<0.01$) during the late storage period (30 to 60 days). Data also suggested that *Mycobacterium paratuberculosis* could persist for a longer ($p<0.01$) period of time in the samples made with lower (2% and 3%) salt concentration. Consequently, higher salt concentration could shorten the survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in IUFWC. In addition, considering the effect of time on the persistence of *Mycobacterium paratuberculosis*, storage of IUFWC until the end of storage period (60 days) could inactivate more of the bacterium.

Key words: Iranian UF-white cheese, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, Salt, *F57*-qPCR