

میکروب شناسی مواد غذایی



فهرست فارسی

استفاده از روش ERIC-PCR جهت دسته بندی ژنتیکی ایزوله های کمپیلوباکتر جدا شده از شیر خام

غلامرضا بنی شریف، محمد حسین مرحمتی زاده*، حسن ممتاز

تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در جدایه های انتروباکتر کلوآکه از گوشت گوسفند و مرغ در شهرستان

شهرکرد در سال ۱۴۰۰

الهه برزم دهکردی، الهه تاج بخش*، حسن ممتاز

بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره و اسانس بادرنجبویه و اسطوخدوس بر برخی باکتری های مواد غذایی

مهرداد عطایی کچویی، الهام فخری*، فاطمه خداوردی پور

بررسی تاثیر پلاسمای سرد فشار اتمسفری بر شاخص های اکسایش و کیفیت میکروبی فلفل قرمز

سمانه خدابنده شهرکی، محمد گلی*، شریفه شاهی

استفاده از روش ERIC-PCR جهت دسته بندی ژنتیکی ایزوله‌های کمپیلوباکتر جدا شده از شیر خام

غلامرضا بنی شریف^۱، محمد حسین مرحمتی زاده^{۱*}، حسن ممتاز^۲

۱- گروه بهداشت مواد غذایی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران

۲- استاد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

* نویسنده مسوول: Drmarhamati@gmail.com

چکیده

گونه‌های کمپیلوباکتر از مهم‌ترین پاتوژن‌های عامل گاستروانتریت‌های باکتریایی هستند که عموماً از طریق مواد غذایی با منشأ حیوانی منتقل می‌شوند. مطالعه حاضر با هدف دسته بندی ژنتیکی ایزوله‌های کمپیلوباکتر جدا شده از شیر خام گاو، گوسفند و بز در استان چهارمحال و بختیاری انجام شد. تعداد ۴۳ ایزوله کمپیلوباکتر که از شیر خام گاو، گوسفند و بز در سطح استان چهارمحال و بختیاری جدا شده بودند، انتخاب و به روش ERIC-PCR آزمایش شدند.

ایزوله‌های مورد مطالعه دارای الگوی بانندی از محدوده ۱۰۰ تا ۲۰۰۰ جفت باز بودند که در آنالیز الگوی باندینگ حاصله با ضریب تشابه تطابق ساده در سطح تشابه بالای ۸۰ درصد در قالب ۵ پروفایل اصلی طبقه بندی شدند. بجز قرابت ۱۰۰ درصدی که در ۱ مورد دیده شد، سایر ایزوله‌ها دارای قرابت ژنتیکی بین ۵۴٪ تا ۹۸٪ بودند.

قرار گرفتن ایزوله‌های مورد مطالعه در چند زیر گروه نشان گر قدرت تمایزدهی قابل قبول تکنیک ERIC-PCR در ژنوتایپینگ کمپیلوباکتر و وجود منابع مختلف آلودگی فراورده‌های لبنی با این پاتوژن می‌باشد. روش ERIC-PCR روشی ساده، سریع و کم هزینه جهت توصیف تنوع ژنتیکی سویه‌های مختلف کمپیلوباکتر از جمله سویه‌های کمپیلوباکتر ژرژونی و کمپیلوباکتر کولی می‌باشد.

کلید واژه‌ها: کمپیلوباکتر، شیر خام، دسته بندی ژنتیکی، ERIC-PCR

مقدمه

در اثر مصرف مواد غذایی آلوده است (۱۰). در صورتی که بار میکروبی در شیر خام بالا باشد به دلیل فعالیت آنزیم‌های مقاوم به گرما در باکتری‌ها حتی بعد از عمل پاستوریزاسیون شیر خام، مواد لبنی حاصل از آن کیفیت مورد انتظار را ندارند و حامل باکتری‌ها می‌باشند (۱۱).

۲ تا ۵ روز پس از مصرف غذای آلوده، علائم کمپیلوباکتریوزیس شامل تب، دل درد و اسهال ظاهر می‌شود که اسهال ممکن است به اسهال خونی ختم گردد. معمولاً در این عفونت غذایی استفراغ وجود ندارد. برای کنترل این عفونت باید مواد غذایی گوشتی به طور کامل پخته شده و از مصرف شیر خام و آب غیر کلرینه نیز جلوگیری شود (۱۲).

بنابر مطالب گفته شده آلودگی باکتریایی شیر خام دارای اهمیت بوده و وجود یا عدم وجود کمپیلوباکتر جهت تأیید سلامت غذایی مواد لبنی از نقطه نظر وجود این باکتری ضروری است. به طور معمول روش‌های کشت، جداسازی و تست‌های تشخیص بر اساس خواص فنوتیپی جهت شناسایی گونه‌های کمپیلوباکتر به کار می‌رود (۱۳) اما از آن جا که این باکتری جز باکتری‌های سخت رشد است، جداسازی آن به وسیله روش‌های کشت دشوار می‌باشد، لذا روش‌های مولکولی بر پایه واکنش زنجیره‌ای پلیمرز [Polymerase Chain Reaction (PCR)] در شناسایی کمپیلوباکتر بیش‌تر مورد اطمینان بوده و به طور تجاری نیز مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۴).

از روش‌های مختلف فنوتیپی و ژنوتیپی نظیر سروتاپینگ، بررسی الگوی پلاسمیدی، تعیین الگوی حدت و مقاومت آنتی بیوتیکی، روش‌های متکی بر برش آنزیمی نظیر RFLP، روش‌های متکی بر PCR نظیر ERIC-PCR، RAPD-PCR، REP-PCR و BOX-PCR به عنوان روش‌های سریع جهت دسته بندی این باکتری استفاده شده است. روش RAPD-PCR یکی از سریع‌ترین روش‌های تایپینگ

گونه‌های کمپیلوباکتر (*Campylobacter*) باسیل‌هایی گرم منفی، خمیده، متحرک، گرمادوست و میکروآئروفیل از خانواده کمپیلوباکتریاسه (*Campylobacteriaceae*) بوده و یکی از عاملین مهم انتزیت به نام کمپیلوباکتریوزیس می‌باشند (۱). این جنس با دارا بودن گونه‌ها و میزبان‌های مختلف یکی از مهم‌ترین باکتری‌های مشترک بین انسان و حیوان محسوب می‌شود (۲،۳). مطالعات نشان می‌دهد که ۹۵ درصد موارد کمپیلوباکتریوزیس در انسان توسط کمپیلوباکتر ژرونی و ۴ درصد توسط کمپیلوباکتر کولی و ۱ درصد به وسیله سایر گونه‌ها ایجاد می‌شود (۴). مهم‌ترین گونه کمپیلوباکتر که بیش از ۸۵ درصد از عفونت‌های روده‌ای را باعث می‌شود، کمپیلوباکتر ژرونی است. معمول‌ترین بیماری که در نتیجه مسمومیت غذایی ناشی از این باکتری در انسان ایجاد می‌شود گاستروانتریت است (۵). آمار جهانی ۲۰ تا ۳۵ درصد اسهال‌ها را ناشی از این باکتری‌ها می‌داند (۶). آرتزیت سپتیک و باکتری، عفونت‌های نادری هستند که توسط گونه‌های کمپیلوباکتر ایجاد می‌شوند (۷). منبع اصلی این باکتری مجرای گوارش حیوانات، به ویژه مرغ و بوقلمون می‌باشد. مصرف گوشت و مرغ نیم پز، شیر خام و آب غیر کلرینه علل عمده انتقال این باکتری به انسان و بروز کمپیلوباکتریوزیس می‌باشند (۸). همچنین این بیماری در افراد با نقص ایمنی یا افراد خیلی جوان یا پیر به علت ضعف سیستم ایمنی و توانایی بیشتر این باکتری برای بیماری زایی، بیشتر دیده می‌شود (۹).

مطالعات نشان می‌دهد که کمپیلوباکتر به طور عمده همراه با مواد غذایی با منشأ دامی انتقال می‌یابد. علاوه بر این که مصرف شیر خام در کشور ما بسیار پایین است و شیر به صورت سنتی و یا مدرن پاستوریزه می‌گردد، شیر خام آلوده به کمپیلوباکتر یکی از شایع‌ترین علت بیماری‌های روده‌ای

Base) ساخت شرکت مرک آلمان و بر پایه آگار خون دار کشت داده شد.

محیط Campylobacter Selective Agar Base حاوی ۷ درصد خون تجزیه شده اسب بود. همچنین هر ۵۰۰ میلی لیتر از آن شامل ۲ میلی گرم آنتی بیوتیک وانکومايسين جهت جلوگیری از رشد باکتری‌های گرم مثبت مقاوم به متی سیلین، ۵۰ میلی گرم پلی میکسین B جهت جلوگیری از رشد باکتری‌های پseudomonas، پاستورلا، سالمونلا، شیگلا و کلبسیلا و ۱ میلی گرم تری متوپریم به منظور جلوگیری از رشد/شیریشیاکلی، انتروباکتر، کلبسیلا، استرپتوکوکوس، پاستورلا، کلاستریدیم، سامونلا، شیگلا، کورینه باکتریوم و پرتئوس بود (۱۶). سپس پلیت های فوق در شرایط میکروآئروفیلیک به همراه گازپک شامل ۵ درصد اکسیژن، ۱۰ درصد دی اکسیدکربن و ۸۵ درصد نیتروژن (گازپک ساخت شرکت Oxoid کانادا) در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد و مدت زمان ۴۸ ساعت گرم خانه گذاری شدند (۱۷).

شناسایی و جداسازی کمپیلوباکتر

پلیت های یی که حاوی پرگنه های مسطح، غیر همولیتیک، کروی، آبکی و خاکستری به قطر ۱ میلی متر بودند مورد بررسی های بعدی قرار گرفتند. پس از شناسایی پرگنه های مشکوک با مشخصات ذکر شده در بالا در پلیت ها، پرگنه ها به روش گرم، رنگ آمیزی شدند. پرگنه هایی که واجد مشخصات کمپیلوباکتر بودند برای انجام آزمایشات تکمیلی و تأیید کمپیلوباکتر ژرونی و کولی، خالص سازی و نگهداری شدند. آزمایشات تکمیلی شامل آزمایش اکسیداز و کاتالاز می باشند. از آزمایش اکسیداز با استفاده از دیسک اکسیداز برای تأیید کمپیلوباکتر بودن پرگنه مشکوک استفاده گردید. در ادامه نیز از آزمایش هیدرولیز هیپورات جهت تشخیص کمپیلوباکتر ژرونی و کولی استفاده شد (۱۷).

ایزوله های جدا شده جهت مطالعات بعدی در محیط مایع TSB کشت داده شدند. جهت استخراج DNA از ایزوله های جدا شده از روش جوشاندن (Boiling) استفاده

مولکولی پیشرفته می باشد که به آسانی قابل انجام است. در سال های اخیر به دلیل سادگی این روش، سرعت بالای آن، دقت بالا، قابلیت تکرارپذیری، هزینه نسبتاً پایین و قدرت بالا در افتراق بین سویه ای مورد استفاده ویژه ای قرار گرفته است (۱۴).

علاوه بر تکنیک RAPD-PCR، تکنیک ERIC-PCR جهت مطالعات اپیدمیولوژیک مورد استفاده قرار می گیرد. ارزیابی و سنجش های مبتنی بر ERIC-PCR استفاده از پرایمرهایی می باشد که هدف آن ها توالی های تکراری محفوظ شده در ژنوم باکتری می باشد. از جمله این عناصر تکراری، توالی های تکراری توافقی درون ژنی انتروباکتریال یا ERIC می باشد که در باکتری های روده ای گرم منفی شایع است. به طور کلی اجزاء و عناصر ۱۲۶ جفت بازی، ERIC شامل یک نمونه تکراری معکوس مرکزی بسیار حفاظت شده در مناطق فراژنی می باشد که از این توالی تکراری جهت طراحی پرایمر در تکنیک ERIC-PCR جهت انگشت نگاری DNA استفاده می شود (۱۵).

با توجه به افزایش مصرف مواد لبنی در دهه گذشته و امکان بیش تر آلودگی باکتری ها، در مطالعه حاضر از روش ERIC-PCR جهت دسته بندی ایزوله های کمپیلوباکتر ژرونی و کمپیلوباکتر کولی جدا شده از شیر خام گاو، گوسفند و بز استفاده شده است.

روش کار

غنی سازی نمونه های شیر خام

۱۰ میلی لیتر از هر کدام از نمونه های شیر خام در ۱۴۰۰۰ دور به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. توده به دست آمده بعد از سانتریفوژ به ۹۰ میلی لیتر محیط پرستون برات (محیط پرستون برات ساخت شرکت Merck آلمان) جهت غنی سازی کمپیلوباکتر انتقال یافت و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شد. سپس نمونه ها به روش کشت خطی در محیط کشت اختصاصی (Campylobacter Selective Agar

برای تأیید قطعی کمپیلوباکتر در ایزوله‌های جدا شده از ردیابی ژن *16SrRNA* به روش PCR استفاده شد که این ناحیه ژنی در تمام گونه‌های کمپیلوباکتر وجود دارد (۱۸). جهت افتراق گونه‌های کمپیلوباکتر ژژونی و کمپیلوباکتر کولی از PCR ژن‌های *mapA* و *ceuE* با زوج پرایمرهای نشان داده شده در جدول ۱ استفاده شد.

شد برای این منظور ۵۰ میکرولیتر از کشت مایع یک شبه باکتری در محیط TSB در ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش حرارت داده شد. پس از سانتریفیوژ نمونه‌ها در ۱۰۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه، مایع رویی به عنوان منبع DNA جدا گردید.

آزمایشات مولکولی

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت تشخیص گونه‌های کمپیلوباکتر

هدف	نام ژن	توالی پرایمر (۳-۵)	اندازه محصول (جفت باز)
جنس کمپیلوباکتر	<i>16SrRNA</i>	ATC TAA TGG CTT AAC CAT TAA AC GGA CGG TAA CTA GTT TAG TAT T	۸۵۷
کمپیلوباکتر ژژونی	<i>mapA</i>	CTA TTT TAT TTT TGA GTG CTT GTG GCT TTA TTT GCC ATT TGT TTT ATT A	۵۸۹
کمپیلوباکتر کولی	<i>ceuE</i>	AAT TGA AAA TTG CTC CAA CTA TG TGA TTT TAT TAT TTG TAG CAG CG	۴۶۲

در آزمایش PCR از سویه‌های استاندارد *Campylobacter jejuni* ATCC29428 و *Campylobacter coli* ATCC43478 و ایزوله‌های جدا شده در مطالعات قبلی به عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر به عنوان نمونه کنترل منفی استفاده شد. جهت دسته‌بندی ژنتیکی و تیپ بندی ایزوله‌های کمپیلوباکتر ژژونی و کولی جدا شده از فراورده‌های لبنی از روش ERIC-PCR استفاده شد. آزمایش ERIC-PCR به کمک زوج پرایمرهای R1: ATGAAGCTCCTGGGGATTAC و R2: AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG معرفی شده توسط Zorman و همکاران (۲۰۰۶) انجام

واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر مدل (Germany) FlexCycler2 در حجم ۵۰ میکرولیتر واجد ۵ میکرولیتر ۱۰x PCR buffer، ۱/۵ میلی مول Mgcl2، ۲۰۰ میکرومول NTP Mix، ۰/۵ میکرومول از زوج پرایمرهای R و F (مربوط به سه ژن)، ۰/۶ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase و ۴ میکرولیتر از DNA مربوط هر ایزوله تنظیم شد. برنامه حرارتی مورد استفاده عبارت بود از: یک سیکل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، ۳۵ سیکل تکراری ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه.

الکتروفورز نمونه‌ها در ولتاژ ثابت ۹۰ ولت به مدت حدوداً یک ساعت انجام و بعد از مشاهده ژل در زیر نور UV از ژل حاصله تصویربرداری و ثبت گردید.

در تکنیک ERIC-PCR آزمایش PCR روی ایزوله‌های مورد مطالعه سه نوبت انجام و پس از اطمینان از تعداد و اندازه باندهای ایجاد شده در هر ایزوله، الگوی باندی حاصله به کمک نرم‌افزار NTSIS آنالیز و با در نظر گرفتن قرابت بالای ۸۰ درصد، ژنوتیپ‌های (پروفایل‌های) مربوط با روش UPGMA شناسایی و دندروگرام مربوط به این نشان‌گر ترسیم گردید (۲۰).

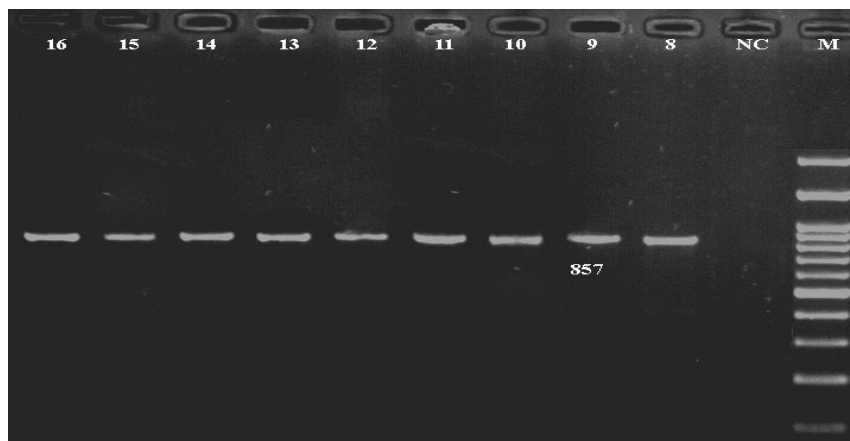
نتایج:

علاوه بر آزمون‌های میکروبی متداول به منظور تشخیص ایزوله‌های کمپیلوباکتر از روش PCR جهت ردیابی ژن *16SrRNA* استفاده گردید نتیجه حاصل از ردیابی ژن *16SrRNA* در شکل ۱ نشان داده شده است.

شد (۱۹). آزمایش PCR در این مرحله سه نوبت روی ۴۳ ایزوله انتخابی از ایزوله‌های کمپیلوباکتر ژژونی و کولی جدا شده، در حجم ۲۵ میکرولیتر واجد ۲/۵ میکرولیتر ۱۰X PCR buffer، ۳ میلی مول *Mgcl2*، ۲۵۰ میکرومول dNTP Mix، ۲ میکرومول از زوج پرایمرهای فوق، ۲ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase و ۳ میکرولیتر از DNA مربوط به هر ایزوله با برنامه حرارتی شامل:

یک سیکل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، ۴۵ سیکل تکراری ۹۴ سانتی‌گراد ۴۵ ثانیه، ۳۸ درجه سانتی‌گراد ۴۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۶۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد.

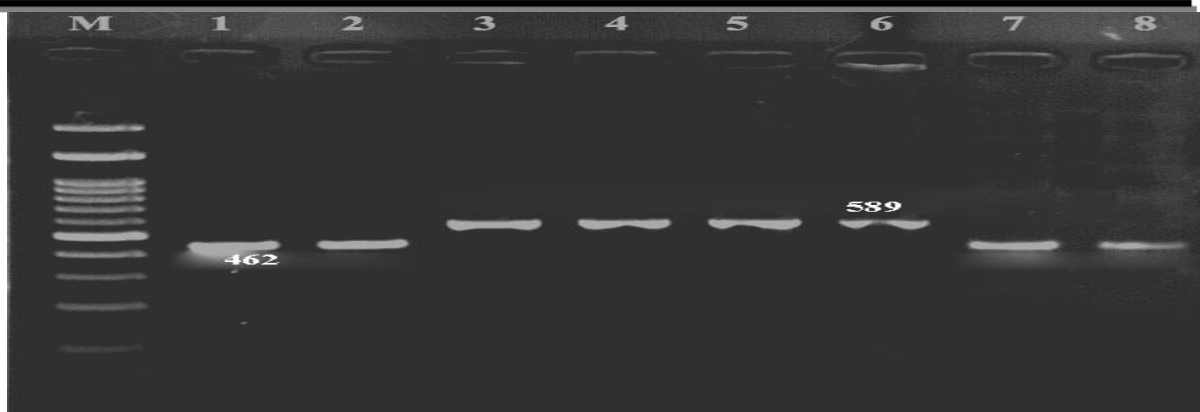
در تمام مراحل فوق جهت ارزیابی محصول PCR، از الکتروفورز محصول روی ژل آگاروز ۲ درصد استفاده شد.



شکل ۱- ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به ردیابی ژن *16srRNA* مربوط به گونه‌های کمپیلوباکتر در ایزوله‌های جدا شده (ستون M= مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA، ستون NC= نمونه کنترل منفی، ستون ۱= نمونه کنترل مثبت، ستون‌های ۱۶-۸= نمونه‌های مورد مطالعه)

نشان‌گر وجود گونه کمپیلوباکتر کولی بود. ایزوله‌های فاقد دو ژن به‌عنوان سایر گونه‌های کمپیلو باکتر قلمداد شدند

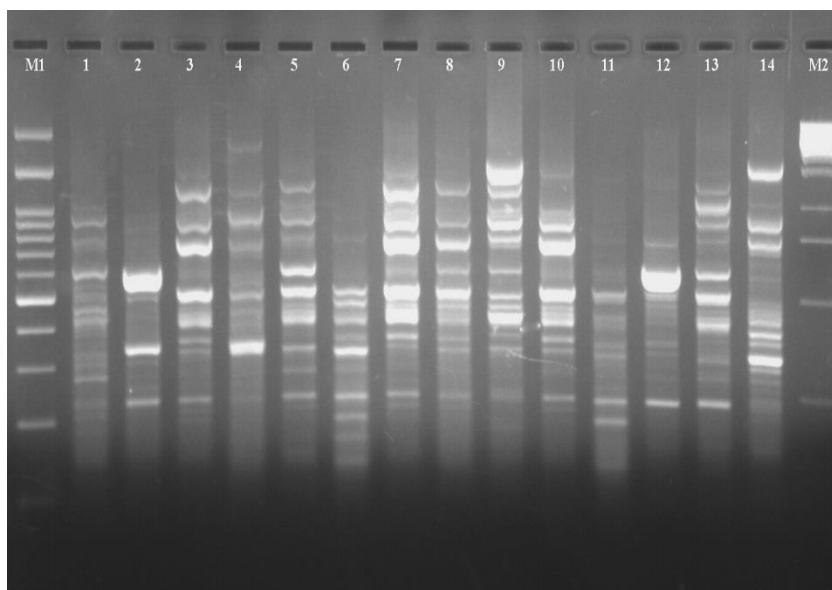
در کلنی‌های مشکوک به گونه‌های کمپیلوباکتر وجود ژن *mapA* نشانگر وجود گونه کمپیلو باکتر ژژونی و ژن *ceuE*



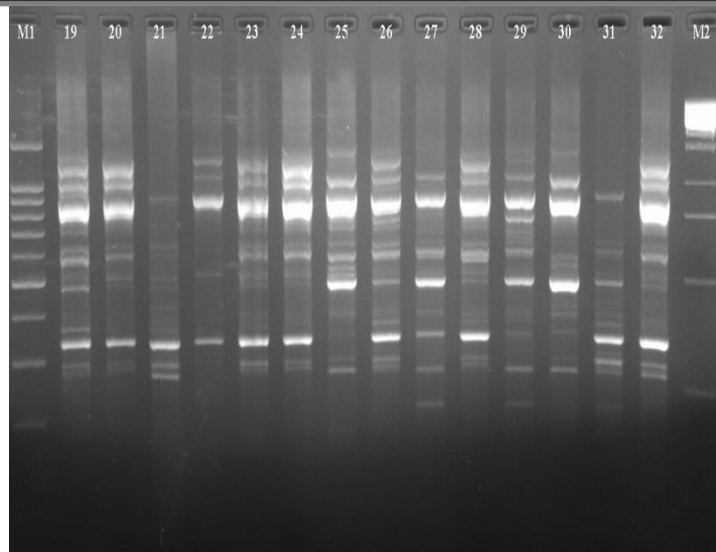
عکس ۲- ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به ردیابی ژن *mapA* مربوط به گونه کمپیلوباکتر ژژونی (قطعه ۵۸۹ جفت بازی) و ژن *ceuB* مربوط به گونه کمپیلوباکتر کولی (قطعه ۴۶۲ جفت بازی) در ایزوله‌های جدا شده از شیر خام گاو، گوسفند و بز (ستون M= مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA، ستون‌های ۱-۸= نمونه‌های مورد مطالعه)

ایزوله‌های انتخابی شامل، نمونه‌های شماره ۱-۱۸ گونه کمپیلوباکتر ژژونی (ایزوله‌های ۱-۳ جدا شده از شیر بز، ایزوله‌های ۴-۱۲ جدا شده از شیر گاو، ایزوله‌های ۱۳-۱۸ جدا شده از شیر گوسفند) و نمونه‌های شماره ۱۹-۴۳ گونه کمپیلوباکتر کولی (ایزوله‌های ۱۹-۲۶ جدا شده از شیر بز، ایزوله‌های ۲۷-۳۸ جدا شده از شیر گاو، ایزوله‌های ۳۹-۴۳ جدا شده از شیر گوسفند) بودند.

از مجموع ۴۳۲ نمونه اخذ شده از شیر خام گاو، گوسفند و بز، ۷۶ ایزوله کمپیلوباکتر جدا شد که جهت دسته بندی ژنتیکی ۴۳ ایزوله انتخاب شده از بین آن‌ها، از روش ERIC-PCR استفاده شد که در این راستا ۴۳ ایزوله مورد مطالعه سه نوبت با روش ERIC-PCR آزمایش و پس از اطمینان از حضور قطعات تکثیر یافته در PCR (تصاویر حاصل از الکتروفورز (عکس‌های ۳ و ۴) آنالیز شدند .



شکل ۳- ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به نشان گر ERIC-PCR روی ایزوله‌های کمپیلوباکتر ژژونی (ستون M1= مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA، ستون M2= مارکر ۱ کیلو بازی DNA)



عکس ۴- ژل حاصل از الکتروفورز محصول ERIC-PCR روی ایزوله‌های کمپیلوباکتر کولی (ستون M1= مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA، ستون M2= مارکر ۱ کیلو بازی DNA)

امتیازدهی ژل‌ها، شباهت ژنتیکی بر اساس داده‌های ۰ و ۱ با استفاده از ضرایب جاکارد، دایس و تطابق ساده محاسبه شد که ضریب کوفنتیک محاسبه شده برای الگوریتم A و هر کدام از سه ضریب فوق در جدول ۱ آورده شده است.

طبق تصاویر ایزوله‌های مورد مطالعه دارای الگوی باندی از محدود ۱۲۰ تا ۳۰۰۰ جفت بازی DNA بودند که قطعات تکثیر یافته در ایزوله‌ها در قالب اعداد (۱ وجود باند) و (عدم وجود باند) امتیازدهی و به وسیله بازخوانی مقادیر کامپیوتری ژل هادر برنامه INTSYS آنالیز شدند. پس از

جدول ۱- ضریب کوفنتیک محاسبه شده برای الگوریتم و ضرایب تشابه جاکارد، دایس و تطابق ساده روی ایزوله‌های کمپیلوباکتر ژرژونی و کولی با نشانگر ERIC-PCR

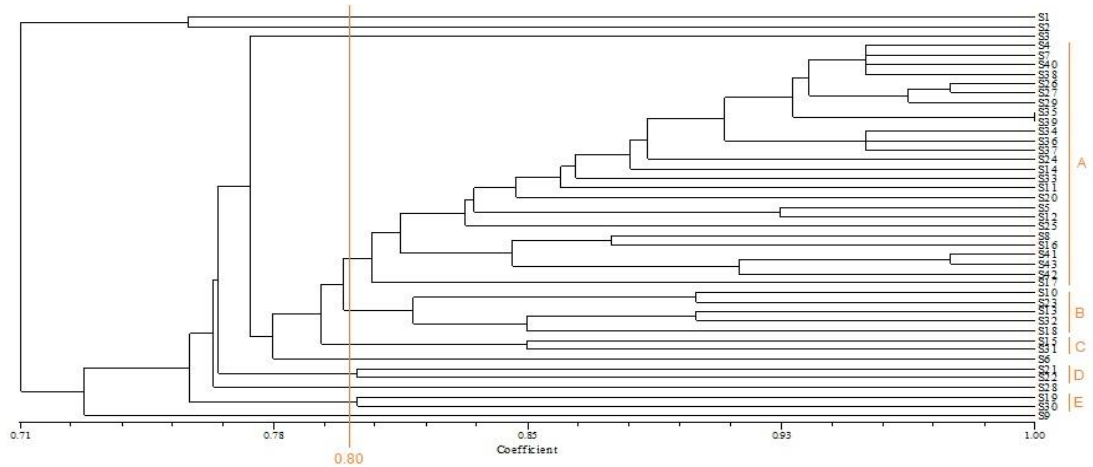
ضریب تشابه الگوریتم	ضریب تشابه	ضریب تشابه دایس	ضریب تطابق ساده (SM)
جاکارد (J)		(DICE)	
0.77145	UPGMA	0.68810	0.77743

بین ایزوله‌های ۳۵ با ۳۹ مشاهده شد. و کمترین قرابت ژنتیکی بین ایزوله ۲۲ با ۱۱ (ضریب شباهت ۵۴٪) وجود داشت (جدول ۲) با در نظر گرفتن قرابت بالای ۸۰ درصد ۴۳ ایزوله انتخابی در قالب ۵ پروفایل قرار گرفتند (شکل ۵).

طبق اطلاعات جدول فوق ضریب تطابق ساده (۰.۷۷۷) بزرگ‌تر از دو ضریب جاکارد و دایس بوده لذا جهت محاسبه درصد تشابه ژنتیکی ایزوله‌ها و ترسیم درخت فیلوژنی از این ضریب استفاده شد.

در نشانگر ERIC-PCR یک مورد ایزوله‌ها داری قرابت ۱۰۰٪ (ضریب شباهت ۱) بودند. قرابت ژنتیکی ۱۰۰٪

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	S20	S21	S22	S23	S24	S25	S26	S27	S28	S29	S30	S31	S32	S33	S34	S35	S36	S37	S38
S1	1.00																																					
S2	0.76	1.00																																				
S3	0.61	0.76	1.00																																			
S4	0.71	0.80	0.80	1.00																																		
S5	0.66	0.71	0.80	0.85	1.00																																	
S6	0.68	0.73	0.68	0.83	0.78	1.00																																
S7	0.71	0.80	0.80	0.95	0.85	0.83	1.00																															
S8	0.71	0.76	0.71	0.80	0.80	0.83	0.80	1.00																														
S9	0.59	0.63	0.73	0.73	0.78	0.71	0.73	0.68	1.00																													
S10	0.66	0.71	0.71	0.85	0.80	0.73	0.90	0.71	0.83	1.00																												
S11	0.68	0.73	0.78	0.88	0.83	0.80	0.88	0.73	0.66	0.78	1.00																											
S12	0.63	0.68	0.78	0.83	0.93	0.80	0.83	0.78	0.76	0.78	0.80	1.00																										
S13	0.59	0.63	0.73	0.78	0.78	0.71	0.78	0.73	0.80	0.83	0.76	0.80	1.00																									
S14	0.66	0.76	0.76	0.90	0.85	0.78	0.90	0.80	0.68	0.80	0.88	0.83	0.78	1.00																								
S15	0.63	0.73	0.78	0.83	0.83	0.71	0.83	0.78	0.76	0.83	0.80	0.76	0.71	0.83	1.00																							
S16	0.73	0.73	0.73	0.83	0.83	0.76	0.83	0.88	0.66	0.73	0.80	0.80	0.71	0.83	0.80	1.00																						
S17	0.68	0.68	0.78	0.83	0.78	0.71	0.83	0.73	0.71	0.78	0.85	0.76	0.76	0.83	0.76	0.80	1.00																					
S18	0.76	0.71	0.66	0.80	0.80	0.73	0.80	0.80	0.73	0.80	0.78	0.78	0.83	0.80	0.78	0.88	0.78	1.00																				
S19	0.63	0.73	0.68	0.78	0.73	0.71	0.78	0.68	0.66	0.73	0.71	0.80	0.66	0.73	0.76	0.71	0.66	0.68	1.00																			
S20	0.76	0.80	0.76	0.85	0.76	0.78	0.85	0.76	0.68	0.80	0.78	0.78	0.73	0.80	0.78	0.78	0.78	0.80	0.83	1.00																		
S21	0.59	0.68	0.73	0.83	0.78	0.76	0.83	0.68	0.71	0.78	0.80	0.76	0.76	0.83	0.80	0.71	0.71	0.73	0.76	0.78	1.00																	
S22	0.54	0.63	0.68	0.78	0.73	0.76	0.78	0.68	0.71	0.73	0.71	0.80	0.76	0.78	0.66	0.71	0.71	0.68	0.76	0.73	0.80	1.00																
S23	0.66	0.66	0.66	0.80	0.76	0.68	0.80	0.66	0.78	0.90	0.78	0.73	0.78	0.80	0.78	0.73	0.83	0.80	0.68	0.76	0.73	0.68	1.00															
S24	0.63	0.78	0.88	0.88	0.88	0.76	0.88	0.73	0.76	0.78	0.85	0.85	0.76	0.83	0.80	0.76	0.80	0.73	0.76	0.78	0.76	0.71	0.73	1.00														
S25	0.59	0.73	0.78	0.83	0.78	0.76	0.83	0.68	0.80	0.83	0.76	0.85	0.76	0.83	0.80	0.71	0.76	0.73	0.80	0.78	0.76	0.76	0.83	0.85	1.00													



شکل ۵- دندروگرام حاصل از آنالیز ایزوله‌های کمپیلوباکتر بر مبنای الگوریتم تطابق ساده (Simple Match)

در گذشته از روش‌های فنوتیپی از جمله سروتایپینگ جهت دسته بندی سویه‌های این باکتری استفاده می‌شد. امروزه روش‌های مولکولی جایگزین روشهای مرسوم فنوتیپی شده است. چند روش برای دسته بندی سویه‌های مختلف کمپیلوباکتر طراحی و ارائه شده است. ارزیابی سیستم‌های مختلف طبقه بندی باکتری‌ها در بررسی‌های اپیدمیولوژیکی بر پایه معیارهای مهمی نظیر توان تمایزدهی تکنیک، قابلیت تعیین تیپ و تکرارپذیری روش مربوطه می‌باشد. روش‌های مختلف فنوتیپی و ژنوتیپی برای تیپ بندی سویه‌های کمپیلوباکتر شناخته شده است روش‌های فنوتیپی نظیر سروتایپینگ و فاژتایپینگ قدرت تمایزدهی پایینی دارند از این رو روش‌های ژنوتیپی با قدرت تمایز بالا، هزینه پایین، کاربرد آسان و سریع در شناسایی و دسته بندی سویه‌های کمپیلوباکتر کاربرد پیدا کرده‌اند (۲۵).

اخیراً روش‌های مختلفی برای تعیین منشأ و منبع میکروب‌ها به کاررفته‌اند. روش‌هایی مثل ریبوتایپینگ، ERIC-PCR، RAPD-PCR و RFLP به طرز موفقیت آمیزی برای متمایز کردن سویه‌های باکتری‌های مختلف استفاده شده‌اند. از کاربردی ترین روش‌ها در تیپ بندی سویه‌های کمپیلوباکتر روش‌های مبتنی بر PCR به ویژه سه روش ERIC-PCR، RAPD-PCR و RFLP به طرز موفقیت آمیزی برای متمایز کردن سویه‌های باکتری‌های مختلف استفاده شده‌اند. از کاربردی ترین روش‌ها در تیپ بندی سویه‌های کمپیلوباکتر روش‌های مبتنی بر PCR به ویژه سه روش ERIC-PCR، RAPD-PCR و RFLP

بحث

کمپیلوباکتریوز یک بیماری گوارشی ناشی از غذای مشترک انسان و دام است که بیشتر از طریق شیر و فرآورده‌های حیوانی غیر پاستوریزه یا آلوده به انسان منتقل می‌شود (۲۲). با توجه به سهم بالای محصولات طیور در انتقال گونه‌های کمپیلوباکتر، نقش شیر خام گونه‌های حیوانی در چندین پژوهش ایرانی شناسایی شده است (۲۳). کمپیلوباکترها با داشتن گونه‌ها و میزبان‌های مختلف، یکی از مهم‌ترین و شایع‌ترین باکتری‌های بیماری‌زای مشترک بین انسان و دام محسوب می‌شوند. در جنس کمپیلوباکتر دو گونه مهم به نام کمپیلوباکتر ژرژونی و کمپیلوباکتر کولی مسئول اصلی عفونت‌های ناشی از کمپیلوباکترها در انسان محسوب می‌شوند. همچنین کمپیلوباکتر امروزه به‌عنوان یکی از عوامل مهم در عفونت‌های باکتریایی با منشأ غذایی مورد توجه قرار گرفته است. این باکتری سالانه ۴۰۰ تا ۵۰۰ میلیون نفر را در دنیا مبتلا می‌کند. مطالعات جدید نشان می‌دهد که در کشورهای توسعه‌یافته و در حال توسعه عفونت‌های ناشی کمپیلوباکترها در انسان رو به افزایش است (۲۴).

مطالعه ژنوتایپینگ انتخاب شدند. آنالیز الگوی باندی حاصل از آزمایش ایزوله‌ها با روش ERIC-PCR با نرم‌افزار GelJ نشان دادند که ۳۶ ایزوله کمپیلوباکتر ژرونی مورد مطالعه در ۲۹ پروفایل و ۴ کلاستر و ۳۵ ایزوله کمپیلوباکتر کولی در ۲۹ پروفایل و ۶ کلاستر قرار گرفتند. نتایج این مطالعه نشان‌گر تنوع ژنتیکی بالا در ایزوله‌های کمپیلوباکتر ژرونی و کمپیلوباکتر کولی جدا شده از منابع مختلف بود (۲۷).

Ammar و همکاران (۲۰۲۱) در مطالعه‌ای مشابه با مطالعه حاضر خصوصیات مولکولی (الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و توزیع عوامل حدت) و دسته‌بندی ژنتیکی ایزوله‌های کمپیلوباکتر ژرونی جدا شده از منابع انسانی و دامی را ارزیابی کردند. در این مطالعه ۳۲/۸ درصد از ایزوله‌های جدا شده از مدفوع انسان و گوشت خام مرغ مقاومت چندگانه آنتی‌بیوتیکی داشته و در روش ERIC-PCR در ۵ کلاستر قرار گرفتند (۲۸).

نتیجه گیری

انتخاب یک تکنیک ژنوتایپینگ به سطح مهارت کاربران و امکانات آزمایشگاه و نیز به هدف بررسی وابسته است. در بررسی حاضر از تکنیک ERIC-PCR جهت دسته بندی ژنتیکی سویه‌های کمپیلوباکتر به عنوان یکی از مهم‌ترین و شایع‌ترین میکروارگانیسم‌های پاتوژن دار استفاده شد. استفاده از روش ERIC-PCR در ژنوتایپینگ ایزوله‌های جدا شده نشان‌گر وجود تنوع ژنتیکی بالا در بین ایزوله‌ها بود و نشان داد که ایزوله‌های قرار گرفته در یک پروفایل احتمالاً می‌توانند نحوه انتقال مشابهی داشته باشند.

PCR، RFLP-PCR می‌باشد، در این مطالعه نیز از روش ERIC-PCR جهت دسته بندی ایزوله‌های کمپیلوباکتر جدا شده از فراورده‌های لبنی در استان چهارمحال و بختیاری استفاده شد

۴۳ ایزوله کمپیلوباکتر با نشانگر، ERIC-PCR آزمایش و میزان شباهت ژنتیکی آن‌ها با ضریب تطابق ساده تعیین گردید. به جز شباهت ۱۰۰ درصدی که در یک مورد بین ایزوله‌های ۳۵ با ۳۹ مشاهده شد بیش‌ترین و کمترین درصد قرابت ۵۴٪ تا ۹۸٪ بین ایزوله‌های مورد مطالعه دیده شد و همان گونه در درخت فیلوژنی ترسیم شده بر اساس ضریب تطابق ساده مشهود است،

Ahmed و همکاران (۲۰۱۵) در مصر، از روش ERIC-PCR جهت ژنوتایپینگ ایزوله‌های کمپیلوباکتر ژرونی جدا شده از منابع انسانی و مرغ استفاده کردند. ایزوله‌های جدا شده از ۲۸۷ نمونه مرغ (۱۳۱ سواپ رکتوم، ۳۹ نمونه پوست مرغ، ۸۷ نمونه گوشت خام مرغ و ۳۹ نمونه بافت سکوم روده) و ۲۴۶ نمونه مدفوع از بیماران مشکوک به گاستروانتریت بعد از تأیید مولکولی به روش Real-Time PCR و روش ERIC-PCR آنالیز شدند. در این مطالعه ۳۱ ایزوله کمپیلوباکتر ژرونی جدا شده در ۱۸ پروفایل قرار گرفتند که ۲ پروفایل مربوط به ایزوله‌های انسانی و دامی مشترک بود (۲۶).

در مطالعه Okoh, Lgwaran (۲۰۲۰) از مجموع ۴۰۲ ایزوله کمپیلوباکتر جدا شده از منابع مختلف (گوشت، شیر گاو و آب) در مناطق مختلف، ۸۵ ایزوله کمپیلوباکتر ژرونی و ۶۷ ایزوله کمپیلوباکتر کولی شناسایی شد که از این تعداد ۷۱ ایزوله (۳۵ ایزوله کمپیلوباکتر کولی و ۳۶ ایزوله کمپیلوباکتر ژرونی) جهت

منابع

1. Izat AL, Gardner FA, Denton JH, Golan FA. Incidence and level of *Campylobacter jejuni* in broiler processing. Poultry Science. 1988 Nov 1;67(11):1568-72.
2. Karenlampi R, Kalso S, Ponka A, Schildt M, Hakkinen M, Hanninen ML. Isolation and PFGE typing of Finnish *Campylobacter jejuni* strains from cattle, poultry and organic hens Abstracts of 5th World Congress

- Foodborne Infections and Intoxications. Berlin, Germany. 2004; 7-11:165
3. Allos BM, Blaser MJ. *Campylobacter jejuni* and the expanding spectrum of related infections. *Clinical Infectious Diseases*. 1995 May 1;1092-9.
 4. Alterkruse SF, Boor KJ, Cook M, Cole E, Freier T, Jaykus L, King R, Mazzotta A, Kowalczyk B, Perencevich E, Ruple A. Analytical utility of campylobacter methodologies. *Journal of Food Protection*. 2007 Jan 20; 70(1):241-50.
 5. Blaser MJ. Epidemiologic and clinical features of *Campylobacter jejuni* infections. *Journal of Infectious Diseases*. 1997 Dec 1;176 (Supplement_2):S103-5.
 6. Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM, Tauxe RV. Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases*. 1999 Sep;5(5):607.
 7. Christopher FM, Smith GC, Vanderzant C. Examination of poultry giblets, raw milk and meat for *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*. *Journal of Food Protection*. 1982 Feb 1;45(3):260-2.
 8. Jay JM, Loessner MJ, Golden DA. *Modern food microbiology*. Springer Science & Business Media; 2008 Feb 5.
 9. Hesari J, Ehsani MR, Khosrowshahi A, Ghaemi N. Effect of psychrotrophic bacteria and somatic cell count on proteolysis and sensory properties of UF white cheese. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. 2005 Sep 23;1(2).
 10. Rosyidi A, Budhiharta S, Asmara W, Yudhabuntara D. Phenotypic and genotypic detection of *Campylobacter jejuni* at local chicken and chicken meat. *Animal Production*. 2010;12(2):128-34.
 11. Klena JD, Parker CT, Knibb K, Ibbitt JC, Devane PM, Horn ST, Miller WG, Konkell ME. Differentiation of *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari*, and *Campylobacter upsaliensis* by a multiplex PCR developed from the nucleotide sequence of the lipid A gene *lpxA*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004 Dec;42(12):5549-57.
 12. Saif YM, Fadly AM, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Swayne DE. *Disease of poultry 12th Edition*, Blackwell Publishing Professional, 2008; 657-90.
 13. Lastovica AJ, Le Roux E. Efficient isolation of *Campylobacter upsaliensis* from stools. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001 Nov;39(11):4222.
 14. Linton D, Lawson AJ, Owen RJ, Stanley JP. PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples. *Journal of Clinical Microbiology*. 1997 Oct;35(10):2568-72.
 15. Soleimanjahi H, Bamdad T, Kermanian M. Diagnosis of Enterovirus and mumps virus in CSF samples of patients with aseptic meningitis by RT-PCR assay. *Daneshvar Medicine*. 2008 Aug 22;15(3):75-80.
 16. Shahrokhahad R, Rahimi E, Mommtaz H. Investigation of morbidity and antibacterial resistance of *Campylobacter* spp. sample isolation from broilers slaughter in Rafsanjan city using basic culture method. *Veterinary Researches & Biological Products*. 2011 Jun 22;24(2):53-8.
 17. Khanzadi S, Jamshidi A, Soltaninejad V, Khajenasiri S. Isolation and identification of *Campylobacter jejuni* from bulk tank milk in Mashhad-Iran. *World Applied Sciences Journal*. 2010;9(6):638-43.
 18. Rahimi E, Mommtaz H, Ameri M, Ghasemian-Safaei H, Ali-Kasemi M. Prevalence and antimicrobial resistance

- of *Campylobacter* species isolated from chicken carcasses during processing in Iran. *Poultry Science*. 2010 May 1;89(5):1015-20.
19. Zorman T, Heyndrickx M, Uzunović-Kamberović S, Možina SS. Genotyping of *Campylobacter coli* and *C. jejuni* from retail chicken meat and humans with campylobacteriosis in Slovenia and Bosnia and Herzegovina. *International Journal of Food Microbiology*. 2006 Jul 1;110(1):24-33.
 20. Heras J, Domínguez C, Mata E, Pascual V, Lozano C, Torres C, Zarazaga M. GelJ—a tool for analyzing DNA fingerprint gel images. *BMC Bioinformatics*. 2015 Dec;16(1):1-8.
 21. Versalovic J, Koeth T, Lupski R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to finger printing of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*. 1991 Dec 25;19(24):6823-31.
 22. TCR from Poultry. Antimicrobial resistance and antibiogram of thermotolerant *Campylobacter* recovered from poultry meat in Baghdad markets, Iraq. *Archives of Razi Institute*. 2022;77(1):249-55.
 23. Taghizadeh M, Nematollahi A, Bashiry M, Javanmardi F, Mousavi M, Hosseini H. The global prevalence of *Campylobacter* spp. in milk: A systematic review and meta-analysis. *International Dairy Journal*. 2022 Oct 1;133:105423.
 24. Fani MJ, Mokhtarian D H, Mohsenzadeh M, Ghahramani M, Moshki M. Detection and identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from poultry carcasses slaughtered in Gonabad poultry slaughterhouse. *Internal Medicine Today*. 2009 Jul 10;15(2):30-5.
 25. Kamerbeek J, Schouls LE, Kolk A, Van Agterveld M, Van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, van Embden J. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *Journal of Clinical Microbiology*. 1997 Apr;35(4):907-14.
 26. Ahmed HA, El Hofy FI, Ammar AM, Abd El Tawab AA, Hefny AA. ERIC-PCR genotyping of some *Campylobacter jejuni* isolates of chicken and human origin in Egypt. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2015 Dec 1;15(12):713-7.
 27. Igwaran A, Okoh AI. Molecular determination of genetic diversity among *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from milk, water, and meat samples using enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR (ERIC-PCR). *Infection Ecology & Epidemiology*. 2020 Jan 1;10(1):1830701.
 28. Ammar AM, El-Naenaey ES, El-Malt RM, El-Gedawy AA, Khalifa E, Elnahriry SS, Abd El-Hamid MI. Prevalence, antimicrobial susceptibility, virulence and genotyping of *Campylobacter jejuni* with a special reference to the anti-virulence potential of Eugenol and beta-resorcylic acid on some multi-drug resistant isolates in Egypt. *Animals*. 2020 Dec 22;11(1):3.

Application of ERIC-PCR method for genetic classification of campylobacter strains isolated from raw milk

GholamReza Banisharif¹, Mohammad Hosein Marhamatizadeh^{1*}, Hassan Momtaz²

1. Department of Food Safety and Quality Control, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran
2. Department of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

* Corresponding author: Drmarhamati@gmail.com

Abstract

Introduction and purpose: *Campylobacter* species are one of the most important pathogens causing bacterial gastroenteritis, which are generally transmitted through food of animal origin. The present study was conducted with the aim of genetic classification of *Campylobacter* isolated from raw milk of cows, sheep and goats in Chaharmahal and Bakhtiari province.

Methods: 43 isolates of *Campylobacter* isolated from raw milk of cows, sheep and goats in Chaharmahal and Bakhtiari provinces were selected and confirmed by ERIC-PCR method.

Results: The studied isolates revealed banding patterns ranging from 100 to 2000 open pairs, which were further classified into 5 main profiles with a similarity coefficient of simple matching at a similarity level above 80%. Except for 100% affinity which was observed in 1 case, other isolates had genetic affinity between 54% and 98%.

Conclusion: The placement of the studied isolates in several subgroups showed the acceptable discrimination power of the ERIC-PCR technique in *Campylobacter* genotyping and the presence of different sources of contamination of dairy products with this pathogen. ERIC-PCR method is a simple, fast and low-cost method to describe the genetic diversity of different *Campylobacter* strains, including *Campylobacter jejuni* and *coli* strains.

Keywords: *Campylobacter*, Raw milk, Genetic classification, ERIC-PCR

تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در جدایه های *انتروباکتر کلوآکه* از گوشت گوسفند و مرغ در شهرستان شهرکرد

در سال ۱۴۰۰

الهه برزم دهکردی^۱، الهه تاجبخش^{۲*}، حسن ممتاز^۲

۱. دانش آموخته ی دکتری تخصصی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی،

شهرکرد، ایران

۲. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

*نویسنده مسئول)، پست الکترونیکی: ee_tajbakhsh@yahoo.com

چکیده:

به طور معمول غذاهای آلوده از عوامل اصلی عفونت‌های انسانی بوده و در این بین گوشت طیور و گوشت گوسفند از منابع مهم به حساب می‌آیند. سویه‌های *انتروباکتر کلوآکه* با داشتن عوامل حدت مختلف و مقاومت آنتی‌بیوتیکی چندگانه، عمدتاً به‌عنوان یک بیماری‌زای فرصت‌طلب محسوب می‌شوند. در این تحقیق جداسازی *انتروباکتر کلوآکه* ۳۸۴ گوشت مرغ و گوسفند به صورت تصادفی در سال ۱۳۹۹ در شهرستان شهرکرد به روش‌های میکروبی و مولکولی انجام شد. تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی به روش انتشار دیسک صورت گرفت و به منظور بررسی تولید بیوفیلیم از روش میکروتیتیر پلیت استفاده شد. توانایی تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع الطیف از طریق فنوتیپی و ژنوتیپی بررسی شد. از ۳۸۴ نمونه‌ی مورد بررسی، *انتروباکتر کلوآکه* در ۲۵ نمونه (۶/۵۱ درصد) به عنوان *انتروباکتر کلوآکه* شناسایی شدند که در بررسی مولکولی در حضور ژن *hsp60* نیز تأیید شدند. از این بین ۱۸ نمونه مربوط به گوشت مرغ (۷۲ درصد) و ۷ نمونه (۲۸ درصد) مربوط به گوشت گوسفند بودند. در بین جدایه‌ها بیش‌ترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به کوتریموکسازول و سفوتاکسیم در ۲۰ ایزوله (درصد) و کم‌ترین مقاومت نسبت به نیتروفوراننتین در ۱۵ جدایه (۲۳/۸ درصد) گزارش شد. در روش میکروتیتیر. ۱۵ ایزوله (۶۰ درصد) واکنش بیوفیلیم قوی، ۱۰ ایزوله (۴۰ درصد) واکنش بیوفیلیم متوسط را نشان دادند. مطالعه حاضر حاکی از آن است که سویه‌های *انتروباکتر کلوآکه* مولد ESBL نسبتاً از شیوع بالایی برخوردارند. افزایش میزان این سویه‌ها غالباً ناشی از تجویز غیر منطقی آنتی‌بیوتیک‌ها است که رفع این مشکل مستلزم به‌کارگیری عوامل ضد میکروبی جدید و محدود نمودن استفاده غیر ضروری از عوامل ضد میکروبی و افزایش بهره‌گیری از ابزارهای کنترل عفونت می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: *انتروباکتر کلوآکه*، بتالاکتامازهای وسیع الطیف، گوشت گوسفند، گوشت مرغ، مقاومت آنتی‌بیوتیکی

مقدمه:

چسبندگی به سلول‌های اپی‌تلیال، سویه‌های *انتروباکتر* در شرایط آزمایشگاهی بسیاری از فاکتورهای حدت بالقوه، از جمله *انتروتوکسین‌ها*، آلفا-همولیزین و سیتوتوکسین‌های منفذساز فعال شده با تیول شبیه به سم II مانند شیگا را تولید می‌کنند (Davin-Regli A. and Jean-Marie, 2015). امروزه مصرف فرآورده‌های غذایی با منشأ دامی که ممکن است حاوی باقی مانده‌های آنتی بیوتیکی باشند، نگرانی‌های زیادی را برای مصرف کنندگان ایجاد کرده است. از مهم‌ترین خطر باقی مانده‌های آنتی بیوتیکی در مواد غذایی، بروز مقاومت دارویی در برابر باکتری‌های پاتوژن در بدن مصرف کنندگان می‌باشد.

از آن‌جا که تاکنون تحقیقی در مورد الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در جدایه‌های *انتروباکتر کلواکه* جدا شده از گوشت مرغ و گوسفند در شهرستان شهرکرد صورت نگرفته است، مطالعه حاضر طراحی تا به بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه‌های *انتروباکتر کلواکه* جدا شده از گوشت مرغ و گوسفند پرداخته شود.

مواد و روش کار:

جداسازی باکتری

این مطالعه از نوع توصیفی - مقطعی می‌باشد که در یک دوره یک‌ساله (از خرداد ماه ۱۳۹۸ تا خرداد ۱۳۹۹) در شهرستان شهرکرد ۳۸۴ نمونه‌ی گوشت گوسفند و مرغ (قسمت ران) انجام شد. بر اساس فرمول آماری زیر تعداد

$$n = \frac{Z^2 pq}{d^2}$$

نمونه‌ها ۳۸۴ عدد انتخاب شد. نمونه‌ها در کوتاه‌ترین زمان ممکن با رعایت شرایط اسپتیک به آزمایشگاه کنترل کیفی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد انتقال داده شدند. تمامی نمونه‌ها از نظر حضور *انتروباکتر کلواکه* مورد بررسی قرار گرفتند. مقدار ۱۰ گرم از هر نمونه در شرایط

خانواده *انتروباکتریاسه* گروه بزرگی از باسیل‌های گرم منفی است که جایگاه اصلی آن‌ها دستگاه گوارش انسان و حیوانات خون گرم می‌باشد. آن‌ها در محیط طبیعی ساپروفیت هستند و در خاک و فاضلاب‌ها یافت می‌شوند و نیز قسمتی از فلور نرمال دستگاه گوارش انسان محسوب می‌شوند (Mezzatesta, et al., 2012). *انتروباکترها* باسیل‌های گرم منفی و بی‌هوازی اختیاری می‌باشند که اندازه‌ای معادل ۰/۶ تا ۲ میکرومتر دارند و نیز به واسطه دارا بودن تازک اطرافی متحرک می‌باشد (Antony and Prasad, 2011).

میکروارگانیزم‌های گونه *انتروباکتر* در آب، خاک، فاضلاب، محصولات لبنی و سبزیجات وجود دارند و قسمتی از فلور روده بوده و به طور معمول بیماری‌زا نیستند. اگرچه *انتروباکتر* به ندرت در افراد سالم ایجاد عفونت می‌کند اما می‌تواند عامل مهم مرگ و میر و بیماری در افراد مبتلا به نقص ایمنی باشند. *انتروباکتر اندوتوکسینی* تولید می‌کند که باعث بروز توکسمی می‌شود. علائم عفونت‌های *انتروباکتر* اختصاصی نبوده و در سایر باکتری‌های گرم منفی هم وجود دارد. (Conly, 2012). گونه‌های *انتروباکتر* به علت کلنی‌های بزرگ و موکوئیدی شبیه به گونه‌های *کلسیلا* هستند، اما با تعداد کمی از آزمون‌ها مثل حرکت و اوره‌آز از هم افتراق داده می‌شوند (Murray, et al., 2020). طبقه بندی جنس *انتروباکتر* به طور مکرر دچار تغییر شده است. چندین گونه در این جنس دوباره تعریف شده‌اند از جمله: *انتروباکتر آئروژنز*، *انتروباکتر آمینوجنوس*، *انتروباکتر کانسروجنوس*، *انتروباکتر کووانی*، *انتروباکتر جرجویا*، *انتروباکتر اینترمدیوس*، *انتروباکتر پیرینوس* (Morand, et al., 2009). مکانیسم بیماری‌زایی *انتروباکتر* پیچیده و چند عاملی است که با دخالت تعدادی از عوامل حدت احتمالی، که نقش آن‌ها در توسعه بیماری هنوز مشخص نیست، ایجاد می‌شود. پس از

برای تعیین غلظت DNA، استوک تهیه شده ۱:۱۰۰ رقیق شد. میزان جذب نوری در طول موج‌های ۲۸۰ و ۲۶۰ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد. در صورتی که جذب نوری ۲۶۰ به ۲۸۰ بین ۱/۸ تا ۲ باشد DNA دارای کیفیت خوبی جهت انجام PCR است. پس از خواندن جذب نوری نمونه‌ها، با استفاده از فرمول زیر غلظت DNA تعیین شد (۸).

$$\text{DNA غلظت (OD)} = (\text{ng}/\mu\text{l}) \times 260 \times 50 = (\text{ng}/\mu\text{l})$$

فاکتور رقت

جهت تأیید قطعی وجود *انتروباکتر کلوآکه* در کلونی‌های رشد یافته، از آزمایش PCR جهت ردیابی ژن *hsp60* استفاده شد (Masoomiv Jahandizi, et al., 2020).

در این تحقیق از سویه استاندارد *انتروباکتر کلوآکه* ATCC 23355 تهیه شده از مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. توالی پرایمر مورد استفاده در جدول (۱) نشان داده شده است.

استریل همگن و به محیط استریل پیتون واتر اضافه شد و ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. سپس توسط لوپ استریل به محیط مک کانگی آگار انتقال داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت پلیت‌های کشت داده شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. پس از گذراندن زمان فوق کلنی‌های مشکوک به *انتروباکتر کلوآکه* انتخاب و آزمون‌های تکمیلی روی آن‌ها انجام شد. جهت تشخیص بیوشیمیایی جدایه‌های *انتروباکتر کلوآکه* آزمون‌های بیوشیمیایی از قبیل تولید اندول، واکنش متیل رد، ووژس پروسکائر، سترات، تولید سولفید هیدروژن، اوره، لایزین دکربوکسیلاز، آرژینین دهیدرولاز، اورنیتین دکربوکسیلاز، حرکت و تولید اسید در اثر تخمیر قندها انجام شد (Shimaa, et al., 2023).

تشخیص مولکولی جدایه‌ها

به‌منظور تشخیص مولکولی و تأیید جدایه‌های *انتروباکتر کلوآکه*، استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA (شرکت سیناژن) و طبق دستور شرکت سازنده صورت گرفت.

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت ردیابی ژن *hsp60* *انتروباکتر کلوآکه*

ژن	توالی	اندازه محصول	دمای اتصال
<i>hsp60</i>	F: GGT AGA AGA AGG CGT GGT TGC	۳۴۱	۵۸
	R: ATG CAT TCG GTG GTG ATC ATC AG		

DNA و ۱/۲۵ واحد آنزیم DNA Taq Polymerase، انجام می‌پذیرد. فرایند دمایی برای ردیابی ژن *hsp60* شامل یک سیکل ۹۵ درجه ۴ دقیقه، ۵ سیکل تکراری ۹۴ درجه ۴۰ ثانیه، ۶۵ درجه ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه ۶۰ ثانیه و ۲۵ سیکل تکراری ۹۴ درجه ۴۵ ثانیه، ۵۵ درجه ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه

جهت ردیابی ژن *hsp60* واکنش PCR در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر شامل: ۵ میکرولیتر 10X PCR buffer، ۱/۵ میلی مول MgCl₂، ۲۵۰ میکرومول دئوکسی نوکلئوتید تری فسفات، ۲۰۰ میکرو مول dNTP، ۱ میکرومول از هر یک از زوج پرایمرهای جلویی و عقبی، ۵ میکرولیتر از هر نمونه

¹
(CinnaGen)

DNPTM

(سفتواکسیم، سفتازیدیم، سفپیم) و در ترکیب با اسید کلاوولانیک استفاده می‌شود. هاله اطراف دیسک سفالوسپورین همراه با اسید کلاوولانیک با هاله اطراف دیسک سفالوسپورین به تنهایی مقایسه می‌شود. برای انجام این آزمون مانند دیسک انتشاری عمل شد. ۲ الی ۳ کلنی از کشت کلنی (۲۴ ساعته) در سرم فیزیولوژی استریل حل شد و بعد از مقایسه با محلول استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند، بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت انجام شد. از یک دیسک سفتازیدیم (CAZ) (۳۰ میکروگرم) به تنهایی و یک دیسک سفتازیدیم در ترکیب با اسید کلاوولانیک (CAC) (۳۰/۱۰) میکروگرم) و دیسک سفتواکسیم (CTX) (۳۰ میکروگرم) در کنار دیسک اسید کلاوولانیک (CAC) (۳۰/۱۰) میکروگرم) استفاده شد.

پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شدند. کشت‌های باکتریایی بعد از ۱۸ تا ۲۴ ساعت بررسی شدند و قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک‌های سفالوسپورین همراه و بدون اسید کلاوولانیک اندازه‌گیری و با هم مقایسه شد. در صورتی که قطر هاله عدم رشد باکتری اطراف هر دیسک به تنهایی در مقایسه با دیسک ترکیبی خود ۵ میلی‌متر یا بیش‌تر بود به‌عنوان سویه تولیدکننده بتا لاکتاماز وسیع‌الطیف در نظر گرفته شد. از سویه/شریشیاکلی ATCC 25922 و کلبسیلا پنومونیه ATCC700603 تهیه شده از مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران جهت کنترل روش‌های آنتی‌بیوگرام و دیسک ترکیبی استفاده شد (Torshizi, et al., 2011).

آزمایش تشکیل بیوفیلم با روش میکروتیتر پلیت

برای بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم از روش میکروتیتر پلیت ۹۶ خانه‌ای استفاده شد. برای این منظور ابتدا یک لوپ کامل از کلنی باکتری به یک لوله حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط

۶۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه ۴ دقیقه بود. محصول PCR در این مرحله بر روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شد. الکتروفورز نمونه‌ها در ولتاژ ثابت ۸۰ ولت به مدت حدوداً ۶۰ دقیقه انجام گرفت و از ژل حاصله در حضور نور UV تصویربرداری شد و ثبت گردید. وجود قطعه ۳۴۱ جفت بازی تکثیر یافته از ژن *hsp60* در این مرحله نشان‌گر وجود قطعی *انتروباکتر کلوآکه* در جدایه‌های مورد آزمایش بود.

تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی

برای تعیین مقاومت باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها از روش کربی-بائر^۲ مطابق دستورالعمل CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute) ۲۰۱۹ استفاده شد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیک در این آزمایش شامل: کوتریموکسازول (STX 25µg)، آمیکاسین (AN 30 µg)، نیتروفوراننتین (FM 300µg)، سفتواکسیم (CTX 30µg)، سفتازیدیم (CAZ 30µg)، سفتریاکسون (CRO 30 µg) و سفالوتین (CF 30µg)، سیپروفلوکساسین (CP 5µg)، نالیدیکسیک اسید (NA30µg)، نورفلوکساسین (NOR 10µg)، تتراسایکلین (TE 30µg)، ایمی‌پنم (IMP 10µg)، جنتامایسین (GM 10µg)، آمپی‌سیلین (AM 10µg)، کانامایسین (K 30 µg)، اریترومایسین (E 15µg) که از شرکت پادتن طب-ایران خریداری شدند.

شناسایی سویه‌های *انتروباکتر کلوآکه* تولیدکننده

بتا لاکتامازهای وسیع‌الطیف

به‌منظور بررسی سویه‌های *انتروباکتر کلوآکه* تولیدکننده آنزیم‌های *ESBL* آزمون دیسک ترکیبی انجام شد. در این آزمون مهار فعالیت *ESBLs* توسط اسید کلاوولانیک ارزیابی می‌شود و دیسک‌های حاوی سفالوسپورین به تنهایی

³ -Combination Disk Test (CDT)

² Kirby Bauer

در دمای آزمایشگاه سطح پلیت‌ها خشک شد. سپس جذب نوری چاهک‌های رنگ شده با کریستال ویوله در ۶۳۰ نانومتر توسط دستگاه قرائت کننده الیزا (BioTeK)، ساخت کشور آمریکا (خوانده شد. که بر اساس OD در سه گروه قوی، متوسط و ضعیف طبقه‌بندی شدند. به طوری که جدایه‌هایی که $4ODc < OD$ به عنوان بیوفیلیم قوی، در صورتی که $2ODc < OD \leq 4ODc$ داشتند به عنوان بیوفیلیم متوسط و $OD \leq 2ODc$ به عنوان بیوفیلیم ضعیف و $OD \leq OD$ به عنوان بیوفیلیم منفی در نظر گرفته شدند. (Torshizi, et al., 2011).

واکنش PCR جهت ردیابی ژن‌های *bla*_{TEM} *bla*_{CTX-M} و *bla*_{SHV}

واکنش PCR برای ردیابی ژن‌های *bla* با استفاده از پرایمرهای نشان داده شده در جدول (۴) انجام شد. (Rizzi, et al., 2016).

جدول ۴: پرایمرهای مورد استفاده برای ردیابی ژن‌های *bla*_{SHV} و *bla*_{TEM} *bla*_{CTX-M}

ژن	توالی پرایمر (3'-5')	اندازه‌ی محصول (bp)	دمای اتصال
<i>bla</i> _{SHV}	F: ATGCGTTATATTCGCCTGTG R: TGCTTTGTTATTCGGGCCAA	۷۴۷	۶۵
<i>bla</i> _{CTX-M}	F: ATGTGCAGCACCAGTAAAGTGATGGC R: TGGGTAAAGTAAGTGACCAGAATCAGCGG	۵۹۳	۶۵
<i>bla</i> _{TEM}	F: TCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGA R: ACGCTCACCGGCTCCAGATTTAT	۴۴۵	۶۵

جلویی و عقبی، ۵ میکرولیتر از هر نمونه DNA و ۱/۲۵ وا حد آنزیم DNA Taq Polymerase، از جام می پذیرد. فرایند دمایی شامل یک سیکل ۹۴ درجه ۵ دقیقه، ۱۰ سیکل تکراری ۹۴ درجه ۴۵ ثانیه، ۶۵ درجه ۴۵ ثانیه، ۷۲

TSB تلقیح شد و به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شدند. سپس ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری به لوله آزمایش حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط استریل TSB (حاوی ۰/۲۵ گلوکز) تلقیح گردید. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از این محیط در داخل چاهک‌های میکروتیتر پلیت ریخته شد. در چاهک شاهد فقط محیط کشت استریل TSB ریخته شد و از سویه استاندارد کلبسیلا پنومونیه ATCC 1705 تهیه شده از مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. بعد از شست‌وشوی میکروپلیت‌ها ۲۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۰/۹ درصد افزوده شد و گرمخانه گذاری به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. سپس محتوی داخل چاهک‌ها خالی و شست‌وشوی چاهک‌ها ۳ بار با سرم فیزیولوژی استریل انجام شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۵ درصد به چاهک‌ها اضافه گردید تا سلول‌ها تثبیت گردند. بعد از گذشت ۱۵ دقیقه، محتویات چاهک‌ها تخلیه شدند و

واکنش PCR در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر شامل: ۵ میکرولیتر 10X PCR buffer، ۱/۵ میلی مول Mgcl2، ۲۵۰ میکرومول دئوکسی نوکلئوتید تری فسفات، ۲۰۰ میکرو مول dNTP، ۱ میکرومول از هر یک از زوج پرایمرهای

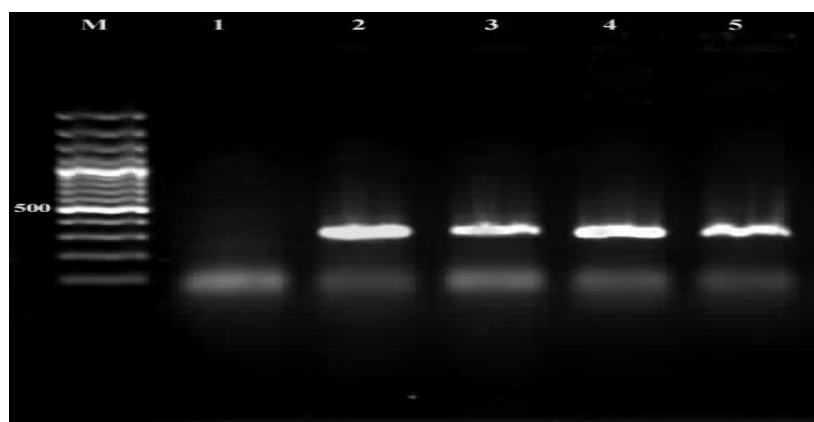
همراه DNA به سمت قطب مثبت حرکت می‌کند.

نتایج:

پس از کشت نمونه‌های گوشت و انجام آزمون‌های بیوشیمیایی ۲۵ جدایه (۶/۵۱ درصد) به عنوان *انتروباکتر کلواکه* شناسایی شدند که در بررسی مولکولی و حضور ژن *hsp60* نیز تأیید شدند (شکل ۱). که ۱۸ نمونه مربوط به گوشت مرغ (۷۲ درصد) و ۷ نمونه (۲۸ درصد) مربوط به گوشت گوسفند می‌باشد.

درجه ۹۰ ثانیه و ۲۵ سیکل تکراری ۹۴ درجه ۴۵ ثانیه، ۵۵ درجه ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه ۹۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه ۵ دقیقه انجام شد.

جهت انجام الکتروفورز ۱۵ میکرولیتر از محصول PCR با ۳ میکرولیتر از بافر بارگذاری مخلوط و به چاهک ژل منتقل گردید. به همراه نمونه‌ها از مارکر DNA ۱۰۰ جفت بازی یا ۱ کیلو بازی (فرمنتاس لیتوانی) جهت تعیین وزن با ند مورد نظر در الکتروفورز استفاده شد. مولکول‌های DNA به علت داشتن فسفات که دارای بار منفی است، به سمت قطب مثبت حرکت می‌کنند. رنگ نشانگر نیز خود باردار شده



شکل ۱: الکتروفورز ژن *hsp60* جدایه های *انتروباکتر کلواکه*: ستون M مارکر، ستون ۱: کنترل منفی، ستون ۲: کنترل مثبت، ستون‌های ۳ تا ۵: نمونه‌های مثبت

آمیپ سیلین، کانامایسین و اریترومایسین مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به نتایج به دست آمده بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به کوتریموکسازول و سفوتاکسیم در ۲۰ جدایه (۸۰ درصد) و کمترین مقاومت نسبت به نیتروفوراننتین در ۱۵ جدایه (۲۳/۸ درصد) مشاهده شد (جدول ۵).

نتایج مربوط به مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه های *انتروباکتر کلواکه*

حساسیت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه های *انتروباکتر کلواکه* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کوتریموکسازول، آمیکایسین، نیتروفوراننتین، سفوتاکسیم، سفتازیدیم، سفتریاکسون، سفالوتین، سیپروفلوکساسین، نالیدیکسیک اسید، نورفلوکساسین، تتراسایکلین، ایمی‌پنم، جنتامایسین،

جدول ۵: نتایج مقاومت آنتی بیوتیکی در جدایه های *انتروباکتر کلوآکه* جدا شده از گوشت مرغ و گوسفند

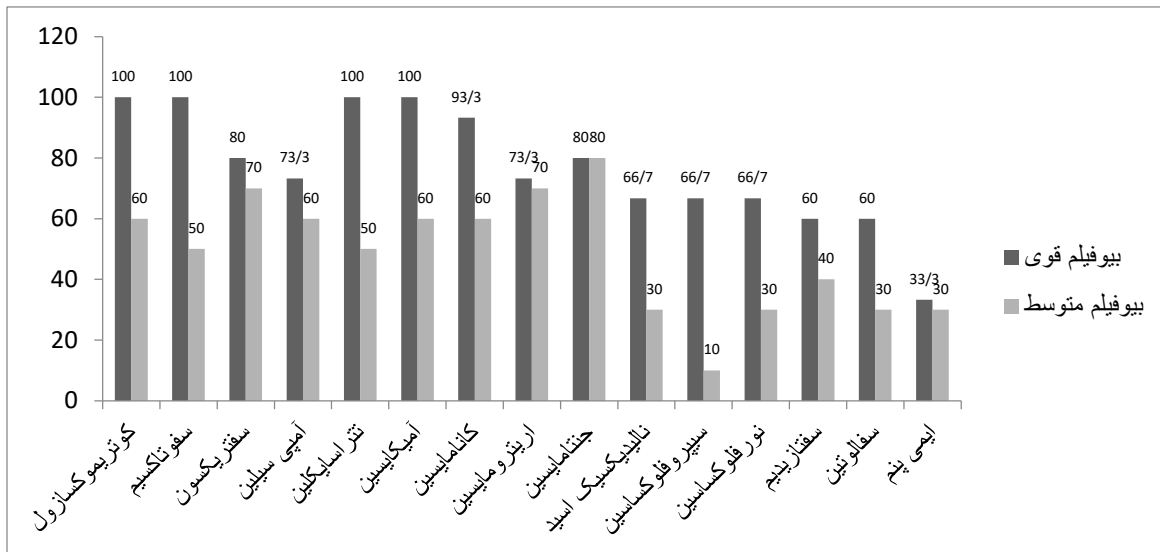
آنتی بیوتیک	مقاوم		نیمه حساس		حساس	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
کوتریموکسازول	۲۰	۸۰	۴	۱۶	۱	۴
سفتوتاکسیم	۲۰	۸۰	۳	۱۲	۲	۸
سفتریکسون	۱۸	۷۲	۲	۸	۵	۲۰
آمپی سیلین	۱۷	۶۸	۳	۱۲	۵	۲۰
تتراسایکلین	۱۷	۶۸	۴	۱۶	۴	۱۶
آمیکاسین	۱۵	۶۰	۷	۲۸	۳	۱۲
کاناماسین	۱۶	۶۴	۴	۱۶	۵	۲۰
اریترومایسین	۱۴	۵۶	۵	۲۰	۶	۲۴
جنتامایسین	۱۴	۵۶	۴	۱۶	۷	۲۸
نالیدیکسیک اسید	۱۲	۴۸	۳	۱۲	۱۰	۴۰
سیپروفلوکساسین	۱۲	۴۸	۴	۱۶	۹	۳۶
نورفلوکساسین	۱۰	۴۰	۵	۲۰	۱۰	۴۰
سفتازیدیم	۱۰	۴۰	۴	۱۶	۱۱	۴۴
سفالوتین	۹	۳۶	۴	۱۶	۱۲	۴۸
ایمی پنم	۵	۲۰	۵	۲۰	۱۵	۶۰

۱۵ جدایه (۶۰ درصد) بیوفیلم قوی، ۱۰ جدایه (۴۰ درصد) تولید بیوفیلم متوسط را نشان دادند. عدم تولید بیوفیلم در هیچ کدام از جدایه ها مشاهده نگردید. در نمودار (۳) نتایج

نتایج مربوط به آزمایش تشکیل بیوفیلم با روش میکروتیتر پلیت

در روش میکروتیتر پلیت ۲۵ جدایه *انتروباکتر کلوآکه* بر اساس OD در سه گروه قوی، متوسط و ضعیف طبقه بندی شدند.

تولید بیوفیلیم جدایه های *انتروباکتر کلوآکه* جدا شده از گوشت کوسفند و مرغ آورده شده است.



نمودار ۲: مقاومت آنتی بیوتیکی در جدایه های *انتروباکتر کلوآکه* بر اساس بیوفیلیم

استفاده از آن‌ها در دامداری‌ها و مرغداری‌ها و باقی مانده آن‌ها در گوشت، شیرو سایر مواد غذایی با منشأ دامی سبب ایجاد خطرهای قابل توجه برای مصرف کنندگان خواهد شد (Gracey, and Gollins 1992). نتایج حاصله از مطالعات صورت گرفته طی سی سال اخیر در کشور ضرورت‌هایی را در جهت کنترل کیفیت مواد غذایی با منشأ دامی آشکار می‌سازد. مشاهده آلودگی به بقایای آنتی بیوتیکی در اغلب بررسی‌های صورت گرفته روی شیر و لبنیات، اندام‌های مصرفی طیور هم‌چون کبد و کلیه و گوشت در برخی از استان‌ها از جمله نکات قابل توجه در تهدید سلامت غذایی کشور می‌باشد. (Msgari Abasi, et al., 2009). وجود مقاومت‌های آنتی بیوتیکی در پاتوژن‌های بیمارستانی یکی از نگرانی‌های بزرگ و اساسی علم پزشکی است. مقاومت به آنتی بیوتیک‌های جدید و گسترش باکتری‌های مقاوم نه تنها بین بیماران بستری در بیمارستان بلکه در بین افراد جامعه از پیامدهای این معضل است (Yelin

بر اساس آزمون دقیق فیشر بین مقاومت به آنتی بیوتیک‌های کوتریموکسازول، سفوتاکسیم، تتراسایکلین، آمیکاسین و سیپروفلوکساسین با تولید بیوفیلیم رابطه آماری معناداری مشاهده شد ($p < 0.05$) اما بین مقاومت با سایر آنتی بیوتیک‌ها و تولید بیوفیلیم رابطه آماری معناداری مشاهده نشد.

از ۲۵ جدایه *انتروباکتر کلوآکه* مورد بررسی ۱۰ جدایه (۴۰ درصد) در بررسی فنوتیپی مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف تشخیص داده شدند. در بررسی مولکولی ۵ جدایه (۵۰ درصد) دارای ژن *bla*_{CTX-M} ۴ جدایه (۴۰ درصد) دارای ژن *bla*_{TEM} ۳ جدایه (۳۰ درصد) دارای ژن *bla*_{SHV} بودند.

بحث

امروزه مصرف فرآورده‌های غذایی با منشأ دامی که ممکن است حاوی باقی مانده‌های آنتی بیوتیکی باشند، نگرانی‌های زیادی را برای مصرف کنندگان ایجاد کرده است. مصرف بی-رویه آنتی بیوتیک‌ها و عدم رعایت نکات ضروری در

علت آلودگی کمتر در گوشت قرمز می‌تواند به علت بافت مخصوص آن باشد که بعد از مرگ حیوان حالت اسیدی پیدا می‌کند و باعث کاهش pH می‌شود. زیرا طبق بررسی‌های انجام شده، باکتری‌ها بر روی گوشت‌هایی که دارای pH پایین هستند به کندی رشد می‌کنند (Jay James, et al., 2000). غذاهای حیوانی منبع مهمی برای تغذیه برای بسیاری از مردم در سراسر جهان هستند، اما مصرف آن‌ها ممکن است چندین خطر برای سلامتی داشته باشد. این موضوع، ایمنی غذاهای حیوانی را در خط مقدم نگرانی‌های اجتماعی قرار می‌دهد و یکی از چالش‌های فعلی و مداوم برای تولیدکنندگان مواد غذایی است. یکی از این خطرات برای سلامتی باکتری‌های خانواده‌ی انتروباکتریاسه می‌باشند که به طور طبیعی در دستگاه گوارش پستانداران زندگی می‌کنند. این باکتری‌ها نه تنها باعث فساد مواد غذایی می‌شوند، بلکه خطر میکروبیولوژیکی برای مصرف کنندگان نیز دارند. مصرف گوشت خام یا نیم پز و محصولات غذایی با آلودگی متقاطع باعث افزایش عفونت انسانی در اعضای این خانواده می‌شود. باکتری‌های خانواده‌ی انتروباکتریاسه همیشه به‌عنوان باکتری‌های شاخص برای کیفیت میکروبیولوژیکی غذا و سطح بهداشت فرآورده‌های تولیدی، به دلیل این خطرات مورد نیاز بوده‌اند (Jay James, et al., 2000).

در تحقیق انجام شده توسط Edris و همکاران که بر روی ۲۷۴ نمونه غذای حیوانی شامل: گوشت گاو، مرغ، خرگوش، شیر، کره و تخم مرغ جمع آوری شده از سوپرمارکت‌ها به منظور جداسازی انتروباکتریاسه‌ها انجام شد. در این تحقیق *پسودوموناس آئروژینوزا* از بیشترین فراوانی (۱۱/۴ درصد) برخوردار بود که بیشترین آلودگی در گوشت خرگوش، کره و شیر گزارش گردیده است. در این تحقیق شیوع *انتروباکتر کلوآکه* (۷/۲۷ درصد) گزارش گردید که نسبت به تحقیق ما از فراوانی کمتری برخوردار می‌باشد. کمترین فراوانی متعلق

(et al., 2019). بسیاری از باکتری‌های خانواده‌ی انتروباکتریاسه از عوامل شایع عفونت‌های ادراری بوده و مصرف گسترده آنتی‌بیوتیک‌ها باعث افزایش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در این باکتری‌ها شده است که مقاومت آن‌ها به بتالاکتام‌ها (مثل آمپی‌سیلین و سفوتاکسیم) و نیز سایر آنتی-بیوتیک‌های دیگر مثل کوتریموکسازول و سولفونامیدها در بسیاری از مناطق دنیا گزارش شده است (Yang, et al.,). برخی از آنتی‌بیوتیک‌های رایج در دامپزشکی عبارتند از: تتراسایکلین‌ها (مثل اکسی تتراسایکلین، کلرتتراسایکلین، داکسی سایکلین)، پنی‌سیلین‌ها، ماکرولیدها (تایلوزین، تیل مایکوزین و ...)، آمینوگلیکوزیدها مثل نئومایسین، کانامایسین، استرپتومایسین و ...). مطالعات نشان می‌دهد صرف نظر از الگوی مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها، ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌توانند در ایجاد مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها نقش داشته باشند. در سال‌های اخیر استفاده از طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌های مختلف از جمله سفالوسپورین‌ها، کینولون‌ها و آمینوگلیکوزیدها از تدابیر درمانی مناسب به‌منظور کنترل بیماری‌های عفونی در افراد مختلف می‌باشد و به‌دلیل استفاده زیاد از داروهای آنتی‌میکروبی، شیوع و انتشار کلون‌های مقاوم و ژن‌های مقاومت در بیمارستان‌ها افزایش یافته است. بنابراین، بررسی الگوی مقاومت ضد میکروبی باکتری‌ها ضروری به‌نظر می‌رسد (Jay James, et al., 2000).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که از ۳۸۴ نمونه‌ی گوشت مورد بررسی، تعداد ۲۵ نمونه آلوده به *انتروباکتر کلوآکه* می‌باشند. که ۱۸ نمونه مربوط به گوشت مرغ (۷۲ درصد) و ۷ نمونه (۲۸ درصد) مربوط به گوشت گوسفند می‌باشد. بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به کوتریموکسازول و سفوتاکسیم (۸۰ درصد) و کمترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به ایمپنم (۲۰ درصد) گزارش گردید.

سطوح جامد منجر به تشکیل بیوفیلم میکروبی می‌گردد (Kadouri, et al., 2005).

تشکیل بیوفیلم منافع زیادی برای باکتری‌ها دارد از جمله حفاظت آن‌ها در برابر سیستم ایمنی میزبان، مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها و ضد عفونی کننده‌ها، حفظ و نگهداری محیط فیزیکی شیمیایی مناسب برای رشد و بقا میکروارگانیسم، بنابراین آن‌ها می‌توانند در شرایط نامساعد محیطی مقاومت کنند و زنده بمانند. با توجه به مقاومت آنتی‌بیوتیکی بیوفیلم باکتری‌ها نسبت به حالت پلانکتونیک، این مسئله اهمیت بررسی و تشخیص بیوفیلم در عفونت ایجاد شده و لحاظ این مسئله را در درمان نشان می‌دهد (Davey, et al., 2000).

در تحقیق حاضر به منظور بررسی تشکیل بیوفیلم ۲۵ ایزوله /انتروباکتر کلوآکه جدا شده از گوشت، که براساس OD در سه گروه قوی، متوسط و ضعیف طبقه‌بندی شدند. ۱۵ ایزوله (۶۰ درصد) واکنش بیوفیلم قوی، ۱۰ ایزوله (۴۰ درصد) واکنش بیوفیلم متوسط را نشان دادند. واکنش بیوفیلم منفی در هیچ کدام از ایزوله‌ها مشاهده نگردید. در تجزیه و تحلیل آماری بین مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های کوتریموکسازول، سفوتاکسیم، تتراسایکلین، آمیکاسین و سیپروفلوکساسین با واکنش بیوفیلم رابطه آماری معناداری مشاهده گردید. در تحقیق انجام شده توسط Edris و همکاران (Edris et al., 2023) توانایی تشکیل بیوفیلم قوی در ایزوله‌های /انتروباکتر کلوآکه (۵۷/۱۴ درصد) و توانایی تشکیل بیوفیلم متوسط (۴۲/۸۶ درصد) گزارش گردید که تقریباً با نتایج حاصل از تحقیق ما مشابه می‌باشد. تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز توسط باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه یکی از مشکلات بهداشتی و درمانی در سراسر جهان است. شیوع این آنزیم‌ها در نواحی جغرافیایی مختلف و با زمان تغییر می‌کند (Mehrang, et al., 2008; Al-Zahrani, et al., 2005; Knothe, et al., 1983).

به پروتئوس میرابیلیس می‌باشد. در این تحقیق بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی به آموکسی سیلین-کلاولانیک اسید و سفوروکسیم (۱۰۰ درصد) گزارش شد. در حالی که در تحقیق ما بیشترین مقاومت به کوتریموکسازول و سفوتاکسیم (۸۰ درصد) گزارش شده است (Edris, et al., 2023).

در تحقیقی که توسط Haryani و همکاران بر روی ۷ نوع غذای خیابانی در مالزی صورت گرفت، در ۶ نمونه آلودگی به انتروباکتر کلوآکه گزارش شد. در این تحقیق بیشترین مقاومت نسبت به استرپتومایسین (۸۵/۷۱ درصد) گزارش شد. مقاومت نسبت به تتراسایکلین (۸۶,۴۲ درصد) و مقاومت نسبت به سفوروکسیم (۲۸,۵۷ درصد) گزارش شد (Hayrani, et al., 2008).

توانایی تشکیل بیوفیلم نقش مهمی در حدت باکتری‌ها دارد. بیوفیلم از یک طرف باعث محافظت میکروارگانیسم‌های تشکیل دهنده می‌شود و از طرف دیگر باعث مبادله مواد ژنتیکی می‌باشد. باکتری‌هایی که توانایی تشکیل بیوفیلم دارند نسبت به شرایط نامساعد محیطی و بیوسایدها مقاومت زیادی دارند و از طرف دیگر در بیوفیلم مواد را نگهداری و تغلیظ می‌کنند و از مواد متابولیکی یکدیگر مصرف می‌نمایند. در یک بیوفیلم ممکن است جذب مواد آلی و تغذیه کمتر از زمانی باشد که باکتری‌ها آزاد می‌باشند ولی پایداری ژنتیکی در آن‌ها بیشتر می‌باشد. بیوفیلم باکتری را در برابر آنتی-بیوتیک‌ها، آنتی‌بادی‌ها و سلول‌های فاگوسیتوز مقاوم می‌نماید. بیوفیلم باکتریایی، جامعه‌ای از باکتری‌های چسبنده و رشد کننده بر سطوح جان‌دار یا بی‌جان محصور در یک ماتریکس پلی‌ساکاریدی است. در طبیعت میکروارگانیسم‌ها اغلب در ارتباط نزدیکی با سطوح جامد رشد می‌کنند که این سطوح ممکن است بافت‌های نرم زنده و یا سطوح غیر زنده، مواد غوطه ور و یا ذرات خاک باشد. ارتباط و پیوستگی با

تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف از لحاظ بالینی بسیار با اهمیت هستند، زیرا الگوی مقاومت دارویی گسترده‌ای از خود نشان می‌دهند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان، صمیمانه از زحمات معاونت محترم پژوهشی و جناب آقای دکتر منوچهر مؤمنی تشکر و قدردانی به‌عمل می‌آورند.

تعارض در منافع: وجود ندارد

حمایت مالی: ندارد

نتیجه‌گیری

بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در دو دهه اخیر افزایش قابل‌ملاحظه‌ای داشته‌اند. این باکتری‌ها به علت غیر فعال سازی طیف وسیعی از داروهای بتالاکتام به‌ویژه نسل سوم سفالوسپورین‌ها و مونوباکتام‌ها، مشکلات فراوانی را برای درمان ایجاد کرده‌اند. پیدایش و انتشار این باکتری‌ها به‌نظر می‌رسد که غالباً ناشی از استفاده گسترده داروهای بتالاکتام وسیع‌الطیف باشد به‌طوری‌که امروزه شاهد افزایش روزافزون باکتری‌های تولیدکننده *ESBL* هستیم. ارگانسیم‌های

منابع:

- 1- Antony B. and Prasad BR. 2011. An outbreak of neonatal septicaemia by *Enterobacter cloacae*. Asian. Pacific. J. Trop. Dis. 1(3): 227-9.
- 2- Conly J. 2012. Antimicrobial resistance in Canada. Canadian. Med. Association. J. 167: 885-891.
- 3- Davin-Regli A. and Jean-Marie P. 2015. *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. Frontiers. Microbiol. 6: 392.
- 4- Davey M.E. and O'toole G.A. 2000. Microbial Biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbiol Mol. Biol. Rev64(4): 847-867.
- 5- Al-Zahrani A.J. and Akhtar N. 2005. Susceptibility patterns of extended spectrum β -lactamases (*ESBL*) producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated in a teaching hospital. Pakistan. J. Med. Res. 44(2): 64-67.
- 6- Gracey JF. and Gollins D.S. 1992. Meat Hygiene. 9th ed. London: Baillière Tindall; 1992.
- 7- Hadziyannis E., Tuohy M., Thomas L., Procop W.G. and Hall S.G. 2000. Screening and confirmatory testing for extended spectrum beta-lactamases (*ESBL*) in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 36: 113-117.
- 8- Haryani Y., Tunung R. and Chai L.C. Characterization of *Enterobacter cloacae* Isolated from Street Foods 57 Characterization of *Enterobacter cloacae* isolated from Street Foods. ASEAN Food Journal 15 (1): 57-64.
- 9- Jay James M. 2000. Modern Food Microbiology, 6th ed. Aspen publisher.
- 10- Kadouri D. and O'toole GA. 2005. Susceptibility of Biofilms to *BdellovibrioBacteriovorus* Attack. Appl Environ. Microbiol. 71(7): 4044-4051.
- 11- Knothe H., Shah P., Krcmery V., Antal M. and Mitsuhashi S. 1983. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and

- Serratia marcescens. Infection. 11: 315-317.
- 12- Masoomi Jahandizi R., Aletaha M. and Musavi M.K. 2020. Evaluation of the Frequency of TEM beta-lactamase gene in patients with urinary tract infections in Bonab County. Iran. J. Bio. 32(3): 438-48
- 13- Mesgari Abasi M., Rashidi M.R. and Javadi A. 2009. Levels of tetracycline residues in cattle meat, liver, and kidney from a slaughterhouse in Tabriz, Iran. Turk. J. Vet. Animal. Sci. 33(4): 345-349.
- 14- Mezzatesta M.Lina., Gona F. and Stefani S. 2012. *Enterobacter cloacae* complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. Future. Microbiology. 7(7): 887-902.
- 15-Mehrang H. and Rahbar M. 2008. Prevalence Of extended spectrum B-lactamase-producing *Escherichia coli* in a tertiary care hospital in Tehran, Iran. Int J Antimicrob Agents. 31: 147-151.
- 16- Morand P.C, Billoet A., Rottman M., Sivadon-Tardy V., Eyrolle L., Jeanne L, et al. 2009. Specific distribution within the *Enterobacter cloacae* complex of strains isolated from infected orthopedic implants. J. Clin. Microbiol. 47: 2489-2495.
- 17- Murray PR., Holmes B., Aucken H.M. 2010. *Citrobacter, Enterobacter, Klebsiella, Plesiomonas, Serratia*, and other members of the *enterobacteriaceae*. Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections.
- 18- Rains R. 1993. Principles of Antibiotics. Shafiee A, Ganbarpour A (Translated by). Tehran: Tehran University Press.
- 19- Rizi K.S., Peerayeh S.N., Bakhshi B. and Rahbar M. 2016. Prevalence of integrons and Antimicrobial Resistance Genes Among Clinical Isolates of *Enterobacter* spp. From Hospitals of Tehran. International Journal of Enteric Pathogens. 3(1); e-22531.
- 20- Edris S.N., Hamad A., Dina A.BA. and Islam S. 2023 Antibiotic resistance patterns and biofilm formation ability of *Enterobacteriales* recovered from food of animal origin in Egypt. Vet. World. 2023: 16: 403-413
- 21- Torshizi R., Zamanzad B., Mokhtareyan K. and Karimi A. 2011. Determination of CTX-M genes in *enterobacteriaceae* producing extended-spectrum beta-lactamase using PCR method. J. Shahrekord. Univ. Med. Sci. 13(3): 9-17.
- 22- Yang Q., Zhang H., Yu Y., Kong H., Duan Q., Wang Y, and Xu Y. 2015. In vitro activity of imipenem/relebactam against *Enterobacteriaceae* isolates obtained from intra-abdominal, respiratory tract and urinary tract infections in China: Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART), 2015–2018. Clin. Infect Dis. 71(4): 427-435.
- 23- Yelin I, Snitser O., Novich G., Katz R., Tal O., Parizade M. and Kishony R. 2019. Personal clinical history predicts antibiotic resistance of urinary tract infections. Nature Medicine. 25(7), 1143-1152.

Determining antibiotic resistance pattern in *Enterobacter cloacae* strains isolated from chicken and sheep meat in Shahrekord city

Elaha Barzam Dehkordi¹, Elaha Tajbakhsh^{*2}, Hassan Mumtaz³

1. PhD student, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

2. Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

* Corresponding author: ee_tajbakhsh@yahoo.com

Abstract

Usually, contaminated food is one of the main causes of human infections, and in this case, poultry meat and sheep are considered as the main causes. *Enterobacter cloacae* strains, having different virulence factors and multiple antibiotic resistance are mainly considered as an opportunistic pathogen. In this research, the isolation of *Enterobacter cloacae* from chicken and sheep meat samples in Shahrekord in 2019 was done by microbial and molecular methods. Antibiotic resistance pattern was determined by disc diffusion method and microtitre plate method was used to check biofilm production. The ability to produce broad-spectrum β -lactamase enzymes was investigated through phenotypic and genotypic methods. Out of 384 examined samples, *Enterobacter cloacae* were identified in 25 samples (6.51%) which also confirmed in the presence of the *hsp60* in molecular analysis. Among these, 18 samples were related to chicken meat (72%) and 7 samples (28%) were related to sheep meat. The highest antibiotic resistance to cotrimoxazole and cefotaxime was reported in 20 isolates (80%) and the lowest resistance to nitrofurantoin was reported in 15 isolates (23.8%). In microtiter method. 15 isolates (60%) showed strong biofilm reaction, 10 isolates (40%) showed moderate biofilm reaction. The present study indicates that ESBL-producing *Enterobacter cloacae* strains have a relatively high prevalence. The increase in the number of these strains is often caused by the irrational prescription of antibiotics, which requires the use of new antimicrobial agents, limiting the unnecessary use of antimicrobial agents, and increasing the use of infection control tools.

Key words: Antibiotic resistance, Chicken, *Enterobacter cloacae*, ESBL, Sheep.

بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره و اسانس بادرنجبویه و اسطوخدوس بر برخی باکتری‌های مواد غذایی

مهرداد عطایی کچویی^۱، الهام فخری^{۲*}، فاطمه خداوردی پور^۳

۱. گروه گیاهان دارویی، دانشکده غذا و دارو، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.

۲. دانشجوی دکتری اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهان باغبانی، گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۳. دانشجوی دکتری میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

*نویسنده مسئول: Elham.fakhri18@gmail.com

چکیده

افزایش مقاومت‌های دارویی علیه باکتری‌ها و افزایش میزان دوز مصرفی داروهای متداول و آنتی‌بیوتیک‌ها و همچنین عوارض ناشی از این داروها موجب شده است تا در سال‌های اخیر توجه بیشتری به عوامل طبیعی مثل گیاهان دارویی که دارای عوارض کمتری هستند جلب شود. از این جهت در این پژوهش بعد از تهیه عصاره الکلی و اسانس از گیاهان بادرنجبویه، و اسطوخدوس این گیاهان، رقت‌های متوالی از آن‌ها جهت به دست آوردن حداقل غلظت مهار رشد (MIC) و حداقل غلظت باکتری کشی (MBC) در برابر باکتری‌های *شیگلا فلکسنری* (*Shigella Flexneri*)، *سالمونلا تیفی موریوم* (*Salmonella Typhimurium*)، *اشرشیا کلائی* (*Esherichia coli*) و *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus*) تهیه گردید. همچنین با استفاده از روش انتشار دیسک، هاله مهار رشد باکتری نیز اندازه گیری و مورد مقایسه قرار گرفت. بر اساس نتایج به دست آمده قطر هاله در اسانس‌ها بیشتر از عصاره‌ها بود و نمونه‌ها نسبت به باکتری گرم مثبت / *استافیلوکوکوس اورئوس* حساسیت بیشتری نشان دادند. میزان MIC و MBC برای هر کدام از اسانس‌ها و عصاره‌ها در برابر هر کدام از ۴ باکتری مورد آزمایش به روش میکروداپلوشن اندازه گیری شد و نتایج حاکی از پایین بودن میزان غلظت MIC و MBC در اسانس‌ها نسبت به عصاره‌ها بود. آنالیز ترکیبات هر کدام از اسانس‌ها توسط دستگاه GC-MS و آنالیز عصاره‌ها با دستگاه HPLC انجام شد که اسانس‌ها نسبت به عصاره‌ها دارای ترکیبات بیشتری که همین دلیل برخواص ضد آنتی‌بیوتیکی بیشتر آن‌ها می‌باشد. لذا نتایج تحقیق حاضر، مشخص کرد که اسانس و عصاره بادرنجبویه و اسطوخدوس اثرات ضد میکروبی دارند؛ بنابراین می‌توانند بعنوان فرآورده‌های گیاهی طبیعی جهت کنترل عفونت‌های باکتریایی مورد استفاده قرار گیرند.

کلمات کلیدی: بادرنجبویه، اسطوخدوس، عصاره، اسانس، اثرات ضد میکروبی

مقدمه

پایا دارای میوه فندقه با بذر تخم مرغی، سیاه رنگ و براق است و پیکر رویشی گیاه بوی خاصی تقریباً شبیه به لیمو دارد (Basiri et al., 2007). اسانس بادرنجبویه از گل، شاخه‌ها و برگ‌های تازه یا خشک آن، تهیه می‌شود و از ویژگی‌های آن بوی تازه لیمو و رنگ زرد کم‌رنگ می‌باشد. اسانس این گیاه از لحاظ عطر و طعم‌دهی کاربرد های متنوع و زیادی در بسیاری از صنایع مانند آرایشی و عطرها، آشامیدنی، بستنی‌سازی و ... دارد. بادرنجبویه در طب سنتی ایران به عنوان تسکین‌دهنده، تب‌بر، ضد اسپاسم، ضد تشنج، معرق، خوشبو کننده و بادشکن کاربرد دارد. همچنین بادرنجبویه دارای اثر ضد اضطراب و ضد باکتری است (Venskutonis et al., 1995). اندام‌های این گیاه دارای در صدی روغن فرار است که بیشترین ترکیبات آن شامل سیترونورول، کارواکرول، ژرانیل و آلفاپینن می‌باشد همین‌طور اسانس روغنی گیاه بادرنجبویه دارای فعالیت ضد میکروبی، ضد مخمری و ضد قارچی مناسبی است (Davazdahemami et al., 2008).

Andrade و همکاران (۲۰۱۱) با اسانس‌گیری گیاه بادرنجبویه، ترکیبات شیمیایی عمده اسانس را ژرانیل، بتا - سیترونلال، سیترونلال، سیترونول، ژرانیل و استات معرفی کردند (Andrade et al., 2011). با مطالعه و بررسی ترکیبات شیمیایی و فعالیت ضد میکروبی اسانس گیاه بادرنجبویه، اسانس این گیاه بر رشد باکتری‌های بیماری‌زا، به ویژه انواع گرم مثبت، اثر مهارکنندگی قابل توجهی از خود نشان داده است، کمترین بازدارندگی اسانس مربوط به سودوموناس آئروژینوزا و بیشترین آن برای استافیلوکوکوس اورئوس بود (Arzhang et al., 2015).

مصرف گیاهان برای درمان سابقه‌ای به قدمت عمرانسان دارد. در سال‌های اخیر کاربرد گیاهان دارویی با توجه به عوارض و هزینه کمتر و سازگاری بیماران به این داروها و به لحاظ اثرات جانبی شناخته شده داروهای سنتتیک افزایش یافته است (Talei et al., 2007). بسیار پیش از آن که بشر وجود میکروب‌ها را کشف کند، این ایده که گیاهانی خاص توانایی شفا بخشی دارند پذیرفته شده بود و از زمان قدیم، انسان از گیاهان برای درمان بیماری‌های عفونی رایج استفاده می‌کرد.

استفاده بی‌رویه از داروهای شیمیایی جهت درمان بیماری‌های عفونی منجر به ظهور نمونه‌های مقاوم میکروبی شده است که هرروزه بر تعداد آن‌ها اضافه می‌شود (Dupont et al., 1996). ظهور سویه‌های مقاوم به داروهای شیمیایی، چالش برای یافتن عوامل ضد میکروبی جدید را ضروری می‌کند (Srinivasan et al., 2001) و این در حالی است که عوارض جانبی این ترکیبها در مقایسه با داروهای شیمیایی کمتر است (Mashreghi & Momtazi, 2012). بنابراین بهره‌گیری از داروهای گیاهی به عنوان جایگزین داروهای شیمیایی و آنتی‌بیوتیک‌ها آزمایش شد. که از گیاهان استفاده شده می‌توان به گیاهان خانواده نعناع اشاره کرد (Abu-Lafi et al., 2008). گونه‌های نعناع تقریباً در سراسر جهان و به خصوص در مناطق مدیترانه‌ای پراکنده‌اند. جنس‌های اسطوخودوس، بادرنجبویه، رزماری و آویشن از گیاهان اصلی متعلق به منطقه مدیترانه‌ای هستند و در نواحی آفریقا و هند وجود دارد (Ahmady-asbchin & Mostafapour, 2018). گیاه بادرنجبویه با نام علمی *Melissa officinalis* به خانواده Lamiaceae تعلق دارد، این گیاه، بومی مناطق مدیترانه‌ای و غرب آسیا بوده معطر،

این ترتیب: سودوموناس آئروژیناز، استرپتوکوکوس فکالیس، کلبسیلا پنومونیا، اشرشیاکلای و استافیلوکوکوس اورئوس می باشد (Ghadri et al., 2010). لطفی (۱۳۹۷) در مورد اثر ضد باکتریایی عصاره آبی اسطوخدوس روی برخی از باکتری‌های نشان دادند که عصاره آبی گیاه اسطوخدوس اثر بازدارندگی و مهار کنندگی قابل توجهی روی باسیلوس سوبتیلیس، استرپتوکوکوس موتاس، لیستر یا منوسیتوزن، یرسینیا اینتروکولیتیکا و سالمونلا اینتربیتیدیس دارد و هر چقدر میزان غلظت عصاره‌ی آبی افزایش می‌یافت اثر باز دارندگی نیز بیشتر و چشمگیرتر می‌شد (Ghiami Rad & Lotfi, 2021). لذا در تحقیق حاضر به منظور بررسی تعیین خواص ضد باکتریایی عصاره و اسانس بادرنجبویه و اسطوخدوس بر روی باکتری‌های شیگلا فلکسنری (*Shigella Flexneri*)، سالمونلا تیفی موریوم (*Salmonella*)، اشرشیاکلای (*Esherichia coli*) و استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*) با استفاده از روش‌های میکروبیولوژی و انتشار از دیسک مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت.

مواد و روش

مواد مورد استفاده در این تحقیق، گیاهان دارویی بادرنجبویه و اسطوخدوس که از مزارع استان چهارمحال بختیاری جمع‌آوری شد و توسط مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد مورد تأیید قرار گرفت. سپس در شرایط مناسب خشک گردیدند. باکتری‌های مورد آزمون شیگلا فلکسنری (ATCC 12022)، سالمونلا تیفی موریوم (ATCC14028)، اشرشیاکلای (ATCC 25922) و استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 25923) بودند. که از مرکز مرکز کلمکس-یون میکروارگانسیم‌های صنعتی ایران تهیه شدند. آنتی

اسطوخدوس با نام علمی *Lavandula officinalis* گیاهی چند ساله و همیشه سبز از خانواده نعنائیان *Lamiaceae* است. ارتفاع گیاه اسطوخدوس بین ۳۰ تا ۶۰ سانتی‌متر، گل‌ها در انتهای خوشه‌ها و مجتمع در رأس ساقه است. این گیاه درختچه‌ای همیشه سبز، پرپشت و چند ساله است. گل‌های آن آبی رنگ و بوی سفید و بسیار معطر است (Adam, 2006). اسانس اسطوخدوس دارای حدود ۴۰ درصد استات لینالیل بوده و همچنین در آن ترکیباتی نظیر اسید بوتیریک، اسید پروپیونیک و اسید والریک، لینالول آزاد و ژرانیول وجود دارد. اسانس این گیاه در طب سنتی دارای خواص درمانی بسیاری از جمله آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی، ضد باکتری، ضد اضطراب و آرام‌بخش، فعالیت ضد پلاکتی، ضد انعقادی و ضد جهش برخوردار است و در درمان بیماران با زوال عقلی شدید کاربرد دارد. ازدم‌کرده اسطوخدوس به عنوان ضد نفخ، ضد صرع، ضد دردهای روماتیسمی و کمردرد، سردردهای عصبی و میگرنی استفاده می‌شود. مهم‌ترین ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس آن لینالیل استات، لینالول، کامفور، ژرانیول، سینئول، تانن، کومارین، فلاونوئیدها و دانه‌های خشک آن که حاوی پروتئین و چربی است (Ez zoubi et al., 2020)

این گیاه دارای خواص بالینی زیادی از جمله خواص ضد قارچی، ضد التهابی، ضد میکروبی، آرام‌بخشی و کاهش درد است (Adam et al., 1998) همچنین اثرات آرام‌بخشی، ضد تشنجی، ضد صرعی، ضد اضطراب، ضد افسردگی، نوروپروتکتیو، ضد درد، ضد اعتیاد، ضد التهاب، ضد آپوپتوز، ضد جهش و ضد سرطان اسطوخدوس آن را مورد توجه قرار می‌دهد (Yaghoobi et al., 2016). قدری و همکاران (۱۳۸۸) نمای حساسیتی میکروارگانسیم‌ها در برابر اسانس اسطوخدوس بر اساس حساس‌ترین به مقاوم‌ترین به

زیر مورد آماده سازی قرار دادیم. عصاره را ۴۸ ساعت در دمای (۱۲-) فریزر قرار دادیم تا موم و چربی آن جدا شود. سپس در همان فریزر با کاغذ صافی فاز عصاره اتانولی را جدا کردیم. فاز عصاره اتانولی را در یک ارلن با درپوش ریخته و به نسبت مساوی به آن هگزان افزودیم و ۱ ساعت آن را روی شیکر با دور ۱۸۶ قرار دادیم تا یکنواخت و همزده شود. سپس آن را در یک جداکننده ریخته و ۱۵ دقیقه آن را ثابت گذاشته تا دو فاز شود. سپس فاز هگزانی را جهت تزریق به HPLC مورد جدا سازی قرار دادیم.

تهیه و کشت باکتری

باکتری‌های پس از جدا سازی و شناسایی در آزمایشگاه به صورت لیوفیلیزه تهیه شدند و بعد از احیای باکتری ابتدا ۲۴ ساعت در محیط مولر هینتون برات در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شده و پس از رشد باکتری هر کدام روی محیط کشت جامد مخصوص خود کشت داده شد و مجدد ۲۴ ساعت انکوبه شد تا توانستیم از باکتری‌ها کلونی‌های مورد نظر را به دست آوریم.

تهیه محلول استاندارد نیم مک فارلند

مواد مورد استفاده برای تهیه استاندارد نیم مک فارلند شامل: باریم کلرید ($BaCl_2 \cdot H_2O$) دهیدراته و اسید سولفوریک (H_2SO_4) بوده که تهیه شدند. با مخلوط کردن ۰/۰۵ میلی‌لیتر باریم کلرید دهیدراته ($BaCl_2 \cdot H_2O$)، ۱/۱۷۵ درصد با ۹/۹۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک (H_2SO_4) ۱ درصد استاندارد نیم مک فارلند تهیه شد. با مخلوط این دو ترکیب رسوب سولفات باریم که سبب ایجاد کدورت در محلول می‌شود، ایجاد شد. از آنجایی که تعداد باکتری تلقیح شده یکی از مهم‌ترین متغیرهایی است که بر نتیجه هر

بیوتیک‌های مورد استفاده شامل نالیدیکسیک اسید، سیپروفلوکساسین، مترونیدازول، ریفامپین، اریترومایسین (به صورت دیسک و پودری) بودند. که از شرکت پادتن طب و شرکت سیگما تهیه شدند.

اسانس گیری از گیاهان

ابتدا گیاهان خشک شده و حلال را داخل بالن ریخته و بالن روی شعله قرار داده می‌شود. اسانس گیری با دستگاه کلونجر انجام شد پس از اسانس گیری شعله را خاموش می‌کنیم. داخل بورت مجموعه آب و اسانس جمع می‌شود. اسانس سنگین‌تر از آب شده و در انتهای بورت قرار می‌گیرد. پس از ۱۱ ساعت شیر بورت را باز نموده و اسانس در ظرفی جدا گانه جمع‌آوری می‌شود (Myint et al., 1996).

تهیه عصاره الکلی

۵۰ گرم از گیاهان خشک شده مورد مطالعه به ۱۵۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درجه اضافه شده و به مدت ۷۲ ساعت در آن (در دمای زیرنقطه جوش اتانول) قرار داده شد تا استخراج عصاره انجام شود عصاره به دست آمده از صافی توسط دستگاه تقطیر در خلأ یا روتاری^۱ تغلیظ شد. عصاره‌ها در پلیت‌های استریل شده به وسیله پارافیلیم پوشیده شدند. سپس عصاره‌ها از فیلتر میکروبیولوژی ۰/۲۲ میکرون عبور داده شده و در ظرف درب‌دار در یخچال در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Akbari, 2014).

آماده سازی عصاره جهت شناسایی ترکیبات

توسط GC/MS

قسمتی از عصاره اتانولی حاصله را پس از تغلیظ، جهت شناسایی ترکیبات آن توسط HPLC به روش

^۱ Rotary evaporator

تعیین MIC و MBC به روش میکروداپلوشن

برای تعیین غلظت‌های مختلف اسانس‌ها و عصاره‌ها شامل بادرنجبویه و اسطوخودوس، (۰/۰۵ گرم بر میلی‌لیتر) بود. آزمایش MIC و MBC در پلیت ۹۶ خانه استریل و با روش میکروداپلوشن طبق دستورالعمل^۱ CLSI انجام شد. نحوه کار به این صورت بود که ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت مولر هینتون برات اضافه شد سپس برای هر کدام از اسانس‌ها غلظت اول در خانه اول به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر اضافه گردید و جهت رقت‌سازی بعد از شیک ۱۰۰ میکرولیتر از خانه اول برداشته شده در خانه دوم ریخته شد و این کار تا خانه شماره ۹ ادامه پیدا کرد و در آخر هم از خانه نهم ۱۰۰ میکرولیتر به بیرون ریخته شد، سپس از سوسپانسیون باکتری‌های مذکور به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به ۹ خانه اضافه گردید. و خانه‌های آخر جهت کنترل مثبت (محیط کشت حاوی باکتری، بدون عصاره) و منفی (محیط کشت بدون باکتری) در نظر گرفته شد.

در نهایت لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه و سپس نتایج قرائت شد و برای هر کدام از رقت‌های اسانس و عصاره الکلی، آخرین رقتی که در آن هیچ‌گونه کدورتی مشاهده نشد (عدم رشد) به عنوان MIC در نظر گرفته شد و از تمام لوله‌های بدون کدورت روی محیط مولر هینتون برات آگار کشت داده شد. آخرین رقتی از عصاره‌ها که قادر به مرگ ۹۹/۹ درصد از باکتری‌های زنده اولیه بود، به عنوان MBC عصاره‌ها در نظر گرفته شد (Hall, 2013).

پژوهش اثر می‌گذارد، تراکم سوسپانسیون میکروبی تلقیحی باید استناد ندارد باشد پس برای تهیه سوسپانسیون میکروبی، از کشت تازه و جوان باکتری با استفاده از سوآپ استریل چند کلنی به لوله حاوی سرم فیزیولوژی استریل منتقل شده و پس از هم‌زدن محلول، کدورت حاصله در مقابل چراغ مطالعه با کدورت محلول نیم‌مک‌فارلند که توسط ورتکس هم زده شد، مقایسه گردید. این عملیات برای هر باکتری به طور جداگانه انجام شد.

ارزیابی فعالیت ضد میکروبی نمونه‌ها به روش دیسک دیفیوژن

محیط کشت مولر هینتون آگار بر مبنای دستورالعمل کارخانه سازنده آماده‌سازی شد. از سوسپانسیون نیم‌مک‌فارلند هر کدام از باکتری‌ها با سوآپ روی محیط به صورت چمنی کشت داده شد. سپس دیسک‌های بلانک استریل را با پنس روی محیط قرار داده و غلظت‌های تهیه شده با آب مقطر برای هر کدام از اسانس‌ها شامل: بادرنجبویه و اسطوخودوس غلظت‌های (۰/۰۵، ۰/۰۲۵، ۰/۰۱۲۵، ۰/۰۰۶۲۵) گرم بر میلی‌لیتر می‌باشد.

از دیسک‌های آنتی‌بیوتیک نالیدیکسیک اسید، سیپروفلوکساسین، مترونیدازول، ری‌فامپین و اریترومایسین به عنوان شاهد برای هر کدام از باکتری‌ها استفاده شد. از هر کدام از پتری‌های نمونه‌ها سه تکرار انجام شده و تمامی آن‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار داده شد. تعیین فعالیت ضد باکتریایی نمونه‌ها بر مبنای اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد دیسک‌ها بر حسب میلی‌متر توسط کولیس اندازه‌گیری شد.

^۱Clinical and Laboratory Standards Institute

تجزیه و تحلیل آماری

سالمونلا تیفی موریوم و شیگلا فلکسنری نشان داده است که بیشتترین قطر هاله عدم رشد مربوط به آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین و کمترین قطر هاله عدم رشد مربوط به غلظت ۰/۰۰۶۲۵ گرم بر میلی لیتر اسانس گیاه بادرنجبویه بوده است. با توجه به جدول مقایسات میانگین (جدول ۱) بیشتترین قطر هاله عدم رشد در باکتری *اشرشیا کلائی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* مربوط به آنتی بیوتیک ریفامپین و کمترین را غلظت های ۰/۰۰۶۲۵ و ۰/۰۱۲۵ گرم بر میلی لیتر اسانس بادرنجبویه داشته اند.

بر اساس تجزیه واریانس اسانس گیاه اسطوخدوس می توان گفت، اسانس گیاه اسطوخدوس در سطح احتمال ۱ درصد بر قطر هاله عدم رشد هر ۴ باکتری معنی دار بوده است. همچنین با توجه به جدول (۱) و نتایج مقایسات میانگین اسانس گیاه اسطوخدوس بر باکتری *سالمونلا تیفی* موریوم و *شیگلا فلکسنری* بیشترین قطر هاله عدم رشد مربوط به آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین برای باکتری *سالمونلا تیفی* موریوم کمترین قطر هاله عدم رشد را غلظت ۰/۰۰۶۲۵ گرم بر میلی لیتر و برای باکتری *شیگلا فلکسنری* کمترین قطر هاله عدم رشد مربوط به غلظت های ۰/۰۰۶۲۵ و ۰/۰۱۲۵ گرم بر میلی لیتر اسانس گیاه اسطوخدوس داشته است. با توجه به جدول (۱) مقایسات میانگین اسانس گیاه اسطوخدوس برای باکتری *اشرشیا کلائی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* آنتی بیوتیک ریفامپین بیشترین قطر هاله عدم رشد و کمترین قطر هاله عدم رشد در باکتری *اشرشیا کلائی* مربوط به غلظت ۰/۰۰۶۲۵ گرم بر میلی لیتر و برای باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* آنتی بیوتیک نالیدیک اسید کمترین قطر هاله عدم رشد در اسانس گیاه اسطوخدوس نشان داده است.

نتایج به دست آمده با استفاده از نرم افزار MiniTab16 به صورت اسپلیت پلات در پلات اصلی باکتری و پلات فرعی به صورت فاکتوریل هر کدام از اسانس ها و عصاره ها در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد بررسی قرار گرفت و آزمایش های خصوصیات ضد میکروبی در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و آزمون همبستگی به روش پیرسون و مقایسه میانگین داده ها با آزمون LSD سطح احتمال ۱ و ۵ درصد صورت پذیرفت.

نتایج

نتایج حاصل از این مطالعه تجربی در جدول های زیر درج شده است. در جدول شماره ۱، قطر هاله عدم رشد اسانس و عصاره گیاهان بادرنجبویه و اسطوخدوس و همین طور تأثیر ۵ آنتی بیوتیک نالیدیک اسید، سیپروفلوکساسین، مترونیدازول، ریفامپین، اریترومایسین بر روی چها باکتری مورد بررسی بیان شده است. بررسی مقایسه ی خاصیت ضد باکتریایی (قطر هاله ی عدم رشد) اسانس و عصاره گیاهان بادرنجبویه و اسطوخدوس توسط نرم افزار MiniTab16 با آزمون LSD سطح احتمال ۱ و ۵ درصد به عنوان نتایج معنی دار محسوب می شود.

اثر فعالیت ضد باکتریایی اسانس و عصاره بادرنجبویه و اسطوخدوس بر قطر هاله رشد

بر اساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس اسانس گیاه بادرنجبویه نشان می دهد که اسانس بادرنجبویه در سطح احتمال ۱ درصد بر قطر هاله عدم رشد هر ۴ باکتری معنی دار است همچنین طبق جدول (۱) مقایسات میانگین اسانس گیاه بادرنجبویه بر باکتری

جدول ۱- جدول مقایسات میانگین اسانس گیاهان بادرنجبویه و اسطوخدوس

نام نمونه	غلظت	میانگین مربعات		
	(گرم بر میلی لیتر)	اشرشیا کلای	شیگلافلکسنری	استافیلوکوکوس اورئوس
اسانس بادرنجبویه	۰/۰۰۶۲۵	۸/۳۳ ^{lmn}	۸/۳۰۰ ^{lmn}	۹/۱۰۰ ^{hij}
	۰/۰۱۲۵	۹/۱۳۳ ^{klmn}	۹/۴۰۰ ^{ijklm}	۹/۴۶۶ ^{ghi}
	۰/۰۲۵	۱۰/۴۶۶ ^{ghij}	۱۰/۱۳۳ ^{ijk}	۱۰/۴۶۶ ^{gh}
	۰/۰۵	۱۱/۲۶۶ ^{efgh}	۱۱/۲۶۶ ^{fghi}	۱۱/۴۶۶ ^{ef}
اسانس اسطوخدوس	۰/۰۰۶۲۵	۸/۳۶۶ ^{lmn}	۷/۴۰۰ ⁿ	۷/۲۳۳ ^{klm}
	۰/۰۱۲۵	۹/۶۰۰ ^{jkl}	۸/۲۳۳ ^{lmn}	۸/۲۳۳ ^{ijk}
	۰/۰۲۵	۱۰/۹۶۶ ^{fghi}	۱۱/۰۶۶ ^{ghi}	۹/۴۶۶ ^{ghi}
	۰/۰۵	۱۱/۵۶۶ ^{ef}	۱۲/۴۶۶ ^{def}	۱۰/۳۰۰ ^{fgh}
عصاره بادرنجبویه	۰/۰۰۶۲۵	۷/۲۳۳ ^g	۷/۵۰۰ ^g	۱۳/۲۳۳ ^f
	۰/۰۱۲۵	۸/۳۶۶ ^f	۸/۳۶۶ ^{fg}	۱۴/۴۰۰ ^{ef}
	۰/۰۲۵	۹/۵۳۳ ^e	۹/۵۳۳ ^{ef}	۱۵/۲۳۳ ^{de}
	۰/۰۵	۱۰/۵۳۳ ^e	۱۰/۵۳۳ ^e	۱۶/۳۳۳ ^d
عصاره اسطوخدوس	۰/۰۰۶۲۵	۸/۰۶۶ ^g	۸/۹۰۰ ^f	۱۳/۰۳۳ ^f
	۰/۰۱۲۵	۹/۵۳۳ ^f	۹/۴۰۰ ^{ef}	۱۳/۴۳۳ ^{ef}
	۰/۰۲۵	۱۰/۴۶۶ ^{ef}	۱۰/۲۶۶ ^e	۱۴/۴۶۶ ^{de}
	۰/۰۵	۱۱/۵۳۳ ^e	۱۱/۴۰۰ ^d	۱۵/۱۶۶ ^d
آنتی بیوتیک				
نالیدیک اسید	۱۵/۹۶۶ ^d	۱۰/۱۶۶ ^{ijk}	۱۸/۰۳۳ ^c	۶/۵۳۳ ^m

۲۰/۱۰۰ ^c	۳۰/۱۰۰ ^b	۲۹/۹۰۰ ^a	۳۰/۰۶۶ ^a	سیپروفلوکساسین
۶/۸۰۰ ^{lm}	۱۲/۹۰۰ ^d	۱۲/۰۳۳ ^{efg}	۱۱/۰۰۰ ^{hij}	مترونیدازول
۴۱/۸۶۶ ^a	۴۵/۰۶۶ ^a	۲۳/۰۶۶ ^b	۲۱/۲۰۰ ^b	ریفامپین
۳۶/۱۳۳ ^b	۳۱/۰۳۳ ^b	۱۶/۸۶۶ ^c	۱۹/۱۳۳ ^c	اریترومایسین

در هر ستون تیمارهایی که حداقل در یک حرف مشترک هستند از نظر آماری در سطح ۵ درصد اختلاف معنی داری ندارند

بر اساس تجزیه واریانس عصاره گیاه بادرنجبویه، این عصاره در سطح احتمال ۱ درصد بر قطر هاله عدم رشد هر ۴ باکتری معنی دار بوده است. مقایسه میانگین عصاره گیاه بادرنجبویه بر عدم رشد باکتری سالمونلا تیفی موریوم و باکتری شیگلا فلکسنری نشان می‌دهد که آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین بیشترین قطر هاله عدم رشد را داشته است و کمترین قطر هاله عدم رشد برای باکتری سالمونلا تیفی موریوم مربوط به غلظت‌های ۰/۰۶۲۵ و ۰/۰۱۲۵ گرم بر میلی‌لیتر و برای باکتری شیگلا فلکسنری غلظت ۰/۰۶۲۵ گرم بر میلی‌لیتر عصاره گیاه بادرنجبویه بوده است (جدول ۱). مقایسات میانگین عصاره گیاه بادرنجبویه (جدول ۱) نشان داده است که برای باکتری/شرشیاکلای و باکتری/استافیلوکوکوس/اورئوس آنتی‌بیوتیک ریفامپین دارای بیشترین قطر هاله عدم رشد بوده و کمترین قطر هاله عدم رشد برای باکتری/شرشیاکلای مربوط به غلظت ۰/۰۶۲۵ گرم بر میلی‌لیتر عصاره بادرنجبویه و برای باکتری/استافیلوکوکوس/اورئوس مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های نالیدیک اسید و مترونیدازول بوده است (جدول ۱). تجزیه واریانس عصاره گیاه اسطوخدوس نشان می‌دهد که این عصاره در سطح احتمال ۱ درصد بر قطر هاله عدم رشد هر ۴ باکتری معنی دار بوده است. نتایج مقایسات میانگین عصاره گیاه اسطوخدوس روی باکتری سالمونلا تیفی موریوم و باکتری شیگلا فلکسنری (جدول ۱) حاکی از آن است که آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین بیشترین قطر هاله عدم رشد و کمترین قطر هاله برای باکتری سالمونلا تیفی موریوم و باکتری شیگلا فلکسنری مربوط به غلظت ۰/۰۶۲۵ گرم بر میلی‌لیتر عصاره گیاه اسطوخدوس و همین‌طور برای شیگلا فلکسنری بوده است. با توجه به نتایج مقایسات میانگین عصاره گیاه اسطوخدوس روی باکتری/شرشیاکلای و باکتری/استافیلوکوکوس/اورئوس (جدول ۱)، آنتی‌بیوتیک ریفامپین بیشترین قطر هاله عدم رشد را داشته است و کمترین قطر هاله عدم رشد برای باکتری/شرشیاکلای مربوط به غلظت ۰/۰۶۲۵ گرم بر میلی‌لیتر عصاره گیاه اسطوخدوس و برای باکتری/استافیلوکوکوس/اورئوس مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های نالیدیک اسید و مترونیدازول بوده است.

اثر فعالیت ضد باکتریایی اسانس و عصاره بادرنجبویه و اسطوخدوس بر میزان MIC و MBC

در جدول (۲)، در مورد باکتری سالمونلا تیفی موریوم کمترین غلظت به عنوان MBC با غلظت ۰/۰۳۱ گرم بر میلی‌لیتر و کمترین غلظت به عنوان MIC با غلظت ۰/۰۱۵۶ گرم بر میلی‌لیتر مربوط به اسانس اسطوخدوس بود. نتایج به دست آمده در خصوص باکتری شیگلا فلکسنری حاکی از این بود حداقل غلظت مهارکنندگی یا MIC مربوط به غلظت ۰/۰۶۲۵ گرم بر میلی‌لیتر و حداقل غلظت کشندگی یا MBC آن نیز ۰/۰۱۲۵ گرم بر میلی‌لیتر که در اسانس

بادرنجیویه و اسانس و عصاره اسطوخودوس بود. در مورد باکتری / شرشیاکلای اسانس هر دو گیاه دارای حداقل غلظت MBC به میزان ۰/۰۰۶۲۵ گرم بر میلی لیتر و همچنین حداقل غلظت مهارکنندگی MIC به میزان ۰/۰۰۳۱۲ گرم بر میلی لیتر مربوط به این دو اسانس بود. با این حال در خصوص تنها باکتری گرم مثبت / ستافیلوکوکوس / اورئوس اسانس بادرنجیویه دارای کمترین غلظت به عنوان MBC با غلظت ۰/۰۰۰۳۹ گرم بر میلی لیتر و غلظت ۰/۰۰۰۱۹ گرم بر میلی لیتر برای MIC بوده است. در نتیجه می توان تفسیر کرد که باکتری سالمونلا تیفی موریوم نسبت به اسانس اسطوخودوس حساسیت بیشتری نشان داده است و باکتری / ستافیلوکوکوس / اورئوس نیز به اسانس اسانس بادرنجیویه حساسیت بیشتری داشته است.

جدول ۲- حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) اسانس و عصاره بادرنجیویه و اسطوخودوس علیه باکتری های مورد آزمایش بر حسب گرم بر میلی لیتر

نمونه ها	سالمونلاتیفی موریوم		شیگلافلکسنری		اشرشیاکلای		ستافیلوکوکوس اورئوس	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
اسانس بادرنجیویه	۰/۰۰۳۱۲	۰/۰۰۱۲۵	۰/۰۰۶۲۵	۰/۰۱۲۵	۰/۰۰۳۱۲	۰/۰۰۶۲۵	۰/۰۰۰۱۹	۰/۰۰۰۳۹
اسانس اسطوخودوس	۰/۰۰۱۵۶	۰/۰۱۲۵	۰/۰۰۶۲۵	۰/۰۱۲۵	۰/۰۰۳۱۲	۰/۰۰۶۲۵	۰/۰۰۰۳۱۲	۰/۰۰۰۶۲
عصاره بادرنجیویه	۰/۰۱۲۵	۰/۰۲۵	۰/۰۱۲۵	۰/۰۱۲۵	۰/۰۰۶۲۵	۰/۰۱۲۵	۰/۰۰۶۲۵	۰/۰۱۲۵
عصاره اسطوخودوس	۰/۰۱۲۵	۰/۰۱۲۵	۰/۰۱۲۵	۰/۰۱۲۵	۰/۰۰۶۲۵	۰/۰۲۵	۰/۰۰۶۲۵	۰/۰۲۵
ریفامپین	۰/۰۰۵	۰/۰۱	۰/۰۰۲۵	۰/۰۰۲۵	۰/۰۰۱۵۶	۰/۰۰۳۱۲	۰/۰۰۵	۰/۰۰۲۵
مترونیدازول	۰/۰۰۵	۰/۰۱	۰/۰۰۵	۰/۰۱	۰/۰۰۱۲۵	۰/۰۰۱۲۵	۰/۰۰۵	۰/۰۰۲۵

۰/۰۰۵	۰/۰۰۲۵	۹۷×۱۰^{-۷}	۴۸×۱۰^{-۷}	۴۸×۱۰^{-۷}	۲۴×۱۰^{-۷}	۲۴×۱۰^{-۷}	۱۲×۱۰^{-۷}	سیپروفلوکس اسین
$g.ml^{-1}$	$g.ml^{-1}$	$g.ml^{-1}$	$g.ml^{-1}$	$g.ml^{-1}$	$g.ml^{-1}$	$g.ml^{-1}$	$g.ml^{-1}$	
۴۸×۱۰^{-۸}	۲۴×۱۰^{-۷}	۱۹×۱۰^{-۶}	۹۷×۱۰^{-۷}	۴۸×۱۰^{-۷}	۲۴×۱۰^{-۷}	۱۹×۱۰^{-۶}	۹۷×۱۰^{-۷}	نالیدیک اسید
$g.ml^{-1}$	$g.ml^{-1}$	$g.ml^{-1}$	$g.ml^{-1}$	$g.ml^{-1}$	$g.ml^{-1}$	$g.ml^{-1}$	$g.ml^{-1}$	
۱۵×۱۰^{-۵}	۷۸×۱۰^{-۶}	۰/۰۱	۰/۰۰۵	۰/۰۱	۰/۰۰۵	۰/۰۱	۰/۰۰۵	اریترومایسین
$g.ml^{-1}$	$g.ml^{-1}$	$g.ml^{-1}$	$g.ml^{-1}$	$g.ml^{-1}$	$g.ml^{-1}$	$g.ml^{-1}$	$g.ml^{-1}$	

نالیدیک اسید کمترین غلظت MIC و MBC را داشت.

شناسایی ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس و گیاهان بادرنجبویه و اسطوخدوس

ترکیبات تشکیل دهنده اسانس توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی بررسی شد که در اسانس بادرنجبویه حدود ۵۵ ترکیب شناسایی گردید. مهم ترین ترکیبات تشکیل دهنده اسانس و فراوانی این ترکیبات در جدول ۳ مشخص شده است. بیشترین ترکیبات اسانس شامل سیترال (۳۴/۱۸ درصد)، نرول استات (۱۴/۹۹ درصد)، نرال (۱۷/۵۹ درصد) و اکسید کاریوفیلین (۹/۶۳ درصد) بود. در اسانس اسطوخدوس حدود ۴۲ ترکیب شناسایی گردید. مهم ترین ترکیبات تشکیل دهنده اسانس و فراوانی این ترکیبات در جدول ۴ مشخص شده است. بیشترین ترکیبات اسانس شامل: بورنئول (۲۹/۳۸ درصد)، لینالول (۲۴/۷۶ درصد) و کامفور (۱۱/۸۱ درصد)، اوکالیپتول (۹/۱۱ درصد) بود.

با مقایسه غلظت های به دست آمده MIC و MBC در اسانس ها و عصاره ها و با توجه به این که در اسانس ها این غلظت ها بسیار کمتر از غلظت ها در عصاره ها است به طوری که کمترین غلظت برای MIC در اسانس بادرنجبویه در برابر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس $۰/۰۰۰۱۹$ گرم بر میلی لیتر به دست آمده است در حالی که در عصاره ها کمترین غلظت MIC $۰/۰۰۶۲۵$ گرم بر میلی لیتر تعیین شد می توان این گونه نتیجه گیری کرد که اسانس ها تأثیرات بیشتری روی باکتری ها داشته اند و قدرت آن ها در مهار و از بین بردن باکتری ها بیشتر بوده است و این موضوع را با توجه به ترکیبات بیشتر و خاص تر موجود در اسانس ها می توان توجیه کرد. کمترین غلظت MIC و MBC در مورد باکتری سالمونلاتیفی موریوم و / شرشیا کلای مربوط به آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین بود و آنتی بیوتیک های سیپروفلوکساسین و نالیدیک اسید در باکتری شیگلا فلکسنری دارای کمترین غلظت MIC و MBC بودند. در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس هم آنتی بیوتیک

جدول ۳- ترکیبات شیمیایی اسانس گیاه بادرنجبویه و اسطوخدوس

زمان	درصد ترکیب	نام ترکیب	نمونه
بازدارندگی (دقیقه)			
۱۰/۳۲	۱/۹۴	وینیل هگزانول	اسانس بادرنجبویه
۱۱/۵۲	۱/۳۷	ترپین	
۱۳/۳۸	۱/۱	اکسیدسیس رز	
۱۴/۳۳	۱/۳۷	سیترنلال	
۱۴/۷۹	۱/۹۱	منتول	
۱۶/۳	۱۷/۵۹	نرال	
۱۶/۵۷	۱/۵۲	اکتنوئیک اسید	
۱۶/۹۲	۳۴/۱۸	سیترال	
۱۸/۹۹	۱۴/۹۹	نرول استات	
۲۰/۹	۱/۰۲	بتایونون	
۱۰/۱۹	۱/۲۳	سودولیمونن	اسانس اسطوخدوس
۱۱/۶۴	۹/۱۱	اوکالیپتول	
۱۲/۵۹	۳/۸	آلفا ترپینئول	
۱۲/۹۴	۳/۲	وربنون	
۱۳/۴۵	۲۴/۷۶	لینالول	
۱۴/۳۱	۱۱/۸۱	کامفور	
۱۴/۸۳	۲۹/۳۸	بورنتول	
۱۴/۹۹	۲/۶۳	ترپینن-۴-اول	
۱۵/۱۶	۱/۳۲	کریپتون	

اتیل بنزن (۱۳/۴۱ درصد) بوده است. و ترکیبات تشکیل دهنده عصاره اسطوخدوس حدود ۲۵ ترکیب شناسایی شد. که مهم ترین ترکیبات تشکیل دهنده عصاره و فراوانی آن در جدول ۴ آمده است. بیشترین ترکیبات در عصاره گیاه اسطوخدوس شامل: ترانس بورنتول (۲۶/۰۸ درصد) و گرانال (۲۶/۰۴ درصد) بود.

ترکیبات تشکیل دهنده عصاره نیز توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی بررسی شد که در عصاره بادرنجبویه حدود ۲۶ ترکیب شناسایی شد. مهم ترین ترکیبات تشکیل دهنده عصاره و فراوانی این ترکیبات در جدول ۴ مشخص شده است. بیشترین ترکیبات در عصاره گیاه بادرنجبویه شامل: پارازایلین (۴۱/۴۵ درصد)، متازایلین (۱۵/۹۹ درصد) و

جدول ۴- ترکیبات شیمیایی عصاره گیاه بادرنجبویه و اسطوخدوس

نمونه	نام ترکیب	درصد ترکیب	زمان بازدارندگی (دقیقه)
عصاره بادرنجبویه	۲،۲-دی متوکسی بوتان	۸/۲۳	۴/۷۶
	۳،۳-دی متوکسی-۲-بوتانون	۱/۰۳	۶/۹۶
	اتیل بنزن	۱۳/۴۱	۷/۲۵
	پارازایلین	۴۱/۴۵	۷/۴۶
	متازایلین	۱۵/۹۹	۸/۰۷
	۴،۲-دی-تری-بوتیل فنل	۲/۹۳	۲۱/۳۲
	۷-فنیل ایکوزان	۱/۱۷	۲۳/۳۴
	فنیل بنزان-۲	۲/۱۴	۲۴/۴۵
	فنل، ۲،(۱،۱-دی متیل اتیل)-(۱،۱-متیل-۱-فنیل اتیل)	۳/۲۶	۲۵/۶۶
	بنزن،(۱-متیل هگزادسیل)	۱/۱۲	۲۶/۰۳
عصاره اسطوخدوس	اتیل بنزن	۵/۴۵	۷/۲۳
	پارازایلین	۱۵/۹۸	۷/۴۴
	اورتو-زایلین	۵/۹۷	۸/۰۶
	لینالول	۲/۰۸	۱۳/۱۵
	ترانس-بورنئول	۲۶/۰۸	۱۴/۶۳
	گرانیال	۲۶/۰۴	۱۵/۱۴
	۳-متیل هگزیل-۳-متیل بوتانوات	۴/۲	۱۶/۳۷
	ترانس-۸-هیدروکسینالول	۱/۹۵	۱۶/۹
	۶-متیل-سیکلودک-۵-انول	۱/۲۶	۱۷/۸۷
	۷،۳-سیکلوندکادین-۱-اول، ۱،۵،۵،۸-تترامتیل	۱/۴۲	۱۸/۱۱
۵،۳-دی-تری-بوتیل فنل	۳/۵۶	۲۱/۲۹	

بحث

موسیلاژ، اسانس، ویتامین‌ها و املاح گیاه است اما اسانس تنها شامل ترکیبات ترپنی و یا مشتقات ترپنی گیاه می‌باشد در بررسی اسانس‌ها و عصاره با GC-MS اسانس‌ها دارای ترکیبات بیشتر و خاص تری بودند مهم‌ترین ترکیبات اسانس‌ها از این قرار بود: اسانس گیاه بادرنجبویه (سیترال، نرول استات، نرال،

استفاده در ست و به‌جا از گیاهان دارویی مستلزم این است که اطلاعات دقیق و علمی از آن‌ها داشته باشیم و ترکیبات شیمیایی موجود در آن‌ها را بشناسیم زیرا اثرات درمانی هر گیاه ناشی از ترکیبات شیمیایی موجود در آن است. با توجه به این که عصاره محلولی است که حاوی تمام مواد مفید گیاه مانند تانن،

از مناطق مختلف جغرافیایی و یا مراحل مختلف برداشت به دست آمده باشد ممکن است متفاوت باشد و این دلیل هم می‌تواند علت تأثیرات مختلف اسانس‌ها و عصاره‌ها بین باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی باشد. با وجود این که در اسانس‌ها و عصاره ترکیبات شیمیایی متعددی وجود دارد اما نمی‌توان مکانیسم واحدی برای اثرات ضد باکتریایی آن‌ها تعیین کرد به طوری که این مکانیسم‌ها جداگانه و به تنهایی عمل نمی‌کنند و برخی از آن‌ها توسط سایر مکانیسم‌ها تحت تأثیر قرار می‌گیرند به طور مثال هر قدر ترکیبات فنولیک مانند کارواکرول، تیمول و اوژنول در اسانس‌ها بیشتر باشد فعالیت ضد باکتریایی آن‌ها در برابر باکتری‌ها بیشتر است، مکانیسم اثر این ترکیبات مانند سایر ترکیبات فنولیک شامل: اختلال در غشاء سیتوپلاسمی، بر هم زدن نیروی حرکت پروتونی و جریان الکتریکی و انعقاد محتویات سلولی می‌باشد (Cseke et al., 2016).

با توجه به نتایج به دست آمده از آزمایشات دیسک دیفیوژن، میکروداپلو شن، شناسایی ترکیبات با GC-MS و ارزیابی صفات فیتوشیمیایی این گیاهان می‌توان گفت که اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهان دارای اثرات ضد باکتریایی در برابر باکتری‌های بررسی شده بودند و باکتری گرم مثبت / استافیلوکوکوس / اورئوس دارای بیشترین حساسیت نسبت به اسانس‌ها و عصاره‌ها بود به نحوی که در برابر این باکتری برخی از اسانس‌ها و عصاره‌ها قطر هاله عدم رشد بیشتری نسبت به قطر هاله عدم رشد بعضی از آنتی‌بیوتیک‌های شاهد (مترونیدازول، نالیدیک اسید) داشتند. وجود برخی تفاوت‌ها در میزان اثرات ضد باکتری مشاهده شده در این مطالعه و تحقیقات مشابه می‌تواند به سبب تفاوت مکان رشدی این گیاهان و همپنین روش استخراج اسانس و عصاره باشد.

اکسیدکاریوفیلین، اسانس گیاه اسطوخدوس (بورنتول، لینالول، کامفور، اوکالیپتول). با مطالعه روی اسانس‌ها و عصاره‌ها مشخص شد که باکتری گرم مثبت (استافیلوکوکوس / اورئوس) حساس‌تر از باکتری‌های گرم منفی (سالمونلا تیفی موربوم، شیگلا فلکسنری و شرشیاکلا) بودند و از طرف دیگر میزان حساسیت تابعی از نوع و میزان اسانس یا عصاره است (Akgül & Chialva, 1989) به طوری که در این تحقیق اسانس‌ها اثر ضد باکتریایی بیشتری داشتند و با افزایش غلظت قطر هاله عدم رشد و خاصیت ضد باکتریایی در اسانس‌ها و عصاره‌ها بیشتر می‌شد.

علت حساسیت کمتر باکتری‌های گرم منفی به اثرات ضد باکتریایی اسانس‌ها و عصاره‌ها به خاطر غشاء خارجی اطراف دیواره سلولی گرم منفی‌ها می‌باشد که باعث محدود کردن انتشار اجزاء آب‌گریز اسانس‌ها و عصاره‌ها به لایه لیپو پلی ساکاریدی می‌شود. غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی دارای کاتیون‌های دو ظرفیتی و قسمت پلی ساکاریدی لیپو پلی ساکارید در سطح سلول است. این ترکیبات آب‌دوست بوده و به عنوان یک سد در برابر ماکرومولکول‌ها و ترکیبات آب‌گریز مانند ترکیبات موجود در اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی عمل می‌کنند. البته گاهی موارد استثنایی نیز مشاهده می‌شود که حساسیت گرم مثبت‌ها کمتر بوده است. هر جزء از اجزاء اسانس‌ها و عصاره‌ها در جات متفاوتی از فعالیت را در برابر باکتری‌های گرم مثبت یا گرم منفی نشان می‌دهند و این‌طور می‌توان تفسیر کرد که اسانس‌ها به خاطر داشتن ترکیباتی با درجات بالاتر فعالیت ضد باکتریایی اثر بیشتری نسبت به باکتری‌ها در این تحقیق از خود نشان داده‌اند.

همچنین ترکیبات شیمیایی اسانس‌ها و عصاره‌های به دست آمده از یک گونه گیاهی خاص بر حسب این که

نتیجه گیری

با توجه به نتایج بدست آمده از دیسک دیفیوژن و میکرودایلوشن و مقایسه نتایج می توان گفت که، اسانس و عصاره بادرنجبویه و اسطوخدوس اثرات ضد میکروبی علیه باکتری های مورد بررسی در این تحقیق داشتند و باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* دارای بیشترین حساسیت به اسانس بادرنجبویه می باشد. بنابراین خالص سازی و ارزیابی اثرات ضد باکتریایی ترکیبات فعال در عصاره و اسانس این دو گیاه به منظور ترکیب ضد باکتریایی و نگهدارنده مواد غذایی با عنوان یک ماده طبیعی گیاهی جایگزینی مناسب برای ترکیبات شیمیایی علیه میکروارگانیسم های مسمومیت زا و منتقله از مواد غذایی در جهت بهبود کیفیت و سلامت غذایی استفاده کرد. همچنین امروزه یکی از مشکلات بارز در مورد درمان عفونت ها و استفاده از آنتی بیوتیک ها، مقاومت باکتری ها به آنتی بیوتیک هاست که توجه ویژه را برای درمان می طلبد و از آنجایی که اثرات ضد باکتریایی اسانس و عصاره این دو گیاه نه تنها در این تحقیق که در مطالعات دیگر نیز به اثبات رسیده است، این مواد می توانند گزینه های مناسبی برای درمان عفونت هایی که توسط باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک ها ایجاد می شوند، توصیه می گردد.

- 1- Abu-Lafi, S., Odeh, I., Dewik, H., Qabajah, M., Hanuš, L., & Dembitsky, V. (2008). Thymol and carvacrol production from leaves of wild Palestinian *Majorana syriaca*. *Bioresource Technology*, 99(9), 3914-3918.
- 2- Adam, K., Sivropoulou, A., Kokkini, S., Lanaras, T., & Arsenakis, M. (1998). Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* essential oils against human pathogenic fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(5), 1739-1745.
- 3- Adam, K. L. (2006). Lavender production, products, markets, and entertainment farms. Retrieved November, 5, 2006.
- 4- Ahmady-asbchin, S., & Mostafapour, M. J. (2018). Anti-bacterial interactions Rosemary (*Officinalis rosmarinus*) and essential oils of lavender (*Lavandula stoechas*) on two Gram-positive and three Gram-negative bacteria in vitro. *Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)*, 31(2), 121-136.
- 5- Akbary, P. (2014). In vitro inhibitory activity of the leaf methanol extract of green tea (*Camellia sinensis*) against *Lactococcus garvieae* and *Aeromonas hydrophila* isolated of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Advances in Microbiology*, 4(12), 829.
- 6- Akgül, A., & Chialva, F. (1989). Constituents of the essential oil of *Echinophora tenuifolia* L. subsp. *sibthorpiana* (Guss.) Tutin from Turkey. *Flavour and Fragrance Journal*, 4(2), 67-68.
- 7- Andrade, E. H. A., Alves, C. N., Guimarães, E. F., Carreira, L. M. M., & Maia, J. G. S. (2011). Variability in essential oil composition of *Piper dilatatum* LC Rich. *Biochemical Systematics and Ecology*, 39(4-6), 669-675.
- 8- Arzhang, M., Dakhili, M., & Farahani, F. (2015). Investigation of chemical compounds and anti-microbial activity of essential Oil of *Melissa officinalis* L. *Qom University of Medical Sciences Journal*, 9(1), 7-13.
- 9- Basiri, S., Esmaily, H., Vosough-Ghanbari, S., Mohammadirad, A., Yasa, N., & Abdollahi, M. (2007). Improvement by *Satureja khuzestanica* essential oil of malathion-induced red blood cells acetylcholinesterase inhibition and altered hepatic mitochondrial glycogen phosphorylase and phosphoenolpyruvate carboxykinase activities. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 89(2), 124-129.
- 10- Cseke, L. J., Kirakosyan, A., Kaufman, P. B., Warber, S., Duke, J. A., & Briemann, H. L. (2016). *Natural Products from Plants*. CRC press.
- 11- Davazdahemami, S., Sefidkon, F., Jahansooz, M., & Mazaheri, D. (2008). Comparison of biological yield, essential oil content and composition and phenological stages of moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.) in three planting dates. *Iranian journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, 24(3), 263-270.
- 12- Dupont, B. F., Dromer, F., & Improvisi, L. (1996). The problem of azole resistance in *Candida*. Commentary. *Journal de Mycologie Médicale. Supplément*, 6(2), 12-19.
- 13- Ez zoubi, Y., Boust, D., & Farah, A. (2020). A Phytopharmacological review of a Mediterranean plant: *Lavandula stoechas* L. *Clinical Phytoscience*, 6, 1-9.
- 14- Ghadri, T., Mousavi Gargari, S. L., Sharafi, S. M., Darvish Alipour Astaneh,

- S., & Rezaee, M. B. (2010). Antimicrobial, antioxidant, hematologic and cytotoxic properties of *Lavandula angustifolia* essential oil. *Pathobiology Research*, 12(4), 45-58.
- 15- Ghiami Rad, M., & Lotfi, A. (2021). Evaluation of Anti-Bacterial Activity of *Lavandula angustifolia* Alcoholic and Aquatic Extracts on some Pathogenic Bacteria.
- 16- Hall, G. S. (2013). Bailey & Scott's Diagnostic microbiology, 13th edn. In: American Society for Clinical Pathology.
- 17- Mashreghi, M., & Momtazi, F. (2012). Comparison of the antibacterial effects of various concentrations of alcoholic extracts of *Rosmarinus officinalis*, *Hypericum perforatum* and *Carthamus tinctorius* on the growth phases of *Esherichia coli* O157. *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences*, 11(2), 103-114.
- 18- Myint, S., Daud, W. R. W., Mohamad, A. B., & Kadhum, A. A. H. (1996). Gas chromatographic determination of eugenol in ethanol extract of cloves. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 679(1-2), 193-195.
- 19- Srinivasan, D., Nathan, S., Suresh, T., & Perumalsamy, P. L. (2001). Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 74(3), 217-220.
- 20- Talei, G., Meshkatalasadat, M., & Mosavi, Z. (2007). Antibacterial Activity and Chemical Composition of Essential Oils from Four Medicinal Plants of Lorestan, Iran. *Journal of Medicinal Plants*, 6(21), 45-52.
- 21- Venskutonis, P., Dapkevičius, A., & Baranauskienė, M. (1995). Flavour composition of some lemon-like aroma herbs from Lithuania. In *Developments in food Science* (Vol. 37, pp. 833-847). Elsevier.
- 22- Yaghoobi, K., Kaka, G., Sh, D., & Ashayeri, H. (2016). Therapeutic effects of *Lavandula angustifolia*. *Journal of Gorgan University of Medical Sciences*, 17(4), 1-9.

Investigating the antimicrobial effects of lemongrass and lavender extract and essential oil on some food bacteria

Mehrdad Ataei Kachoei¹, Elham Fakhri^{2*}, Fatemeh Khodaverdipour³

1. Department of Medicinal Plants, College of Food and Drug, Islamic Azad University , Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran.
2. Ph.D Student of Horticultural Plant Breeding and Biotechnology, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture and Food Industry, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
3. Ph.D Student of Microbiology, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

*Corresponding author: *Elham.fakhri18@gmail.com*

Abstract

In recent years, the increase in drug resistance against bacteria and the increased dosage of common drugs and antibiotics, as well as the side effects caused by, have brought natural factors such as medicinal plants with fewer side effects, which have received more attention. For this reason, in this study, we prepared alcoholic extracts and essential oils from lemongrass and lavender plants and then serially diluted them to obtain the minimum growth inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) against *Shigella Flexnerl*, *Salmonella Typhimurium*, *Esherichia coli* and *Staphylococcus aureus* bacteria were prepared. Zones of inhibition of bacterial growth were also measured and compared using the disc diffusion method. The results obtained showed that the halo diameter of the essential oil was larger than that of the extract, indicating a higher susceptibility of the sample to the Gram-positive bacterium *Staphylococcus aureus*. The amount of MIC and MBC in essential oil and extract, respectively, against each of the four bacteria tested was measured by microdilution method, which showed that the concentration of MIC and MBC in essential oil was lower than in extract. Analysis of compounds in each essential oil and extract was performed using a GC-MS device, essential oils contain more compounds than extracts and therefore have more antibiotic properties. Therefore, the results of this study demonstrate that lemongrass and lavender essences and extracts revealed antibacterial effects. Therefore, they can be used as natural plant products to combat bacterial infections.

Keywords: Lemon balm, Lavender, Extract, Essential oil, Antibacterial effects

بررسی تاثیر پلاسمای سرد فشار اتمسفری بر شاخص های اکسایش و کیفیت میکروبی فلفل قرمز

تاثیر پلاسمای سرد بر ویژگی های کیفی و بار میکروبی فلفل قرمز

سمانه خدابنده شهرکی^۱، محمد گلی^{۲*}، شریفه شاهی^۳

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد

اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران

۲- گروه علوم و صنایع غذایی، مرکز تحقیقات لیزر و بیوفوتونیک در فناوریهای زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد

اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران

۳- گروه مهندسی پزشکی، مرکز تحقیقات لیزر و بیوفوتونیک در فناوریهای زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد

اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران

*نویسنده مسئول: mgolifood@yahoo.com

چکیده

ادویه، به علت افزایش اشتها و همچنین افزایش عطر و طعم و رنگ به مواد غذایی، در سراسر جهان محبوب است، اما با این وجود بار میکروبی زیادی دارند. پلاسمای سرد یک فناوری غیرحرارتی و جایگزین مناسب برای روش های مرسوم حرارتی مورد استفاده در صنایع غذایی است که با خاصیت ضد میکروبی، بدون تأثیر منفی در کیفیت مواد غذایی باعث افزایش طول عمر مفید آنها می شود. هدف از پژوهش حاضر بررسی برخی خواص کیفی و میکروبی فلفل قرمز به روش پلاسمای سرد بود. نتایج نشان داد ولتاژ پلاسمای نسبت به مدت زمان تابش اثر بیشتری بر بهبود و حفظ محتوی فنول کل فلفل قرمز داشت، به طوری که استفاده از تیمار پلاسمای سرد با ولتاژ متوسط (۱۶/۶۶ کیلو ولت) از نظر افزایش محتوی فنول کل فلفل قرمز نسبت به ولتاژهای پایین تر و بالاتر برتر بود. عدد اسیدی، عدد پراکسید، تیوباریتوریک اسید و اندیس آنیزیدین تیمارها به طور معنی داری بیشتر از نمونه شاهد ارزیابی شد ($p < 0.05$)، و نمونه شاهد کمترین شاخص های اکسایش را داشت. شمارش کلی میکروارگانیسیمها، *Staphylococcus aureus*، *E. coli* در نمونه های تیمار شده به طور معنی داری ($p < 0.05$)، کمتر از نمونه شاهد بود. طبق نتایج به دست آمده، روش پلاسمای سرد به منظور فرآوری مواد غذایی پیشنهاد می شود زیرا می تواند کیفیت مواد غذایی را در سطح قابل قبولی حفظ کند.

کلمات کلیدی: پلاسمای سرد فشار اتمسفری، عدد پراکسید، فلفل قرمز، فنول کل، کیفیت میکروبی

مقدمه

توان، ولتاژ، رطوبت و فاز اطراف آن بستگی دارد (Misra et al., 2016). با استفاده از فناوری پلاسما سرد، امکان پردازش مواد غذایی در دمای پایین وجود دارد که از مزایای بالای این روش می‌باشد. همچنین، به نظر می‌رسد این فناوری از نظر زیست محیطی مناسب است اما پلاسما سرد یک درمان سطحی است که عدم کاربرد آن برای پردازش کل حجم مواد را می‌توان از محدودیت‌های این روش ذکر کرد (Ranjbar Nedamani, 2023). کاربرد پلاسما سرد در غیرفعال‌سازی میکروارگانیسم‌ها در ادویه‌جات در پژوهش‌های مختلفی مورد بررسی قرار گرفته است. هرتویگ و همکاران (Hertwig et al., 2015)، فلور میکروبی طبیعی دانه فلفل و پودر فلفل قرمز را بیش از ۳ سیکل لگاریتمی پس از ۶۰ دقیقه تیماردهی کاهش دادند. در پژوهشی توسط چاروکس و همکاران (Charoux et al., 2020)، آسیب غشای سلولی دانه‌های فلفل سیاه ناشی از فناوری پلاسما غیرحرارتی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی قابل مشاهده بود. درویش و همکاران (Darvish et al., 2022)، به بررسی آلودگی میکروبی زعفران با استفاده از فناوری پلاسما سرد کم فشار پرداختند که بیشترین کاهش بار میکروبی در ۱۱۰ وات به مدت ۳۰ دقیقه مشاهده شد. آلوده شدن ادویه‌جات به طرق مختلف، موجب بروز عوارضی در انسان خواهد گشت که فواید و خواص آن‌ها را تحت الشعاع قرار داده و باعث بروز مشکلات و بیماری‌های میکروبی در مصرف کننده می‌شود. نبود یک سامانه مناسب برای ضدعفونی کردن این محصولات، عامل اصلی کیفیت ضعیف ادویه‌جات محسوب می‌شود (Pankaj et al., 2018). در کنار بررسی اثربخشی پلاسما سرد در آلودگی‌زدایی مواد غذایی، مطالعات اخیر برخی از محدودیت‌های این تکنولوژی را مانند افزایش اکسیداسیون لیپیدها، کاهش رنگ و تغییر ویژگی‌های حسی و ارگانولپتیکی را گزارش می‌دهند. بنابراین در این پژوهش، به بررسی تاثیر پلاسما سرد در زمان‌ها و ولتاژهای متفاوت بر بار

ادویه‌های تجاری توسط مصرف کنندگان، به‌منظور ارتقاء طعم و عطر و ایجاد تنوع، در طیف گسترده‌ای از وعده‌های غذایی گنجانده شده‌اند. از میان ادویه‌جات پرکاربرد و پرطرفدار می‌توان به فلفل اشاره کرد. فلفل‌ها در سراسر دنیا در تهیه غذا به علت طعم و رایحه مطلوب و تأخیر در فساد مواد غذایی استفاده می‌شوند (Omolo et al., 2014)، و پودر فلفل قرمز برای ایجاد رنگ قرمز روشن با طعمی تند و تقویت طعم بسیاری از محصولات غذایی فرآوری شده قابل استفاده است (Akbas and Ozdemir, Rico et al., 2010). آلودگی میکروبی ادویه‌جات به شدت با شرایط بهداشتی در زمان برداشت، مراحل خشک کردن و آسیاب ارتباط دارد (Hertwig et al., 2015). اکثر ادویه‌ها با استفاده از سیستم‌های سنتی تولید می‌شوند (Kashfi et al., 2020)، و طی مراحل برداشت و حمل و نقل نیز بار میکروبی ادویه‌ها افزایش می‌یابد که مصرف آن‌ها مستقیماً و بدون حرارت ممکن است سبب بروز بیماری‌های مختلف شود (Sanai et al., 2019). با توجه به اهمیت ادویه‌ها در صنعت غذا، استفاده از روش‌های آلودگی‌زدایی، بدون ایجاد تغییر در کیفیت ادویه‌ها ضروری است. روش‌های مورد استفاده علاوه بر نابودی فلور میکروبی ماده غذایی و افزایش زمان ماندگاری آن، باید کاهش‌دهنده مصرف انرژی و دوست‌دار محیط زیست باشند و مهم‌تر از همه، تغییرات نامطلوبی را بر روی چربی‌ها، پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها، رنگدانه‌ها، مواد معطر و برخی از ویتامین‌های ماده غذایی نگذارند (Sanai, 2018). پلاسما سرد روشی جدید برای فرآوری مواد غذایی است که با توجه به غیر حرارتی بودن آن، می‌تواند جایگزین سایر روش‌های شیمیایی و فیزیکی مورد استفاده برای از بین بردن آلودگی مواد غذایی باشد. پلاسما حاوی بسیاری از گونه‌های فعال مانند الکترون‌ها، یون‌ها، رادیکال‌های آزاد حالت برانگیخته و تعداد زیادی مولکول خنثی غیر یونیزه می‌باشد (Thirumdas et al., 2017)، که خصوصیات شیمیایی پلاسما به ترکیب گاز ورودی،

ارزیابی ویژگی‌های اکسایشی نمونه‌های تیمار شده اندازه‌گیری ترکیبات فنلی مقدار ترکیبات فنلیک موجود در نمونه‌ها با روش رنگ سنجی به روش فولین سیوکالتو^۱ مورد بررسی قرار گرفت. جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۶۵ نانومتر خوانده شد و برای رسم منحنی استاندارد از اسید گالیک استفاده گردید (Yang et al., 2020).

عدد پراکسید

اندازه‌گیری شاخص پراکسید با استفاده از روش آگریکان و همکاران (Agregan et al., 2017) انجام شد. در این روش، ابتدا ۵ گرم از روغن استخراج شده از هر نمونه را توزین و سپس ۳۰ میلی‌لیتر مخلوط اسید استیک و کلروفرم (۳ حجم اسید استیک و ۲ حجم کلروفرم) اضافه شد. پس از آن، ۰/۵ میلی‌لیتر محلول اشباع یدوریتاسیم اضافه کرده و به مدت یک دقیقه در محیط تاریک قرار داده شد. سپس، ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر و چند قطره معرف چسب نشاسته افزوده و با تیوسولفات سدیم ۰/۰۱ نرمال تا حذف رنگ آبی تیترا شد. در نهایت، عدد پراکسید با استفاده از رابطه (۱) محاسبه گردید.

رابطه (۱) وزن روغن / نرمالیت تیوسولفات مصرفی × (حجم تیترا شاهد - حجم تیترا نمونه) × 1000 = عدد پراکسید

اندیس آنیزیدین

برای این کار، ۰/۵ گرم روغن نمونه وزن شده و با ۵ میلی‌لیتر ایزواکتان حل شد و به حجم ۲۵ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس جذب این محلول در طول موج ۳۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. سپس ۵ میلی‌لیتر از این محلول را برداشته و با ۱ میلی‌لیتر محلول آنیزیدین (۲۵ درصد وزنی - حجمی) تهیه شده در استیک اسید مخلوط شد و ۳۰ دقیقه در محل تاریک نگهداری شد. سپس جذب

میکروبی و شاخص‌های اکسیداسیونی فلفل قرمز پرداخته شد.

مواد و روش کار

در این تحقیق، فلفل قرمز از نوع عنابی از شرکت فرس انوشه واقع در دانشگاه آزاد اسلامی خوراسگان خریداری شد و جهت بررسی تأثیر پلاسمای سرد در ولتاژهای مورد استفاده ۱۳/۳۳، ۱۶/۶۶ و ۲۰ کیلوولت و زمان‌های ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه برای هر ۳ ولتاژ، بر محتوی فنل کل، شاخص‌های اکسایش و بار میکروبی فلفل قرمز مورد استفاده قرار گرفت.

روش تابش‌دهی

سیستم مورد استفاده برای تابش‌دهی، دستگاه پلاسمای تخلیه سد دی الکتریک بود که قابلیت کار کردن در فشار اتمسفر را داشته و گاز مورد استفاده برای آن، هوا بود. در این بخش، نمونه‌های فلفل قرمز خریداری شده، درون ظرف پیرکس مخصوص دستگاه ریخته شد و نمونه‌ها با استفاده از متغیرهای مورد استفاده در این پژوهش (زمان فرآیند و ولتاژ دستگاه) تیمار شدند.

آماده سازی و استخراج چربی

برای اندازه‌گیری شاخص‌های اکسایشی، ابتدا روغن نمونه‌ها با استفاده از روش کاظمی و عبدالحسینی (Kazemi and Abdul Hosseini, 2012)، با تغییرات جزئی استخراج شد تا آزمون‌های مورد نظر بر روی روغن استحصالی انجام گیرد. بنابراین، پس از آسیاب کردن نمونه‌های فلفل قرمز، 500 گرم از نمونه پودر شده درون بالن ریخته شد و حلال پترولیوم اتر با نسبت جامد به حلال 1 به 3، به آن اضافه گردید. درب بالن با استفاده از وزق آلومینیومی پوشانده شد و پس از گذشت 48 ساعت، از کاغذ صافی عبور داده شد و حلال با استفاده از دستگاه تبخیرکننده دوار، جدا گردید.

تعداد کلنی‌های قابل شمارش در هر گرم نمونه بود. بدین منظور، رقت‌سازی تا سه مرحله انجام شد، سپس آزمون‌های میکروبی نمونه‌های فلفل قرمز، مطابق با استانداردهای مربوطه انجام گرفت. شمارش *Cl.perfringens* بر اساس استاندارد ملی ایران به شماره ۲۱۹۷، شمارش *E.coli* بر اساس استاندارد ملی ایران به شماره ۲۹۴۶، شمارش کلی میکروارگانسیم‌ها مطابق با استاندارد ملی ایران به شماره ۵۲۷۲ و شمارش کپک و مخمر بر اساس استاندارد ملی ایران به شماره ۱۰۸۹۹-۲ انجام شد. جهت جداسازی و شناسایی *S.aureus* از محیط کشت Bair Parker Agar و با روش رحیمی و صفائی (Rahimi and Safai, 2010) انجام گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری

در این پژوهش، آزمون‌ها به صورت فاکتوریل، در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گردید. کلیه آزمون‌ها در سه تکرار انجام شد که دو فاکتور مورد بررسی، شامل ولتاژهای مورد استفاده (۱۳/۳۳، ۱۶/۶۶ و ۲۰ کیلوولت) و زمان اعمال تیمار پلاسما (۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه) بر نمونه‌های فلفل قرمز بود. به منظور انجام آزمون‌های آماری، از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ استفاده شد و میانگین‌ها با روش دانکن در سطح ۵ درصد مقایسه گردید. ضمناً برای رسم نمودارها از نرم افزار اکسل (۲۰۰۷) استفاده شد.

نتایج و بحث

محتوی فنول کل

ترکیبات فنولی از جمله متابولیت‌های ثانویه در انواع مواد غذایی از جمله ادویه‌جات وجود دارند که از هسته‌های آروماتیک و یک یا چند گروه OH ساخته شده‌اند و به فنول‌های ساده، فنولیک اسیدها، کومارین-ها، فلاونوئیدها و تانن‌ها تقسیم می‌شوند. ترکیبات فنولیک در طبیعت، به فرم‌های آزاد و باند شده با پیوند گلیکوزیدی با دیواره سلولی و یا ترکیبات درون

آن در طول موج ۳۵۰ قرائت شد. اندیس آنیزیدین از رابطه (۲) محاسبه گردید (Tompkins and Perkins, 1999).

رابطه (۲)
$$\text{اندیس آنیزیدین} = \frac{25 \times (1/2 \times A_S - A_B)}{w}$$
 در رابطه (۲)، A_S میزان جذب چربی بعد از واکنش با آنیزیدین، A_B جذب نمونه شاهد، w وزن نمونه (گرم)، v حجمی که نمونه در آن حل شده (میلی لیتر) و $1/2$ ضریب تصحیح برای رقیق سازی محلول نمونه با یک میلی لیتر واکنشگر آنیزیدین است.

تیوباربتوریک اسید

200 میلی گرم از روغن نمونه را در مقدار کمی از ۱- بوتانل حل کرده و با همین حلال به حجم ۲۵ میلی لیتر رسانده شد. ۵ میلی لیتر از آن را به یک لوله آزمایش خشک انتقال داده و ۵ میلی لیتر از محلول واکنشگر تیوباربتوریک اسید به آن اضافه و کاملاً مخلوط شد. پس از ۱۲۰ دقیقه قرارگیری در حمام آبی با دمای ۹۵ درجه سانتی گراد، به مدت ۱۰ دقیقه زیر جریان آب سرد شیر قرار داده شد. جذب نوری آن (A_S) در طول موج ۵۳۰ نانومتر در مقابل بلانک (آب مقطر) (A_B) توسط اسپکتروفتومتر قرائت شد. شاخص تیوباربتوریک اسید با استفاده از رابطه (۳) بدست آمد (Egan et al., 1997).

رابطه (۳)
$$\text{TBA} = (A_S - A_B) \times 50/200$$

عدد اسیدی

جهت اندازه گیری عدد اسیدی از روش تیتراسیون با استفاده از معرف فنل فتالین و سود ۰/۱ نرمال تا ظهور صورتی استفاده شد و عدد اسیدی از رابطه (۴) محاسبه شد (استاندارد AOAC با شماره ۶۳-۳-cd).

رابطه (۴)
$$\text{عدد اسیدی} = \frac{\text{میلی لیتر سود } 0/1 \text{ نرمال مصرفی} \times 2/82}{\text{وزن نمونه}}$$

بررسی بار میکروبی

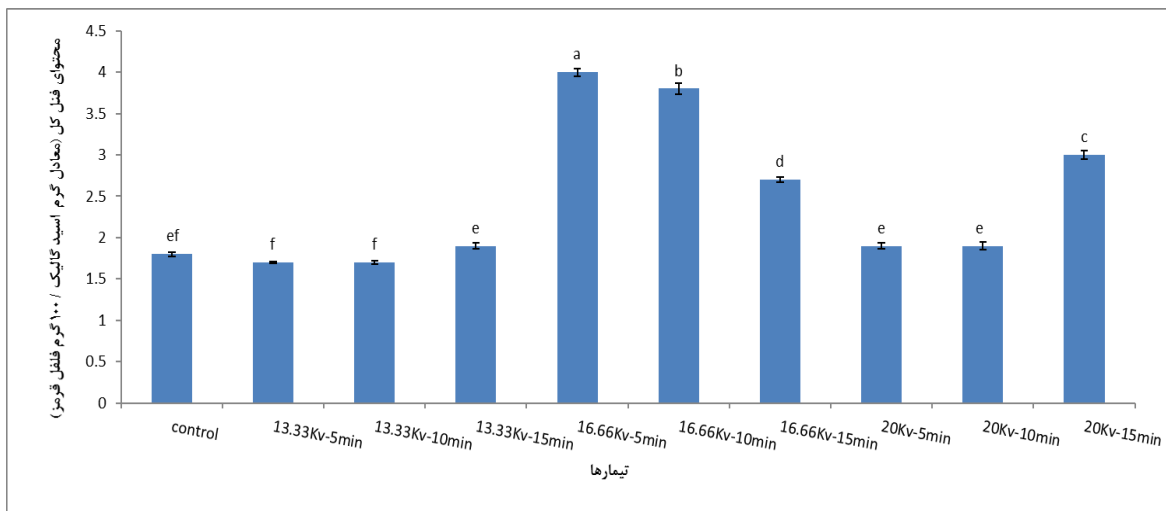
اساس آزمایشات میکروبی شامل کشت مقادیر مشخصی از نمونه با استفاده از محیط کشت معین، از رقت‌های تهیه شده، گرمخانه گذاری پلیت‌ها و در نهایت محاسبه

زمان تابش از ۵ به ۱۵ دقیقه سبب افزایش محتوی فنول کل فلفل قرمز شد ($p < 0.05$). در ولتاژ متوسط (۱۶/۶۶ کیلو ولت)، روند کاهشی محتوی فنول کل با افزایش زمان از ۵ تا ۱۵ دقیقه مشاهده گردید ($p < 0.05$). از آنجایی که غلظت گونه‌های فعال واکنشگر پلازما در اثر افزایش مدت زمان تابش پلازما افزایش می‌یابد، این امر به نوبه‌ی خود موجب افزایش سرعت و شدت اکسیداسیون می‌شود (Fernandes et al., 2019). تحقیقات بسیاری نشان داده است که میزان ولتاژ و مدت زمان تابش دهی پلازما تأثیر شگرفی بر ترکیبات فنولیک، فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها، و همچنین فعالیت آنتی اکسیدان مواد غذایی دارد. در همین راستا، اثر تیمار پلازما سرد بر محتوی فنول کل، ویتامین ث، فلاونوئیدها و فعالیت آنتی اکسیدانی آب سیب و بادام هندی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد تیمار پلازما باعث افزایش محتوی فنول کل، فلاونوئیدها و فعالیت آنتی اکسیدانی شد، اما با افزایش زمان اعمال تیمار از ۵ تا ۱۵ دقیقه میزان ترکیبات زیست فعال به‌طور قابل توجهی کاهش یافت (Rodriguez et al., 2017). لیاو و همکاران (Liao et al., 2018)، کاهش محتوی فنول کل آب سیب تیمار شده با پلازما سرد را به ویژه با افزایش شدت و مدت زمان تابش پلازما گزارش کردند. در تحقیق دیگری، فرناندز و همکاران (Fernandes et al., 2019)، بیان کردند که استفاده از پلازما سرد با سرعت جریان بالا (۲۰ میلی لیتر بر دقیقه) تغییری در ظرفیت آنتی اکسیدانی آب میوه Acerola ایجاد نکرد. اما کاهش سرعت جریان به ۱۵ و ۱۰ میلی لیتر بر دقیقه باعث کاهش ظرفیت آنتی اکسیدانی آب میوه گردید. کشفی و همکاران (Kashfi et al., 2020)، در مطالعه‌ای به بررسی اثر استفاده از تیمار پلازما سرد

سلولینوئی موجود می‌باشند. فلاونوئیدها و سایر ترکیبات فنولی دارای فعالیت‌های بیولوژیک متنوع از جمله آنتی اکسیدانی، آنتی میکروبی و ضد التهابی هستند (Charoux et al., 2020). نتایج این پژوهش بیانگر آن است که اثر ولتاژ پلازما نسبت به اثر مدت زمان تابش بر محتوی فنول کل چشمگیرتر بود، به‌طوری‌که استفاده از تیمار پلازما سرد با ولتاژ متوسط (۱۶/۶۶ کیلو ولت) از نظر افزایش محتوی فنول کل فلفل قرمز نسبت به ولتاژهای پایین‌تر و بالاتر برتر بود. محتوی فنول کل در تیمارهای با ولتاژ ۱۶/۶۶ کیلو ولت به مدت ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه، و ۲۰ کیلو ولت به مدت ۱۵ دقیقه به‌طور معنی‌داری ($p < 0.05$)، نسبت به نمونه شاهد و سایر تیمارها بیشتر به‌دست آمد. تیمار با ولتاژ ۱۶/۶۶ کیلو ولت به مدت ۵ دقیقه بیشترین محتوی فنول کل فلفل قرمز را نشان داد (شکل ۱). علت افزایش محتوی فنول کل نمونه فلفل قرمز در اثر اعمال پلازما را اینگونه می‌توان توضیح داد که گونه‌های فعال، ذرات باردار، رادیکال‌های آزاد و فوتون‌های فرابنفش تشکیل شده در حین فرایند پلازما دیواره سلولی ماده مورد نظر (فلفل قرمز) را تخریب نموده و با شکست پیوندهای گلیکوزیدی ترکیبات فنولیک باند شده با دیواره سلولی، باعث استخراج و رهاسازی هر چه بیشتر ترکیبات فنولی و در نتیجه افزایش محتوی فنول کل می‌شود (Khoddami et al., 2013). البته لازم به تذکر است که کاهش محتوی فنول کل فلفل قرمز در تیمارهای با ولتاژ بالاتر (۲۰ کیلو ولت) نسبت تیمارهای با ولتاژ ۱۶/۶۶ کیلو ولت می‌تواند با اکسیداسیون، پلیمریزاسیون، ایزومریزاسیون و تجزیه و تخریب ترکیبات فنولی توسط گونه‌های فعال واکنشگر مرتبط باشد (Fernandes et al., 2019). طبق یافته‌های این تحقیق در ولتاژهای ۱۳/۳۳ و ۲۰ کیلو ولت، افزایش

برش‌های عناب به مدت ۱۵، ۳۰ و ۶۰ دقیقه مشاهده نمودند که محتوی پروسیانیدین‌ها، فلاونوئیدها، و فنول کل به ترتیب، به میزان ۸۱/۵۳، ۸۹/۳۳، و ۸۵/۱۳ درصد بهبود پیدا کرد و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی حداکثر تا ۸۵/۳۶ درصد افزایش یافت.

بر محتوی فنول کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی نعناع خشک پرداختند. نتایج آن‌ها نشان داد که اعمال تیمار با شدت ۵۰ و ۶۰ وات به مدت ۲۰ دقیقه باعث افزایش محتوی فنول کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های نعناع خشک تیمار شده گردید. بائو و همکاران (Bao et al., 2021)، با اعمال تیمار پلاسمای سرد بر



شکل ۱- اثر متقابل ولتاژ- زمان اعمال پلاسمای سرد بر محتوی فنول کل فلفل قرمز

شخص‌های اکسایش پایداری اکسایشی می‌شوند (Puprasit et al., 2020). می‌توان گفت که اثر ولتاژ بر تغییرات عدد اسیدی و عدد پراکسید فلفل قرمز بیشتر از اثر مدت زمان تابش پلاسما بود. به‌طوریکه نمونه‌های تیمار شده با ولتاژ ۱۶/۶۶ کیلو ولت عدد اسیدی و عدد پراکسید بیشتری را نسبت به سایر تیمارها نشان داد. تیمار با ولتاژ ۱۳/۳۳ کیلو ولت به مدت ۵ دقیقه کمترین عدد تیوباربیتوریک اسید را دارا بود ($p < 0.05$). بیشترین کمترین اندیس آنیزیدین به ترتیب، به تیمارهای با ولتاژ ۱۳/۳۳ کیلو ولت به مدت ۱۰ و ۵ دقیقه اختصاص داشت. به‌طور کلی نتایج این تحقیق حاکی از آن بود که با اعمال تیمار پلاسما به مدت طولانی (بیش از ۵ دقیقه) عدد پراکسید، عدد اسیدی، عدد تیوباربیتوریک اسید و اندیس آنیزیدین افزایش یافت (جدول ۱)، زیرا با افزایش مدت زمان تابش دهی پلاسما غلظت گونه‌های فعال واکنشگر و به دنبال آن پتانسیل

بمنظور ارزیابی درجه اکسیداسیون چربی‌ها در مواد غذایی بطور وسیعی از شاخص‌های عدد پراکسید، عدد تیوباربیتوریک اسید (TBA) و اندیس آنیزیدین استفاده می‌شود که میزان محصولات اولیه (هیدروپراکسیدها) و ثانویه اکسیداسیون به‌ویژه آلدئیدها و کتون‌ها را نشان می‌دهند (Almasi, 2017). عدد اسیدی، عدد پراکسید، تیوباربیتوریک اسید و اندیس آنیزیدین تیمارها به‌طور معنی‌داری بیشتر از نمونه شاهد اندازه‌گیری شد ($p < 0.05$) و نمونه شاهد کمترین شاخص‌های اکسایش را داشت (جدول ۱)، زیرا گونه‌های فعال واکنشگر، ذرات باردار، رادیکال‌های آزاد و فوتون‌های فرابنفش تولید شده طی فرایند پلاسما باعث اکسیداسیون لیپیدها به ویژه اسیدهای چرب غیر اشباع و تشکیل محصولات اولیه و ثانویه حاصل از اکسیداسیون و در نهایت کاهش

خوک و گاو پلاسما شده به مدت ۱۰ دقیقه بود (Jayasena et al., 2015). وان دورميو واندامه، (Van Durme and Vandamme, 2016) گزارش دادند که استفاده از تیمار پلاسما سرد (۶۰ دقیقه) روی روغن زیتون باعث افزایش میزان ترکیبات ثانویه حاصل از اکسیداسیون از ۱۱/۵۵۸ میکروگرم بر گرم به ۱۸/۹۳۹ میکروگرم بر گرم می‌گردد. نتایج تحقیقی نشان داد که اعمال تیمار پلاسما سرد تحت فشار اتمسفری با ولتاژ ۸۰ کیلو ولت به مدت ۳۰ دقیقه موجب افزایش عدد چربی حیوانی (کره و پیه گاو) می‌شود (Sarangapani et al., 2017).

و قدرت اکسید کنندگی پلاسما بیشتر می‌شود (Thirumdas, 2022). تحقیقات گسترده‌ای در زمینه تأثیر تیمار پلاسما سرد بر اکسیداسیون مواد غذایی صورت گرفته است که نتایج آن‌ها نشان دهنده آن است که تیمار پلاسما اثر قابل ملاحظه‌ای بر میزان اکسیداسیون لیپیدها در انواع مواد غذایی می‌گذارد. در همین راستا، جانسون و دیگر (Johnson and Decker., 2015) گونه‌های فعال اکسیژن تولید شده طی فرایند پلاسما را مسئول اصلی اکسیداسیون لیپیدها دانستند. در تحقیق دیگری نتایج حاکی از افزایش ۳۰ درصدی میزان مالون دی‌آلدئید در چربی

جدول ۱- اثر ولتاژ و زمان اعمال تیمار پلاسمای سرد بر شاخص‌های اکسایش و کیفیت میکروبی فلفل قرمز

بار میکروبی			شاخص‌های اکسایش			تیمارها		
کیک و مخمر (CFU/g)	اشرشیا کلی (CFU/g)	استافیلوکوکوس اورئوس (CFU/g)	شمارش کلی (CFU/g)	اندیس آنیزیدین	تیوباریتوریک اسید (میلی‌گرم مالون دی آلدئید بر کیلوگرم روغن)	عدد اسیدی (گرم اولئیک اسید بر ۱۰۰ گرم روغن)	عدد پراکسید (میلی اکی‌والان اکسیژن بر کیلوگرم روغن)	
1/333±577/35 ^a	313/00±23/09 ^a	280000±5773/503 ^a	7100000±100000/00 ^a	37/50±0/94 ^g	80/90±2/02 ^f	1/88±0/05 ⁱ	9/70±0/24 ^g	شاهد
0/00±0/00 ^b	0/00±0/00 ^b	0/00±0/00 ^b	60000±1581/14 ^b	18/20±0/18 ⁱ	67/90±0/68 ^g	14/10±0/14 ^b	12/60±0/13 ^f	13/33Kv-5min
0/00±0/00 ^b	0/00±0/00 ^b	0/00±0/00 ^b	45000±707/11 ^b ^c	182/70±3/65 ^a	92/40±1/85 ^d	2/82±0/06 ^h	14/70±0/29 ^e	13/33Kv-10min
0/00±0/00 ^b	0/00±0/00 ^b	0/00±0/00 ^b	32000±707/11 ^b ^c	58/60±1/76 ^e	107/30±3/22 ^b	3/76±0/11 ^f	72/80±2/18 ^a	13/33Kv-15min
0/00±0/00 ^b	0/00±0/00 ^b	0/00±0/00 ^b	60000±1414/21 ^b	76/50±1/53 ^c	104/60±2/09 ^{bc}	14/57±0/29 ^a	58/70±1/17 ^b	16/66Kv-5min
0/00±0/00 ^b	0/00±0/00 ^b	0/00±0/00 ^b	28000±707/11 ^{bc}	53/10±1/59 ^f	155/60±4/67 ^a	12/69±0/38 ^c	54/60±1/64 ^c	16/66Kv-10min
0/00±0/00 ^b	0/00±0/00 ^b	0/00±0/00 ^b	20000±707/11 ^{bc}	111/18±2/43 ^b	84/20±1/84 ^{ef}	11/38±0/25 ^d	53/50±1/17 ^c	16/66Kv-15min
0/00±0/00 ^b	0/00±0/00 ^b	0/00±0/00 ^b	50000±707/11 ^c	65/60±1/97 ^d	101/20±3/04 ^c	14/10±0/42 ^b	4/20±0/13 ^b	20Kv-5min
0/00±0/00 ^b	0/00±0/00 ^b	0/00±0/00 ^b	42600±894/43 ^{bc}	27/50±1/10 ^h	83/20±3/33 ^{cf}	3/29±0/13 ^g	9/50±0/38 ^g	20Kv-10min
0/00±0/00 ^b	0/00±0/00 ^b	0/00±0/00 ^b	16000±707/11 ^c	61/50±1/85 ^e	87/50±2/63 ^e	6/58±0/20 ^e	21/60±0/65 ^d	20Kv-15min

نتایج بر حسب میانگین داده‌ها ± انحراف معیار، میانگین‌هایی که دارای حروف مختلف هستند اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد هستند ($p < 0.05$).

تخریب اکسایشی وارد شده به DNA منجر به تجزیه بازها و در نهایت تجزیه رشته‌های آن می‌شوند. سه مکانیسم عمده برای غیرفعال‌سازی میکروب‌ها در شرایط اعمال فرایند پلاسما وجود دارد که شامل سوراخ کردن غشاء و یا دیواره سلول که منجر به نشت اجزای سلولی از جمله پتاسیم، پروتئین و اسیدهای نوکلئیک می‌شود، تخریب جدی پروتئین درون سلولی توسط عوامل اکسیداتیو و نیتروزیو، و تخریب مستقیم نوکلئیک اسید می‌باشد (Mahnot et al., 2019). مطالعات متعددی نشان داده است که پلاسمای سرد تأثیر چشمگیری بر کاهش بار میکروبی مواد غذایی مختلف دارد. در همین زمینه، رضایی مهر و همکاران (Rezaee Mehr et al., 2015) با بررسی اثر پلاسمای سرد اتمسفری در باکتری‌زدایی *E. coli* در شیر به این نتیجه دست یافتند که با افزایش مدت زمان تابش پلاسما، میزان غیر فعال‌سازی باکتری افزایش می‌یابد. خلج و همکاران (Khalaj et al., 2018) اثر پلاسمای سرد به مدت ۰، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ ثانیه را بر انگور قرمز رقم فخری آلوده به قارچ‌های *Aspergillus* و *Botrytis* به این نتیجه دست یافتند که در تیمار ۲۰ ثانیه، ۱۵ درصد آلودگی برای قارچ *Botrytis* و ۲۰ درصد آلودگی برای قارچ *Aspergillus* پس از ۳۵ روز مشاهده شد. در تیمار ۴۰ ثانیه اثری از آلودگی برای هیچ کدام از قارچ‌ها دیده نشد. در تحقیق دیگری تأثیر پلاسمای سرد را بر کاهش باکتری *Salmonella Enteritidis* موجود بر روی پوسته تخم مرغ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که مدت زمان تابش پلاسما اثر معنی‌داری بر باکتری مورد آزمون داشته است. به‌طوریکه با افزایش زمان پلاسما تا ۳ دقیقه کاهش چشمگیری در تعداد کلنی‌ها مشاهده شد. همچنین افزایش زمان تابش تا ۳ دقیقه منجر به حذف کامل آلودگی میکروبی گردید (Bohlouli et al., 2021). در مطالعه‌ای یک رقم چای سیاه لاهیجان با ولتاژهای ۲۰، ۲۲ و ۵۲ کیلو ولت در

کیفیت میکروبی نتایج آزمون میکروبی نشان داد که فلفل قرمز از نظر بار میکروبی *Cl. perfringens* منفی بود. نتایج این تحقیق نشان داد که شمارش کلی میکروارگانیزم‌ها، *S. aureus* و *E. coli* در نمونه‌های تیمار شده به‌طور معنی‌داری ($p < 0.05$)، کمتر از نمونه شاهد بود. مدت زمان تابش در کاهش شمارش کلی میکروارگانیزم‌ها نسبت به اثر ولتاژ اثر بیشتری داشت. تنها تیمارهای با ولتاژ ۲۰ کیلو ولت به مدت ۵ و ۱۵ دقیقه شمارش کلی میکروارگانیزم کمتری نسبت به تیمارهای با ولتاژ ۱۳/۳۳ و ۱۶/۶۶ کیلو ولت به مدت ۵ دقیقه داشتند ($p < 0.05$). میزان ولتاژ و مدت زمان اعمال تیمار پلاسمای سرد اثر معنی‌داری روی شمارش کلی میکروارگانیزم‌ها، *E. coli*، *S. aureus* و کپک و مخمر نداشت ($p > 0.05$)، (جدول ۱). پلاسما یک فرایند کاملاً پیچیده است که در حین انجام این فرایندهای فعال (OH ، NO ، NO_2 ، AR^* و OI)، ذرات باردار، اتم‌های برانگیخته، اتم‌های خنثی و فوتون‌های فرابنفش تشکیل می‌شوند. تجمع ذرات پلاسما بر روی سطح غشای سلولی میکروب باعث تخریب دیواره و کشته شدن آن‌ها می‌گردد. برهم کنش مستقیم سلول و ذرات باردار موجود در پلاسما موجب اکسیداسیون لیپیدها، آمینو اسیدها و اسیدهای نوکلئیک در غشای سلولی و در نهایت مرگ سلول می‌گردند. اکسیداسیون توسط گونه‌های اکسید کننده ازت و اکسیدهای ازت صورت می‌گیرد. پروتئین‌ها نسبت به آسیب ناشی از اکسیداسیون به خصوص در محلهایی که آمینو اسیدهای گوگردی در آن یافت می‌شود، حساس هستند. گونه‌های فعال فوتون‌های فرابنفش که حاصل از بازگشت گونه‌های برانگیخته به حالت پایه می‌باشند، با تخریب مستقیم مواد ژنتیکی میکروب، منجر به ایجاد تداخل در سیستم تقسیم سلولی و در آخر سبب مرگ سلولی می‌شوند. همچنین فوتون‌های فرابنفش با

پژوهش حاضر با هدف بررسی تأثیر پلاسما سرد در ولتاژ و زمان‌های مختلف بر محتوی فنول کل، کیفیت میکروبی، و شاخص‌های اکسایش فلفل قرمز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که در مدت زمان‌های مختلف تابش‌دهی، استفاده از تیمار پلاسما سرد با ولتاژ متوسط (۱۶/۶۶ کیلو ولت) از نظر حفظ محتوی فنول کل فلفل قرمز نسبت به ولتاژهای پایین‌تر و بالاتر ارجح بود. تیمار پلاسما سرد به‌طور قابل توجهی موجب کاهش شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها، *E. coli*، *S. aureus* و کپک و مخمرها گردید. نتایج به‌دست آمده از اندازه‌گیری شاخص‌های اکسایشی بیانگر آن بود که عدد اسیدی، عدد پراکسید، عدد تیوباربتوریک اسید و اندیس آنیزیدین تیمارها در مقایسه با نمونه شاهد افزایش یافت. قدرت پلاسما در غیرفعال‌سازی میکروارگانیسم‌ها مناسب بود. این تکنولوژی غیر حرارتی به‌دلیل عدم تولید ضایعات، انرژی مصرفی پایین، کم هزینه بودن، حفظ مواد مغذی و همچنین انجام آن در دمای اتاق می‌تواند به عنوان یک روش ضد عفونی کننده جایگزین خوبی برای روش‌های شیمیایی و فیزیکی و به‌خصوص استرلیزاسیون و پاستوریزاسیون مطرح شود.

بازه‌های زمانی ۲، ۴، ۶ و ۸ دقیقه در معرض تیمار پلاسما سرد قرار گرفت. نتایج نشان داد که جمعیت میکروبی کلی، *Enterococcus*، *E. coli*، شمارش کلی فرم‌ها، و کپک و مخمرها نمونه‌های تیمار شده به مدت ۸ دقیقه کاهش چشمگیری داشت. همچنین با افزایش ولتاژ پلاسما میزان کاهش بار میکروبی به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (Afshari et al., 2022). پاسکوئالی و همکاران (Pasquali et al., 2016) بیان کردند که اعمال پلاسما سرد با ولتاژ ۱۵ کیلو ولت به مدت ۱۵ دقیقه موجب کاهش ۱/۳۵ سیکل لگاریتمی *E. coli* و اعمال تیمار با همین ولتاژ به مدت ۳۰ دقیقه سبب کاهش ۲/۲ سیکل لگاریتمی *Listeria monocytogenes* در کاسنی گردید. یانام و همکاران (Yannam et al., 2018)، گزارش دادند که اعمال تیمار پلاسما با ولتاژ بالا (۳۰ کیلو ولت) به مدت ۲۰ دقیقه موجب کاهش ۸/۲ واحد لگاریتمی *E. coli* در آب نارنگی می‌گردد. نتایج تحقیقی نشان داد که شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها، کپک و مخمرها و شمارش *S. aureus* در سطح خلال بادام تیمار شده با پلاسما به مدت ۲۰ دقیقه حدود $2.72 \log_{cfu}/g$ کاهش یافت (Shirani et al., 2020). گان و همکاران (Gan et al., 2020) ادعان داشتند که با افزایش زمان اعمال پلاسما بر آب میوه Chokeberry مقدار غیر فعال شدن/شرشیاکلای افزایش یافت و بیشترین میزان غیر فعال شدن پس از گذشت ۵ دقیقه به میزان $2.72 \log_{cfu}/g$ بود. همتی و همکاران (Hemmati et al., 2021) اثر پلاسما سرد را بر بار میکروبی زردچوبه بررسی کردند. آن‌ها مشاهده نمودند که پس از ۷ دقیقه تیمار پلاسما تعداد سلول‌های زنده هوازی حدود $5.1 \log_{cfu}/g$ کاهش یافت.

نتیجه‌گیری کلی

منابع

- Afshari H, Rouzbahani F, Saberi Guderzi A. 2021. Investigating the effect of cold plasma on reducing the microbial load of black tea. The 11th National Conference on Sustainable Agriculture and Natural Resources, Tehran, Iran.
- Agregán R, Munekata P.E, Domínguez R, Carballo J, Franco D, & Lorenzo J.M. 2017. Proximate composition, phenolic content and *in vitro* antioxidant activity of aqueous extracts of the seaweeds *Ascophyllum nodosum*, *Bifurcaria bifurcata* and *Fucus vesiculosus*. Effect of addition of the extracts on the oxidative stability of canola oil under accelerated storage conditions. *Food Res. Int.* 99: 986-994.
- Akbas MY, Ozdemir M. 2008. Effect of gaseous ozone on microbial inactivation and sensory of flaked red peppers. *Int. J. Food Sci. Technol.* 43(9):1657-1662.
- Almasi H. 2017. Comparison of the effect of direct addition of extract and use of antioxidant active film containing nettle leaf extract on the oxidative stability of soybean oil. *Food Industry Res.* 26(3): 411-427.
- AOCS. 1993. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society, AOCS Press, Champaign, IL, 762p.
- Bao T, Hao X, Shishir M.R.I, Karim N, Chen W. 2021. Cold plasma: An emerging pretreatment technology for the drying of jujube slices. *Food Chem.* 33: 127783.
- Bohlouli P, Jalali Rad R, Duranian D. 2021. Antimicrobial effects of cold plasma on the pathogenic bacteria *Salmonella enteritidis* present on eggshell. *Food Sci. Nutr.* 17(4 (68 consecutive)): 85-92.
- Charoux CM, Free L, Hinds L.M, Vijayaraghavan R.K, Daniels S, O'Donnell CP, & Tiwari BK. 2020. Effect of non-thermal plasma technology on microbial inactivation and total phenolic content of a model liquid food system and black pepper grains. *Lwt.*118: 108716.
- Darvish H, Ramezan Y, Khani M.R, Kamkari A. 2022. Effect of low-pressure cold plasma processing on decontamination and quality attributes of Saffron (*Crocus sativus* L.). *Food Sci. Nutr.* 10(6): 2082-2090.
- Egan H.K.R.S, Krik R.S, Sawyer R. 1997. *Pearson's chemical Analysis of food*. 9th. Edition. Edinburgh. Scotland, Churchill. Livingstone, UK, pp. 609-634.
- Fernandes F.A, Santos, V.O, Rodrigues S. 2019. Effects of glow plasma technology on some bioactive compounds of acerola juice. *Food Res. Int.* 115: 16-22.
- Gan Z, Feng X, Hou Y, Sun A, Wang R. 2021. Cold plasma jet with dielectric barrier configuration: Investigating its effect on the cell membrane of *E. coli* and *S. cerevisiae* and its impact on the quality of chokeberry juice. *Lwt.* 136: 110223.
- Hemmati V, Garavand F, Goudarzi M, Sarlak Z, Cacciotti I, Tiwari B. K. 2021. Cold atmospheric-pressure plasma treatment of turmeric powder: microbial load, essential oil profile, bioactivity and microstructure analyses. *Int. J. Food Sci. Technol.* 56(5): 2224 -2232.
- Hertwig C, Reineke K, Ehlbeck J, Erdoğdu B, Rauh C, Schlüter O. 2015. Impact of remote plasma treatment on natural microbial load and quality parameters of selected herbs and spices. *J Food Eng.* 167: 12-17.
- Institute of Standards and Industrial Research of the country. Microbiology of animal feed foods - Comprehensive method for counting molds and yeasts - Part II: Colony counting method in products with water activity equal to or less than 0.95. National Standard of Iran No. 2-10899.
- Institute of Standards and Industrial Research of the country. Microbiology of animal feed foods - Comprehensive method for counting molds and yeasts - Part II: Colony counting method in products with water activity equal to or less than 0.95. National Standard of Iran No. 2-10899.
- Institute of Standards and Industrial Research of the country. Microbiology of food and animal feed - a comprehensive method for the search, identification and enumeration of *Clostridium perfringens*, National Standard of Iran No. 2197.

- Institute of Standards and Industrial Research of the country. *Escherichia coli* search and identification method, Iranian National Standard No. 2946.
- Institute of Standards and Industrial Research of the country. Total counting of microorganisms, Iranian National Standard No. 5272.
- Jayasena D.D, Kim H.J, Yong H.I, Park S, Kim K, Choe W, Jo C. 2015. Flexible thin-layer dielectric barrier discharge plasma treatment of pork butt and beef loin: Effects on pathogen inactivation and meat-quality attributes. *Food Microbiology*. 46: 51-57.
- Johnson D.R, Decker E.A. 2015. The role of oxygen in lipid oxidation reactions: a review. *Annu Rev Food Sci Technol*. 6: 171-190.
- Kashfi A.S, Ramezan Y, Khani MR. 2020. Simultaneous study of the antioxidant activity, microbial decontamination and color of dried peppermint (*Mentha piperita* L.) using low pressure cold plasma. *Lwt*. 123: 109121.
- Khalaj A, Ahmadi E, Mirzaei S, Abbaszadeh R. 2018. The effect of cold plasma treatment on the disinfection and quality characteristics of grapes (*Vitis vinifera* L). The 12th National Congress of Biosystem Mechanical Engineering and Mechanization of Iran, Ahvaz.
- Khoddami A, Wilkes M.A, Roberts T.H. 2013. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*. 18(2): 2328-2375.
- Liao X, Li J, Muhammad A.I, Suo Y, Chen S, Ye X., ... & Ding T. 2018. Application of a dielectric barrier discharge atmospheric cold plasma (Dbd-Acp) for *Escherichia coli* inactivation in apple juice. *J. Food Sci*. 83(2): 401-408.
- Mahnot N.K, Siyu L.P, Wan Z, Keener K.M, Misra N.N. 2020. In-package cold plasma decontamination of fresh-cut carrots: Microbial and Quality Aspects. *J. Phys*. 53(15): 154002.
- Misra N.N, Schlüter O, Cullen P.J. (Eds.). 2016. *Cold plasma in food and agriculture: fundamentals and applications*. Academic Press.
- Omolo M.A, Wong Z.Z, Mergen A.K, Hastings J.C, Le N.C, Reiland H.A, ... & Baumler D.J. 2014. Antimicrobial properties of chili peppers. *J. Infect. Dis. Ther*. 2(4): 2332-0877.
- Pankaj S.K, Wan Z, Keener K.M. 2018. Effects of cold plasma on food quality: A review. *Foods*. 7(1): 4.
- Pasquali F, Stratakos A.C, Koidis A, Berardinelli A, Cevoli C, Ragni L, ... & Trevisani M. 2016. Atmospheric cold plasma process for vegetable leaf decontamination: A feasibility study on radicchio (red chicory, *Cichorium intybus* L.). *Food control*. 60:552-559.
- Puprasit K, Wongsawaeng D, Ngaosuwan K, Kiatkittipong W, Assabumrungrat S. 2020. Non-thermal dielectric barrier discharge plasma hydrogenation for production of margarine with low trans-fatty acid formation. *IFSET*. 66: 102511.
- Rahimi E, Safai H.G. 2010. Detection of classical enterotoxins of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine subclinical mastitis in Isfahan, Iran. *Vet. Microbiol*, 141(3-4): 393-394.
- Ranjbar Nedamani A. 2023. Numerical Calculation of the Lethality of Bacteria in Bottled Milk under Cold Plasma Treatment. *IFSTRJ*. 18 (6):153-165.
- Rezaei Mehr E, Sahabzadeh F, Siadati S.N and Alavi S.O. 2013. Use of atmospheric pressure cold plasma in *Escherichia coli* bactericidal from milk. 3rd National Food Science and Industry Conference, Qochan.
- Rico C.W, Kim G.R, Ahn J.J, Kim H.K, Furuta M, Kwon J.H. 2010. The comparative effect of steaming and irradiation on the physicochemical and microbiological properties of dried red pepper (*Capsicum annum* L.). *Food Chem*. 119(3):1012-1016.
- Rodríguez Ó, Gomes W.F, Rodrigues S, Fernandes F.A. 2017. Effect of indirect cold plasma treatment on cashew apple juice (*Anacardium occidentale* L.). *Lwt*. 84:457-463.
- Sanaee F. 2018. *Investigating the effect of cold plasma on reducing microbial load and physicochemical characteristics of turmeric*. Master's thesis, Faculty of Agriculture,

Department of Food Science and Industry,
Ferdowsi University of Mashhad.

Sanaee F, Mortazavi S.A, tabatabaei yazdi F,
Shahidi F. 2020. Effect of cold plasma
treatment on microbial load reduction and
physicochemical properties of turmeric.
FSCT. 17 (99): 153-161.

Sarangapani C, O'Toole G, Cullen P.J,
Bourke P. 2017. Atmospheric cold plasma
dissipation efficiency of agrochemicals on
blueberries. Innov Food Sci Emerg
Technol.44:235-241.

Shirani K, Shahidi, F, Mortazavi S.A. 2020.
Investigation of decontamination effect of
argon cold plasma on physicochemical and
sensory properties of almond slices. Int. J.
Food Microbiol. 335: 108892.

Thirumdas R. 2023. Partial hydrogenation of
oils using cold plasma technology and its
effect on lipid oxidation. Int. J. Food Sci.
Technol. 60(6): 1674-1680.

Thirumdas R, Trimukhe A, Deshmukh R.R,
Annapure U.S. 2017. Functional and
rheological properties of cold plasma treated
rice starch. Carbohydr. Polym.157:1723-
.1731.

Tompkins C, Perkins E.G.1999. The
evaluation of frying oils with the p-anisidine
value. JAOCS. 76(8):945-947.

Van Durme J, Vandamme J. 2016. Non-
thermal plasma as preparative technique to
evaluate olive oil adulteration. Food Chem.
208:185-191.

Yang Q.Q, Cheng L.Z, Zhang T, Yaron S,
Jiang H.X, Sui Z.Q, Corke H. 2020.
Phenolic profiles, antioxidant, and
antiproliferative activities of turmeric
(*Curcuma longa*). Ind Crops Prod.
152:112561.

Yannam S.K, Estifae P, Rogers S, Thagard
S.M. 2018. Application of high voltage
electrical discharge plasma for the
inactivation of *Escherichia coli*
ATCC700891 in tangerine juice. LWT. 90:
180-185.

Investigating the effect of atmospheric pressure cold plasma on oxidation indices and microbial quality of red pepper

The effect of cold plasma on the quality characteristics and microbial load of red pepper

Shahi Sh³. Goli M^{2*}. Khodabandeh Shahraki S¹

1. Master's degree student, Department of Food Science and Industry, Islamic Azad University Isfahan (Khorasgan), Isfahan, Iran
2. Department of Food Science and Technology, Laser and Biophotonics in Biotechnologies Research Center, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran
3. Department of Medical Engineering, Laser and Biophotonics in Biotechnologies Research Center, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

*Corresponding author: mgolifood@yahoo.com

Abstract

Spices are popular worldwide for increasing appetite and adding flavor and color to food, but they also carry a high microbial load. Cold plasma is a non-thermal technology and a suitable alternative to the conventional thermal methods used in the food industry, which, with its antimicrobial properties, increases the shelf life of food without negatively affecting its quality. The purpose of this research was to investigate some qualitative and microbial properties of red pepper by a cold plasma method. The results showed that the plasma voltage had a greater effect on improving and maintaining the total phenolic content of red pepper than the duration of irradiation, so the use of cold plasma treatment with medium voltage (16.66 kV) increased the total phenolic content of red pepper compared to the voltages lower and higher were superior. The acid value, peroxide value, thiobarbituric acid, and anisidine index of the treatments were significantly higher than the control sample ($p < 0.05$), and the control sample had the lowest oxidation indices. The total count of microorganisms, *Staphylococcus aureus*, and *E. coli* in the treated samples was significantly less than the control sample ($p < 0.05$). According to the obtained results, the cold plasma method is suggested for food processing because it can maintain the quality of food at an acceptable level.

Keywords: Atmospheric Pressure Cold Plasma, Peroxide Value, Red Pepper, Total Phenol, Microbial Quality

Contents

Application of ERIC-PCR method for genetic classification of campylobacter strains isolated from raw milk

GholamReza Banisharif, Mohammad Hosein Marhamatizadeh*, Hassan Momtaz

Determining antibiotic resistance pattern in *Enterobacter cloacae* strains isolated from chicken and sheep meat in Shahrekord city

Elaha Barzam Dehkordi, Elaha Tajbakhsh*, Hassan Mumtaz

Investigating the antimicrobial effects of lemongrass and lavender extract and essential oil on some food bacteria

Mehrdad Ataei Kachoei, Elham Fakhri*, Fatemeh Khodaverdipour

Investigating the effect of atmospheric pressure cold plasma on oxidation indices and microbial quality of red pepper

Samane Khodabande Shahraki, Mohammad Goli*, Sharifa Shahi

میکروبی شناسی مواد غذایی



INDEX  COPERNICUS
INTERNATIONAL

ICV score: 5.21