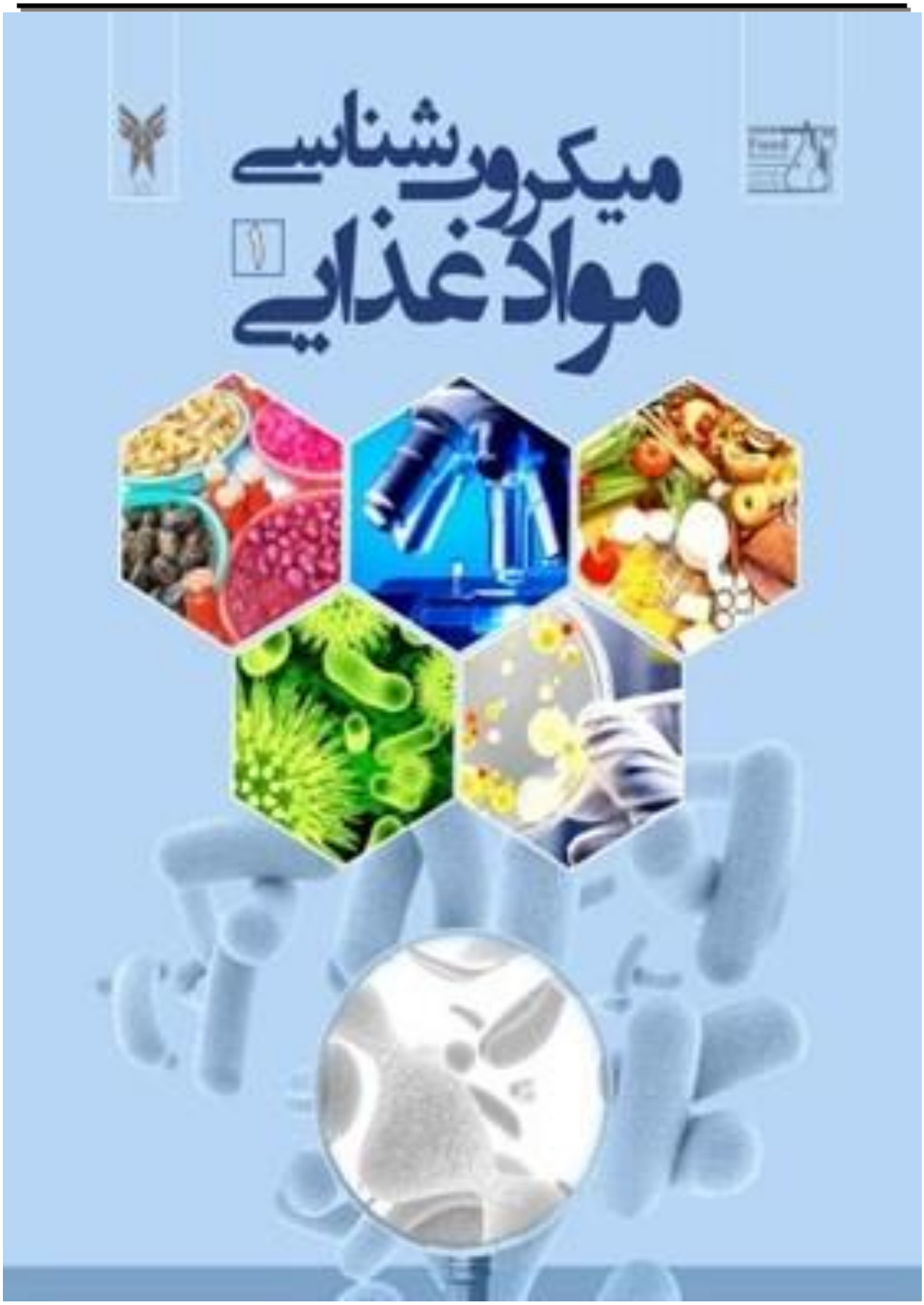

میکروب شناسی
مواد غذایی

فهرست

ارتباط بین استفاده از تکنیک های یادگیری با انگیزه ی فراگیری و تفکر انتقادی در بین فراگیران زبان انگلیسی در رشته کارشناسی ارشد بهداشت و تکنولوژی مواد غذایی
فریبا رحیمی اصفهانی.....۳

به کارگیری سه روش ERIC-PCR, RAPD-PCR, Rep-PCR در دسته بندی ژنتیکی ایزوله‌های *کمپیلوباکتر ژژونی وکمپیلوباکترکولی* جدا شده از گوشت خام مرغ
مریم هادیان، حسن ممتاز، امیر شاکریان.....۳۱

افزایش ماندگاری فیله ماهی سفید دریای خزر با استفاده از فیلم نانوکامپوزیت حاوی نانوذرات اکسیدروی سنتز شده به روش سبز با استفاده از عصاره کلاهک بادمجان
مهسا صالحی ، امیر شاکریان ، زهره مشاک ، ابراهیم رحیمی.....۴۲

بررسی مقاومت ژن‌های انتروتوکسیژنیک جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی-سیلین در مواد غذایی عرضه‌شده در شهرستان قم
سید عرفان حسینی‌نسب، نجمه واحد دهکردی.....۶۲

ارتباط بین استفاده از تکنیک های یادگیری با انگیزه ی فراگیری و تفکر انتقادی در بین فراگیران زبان انگلیسی در رشته کارشناسی ارشد بهداشت و تکنولوژی مواد غذایی

فریبا رحیمی اصفهانی*

[۳]گروه زبان انگلیسی، دانشکده علوم انسانی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

* نویسنده مسئول: e-mail: rahimi_fariba@yahoo.com

چکیده

این تحقیق با هدف کشف نوع تکنیکهای یادگیری زبان آموزی مورد استفاده دانشجویان ایرانی در رشته بهداشت و تکنولوژی مواد غذایی و همچنین یافتن رابطه بین استفاده از تکنیکهای یادگیری زبان با تفکر انتقادی و سطح انگیزش این زبان آموزان انجام شد. بدین منظور ۶۰ شرکت کننده به صورت تصادفی از بین دانشجویان کارشناسی در رشته بهداشت وتکنولوژی مواد غذایی انتخاب شدند. دانشجویان نامبرده که در دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد در حال تحصیل بودند از نظر تسلط بر زبان انگلیسی از طریق آزمون تعیین سطح سریع آکسفورد (OQPT) همگن شدند. سپس، یک فهرست ۵۰ موردی استراتژی یادگیری زبان برای شرکت‌کنندگان اجرا شد تا انواع تکنیکهای یادگیری مورد استفاده توسط آنها در طول دوره زبان آموزی خود را کشف کنند. سپس توانایی تفکر انتقادی و انگیزه شرکت کنندگان از طریق پرسشنامه های مربوطه تعیین شد. نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که اکثر این دانشجویان استفاده از تکنیکهای شناختی را ترجیح می‌دهند. همچنین، نتایج به رابطه معنادار بین استفاده از تکنیکهای یادگیری زبان و پتانسیل تفکر انتقادی این دانشجویان و عدم وجود رابطه معنا داربین استفاده از تکنیکهای یادگیری زبان و انگیزه دانشجویان نامبرده اشاره کرد. نتایج همچنین کاربرد این یافته ها را برای دوره های فراگیری زبان برای اهداف ویژه (ESP) را ارائه می دهد.

کلمات کلیدی: دوره ESP، تکنیکهای یادگیری زبان، تفکر انتقادی ، انگیزه

۱. مقدمه

بر اساس ایده های جدید ارائه شده توسط محققان زبان آموزان موفق کسانی هستند که می توانند کنترل عمیق تری بر یادگیری خود داشته باشند و برای تجزیه و تحلیل اطلاعات کمتر به دیگران وابسته هستند. بنابراین، می توان چنین استنباط کرد که این زبان آموزان مسئولیت یادگیری خود را بر عهده می گیرند و از تکنیکهای یادگیری برای برطرف کردن نیازهای یادگیری خود به درستی استفاده می کنند. در واقع، دانش آموزان با استفاده از تکنیکهای یادگیری میتوانند تواناییهای خود را عملی کنند. شوند که دانش آموز باید برای بنابراین، آنها باید با استراتژی ها یادگیری آشنا باشند تا بتوانند انتقادی فکر کنند و مستقل عمل کنند. استفاده از این استراتژی ها به زبان آموزان کمک می کند تا هوشیارتر و خودمختارتر شوند .Peculea و Bocos (۲۰۱۵). تفکر انتقادی یا توانایی درگیر کردن قوای شناختی در حل موقعیت‌های یادگیری پیچیده، می‌تواند به عنوان یکی از عناصر اساسی فرآیند یادگیری در نظر گرفته شود .(Schön, 1991). تفکر انتقادی توانایی تفکر واضح و منطقی و درک ارتباط بین ایده ها است که از زمان فیلسوفان اولیه ی یونان مثل افلاطون و سقراط تا عصر مدرن وجود داشته و دارد.این مهارت فواید و کاربردهای بسیاری مثل بحث و تفکر برای حل مشکلات و توانایی تشخیص اخبار جعلی دارد.

انگیزه عامل دیگری است که در فرآیند یادگیری زبان بسیار مهم است. تعاریف متعددی برای انگیزه ارائه شده است. طبق نظر کروکس و اشمیت (۱۹۹۱)، انگیزه جهت گیری یادگیرندگان به منظور یادگیری زبان دوم است. بنابراین، انگیزه عامل مهمی است که بر یادگیری زبان تأثیر می گذارد. به گفته صادقی (۱۳۹۲)، «بدیهی است دانش آموزانی که انگیزه موفقیت ندارند، سخت کار نخواهند کرد. در واقع انگیزه مستقیماً بر پیشرفت تحصیلی تأثیر می گذارد» (ص ۲۰۷).

اصطلاح ESP (انگلیسی با اهداف ویژه) ابتدا توسط Mackay و Mountford (۱۹۷۸) به عنوان زبان انگلیسی برای اهداف ویژه تعریف شد. هدفی که به آن اشاره کردند نیازهای مختلف زبان آموزان در مواجهه با زبان انگلیسی برای مقاصد شغلی، علمی و دانشگاهی بود. استریونز (۱۹۸۸) ESP را شامل ویژگی هایی می دانست که مطلق و متغیر هستند. این دوره ها به طور هدفمند برای رفع نیازهای دانش آموزان در فرآیند شغلی، فرآیند آموزشی و فعالیت های مختلف ایجاد می آموزش شوند.

زبان آموزان موفق، افرادی با انگیزه و متفکر هستند که انتقادی و تحلیلی فکر می کنند. متفکران انتقادی به خوبی آگاه هستند و آماده تمرکز بر امکانات استفاده از تفکر انتقادی هستند. آنها به توانایی های خود در استدلال مطمئن هستند و در نهایت نسبت به دیدگاه های مختلف جهان ذهنی باز دارند. این ویژگی ها با ویژگی های زبان آموزان موفقی که از تکنیکهای یادگیری زبان به درستی استفاده می کنند، سازگار است. بررسی مطالعات قبلی به وضوح نشان می دهد که تاکنون تحقیقات کمی در مورد رابطه بین استفاده از تکنیکهای یادگیری زبان و متغیرهای یادگیری انگیزه و تفکر انتقادی به ویژه در کلاس های ESP در ایران انجام شده است. بنابراین، اجرای یک پروژه تحقیقاتی که دامنه استفاده استراتژیک و رابطه بین متغیرهای مهم یادگیری مانند تفکرانتقادی و انگیزه ی فراگیران زبان انگلیسی را بررسی می کند، ایده خوبی است

۲. سوالات و فرضیه های تحقیق

این پژوهش سعی بر یافتن پاسخ های مناسبی برای سؤالات تحقیق زیر دارد:

RQ1. راهبردهای یادگیری زبان توسط دانش آموزان ESP ایرانی چیست؟

RQ2. آیا بین استفاده از راهبردهای یادگیری زبان و پتانسیل تفکر انتقادی دانشجویان ایرانی ESP رابطه معناداری وجود دارد؟

RQ3. آیا بین استفاده از راهبردهای یادگیری زبان و میزان انگیزه دانشجویان ایرانی ESP رابطه معناداری وجود دارد؟

بر اساس سؤالات پژوهشی که در بالا بیان شد، فرضیه های تحقیق زیر تدوین شد:

Ho1. بین استفاده از راهبردهای یادگیری زبان و پتانسیل تفکر بازتابی دانشجویان ایرانی ESP رابطه معناداری وجود ندارد.

Ho2. بین استفاده از راهبردهای یادگیری زبان و سطح انگیزش دانشجویان ایرانی ESP رابطه معناداری وجود ندارد.

۳. مروری بر ادبیات تحقیق

تکنیکهای های یادگیری زبان (LLS) به عنوان روش ها یا تکنیک هایی تعریف می شود که زبان آموزان برای بهبود یادگیری خود استفاده می کنند. هنگامی که زبان آموزان با یادگیری زبان دوم یا خارجی مواجه می شوند، از راه های خاصی برای کمک به درک، حفظ و تولید زبان بهتر و آسان تر استفاده می کنند. (اومالی و همکاران، ۱۹۹۰؛ آکسفورد، ۱۹۹۰).

برخی از محققان تصور می کنند که استراتژی های یادگیری لزوما آگاهانه نیستند. به عنوان مثال، در مطالعه کوهونن و بدلی (۱۹۹۲)، او بیان کرد که پس از اینکه یادگیرندگان به اجرای تکنیکهای های یادگیری عادت کنند، این تکنیکها خودکار و بدون تلاش آگاهانه خواهند شد. بنابراین، زبان آموزان بویژه مبتدیان قبل از اینکه

بتوانند تکنیکها را به طور خودکار تولید و به کار گیرند، باید آگاهی خود از این استراتژی ها را بالا ببرند.

زبان آموزانی که انگلیسی را برای اهداف ویزه یاد میگیرند باید در مورد استراتژی های یادگیری زبان مورد استفاده توسط معلمان خود آموزش بینند و در عین حال فرصت هایی برای تمرین صحیح آنها در دوره یادگیری زبان به طور منظم به آنها داده شود. فرآیند یادگیری یک زبان خارجی باید به عنوان یک شایستگی کلیدی در نظر گرفته شود که به زبان آموزانی که انگلیسی را برای اهداف ویزه یاد میگیرند ارائه می شود زیرا "یادگیری زبان فقط یک موضوع دانش زبانی نیست" (Hutchinson & Waters, 1987, p. 129). معلمان زبان باید زبان آموزان را به شایستگی ها و استراتژی هایی مجهز کنند که آنها را قادر می سازد تا نیازهای زبان آموزان را برآورده کنند و به اهداف جامعه دست یابند. این بدان معناست که حتی آموزش عالی باید تمام تلاش خود را برای توسعه راهبردهای یادگیری زبان زبان آموزان به طور مناسب انجام دهد.

روترمن و ویلینگهام (۲۰۱۰، ص ۱۷) تفکر انتقادی و حل مسئله را به عنوان مهارت های قرن ۲۱ تعریف کردند و تأکید کردند که چنین مهارت هایی "مولفه های پیشرفت بشر در طول تاریخ" بوده اند. هر دو محقق این مفهوم را در آموزش تشخیص دادند و تأکید کردند که آموزش تفکر انتقادی و آموزش دانش به یک اندازه مهم هستند، زیرا هر دو مؤلفه با هم مرتبط هستند. در نتیجه، روترمن و ویلینگهام (۲۰۱۰) از سیاستگذاران آموزشی خواستند تا آموزش و ارزیابی تفکر انتقادی را برای اطمینان از دستیابی به مفهوم علیرغم چالش‌های احتمالی در نظر بگیرند.

انگیزه دومین تأثیر بر سبک های یادگیری است و بر حافظه و همچنین تکنیکهای یادگیری فراگیران تأثیر می گذارد. علاوه بر این، انگیزه به عنوان عاملی برای برنامه های استراتژیک عمل می کند (ماکارو، ۲۰۰۶). بر اساس دانش و تجربه فراشناختی، برنامه‌های استراتژیک برای پوشش طیف وسیع‌تری از اهداف نسبت به استراتژی‌هایی که چشم‌اندازی از رفتار شناختی آینده ارائه می‌دهند، استفاده می‌شوند (ماکارو، ۲۰۰۶). انگیزه پل های استراتژیک را با استراتژی های یادگیری و سبک های یادگیری پیوند می دهد. اهداف فراگیران تأثیر مهمی بر انگیزه ی آنها دارند. تلاش برای دستیابی به اهداف و همچنین دستاوردها یا شکست های گذشته، بر انگیزه ی یادگیری و انتخاب هایی که در یادگیری انجام می دهیم تأثیر می گذارد (ماکارو، ۲۰۰۶). انگیزه اولیه برای شروع یادگیری زبان دوم و بعداً نیروی محرکه برای حفظ فرآیند یادگیری طولانی و اغلب خسته کننده را فراهم می کند. در واقع، همه عوامل دیگر دخیل در یادگیری زبان دوم تا حدی انگیزه را پیش‌فرض می‌گیرند» (Dornyei, 2005, p. 65).

در ایران، مطالعات زیادی در مورد استفاده از تکنیکهای یادگیری زبان انگلیسی زبان آموزان ایرانی انجام شده است. به عنوان نمونه، نیکوپور و همکاران. (۲۰۱۱) تلاش کردند تا انواع تکنیکهای یادگیری زبان مورد استفاده ی زبان آموزان ایرانی زبان انگلیسی را پیدا کنند.. علاوه بر این، تکنیکهای یادگیری زبان ترجیحی توسط برونگراها/درونگراهای ایرانی، حسی/شهودی، تفکری/احساسی و قضاوتی/درکی زبان آموزان نیز در نظر گرفته شده است. نتایج مطالعه نشان داد که زبان آموزان دارای شخصیت برون گرا و درونگرا تفاوت معناداری در استفاده از تکنیکهای یادگیری زبان نشان ندادند. فراگیران حسی و شهودی تکنیکهای عاطفی را ترجیح دادند. همچنین یافته ها نشان داد که فراگیران تفکری و احساسی از حافظه و تکنیکهای اجتماعی استفاده می کردند. فراگیران درکی از دو دسته راهبرد شناختی و جبرانی استفاده می‌کردند، در حالی که فراگیران که دارای شخصیت قضاوتی بودندفقط از تکنیکهای جبرانی استفاده می‌کردند.

Alhaysony (۲۰۱۷) تکنیکهای یادگیری زبان (LLS) مورد استفاده توسط دانشجویان زبان انگلیسی عربستانی در دانشگاه الجوف را بررسی کرد. در مجموع ۱۳۴ دانش آموز (۶۶ مرد، ۶۸ زن) پرسشنامه ای را تکمیل کردند که از پرسشنامه استراتژی آکسفورد (۱۹۹۰) برای یادگیری زبان (SILL) اقتباس شده بود. هدف از این مطالعه درک بهتر

رابطه بین استفاده از تکنیکهای یادگیری زبان و جنسیت و مدت زمان مطالعه زبان انگلیسی بود. نتایج نشان داد که میانگین استفاده از استراتژی در محدوده کم تا متوسط قرار دارد. تکنیکهای شناختی، فراشناختی و جبرانی بیشترین استفاده را داشتند، در حالی که تکنیکهای حافظه و عاطفی کمترین استفاده را داشتند.

همچنین مطالعه جامع تری توسط چنگ و همکاران در سال(۲۰۱۸) انجام شد که روابط بین تکنیکهای یادگیری زبان، انگیزه، اضطراب و استقلال زبان آموز ان را بررسی کرد. نتایج حاصل از تحلیل همبستگی پیرسون نشان داد که از بین سه متغیر مورد بررسی، تکنیک و انگیزه یادگیری زبان با خودمختاری فراگیران به ترتیب رابطه مثبت و معنادار داشت، اما اضطراب با استقلال یادگیرنده همبستگی معنادار و منفی داشت. نتایج حاصل از تحلیل رگرسیون چندگانه نشان داد که تکنیک یادگیری به بهترین وجه می‌تواند واریانس استقلال یادگیرنده و به دنبال آن انگیزه و اضطراب را پیش‌بینی کند.

در مطالعه اخیر طاهری و همکاران. (۲۰۲۰) از یک طرح ترکیبی برای بررسی رابطه بین استفاده زبان آموزان زبان انگلیسی از تکنیک های یادگیری زبان و میزان دستیابی آنها به مهارت های زبان خارجی، یعنی نوشتن، خواندن، گوش دادن و صحبت کردن استفاده کرد. نتایج تحلیل کیفی داده‌های کمی را تأیید کرد و نشان داد که اکثریت قابل توجهی از زبان‌آموزان زبان انگلیسی استفاده از تکنیک‌های یادگیری زبان را مفید می‌دانند.

، گریفیث در پایان نامه خود رابطه استفاده از تکنیک‌های یادگیری زبان و مهارت زبان انگلیسی زبان آموزان را مورد بررسی قرار داد (گریفیث، ۲۰۰۳). تمام تحقیقات در یک مؤسسه زبان خصوصی در نیوزلند با تعداد دانش‌آموزان متنوع از ملیت‌های مختلف، از دانش‌آموزان دبیرستانی گرفته تا زبان‌آموزان در دهه ۵۰ سالگی و با سطوح مختلف مهارت زبان انجام شد. بنابراین استفاده از تکنیک‌های یادگیری زبان نه تنها در سطح کمی بلکه با توجه به کیفیت آنها نیز متفاوت است. تجزیه و تحلیل رگرسیون تک متغیره شامل ۱۵ تکنیک که با میزان بالا توسط زبان آموزان پیشرفته استفاده می شد، ۱۰٪ از واریانس مهارت را توضیح داد. علاوه بر این، آگاهی از تکنیک‌های یادگیری زبان برای یادگیرندگان موفق ضروری است. آن دسته از زبان آموزانی که توانستند تکنیک‌های کلیدی را برای بهبود و تقویت یادگیری زبان خود فهرست کنند، متعلق به گروه فراگیران موفقی بودند که نسبتاً سریع پیشرفت می کردند، در حالی که آنهایی که قادر به شناسایی تکنیک‌های کلیدی نبودند، این کار را نکردند.

در تحقیقی دیگر چاندران و هاشم (۲۰۲۲) سعی کردند مطالب بیشتری در مورد تکنیک‌های های یادگیری زبان (LLS) مورد استفاده دانشجویان یک دانشگاه خصوصی در سلانگور پیدا کنند.یافته ها نشان داد که تکنیک‌های فراشناختی و اجتماعی پر استفاده ترین تکنیک‌های یادگیری زبان هستند و اغلب توسط دانشجویان مقطع کارشناسی در هنگام یادگیری و مطالعه زبان انگلیسی مورد استفاده قرار می گیرند. نتایج همچنین نشان داد که تکنیک‌های حافظه و عاطفی کم استفاده ترین تکنیک‌ها هستند . بنابراین، تکنیک‌های استفاده شده توسط دانش آموزان بیشتر با سبک و روش یادگیری فراگیران مرتبط است.

تقریباً در تمام مطالعاتی که در بالا بررسی شد، این نکته تأکید شده است که زبان‌آموزان موفق متفکرانی هستند که انتقادی و تحلیلی فکر می‌کنند . آنها فرصت های استفاده از تفکر انتقادی را مشاهده می کنند و به توانایی های خود در استدلال اعتماد به نفس دارند و در نهایت نسبت به دیدگاه های متفاوت جهان ذهنی باز دارند. این ویژگی ها با ویژگی های زبان آموزان موفقی که از تکنیک‌های یادگیری زبان استفاده مناسبی می کنند، همخوانی دارد. آنچه در تحقیقات انجام شده قبلی کمتر شفاف است و این مقاله به آن توجه دارد، آموزش تکنیک‌های مهارت های زبان در کلاس های انگلیسی با اهداف ویژه است، به این معنی که معلمان ESP چندان نگران آموزش تکنیک‌های یادگیری در کلاس های خود نیستند. دانش زبان به صورت

غیر تعاملی از معلم به دانش آموزان منتقل می شود. در واقع هیچ تلاشی از جانب معلمان برای تشویق تفکر انتقادی یا ارتقای انگیزه دانش آموزان در دوره های یادگیری زبان انگلیسی با اهداف ویژه انجام نمی شود.

۴. روش تحقیق

۴. ۱. طرح مطالعه

این مطالعه از طراحی کمی برخوردار است زیرا متغیرها به صورت عینی و تحت شرایط کنترل شده اندازه گیری می شوند (آری و همکاران، ۲۰۱۰). روش تحقیق غیرآزمایشی و از نوع همبستگی است. این روش تحقیق با توجه به اینکه شرکت کنندگان بر اساس عملکردشان در آزمون همگنی استاندارد شده به صورت غیرتصادفی انتخاب شدند و هدف اصلی آن کشف رابطه بین متغیرها بود، استفاده شد. این روش تحقیق شامل مشاهده دو متغیر به منظور ایجاد رابطه آماری متناظر بین آنها می باشد. هدف پژوهش همبستگی شناسایی متغیرهایی است که به نوعی با هم ارتباط دارند تا جایی که تغییر در یکی باعث ایجاد تغییر در دیگری شود. این نوع پژوهش بر خلاف تحقیقات تجربی، توصیفی است که کاملاً بر روش شناسی و فرضیه علمی تکیه دارد.

۲،۴. شرکت کنندگان

شرکت کنندگان در این پژوهش ۶۰ نفر از دانشجویان کارشناسی در رشته بهداشت و تکنولوژی مواد غذایی در دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد بودند. آنها یک دوره دو واحدی یادگیری زبان انگلیسی با اهداف ویزه (ESP)داشتند که در آن باید مهارت خواندن کافی در درک متون تخصصی در زمینه در رشته بهداشت و تکنولوژی مواد غذایی را به دست آورند. به منظور حصول اطمینان از همگن بودن آنها از نظر تسلط به زبان انگلیسی، یک آزمون استاندارد شده همگنی، آزمون تعیین سطح سریع آکسفورد، اجرا شد و افرادی که نمرات آنها بین ۱+ و ۱- انحراف معیار از میانگین قرار داشت، انتخاب شدند.

۳،۴ ابزار

در پژوهش حاضر از ابزارهای زیر استفاده شد:

۱،۳،۴ آزمون تعیین سطح سریع آکسفورد (OQPT)

برای انتخاب شرکت کنندگان همگن برای مطالعه، OQPT برای دانشجویان رشته بهداشت و تکنولوژی مواد غذایی که در کلاس های فراگیری زبان انگلیسی با اهداف ویزه دانشگاه ثبت نام کرده بودند، اجرا شد. این یک آزمون معتبر و پایا است که در ابتدای مطالعه به عنوان یک آزمون مهارت عمومی مورد استفاده قرار گرفت. این آزمون به دو بخش تقسیم می‌شود: بخش اول شامل ۴۰ سوال و بخش دوم شامل ۲۰ مورد است. همه تستها در قالب سوالات چند گزینه ای بودند.

۲،۳،۴ فهرست استراتژی برای یادگیری زبان (SILL)

دومین ابزار مورد استفاده در این مطالعه، پرسشنامه استراتژی ۵۰ موردی برای یادگیری زبان (SILL) (نسخه ۷، نسخه دانشجویی ESL/EFL) بود که توسط آکسفورد (۱۹۹۰) ابداع شد. به گفته رحیمی و همکاران. (۲۰۲۱)، در مقایسه با پرسشنامه های دیگر از همین نوع (بیالیستوک، ۱۹۸۱؛ اومالی و همکاران، ۱۹۸۷)، این فهرست در حداقل ۴۰ تا ۵۰ مطالعه عمده، از جمله تعداد زیادی پایان نامه، که در مورد ۱۰۰۰۰ موضوع آکسفورد و بری استاک (۱۹۹۵) اظهار کرده اند که این فهرست به طور گسترده برای شاخص های پایایی و اعتبار بررسی شده است و به روش های متعدد اعتبار سنجی شده است.

در پژوهش حاضر از ترجمه فارسی این پرسشنامه استفاده شده است. ترجمه فارسی پرسشنامه توسط دهقان (۱۳۸۱) تهیه و اعتبار سنجی شده است. این موجودی شامل شش دسته اصلی است که هر کدام شامل تعدادی سوال است. دسته بندی ها عبارتند از: ۱) حافظه (نه مورد: ۱-۹)، ۲) شناختی (۱۴ مورد: ۱۰-۲۳)، ۳) جبرانی (شش ماده: ۲۴-۲۹)، ۴) فراشناختی (نه مورد: ۳۰-۳۸) ۵) عاطفی (شش ماده: ۳۹-۴۴)، و ۶) اجتماعی (شش ماده: ۴۵-۵۰). . عملکرد دانش‌آموزان در پرسشنامه‌ها برای الگوی استفاده از

تکنیکهای یادگیری زبان در این گروه از دانشجویان زبان انگلیسی با اهداف ویزه کدگذاری و و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

۳،۳،۴. پرسشنامه تفکر انتقادی (RTQ)

در این مطالعه ازنسخه فارسی RTQ ساخته و تایید شده توسط Kember و همکاران. (۲۰۰۰) استفاده شد. این شامل ۱۶ مورد است که چهار نوع تفکر انتقادی را اندازه گیری می کند: درکی (UND)، تفکری (REF). تفکر انتقادی (CREF) و عمل عادتی (HA). این پرسشنامه توسط غنی زاده و جاهدی زاده (۱۳۹۶) به فارسی ترجمه شده است.

۴،۴،۴.پرسشنامه انگیزه یادگیری زبان خارجی (FLLMQ)

پرسشنامه انگیزه یادگیری زبان خارجی (FLLMQ) که توسط Gonzales (۲۰۰۶) طراحی شد از ۵۰ مورد تشکیل شده است. فاکتورهای تشکیل دهنده ی این پرسشنامه عبارتند از : فاکتور ۱ (میل به ارتقای شغلی و اقتصادی / نیاز شغلی-اقتصادی)، فاکتور ۲ (میل برای تبدیل شدن به یک شهروند جهانی/نیاز به درک فرهنگی)، فاکتور ۳ (میل به برقراری ارتباط و وابستگی با خارجی ها/نیاز ارتباطی-وابستگی) ، فاکتور ۴ (میل به خود ارضایی در یادگیری/نیاز به رضایت از خود)، فاکتور ۵ (خودکارآمدی) و عامل ۶ (میل به ادغام با فرهنگ های دیگر/نیاز به ادغام فرهنگی). قابلیت اعتماد کل پرسشنامه α = ۰/۹۸۲ و دامنه ضریب آلفای فاکتور ها از α = ۰/۴۵۱ تا ۰/۷۱۴ بود.

۵،۴. روش های جمع آوری داده ها

برای یافتن پاسخ مناسب به سوالات پیشنهادی تحقیق، مراحل زیر انجام شد:

در ابتدای مطالعه، یک آزمون تعیین سطح سریع آکسفورد (OQPT) برای ۶۰ نفر از دانشجویان کارشناسی رشته بهداشت و تکنولوژی مواد غذایی که در حال فراگیری زبان انگلیسی در دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد بودند، اجرا شد تا از همگن بودن سطح زبان آنها اطمینان حاصل شود. سپس برای پاسخ به سوال اول تحقیق، فهرست ۵۰ موردی استراتژی برای یادگیری زبان در اختیار شرکت‌کنندگان قرار گرفت تا انواع استراتژی‌های یادگیری مورد استفاده در این دوره از فراگیری زبان انگلیسی با اهداف ویزه (ESP)را کشف کنند.

مرحله بعدی تعیین توانایی تفکر انتقادی از طریق پرسشنامه مربوطه بود. پرسش‌های مطرح شده مهارت‌های تفکر انتقادی شرکت‌کنندگان را مورد آزمون قرار دادند. چنین مهارت هایی برای مشخص کردن اینکه آیا پاسخ دهندگان توانایی ارزیابی موثر اطلاعات و تصمیم گیری هوشمندانه را دارند یا خیر، ارزیابی شدند. هنگام پاسخ دادن به سؤالات، شرکت کنندگان باید پاسخ هایی ارائه می کردند که نشان دهنده ذهن نوآور و متفکر آنها باشد. مرحله نهایی تعیین میزان انگیزه شرکت کنندگان بود. بنابراین، مقیاس های مربوطه مشخص شده در بالا اجرا شد. پس از جمع آوری داده های مورد نیاز، فرآیند تحلیل داده ها آغاز شد.

۴،۲. نتایج تحقیق

RQ1. تکنیکهای یادگیری زبان توسط فراگیران ایرانی زبان انگلیسی با اهداف ویزه(ESP)چیست؟

جدول ۱ پاسخ ۱۵ دانش آموز ESP به استراتژی های یادگیری زبان را نشان می دهد.

آنها از تکنیکهای فراشناختی، جبرانی، اجتماعی، حافظه، شناختی و عاطفی استفاده کردند. میانگین پرکاربردترین راهبرد شناختی ۱/۶۶ و میانگین کم استفاده ترین راهبرد فراشناختی ۱/۲۶ است.

جدول ۱

Frequency of Language learning strategies used by ESP students during the in-depth interview

	N	Min	Max	M	S. D
Cognitive	15	1.00	2.00	1.66	.48
Memory	15	1.00	2.00	1.60	.50
Social	15	1.00	2.00	1.53	.51
Affective	15	1.00	2.00	1.46	.51
compensation	15	1.00	2.00	1.33	.48
metacognitive	15	1.00	2.00	1.26	.45
Valid N (listwise)	15				

در میان پر استفاده ترین تکنیکها در میان دانشجویان ESP در این مطالعه، «از کلمات جدید انگلیسی در جمله استفاده می‌کنم تا بتوانم آنها را به خاطر بسپارم»، تکنیک حافظه است، و «به یاد می‌آورم که کلمات انگلیسی جدید را به صورت فیزیکی اجرا می‌کنم» کمترین ارجحیت را دارد. تکنیک حافظه در بین دانشجویان ESP برای استراتژی شناختی، "من سعی می کنم مانند انگلیسی زبانان مادری راه بروم، پر کاربردترین بود"و «من خلاصه ای از اطلاعاتی را که می شنوم یا می خوانم به زبان انگلیسی تهیه می کنم» کمترین استفاده را داشت.

RQ2. آیا بین استفاده از تکنیکهای یادگیری زبان و پتانسیل تفکر انتقادی دانشجویان ایرانی ESP رابطه معناداری وجود دارد؟

جدول ۲ در زیر نتایج تجزیه و تحلیل آماری داده ها را برای چند خطی بودن بین متغیرها نشان می دهد: نتایج جدول ۱۰ فرضیه چند خطی بودن را نشان می دهد. با این کار، فرض می‌شود که همه استراتژی‌ها با تفکر انتقادی همبستگی دارند (به ترتیب ۰/۱۶، ۰/۰۵، ۰/۰۱، ۰/۱۵، ۰/۰۰۸-، ۰/۰۹-).

جدول ۲

Multi-collinearity Between the Variables

		R. thinking	memory	cognitive	compensation	metacognitive	affective	social
Pearson Correlation	R. thinking	1.00	-.16	.05	.01	.15	-.008	.09
	Memory	-.16	1.00	.02	.27	-.22	-.33	.15
	Cognitive	.05	.02	1.00	.12	.10	.03	.06
	compensation	.01	.27	.12	1.00	-.11	-.22	.07
	metacognitive	.15	-.22	.10	-.11	1.00	.18	.08
	Affective	-.00	-.33	.03	-.22	.18	1.00	.16
	social	.09	.15	.06	.07	.08	.16	1.00
Sig. (1-tailed)	R. thinking	.	.05	.30	.45	.05	.46	.17
	memory	.05	.	.42	.00	.01	.00	.06
	cognitive	.30	.42	.	.10	.15	.38	.26
	compensation	.45	.003	.10	.	.12	.01	.23
	metacognitive	.05	.01	.15	.12	.	.03	.20
	affective	.46	.00	.38	.01	.03	.	.05
	social	.17	.06	.26	.23	.20	.05	.
N	R. thinking	100	100	100	100	100	100	100
	memory	100	100	100	100	100	100	100
	cognitive	100	100	100	100	100	100	100
	compensation	100	100	100	100	100	100	100
	metacognitive	100	100	100	100	100	100	100
	affective	100	100	100	100	100	100	100
	social	100	100	100	100	100	100	100

۳RQ. آیا بین استفاده ازکتنیکهای یادگیری زبان و میزان انگیزه دانشجویان ایرانی ESPرابطه معناداری وجود دارد؟

جدول ۳ فرض چند خطی را بررسی می کند. نتایج این جدول نشان می دهد که همه استراتژی ها به ترتیب با انگیزه ۰,۱۴، -.۰۵، -.۰۱، -.۰۱، ۰,۰۰، -.۰۲۹ همبستگی دارند. با این حال، با بررسی همبستگی بین هر یک از متغیرهای مستقل، مشخص می شود که همبستگی چندان بالایی بین متغیرهای مستقل و انگیزه ی یادگیری زبان وجود ندارد

جدول ۳

Multi-collinearity Between the Variables

		Motivation	memory	cognitive	compensation	metacognitive	affective	social
Pearson Correlation	motivation	1.00	.14	-.05	-.01	-.10	.00	-.029
	memory	.14	1.00	.02	.27	-.22	-.33	.15
	cognitive	-.053	.02	1.00	.12	.10	.03	.06
	Compensation	-.016	.27	.12	1.00	-.11	-.22	.07
	Metacognitive	-.101	-.22	.10	-.11	1.00	.18	.08
	affective	.002	-.33	.03	-.22	.18	1.00	.16
	social	-.029	.15	.06	.07	.08	.16	1.00
Sig. (1-tailed)	motivation	.	.07	.30	.43	.15	.49	.38
	memory	.07	.	.42	.003	.01	.00	.06
	cognitive	.30	.42	.	.10	.15	.38	.26
	compensation	.43	.00	.10	.	.12	.014	.23
	Metacognitive	.15	.012	.15	.12	.	.034	.20
	affective	.49	.00	.38	.01	.03	.	.05
	social	.38	.06	.26	.23	.20	.05	.
N	motivation	100	100	100	100	100	100	100
	memory	100	100	100	100	100	100	100
	cognitive	100	100	100	100	100	100	100

compensation	100	100	100	100	100	100	100
Metacognitive	100	100	100	100	100	100	100
affective	100	100	100	100	100	100	100
social	100	100	100	100	100	100	100

۵. بحث

۱،۵. بحث و بررسی سوال اول تحقیق

همانطور که تجزیه و تحلیل آماری نتایج نشان داد، اکثر دانشجویان ESP استفاده از تکنیک شناختی را ترجیح دادند، در حالی که علاقه زیادی به استفاده از تکنیک فراشناختی نشان ندادند. دلیل این موضوع این است که تکنیکهای شناختی فراگیران را قادر به درک یا شناخت فرآیندهای ذهنی زبان میسازد. به عنوان مثال، زبان آموز در حین خواندن کتاب های درسی، از هردو تکنیک سریع خواندن و دقیق خواندن استفاده می کند تا ایده اصلی را به سرعت دریافت کند. به گفته روبین (۱۹۸۱)، آنها به طور مستقیم بر یادگیری زبان (تکنیکهای مستقیم) تأثیر می گذارند. فراگیران به عنوان افرادی مستقل و دارای ذهنی فعال تلقی می شوند (چاموت و اومالی، ۱۹۹۴) که در یک فرآیند پویا و با استفاده از تکنیکهای موثر، اطلاعات را انتخاب، سازماندهی، حفظ و استفاده می کنند (O'malley et al., 1990).

تکنیکهای شناختی، جبرانی و حافظه، تکنیکهای مستقیم را تشکیل می دهند در حالی که تکنیکهای فراشناختی، اجتماعی و عاطفی استراتژیهای غیر مستقیم را پوشش می دهند (آکسفورد، ۱۹۹۰). تکنیکهای شناختی اساساً آن دسته از فرآیندهای ذهنی هستند که به ما کمک می کنند زبان را یاد بگیریم، به خاطر بسپاریم و در نهایت بازیابی کنیم. آنها شامل پردازش اطلاعات دریافتی، دستکاری و/یا تبدیل ورودی (زبان) برای تقویت یادگیری و توانمندسازی فراگیران برای بازیابی اطلاعات هستند (O'malley و همکاران، ۱۹۹۰؛ آکسفورد، ۱۹۹۰؛ A. Wenden & Rubin، ۱۹۸۷). بر اساس توصیف تکنیکهای شناختی، کاملاً واضح است که چرا دانشجویان ESP چنین تکنیکهای را ترجیح می دهند. این تکنیکها به دانشجویان ESP کمک می کنند تا متون تخصصی خود را بهتر درک و تفسیر کنند. این فرآیندهای فردی هستند که تکنیکهای شناختی را تشکیل می دهند و بدون آنها یادگیری و فعال کردن دانش قبلی غیرممکن است (کوهن، ۲۰۱۱).

تحقیقات قبلی انجام شده در زمینه شناسایی تکنیکهای یادگیری منجر به نتایج متفاوتی شده است که برخی از آنها در یک راستا و برخی دیگر در تضاد بایافته های این مطالعه هستند.دلیل تضاد در این واقعیت نهفته است که شرکت کنندگان تحقیق کنونی دانشجویان ESP با سطح پایینی از مهارت زبان بودند، نه زبان آموزان EFL/ESL که علایق اصلی آنها یادگیری زبان است. به عنوان مثال، در مطالعه ای توسط گرین و آکسفورد (۱۹۹۵) زبان آموزان مسلط تر بر زبان انگلیسی استفاده بیشتری از تگنیکهای شناختی، جبرانی، فراشناختی و اجتماعی را گزارش کردند (گرین و آکسفورد، ۱۹۹۵). در مطالعه‌ای که توسط Alhaysony (۲۰۱۷) انجام شد، استراتژی‌های شناختی، فراشناختی و جبرانی بیشترین استفاده را داشتند، در حالی که استراتژی‌های حافظه و عاطفی کمترین استفاده را گزارش کردند.

۲،۵. بحث و بررسی سوال سوم پژوهشی

برای مشخص کردن رابطه بین استفاده ازتکنیکهای یادگیری زبان و پتانسیل تفکر انتقادی دانشجویان ایرانی ESP، از تحلیل رگرسیون استفاده شد. نتایج حاکی از

وجود رابطه معنادار بود و بنابراین فرضیه مربوطه رد شد. Shukla و Dungsungnoen (۲۰۱۶) معتقد بودند که تفکر تفکر انتقادی شامل انعطاف پذیری شناختی (تفکر در مورد چیزی به روش های مختلف)، حافظه فعال (در نظر گرفتن اطلاعات و معمولاً دستکاری آن به نوعی) و کنترل بازدارنده (سرکوب عمدی فرآیند توجه برای یافتن پاسخ). این مهارت ها نه تنها به فراگیران اجازه می دهد تا به طور موثرتری یاد بگیرند، بلکه به آنها کمک می کند تا دانش قبلی را به موقعیت های واقعی در زندگی روزمره خود منتقل کنند. مهارت های تفکر برای تجزیه و تحلیل موقعیت ها یا مشکلات، پیش بینی ها، شناسایی الگوها و نمایش نتیجه گیری ضروری است. در طول فرآیند آموزش و یادگیری، تسهیل تفکر انتقادی فراگیران به آنها کمک می کند تا از فرآیندهای تفکر خود آگاه تر شوند. اگرچه خودآگاهی مستلزم مهارت‌های تفکر فراشناختی و تأملی است، اما فراگیران را در توسعه سایر مهارت‌های فکری تشویق می‌کند و این امکان را برای آنها فراهم می‌کند تا دانش علمی را که قبلاً به دست آورده‌اند منتقل کنند و آن را در موقعیت‌های جدید به کار ببرند (Shiner & DeYoung، ۲۰۱۳).

ESP یکی از دوره های اجباری است که برای تمامی دانشجویان دانشگاه های ایران ارائه می شود. دانش زبانی معمولاً توسط معلمان به فراگیران منتقل می شود و کلاس عمدتاً معلم محور است. به نظر می‌رسد که دانش‌آموزان با استفاده صحیح از تکنیکهای یادگیری زبان آشنا نیستند و در اغلب موارد فاقد پتانسیل تفکر انتقادی هستند. آموزش تفکر تأملی یک هدف مهم آموزش مدرن است، زیرا دانش آموزان را با شایستگی لازم برای استدلال در مورد امور اجتماعی در دنیایی که به سرعت در حال تغییر است مجهز می کند. برای توسعه چنین شایستگی، دانش‌آموزان باید فراتر از جذب دانش کتاب درسی بروند و یاد بگیرند که مهارت‌های مربوط به قضاوت اطلاعات، ارزیابی شواهد جایگزین، و استدلال با دلایل محکم را ایجاد کنند.

تحقیقات قبلی انجام شده در مورد رابطه بین تفکر انتقادی و تکنیکهای یادگیری زبان زیاد نیستند با این حال، مطالعات کمی تا کنون انجام شده است. در مطالعه ای که توسط نیکو پور و همکاران انجام شد (۲۰۱۱) رابطه بین RT و استفاده از LLS توسط زبان آموزان ایرانی مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌های آن‌ها ارتباط معناداری بین برخی از LLS مستقیم و غیرمستقیم، مانند شناختی، فراشناختی و اجتماعی، با تفکر انتقادی را نشان می‌دهد، در حالی که هیچ رابطه‌ای بین CT و حافظه، جبران و راهبردهای عاطفی کشف نشد. در مطالعه دیگری توسط Ku و همکارانش. (۲۰۰۹) با هدف بررسی نقش تکنیکهای فراشناختی در تفکر انتقادی انجام شد. بر اساس یافته‌ها، افرادی که دارای توانایی تفکر انتقادی بالایی هستند در فعالیت‌های فراشناختی فعال‌تر هستند.

۳,۵. بحث و بررسی سوال چهارم پژوهشی

برای پاسخ به این سوال پژوهشی که با هدف کشف رابطه بین استفاده از تکنیکهای یادگیری زبان و سطح انگیزش دانشجویان ایرانی ESP انجام شد، از تحلیل رگرسیون مجدد استفاده شد و نتایج مشابهی به دست آمد که به عدم وجود رابطه معنادار بین دو متغیر مورد بررسی اشاره کرد. بنابراین، فرضیه چهارم نیز رد شد. انگیزه ی یادگیری عامل مهمی است که بر سبک های یادگیری ، حافظه و همچنین استراتژی های یادگیرنده تأثیر می گذارد. علاوه بر این، انگیزه به عنوان نماینده ای برای برنامه های استراتژیک عمل می کند (ماکارو، ۲۰۰۶).

انگیزه نقش یک دروازه بان را دارد که بدون آن تکنیکهای یادگیری زبان نمی توانند مفید واقع شوند. "نه تنها انگیزه بالا منجر به استفاده قابل توجه از استراتژی های یادگیری زبان می شود ...، بلکه استفاده از استراتژی بالا احتمالا منجر به انگیزه بالا نیز می شود!" (Oxford & Nyikos, 1989, p. 295). با این حال، تکنیکهای یادگیری زبان ممکن است به نوبه خود برای حفظ یا افزایش انگیزه نیز استفاده شود (کوهن و هنری، ۲۰۱۹، ص ۱۷۲). سطوح بالاتر انگیزه برای یادگیری یک زبان باعث فرکانس های

بالاتر در استفاده از تکنیکهای یادگیری زبان می شود (آکسفورد و نییکوس، ۱۹۸۹؛ وارتون، ۲۰۰۰).

اخیراً موروياما و پکرون (۲۰۱۲) سهم مهمی در زمینه تکنیکهای یادگیری زبان داشته اند که انگیزه و استراتژی های شناختی را در استفاده از ریاضیات ۳۵۳۰ دانش آموز باواریایی در یک دوره شش ساله بررسی کردند. آنها پیشنهاد کردند که "استفاده موثر از یادگیری عمیق استراتژی‌ها ممکن است بعداً در حرفه تحصیلی دانش‌آموزان رخ دهند» (موروياما و پکرون، ۲۰۱۲، ص ۱۲).

در زمینه خارجی، مطالعه جامع تری توسط چنگ و همکاران انجام شد. (۲۰۱۸)، که روابط بین استراتژی یادگیری زبان، انگیزه، اضطراب و استقلال زبان آموزان را بررسی کرد. نتایج حاصل از تحلیل همبستگی پیرسون نشان داد که از بین سه متغیر مورد بررسی، تکنیکها و انگیزه ی یادگیری زبان با خودمختاری یادگیرنده به ترتیب رابطه مثبت و معنادار داشت، اما اضطراب با استقلال یادگیرنده همبستگی معنادار و منفی داشت. نتایج حاصل از تحلیل رگرسیون چندگانه نشان داد که تکنیکهای یادگیری به بهترین وجه می‌تواند واریانس استقلال یادگیرنده و به دنبال آن انگیزه و اضطراب را پیش‌بینی کند.

بر خلاف یافته های این تحقیق ، در اکثر مطالعات بین انگیزه و استفاده از تکنیکها ی یادگیری زبان همبستگی مثبت گزارش شده است. این یافته ها احتمالاً به دلیل این واقعیت است که دانشجویان ESP در ایران انگیزه کافی برای یادگیری موضوع خود به زبان انگلیسی ندارند. علاوه بر این ،آنها در تماس مستقیم با انگلیسی زبانان نیستند و ترجمه کتاب های درسی به آنها ارائه می شود. بنابراین، به نظر می‌رسد که انگیزه کافی برای یادگیری زبان انگلیسی خاص ندارند و وقت و انرژی آنها صرف به کارگیری استراتژی‌ها می‌شود.

۶. نتیجه

پژوهش حاضر با هدف کشف تکنیکها ی یادگیری زبان مورد استفاده توسط دانشجویان ESP و همچنین بررسی رابطه بین استفاده از تکنیکها ی یادگیری زبان و تفکر انتقادی و انگیزه دانشجویان ایرانی ESP انجام شد. نتایج تحلیل آماری به عدم وجود رابطه معنادار بین متغیرهای مورد نظر اشاره کرد و تکنیک شناختی مورد پسندترین و تکنیک فراشناختی کمترین کتربرد را در بین تکنیکها ی یادگیری زبان مورد استفاده دانشجویان ESP داشت.

ESP یکی از دوره های اجباری است که برای تمامی دانشجویان دانشگاه های ایران ارائه می شود. به نظر می‌رسد دانش‌آموزان با استفاده صحیح از تکنیکها ی یادگیری زبان آشنا نیستند و در اغلب موارد فاقد انگیزه و پتانسیل تفکر انتقادی هستند. معلمان ESP چندان نگران آموزش تکنیکها ی یادگیری زبان در چنین کلاس هایی نیستند. شیوه ارائه به طور معمول آموزشی و معلم محور است. دانش به صورت غیر تعاملی از معلم به دانش آموزان منتقل می شود. معمولاً هیچ تلاشی برای تشویق تفکر انتقادی یا ارتقای انگیزه دانشجویان صورت نمی گیرد. بنابراین، یافته‌های این مطالعه می‌تواند به درک عمیق‌تر این عوامل مهم مرتبط با استفاده صحیح از تکنیکها ی یادگیری زبان یادگیری کمک کند.

دوره های ESP که در دانشگاه های ایران ارائه می شود تا حدود زیادی با آموزش متون فنی از جمله لغات فنی و تخصصی مرتبط است. مربیان معمولاً معلمان محتوا هستند، نه مربیان زبان، که از تفاوت های فردی و اهمیت استراتژی های یادگیری زبان اطلاعی ندارند. این موضوع دلیل عدم رابطه معنی دار بین بعضی از متغیر ها را در این مطالعه میتواند توضیح دهد.

۷.کاربردهای تحقیق

یافته های این مطالعه پیامدهای مفیدی برای افراد و موسسات آموزشی در تدریس دوره های ESP دارد. بر اساس بررسی ادبیات مربوطه، می توان به خوبی درک کرد که سطوح بالای تفکر انتقادی و انگیزه ی یادگیری به استفاده بهتر و مناسب تر از استراتژی های یادگیری زبان کمک می کند. اما به دلیل روش‌های نامناسب تدریس در

کلاس‌های ESP ایران و این که اغلب مدرسان معلم زبان نیستند، بلکه مدرس محتوا هستند، معمولاً به پرورش ویژگی‌های شخصیتی و متغیرهای یادگیرنده توجه لازم را نمی‌کنند.معلمان زبان، به طور کلی، و مربیان ESP، به طور خاص، باید دانش تکنیکهای یادگیری را در اختیار زبان آموزان خود قرار دهند تا در یادگیری زبان موفق باشند. مربیان زبان انگتیسی باید تدریس خود را بر مهارت و اجرای استراتژی در یادگیری دانش آموزان تنظیم کنند و به فراگیران کنترل و مسئولیت بیشتری در یادگیری زبان بدهند.

بنابراین، می توان استنباط کرد که آموزش استراتژی ارائه شده توسط معلمان زبان دوم می تواند به فراگیران کمک کند تا حس عاملیت، قضاوت خودکارآمدی، انگیزه، اعتماد به نفس و عملکرد زبان دوم خود را بهبود بخشند. استفاده کارآمد از استراتژی‌ها می‌تواند بر عوامل دیگری تأثیر بگذارد که بخش مهمی از فرآیند یادگیری و آموزش زبان هستند.

۸. محدودیت های مطالعه

برای اجرای پژوهش حاضر، محقق با محدودیت‌هایی مواجه بوده است. با توجه به این محدودیت ها ، تعمیم یافته های پژوهش حاضر باید با دقت انجام شود. تعمیم پذیری یافته ها نیز توسط حجم نمونه محدود شده است. به نظر می‌رسد که حجم نمونه کوچک است و نمونه‌های بزرگ‌تر ممکن است بهتر بتوانند رابطه بین تکنیکها، انگیزه، و تفکرانتقادی را تحلیل کنند. شرکت کنندگان در این مطالعه دانشجویان در رشته بهداشت و تکنولوژی مواد بودند. آنها همچنین دانش آموزان غیر بومی بودند که بیشتر در مدارس دولتی انگلیسی می خواندند. بنابراین دامنه و تنوع شرکت کنندگان نیز محدود بود. بنابراین، یکی از محدودیت های این مطالعه به تعمیم پذیری آن مربوط می شود. محدودیت عمده از مطالعه این بود که افراد مورد مطالعه به صورت تصادفی انتخاب نشده بودند و از نمونه استفاده شد. اندازه کوچک گروه‌های نمونه، اعتبار جهانی اهمیت مشاهده‌شده را شک بر انگیز می‌کند. یک مطالعه با شرکت کنندگان بیشتر باید تکرار شود تا نتایج قابل اعتمادتر و قابل تعمیم بیشتری به دست آید.

منابع

Ary, D., Jacobs, L., Razavieh, A., & Sorensen, C. (2010). Introduction to research in education 8th ed. *Belmont, CA: Wadsworth*.

Benson, P. (2001). Teaching and researching autonomy in language learning. Harlow. *England: Pearson Education*.

Bialystok, E. (1981). The role of conscious strategies in second language proficiency. *The modern language journal, 65*(1), 24-35.

Chamot, A. U., & O'malley, J. M. (2009). *The CALLA handbook: Implementing the cognitive academic language learning approach*: Addison-Wesley Publishing Company Reading, MA.

Cheng, J., Sagaya Raj, G., & Tan Tjin Ai, J. (2018). The relationship among learning strategy, autonomy and language proficiency of Chinese EFL learners. *International Journal of Foreign Language Teaching and Research, 6*(23), 23-34.

Cohen, A. D. (2011). Second language learner strategies. In *Handbook of research in second language teaching and learning* (pp. 681-698): Routledge.

Crookes, G., & Schmidt, R. W. (1991). Motivation: Reopening the research agenda. *Language learning, 41*(4), 469-512.

Dehghan, F. (2002). Effects of foreign language learning beliefs and proficiencylevel on the use of language strategies by Iranian female EFL learners. MA thesis. Shiraz University, Iran, (In Persian),

Dornyei, Z. (2005). The psychology of the language learner: Individual differences in second language acquisition. *New Jersey: Mahwah*.

Gardner, R. C. (1985). *Social psychology and second language learning: The role of attitudes and motivation*: Arnold.

Ghanizadeh, A., & Jahedizadeh, S. (2017). Validating the Persian Version of Reflective Thinking Questionnaire and Probing Iranian University Students' Reflective Thinking and Academic Achievement. *International Journal of Instruction, 10*(3), 209-226. 132

Green, J. M., & Oxford, R. (1995). A closer look at learning strategies, L2 proficiency, and gender. *TESOL quarterly, 29*(2), 261-297.

Griffiths, C. (2003). Language learning strategy use and proficiency: The Relationship between patterns of reported language learning strategy (LLS)use by speakers of other languages (SOL) and proficiency with implications for the teaching/learning situation: The University of Auckland (New Zealand).

Kember, D., Leung, D. Y., Jones, A., Loke, A. Y., McKay, J., Sinclair, K., . . . Wong, M. (2000). Development of a questionnaire to measure the level of reflective thinking. *Assessment & evaluation in higher education, 25*(4), 381-395.

Kohonen, V., & Bedley, G. (1992). Experiential language learning: second language learning as cooperative learner education. *Collaborative language learning and teaching*, 45-64.

Ku, Kelly Y. L. & Ho, Irene T. (2009). Assessing students' critical thinking performance: Urging for measurements using multi-response format, Thinking Skills and Creativity, ELSEVIER, 4, 70–76

Little, D. (1995). Learning as dialogue: The dependence of learner autonomy on

teacher autonomy. *System, 23*(2), 175-181.

Macaro, E. (2006). Strategies for language learning and for language use: Revising the theoretical framework. *The modern language journal, 90*(3), 320-337.

Mackay, R., & Mountford, A. J. (1978). The teaching of English for special purposes: Theory and practice. *English for specific purposes*, 2-20.

Muruyama, K., & Pekrun, R. L. (2012). S., & vom Hofe, R.(2013). Predicting long-term growth in students' mathematics achievement: The unique contributions of motivation and cognitive strategies. *Child development, 84*(4), 1475-1490.

Nguyen, N., & Godwyll, F. (2010). Factors influencing language-learning strategy use of English learners in an ESL context. *Mid-Western Educational Researcher, 23*(4).

Nikoopour, J., Farsani, M. A., & Neishabouri, J. K. (2011). *Language learning strategy preferences of Iranian EFL students*. Paper presented at the International Conference on Social Science and Humanity IPEDR.

O'Malley, J. M., Chamot, A. U., &

Walker, C. (1987). Some applications of cognitive theory to second language acquisition. *Studies in second language acquisition*, *9*(3), 287-306.

O'malley, J. M., O'Malley, M. J., Chamot, A. U., & O'Malley, J. M. (1990).

Learning strategies in second language acquisition: Cambridge university.press.

Oxford, R. (1990). *Language learning strategiesWhat every teacher should know*: Heinle & heinle Publishers.;.

Oxford, R. L., & Burry-Stock, J. A. (1995). Assessing the use of language learning strategies worldwide with the ESL/EFL version of the Strategy Inventory for Language Learning (SILL). *System*, *23*(1), 1-23.

Peculea, L., & Bocos, M. (2015). The role of learning strategies in the development of the learning-to-learn competency of 11th graders from technical schools. *Procedia-Social and Behavioral Sciences*, *203*, 16-21. 136

Rahimi, S., Ghonsooly, B., & Rezai, A. (2021). An Online Portfolio Assessment and Perception Study of Iranian High School Students' English Writing Performance during the COVID-19 Pandemic. *Teaching English as a Second Language (Formerly Journal of Teaching Language Skills)*, *40*(3), 197-231.

Rotherman, A. J., & Willingham, D. T. (2010). 21st century skills" not new but a worthy challenge. *American Educator*, *34*(1), 17-20.

Rubin, J. (1981). Study of cognitive processes in second language learning1. *Applied linguistics*, *2*(2), 117-131.

Sadeghi, M. (2013). The impact of achievement motivation on vocabulary learning in intermediate EFL learners. Journal of Basic and Applied Scientific Research, 3(10), 206-213.

Schön, D. A. (1991). The Reflective Practitioner: How Professionals Think in Action. Arena. *Farnham: Ashgate Publishing*.

Shiner, R. L., & DeYoung, C. G. (2013). The structure of temperament and personality traits: A developmental perspective.

Shukla, D., & Dungsungnoen, A. P. (2016). Student's Perceived Level and Teachers' Teaching Strategies of Higher Order Thinking Skills: A Study on Higher Educational Institutions in Thailand. *Journal of education and Practice*, *7*(12), 211-219.

Strevens, P. (1988). ESP after twenty years: A reappraisal. *ESP: State of the Art*.

Taheri, H., Sadighi, F., Bagheri, M. S., & Bavali, M. (2020). Investigating the relationship between Iranian EFL learners' use of language learning strategies and foreign language skills achievement. *Cogent Arts & Humanities, 7*(1), 1710944.

The relationship between the use of motivational learning techniques and critical thinking among English language learners in the master's degree in health and food technology

Fariba Rahimi Esfahani

Department of English Language, Faculty of Humanities, Islamic Azad University, Shahrekord ۳ Branch, Shahrekord, Iran

Corresponding author: Email: rahimi_fariba@yahoo.com

abstract

This research was conducted with the aim of discovering the type of linguistic techniques used by Iranian students in the field of health and food technology and also to find the relationship between the use of language techniques with critical thinking and the level of motivation of these students. For this purpose, 60 participants were randomly selected from undergraduate students in the field of health and food technology. The mentioned students who were studying in Islamic Azad University, Shahrekord branch, were homogenized in terms of English language proficiency through the Oxford Quick Placement Test (OQPT). Then, a 50-item language use inventory was administered to the companies to explore the variety of techniques used by them during their language training course. Then the critical thinking and motivation of the participants were determined through related questionnaires. The obtained results showed that most of these students give cognitive techniques. Also, the results indicated a significant relationship between the use of language techniques and the potential of critical thinking of these students and the absence of a significant relationship between language techniques and the motivation of the mentioned students. The results also provide the application of these findings to language learning courses for specific purposes (ESP).

Keywords: ESP course, language techniques, critical thinking, motivation

به کارگیری سه روش ERIC-PCR, RAPD-PCR, Rep-PCR در دسته بندی ژنتیکی ایزوله‌های *کمپیلوباکتر ژژونی* و*کمپیلوباکترکولی* جدا شده از گوشت خام مرغ

مریم هادیان[۱]، حسن ممتاز[۲*]، امیر شاکریان[۳]

۱-دانشجوی دکتری میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران،

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

۳- استاد بهداشت مواد غذایی، گروه کنترل و بهداشت مواد غذایی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران،

hamomtaz@yahoo.com, ha.momtaz@iau.ac.ir

چکیده

کمپیلوباکترها به ویژه دو گونه *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* با داشتن سویه‌ها و میزبان‌های مختلف، یکی از مهم‌ترین و شایع‌ترین باکتری‌های بیماری‌زای مشترک بین انسان و دام محسوب می‌شوند. مطالعه حاضر با هدف دسته بندی ژنتیکی ایزوله‌های های *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* جدا شده از گوشت خام مرغ انجام شد.

این مطالعه مقطعی بر روی ۳۶ ایزوله *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* جداشده از گوشت خام مرغ انجام گرفت. به منظور ژنوتایپینگ ایزوله‌ها از سه روش ERIC-PCR, RAPD-PCR, Rep-PCR استفاده گردید. ۳۶ ایزوله کمپیلوباکتر جدا شده از گوشت خام مرغ در روش ERIC-PCR در ۷ پروفایل، در روش RAPD-PCR در ۳ پروفایل و در روش REP-PCR در ۳ پروفایل قرار گرفتند.

تمام جدایه های مورد بررسی دارای الگوی باندی پلی مورفیک بودندکه سرعت بالایی از پلی مورفیسم در ژنوم *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* را نشان می‌دهد. روش‌های مورد استفاده در این مطالعه هر کدام ابزارهای قدرتمند در دسته بندی *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* می‌باشد ولی طبق یافته‌های حاصله، روش ERIC-PCR روش مناسب‌تری نسبت به روش‌های دیگر برای تایپینگ ودسته بندی جدایه های *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* می‌باشد .

کلمات کلیدی: *کمپیلوباکترژژونی*، *کمپیلوباکترکلی*، ERIC-PCR, RAPD-PCR, Rep-PCR

مقدمه

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 *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* مسئول اصلی عفونت‌های ناشی از کمپیلوباکترها در انسان محسوب می‌شوند. امروزه کمپیلوباکترها از شایع‌ترین علل اسهال باکتریایی در سراسر جهان محسوب شده و بر طبق آمارهای جهانی ۲ تا ۳۵ درصد از اسهال‌های میکروبی ناشی از این باکتری‌ها می‌باشد (۱).

برای بیش از ۳۰ سال، استاندارد طلایی برای دسته‌بندی ایزوله‌های *کمپیلوباکتر ژژونی* روش سروتایپینگ مبتنی بر آنتی‌ژن پایدار در برابر حرارت پلی‌ساکارید کپسولی بوده است. به دلیل تنوع ژنومی بالا در *کمپیلوباکتر ژژونی*، بسیاری از بخش‌های پلی ساکارید کپسولی‌در سروتیپ ها وجود دارند و درمجموع در گونه ژژونی ۴۷ سروتیپ شناسایی‌شده است، اما به دلیل واکنش‌متقاطع، سروتیپ ها به ۳۵ سروتیپ پلی ساکارید کپسولی طبقه‌بندی می‌شوند(۲).

در سایر روش‌های ایمونولوژیک نظیر، آگلوتیناسیون لاتکس و الایزا، از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال و پلی کلونال برای شناسایی لیپوپلی ساکاریدها، فلاژلین یا سایر آنتی ژن‌های غشای بیرونی استفاده می‌کنند که امکان شناسایی سریع و اختصاصی‌کمپیلوباکترهای گرمادوست را بر روی محیط کشت جامد یا مایع فراهم می‌کند(۲). چندین آزمایش بیوشیمیایی مانند آزمایش‌های کاتالاز و اکسیداز، احیای نیترات و نوار استات سرب معمولاً توسط‌سازمان‌های نظارتی مواد غذایی برای تیپ بندی ایزوله‌های جداشده انجام می‌شود(۳). آزمایش‌های بیوشیمیایی نظیر اندازه گیری فعالیت L-آلانیل آمینوپپتیداز، جهت تمایز بین کمپیلوباکتر ها از جنس‌های مرتبط و شناسایی برخی جدایه ها در سطح گونه انجام می‌شود(۵-۳).

اخیراً چندین روش مولکولی برای تشخیص ارتباط جدایه ها و منبع آلودگی معرفی شده است. تکثیر ژن‌های هدف با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) روش ترجیحی برای استفاده توسط آزمایشگاه‌های نظارت و کنترل کیفی است. مزیت استفاده از PCR مقرون به صرفه بودن و سادگی آن است و سنجش‌های مبتنی بر PCR تائیدی مؤثر برای تمایز آن دسته از ایزوله‌هایی است که با سنجش‌های بیوشیمیایی قابل‌تشخیص نیستند. در مطالعات قبلی برای شناسایی گونه‌های کمپیلوباکتر یک منطقه متغیر از ژن *16S rRNA* ، که متمایز کننده گونه‌ها بود، مورد ارزیابی قرار می‌گرفت. اخیراً، سنجش‌هایی برای هدف قرار دادن سایر ژن‌ها به منظور افزایش ویژگی و حساسیت تست‌های مولکولی و همچنین طبقه بندی ایزوله‌های بیماری زا توسعه یافته‌اند(۲).

امروزه روش‌های مولکولی یا درواقع روش‌های انگشت‌نگاری ژنومی به‌عنوان دقیق‌ترین روش‌ها برای طبقه‌بندی میکروارگانیسم‌ها در جهت اهداف اپیدمیولوژیک تلقی می‌گردند(۶،۷). روش‌های مولکولی قدرت تشخیص و تکرارپذیری بسیار بالایی نسبت به روش‌های سنجش فنوتیپی دارند. همچنین از توانایی بالایی در تعیین تفاوت‌های ژنومی کوچک و ثبات مولکولی بالا در مقایسه با سنجش‌های فنوتیپی همان‌گونه باکتری برخوردار می‌باشند(۸). روش‌های RAPD-PCR و ERIC-PCR برای مطالعه اپیدمیولوژی *کمپیلوباکتر* مناسب می‌باشند. روش RAPD-PCR یکی از سریع‌ترین روش‌های تایپینگ مولکولی است. در سال‌های اخیر به دلیل سادگی این روش، سرعت و دقت بالا، قابلیت تکرارپذیری، هزینه نسبتاً پایین و قدرت بالا در افتراق بین سویه‌ای مورد استفاده ویژه‌ای قرارگرفته است(۹). علاوه بر تکنیک RAPD-PCR تکنیک ERIC-PCR به‌منظور مطالعات اپیدمیولوژیک مورد استفاده قرار می‌گیرد. ارزیابی و سنجش‌های مبتنی برRep-PCR استفاده از

پرایمرهایی می‌باشد که هدف آن‌ها توالی تکراری حفاظت‌شده در ژنوم باکتری می‌باشد. ازجمله گروه‌هایی از عناصر تکراری، توالی‌های تکراری توافقی درون ژنی انتروباکتریال یا ERIC می‌باشد (۱۰). Rep-PCR روشی برای نشانه‌گذاری ژنوم‌های باکتریایی است که الگوهای خاص به‌دست‌آمده از PCR عناصر DNA تکراری موجود درون ژنوم‌های باکتریایی را مورد بررسی قرار می‌دهد. سه مجموعه اصلی عناصر تکراری برای اهداف تایپینگ استفاده می‌شوند: توالی پالیندرومیک برون ژنی تکراری(Rep)، توالی اجماع درون ژنی تکراری انتروباکتریایی (ERIC) و عناصرBOX. ثابت شده است که روش‌های Rep-PCR و ERIC-PCR برای جداسازی و تعیین انواع گونه‌های کمپیلوباکتر مفید می‌باشند(۱۰).

از آنجایی که گوشت و فراورد های گوشتی طیور به ویژه گوشت مرغ از منابع مهم انتقال باکتری‌های غذازاد نظیر کمپیلوباکتر هستند و در مزارع پرورش آن‌ها از آنتی بیوتیک ها به شکل بی رویه استفاده می‌شود، مطالعه حاضر با هدف ارزیابی و مقایسه سه روش وابسته به PCR یعنی روش‌های RAPD-PCR ، Rep-PCR و ERIC-PCR جهت دسته بندی نتیکی ایزوله‌های *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* جدا شده از گوشت خام مرغ انجام شد.

روش کار:

ایزوله‌ها: تعداد ۳۶ ایزوله کمپیلوباکتر شامل ۱۸ ایزوله *کمپیلوباکتر ژژونی* (ایزوله‌های شماره ۱۸-۱) و ۱۸ ایزوله *کمپیلوباکتر کولی* (ایزوله‌های ۳۶-۱۹) که در مطالعات قبلی از گوشت خام مرغ جدا شده بودند، انتخاب گردید. ایزوله‌های مورد مطالعه به شکل گلیسیرینه در محیط مایع Bolton Broth واجد ۳۰ درصد گلیسیرین در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شده بودند(۱۳-۱۱).

تأیید ایزوله‌ها: جهت تائید قطعی وجود گونه کمپیلوباکتر و شناسایی گونه‌های *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* در باکتری‌های ذخیره شده در محیط Bolton Broth از ردیابی ژن‌های *16srRNA, ceuE, mapA* به روش PCR (جدول ۱) استفاده شد. برای این منظور ابتدا DNA ژنومی از باکتری‌های رشد کرده در این محیط با استفاده از کیت استخراج DNA ساخت شرکت Thermo Fisher Scientific آلمان طبق دستورالعمل کیت، استخراج گردید.

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت تشخیص گونه‌های کمپیلوباکتر (۱۴)

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

واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر در حجم ۵۰ میکرولیتر واجد ۵ میکرولیتر PCR buffer 10x، ۱/۵ میلی مول Mgcl2، ۲۰۰ میکرومول dNTP Mix، نیم میکرومول از زوج پرایمرهای F و R (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 مدت۶۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه (۱۱،۱۵).

در آزمایش PCR از سویه‌های استاندارد *Campylobacter jejuni* ATCC29428 و *Campylobacter coli* ATCC43478 و ایزوله‌های

جداشده در مطالعات قبلی به‌عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر به‌عنوان نمونه کنترل منفی استفاده شد(۱۱،۱۵).

دسته بندی ژنتیکی ایزوله‌ها: جهت دسته‌بندی ژنتیکی و تیپ بندی ایزوله‌های *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* جداشده از گوشت خام مرغ از سه روش ERIC-PCR, RAPD-PCR, Rep-PCR استفاده شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده و شرایط انجام واکنش PCR در مورد هر کدام از این تکنیک‌ها در جدول ۲ نشان داده شده است:

جدول ۲- توالی پرایمرها و شرایط انجام واکنش PCR جهت دسته بندی ژنتیکی گونه‌های *کمپیلوباکتر*

نام روش	توالی پرایمرها	شرایط انجام PCR	برنامه حرارتی واکنش PCR	منبع
ERIC-PCR	R1: ATGAAGCTCCTGGGGATTCAC R2: AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	5 µL PCR buffer 10X 3 mM Mgcl2 250 µM dNTP (Fermentas) 0.3 µM of each primers F & R 2 U Taq DNA polymerase (Fermentas) 3 µL DNA template	1 cycle: 94 0C ---------- 2 min. 45 cycle: 94 0C ---------- 45 s 38 0C ---------- 40 s 72 0C ---------- 60 s 1 cycle: 72 0C ---------- 5 min	۱۱
RAPD-PCR	OPA 11:CAA TCGCCG T	5 µL PCR buffer 10X 2.5 mM Mgcl2 200 µM dNTP (Fermentas) 0.3 µM of each primers F & R 2.5 U Taq DNA polymerase (Fermentas) 3 µL DNA template	1 cycle: 94 0C ---------- 3min. 45 cycle: 94 0C ---------- 60 s 36 0C ---------- 60 s 72 0C ---------- 120 s 1 cycle: 72 0C ---------- 5 min	۱۶
Rep-PCR	Rep1: IIINCGNCGNCATCNGGC Rep2: NCGNCTTATCNGGCCTAC	5 µL PCR buffer 10X 2 mM Mgcl2 200 µM dNTP (Fermentas) 0.2 µM of each primers F & R 2 U Taq DNA polymerase (Fermentas) 3 µL DNA template	1 cycle: 94 0C ---------- 2 min. 31 cycle: 94 0C ---------- 30 s 40 0C ---------- 60 s 72 0C ---------- 110 s 1 cycle: 72 0C --------- 16 min	۱۷

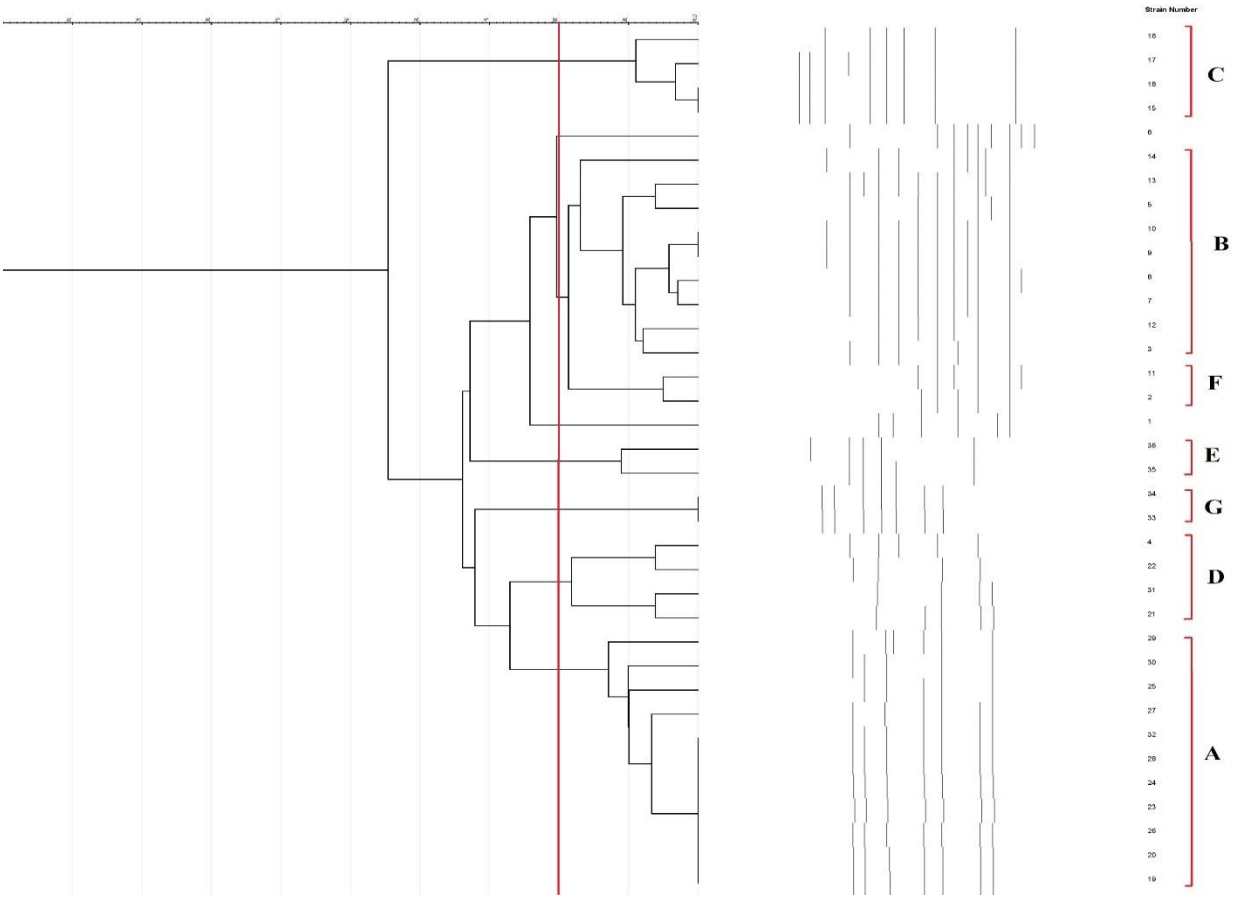
در تمام مراحل فوق جهت ارزیابی محصول PCR، از الکتروفورز محصول روی ژل آگارز ۲ درصد استفاده شد. الکتروفورز نمونه‌ها در ولتاژ ثابت ۹۰ ولت به مدت حدوداً یک ساعت انجام و بعد از مشاهده ژل در زیر نور UV از ژل حاصله تصویربرداری و ثبت گردید.

آنالیز نتایج: در هر کدام از سه تکنیک ژنوتایپینگ، آزمایش PCR روی ایزوله‌های موردمطالعه سه نوبت انجام و پس از اطمینان از تعداد و اندازه باندهای ایجادشده در هر ایزوله، الگوی باندی حاصله طبق روش توصیه شده توسط Heras و همکاران (۲۰۱۵) به کمک نرم‌افزار Gel J آنالیز و با در نظر گرفتن قرابت بالای ۸۰ درصد، ژنوتیپ‌های (پروفایل‌های) مربوط با روش UPGMA شناسایی و دندروگرام مربوط به هر نشان‌گر ترسیم گردید(۱۸).

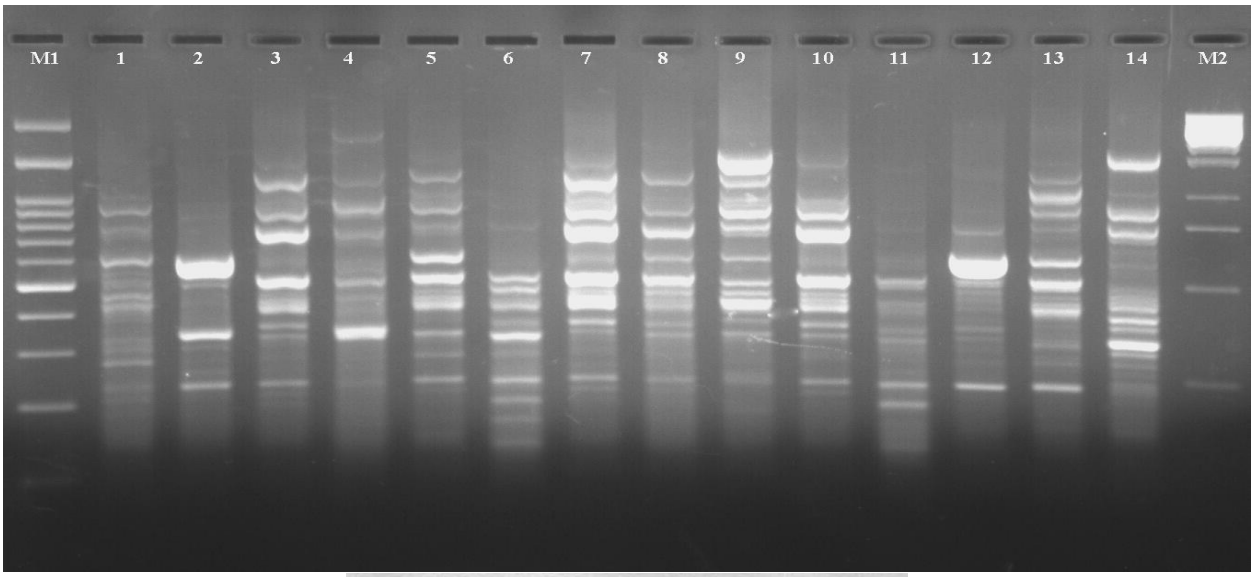
یافته‌ها:

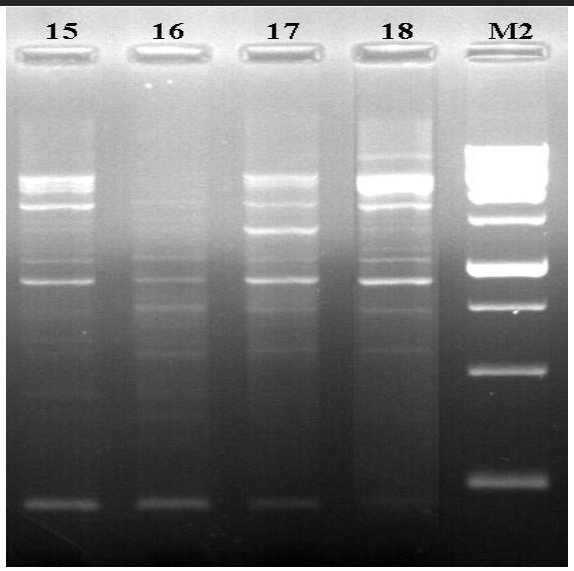
در روش ERIC-PCR مجموع ۳۶ ایزوله *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* مورد مطالعه در ۷ پروفایل A-G با قرابتی معادل ۱۰۰-۵۵/۳ درصد قرار گرفتند (شکل۱). این الگوی کلاسترینگ براساس شباهت ۵۵ در صدی وتکرار پذیری ۹۵ درصدی دارای تعدادی عضو می‌باشد. در آنالیز ۱۸ ایزوله *کمپیلوباکترژژونی* با روش ERIC-PCR باندهای مختلف در محدوده ۲۶۰۰-۱۲۰ جفت باز مشاهده شد که ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به این ایزوله‌ها در شکل ۲ نشان داده شده است. در ژنوتایپینگ این ۱۸ ایزوله با نشانگر ERIC-PCR، ایزوله‌های مورد نظر در ۳ پروفایل A-C با قرابتی معادل ۱۰۰-۵۸/۴ درصد قرار گرفتند

(شکل۳). الکتروفورز محصول ERIC-PCR در مورد ایزوله‌های *کمپیلوباکترکولی* نشان گر حضور باندهای مختلف در محدوده ۲۸۰۰-۱۱۰ جفت باز بود که با بررسی این الگوی باندی ۱۸ ایزوله *کمپیلوباکترکولی* مورد مطالعه در قالب ۴ پروفایل A-D با قرابتی معادل ۱۰۰-۶۲/۳ درصد تقسیم شدند (اشکال ۴ و ۵).

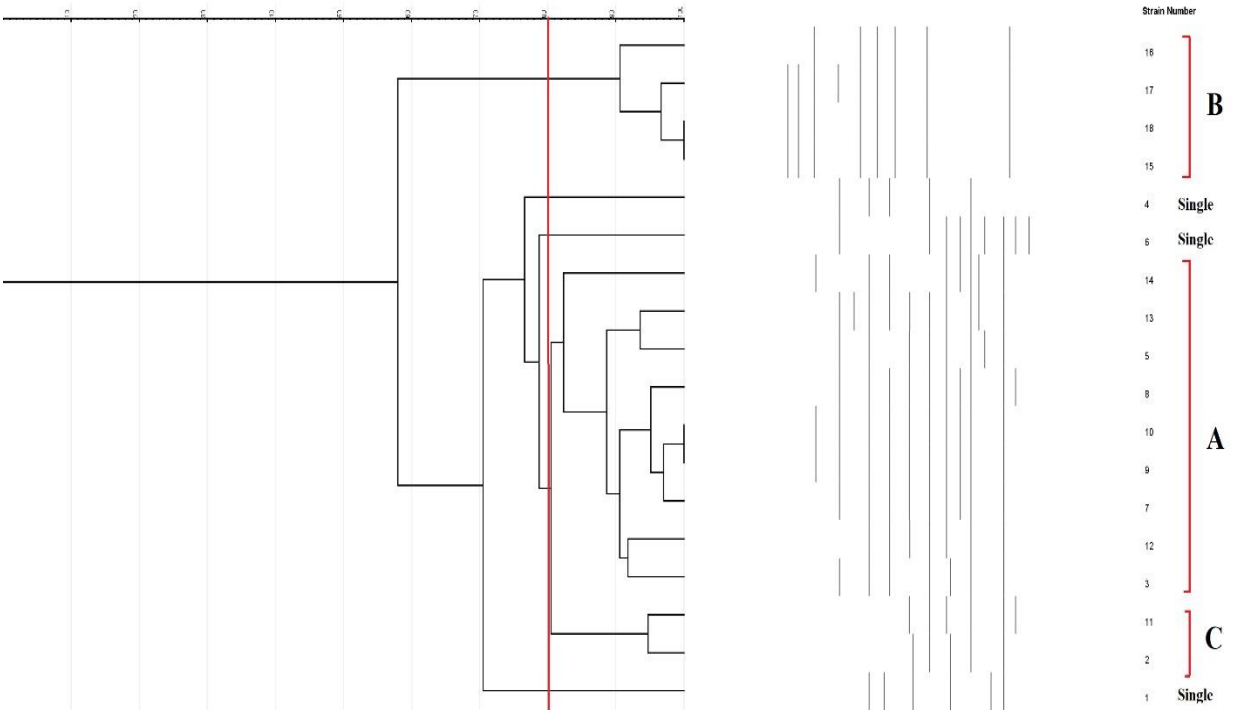


شکل ۱- دندروگرام حاصل از ژنوتایپینگ ایزوله‌های *کمپیلو باکتر* جدا شده از گوشت خام مرغ با نشانگر ERIC-PCR

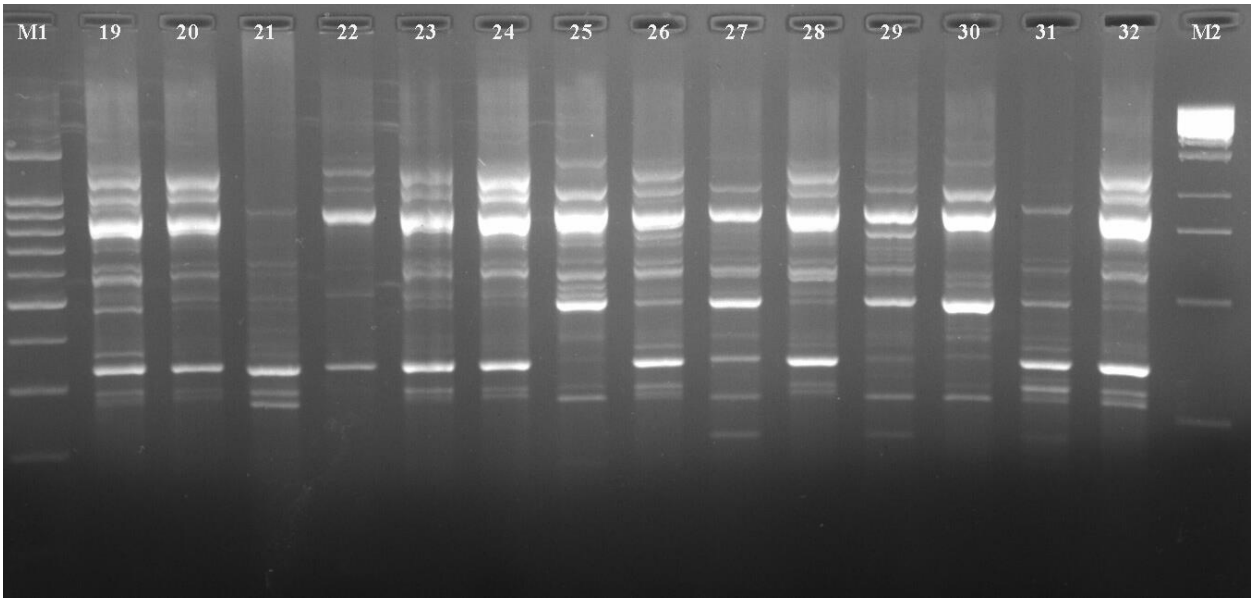


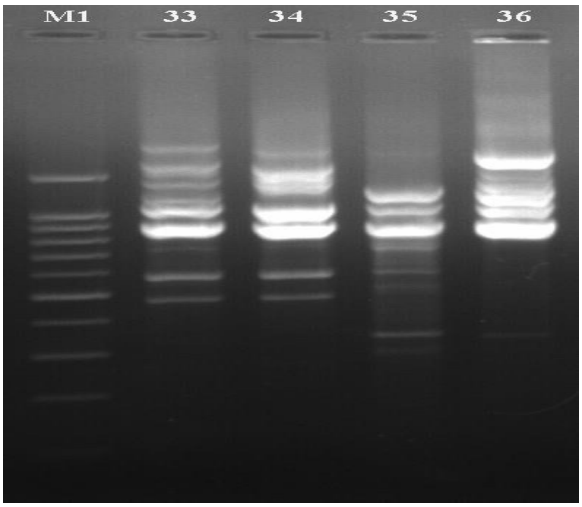


شکل ۲- ژل حاصل از الکتروفورز محصول ERIC-PCR در مورد ایزوله‌های *کمپیلوباکترژژونی* جدا شده از گوشت خام مرغ (ستون M1= مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA، ستون M2= مارکر ۱ کیلو بازی DNA)

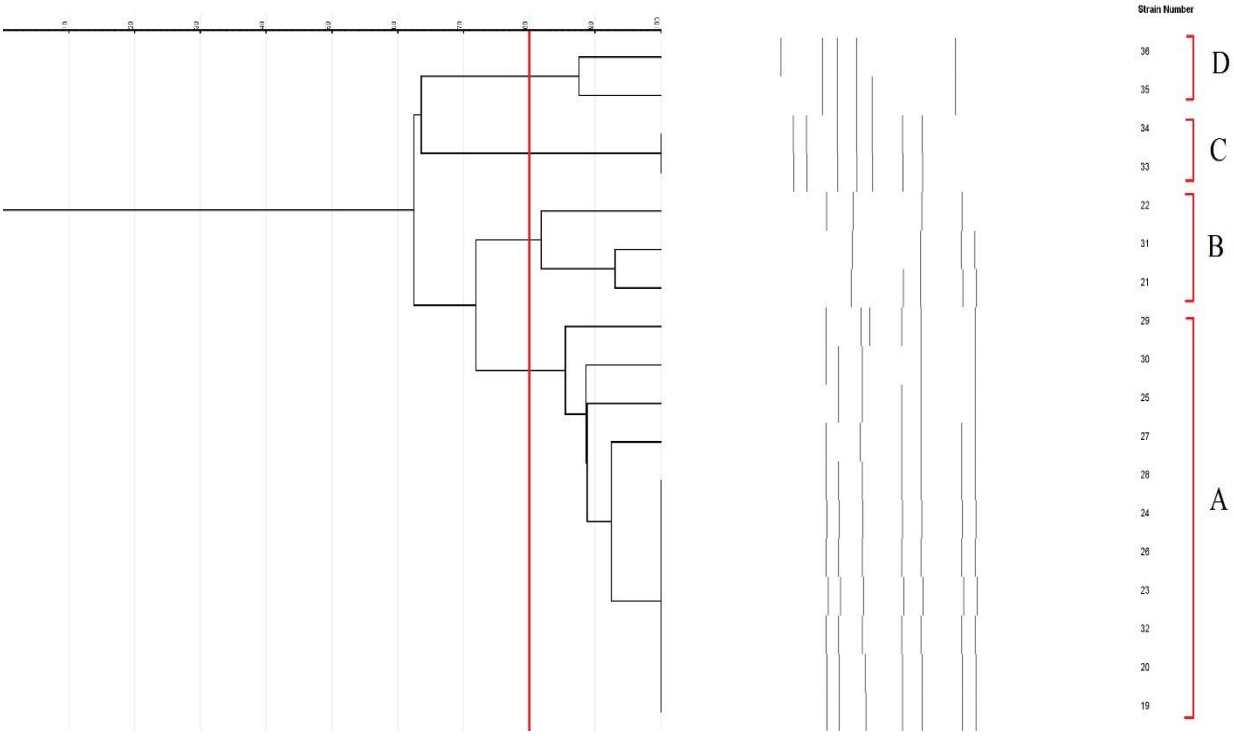


شکل ۳- دندروگرام حاصل از ژنوتایپینگ ایزوله‌های *کمپیلو باکتر ژژونی* جدا شده از گوشت خام مرغ با نشانگر ERIC-PCR



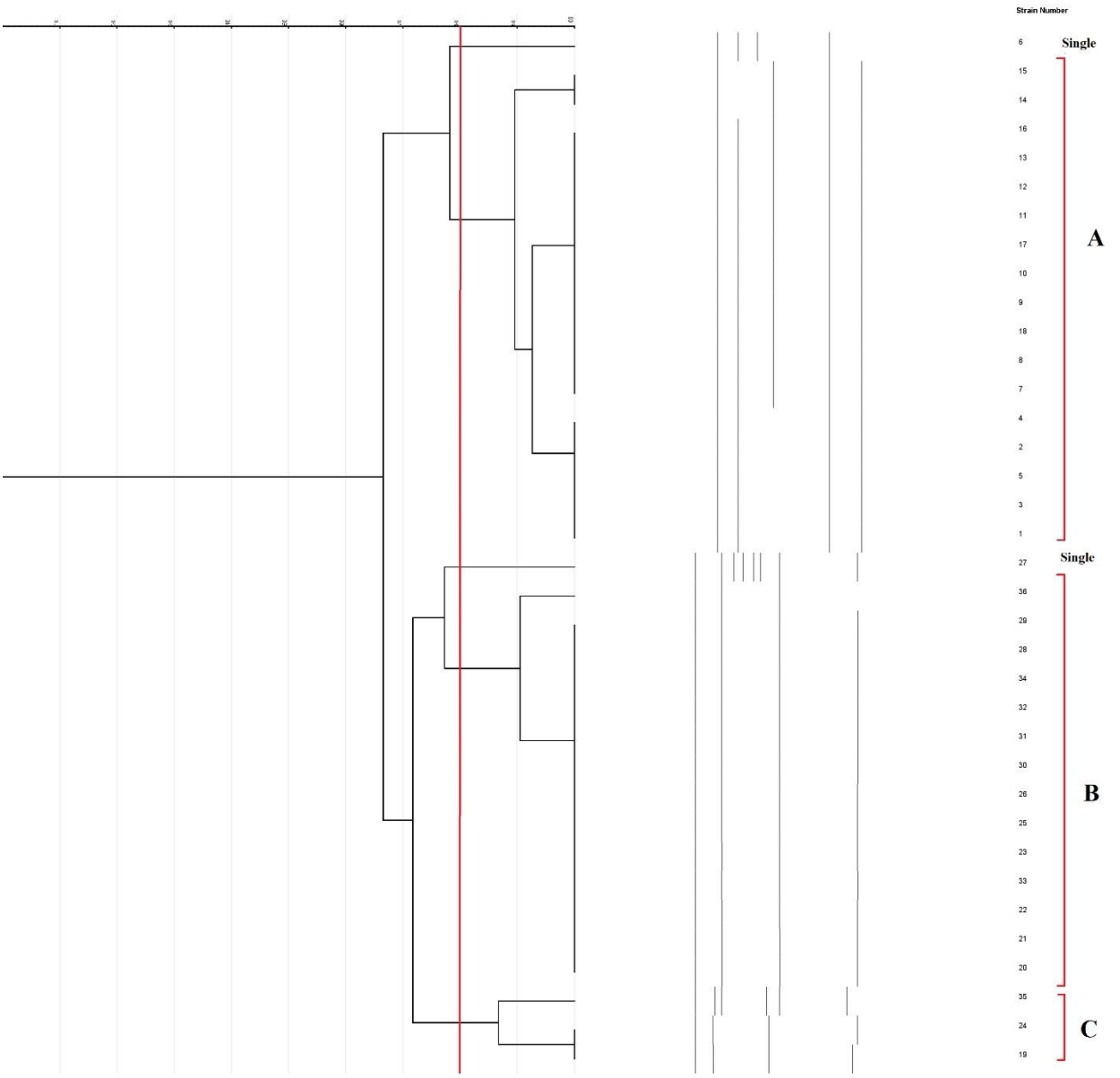


شکل ۴- ژل حاصل از الکتروفورز محصول ERIC-PCR در مورد ایزوله‌های *کمپیلوباکترکولی* جدا شده از گوشت خام مرغ
(ستون M1= مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA، ستون M2= مارکر ۱ کیلو بازی DNA)

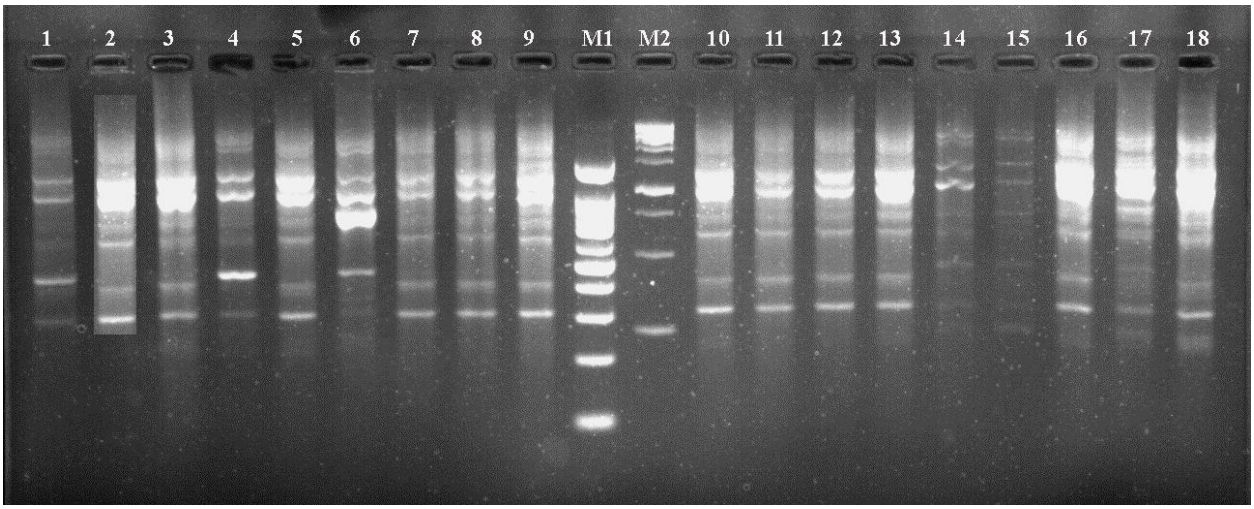


شکل ۵- دندروگرام حاصل از ژنوتایپینگ ایزوله‌های *کمپیلو باکتر کولی* جدا شده از گوشت خام مرغ با نشانگر ERIC-PCR

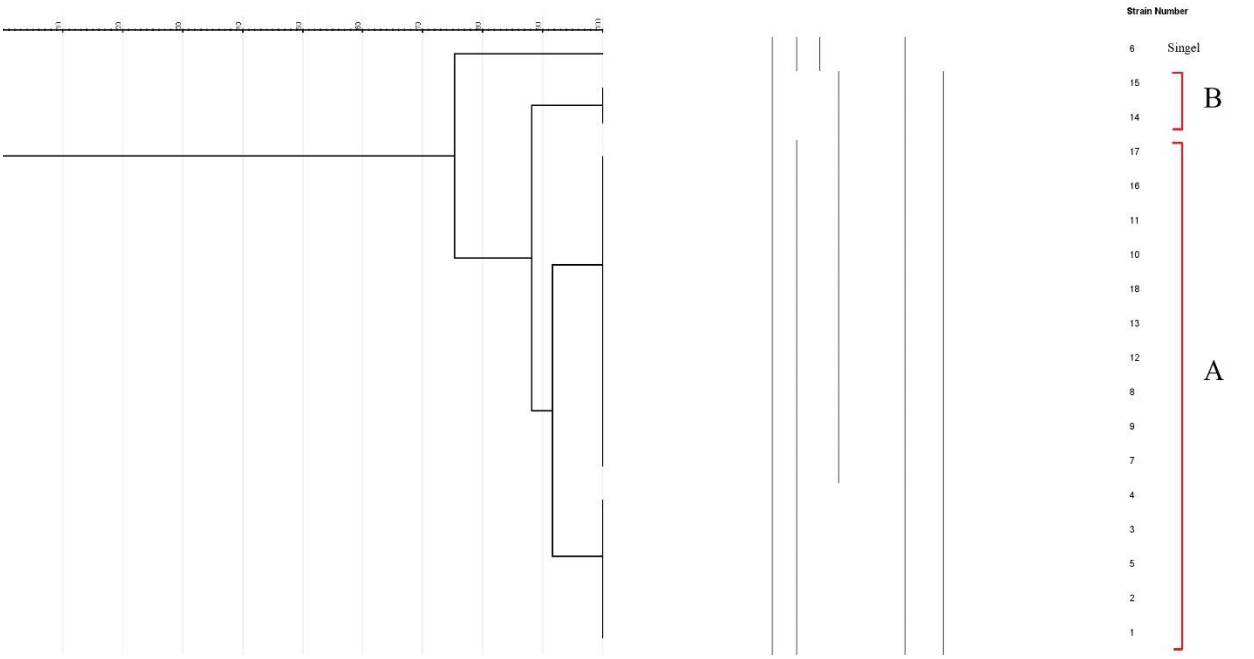
در تکنیک RAPD –PCR با کمک تک پرایمر ۱۰ نوکلئوتیدی، ۳۶ ایزوله *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* مورد مطالعه در ۳ پروفایل A-C با قرابتی معادل ۱۰۰-۵۵/۳ درصد قرار گرفتند (شکل ۶) طوری که ۱۸ ایزوله *کمپیلوباکترژژونی* با داشتن باندهای مختلف ۴۹۰۰-۲۲۰ جفت باز، در ۲ پروفایل A-B با قرابتی معادل ۱۰۰-۷۵/۴ درصد و ایزوله‌های *کمپیلوباکترکولی* با محدوده باندی ۴۷۰۰-۳۱۰ جفت باز در ۲ پروفایل A-B با قرابتی معادل ۱۰۰-۷۰ درصد قرار گرفتند (اشکال ۷ تا ۱۰).



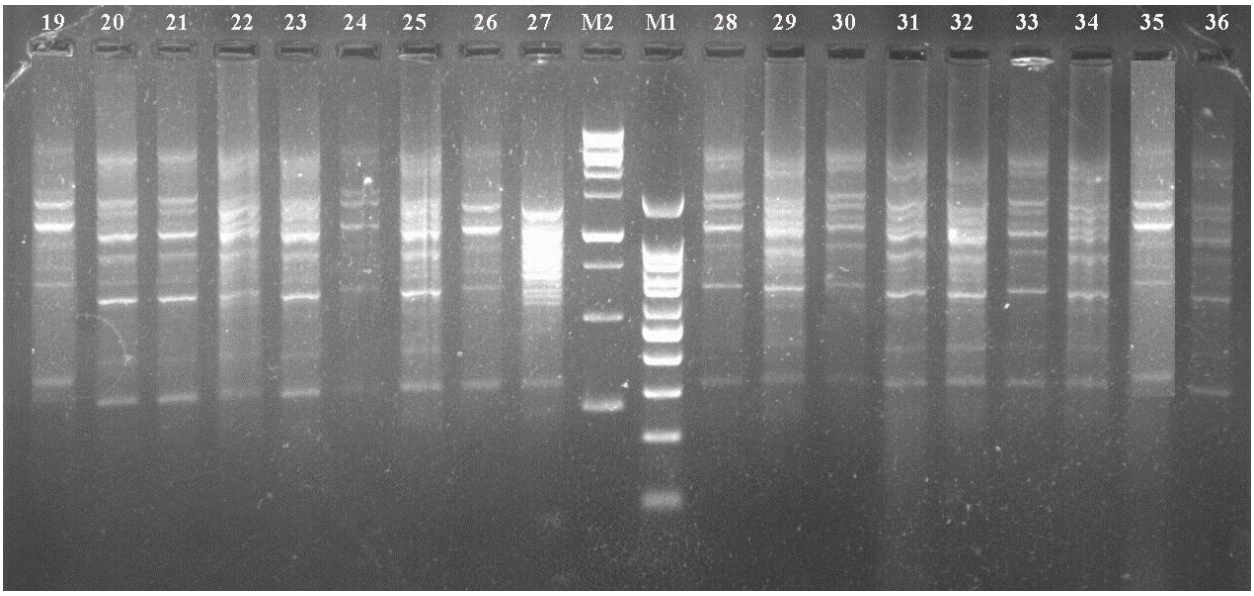
شکل ۶- دندروگرام حاصل از ژنوتایپینگ ایزوله‌های *کمپیلو باکتر* جدا شده از گوشت خام مرغ با نشانگر RAPD-PCR



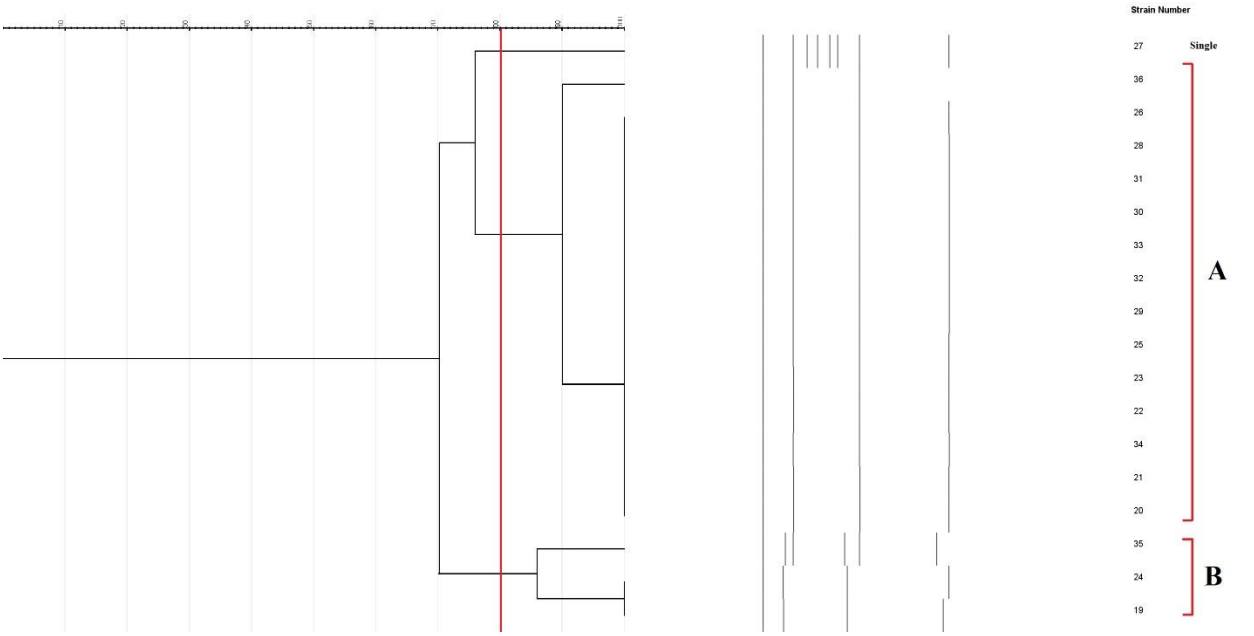
شکل ۷- ژل حاصل از الکتروفورز محصول RAPD-PCR در مورد ایزوله‌های *کمپیلوباکترژژونی* جدا شده از گوشت خام مرغ (ستون M1= مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA، ستون M2= مارکر ۱ کیلو بازی DNA)



شکل ۸- دندروگرام حاصل از ژنوتایپینگ ایزوله‌های *کمپیلو باکتر ژژونی* جدا شده از گوشت خام مرغ با نشانگر RAPD-PCR

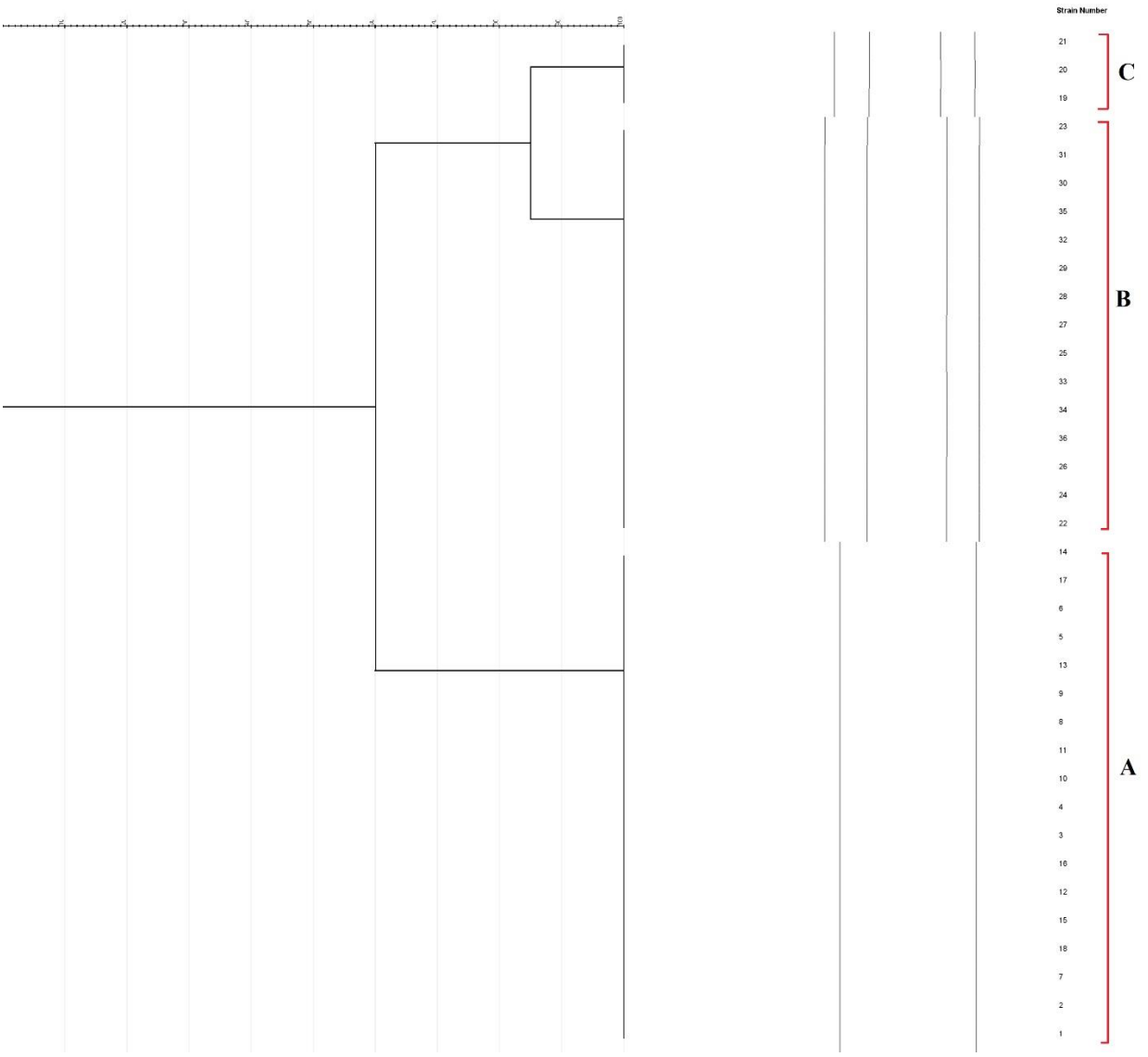


شکل ۹- ژل حاصل از الکتروفورز محصول RAPD-PCR در مورد ایزوله‌های *کمپیلوباکتر کولی* جدا شده از گوشت خام مرغ (ستون M1= مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA، ستون M2= مارکر ۱ کیلو بازی DNA)



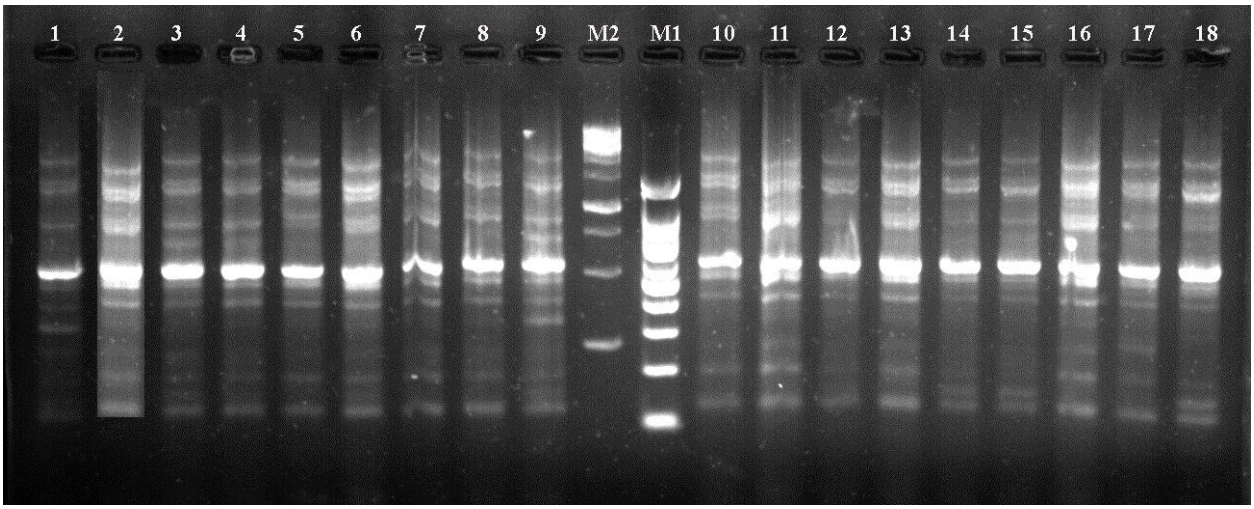
شکل ۱۰- دندروگرام حاصل از ژنوتایپینگ ایزوله‌های *کمپیلو باکتر کولی* جدا شده از گوشت خام مرغ با نشانگر RAPD-PCR

در شـــکل ۱۱، دندروگرام حاصـــل از آنالیز الگوی باندی ۳۶ ایزوله *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* مورد مطالعه با نشان گر REP -PCR آورده شده است که همان گونه که مشـــهود اســـت این ایزوله‌ها در ۳ پروفایل A-C با قرابتی معادل ۱۰۰-۶۰ درصد قرار گرفته‌اند.

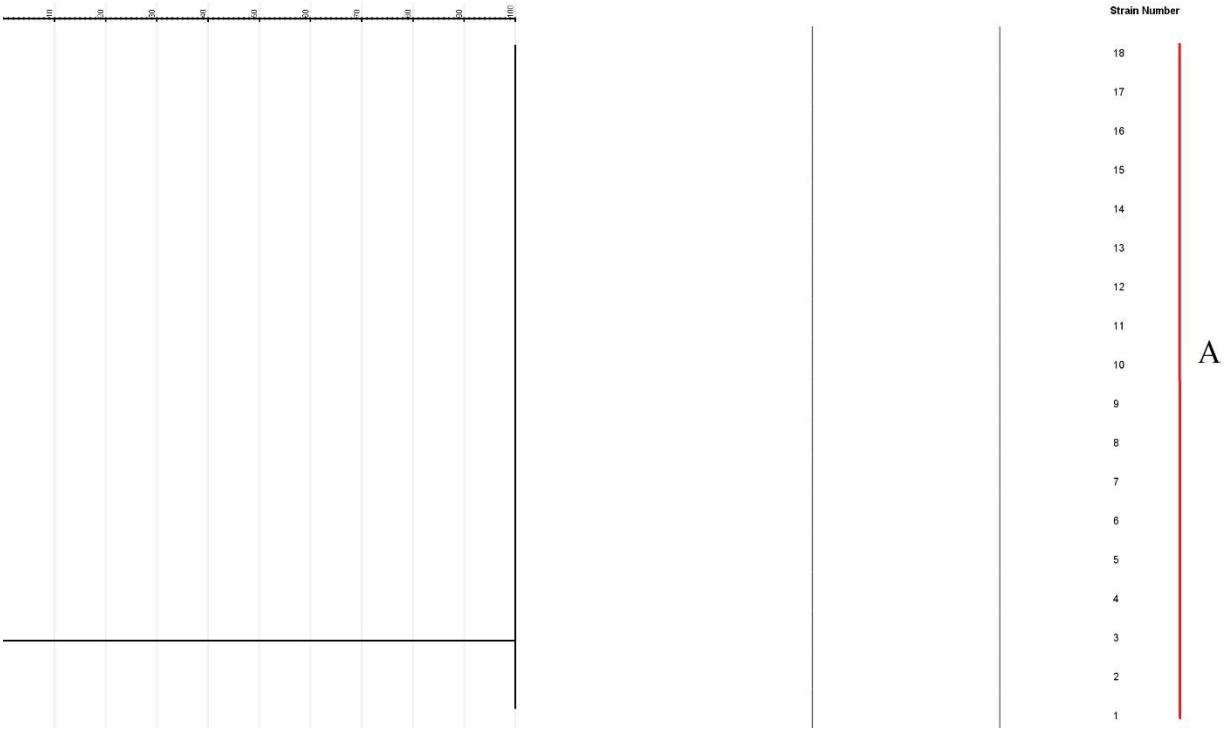


شکل ۱۱- دندروگرام حاصل از ژنوتایپینگ ایزوله‌های *کمپیلو باکتر* جدا شده از گوشت خام مرغ با نشانگر Rep-PCR

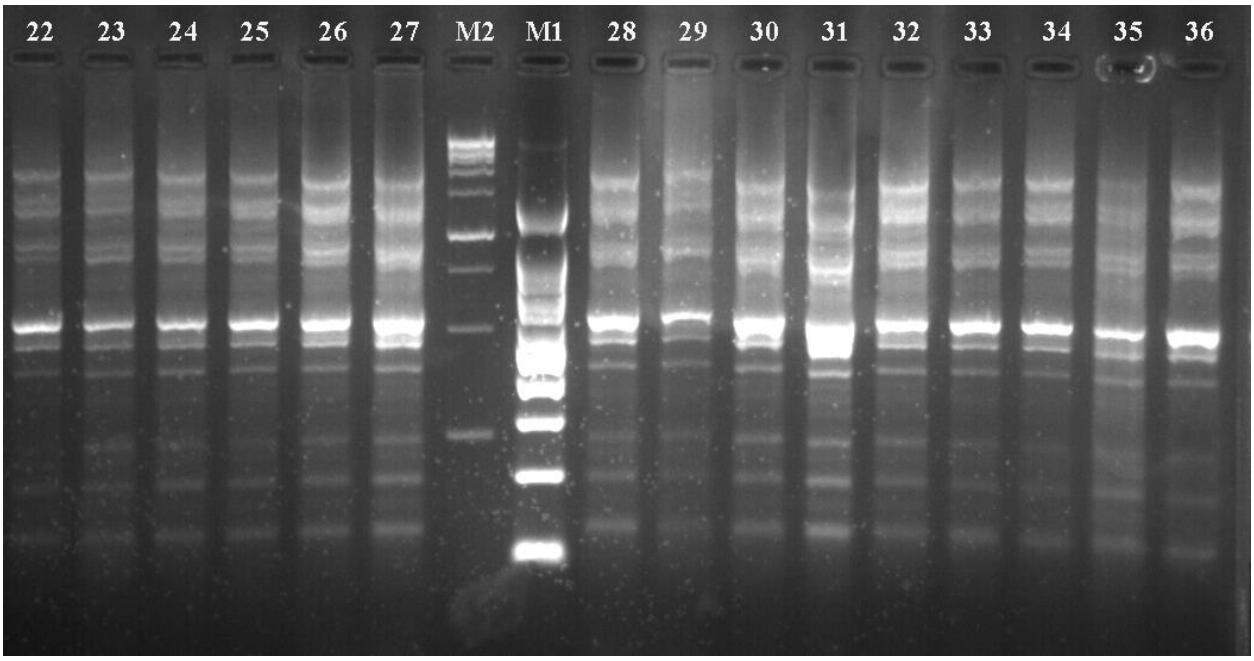
در آنالیز ۱۸ ایزوله *کمپیلوباکترژژونی* با این نشانگر، باندهای مختلف معادل ۲۱۰۰-۱۱۰ جفت باز مشاهده شد (شکل ۱۲) که همگی در ۱ پروفایل با قرابتی معادل ۱۰۰-۸۰ درصد قرار گرفتند (شکل۱۳). در مورد ایزوله‌های *کمپیلوباکترکولی*، در الکتروفورز محصول REP -PCR باندهای مختلف در محدوده، ۱۹۰۰-۱۱۰ جفت باز مشاهده شد (شکل ۱۴) که در آنالیز الگوی باندی حاصله، قرابتب معادل ۱۰۰ درصد در بین آن‌ها مشاهده شد (شکل ۱۵).



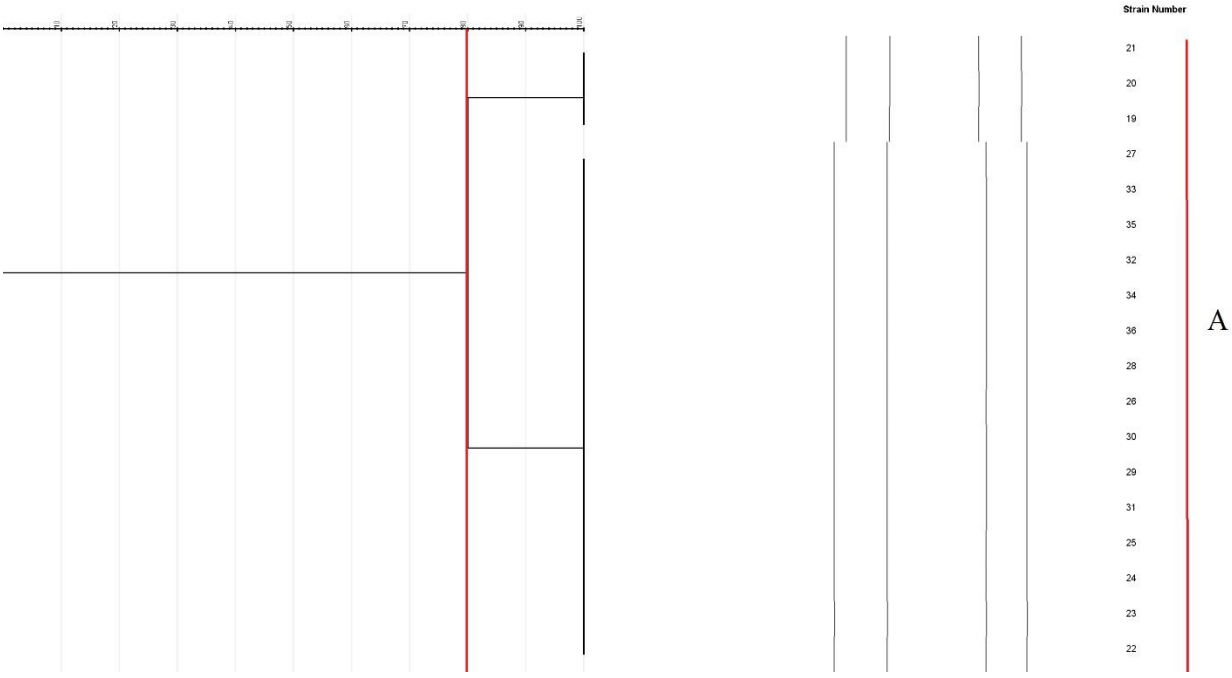
شکل ۱۲- ژل حاصل از الکتروفورز محصول Rep-PCR در مورد ایزوله‌های *کمپیلوباکترژژونی* جدا شده از گوشت خام مرغ (ستون M1= مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA، ستون M2= مارکر ۱ کیلو بازی DNA)



شکل ۱۳- دندروگرام حاصل از ژنوتایپینگ ایزوله‌های *کمپیلو باکتر ژژونی* جدا شده از گوشت خام مرغ با نشانگر Rep-PCR



شکل ۱۴- ژل حاصل از الکتروفورز محصول Rep-PCR در مورد ایزوله‌های *کمپیلوباکترکولی* جدا شده از گوشت خام مرغ (ستون M1= مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA، ستون M2= مارکر ۱ کیلو بازی DNA)



شکل ۱۵- دندروگرام حاصل از ژنوتایپینگ ایزوله‌های *کمپیلو باکتر کولی* جدا شده از گوشت خام مرغ با نشانگر Rep-PCR

بحث:

تشخیص سریع و دقیق پاتوژن‌های زئونوز برای رسیدگی به وضعیت بیمار، کنترل بیماری و حفاظت از سلامت عمومی امری ضروری می‌باشد. یکی از پاتوژن‌های مهم زئونوز، باکتری کمپیلوباکتر است که به‌عنوان عامل اصلی ایجاد عفونت باکتریایی در دستگاه گوارش شناخته شده است. طیور (شامل گوشت خام، فرآورده‌های مرغ و محصولات جانبی) به‌عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل خطر برای ایجاد کمپیلوباکتریوز انسانی شناسایی شده‌اند(۱۹). در مطالعه Kovalenko و همکاران در سال ۲۰۱۳ مشخص شد که پوست مرغ شایع‌ترین محل برای کلونیزه شدن گونه‌های گرمادوست *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* بوده و این محصول با بیش‌ترین موارد بروز کمپیلوباکتریوزیس در انسان مرتبط است (۲۰). درمطالعه حاضر از سه روش مبتنی بر PCR یعنی ERIC-PCR, RAPD-PCR, Rep-PCR به منظور ژنوتایپینگ جدایه های *کمپیلوباکترژژونی* و*کمپیلوباکترکولی* استفاده شد و الگوی ژنتیکی جدایه های مورد نظر با سه روش یاد شده ارزیابی شد. نتایج به دست آمده نشان دادکه جدایه های مورد مطالعه در هریک از ۳ روش مورد استفاده دارای الگوی باندی (قطعات تکثیر شده DNA) متفاوتی هستند .این تنوع در تعداد باندها می‌تواند مربوط به توالی پرایمر مورد استفاده، دسترسی به مکان‌های متعدد اتصال پرایمر در ژنوم و یا کیفیت DNA الگو باشد. تمام جدایه های مورد مطالعه دارای الگوی باندی پلی مورفیک بودند و هیچ مونوفورمیسم باندی برای هیچ کدام از ایزوله‌ها مشاهده نشد. وجود الگوی باندی پلی مورفیک در استفاده از تکنیک‌های به کار برده شده نشان می‌دهد که سرعت بالایی از پلی مورفیسم در ژنوم *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* وجود دارد و سازگاری واقعی در این باکتری‌ها با ژنومی به طول ۵۵۷۰ فریم خوانش راپیش بینی می‌کند. نکته مهم در تفسیر نتایج حاصل از ژنوتایپینگ ایزوله‌های میکروبی با تکنیک‌های وابسته به PCR این است که، ایزوله‌هایی که دارای الگوی باندی کاملاً مشابه بوده و هیچ تفاوتی در تعداد و اندازه‌های قطعات تکثیر شده در PCR ندارند، به‌عنوان یک کلون محسوب می‌شوند. کلونی که بیشترین فراوانی را داشته باشد کلون A محسوب می‌شود و ایزوله‌هایی که در ۳-۲ باند با کلون A متفاوت باشند کلونA_1، ایزوله‌هایی که دارای ۶-۴ باند متفاوت باشند کلون A_2 و ایزوله‌هایی با حداقل ۷ باند متفاوت، کلون نامرتبط قلمداد می‌شوند (۲۱). در مطالعه Igwaran، Okoh در سال ۲۰۲۰ از مجموع ۴۰۲ ایزوله کمپیلوباکتر جداشده از منابع مختلف (گوشت، شیر گاو و آب) در مناطق مختلف، ۸۵ ایزوله *کمپیلوباکترژژونی* و ۶۷ ایزوله *کمپیلوباکترکولی* شناسایی شد که از این تعداد ۷۱ ایزوله (۳۵ ایزوله *کمپیلوباکترکولی* و ۳۶ ایزوله *کمپیلوباکترژژونی*) جهت مطالعه ژنوتایپینگ انتخاب شدند. آنالیز الگوی باندی حاصل از آزمایش ایزوله‌ها با روش ERIC-PCR با نرم‌افزار GelJ نشان دادند که ۳۶ ایزوله *کمپیلوباکترژژونی* مورد مطالعه در ۲۹ پروفایل و ۴ کلاستر و ۳۵ ایزوله *کمپیلوباکترکولی* در ۲۹ پروفایل و ۶ کلاستر قرار گرفتند. نتایج این مطالعه نشان‌گر تنوع ژنتیکی بالا در ایزوله‌های *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* جداشده از منابع مختلف بود(۲۲). در مطالعه حاضر در روشERIC-PCR ، ۳۶ ایزوله کمپیلوباکتر جدا شده از گوشت خام مرغ در ۷پروفایل و ۱۸ ایزوله انتخابی *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* به ترتیب در ۳ و۴ پروفایل قرار گرفتند . در مطالعه‌ای در ایران، Staji و همکاران (۲۰۱۸)، به مقایسه دو روش RAPD و ERIC در دسته‌بندی ژنتیکی ایزوله‌های *کمپیلوباکترژژونی* جداشده از مدفوع جوجه‌های گوشتی و بوقلمون پرداختند. در این مطالعه ۶۰ ایزوله (۳۰ ایزوله جداشده از مدفوع جوجه‌های گوشتی و ۳۰ ایزوله جداشده از مدفوع بوقلمون‌های پرورشی) ارزیابی شد.۶۰ ایزوله مورد نظر در روش RAPD در ۶ پروفایل و در روش ERIC در ۲۱ پروفایل قرار گرفتند. یکی از پروفایل‌های متعلق به ایزوله‌های جداشده از جوجه‌های گوشتی قرابتی معادل ۸۳ درصد با ایزوله‌های جداشده از مدفوع بوقلمون داشت. وجود این تشابه ژنتیکی نشان‌گر آلودگی متقاطع بین نمونه‌ها بود (۱۶). در مطالعه حاضر، با به کارگیری تکنیک RAPD-PCR ۳۶ ایزوله کمپیلوباکتر

جدا شده از گوشت خام مرغ در ۳ پروفایل و ۱۸ ایزوله *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* مورد مطالعه، هر کدام در ۲ پروفایل قرار گرفتند. Ammar و همکاران در سال ۲۰۲۱ در مطالعه‌ای مشابه با مطالعه حاضر، خصوصیات مولکولی (الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و توزیع عوامل حدت) و دسته‌بندی ژنتیکی ایزوله‌های *کمپیلوباکترژژونی* جداشده از منابع انسانی و دامی را ارزیابی کردند. در این مطالعه ۳۲/۸ درصد از ایزوله‌های جداشده از مدفوع انسان و گوشت خام مرغ مقاومت چندگانه آنتی‌بیوتیکی داشته و در روش ERIC-PCR در ۵ کلاستر قرار گرفتند (۲۳). مطالعات انجام شده در خصوص ژنوتایپینگ ایزوله‌های میکروبی، شباهت قابل توجهی را بین منبع سویه‌های *کمپیلوباکترژژونی* و بروز عفونت همه گیر با این باکتری در زمان استفاده از نشانگر RAPD-PCR در یک دوره زمانی خاص در منطقه‌ای تعریف شده را معرفی می‌کند (۲۷-۲۴). مطالعه‌ای در سال ۲۰۲۰ نشان داد که برخی از سویه‌های *کمپیلوباکترکولی* هیچ گونه پلی موزفیسم باندی در الکتروفورز محصول PCR نداشتند و شباهت ژنتیکی بالای ۱۰۰ درصد را نشان دادند. در این مطالعه،۳۵ ایزوله *کمپیلوباکترکولی* آنالیز شده در ۲۹ ژنوتیپ گروه بندی شدند (۲۸). مطالعات قبلی نشان دادند که REP-PCR می‌تواند به طور قابل اعتمادی تحت گروه‌های کمپیلوباکتر را از همدیگر متمایز کند و به عنوان یک روش تایپینگ ارزان و قابل اعتماد استفاده شود(۲۹).

Behringer و همکاران در سال ۲۰۱۱، ۱۰۰ نمونه از طیور زنده و گوشت طیور گوشتی را جمع‌آوری کرده و با روش‌های REP-PCR، PFGE، MLST، flaA-RFLP آنالیز کرده‌اند. تمام این روش‌ها همزمان برای تشخیص *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* انجام شد. ژنوتایپینگ ایزوله‌ها با روش REP-PCR برای تمایز سویه‌های *کمپیلوباکترژژونی* بهتر از *کمپیلوباکترکولی* بود ولی در هر دو روش REP-PCR و flaA-RFLP ایزوله‌های وجود داشتند که بین *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* غیرقابل تمایز بودند و به نظر می‌رسید به‌صورت تصادفی بوده و هیچ ارتباطی به گونه، مکان و منبع ندارد. اما نتایج PFGE و MLST مرتبط با مکان جغرافیایی نمونه‌ها بود. دو روش، PFGE و MLST بیشترین هماهنگی و تشابه را با هم داشتند. و همچنین قدرت تمایز بالاتری نسبت به REP-PCR و flaA-RFLP برای تفکیک *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* از خود نشان دادند (۳۰).

Ghorbanalizadgan و همکاران در سال ۲۰۱۶، ۴۰۰ نمونه از مدفوع کودکان زیر ۵ سال را از نظرحضور ژن *flaA* در گونه‌های کمپیلوباکتر به روش RFLP مورد بررسی قرار داده و با نرم‌افزار MEGA آنالیز کردند که به ترتیب ۴۳ و ۱۲ نمونه از نمونه‌های موردمطالعه از نظر سایت‌های بررسی در ژن *flaA* متفاوت و جدید بودند. روش RFLP روشی، ارزان و سریع و قابل‌اعتماد برای مطالعات اپیدمیولوژیک جدایه‌های *کمپیلوباکترژژونی* و تعیین منابع آلودگی در جوامع بزرگ و کوچک است (۳۱).

در انتخاب نوع روش تیپ بندی مولکولی، باید قدرت تکنیک، تکرارپذیری نتایج، سادگی روش، وسعت کاربرد، سرعت انجام و سهولت تفسیر نتایج را در نظر گرفت. روش‌های نوین مولکولی برخلاف روش‌های متداول فنوتیپی که بر مبنای خصوصیات ظاهری و تغییرپذیر می‌باشند، بر پایه ترادف غیرقابل تغییر یا کم تغییرپذیر ژنی در میکروارگانیسم مربوطه استوار بوده و کمتر تحت تأثیر شرایط محیطی قرار می‌گیرند. این روش‌ها در مقایسه با روش‌های سنتی، قدرت افتراق دهی بالاتر و کاربرد گسترده‌تری برای انواع گونه‌های میکروبی دارند (۳۲).

در مطالعه Strakova و همکاران (۲۰۲۳)، چهار روش مختلف ژنوتایپینگ باکتری‌ها شامل روش‌های Core Genome Multilocus Sequence Typing (cgMLST), Multilocus Sequence Typing (MLST), Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) و Multiplex PCR binary Typing جهت دسته بندی ژنتیکی ایزوله‌های *کمپیلوباکتر ژژونی* جدا شده از منابع مختلف غذایی مقایسه گردید. نتایج نشان داد که هر چند روش multiplex PCR binary typing دارای

حساسیت کمتری از سه روش دیگر است اما می‌تواند برای ژنوتایپینگ باکتری‌ها بر پایه حضور انواع ژن‌های حدت مورد استفاده قرار گیرید (۳۳).

بر اساس مطالعاتی که در گذشته انجام شده میزان بالایی از پلی مورفیسم در ژنوم این باکتری گزارش شده است(۱۶،۱۷). ارتباط بین نتایج روش‌های به کار برده شده نشان می‌دهد که در ایزوله‌های کمپیلوباکتر جدا شده پلی مورفیسم زیادی وجود دارد که اکثراً به دلیل سرعت بالا در تغییرات ژنتیکی است. این تنوع بالا ممکن است یکی از مزایای انتخابی برای یک سویه باشد تا خود را به محیط عادت دهد و می‌تواند برای انتشار و اهلی شدن سویه‌های وحشی مفید باشد. تنوع ژنتیکی می‌تواند ناشی از استقرار متقاطع یا آلودگی با منبع یکسان یا کسب ژن‌های مستقل از سویه‌های محیطی باشد. انتقال دام به دام نیز هر چند احتمال پائینی دارد، اما احتمال آن صفر نیست. تائید انتقال آلودگی متقاطع به طور دقیق و صحیح امکان پذیر نمی‌باشد، زیرا عوامل مختلفی در این امر دخالت دارند و وجود هر یک از الگوهای باندینگ در باکتری کمپیلوباکتر می‌تواند سویه محیطی غالب در یک مکان را نشان دهد.

نتیجه گیری:

در مقایسه روش‌های مختلف ژنوتایپینگ عوامل عفونی، سهولت در انجام کار و به کارگیری روش مورد نظر حائز اهمیت است. از طرف دیگر هرچه تعداد باندهای ایجاد شده برای یک جدایه در یک تکنیک بیشتر باشد امکان افتراق بین سویه‌ها افزایش می‌یابد. بنابراین با توجه به دو مورد یاد شده و بر اساس نتایج به دست آمده در این مطالعه روش ERIC-PCR روش مناسب‌تری برای تایپینگ و دسته بندی جدایه های مختلف کمپیلوباکتر می‌باشد .از طرفی تکنیک‌های مورد استفاده در این مطالعه یعنی روش‌های ERIC-PCR و Rep-PCRو RAPD-PCR هر کدام ابزارهایی قدرتمند در دسته بندی گونه‌های کمپیلوباکتر هستند. اما روش‌های پیشرفته‌تر مولکولی مانند PFGE به منظور ژنوتایپینگ این باکتری توصیه می‌گردد. با توجه به این که منبع جداسازی جدایه ها با یکدیگر متفاوت است، بنابراین برقراری ارتباط آماری بین الگوهای باندی ایجاد شده در هر تکنیک مقدور نمی‌باشد.

منابع:

1. Shakrian A, Rukni N, Sharifzadeh A, Al-Agha S, Talebian R. Campylobacter jejuni as a potential pathogen in the liver of slaughtered poultry and poultry meat supply stores in Shahrekord. Iranian Journal of Food Sciences and Technology. 2014;1(4):43-50 [In Persion].
2. Soto-Beltrá n M, Lee BG, Amézquita-López BA, Quiñones B. Overview of methodologies for the culturing, recovery and detection of Campylobacter. International Journal of Environmental Health Research. 2023 Mar 4;33(3):307-23.
3. Feucherolles M, Nennig M, Becker SL, Martiny D, Losch S, Penny C, Cauchie HM, Ragimbeau C. Investigation of MALDI-TOF mass spectrometry for assessing the molecular diversity of Campylobacter jejuni and comparison with MLST and cgMLST: a luxembourg one-health study. Diagnostics. 2021 Oct 20;11(11):1949.
4. Fung F, Wang HS, Menon S. Food safety in the 21st century. Biomed. J., 41 (2): 88-95.
5. Jo Y, Oh HM, Yoon Y, Lee SY, Ha JH, Kim WI, Kim HY, Han S, Kim SR. Enrichment broth for the detection of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli in fresh produce and poultry. Journal of food protection. 2017 Nov 1;80(11):1842-50.
6. Marotta F, Di Marcantonio L, Janowicz A, Pedonese F, Di Donato G, Ardelean A, Nuvoloni R, Di Giannatale E, Garofolo G. Genotyping and antibiotic resistance traits in Campylobacter jejuni and coli from pigs and wild boars in Italy. Frontiers in cellular and infection microbiology. 2020 Oct 15;10:592512.
7. Marotta F, Garofolo G, Di Marcantonio L, Di Serafino G, Neri D, Romantini R, Sacchini L, Alessiani A, Di Donato G, Nuvoloni R, Janowicz A. Antimicrobial resistance genotypes and phenotypes of Campylobacter jejuni isolated in Italy from humans, birds from wild and urban habitats, and poultry. PloS one. 2019;14(10):e0223804.
8. Shakir ZM, Alhatami AO, Ismail Khudhair Y, Muhsen Abdulwahab H. Antibiotic resistance profile and multiple antibiotic resistance index of Campylobacter species isolated from poultry. Archives of Razi Institute. 2021;76(6):1677-86.
9. Salimi H, Owlia P, Yakhchali B, Rastegar Lari A. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* in burn patients using PCR– restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA analysis. Iranian Journal of Medical Sciences. 2010;35(3):236-41.
10. Wolska K, Kot B, Jakubczak A, Rymuza K. BOX-PCR is an adequate tool for typing of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates. Folia Histochemica et Cytobiologica. 2011;49(4):734-8.
11. Hadiyan M, Momtaz H, Shakerian A. Prevalence, antimicrobial resistance, virulence gene profile and molecular

typing of Campylobacter species isolated from poultry meat samples. Veterinary Medicine and Sciences. 2022;8(6):2482-93.
12. Rahimi E, Momtaz H, Bonyadian M. PCR detection of Campylobacter sp. from turkey carcasses during processing plant in Iran. Food Control. 2010;21(5):692-4.
13. Rahimi E, Momtaz 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;89(5):1015-20.
14. Bardoň J, Pudova V, Koláčková I, Karpíšková R, Röderová M, Kolář M. Virulence and antibiotic resistance genes in Campylobacter spp. in the Czech Republic. Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie: casopis Spolecnosti pro epidemiologii a mikrobiologii Ceske lekarske spolecnosti JE Purkyne. 2017;66(2):59-66.
15. BaniSharif GR, Karimi S, Momtaz H. Determining the pattern of virulence factors and antibiotic resistance in Campylobacter jejuni and Campylobacter coli strains isolated from the liver of meat halves slaughtered in Chaharmahal and Bakhtiari province. New finding in Veterinary Microbiology. 2019;2(1):15-25 [In Persian].
16. Staji H, Birgani SF, Raeisian B. Comparative clustering and genotyping of Campylobacter jejuni strains isolated from broiler and turkey feces by using RAPD-PCR and ERIC-PCR analysis. Annals of microbiology. 2018;68(11):755-62.
17. Yadav R, Yadav J, Gahlot K, Purva M, Deora A, Kumar P, Nathawat P, Rathore NS, Maherchandani S, Kashyap SK. Repetitive extragenic palindromic-PCR (REP-PCR) typing of Campylobacter jejuni isolated from poultry. Veterinary Practitioner. 2017;18(2).160-2.
18. 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;16(1):1-8.
19. Hormeno L, Palomo G, Ugarte-Ruiz M, Porrero MC, Borge C, Vadillo S, Piriz S, Dominguez L, Campos MJ, Quesada A. Identification of the main quinolone resistance determinant in Campylobacter jejuni and Campylobacter coli by MAMA-DEG PCR. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2016;84(3):236-9.
20. Kovalenko K, Roasto M, Liepinš E, Mäesaar M, Hörman A. High occurrence of Campylobacter spp. in Latvian broiler chicken production. Food control. 2013;29(1):188-91.
21. Banisharif G, Momtaz H. Genotyping of Pseudomonas aeroginusa isolated from hospital infections. Journal of Microbial World. 2016;9(2):96-107 [In Persion].
22. 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;10(1):1830701.
23. Ammar AM, El-Naenaeey 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;11(1):3.
24. Zimmer M, Barnhart H, Idris U, Lee MD. Detection of Campylobacter jejuni strains in the water lines of a commercial broiler house and their relationship to the strains that colonized the chickens. Avian diseases. 2003;47(1):101-7.
25. Workman SN, Mathison GE, Lavoie MC. Pet dogs and chicken meat as reservoirs of Campylobacter spp. in Barbados. Journal of clinical microbiology. 2005;43(6):2642-50.
26. Stabler RA, Larsson JT, Al-Jaberi S, Nielsen EM, Kay E, Tam CC, Higgins CD, Rodrigues LC, Richardson JF, O'Brien SJ, Wren BW. Characterization of water and wildlife strains as a subgroup of C ampylobacter jejuni using DNA microarrays. Environmental microbiology. 2013;15(8):2371-83.
27. Chuma IS, Nonga HE, Mdegela RH, Kazwala RR. Epidemiology and RAPD-PCR typing of thermophilic campylobacters from children under five years and chickens in Morogoro Municipality, Tanzania. BMC infectious diseases. 2016;16:1-1.
28. García-Sánchez L, Melero B, Diez AM, Jaime I, Canepa A, Rovira J. Genotyping, virulence genes and antimicrobial resistance of Campylobacter spp. isolated during two seasonal periods in Spanish poultry farms. Preventive veterinary medicine. 2020;176:104935.
29. Healy M, Huong J, Bittner T, Lising M, Frye S, Raza S, Schrock R, Manry J, Renwick A, Nieto R, Woods C. Microbial DNA typing by automated repetitive-sequence-based PCR. Journal of clinical microbiology. 2005;43(1):199-207.
30. Behringer M, Miller WG, Oyarzabal OA. Typing of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli isolated from live broilers and retail broiler meat by flaA-RFLP, MLST, PFGE and REP-PCR. Journal of microbiological methods. 2011;84(2):194-201.
31. Ghorbanalizadgan M, Bakhshi B, Najar-Peerayeh S. PCR-RFLP provides discrimination for total flaA sequence analysis in clinical Campylobacter jejuni isolates. Japanese Journal of Infectious Diseases. 2016;69(5):373-7.
32. Loeb M. Host genomics in infectious diseases. Infection & chemotherapy. 2013;45(3):253-9.
33. Strakova N, Michova H, Shagieva E, Ovesna P, Karpiskova R, Demnerova K. Genotyping of Campylobacter jejuni and prediction tools of its antimicrobial resistance. Folia Microbiologica. 2023;10:1-3.

Using of ERIC-PCR, RAPD-PCR, Rep-PCR methods for genotyping of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains isolated from raw chicken meat

Maryam Hadiyan[1], Hassan Momtaz[2*], Amir Shakerian[3]
[1]Ph.D student of Microbiology, Department of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran,
[2*]Department of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran,
[3]Department of Food Hygine, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran,

Email: hamomtaz@yahoo.com, ha.momtaz@iau.ac.ir

Abstract

Campylobacter, especially the two species *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*, having different strains and hosts, are considered one of the most important and common pathogenic bacteria between humans and animals. The present study was conducted with the aim of genetic classification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains isolated from raw chicken meat.

This cross-sectional study was conducted on 36 strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains isolated from raw chicken meat. In order to genotyping the isolates, 36 *Campylobacter* strains .three methods ERIC-PCR, RAPD-PCR, and Rep-PCR were used isolated from raw chicken meat were placed in 7 profiles in ERIC-PCR method, in 3 profiles in RAPD-PCR method and in 3 profiles in REP-PCR method.

All investigated strains had a polymorphic band pattern, which shows a high rate of polymorphism in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* genomes. The methods used in this study are powerful tools for genotyping of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*, but according to the findings, the ERIC-PCR method is a more suitable method than other methods for typing and classifying *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains.

Keywords: *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, ERIC-PCR, RAPD-PCR, Rep-PCR

افزایش ماندگاری فیله ماهی سفید دریای خزر با استفاده از فیلم نانوکامپوزیت حاوی نانوذرات اکسیدروی سنتز شده به روش سبز با استفاده از عصاره کلاهک بادمجان

مهسا صالحی [۱]، امیر شاکریان [۲]، زهره مشاک [۳]*، ابراهیم رحیمی[۱]

۱ گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

مرکز تحقیقات تغذیه و فرآورده های ارگانیک، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران ۲

گروه بهداشت مواد غذایی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران ۳

*نویسنده مسئول مکاتبات: mashak@kiau.ac.ir

چکیده

مقدمه و هدف: فساد مواد غذایی به دلیل فقدان فناوری بسته بندی مناسب یک نگرانی بزرگ جهانی است. انتظار می‌رود فناوری نانو باعث بهبود بسته بندی مواد غذایی شود. در این مطالعه، تاثیرکیتوزان/ آنتوسیانین پوست بادمجان/ نانوذرات اکسیدروی سنتز شده از عصاره کلاهک بادمجان (در سه سطح ۱، ۳ و ۵ درصد) در ماتریس فیلم هیدروکسی پروپیل متیل سلولز بر مدت ماندگاری فیله‌های ماهی سفید دریای خزر بررسی شد. جهت تعیین کیفیت فیله‌های ماهی از آزمون‌های شیمیایی (pH، TVB-N[۲] و TBARs[۳]) و میکروبی (شمارش باکتری‌های سایکروفیل، مزوفیل و انتروباکتریاسه)، ارزیابی حسی (طعم، بو، بافت، رنگ و پذیرش کلی) طی ۱۴ روز (در روزهای ۰، ۱، ۷ و ۱۰ و ۱۴) نگهداری در دمای یخچالی بر روی تیمارها استفاده شد.

میانگین اندازه نانوذرات سنتز شده ۰/۵۲۷ نانومتر بود. توزیع پراکندگی یکنواخت نانو ذرات روی سنتز شده از عصاره کلاهک بادمجان با PDI[۴] برابر ۰/۳۳۲ با آزمون DLS[۵] تأیید شد. بطورکلی، داده‌ها نشان دهنده تأثیر مثبت فیلم بسته‌بندی بر ماندگاری فیله‌های ماهی سفید دریای خزر بود. بالاترین میزان pH، TVB-N و TBARs و جمعیت باکتری‌های مزوفیل، سایکروتروف و انتروباکتریاسه متعلق به نمونه شاهد و پائین‌ترین میزان آن متعلق به فیلم نانوکامپوزیت حاوی ۵٪ نانوذرات اکسیدروی سنتز شده از عصاره کلاهک بادمجان بود. فیله‌های بسته‌بندی شده در به فیلم نانوکامپوزیت حاوی ۵٪ نانوذرات اکسیدروی در طی دوره ذخیره‌سازی بالاترین امتیاز حسی را داشتند. بنابراین فیلم نانوکامپوزیت تولید شده می‌تواند به عنوان بسته‌بندی فعال برای افزایش مدت زمان ماندگاری فیله ماهی دریای خزر استفاده شود.

کلیدواژه: فیلم بسته‌بندی، ماهی سفید دریای خزر، نانوذرات اکسیدروی، سنتز سبز، عصاره کلاهک بادمجان

---

[۲] Total volatile basic nitrogen
[۳] Thiobarbituric acid reactive substances
[۴] Polydispersity Index
[۵] Dynamic light scattering

مقدمه

ماهی سفید دریای خزر (*Rutilusfrisii kutum*) متعلق به خانواده کپور ماهیان است که طی سال‌های اخیر هر ساله بیش از ۵۰ در صد صید ماهیان استخوانی دریای خزر را به خود اختصاص داده است (۱). صرف نظر از اهمیت اقتصادی، تغذیه‌ای، حضور پروتئین‌های ضروری، محتوی اسید چرب غیر اشباع بالا (خصوصاً ω_6 و ω_3)، پروفایل اسیدهای آمینه و لذیذ بودن گوشت این ماهی سبب شده که بسیار مورد استقبال مصرف کننده قرار بگیرد. عمر مفید و کیفیت ماهی به دلیل افزایش تقاضای مصرف کننده برای مصرف ماهی بسیار مهم است (۲). طبق گزارش ارائه شده از طرف سازمان غذا و دارو آمریکا (FAO[۶])، حدود ۸۸ درصد از کل تولید ماهی برای مصرف مستقیم انسان مورد استفاده قرار گرفته و محبوب‌ترین شکل‌های مصرف آن بصورت تازه یا سرد (۴۴ در صد) و سپس به شکل منجمد (۳۵ در صد) می باشد که این امر بر اهمیت نوع ذخیره سازی ماهی تاکید می‌نماید (۳). در روش سنتی نگهداری ماهی، دمای انجماد (عموماً ۱۱- درجه سلسیوس)، کاهش ارزش کیفی ماهی را به دنبال دارد.

استفاده از فیلم‌های بسته بندی زیست‌تخریب‌پذیر با اثرات آنتی اکسیدانی و ضدمیکروبی از جمله راهکارهایی جهت افزایش ماندگاری موادغذایی است (۴). هیدروکسی پروپیل متیل سلولز یک اتر نیمه سنتزی، غیر یونی، کم هزینه و شفاف مشتق شده از سلولز است که به عنوان یک افزودنی غذایی برای افزودن مستقیم به غذا برای مصرف انسان توسط کمیسیون اروپا (۲۰۱۱) به عنوان یک افزودنی غذایی ایمن با شماره E 464 تایید شده است (۵). این پلیمر زیستی محلول در آب است و به طور گسترده در صنایع غذایی به عنوان امولسیفایر، تثبیت کننده، غلیظ کننده، عامل تعلیق و مواد تشکیل دهنده فیلم استفاده می شود (۶). فیلم‌های مبتنی بر هیدروکسی پروپیل متیل سلولز دارای شفافیت خوب، انعطاف پذیری، مقاومت در برابر چربی و روغن با استحکام متوسط و نفوذپذیری کارآمد در برابر انتقال اکسیژن هستند (۷). با این حال، آنها به دلیل ماهیت آبدوستی ذاتی خود در برابر رطوبت بسیار حساس هستند (۸). این یک نقطه ضعف برای کاربردهای صنعتی آن‌ها جهت بسته‌بندی مواد غذایی با فعالیت آبی بالا است. تقویت فیلم هیدروکسی پروپیل متیل سلولز با ترکیبات زیست فعال می‌تواند منجر به بهبود خواص ضدمیکروبی و آنتی اکسیدانی آن و در نتیجه حفظ و حتی بهبود ویژگی‌های حسی موادغذایی شود (۹).

کیتوزان یک پلی ساکارید است که از استیل زدایی کیتین به دست می‌آید. کیتوزان دومین پلی ساکارید فراوان در طبیعت پس از سلولز است و در اسکلت بیرونی سخت پوستان و حشرات به وفور یافت می شود (۱۰). کیتوزان به دلیل پروتونه شدن گروه‌های NH_2 در محلول‌های آبی با pH پایین ،محلول است و به دلیل رفتار کاتیونی خود از رشد طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها جلوگیری می‌کند (۱۱). علاوه بر این، این پلی ساکارید خواص بسیار عالی تشکیل فیلم و مانع قابل قبولی در برابر گازهایی مانند CO_2 و O_2 دارد (۱۲). این هم افزایی ممکن است با تشکیل پیوندهای هیدروژنی بین مولکولی قوی بین گروه‌های NH_2 کیتوزان و OH هیدروکسی پروپیل متیل سلولز مرتبط باشد.

[۶] Food and Agriculture Organization

آنتوسیانین‌ها ترکیبات فنلی محلول در آب طبیعی با قابلیت‌های آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی هستند (۱۳). بنابراین، آن‌ها می‌توانند معایب هیدروکسی پروپیل متیل سلولز در خواص ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی را جبران کنند. پوست بادمجان منبع خوبی از آنتوسیانین‌ها و یکی از مهم‌ترین فلاونوئیدها است که دارای خواص آنتی‌اکسیدانی است (۱۴, ۱۵).

در میان چندین ترکیب غیر سمی و ضدباکتریایی که به عنوان افزودنی در بسته بندی استفاده شده است، نانوذرات اکسیدروی به عنوان یک عامل ایمن و عنصر ضروری برای سلامتی در صنایع غذایی در نظر گرفته شده است. اگرچه نانوذرات اکسید روی با استفاده از روش‌های فیزیکی-شیمیایی مختلف سنتز شده‌اند، اما در سال‌های اخیر سنتز نانو ذرات اکسیدروی با استفاده از روش‌های زیستی و سازگار با محیط زیست نظیر استفاده از عصاره‌های گیاهی، اهمیت بسیاری پیدا کرده است (۱۶). سنتز سبز روشی آسان، سریع و سازگار با محیط زیست است. چندین مطالعه استفاده از نانوذرات اکسیدروی را در کامپوزیت‌های بیوپلیمری برای بسته‌بندی فعال مواد غذایی برای از بین بردن باکتری‌های مضر گزارش کرده‌اند (۱۷-۲۰).

بنابراین، در این مطالعه، نانوذرات اکسیدروی از طریق روش سبز آسان، سریع و سازگار با محیط زیست با استفاده از عصاره کلاهک بادمجان سنتز شدند و پس از آن غلظت های مختلف نانوذرات اکسیدروی به عنوان یک افزودنی ضدمیکروبی در فیلم نانوکامپوزیت هیدروکسی پروپیل متیل سلولز/کیتوزان/آنتوسیانین پوست بادمجان ترکیب شدند. فیلم‌های نانوکامپوزیت سنتز شده روی فیله ماهی سفید دریای خزر اعمال شد و عملکرد نگهداری طی ۱۴ روز نگهداری در دمای ۴ درجه سلسیوس ارزیابی شد.

مواد و روش کار

مواد

مواد اولیه طرح شامل بادمجان، ماهی سفید دریای خزر از بازار خریداری شدند. همچنین کلیه‌ی مواد شیمیایی مورد استفاده در این مطالعه از نمایندگی‌های معتبر شرکت مرک خریداری شدند.

استخراج آنتوسیانین پوست بادمجان

ابتدا نمونه‌های بادمجان پوست کنده، تفاله آن جدا شد. سپس پوست بادمجان را شسته و خشک کرده و در خشک کن الکتروترمال بلاست به قطعات کوچک برش داده شدند. تکه‌های کوچک پوست بادمجان با وزن ثابت در دمای ۶۰ درجه سیلسوس پخته و به پودر تبدیل شد. برای استخراج از حلال اتانولی و روش اولتراسونیک (فرکانس ۱۲/۵ کیلوهرتز به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سلسیوس) استفاده شد. برای این منظور ۲۵ گرم پودر بادمجان به یک فلاسک ته گرد حاوی مقدار معینی اتانول بی‌آب (نسبت ۱۵:۱) اضافه شد و سپس آن را تکان داده و برای مدت معینی حرارت داده شد. عصاره استخراج شده به فالکون سانتریفیوژ منتقل و پس از سانتریفیوژ، مایع رویی جدا شد (۲۱).

تهیه عصاره کلاهک بادمجان

مقدار ۱ گرم پودر کلاهک بادمجان با ۲۰ میلی‌لیتر اتانول (۷۰ درصد) مخلوط شد. مخلوط در یک حمام آب اولترا سونیک با فرکانس ۴۰ کیلوهرتز، ۴۰ درجه سلسیوس، به مدت ۳۰ دقیقه تیمار شد. سپس نمونه‌ها با سرعت ۶۵۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سه مرحله استخراج متوالی انجام، و حجم‌های مایع رویی حاصل با هم جمع‌آوری شد (۲۲).

سنتزسبز نانو ذرات روی با عصاره کلاهک بادمجان

ماده اصلی سنتز نانو ذرات روی، نیترات روی است که با درجه خلوص ۹۹/۹۸ درصد به همراه کربنات آمونیوم با درجه خلوص ۹۹/۵ درصد تهیه شد، لازم به ذکر است که در تهیه محلول‌های فوق از آب دیونیزه شده استفاده شد، همچنین با استفاده از روش سنتز سبز از کلاهک بادمجان محلول ذرات روی تهیه شد. ۲۰۰ میلی‌لیتر محلول آبی نیترات روی (۱/۵ میلی‌مولار) با ۲۰ میلی‌لیتر از عصاره کلاهک بادمجان مخلوط شد و متعاقباً با ۱ مولار هیدروکسید سدیم (۱۰ میلی‌لیتر) تیمار شد. یون‌های آغازکننده واکنش توسط نیترات روی در آب دی یونیزه به دست آمد. مخلوط واکنش با هم زدن مداوم در تاریکی در دمای ۶۰ درجه سلسیوس برای جلوگیری از کاتالیز نوری انکوبه شد. تشکیل رنگ سفید، تشکیل نانوذرات روی ZnONPs[۷] در پایان ۲۴ ساعت مشخص کرد. محصول به دست آمده با سانتریفیوژ بیشتر خالص‌سازی شد و به ترتیب در آب دوبار تقطیر و اتانول شسته و خشک شد (۲۳).

تهیه فیلم هیدروکسی پروپیل متیل سلولز/کیتوزان/آنتوسیانین پوست بادمجان/ نانو ذرات روی

فیلم نانوکامپوزیت مبتنی بر هیدروکسی پروپیل متیل سلولز/کیتوزان از طریق تکنیک تبخیر ریخته‌گری حلال تهیه شدند. محلول تشکیل فیلم با حل کردن ۱ گرم از کیتوزان در ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول اسید استیک (۲ درصد v/v) تهیه و برای حذف ذرات حل نشده از فیلتر پنبه‌ای فیلتر شد. ۰/۵ گرم هیدروکسی پروپیل متیل سلولز در ۳۰ میلی‌لیتر آب بصورت سوسپانسیون تهیه و به مدت ۳۰ دقیقه به شدت هم زده شد و سپس ۲۰ میلی‌لیتر آب سرد به آن اضافه شد تا کاملاً حل شود. محلول کیتوزان به آن افزوده، با استفاده از همزن مغناطیسی در دمای اتاق به مدت ۱ ساعت مخلوط شد. ۱۰ درصد وزنی آنتوسیانین به مخلوط اضافه و به مدت ۱ ساعت هم زده شد. در نهایت، نانوذرات تهیه شده در سه سطح ۱، ۳ و ۵ درصد به آن‌ها افزوده شد. محلول فیلم تشکیل شده درون ظروف‌شش پتری شیشه‌ای (شعاع ۱۰ سانتی‌متر) ریخته شد و در دمای ۲ ± ۲۷ درجه سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت خشک شدند (۲۴).

جدول ۱- تیمارهای تحقیق

تیمار	فرمولاسیون
C1	فیلم شاهد (فیلم هیدروکسی پروپیل متیل سلولز (HPMC[۸]))
C2	HPMC/ کیتوزان
C3	HPMC/ کیتوزان/ ۱۰ درصد وزنی آنتوسیانین پوست بادمجان
C4	HPMC/ کیتوزان/ ۱۰ درصد وزنی آنتوسیانین پوست بادمجان / ۱ درصد نانو ذارت اکسیدروی
C4	HPMC/ کیتوزان/ ۱۰ درصد وزنی آنتوسیانین پوست بادمجان / ۳ درصد نانو ذارت اکسیدروی
C6	HPMC/ کیتوزان/ ۱۰ درصد وزنی آنتوسیانین پوست بادمجان / ۵ درصد نانو ذارت اکسیدروی

[۷] Zinc Oxide Nanoparticles

[۸] Hydroxypropyl methylcellulose

تعیین اندازه ذرات و چگونگی پراکنش نانو ذرات روی

بررسی اندازه و چگونگی پراکنش ذرات نانو تشکیل شده بوسیله پارتیکل سایز آنالایزر (Horiba، مدل SZ100، ژاپن) صورت گرفت، بدین منظور ذرات نانویی که در آب یون زدایی شده بود، مورد ا ستفاده قرار گرفت، بدین ترتیب ۲ میلی‌لیتر از محلول حاوی نانو ذرات به دستگاه اضافه شد و نتایج بر اساس (قطر ۱۰درصد از نانو ذرات یا d ۱/۰) یا (قطر ۵۰ ٪ از نانو ذرات یا d ۵/۰) یا (قطر ۹۰ ٪ از نانو ذرات یا d ۹/۰) و قطر حجم میانگین نانو ذرات گزارش شد، همچنین قطر نانو ذرات برای ۱۰ نمونه تشکیل شده تصادفی با استفاده از میکروسکوپ نوری بوسیله آنالیز تصویری نرم افزار مدل (Lica DMLB) نیز مورد برر سی قرار گرفت (۲۵).

آزمون‌های ماهی

ماهی سفید دریای خزر از محل فروش ماهی با وزن متوسط ۶۰۰-۶۵۰ گرم تهیه و بلافاصله در ظروف حاوی یخ به آزمای شگاه میکروبیولوژی دان شگاه آزاد ا سلامی واحد علوم و تحقیقات منتقل گردید. پس از سر و دم زنی و تخلیه امعا و احشا و جداسازی پوست و استخوان از هر ماهی ۲ فیله تهیه گردید. فیلم‌های نانوکامپوزیت تهیه شده بر روی نمونه‌های ماهی قرار گرفت و در دمای ۴ درجه سلسیوس، به مدت ۱۴ روز (۰ و۱ و۷ و۱۰ و ۱۴) ارزیابی شد.

آزمونهای شیمیایی:

-اندازه‌گیری pH

pH نمونه‌ها تو سط pHمتر اندازه‌گیری شد. ابتدا pH دستگاه با بافر استاندارد در pH ۳ و ۷ کالیبره (تنظیم) شد. ۵ گرم از نمونه با دو برابر آب مقطر (g/l) همگن شد و سپس در دمای ۲۵ درجه سلسیوس، pH نمونه‌ها تعیین شد (۲۶).

-ا ندازه گ یری ماده وا کنش د ه نده با اسید تیوباربیتوریک (TBARS)

مقدار TBARS به صورت کالریمتریک (رنگ سنجی) انجام شد. حدود ۱۰ گرم از نمونه گوشت ماهی وزن شده و با ۱ میلی‌لیتر از BHT[۹] (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و ۳۵ میلی‌لیتر از تری کلرواستیک اسید (۵ درصد) هموژن شدند. محلول هموژن به د ست آمده به یک فلا سک انتقال داده شده و سپس ۱۰۰ میلی‌لیتر از آب مقطر اضافه و تقطیر شد. بعد از جمع آوری ۵۰ میلی‌لیتر از تقطیر شده (عصاره)، محلول از طریق یک کاغذ صافی (واتمن شماره یک) فیلتر شد. ۵ میلی‌لیتر از محلول فیلتر شده با ۵ میلی‌لیتر از محلول تیوباربیتوریک ا سید (۰/۰۲ مولار) ترکیب و در حمام آب با دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ دقیقه قرار گرفت. بعد از سرد کردن، جذب در ۵۳۲ نانومتر در برابر آب، به عنوان شاهد، اندازه‌گیری شد. مقدار TBARS بر ا ساس اکی والان میلی‌گرم مالون آلدئید بر یک کیلوگرم نمونه بیان شد (۲۶).

-اندازه‌گیری نیتروژن بازی فرار کل (TVB-N)

ترکیبات نیتروژنی فرار از طریق تقطیر مستقیم ماهی هموژن شده بعد از اضافه کردن منیزیم اکسید اندازه‌گیری شدند. تقطیر حاصل در یک فلاسک که دارای محلول آبی بوریک اسید ۲ درصد، مخلوطی از شناساگرهای متیل قرمز و بروموکروزل سبز (هر کدام ۰/۱ درصد) اتانول بود، جمع آوری شد. سپس محلول بوریک اسید با سولفوریک اسید ۰/۱ نرمال تیتر شد. مقدار نیتروژن کل فرار بازی (میلی‌گرم نیتروژن در۱۰۰ گرم ماهی) بر اساس مصرف اسید سولفوریک محاسبه شد .

[۹] Butylated hydroxytoluene

آزمون‌های میکروبی

-تهیه آزمایه (آماده سازی نمونه)

در یک ظرف پلا ستیکی سترون، مقدار ۱۰ گرم از نمونه اندازه‌گیری شـــد به اندازه ۹ برابر وزن نمونه به آن محلول رقیق کننده آب پپتونه بافری ســـترون افزوده شـــد. مخلوط مطابق ا ستاندارد ملی ایران شماره ۹۸۹۹ با مخلوط کن استومکر با کیسه‌های سترون همگن شد، سپس با پیپت سترون ۱ میلی‌لیتر از سو سپان سیون اولیه به لوله حاوی ۱ میلی‌لیتر محلول رقیق کننده اســـتریل ریخته و توســـط ورتکس به مدت ۵ تا ۱۰ ثانیه مخلوط شـــد (رقت 10^{-2}) و رقتهای موازی ده برابر حاصـــل شـــد (اســـتاندارد ملی ایران شماره ۱-۸۹۲۳، ۱۳۸۶).

-شمارش باکتری‌های سایکروتروف

ابتدا ۰/۱ میلی‌لیتر از ســـوســـپانســـیون اولیه تهیه شده با پیپت سترون را بردا شته و درون پتری دیش حاوی محیط کشـــت نوترینت آگار به صـــورت ســـطحی کشـــت داده شـــد. ظرف پتری دیش را بصـــورت وارانه در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ روز گرمخانه‌گذاری شد. پس از مدت زمان آزمایش، پتری دیش‌های کمتر از ۱۵۰ کلنی انتخاب و شـــمارش شـــدند. نتایج به صـــورت cfu/g گزارش شـــد (استاندارد ملی ایران شماره ۲۶۲۹، ۱۳۸۲).

-شمارش باکتری‌های مزوفیل

ابتدا ۰/۱ میلی‌لیتر از ســـوســـپانســـیون اولیه تهیه شـــده با پیپت ســـترون برداشـــته و درون پتری دیش حاوی محیط کشت نوترینت آگار انتقال و کشت سطحی داده شد. ظرف پتری دیش بصورت وارانه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. پس از مدت زمان آزمایش، پتری دیش‌های بین ۳۰ الی ۳۰۰ کلنی انتخاب و شـــمارش شـــدند. نتایج به صـــورت cfu/g گزارش شـــد (استاندارد ملی ایران شماره ۲-۸۲۷۲، ۱۳۹۳).

- شمارش باکتری‌های انتروباکتریاسه

مقدار ۱ میلی‌لیتر از رقت‌های موجود را در پتری دیش ریخته و مقدار ۱۰ تا ۱۵ میلی‌لیتر محیط کشـــت VRBGA[10] با دمای ۴۵ درجه سلسیوس به آن اضافه شد. محیط را با نمونه به وسیله حرکات چرخشی هشت انگلیسی در دو جهت افقی و عمودی، خوب مخلوط کرده و تا خنک شدن کنار گذاشته شد. بعد از اینکه محیط به صورت جامد در آمد پلیت‌ها بصـــورت وارونه شـــده در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. سپس کلنی‌های با هاله ارغوانی رنگ شـــمارش و نتایج به صـــورت cfu/g بیان شد.

بررسی ارزیابی حسی

ارزیابی خصوصیات حسی نمونه‌ها را بر اساس بو، ظاهر، رنگ، بافت و مقبولیت کلی توســـط ۲۰ نفر ارزیاب آموزش دیده (۱۰ مرد- ۱۰ زن) بر اساس سیستم نمره دهی هدونیک ۵ نقطه‌ای انجام شد (۲۷).

روش تجزیه و تحلیل آماری

نتایج به دســـت آمده در آزمایشـــات برای داده‌های تجربی (آزمایشی) به صورت میانگین ± انحراف معیار در سه بار تکرار بیان شـــدند. واحدهای تشـــکیل دهنده کلونی (CFUs) در تمامی آزمایشات به مقادیر لگاریتمی آن‌ها قبل از تجزیه و تحلیل آماری تبدیل شـــد. داده‌های آزمایشـــات با تجزیه و تحلیل واریانس یکطرفه (One-way ANOVA) مقایســـه و تفاوت‌های معنی‌دار آماری بین مقادیر میانگین‌ها

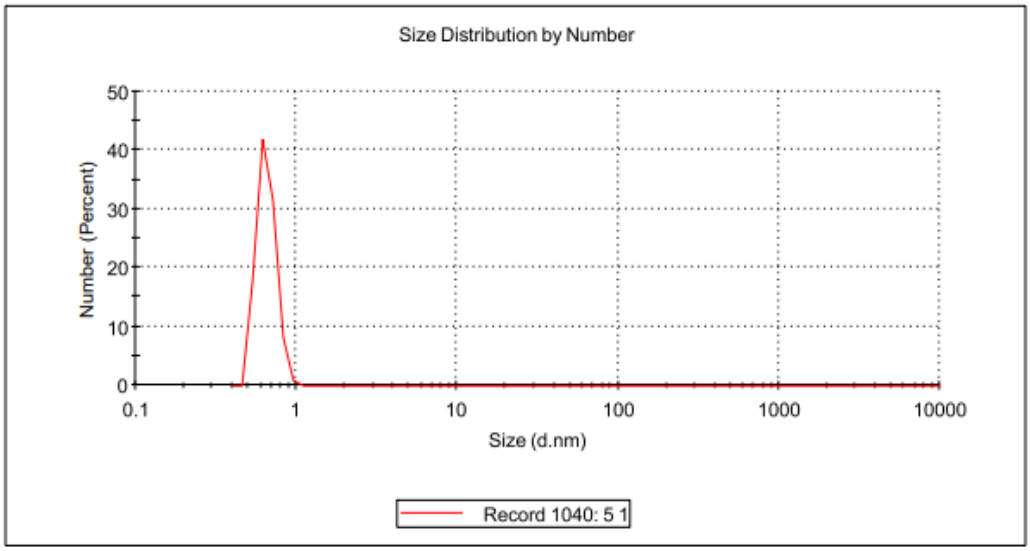
[10] Violet Red Bile Glucose Agar

(در مواردی که اثر کلی تیمارها معنی‌دار بود) با استفاده از آزمون تعقیبی چند دامنه‌ای دانکن تعیین شد. نتایج آزمون‌های آماری به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSSنسخه ۲۶ انجام شد. سطح معنی‌داری $p\leq$۰/۰۵ برای مقایسه داده‌ها در نظر گرفته شد.

نتایج

تعیین اندازه ذرات و چگونگی پراکنش نانو ذرات اکسیدروی

شکل ۱ نتایج توزیع اندازه ذرات نانو ذرات اکسیدروی را نشان می‌دهد. مطابق با شکل یک پیک با اندازه ذرات ۰/۵۲۷ نانومتر و PDI برابر ۰/۳۳۲ نشان دادند.

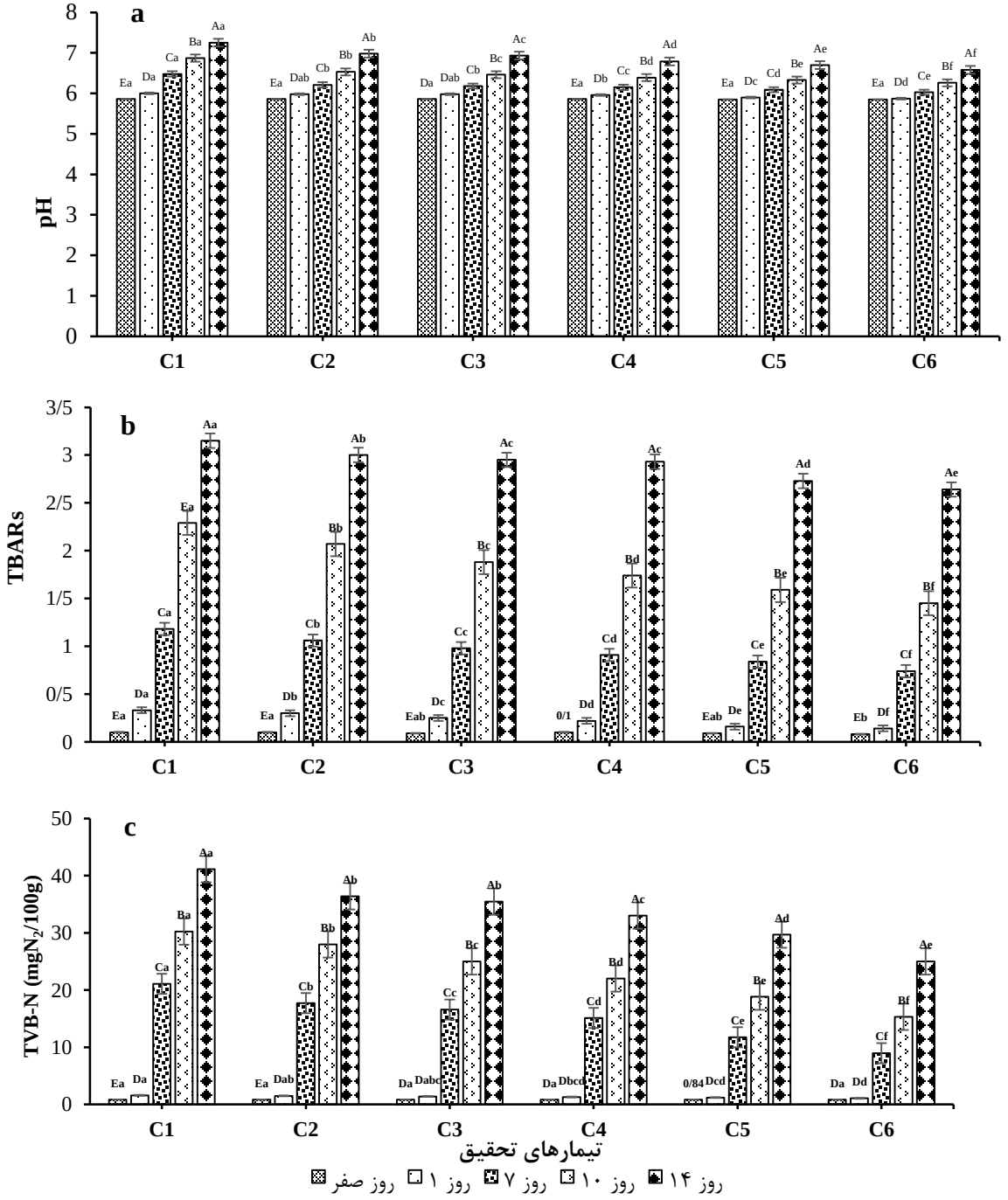


شکل ۱- نتایج توزیع اندازه ذرات نانو ذرات روی

آزمون‌های فیله‌های ماهی بسته بندی شده با فیلم نانوکامپوزیت

آزمون‌های شیمیایی

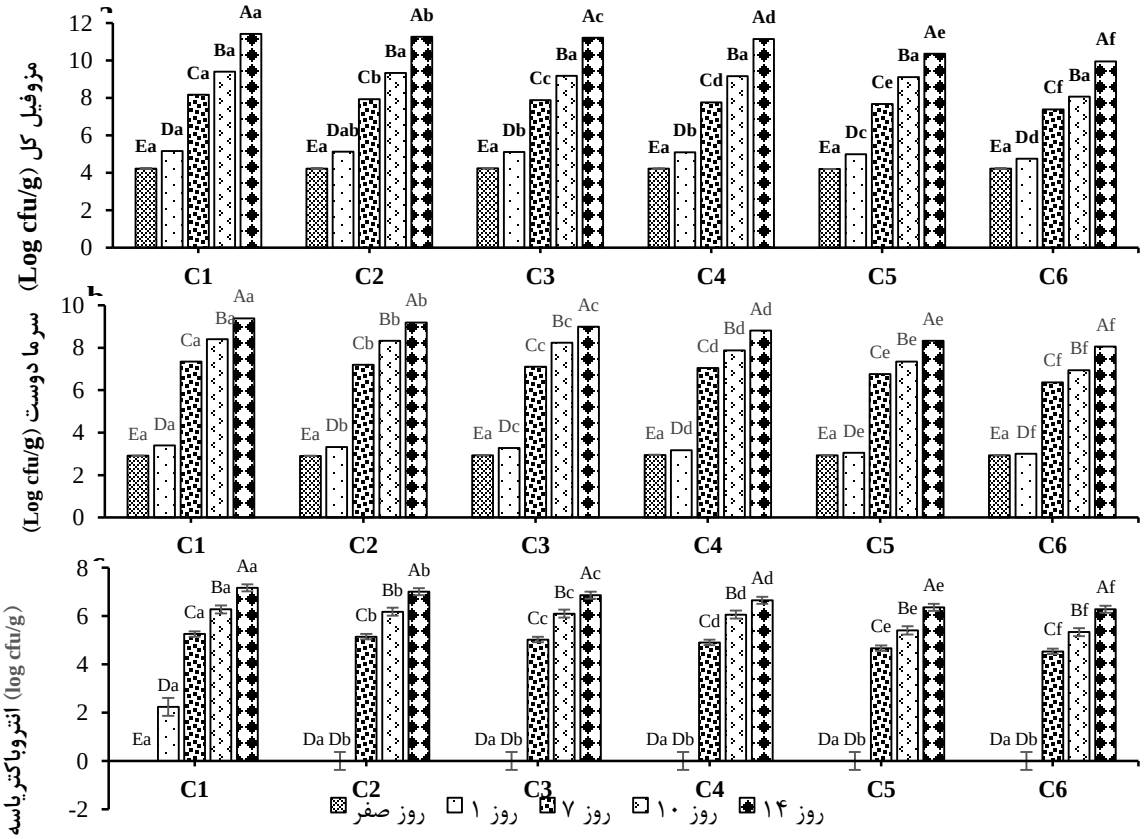
نتایج میزان pH، TBARs و TVB-N نمونه‌های مختلف فیله ماهی بسته‌بندی شده در فیلم نانوکامپوزیت طی ۱۴ روز نگهداری در شکل۲ (a-c) نشان داده شده است. مطابق نتایج، تیمارهای مختلف و زمان نگهداری تأثیر معنادار بر میزان pH، TBARs و TVB-N نمونه‌های فیله ماهی داشت ($p<0.05$). در روز صفر تفاوت آماری معنادار بین تیمارهای مختلف مشاهده نشد. با این حال از روز اول نگهداری اختلاف معنادار بین تیمارهای مختلف مشاهده شد. ادغام کیتوزان، آنتوسیانین و نانوذرات روی سبب کاهش معنادار میزان pH، TBARs و TVB-N نمونه‌های فیله ماهی شدند ($p<0.05$). با افزایش درصد نانو ذرات از ۱ به ۳ درصد، این کاهش معنادارتر بود. با این حال طی ۱۴ روز نگهداری روند افزایشی میزان pH، TBARs و TVB-N نمونه‌های فیله ماهی در تمام تیمارهای مورد بررسی گزارش شد.



شکل ۲- نتایج میانگین pH (a)، TBARs (b) و TVB-N (c) نمونه‌های ماهی طی ۱۴ روز نگهداری

آزمون‌های میکروبی

تایج میزان باکتری‌های سایکروفیل کل، مزوفیل کل، انتروباکتریا سه نمونه‌های مختلف فیله ماهی بسته‌بندی شده در فیلم نانوکامپوزیت طی ۱۴ روز نگهداری در شکل (a-c) ۳ نشان داده شده است. مطابق نتایج تیمارهای مختلف و زمان نگهداری تأثیر معنادار بر میزان باکتری‌های سایکروفیل کل، مزوفیل کل، انتروباکتریا سه نمونه‌های فیله ماهی داشت ($p<0.05$). در روز صفر تفاوت آماری معنادار بین تیمارهای مختلف مشاهده نشد. با این حال از روز اول نگهداری اختلاف معنادار بین تیمارهای مختلف مشاهده شد. ادغام کیتوزان، آنتوسیانین و نانوذرات اکسیدروی سبب کاهش معنادار میزان باکتری‌های سایکروفیل کل، مزوفیل کل، انتروباکتریاسه نمونه‌های فیله ماهی شد. با افزایش درصد نانوذرات از ۱ به ۳ درصد این کاهش معنادارتر بود ($p<0.05$). با این حال طی ۱۴ روز نگهداری روند افزایشی میزان باکتری‌های سایکروفیل کل، مزوفیل کل، انتروباکتریاسه نمونه‌های فیله ماهی در تمام تیمارهای مورد بررسی گزارش شد.



شکل ۳. میانگین تعداد باکتری‌های (a) مزوفیل کل، (b) سایکروفیل و (c) انتروباکتریاسه نمونه‌های ماهی طی ۱۴ روز نگهداری

ارزیابی حسی

نتایج میزان ارزیابی حسی طعم نمونه‌های مختلف فیله ماهی بسته‌بندی شده با فیلم نانوکامپوزیت طی ۱۴ روز نگهداری در جدول ۲ نشان داده شده است. مطابق نتایج تیمارهای مختلف و زمان نگهداری تأثیر معنادار بر میزان ارزیابی حسی طعم، بو، بافت، رنگ و پذیرش کلی نمونه‌های فیله ماهی داشت ($p<0.05$). در روزهای مختلف تفاوت آماری معنادار در طعم، بو و رنگ بین تیمارهای مختلف مشاهده نشد. در حالیکه از روز هفتم اختلاف آماری معنادار در بافت نمونه‌ها و از روز دهم در پذیرش کلی نمونه‌های بسته‌بندی شده با نمونه شاهد گزارش شد.

جدول ۲- امتیاز طعم، بو، بافت، رنگ و پذیرش کلی نمونه‌های ماهی بسته‌بندی شده در فیلم نانوکامپوزیت طی ۱۴ روز نگهداری

		دوره نگهداری (روز)					
	تیمار	۰	۱	۷	۱۰	۱۴
طعم	C_1	۴/۶۷ ± ۰/۵۸ ^{Aa}	۴/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{Ab}	۲/۶۷ ± ۰/۵۸ ^{Ba}	۲/۰۰ ± ۰/۰ ^{Bb}	۱/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Ca}
	C_2	۵/۰۰ ± ۰/۰ ^{Aa}	۴/۶۷ ± ۰/۵۸ ^{Aab}	۲/۶۷ ± ۰/۵۸ ^{Ba}	۲/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{Bab}	۱/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Ca}
	C_3	۵/۰۰ ± ۰/۰ ^{Aa}	۵/۰۰ ± ۰/۰ ^{Aa}	۳/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{Ba}	۲/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{Cab}	۱/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Da}
	C_4	۵/۰۰ ± ۰/۰ ^{Aa}	۵/۰۰ ± ۰/۰ ^{Aa}	۳/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Ba}	۲/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{Cab}	۱/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Da}
	C_5	۵/۰۰ ± ۰/۰ ^{Aa}	۵/۰۰ ± ۰/۰ ^{Aa}	۳/۶۷ ± ۰/۵۸ ^{Ba}	۳/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Ca}	۱/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Da}
	C_6	۵/۰۰ ± ۰/۰ ^{Aa}	۵/۰۰ ± ۰/۰ ^{Aa}	۳/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{Ba}	۲/۶۷ ± ۰/۵۸ ^{Cab}	۱/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Da}
بو	C_1	۴/۶۷ ± ۰/۰ ^{Aab}	۴/۳۳ ± ۰/۰ ^{Ab}	۳/۰۰ ± ۱/۰۰ ^{Ba}	۲/۰۰ ± ۰/۰ ^{BCa}	۱/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Ca}
	C_2	۴/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{Ab}	۴/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{Ab}	۳/۳۳ ± ۱/۵۸ ^{Ba}	۲/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{Ca}	۱/۰۰ ± ۰/۰ ^{Da}
	C_3	۵/۰۰ ± ۰/۰ ^{Aa}	۵/۰۰ ± ۰/۰ ^{Aa}	۳/۳۳ ± ۰/۰ ^{Ba}	۲/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{Ca}	۱/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{Da}
	C_4	۵/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Aa}	۵/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Aa}	۳/۶۷ ± ۰/۵۸ ^{Ba}	۲/۶۷ ± ۰/۵۸ ^{Ca}	۱/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{Da}
	C_5	۵/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Aa}	۵/۰۰ ± ۰/۰ ^{Aa}	۳/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{Ba}	۲/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{Ca}	۱/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{Da}
	C_6	۵/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Aa}	۵/۰۰ ± ۰/۰ ^{Aa}	۳/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{Ba}	۲/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{Ca}	۱/۶۷ ± ۰/۵۸ ^{Ca}
بافت	C_1	۵/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Aa}	۵/۰۰ ± ۰/۰ ^{Aa}	۲/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{Bb}	۲/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Bb}	۱/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Cb}
	C_2	۵/۰۰ ± ۰۰/۰۰ ^{Aa}	۵/۰۰ ± ۰/۰ ^{Aa}	۲/۶۷ ± ۰/۵۸ ^{Bab}	۲/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{Bab}	۱/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{Cab}
	C_3	۵/۰۰ ± ۰۰/۰۰ ^{Aa}	۵/۰۰ ± ۰/۰ ^{Aa}	۳/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{Bab}	۲/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{Cab}	۱/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{Dab}
	C_4	۵/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Aa}	۵/۰۰ ± ۰/۰ ^{Aa}	۳/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{Bab}	۲/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{Cab}	۱/۶۷ ± ۰/۵۸ ^{Cab}
	C_5	۵/۰۰ ± ۰/۰ ^{Aa}	۵/۰۰ ± ۰/۰ ^{Aa}	۳/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{Bab}	۲/۶۷ ± ۰/۵۸ ^{Bab}	۱/۶۷ ± ۰/۵۸ ^{Cab}
	C_6	۵/۰۰ ± ۰/۰ ^{Aa}	۵/۰۰ ± ۰/۰ ^{Aa}	۳/۶۷ ± ۰/۵۸ ^{Ba}	۳/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Ca}	۲/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Da}
رنگ	C_1	۵/۰۰ ± ۰/۰ ^{Aa}	۵/۰۰ ± ۰/۰ ^{Aa}	۲/۶۷ ± ۰/۵۸ ^{Ba}	۲/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Ca}	۱/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Da}
	C_2	۵/۰۰ ± ۰/۰ ^{Aa}	۵/۰۰ ± ۰/۰ ^{Aa}	۳/۰۰ ± ۰/۰ ^{Ba}	۲/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Ca}	۱/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{Da}
	C_3	۵/۰۰ ± ۰/۰ ^{Aa}	۵/۰۰ ± ۰/۰ ^{Aa}	۳/۶۷ ± ۰/۵۸ ^{Ba}	۲/۶۷ ± ۰/۵۸ ^{Ca}	۱/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{Da}

	C_4	۵/۰۰ ± ۰/۰ ^{Aa}	۵/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Aa}	۳/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{Ba}	۲/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{Ca}	۱/۶۷ ± ۰/۵۸ ^{Ca}
	C_5	۵/۰۰ ± ۰/۰ ^{Aa}	۵/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Aa}	۳/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{Ba}	۲/۶۷ ± ۰/۵۸ ^{BCa}	۲/۰۰ ± ۱/۰۰ ^{Ca}
	C_6	۵/۰۰ ± ۰/۰ ^{Aa}	۵/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Aa}	۳/۶۷ ± ۰/۵۸ ^{Ba}	۲/۶۷ ± ۰/۵۸ ^{Ca}	۲/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Da}
نانو ذرات کلی	C_1	۵/۰۰ ± ۰/۰ ^{Aa}	۴/۶۷ ± ۰/۵۸^{Aa}	۲/۶۷ ± ۰/۵۸^{Ba}	۲/۰۰ ± ۰/۰۰^{Cb}	۱/۰۰ ± ۰/۰۰^{Db}
	C_2	۵/۰۰ ± ۰/۰ ^{Aa}	۴/۶۷ ± ۰/۵۸^{Aa}	۲/۶۷ ± ۰/۵۸^{Ba}	۲/۳۳ ± ۰/۵۸^{Bab}	۱/۳۳ ± ۰/۵۸^{Cab}
	C_3	۵/۰۰ ± ۰/۰ ^{Aa}	۵/۰۰ ± ۰/۰۰^{Aa}	۳/۳۳ ± ۰/۵۸^{Ba}	۲/۳۳ ± ۰/۵۸^{Cab}	۱/۳۳ ± ۰/۵۸^{Dab}
	C_4	۵/۰۰ ± ۰/۰ ^{Aa}	۵/۰۰ ± ۰/۰۰^{Aa}	۳/۶۷ ± ۰/۵۸^{Ba}	۲/۶۷ ± ۰/۵۸^{Cab}	۱/۶۷ ± ۰/۵۸^{Dab}
	C_5	۵/۰۰ ± ۰/۰ ^{Aa}	۵/۰۰ ± ۰/۰^{Aa}	۳/۶۷ ± ۰/۵۸^{Ba}	۳/۰۰ ± ۰/۰۰^{Ca}	۱/۶۷ ± ۰/۵۸^{Dab}
	C_6	۵/۰۰ ± ۰/۰ ^{Aa}	۵/۰۰ ± ۰/۰۰^{Aa}	۳/۶۷ ± ۰/۵۸^{Ba}	۳/۰۰ ± ۰/۰۰^{Ca}	۲/۰۰ ± ۰/۰۰^{Da}

* حروف کوچک متفاوت نشان دهنده تفاوت آماری معنادار در هر ستون است ($p<0.05$)

* حروف بزرگ متفاوت نشان دهنده تفاوت آماری معنادار در هر سطر است ($p<0.05$)

بحث

تعیین ا ندازه ذرات و چگونگی پراکنش نانو ذرات اکسیدروی

میانگین اندازه نانوذرات اکسید روی سنتز شده با استفاده از تکنیک DLS اندازه‌گیری شد. همانطور که در شکل ۱ نشان داده شده است، اندازه گیری‌ها نشان داد که اندازه متوسط نانوذرات اکسیدروی از عصاره کلاهک بادمجان حدود ۰/۵۷۲ نانومتر بود. هنگامی که مقدار PDI کمتر از ۰/۴ باشد، نمونه همگن در نظر گرفته می‌شود. همگنی برای مقادیر بین ۰/۴ و ۱ کاهش می‌یابد، و زمانی که مقدار PDI از ۱ بیشتر شود، نمونه ناهمگن در نظر گرفته می‌شود. در مطالعه حاضر نانوذرات اکسیدروی دارای شاخص چند پراکندگی (PDI) ۰/۳۳۲ هستند. این نشان داد که نانوذرات اکسید روی همگن هستند. Fouda و همکاران، طی سنتز سبز نانو ذرات اکسیدروی از عصاره آبی *Punica granatum* نشان دادند مقدار PDI حدود ۰/۳۱۲ بود، به این معنی که نانو ذرات اکسیدروی دارای توزیع خوب و همگنی بالا هستند (۲۸). در مطالعه‌ای Vaishnav و همکاران (۲۰۱۷)، طی بررسی توزیع اندازه ذرات روی سنتز شده به روش سبز عصاره *Celosia argentea* نشان دادند دو پیک برای DLS نانوذرات اکسید روی سنتز شده، با ابعاد ۱۵۶/۶نانومتر و ۵۸۱/۹ نانومتر بدست آمد که ممکن است از تجمع ذرات حاصل شود (۲۹).

آزمون‌های شیمیایی

تغییرات pH یکی از شاخص‌های کیفی فساد ماهی است. به طورکلی، روند pH عضله ماهی زنده عموماً بین ۷- ۶/۷ است اما پس از مرگ، بر اساس فصل، گونه و فاکتورهای دیگر، از ۶ تا ۷ متغیر است. براساس نتایج، روند افزایشی در میزان pH نمونه های فیله ماهی در تمام تیمارهای مورد بررسی طی ۱۴ روز نگهداری مشاهده شد. افزایش مربوط به تولید ترکیباتی مثل تری متیل آمین، دی متیل آمینو آمونیاک توسط باکتری‌های عامل فساد، تجزیه پروتئین‌ها و تولید بازهای ازته فرار می باشد. با توجه به نتایج شکل 2a، ادغام کیتوزان در ماتریس پلیمری از روز ۷

نگهداری سبب کاهش معنادار میزان pH نمونه‌های فیله ماهی شد همچنین تأثیر معنادار آنتو سیانین بر کاهش روند افزای شی pH نمونه‌ها گزارش شد. نانوذرات اک سیدروی نیز سبب کاهش روند افزای‌شی میزان pH نمونه‌های فیله ماهی شدند. کاهش pH طی دوره نگهداری در تیمار نانوکامپوزیت ممکن است به دلیل تولید دی اکسیدکربن و تجزیه مواد آلی توسط نانوذرات اتفاق افتاده باشد. Khanipour و همکاران (۲۰۲۰)، طی بررسی تأثیر نانوکامپوزیت نانو ذرات مس/ LDPE بر فیله ماهی قزل‌آلای رنگین کمانی روند مشابهی نشان دادند (۳۰). Riahi و همکاران اعلام کردند که کمترین مقدار pH در نمونه‌های میگو که در فیلم‌های کاراگینان حاوی آنتوسیانین پوست سیب‌زمینی شیرین و ۳ درصد نقاط کربن دوپ شده با TiO_2 در طول نگهداری بود (۳۱). به طور مشابه، Haghighi و Yazdanpanahکمترین pH (۵,۴۶) را برای فیله‌های رنگین کمان پوشش داده شده با کیتوزان/اسانس دارچین/عصاره چای و بالاترین pH (۸/۸۵) را برای نمونه‌های شاهد، در پایان نگهداری گزارش کردند (۳۲).

TBARs روشی برای ارزیابی اکسیداسیون لیپید، به ویژه مالون دی آلدئید (MDA)[11] است که ارتباط نزدیکی با کیفیت حسی (طعم، بو، بافت) گوشت دارد. مالون دی آلدئید دومین و مهم‌ترین محصول اکسیداسیون چربی است و نشانگر درجه اکسیداسیون و فساد است (۳۳). براساس نتایج، روند افزایشی در میزان TBARs نمونه‌های فیله ماهی در تمام تیمارهای مورد بررسی طی ۱۴ روز نگهداری مشاهده شد. روند افزای شی این شاخص در طول مدت نگهداری ممکن است به دلیل افزایش آهن آزاد و دیگر پراکسیدان‌ها در ماهیچه ماهی باشد. روند افزایشی کندتر میزان TBARs فیله‌های بسته‌بندی شده در نانوکامپوزیت‌ها در مقایسه با تیمار C1 ممکن است به ویژگی‌های شناخته شده و مستند شده عالی مانع اکسیژن فیلم‌های نانوکامپوزیت مربوط باشد که فقط مقدار کمی از اکسیژن می‌تواند با نمونه‌ها در تماس باشد. در نتیجه، سرعت اکسیداسیون کاهش می‌یابد. از طرفی به نظر می‌رسد مکانیسم عمل آنتوسیانین‌ها در کاهش میزان TBARs از طریق واکنش با رادیکال‌های آزاد و کند شدن فرآیند اکسیداسیون باشد. مکانیسم فعالیت آنتی اکسیدانی نانو ذرات روی ممکن است به دلیل جذب الکترواستاتیکی ترکیبات زیست فعال (COO^-, O^-) آنتوسیانین با نانوذرات با بار مثبت ($ZnO = Zn^{2+} + O_2$) باشد. به طور کلی، محصولات غذاهای دریایی با محتوای TBARs که از ۵ میلی‌گرم MDA/kg تجاوز نمی‌کند، کیفیت خوبی در نظر گرفته می‌شوند، با این تفاوت که این حد معمولاً تا ۸ میلی‌گرم MDA/kg افزایش می‌یابد و این محصولات همچنان ایمن و مناسب برای خوردن در نظر گرفته می‌شوند (۳۴). Hong و همکاران، مشاهده کردند که افزودن ۵ درصد روی/پوست گریپ فروت/کربن کوانتوم دات به فیلم نانوالیاف سلولزی، مقادیر TBARs گوشت خوک چرخ شده را کاهش داد (۳۵). به طور مشابه، Khan و همکاران، کاهش سطح TBARs گوشت مرغ بسته‌بندی شده در فیلم بر پایه صمغ حاوی ۲٪ ZnONPs و ۶٪ اسانس فورسیتیا را نشان داد (۳۶). Maghami و همکاران (۲۰۱۹) نیز نشان دادند میزان TBAR فیله‌های ماهی *Huso huso* بسته‌بندی شده با فیلم‌های زیست تخریب‌پذیر حاوی عصاره رازیانه به تأخیر افتاد و میزان آن در سطح قابل قبول (۰/۴۵mgMDA/kg) طی ۱۸ روز بود. علت این امر به

[11] Malondialdehyde

ترکیبات فنلی و توکوفرول‌های عصاره رازیانه نسبت داده شده که قادر به تاخیر در اکسیداسیون هستند (۳۷).

نیتروژن کل فرار به طور گسترده برای تعیین کیفیت غذاهای دریایی استفاده می‌شود. براساس نتایج، روند افزایشی در میزان TVB-N نمونه‌های فیله ماهی در تمام تیمارهای مورد برر سی طی ۱۴ روز نگهداری م شاهده شد. افزایش TVB-N نمونه‌ها می‌تواند ناشی از فعالیت آنزیمهای درون‌زا و فعالیتهای متابولیکی میکروارگانیسمهای تولیدکننده آمونیاک و آمین های بیوژنیک باشد (۳۸). کیتوزان (به تنهایی یا در ترکیب با مواد دیگر) می‌تواند به طور قابل توجهی مقادیر TVB-N را کاهش دهد که ممکن است به این دلیل باشد که فیلم‌های بسته‌بندی توانایی باکتری برای ترکیبات نیتروژنی غیرپروتئینی اکسیداتیو دِآمینه شده را تضعیف می‌کنند و تعداد باکتری های پروتئولیتیک را کاهش می‌دهند. پس از مرگ ماهی، میکروارگانیسم‌ها، پروتئین‌ها را برای تولید ترکیبات نیتروژن مانند آمین تجزیه می‌کنند (۳۹). محتوای TVB-N ماهی تازه از mgN_2/kg ۵ تا ۱۰ تا رسیدن به حد مجاز mgN_2/kg ۳۰ متغیر است (۴۰). بنابراین، تمامی نمونه‌ها طی ۱۰ روز (به استثناء نمونه C1) TVB-N حد مجاز داشتند درحالیکه در روز ۱۴، تنها نمونه‌های C5 و C6 (به ترتیب نمونه های حاوی ۳ و ۵ درصد نانوذرات) محتوای TVB-N حد مجاز را داشتند. Maghami و همکاران، نشان داد که بسته بندی فیله ماهی با کیتوزان حاوی اسانس رازیانه باعث کاهش مقدارTVB-N در طول دوره نگهداری شد، به طوری که در روز ۱۸ در سطح قابل قبول (mgN_2/kg ۱۴/۵۳) باقی ماند (۳۷). Mohammadi و همکاران (۲۰۱۹)، طی بررسی تأثیر کربوکسی متیل سلولز/موسیلاژ بامیه/ نانوذرات روی بر ماندگاری گوشت سینه مرغ بارگذاری شده در دمای ۴ درجه سلسیوس نشان دادند استفاده از نانو کامپوزیت مذکور در بسته‌بندی، به طور قابل توجهی افزایش میزان TVN-B را تا ۱۲ روز نگهداری به تاخیر انداخت (۴۱).

آزمون‌های میکروبی

نتایج میزان باکتری‌های مزوفیل کل، سایکروفیل و انتروباکتریاسه نمونه‌های مختلف فیله ماهی بسته‌بندی شده در فیلم نانوکامپوزیت طی ۱۴ روز نگهداری روند افزایشی را نشان داد. افزایش بار باکتریایی با گذشت زمان به خاطر تکثیر تصاعدی باکتری‌ها یک امر طبیعی است. تعداد باکتری‌ها در تیمار C3 کمتر از گروه C1 و C2 بوده است. نانوذرات اکسیدروی نیز سبب کاهش معنادار روند افزایشی میزان باکتری‌های مزوفیل کل نمونه‌های فیله ماهی شد. مقدار بارکل میکروبی برای فراورده‌های شیلاتی log cfu/g ۷ گزارش شده است. بنابراین تمامی نمونه‌ها طی ۷ روز (به استثناء نمونه C2) حد مجاز بار میکروبی کل را نشان دادند.

باکتری‌های سرمادوست گرم منفی گروه اصلی میکروارگانیسم‌هایی هستند که مسئول فاسد شدن ماهی‌های تازه ذخیره‌شده هوازی در دمای سرد هستند. محدوده فساد ماهی با باکتری‌های سرمادوست log cfu/g ۷ – ۶ گزارش شده است. بر این اساس، نمونه‌های بسته‌بندی شده با فیلم‌های حاوی نانوذرات (در هر سه سطح ۱، ۳ و ۵ درصد) تا روز دهم در محدوده مجاز بودند.

باکتری های انتروباکتریاسه نیز به عنوان یک شاخص بهداشتی و همچنین بخشی از میکروفلور ماهی تازه هستند. متداول‌ترین آلوده‌کننده‌های گوشت و محصولات گوشتی، باکتری‌های انتروباکتریاسه هستند که در نتیجه فعالیت آن ها آمین های بیوژنیک تولید می‌شود. تعداد انتروباکتریاسه نمونه‌های ماهی گروه C1 پس از ۱۰ روز به log cfu/g ۶/۲۵ رسید. در حالیکه بین تیمارهای مختلف،

کمترین تعداد انتروباکتریاسه‌ها در گروه C6 مشاهده شد. این نتایج نشان می‌دهد که فیلم نانوکامپوزیت C6 می‌تواند به طور موثر رشد باکتری‌ها را به تاخیر بیندازد و ماندگاری ماهی را افزایش دهد.

به طور کلی کاهش در تعداد باکتری‌ها در نتیجه: ۱) اثرات ضدمیکروبی کیتوزان؛ از طریق تغییر در نفوذپذیری غشای سلولی به واسطه‌ی واکنش بین بار مثبت مولکول‌های کیتوزان و بار منفی غشای سلول‌های میکروبی است که منجر به نشت محتویات پروتئینی و سایر محتویات ضروری داخل سلولی و در نهایت مرگ سلول می‌شود (۴۲)، ۲) اثرات ضدمیکروبی آنتوسیانین‌ها؛ با مکانیسم تحریک آزادسازی لیپوپلی‌ساکاریدها از غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی (۴۳) و ۳) فعالیت ضدمیکروبی نانو ذرات اکسیدروی و از طریق انتشار یون‌های Zn^{2+} از فیلم می‌تواند از طریق دیواره سلولی میکروارگانیسم‌ها نفوذ کند و با اجزای داخلی واکنش دهد که در نهایت بر روی زنده ماندن سلول‌ها تأثیر می‌گذارد. نانو ذرات اکسیدروی به عنوان واسطه تولید پراکسید هیدروژن، یک عامل اکسید کننده قوی می باشدکه باعث آسیب به غشای سلولی باکتری می‌شود (۴۴).

Kizilkaya و Kaya گزارش کردند که پو شش ماهی قزل آلای رنگین کمان با محلول بسته‌بندی بر پایه کیتوزان حاوی رزمارینیک اسید و نانوذرات TiO_2 جمعیت کل باکتری‌های مزوفیل و سرمادوست را کاهش داد (۴۵). در مطالعه دیگر گودرزی و همکاران، گزارش کردند که الیاف ساخته شده از κ-کاراگینان-پلی وینیل الکل حاوی آنتوسیانین *Prunus domestica* و اپی گالو کاتچین گالات باعث کاهش انتروباکتریاسه در گوشت چرخ کرده گاو بسته بندی شده پس از ۱۵ روز شد (۴۵).

ارزیابی حسی

پنج عامل مهم طعم، بافت، رنگ و بو در کیفیت گوشت نقش دارند. بافت، اساسی‌ترین عامل نشان دهنده کیفیت گوشت از دیدگاه مصرف کننده است. بنابراین، بهبود کیفیت گوشت و تُرد بودن آن اهمیت ویژه‌ای دارد (۴۶). همچنین رنگ و بوی گوشت، شاخصی است که از سوی مصرف کننده برای اطمینان از فاسد نبودن گوشت استفاده می‌شود. طعم گوشت یکی از فاکتورهای مهم در مطلوب بودن آن برای مصرف کنندگان است. در گوشت پخته شده، طعم گوشت تحت تأثیر اثر متقابل قندها و اسیدهای آمینه، اکسیداسیون چربی‌ها و تغییرات تیامین قرار دارد (۴۷).

براساس نتایج، روند کاهشی در امتیاز طعم، بو، رنگ، بافت و پذیرش کلی نمونه های فیله ماهی در تمام تیمارهای مورد برر سی طی ۱۴ روز نگهداری مشاهده شد. اکسیداسیون لیپیدها در سیستم گوشتی در غشاء سلولی که اسیدهای چرب چند غیرا شباع وجود دارند آغاز می شوند و نتیجه حسی حاصل از اکسیدا سیون آن‌ها ایجاد و توسعه طعم نامطلوب است که عمدتاً مربوط به طعم تند شدگی در طول زمان است. مطالعات نشان داده است عصاره‌ها وقتی به فیلم‌های بسته‌بندی اضافه می شوند به آهستگی به سطح مواد غذایی رها می‌شوند بنابراین در یک مدت زمان طولانی و در یک غلظت بالا بر روی مواد غذایی باقی می‌مانند و از این طریق باعث حفظ کیفیت مواد غذائی می‌شوند. کاهش امتیاز رنگ به دلیل اکسیداسیون میوگلوبین در نمونه‌های گوشت است که منجر به کاهش میزان قرمزی و افزایش میزان زردی گوشت می‌شود و با ایجاد رنگ نامطلوب در گوشت، کاهش امتیاز ارزیابی حسی رنگ را به دنبال دارد (۴۸). رفتار مصرف کننده نشان می‌دهد که بافت یک عامل خوشایند و مطلوب در تعیین کیفیت گوشت می‌باشد. بافت تحت تأثیر اکسیداسیون گوشت قرار گرفته است که ممکن است به دلیل از دست رفتن گروه‌های تیول باشد زیرا

اکسیداسیون پروتئین‌های گوشت با تشکیل کربونیل و حذف گروه‌های تیول همراه ا ست (۴۹). همچنین می‌تواند به دلیل اثر عصـــاره بر فعالیت میکروارگانیســـم‌ها و در نتیجه کاهش تخریب و دناتوره شدن پروتئین‌ها باشد. در گوشت با گذشت زمان بافت توسط فعالیت آنزیمی میکروارگانیسم‌های گوشت تخر یب می‌شـــود، این تخر یب با فت با تجز یه ترکی بات پروتئینی، نرمتر شـــدن بافت و تولید ترکیبات از ته همراه است.

Zolfaghari و همکاران، طی برر سی ب سته‌بندی فیله ماهی در پوشـــش فیلم خوراکی مبتنی بر زئین ذرت حاوی عصـاره شـوید و بتا سـیکلودکسـترین نشـان دادند ویژگی‌های حســـی (بو، رنگ، بافت، و مقبولیت کلی) فیله ماهی تفاوتی در امتیاز حســـی اولیه تیمارهای مورد مطالعه مشـاهده نشـد و در محدوده ۵-۴ ثبت شـد. مطابق با آنالیز میکروبی و شیمیایی، فیله‌های بسته‌بندی نشده (گروه C0) پس از ۳ روز نگ هداری از نظر قابل یت پذیرش کلی، بو و ویژگی‌های بافت امتیاز غیرقابل قبولی (زیر ۳) ک سب کردند، درحالیکه فیلم‌های اســـتفاده شـــده به طور قابل توجهی از دســـت دادن امتیاز حســـی را به تعویق انداختند. فیله‌های بسته‌بندی شده در طول ۱۲ روز نگهداری در شرایط یخچالی ، نمرات غیرقابل قبولی در یافت نکردند. این امر می‌تواند به دل یل اثرات م حافظتی آن ها در برابر تغییرات میکروبی و شـــیمیایی نمونه‌ها و همچنین ایجاد حس خوشـــایند در ارزیاب‌ها به دلیل طعم و عطر منحصر به فرد عصاره شوید در کنار فیله ماهی باشد (۵۰).

نتیجه گیری

این مطالعه با هدف سنتز نانو ذرات روی با استفاده از عصـــاره کلاهـک بـادمجـان و بکـارگیری آن در فیلم نانوکامپوزیت هیدروکســـی پروپیل متیل ســـلولز-کیتوزان-آنتو سیانین پو ست بادمجان-نانو ذرات روی برای ب سته‌بندی فیله ماهی سفید دریای خزر (*Rutilusfrisii kutum*) طی مدت زمان نگهداری در شـــرایط یخچالی انجام شـــد. نتایج توزیع ا ندازه ذرات نشـــان دهنده یکنواختی توزیع ا ندازه قطرات در همه نمونه سـنتز شـده به روش سـبز بود و مقدار شـاخص پلی پراکندگی برابر با ۰/۳۳۲ گزارش شـد. بررسـی فیلم نانوکامپوزیت برای ب سته‌بندی فیله‌های ماهی ن شان داد طی ۱۴ روز نگ هداری میزان pH، میزان TBRAs و مواد تشکیل دهنده TVB-N نمونه‌های فیله ماهی روند افزایشی دا شت. کاهش روند افزایشی pH، TBRAs و TVB-N با ادغام کیتوزان، آنتو سیانین و نانو ذرات (در صدهای مختلف) م شاهده شد. برر سی نتایج میکروبی نیز ن شان دهنده مهار رشـد باکتری‌ها (مزوفیل، سـایکروفیل و انتروباکتریاسـه) در نمونه‌های بســـته‌بندی شـــده با کیتوزان، آنتوســـیانین و نانو ذرات اکســـ یدروی (درصـــد های مختلف) بود. فی له های بســـته‌بندی طی دوره ذخیره‌ســازی بالاترین امتیاز حســی را داشـــتند که در طول مدت نگهداری کاهش امتیاز حســی از طرف ارزیابان ح سی گزارش شد. درمجموع با توجه به تأثیر م ثبت فی لم‌هـای هیـدروکســـی پرو پیـل م تیـل ســلولز/کیتوزان/آنتوســیانین کلاهک بادمجان/نانو ذرات روی (۱، ۳ و ۵ درصـــد) می‌توان گفت بهینه تیمار این تحقیق ۳ درصـــد نانو ذرات اکســـید روی اســـت که طی ۷ روز زمان نگ هداری بدون تأثیر بر ارز یابی حســـی می‌توا ند کیف یت فیله‌های ماهی سفید دریای خزر را حفظ نماید.

منابع

.۱ Bavand Savadkouhi E, Khara H. Effect of age on reproductive performance of Kutum, Rutilus frisii (Nordmann, 1840) in Shirood River, the southern coast of the Caspian Sea. 2017.

.۲ Heshmati A, Karami-Momtaz J, Nili-Ahmadabadi A, Ghadimi S. Dietary exposure to toxic and essential trace elements by consumption of wild and farmed carp (Cyprinus carpio) and Caspian kutum (Rutilus frisii kutum) in Iran. Chemosphere. 2017;173:207-15.

.۳ Action S. World fisheries and aquaculture. Food and Agriculture Organization. 2020;2020:1-244.

.٤ Rathod NB, Ranveer RC, Benjakul S, Kim SK, Pagarkar AU, Patange S, et al. Recent developments of natural antimicrobials and antioxidants on fish and fishery food products. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 202.٢١٠-٤١٨٢:(٤)٢٠;١

.٥ Bigi F, Haghighi H, Siesler HW, Licciardello F, Pulvirenti A. Characterization of chitosan-hydroxypropyl methylcellulose blend films enriched with nettle or sage leaf extract for active food packaging applications. Food Hydrocolloids.١٢٠:١٠٦٩٧٩;٢٠٢١ .

.٦ Zheng M, Chen J, Tan KB, Chen M, Zhu Y. Development of hydroxypropyl methylcellulose film with xanthan gum and its application as an excellent food packaging bio-material in enhancing the shelf life of banana. Food Chemistry. 2022;374.١٣١٧٩٤:

.٧ Mahadevaiah, Shivakumara LR, Demappa T, Singh V. Mechanical and barrier properties of hydroxy propyl methyl cellulose edible polymer films with plasticizer combinations. Journal of Food Processing and Preservation. 2017;41(4):e13020.

.٨ Wrona M, Cran MJ, Nerín C, Bigger SW. Development and characterisation of HPMC films containing PLA nanoparticles loaded with green tea extract for food packaging applications. Carbohydrate Polymers. 2017;156:108-17.

.٩ Ghadermazi R, Hamdipour S, Sadeghi K, Ghadermazi R, Khosrowshahi Asl A. Effect of various additives on the properties of the films and coatings derived from hydroxypropyl methylcellulose—A review. Food science & nutrition. 2019;7(11):3363-77.

.١٠ Haghighi H, Licciardello F, Fava P, Siesler HW, Pulvirenti A. Recent advances on chitosan-based films for sustainable food packaging applications. Food Packaging and Shelf Life. 2020;26:100551.

.١١ Másson M. Antimicrobial properties of chitosan and its derivatives. Chitosan for Biomaterials III: Structure-Property Relationships: Springer; 2021. p. 131-68.

.١٢ Machado BR, Facchi SP, de Oliveira AC, Nunes CS, Souza PR, Vilsinski BH, et al. Bactericidal pectin/chitosan/glycerol films for food pack coatings: a critical viewpoint. International journal of molecular sciences. 2020;21(22):8663.

.١٣ Alappat B, Alappat J. Anthocyanin pigments: Beyond aesthetics. Molecules. 2020;25(23):5500.

.١٤ Bilgiç S, Söğüt E, Seydim AC. Chitosan and starch based intelligent films with anthocyanins from eggplant to monitor pH variations. Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology. 2019;7:61-6.

.١٥ Yong H, Wang X, Zhang X, Liu Y, Qin Y, Liu J. Effects of anthocyanin-rich purple and black eggplant extracts on the physical, antioxidant and pH-sensitive properties of chitosan film. Food Hydrocolloids. 2019;94:93-104.

.١٦ Kumar S, Basumatary IB, Sudhani HP, Bajpai VK, Chen L, Shukla S, et al. Plant extract mediated silver nanoparticles and their applications as antimicrobials and in sustainable food packaging: A state-of-the-art review. Trends in Food Science & Technology. 2021;112:651-66.

.١٧ Jaiswal V, Butola B, Majumdar A. Production of PVA-chitosan films using green synthesized ZnO NPs enriched with dragon fruit extract envisaging food packaging applications . International Journal of Biological Macromolecules. 2023;252:126457.

.١٨ Kalpana V, Devi Rajeswari V. A review on green synthesis, biomedical applications, and toxicity studies of ZnO NPs. Bioinorganic

chemistry and applications. 2018;2018(1):3569758.
.۱۹ Zahiri Oghani F, Tahvildari K, Nozari M. Novel antibacterial food packaging based on chitosan loaded ZnO nano particles prepared by green synthesis from Nettle leaf extract. Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials. 2021;31:43-54.
.۲۰ Alamdari S, Mirzaee O, Jahroodi FN, Tafreshi MJ, Ghamsari MS, Shik SS, et al. Green synthesis of multifunctional ZnO/chitosan nanocomposite film using wild Mentha pulegium extract for packaging applications. Surfaces and Interfaces. 2022;34:102349.
.۲۱ Fu X, Zhu C, Shen A, Fan W, Shan C, editors. Extraction of anthocyanin from eggplant peel by ultrasonic assisted method and application in cosmetics. E3S Web of Conferences; 2021: EDP Sciences.
.۲۲ Horincar G, Enachi E, Bolea C, Râpeanu G, Aprodu I. Value-added lager beer enriched with eggplant (Solanum melongena L.) peel extract. Molecules. 2020;25(3):731.
.۲۳ Hameed S, Iqbal J, Ali M, Khalil AT, Abbasi BA, Numan M, et al. Green synthesis of zinc nanoparticles through plant extracts: establishing a novel era in cancer theranostics. Materials Research Express. 2019;6(10):102005.
.۲٤ Gasti T, Dixit S, D'souza OJ, Hiremani VD, Vootla SK, Masti SP, et al. Smart biodegradable films based on chitosan/methylcellulose containing Phyllanthus reticulatus anthocyanin for monitoring the freshness of fish fillet. International journal of biological macromolecules. 2021;187:451-61.
.۲۵ Wu M, Zhou Z, Yang J, Zhang M, Cai F, Lu P. ZnO nanoparticles stabilized oregano essential oil Pickering emulsion for functional cellulose nanofibrils packaging films with antimicrobial and antioxidant activity. International Journal of Biological Macromolecules. 2021;190:433-40.
.۲٦ Bazargani-Gilani B. Activating sodium alginate-based edible coating using a dietary supplement for increasing the shelf life of rainbow trout fillet during refrigerated storage (4±1 C). Journal of Food Safety. 2018;38(1):e12395.
.۲۷ Prabhakar PK, Vatsa S, Srivastav PP, Pathak SS. A comprehensive review on freshness of fish and assessment: Analytical methods and recent innovations. Food research international. 2020;133:109157.
.۲۸ Fouda A, Saied E, Eid AM, Kouadri F, Alemam AM, Hamza MF, et al. Green Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles Using an Aqueous Extract of Punica granatum for Antimicrobial and Catalytic Activity. Journal of Functional Biomaterials. 2023;14(4):205.
.۲۹ Vaishnav J, Subha V, Kirubanandan S, Arulmozhi M, Renganathan S. Green synthesis of zinc oxide nanoparticles by Celosia argentea and its characterization. J Optoelectron Biomed Mater.۷۱-٥۹:(۱)۹;۲۰۱۷ .
.۳۰ Khanipour A, Bahmani ZA, Oromiehie A, Motalebi A. Effect of packaging with nano-composite clay/LDPE film on the quality of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) fillet at refrigerated storage. Iranian Journal of Fisheries Sciences. 202.۷۱٤-٦۹۸:(۲)۱۹;۰
.۳۱ Riahi Z, Khan A, Rhim J-W, Shin GH, Kim JT. Carrageenan-based active and intelligent packaging films integrated with anthocyanin and TiO2-doped carbon dots derived from sweet potato peels. International Journal of Biological Macromolecules. 2024;259:129371.
.۳۲ Haghighi M, Yazdanpanah S. Chitosan-based coatings incorporated with cinnamon and tea extracts to extend the fish fillets shelf life: validation by FTIR spectroscopy technique. Journal of Food Quality. 2020;2020(1):8865234.
.۳۳ Khorshidi S, Mehdizadeh T, Ghorbani M. The effect of chitosan coatings enriched with the extracts and essential oils of Elettaria Cardamomum on the shelf-life of chicken drumsticks vacuum-packaged at 4° C. Journal of Food Science and Technology. 2021;58.۳٥-۲۹۲٤:
.۳٤ Duarte AM, Silva F, Pinto FR, Barroso S, Gil MM. Quality assessment of chilled and frozen fish—mini review. Foods. 2020;9(12):1739.
.۳٥ Hong SJ, Ha SY, Shin GH, Kim JT. Cellulose nanofiber-based multifunctional composite films integrated with zinc doped-grapefruit peel-based carbon quantum dots. International Journal of Biological Macromolecules. 2024;267:131397.

.۳۶ Khan S, Shu Y, Li C, Liang T, Zhang Z. The influence of forsythia essential oil and ZnO nanoparticles on the physicochemical properties of ASKG-based film and its effect on the preservation of meat quality. Food Bioscience. 2023;56:103239.
.۳۷ Maghami M, Motalebi AA, Anvar SAA. Influence of chitosan nanoparticles and fennel essential oils (Foeniculum vulgare) on the shelf life of Huso huso fish fillets during the storage. Food science & nutrition. 2019;7(9):3030-41.
.۳۸ Bekhit AE-DA, Holman BW, Giteru SG, Hopkins DL. Total volatile basic nitrogen (TVB-N) and its role in meat spoilage: A review. Trends in Food Science & Technology-۱۰۹:۲۸۰;۲۰۲۱ . .۳۰۲
.۳۹ Kakaei S, Shahbazi Y. Effect of chitosan-gelatin film incorporated with ethanolic red grape seed extract and Ziziphora clinopodioides essential oil on survival of Listeria monocytogenes and chemical, microbial and sensory properties of minced trout fillet. LWT-Food Science and Technology. 2016;72:432-8.
.۴۰ Tahir HE, Hashim SB, Mahunu GK, Arslan M, Jiyong S, Mariod AA, et al. Smart films fabricated from natural pigments for measurement of total volatile basic nitrogen (TVB-N) content of meat for freshness evaluation: A systematic review. Food Chemistry. 2022;396:133674.
.۴۱ Mohammadi H, Kamkar A, Misaghi A, Zunabovic-Pichler M, Fatehi S. Nanocomposite films with CMC, okra mucilage, and ZnO nanoparticles: Extending the shelf-life of chicken breast meat. Food Packaging and Shelf Life. 2019;21:100330.
.۴۲ Yaghoubi M, Ayaseh A, Alirezalu K, Nemati Z, Pateiro M, Lorenzo JM. Effect of chitosan coating incorporated with Artemisia fragrans essential oil on fresh chicken meat during refrigerated storage. Polymers. 2021;13(5):716.
.۴۳ Akhbari M, Hamedi S, Aghamiri Z-s. Optimization of total phenol and anthocyanin extraction from the peels of eggplant (Solanum melongena L.) and biological activity of the extracts. Journal of Food Measurement and Characterization. 2019;13:3183-97.
.۴۴ Gudkov SV, Burmistrov DE, Serov DA, Rebezov MB, Semenova AA, Lisitsyn AB. A mini review of antibacterial properties of ZnO nanoparticles. Frontiers in Physics. 2021;9:641481.
.۴۵ Kizilkaya P, Kaya M. The Effect of a Chitosan/TiO2-Nanoparticle/Rosmarinic Acid-Based Nanocomposite Coating on the Preservation of Refrigerated Rainbow Trout Fillets (Oncorhynchus mykiss). Food Science of Animal Resources. 2023;43(6):1170.
.۴۶ Pateiro M, Barba FJ, Domínguez R, Sant'Ana AS, Khaneghah AM, Gavahian M, et al. Essential oils as natural additives to prevent oxidation reactions in meat and meat products: A review. Food Research International. 2018;113:156-66.
.۴۷ Babuskin S, Babu PAS, Sasikala M, Sabina K, Archana G, Sivarajan M, et al. Antimicrobial and antioxidant effects of spice extracts on the shelf life extension of raw chicken meat. International journal of food microbiology. 2014;171:32-40.
.۴۸ Campo M, Nute G, Hughes S, Enser M, Wood J, Richardson R. Flavour perception of oxidation in beef. Meat Science. 2006;72(2):303-11.
.۴۹ Muíño I, Díaz MT, Apeleo E, Pérez-Santaescolástica C, Rivas-Cañedo A, Pérez C, et al. Valorisation of an extract from olive oil waste as a natural antioxidant for reducing meat waste resulting from oxidative processes. Journal of Cleaner Production. 2017;140:924-32.
.۵۰ Zolfaghari A, Bazargani-Gilani B, Aghajani N. Edible film based on corn zein containing dill extract and essential oil/β-cyclodextrin inclusion complex: Shelf life enhancement of common carp fillet. Food Science & Nutrition. 2023;11(7):4275-88.

Extension of Caspian Sea white fish fillet using a nanocomposite film containing green synthesis of ZnO NPs using eggplant cap extract

Mahsa Salehi[1], Amir Shakerian[2], Zohreh Mashak[3*], Ebrahim Rahimi[1]

[1] *Department of Food Hygiene, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran*

[2] *Research Center of Nutrition and Organic Products, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran*

[3] *Department of Food Hygiene, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.*

Corresponding Author: Mashak@Kiau.ac.ir

Abstract

Introduction and purpose: Food spoilage is a main global concern owing to the lack of suitable packaging technology. Nanotechnology is expected to ameliorate food packaging. In this study, the effect of chitosan/eggplant peel anthocyanin/ZnONPs synthesized from eggplant cap extract (at three levels of 1, 3, and 5%) in a HPMC film matrix on the shelf life of Caspian Sea white fish fillets was investigated.

Chemical (pH, TVB-N, and TBARs) and microbiological (psychrophilic, mesophilic bacteria, and Enterobacteriaceae count) tests, sensory attributes (flavor, odor, color, texture and overall acceptance) were used to determine the quality of fish fillets during 14 days (at days 0, 1, 7, 10, and 14) of storage at refrigerated temperature.

The average size of the synthesized nanoparticles was 0.527 nm. The uniform dispersion of nanoparticles on the synthesized films from eggplant cap extract was confirmed by DLS test with PDI of 0.332. Overall, the results indicated a positive effect of packaging film on the shelf life of Caspian Sea white fish fillets. The highest levels of pH, TVB-N, TBARs, and mesophilic, psychrophilic, and enterobacterial bacterial populations were observed in the control sample, while the lowest levels were observed in the nanocomposite film containing 5% eggplant cap extract-synthesized ZnO nanoparticles.Fish fillets packaged in the nanocomposite film containing 5% ZnO nanoparticles had the highest sensory scores during storage. Therefore, the produced nanocomposite film can be used as active packaging to increase the shelf life of Caspian Sea fish fillet.

Keywords: Packaging film, Caspian Sea white fish, ZnO nanoparticles, green synthesis, eggplant cap extract.

بررسی مقاومت ژن‌های انتروتوکسیژنیک جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین در مواد غذایی عرضه‌شده در شهرستان قم

استافیلوکوکوس اورئوس در مواد غذایی

سید عرفان حسینی‌نسب[1*]، نجمه واحد دهکردی[2]

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

۲- دانشجوی دکترای تخصصی بهداشت مواد غذایی، گروه بهداشت مواد غذایی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

*نویسنده مسئول: serfan1030@gmail.com

چکیده

آلودگی مواد غذایی خیابانی با *استافیلوکوکوس اورئوس* به واسطه توانایی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها از دیدگاه بهداشت مواد غذایی یکی از نگرانی‌ها می‌باشد. بنابراین هدف این پژوهش بررسی مقاومت ژن‌های انتروتوکسیژنیک جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین در مواد غذایی عرضه‌شده در شهرستان قم می‌باشد. نخست ۱۵۰ نمونه از مواد غذایی شامل سوسیس، سمبوسه، همبرگر سنتی، فلافل، خوراک ماکارونی و سالاد به صورت تصادفی نمونه‌گیری و در شرایط سترون برای انجام آزمایش به آزمایشگاه بهداشت مواد غذایی ارسال شد. آزمایش‌ها با استفاده از روش‌های استاندارد انجام شد. نتایج نشان داد بیشترین آلودگی مربوط به سالاد (۶۴ درصد)، خوراک ماکارونی (۵۲ درصد)، همبرگر سنتی (۴۸ درصد)، سمبوسه (۴۴ درصد) و فلافل و سوسیس (۲۰ درصد) بود. شایع‌ترین ژن‌های حامل به ترتیب *sea* (۲۱/۹۵ درصد) و *seb* و *sec* (۹/۷۵ درصد) بود. وضعیت شیوع جدایه‌های مقاوم به متی‌سیلین به ترتیب سالاد (۵۲ درصد)، خوراک ماکارونی (۴۴ درصد)، همبرگر سنتی (۳۲ درصد)، سمبوسه (۲۸ درصد)، و فلافل و سوسیس (۴ درصد) بود. آنالیزهای آماری نشان داد ارتباط بین شیوع *استافیلوکوکوس اورئوس* با جدایه‌های مقاوم به متی‌سیلین معنی‌دار نبود ($p<0/05$). همچنین بیشترین مقاومت جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به پنی‌سیلین (۸۲ درصد) و اریترومایسین (۷۸ درصد) و کمترین مقاومت برای امی‌پنم (۹ درصد) بود. بر مبنای شیوع آلودگی در پژوهش حاضر و نقش تعیین‌کننده کیفیت اولیه مواد خوراکی و نیز دستِ تکنیسین در آماده‌سازی خوراکی‌ها؛ احتمال آلودگی از هر دو قسمت ممکن است؛ لذا آموزش بهداشت به دست‌اندرکاران، می‌تواند نقش مهمی در کاهش آلودگی داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس*، متی‌سیلین، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، مواد غذایی خیابانی

مقدمه:

غذاهای خیابانی به عنوان مواد غذایی تعریف می‌شوند که به‌وسیله دست‌فروشان خیابانی در مناطق عمومی برای مصرف انسان، با یا بدون نیاز به پردازش و آماده‌سازی اضافی، تهیه یا فروخته می‌شوند که جزء یک تجارت مهم برای کشورهای در حال توسعه است تا راه‌گشایی جهت رفع نیازهای تغذیه‌ای باشد و با ایجاد اشتغال برای بسیاری از افراد، گستره‌ی اجتماعی-اقتصادی را ارتقا دهد (Sabuj et al., 2018). بر اساس گزارش سازمان خواربار و کشاورزی، تعداد افرادی که هر روز غذاهای خیابانی مصرف می‌کنند، در حدود ۲/۵ میلیارد نفر هستند (Hasan et al., 2021).

غذاهای خیابانی اغلب در شرایط غیربهداشتی تهیه می‌شوند و در معرض دید عموم قرار می‌گیرند؛ پس در برابر سطح بالایی از آلودگی قرار دارند. فروشندگان مواد غذایی خیابانی نیز این محصولات را با مواد مغذی گوناگون و افزودنی‌های غذایی غنی می‌کنند تا طعم آنها را بهبود بخشند و مشتریان را جذب کنند؛ این محتویات، هنگامی که با دیگر عوامل محیطی ترکیب می‌شوند، رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای گوناگونی را تقویت می‌کنند (Moges et al., 2024). فقدان آموزش در مورد نگهداری و فرآوریِ مناسب مواد غذایی، بهداشت فردی نامناسبِ فروشندگان و محیط غیربهداشتی، همگی می‌توانند پدیدآور مشکلاتی در ایجاد مسائل ایمنی غذایی باشند که پیشتر منجر به پدیداری بیماری‌های منتقل‌شونده از طریق غذا می‌شوند و تهدیدکننده‌ی زندگی افراد مصرف‌کننده هستند. این موضوع در کشورهایی با قوانین ناکارآمد، سیستم ایمنی غذایی ضعیف، منابع مالی محدود، برجسته‌تر است (Tadesse et al., 2019).

در سطح جهانی، بیماری‌های اسهالی منتقل‌شونده از مواد غذایی یک نگرانی عمده برای سلامتی است. تازه‌ترین گزارش در خصوص بیماری‌های ناشی از مواد غذایی عدد ۱/۹ میلیون مرگ را عمدتاً برای کودکان زیر ۵ سال، نشان داده است (Troeger et al., 2017)؛ بنابراین، وعده‌های غذایی با گوشت، مرغ، غذاهای دریایی، میوه‌ها، سبزیجات و غلات تهیه‌شده در خیابان‌ها عاملی بالقوه برای انتقال میکروارگانیسم‌های پاتوژن نقش ارزنده‌ای دارند. در میان واگیرهای اساسی پدیدآمده پاتوژن‌هایی هم‌چون: *کلبسیلا پنومونی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا مونوسیتوژنز*، *اشرشیاکلای* و *سالمونلا* همواره چشمگیر بوده‌اند. این عوامل بیماری‌زا می‌توانند دربرگیرنده علائم بیماری، از ملایم تا سخت را در پی داشته باشند که شامل تب، سردرد، تهوع، استفراغ، درد شکم، اسهال و سرانجام مرگ را برای افراد پدید آورد (Tadesse et al., 2019).

در درازنای تاریخ، آنتی‌بیوتیک‌ها کمک شایانی به درمان بیماری‌های باکتریایی و بهبود ناخوشایندی-های منتقل‌شده از غذا کرده‌اند. با این حال، برخی از پاتوژن‌ها، استراتژی‌های[۱۲]AMR را برای شکست-دادن داروها و زنده ماندن در محیط‌های گوناگون برای خود برگزیده‌اند (Salam et al., 2023). افزایش جهانی[۱۳]AR، به علت به‌کارگیری گسترده از آنتی-بیوتیک‌ها در کشاورزی، دامداری و پزشکی انسانی، یک مشکل بهداشتی مهم برای سازمان بهداشت جهانی[۱۴]WHO و خدمات مراقبت‌های بهداشتی ملی پدیدآورده است (Fusaro et al., 2024).

مسمومیت غذایی با *استافیلوکوکوس* یا[۱۵](SFP) یکی از گسترده‌ترین علل مسمومیت غذایی در سراسر جهان است. خوردن غذاهای آلوده به این باکتری، مایه‌ی پدیداری نشانه‌های بیماری در انسان را می-افزاید. این مسمومیت به علت مصرف انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی و پروتئین‌های مقاوم در برابر حرارت تولید شده توسط سویه‌های انتروتوکسیژنیک *استافیلوکوک‌های* کواگولاز مثبت رخ می‌دهد. این بیماری‌ها معمولاً خود محدودشونده بوده و با استفراغ شدید، اسهال و درد شکمی یا حالت تهوع پس از یک دوره کمون کوتاه بهبود می‌یابد (Savini et al., 2023). مسمومیت غذایی انسان توسط *استافیلوکوکوس اورئوس* عمدتاً از مصرف غذاهای پخته شده یا فرآوری شده و به دنبال آن شرایط محیطی مطلوب برای رشد و تولید انتروتوکسین‌ها در طول نگهداری و آماده‌سازی غذا (یعنی زمان و دما) مرتبط است (Mohamadi et al., 2023).

استافیلوکوکوس اورئوس باکتری گرم‌مثبت، خوشه‌ای شکل، که در گستره‌ی دمایی ۱۶ تا ۴۶ درجه، pH بین ۴/۵ تا ۸/۲ رشد کرده و برخی سویه‌های آن دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد را به مدت ۲۰ دقیقه نیز تحمل می‌کنند. این پاتوژن در دهه‌های پیشین بیشتر مورد توجه جامعه جهانی قرارگرفته است؛ چرا که مقاومت آن به برخی آنتی‌بیوتیک‌ها مشکل‌ساز شده است. *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی-سیلین چالشی بزرگ برای انسان پدید آورده است (Belhout et al., 2022)؛ از آنجایی که پژوهشی در هلند نشان داده که عامل بیش از ۲۰ درصد مسمومیت‌های استافیلوکوکی مقاوم به متی‌سیلین، غذاهای با منشأ دامی است (Kreausukon et al., 2012)، لذا به دلیل اهمیت این موضوع، سازمان بهداشت جهانی پژوهش‌های گسترده‌ای در سطح جهان در مورد *استافیلوکوکوس*‌های مقاوم به متی-سیلین در غذاهای با منشأ دامی گزارش داده است؛ با توجه به مخاطرات ذکر شده در مورد *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین،

[۱۲] Anti Microbial Resistance
[۱۳] Antibiotic Resistance
[۱۴] World health organization
[۱۵] Staphylococcal Food Possoning

پژوهش پیش‌روی، با انگیزه‌ی بررسی مقاومت ژن-های انتروتوکسیژنیک جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین در مواد غذایی عرضه-شده در شهرستان قم انجام گرفته است.

مواد و روش‌کار:

نمونه‌گیری

در گام نخست، ۱۵۰ نمونه مواد غذایی شامل سوسیس (۲۵)، سمبوسه (۲۵)، همبرگر سنتی (۲۵) و خوراک ماکارونی (۲۵)، خوراک بندری (۲۵) و سالاد (۲۵) از بازار عرضه‌کننده این محصولات در شهرستان قم طی ماه‌های اردیبهشت و خرداد نمونه-گیری شد. نمونه‌گیری استوار بر الگویی تصادفی بود و در شرایط سترون به آزمایشگاه پارسا آزمای غدیر واقع در شهرستان قم انتقال داده شد. نمونه‌ها تا آغاز آزمایش در دمای ۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

تشخیص استافیلوکوکوس اورئوس

به منظور جداسازی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* از نمونه‌های غذایی، ابتدا نمونه‌ها در محیط کشت (Broth Soy Tryptic) (Merck, Germany) غنی شده با ۱۰ درصد نمک کشت داده شدند و به مدت ۱۸ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شد. سپس کلنی‌های رشد کرده در محیط کشت Tryptic Soy Broth Agar (Mirmedia, Iran) به محیط کشت Baird Parker (Merck, Germany) غنی شده با امولسیون تلوریت-زرده تخم مرغ انتقال و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند. کلنی‌های سیاه رنگ با هاله رسوبی در اطراف به عنوان کلنی‌های تیپیک برای باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در نظر گرفته شد و با تست‌های بیوشیمیایی کاتالاز، اکسیداز، F/O، اوره‌آز، فسفاتاز، کوواگولاز، DNase و تخمیز مانیتول مورد بررسی قرار گرفت (MomeniShahraki et al, 2020).

شناسایی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین

برای این منظور تمامی ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از نمونه‌ها از نظر مقاومت نسبت به دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی سفوکسیتین (۳۰ میکروگرم) و اگزاسیلین (۱ میکروگرم) در محیط کشت مولر هینتون آگار ارزیابی شدند و ایزوله‌هایی که به صورت همزمان نسبت به هر دو آنتی‌بیوتیک مقاومت داشتند، به عنوان ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین در نظر گرفته شدند (Mehrotra et al., 2000).

استخراج DNA

استخراج DNA به روش فنل-کلروفرم انجام شد. به طور خلاصه، به رسوب تهیه شده از کشت باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین، به ترتیب ۶۰۰ میکرولیتر بافر لیز (Tris-Hcl, pH7.4; EDTA 50mM) ۱۳ میکرولیتر سدیم دودسیل سولفات (SDS 25%)، ۳ میکرولیتر

پروتئیناز K (20mg/ml) اضافه نموده و آن را در دمای ۶۰°C به مدت یک ساعت قرار می‌دهیم. به دنبال آن ۶۰۰ میکرولیتر محلول فنل- کلروفرم - ایزوآمیل الکل (به نسبت 1:24:25) می‌افزاییم تا یک فاز شیری رنگ یکنواخت تشکیل شود. سپس با دور ۱۳۰۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ کرده و فاز بالایی (فاز آبی) را به لوله‌های جدید منتقل می‌کنیم. این مرحله دوبار تکرار شده و به منظور رسوب بهتر DNA، هم حجم فاز آبی اتانول سرد و خالص به همراه ۰/۱ میکرولیتر استات سدیم (1M)اضافه می‌کنیم. در نهایت آن را به مدت ۲ ساعت در دمای ۲۰°C- قرار می‌دهیم. بعد از آن، لوله را با دور ۱۳۰۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ نموده و رسوب حاصله را پس از خشک کردن و حل کردن در بافر به عنوان DNA مورد استفاده قرار می‌دهیم. برای تأیید صحت استخراج ژنوم از الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ استفاده شد.

آزمون Multiplex PCR و جداسازی هم زمان ژن‌های انتروتوکسیژنیک

ابتدا جهت تایید باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین از یک جفت پرایمر رفت و برگشت یونیورسال (16srRNA) با کد دسترسی MN982872 استفاده شد. به منظور تکثیر ژن‌های *sea*، *seb* و *sec* طی فرآیند PCR از ۳ جفت پرایمر اختصاصی و تایید شده توسط BLAST در NCBI استفاده شد (جدول ۱). پرایمر جهت ساخت به شرکت تکاپو زیست سفارش داده شد. برنامه دمایی زمانی برای انجام PCR به شرح زیر می‌باشد:

جهت انجام PCR از دستگاه Master cycler gradient (Mastersycler, Germany) استفاده شد. حجم کلی واکنش PCR، برای تایید باکتری با پرایمر 16srRNA ۱۵ میکرولیتر و شامل ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر F و R، ۷/۵ میکرولیتر مسترمیکس (سیناکلون، ایران) ۱ میکرولیتر DNA الگو و ۵/۵ میکرولیتر آب فوق خالص عاری از نوکلئاز (یکتاتجهیز آزما، ایران) بود. برنامه‌ی حرارتی مورد استفاده شامل: یک سیکل ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه برای واسرشت شدن DNA الگو، ۳۵ سیکل دمایی به ترتیب ۹۴ °C به مدت ۱ دقیقه (دناتوراسیون)، ۵۳°C به مدت ۱ دقیقه (اتصال پرایمر)، ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه (طویل سازی) و در نهایت یک سیکل ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه به منظور طویل سازی نهایی بود. تمام نمونه‌هایی که از نظر حضور 16srRNA مثبت بودند، با استفاده از Multiplex PCR برای ردیابی ژن‌های انتروتوکسیژنیک باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ارزیابی شدند. جهت ردیابی ژن‌های کد کننده توکسین‌ها در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر شامل ۲۵ میکرولیتر مسترمیکس (سیناکلون، ایران)، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر F و R اختصاصی هر ژن، ۵ میکرولیتر از DNA الگو و ۱۷ میکرولیتر آب فوق خالص عاری از نوکلئاز (یکتاتجهیز آزما، ایران) بود.

برنامه‌ی حرارتی مورد استفاده شامل: یک سیکل ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه (دناتوراسیون اولیه)، سپس ۲۵ سیکل دمایی به ترتیب ۹۴°C به مدت ۱ دقیقه (دناتوراسیون)، ۵۶°C به مدت ۱ دقیقه (اتصال پرایمر)، ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه (طویل سازی) و یک سیکل نهایی ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه (طویل سازی نهایی) بود. به منظور تأیید وجود قطعات تکثیر یافته از ژل آگارز ۱ درصد با رنگ آمیزی Safe stain استفاده شد. در تمام واکنش‌های PCR، از آب مقطر فاقد DNA به عنوان کنترل منفی و از باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 10357 به عنوان کنترل مثبت، استفاده شد. (جدول ۱)

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده برای شناسایی ژن‌های هدف *استافیلوکوکوس اورئوس* در واکنش PCR

منبع	اندازه محصول (Pb)	توالی پرایمر ('3-'5)	ژن هدف
	(۷۶۴)	F: AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC R: AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC	*16srRNA*
Masihinejad et al., 2023)	(۱۲۷)	F: ACGATCAATTTTTACAGC R: TGCATGTTTTCAGAGTTAATC	*Sea*
	(۴۷۷)	F: GAATGATATTAATTCGCATC R: TCTTTGTCGTAAGATAAACTTC	*Seb*
	(۲۷۱)	F: GACATAAAAGCTAGGAATTT R: AAATCGGATTAACATTATCCA	*Sec*

مقاومت آنتی‌بیوتیکی

تست آنتی‌بیوگرام به روش diffusion_Disk انجام گرفت. پس از آماده‌سازی سوسپانسیون میکروبی با محلول استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند، در محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد و پس از آن دیسک‌های آنتی‌بیوگرام، شامل اریترومایسین (EM)، پنی‌سیلین (PEN)، جنتامایسین (GM)، سولفامتاکسازول (SXT)، امی‌پنم (IMP) و تتراسیکلین (TE) روی محیط کشت قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، با تعیین قطر هاله‌های عدم رشد، میزان مقاومت جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها اندازه‌گیری شد (Heidarzadi et al., 2021).

آنالیز آماری

تحلیل آماری توسط نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ و جهت مقایسه رابطه بین گروه‌های مختلف در دو سطح معنی‌داری لحاظ گردید.

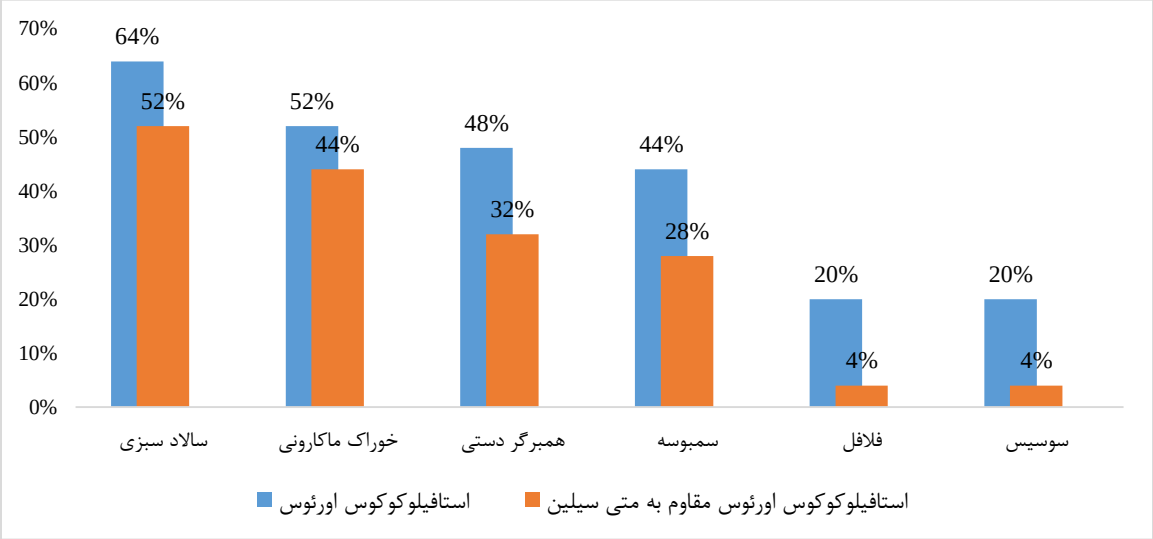
نتایج:

نتایج مربوط به نمونه‌های غذایی شده از بازار شهرستان قم، در جدول ۲ نمایش داده شده است. به طور کلی بیشترین میزان آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب مربوط به سالاد ۱۶ نمونه (۶۴ درصد)، خوراک ماکارونی ۱۳ نمونه (۵۲ درصد)، همبرگر سنتی ۱۲ نمونه (۴۸ درصد)، سمبوسه ۱۱ نمونه (۴۴ درصد)، و فلافل و سوسیس ۵ نمونه (۲۰ درصد) بود. وضعیت شیوع *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین در جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مثبت به صورت سالاد ۱۳ نمونه (۵۲ درصد)، خوراک ماکارونی ۱۱ نمونه (۴۴ درصد)، همبرگر سنتی ۸ نمونه (۳۲ درصد)، سمبوسه ۷ نمونه (۲۸ درصد)، و فلافل و سوسیس ۱ نمونه (۴ درصد) بود. آنالیزهای آماری نشان داد بین شیوع *استافیلوکوکوس اورئوس* با جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین معنی-دار است ($p<0/01$).

جدول ۲: شیوع *استافیلوکوکوس اورئوس* و سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین در مواد غذایی نمونه‌گیری‌شده در شهرستان قم

نوع محصول	تعداد	شیوع *استافیلوکوکوس اورئوس*	شیوع *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین	سطح معنی‌داری
سالاد	۲۵	۱۶ (۶۴ درصد)	۱۳ (۵۲ درصد)	۰/۱۰۲^{ns}
خوراک ماکارونی	۲۵	۱۳ (۵۲ درصد)	۱۱ (۴۴ درصد)	۰/۲۰۴^{ns}
همبرگر سنتی	۲۵	۱۲ (۴۸ درصد)	۸ (۳۲ درصد)	۰/۰۳۹*
سمبوسه	۲۵	۱۱ (۴۴ درصد)	۷ (۲۸ درصد)	۰/۰۱۶**
فلافل	۲۵	۵ (۲۰ درصد)	۱ (۴ درصد)	۰/۰۰۲**
سوسیس	۲۵	۵ (۲۰ درصد)	۱ (۴ درصد)	۰/۰۰۲**
مجموع	۱۵۰	۶۲ (۴۱/۳۳ درصد)	۴۱ (۲۷/۳۳ درصد)	۰/۰۱۴**

ns:تفاوت محل با استاندارد مختلف معنی دار نیست *:تفاوت فصل یا میزان استاندار با احتمال ۹۵ درصد معنی دار است **:تفاوت فصل یا میزان استاندار با احتمال ۹۹ درصد معنی‌دار است ($p<00/01$).



نمودار ۱: وضعیت شیوع *استافیلوکوکوس اورئوس* و سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین در مواد غذایی نمونه‌گیری‌شده در شهرستان قم

مطابق جدول ۳- نتایج جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین مثبت نشان داد که بیشترین و کمترین ژن حامل مربوط به *sea* (۲۱/۹۵ درصد)، *seb* و *sec* (۹/۷۵ درصد) بود.

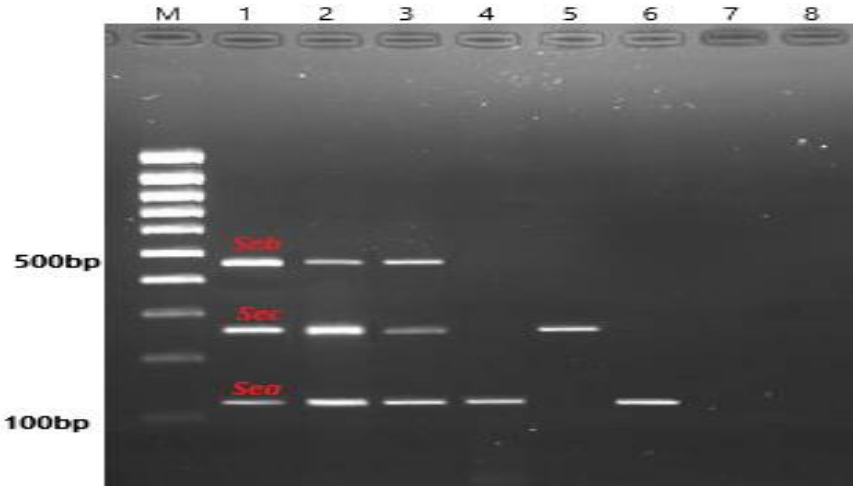
جدول ۳: فراوانی ژن‌های انتروتوکسین در جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از نمونه‌های مواد غذایی شهرستان قم

نمونه‌های متی‌سیلین مثبت	تعداد نمونه	شیوع ژن‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین		
		Sea	*seb*	*Sec*
سالاد	۱۳	۳ (۲۳/۰۷ درصد)	۲ (۱۵/۳۸ درصد)	۲ (۱۵/۳۸ درصد)
خوراک ماکارونی	۱۱	۴ (۳۶/۳۶ درصد)	۱ (۹/۰۹ درصد)	۲ (۱۸/۱۸ درصد)
همبرگر سنتی	۸	۲ (۲۵ درصد)	۰	۰
سمبوسه	۷	۰	۱ (۱۴/۷ درصد)	۰
فلافل	۱	۰	۰	۰
سوسیس	۱	۰	۰	۰
مجموع	۴۱	۹ (۲۱/۹۵ درصد)	۴ (۹/۷۵ درصد)	۴ (۹/۷۵ درصد)

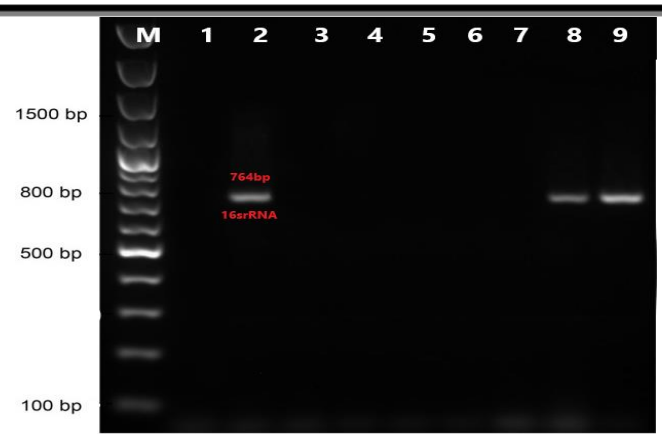
بر مبنای جدول ۴، مقاومت آنتی‌بیوتیکی به جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* را نشان می‌دهد. به این ترتیب بیشترین میزان مقاومت برای پنی‌سیلین (۸۲ درصد) و اریترومایسین (۷۸ درصد) و کمترین مقاومت مربوط به امی‌پنم (۹ درصد) بود.

جدول ۴، الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از نمونه‌های غذایی

وضعیت تعداد جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به انتی‌بیوتیک‌های مختلف			
آنتی‌بیوتیک	حساس	نیم‌حساس	**مقاوم**
اریترومایسین (ER)	۰ (۰)	۱۴ (۲۲٪)	**۴۸ (۷۸٪)**
پنی‌سیلین (PEN)	۰ (۰)	۱۱ (۱۸٪)	**۵۱ (۸۲٪)**
جنتامایسین (GM)	۵ (۹٪)	۱۴ (۲۲٪)	**۴۳ (٪۶۹)**
سولفامتاکسازول (SXT)	۸ (۱۳٪)	۲۱ (٪۳۳)	**۳۳ (۵۴٪)**
امی‌پنم (IMP)	۴۰ (۶۳٪)	۱۷ (۲۸٪)	**۵ (۹٪)**
تتراسایکلین (TE)	۴ (۶٪)	۱۲ (۲۰٪)	**۴۶ (۷۴٪)**



شکل ۱: ژن‌های *sea*، *seb* و *sec* *استافیلوکوکوس اورئوس* در مواد غذایی نمونه‌گیری شده در شهرستان قم. M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی (سیناکلون، ایران)، چاهک ۱ و ۲: ژن‌های *sea*: 127bp و *seb*: 477bp و *sec*: 271bp موجود در نمونه‌های سالاد، چاهک ۳: ژن‌های *sea*: 127bp و *seb*: 477bp و *sec*: 271bp موجود در یکی از نمونه‌های خوراک ماکارونی، چاهک ۴ و ۶: ژن *sea*: 127bp موجود در نمونه‌های همبرگر سنتی، چاهک ۵: ژن *sec*: 271bp موجود در یکی از نمونه‌های سمبوسه، چاهک ۷ و ۸: کنترل منفی.



شکل ۲: PCR ژن 16srRNA به منظور تشخیص و تایید باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* M : مارکر ۱۰۰ جفت بازی (سیناکلون، ایران)، چاهک ۱: کنترل منفی، چاهک‌های ۲، ۸ و ۹: باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* حاوی ژن 16srRNA با اندازه 764bp، چاهک‌های ۳، ۴، ۵، ۶، و ۷: باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* فاقد ژن 16srRNA با اندازه 764bp

بحث

همه‌گیری‌های ناشی از غذا به عنوان یک بار منفی سلامتی و اقتصادی در جهان در نظر گرفته می‌شود. بر اساس تخمین سازمان بهداشت جهانی، هر سال از هر ۱۰ نفر یک نفر در سراسر جهان به دلیل خوردن مواد غذایی آلوده بیمار می‌شود. انتروتوکسین‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* با نفوذ به زنجیره تامین مواد غذایی در مراحل مختلف باعث ایجاد طیف گسترده‌ای از مسمومیت‌های غذایی شده و سلامت انسان را به طور جدی تهدید می‌کنند (Li et al., 2024). در همین راستا هدف از پژوهش حاضر بررسی شیوع *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین در مواد غذایی نمونه‌گیری شده در شهرستان قم بود، که در این پژوهش بیشترین آلودگی مربوط به سالاد (۶۴ درصد)، خوراک ماکارونی (۵۲ درصد)، همبرگر سنتی (۴۸ درصد)، سمبوسه (۴۴ درصد) و فلافل و سوسیس (۲۰ درصد) بود. شایع‌ترین ژن‌های حامل به ترتیب *sea* (۲۱/۹۵ درصد) و *seb* و *sec* (۹/۷۵ درصد) بود. وضعیت شیوع جدایه‌های مقاوم به متی-سیلین به ترتیب سالاد (۵۲ درصد)، خوراک ماکارونی (۴۴ درصد)، همبرگر سنتی (۳۲ درصد)، سمبوسه (۲۸ درصد)، و فلافل و سوسیس (۴ درصد) بود.

در پژوهشی که توسط Thi و همکاران (۲۰۲۱) در ویتنام صورت گرفت گزارش دادند که ۳۴/۶۳ درصد از نمونه‌های غذاهای خیابانی به *استافیلوکوکوس اورئوس* آلوده بودند (Thi et al., 2021)، که با نتایج پژوهش حاضر (۴۱/۳۳ درصد) هم‌راستا نمی‌باشد. Aleglign و همکاران در پژوهشی (۲۰۲۳) روی غذاهای خیابانی پژوهشی انجام دادند که آلودگی ۳۴/۲ درصدی به *استافیلوکوکوس اورئوس* را گزارش دادند (Alelign et al., 2023) که پائین‌تر از نتایج به

دست آمده از پژوهش حاضر است. میبدی و همکاران (۲۰۱۹) هم‌راستا با پژوهش حاضر در مطالعه‌ای گزارش دادند میزان آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه‌های سمبوسه ۱۱/۲ درصد بود (meybodi et al., 1398)، در مطالعه حاضر آلودگی در سمبوسه‌ها ۴۴ درصد بود که مطابقتی بین پژوهش‌ها نیست. فضل‌آرا و همکاران (۲۰۱۶) در پژوهشی مشابه با مطالعه حاضر، گزارش دادند ۲۳/۲۸ درصد نمونه‌ها به *استافیلوکوکوس اورئوس* آلودگی داشتند (Fazlara A et al., 2017)، که پائین‌تر از نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر است. **Khalek و همکاران (۲۰۲۱) در پژوهشی گزارش دادند آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* در مواد غذایی خیابانی ۱۰ درصد بود (Khalek et al., 2021)، که مطابقتی با پژوهش حاضر ندارد.** Beshiruو همکاران (۲۰۲۴) در پژوهشی به بررسی آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی-سیلین گزارش دادند از مجموع ۴۰۰ نمونه، ۱۴/۲۵ حاوی جدایه متی‌سیلین مثبت بود و بیشترین ژن حامل *sea* و *seb* بودند (Beshiru et al., 2024)، مه در خصوص شیوع متی‌سیلین مطابقتی با پژوهش حاضر ندارد، اما بین جدایه‌های *sea* و *seb* با مطالعه حاضر هم‌راستا است.

Sauf وهمکاران (۲۰۲۳) در پژوهشی گزارش دادند از مجموع ۷۰ نمونه مواد غذایی خیابانی، ۶۲/۸ درصد به *استافیلوکوکوس اورئوس* آلوده بودند (Saud et al., 2023)، که فراتر از نتایج پژوهش حاضر است. حیدرزادی و همکاران (۲۰۲۳) در پژوهشی هم‌راستا با مطالعه حاضر گزارش دادند میزان آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* ۷۱/۴۲ بود (Heidarzadi et al., 2023) که فراتر از مطالعه حاضر بود.

در پژوهشی هم‌راستا با مطالعه حاضر Aovare و همکاران (۲۰۲۲) ارزیابی آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* را ۴۰/۳ درصد گزارش دادند (Aovare et al., 2022)، که هم‌راستا با مطالعه حاضر است. پژوهشی توسط Esemu و همکاران (۲۰۲۳) انجام گرفت که گزارش دادند ۳۸/۳ درصد نمونه‌های غذاهای خیابانی به *استافیلوکوکوس اورئوس* آلودگی داشتند و سویه-های مقاوم به متی‌سیلین ۲۵ درصد بودند. همچنین گزارش دادند که بیشترین و کمترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به پنی‌سیلین و اریترومایسین بود (Esemu et al., 2023) که هم‌راستا با پژوهش حاضر است. در این مطالعه میزان آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* ۴۱/۳۳ درصد، مقاومت به متی‌سیلین در بین جدایه‌ها ۲۷/۳۳ درصد و بیشترین مقاومت مربوط به پنی‌سیلین و اریترومایسین بود. Zhou و همکاران در پژوهشی که در شمال چین انجام دادند گزارش کردند که از مجموع ۸۲۴ نمونه غذای خیابانی نمونه‌گیری شده، ۱۳/۶۹ درصد واجد جدایه‌های متی‌سیلین مثبت بود؛ که پنی‌سیلین و اریترومایسین بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی را

داشتند (Zhou et al., 2024)، که در خصوص مقاومت آنتی‌بیوتیکی مطابق با پژوهش حاضر است. پژوهشی توسط Egege و همکاران (۲۰۲۰) هم‌راستا با مطالعه حاضر انجام شد که گزارش دادند ۴۳/۸ درصد به *استافیلوکوکوس اورئوس* آلوده بودند و جدایه‌های متی‌سیلین مثبت ۳۰ درصد بود (Egege et al., 2020) که با مطالعه حاضرمطابقت دارد. پژوهش انجام شده توسط Jia و همکاران (۲۰۲۴) گزارش آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* و مقاوم به متی-سیلین به ترتیب ۳۷/۳ و ۲۹ درصد را دادند (Jia et al., 2024) که هم‌راستا با پژوهش حاضر می‌باشد. امینی و علیزاده در پژوهشی بر روی آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس*، نتایجی مطابق با مطالعه حاضر در خصوص آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* و مقاومت آنتی‌بیوتیک جدایه‌ها را گزارش دادند (Alizadeh and Amini, 2015).

آن‌گونه که از نتایج به دست‌آمده از پژوهش حاضر مشخص است، شیوع *استافیلوکوکوس اورئوس* و جدایه‌های متی‌سیلین مثبت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی نگران‌کننده می‌باشد. امروزه به علت فراوانی مراکز تهیه و توزیع مواد غذایی در خارج از منزل هم‌چون رستوران‌ها، اغذیه‌فروشی‌ها و مراکزی که به‌طور عمده در عرضه مواد غذایی آماده دخالت دارند و استفاده هر چه بیشتر غذاهایی نظیر فست‌فودها که نیاز به طبخ طولانی‌مدت و حرارت بالا ندارند باعث ازدیاد آمار مبتلایان به عفونت‌ها و مسومیت‌های غذایی شده است. همچنین دلایل دیگری نظیر تحول در فناوری مواد غذایی، تغییر در سبک زندگی، خرید مواد غذایی در حجم زیاد و استفاده طولانی‌مدت از مواد غذایی نگهداری شده در یخچال و عدم اطلاعات کافی در زمینه بهداشت مواد غذایی تا نحوه نگهداری و پختن آنها سبب بروز روز افزون طغیان‌های ناشی از مواد غذایی شده است که این مشکلات به‌عنوان یک چالش جهانی مطرح بوده و کشورها در تلاش هستند تا با بررسی‌های آگاهانه در جهت شناخت عوامل و کنترل و پیشگیری آنها بر آیند و با جلوگیری از وقوع این طغیان‌ها باعث صرفه‌جویی در هزینه‌های درمانی شده و سلامت جامعه را با رعایت بهداشت مواد غذایی تامین کنند (Dallal et al., 2015). مومنی‌شهرکی و همکاران در پژوهشی هم‌راستا با مطالعه حاضر، میزان آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* در سبزیجات و سالاد را ۱۴/۰۲ درصد و کمترین مقاومت بر علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* را آنتی‌بیوتیک امی‌پنم گزارش دادند (MomeniShahraki et al, 2020)، که در خصوص میزان آلودگی مطابقتی وجود ندارد اما در خصوص مقاومت امی‌پنم هم‌راستا با پژوهش حاضر است.

نتیجه‌گیری

از مهم‌ترین دلایل ناهمگونی پژوهش‌های پیشین با پژوهش پیش‌رو می‌توان به موقعیت جغرافیایی، تفاوت در محل نمونه‌گیری‌ها، خطای آزمایشگر، عدم

رعایت بهداشت در مراکز عرضه و تفاوت در روش‌های جداسازی اشاره کرد. از مهم‌ترین دلایل آلودگی در پژوهش حاضر می‌توان عدم رعایت بهداشت فردی، عدم استفاده از ماسک و دست‌کش؛ شلوغ‌بودن جایگاه‌های عرضه، نزدیک بودن مواد اولیه پروسس نشده و خام به غذاهای آماده مصرف، وضعیت بسیار آلوده محیط عرضه، آلودگی‌های ثانویه و عدم آگاهی افراد و سوء استفاده از دما و زمان برای پخت کامل مواد غذایی را می‌توان نام‌برد. بنابر الگوهای پیشنهادی توسط سازمان‌های بهداشتی دنیا، برای کنترل وضعیت بهداشت، رعایت اصول بهداشتی، آموزش کارکنان و افراد شاغل، استفاده از ماسک می‌تواند کمک‌کننده باشد و در صورت مسمومیت ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس*، با توجه به خودمحدودشوندگی این مسمومیت، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها به حداقل برسد تا کمک شایانی به بهبود مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سراسر دنیا گردد.

تشکر و قدردانی: از تمامی کسانی که موجبات به سرانجام رسیدن این پژوهش شدند کمال سپاس و قدردانی داریم.

تعارض در منافع: وجود ندارد.

منابع

Alelign, D., Yihune, M., Bekele, M., Oumer, Y., Beyene, K., and Atnafu, K. (2023). Bacteriological quality and antimicrobial resistant patterns of foodborne pathogens isolated from commonly vended street foods in Arba Minch town, southern Ethiopia. *Infection and Drug Resistance*, 2883-2899.

Alizadeh, S., and Amini, K. (2015). Determining the presence of virulence genes panton valentine leukocidin Pvl and methicillin resistance Gene mecA in *Staphylococcus aureus* strains isolated from food samples by multiplex PCR and antibiotic resistance.

Aovare, O., Kendie, S., and Osei-Kufuorp, P. (2022). Safety Assessment of Street Foods in The Bolgatanga Municipality of The Upper East Region, Ghana. *JAFSAT* **9**, 21-34.

Belhout, C., Elgroud, R., and Butaye, P. (2022). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and other methicillin-resistant staphylococci and Mammaliicoccus (MRNaS) associated with animals and food products in Arab countries: A review. *Veterinary Sciences* **9**, 317.

Beshiru, A., Isichei-Ukah, B. O., Uwhuba, K. E., Igere, B. E., and Igbinosa, E. O. (2024). Prevalence, characterization, and implications of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in ready-to-eat foods from Delta, Nigeria: a concern for consumer safety. *Sustainable Microbiology* ,۱ qvae007.

Dallal, M. M. S., Motalebi, S., Asl, H. M., Forushani, A. R., Yazdi, M. K. S., Rajabi, Z., and Aghili, N. (2015). Analysis of epidemiological data of foodborne outbreak reported in Iran. *Tehran University Medical Journal* **72**.

Egege, S. R., Akani, N. P., and Nwankwo, C. E. I. (2020). Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in ready-to-eat shellfish (Corbiculid heterodont) in Bayelsa State, Nigeria. *Microbiology Research Journal International* **30**, 22-35.

K., Kfusi, J. A., and Njukeng, A. P. (2023). Ready-to-Eat Foods: A Potential Vehicle for the Spread of Coagulase-Positive Staphylococci and Antimicrobial-Resistant *Staphylococcus aureus* in Buea Municipality, South West Cameroon. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology* **2023**, 9735319.

Fazlara A, gharibi D, ghorbanpour M, and S, N. (2017). The survey on presence of methicillin-resistant gene (mecA) in *staphylococcus aureus* isolates from food origin. *Food science and industry* **63**, 303-313.

Fusaro, C., Miranda-Madera, V., Serrano-Silva, N., Bernal, J. E., Ríos-Montes, K., González-Jiménez, F. E., Ojeda-Juárez, D., and Sarria-Guzmán, Y. (2024). Antibiotic-Resistant Bacteria Isolated from Street Foods: A Systematic Review. *Antibiotics* **13**, 481.

Hasan, M., Siddika, F., Kallol, M. A., Sheikh, N., Hossain, M. T., Alam, M. M., and Rahman, M. (2021). Bacterial loads and antibiotic resistance profile of bacteria isolated from the most popular street food (Phuchka) in Bangladesh. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research* **8**, 361.

Heidarzadi, M., Rahnama, M., Alipoureskandani, M., Saadati, D., and Afsharimoghadam, A. (2021). Salmonella and Escherichia coli contamination in samosas presented in Sistan and Baluchestan province and antibiotic resistance of isolates. *Food Hygiene* **11**, 81-90.

Heidarzadi, M. A., Ayazi, N., Vahed Dehkordi, N., Karami, M., Ahmadi, S. K., and Hoseini Nasab, S. E. (2023). Prevalence of contamination of sandwiches with pathogenic microorganisms and antibiotic resistance of isolates in

Kermanshah city, Iran. *Food Hygiene* **13**, 53-66.

Jia, K., Qin, X., Bu, X., Zhu, H., Liu, Y., Wang, X., Li, Z., and Dong, Q. (2024). Prevalence, antibiotic resistance and molecular characterization of *Staphylococcus aureus* in ready-to-eat fruits and vegetables in Shanghai, China. *Current Research in Food Science* **8**, 100669.

Khalek, M. A., Akter, M., Rumi, N. A., Sabuj, M. S. S., Hasan, M., and Hosen, M. A. (2021). Characterization of Bacteria from Different Street Foods and Their Antibiotic Resistance Profile from different Selected Area in Gazipur, Bangladesh. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*, 7812–7821-7812–7821.

Kreausukon, K., Fetsch, A., Kraushaar, B., Alt, K., Müller, K., Krömker, V., Zessin, K.-H ,.Käsbohrer, A., and Tenhagen, B.-A. (2012). Prevalence, antimicrobial resistance, and molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from bulk tank milk of dairy herds. *Journal of dairy science* **95**, 4382-4388.

Li, Q., Dou, L ,.Zhang, Y., Luo, L., Yang, H., Wen, K., Yu, X., Shen, J., and Wang, Z. (2024). A comprehensive review on the detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins in food samples. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **23**, 1-45.

Masihinejad, A., Bonyadian, M., and Motamedifar, M. (2023). Detection of genes encoding enterotoxins (SEA-D) in *Staphylococcus aureus* strains isolated from workers' nasal samples and creamy pastries of Shiraz confectioneries. *Iranian Journal of Microbiology* **15**, 251.

Mehrotra, M., Wang, G., and Johnson, W. M. (2000). Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *Journal of clinical microbiology* **38**, 1032-1035.

meybodi ,m., Nejad, Z. M., and khajehkarimaldini, l. (1398). Investigation of *Staphylococcus aureus* contamination in Food Samples and determining of its epidemiological relationship with theirs processing workers by polymerase chain reaction. *Applied Biology* **36**.۱۷-۱ ,

Moges, M., Rodland, E. K., Legesse, T., and Argaw, A. (2024). Antibiotic resistance patterns of *Staphylococcus aureus* and Enterobacteriaceae isolated from street foods in selected towns of Ethiopia. *BMC Infectious Diseases* **24**, 367.

Momeni, S. M., Shakerian, A., Rahimi, E., & Safarpoor, D. F. (2020). Study the frequency of enterotoxin encoding genes and antibiotic resistance pattern of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from vegetable and salad samples in Chaharmahal Va Bakhtiari province.

Mohamadi, S., Rezaee, R., Hashemi, M., Kiani, B., Ghasemi, S., Alizadeh Sani, M., and Afshari, A. (2023). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA), and Vancomycin-Resistant Enterococci (VRE) Contamination of Food Samples in Iran: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Iranian Journal of Medical Microbiology* **17**, 135-149.

Sabuj, A. A. M., Haque, Z. F., Barua, N., Islam, M. A., and Saha, S. (2018). Assessment of bacteriological quality of street vended fast foods and their antimicrobial resistance. *Int J Curr Microbiol Appl Sci* **7**, 3049-59.

Salam, M. A., Al-Amin, M. Y., Salam, M. T., Pawar, J. S., Akhter, N., Rabaan, A. A., and Alqumber, M. A. (2023). Antimicrobial resistance: a growing serious threat for global public health. *In* "Healthcare", Vol. 11, pp. 1946. MDPI.

Saud, B., Devkota, P., Paudel, G., Amatya, N., and Shrestha, V. (2023). Is there a need for regular surveillance for bacterial

contaminants in street foods of Kathmandu. *Clin Res Stud* **2**, 2835-82.

Savini, F., Romano, A., Giacometti, F., Indio, V., Pitti, M., Decastelli, L., Devalle, P. L., Gorrasi, I. S. R., Miaglia, S., and Serraino, A. (2023). Investigation of a *Staphylococcus aureus* sequence type 72 food poisoning outbreak associated with food-handler contamination in Italy. *Zoonoses and Public Health* **70**, 411-419.

Tadesse, G., Mitiku, H., Teklemariam, Z., and Marami, D. (2019). Salmonella and Shigella among asymptomatic street food vendors in the Dire Dawa city, Eastern Ethiopia: prevalence, antimicrobial susceptibility pattern, and associated factors. *Environmental health insights* **13**, 1178630219853581.

Thi, A. N. T., Kittirath, P., Abiola, S. D., and Ha, N. C. (2021). Evaluation of street food safety and hygiene practices of food vendors in can Tho city of Vietnam. *Current Research in Nutrition and Food Science Journal* **9**, 158-171.

Troeger, C., Forouzanfar, M., Rao, P. C., Khalil, I., Brown, A., Reiner, R. C., Fullman, N., Thompson, R. L., Abajobir, A., and Ahmed, M. (2017). Estimates of global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoeal diseases: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet infectious diseases* **17**, 909-948.

Zhou, C., Zhao, L., Zhang, J., Qi, Y., Huang, B., and She, Z .(٢٠٢٤) .Prevalence, Antibiotic Resistance, and Molecular Typing of *Staphylococcus aureus* Isolated from Ready-to-Eat Foods in Guangdong, South China. *Foodborne Pathogens and Disease*.

Investigating the resistance of enterotoxigenic genes of Staphylococcus aureus isolates resistant to methicillin in foods sold in Qom city

Staphylococcus aureus in food

Seyyed Irfan Hosseini-Nesab1*, Najmeh Vahad Dehkordi2

۱- Student of Food Hygiene, Department of Food Hygiene, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

۲- Ph.D. student in food hygiene, Department of Food Hygiene, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

Responsible author: serfan1030@gmail.com ❊

Abstract

Contamination of street food with *Staphylococcus aureus* due to its ability to resist antibiotics is one of the concerns from the point of view of food hygiene. Therefore, the purpose of this study is to investigate the resistance of enterotoxigenic genes of *Staphylococcus aureus* isolates resistant to methicillin in food products offered in Qom city. First, 150 food samples, including sausage, samosa, traditional hamburger, falafel, pasta and salad, were randomly sampled and sent to the food hygiene laboratory under sterile conditions for testing. The tests were performed using standard methods. The results showed that the most contamination was related to salad (64%), pasta food (52%), traditional hamburger (48%), samosa (44%), and falafel and sausage (20%). The most common carrier genes were sea (21.95 percent), seb and sec (9.75 percent), respectively. The prevalence of methicillin-resistant isolates was salad (52%), pasta food (44%), traditional hamburger (32%), samosa (28%), and falafel and sausage (4%). Statistical analysis showed that the relationship between the prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant isolates was not significant ($p<0.05$). Also, *Staphylococcus aureus* isolates had the highest resistance to penicillin (82%) and erythromycin (78%) and the lowest resistance to imipenem (9%). Based on the prevalence of contamination in the present study and the determining role of the initial quality of food ingredients and the technician's hand in food preparation; The possibility of contamination from both parts is possible; Therefore, health education to workers can play an important role in reducing pollution.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, methicillin, antibiotic resistance, street food

Roster

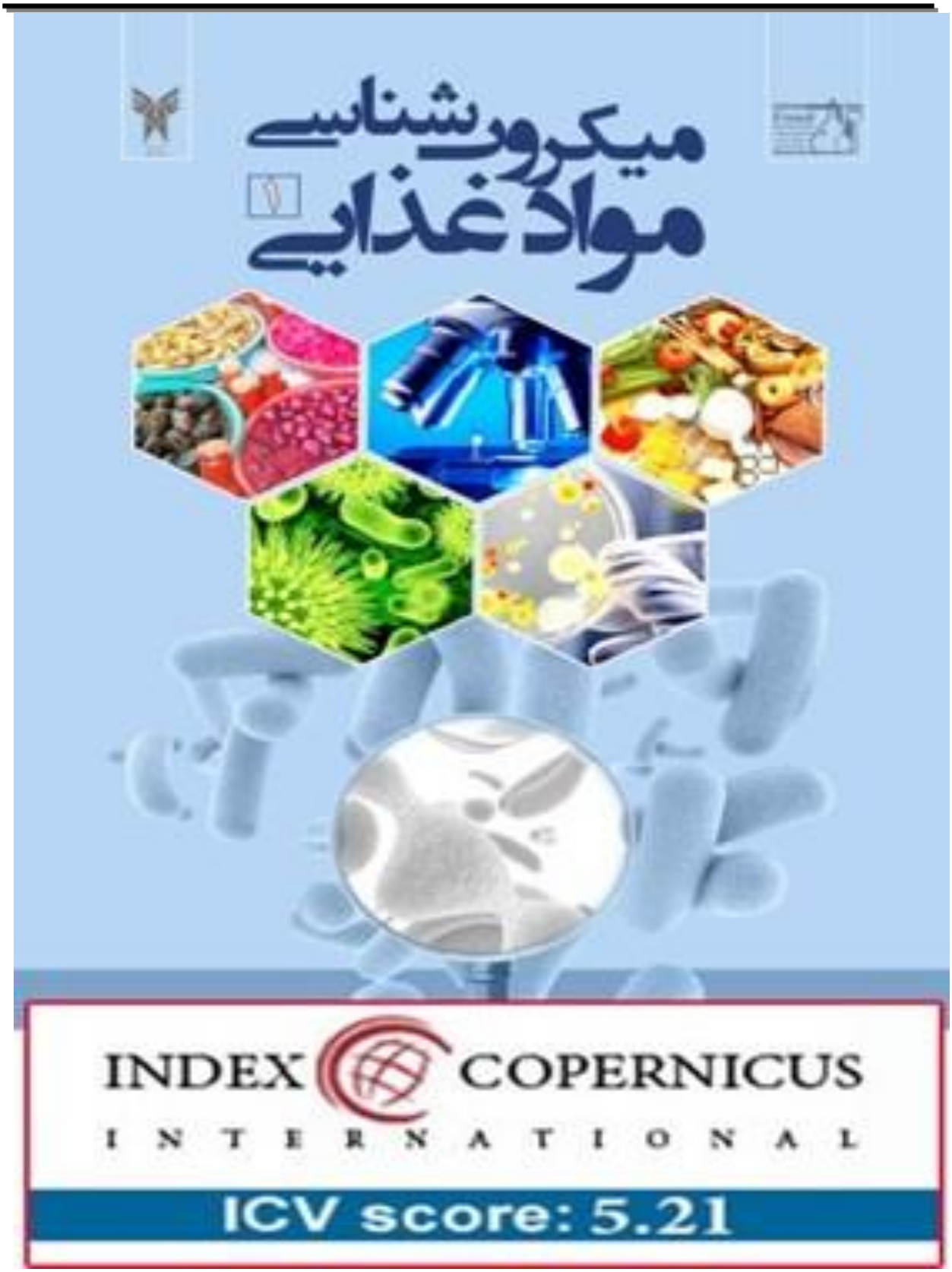
The relationship between the use of motivational learning techniques and critical thinking among English language learners in the master's degree in health and food technology
Fariba Rahimi Esfahani 3

Using of ERIC-PCR, RAPD-PCR, Rep-PCR methods for genotyping of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains isolated from raw chicken meat
Maryam Hadiyan, Hassan Momtaz, Amir Shakerian.....31

of Caspian Sea white fish fillet using a nanocomposite film containing green synthesis of ZnO NPs using eggplant cap extract
Mahsa Salehi, Amir Shakerian, Zohreh Mashak, Ebrahim Rahimi ……..……..……..42

Investigating the resistance of enterotoxigenic genes of Staphylococcus aureus isolates resistant to methicillin in foods sold in Qom County

Seyyed Irfan Hosseini-Nesab, Najmeh Vahad Dehkordi…….…….……..62


میکروب شناسی
مواد غذایی
INDEX COPERNICUS
INTERNATIONAL
ICV score: 5.21