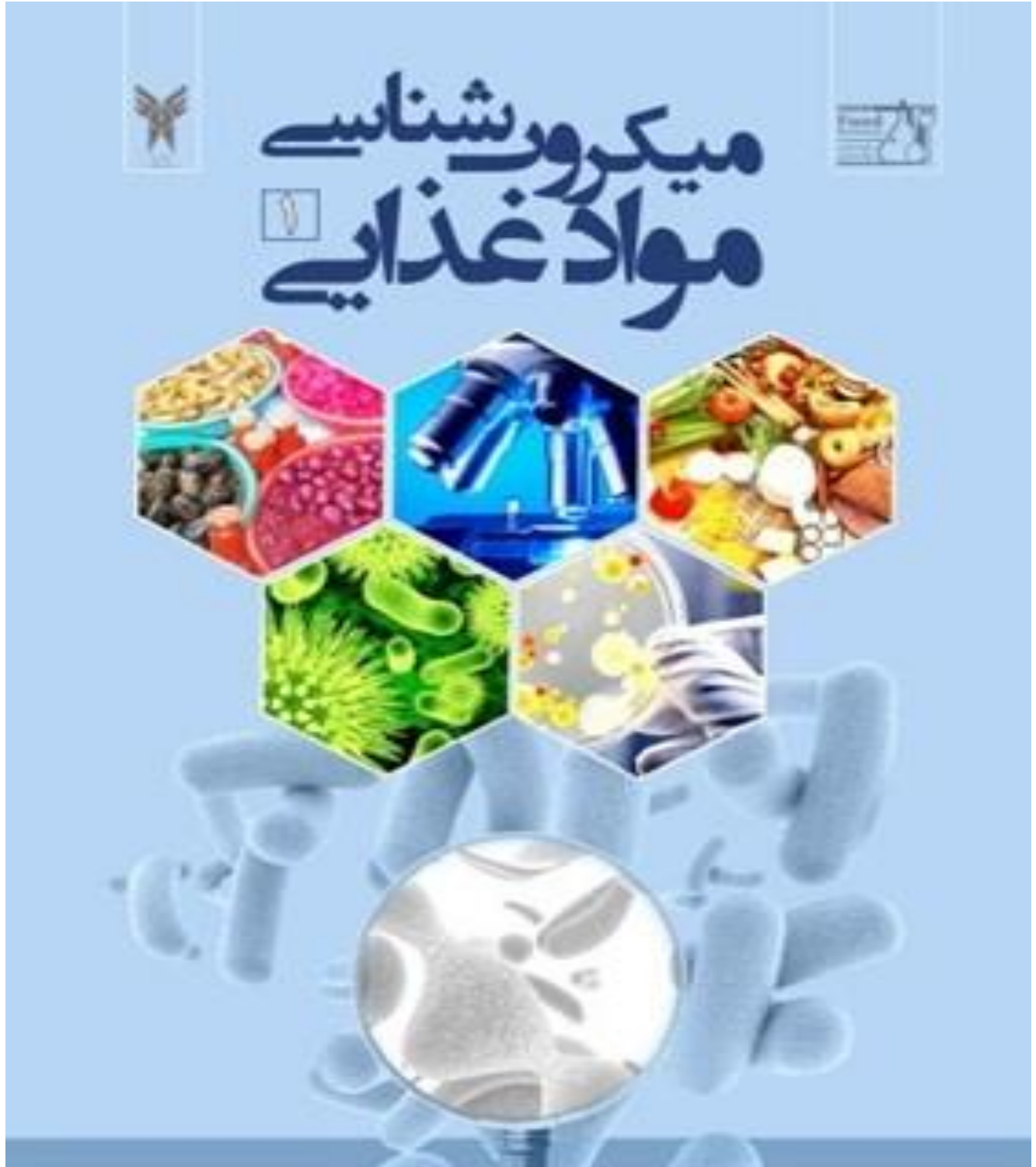




ارزیابی اثرات ضد میکروبی اسانس و نانوامولسیون اسانس سیر بر باکتری های جدا شده از مواد غذایی

اسما عزیزآبادی ، اشرف کریمی نیک.....۳

شناسایی و تعیین مقدار اکراتوکسین A در غلات عرضه شده با استفاده از HPLC

محمدرضا صائبی ، الهه تاجبخش، ابراهیم رحیمی.....۱۸

تغییرات فصلی کیفیت میکروبی شیرهای خام تولید شده در گاوداری های سستی و صنعتی

محبوبه قاسمی، مجتبی بنیادیان ، حمداله مشتاقی.....۳۵

بررسی اثرات ضد قارچی عصاره آبی- الکی میوه واکسینیوم آرکتوستافیلوس (سیاه گیل) بر

گونه های کاندیدا/ آلبیکنس و کاندیدا/ گلابراتا در شرایط آزمایشگاهی

احمد هلاکو، مریم کاظمی، مریم رفیعی راد، مطهره اسکندری.....۵۴

/شریشیا کلی تولیدکننده توکسین شیکا (STEC) در ایمنی مواد غذایی: بررسی ژن های بیماری زایی و مقاومت

آنتی بیوتیکی

الیاس شهریور، ابراهیم رحیمی، فهام خامسی پور.....۶۵

بررسی آلودگی میکروبی لاشه طیور در طی فرایند تولید در کشتارگاه صنعتی شهرستان نجف آباد

امیر شفیعی دستگردی، حمدالله مشتاقی بروجنی، مجتبی بنیادیان.....۷۶

## ارزیابی اثرات ضد میکروبی اسانس و نانوامولسیون اسانس سیر بر باکتری‌های جدا شده از مواد غذایی

اسما عزیزآبادی<sup>۱،۲</sup>، اشرف کریمی نیک<sup>۱،۳\*</sup>

۱. گروه میکروبیولوژی، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران

۲. مرکز تحقیقات ایمن سازی مواد غذایی و کشاورزی، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران

\* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: [a.kariminik@iauk.ac.ir](mailto:a.kariminik@iauk.ac.ir)

### چکیده

با توجه به افزایش نیاز به حفظ کیفیت و پایداری محصولات فسادپذیر، استفاده از اسانس و نانوامولسیون آن‌ها به عنوان راهکارهایی نوین در افزایش پایداری میکروبی این محصولات، مورد توجه قرار گرفته است. این تحقیق با هدف مقایسه اثرات ضدباکتریایی اسانس سیر و نانوامولسیون آن بر باکتری‌های بیماری‌زا و ارزیابی پتانسیل استفاده از نانوامولسیون‌های اسانس سیر در صنایع غذایی انجام شد. اسانس سیر به روش تقطیر با بخار آب استخراج شد و ترکیبات آن با استفاده از روش کروماتوگرافی شناسایی گردید. نانوامولسیون اسانس سیر با استفاده از روش هموژنیزاسیون تهیه شد. سپس اثرات ضدباکتریایی اسانس سیر و نانوامولسیون آن بر پنج باکتری /شریشیا کلی، سالمونلا انتریکا، سودوموناس ائروژینوزا، استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا مونوسیتوژنز با استفاده از روش میکروتیتر پلیت، ارزیابی شد. دی آلیل دی سولفید، تری سولفید دی پروپیل، دی سولفید دی پروپیل و دی آلیل سولفید، ترکیبات اصلی اسانس بودند. نتایج این پژوهش نشان داد نانوامولسیون اسانس سیر نسبت به فرم خام آن، اثر ضدباکتریایی قوی‌تری بر پنج گونه پاتوژن غذایی دارد. این برتری در تمامی غلظت‌های مورد بررسی مشهود بوده و بیشترین حساسیت مربوط به سالمونلا انتریکا با مهار رشد ۹۹٫۸۹٪ در غلظت ۱٫۵۶ μg/ml بود. مقادیر حداقل غلظت بازدارندگی رشد و کشندگی در نانوفرمولاسیون به طور معناداری کاهش یافته و آزمون‌های آماری نیز تفاوت‌های معنادار بین غلظت‌ها را تأیید کردند ( $p < 0.001$ ). یافته‌ها پتانسیل بالای کاربرد نانوامولسیون سیر را در صنایع غذایی به عنوان یک نگهدارنده طبیعی و مؤثر نشان می‌دهد.

**کلمات کلیدی:** اسانس سیر، نانوامولسیون، اثرات ضدباکتریایی، مواد غذایی

## مقدمه

خواص ضدباکتریایی افزایش دهد. مطالعات اخیر همچنین نشان داده‌اند که نانوامولسیون‌ها می‌توانند در ایجاد سیستم‌های تحویل هوشمند برای اسانس‌ها نقش مهمی ایفا کنند، به‌طوری که رهایش اسانس‌ها تنها در مواقع نیاز به‌طور دقیق و کنترل شده انجام شود. این قابلیت می‌تواند در توسعه محصولات غذایی با خواص بهبود یافته و تأثیرات ضدباکتریایی و ضدویروسی مؤثرتر بسیار مفید باشد (Confessor et al., 2024). در این مطالعه، هدف بررسی تأثیرات ضد میکروبی اسانس سیر و نانوامولسیون آن بر روی چندین باکتری مولد فساد مواد غذایی، از جمله /شریشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا مونوسیتوژنز، سودوموناس اثرئوژینوزا و سالمونلا انتریکا، می‌باشد. از نظر کاربردی، نتایج این تحقیق می‌تواند منجر به توسعه بسته‌بندی‌های فعال زیست‌پایه یا پوشش‌های خوراکی با منشأ طبیعی شود که علاوه بر افزایش ایمنی و ماندگاری محصولات غذایی، نیاز به مواد نگهدارنده سنتتیک را کاهش داده و پذیرش مصرف‌کنندگان را ارتقاء دهد.

## روش کار

## استخراج اسانس سیر و شناسایی ترکیبات آن

سیر با نام علمی *Allium sativum* L. پس از برداشت در فصل تابستان از مزارع کشاورزی منطقه کرمان (زرنه)، جمع‌آوری شده و به‌مدت پنج روز در شرایط سایه و در دمای محیط خشک گردید. سپس نمونه‌های خشک‌شده به‌صورت پودر درآمدند. اسانس سیر به روش تقطیر با بخار آب و با استفاده از دستگاه کلونجر استخراج شد. به‌منظور شناسایی ترکیبات موجود در اسانس، آنالیز با دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف‌سنج جرمی (GC/MS) صورت گرفت. شناسایی مواد تشکیل‌دهنده بر اساس مقایسه طیف‌های جرمی و شاخص‌های بازداری حاصل با داده‌های مربوط به ترکیبات استاندارد انجام پذیرفت. درصد نسبی هر یک از ترکیبات نیز با محاسبه سطح زیر منحنی کروماتوگرام‌ها تعیین شد. به‌طور کلی، تعیین اجزای اصلی

در دهه‌های اخیر، افزایش نگرانی‌ها نسبت به مصرف مواد نگهدارنده شیمیایی در صنعت غذا و دارو، پژوهشگران را به سوی بهره‌گیری از ترکیبات زیست‌فعال طبیعی سوق داده است. اسانس‌های گیاهی، به‌عنوان منابعی غنی از ترکیبات فنولی، ترپنوئیدی و آلی‌سولفیدی، به دلیل اثرات ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی و ایمنی بالا، در تحقیقات علمی به‌طور ویژه‌ای مورد توجه قرار گرفته‌اند. استفاده از اسانس‌ها در صنایع غذایی به دلیل ویژگی‌های ضدباکتریایی، ضدویروسی و طعم‌دهی برجسته، اهمیت فراوانی دارد. در میان اسانس‌های گیاهی، اسانس سیر (*Allium sativum*) به سبب دارا بودن ترکیبات گوگردی فعال مانند: آلیسین، دی‌آلیل دی‌سولفید و سایر ترکیبات فرار، دارای فعالیت‌های ضد میکروبی قابل توجهی در برابر طیف گسترده‌ای از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و مولد فساد می‌باشد (Swangsri et al., 2024). با این حال، به کارگیری مستقیم اسانس سیر در محصولات غذایی با چالش‌هایی مانند ناپایداری در مقابل نور، حرارت و اکسیداسیون، همچنین طعم تند و ناخوشایند آن مواجهه است که مانع از بهره‌برداری گسترده و مؤثر از این اسانس در صنعت غذا می‌شود (Espitia et al., 2019). به منظور فائق آمدن بر این محدودیت‌ها، فناوری‌های نوین تحویل هدفمند، به‌ویژه استفاده از نانوامولسیون‌ها، مورد توجه قرار گرفته‌اند. نانوامولسیون‌ها که به‌عنوان سیستم‌های کلوئیدی با اندازه قطره‌ای کمتر از ۲۰۰ نانومتر، شناخته می‌شوند، به دلیل ویژگی‌های خاص خود از جمله سطح تماس بالا، قابلیت رهایش کنترل‌شده، و پایداری بالا در برابر شرایط محیطی مختلف، در بهبود کارایی اسانس‌ها مؤثر هستند (Chen & Zhong, 2022). این سیستم‌ها با افزایش پایداری اسانس‌ها، می‌توانند از تجزیه آن‌ها در برابر نور و حرارت جلوگیری کنند و همچنین اثرات جانبی طعمی ناخواسته را کاهش دهند. نانوامولسیون‌ها علاوه بر افزایش پایداری، توانایی بهبود حل‌پذیری اسانس‌ها در محیط‌های آبی را دارند. این ویژگی می‌تواند در بهبود انتشار اسانس‌ها در محصولات غذایی کمک کند و تأثیر آن‌ها را در طعم‌دهی و

زایلوز لیزین دی اکسی کولات آگار، ستریماید آگار، و بلاد آگار استفاده شد. پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای مناسب هر باکتری گرمخانه گذاری شدند. پس از رشد باکتری ها و تشکیل کلنی، تست های تشخیصی و بیوشیمیایی از قبیل: اکسیداز، کاتالاز، اوره از، تخمیر قند، حرکت و ایندول برای شناسایی هر باکتری انجام شد (Bantawa et al., 2018; Sepahvand et al., 2022).

### آزمون مولکولی و بررسی حضور ژن ویبرولانس در باکتری های جدا شده از مواد غذایی

استخراج DNA با استفاده از کیت تجاری سیناژن انجام شد. جهت تعیین کیفیت DNA های استخراج شده، دستگاه نانودراپ در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر به ترتیب برای بررسی میزان جذب DNA و پروتئین ها و تعیین میزان خلوص DNA انجام گردید. لیست پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن های ویبرولانس هدف در جدول (۱)، ذکر شده است (Aranda et al., 2004; Chen et al., 2000; Mehrotra et al., 2017). مخلوط واکنش پی سی آر در حجم کل ۲۰ میکرولیتری تهیه شد که شامل موارد زیر است: مسترمیکس به میزان ۱۰ میکرولیتر، هر یک از پرایمرهای فوروارد و ریورس به میزان ۱ میکرولیتر، DNA به میزان ۴ میکرولیتر، و آب دیونیزه استریل به میزان ۴ میکرولیتر. برنامه سیکل دمایی به صورت زیر اجرا شد: مرحله دناتوراسیون اولیه در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه. سپس، سیکل های پی سی آر (تعداد ۳۵ سیکل) شامل مراحل زیر بودند: دناتوراسیون در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر در دمای ۶۰-۵۵ درجه سانتی گراد (بسته به نوع پرایمر) به مدت ۳۰ ثانیه، و پلیمریزاسیون در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه. مرحله پلیمریزاسیون نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه انجام شد. در نهایت، محصول پی سی آر با استفاده از تکنیک الکتروفورز در ژل آگارز مورد ارزیابی قرار گرفت.

اسانس از طریق تحلیل طیف های جرمی و محاسبه شاخص بازداری آن ها صورت گرفت (Kariminik et al., 2019).

### تهیه نانوامولسیون اسانس سیر

برای تهیه نانوامولسیون، از روش هموژنیزاسیون به کمک سورفکتانت غیر یونی توپین ۸۰، استفاده شد. در این فرایند، اسانس سیر به عنوان بخش اصلی فاز روغنی به کار گرفته شد. ابتدا مقدار مشخصی از اسانس سیر با روغن گیاهی مخلوط گردید تا یک فاز روغنی همگن حاصل شود. سپس، برای تثبیت امولسیون و کاهش کشش سطحی بین فازهای آبی و روغنی، بین ۱ تا ۵ درصد وزنی توپین ۸۰ به این مخلوط افزوده شد. در ادامه، فاز آبی به آرامی و به صورت تدریجی به ترکیب افزوده گردید و با هم زدن کامل، یک امولسیون اولیه شکل گرفت. امولسیون اولیه حاصل، تحت فرآیند هموژنیزاسیون با دور بالا قرار گرفت تا اندازه قطرات فاز روغنی به محدوده نانومتری (کمتر از ۱۰۰ نانومتر) کاهش یابد. به منظور بررسی اندازه و مورفولوژی ذرات تشکیل شده، از میکروسکوپ الکترونی روبشی، استفاده شد (Hassanzadeh et al., 2022).

### جداسازی و شناسایی باکتری های پاتوژن از مواد غذایی

جداسازی باکتری های *سالمونلا* / *انتریکا* از گوشت مرغ و *اشریشیا کلی*، *سودوموناس انروژینوزا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* از گوشت گاو قصابی ها و *لیستریا مونوسیتوژنز* از شیر خام انجام گرفت. تمامی ارزیابی ها مطابق با استاندارد متدهای میکروبی معتبر انجام گرفت. نمونه های گوشتی شامل مرغ و گوشت گاو تحت شرایط کاملاً استریل جمع آوری شدند. از هر نمونه، ۲۵ گرم به صورت تصادفی از نقاط مختلف محصول برداشته شد و در ۲۲۵ میلی لیتر آب پپتون بافر شده هموژنیزه گردید. جهت رشد باکتری های *اشریشیا کلی*، *سالمونلا* / *انتریکا*، *سودوموناس انروژینوزا*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا مونوسیتوژنز* به ترتیب از محیط کشت مکانکی آگار،

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده

| بakteri              | ژن هدف | توالی پرایمر (۵'→۳')                               | طول محصول (bp) |
|----------------------|--------|----------------------------------------------------|----------------|
| اشریشیا کلی          | lt     | F: GCGACAGATTATACCGTGC<br>R: CGGTCTCTATATTCCCTGTT  | ۴۵۰            |
| استافیلوکوکوس اورئوس | sea    | F: GGTATCAATGTGCGGGTGG<br>R: CGGCACTTTTTTCTCTTCGG  | ۲۷۰            |
| سودوموناس آئروژینوزا | exoS   | F: GAGGAGGCCGATGAGTCG<br>R: TCCTCGCCAGTTCGTTTC     | ۳۵۰            |
| سالمونلا انتریکا     | stn    | F: ATGATGTAATTTCTATCGTC<br>R: TTAATGCTAGTTCTGTTTG  | ۲۶۰            |
| لیستریا مونوسایتوژنز | hlyA   | F: CGGAGGTTCCGCAAAAGATG<br>R: CCTCCAGAGTGATCGATGTT | ۳۰۰            |

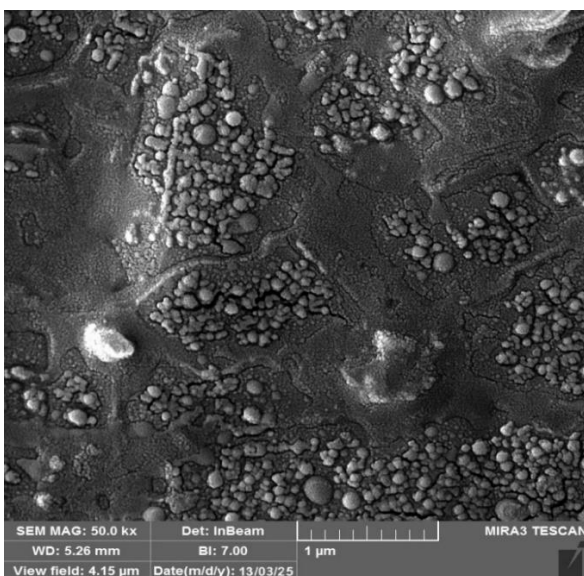
سولفوکسید یک درصد، بود. در نهایت، به ستون ۹ به عنوان کنترل مثبت، ۱۰۰ میکروتر آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین افزوده شد. به تمام خانه های ستون های ۱ تا ۷ و ۹، ۱۰۰ µl سوسپانسیون باکتری (CFU/ml ~ ۱/۵ × ۱۰<sup>۸</sup>) اضافه شد. پلیت به مدت ۱۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. پس از فرآیند انکوباسیون، حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) تعیین شد، که شامل کمترین غلظتی از اسانس است که عدم رشد باکتری را در خانه های پلیت نشان می دهد. این ارزیابی هم به صورت دیداری با چشم غیرمسلح و هم با استفاده از میکروپلیت ریدر در OD<sub>600</sub> انجام شد. برای تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC)، از کمترین غلظت هایی که نشان دهنده عدم رشد کامل یا رشد ضعیف بودند، مقدار ۱۰ میکرولیتر نمونه برداشته و بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای مناسب، عدم رشد کامل به عنوان MBC در نظر گرفته شد. همچنین، برای بررسی فعالیت ضدباکتریایی نانوامولسیون اسانس سیر، از روش مشابه با روش

#### بررسی فعالیت ضدباکتریایی اسانس سیر با استفاده از روش میکروتیتر پلیت

فعالیت ضدباکتریایی اسانس سیر با استفاده از روش میکروتیتر پلیت بر باکتری های جدا شده از مواد غذایی و مورد تایید قرار گرفته به روش مولکولی، مورد بررسی قرار گرفت. غلظت های اسانس شامل ۰،۳۹، ۰،۷۸، ۱،۵۶، ۳،۱۲، ۶،۲۵ و ۱۲،۵ µg/ml در محیط مولر هینتون براث تهیه شدند. از دی متیل سولفوکسید یک درصد به عنوان کنترل منفی و سیپروفلوکساسین (۰/۵ - ۱۲۸ µg/ml) به عنوان کنترل مثبت، استفاده گردید. از سویه های باکتریایی /اشریشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس آئروژینوزا، سالمونلا انتریکا، و لیستریا سوسپانسیون باکتریایی در محلول سرم فیزیولوژی استریل تهیه شد و غلظت آن با استاندارد نیم مک فارلند (CFU/ml ~ ۱/۵ × ۱۰<sup>۸</sup>) تنظیم گردید. در این آزمایش، از میکروپلیت های ۹۶ خانه استفاده شد. ستون های ۱ تا ۶ هر یک با ۱۰۰ میکروتر از غلظت های مختلف اسانس سیر، پر شدند. ستون ۷ به عنوان کنترل رشد، شامل باکتری و محیط مولر هینتون براث، قرار گرفت. ستون ۸ به عنوان کنترل منفی، شامل محیط مولر هینتون براث و دی متیل

<sup>2</sup> Minimum bactericidal concentration<sup>1</sup> Minimum inhibitory concentration

آلیل سولفید (۵,۶۴٪) بودند. این ترکیبات بخش عمده‌ای از محتوای شیمیایی اسانس را تشکیل داده و مسئول ویژگی‌های بیولوژیکی و آروما آن می‌باشند. بررسی نانومولسیون سیر با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی در بزرگنمایی ۲۹,۶۰۰ برابر و فاصله کاری ۴,۵۴ میلی‌متر، ساختارهایی در مقیاس نانومتری با وضوح بالا را به‌نمایش گذاشت. همان‌طور که در شکل (۱)، مشاهده می‌شود، نانوذرات سیر عمدتاً دارای شکل کروی تا بیضی هستند و اندازه آن‌ها در محدوده‌ای بین ۵۰ تا ۲۰۰ نانومتر قرار دارد؛ این مقادیر با گزارش‌های پیشین پیرامون نانوفرمولاسیون‌های اسانس سیر همخوانی دارند. پراکندگی ذرات نسبتاً یکنواخت است؛ با این حال، حضور تعداد اندکی تجمعات کوچک (آگلومره) قابل مشاهده است که می‌تواند ناشی از ماهیت هیدروفوب ترکیبات گوگردی موجود در اسانس باشد. سطح نانوذرات دارای ناهمواری‌های مشخصی است که احتمالاً به‌دلیل حضور ترکیبات فنولی و پلی‌ساکاریدی در ترکیب شیمیایی اسانس سیر می‌باشد. کیفیت تصاویر حاصل نیز به‌دلیل کنتراست مطلوب (B1: 7.00) و تنظیمات بهینه دستگاه (WD: 4.54 mm) بالا بوده و امکان مشاهده دقیق و واضح مرزهای میان ذرات را فراهم ساخته است.



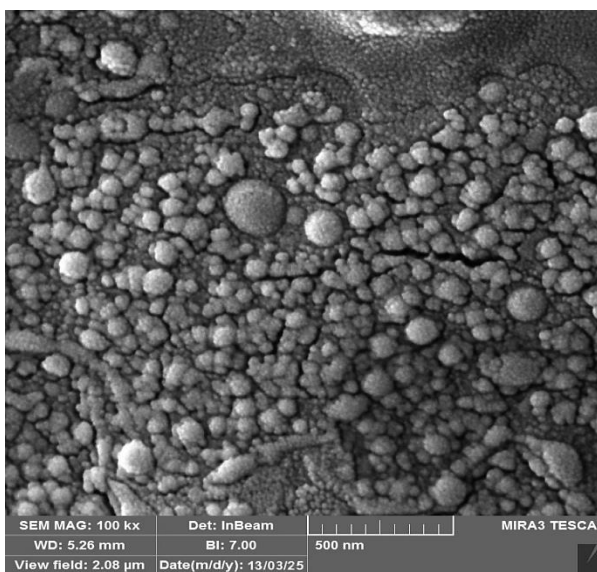
مورد استفاده برای اسانس سیر بهره گرفته شد (Tao et al., 2022).

### بررسی آماری

تحلیل‌های آماری این پژوهش با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۳ انجام شد. برای مقایسه میانگین داده‌ها، از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) بهره گرفته شد و جهت بررسی تفاوت‌های معنادار بین گروه‌ها، آزمون تعقیبی توکی (Tukey's post-hoc test) و آزمون چند دامنه‌ای دانکن (Duncan's multiple range test) مورد استفاده قرار گرفتند. تمامی تحلیل‌ها در سطح معنی‌داری ۵٪ ( $p < 0.05$ ) انجام پذیرفتند.

### نتایج

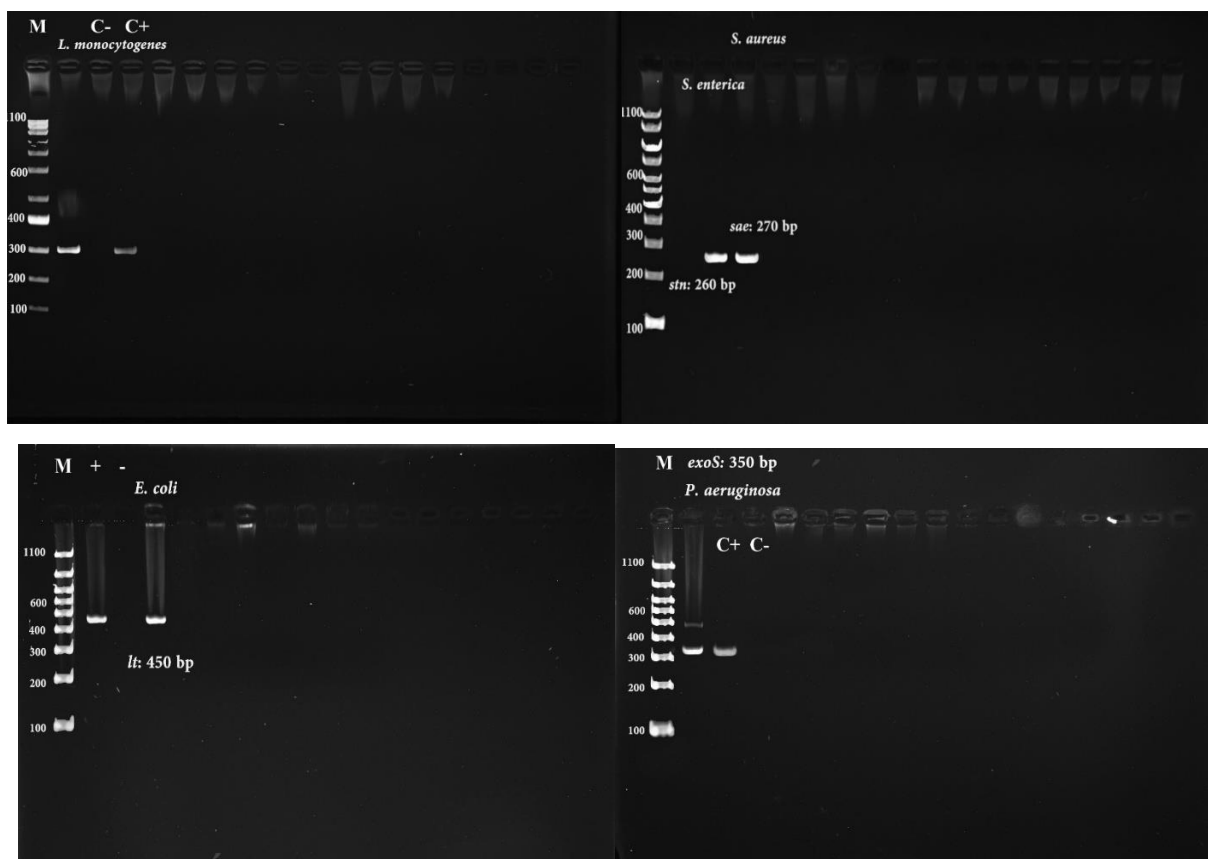
بر اساس نتایج حاصل از آنالیز ترکیبات شیمیایی اسانس سیر، درمجموع ۲۲ ترکیب مختلف شناسایی گردید. از میان این ترکیبات، چهار ماده اصلی با بیشترین فراوانی به‌ترتیب: دی آلیل دی سولفید (۶۰,۱۵٪)، تری سولفید دی پروپیل (۱۴,۲۲٪)، دی پروپیل دی سولفید (۹,۱۶٪) و دی



شکل ۱: تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از نانومولسیون سیر

ژن‌های هدف با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، مورد بررسی قرار گرفتند. سویه‌هایی که در این آزمون نتیجه مثبت نشان دادند، در مراحل بعدی برای بررسی فعالیت ضدباکتریایی اسانس سیر و نانوامولسیون آن مورد استفاده قرار گرفتند.

بر اساس آزمایش‌های بیوشیمیایی و تشخیصی باکتری‌شناسی انجام شده، گونه‌های باکتریایی شامل: /شریشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس آئروژینوزا، سالمونلا انتریکا، و لیستریا مونوسایتوزنز از نمونه‌های مواد غذایی جداسازی گردیدند. سپس، این جدایه‌ها از نظر وجود



شکل ۲: ژل الکتروفورز محصول پی سی ار تکثیر ژن‌های ویروالانس باکتری‌های جدا شده از مواد غذایی M: مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی، ژن‌های هدف شامل: *hlyA*/لیستریا مونوسایتوزنز (۳۰۰ bp)، *sea*/استافیلوکوکوس اورئوس (۲۷۰ bp)، *stn*/سالمونلا انتریکا (۲۶۰ bp)، *lt*/شریشیا کلی (۴۵۰ bp) و *exoS* سودوموناس آئروژینوزا (۴۵۰ bp).

این عملکرد شامل تخریب دیواره سلولی باکتری و افزایش استرس اکسیداتیو بوده که موجب مرگ سریع‌تر سلول‌های باکتریایی شده است. شاخص‌های MIC و MBC بر اساس اندازه‌گیری چگالی نوری پس از انکوباسیون با غلظت‌های معین از اسانس و نانوامولسیون سیر محاسبه گردیدند (جدول ۲). همچنین، میزان مهار نسبی رشد باکتری بر اساس فرمول ذیل محاسبه شد.

### نتایج اثرات ضدباکتریایی اسانس و نانوامولسیون

#### اسانس سیر بر باکتری‌های جدا شده از مواد غذایی

نانوامولسیون سیر، به دلیل اندازه کوچک ذرات آن (در بازه ۵۰ تا ۲۰۰ نانومتر) و افزایش نفوذپذیری، توانست در غلظت‌های بسیار پایین‌تر حتی ۰.۱۹  $\mu\text{g/ml}$  برای لیستریا) اثرات مهاری قوی‌تری از خود نشان دهد. مکانیسم احتمالی

$$\text{مهار رشد (\%)} = \left(1 - \frac{\text{OD تیمار}}{\text{OD کنترل}}\right) \times 100$$

جدول ۲: میزان بازدارندگی رشد باکتری‌ها در برابر غلظت‌های مختلف اسانس و نانوامولسیون سیر (اعداد اول و دوم به ترتیب نمایانگر درصد مهار رشد توسط اسانس سیر و نانوامولسیون سیر می باشند).

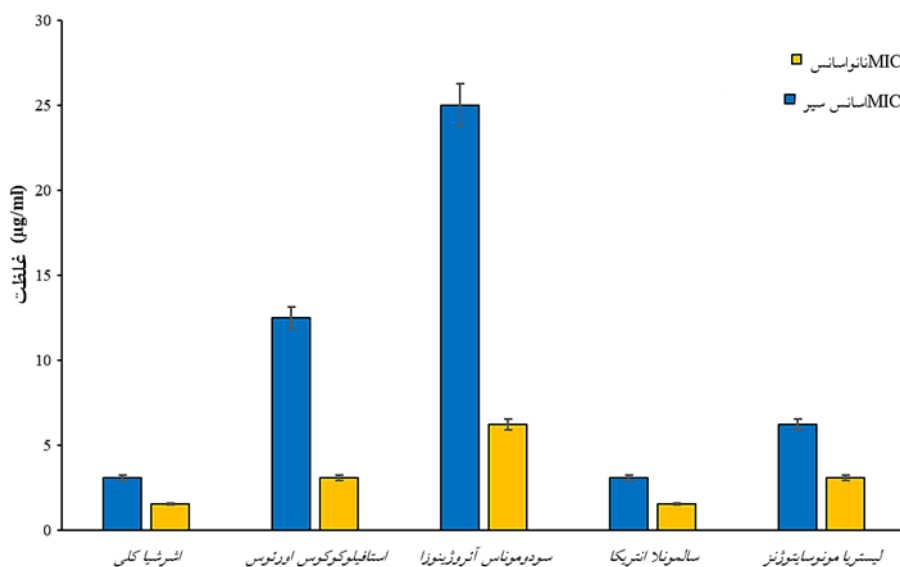
| لیستریا<br>مونوسایتوزنز | سالمونلا/اتریکا | سودوموناس<br>آئروژینوزا | استافیلوکوکوس/اورئوس | اشریشیا کلی   | غلظت<br>(µg/ml) |
|-------------------------|-----------------|-------------------------|----------------------|---------------|-----------------|
| ۱۴,۷۲ / ۳۰,۶۸           | ۱۲,۰۸ / ۲۰,۸۷   | ۱۲,۳۵ / ۳۲,۸۵           | ۷,۴ / ۲۶,۳           | ۷,۶ / ۱۵,۲    | ۰,۰۹۷           |
| ۲۶,۱۳ / ۶۰,۲۲           | ۱۲,۰۸ / ۳۶,۲۶   | ۲۱,۳۴ / ۵۵,۱            | ۲۱ / ۵۲,۶            | ۱۳ / ۲۹,۳     | ۰,۱۹۵           |
| ۴۸,۸۷ / ۸۶,۳۷           | ۱۹,۷۸ / ۵۰,۵۴   | ۳۸,۲ / ۷۱,۹             | ۴۷,۴ / ۹۱,۵۷         | ۲۱,۷ / ۴۵,۷   | ۰,۳۹            |
| ۶۲,۵ / ۹۴,۳۲            | ۹۴,۵ / ۹۷,۸     | ۶۰,۶۷ / ۸۸,۸            | ۷۳,۷ / ۹۶,۷۵         | ۹۳,۴۷ / ۹۷,۸۲ | ۰,۷۸            |
| ۷۱,۶۱ / ۹۷,۷۳           | ۹۶,۹۳ / ۹۹,۸۹   | ۶۸,۵۳ / ۹۱,۵۷           | ۹۱,۳۷ / ۹۵,۲۶        | ۹۶,۷۳ / ۹۸,۹۱ | ۱,۵۶            |

است. در غلظت‌های ۰,۷۸ و ۱,۵۶ µg/ml، باکتری کاملاً حساس شد و مهار رشد به‌طور چشمگیری افزایش یافت. برای باکتری استافیلوکوکوس/اورئوس، نیز روند مشابهی مشاهده شد. در غلظت‌های پایین، مقاومت نسبت به هر دو ترکیب وجود داشت. اما در غلظت ۰,۳۹ µg/ml، مهار رشد با اسانس به ۴۷,۴٪ و با نانوامولسیون به ۹۱,۵۷٪ رسید. در غلظت‌های بالاتر، نانوامولسیون همچنان عملکرد قوی‌تری داشت؛ به‌طوری‌که در حالی‌که اسانس ۹۱,۳۷٪ مهار رشد ایجاد کرد، نانوامولسیون به ۹۵,۲۶٪ رسید. سودوموناس آئروژینوزا در برابر هر دو ترکیب، به‌ویژه در غلظت‌های پایین، مقاومت نشان داد. با افزایش غلظت به ۰,۷۸ µg/ml، مهار رشد با اسانس به ۶۰,۶۷٪ و با نانوامولسیون به ۸۸,۸٪ رسید، که برتری چشمگیر نانوامولسیون را نشان می‌دهد. در غلظت ۱,۵۶ µg/ml، نانوامولسیون به مهار ۹۱,۵۷٪ دست یافت و اثربخشی قوی‌تری را نسبت به اسانس نشان داد. در مورد سالمونلا/اتریکا نیز در غلظت‌های پایین مقاومت مشاهده شد، اما با افزایش غلظت به ۰,۷۸ و ۱,۵۶ µg/ml، میزان مهار رشد به ترتیب به ۹۴,۵٪ (اسانس) و ۹۶,۹۳٪ (نانوامولسیون) افزایش یافت. این یافته‌ها گویای اثربخشی بالای نانوامولسیون در کنترل این پاتوژن غذایی هستند. لیستریا مونوسایتوزنز نیز در غلظت‌های پایین مقاومت نشان داد، اما با افزایش غلظت، مهار رشد به ۶۲,۵٪ برای اسانس و ۹۴,۳۲٪ برای

یافته‌های حاصل از ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی اسانس سیر و نانوامولسیون آن علیه پنج گونه از باکتری‌های بیماری‌زای غذایی، نشان‌دهنده برتری قابل توجه نانوفرمولاسیون نسبت به فرم خام اسانس است. بر پایه نتایج ارائه شده در جدول (۲)، نانوامولسیون سیر در کلیه غلظت‌های مورد آزمایش در بازه ۰,۰۹۷ تا ۱,۵۶ µg/ml، میزان بالاتری از مهار رشد باکتریایی را نسبت به اسانس خام نشان داد. در میان باکتری‌های مورد بررسی، سالمونلا/اتریکا بیشترین حساسیت را نسبت به تیمارها از خود نشان داد. در این باکتری، نانوامولسیون سیر در غلظت ۱,۵۶ µg/ml موفق به مهار رشد باکتری به میزان ۹۹,۸۹٪ شد که به‌عنوان MIC نانو در نظر گرفته شد؛ در حالی‌که همین میزان مهار در اسانس سیر تنها در غلظت ۳,۱۲ µg/ml حاصل شد. همچنین در غلظت ۰,۷۸ µg/ml، میزان مهار رشد توسط نانوامولسیون ۹۷,۵٪ و در اسانس خام ۹۴,۵٪ گزارش گردید. این تفاوت‌ها بیانگر عملکرد بهبود یافته نانوفرمولاسیون در افزایش اثربخشی ضدباکتریایی اسانس سیر می‌باشد. در غلظت‌های پایین (۰,۰۹۷ و ۰,۱۹۵ µg/ml)، باکتری اشریشیا کلی مقاومت نسبی در برابر هر دو ترکیب نشان داد، به‌طوری‌که مهار رشد با اسانس ۷,۶٪ و با نانوامولسیون ۱۳٪ بود. با افزایش غلظت به ۰,۳۹ µg/ml، این مقدار به ترتیب به ۶۲,۵٪ و ۹۴,۳۲٪ رسید که بیانگر اثربخشی بالاتر نانوامولسیون

بهبود دوبرابری اثر مهاری است. این کاهش در لیستریا مونوسایتوزنز نیز دیده می‌شود، جایی که MIC از ۶,۲۵ به ۳,۱۲  $\mu\text{g/ml}$  رسید. اثربخشی نانوفرمولاسیون در استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا، حتی چشمگیرتر بود؛ به گونه‌ای که MIC اسانس به ترتیب از ۱۲,۵ و ۲۵  $\mu\text{g/ml}$  به ۳,۱۲ و ۶,۲۵  $\mu\text{g/ml}$  کاهش یافت، که حاکی از افزایش چهار برابری قدرت مهاری نانومولسیون است.

نانومولسیون رسید. در غلظت ۱,۵۶  $\mu\text{g/ml}$ ، نانومولسیون توانست مهار رشد ۹۳,۷۳٪ ایجاد کند. شکل (۳)، حداقل غلظت بازدارندگی رشد (MIC) اسانس و نانومولسیون سیر را برای پنج باکتری بررسی شده نمایش می‌دهد. نتایج به‌روشنی نشان می‌دهد که نانومولسیون سیر در تمامی موارد عملکرد مؤثرتری نسبت به اسانس خام دارد. به‌طور خاص، در اشریشیا کلی و سالمونلا انتریکا، MIC نانومولسیون به ۱,۵۶  $\mu\text{g/ml}$  کاهش یافته که نسبت به MIC اسانس به معنای



شکل ۳: مقایسه حداقل غلظت بازدارندگی از رشد (MIC) بین اسانس سیر و نانومولسیون آن در برابر باکتری‌های مورد مطالعه

بین گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف نانومولسیون سیر بود.

نتایج آزمون توکی برای مقایسه‌های چندگانه نشان داد که در تمام گونه‌های باکتریایی مورد بررسی، افزایش غلظت نانومولسیون سیر به‌طور معنادار و تصاعدی موجب افزایش میزان مهار رشد شد. در این میان، سالمونلا انتریکا بیشترین حساسیت را نسبت به نانومولسیون از خود نشان داد، در حالی که سودوموناس آئروژینوزا کمترین حساسیت را داشت. همچنین، در مورد استافیلوکوکوس اورئوس، غلظت

نتایج حاصل از آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) و آزمون تعقیبی توکی (جدول ۳)، نشان‌دهنده تفاوت‌های معنادار آماری در اثرات مهاری نانومولسیون سیر بر رشد پنج باکتری پاتوژن غذایی در غلظت‌های مختلف بود. برای تمامی باکتری‌های مورد مطالعه، شامل اشریشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس آئروژینوزا، سالمونلا انتریکا و لیستریا مونوسایتوزنز، مقادیر p-value کمتر از ۰,۰۰۱ به دست آمد که بیانگر وجود تفاوت‌های بسیار معنادار

ضدباکتریایی بالاتری برخوردار است. این تأثیرات از نظر آماری کاملاً معنادار بوده و شواهد محکمی برای پشتیبانی از کاربردهای بالقوه بالینی و صنعتی نانوامولسیون سیر به عنوان یک عامل ضد میکروبی طبیعی فراهم می‌آورد.

۰,۷۸ µg/ml باعث مهار رشدی برابر با ۷۳,۷٪ گردید. این نتایج به وضوح بیانگر آن‌اند که نانوفرمولاسیون اسانس سیر نسبت به فرم خام آن، به دلیل افزایش سطح تماس و نفوذ بهتر ذرات در غشای سلولی باکتری‌ها، از اثربخشی

جدول ۳: نتایج تحلیل آماری اثرات اسانس سیر و نانوامولسیون آن بر هر باکتری

| نتایج Tukey (غلظت‌های متفاوت) | p-value   | F-value | باکتری               |
|-------------------------------|-----------|---------|----------------------|
| $1,56 \neq 0,78 \neq 0,097$   | $0,001 <$ | ۴۵,۶    | اشریشیا کلی          |
| $0,78 \neq 0,195 \neq 0,097$  | $0,001 <$ | ۶۲,۳    | استافیلوکوکوس اورئوس |
| $1,56 \neq 0,78 \neq 0,097$   | $0,001 <$ | ۳۸,۹    | سودوموناس اتروژینوزا |
| $1,56 \neq 0,78 \neq 0,195$   | $0,001 <$ | ۵۱,۲    | سالمونلا انتریکا     |
| $0,78 \neq 0,39 \neq 0,097$   | $0,001 <$ | ۷۵,۸    | لیستریا مونوسایتوژنز |

\*  $p\text{-value} < 0,05$  نشان‌دهنده تفاوت معنادار بین غلظت‌هاست.

\*\* نتایج Tukey: غلظت‌هایی که حروف متفاوت دارند ( $\neq$ )، از نظر آماری تفاوت معنادار دارند.

## بحث

ترین ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس سیر به ترتیب: آلایل متیل تری سولفید (۲۳,۱۰٪) و دی آلایل سولفید (۱۹,۴۷٪) هستند (Sindhu et al., 2023). مقایسه ترکیبات اصلی متشکله اسانس سیر در تحقیق حاضر و تحقیقات مشابه بیانگر آن است که ترکیبات آلایل به ویژه آلایل تری سولفات از ترکیبات مشترک و شاخص اسانس سیر به شمار رفته و دلیل خاصیت ضد میکروبی اسانس سیر نیز به همین ترکیبات مربوط می‌باشد. محققین دیگری خواص ضد میکروبی برخی از ترکیبات آلایل را مورد بررسی و این موضوع را مورد تایید قرار داده‌اند. ترکیبات گوگردی موجود در اسانس سیر مانند: آلایل متیل سولفید، دی آلایل سولفید، آلایل متیل دی سولفید، دی آلایل دی سولفید، آلایل متیل تری سولفید و دی آلایل تری سولفید، نقش اصلی در خواص ضد میکروبی آن دارند. این ترکیبات گوگردی (به ویژه آلایل متیل تری سولفید)، فعالیت رادیکال‌زدایی بالایی دارند و می‌توانند از تشکیل ترکیبات سرطان‌زا مانند بنزوپیرن در فرآورده‌های گوشتی جلوگیری کنند. این خاصیت به مکانیسم ضدباکتری آن‌ها

با توجه به ضرورت حفظ کیفیت و افزایش پایداری محصولات فسادپذیر در طول نگهداری، استفاده از سامانه‌های طبیعی مانند نانوامولسیون‌ها و هیدروژل‌ها به عنوان رویکردهای نوین و مؤثر برای بهبود پایداری میکروبی مورد توجه روزافزون قرار گرفته است. در این پژوهش، اسانس سیر حاوی ۲۲ ترکیب شیمیایی شناسایی شده بود که ترکیبات غالب آن شامل دی آلایل دی سولفید (۶۰,۱۵٪)، تری سولفید دی پروپیل (۱۴,۲۲٪)، دی سولفید دی پروپیل (۹,۱۶٪) و دی آلایل سولفید (۵,۶۴٪)، بودند. در پژوهش دهاریا و همکاران (۲۰۲۱)، مشخص گردید که بیشترین ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس سیر به ترتیب شامل دی آلایل دی سولفید (۴۸,۴۲٪)، دی آلایل سولفید (۷,۶۴٪)، آلایل متیل دی سولفید (۷,۲۷٪)، دی پروپیل و تری سولفید (۳,۴۶٪) می‌باشند (Dehariya et al., 2021). همچنین آنالیز اسانس سیر توسط سینجو و همکاران (۲۰۲۱)، نشان داد که فراوان

غلظت‌های پایین‌تر از اسانس، مهار رشد قوی‌تری ایجاد کند. در مجموع، نانوامولسیون سیر در مقایسه با اسانس خام، در بیشتر غلظت‌ها عملکرد ضدباکتریایی مؤثرتری نشان داده است. مقایسه نتایج اثرات ضدباکتریایی، می‌توان نتیجه گرفت که نانوامولسیون سیر نسبت به اسانس سیر عملکرد قوی‌تری دارد و باکتری‌های گرم‌مثبت حساسیت بیشتری نسبت به باکتری‌های گرم‌منفی نشان داده‌اند. در مطالعه‌ای دیگر، اثر عصاره سیر پایدارشده با سورفکتانت و نانوامولسیون آب در روغن از نظر ویژگی‌های فیزیکی‌شیمیایی و فعالیت ضد میکروبی در کاربردهای غذایی بررسی شد. نتایج نشان داد که این نوع نانوامولسیون در غلظت‌های بالای عصاره سیر دارای خواص ضدباکتریایی مؤثری بوده و در برابر باکتری‌های گرم‌مثبت اثربخشی بیشتری داشته است (Hassanzadeh et al., 2022). در مطالعه دیگری از نانوامولسیون اسانس سیر در سیستم‌های پوشش‌دهی غذایی مانند گوشت، سوسیس و روغن زیتون طعم‌دار جهت بررسی اثرات ضد میکروبی استفاده شده است. نانوامولسیون‌های اسانس سیر به کمک صمغ عربی باعث افزایش پایداری ترکیبات فرار و مؤثر موجود در اسانس سیر شدند و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری نسبت به حالت آزاد اسانس نشان دادند. در محصولات نظیر گوشت سرد، نانوامولسیون اسانس سیر توانست رشد باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *شریشیا کلی* را مهار کند و ماندگاری را تا یک هفته افزایش دهد. در محصولات گوشتی بسته‌بندی شده، فیلم‌های خوراکی حاوی نانوامولسیون اسانس سیر توانستند میزان بار میکروبی را به طور قابل توجهی کاهش دهند. این نتایج نشان‌دهنده اثر ماندگار و مؤثر ترکیبات سیر در جلوگیری از فساد مواد غذایی می‌باشد (Farazi et al., 2023). در مطالعه لیبو و همکاران (۲۰۲۴)، فعالیت‌های ضدباکتری، ضدبوی‌فیل و مکانیزم اثر نانوامولسیون آبی اسانس سیر علیه باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* مورد بررسی قرار گرفت. نانوامولسیون اسانس سیر با اندازه ذره‌ای متوسط  $136.43$  نانومتر توانست رشد باکتری‌های پلانکتونی *لیستریا* را به طور قابل توجهی مهار کند. حداقل غلظت مهاری اسانس سیر در نانوامولسیون برابر با  $512 \mu\text{g/ml}$  بود. اثر ضد میکروبی این نانوامولسیون وابسته

مرتبط است (Hu et al., 2021). وو و همکاران (۲۰۲۳)، در مطالعه‌ای به مقایسه ویژگی‌های ضدباکتریایی دو ترکیب آلایل متیل دی‌سولفید و دی‌متیل تری‌سولفید با ترکیبات فعال موجود در اسانس سیر پرداختند. در این تحقیق، فعالیت ضد میکروبی این ترکیبات در برابر *شریشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا مونوسیتوژنز* مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاکی از آن بود که هر دو ترکیب دارای اثر مهاری قابل توجهی بر رشد باکتری‌ها بوده و از پتانسیل بالایی برای کاربرد به‌عنوان عوامل ضدباکتریایی طبیعی در سیستم‌های زیستی برخوردار هستند (Wu et al., 2023). در پژوهش دیگری اثربخشی فعالیت فوق العاده ضد میکروبی دی‌آلیل دی‌سولفید، دی‌آلیل تری‌سولفید، دی‌آلیل تترا‌سولفید، در مدل غذایی و آزمایشگاهی بر *شریشیا کلی* بررسی شد (Rattanachaikunsopon & Phumkhachorn, 2008). تفاوت در نوع و میزان ترکیبات موجود در اسانس‌های گیاهی مانند اسانس سیر در مطالعات مختلف، به عوامل گوناگونی وابسته است. عواملی نظیر روش‌های کشت، ارتفاع از سطح دریا، شرایط آب‌وهوایی، نوع خاک، و زمان برداشت می‌توانند نقش مهمی در این تفاوت‌ها داشته باشند. افزون بر این، شیوه‌های استخراج اسانس نظیر تقطیر با بخار آب، استفاده از حلال‌های آلی یا روش فشردن، روش‌های مختلف آنالیز شیمیایی (کروماتوگرافی گازی یا طیف‌سنجی جرمی) هم می‌توانند به‌طور مستقیم بر نوع و نسبت ترکیبات استخراج‌شده در اسانس تأثیر بگذارند (Satyal et al., 2017; Vaičiulytė et al., 2022). در این مطالعه، نانوامولسیون سیر در اغلب موارد اثربخشی ضدباکتریایی بالاتری نسبت به اسانس سیر از خود نشان داده است. به‌عنوان نمونه، در غلظت  $0.097 \mu\text{g/ml}$ ، میزان مهار رشد *شریشیا کلی* توسط نانوامولسیون  $15.2\%$  و توسط اسانس  $7.6\%$  بود. این تفاوت در غلظت‌های بالاتر نیز حفظ شده است. به‌طور کلی، *شریشیا کلی* و *سالمونلا* / *اتریکا* مقاومت بالاتری نسبت به سایر باکتری‌ها در برابر هر دو نوع فرمولاسیون نشان دادند، در حالی که *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا مونوسیتوژنز* حساسیت بیشتری به اسانس و به‌ویژه نانوامولسیون سیر داشتند. در مورد *سودوموناس آئروژینوزا* نیز نانوامولسیون توانست در

وارد سلول‌های میکروارگانیزم‌ها شوند و اثرات ضد میکروبی خود را نشان دهند. اندازه نانو آن‌ها باعث می‌شود که بتوانند از طریق غشاء سلولی میکروارگانیزم‌ها عبور کنند و تأثیرات ضد میکروبی بیشتری ایجاد کنند (Paolino et al., 2021; Sharma et al., 2022). بررسی نتایج پژوهش‌های پیشین و تحقیق حاضر نشان می‌دهد که اثرات ضد میکروبی اسانس‌ها در مقابل باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از باکتری‌های گرم منفی است. دلیل این تفاوت در ساختار دیواره سلولی این دو گروه قرار دارد. باکتری‌های گرم مثبت دارای دیواره‌ای ضخیم‌تر و عمدتاً متشکل از لایه‌ای پپتیدوگلیکان هستند که ممکن است جذب اسانس‌های ضد میکروبی را تسهیل کند. در مقابل، باکتری‌های گرم منفی دارای دیواره‌ای پیچیده‌تر هستند که شامل غشای خارجی حاوی لیپیدها و پروتئین‌ها است. این غشا مانع نفوذ اسانس‌ها و ترکیبات ضد میکروبی به داخل سلول می‌شود. علاوه بر این، این باکتری‌ها سیستم‌های پمپ بیرون‌بر دارند که قادرند ترکیبات خارجی را از داخل سلول خارج کنند، و در نتیجه اثرات ضد میکروبی اسانس‌ها کاهش می‌یابد. بنابراین، برای اثربخشی بیشتر اسانس‌ها بر باکتری‌های گرم منفی، نیاز به غلظت‌های بالاتری از این ترکیبات است (Angane et al., 2022; Seow et al., 2014).

### نتیجه‌گیری

نانوامولسیون‌ها به عنوان سامانه‌های نوین و کارآمد، قابلیت قابل توجهی در افزایش ایمنی و ماندگاری مواد غذایی از طریق مهار رشد میکروارگانیزم‌های بیماری‌زا و فسادزا دارند. این سامانه‌ها، به واسطه‌ی پایداری فیزیکی بالا، قابلیت رهایش کنترل‌شده و فعالیت ضد میکروبی مؤثر، می‌توانند جایگزین مناسبی برای نگهدارنده‌های شیمیایی متداول در صنایع غذایی باشند. به‌ویژه، نانوامولسیون‌های حاوی اسانس سیر نسبت به اسانس خام، اثربخشی بیشتری در کنترل رشد میکروبی نشان داده‌اند. نتایج مطالعات حاکی از آن است که این ترکیبات می‌توانند به عنوان یک رویکرد طبیعی، ایمن و مؤثر برای افزایش طول عمر محصولات غذایی و کاهش

به زمان و غلظت بود، به این معنا که با افزایش مدت تماس یا غلظت، تأثیر آن تقویت می‌شد. همچنین، این اسانس توانست تشکیل بیوفیلم توسط لیستریا مونوسیتوزنز را به طور قابل توجهی کاهش دهد. نتایج این تحقیق نشان داد که نانوامولسیون اسانس سیر تأثیر قابل توجهی بر باکتری لیستریا مونوسیتوزنز جدا شده از شیر خام دارد و یافته‌ها با تحقیق حاضر، هم‌راستا هستند (Liu et al., 2024). لیو و همکاران (۲۰۲۲)، تأثیر نانوامولسیون سیر در آب تهیه‌شده با امواج فراصوت با توان بالا را بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از گوشت خوک بررسی نمودند. استفاده از امواج فراصوت با توان بالا اندازه ذرات اسانس سیر را از ۸۲۰٫۳ نانومتر به ۲۱۵ نانومتر کاهش داد. نانوامولسیون بیشترین اثر ضد میکروبی با حداقل غلظت مهاری ۱٫۲۵ mg/ml را نشان داد. این نانوامولسیون باعث مهار رشد سلولی باکتری و آسیب جدی به ساختار سلول شد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی نشان دادند که غشای سلولی به شدت آسیب دیده و ساختار سلول به کلی تخریب شده است. در تحقیق حاضر نیز نانوامولسیون سیر اثر ضد میکروبی قابل توجهی بر سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* استاندارد و جدا شده از گوشت نشان داد (Liu et al., 2022). بررسی نتایج تحقیقات انجام شده بر روی اسانس‌های گیاهان نشان می‌دهد که هم اسانس و هم نانوامولسیون اسانس سیر دارای اثرات ضدباکتریایی بر علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مرتبط با مواد غذایی می‌باشند. اسانس‌ها به فرم کپسوله و نانو یا نانوامولسیون نسبت به اسانس‌های خام دارای اثرات ضد میکروبی و پایداری بیشتری هستند. اسانس‌های خام به دلیل فرار بودن و حساسیت به شرایط محیطی مانند: نور، دما و اکسیژن، ممکن است سریعاً از بین بروند یا خواص خود را از دست بدهند. در مقابل، اسانس‌های کپسوله‌شده و نانوامولسیون‌شده به دلیل محافظت توسط غلاف‌ها یا پوشش‌ها، مقاوم‌تر هستند و به راحتی تخریب نمی‌شوند. این پایداری بیشتر باعث می‌شود که این فرم‌های اسانس‌ها مدت زمان بیشتری مؤثر واقع شوند و از این رو می‌توانند در نگهداری مواد غذایی به عنوان نگهدارنده‌های طبیعی استفاده شوند. در فرم نانوامولسیون، اسانس‌ها قادرند به طور مؤثرتری

---

وابستگی به ترکیبات نگهدارنده‌ی سنتتیک مورد استفاده قرار گیرند.

### تشکر و قدردانی

این پژوهش با همکاری مرکز تحقیقات ایمن سازی مواد غذایی و کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان انجام شده است. در این راستا، نویسندگان از تمامی افرادی که در فرآیند انجام آن، همکاری و مساعدت نموده‌اند، قدردانی می‌نمایند.

### تضاد منافع

نویسندگان هیچ گونه تضاد منافع‌ی ندارند.

1. Angane, M., Swift, S., Huang, K., Butts, C. A., & Quek, S. Y. (2022). Essential oils and their major components: An updated review on antimicrobial activities, mechanism of action and their potential application in the food industry. *Foods*. 11(3): 464 .
2. Aranda, K. R. S., Fagundes-Neto, U., & Scaletsky, I. C. A. (2004). Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. *J Clin Microbiol*. 42(12): 5849-5853 .
3. Bantawa, K., Rai, K., Subba Limbu, D., & Khanal, H. (2018). Food-borne bacterial pathogens in marketed raw meat of Dharan, eastern Nepal. *BMC Res. Notes*. 11: 1-5 .
4. Chen, H., & Zhong, Q. (2022). Physical and antimicrobial properties of self-emulsified nanoemulsions containing three synergistic essential oils. *Int J Food Microbiol*. 365: 109557 .
5. Chen, J.-Q., Healey, S., Regan, P., Laksanalamai, P., & Hu, Z. (2017). PCR-based methodologies for detection and characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* in foods and environmental sources, *Food Sci. Hum. Wellness*. 6(2): 39-59 .
6. Confessor, M. V. A., Agreles, M. A. A., Campos, L. A. d. A., Silva Neto, A. F., Borges, J. C., Martins, R. M., Cavalcanti, I. M. F. (2024). Olive oil nanoemulsion containing curcumin: antimicrobial agent against multidrug-resistant bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 108(1): 241 .
7. Dehariya, N., Guha, P., & Gupta, R. K. (2021). Extraction and characterization of essential oil of garlic (*Allium sativa* L.). *Int. J. Chem. Stud*, 9(1): 1455-1459 .
8. Espitia, P. J., Fuenmayor, C. A., & Otoni, C. G. (2019). Nanoemulsions: Synthesis, characterization, and application in bio-based active food packaging. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf*. 18(1):264-85.
9. Farazi, G., Asadi, G., & Gharachorloo, M. (2023). Investigating the effect of garlic essential oil nanoemulsion encapsulated with arabic gum on antioxidant activity, shelf life, and sensory properties of flavored olive oil. *J. Food Sci. Technol*. 20(140): 96-112 .
10. Hassanzadeh, H., Alizadeh, M., Hassanzadeh, R., & Ghanbarzadeh, B. (2022). Garlic essential oil-based nanoemulsion carrier: release and stability kinetics of volatile components. *Food Sci. Nutr*. 10(5):1613-25.
11. Hu, G., Cai, K., Li, Y., Hui, T., Wang, Z., Chen, C., Zhang, D. (2021). Significant inhibition of garlic essential oil on benzo [a] pyrene formation in charcoal-grilled pork sausages relates to sulfide compounds. *Food Res Int*. 141: 110127 .
12. Kariminik, A., Moradalizadeh, M., Foroughi, M. M., Tebyanian, H., & Motaghi, M. M. (2019). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oils extracted from 4 medicinal plants (Labiatae) of Kerman, Iran. *J. Appl. Biotechnol. Rep*. 6(4): 172-179 .
13. Liu, M., Guo, W., Feng, M., Bai, Y., Huang, J., & Cao, Y. (2024). Antibacterial, anti-biofilm activity and underlying mechanism of garlic essential oil in water nanoemulsion against *Listeria monocytogenes*. *LWT*. 196: 115847 .
14. Liu, M., Pan, Y., Feng, M., Guo, W., Fan, X., Feng, L. Cao, Y. (2022). Garlic essential oil in water nanoemulsion prepared by high-power ultrasound: Properties, stability and its antibacterial mechanism against MRSA isolated from pork .*Ultrason. Sonochem*. 90: 106201 .
15. Mehrotra, M., Wang, G., & Johnson, W. M. (2000). Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic

- shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. J Clin Microbiol. 38(3): 1032-1035 .
16. Paolino, D., Mancuso, A., Cristiano, M. C., Froio, F., Lammari, N., Celia, C., & Fresta, M. (2021). Nanonutraceuticals: The new frontier of supplementary food. Nanomaterials, 11(3): 792 .
  17. Rattanachaikunsopon, P & Phumkhachorn, P. (2008). Diallyl sulfide content and antimicrobial activity against food-borne pathogenic bacteria of chives (*Allium schoenoprasum*). Biosci. Biotechnol. Biochem. 72(11): 2987-2991 .
  18. Satyal, P., Craft, J. D., Dosoky, N. S & Setzer, W. N. (2017). The chemical compositions of the volatile oils of garlic (*Allium sativum*) and wild garlic (*Allium vineale*). Foods. 6(8): 63 .
  19. Seow, Y. X., Yeo, C. R., Chung, H. L., & Yuk, H.-G. (2014). Plant essential oils as active antimicrobial agents. Crit Rev Food Sci Nutr. 54(5): 625-644 .
  20. Sepahvand, F., Rashidian, E., Jaydari, A., & Rahimi, H. (2022). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in raw milk of healthy sheep and goats. Vet. Med. Int. 2022(1):3206172.
  21. Sharma, S., Mulrey, L., Byrne, M., Jaiswal, A. K., & Jaiswal, S. (2022). Encapsulation of essential oils in nanocarriers for active food packaging. Foods. 11(15): 2337 .
  22. Sindhu, M., Rajkumar, V., Annapoorani, C. A., Gunasekaran, C., & Kannan, M. (2023). Nanoencapsulation of garlic essential oil using chitosan nanopolymer and its antifungal and anti-aflatoxin B1 efficacy in vitro and in situ. Int. J. Biol. Macromol. 243:125160 .
  23. Swangsri, T., Reamtong, O., Saralamba, S., Rakthong, P., Thaenkham, U., & Saralamba, N. (2024). Exploring the antimicrobial potential of crude peptide extracts from *Allium sativum* and *Allium oschaninii* against antibiotic-resistant bacterial strains. Pharm. Biol. 62(1): 666-675 .
  24. Tao, J.-j., Xiang, J.-j., Jiang, M., Kuang, S.-f., Peng, X.-x., & Li, H. (2022). A microtitre plate dilution method for minimum killing concentration is developed to evaluate metabolites-enabled killing of bacteria by  $\beta$ -lactam antibiotics. Front. Mol. Biosci. 9: 878651 .
  25. Vaičiulytė, V., Ložienė, K., & Taraškevičius, R. (2022). Impact of edaphic and climatic factors on *Thymus pulegioides* essential oil composition and potential prevalence of chemotypes. Plants, 11(19): 2536 .
  26. Wu, C.-Y., Wang, C.-Y., Sun, G.-J., Li, Y.-Q., Liang, Y., Hua, D.-L., Mo, H.-Z. (2023). Antibacterial characteristics of allyl methyl disulfide and dimethyl trisulfide of *Allium tenuissimum* flower essential oil against *Escherichia coli* O157: H7. Ind. Crop. Prod. 202: 117058 .

## Evaluation of the Antimicrobial Effects of Garlic Essential Oil and Nanoemulsion on Bacteria Isolated from Food Products

Azizabadi A<sup>1,2</sup>, Ashraf Kariminik A<sup>\*1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, KeC., Islamic Azad University, Kerman, Iran

<sup>2</sup>Food and Agricultural Safety Research Center, KeC., Islamic Azad University, Kerman, Iran

\*Corresponding Author) Email: kariminik@iauk.ac.ir

### Abstract

Given the increasing need to preserve the quality and stability of perishable products, the use of essential oils and their nanoemulsions has emerged as a novel strategy for enhancing microbial stability in food systems. This study aimed to compare the antibacterial effects of garlic essential oil and its nanoemulsion against foodborne pathogenic bacteria, and to evaluate the potential application of garlic essential oil nanoemulsions in the food industry. Garlic essential oil was extracted via steam distillation, and its chemical composition was identified using gas chromatography. The nanoemulsion was formulated through a homogenization method. Antibacterial activity was assessed using the microtiter plate method against five bacterial species: *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Listeria monocytogenes*. The main components of the essential oil were diallyl disulfide, dipropyl trisulfide, dipropyl disulfide, and diallyl sulfide. The results revealed that the garlic essential oil nanoemulsion exhibited significantly stronger antibacterial activity than the crude essential oil across all tested concentrations. *Salmonella enterica* showed the highest sensitivity, with 99.89% growth inhibition at 1.56 µg/ml. Both MIC and MBC values were notably lower for the nanoformulation, and statistical analyses confirmed significant differences between concentrations ( $p < 0.001$ ). These findings highlight the high potential of garlic essential oil nanoemulsions as a natural and effective preservative for application in the food industry.

**Keywords:** Garlic essential oil, nanoemulsion, antibacterial effects, food products.

## شناسایی و تعیین مقدار اکراتوکسین A در غلات عرضه شده با استفاده از HPLC

محمدرضا صائبی<sup>۱</sup>، الهه تاجبخش<sup>۲</sup>، ابراهیم رحیمی<sup>\*</sup>

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

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

نویسنده مسئول: ebrahimrahimi55@yahoo.com

### خلاصه

مایکوتوکسین‌ها یا سموم قارچی، ترکیبات آلی هستند که در انتهای فاز رشدی برخی گونه‌های قارچ‌های *Fusarium*، *Aspergillus spp.*، *Penicillium sp.* در شرایط گرم و مرطوب تولید می‌شوند. از حدود ۴۰۰ نوع مایکوتوکسین موجود، حدود ۲۰ نوع آنها از نظر جهانی تهدیدی برای سلامت انسان و حیوانات محسوب می‌شوند. اکراتوکسین‌ها، مایکوتوکسین‌هایی هستند که عمدتاً به وسیله چندین گونه از قارچ‌های *آسپرژیلوس* شامل *آسپرژیلوس فلاووس*، *آسپرژیلوس پارازیتیکوس*، *آسپرژیلوس نومیوس*، *آسپرژیلوس اریزئوس* و پنی سیلیوم پابریکولوم و اکراتوکسین توسط *آسپرژیلوس اکراسئوس* تولید می‌شوند. در تحقیق حاضر میزان نفوذ سموم اکراتوکسین به غلات موجود در فروشگاه‌های شهر اصفهان مورد بررسی قرار گرفت. تعداد ۴۰ نمونه به طور تصادفی انتخاب شدند. و پس از یکنواخت کردن، در ۳ مرحله استخراج، تخلیص و تعیین مقدار سموم قرار گرفتند (تعیین مقدار از طریق مقایسه سطح زیر منحنی تک تک نمونه‌ها و استانداردها با احتساب ضریب رقت انجام شد). با توجه به حضور قارچ‌های مولد آفلاتوکسین و عوامل کنترل کننده این قارچ‌ها در محل تولید، همبستگی مثبتی بین کاهش جمعیت قارچ‌های مولد آفلاتوکسین و عوامل کنترل کننده با کاهش میزان آفلاتوکسین دیده شد. از پتانسیل عوامل کنترل کننده می‌توان برای جلوگیری از آلودگی غلات به آفلاتوکسین به خوبی استفاده نمود. **کلید واژه‌ها:** اکراتوکسین، HPLC، *آسپرژیلوس*، غلات.

## مقدمه

غلات مهمترین منبع غذایی برای انسان و دام بوده و مقادیر قابل توجهی از پروتئین، فیبر رژیمی و کربوهیدرات را تأمین می کنند (Tatari et al, 2022). اصلی ترین غلات مورد استفاده انسان شامل گندم (تریتیکوم)، برنج، ذرت و جو می باشد که همواره در معرض آلودگی توسط کپک های توکسین زا قرار دارند. مایکوتوکسین ها متابولیت های ثانویه ای هستند که توسط سویه های آسپرژیلوس، فوزاریوم و پنی سیلیوم و در محدوده وسیعی از محصولات کشاورزی، قبل، حین و بعد از برداشت تولید می شوند و سبب بروز مسمومیت حاد و مزمن، مسمومیت عصبی، اثرات سرکوب کننده سیستم ایمنی، ناهنجاری های جنینی، جهش زایی، سرطان زایی در انسان و دام و تحمیل خسارات اقتصادی فراوان به بخش کشاورزی می شوند. کپک غلات را می توان به دو گروه کپک های مزرعه ای و کپک های انباری تقسیم بندی نمود (Krska et al, 2008).

غلات به ویژه گندم محصولی مهم و استراتژیک در زندگی انسان محسوب می شود و با اطمینان می توان گفت که جز پرمصرف ترین محصولات کشاورزی به حساب می آید. در صورت آلودگی می تواند خطرات بسیار زیادی برای

سلامت انسان به دنبال داشته باشد. مهم ترین عامل آلودگی غلات در مزرعه و انبار می تواند به وسیله میکروارگانیسم های مختلفی به ویژه قارچ ها باشد. جنس های آسپرژیلوس و پنی سیلیوم کپک معمول انباری بوده و در مراحل مختلف حمل و نقل، خشک کردن، انبار کردن و بسته بندی نامناسب بر روی محصول ظاهر می شوند. غذای آلوده منبع اصلی انتقال مایکوتوکسین ها به شمار می رود. مهمترین انواع مایکوتوکسین ها در محصولات کشاورزی و غذایی شامل آفلاتوکسین ها، فومونیسین، اکراتوکسین، زئارالنون و تریکوتیسین می باشند (Milani & Maleki, 2014). انواع آفلاتوکسین در غلات (ذرت، برنج و گندم) و زئارالنون به ویژه در ذرت وجود دارد. آلودگی با اکراتوکسین غالباً در زمان نگهداری روی می دهد و در انواع غلات به ویژه ذرت وجود دارد. مقاومت حرارتی بالای مایکوتوکسین ها در حین فرآوری مواد غذایی مشکلات جدی برای سلامتی انسان و دام ایجاد کرده است. امروزه به منظور جلوگیری از مسمومیت مایکوتوکسینی، روش های مختلفی مورد استفاده قرار می گیرند که به فناوری های قبل و بعد از برداشت تقسیم می شوند (McKevith, 2004; Pascale, 2009).

مایکوتوکسین‌ها گروهی از متابولیت‌های ثانویه هستند که اغلب توسط قارچ‌هایی مانند پنی سیلیوم و آسپرژیلوس تولید می‌شوند. بزرگترین تخریب این سموم مربوط به مواد غذایی، به ویژه غلات است. بیماری‌های مختلفی توسط این مایکوتوکسین‌ها ایجاد می‌شود، که این بیماری‌ها از پاسخ‌های آلرژیک ساده تا سرکوب سیستم ایمنی و سرطان را شامل می‌شود. مایکوتوکسین‌ها مهم‌ترین متابولیت‌های قارچی هستند که به دلیل شیوع زیاد می‌توانند به سلامت انسان و دام آسیب بزنند. اکراتوکسین (OTA) یکی از مهم‌ترین مایکوتوکسین‌هایی است که اثر متقابلی بر روی سلول‌ها دارد و به طور گسترده بر سلامت انسان و حیوان تأثیر می‌گذارد. این مایکوتوکسین توسط برخی از قارچ‌ها شامل

*A. Ochraceus* و *P. Verrucosum* تولید می‌شود (Milani, 2019; Khaneghah et al, 2013).

اکراتوکسین‌ها، ترکیبات سمی هستند که در انتهای مرحله رشدی قارچ‌های آسپرژیلوس و پنی سیلیوم در محصولات غذایی مختلف مانند حبوبات، ادویه‌جات، قهوه، کاکائو، بادام، پسته، گردو، انجیر خشک، میوه‌های خشک، کشمش و غلات در هنگام رشد در مزرعه، در مرحله برداشت به دلیل آسیب دیدن محصول، در حین

روش‌های کنترل قبل از برداشت نظیر عوامل محیطی مناسب، کشاورزی و عملیات تولید خوب و شرایط انبارداری صحیح است، همچنین در روش‌های کنترل بعد از برداشت نیز می‌توان از روش‌های فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی بهره گرفت. روش‌های فیزیکی کاهش مایکوتوکسین‌ها شامل جداسازی دانه‌های آلوده، شستشو و غوطه‌ور کردن، اشعه دهی و فیلتر کردن و جذب است. انواع مواد شیمیایی نظیر بازها (آمونیاک)، عوامل اکسید کننده (هیدروژن پراکسید و اوزون) و اسیدهای آلی (فرمیک و پروپیونیک اسید) را می‌توان جهت سم‌زدایی بکار برد. به دلیل محدودیت سم‌زدایی فیزیکی و شیمیایی از قبیل کاهش کیفیت، هزینه بالا، ظرفیت اتصال کم و اثرات نامطلوب بر سلامت انسان، کاربرد روش‌های بیولوژیک جهت اطمینان از ایمنی مواد غذایی ضروری است. انواع مختلفی از باکتری (سویه‌های بروی باکتریوم و باسیلوس)، کپک (نظیر کولونوستاچیس روزئا و ائروباژیدیوم پولولانس)، مخمر (ساکارومایسس سرویزیه و پیشیا آنومالا) ترکیبات ضد قارچ طبیعی (اسانس‌های روغنی طبیعی و پلی فنولو فلاونوئیدها) از طریق اتصال به مایکوتوکسین‌ها و جذب آنها توانایی تخریب زیستی این ترکیبات را دارند (Shanakhat et al, 2018; Borbély

DNA (ترکیبی که تمام اطلاعات ژنتیکی و وراثتی موجود زنده روی آن قرار دارد)، متصل شود که در نتیجه سمی تر از بقیه انواع اکراتوکسین ها است (Malir et al, 2016; Heussner & Bingle, 2015). البته نشخوارکنندگان در برابر سمیت اکراتوکسین A حساسیت کمتری دارند به دلیل اینکه در شکمبه آنها، میکروارگانیسم ها (یا میکروب ها) وجود دارد که قادرند اکراتوکسین A را به ترکیبات غیر سمی به نام (آلفا اکراتوکسین) تجزیه کنند با این حال، ممکن است سم اکراتوکسین به شیر وارد شود. البته ردپای کوچکی از آلودگی های اکراتوکسینی در ماهی ها مانند تیلپیا و سالمون دیده شده که منبع خطرناکی از اکراتوکسین محسوب نمی شوند (El Khoury & Atoui, 2010).

از دیگر معضلات اکراتوکسین A که می توان به آن اشاره کرد این است که در صورت آلوده بودن محصولات غذایی به این سم قارچی، به دلیل مقاومت اکراتوکسین در برابر حرارت، با پخت و پزهای معمولی و فرآوری مواد غذایی که اغلب در محدوده دمایی ۸۰ تا ۱۲۰ درجه سانتی گراد صورت می گیرد، از بین نمی رود. آژانس بین المللی تحقیقات روی سرطان (IARC)، اکراتوکسین A را در گروه B۲ یعنی به عنوان ترکیبی که احتمالاً در

حمل و نقل و انبارداری به خصوص در صورتی که محصولات به درستی خشک نشده باشند، در شرایط رطوبتی و دمایی مناسب، تولید می شوند (Khorshidi et al, 2022; Smaoui et al, 2023). اکراتوکسین ها دومین گروه اصلی مایکوتوکسین ها یا سموم قارچی هستند که بعد از کشف آفلاتوکسین ها مورد توجه قرار گرفتند. اکراتوکسین A در سال ۱۹۶۵ در آفریقای جنوبی در پژوهش های آزمایشگاهی برای یافتن ترکیبات سمی جدید قارچ اسپرژیلوس اُکراسئوس کشف شد و به دلیل نام قارچی که از آن گرفته شده بود، اکراتوکسین نامیده شد (Nourbakhsh & Tajbakhsh, 2021). قارچ اسپرژیلوس اُکراسئوس، اولین بار توسط گیاه شناس و قارچ شناس آلمانی به نام کارل ویلهلم در سال ۱۸۷۷ کشف شد که اُکراسئوس به معنای به رنگ اُکر یا اخراپی رنگ یا زرد مایل به قهوه ای روشن است که رنگ کلنی این قارچ هم به رنگ گندمی مایل به زرد روشن است. اکراتوکسین ها در سه نوع A، B و C هستند که در این بین، اکراتوکسین A به دلیل داشتن یه قسمت آمینو اسیدی، که در ساخت پروتئین استفاده می شود (فنیل آلانین) با مهار آنزیم ها می تواند از تولید پروتئین در سلول های ایمنی بدن جلوگیری کند و از طرفی اکراتوکسین A، به دلیل داشتن کلر (cl) قادر است به

ترکیب بیرنگ بلوری شکل با وزن مولکولی ۴۰۳/۸۲ دالتون و دارای فرمول مولکولی  $C_{20}H_{18}NClO_6$  می باشد. اکرآتوکسین A جزو ترکیبات فنیلآلانینی بوده که دارای یک هسته ایزوکومارینی می باشد. اکرآتوکسین A روی سلامت مردان هم اثرات منفی می گذارد و با جلوگیری از ترشح هورمون تستوسترون (هورمون جنسی) و با بدشکلی، کاهش تعداد و تحرک سلول اسپرم باعث ناباروری در آقایان شده و ممکن است باعث سرطان بیضه شود (Ringot et al, 2006; Chain et al, 2020). سم اکرآتوکسین A، با جلوگیری از تولید پروتئین در سلول های ایمنی، باعث سرکوب سیستم ایمنی بدن می شود. تحقیقات روی حیوانات نشان داده است که این سم می تواند باعث کاهش اندازه اندام های ایمنی بدن مانند طحال، اندام لنفاوی (تیموس) و غدد لنفاوی شده و از این طریق عملکرد سیستم ایمنی را کاهش دهد و با گذاشتن اثرات مخرب روی سلول های لوزالمعده، ممکن است منجر به دیابت شود (Bui-Klimke & Wu, 2015). در صورت مصرف مواد غذایی آلوده به اکرآتوکسین در زنان شیرده، این سم از طریق شیر به نوزاد منتقل می شود. کودکان با توجه به وزن کمتری که دارند و تعداد دفعات بیشتری که غذا مصرف می کنند، بیشتر در معرض خطر اکرآتوکسین A قرار می گیرند. علاوه بر مادران و

سرطان زایی روی انسان نقش دارد، طبقه بندی کرد. اکرآتوکسین A قادر است به DNA متصل شده و این فرآیند می تواند شروع سرطانی شدن یک سلول (کوچکترین واحد حیاتی بدن هر موجود زنده) باشد (Pfohl-Leszkowicz & Manderville, 2007). با مصرف مواد غذایی آلوده به اکرآتوکسین A، این سم به راحتی از طریق دستگاه گوارش بدن جذب شده و با اتصال به پروتئین اصلی خون (آلبومین) به سمت بخش های مختلف بدن از جمله کلیه و کبد رفته و در بافت های چربی بدن ذخیره می شود. طبق تحقیقات اکرآتوکسین A، می تواند تا مدت ها در خون باقی بماند (Amézqueta et al, 2009). اثر مخرب و سمی اکرآتوکسین A بیشتر روی کلیه است اما روی سایر اندام ها مانند کبد و همین طور سیستم ایمنی بدن نیز تأثیرگذار است. علاوه بر این، اکرآتوکسین A قادر به عبور از جفت و ایجاد نقایص مادرزادی در جنین از جمله اختلال در رشد اندام های بدن و همین طور مرگ جنین است. بر اساس تحقیقات سازمان ایمنی مواد غذایی اروپا (EFSA)، مشخص شد که تجمع اکرآتوکسین A می تواند بیشتر در خون، کبد و کلیه اتفاق بیفتد و مقدار کمتری از آن در بافت ماهیچه ای، چربی و شیر یافت می شود (Pfohl-Leszkowicz & Manderville, 2007). اکرآتوکسین A یک

## مواد و وسایل مورد استفاده

مواد و وسایل مورد استفاده در طرح شامل سم آفلاتوکسین (B1, B2, G1, G2) خالص، سم اکراتوکسین A خالص، محلول متانول MeO، محلول اسید استیک خالص، محلول PBS، محلول Tween-20، محلول NaCl، حلال فاز متحرک H<sub>2</sub>O-HPLC، MeCN: H<sub>2</sub>O، کاغذ صافی معمولی، آب دیونیزه، دتکتور فلورسانس، GFF، دستگاه HPLC، ستون Immuno affinity، بلندر، حلال فاز متحرک می باشد. تمامی مواد شیمیایی به استثناء متانول و استونیتریل درجه HPLC دارای درجه آزمایشگاهی بودند (مرک آلمان). کلیه محلول ها با آب دیونیزه تهیه شدند (Swartz, 2010). استانداردهای AFB1 و OTA از شرکت شیمیایی سیگما خریداری شدند که در تهیه منحنی های کالیبراسیون مورد استفاده قرار گرفتند. ستون مورد استفاده برای آفلاتوکسین (Aflatest P) و اکراتوکسین (Chratest TM) از شرکت Vicam تهیه شد. جهت تایید اولیه میزان مایکوتوکسین ها از کیت آنزیمی ELIZA برای اکراتوکسین A و آفلاتوکسین B1 از شرکت Sigma تهیه شد. دستگاه HPLC مجهز به یک پمپ Quarternary مدل 1200 Series و یک آشکار ساز

نوزادان، افراد مسن که سیستم ایمنی ضعیفتری دارند هم از گروه های پرخطر محسوب می شوند. هدف از این مطالعه ارزیابی میزان سم اکراتوکسین در نمونه های غلات جداسازی شده از سطح عرضه بوده است (Clark & Snedeker, 2006; Battacone, Nudda, & Pulina, 2010).

## روش کار

## آماده سازی نمونه

جهت رفع آلودگی احتمالی، تمامی ظروف آزمایشگاهی با اسید هیدروکلریک شسته شده و با آب دیونیزه آبکشی و در آون خشک شدند. کلیه ظروف مورد استفاده در این بررسی در حدود دو ساعت در محلول ۲ مولار اسید سولفوریک خیسانده شدند و پس از چندین بار شستشو با آب دیونیزه شسته و در آون خشک شدند. در این پژوهش تعداد ۴۰ نمونه از غلات صبحانه با پایه غله ای شامل گندم، ذرت، جو و برنج غیر شکلاتی در گروه های مختلف از شرکت های داخل ایران طبقه بندی شدند. نمونه ها به صورت تصادفی انتخاب و برای ادامه مراحل جداسازی انتخاب شدند. در ادامه نمونه ها با یک آسیاب آزمایشگاهی آسیاب شدند و پس از آن به منظور دستیابی به یک ترکیب یکنواخت توسط دستگاه مخلوط کن مخلوط و یکنواخت شدند (Rahimi et al, 2012).

10-Avp و همچنین نرم افزار LC-solution استفاده شد (Hallsworth & Magan, 1997; Adams et al, 2009).

مرحله استخراج، تخلیص و تعیین مقدار سم انجام پذیرفت. در مرحله استخراج، ابتدا برای فعال کردن ستون ها محلول PBS را از آنها عبور داده شد. هر نمونه را به خوبی مخلوط کرده و سپس ۱۰ گرم از هر نمونه را با احتساب ۰/۱ خطا توزین گردید. سپس مقدار ۱۰ گرم از نمونه دیگر را نیز به عنوان نمونه Spike با ۰/۱ خطا توزین شد. به نمونه مد نظر ۵۰ μl از اکراتوکسن A و آفلاتوکسین های B1, B2, G1, G2 با غلظت استاندارد ۱۰۰۰ ppm تهیه شدند (Dohnal et al, 2013). سپس یک گرم از محلول NaCl و ۱۰۰ میلی لیتر حلال استخراج اضافه، سپس محلول فوق را یک دقیقه با بلندر مخلوط و با کاغذ صافی فیلتر و سپس ۵ میلی لیتر از محلول فیلتر شده را به ۲۵ میلی لیتر محلول بافر نمکی (PBS) اضافه شد. پس از تکان دادن نمونه را از کاغذ صافی GFF عبور دادیم و در نهایت همه عصاره رقیق شده را ضمن رساندن دمای ستون به دمای آزمایشگاه برداشته و نمونه را از ۲۰ میلی لیتر محلول بافر نمکی (PBS) عبور داده شد (Luque et al, 2013). در مرحله تخلیص ۴۰ میلی لیتر از عصاره رقیق شده را از ستون عبور و سپس ستون با

UV/VIS از شرکت Agilent آلمان تهیه شد. ماکزیمم سرعت دوران یا چرخش 5000 rpm در نظر گرفته شد. متانول، اسید استیک گلایسال، استو نیتریل و محلول ذخیره استاندارد اکراتوکسین A با غلظت ۱۰۰۰ ppb در متانول با درجه خلوص بسیار بالا و مخصوص دستگاه HPLC از نمایندگی شرکت Sigma و ستون های ایمونوآفینیته مخصوص اکراتوکسین A به نام پوری فست (Puri- Fast) از نمایندگی شرکت BIOS-LI در ایران تهیه شد (Kazakevich & Lobrutto, 2007).

### استخراج و تخلیص

کلیه ظروف به کار رفته در این بررسی، ابتدا چندین ساعت در محلول ۲ مولار اسید سولفوریک خیسانده می شدند و پس از چندین بار شستشو با آب لوله کشی و حصول اطمینان از اینکه در ظروف، اسیدی باقی نمانده (چک کردن با کاغذ pH)، در نهایت با آب دیونیزه شسته و در آون خشک می شدند. در انجام این تحقیق، از دستگاه HPLC دستگاه HPLC از نمایندگی شرکت Sigma و ستون های ایمونوآفینیته مخصوص اکراتوکسین A به نام پوری فست (Puri- Fast) از نمایندگی شرکت BIOS-LI در ایران تهیه شد. این دستگاه مجهز به دکتور فلورسانس RF-10AXL و کنترل کننده سیستم و جریان

شد و سپس به هر یک از غلظت‌ها، ۲۰ میلی لیتر از نمونه زیر صافی اضافه و مطابق روش کار استخراج و آنالیز شدند و این عمل برای هر غلظت شش بار تکرار شد.

### تجزیه آماری

آمار توصیفی (میانگین، انحراف استاندارد، دامنه، حداکثر و متوسط) با تجزیه دو طرفه واریانس (ANOVA) و با استفاده از نرم افزار Minitab مورد ارزیابی و بررسی قرار گرفت.

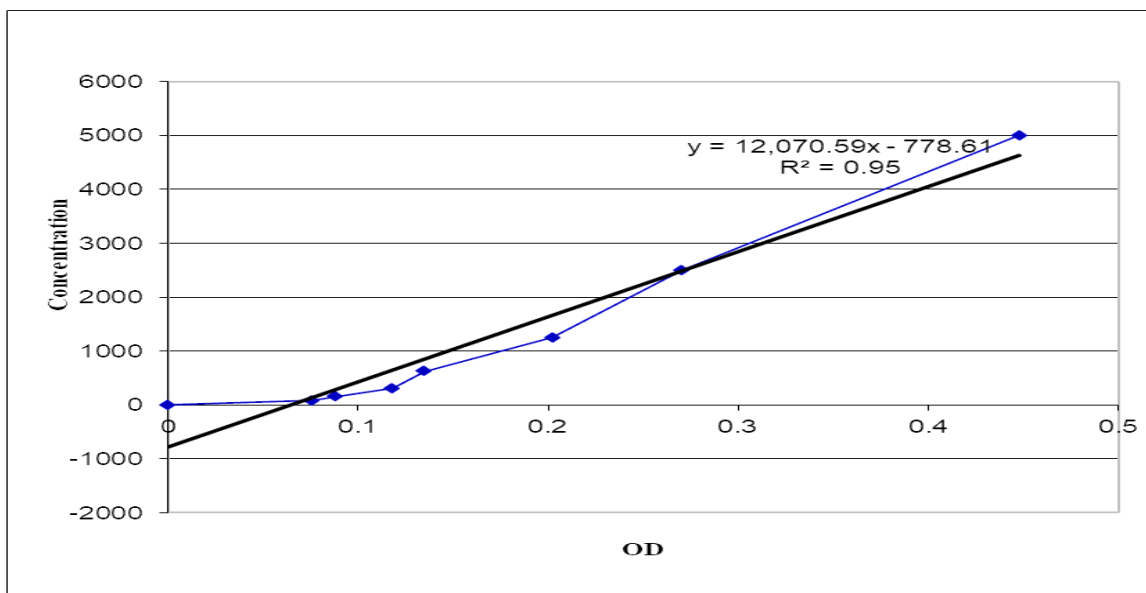
### نتایج

در این پژوهش تعداد ۴۰ نمونه از غلات صبحانه با پایه غله‌ای شامل گندم، ذرت، جو و برنج غیر شکلاتی در گروه‌های مختلف از شرکت‌های داخل ایران طبقه‌بندی شدند. نمودار ۱ منحنی کالیبراسیون برای تعیین غلظت اکراتوکسین A، نمودار ۲ منحنی کروماتوگرام مربوط به استاندارد اکراتوکسین A (۱۰ ppb) و نمودار ۳ کروماتوگرام مربوط به نمونه غلات مورد بررسی را نشان داد. نتایج حاصله با تکرارپذیری و تجدیدپذیری و همچنین میانگین پنج بار تکرار نشان داده شده است. نمونه‌ها در غلظتی با میانگین ۰/۰۹ ppb و ماکزیمم ۰/۸۰۹ ppb به اکراتوکسین A آلودگی داشتند. که

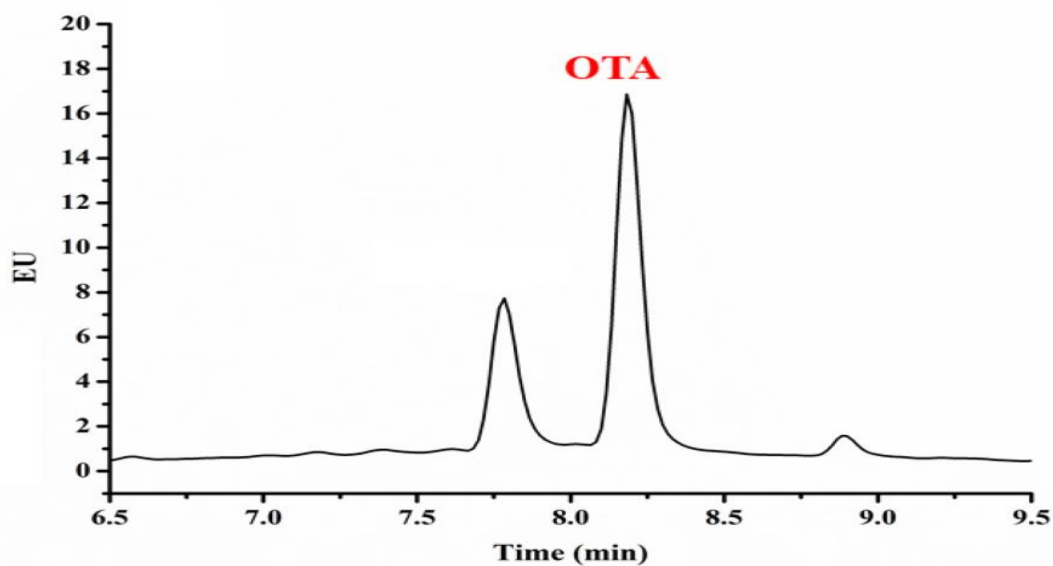
استفاده از بافر نمکی (PBS) فسفات شستشو داده شد. در نهایت ستون با عبور فشار ملایم هوا به مدت ۱۰-۱۵ ثانیه خشک و به ستون ۱۰۰۰  $\mu$ l MeOH: AOCCH اضافه گردید. در مرحله تعیین مقدار، تشخیص با دتکتور فلورسانس ۳۳۳  $me\lambda$  و ۴۶۰  $xe\lambda$  و Gain= ۱۰۰۰ و  $Attn=16$  تعیین مقدار شد. با مقایسه سطح زیر منحنی تک تک نمونه‌ها و استانداردها با احتساب ضریب رقت انجام تعیین مقدار شدند. رابطه خط به دست آمده و ضریب همبستگی نشان‌دهنده رابطه خطی مطلوب بین غلظت‌های مختلف نمونه و سطوح زیر جذب در محدوده کاری بود (Mishra et al, 2016; Leitner et al, 2002). تکرارپذیری و تجدیدپذیری روش با تزریق محلول استاندارد اکراتوکسین A به دستگاه HPLC، در غلظت‌های ۰/۱، ۱، ۵، ۲/۵ و ۱۰ ppb در هفت روز متوالی، در روز اول از هر غلظت استاندارد شش بار و در بقیه روزها یک بار، و تعیین درصد انحراف معیار نسبی بررسی شد. برای تعیین کارایی روش در استخراج اکراتوکسین A از نمونه‌های غلات مورد بررسی، ابتدا یکی از نمونه‌ها بدون هیچ گونه افزایشی از استاندارد اکراتوکسین A به آن نمونه، مطابق روش کار، استخراج و آنالیز گردید (این عمل سه بار انجام شد). سپس یک میلی لیتر به ترتیب از استانداردهای ۰/۱، ۲/۵، ۵ ppb توسط گاز خلاء خشک

خوشبختانه میزان آلودگی گزارش شده از حد مجاز نرمال و گندم با نمونه‌های جو و برنج دارای اختلاف معنی‌داری پایین‌تر است. در حالی که میزان آلودگی نمونه‌های ذرت از نظر وجود اکراتوکسین A بودند.

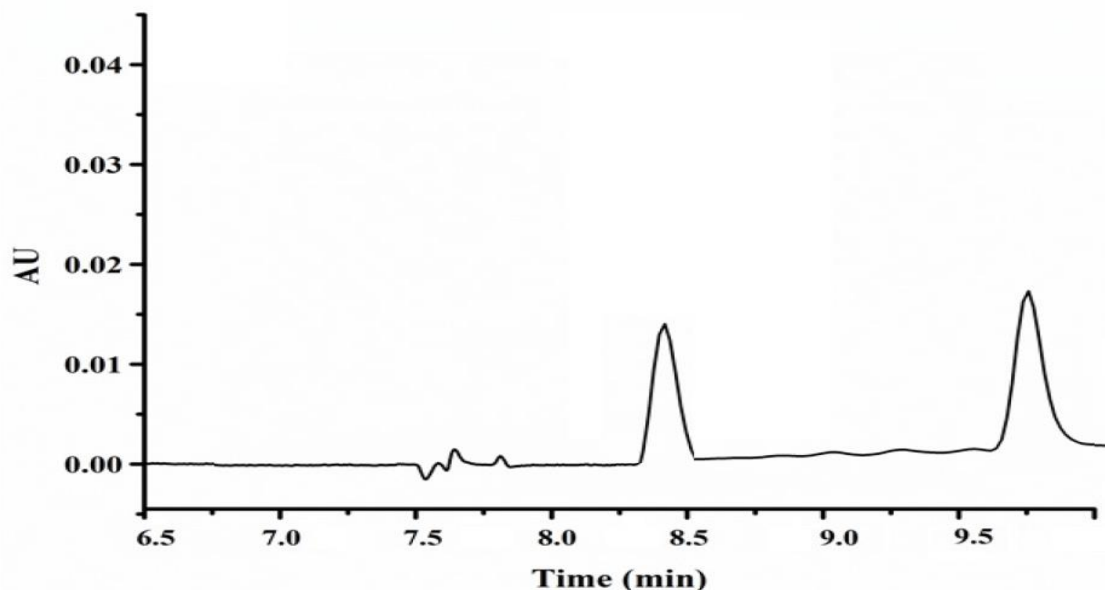
نمودار ۱: منحنی کالیبراسیون اکراتوکسین A



نمودار ۲: کروماتوگرام مربوط به استاندارد اکراتوکسین A (۱۰ ppb)



نمودار ۳: کروماتوگرام مربوط به نمونه غلات مورد بررسی



مقادیر اکراتوکسین در نمونه‌های غلات مورد ارزیابی در سه سطح غلظتی مختلف با میانگین پنج بار تکرار مورد ارزیابی قرار گرفت.

جدول ۱: تکرارپذیری و تجدیدپذیری نتایج اکراتوکسین A (نتایج میانگین پنج بار تزریق)

| غلظت OTA<br>ppb | میانگین سطح<br>( $\mu V \cdot S$ )<br>بین یک روز | میانگین سطح<br>( $\mu V \cdot S$ )<br>در طول روزها | RSD (%)<br>بین یک روز | RSD (%)<br>در طول روزها |
|-----------------|--------------------------------------------------|----------------------------------------------------|-----------------------|-------------------------|
| ۰/۱             | ۵۵۱۸/۲                                           | ۷۲۹۲/۵                                             | ۱۴/۰۸۸                | ۱۵/۹۸۳                  |
| ۱/۵             | ۴۸۹۳/۳                                           | ۵۹۷۲۲/۶                                            | ۳/۵۱۶                 | ۳/۵۷۱                   |
| ۲/۵             | ۱۵۶۴۹/۴                                          | ۱۳۶۴۸۰/۷                                           | ۳/۲۸۸                 | ۲/۴۲۷                   |
| ۵               | ۲۷۷۷۰/۷                                          | ۲۵۴۷۲۶/۲                                           | ۲/۲۲۳                 | ۱/۶۷۰                   |
| ۱۰              | ۵۴۱۰۸/۸                                          | ۴۹۷۰۲۴/۸                                           | ۰/۶۴۳                 | ۱/۱۲                    |

جدول ۲: درصد بازیافت اکراتوکسین A در نمونه غلات در سه سطح غلظتی مختلف ۰/۱ ppb، ۲/۵ ppb و ۵ ppb (نتایج میانگین ۵ اندازه‌گیری متوالی)

| بازیافت % | مقدار اکراتوکسین A به دست آمده (ppb) | مقدار اکراتوکسین A اضافه شده (ppb) | فرآورده   |
|-----------|--------------------------------------|------------------------------------|-----------|
| ۱۰۱       | ۰/۱۰۱                                | ۰/۱                                | ذرت       |
| ۸۸        | ۲/۲                                  | ۲/۵                                | گندم      |
| ۹۵        | ۴/۷۵                                 | ۵                                  | جو و برنج |

## بحث

آفات توکسین ها و اکراتوکسین ها از متابولیت های ثانویه قارچی هستند که توسط گروهی از قارچ ها به ویژه از جنس آسپرژیلوس ایجاد می گردند. مهم ترین قارچ های ایجاد کننده آفات توکسین، آسپرژیلوس فلاووس، آسپرژیلوس پارازیتیکوس و پنی سیلیوم پابریکولوم و قارچ اصلی ایجاد کننده اکراتوکسین، آسپرژیلوس اکراسئوس می باشد (Raters & Matissek, 2008). تاکنون در ایران مطالعه ای مبنی بر شیوع و گسترش اکراتوکسین A در گندم، آرد یا غلات مشابه دیده نشده است. در سال ۱۳۸۶ هادیان و همکاران به بررسی میزان شیوع اکراتوکسین A در برنج فروشگاه های زنجیره ای شهر تهران پرداختند. به این منظور ۱۰۰ نمونه به صورت تصادفی از فروشگاه ها تهیه و ۸۰ نمونه برنج داخلی و ۲۰ نمونه دیگر از برنج های وارداتی بودند. بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه میزان آلودگی به اکراتوکسین A در ۹۷ درصد از نمونه های مورد ارزیابی کمتر از حد مجاز ( $5 \mu\text{g/kg}$ ) توسط استاندارد ملی و تحقیقات صنعتی ایران بود (Hadian et al, 2009).

در مطالعه حاضر، سطوح آلودگی به اکراتوکسین A نمونه های غلات داخل کشور، کمتر از انواع داخلی بود. دامنه تغییرات آلودگی به اکراتوکسین A در انواع غلات

مورد ارزیابی ۱/۰۷ - ۰/۱۵ میکروگرم به ازای هر کیلوگرم بود. شرایط خوب بسته بندی در مورد غلات بسیار مهم است؛ زیرا عدم تهویه و وجود رطوبت و عدم فرآوری مطلوب می تواند از عللی باشد که غلات را به اقسام قارچ ها آلوده می نماید. موضوع دیگر نگهداری مواد به صورت خرد شده یا سالم است؛ زیرا آلودگی قارچی، ابتدا به صورت فراوان در دانه های شکسته یا آسیب دیده به وجود می آید. مطالعات اخیر نشان می دهد که به علت بالا بودن آلودگی قارچی میزان آفات توکسین افزایش می یابد و آلودگی قارچی ارتباط مستقیمی با افزایش سطح اکراتوکسین داشته و به همان میزان افزایش دارد؛ اما گاهی به دلیل نبود شرایط کافی تولید توکسین قارچی انجام نمی شود. بنا به گزارش پی و همکاران در سال ۱۹۹۱ دانه های ذرت فاقد پوشش و فاقد سد طبیعی برای جلوگیری از آلودگی با قارچ آسپرژیلوس می باشند از این رو احتمال آلودگی با این مایکوتوکسین ها به ویژه در دمای ۲۵ درجه به مدت ۷ تا ۹ روز افزایش می یابد. لازم به ذکر است عوامل دیگری همچون رطوبت، PH و فشار اسمزی در افزایش مایکوتوکسین ها نقش دارند (Pier, 1992).

از طرفی ممکن است قارچ ها در صورت نامطلوب شدن شرایط از بین بروند، اما سم تولید شده توسط آنها

شرایط مناسب، امکان رشد قارچ و تولید آفاتوکسین در تمام مراحل از عمل‌آوری تا ذخیره وجود دارد. شرایط خوب بسته‌بندی در مورد غلات بسیار مهم است؛ زیرا عدم تهویه و وجود رطوبت و عدم فرآوری مطلوب می‌تواند از عللی باشد که غلات را به اقسام قارچ‌ها آلوده می‌نماید (Thompson & Henke, 2000; Henke et al, 2001). در کشور ایران ضایعات نان به صورت نان خشک زیاد است و ریسک آلودگی آنها به مایکوتوکسین‌ها بالاست. با توجه به اینکه منشأ این نان خشک‌ها متفاوت بوده و ضوابط بهداشتی در نگهداری این گونه مواد زائد رعایت نمی‌شود، ورود این سموم قارچی از این طریق به جیره غذایی دام‌ها بسیار محتمل و بالطبع انسان به طور غیرمستقیم در معرض این آلاینده‌ها قرار می‌گیرد. لذا ضرورت دارد که غذای دام‌ها از نظر آلودگی به مایکوتوکسین‌هایی مانند اکراتوکسین و آفاتوکسین بررسی شوند. در حال حاضر بهترین روش برای مقابله با آلودگی به اکراتوکسین‌ها پیش‌گیری از آلودگی می‌باشد. با تغییر دما، کاهش رطوبت نسبی هوا، کاهش محتوای آب سوپسترا تا حدود زیادی می‌توان از رشد قارچ و تولید سم جلوگیری کرد. مطالعات نشان داده است که چنانچه پس از آلودگی به سم از آسپارتام به صورت خوراکی استفاده شود، آسپارتام از اتصال اکراتوکسین A به

دوره ۱۲ شماره ۱ بهار ۱۴۰۴

همچنان باقی می‌ماند؛ اما سم تولید شده توسط آنها همچنان باقی می‌ماند. ویلا و مرکاکی به بررسی میزان آفاتوکسین و اکراتوکسین B در غلات صبحانه در فروشگاه‌های سطح شهر به روش HPLC پرداختند که به این نتیجه رسیدند که در بیش از نیمی از نمونه‌های مورد بررسی آفاتوکسین B1 وجود دارد که این میزان مطابق نتایج به دست آمده در ۱۰٪ نمونه‌ها بیش از حد مجاز استاندارد اروپا می‌باشد (Villa & Markaki, 2009). مطالعات نشان داده است که پس از برداشت محصول نیز به‌کارگیری روش‌های مناسب فرآوری و خشک کردن و نگهداری در انبار جهت کاهش آلودگی و جلوگیری از گسترش آن لازم است. تامسون و هنک طی مطالعه مشابهی در سال ۲۰۰۰ نشان دادند که تولید آفاتوکسین در صورت وجود شرایط مناسب، بدون توجه به طول مدت ذخیره و شرایط آب و هوایی انجام می‌گیرد (Thompson & Henke, 2000).

بنا به گزارش تامسون و هنک در سال ۲۰۰۰ تولید آفاتوکسین در صورت وجود شرایط مناسب، بدون توجه به طول مدت ذخیره و شرایط آب و هوایی انجام می‌گیرد. هنک و همکاران در سال ۲۰۰۱ با مطالعه بر روی

دانه‌های گیاهی گزارش نمودند در صورت فراهم بودن

جمع‌آوری نتایج سایر مطالعات انجام شده در این خصوص و الگوی مصرفی در کره، دریافت احتمالی روزانه اکراتوکسین A را در برای همه افاد کرهای، در محدوده ۴/۱ - ۰/۸ برآورد کردند. در حالی که برای مصرف‌کنندگان سنگین وزن ۹/۱ - ۱/۷ نانو گرم بر کیلوگرم وزن بدن برآورد کردند (Park, Chung & Kim, 2005). محققان اظهار داشته‌اند که بر اساس این برآوردها، می‌توان نتیجه گرفت که در حال حاضر ریسک قابل توجه‌ای از تماس با اکراتوکسین A برای مصرف‌کنندگان متوسط کرهای، وجود ندارد (Park, Chung & Kim, 2005).

مطالعات مشابه به بررسی میزان مایکوتوکسین‌ها در لبنیات پرداختند. البرزی و همکاران در شیراز میزان آلودگی پنیر پاستوریزه به آفلاتوکسین M<sub>1</sub> را به روش ELISA تعیین کردند. نتایج این مطالعه نشان داد که برخلاف اینکه ۳۰٪ از شیرهای پاستوریزه آلوده بودند ولی هیچ یک از پنیرهای تولید شده آفلاتوکسین M<sub>1</sub> بالاتر از حد مجاز نداشتند (Aydin et al, 2011).

با توجه به آلودگی اکثر نمونه‌ها به اکراتوکسین A، ضرورت توجه به این موضوع نمایان می‌شود. حداکثر حد مجاز آلودگی غلات به اکراتوکسین A در کشورهای

پروتئین‌های پلاسما جلوگیری کرده و باعث دفع آن می‌شود بدون اینکه اثر جانبی ایجاد نماید. نتایج بررسی شاتول (Shotwell) و همکارانش بر روی ۱۴۲ نمونه گندم جمع‌آوری شده از ویرجینیا، کارولینای شمالی، جنوب ایلینویز، کنتاکی و جنوب شرقی میسوری حاکی از عدم آلودگی نمونه‌های مورد بررسی به اکراتوکسین A بود (Shotwell et al, 1977). تابوک (Tabuc) و همکارانش در سال‌های ۲۰۰۲ - ۲۰۰۴ قارچ‌ها و مایکوتوکسین‌های (آفلاتوکسین، دزوکسی نیوالنول، زیرالنون، فوموزین و اکراتوکسین A) موجود در ۱۱۰ نمونه غلات (۳۵ گندم، ۵۴ ذرت و ۲۱ جو) از جنوب شرقی رومانی را مطالعه کردند. بر اساس نتایج آنها بیشترین آلودگی تعلق به قارچ‌های *آسپرژیلوس* و *فوزاریوم* داشت. بیش از ۹۰ درصد نمونه‌ها حداقل به یکی از مایکوتوکسین‌های مورد بررسی آلودگی داشتند. ولی فوموزین و اکراتوکسین A در هیچ یک از غلات مورد بررسی مشاهده نشد (Tabuc et al, 2009). نتایج این تحقیق نیز با نتایج مطالعات اخیر در راستای بررسی و جداسازی مایکوتوکسین‌ها از غلات و گندم در ایران همخوانی ندارد.

پارک (Park) و همکارانش در سال ۲۰۰۳ میزان اکراتوکسین A را در اقلام مختلف مواد غذایی (برنج، آرد گندم جو، آجود) کشور کره بررسی کرده‌اند. آنها با

حمل و نگهداری آنها ایجاد شود. نکته قابل توجه دیگر اینکه هر چه زمان برداشت محصول در نقطه پایانی خط تولید یا در زمان تهیه خوراک تا زمان مصرف کمتر باشد، احتمال آلودگی کمتر است. نظر به اینکه هیچ کار تحقیقاتی گسترده‌ای در ارتباط با میزان دریافت میکوتوکسین‌ها متناسب با عادات غذایی مردم ایران صورت نگرفته است، توجه مقامات بهداشتی را به تأثیر فزاینده این آلاینده‌های مواد غذایی و نیاز روزافزون به بررسی سطوح آنها به‌طور پیوسته در مواد غذایی، آب و گیاهان برای تعیین دریافت مجاز روزانه، جلب می‌نماید.

اروپایی و برزیل و آمریکا  $5 \mu\text{g/kg}$  تعیین شده است، در حالی که برای فرآورده‌های غلات حداکثر حد مجاز  $\text{ng/g}$  ۳ تعیین شده است.

### نتیجه‌گیری

با برجسته شدن مفهوم توسعه انسانی در سطح جهان، مسأله امنیت و ایمنی غذایی که از دیرباز مطرح بوده ابعاد تازه‌ای به خود گرفته و تحت تأثیر فعالیت سازمان ملل مورد توجه خاص قرار گرفته است. با گسترش ارتباطات و پدیده جهانی شدن، نیاز به ارتباط در کشورمان نیز احساس می‌گردد. این ارتباطات تابع قوانینی است که برای تمام کشورها تدوین گردیده و نادیده گرفتن آن امکان‌پذیر نیست. روابط تجاری در آینده تابع قوانین وضع شده توسط سازمان تجارت جهانی (WHO) صورت خواهد گرفت و رعایت استانداردهای بین‌المللی در مورد کالاهای تجاری امری اجتناب‌ناپذیر است. از مقایسه نتایج این مطالعه با نتایج سایر مطالعه‌ها می‌توان نتیجه گرفت که در اقلام عمده مواد غذایی آلودگی بالقوه به قارچ و سم ناشی از آن وجود دارد و می‌بایست در هنگام برداشت کلیه اقلام تشکیل‌دهنده خوراک انسان، استانداردهای جهانی اعمال گردد تا زمان مصرف شرایط مناسبی برای

۱. تاتاری، ش.، et al., رد کامل سنجد و جودوسر در فرمولاسیون غلات صبحانه حجیم کارایی. *Journal of Food Science & Technology* (2008-8787), 2022. **19** (123).
۲. Krska, R., et al., *Mycotoxin analysis: An update*. Food additives and contaminants, 163–2008. **25**(2): p. 152
۳. Milani, J. and G. Maleki, *Effects of processing on mycotoxin stability in cereals*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2014. **94**(12): p. 2372-2375
۴. McKevith, B., *Nutritional aspects of cereals*. 142–Nutrition Bulletin, 2004. **29**(2): p. 111
۵. Pascale, M.N., *Detection methods for mycotoxins in cereal grains and cereal products*. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*, 2009 (117): p. 15-25
۶. Shanakhat, H., et al., *Current methods for mycotoxins analysis and innovative strategies for their reduction in cereals: An overview*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2018. **98**(11): p. 4003-4013
۷. Borbély, M., et al., *Mycotoxin contamination in cereals*. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 2010. **16**: p. 96-98
۸. Milani, J., *Ecological conditions affecting mycotoxin production in cereals: a review*. *Veterinarni Medicina*, 2013. **58** (8).
۹. Khaneghah, A.M., et al., *Mycotoxins in cereal-based products during 24 years (1983–2017): A global systematic review*. science & technology, 2019. Trends in food **91**: p. 95-105
۱۰. Khorshidi, M., et al., *The occurrence of aflatoxin M 1 in doogh, kefir, and kashk in Hamadan, Iran*. *Food Science and Technology*, 2022. **42**: p. e42022
۱۱. Smaoui, S., et al., *The control of Fusarium decontamination of produced growth and mycotoxins by lactic acid bacteria*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2023. **63**(32): p. 11125-11152
۱۲. Nourbakhsh, F. and E. Tajbakhsh, *Neurotoxicity mechanism of Ochratoxin A*. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 2021. **13**(2): p. 34-45
۱۳. Malir, F., et al., *Ochratoxin A: 50 years of research*. *Toxins*, 2016. **8**(7): p. 191
۱۴. Heussner, A.H. and L.E. Bingle, *Comparative ochratoxin toxicity: A review of the available data*. *Toxins*, 2015. **7**(10): p. 4253-4282
۱۵. El Khoury, A. and A. Atoui, *Ochratoxin A: General overview and actual molecular status*. *Toxins*, 2010. **2**(4): p. 461-493
۱۶. Pfohl-Leszkowicz, A. and R.A. Manderville, *Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans*. *Molecular nutrition & food research*, 2007. **51**(1): p. 61-99
۱۷. Amézqueta, S., et al., *Ochratoxin A decontamination: A review*. *Food control*, 2009. **20**(4): p. 326-333
۱۸. Ringot, D., et al., *Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update*.

- Chemico-biological interactions, 2006. **159**(1): p. 18-46
- Chain, E.P.o.C.i.t.F., et al., *Risk assessment of ochratoxin A in food*. EFSA journal, 2020. **18**(5): p. e06113
- Bui-Klimke, T.R. and F. Wu, *Ochratoxin A and human health risk: A review of the evidence*. Critical reviews in food science and nutrition, 2015. **55**(13): p. 1860-1869
- Clark, H.A. and S.M. Snedeker, *Ochratoxin A: its cancer risk and potential for exposure*. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B: Critical Reviews, 2006 **9**(3): p. 265-296
- Battaccone, G., A. Nudda, and G. Pulina, *Effects of ochratoxin A on livestock production*. Toxins, 2010. **2**(7): p. 1796-1824
- رحیمی, et al., میزان آلودگی اکراتوکسین A در برنج های عرضه شده در اصفهان. بهداشت مواد غذایی, ۲۰۱۲. **۲**(۱۵) (بهار): p. 11-17
- Swartz, M., *HPLC detectors: a brief review*. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2010. **33**(9-12): p. 1130-1150
- Kazakevich, Y.V. and R. Lobrutto, *HPLC for pharmaceutical scientists*. 2007: John Wiley & Sons
- Hallsworth, J.E. and N. Magan, *A rapid HPLC protocol for detection of polyols and trehalose*. Journal of microbiological methods, 1997. **29**(1): p. 7-13
- Adams, M., et al., *A protocol for HPLC-based activity profiling for natural products with activities against tropical parasites*. Natural Product Communications, 2009. **4**(10): p. 1934578X0900401013
- Dohnal, V., et al., *A comparison of ELISA and HPLC methods for determination of ochratoxin A in human blood serum in the Czech Republic*. Food and chemical toxicology, 2013. **62**: p. 427-431
- Luque, M.I., et al., *Development of a PCR protocol to detect ochratoxin A producing moulds in food products*. Food control, 2013. **29**(1): p. 270-278
- Mishra, R.K., et al., *Evaluation of extraction methods for ochratoxin A detection in cocoa beans employing HPLC*. Food Additives & Contaminants: Part A, 2016. **33**(3): p. 500-508
- Leitner, A., et al., *Comparison of methods for the determination of ochratoxin A in wine*. Analytica Chimica Acta, 2002. **453**(1): p. 41-33
- Raters, M. and R. Matissek, *Thermal stability of aflatoxin B 1 and ochratoxin A*. Mycotoxin research, 2008. **24**: p. 130-134
- Hadian, H., et al., *Occurrence of ochratoxin A in rice sold in chain stores in Tehran, 2007*. 2009
- Pier, A., *Major biological consequences of aflatoxicosis in animal production*. Journal of Animal Science, 1992. **70**(12): p. 3964-3967
- Villa, P. and P. Markaki, *Aflatoxin B1 and ochratoxin A in breakfast cereals from Athens market: Occurrence and risk assessment*. Food Control, 2009. **20**(5): p. 455-461
- Thompson, C. and S.E. Henke, *Effect of climate and type of storage container on aflatoxin production in corn and its*

associated risks to wildlife species. Journal of Wildlife Diseases, 2000. **36**(1): p. 172-179

Henke, S.E., et al., Survey of aflatoxin concentrations in wild bird seed purchased in Texas. Journal of Wildlife Diseases, 2001. **37**(4): p. 831-835

Shotwell, O.L., et al., Survey of 1975 wheat and soybeans for aflatoxin, zearalenone, and ochratoxin. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 1977. **60**(4): p. 778-783

Tabuc, C., et al., Molds and mycotoxin content of cereals in southeastern Romania. Journal of food protection, 2009. **72**(3): p. 662-665

Y.-B. Kim, Park, J.W., S.-H. Chung, and Ochratoxin A in Korean food commodities: occurrence and safety evaluation. Journal of agricultural and food chemistry, 2005. **53**(11): p. 4637-4642

آیدین, م.ت., et al., ارزیابی میزان اکراتوکسین A و آفلاتوکسین های (B1, B2, G1, G2) غلات عرضه شده در فروشگاه های شهر تهران به روش کروماتوگرافی با کارایی بالا در سال ۱۳۸۹. ۲۰۱۱.

**Abstract**

Mycotoxins or fungal toxins are organic compounds that occur at the end of the growth phase of some species of *Fusarium fungi*. spp. *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.* They are produced in hot and humid conditions. Out of about 400 types of mycotoxins, about 20 of them are considered a global threat to human and animal health. Ochratoxins are mycotoxins that are mainly produced by several species of *Aspergillus fungi* including *flavus*, *Parasiticus*, *Nomius*, *Eryzeus* and *Penicillium paberculum* and Ochratoxin by *Aspergillus ochraceus*. In the present research, the penetration rate of *Ochratoxin* toxins into cereals available in the stores of Isfahan city was investigated. 40 samples were randomly selected. After homogenization, they were placed in 3 stages of extraction, purification and determination of the amount of toxins (determination of the amount was done by comparing the area under the curve of individual samples and standards, including the dilution factor). According to the presence of aflatoxins-producing fungi and the controlling factors of these fungi in the production site, a positive correlation was seen between the decrease in the population of aflatoxins-producing fungi and the controlling factors with the decrease in the amount of aflatoxins. The potential of control agents can be used to prevent contamination of grains with aflatoxins.

**Keywords:** Ochratoxin, HPLC, *Aspergillus*, cereals.

## تغییرات فصلی کیفیت میکروبی شیرهای خام تولید شده در گاوداری های سنتی و صنعتی

محبوبه قاسمی<sup>۱</sup>، مجتبی بنیادیان<sup>۲\*</sup>، حمداله مشتاقی<sup>۲</sup>

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

۲- استاد گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

\*نویسنده مسئول: Boniadian@sku.ac.ir

### چکیده

در حال حاضر تازگی شیر در هنگام تحویل شیر به کارخانه ها مورد ارزیابی قرار می گیرد، ولی کیفیت میکروبی شیر ملاکی برای تحویل شیر نیست. مطالعه حاضر با هدف بررسی کیفیت میکروبی شیرهای خام تولیدی تحویل شده به کارخانجات فراورده های لبنی در استان چهارمحال و بختیاری در فصول مختلف سال و مقایسه کیفیت شیرهای خام تولیدی در دامداری های صنعتی و غیر صنعتی طراحی و اجرا گردید. در این مطالعه تعداد ۲۴۰ نمونه از شیرهای خام تحویلی به کارخانه ها در هر فصل ۶۰ نمونه اخذ و پس از انتقال به آزمایشگاه آزمون های میکروبی شامل: شمارش کلی باکتری های مزوفیل، مقاوم به گرما، سرماگرا، کلی فرم و کپک مخمر و اندازه گیری pH انجام شد. نتایج نشان داد که میانگین pH نمونه های شیر صنعتی و سنتی در تمام فصول در سطح استاندارد قرار داشتند، اگر چه مقدار pH شیرهای سنتی در تابستان و پاییز اختلاف آماری معنی داری با شیرهای صنعتی داشت. همچنین نتایج بیانگر این بود که تعداد میکروارگانیسم های شیرهای سنتی در همه گروه های میکروبی بیشتر از شیرهای صنعتی بود. تعداد باکتری های مزوفیل، سرماگرا، کلی فرم و کپک و مخمر در شیرهای سنتی در چهار فصل اختلاف معنی دار وجود داشت. در شیرهای صنعتی نیز به استثنای کپک و مخمر، در تعداد سایر گروه های باکتریایی در چهار فصل اختلاف معنی داری وجود داشت. بر اساس نتایج شیرهای خام تولید شده در سیستم صنعتی کیفیت مناسبتری نسبت به شیرهای سنتی دارا بودند ولی اغلب شیرهای خام تولیدی اعم از صنعتی و سنتی از کیفیت میکروبی مناسبی در همه فصول سال برخوردار نبودند.

**کلمات کلیدی:** شیر خام، کیفیت میکروبی، فصل، گاوداری سنتی، گاوداری صنعتی

## مقدمه

شیر ماده سفید رنگی است که از دوشش کامل گاو سالم پنج روز بعد از زایمان به دست می آید که باید حاوی حداقل ۸/۵٪ ماده خشک و ۳/۵٪ چربی باشد (Vahmni.,2003). گاو شیری در حدود ۶ هزار سال پیش اهلی شده است. شیر حیوانات در آغاز دوره اهلی کردن به عنوان غذا استفاده شده است (کریم، ۱۳۹۲). از آنجایی که تاریخچه استفاده از شیر حیوانات به عنوان غذا برای انسان به قبل از تاریخ مدون بر می گردد؛ بنابراین نمی توان تعیین کرد بشر چه زمانی از ترکیب شیر و خواص آن آگاه شده است؛ اما به یقین می توان گفت که انسان بعد از مدت کوتاهی که به خواص شیر به عنوان غذا پی برد، فرآورده های آن را تولید کرد (کریم، ۱۳۹۲).

شیر ماده منحصر به فردی است که به صورت مایع و با حداقل پردازش مورد استفاده قرار می گیرد. شیر دارای پروتئین با کیفیت بالا می باشد و به عنوان ماده اولیه برای تولید طیف وسیعی از محصولات مورد استفاده قرار می گیرد. برای تولید محصولات متنوع، شیر ممکن است تغلیظ شود، خشک شود، طعم دار شود، مقوی شود یا مواد معدنی آن گرفته شود یا اعمال دیگری بر روی آن انجام شود (Edward.,2013).

کیفیت اولیه شیر خام متأثر از عواملی همچون؛ تغذیه دام، سلامتی دام، ترکیب شیمیایی شیر و فعالیت میکروب های موجود در آن بوده که روی محصولات نهایی تأثیر گذار می باشد؛ بنابراین کیفیت شیر خام به مدت زمان و شرایط دمایی که شیر از تولید تا تحویل به کارخانه را طی می کند بستگی تمام دارد. عدم آشنایی دامداران با اصول بهداشتی تولید شیر و شیوه های صحیح نگهداری آن منجر به هدر رفتن سرمایه دامداران می شود (پاراحمدی، ۱۳۸۷).

فساد و آلودگی در زنجیره تولید شیر خام و عمل آوری آن در نتیجه شرایط بهداشتی نامناسب، حمل و نقل طولانی مدت و نبود امکانات مناسب برای ذخیره سازی شیر اتفاق می افتد. باکتری های مولد اسید لاکتیک و کلی - فرم ها فلور باکتریای متداول در شیر تازه را تشکیل می دهند. همچنین تعدادی از باکتری های موجود در شیر سرما گرا و سرما دوست<sup>۲</sup>، بعضی مقاوم به حرارت<sup>۴</sup> و بعضی گرما دوست هستند. وجود این طیف وسیع از باکتری ها در شیر موجب می شود تا شیر به فساد مستعد شود (آقازده مشگی، ۱۳۸۶).

کیفیت شیر خام و محصولات لبنی به میزان زیادی به نگهداری مناسب شیر خام از مزرعه تا کارخانه بستگی دارد. همچنین نگهداری طولانی مدت شیر خام در دمای یخچال موجب رشد باکتری های سرما گرا در شیر شده که برخی از آنها آنزیم های لیپاز و پروتئاز مقاوم به حرارت تولید می کنند که موجب بروز فساد آنزیمی در فرآورده های شیر می شوند (آقازده مشگی، ۱۳۸۶). بر این اساس روش های پایش کیفیت میکروبی شیر خام ارزیابی شیر از نظر حضور گروه های متعدد باکتری ها است (عزت پناه، ۱۳۸۵).

کیفیت میکروبی شیر خام نه تنها از نظر بهداشت مصرف کننده دارای اهمیت است بلکه نقش مهمی در کیفیت سایر فرآورده های لبنی داشته و در نهایت می تواند منجر به تولید فرآورده ای سالم و با کیفیت برای مصرف کننده شده و سلامت غذایی جامعه را تامین نماید (ذوالفقاری، ۱۳۹۱).

بر این اساس و همچنین درخواست ارگانهای نظارتی (سازمان دامپزشکی و اداره غذا و دارو) برای بررسی کیفیت شیر خام تولیدی در استان، این پژوهش طراحی شد تا کیفیت میکروبی شیر خام شامل: تعداد کل باکتری ها، کلی فرم ها، باکتری های مولد اسید

<sup>4</sup> Thermotrophic<sup>3</sup> Psychrotroph & Psychrophil

(ایربسکو - زیست کاوش ایرانیان) مطابق دستورالعمل کارخانه سازنده تهیه، به مدت 15 دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس اتوکلاو شد. مقدار یک میلی لیتر از دو رقت آخر را در درون پلیت ها انتقال داده و حدود ۱۵ میلی لیتر از محیط کشت پلیت کانت آگار را که تا  $5 \pm 45$  درجه سانتی گراد سرد شده، از رقت های  $10^{-4}$  و  $10^{-5}$  به میزان یک میلی لیتر درون پلیت ها ریخته، کشت به صورت پور پلیت انجام شد. محتوای پلیت به آرامی و به خوبی مخلوط شد. پس از جامد شدن پلیت ها به مدت ۲۴-۷۲ ساعت و  $1 \pm 31$  درجه سلسیوس گرم خانه گذاری شد.

پلیت های دارای 300-30 پرگنه برای شمارش انتخاب شده و تعداد پرگنه ها در آزمایش بر حسب میانگین دو رقت متوالی با استفاده از فرمول شماره  $\frac{\sum C}{v \cdot 1.1 + d}$  محاسبه گردید. که در آن  $\sum C$  مجموع کلنی های شمارش شده روی دو پلیت از دو رقت متوالی که حداقل یکی از پلیت ها حداقل ۱۰ کلنی داشته باشد.  $V$  حجم تلقیح شده در هر پلیت بر حسب میلی لیتر؛  $d$  رقت معادل با اولین رقت شمارش شد (استاندارد ملی ۱۱۸۰۴).

برای شمارش کپک و مخمر محیط پوتیتو دکستروز آگار<sup>۱</sup> (ایربسکو - زیست کاوش ایرانیان) مطابق دستور شرکت سازنده تهیه و پس از ساخته شدن در ظروف پتری دیش ریخته شد. و سپس از رقت های  $10^{-1}$  و  $10^{-2}$  کشت سطحی انجام گرفت. و به مدت ۵ روز دمای ۲۵ درجه قرار گرفت. و سپس تعداد کلنی شمارش و ثبت گردید (استاندارد ملی ۱۰۱۵۴). به منظور شمارش باکتری های کلی فرم محیط کشت وایولت رد بایل لاکتوز آگار<sup>۲</sup> (ایربسکو - زیست کاوش ایرانیان) مطابق با دستور شرکت سازنده تهیه شد. سپس

لاکتیک، باکتری های سرماگرا و باکتری های گرمادوست مورد ارزیابی قرار گرفته و نتایج آن در اختیار سازمان های ذیربط قرار داده تا با اعمال مدیریت صحیح نسبت به بهبود کیفیت شیر خام تولیدی در استان اقدام لازم صورت پذیرد.

## مواد و روش کار

### -جمع آوری نمونه

۱۲۰ نمونه شیر خام به طور تصادفی در ۱۲ ماه سال و فواصل منظم زمانی، از تانکرهای شیر خام تولید شده در استان چهارمحال و بختیاری، در هنگام تحویل به کارخانه های شیر استان در فصول مختلف (بهار، پاییز، زمستان و تابستان) در شرایط استریل اخذ و در مجاورت یخ به آزمایشگاه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی دانشگاه شهرکرد منتقل شد.

### -اندازه گیری pH

به منظور اندازه گیری pH متر الکتریکی (شرکت کانسورت بلژیک) به وسیله محلول بافر با دمای مناسب (۲۰ درجه سلسیوس) مطابق استاندارد ملی ایران تنظیم شد. نمونه شیر داخل بشر ۵۰ میلی لیتری ریخته شد و الکتروود داخل نمونه همگن شده قرار گرفت و پس از ۴۵ ثانیه pH یادداشت شد (کریم، ۱۳۹۲).

-آزمونهای میکروبی برای ارزیابی کیفیت میکروبی شیر خام آزمون های استاندارد شامل شمارش کلی باکتری های مزوفیل ۵ هوازی، شمارش کلی فرم، شمارش باکتری های سرماگرا، شمارش باکتری های مقاوم به گرما، شمارش کپک و مخمر انجام شد.

به منظور شمارش کلی باکتری های مزوفیل (Total count) محیط کشت پلیت کانت آگار ۱۰

<sup>9</sup> mold and yeast

<sup>1</sup> Plate Count Agar (PCA) 0

<sup>1</sup> Potato Dextrose Agar (PDA) 1

<sup>1</sup> Violet Red Bile Agar (VRBA) 2

<sup>5</sup> Mesophile

<sup>6</sup> coliform

<sup>7</sup> Sacrophile

<sup>8</sup> Thermoduric

آگار را که تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد سرد شده، از رقت‌های  $10^{-3}$  و  $10^{-4}$  به میزان یک میلی‌لیتر درون پلیت‌ها ریخته، کشت به صورت مخلوط انجام شد. محتوای پلیت به آرامی و به خوبی مخلوط شد و پس از جامد شدن پلیت‌ها به مدت یک هفته و در دمای ۷ درجه سلسیوس در یخچال نگهداری شدند (سعیدی اصل، ۱۳۸۸).

#### تجزیه و تحلیل نتایج:

نتایج بدست آمده از آزمون‌ها توسط نرم افزار Sigma stst 4 و آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) در سطح معنی داری  $P < 0.05$  مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

#### نتایج

##### -بهار

بر اساس نتایج مطالعه حاضر میانگین pH برای کل نمونه های بررسی شده در فصل بهار در محدوده استاندارد قرار داشت. بررسی‌های آماری نتایج نشان داد اختلاف معنی داری بین pH شیرهای سنتی و صنعتی وجود نداشت. بر اساس نتایج آزمون‌های میکروبی میانگین باکتری‌های مزوفیل برای کل نمونه‌های شیرهای سنتی در محدوده استاندارد قرار نداشت و برای شیرهای صنعتی در محدوده شیرهای درجه ۲ قرار گرفت. آزمون آماری نشان داد اختلاف معنی داری در ارتباط با باکتری‌های مزوفیل، سرماگرا، مقاوم به گرما، کلی فرم و کپک و مخمر در بین شیرهای صنعتی و سنتی در فصل بهار وجود داشت ( $P < 0.05$ ). (جدول ۱)

از رقت‌های  $10^{-3}$  و  $10^{-4}$  به میزان یک میلی لیتر درون پلیت ها ریخته، کشت به صورت مخلوط انجام شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری شد. کلنی‌های قرمز ارغوانی با قطر ۵/ میلی لیتر یا بزرگتر با هاله از رسوب املاح صفراوی احتمالاً کلی‌فرم هستند. برای تایید، تعدادی از کلنی‌های انتخاب شده، به لوله‌های محتوی کشت آبگوشت سبز درخشان منتقل و پس از ۲۴ تا ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس از نظر تولید گاز بررسی شدند. کلنی‌هایی که گاز تولید کرده اند، کلی‌فرم هستند (استاندارد ملی ۱۱۱۶۶).

برای شمارش باکتری‌های گرمادوست محیط کشت پلیت کانت آگار (Plate Count Agar (PCA) (ایربسکو - زیست کاوش ایرانیان) مطابق دستورالعمل کارخانه سازنده تهیه، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو شد. شیر را در دمای ۶۳ درجه سانتیگراد برای مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه بن ماری پاستوریزه می کنیم. مقدار یک میلی‌لیتر از دو رقت آخر را در درون پلیت‌ها انتقال داده و حدود ۱۵ میلی لیتر از محیط کشت پلیت کانت آگار را که تا  $5 \pm 45$  درجه سانتی‌گراد سرد شده، از رقت‌های  $10^{-3}$  و  $10^{-4}$  به میزان یک میلی‌لیتر درون پلیت ها ریخته، کشت به صورت پور پلیت انجام شد. محتوای پلیت به آرامی و به خوبی مخلوط شد. پس از جامد شدن محیط کشت، به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت و ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شد (سعیدی اصل، ۱۳۸۸).

به منظور شمارش باکتری‌های سرماگرا محیط کشت پلیت کانت آگار (ایربسکو - زیست کاوش ایرانیان) مطابق دستورالعمل کارخانه سازنده تهیه، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس اتوکلاو شد. مقدار یک میلی‌لیتر از دو رقت آخر را در درون پلیت‌ها انتقال داده و حدود ۱۵ میلی لیتر از محیط کشت پلیت کانت

جدول ۱: کیفیت میکروبی شیرهای دامداری‌های سنتی و صنعتی در فصل بهار

| Mold & Yeast                                       | Coliform                                           | Thermotolerant                                     | Psychrotroph                                       | Mesophile                                          | pH                | نوع شیر |
|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|-------------------|---------|
| $5.5 \times 10^3 \pm 4.4 \times 10^2$ <sup>a</sup> | $9.5 \times 10^3 \pm 9 \times 10^2$ <sup>a</sup>   | $8.5 \times 10^4 \pm 1.9 \times 10^3$ <sup>a</sup> | $4.2 \times 10^4 \pm 3.4 \times 10^3$ <sup>a</sup> | $2.4 \times 10^5 \pm 3 \times 10^4$ <sup>a</sup>   | 6.7 <sup>a</sup>  | صنعتی   |
| $1.4 \times 10^4 \pm 2.1 \times 10^3$ <sup>b</sup> | $4.1 \times 10^5 \pm 9.1 \times 10^4$ <sup>b</sup> | $1.4 \times 10^6 \pm 1.8 \times 10^5$ <sup>b</sup> | $8 \times 10^6 \pm 9 \times 10^5$ <sup>b</sup>     | $1.2 \times 10^7 \pm 1.2 \times 10^6$ <sup>b</sup> | 6.65 <sup>a</sup> | سنتی    |

حروف غیر مشابه در هر ستون نشانگر وجود اختلاف آماری معنی دار است ( $P < 0.05$ )

همچنین نتایج بدست آمده از آزمون‌های میکروبی نشان داد اختلاف معنی دار در ارتباط با باکتری‌های مزوفیل، سرماگرا، مقاوم به گرما، کلی‌فرم و کپک و مخمر در بین شیرهای صنعتی و سنتی در فصل تابستان وجود داشت ( $P < 0.05$ ). (جدول ۲)

-تابستان

میانگین pH برای نمونه‌های شیرهای صنعتی در فصل تابستان در محدوده استاندارد قرار داشت، ولی برای شیرهای سنتی میانگین pH کمی کمتر از حد استاندارد بود. بررسی‌های آماری نتایج بدست آمده نشان داد اختلاف معنی داری بین pH شیرهای صنعتی و سنتی در فصل تابستان وجود داشت ( $P < 0.05$ ). (جدول ۲)

جدول ۲: کیفیت میکروبی شیرهای دامداری‌های سنتی و صنعتی در فصل تابستان

| Mold & Yeast                                       | Coliform                                           | Thermotolerant                                     | Psychrotroph                                       | Mesophile                                          | pH                | نوع شیر |
|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|-------------------|---------|
| $2.1 \times 10^3 \pm 1.8 \times 10^2$ <sup>a</sup> | $6.6 \times 10^4 \pm 5 \times 10^3$ <sup>a</sup>   | $1.7 \times 10^5 \pm 3.2 \times 10^4$ <sup>a</sup> | $9.6 \times 10^5 \pm 9.4 \times 10^4$ <sup>a</sup> | $1.7 \times 10^6 \pm 1.9 \times 10^5$ <sup>a</sup> | 6.68 <sup>a</sup> | صنعتی   |
| $4.9 \times 10^3 \pm 4.3 \times 10^2$ <sup>a</sup> | $1.2 \times 10^6 \pm 1.8 \times 10^5$ <sup>b</sup> | $2.3 \times 10^6 \pm 2.1 \times 10^5$ <sup>b</sup> | $1.1 \times 10^7 \pm 1.1 \times 10^6$ <sup>b</sup> | $2 \times 10^7 \pm 1.9 \times 10^6$ <sup>b</sup>   | 6.56 <sup>b</sup> | سنتی    |

حروف غیر مشابه در هر ستون نشانگر وجود اختلاف آماری معنی دار است ( $P < 0.05$ )

- پاییز

بر اساس نتایج مطالعه حاضر میانگین pH برای کل نمونه‌های بررسی شده در فصل پاییز در محدوده استاندارد قرار داشت. بررسی‌های آماری نتایج نشان داد اختلاف معنی داری بین pH شیرهای صنعتی و سنتی در فصل پاییز وجود داشت ( $P < 0.05$ ). بررسی‌های آماری نتایج بدست آمده از آزمون‌های میکروبی نشان داد اختلاف معنی‌داری در ارتباط با باکتری‌های مزوفیل، سرماگرا، مقاوم به گرما، کلی فرم و کپک و مخمر در بین شیرهای صنعتی و سنتی در فصل پاییز وجود داشت ( $P < 0.05$ ). (جدول ۳)

جدول ۳: کیفیت میکروبی شیرهای دامداری‌های سنتی و صنعتی در فصل پاییز

| نوع شیر | pH                | Mesophile                             | Psychrotroph                          | Thermoturic                           | Coliform                              | Mold & Yeast                          |
|---------|-------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| صنعتی   | 6.67 <sup>a</sup> | $1.8 \times 10^6 \pm 2.6 \times 10^5$ | $9.3 \times 10^5 \pm 1.4 \times 10^4$ | $3.8 \times 10^5 \pm 5.4 \times 10^4$ | $2.3 \times 10^4 \pm 1.8 \times 10^3$ | $3.3 \times 10^3 \pm 1.9 \times 10^2$ |
| سنتی    | 6.6 <sup>b</sup>  | $1 \times 10^7 \pm 1.1 \times 10^6$   | $4.4 \times 10^6 \pm 4.4 \times 10^5$ | $1.7 \times 10^6 \pm 1.3 \times 10^5$ | $1.6 \times 10^5 \pm 2.2 \times 10^4$ | $3.8 \times 10^3 \pm 2.3 \times 10^2$ |

حروف غیر مشابه در هر ستون نشانگر وجود اختلاف آماری معنی دار است ( $P < 0.05$ )

-زمستان

بر اساس نتایج مطالعه حاضر میانگین pH برای کل نمونه‌های بررسی شده در فصل زمستان در محدوده استاندارد قرار داشت. بررسی‌های آماری نتایج نشان داد اختلاف معنی داری بین pH شیرهای صنعتی و سنتی در فصل پاییز وجود نداشت. همچنین نتایج بدست آمده از آزمون‌های میکروبی نشان داد اختلاف معنی داری در ارتباط با باکتری‌های مزوفیل، سرماگرا، مقاوم به گرما، کلی فرم و کپک و مخمر در بین شیرهای صنعتی و سنتی در فصل پاییز وجود داشت ( $P < 0.05$ ).

جدول ۴: کیفیت میکروبی شیرهای دامداری‌های سنتی و صنعتی در فصل زمستان

| نوع شیر | pH                | Mesophile                                          | Psychrotroph                                       | Thermotolerant                                     | Coliform                                           | Mold & Yeast                                       |
|---------|-------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| صنعتی   | 6.7 <sup>a</sup>  | $7.1 \times 10^5 \pm 1.3 \times 10^4$ <sup>a</sup> | $4 \times 10^5 \pm 7.2 \times 10^4$ <sup>a</sup>   | $2.2 \times 10^5 \pm 5.3 \times 10^4$ <sup>a</sup> | $5.8 \times 10^4 \pm 4.5 \times 10^3$ <sup>a</sup> | $3.7 \times 10^3 \pm 2.1 \times 10^2$ <sup>a</sup> |
| سنتی    | 6.64 <sup>a</sup> | $1.9 \times 10^7 \pm 1.9 \times 10^6$ <sup>b</sup> | $1.1 \times 10^7 \pm 1.1 \times 10^6$ <sup>b</sup> | $3.5 \times 10^6 \pm 5.2 \times 10^5$ <sup>b</sup> | $5.2 \times 10^5 \pm 1.1 \times 10^4$ <sup>b</sup> | $4 \times 10^3 \pm 2.2 \times 10^2$ <sup>b</sup>   |

حروف غیر مشابه در هر ستون نشانگر وجود اختلاف آماری معنی دار است ( $P < 0.05$ )

- مقایسه کیفیت میکروبی شیرهای سنتی و صنعتی در فصول مختلف

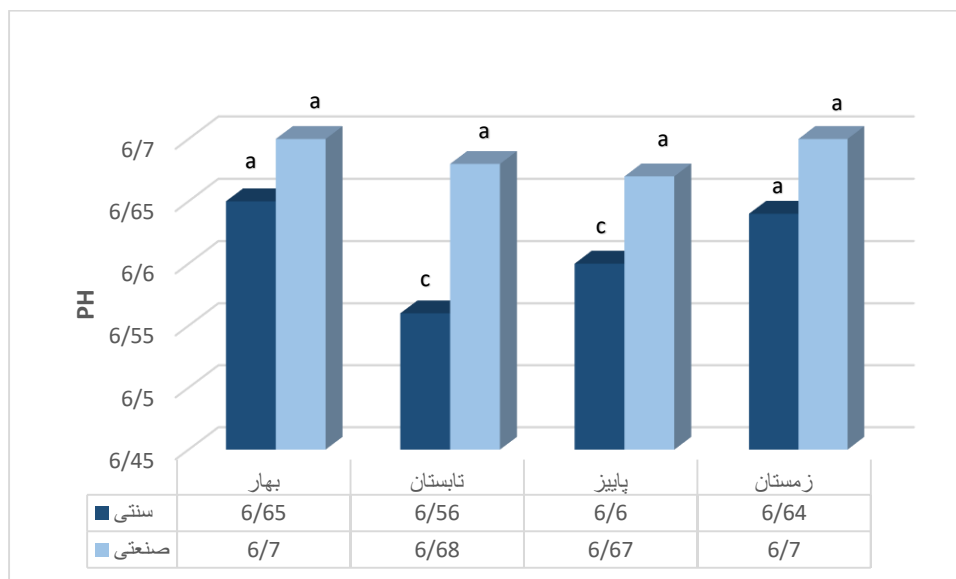
نتایج بدست آمده در طی چهار فصل روی شیرهای سنتی نشان داد pH در فصول تابستان و پاییز با سایر فصل‌ها اختلاف معنی دار داشته و کمتر از سایر فصول است ( $P < 0.05$ ). بیشترین و کمترین مقدار pH بین شیرهای سنتی به ترتیب در فصول بهار و تابستان مشاهده شد. (نمودار ۱) ولی نتایج بدست آمده از مقادیر pH شیرهای صنعتی نشان داد که مقادیر pH در فصول

مختلف اختلاف آماری معنی داری وجود ندارد. بیشترین مقدار pH ثبت شده در فصل بهار و زمستان و کمترین pH در فصل‌های تابستان و پاییز ثبت شد. (نمودار ۱) نتایج آزمون‌های میکروبی در چهار فصل روی شیرهای سنتی نشان داد در فصل بهار و تابستان تعداد باکتری-های مزوفیل بطور معنی دار بیشتر از پاییز و زمستان بود ( $P < 0.05$ ). بیشترین و کمترین تعداد باکتری‌های مزوفیل به ترتیب در فصل تابستان و پاییز ثبت شد. این نتایج برای باکتری‌های سرماگرا نشان داد که تعداد این

( $P < 0.05$ )، بیشترین و کمترین تعداد کپک و مخمر به ترتیب در فصول بهار و پاییز ثبت شد. (نمودار ۲ تا ۶)

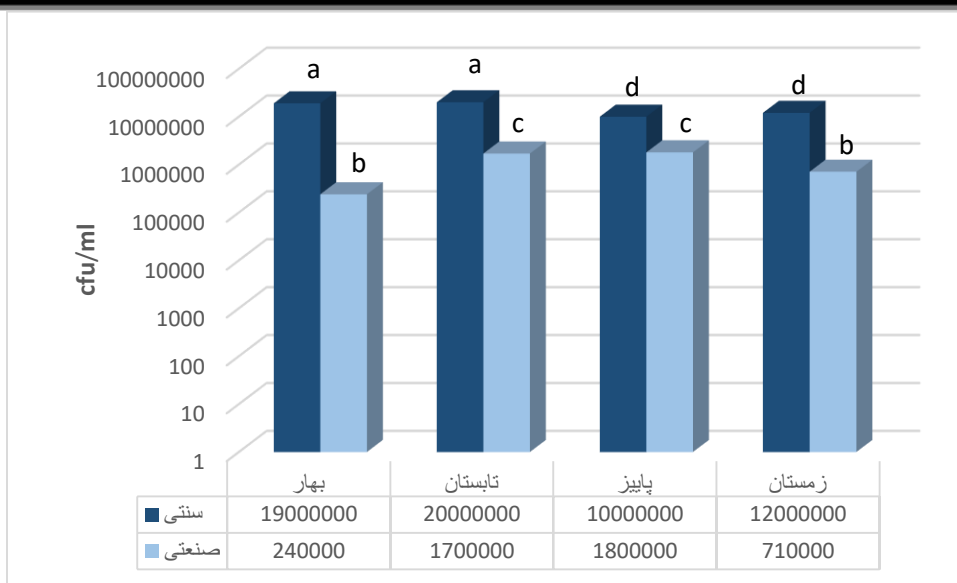
نتایج آزمون‌های میکروبی روی شیرهای صنعتی و تجزیه و تحلیل نتایج نشان داد که در تعداد باکتری‌های مزوفیل، سرماگرا، مقاوم به گرما و کلی‌فرم شیرهای فصل بهار و زمستان با شیرهای تابستان و پاییز اختلاف معنی‌داری وجود داشت ( $P < 0.05$ )، ولی تعداد کپک و مخمر در شیرهای صنعتی در فصول بهار و تابستان با فصول دیگر اختلاف آماری معنی‌دار داشت ( $P < 0.05$ ). (نمودار ۲ تا ۶)

باکتری‌ها در فصول بهار و پاییز با فصول تابستان و زمستان اختلاف معنی‌داری وجود داشت ( $P < 0.05$ ). بیشترین و کمترین تعداد باکتری سرماگرا در فصل تابستان و پاییز ثبت شد. ولی در تعداد باکتری‌های مقاوم به گرما در شیرهای سنتی در فصول مختلف سال اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نشد. همچنین تعداد باکتری‌های کلی‌فرم شیرهای سنتی در فصل تابستان با سایر فصول بطور معنی‌داری بیشتر از فصول دیگر بود ( $P < 0.05$ )، بیشترین و کمترین تعداد باکتری کلی‌فرم در شیرهای سنتی به ترتیب در فصول تابستان و پاییز ثبت شد. در تعداد کپک و مخمر در شیرهای سنتی در فصل بهار با فصول دیگر اختلاف معنی‌دار مشاهده شد



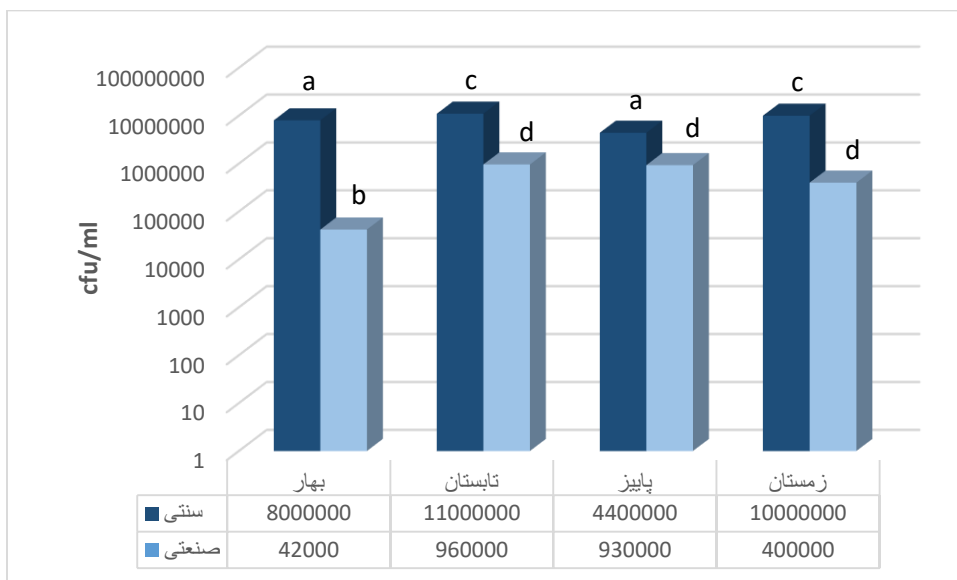
نمودار ۱: مقایسه pH شیرهای سنتی و صنعتی در فصول مختلف

حروف غیر مشابه نشانگر وجود اختلاف آماری معنی‌دار است ( $P < 0.05$ )



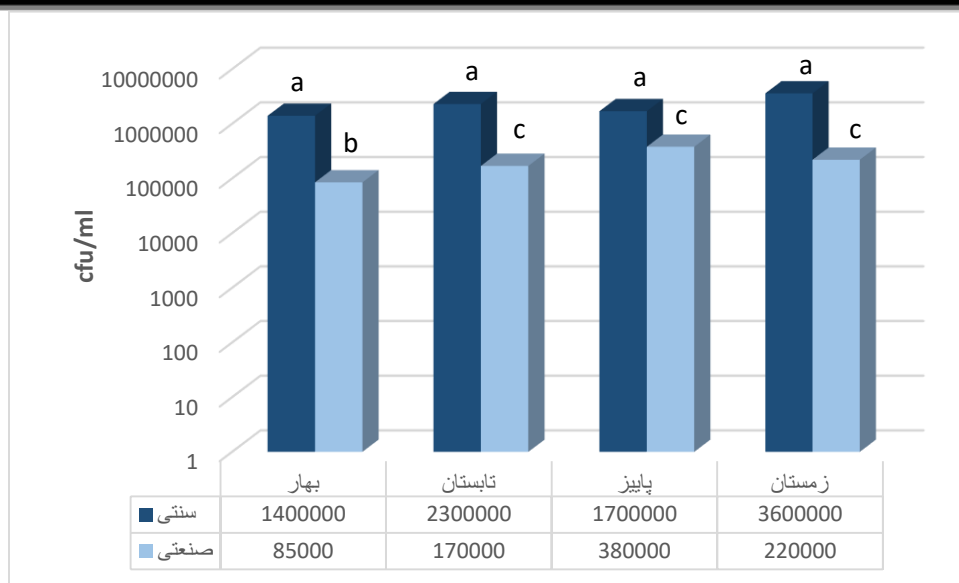
نمودار ۲: مقایسه تعداد باکتری‌های مزوفیل در شیرهای سنّتی و صنعتی در فصول مختلف

حروف غیر مشابه نشانگر وجود اختلاف آماری معنی دار است ( $P < 0.05$ )



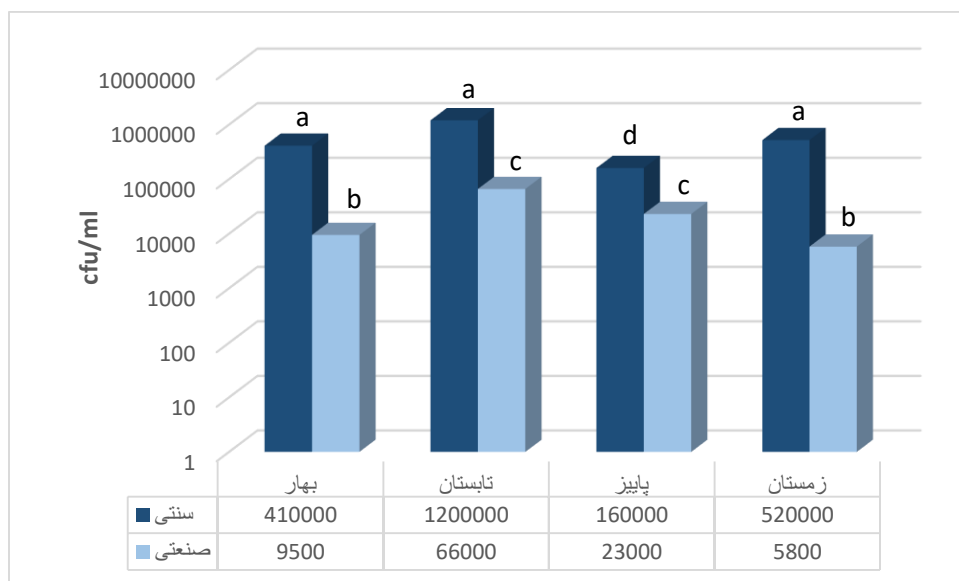
نمودار ۳: مقایسه تعداد باکتری‌های سرماگرا در شیرهای سنّتی و صنعتی در فصول مختلف

حروف غیر مشابه نشانگر وجود اختلاف آماری معنی دار است ( $P < 0.05$ )



نمودار ۴: مقایسه تعداد باکتری‌های مقاوم به گرما در شیرهای سنّتی و صنعتی در فصول مختلف

حروف غیر مشابه نشانگر وجود اختلاف آماری معنی دار است ( $P < 0.05$ )



نمودار ۵: مقایسه تعداد باکتری‌های کلی‌فرم در شیرهای سنّتی و صنعتی در فصول مختلف

حروف غیر مشابه نشانگر وجود اختلاف آماری معنی دار است ( $P < 0.05$ )



نمودار ۶: مقایسه تعداد کپک و مخمر در شیرهای سنتی و صنعتی در فصول مختلف

حروف غیر مشابه نشانگر وجود اختلاف آماری معنی دار است ( $P < 0.05$ )

### بحث و نتیجه گیری

نتایج حاصل از آزمایش pH شیرهای خام نشان داد که میانگین کل بدست آمده برای pH نمونه ها به استثنای شیرهای سنتی در فصل تابستان، در محدوده استاندارد (بین ۶/۷-۶/۶) قرار داشت (استاندارد ملی ۱۶۴). همچنین نتایج بیانگر این بود که کمترین مقدار pH در فصل تابستان و بالاترین مربوط به فصل زمستان بود. گرمای هوا در تابستان و خنک نکردن سریع شیر خام عامل مهم در افزایش رشد باکتری‌های تخمیر کننده قند لاکتوز و تولید اسید لاکتیک در شیر است. در مطالعه خسروی و غزنوی در سال ۱۳۸۷ بر روی شیر خام منطقه کاشمر انجام شد، میانگین pH در زمستان نسبت به سایر فصول به طور معنی داری بالاتر و در فصل تابستان پایین تر بود (خسروی، ۱۳۸۷). همچنین در مطالعه‌ای که هاشمی در سال ۱۳۸۰ بر روی pH شیر خام استان فارس انجام داد اختلاف معنی داری بین pH فصول

مختلف گزارش کرد، بطوریکه بیشترین میانگین را برای فصل زمستان و کمترین را در فصل تابستان گزارش کرد (هاشمی، ۱۳۸۰). ولی در مطالعه انجام شده در استان وان ترکیه میزان pH شیر در فصول مختلف تغییر معنی داری نداشت. میانگین pH در این مطالعه  $6/5 \pm 0/33$  گزارش شد (Ozrenk., 2008) که این میزان کمتر از میانگین به دست آمده برای pH در مطالعه حاضر است. pH بالاتر از عدد ۶/۸ معمولاً نشان دهنده ورم پستان و پایین تر از عدد ۶/۵ نشان دهنده وجود کلستروم یا فساد باکتریایی می باشد (هاشمی، ۱۳۸۰).

مقایسه کیفیت میکروبی مزوفیل شیرهای سنتی و صنعتی در فصول مختلف سال نشان داد که تعداد باکتری‌های مزوفیل در شیرهای سنتی بیشتر از صنعتی بود. مطابق استاندارد ملی ایران، شیر خام بر اساس میزان تعداد کل باکتری‌های مزوفیل در هر میلی لیتر به چهار دسته تقسیم شده است (عزت پناه، ۱۳۸۵)، شیر

بار میکروبی در دی ماه و بیشترین بار میکروبی در مرداد ماه بوده است. همچنین کاهش بار میکروبی از شهریور ماه شروع و در دی و بهمن به کمترین میزان می رسید (یاراحمدی، ۱۳۸۵).

خسروی و غزنوی در سال ۱۳۸۷، در ارزیابی بار میکروبی و pH شیر خام دامداری های سنتی در فصول و مختلف به این نتیجه رسیدند که شمارش میکروبی کل در مرحله ماشین شیر دوشی، بیدون در مرکز جمع آوری شیر و مخزن مرکز جمع آوری نسبت به مراحل قبل دارای افزایش معنی داری بود. بار میکروبی شیر خام و pH فصل تابستان نسبت به زمستان افزایش معنی داری داشت (خسروی، ۱۳۸۷).

Salari و همکاران در سال ۲۰۰۷ ادغام به مطالعه آلودگی میکروبی شیر و فرآورده های آن در استان یزد نمودند. نتایج این تحقیق نشان داد که میانگین شمارش تعداد کلی باکتری ها در نمونه های شیر  $35 \times 10^4$  پرگنه در هر میلی لیتر بود که  $8/3$  درصد از نمونه ها دارای آلودگی بیشتر از حد مجاز بودند (Salari.,2007).

Holm و همکاران در سال ۲۰۰۴ در بررسی میکروبیولوژی ۵۹۲۳ نمونه شیر خام جمع آوری شده از ۷۵ مخزن جمع آوری شیر در دانمارک میانگین شمارش میکروبی این نمونه ها را  $3 \times 10^4$  کلنی در هر میلی لیتر گزارش کردند (Holm.,2004).

بر اساس نتایج مطالعه حاضر تعداد باکتری های سرمادوست در شیرهای صنعتی بطور معنی داری از شیرهای سنتی در تمام فصول کمتر بود. حد مجاز استاندارد برای باکتری های سرمادوست در شیر خام  $5 \times 10^4$  می باشد (موسوی، ۱۳۹۷)، ولی نتایج نشان داد که میانگین باکتری های سرمادوست در شیرهای سنتی و صنعتی در چهار فصل بیشتر از محدوده

درجه ۱ حداکثر دارای  $1 \times 10^5$  باکتری در هر میلی لیتر، شیر درجه ۲  $1 \times 10^5$  تا  $5 \times 10^5$ ، شیر درجه ۳  $5 \times 10^5$  تا  $1 \times 10^6$  و شیر درجه ۴ حداکثر تا  $5 \times 10^6$  تعیین شده است (خسروی، ۱۳۸۷). در مطالعه حاضر میانگین شمارش باکتری های مزوفیل در فصل بهار در شیرهای صنعتی  $2/4 \times 10^5$  cfu/ml بود که این میزان در محدوده استاندارد و جزء شیرهای درجه ۱ قرار داشت. در فصل تابستان و پاییز میانگین شمارش باکتری های مزوفیل به ترتیب  $1/$  cfu/ml و  $7 \times 10^6$  و  $1/8 \times 10^6$  بود که این میزان در محدوده شیرهای درجه ۴ قرار گرفت. میانگین شمارش باکتری های مزوفیل در فصل زمستان  $7/1 \times$  cfu/ml بود که این میزان در محدوده شیرهای درجه ۳ قرار داشت. میانگین شمارش باکتری های مزوفیل در شیرهای سنتی در چهار فصل خارج از محدوده استاندارد قرار داشت.

در مطالعه ای دیگر Tasew و همکاران در سال ۲۰۱۰ که با هدف بررسی کیفیت میکروبی شیر خام در دیرزوری و ناحیه Meche در اتیوپی انجام شد، نتایج نشان داد که کیفیت میکروبی شیر تولید شده توسط دامداران سنتی ضعیف است که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد (Tasew, 2010). همچنین Maha Alaoui Ismaili و همکاران در سال ۲۰۱۶ در مراکش بر روی شیر خام شتر انجام داده و نتایج به وضوح نشان داد که شرایط بهداشتی در تولید شیر رعایت نشده و این شیرها بار میکروبی بالایی داشتند (Alaoui.,2019).

در مطالعه ای دیگر که توسط یار احمدی و همکاران در سال ۱۳۸۷ در بررسی بار میکروبی کل شیر خام از مرحله دوشش تا تحویل به کارخانه در استان لرستان، به این نتیجه رسیدند که اثر ماه های مختلف سال، مراحل مختلف نمونه گیری از شیر، نتایج نشان داد که کمترین

ورود آن پرداخت و نتایج نشان داد میانگین باکتری‌های سرمادوست  $CFU/ml$   $8/9 \times 10^5$  می‌باشد (میرزایی، ۱۳۹۴).

در مطالعه‌ای رضاپور و همکاران در سال ۱۳۹۶ به بررسی میزان آلودگی شیرهای خام تبریز به باکتری سرمادوست پرداختند که نتایج نشان داد از بین ۸۰ نمونه مختلف، ۲۶/۲۵ درصد آلوده به باکتری‌های سرمادوست بودند (رضاپور، ۱۳۹۷).

یاسینی در بررسی کیفیت میکروبیولوژی شیر تولیدی استان یزد در طی گزارشی بین شمارش کلی میکروبی، کلی‌فرم‌ها و باکتری‌های سرماگرا در ماه‌های تیر و شهریور تفاوت معنی‌داری در گاو‌داری‌های صنعتی و سنتی مشاهده نکرد (Yasini, 1997).

نتایج یاراحمدی و همکاران در سال ۱۳۸۵ در بررسی آلودگی بار میکروبی شیرخام تحویلی به کارخانه در استان لرستان نشان داد که تمام نمونه‌های شیرخام ارزیابی شده دارای میکروارگانیسم‌های مزوفیلی و سایکروفیلی بوده و تعداد کلی‌فرم‌ها در شیر خام میزان بالایی را نشان می‌دهد (یاراحمدی، ۱۳۸۵).

مقایسه تعداد باکتری‌های گرمادوست در شیرهای صنعتی و سنتی نشان داد که تعداد باکتری‌های گرمادوست نیز در شیرهای سنتی در تمام فصول از شیرهای صنعتی بطور معنی‌داری بیشتر بود. حد مجاز استاندارد برای میانگین شمارش باکتری‌های گرمادوست  $10^2$  در میلی لیتر می‌باشد (موسوی، ۱۳۹۷). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میانگین تعداد باکتری‌های گرمادوست در شیرهای صنعتی و سنتی از حد مجاز تعیین شده برای این گروه از باکتری‌ها بیشتر بود. عدم شستشوی مناسب دستگاه‌های شیردوشی و مخازن نگهداری شیر و تولید بیوفیلم و سنگ شیر در این تجهیزات از جمله دلایل بالا بودن تعداد باکتری‌های

استاندارد بود. عدم رعایت بهداشت شیر دوشی و خنک نکردن سریع شیر پس از دوشش در شیرهای سنتی، و همچنین نگهداری شیر در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت طولانی در شیرهای صنعتی از جمله دلایل بالا بودن تعداد باکتری‌های سرمادوست در شیرهای خام است. باکتری‌های سرمادوست با تولید آنزیم‌های خارج سلولی مختلف باعث تجزیه ترکیبات شیر از جمله پروتئین و چربی شده و کاهش کیفیت شیر و فرآورده‌های آن را به دنبال خواهد داشت. در مطالعه‌ای فلاح راد و همکاران در سال ۲۰۰۷ در مشهد به بررسی میزان بار کلی میکروبی (TBC) و کل باکتری‌های سرمادوست (PBC) در شیر خام تولیدی و همچنین اثر این باکتری‌ها در روند تغییرات بعضی از ترکیبات غذایی شیر پاستوریزه پرداخت. نتایج نشان داد که میانگین تعداد باکتری‌های سرمادوست  $CFU/ml$   $3/9 \times 10^5$  و میانگین تعداد کل باکتری‌ها  $CFU/ml$   $1/6 \times 10^6$  بود که نشان دهنده آلودگی باکتریائی زیاد در شیر خام تحویلی به کارخانه‌های فرآورده‌های لبنی مشهد است (فلاح راد، ۲۰۰۷).

در مطالعه دیگر آقازاده مشگی در سال ۱۳۸۶ بر روی ۵۰ نمونه شیر خام عرضه شده به یکی از کارخانه‌های تولید فرآورده‌های لبنی استان تهران از نظر آلودگی به باکتری‌های سرمادوست مورد بررسی قرار داد بیشترین تعداد باکتری‌های سرما دوست قبل از پاستوریزاسیون  $CFU/ml$   $3/2 \times 10^6$  و کمترین میزان آن  $1/6 \times 10^3$  به دست آمد (۲). که این میزان کمتر از نتایج بدست آمده برای شیرهای سنتی در مطالعه حاضر می‌باشد.

در مطالعه‌ای میرزایی در سال ۱۳۹۴ به بررسی فراوانی باکتری‌های سرما دوست در شیر خام تحویلی به کارخانه‌های شیر پاستوریزه شهرستان رشت و راه‌های

بهداشتی برای مواد غذایی از جمله شیر محسوب می‌شوند، بنابر این بالا بودن تعداد این باکتری‌ها در شیر نشانگر عدم رعایت شرایط بهداشتی پستان همچنین در فرایند شیردوشی، نگهداری و حمل شیر است.

نتایج مطالعه تقدیری و همکاران در سال ۲۰۱۹ استان تهران هم نشان داد که میانگین تعداد باکتری‌های کلی-فرم نمونه‌های شیر خام استان تهران بیشتر از حد مجاز بود (Taghdiri., 2019). در مطالعه‌ای دیگر که توسط یار احمدی و همکاران در سال ۱۳۸۷ استان لرستان انجام شد، نشان داد که تعداد باکتری‌های کلی‌فرم در شیر بیش از حد مجاز بوده و بیشترین میزان باکتری‌های کلی‌فرم در شیر خام در دی و بهمن ماه بود (یاراحمدی، ۱۳۸۵) که با نتایج مطالعه حاضر تطابق دارد.

جستجوی باکتریولوژیک کلی‌فرم‌ها در بیشتر آزمایشگاه‌های کنترل شیر خام در شمار بررسی‌های بهداشتی روزانه و جاری شیر خام و پاستوریزه است. اکثراً مشکل آلودگی با کلی‌فرم‌ها در مورد شیر خام مطرح است (Wanjala., 2018). Salari و همکاران در سال ۲۰۰۷ در یزد نشان دادند که میانگین باکتری‌های کلی-فرم در نمونه‌های شیر خام بیشتر از حد مجاز بود (Salari., 2007).

اومبوی و همکاران در سال ۱۹۹۴ برای بررسی میزان آلودگی کلی‌فرم و /شیرشیا کلی در نمونه‌های شیر تعاونی‌های جمع‌آوری شیر در کشور کنیا در دو مرحله میزان کلی‌فرم را در ظروف دامداران و نمونه شیر مراکز جمع‌آوری اندازه‌گیری کرده و نتیجه گرفتند حدود ۸۹٪/۵ نمونه شیر ظروف دامداران و ۵۰٪ نمونه شیر مراکز جمع‌آوری بیش از  $5 \times 10^4$  cfu/ml کلی‌فرم داشتند (Ombui., 1994).

گرمادوست در شیر است. یافته‌های ستاری و همکاران در سال ۱۳۹۵ بر روی شیرهای خام و پاستوریزه استان آذربایجان شرقی نشان داد که نمونه‌های شیر خام دارای درصد آلودگی بالا از نظر باکتری‌های هاگزا مزوفیل و گرمادوست بودند این حالت در نمونه‌های شیر پاستوریزه نیز مشاهده گردید (ستاری، ۱۳۹۵).

در مطالعه آقازاده مشگی در سال ۱۳۸۶ بر روی ۵۰ نمونه شیر خام عرضه شده به یکی از کارخانه‌های تولید فرآورده‌های لبنی استان تهران از نظر آلودگی به باکتری‌های گرمادوست مورد بررسی قرار داد. تعداد باکتری‌های گرمادوست در ۱۸ نمونه از نمونه‌های مورد آزمایش منفی به دست آمد. در ۲۰ نمونه میانگین تعداد باکتری‌های گرما دوست  $1/5 \times 10^5$  CFU/ml تعیین گردید. در ۱۲ نمونه تعداد باکتری‌های گرمادوست بالا و بیش از  $500 \times 10^5$  CFU/ml به دست آمد (آقازاده مشگی، ۱۳۸۶). که این میزان کمتر از نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر می‌باشد.

ماهاری و گاش در سال ۱۹۹۷ در بررسی میکروفلور شیرخام در کشور اتیوپی پایین ترین میزان بار میکروبی را  $4 \times 10^7$  CFU/ml و بالاترین میزان بار میکروبی را  $1 \times 10^9$  CFU/ml گزارش کردند. آنها در پژوهش خود فراوانی بار میکروبی (TC) را ۹۸/۱٪، باکتری‌های سرماگرا ۱/۴٪ و باکتری‌های گرمادوست را ۰/۵٪ گزارش کردند (Mahari., 1997).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تعداد باکتری‌های کلی-فرم در شیرهای سنتی و صنعتی در تمام فصول سال بالا بود. هر چند در ایران تاکنون حد مجازی برای این گروه از باکتری‌ها در شیر خام ارائه نشده است ولی در برخی از کشورها حد مجاز استاندارد برای میانگین باکتری‌های کلی‌فرم  $10^2$  در میلی‌لیتر ذکر شده است (Bogdanovicova., 2016). کلی‌فرم‌ها یک شاخص

ولی در فصل‌های تابستان و پاییز و زمستان در محدوده استاندارد قرار داشت. مطالعه تقدیری و همکاران در استان تهران (۲۰۱۹) نشان داد که میزان آلودگی نمونه‌های شیر خام استان تهران به کپک و مخمر بیشتر از حد مجاز بود (Taghdiri., 2019). در مطالعه دیگر که در اردن صورت گرفت میانگین شمارش کپک و مخمر  $1.5 \times 10^4 \text{ cfu/ml}$  بدست آمد که بیشتر از مقدار میانگین بدست آمده در شیرهای سنتی و صنعتی در مطالعه حاضر می باشد (Alaoui., 2019). ذوالفقاری و همکاران در سال ۱۳۹۱ اقدام به مطالعه آلودگی میکروبی شیر و فرآورده‌های شیری جمع‌آوری شده از استان قم نمودند. نتایج این مطالعه نشان داد که از نظر کیفی، ۸۰۹ مورد (۸۹/۶۰ درصد) از نمونه‌های مورد بررسی، دارای کیفیت قابل قبول و ۹۴ مورد (۱۰/۴ درصد) دارای کیفیت غیرقابل قبول بودند. در مجموع میکروارگانیسم‌های آلوده کننده غیرقابل قبول که بیش از حد مجاز استاندارد در نمونه‌های مورد بررسی یافت شدند به ترتیب انتروباکتریاسه (۶/۳ درصد)، /شریشیا کلی (۶/۱ درصد)، کپک و مخمر (۴/۸ درصد)، کلی‌فرم (۴/۷ درصد)، باکتری‌های مزوفیل هوازی (۴/۲ درصد) و /استافیلوکوکوس/ورئوس (۱/۱ درصد) بودند که با بخشی از نتایج مطالعه حاضر همخوانی داشت (ذوالفقاری، ۱۳۹۱). Salari و همکاران در سال ۲۰۰۷ در استان یزد نشان دادند که ۳/۸ درصد از نمونه‌های شیر خام دارای آلودگی کپک و مخمر بیشتر از حد مجاز بودند (Salari., 2007).

وجود آلودگی کپک و مخمری بالا در شیر خام موجب عدم کفایت پاستوریزاسیون در از بین بردن کامل آنها می‌شود. میسلیم‌های با دیواره ضخیم و اسپور برخی از گونه‌های کپکی با پاستوریزاسیون غیرفعال نمی‌شوند و در صورت مناسب بودن شرایط رشد از نظر حرارت و رطوبت، به سرعت در سطح فراورده‌های شیر بخصوص

در مطالعه‌ای که در نیویورک انجام شد Boor و همکاران (بین دسامبر ۱۹۹۳ و ژانویه ۱۹۹۶) نمونه‌های شیر خام از مخازن عمده توسط حمل‌کننده‌های دارای مجوز حمل شیر از ۸۵۵ مزرعه که به طور تصادفی در این ایالت انتخاب شدند و شیر از کیفیت میکروبی و شیمیایی مورد آزمایش قرار گرفت. و شمارش باکتری-های کلی‌فرم‌ها، شمارش اسپورهای مقاوم در برابر حرارت، شمارش اسپور هوازی (مزوفیل)، شمارش سریع سرماگرا و شمارش اولیه گرمخانه‌گذاری تعیین شد. نتایج نشان داد تنها حدود ۲۳ درصد دارای حد قانونی ۱۰ کلی‌فرم در هر میلی لیتر بودند (Boor., 1998).

لوپز و استن فورد در سال ۱۹۹۷ در بررسی کانون‌های آلودگی شیر خام و پاستوریزه در برزیل دریافتند، وجود آلودگی میکروبی کلی‌فرمی در ۶۰٪ نمونه‌ها بعلت شستشوی نامناسب تانکرهای ذخیره شیر و دمای نامناسب بود. نتایج آنها نشان داد که تمام نمونه‌های شیر خام ارزیابی شده دارای تعداد کلی‌فرم‌ها بالایی بودند (Lopes., 1997).

بر اساس نتایج مطالعه حاضر تعداد کپک و مخمر در شیرهای سنتی بطور معنی داری بالاتر از شیرهای صنعتی بود که نشانگر عدم رعایت شرایط بهداشتی در فرایند شیر دوشی، نگهداری و حمل شیر در دامداری-های سنتی است. در ایران تاکنون حد مجازی برای تعداد کپک و مخمر در شیر خام تعریف نشده است ولی برخی منابع در سایر کشورها حد مجاز استاندارد برای میانگین کپک و مخمر در شیر خام را  $10^4$  در میلی‌لیتر ذکر کرده‌اند (Buchl., 2011). بر این اساس نتایج مطالعه حاضر نشانگر این است که میانگین کپک و مخمر در فصول بهار، تابستان، پاییز و زمستان در شیرهای صنعتی در محدوده استاندارد است. میانگین کپک و مخمر در شیرهای سنتی در فصل بهار خارج از محدوده استاندارد

شناسایی شده، بتوان کیفیت شیر خام تولیدی را بهبود بخشید.

### تشکر و قدردانی:

نویسندگان مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه شهرکرد جهت حمایت و اداره کل دامپزشکی استان برای کمک به اخذ نمونه‌ها، و آقای یداله خسروی کارشناس ارشد آزمایشگاه بهداشت مواد غذایی دانشگاه شهرکرد جهت فراهم نمودن انجام آزمایش‌ها تقدیر به عمل می آورند.

فراورده‌های تخمیری مانند ماست، دوغ، پنیر و کره رشد می کنند و تعداد زیادی از آن‌ها مایکوتوکسین تولید می کنند (Agarwal., 2012). بنابراین پایش بهداشتی شیر خام از نظر حضور و تعداد انواع کپک بسیار مهم و ضروری است.

Keshavarzpour و همکاران در سال ۲۰۱۶ اقدام به مطالعه آلودگی باکتریایی و کپکی شیر و فراورده‌های شیری جمع آوری شده از استان اصفهان نمودند. نتایج این تحقیق نشان داد که در مجموع ۱۵ نمونه (۹/۷ درصد) از نظر کلی فرم، ۱۱ نمونه (۷/۱ درصد) از نظر /شریشیا کلی و ۲۰ نمونه (۱۳ درصد) از نظر شمارش کپک مخمر، بیش از حد مجاز استاندارد بودند (Keshavarzpour.,2016).

### نتیجه گیری:

با توجه به نتایج، هر چند شیرهای خام تولید و توزیع شده در سیستم صنعتی کیفیت مناسبتری نسبت به شیرهای سنتی دارا بودند ولی اغلب شیرهای خام تولیدی اعم از صنعتی و سنتی در استان از کیفیت میکروبی مناسبی در همه فصول سال برخوردار نیستند. همچنین کیفیت میکروبی همه شیرهای خام تولیدی در فصول گرم سال نامناسبتر از فصول سرد سال بود. بنابراین نظارت بیشتر بر تولید، نگهداری و توزیع شیر خام در استان توسط ارگان‌های نظارتی از جمله سازمان دامپزشکی بیش از پیش ضرورت داشته و در مجموع از آنجا که تأثیر کیفیت بهداشتی و میکروبی شیر خام بر روی شیر پاستوریزه و سایر فراورده‌های شیر کاملاً مشخص شده تحقیقات نشان دهنده ارتباط مستقیم بین تعداد کل میکروب‌ها در شیر خام و تعداد کل میکروب‌های باقی مانده در شیر پس از پاستوریزاسیون می باشد (سعیدی اصل، ۱۳۸۸)، به نظر می رسد که با تمرکز فعالیت‌های اجرایی، آموزشی و تحقیقاتی در نقاط بحرانی

## منابع:

- 1- Aghazadeh Meshgi M. (2007). Investigation of raw milk supplied by several livestock farms to one of the milk production factories in Tehran province in terms of contamination with psychrophilic, thermophilic and thermophilic bacteria. *Iranian J Vet Sci.* 4(1): 33-40.
- 2- Agarwal A., Awasthi V., Dua A., Ganguly S., Garg V., and Marwaha S.S. (2012). Microbiological profile of milk: Impact of household practices. *Ind J Publ Health.* 56: 88.
- 3- Alaoui Ismaili M., Saidi B., Zahar M. (2019). Composition and microbial quality of raw camel milk produced in Morocco. *J. Saudi Society Agri.* 18: 17-21.
- 4- Bogdanovicova, K., Vyletelova Klimesova, M., Baabak V., Kalhotka L., Kolackova I., and Karpiskova R. (2016). Microbiological quality of raw milk in the Czech Republic. *Czech J Food Sci.* 34: 189-196.
- 5- Boor K., Brown D., Murphy S. (1998). Microbiological and Chemical Quality of Raw Milk in New York State. *J. Dairy Sci.* 81(6): 23-29.
- 6- Buchl NR., and Seiler H. (2011). Yeastes and molds. *Yeasts in milk and dairy products.* Elsevier Ltd. Pp. 744-753.
- 7- Edward KC., Inyal M. (2013). The microbial quality of raw milk from four locations in Abia State, Nigeria. *J. Pharm Biol Sci.* 5(3): 30-35.
- 8- Ezzat Panah H. (2006). Evaluation of microbial load of raw milk produced by several semi-industrial livestock farms in Hamedan province. *Iranian J Food Sci Technol.* 3(4): 57-64.
- 8- Fallah Rada A, Mohsenzadeh M and Ghaemi Bafghi M. (2007). Investigation of the abundance of psychrophilic bacteria in tank milk delivered to Mashhad pasteurized milk factories and the effect of these bacteria on the characteristics of the produced pasteurized milk. *Agri Sci Indust.* 20(6): 201-208.
- 9- Hashemi M. (2002). A report on the quality control and improvement plan for raw milk in Fars province. First Agricultural Conference, Tabriz, Iran.
- 10- Holm C., Mathiasen T., jespersen L. (2004). A flow cytometric technique for identification and differentiation of bacteria in bulk tank milk. *J Appl Microbiol.* .97: 935-941.
- 11- Iranian Institute of Standards and Industrial Research. (2018). Milk microbiology of health and cosmetic products, search, counting and identification of aerobic mesophilic bacteria. INSR, No. 11804, First revision.
- 12- Iranian Institute of Standards and Industrial Research. (2008). Microbiology of food and animal feed, comprehensive method for identification and enumeration of coliforms. INSR, No. 11166, First edition.
- 13- Iranian Institute of Standards and Industrial Research, (2007). Milk and its products - Enumeration of mold or yeast colony forming units - Colony counting in plates at 25

- degrees Celsius. INSR, No. 10154, First edition.
- 14- Iranian Institute of Standards and Industrial Research. (2016). Raw milk, characteristics and test methods. INSR, No. 164, Third revision.
- 15- Karim G. (2013). Milk Hygiene and Technology. 3rd ed. Tehran University Press, p: 1-63.
- 16- Keshavarzpour Z., Sami M., Falahati H., and Mohammadi R. (2016). Bacterial and mold contamination of milk and dairy products distributed by traditional or commercial producers in Isfahan, Iran, in (2014). J Isfahan Med School. 34: 712-717.
- 17- Khosravi M. and Ghaznavi A. (2008). Evaluation of microbial load and pH of raw milk from traditional livestock farms in Kashmar County in different seasons. J Crop Ecolo. 4(4): 33-37.
- 18- Lopes AC., Stamford TL (1997). Critical control points in the pasteurized milk processing fluxogram. Arch Latinoam Nutr. 47(4): 367-371.
- 19- Mahari T., Gashe BA. (1997). A survey of the microflora of raw and pasteurized milk processing plant in Addis Ababa, Ethiopia, J Dairy Res. 57(2): 233-238.
- 20- Mirzaei H. (2015). Study of the abundance of psychophilic bacteria in raw milk delivered to pasteurized milk factories in Rasht city and its entry routes. Master's thesis, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University Rasht Branch.
- 21- Mousavi M, Mahmoudi R, Ghorbanpour Farhad A and Khatibi A. (2018). Evaluation of microbial and physicochemical quality of raw cow milk delivered to pasteurized milk factories in Tabriz city. J Food Indust Res, 28(1): 183-196.
- 22- Ombui JN., Kaburia HF., Nduhiu G., Macharia JK. (1994). Counts and Coliform *Escherichia coli* in raw commercial milk from dairy farmers in Kiambu District, Kenya. East Afr Med J. 71(10): 635- 639.
- 23- Rezapour R, Hanifian S. (2018). Investigation of contamination and biofilm production of cold-tolerant bacteria in raw milk tanks and dairy product processing equipment. J Food Microbiol. 5(2): 79-89.
- 24- Saeidi Asl M.R. (2009). Introduction to General Microbiology and Laboratory Foodstuffs. Islamic Azad University, Sabzevar Branch. p: 297.
- 25- Salari MH., Sharifi MR., Golzari MS., Sadrabadi AA., and Kafilian MH. (2007). Study the microbial contamination of milk and its products in Yazd province. J Health Res Inst. 1: 37-43.
- 26- Sattari M., Shayeg J and Hanifian S. (2016). Spore-forming bacteria in raw and pasteurized milk of East Azerbaijan region: abundance, quantity and species diversity. J Food Microbiol. 3(2): 61-70.
- 27- Taghdiri M., Karim G., Safi Sh. (2019). Study the total microbial load. Coliform. *Escherichia coli*. *Staphylococcus aureus* and mold and yeast and Amyloid A concentration in bulk milk samples of animal farms of Tehran province. J.Food Microbiol. 6: 67 – 78.
- 28- Tasew A., Seifu E. (2011). Microbial quality of raw cow's milk collected from farmers and dairy cooperatives in Bahir Dar Zuria and Mecha district Ethiopia. Agri Biol J. 2(1): 29-33.

- 
- 29- Yarahmadi B., Mahdavi H and Moaidi Nejad A. (2008). Investigation of microbial contamination of raw milk from milking stage to delivery to the factory in Lorestan province. Quarterly J Yafte. 10(3): 67-78.
- 30- Yarahmadi B., Eslami M., Mahdavi H and Moaidi Nejad A. (2006). Investigation of microbial contamination of raw milk and seasonal factors affecting it in Lorestan province. Quarterly J Res Cons. 18(4): 28-33.
- 31- Zolfaghari M., Gaini R., Kalhor N., Khalilian M., Rezavian M and Soleimani M. (2012). Investigation of microbial contamination of various types of pasteurized milk and dairy products in Qom province. J World Microb. 5(1): 47-57.

## Seasonal variation in microbial quality of raw milk produced in traditional and industrial cattle farms

Ghasemi M<sup>1</sup>, Bonyadian M<sup>2\*</sup>, Moshtaghi A<sup>2</sup>

1- MSc graduate in Food Hygiene, Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.

2-Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.

\*Corresponding author: Bonyadian@sku.ac.ir

### ABSTRACT

Currently, the freshness of milk is more evaluated when milk is delivered to dairy plants, but the microbial quality of milk is not considered a criterion for milk delivery. This study aimed to investigate the microbial quality of raw milk produced in Chaharmahal and Bakhtiari province in different seasons and compare the quality of raw milk produced in industrial and non-industrial livestock farms.

In total, 240 raw milk samples were taken and transferred to the laboratory. Microbial tests were done on the samples, including the total mesophilic, thermotolerant, psychrotroph, coliform, yeast and mold count, and pH measurement. The results showed that although the average pH of industrial and traditional milk samples was at the standard level in all seasons, the pH value of conventional milk in summer and autumn had statistically significant differences with industrial milk. Also, the results showed that the number of microorganisms in traditional milk in all microbial groups was higher than in industrial milk. The mesophilic, psychrotroph, thermotolerant, coliform, mold and yeast count in non-industrial milk had significant differences in four seasons, but there was no significant difference for thermotolerant bacteria. For industrial milk, except for mold and yeast, there was a significant difference in the number of other bacteria in the four seasons.

In conclusion, although the raw milk produced in the industrial system had better microbial quality than milk from traditional livestock farms, most of the raw milk produced, both industrial and traditional, did not have a suitable quality in all seasons.

**Keywords:** Raw milk, Microbial quality, Season, Industrial farm, Non-Industrial farm

## بررسی اثرات ضد قارچی عصاره آبی - الکلی میوه واکسینیوم آرکتوستافیلوس (سیاه گیل) بر گونه‌های کاندیدا/آلبیکنس و کاندیدا/گلابراتا در شرایط آزمایشگاهی

احمد هلاکو<sup>۱</sup>، مریم کاظمی<sup>۱</sup>، مریم رفیعی راد<sup>۱\*</sup>، مطهره اسکندری<sup>۲</sup>

۱- گروه زیست شناسی، واحد ایذه، دانشگاه آزاد اسلامی، ایذه، ایران

۲- گروه زیست شناسی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

نویسنده مسئول: [maryam.rafieirad@iau.ac.ir](mailto:maryam.rafieirad@iau.ac.ir)

**مقدمه:** کاندیدیازیس طیفی از بیماری‌ها است که شامل عفونت‌های سطحی و مخاطی ساده تا عفونت‌های سیستمیک خطرناک و کشنده می‌باشد. کاندیدا/گلابراتا پس از کاندیدا/آلبیکنس، چهارمین عامل شایع کاندیدیازیس محسوب می‌شود. استفاده بیش از حد از داروهای سنتتیک ضد قارچی منجر به ظهور سویه‌های مقاوم شده است. از سوی دیگر، گیاهان دارویی به دلیل دارا بودن منابع سرشار از آنتی‌اکسیدان‌ها و متابولیت‌های ثانویه، به عنوان جایگزین‌های ایمن و مقرون‌به‌صرفه برای داروهای شیمیایی مطرح هستند. **هدف:** هدف این مطالعه بررسی اثر ضد قارچی عصاره میوه سیاه گیل بر گونه‌های کاندیدا/آلبیکنس و کاندیدا/گلابراتا بود. **روش کار:** میوه سیاه گیل پس از خشک‌شدن، در متانول ۸۵٪ حل شد و عصاره آن از صافی عبور داده شد. سپس اثر عصاره به روش میکرودايلوشن در رقت‌های ۲ تا ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر گونه‌های استاندارد کاندیدا/آلبیکنس و کاندیدا/گلابراتا در چاهک‌های میکروپلیت ارزیابی شد. **نتایج:** نتایج نشان داد که عصاره سیاه گیل دارای اثر مهاري بر رشد هر دو گونه کاندیدا/آلبیکنس و کاندیدا/گلابراتا (MIC) عصاره برای کاندیدا/آلبیکنس و کاندیدا/گلابراتا به ترتیب ۳۲ و ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. همچنین، حداقل غلظت کشندگی (MFC) برای کاندیدا/آلبیکنس و کاندیدا/گلابراتا به ترتیب ۱۲۵ و ۶۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شد.

با توجه به اثر مهاري قابل توجه عصاره سیاه گیل بر هر دو گونه کاندیدا/آلبیکنس و کاندیدا/گلابراتا، این عصاره می‌تواند به عنوان یک عامل ضد قارچی موثر در شرایط آزمایشگاهی معرفی شود. انجام مطالعات بالینی برای ارزیابی بیشتر اثرات ضد قارچی این عصاره توصیه می‌گردد.

**کلمات کلیدی:** کاندیدیازیس، کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا گلابراتا، عصاره سیاه گیل

## مقدمه:

کاندیدایازیس یکی از شایع ترین عفونت های قارچی در انسان است که توسط گونه های مختلف جنس کاندیدا ایجاد می شود. این عفونت ها می توانند از عفونت های سطحی و موضعی (مانند برفک دهانی و عفونت های پوستی) تا عفونت های سیستمیک و تهاجمی (مانند کاندیدایازیس منتشر و عفونت های جریان خون) گسترده باشند. کاندیدا آلبیکنس (*Candida albicans*) به عنوان شایع ترین عامل کاندیدایازیس شناخته می شود، اما در سال های اخیر، گونه های غیر آلبیکنس مانند کاندیدا گلابراتا (*Candida glabrata*) نیز به دلیل افزایش مقاومت دارویی و شیوع بیشتر، اهمیت بالایی پیدا کرده اند. (1) کاندیدا گلابراتا به عنوان چهارمین عامل شایع کاندیدایازیس، به ویژه در بیماران با نقص سیستم ایمنی و افرادی که تحت درمان های طولانی مدت با داروهای ضد قارچی هستند، مطرح است. (2). استفاده گسترده و گاه بی رویه از داروهای ضد قارچی سنتتیک مانند آزول ها (مانند فلوکونازول) و پلی ن ها) مانند آمفوتریسین (B منجر به ظهور سویه های مقاوم به این داروها شده است. مقاومت دارویی در گونه های کاندیدا نه تنها اثربخشی درمان های رایج را کاهش داده، بلکه هزینه های درمانی و مدت زمان بستری بیماران را نیز افزایش داده است (3). این مسئله لزوم یافتن ترکیبات ضد قارچی جدید و ایمن را بیش از پیش آشکار می سازد. گیاهان دارویی به دلیل دارا بودن ترکیبات فعال زیستی مانند آنتی اکسیدان ها،

فلاونوئیدها، تانن ها و سایر متابولیت های ثانویه، به عنوان منابعی غنی و امیدوارکننده برای توسعه داروهای ضد قارچی طبیعی مورد توجه قرار گرفته اند (4). این ترکیبات نه تنها دارای خواص ضد میکروبی قوی هستند، بلکه عوارض جانبی کمتری نسبت به داروهای شیمیایی دارند و می توانند به عنوان جایگزین های ایمن و مقرون به صرفه برای درمان عفونت های قارچی مورد استفاده قرار گیرند. یکی از گیاهان دارویی مورد توجه، سیاه گیل به نام علمی *Vaccinium arctostaphylos*، گیاهی از خانواده *Ericaceae* است که به طور گسترده در مناطق جنگلی و کوهستانی اروپا، آسیا و به ویژه گیلان یافت می شود. این گیاه به دلیل خواص دارویی و تغذیه ای بالا، از دیرباز در طب سنتی مورد استفاده قرار گرفته است. میوه های این گیاه به رنگ سیاه یا بنفش تیره بوده و حاوی ترکیبات فعال زیستی متعددی هستند که آن را به یک منبع ارزشمند برای تحقیقات علمی تبدیل کرده اند. میوه این گیاه حاوی ترکیبات فنولی به ویژه سیانوزیدها، آنتوسیانین ها و سایر متابولیت های ثانویه است که می توانند در مهار رشد قارچ ها مؤثر باشند (5). با توجه به پتانسیل بالای گیاهان دارویی در کنترل عفونت های قارچی و نیاز به یافتن ترکیبات ضد قارچی جدید، این مطالعه با هدف بررسی اثر ضد قارچی عصاره میوه سیاه گیل بر گونه های کاندیدا/آلبیکنس و کاندیدا گلابراتا انجام شد.

## روش کار:

بر میلی لیتر از عصاره بدست آمد که ۱ میلی گرم بر میلی لیتر از آن توزین شد و وزن آن یادداشت شد که حدود ۰/۸ میلی گرم بود.

### تهیه سویه مخمر

مخمر کاندیدا/آلبیکنس و کاندیدا/گلابراتا به صورت لیوفلیزه از سازمان ملی استاندارد تهیه شدند. سپس مقداری از پودر مخمرها را به دو لوله ی آزمایشگاهی که هر کدام حاوی ۱ میلی لیتر محیط کشت سابروودکستروز آگار بودند ، منتقل شدند و به مدت ۳ روز در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شدند. بعد از ۳ روز رشد مخمرها از لحاظ ایجاد کدورت بررسی شد و به پلیت های حاوی محیط کشت سابروودکستروز آگار منتقل و به صورت خطی کشت داده شدند. بعد به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در گرمخانه قرار داده شدند تا کلنی های مخمرها تشکیل شوند. پس از کشت مخمرها و آماده کردن سوسپانسیون نیم مک فارلند میکروبی هر دو مخمر ، تهیه استوک عصاره گیاهی و ساخت محیط کشت RPMI-1640 موپس دار بدون بی کربنات ، ارزیابی رقت های مختلف عصاره بر مخمر صورت گرفت (۷).

این مطالعه بصورت تجربی است. میوه سیاه گילה در تابستان ۱۴۰۱ از رویشگاه بومی آن در شمال ایران جمع آوری شد. برای افزایش دقت نتایج، از سویه های استاندارد و خالص قارچ های کاندیدا/آلبیکنس و کاندیدا/گلابراتا استفاده شد که از سازمان ملی استاندارد و سازمان پژوهش ها تهیه شده بودند. جهت ارزیابی حساسیت دارویی قارچ ها، از روش میکروالوژن (ریز رقت) استفاده گردید.

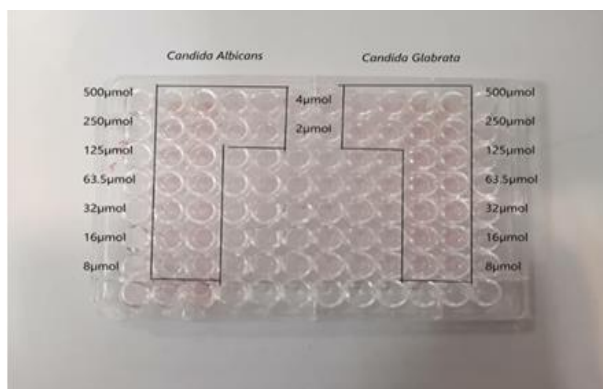
### تهیه و آماده سازی عصاره گیاه:

میوه سیاه گילה پس از جمع آوری در معرض هوا خشک و سپس با آسیاب برقی به پودر تبدیل شد. ۱۰۰ گرم از این پودر با ۵۰۰ میلی لیتر متانول ۸۵٪ به روش خیساندن (ماسراسیون) به مدت سه روز در دمای اتاق و همراه با همزدن های متوالی فرآوری شد. پس از این مدت، مخلوط از طریق کاغذ صافی واتمن شماره ۲۲ فیلتر شد تا مواد جامد جدا شوند. عصاره به دست آمده در سینی استریل خشک و به پودر تبدیل شد. این پودر در ظرف شیشه ای دربسته در یخچال نگهداری و برای تهیه غلظت های مختلف مورد استفاده قرار گرفت (۶).

### تهیه و آماده سازی استوک عصاره گیاه سیاه گילה

۲ گرم از پودر خشک عصاره گیاه سیاه گילה را در ۲۰ میلی لیتر محیط کشت RPMI – 1640 مخلوط کرده و در حدود ۳ تا ۴ ساعت در محیط آزمایشگاه قرار داده تا پودر در محلول حل شد. ۱۰ میلی گرم

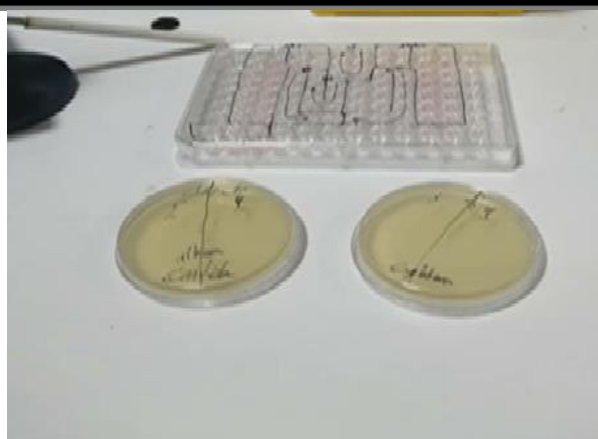
سوسپانسیون کاندیدا آلبیکنس به تمام چاهک‌ها، پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. در کنترل مثبت باید کدورت (رشد مخمر) و در کنترل منفی شفافیت (عدم رشد) مشاهده شد. این فرآیند دو بار تکرار گردید. در سمت دیگر میکرو پلیت تمام مراحل بالا برای گونه کاندیدا گلابراتا انجام داده شد و یک بار دیگر تکرار شد. سپس میکروپلیت به مدت ۲۴ ساعت در دستگاه انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد و بعد از گذشت این مدت انکوباسیون میزان کدورت محیط‌ها و جذب نوری آنها بوسیله دستگاه پلیت ریدر در طول موج ۶۳۰ نانومتر خوانده شد



شکل ۲- پلیت میکروتیتراسیون ۹۶ خانه ای

#### ارزیابی نتایج و تعیین MIC و MFC

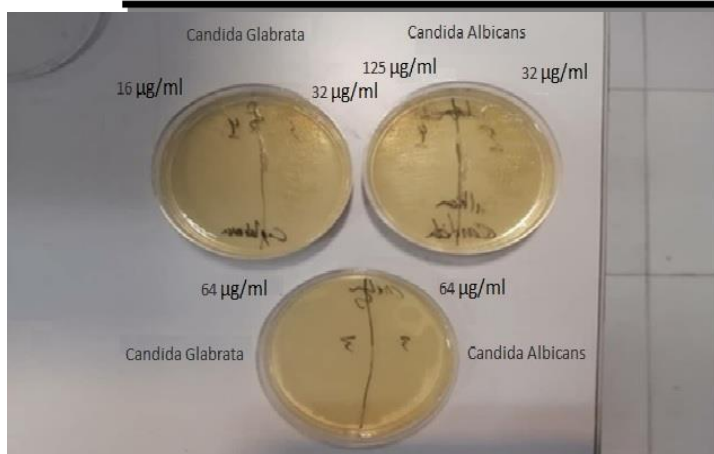
پس از انکوباسیون ۲۴ ساعته در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، تغییرات رشد مخمرها در چاهک‌ها بررسی شد. کدورت چاهک‌ها با چاهک کنترل مثبت (رشد مخمر) و شفافیت با چاهک کنترل منفی (عدم رشد) مقایسه گردید. نتایج بر اساس



شکل ۱- تهیه و آماده سازی سوسپانسیون با استفاده مستقیم از کلنی ( Direct Colony Suspension Method)

#### رقت‌سازی عصاره و تلقیح با مخمرها:

برای ارزیابی اثر رقت‌های مختلف عصاره بر مخمرها به روش میکروالوژشن، از پلیت میکروتیترا ۹۶ خانه‌ای استفاده شد. چاهک‌های ۱ تا ۹ برای رقت‌های مختلف عصاره و چاهک‌های ۱۰ و ۱۱ به عنوان کنترل مثبت و منفی در نظر گرفته شدند. ابتدا محیط کشت RPMI موپس‌دار بدون بی‌کربنات با سرم فیزیولوژی رقیق شد و ۵۰ میکرولیتر از آن به چاهک‌های ۱ تا ۹ اضافه گردید. سپس از محلول عصاره ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، ۵۰ میکرولیتر به چاهک اول اضافه و با انجام رقت‌های متوالی، غلظت‌های ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۳٫۵، ۳۲، ۱۶، ۸، ۴ و ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر ایجاد شد. به چاهک ۱۰ (کنترل مثبت) فقط محیط کشت و سوسپانسیون میکروبی و به چاهک ۱۱ (کنترل منفی) فقط سوسپانسیون میکروبی اضافه شد. پس از افزودن ۵۰ میکرولیتر



شکل ۳- کشت مخمرها در محیط کشت سابرو

دکستروز آگار و تشکیل کلنی ها

پس از جمع آوری اطلاعات مورد نیاز جهت تحلیل یافته ها از آزمون T Test استفاده شد.

### نتایج

#### بررسی غلظت های مختلف عصاره متانولی

##### میوه سیاه گیله بر کاندیدا آلبیکنس:

یافته های این مطالعه نشان داد که غلظت های مختلف عصاره متانولی میوه سیاه گیله تأثیر متفاوتی بر رشد کاندیدا آلبیکنس دارد. در رقت های پایین تر (۲، ۴، ۸ و ۱۶ میکروگرم بر میلی لیتر)، جذب نوری بیشتری مشاهده شد که نشان دهنده رشد بیشتر مخمر بود. در مقابل، در رقت های بالاتر (۳۲، ۶۳، ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر)، جذب نوری کاهش یافت که نشان دهنده مهار رشد مخمر بود. حداقل غلظت مهار (MIC) برای کاندیدا آلبیکنس ۳۲ میکروگرم بر میلی لیتر تعیین شد، زیرا این کمترین غلظتی بود که رشد مخمر را به طور کامل مهار کرد.

استانداردهای CLSI (به عنوان استاندارد طلایی در ایالات متحده) تحلیل شدند. حداقل غلظت مهار (MIC) به عنوان آخرین چاهکی که هیچ کدورتی (رشدی) مشاهده نشد، تعیین شد. برای کاندیدا آلبیکنس، MIC برابر با ۳۲ میکروگرم بر میلی لیتر و برای کاندیدا گلابراتا، MIC برابر با ۱۶ میکروگرم بر میلی لیتر گزارش شد. برای تعیین حداقل غلظت کشندگی (MFC)، از چاهک های مربوط به MIC و رقت های بالاتر (۶۴ و ۱۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر برای کاندیدا آلبیکنس و ۱۶، ۳۲ و ۶۴ میکروگرم بر میلی لیتر برای کاندیدا گلابراتا) نمونه برداری شد و بر روی محیط کشت سابرو دکستروز آگار (SDA) کشت داده شد. پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند تا حضور یا عدم حضور کلنی های زنده مخمر بررسی شود. MFC به عنوان کمترین غلظتی که هیچ رشد مخمری مشاهده نشد، تعیین گردید. پس از مشاهده کلنی های تشکیل شده در رقت های مختلف بر روی پلیت ها، حداقل غلظت قارچ کشی یا

MFC (Minimum fungicidal concentration) بررسی شد و پس از اتمام آزمایش نتایج تجزیه و تحلیل شدند. و با استانداردهای CLSI مقایسه شدند (۸).

کاهش می‌یابد. این یافته‌ها در دو تکرار آزمایش تأیید شدند و اعداد به‌دست‌آمده بسیار مشابه بودند. این نتایج نشان‌دهنده پتانسیل عصاره متانولی میوه سیاه گیله به‌عنوان یک عامل ضد قارچی مؤثر علیه کاندیدا آلبیکنس است.

حداقل غلظت کشندگی (MFC) نیز ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شد، زیرا این غلظت باعث کاهش ۹۰ درصدی تشکیل کلنی‌های مخمر شد جدول (۴-۱). نتایج نشان داد که با کاهش غلظت عصاره، اثر مهارکنندگی آن بر رشد مخمر

جدول (۴-۱)، تاثیر غلظت های مختلف عصاره بر قارچ کاندیدا آلبیکنس

| چاهک                         | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6   | 7    | 8    | 9   |
|------------------------------|------|------|------|------|------|-----|------|------|-----|
| غلظت<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) | 500  | 250  | 125  | 63.5 | 32   | 16  | 8    | 4    | 2   |
| میزان جذب                    | 0.08 | 0.06 | 0.06 | 0.07 | 0.08 | 0.2 | 0.25 | 0.28 | 0.3 |

غلظت کشندگی (MFC) نیز ۶۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شد، زیرا این غلظت باعث کاهش ۹۰ درصدی تشکیل کلنی‌های مخمر شد. نتایج نشان داد که با کاهش غلظت عصاره، اثر مهارکنندگی آن بر رشد مخمر کاهش می‌یابد. این یافته‌ها مشابه نتایج به‌دست‌آمده برای کاندیدا آلبیکنس بود و نشان‌دهنده پتانسیل عصاره متانولی میوه سیاه گیله به‌عنوان یک عامل ضد قارچی مؤثر علیه کاندیدا گلابراتا است.

### بررسی غلظت‌های مختلف عصاره متانولی میوه سیاه گیله بر کاندیدا گلابراتا:

یافته‌های این مطالعه نشان داد که غلظت‌های مختلف عصاره متانولی میوه سیاه گیله تأثیر متفاوتی بر رشد کاندیدا گلابراتا دارد. در رقت‌های پایین‌تر (۲، ۴ و ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، جذب نوری بیشتری مشاهده شد که نشان‌دهنده رشد بیشتر مخمر بود. در مقابل، در رقت‌های بالاتر (۱۶، ۳۲، ۶۳، ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، جذب نوری کاهش یافت که نشان‌دهنده مهار رشد مخمر بود. حداقل غلظت مهاری (MIC) برای کاندیدا گلابراتا ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد، زیرا این کمترین غلظتی بود که رشد مخمر را به‌طور کامل مهار کرد. حداقل

جدول (۴-۲)، تاثیر غلظت های مختلف عصاره بر قارچ کاندیدا گلابراتا

| چاهک            | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9   |
|-----------------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|
| غلظت<br>(µg/ml) | 500  | 250  | 125  | 63.5 | 32   | 16   | 8    | 4    | 2   |
| میزان جذب       | 0.08 | 0.08 | 0.06 | 0.06 | 0.07 | 0.07 | 0.25 | 0.27 | 0.3 |

### مقایسه تاثیر عصاره بر مخمرهای کاندیدا/ آلبیکنس و کاندیدا گلابراتا

نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره متانولی میوه سیاه گیله تاثیر متفاوتی بر دو گونه کاندیدا/آلبیکنس و کاندیدا گلابراتا دارد. برای کاندیدا آلبیکنس، MIC<sub>50</sub> (غلظتی که باعث کاهش ۵۰ درصدی رشد کلنی ها می شود) در رقت ۳۲ میکروگرم بر میلی لیتر و MIC<sub>90</sub> (غلظتی که باعث کاهش ۹۰ درصدی رشد کلنی ها می شود) در رقت ۶۴ میکروگرم بر میلی لیتر تعیین شد. حداقل غلظت کشندگی (MFC) نیز در رقت ۱۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر مشاهده گردید. در مورد کاندیدا گلابراتا، MIC<sub>50</sub> در رقت ۱۶ میکروگرم بر

میلی لیتر و MIC<sub>90</sub> در رقت ۶۴ میکروگرم بر میلی لیتر تعیین شد. این نتایج نشان دهنده حساسیت بیشتر کاندیدا گلابراتا نسبت به کاندیدا آلبیکنس به عصاره متانولی میوه سیاه گیله بود، زیرا کاندیدا گلابراتا در غلظت های پایین تر (۱۶ و ۶۴ میکروگرم بر میلی لیتر) مهار و کشته شد.

به طور کلی، این یافته ها نشان می دهد که عصاره متانولی میوه سیاه گیله پتانسیل ضد قارچی قوی تری علیه کاندیدا گلابراتا نسبت به کاندیدا آلبیکنس دارد. این نتایج می تواند در توسعه درمان های طبیعی و ایمن برای عفونت های ناشی از این گونه های قارچی مورد استفاده قرار گیرد.

جدول (۴-۳)، مقایسه MIC و MFC، دو مخمر کاندیدا/آلبیکنس و کاندیدا گلابراتا

| MFC (µg/ml) | MIC (µg/ml) |        |                  |
|-------------|-------------|--------|------------------|
|             | MIC 90      | MIC 50 |                  |
| 125         | 64          | 32     | کاندیدا آلبیکنس  |
| 64          | 32          | 16     | کاندیدا گلابراتا |

### تعیین میزان غلظت عصاره گیاه در هر رقت

از آنجاییکه وزن ۱ میلی لیتر از محلول عصاره گیاه تلقیح شده، ۰/۸ میلی گرم بوده است و از طرفی

ترتیب برای سایر چاهک های تلقیح شده ، غلظت عصاره موجود در آن محاسبه شدند . جدول (۴-۴) ، غلظت عصاره را در رقت های مختلف نشان می دهد.

هر میلی لیتر ۱۰۰۰ میکرولیتر می باشد و هر میلی گرم ۱۰۰۰ میکروگرم می باشد بنابر این غلظت عصاره در یک میلی لیتر از محلول ۸۰۰ (μg/ml) می باشد. پس در غلظت ۱/۲ (۵۰۰ μg/ml) ، غلظت عصاره ۴۰۰ (μg/ml) بدست آمد . بدین

جدول (۴-۴) تعیین غلظت عصاره میوه سیاه گیله در رقت های مختلف برای کاندیدا/آلبیکنس و کاندیدا/گلایراتا

گلایراتا

| غلظت<br>(μg/μl)                          | 1/2 | 1/4 | 1/8 | 1/16 | 1/32 | 1/64 | 1/128 | 1/256 | 1/512 |
|------------------------------------------|-----|-----|-----|------|------|------|-------|-------|-------|
| رقت عصاره<br>(μg/ml)                     | 500 | 250 | 125 | 63.5 | 32   | 16   | 8     | 4     | 2     |
| غلظت عصاره<br>موجود در<br>رقت<br>(μg/ml) | 400 | 200 | 100 | 50   | 25   | 12.5 | 6.25  | 3.125 | 1.562 |

نتایج جدول بالا نشان دادند که در کمترین رقت موثر بر مهار مخمرها (MIC)، غلظت عصاره موجود برای کاندیدا/آلبیکنس ۲۵ (μg/ml) ، و برای کاندیدا/گلایراتا ۱۲/۵ (μg/ml) می باشد.

نتایج این مطالعه نشان دهنده اثرات ضد قارچی قابل توجه عصاره متانولی میوه سیاه گیله (*Vaccinium arctostaphylos*) بر دو گونه مهم قارچی کاندیدا/آلبیکنس و کاندیدا/گلایراتا است. این یافته ها با توجه به افزایش مقاومت دارویی در گونه های کاندیدا و نیاز به یافتن ترکیبات ضد قارچی جدید و ایمن، از اهمیت بالایی برخوردار هستند. در ادامه، این نتایج در چارچوب مطالعات پیشین و مکانیسم های احتمالی اثر عصاره مورد

همچنین در کمترین رقت موثر بر مرگ مخمرها (MFC) ، غلظت عصاره موجود برای کاندیدا آلبیکنس ، ۱۰۰ (μg/ml) و برای کاندیدا گلایراتا ۵۰ (μg/ml)، میباشد. بنابراین کاندیدا گلایراتا در غلظت پایین تر از کاندیدا البیکنس از بین میرود. و میزان عصاره دارویی کمتری برای مهار و مرگ مخمر نیاز است.

بحث

قارچی، مانند آنزیم‌های مرتبط با سنتز ارگوسترول (جزء ضروری غشای سلولی قارچ)، اثر ضد قارچی خود را اعمال کنند (۱۱؛ ۱۲). علاوه بر این، ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجود در عصاره ممکن است با کاهش استرس اکسیداتیو در سلول‌های قارچی، رشد آن‌ها را مهار کنند (۱۳).

مطالعات متعددی اثرات ضد قارچی گیاهان دارویی را بررسی کرده‌اند. به عنوان مثال، عصاره‌های گیاهانی مانند اکالیپتوس، آویشن و مریم‌گلی نیز اثرات ضد قارچی قوی علیه گونه‌های کاندیدا نشان داده‌اند (۱۴؛ ۱۵). در مطالعه‌ای توسط Furletti و همکاران (۲۰۱۱)، عصاره‌های گیاهی مانند گشنیز (*Coriandrum sativum*) فعالیت ضد قارچی قوی علیه کاندیدا آلبیکنس نشان دادند (۱۶). شروع و شدت عفونت قارچی به بار تلقیح، وضعیت ایمنی و مقاومت میزبان بستگی دارد. روغن‌های گیاهی می‌توانند یکی از امیدوار کننده ترین نتایج محصولات طبیعی برای مهار قارچ را نشان دهند (۱۷). در واقع، بسیاری از انواع عصاره‌های به دست آمده از گیاهان یا گیاهان مختلف، خواص ضد قارچی شدیدی از خود نشان داده‌اند (۱۷؛ ۱۸). این نتایج با یافته‌های حاضر همخوانی دارد و نشان می‌دهد که ترکیبات گیاهی می‌توانند به عنوان جایگزین‌های طبیعی برای داروهای شیمیایی ضد قارچی مورد استفاده قرار گیرند.

افزایش مقاومت دارویی در گونه‌های قارچی کاندیداها، نیاز به توسعه ترکیبات ضد قارچی

بحث قرار می‌گیرند. عصاره متانولی میوه سیاه گילה در این مطالعه به‌طور معناداری رشد هر دو گونه کاندیدا/آلبیکنس و کاندیدا/گلایراتا را مهار کرد. حداقل غلظت مهاری (MIC) برای کاندیدا آلبیکنس ۳۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای کاندیدا گلایراتا ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. این نتایج نشان‌دهنده حساسیت بیشتر کاندیدا گلایراتا نسبت به کاندیدا آلبیکنس به عصاره است. این تفاوت ممکن است به دلیل تفاوت در ساختار دیواره سلولی، متابولیسم و مکانیسم‌های مقاومت این دو گونه باشد (۱). کاندیدا گلایراتا به‌طور کلی نسبت به بسیاری از داروهای ضد قارچی مانند فلوکونازول مقاوم‌تر است با این حال، در این مطالعه، این گونه نسبت به کاندیدا آلبیکنس حساسیت بیشتری به عصاره متانولی میوه سیاه گילה نشان داد. این یافته ممکن است به دلیل وجود ترکیبات فعال زیستی خاص در عصاره باشد که به‌طور انتخابی بر مکانیسم‌های حیاتی کاندیدا گلایراتا تأثیر می‌گذارند. مطالعات پیشین نیز نشان داده‌اند که ترکیبات فنولی و آنتوسیانین‌های موجود در میوه‌های خانواده *Ericaceae* (مانند سیاه گילה) دارای خواص ضد میکروبی قوی هستند (۹).

ترکیبات فنولی و آنتی‌اکسیدان‌های موجود در عصاره میوه سیاه گילה ممکن است با ایجاد اختلال در ساختار دیواره سلولی و غشای سلولی قارچ، نفوذپذیری غشا را افزایش داده و منجر به مرگ سلولی شوند (۱۰). همچنین، این ترکیبات ممکن است با مهار آنزیم‌های کلیدی در متابولیسم

جدید را بیش از پیش آشکار ساخته است و استفاده از داروهای ضد قارچ در درمان بیماری های قارچی می تواند منجر به ایجاد مقاومت ضد قارچی شود (۲). عصاره متانولی میوه سیاه گیل به دلیل اثرات ضد قارچی قوی و ایمنی نسبی، می تواند به عنوان یک جایگزین طبیعی برای داروهای شیمیایی مورد بررسی بیشتر قرار گیرد. با این حال، انجام مطالعات بالینی برای ارزیابی سمیت، فارماکوکینتیک و اثربخشی این عصاره در مدل های حیوانی و انسانی ضروری است. این مطالعه نشان داد که عصاره متانولی میوه سیاه گیل دارای اثرات ضد قارچی قوی علیه *کاندیدا آلبیکنس* و *کاندیدا گلابراتا* است. *کاندیدا گلابراتا* حساسیت بیشتری نسبت به *کاندیدا آلبیکنس* به این عصاره نشان داد. احتمالاً ترکیبات فنولی و آنتی اکسیدانی موجود در عصاره ممکن است مسئول این اثرات باشند. با توجه به افزایش مقاومت دارویی در گونه های *کاندیدا*، عصاره میوه سیاه گیل می تواند به عنوان یک گزینه امیدوارکننده برای توسعه درمان های ضد قارچی طبیعی مورد استفاده قرار گیرد.

## منابع :

۱. Pfaller M.A, Diekema D.J. 2002. Role of sentinel surveillance of candidemia: trends in species distribution and antifungal susceptibility. J Clin Microbiol 40:3551-7
۲. Sanglard D. 2016. Emerging Threats in Antifungal-Resistant Fungal Pathogens. Front Med (Lausanne) 3:11
۳. Cowen L.E, Sanglard D, Howard SJ, Rogers P.D, Perlin D.S. 2014. Mechanisms of Antifungal Drug Resistance. Cold Spring Harb Perspect Med 5:a019752
۴. Raut J.S, Shinde R.B, Chauhan N.M, Karuppayil S.M. 2013. Terpenoids of plant origin inhibit morphogenesis, adhesion, and biofilm formation by *Candida albicans*. Biofouling 29:87-96
۵. Jalal O, Samaneh A, Mehdi B. 2021. A review of the medicinal plant *Vaccinium arctostaphylos* and its applications. J. Plant Biotechnol. 16:63-72
۶. Mahmoudi R, Rafieirad M, Goudarzi S. 2018. Effect of Hydroalcoholic Extract of *Ferulago angulata* (Schlecht) Boiss on Motor and Memory Disorders in Animal Model of Parkinson Disease. Qom Univ. Med. Sci. J. 12:36-47
۷. Yahyapour ,Anvar S.A.A, Ataee M ,AhariH. ۲۰۲۳. ح Isolation and optimization of growth conditions of yeasts with aflatoxin B1 reducing properties from local cheeses in Iran. J Comp Pathol. 19:3983-92
۸. Haji Fattahi F, Alirezaei, Somayeh, Goodarzi ,Hossein, Khalesi M.A. 2019. Investigation of antifungal effect of aqueous extract of garlic on *Candida albicans* (INVITRO). J. Dent. Res. 16:20-6
۹. Sepehrifar R, Hasanloo T. 2010. Polyphenolics, Flavonoids and Anthocyanins Content and Antioxidant Activity of Qare-Qat (*Vaccinium arctostaphylos* L.) from Different Areas of Iran. Journal of Medicinal Plants. 9:66-74
۱۰. Shamilov A.A, Olennikov D.N, Pozdnyakov D.I, Bubenchikova V.N, Garsiya E.R, Larskii M.V. 2022. Caucasian Blueberry: Comparative Study of Phenolic Compounds and Neuroprotective and Antioxidant Potential of *Vaccinium myrtillus* and *Vaccinium arctostaphylos* Leaves. Life (Basel) 12
۱۱. Zhou X, Zeng M, Huang F, Qin G, Song Z, Liu F. 2023. The potential role of plant secondary metabolites on antifungal and immunomodulatory effect. Appl Microbiol Biotechnol. 107:4471-92
۱۲. Eliaš D, Tóth Hervay N, Gbelská Y. 2024. Ergosterol Biosynthesis and Regulation Impact the Antifungal Resistance and Virulence of *Candida* spp. Stresses 4:641-62
۱۳. El Moussaoui A, Jawhari F.Z, Almehdi A.M, Elmsellem H, Fikri Benbrahim K, et al. 2019. Antibacterial, antifungal and

- antioxidant activity of total polyphenols of *Withania frutescens*.L. Bioorg Chem. 93:103337
۱۴. Shafaroudi A.M, Gorji N.E, Nasiri P, Javidnia J, Saravi M.E. 2022. Antifungal Properties of *Zataria multiflora* on *Candida* species: A Systematic Review. JEBIM. 27:2515690X221132272
۱۵. Naeini A.R, Naseri M, Kamalinejad M, Khoshzaban F, Rajabian T, et al. 2011. Study on Anti\_ *Candida* Effects of Essential Oil and Extracts of Iranian Medicinal Plants, In vitro. Journal of Medicinal Plants 10:163-72
۱۶. Furletti V.F, Teixeira I.P, Obando-Pereda G, Mardegan R.C, Sartoratto A, et al. 2011. Action of *Coriandrum sativum* L. Essential Oil upon Oral *Candida albicans* Biofilm Formation. eCAM. 2011:985832
۱۷. Hu Y, Zhang J, Kong W, Zhao G, Yang M. 2017. Mechanisms of antifungal and anti-aflatoxigenic properties of essential oil derived from turmeric (*Curcuma longa* L.) on *Aspergillus flavus*. Food Chem 220:1-8
۱۸. Nazzaro F, Fratianni F, Coppola R, Feo V. 2017. Essential Oils and Antifungal Activity. J. Pharm. (Basel) 10

**Evaluation of the Antifungal Effects of *Vaccinium arctostaphylos* (Blackberry) Fruit Hydroalcoholic Extract on *Candida albicans* and *Candida glabrata* under Laboratory Conditions**

Ahmad Holakou<sup>1</sup>, Maryam Kazemi<sup>1</sup>, Maryam Rafieirad<sup>1\*</sup>, Motahareh Eskandari<sup>2</sup>

1- Department of Biology, Izeh Branch, Islamic Azad University, Izeh, Iran

2-Department of Biology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

•Corresponding Author: [maryam.rafieirad@iau.ac.ir](mailto:maryam.rafieirad@iau.ac.ir)

**Abstract**

Candidiasis encompasses a spectrum of diseases, ranging from superficial and mucosal infections to severe and life-threatening systemic infections. *Candida glabrata* is the fourth most common cause of candidiasis after *Candida albicans*. The overuse of synthetic antifungal drugs has led to the emergence of resistant strains. On the other hand, medicinal plants, rich in antioxidants and secondary metabolites, are considered safe and cost-effective alternatives to chemical drugs.

This study aimed to investigate the antifungal effects of *Vaccinium arctostaphylos* (blackberry) fruit extract on *Candida albicans* and *Candida glabrata*.

The blackberry fruits were dried, dissolved in 85% methanol, and filtered to obtain the extract. The antifungal activity of the extract was evaluated using the microdilution method at concentrations ranging from 2 to 500 µg/mL against standard strains of *Candida albicans* and *Candida glabrata* in microplate wells.

The results demonstrated that the extract inhibited the growth of both *Candida* species. The minimum inhibitory concentration (MIC) of the extract for *Candida albicans* and *Candida glabrata* was 32 and 16 µg/mL, respectively. Additionally, the minimum fungicidal concentration (MFC) for *Candida albicans* and *Candida glabrata* was 125 and 64 µg/mL, respectively.

Given the significant inhibitory effects of *Vaccinium arctostaphylos* extract on both *Candida albicans* and *Candida glabrata*, this extract can be introduced as an effective antifungal agent under laboratory conditions. Further clinical studies are recommended to evaluate its antifungal potential.

**Key Word:** Candidiasis, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, Blackberry extract

اشریشیا کلی تولیدکننده توکسین شیگا (STEC) در ایمنی مواد غذایی: بررسی ژن‌های بیماری‌زایی و مقاومت

### آنتی‌بیوتیکی

الیاس شهریور، ابراهیم رحیمی\*، فهام خامسی پور

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

• نویسنده مسئول

### چکیده

اشریشیا کلی تولیدکننده توکسین شیگا (STEC) یکی از عوامل مهم بیماری‌زا منتقله از غذا است که با بیماری‌های شدید، از جمله سندرم همولیتیک اورمیک، مرتبط است. این مقاله مروری به بررسی شیوع، ژن‌های بیماری‌زایی، الگوهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی و پیامدهای ایمنی غذایی STEC در منابع غذایی مختلف می‌پردازد. شیوع STEC بسیار متغیر است و از ۰٫۵ درصد در کاهو تا ۵۲ درصد در گوشت گاو گزارش شده است. محصولات سنتی مانند آب‌میوه و بستنی نیز نرخ آلودگی بالاتری نشان می‌دهند. ژن‌های بیماری‌زای کلیدی در این مطالعه شامل *stx1* (تا ۹۰٫۵ درصد) و *eae* (تا ۵۹٫۶ درصد)، به‌ویژه در سویه‌های EHEC، بوده که به‌طور مکرر شناسایی شده‌اند. مقاومت بالا به آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند آمپی‌سیلین (تا ۹۱٫۷ درصد)، تتراسایکلین (تا ۹۱٫۷ درصد) و تری‌متوپریم-سولفامتوکسازول (تا ۸۳٫۳ درصد) شایع است که توسط ژن‌هایی مانند *aadA1*، *tetA* و *blaTEM* هدایت می‌شود. چالش‌های ایمنی غذایی از عواملی نظیر بهداشت ناکافی، مقررات ناهماهنگ و سویه‌های مقاوم به چند دارو (MDR) ناشی می‌شود. در این مطالعه پیشنهاداتی شامل پیاده‌سازی سیستم تحلیل خطر و نقاط کنترل بحرانی (HACCP)، تقویت مدیریت استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و بهره‌گیری از روش‌های تشخیص پیشرفته مانند توالی‌یابی کل ژنوم (WGS) ارائه شد. در این مرور بر تهدید جهانی سلامت عمومی بدلیل STEC و نیاز به استراتژی‌های یکپارچه ایمنی غذایی تأکید شده است.

**کلمات کلیدی** STEC، توکسین شیگا، ژن‌های بیماری‌زایی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، ایمنی مواد غذایی، EHEC

## مقدمه

و نقاط کنترل بحرانی (HACCP) و روش‌های تشخیص پیشرفته، از جمله توالی‌یابی کل ژنوم (WGS)، برای کنترل آلودگی STEC ضروری می‌باشند (۱،۲۱). این مقاله مروری داده‌های مربوط به شیوع STEC، پروفایل‌های بیماری‌زایی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی و استراتژی‌های ایمنی غذایی را تلفیق کرده و بینش‌هایی را برای پژوهشگران، سیاست‌گذاران و متخصصان سلامت عمومی ارائه می‌دهد تا خطرات مرتبط با STEC را کاهش دهند.

## ژن‌های بیماری‌زا در STEC

## عوامل اصلی بیماری‌زایی

سویه‌های STEC با ژن‌های بیماری‌زای مشخص می‌شوند که قدرت بیماری‌زایی آنها را افزایش می‌دهند. ژن‌های stx1 و stx2 که توکسین‌های شیکا را کدگذاری می‌کنند، ویژگی بارز STEC بوده و به ترتیب در ۹۸،۳٪ و ۹۰،۵٪ از سویه‌های بالینی و غذایی شناسایی شده‌اند (شکل ۲) (۵،۲۲). ایزول‌های اشریشیا کلی تولیدکننده سم (Verotoxigenic) از بیماران مبتلا به اسهال دارای ژن‌های stx1 (۲۷،۶٪) و stx2 (۱۳،۸٪) بودند، به طوری که سروتیپ‌های غیر-O157 در ایران به مسائل بهداشتی قابل توجهی منجر شده‌اند (۳۹). ژن stx2، به‌ویژه زیرگونه‌های stx2a و stx2c، به دلیل سمیت بالا با پیامدهای شدید مانند سندرم همولیتیک اورمیک مرتبط است (۳،۲۳). ژن eae که پروتئین intimin را کدگذاری می‌کند، در حداکثر ۵۹،۶٪ از سویه‌ها یافت می‌شود و ویژگی تعیین‌کننده EHEC است (جدول ۱، شکل ۲) (۱،۲۰). سایر ژن‌های بیماری‌زایی مانند ehxA (همولیزین، تا ۸۳،۳٪)، hlyA (تا ۴۷،۸٪) و espA (تا ۳۳،۳٪) به آسیب بافتی، چسبندگی و انتقال پروتئین‌های اثرگذار کمک می‌کنند (۱۷،۲۴). مطالعات نشان داده‌اند که پروفایل‌های متنوع بیماری‌زایی در منابع غذایی مختلف هستند (شکل ۲). برای مثال، آبمیوه سنتی و بستنی شیوع بالایی از EHEC (به ترتیب ۷۵٪ و ۶۶،۷٪) را نشان می‌دهند، با هم‌رخدادی شایع ژن‌های stx1، stx2 و eae (جدول ۱) (۱). در گوشت گاو، ژن stx2 غالب است (۹۰،۵٪ از سویه‌ها)، در حالی که طیور و صدف‌ها شیوع کمتری از eae دارند (جدول ۱) (۵،۲۱).

اشریشیا کلی تولیدکننده توکسین شیکا (STEC) یکی از عوامل بیماری‌زای مهم منتقله از طریق غذا است که باعث شیوع جهانی بیماری‌های گوارشی، از اسهال خفیف تا بیماری‌های شدید مانند سندرم همولیتیک اورمیک می‌شود (۱،۳،۱۹). STEC، به‌ویژه اشریشیا کلی انتروهموراژیک (EHEC)، با ژن‌های توکسین شیکا (stx1 و stx2) مشخص می‌شود و در EHEC، ژن eae که پروتئین intimin را کدگذاری می‌کند و به چسبندگی در روده کمک می‌کند، نیز حضور دارد (۱،۲۵،۲۶). غذاهای آلوده، مانند گوشت گاو، محصولات لبنی، طیور و سبزیجات، اصلی‌ترین راه‌های انتقال بوده و شیوع آنها به دلیل تفاوت در شیوه‌های بهداشتی، روش‌های تولید و مقررات منطقه‌ای متفاوت است (۵،۱۸،۲۴). برای مثال، گوشت گاو و محصولات لبنی اغلب آلودگی بیشتری نسبت به STEC نشان می‌دهند و خطرات قابل‌توجهی برای سلامت عمومی در پی دارند (جدول ۱، شکل ۱) (۱،۱۶). سروگروپ‌های غیر-O157 مانند O26، O111 و O177 نیز نقش مهمی در بیماری‌زایی دارند (جدول ۲) (۳،۲۰). شیوع بالای باکتری‌های STEC (۱۰،۶۶٪) و مقاومت چنددارویی در شیر خام و محصولات لبنی، خطرات قابل توجهی برای سلامت عمومی (به‌دلیل سروگروپ‌های سرولوژیک O157 و O26) نشان می‌دهد (۳۵).

اشریشیا کلی (Escherichia coli) در ۲۹،۰۲٪ از نمونه‌های گوشت نشخوارکنندگان شناسایی شده است که، با O157 و O26 به عنوان گروه‌های سرولوژیکی غالب، که همگی دارای ژن‌های ویرولنس stx1، stx2، eaeA و ehly بودند (۳۶).

مقاومت آنتی‌بیوتیکی، به‌ویژه مقاومت چنددارویی (MDR)، درمان STEC را پیچیده کرده است و توسط ژن‌هایی نظیر blaTEM و tetA، aadA1 که اغلب روی پلاسمیدها حمل می‌شوند، هدایت می‌شود (جدول ۱) (۳،۲۰،۲۲،۲۳). این مقاومت، که با استفاده نادرست از آنتی‌بیوتیک‌ها در کشاورزی تشدید شده، بر ضرورت اقدامات مؤثر ایمنی غذایی تأکید دارد (۱،۲۲). استراتژی‌هایی مانند تحلیل خطر

ژن های کلیدی مقاومت، از جمله aadA1 (تا ۷۶,۹٪)، tetA (تا ۵۷,۷٪) و blaTEM (تا ۸۴,۵٪)، در جدول ۱ شرح داده شده اند (۱,۲۳). تولید بتالاکتاماز با طیف گسترده (ESBL)، که توسط ژن هایی مانند blaCTX-M-55 و blaSHV هدایت می شود، در حداکثر ۴۰٪ از سویه ها گزارش شده است (۵,۲۲). مقاومت به کولیسیتین، که توسط ژن mcr-1 ایجاد شده، به ویژه در گوشت گاو و طیور در حال ظهور است (۵,۲۴). فنوتیپ های مقاوم به چند دارو (MDR)، که تا ۸۳,۳٪ از سویه ها مشاهده شده اند، با انتقال ژن های مبتنی بر پلاسمید مرتبط هستند (جدول ۱) (۲۰,۲۳). استفاده نادرست از آنتی بیوتیک ها در کشاورزی مقاومت را تشدید می کند و نیاز به برنامه های مدیریت آنتی بیوتیک را ضروری می سازد (۱,۲۲).

### پیامدهای ایمنی غذایی

آلودگی STEC در محصولات غذایی خطرات قابل توجهی برای سلامت عمومی ایجاد می کند. شیوع بسته به نوع غذا متفاوت است، به طوری که گوشت گاو (تا ۵۲٪) و آب میوه سنتی (۲۰٪) نرخ های بالاتری نسبت به سبزیجات (۳,۰-۱۲٪) و صدف ها (۵,۹-۸,۹٪) نشان می دهند (شکل ۱) (۱,۱۸,۲۱,۲۴). توکسین شینگلا تولیدکننده اشرشیا کلی (STEC) در ۲,۶۳٪ از غذاهای آماده به خوردن، با سالادها (۱۵٪) و سویه های EHEC حامل ژن های stx1، eae و ehly، خطرات بهداشتی قابل توجهی را به وجود می آورند (۳۸). بهداشت ضعیف در فرآیند تولید، نظافت ناکافی و نبود پاستوریزاسیون از عوامل اصلی هستند (۴,۱۸). برای مثال، مزارع مرتبط با محصولات لبنی با روش های نظافت نامناسب تا ۴۲,۹٪ شیوع STEC گزارش کرده اند (جدول ۱) (۴).

چارچوب های نظارتی، مانند دستورالعمل های INSO و IFDA ایران، برای کنترل آلودگی طراحی شده اند، اما اجرای آنها در بازارهای سنتی ناهماهنگ است (۱). پیاده سازی HACCP، نظارت منظم و آموزش مصرف کنندگان از استراتژی های مؤثر هستند (۱,۱۹). روش های تشخیص پیشرفته، از جمله PCR و توالی یابی کل ژنوم (WGS)، شناسایی STEC، به ویژه سروگروپ های غیر-

انتقال افقی ژن های بیماری زایی از طریق پلاسمیدها و باکتریوفاژها اپیدمیولوژی STEC را پیچیده تر می کند (۲۰,۲۳).

### سروگروپ های غیر-O157 و تنوع بیماری زایی

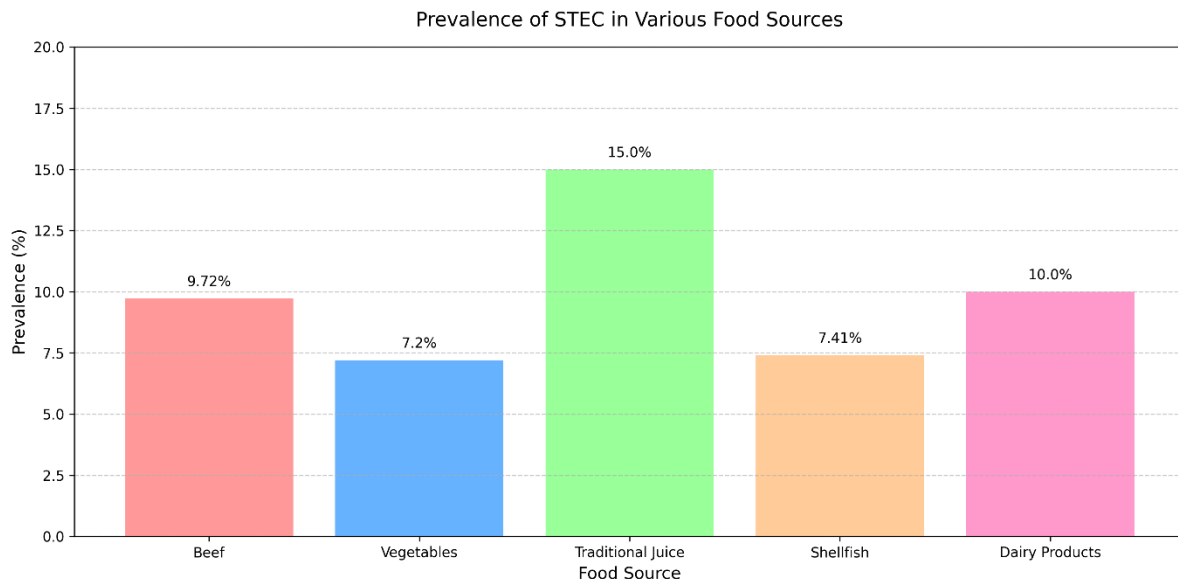
سروگروپ های غیر-O157 STEC، مانند O26، O111 و O177، به طور فزاینده ای به دلیل پتانسیل بیماری زایی خود شناخته شده اند و اغلب حامل ژن های stx1، stx2 و eae همراه با ترکیبات ژنی منحصربه فرد هستند (جدول ۲) (۳,۲۰). برای مثال، جدایه های O26 از گوشت گاو اغلب ژن های stx1 و espA (تا ۳۳,۳٪) را دارا هستند که توانایی چسبندگی آنها را افزایش می دهد (۲۰). این سروگروپ ها که در غذاهای متنوعی مانند لبنیات و سبزیجات شناسایی شده اند، پروفایل های بیماری زایی متغیری دارند و شیوع ehxA در سویه های صدف تا ۴۰٪ گزارش شده است (جدول ۱، جدول ۲) (۲۱). تنوع ژنتیکی سروگروپ های غیر-O157 STEC، که توسط عناصر ژنتیکی متحرک ایجاد می شود، نیاز به نظارت هدفمند برای مقابله با تهدید رو به رشد سلامت عمومی را ایجاد می کند (۳,۲۳).

### الگوهای مقاومت آنتی بیوتیکی

مقاومت آنتی بیوتیکی در STEC یک نگرانی جدی است و نرخ های بالایی از مقاومت به آمپی سیلین (تا ۹۱,۷٪)، تتراسایکلین (تا ۹۱,۷٪) و تری متوپریم-سولفامتوکسازول (تا ۸۳,۳٪) مشاهده شده است (جدول ۱) (۵,۱۶,۲۲). سم ایجادکننده شینگا از نوع E. coli در ۱۴,۱۸٪ از نمونه های شیر و محصولات لبنی یافت شده، که با سرولوژی های O26 (۱۷,۶۴٪) و O157 (۱۳,۷۲٪) که مقاومت بالایی به تتراسیلین نشان دادند و این مقاومت به ژن های tetA و tetB مرتبط بود (۳۷). مقاومت به نالیدیکسیک اسید (تا ۹۱,۴٪) و استرپتومایسین (تا ۷۵٪) نیز به ویژه در سویه های طیور و لبنیات شایع است (۱۶,۱۸). مقاومت پایین به ایمپنم (۷,۷٪) و مرپنم (۰٪) نشان می دهد که این داروها همچنان گزینه های درمانی مؤثری هستند (۱,۵).

O157 مانند O26، O111 و O177 را بهبود می‌بخشند

(جدول ۲) (۳،۲۰،۲۳).



شکل ۱: شیوع STEC در منابع غذایی مختلف: شیوع اشریشیا کلی تولیدکننده توکسین شیگا (STEC) در منابع غذایی مختلف، از ۷،۲٪ در سبزیجات، ۹،۷۲٪ در گوشت گاو، با نرخ‌های بالاتر در محصولات سنتی مانند آبمیوه (۱۵٪) و صدف‌ها (۷،۴۱٪).

جدول ۱: شیوع، ژن‌های بیماری‌زایی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی STEC در منابع غذایی

| Food Source | Prevalence (%) | Virulence Genes                                         | Resistance Genes               | MDR (%) | Reference |
|-------------|----------------|---------------------------------------------------------|--------------------------------|---------|-----------|
| گوشت گاو    | 9.72–52        | eae (33.3%) ,stx2 (90.5%)<br>hlyA (47.8%) ,ehxA (58.3%) | tetA (55.7%)<br>blaTEM (30.6%) | 83.3    | ۳، ۸، ۵   |
| گوشت خوک    | 1.74–5.56      | ehxA (58.3%) ,stx2 (90.5%)                              | -                              | -       | ۱۹، ۵     |
| گوشت مرغ    | 1.39–8         | stx2 (33.3%) ,stx1 (16.1%)                              | tetA (50%)                     | -       | ۶، ۸، ۵   |
| لبنیات      | 10–27.4        | eae (59.6%) ,stx1 (67.3%)                               | blaTEM (84.5%)                 | 60.9    | ۴، ۱      |
| آبمیوه      | 8–15           | stx2 (48.1%) ,stx1 (67.3%)                              | aadA1 (76.9%)                  | -       | ۱         |
| سبزیجات     | 0.3–12         | -                                                       | blaSHV (12.5%)                 | 17.2    | ۴، ۸      |
| صدف         | 5.93–8.89      | stx2 (15%) ,eae (55%)                                   | -                              | 100     | ۸         |

## نقش منابع محیطی در پایداری و انتقال STEC

منابع محیطی مانند آب‌های سطحی، خاک، و فاضلاب‌های کشاورزی به عنوان مخازن اصلی اشریشیا کلی تولیدکننده توکسین شیکا (STEC) شناخته شده‌اند و نقش مهمی در انتقال این پاتوژن به زنجیره غذایی ایفا می‌کنند (۶،۲۷). مطالعات نشان داده‌اند که STEC می‌تواند در آب‌های آلوده به مدفوع حیوانی برای هفته‌ها زنده بماند و از طریق آبیاری محصولات کشاورزی مانند سبزیجات برگ‌دار به انسان منتقل شود (۶،۲۴). برای مثال، شیوع ۰،۳ تا ۱۲٪ در سبزیجات (شکل ۱) اغلب به استفاده از آب آلوده مرتبط است (۱۸). ژن‌های بیماری‌زایی مانند stx1 (تا ۹۸،۳٪) و stx2 (تا ۹۰،۵٪) از طریق باکتریوفاژها در محیط منتقل می‌شوند و تنوع ژنتیکی سویه‌ها را افزایش می‌دهند (شکل ۲) (۲۰،۲۷). خاک‌های غنی از مواد آلی در مزارع دامداری نیز بقای طولانی‌مدت STEC را تسهیل می‌کنند (۳۲). سروگروپ‌های غیر-O157 مانند O26 و O177، که در منابع محیطی شیوع بیشتری دارند، چالش‌های نظارتی را به دلیل تنوع ژنتیکی ناشی از عناصر متحرک افزایش می‌دهند (جدول ۲) (۳،۲۰). برای کاهش این خطرات، تصفیه فاضلاب، نظارت منظم بر منابع آبی، و مدیریت پسماندهای کشاورزی ضروری است (۲۴،۳۲). مدل‌های پیش‌بینی مبتنی بر داده‌های محیطی می‌توانند مناطق پرخطر را شناسایی کنند و به پیشگیری از شیوع کمک کنند (۳۳). این اقدامات با استراتژی‌های ایمنی غذایی مانند HACCP همخوانی دارند و می‌توانند بار بیماری‌های منتقله از غذا را کاهش دهند (۱،۱۹).

## فناوری‌های نوین در تشخیص و ردیابی STEC

پیشرفت‌های اخیر در فناوری‌های تشخیص مانند توالی‌یابی کل ژنوم (WGS) و حسگرهای زیستی مبتنی بر CRISPR شناسایی اشریشیا کلی تولیدکننده توکسین شیکا (STEC) را متحول کرده‌اند WGS (7,28,34). امکان شناسایی دقیق ژن‌های بیماری‌زایی (stx1, stx2, eae) و مقاومت آنتی‌بیوتیکی (blaTEM, aadA1) را فراهم می‌کند و ردیابی منشأ سویه‌ها در شیوع‌های غذایی را بهبود داده است (شکل ۲) (۲۰،۲۸). برای مثال، WGS نشان داد که سویه‌های

O26 مرتبط با سندرم همولیتیک اورمیک (HUS) منشأ گاوی دارند، که اطلاعات کلیدی برای کنترل شیوع فراهم کرد (جدول ۲) (۲۰). حسگرهای CRISPR، همان‌طور که Delannoy و همکاران (۲۰۱۶) گزارش کردند، تشخیص سریع و ارزان STEC را با حساسیت بالا امکان‌پذیر کرده‌اند، به‌ویژه برای سروگروپ‌های غیر O157-مانند O111 و O177 (جدول ۲) (۳،۲۸). این فناوری‌ها نسبت به PCR سنتی زمان تشخیص را کاهش داده و در مناطق کم‌منابع کاربرد دارند (۲۹). با این حال، هزینه بالای WGS و نیاز به زیرساخت‌های پیشرفته، استفاده از آن را در بازارهای سنتی محدود کرده است (۷). توسعه حسگرهای قابل حمل و آموزش تکنسین‌ها می‌تواند این محدودیت‌ها را برطرف کند (۲۸،۲۹). ادغام داده‌های WGS با شبکه‌های نظارتی جهانی، همان‌طور که Pires و همکاران (۲۰۱۹) پیشنهاد کردند، پاسخ به شیوع‌ها را تسریع می‌کند (۳۱). این فناوری‌ها با استراتژی‌های نظارتی مقاله همخوانی دارند و می‌توانند شناسایی STEC را در منابع غذایی مانند گوشت گاو و لبنیات بهبود بخشند (جدول ۱) (۱،۵).

## تأثیر تغییرات اقلیمی بر شیوع و پایداری STEC

تغییرات اقلیمی، از جمله افزایش دما و رطوبت، بر پایداری و شیوع اشریشیا کلی تولیدکننده توکسین شیکا (STEC) در زنجیره غذایی تأثیر می‌گذارد (۳۰،۳۱). افزایش دما بقای STEC را در خاک و آب‌های سطحی تقویت می‌کند، که به آلودگی محصولات کشاورزی مانند سبزیجات (۳،۱۲٪؛ شکل ۱) کمک می‌کند (۶،۳۱). Cunningham و همکاران (۲۰۲۴) گزارش کردند که شیوع STEC O157 در کاهو در انگلستان به دلیل بارندگی‌های شدید ناشی از تغییرات اقلیمی افزایش یافت (۳۰). ژن stx2 (۹۰،۵٪) در گوشت گاو، جدول ۱) در شرایط گرم‌تر پایداری بیشتری دارد و خطر انتقال را افزایش می‌دهد (شکل ۲) (۵،۳۱). تغییرات اقلیمی همچنین می‌توانند الگوهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی را تحت تأثیر قرار دهند، زیرا فشارهای محیطی انتخاب سویه‌های مقاوم به چند دارو (MDR) را تسریع می‌کنند (جدول ۱) (۲۲،۳۱). برای مثال، افزایش استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در دامداری برای مقابله با بیماری‌های مرتبط با گرما، شیوع ژن mcr-1 را در گوشت گاو تقویت کرده است (۵،۲۴).

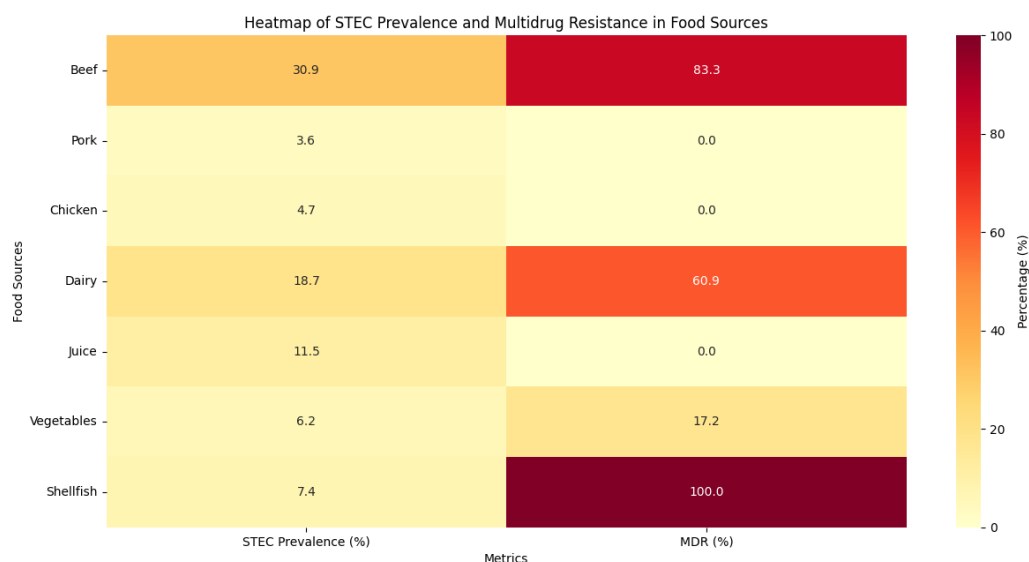
که در چارچوب‌های HACCP پیشنهاد شده، ضروری است (۱۰،۱۹). تحقیقات آینده باید مدل‌سازی اثرات بلندمدت تغییرات اقلیمی بر اپیدمیولوژی STEC را اولویت‌بندی کند (۳۱).

استراتژی‌های سازگار با تغییرات اقلیمی، مانند مدیریت بهتر منابع آبی و فناوری‌های کشاورزی مقاوم به گرما، می‌توانند این خطرات را کاهش دهند (۳۰،۳۱). آموزش کشاورزان درباره تأثیرات اقلیمی بر ایمنی غذایی، همان‌طور

جدول ۲: تنوع سروتایپ‌های STEC و ارتباط با منابع غذایی

| سروتایپ  | منبع غذایی       | بخش<br>رفرنس | ژن‌های بیماری‌زایی گزارش‌شده            | توضیحات                   |
|----------|------------------|--------------|-----------------------------------------|---------------------------|
| O157:H7  | گوشت گاو         | ۵            | stx2 (90.5%), eae (33.3%), ehxA (58.3%) | -                         |
| O26:H11  | گوشت خوک،<br>صدف | ۲۰، ۵        | stx2, eae                               | شایع در موارد بالینی      |
| O111:HNM | گوشت مرغ         | ۵            | -                                       | -                         |
| O177:H25 | گوشت گاو         | ۳            | hlyA (47.8%)                            | مرتبط با آلودگی گله       |
| O128:H2  | صدف، سبزیجات     | ۸، ۶         | stx2 (15%)                              | تنوع در منابع<br>غیرگوشتی |

شکل ۲: نقشه حرارتی شیوع اشرشیا کلای تولیدکننده توکسین شینگلا (STEC) و مقاومت چند دارویی در منابع غذایی



O157 مانند O26 و O177 را بهبود بخشیده‌اند، اما کاربرد محدود آن‌ها در بازارهای سنتی همچنان یک مانع است [۳، ۲۱، ۲۸]. تشکیل بیوفیلم توسط STEC روی سطوح فرآوری مواد غذایی، همان‌طور که در مطالعات اخیر بررسی شده، حذف این پاتوژن را دشوار می‌کند و نیاز به فناوری‌های نوین ضدعفونی، مانند نانوذرات یا عوامل ضد میکروبی طبیعی، را برجسته می‌سازد. [29]

عوامل محیطی و اقلیمی نیز نقش مهمی در پایداری STEC دارند. منابع آلوده مانند آب و خاک، به‌عنوان مخازن محیطی، به گسترش STEC در زنجیره غذایی کمک می‌کنند [۶، ۲۷]. همچنین، تغییرات اقلیمی، از جمله افزایش دما و رطوبت، ممکن است بقای STEC را در محیط‌های کشاورزی تقویت کند، که نیازمند تحقیقات بیشتر برای ارزیابی این تأثیرات است [۳۰]. برای مقابله با این چالش‌ها، استراتژی‌های یکپارچه مانند پیاده‌سازی سیستم تحلیل خطر و نقاط کنترل بحرانی (HACCP)، آموزش تولیدکنندگان و مصرف‌کنندگان، و توسعه فناوری‌های تشخیص سریع مانند حسگرهای زیستی مبتنی بر CRISPR می‌توانند مؤثر باشند [۱، ۱۹، ۲۸]. همکاری بین‌المللی برای استانداردسازی مقررات و اشتراک داده‌های ژنومی و اپیدمیولوژیک، همان‌طور که در شبکه‌های نظارتی جهانی پیشنهاد شده، می‌تواند به کاهش تهدیدات STEC کمک کند [۳۱]. تحقیقات آینده باید بر بهبود زیرساخت‌های بهداشتی، ارزیابی اثربخشی فناوری‌های نوین، و ردیابی مخازن محیطی تمرکز کند تا رویکردهای جامعی برای کنترل STEC ارائه شود [۲۴، ۲۷].

#### نتیجه‌گیری

این مرور چالش‌های چندوجهی ناشی از STEC در ایمنی مواد غذایی را برجسته می‌کند که با شیوع بالا، ژن‌های بیماری‌زایی قوی و مقاومت گسترده آنتی‌بیوتیکی هدایت می‌شوند (جدول ۱، شکل ۱). کنترل مؤثر این شرایط نیازمند استراتژی‌های یکپارچه، از جمله پیاده‌سازی HACCP، مدیریت صحیح آنتی‌بیوتیک‌ها و استفاده از روش‌های تشخیص پیشرفته است. تقویت مقررات، به‌ویژه در بازارهای سنتی، و ترویج آموزش مصرف‌کنندگان برای

شیوع جهانی اشریشیا کلی تولیدکننده توکسین شیکا (STEC) در محصولات غذایی، از ۰.۵٪ در سبزیجات تا ۵۲٪ در گوشت گاو، نشان‌دهنده تفاوت‌های قابل‌توجه در شیوه‌های تولید و استانداردهای بهداشتی منطقه‌ای است [۱، ۱۸، ۲۴]. این تنوع، همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده، به‌ویژه در محصولات سنتی مانند آب‌میوه (تا ۲۰٪) و لبنیات (تا ۴۲،۹٪) برجسته است و نیاز به بهبود فرآیندهای پاستوریزاسیون و نظارت بهداشتی می‌باشد [۱، ۴]. حضور ژن‌های بیماری‌زایی مانند stx2، eae و ehxA در سویه‌های EHEC، به‌ویژه در گوشت گاو و لبنیات (جدول ۱)، با پیامدهای بالینی شدید مانند سندرم همولیتیک اورمیک (HUS) همخوانی دارد [۳، ۲۳]. این ژن‌ها، که در ۰.۵٪ و ۵۹،۶٪ از جدایه‌ها به ترتیب برای stx2 و eae شناسایی شدند، نشان‌دهنده پتانسیل بالای بیماری‌زایی این سویه‌هاست. [5، 1]

مقاومت آنتی‌بیوتیکی، به‌ویژه مقاومت چنددارویی (MDR)، درمان عفونت‌های STEC را به چالش کشیده است. شیوع بالای ژن‌های مقاومتی مانند blaTEM (تا ۸۴،۵٪) و aadA1 (تا ۷۶،۹٪) در جدایه‌های غذایی و بالینی، که در جدول ۱ گزارش شده، به استفاده نادرست از آنتی‌بیوتیک‌ها در کشاورزی نسبت داده می‌شود [۵، ۲۲]. ظهور سویه‌های تولیدکننده بتالاکتاماز با طیف گسترده (ESBL) و مقاومت به کولیستین (mcr-1)، به‌ویژه در گوشت گاو و طیور، نیاز به برنامه‌های مدیریت دقیق‌تر آنتی‌بیوتیک‌ها را ضروری می‌سازد [۵، ۲۴]. علاوه بر این، انتقال افقی ژن‌های مقاومت و بیماری‌زایی از طریق پلاسمیدها و باکتریوفازها، همان‌طور که در مطالعات اخیر گزارش شده، پیچیدگی اپیدمیولوژی STEC را افزایش داده و ردیابی این سویه‌ها را دشوارتر می‌کند. [20، 27]

چالش‌های ایمنی غذایی با مقررات ناهماهنگ، به‌ویژه در بازارهای سنتی، و نظارت ناکافی در مناطق در حال توسعه تشدید می‌شود [۱، ۱۹]. روش‌های تشخیص پیشرفته، مانند توالی‌یابی کل ژنوم (WGS) و محیط‌های کروموزنیک (مانند CHROMagar STEC)، شناسایی سویه‌های غیر-

---

کاهش خطرات مرتبط با STEC حیاتی است. این یافته‌ها پایه‌ای برای مداخلات هدفمند به منظور ارتقای ایمنی غذایی جهانی فراهم می‌کنند.

1. Shahrivar E, Rahimi E, Khamesipour F. Prevalence, identification of virulence genes, and antibiotic resistance properties of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) strains isolated from ice cream and juice in sales centers. *BMC Infectious Diseases*. 2025 Apr 22;25(1):581.
2. Ramatla T, Motlhaping T, Ndlovu N, Mileng K, Howard J, Khasapane G, Ramaili T, Mokgokong P, Nkhebenyane J, Ndou R, Lekota K. Molecular Detection of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O177 Isolates, Their Antibiotic Resistance, and Virulence Profiles From Broiler Chickens. *International Journal of Microbiology*. 2024;2024(1):9778058.
3. Bonardi S, Conter M, Andriani L, Bacci C, Magagna G, Rega M, Lamperti L, Loiudice C, Pierantoni M, Filipello V. Emerging of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O177: H11 and O177: H25 from cattle at slaughter in Italy. *International Journal of Food Microbiology*. 2024 Oct 2;423:110846.
4. Ribeiro LF, Rossi GA, Sato RA, de Souza Pollo A, Cardozo MV, Amaral LA, Fairbrother JM. Epidemiology, Virulence and Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* Isolated from Small Brazilian Farms Producers of Raw Milk Fresh Cheese. *Microorganisms*. 2024 Aug 22;12(8):1739.
5. Duc HM, Ha CT, Hoa TT, Hung LV, Thang NV, Son HM. Prevalence, molecular characterization, and antimicrobial resistance profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from raw beef, pork, and chicken meat in Vietnam. *Foods*. 2024 Jun 28;13(13):2059.
6. Alotaibi K, Khan AA. Prevalence and Molecular Characterization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* from Food and Clinical Samples. *Pathogens*. 2023 Oct 31;12(11):1302.
7. Nouws S, Verhaegen B, Denayer S, Crombé F, Piérard D, Bogaerts B, Vanneste K, Marchal K, Roosens NH, De Keersmaecker SC. Transforming Shiga toxin-producing *Escherichia coli* surveillance through whole genome sequencing in food safety practices. *Frontiers in Microbiology*. 2023 Jul 13;14:1204630.
8. van Hoek AH, Lee S, van den Berg RR, Rapallini M, van Overbeeke L, Opsteegh M, Bergval I, Wit B, van der Weijden C, Van Der Giessen J, van der Voort M. Virulence and antimicrobial resistance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from dairy goat and sheep farms in The Netherlands. *Journal of Applied Microbiology*. 2023 Jun;134(6):lxad119.
9. Yihunie FB, Belete MA, Fentahun G, Dubie T. Molecular detection and antibiogram of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) from raw milk in and around Bahir Dar town dairy farms, Ethiopia. *Heliyon*. 2024 Apr 15;10(7).
10. Duc HM, Hoa TT, Ha CT, Hung LV, Thang NV, Son HM, Flory GA. Antibiotic resistance profile and bio-control of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from raw milk in Vietnam using bacteriophages. *Pathogens*. 2024 Jun 9;13(6):494.
11. Gupta MD, Sen A, Shaha M, Dutta A, Das A. Occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* carrying antimicrobial resistance genes in sheep on

- smallholdings in Bangladesh. *Veterinary Medicine and Science*. 2022 Nov;8(6):2616-22.
12. Zhang S, Bai Z, Wang Z, Wang X, Wang W, Li H, Dong Q. Molecular characterization and phylogeny of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* derived from cattle farm. *Frontiers in Microbiology*. 2022 Aug 4;13:950065.
  13. Nada HG, El-Tahan AS, El-Didamony G, Askora A. Detection of multidrug-resistant Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in some food products and cattle faeces in Al-Sharkia, Egypt: one health menace. *BMC microbiology*. 2023 May 12;23(1):127.
  14. Hasona IF, Helmy SM, El Gamal AM. Prevalence, virulence factors, and antimicrobial resistance profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from broiler chickens in Egypt. *In Veterinary Research Forum* 2023 Mar 15 (Vol. 14, No. 3, p. 131).
  15. Guragain M, Schmidt JW, Bagi LK, Paoli GC, Kalchayanand N, Bosilevac JM. Antibiotic Resistance and Disinfectant Resistance Among *Escherichia coli* Isolated During Red Meat Production. *Journal of Food Protection*. 2024 Jun 1;87(6):100288.
  16. Zarei O, Shokoohizadeh L, Hossainpour H, Alikhani MY. The Prevalence of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and Enteropathogenic *Escherichia coli* Isolated from Raw Chicken Meat Samples. *International Journal of Microbiology*. 2021;2021(1):3333240.
  17. Díaz L, Gutierrez S, Moreno-Switt AI, Hervé LP, Hamilton-West C, Padola NL, Navarrete P, Reyes-Jara A, Meng J, González-Escalona N, Toro M. Diversity of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle from central and southern Chile. *Animals*. 2021 Aug 13;11(8):2388.
  18. Kholdi S, Motamedifar M, Fani F, Mohebi S, Bazargani A. Virulence factors, serogroups, and antibiotic resistance of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* from raw beef, chicken meat, and vegetables in Southwest Iran. *Iranian Journal of Veterinary Research*. 2021;22(3):180.
  19. Shen J, Zhi S, Guo D, Jiang Y, Xu X, Zhao L, Lv J. Prevalence, antimicrobial resistance, and whole genome sequencing analysis of shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) from imported foods in China during 2015–2021. *Toxins*. 2022 Jan 19;14(2):68.
  20. Michelacci V, Montalbano Di Filippo M, Gigliucci F, Arancia S, Chiani P, Minelli F, Roosens NH, De Keersmaecker SC, Bogaerts B, Vanneste K, Morabito S. Population Analysis of O26 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Causing Hemolytic Uremic Syndrome in Italy, 1989–2020, Through Whole Genome Sequencing. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2022 Feb 9;12:842508.
  21. Al Qabili DM, Aboueisha AK, Ibrahim GA, Youssef AI, El-Mahallawy HS. Virulence and antimicrobial-resistance of shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) isolated from edible shellfish and its public health significance. *Archives of Microbiology*. 2022 Aug;204(8):510.
  22. Jafari E, Oloomi M, Bouzari S. Characterization of antimicrobial susceptibility, extended-spectrum  $\beta$ -lactamase genes and phylogenetic groups of

- Shigatoxin producing *Escherichia coli* isolated from patients with diarrhea in Iran. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2021 Dec;20:1-9.
23. Gigliucci F, van Hoek AH, Chiani P, Knijn A, Minelli F, Scavia G, Franz E, Morabito S, Michelacci V. Genomic characterization of hlyF-positive Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, Italy and the Netherlands, 2000–2019. *Emerging infectious diseases*. 2021 Mar;27(3):853.
24. Sánchez F, Fuenzalida V, Ramos R, Escobar B, Neira V, Borie C, Lapierre L, López P, Venegas L, Dettleff P, Johnson T. Genomic features and antimicrobial resistance patterns of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from food in Chile. *Zoonoses and Public Health*. 2021 May;68(3):226-38.
25. Nemati A, Askari Badouei M, Tabar H. Molecular and in Silico analyses for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and highly pathogenic enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) using genetic markers located on plasmid, O Island 57 and O Island 71. *BMC Vet Res*. 2024;20:413.
26. Travert B, Rafat C, Mariani P, et al. Shiga Toxin-Associated hemolytic uremic syndrome: specificities of adult patients and implications for critical care management. *Toxins (Basel)*. 2021;13(5):306. <https://doi.org/10.3390/toxins13050306>. Published 2021 Apr 26.
27. GM Gonzalez A, MF Cerqueira A. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in the animal reservoir and food in Brazil. *Journal of applied microbiology*. 2020 Jun;128(6):1568-82.
28. Delannoy S, Beutin L, Fach P. Improved traceability of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* using CRISPRs for detection and typing. *Environmental Science and Pollution Research*. 2016 May;23:8163-74.
29. Patel, S. K., Kumar, V., & Singh, R. (2022). Biofilm formation by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in food processing environments: Challenges and novel disinfection strategies. *Journal of Applied Microbiology*, 133(4), 2105-2116.
30. Cunningham N, Jenkins C, Williams S, Garner J, Eggen B, Douglas A, Potter T, Wilson A, Leonardi G, Larkin L, Hopkins S. An outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O157: H7 associated with contaminated lettuce and the cascading risks from climate change, the United Kingdom, August to September 2022. *Eurosurveillance*. 2024 Sep 5;29(36):2400161.
31. Pires SM, Majowicz S, Gill A, Devleesschauwer B. Global and regional source attribution of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections using analysis of outbreak surveillance data. *Epidemiology & Infection*. 2019 Jan;147:e236.
32. Fremaux B, Prigent-Combaret C, Vernozy-Rozand C. Long-term survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle effluents and environment: an updated review. *Veterinary microbiology*. 2008 Nov 25;132(1-2):1-8.
33. Hellberg RS, Chu E. Effects of climate change on the persistence and dispersal of foodborne bacterial pathogens in the outdoor environment: A review. *Critical reviews in microbiology*. 2016 Jul 3;42(4):548-72.
34. Sun Y, Li J, Zhu L, Jiang L. Cooperation and competition between CRISPR-and omics-based technologies in foodborne pathogens detection: a state of

the art review. Current Opinion in Food Science. 2022 Apr 1;44:100813.

35. Ranjbar R, Safarpour Dehkordi F, Sakhaei Shahreza MH, Rahimi E. Prevalence, identification of virulence factors, O-serogroups and antibiotic resistance properties of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* strains isolated from raw milk and traditional dairy products. Antimicrobial Resistance & Infection Control. 2018 Dec;7:1-1.

36. Momtaz H, Dehkordi FS, Rahimi E, Ezadi H, Arab R. Incidence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroups in ruminant's meat. Meat science. 2013 Oct 1;95(2):381-8.

37. Momtaz H, Farzan R, Rahimi E, Safarpour Dehkordi F, Souod N. Molecular characterization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* isolated from ruminant and donkey raw milk samples and traditional dairy products in Iran. The Scientific World Journal. 2012;2012(1):231342.

38. Shahreza MH, Rahimi E, Momtaz H. Shiga-toxigenic *Escherichia coli* in ready-to-eat food staffs: Prevalence and distribution of putative virulence factors. Microbiology Research. 2017 Nov 22;8(2):7244.

39. Bonyadian M, Momtaz H, Rahimi E, Habibian R, Yazdani A, Zamani M. Identification & characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from patients with diarrhoea in Iran. Indian Journal of Medical Research. 2010 Sep 1;132(3):328-31.



## بررسی آلودگی میکروبی لاشه طیور در طی فرایند تولید در کشتارگاه صنعتی شهرستان نجف آباد

امیر شفیعی دستگردی<sup>۱\*</sup>، حمدالله مشتاقی بروجنی<sup>۲</sup>، مجتبی بنیادیان<sup>۲</sup>

۱- دانش آموخته دکتری بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

۲- استاد گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

\* (نویسنده مسئول)، پست الکترونیک: [moshtaghi@sku.ac.ir](mailto:moshtaghi@sku.ac.ir)

### چکیده

گوشت یکی از مهم ترین نیازهای بشر و از اصلی ترین منبع تأمین پروتئین است. سالمونلوز یکی از شایع ترین عوامل مسمومیت غذایی به شمار می رود که مصرف گوشت آلوده مهم ترین راه انتقال این بیماری مشترک بین انسان و حیوان می باشد. کشتارگاه به عنوان یکی از بخش های مهم در تأمین زنجیره گوشت نقش به سزایی در کنترل و یا شیوع بیشتر این بیماری دارد. با توجه به اینکه لاشه طیور یک منبع مهم آلودگی به این بیماری است، تعیین فراوانی و میزان آلودگی باکتریایی، معیاری برای سنجش وضعیت بهداشتی کشتارگاه ها جهت پیشگیری مخاطرات بهداشتی احتمالی برای مصرف کنندگان محسوب می شود. این پژوهش با هدف ارزیابی وضعیت بهداشتی کشتارگاه طیور نجف آباد در سال ۱۴۰۳ صورت گرفت. بدین منظور، از آب مصرفی در تجهیزات و سطح پوست ناحیه سینه لاشه طیور به صورت تصادفی نمونه برداری انجام شد. همچنین، ۱۷۰ نمونه در ۵ نوبت در طی مراحل مختلف کشتار با روش کشت مرسوم به منظور شناسایی *سالمونلا* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که از ۱۷۰ نمونه، در مجموع ۲۰ نمونه (۱۱/۸ درصد) آلوده به *سالمونلا* بودند. بیشترین میزان آلودگی (۴۵ درصد) در قسمت چیلرها مشاهده شد. یافته های این تحقیق بیانگر آن بود که مقاطع چیلرها، خط تخلیه اندرون و پرکنی از نقاط بحرانی کشتارگاه می باشد. به طور کلی می توان نتیجه گرفت که با توجه به وجود *سالمونلا* در لاشه های طیور، شست و شوی صحیح لاشه و رعایت اصول بهداشتی در تمام مراحل فرایند کشتار جهت تضمین سلامت و بهداشت عمومی ضروری است.

**واژه های کلیدی:** *سالمونلا*، لاشه طیور، کشتارگاه، استان اصفهان.

## مقدمه

اطمینان از بهداشت و ایمنی مواد غذایی مصرفی یکی از جنبه‌های مهم سلامت است و نقش سلامت مواد غذایی مصرفی در سلامتی انسان از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است. گوشت یکی از مهم‌ترین منابع پروتئینی و یکی از اقلام غذایی پر مصرف در تمام کشورها محسوب می‌شود. گوشت طیور یکی از منابع پروتئینی با ارزش است که مصرف آن در سال‌های اخیر به دلیل پایین بودن نسبی هزینه‌های تولید، ارزش غذایی بالا و عدم وجود بیماری‌های مشترک خطرناک در مقایسه با سایر دام‌ها در سراسر جهان افزایش یافته است (Fahim, 2020). با این وجود مصرف گوشت طیور آلوده می‌تواند باعث بروز برخی بیماری‌ها در انسان شود. گوشت مرغ به دلیل داشتن مقادیر بالای پروتئین (۲۱-۱۹٪)، فعالیت آبی زیاد (۹۸-۹۹٪) و pH برابر با محدوده ۴/۷-۶/۶، شرایط مناسبی را برای رشد و تکثیر باکتری‌های بیماری‌زا نظیر *سالمونلا* فراهم می‌کند. لذا، ارزیابی وضعیت بهداشتی گوشت قبل و بعد از کشتار در کشتارگاه‌ها به منظور کنترل انتقال باکتری به انسان و ممانعت از بروز بیماری *سالمونلوزیس* از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Boubendir et al., 2021). *سالمونلا* از خانواده *انتروباکتریاسه*، یک باکتری گرم منفی و میله‌ای شکل است. که بیش از ۲۷۰۰ سروتیپ از آن شناسایی شده است که اغلب آنها در انسان و حیوان باعث عفونت می‌شوند. سروتیپ‌هایی که به میزبان انسان عادت کرده‌اند مانند *سالمونلا* تیفی و *سالمونلا* پارتیفی، بیماری خطرناکی همراه با سندرم عفونت خونی تب روده به وجود می‌آورند. سروتیپ‌هایی که هر دو نوع میزبان انسان و حیوان را تحت تأثیر قرار می‌دهند باعث ایجاد عفونت گاستروانتریت با حدت متفاوت، اسهال اطفال و اسهال مسافری می‌شوند. *سالمونلا* آبورتویس و *سالمونلا* گالیناروم سروتیپ‌هایی هستند که فقط به میزبان حیوان عادت کرده‌اند و معمولاً بدون بیماری‌زایی و یا بیماری بسیار خفیف برای انسان می‌باشند. یکی از شایع‌ترین علل بیماری‌های عفونی با منشأ غذایی در انسان *سالمونلا* می‌باشد که توسط

سروتیپ‌های مختلف *سالمونلا* به ویژه *سالمونلا* تیفی موریوم و *سالمونلا* انترتینیدیس ایجاد می‌شود (Hardie et al., 2019). یکی از اصلی‌ترین عوامل بروز *سالمونلوز* با منشأ غذایی، مصرف گوشت مرغ و فرآورده‌های آن می‌باشد. حداقل دوز عفونی برای ایجاد بیماری *سالمونلوز* ۱۰<sup>۵</sup> تا ۱۰<sup>۶</sup> *سالمونلای* زنده در هر گرم ماده غذایی می‌باشد. مطابق با دستورالعمل استاندارد مواد غذایی در ۲۵ گرم از ماده غذایی هیچ گونه *سالمونلایی* نباید وجود داشته باشد. علائم افراد مبتلا به فرم حاد عفونت *سالمونلوزیس* شامل سردرد، تهوع، استفراغ، درد در قسمت بالای شکم، تب و اسهال است، و فرم حاد این عفونت با علائم آرتریت، آندوکاریت، ذات‌الریه و عفونت دستگاه ادراری همراه می‌باشد (Rodrigues et al., 2019).

افزایش مصرف سالانه گوشت مرغ آلوده، احتمال بروز مسمومیت در مصرف کنندگان این ماده غذایی را افزایش می‌دهد. کشتارگاه‌ها از مهم‌ترین مراکز تهیه و فراوری هستند که نقش مهمی در گسترش و انتقال آلودگی دارند و از طریق آلوده کردن محیط، دستگاه‌ها و تجهیزات، و کارکنان، لاشه‌ها را آلوده نموده و در نهایت با مصرف این فراورده، آلودگی به انسان منتقل و بسته به میزان و حدت باکتری، بیماری به شکل حاد و یا مزمن بروز می‌کند. گزارشات متعدد نشان داده است که نوع سروتیپ، نوع ماده غذایی و شرایط میزبان از عوامل مهم در میزان بیماری‌زایی این باکتری هستند. دستیابی به اطلاعات صحیح و دقیق در رابطه با شیوع *سالمونلا* در طیور، در نظارت کارآمد منابع آلودگی میکروبی برای مسئولان و مدیران مربوطه جهت تدوین و اجرای راهکارهای پیشگیرانه ضرورت دارد تا به کاهش و یا حذف آلودگی به این باکتری کمک کند (Lin et al., 2020). لذا با توجه به اهمیت کیفیت بهداشتی گوشت طیور به عنوان یکی از منابع مهم و اصلی تأمین پروتئین حیوانی و تأثیر شرایط و فرایندهای کشتار بر روی آلودگی لاشه طیور، این تحقیق با هدف بررسی وضعیت بهداشتی کشتارگاه طیور نجف‌آباد طی فرایند تولید به باکتری *سالمونلا* و شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها انجام شد.

## مواد و روش کار

این مطالعه به صورت توصیفی- مقطعی جهت بررسی وضعیت بهداشتی کشتارگاه صنعتی درسا طیور سپاهان واقع در شهرستان نجف آباد طی فرآیند تولید با جداسازی سالمونلا و همچنین ارزیابی تغییرات میکروبی لاشه طیور با شمارش کلی میکروارگانیسم ها صورت پذیرفت. نمونه برداری به روش تصادفی سیستماتیک (از هر محموله تعداد ۵ قطعه لاشه در هر نوبت به مدت ۳ شیفت کاری) از اوایل مرداد تا اواخر آذر سال ۱۴۰۳ انجام شد.

## نمونه برداری

نمونه برداری در نقاط کنترل بحرانی (Critical Control Point = CCP) شامل دو گروه نمونه آب و نمونه مرغ بود که هر کدام به روش مجزا نمونه گیری شد. ابتدا در هر شیفت کاری (نوبت نمونه گیری) از منبع اصلی ورودی آب کشتارگاه یک نمونه آب به عنوان شاهد (O)، قبل و بعد از ورود محموله مورد آزمون به دستگاه قفس شوی (A1) و (A2)، اسکالدر (B1 و B2)، چیلر شستشو (C1 و C2) و چیلر خنک کننده (D1 و D2) انتخاب شد. نمونه برداری از آب این نقاط به طور مجزا به میزان ۲۵ میلی لیتر در نظر گرفته شد و در شرایط استریل درون ظروف شیشه ای دهانه گشاد استریل حاوی محیط کشت پپتون واتر بافری ۱/۵ درصد منتقل گردید. سپس نمونه برداری از نمونه های مرغ به این صورت که از محموله مورد آزمون به تعداد ۵ قطعه مرغ

کشتار شده که به روش تصادفی سیستماتیک انتخاب گردیدند، از خط کشتار جدا شد و با نصب پابند و پلاک فلزی به کتف هر کدام به منظور اطمینان، شماره گذاری و در دفاتر ثبت گزارشات یادداشت گردید. نمونه های مرغ در ۷ نقطه مختلف نمونه برداری شدند که شامل نمونه مدفوعی از کلوک (E)، نمونه لاشه مرغ پس از پرکنی (F)، نمونه جگر مرغ بلافاصله پس از تخلیه (G)، نمونه لاشه مرغ پس از تخلیه کامل اندرون (H)، نمونه مرغ پس از چیلر شستشو (J)، نمونه لاشه مرغ پس از چیلر خنک کننده (K) و نمونه مرغ پس از قطعه بندی و شینسل زنی (M) بودند. به استثنای نمونه شماره E، که با روش سواپ مقعدی و قرار دادن آن درون ظروف محتوی پپتون واتر بافری نمونه برداری شد، نمونه گیری از سایر نقاط فوق به روش غوطه وری لاشه درون نایلون حاوی ۲۵۰ میلی لیتر محیط بافری پپتون واتر انجام گردید. سپس نمونه داخل نایلون به مدت ۱ دقیقه تکان داده شد و نمونه مرغ به خط کشتار جهت نمونه گیری مجدد آن در نقاط مشخص شده بعدی، زده شد. سپس جمع آوری و انتقال محتویات داخل نایلون به ظروف درب دار مخصوص انجام گرفت و ظروف حاوی نمونه با رعایت شرایط استریل در یونولیت و کارتن مخصوص جهت جلوگیری از شکستن و ریختن محتویات بسته بندی و مدت کمتر از ۸ ساعت به آزمایشگاه ارسال گردید.

جدول (۱) آمار توصیفی محل های نمونه گیری جهت جداسازی سالمونلا و شمارش کلی میکروارگانیسم ها

| ردیف | محل نمونه گیری                   | نام/کد نمونه | تعداد نمونه (سالمونلا) | تعداد نمونه (شمارش کلی میکروب ها) |
|------|----------------------------------|--------------|------------------------|-----------------------------------|
| ۱    | آب ورودی اصلی                    | O            | ۳                      | ۳                                 |
| ۲    | آب قفس شوی قبل از ورود محموله    | A1           | ۳                      | ۳                                 |
| ۳    | آب قفس شوی پس از ورود محموله     | A2           | ۶                      | ۳                                 |
| ۴    | آب اسکالدر قبل از ورود محموله    | B1           | ۳                      | ۳                                 |
| ۵    | آب اسکالدر پس از ورود محموله     | B2           | ۷                      | ۳                                 |
| ۶    | آب چیلر شستشو قبل از ورود محموله | C1           | ۳                      | ۳                                 |
| ۷    | آب چیلر شستشو پس از ورود محموله  | C2           | ۷                      | ۴                                 |

|    |                                          |    |     |     |
|----|------------------------------------------|----|-----|-----|
| ۸  | آب چیلر خنک کننده قبل از ورود محموله     | D1 | ۳   | ۳   |
| ۹  | آب چیلر خنک کننده پس از ورود محموله      | D2 | ۷   | ۴   |
| ۱۰ | نمونه مدفوع مرغ پس از ذبح (سواپ از کلوک) | E  | ۲۱  | ۰   |
| ۱۱ | نمونه مرغ پس از خروج از پرکن ها          | F  | ۱۶  | ۱۵  |
| ۱۲ | نمونه جگر مرغ پس از خروج از شکم          | G  | ۱۶  | ۱۷  |
| ۱۳ | نمونه مرغ پس از تخلیه کامل اندرون        | H  | ۱۶  | ۱۵  |
| ۱۴ | نمونه مرغ پس از پابری                    | I  | ۱   | ۰   |
| ۱۵ | نمونه مرغ پس از خروج از چیلر شستشو       | J  | ۱۶  | ۱۵  |
| ۱۶ | نمونه مرغ پس از خروج از چیلر خنک کننده   | K  | ۱۶  | ۱۷  |
| ۱۷ | نمونه مرغ بسته بندی شده                  | L  | ۳   | ۱۸  |
| ۱۸ | نمونه مرغ پس از شینسل وقطعه بندی کامل    | M  | ۱۹  | ۰   |
| ۱۹ | نمونه خرده گوشت مرغ                      | N  | ۳   | ۰   |
| ۲۰ | نمونه پای مرغ                            | P  | ۱   | ۰   |
|    | جمع کل                                   | -  | ۱۷۰ | ۱۲۶ |

#### - تأیید کلنی های سالمونلا:

پس از مشخص شدن نمونه های مشکوک به سالمونلا (مشاهده کلنی های صورتی)، به منظور خالص سازی، از هر نمونه مشکوک حداقل ۲ کلنی تک انتخاب و مشابه روش قبل کشت داده شد، و سپس مورد آزمون های بیوشیمیایی (TSI، Urease، IMVIC و LIA) قرار گرفت.

#### شمارش کلی میکروارگانیسم ها

بدین منظور، ابتدا رقت سازی سریالی با استفاده از محلول آب پپتونه ۰/۱ درصد استریل بر روی نمونه ها انجام شد. سپس از هر رقت به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر بر روی محیط پلیت کانت آگار به روش شمارش صفحه ای سطحی کشت داده شد. پلیت ها در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری شدند. برای شمارش کلی، پلیت های دارای ۳۰-۳۰۰ پرگنه انتخاب گردیدند (Ibrahim et al., 2015).

#### تجزیه و تحلیل آماری

آنالیز نتایج به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام شد، و بر اساس آزمون های آمار توصیفی (تعیین

#### کشت و جداسازی سالمونلا

جست و جو و شناسایی سالمونلا بر اساس مراحل زیر طبق دستورالعمل استاندارد ملی ایران به شماره ۱-۱۸۱۰ انجام شد:

- مرحله پیش غنی سازی: در این مرحله نمونه مورد آزمون در آب پپتونه بافوری که به دمای محیط آزمایشگاه رسیده است، تلقیح شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری گردید.

- کشت انتخابی: از کشت حاصل به محیط کشت راپاپورت واسیلیادیس حاوی سویا (RVS براث) یا راپاپورت واسیلیادیس نیمه جامد اصلاح شده (MSRV) آگار و مولر کافمن تتراتیونات نوو بیوسین براث (MKTTn براث) تلقیح گردید. RVS براث یا MSRV آگار در دمای ۴۱۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت و MKTTn براث در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شد.

- جداسازی با محیط انتخابی: از کشت همگن شده مرحله قبل به محیط کشت برلیانت گرین آگار (BGA) به روش کشت خطی تلقیح شد، و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری گردید.

درصد و میانگین) توصیف گردید. حداقل اختلاف معنی دار با  $p < 0.05$  مورد پذیرش بود.

### نتایج

در این تحقیق، در مجموع ۱۷۰ نمونه جهت جداسازی سالمونلا و ۱۲۶ نمونه جهت شمارش کلی باکتری‌ها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که از مجموع ۱۷۰ نمونه با ۴ تکرار (۶۵۱ نمونه)، ۳۰ نمونه (۴/۶ درصد) دارای آلودگی سالمونلایی بودند. با توجه به اینکه برخی نمونه‌ها در تمامی تکرارهای خود مثبت بودند، در پایان برای هر نمونه مثبت فقط یک تکرار در نظر گرفته شد و ثبت گردید.

به این ترتیب از مجموع کل ۱۷۰ نمونه اخذ شده، ۲۰ نمونه (۱۱/۸ درصد) دارای آلودگی سالمونلایی بودند. نتایج حاصل از نمونه‌های اخذ شده در نقاط مختلف خط تولید کشتارگاه نشان داد که از مجموع نمونه‌های مثبت، ۱ نمونه (۵ درصد) مربوط به نمونه‌های مرحله آزمایشی، ۲ نمونه (۱۰ درصد) مربوط به مرحله ابتدایی فرآیند کشتار، ۱۶ نمونه (۸۰ درصد) مربوط به مرحله میانی فرآیند کشتار، و ۱ نمونه (۵ درصد) مربوط به مرحله انتهایی فرآیند کشتار بود (جدول ۲).

جدول (۲) آمار توصیفی تعداد نمونه‌ها و مراحل نمونه‌گیری جهت جداسازی سالمونلا در طی فرآیند کشتار در چند شیفت کاری مختلف

| نوبت   | مرحله نمونه گیری | تعداد نمونه | تعداد نمونه مثبت | درصد کل نمونه های مثبت | درصد از کل نمونه های مثبت |
|--------|------------------|-------------|------------------|------------------------|---------------------------|
| اول    | آزمایشی          | ۱۳          | ۱                | ۰/۵۹                   | ۵ <sup>c</sup>            |
| دوم    | آزمایشی          | ۲۵          | ۰                | ۰                      | ۰ <sup>d</sup>            |
| سوم    | ابتدایی کشتار    | ۴۴          | ۲                | ۱/۱۸                   | ۱۰ <sup>b</sup>           |
| چهارم  | میانی کشتار      | ۴۴          | ۱۶               | ۹/۴۱                   | ۸۰ <sup>a</sup>           |
| پنجم   | انتهایی کشتار    | ۴۴          | ۱                | ۰/۵۹                   | ۵ <sup>c</sup>            |
| جمع کل | ۵                | ۱۷۰         | ۲۰               | ۱۱/۸                   | ۱۰۰                       |

حروف غیر مشابه در هر ستون نشان دهنده اختلاف آماری معنی دار برای هر مرحله می‌باشد ( $p < 0.05$ ).

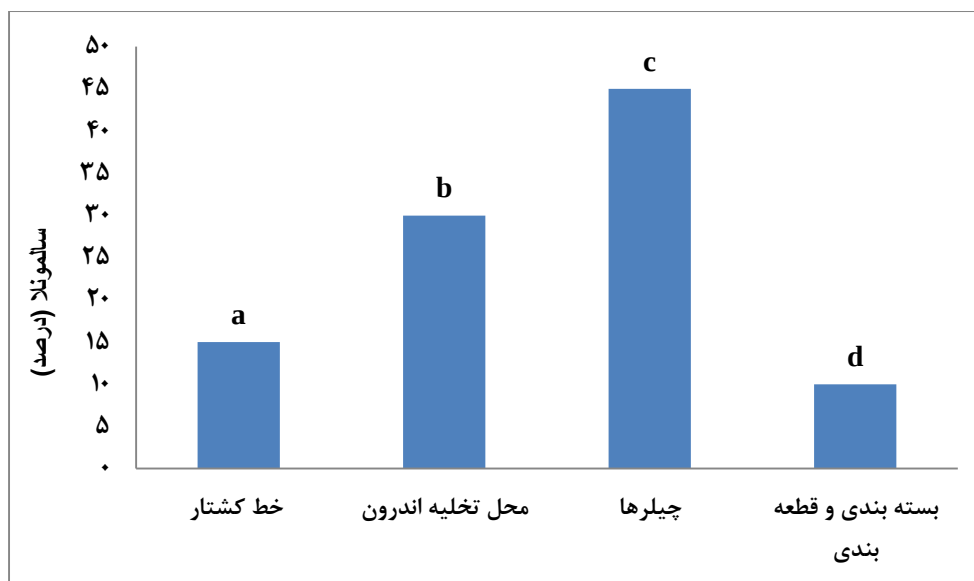
نتایج این تحقیق نشان داد که در نمونه‌های مورد بررسی، میزان آلودگی در نقاط مختلف کشتارگاه به طور معنی داری متفاوت بود ( $p < 0.05$ )، به طوریکه در قسمت خط کشتار (کشیف ترین قسمت کشتارگاه که شامل دستگاه قفس شوی، نمونه‌های سواپ کلوک، قسمت پرکنی و دستگاه اسکالدر می‌باشد) از مجموع ۵۷ نمونه، ۳ نمونه (۱/۸ درصد) آلوده به سالمونلا بودند. در حالیکه، در قسمت تخلیه اندرون که شامل نمونه‌های جگر، و همچنین نمونه‌های مرغ پس از تخلیه امعاء و احشاء می‌باشد، از مجموع ۳۳ نمونه، ۶ نمونه (۳/۵ درصد) آلودگی داشتند. همچنین، در قسمت چیلرها که شامل چیلرهای شستشوی و خنک کننده قبل و بعد از

ورود محموله مورد آزمون، و نمونه‌های مرغ در انتهای این دو چیلر می‌باشد، از مجموع ۵۵ نمونه، ۹ نمونه (۵/۳ درصد) آلودگی داشتند. در قسمت تمیز کشتارگاه که شامل نمونه‌های مرغ بسته بندی شده و نمونه‌های مرغ قطعه بندی شده می‌باشد، از مجموع ۲۵ نمونه، ۲ نمونه (۱/۲ درصد) آلوده به سالمونلا بودند.

لازم به ذکر است که از قسمت خط کشتار به طرف بسته بندی، کل تأسیسات و تجهیزات کشتارگاه به ۴ ناحیه تقسیم بندی شده است که خط کشتار به عنوان کشیف ترین ناحیه و بسته بندی به عنوان تمیزترین ناحیه در نظر گرفته شده است و دو قسمت دیگر یعنی قسمت تخلیه اندرون و

محصولات (۱۰ درصد) و بیشترین میزان آلودگی به قسمت چیلرها (۴۵ درصد) مربوط بود، و میزان آلودگی در قسمت‌های خط کشتار و تخلیه اندرون به ترتیب ۱۵ و ۳۰ درصد به دست آمد ( $p < 0.05$ ).

قسمت چیلرها به ترتیب از نظر رتبه تمیزی نواحی بعد از خط کشتار هستند. نمودار (۱) نتایج میزان آلودگی به سالمونلا در این ۴ ناحیه فرآوری کشتارگاه را نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود کمترین میزان آلودگی به قسمت تمیز خط تولید یعنی محل بسته بندی و قطعه بندی

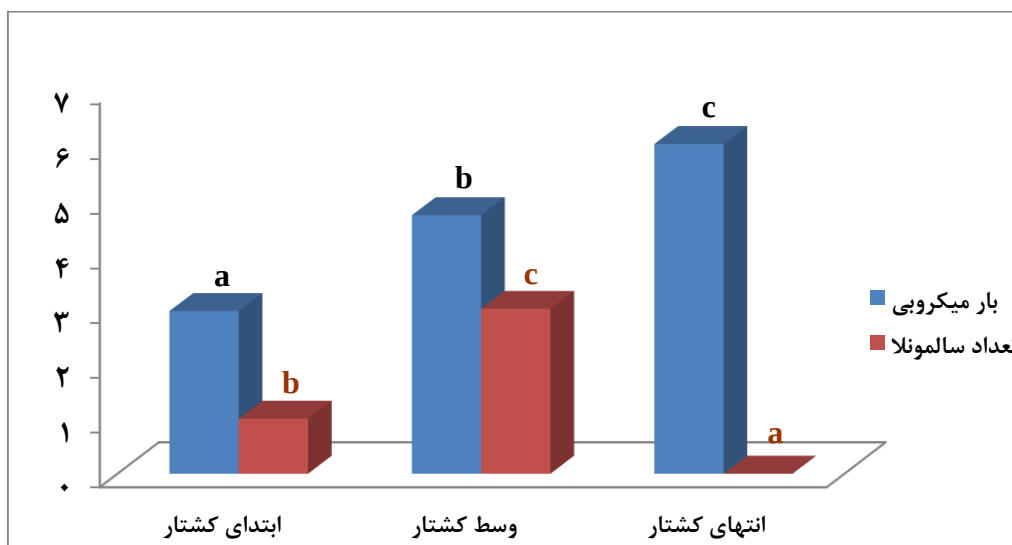


نمودار (۱) مقایسه میزان آلودگی در نواحی مختلف خط تولید کشتارگاه

حروف غیر مشابه در هر ستون نشان دهنده اختلاف آماری معنی دار برای هر ناحیه می‌باشد ( $p < 0.05$ ).

( $p < 0.05$ ). در نمودار (۲) مشخص است که میان تعداد سالمونلا جداسازی شده و بار میکروبی در طی ۳ مرحله فوق اختلاف معنی داری ( $p < 0.05$ )، وجود داشت. بر اساس نتایج حاصل بیشترین و کمترین آلودگی سالمونلا به ترتیب در مرحله میانی کشتار و انتهایی کشتار مشاهده شد ( $p < 0.05$ )، و از نظر شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها بیشترین و کمترین بار میکروبی به ترتیب مربوط به مراحل انتهایی کشتار و میانی کشتار بود.

ارزیابی نتایج نشان داد (نمودار ۲)، در مرحله اول یعنی در ابتدای کشتار که هیچ گونه پرنده‌ای قبل از آن کشتار نگردیده و تمام تجهیزات، سطوح و سالن‌های فرآوری تمیز و بهداشتی بوده است، میزان آلودگی کمتر بوده و حداقل میزان بار میکروبی ( $2.96 \log_{10} \text{cfu/ml}$ ) به دست آمد و تعداد سالمونلا نیز ۱ مورد مشاهده گردید. در مرحله میانی کشتار نتایج به دست آمده نشان دهنده افزایش آلودگی سالمونلا و بار میکروبی بود، به طوریکه بار میکروبی به  $\log_{10} \text{cfu/ml}$  ۴/۳۱ افزایش یافت ( $p < 0.05$ )، و تعداد سالمونلا جدا شده نیز به ۳ عدد رسید. در مرحله انتهایی کشتار سالمونلایی جدا نشد، اما بار میکروبی به  $6.17 \log_{10} \text{cfu/ml}$  افزایش یافت



نمودار (۲) مقایسه آلودگی سالمونلایی و وضعیت میکروبی آب ( $\log_{10}^{cfu/ml}$ ) در طی فرآیند کشتار. حروف غیر مشابه در هر ستون نشان دهنده اختلاف آماری معنی دار برای هر ناحیه می باشد ( $p < 0.05$ ).

درجه سانتی گراد)، کمترین میزان بار میکروبی در آن مشاهده شد و از نظر آلودگی سالمونلایی ۵ درصد از کل آلودگی سالمونلایی را به خود اختصاص داد. دستگاه قفس شوی بعد از ورود محموله به علت داشتن دمای متغیر (۴۵ تا ۶۰ درجه سانتی گراد) و فضولات طیور با حجم زیاد، بالاترین میزان بار میکروبی را داشت. همانطور که مشاهده می شود با افزایش تعداد پرند کشتار شده در هر قسمت از فرآیند کشتار، میزان بار میکروبی و احتمال آلودگی به سالمونلا افزایش یافت. در این تحقیق، کمترین آلودگی به سالمونلا و کمترین میزان بار میکروبی در قسمت آب دستگاه اسکالدر قبل از ورود محموله مورد آزمون مشاهده گردید ( $p < 0.05$ ). همچنین، بیشترین آلودگی به سالمونلا در چیلر خنک کننده بعد از ورود محموله مورد آزمون، و بیشترین مقدار بار میکروبی در قسمت چیلر شستشوی بعد از ورود محموله مورد آزمون به دست آمد ( $p < 0.05$ ).

با توجه به اینکه آب مصرفی در قسمت های مختلف فرآیند کشتار نقش مهمی در کیفیت بهداشتی محصول نهایی دارد، در این تحقیق آب اصلی ورودی کشتارگاه که قسمت اعظم آن از چاه آب موجود در کشتارگاه و مابقی بوسیله تانکر حمل آب تأمین گردیده است، همراه با آب موجود در کلیه دستگاه ها و تجهیزات فرآوری که شامل قفس شوی، اسکالدر، چیلر شستشو و چیلر خنک کننده می باشد به طور جداگانه مورد بررسی و آنالیز قرار گرفت. یافته های این تحقیق نشان داد که آب مصرفی این کشتارگاه فاقد آلودگی سالمونلایی بود و همچنین مقدار بار میکروبی آن نیز کمتر از حد مجاز تعیین شد. بنابراین آب ورودی اصلی را در این قسمت ها (دستگاه های قفس شوی، اسکالدر، چیلر شستشو و چیلر خنک کننده) می توان به عنوان شاهد در نظر گرفت و سایر مراحل فرآیند کشتار را بر اساس آن مقایسه نمود. همانگونه که در جدول (۳) ملاحظه می گردد با توجه به دمای ثابت اسکالدر در تمام مدت فرآیند کشتار مرغ (۶۳

جدول (۳) نتایج لگاریتم شمارش کلی میکروارگانیسم ها در آب قفس شوی، اسکالدر و چیلرها ( $\log_{10}^{cfu/ml}$ ) در مدت فرآوری در کشتارگاه

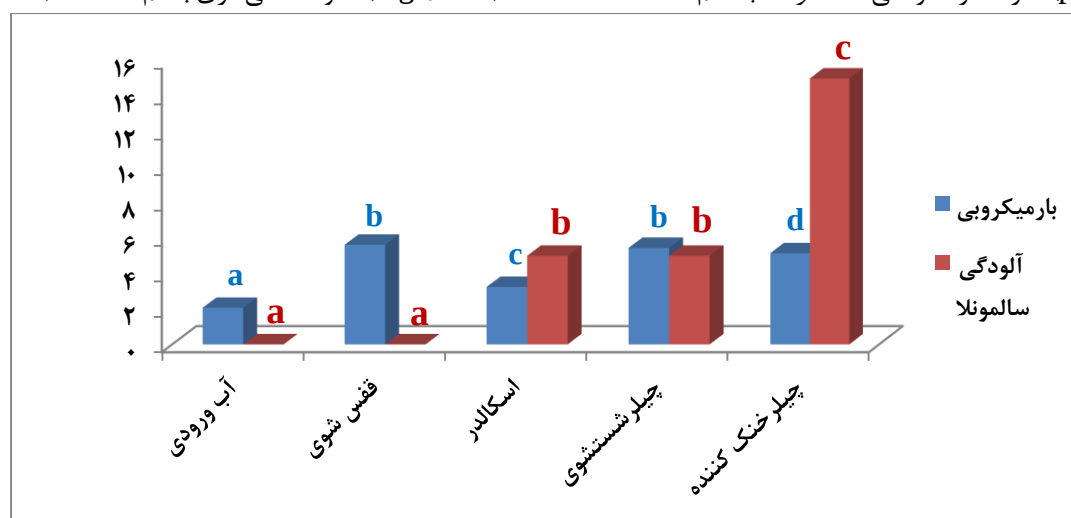
| شمارش کلی میکروارگانیسم ها |               |       |        |          | فرآیند کشتار |
|----------------------------|---------------|-------|--------|----------|--------------|
| تعداد                      | تعداد         | تعداد | وجود   | سالمونلا |              |
| نمونه                      | میکروارگانیسم | نمونه | آلودگی | آلودگی   | درصد         |

|    |   |   |           |   |                                      |
|----|---|---|-----------|---|--------------------------------------|
| ۰  | - | ۳ | ۲/۰۶۰±/۱  | ۳ | آب ورودی اصلی                        |
| ۰  | - | ۳ | ۵/۰۸۲±/۶۳ | ۳ | آب قفس شوی قبل از ورود محموله        |
| ۰  | - | ۶ | ۶/۱۶۰±/۹۴ | ۳ | آب قفس شوی بعد از ورود محموله        |
| ۰  | - | ۳ | ۲/۸۱۲±/۷۱ | ۳ | آب اسکالدر قبل از ورود محموله        |
| ۵  | + | ۷ | ۳/۶۷۱±/۹۹ | ۳ | آب اسکالدر بعد از ورود محموله        |
| ۵  | + | ۳ | ۴/۸۰۲±/۱۰ | ۳ | آب چیلر شستشوی قبل از ورود محموله    |
| ۰  | - | ۷ | ۵/۹۲۱±/۱۵ | ۴ | آب چیلر شستشوی بعد از ورود محموله    |
| ۵  | + | ۳ | ۴/۹۶۱±/۴۹ | ۳ | آب چیلر خنک کننده قبل از ورود محموله |
| ۱۰ | + | ۷ | ۵/۲۸۰±/۹۹ | ۴ | آب چیلر خنک کننده بعد از ورود محموله |

نتایج به صورت میانگین سه تکرار  $\pm$  انحراف معیار گزارش شده است.

بیشترین آلودگی *سالمونلایی* (۱۵ درصد) در قسمت چیلر خنک کننده مشاهده گردید که تفاوت معنی داری ( $p < 0.05$ )، با سایر قسمت های فوق الذکر داشت. بیشترین بار میکروبی مربوط به دستگاه قفس شوی و چیلر شست و شو بود که از نظر میانگین لگاریتم تعداد میکروارگانیسم ها ( $\log_{10}^{cfu/ml}$ ) تفاوت معنی داری با هم نداشتند ( $p < 0.05$ ).

همانگونه که در نمودار (۳) ملاحظه می شود درصد آلودگی *سالمونلایی* در قسمت آب ورودی کشتارگاه و دستگاه قفس شوی حداقل بود و هیچ *سالمونلایی* جداسازی نشد. در دستگاه اسکالدر و چیلر شست و شو میزان آلودگی *سالمونلایی* ۵ درصد بود و این دو قسمت تفاوت معنی داری ( $p < 0.05$ )، از نظر آلودگی *سالمونلا* با هم نداشتند.



نمودار (۳) مقایسه درصد آلودگی *سالمونلایی* و میانگین لگاریتم تعداد میکروارگانیسم ها ( $\log_{10}^{cfu/ml}$ ) در قسمت های مختلف فرآیند کشتار.

حروف غیر مشابه در هر ستون نشان دهنده اختلاف آماری معنی دار برای هر مرحله کشتار می باشد ( $p < 0.05$ ).

خط تخلیه اندرون و چیلر خنک کننده بیشترین میزان بار میکروبی را نشان دادند. کمترین میزان بار میکروبی به ترتیب در جگر و انتهای چیلر شست و شو مشاهده شد (جدول ۴).

بر اساس یافته های این تحقیق می توان نتیجه گرفت که بیشترین و کمتری میزان بار میکروبی لاشه به ترتیب در دستگاه های پرکنی و جگر مرغ مشاهده شد. لاشه های مرغ در طی فرآیند تولید به ترتیب در انتهای قسمت های پرکنی،

جدول (۴) نتایج وضعیت میکروبی در سطح پوست لاشه طیور ( $\log_{10}^{cfu/cm^2}$ ) در مدت فرآوری در کشتارگاه

| شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها |                     |             |             |             | فرآیند کشتار          |
|----------------------------|---------------------|-------------|-------------|-------------|-----------------------|
| تعداد نمونه                | تعداد میکروارگانیسم | تعداد نمونه | وجود آلودگی | درصد آلودگی |                       |
| ۰                          | *                   | ۲۱          | -           | ۰           | سوپا کلوک             |
| ۱۵                         | $4/67 \pm 58$       | ۱۶          | +           | ۱۰          | پرکنی                 |
| ۱۷                         | $3/86 \pm 63$       | ۱۶          | +           | ۱۵          | جگر                   |
| ۱۵                         | $4/60 \pm 46$       | ۱۶          | +           | ۱۵          | تخلیه اندرون‌ها       |
| ۱۵                         | $4/07 \pm 54$       | ۱۶          | +           | ۵           | انتهای چیلر شستشوی    |
| ۱۷                         | $4/21 \pm 72$       | ۱۶          | +           | ۲۰          | انتهای چیلر خنک کننده |
| ۱۸                         | $4/18 \pm 66$       | ۱۹          | +           | ۱۰          | قطعه بندی و شینسل مرغ |

نتایج به صورت میانگین سه تکرار  $\pm$  انحراف معیار گزارش شده است.

آلودگی در ابتدا از نمونه‌های آب در دستگاه اسکالدر و چیلر شست و شو قبل از ورود نمونه‌ها مشاهده شد، و همچنین نمونه‌های آب چیلر خنک کننده پس از عبور محموله مورد آزمون آلودگی سالمونلایی را نشان داد. هیچ یک از نمونه‌های مرغ در همه نقاط نمونه‌گیری (شامل ۶ نقطه) دارای آلودگی نبودند، به این ترتیب که نمونه‌های شماره ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ به ترتیب در ۳، ۲، ۲، ۳ و ۳ نقطه نمونه‌گیری آلودگی سالمونلایی نشان دادند. با توجه به اینکه بیشترین آلودگی سالمونلا در این مرحله مشاهد گردید، این امکان وجود دارد که محموله‌های کشتار شده قبلی دارای آلودگی بوده و باعث انتقال آلودگی به این محموله مورد آزمون شده، باشند.

جدول (۵) نشان می‌دهد که آب اسکالدر در هیچ کدام از مراحل کشتار آلودگی سالمونلایی نشان نداد. در مرحله ابتدای کشتار در نمونه‌های لاشه هیچ گونه آلودگی مشاهده نگردید ولی پس از عبور محموله مورد آزمون از دستگاه‌های اسکالدر و چیلر خنک‌کننده، در نمونه‌های آب آلودگی مشاهده شد که این آلودگی ممکن است از سایر لاشه‌ها و یا تجهیزات فرآوری به این قسمت منتقل گردیده باشد. در مرحله انتهایی کشتار به استثنای یک مورد آلودگی سالمونلایی در نمونه لاشه مرغ پس از پرکنی، هیچ گونه آلودگی دیگری دیده نشد. اما نتایج آزمون در مرحله وسط کشتار که در واقع از ششمین محموله در حال کشتار نمونه‌برداری گردید، نتایج بسیار متفاوت با مراحل قبل بود.

جدول (۵) روند آلودگی نمونه‌های لاشه مرغ به سالمونلا در طول فرآیند کشتار در مراحل مختلف نمونه‌گیری

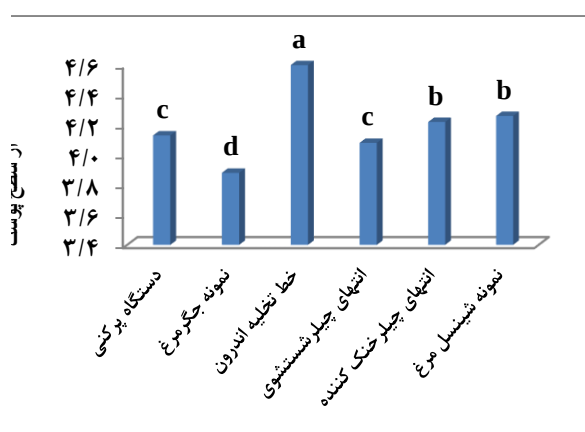
| مرحله        | شماره نمونه | ترتیب حضور لاشه‌های مرغ در قسمت‌های مختلف فرایند کشتار |                |                |   |                |   |   |   |   |                |   |                |   |
|--------------|-------------|--------------------------------------------------------|----------------|----------------|---|----------------|---|---|---|---|----------------|---|----------------|---|
|              |             | B <sub>1</sub>                                         | C <sub>1</sub> | D <sub>1</sub> | E | B <sub>2</sub> | F | G | H | J | C <sub>2</sub> | K | D <sub>2</sub> | M |
| ابتدای کشتار | ۱           | ۰                                                      | ۰              | ۰              | ۰ | ۱              | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰              | ۰ | ۱              | ۰ |
|              | ۲           | ۰                                                      | ۰              | ۰              | ۰ | ۱              | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰              | ۰ | ۱              | ۰ |
|              | ۳           | ۰                                                      | ۰              | ۰              | ۰ | ۱              | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰              | ۰ | ۱              | ۰ |
|              | ۴           | ۰                                                      | ۰              | ۰              | ۰ | ۱              | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰              | ۰ | ۱              | ۰ |
|              | ۵           | ۰                                                      | ۰              | ۰              | ۰ | ۱              | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰              | ۰ | ۱              | ۰ |
| وسط کشتار    | ۱           | ۰                                                      | ۱              | ۱              | ۰ | ۰              | ۱ | ۰ | ۱ | ۱ | ۰              | ۰ | ۱              | ۰ |
|              | ۲           | ۰                                                      | ۱              | ۱              | ۰ | ۰              | ۰ | ۰ | ۰ | ۱ | ۱              | ۰ | ۱              | ۰ |
|              | ۳           | ۰                                                      | ۱              | ۱              | ۰ | ۰              | ۱ | ۰ | ۰ | ۱ | ۱              | ۰ | ۱              | ۰ |

۱: آلودگی سالمونلا، \*: عدم آلودگی سالمونلا، B<sub>1</sub>: آب اسکالدر قبل از ورود نمونه‌ها، C<sub>1</sub>: آب چیلر شستشوی قبل از ورود نمونه‌ها، D<sub>1</sub>: آب چیلر خنک کننده قبل از ورود نمونه‌ها، E: نمونه‌های مدفوع، B<sub>2</sub>: آب اسکادر پس از ورود نمونه‌ها، F: نمونه‌های لاشه پس از پرکنی، G: نمونه‌های جگر، H: نمونه‌های لاشه پس از تخلیه اندرون، I: نمونه‌های لاشه در انتهای چیلر شستشوی، C<sub>2</sub>: آب چیلر شستشوی پس از ورود نمونه‌ها، K: نمونه‌های لاشه در انتهای چیلر خنک کننده، D<sub>2</sub>: آب چیلر خنک کننده پس از ورود نمونه‌ها، M: نمونه‌های شینسل مرغ.

(b)

طبق نتایج نمودار (۴)، در قسمت خط تخلیه اندرون بالاترین میزان بار میکروبی، و در نمونه‌های جگر مرغ پایین‌ترین میزان بار میکروبی مشاهده گردید ( $p < 0.05$ ). بررسی آلودگی *سالمونلایی* نیز نشان داد که در قسمت انتهای چیلر خنک کننده از ۱۶ نمونه گرفته شده، ۴ نمونه (۲۵ درصد)، در قسمت‌های نمونه جگر مرغ و خط تخلیه اندرون هر کدام از ۱۶ نمونه گرفته شده، ۳ نمونه (۱۸/۷۵)

(الف)



حروف غیر مشابه در هر ستون نشان دهنده اختلاف آماری معنی‌دار برای هر بخش از فرآیند کشتار می‌باشد ( $P < 0.05$ ).

در این تحقیق ۱۵ قسمت از خط تولید و فرآوری کشتارگاه مورد نمونه برداری قرار گرفت و وضعیت بهداشتی از نظر

از حضور این باکتری در ۱۰ نقطه از محل های فرآوری در طی فرآیند کشتار بود. برخلاف نتایج بار میکروبی در این نقاط، آلودگی سالمونلایی بیشتر در مراحل انتهایی فرآیند کشتار مشاهده گردید که این موضوع ممکن است در اثر آلودگی ثانویه در طی فرآیند کشتار باشد.

که نتایج آن در جدول (۶) آورده شده است. از نظر میزان بار میکروبی ۴ نقطه از محل های فرآوری مرغ بار میکروبی بالاتر از میزان مجاز تعیین شده بودند که این نقاط در مراحل ابتدایی فرآیند تولید واقع شده اند، و ۱۱ نقطه دیگر نمونه برداری بار میکروبی پایین تر از حد مجاز داشتند. خوشبختانه محصول نهایی از نظر میزان بار میکروبی دارای شرایط بهداشتی مناسب بود و بار میکروبی پایین تر از حد مجاز داشت. ارزیابی آلودگی سالمونلا حاکی

جدول (۶) بررسی وضعیت بهداشتی از نظر میزان بار میکروبی و حضور سالمونلا در نقاط مختلف فرآوری مرغ در طی فرآیند کشتار

| فرآیند کشتار                         |  | شمارش کل میکروارگانیسم ها<br>(CFU/ml&cm <sup>2</sup> ) |                       | حضور سالمونلا |            |
|--------------------------------------|--|--------------------------------------------------------|-----------------------|---------------|------------|
|                                      |  | حد مجاز                                                | میانگین هر قسمت       | حد مجاز       | مشاهده شده |
| آب ورودی اصلی                        |  | ۱۰ <sup>۵</sup>                                        | ۱/۱ × ۱۰ <sup>۲</sup> | منفی          | منفی       |
| آب قفس شوی قبل از ورود محموله        |  | ۱۰ <sup>۵</sup>                                        | ۱/۲ × ۱۰ <sup>۵</sup> | منفی          | منفی       |
| آب قفس شوی بعد از ورود محموله        |  | ۱۰ <sup>۵</sup>                                        | ۱/۴ × ۱۰ <sup>۶</sup> | منفی          | منفی       |
| آب اسکالدر قبل از ورود محموله        |  | ۱۰ <sup>۵</sup>                                        | ۶/۵ × ۱۰ <sup>۲</sup> | منفی          | منفی       |
| آب اسکالدر بعد از ورود محموله        |  | ۱۰ <sup>۵</sup>                                        | ۴/۷ × ۱۰ <sup>۳</sup> | منفی          | مثبت       |
| آب چیلر شستشوی قبل از ورود محموله    |  | ۱۰ <sup>۵</sup>                                        | ۶/۳ × ۱۰ <sup>۴</sup> | منفی          | مثبت       |
| آب چیلر شستشوی بعد از ورود محموله    |  | ۱۰ <sup>۵</sup>                                        | ۸/۳ × ۱۰ <sup>۵</sup> | منفی          | منفی       |
| آب چیلر خنک کننده قبل از ورود محموله |  | ۱۰ <sup>۵</sup>                                        | ۹/۱ × ۱۰ <sup>۴</sup> | منفی          | مثبت       |
| آب چیلر خنک کننده بعد از ورود محموله |  | ۱۰ <sup>۵</sup>                                        | ۱/۹ × ۱۰ <sup>۵</sup> | منفی          | مثبت       |
| نمونه لاشه پس از پرکنی               |  | ۱۰ <sup>۵</sup>                                        | ۴/۷ × ۱۰ <sup>۴</sup> | منفی          | مثبت       |
| نمونه جگر مرغ                        |  | ۱۰ <sup>۵</sup>                                        | ۷/۲ × ۱۰ <sup>۳</sup> | منفی          | مثبت       |
| نمونه لاشه پس از تخلیه اندرون ها     |  | ۱۰ <sup>۵</sup>                                        | ۴ × ۱۰ <sup>۴</sup>   | منفی          | مثبت       |
| نمونه لاشه در انتهای چیلر شستشوی     |  | ۱۰ <sup>۵</sup>                                        | ۱/۲ × ۱۰ <sup>۴</sup> | منفی          | مثبت       |
| نمونه لاشه در انتهای چیلر خنک کننده  |  | ۱۰ <sup>۵</sup>                                        | ۱/۶ × ۱۰ <sup>۴</sup> | منفی          | مثبت       |
| نمونه لاشه قطعه بندی و شینسل شده     |  | ۱۰ <sup>۵</sup>                                        | ۱/۵ × ۱۰ <sup>۴</sup> | منفی          | مثبت       |

از دست می دهند. پرنده گانی که از نظر آلودگی به سالمونلا مثبت باشند، در زمان کشتار حامل مقادیر زیادی میکروارگانیسم در مدفوع و پوشش خارجی بوده و این آلودگی را به کشتارگاه انتقال می دهند و در نتیجه در اثر آلودگی ثانویه در مراحل مختلف کشتار این آلودگی را به

بافت عفونت سالمونلایی ناشی از مواد غذایی یکی از چالش های بزرگ بهداشتی در سراسر جهان است، چرا که هر ساله تعداد بی شماری از افراد به این عفونت دچار شده و جان خود را

نیز از نظر آلودگی به سالمونلا مثبت ارزیابی شدند (Marin et al., 2022).

موسوی زاده و همکاران (۲۰۲۴) بیان کردند که هیچ یک از نمونه های مرغ گوشتی کشتار شده در کشتارگاه استان گلستان آلوده به سالمونلا نبودند، و شمارش کلی میکروارگانیزم ها نیز بسار کمتر از حد مجاز ( $2 \times 10^6$  LogCFU/g) گزارش شد (Mousavizadeh et al., 2024).

نتایج تحقیق دیگری نشان داد که ۳/۳ درصد از نمونه های لاشه های طیور کشتار شده در کشتارگاه استان کهگیلویه و بویر احمد از نظر شمارش کلی میکروارگانیزم ها بالاتر از حد مجاز، و تمامی نمونه های مثبت متعلق به چیلرها با دمای ۲۴ درجه سانتی گراد بودند. علاوه بر این، ۲۸/۳ درصد از نمونه ها به /شرشیاکلی، و ۱۶/۲ درصد از نمونه ها به سالمونلا آلوده بودند. نتایج آنها حاکی از آن بود که مراحل خنک سازی بیشترین تأثیر را بر کاهش تعداد /شرشیاکلی، سالمونلا و شمارش کلی میکروارگانیزم ها داشت (Ghasemian et al., 2024).

در این تحقیق میزان آلودگی سالمونلایی در ۴ منطقه مختلف کشتارگاه شامل خط کشتار، تخلیه اندرون، چیلرها و قسمت بسته بندی محصولات به ترتیب ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۱۰ درصد به دست آمد. همانگونه که نتایج نشان داد هر چه به سمت تولید محصول نهایی پیش رفتیم میزان آلودگی افزایش یافت، این در حالی است که بر اساس قوانین و ضوابط سازمان دامپزشکی کشور هر چه قدر به سمت قسمت انتهایی فرآیند تولید در کشتارگاه پیش برویم میزان آلودگی باید کاهش یابد.

با توجه به نتایج تحقیق حاضر و درصد بالای آلودگی (۸۰ درصد) در مرحله نمونه گیری در مرحله میانی کشتار (نوبت چهارم نمونه گیری) می توان چنین استنباط نمود که ممکن است این آلودگی از طیور زنده ارسالی به کشتارگاه و یا از سایر طیور ارسالی در مرحله قبل از کشتار محموله مورد آزمون باشد (Stearns et al., 2024).

بر اساس یافته های حاصل از این تحقیق، وجود آلودگی بالا در چیلرهای شستشوی و خنک کننده نشان دهنده آلودگی متقاطع در این قسمت می باشد که توسط لاشه های طیور از سایر قسمت های فرآوری کشتارگاه به آن منتقل می گردد.

محیط، ابزار و وسایل و در نهایت به محصول نهایی منتقل می کنند (Zeng et al., 2021). لذا در این تحقیق سعی به بررسی وضعیت بهداشتی کشتارگاه طیور نجف آباد استان اصفهان از نظر آلودگی به سالمونلا و شمارش کلی میکروارگانیزم ها نمودیم. بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق، آلودگی به باکتری سالمونلا در ۸۸/۲ درصد از نمونه های مورد آزمایش، منفی و در ۱۱/۸ درصد مثبت ارزیابی شد.

با توجه به مطالعات انجام گرفته در داخل کشور و همچنین مطالعات صورت گرفته در سایر نقاط جهان، میزان آلودگی از ۳/۶ الی ۸۸/۴۶ درصد گزارش شده است که تحقیق حاضر نشان داد که میزان آلودگی نسبت به سایر مطالعات پایین تر به دست آمد. در همین راستا، نیازی شهرکی و همکاران (۱۳۸۶) گزارش دادند که ۶۹ درصد از لاشه های طیور آلوده به سالمونلا بودند (Niazi Shahraki et al., 2008).

جمشیدی و نقدی پور (۱۳۹۰) در مطالعه ای تعیین آلودگی آب مورد استفاده در سیستم خنک کننده لاشه طیور به باکتری های جنس سالمونلا و گونه های /انتریتیدیس و تایفی موریوم در کشتارگاه صنعتی مشهد با استفاده از روش Multiplex-PCR، میزان آلودگی به سالمونلا را ۱۹/۲ درصد گزارش کردند (Jamshidi and Naghdipoor, 2011).

نیدالله و همکاران (۲۰۱۷) نیز در مطالعه ای میزان آلودگی سالمونلایی در محیط فرآوری طیور در گوشت تازه طیور در مالزی میزان آلودگی به این باکتری را ۸۸/۴۶ درصد گزارش نمودند (Nidaullah et al., 2017).

در تحقیق دیگری، ترونکیت و همکاران (۲۰۱۷) میزان آلودگی به سالمونلا در لاشه های مرغ را ۲۸/۷ درصد گزارش کردند (Trongjit et al., 2017).

در تحقیق انجام شده توسط کونا-نیتو و همکاران (۲۰۱۸) در رابطه با جداسازی سالمونلا در لاشه طیور در کشتارگاه برزیل به روش PCR، میزان آلودگی به سالمونلا ۳/۶ درصد تشخیص داده شد (da Cunha-Neto et al., 2018).

مارین و همکاران (۲۰۲۲) اذعان داشتند که ۶۹/۴ درصد از نمونه ها مرغ هنگام ورود به کشتارگاه آلوده به سالمونلا بودند. همچنین ۴۶/۳ درصد از لاشه های مرغ پس از کشتار

مثبتی بر کاهش میزان آلودگی باکتریایی دارد، شست و شوی صحیح لاشه ضروری به نظر می‌رسد (Ramirez-Hernandez et al., 2021).

### نتیجه‌گیری

با توجه به میزان و شیوع آلودگی سالمونلایی در لاشه طیور طی مراحل فرآوری در کشتارگاه، رعایت اصول بهداشتی در طول مراحل مختلف کشتار و شست و شوی صحیح لاشه و بهبود کنترل کیفی لاشه‌ها در کشتارگاه ضرورت دارد تا بدین طریق از انتقال این باکتری به انسان از طریق زنجیره غذایی جلوگیری شود. از آنجایی که حذف کامل باکتری *سالمونلا* تحت شرایط نرمال فرآوری لاشه طیور امکان پذیر نیست، اما احتمال حذف آلودگی بینابینی در مراحل مختلف کشتار وجود دارد. لذا ضدعفونی مستمر وسایل حمل و نقل و تجهیزات، استفاده از مواد ضدعفونی کننده با دوز مؤثر، استفاده از سیستم‌های مکانیزه تخلیه شکم، کاهش آلودگی ثانویه ناشی از دست کارگران، افزایش تعداد دوش‌های شستشوی لاشه در سالن، تعویض آب چیلرها در فاصله زمانی کوتاه‌تر، استفاده از حجم بیشتر آب در چیلرها، تنظیم مرتب دمای آب چیلر برای کاهش دما و تأمین دمای مورد نیاز لاشه، استفاده کافی از یخ بهداشتی، استفاده از نقاله مناسب در محل‌های انتقال لاشه در کشتارگاه، قطع کامل ارتباط سالن کشتار با قسمت تخلیه مرغ زنده و قسمت بسته‌بندی، رعایت اصول بهداشتی توسط کارگران و در نهایت استفاده از تکنیک‌های جدید مانند اسید لاکتیک، میدان الکتریکی پالسی، آب ازن‌دار و ترکیبی از تکنیک‌ها و روش‌های فوق پیشنهاد می‌گردد.

به علاوه آب اسکالدر بعد از ورود محموله نیز از نظر آلودگی به *سالمونلا* مثبت ارزیابی گردید که نشان دهنده جریان ناکافی آب و تجمع آلودگی در آن و همچنین دمای بالای آب اسکالدر می‌باشد (Manafi et al., 2020).

در این تحقیق نتایج حاصل از بررسی شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها در طی فرآیند کشتار نشان داد که آب دستگاه قفس‌شوی بالاترین میزان بار میکروبی را داشت که به دلیل وجود مدفوع زیاد در قفس‌های حمل طیور زنده می‌باشد که در اثر شست و شوی این قفس‌ها توسط دستگاه مذکور منجر به افزایش آلودگی میکروبی این قسمت گردیده است. به علاوه باید تذکر داشت که یکی دیگر از دلایل آلودگی زیاد آب دستگاه قفس‌شوی استفاده ناکافی از مواد ضدعفونی کننده و آب گرم با درجه حرارت مناسب (۸۰ درجه سانتی‌گراد) در این دستگاه می‌باشد (Bell et al., 2016). البته می‌توان اشاره داشت که آلودگی بالای قفس‌های حمل طیور زنده می‌تواند باعث آلودگی متقاطع در کامیون حمل طیور زنده، سایر فارم‌های پرورش طیور و احتمالاً آلودگی طیور کشتاری در سرویس‌های بعدی گردد ولی به طور مستقیم در میزان آلودگی محصول نهایی تأثیری ندارد (Ha et al., 2018).

به طور کلی می‌توان گفت که وضعیت بهداشتی کشتارگاه طیور نجف‌آباد استان اصفهان وضعیت نسبتاً خوبی داشت و نتایج آزمون شامل شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها و *سالمونلا* در حد قابل قبول بود. علاوه براین باید تأکید داشت که اختلافات آماری مشاهده شده در پژوهش حاضر با سایر مطالعات در کشورهای مختلف احتمالاً به علت تأثیر منطقه جغرافیایی بر میزان ابتلای طیور به باکتری *سالمونلا* و تفاوت‌های مربوط به قسمت‌های مختلف خط کشتار کشتارگاه است (Bridier et al., 2019). همچنین با توجه به اثر فصل و شرایط آب و هوایی بر میزان شیوع عفونت سالمونلایی در طیور، نمونه‌گیری در فصول مختلف یکی دیگر از دلایل این تفاوت‌ها می‌باشد. اگرچه میزان آلودگی لاشه‌های طیور به *سالمونلا* در این مطالعه در مقایسه با مطالعات دیگر کمتر می‌باشد اما احتمالاً شست و شوی ناقص لاشه‌های طیور در کشتارگاه و انتقال باکتری از امحاء و احشاء به لاشه طیور از علل اصلی آلودگی می‌باشد. لذا از آنجایی که شست و شوی صحیح و مناسب لاشه اثر

## منابع

- 1-Boubendir S., Arsenault J., Quessy S., Thibodeau A., Fravalo P., Thériault W.P., Fournaise S. and Gauche, M.L. 2021. *Salmonella* contamination of broiler chicken carcasses at critical steps of the slaughter process and in the environment of two slaughter plants: prevalence, genetic profiles, and association with the final carcass status. J Food prot. 84(2): 321-332.
- 2-Bell R.L., Jarvis K.G., Ottesen A.R., McFarland M.A. and Brown E.W. 2016. Recent and emerging innovations in *Salmonella* detection: a food and environmental perspective. Microb biotechnol. 9(3): 279-292.
- 3-Bridier A., Le Grandois P., Moreau M.H., Prénom C., Le Roux A., Feurer C. and Soumet, C. 2019. Impact of cleaning and disinfection procedures on microbial ecology and *Salmonella* antimicrobial resistance in a pig slaughterhouse. Sci. Rep. 9(1): 12947.
- 4-da Cunha-Neto A., Carvalho L.A., Carvalho R.C.T., dos Prazeres Rodrigues D., Mano S.B., de Souza Figueiredo E.E. and Conte-Junior C.A. 2018. *Salmonella* isolated from chicken carcasses from a slaughterhouse in the state of Mato Grosso, Brazil: antibiotic resistance profile, serotyping, and characterization by repetitive sequence-based PCR system. Poult sci. 97(4): 1373-1381.
- 5-Fahim A.S. 2020. Microbiological quality of chicken carcasses at modern poultry plant. J. Nut Food Process. 3(1).
- 6-Ghasemian S.O., Fardaei A. and Gharib Mombeni E. 2024. Effects of different slaughterhouse water chiller temperatures on the microbial quality of poultry carcasses. J. Zoonotic Dis. 8(3): 566-572.
- 7-Ha J.S., Seo K.W., Kim Y.B., Kang M.S., Song C.S. and Lee Y.J. 2018. Prevalence and characterization of *Salmonella* in two integrated broiler operations in Korea. Ir Vet J. 71: 1-9.
- 8-Hardie K.M., Guerin M.T., Ellis A. and Leclair D. 2019. Associations of processing level variables with *Salmonella* prevalence and concentration on broiler chicken carcasses and parts in Canada. Prev vet med. 168: 39-51.
- 9-Ibrahim H.M., Amin R.A., El-Shater M.A. and Hafez S.M. 2015. Bacteriological evaluation of freshly slaughtered chicken carcasses. Benha Vet Med J. 28(2): 74-82.
- 10-Iranian Institute of Standards and Industrial Research, *Salmonella* Search and Identification Method, 1992, Iranian National Standard 1810.
- 11-Jamshidi A. and Naghdipour D. 2011. Contamination of water used for chilling of poultry carcasses to *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis* using multiplex-PCR method. J. Vet Res. 66(2): 149-152.
- 12-Lin C.H., Huang J.F., Sun Y.F., Adams P.J., Lin J.H. and Robertson I.D. 2020. Detection of chicken carcasses contaminated with *Salmonella enterica* serovar in the abattoir environment of Taiwan. Int J Food Microbiol. 325: 108640.
- 13-Manafi L., Aliakbarlu J. and Dastmalchi Saei H. 2020. Antibiotic resistance and biofilm formation ability of *Salmonella* serotypes isolated from beef, mutton, and meat contact surfaces at retail. J Food Sci. 85(8): 2516-2522.
- 14-Nidaullah H., Abirami N., Shamila-Syuhada A.K., Chuah L.O., Nurul H., Tan T.P., Abidin F.W.Z. and Rusul, G. 2017. Prevalence of *Salmonella* in poultry processing environments in wet markets in Penang and Perlis, Malaysia. Vet. world. 10(3): 286.
- 15-Ramirez-Hernandez A., Carrascal-Camacho A.K., Varón-García A., Brashears M.M. and Sanchez-Plata M.X. 2021. Genotypic characterization of antimicrobial resistant *Salmonella* spp. strains from three poultry processing plants in Colombia. Foods, 10(3):491.
- 16-Rodrigues I.B.B.E., Silva R.L., Menezes J., Machado S.C.A., Rodrigues D.P., Pomba C., Abreu D.L.C., Nascimento E.R., Aquino M.H.C. and Pereira V.L.A. 2020. High prevalence of multidrug-resistant nontyphoidal

*Salmonella* recovered from broiler chickens and chicken carcasses in Brazil. Braz J Poult Sci. 22(01): eRBCA-2019.

17-Marín C., Cerdà-Cuellar M., González-Bodi S., Lorenzo-Rebenaque L. and Vega S. 2022. Research Note: Persistent *Salmonella* problems in slaughterhouses related to clones linked to poultry companies. Poult sci. 101(8): 101968

18-Mosavizadeh M.U.S., Makerani A.B., Aminoroya K. and Vakilifar, T. 2024. Evaluation of *Salmonella* Contamination in Slaughtered Broiler Chickens in Slaughterhouses in Golestan Province, Iran. J Health Rep. Technol. 10(3).

19-Niazi Shahraki S., Rokni N., Razavilar V., Bahonar A.R. and Akhondzadeh A. 2008. Qualitative and quantitative assessment of poultry carcasses contaminated with *salmonella* in tehran industrial slaughterhouses. j.vet.res. 62(6): 385-389.

20-Stearns R., Bowen K., Taylor Jr R.L., Moritz J., Matak K., Tou J., Freshour A., Jaczynski J., Boltz T., Li X. and Long C. 2024. Microbial profile of broiler carcasses processed at a university scale mobile poultry processing unit. Poult Sci. 103(5): 103576.

21-Trongjit S., Angkititrakul S., Tuttle R.E., Pongseree J., Padungtod P. and Chuanchuen R. 2017. Prevalence and antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* isolated from broiler chickens, pigs and meat products in Thailand-Cambodia border provinces. Microbiol immunol. 61(1): 23-33.

22-Zeng H., De Reu K., Gabriël S., Mattheus W., De Zutter L. and Rasschaert, G. 2021. *Salmonella* prevalence and persistence in industrialized poultry slaughterhouses. Poult Sci. 100(4): 100991.

## Investigating the microbial contamination of poultry carcasses during processing in Najafabad industrial slaughterhouse

Shafiee Dastgerdi A<sup>1</sup>, Moshtaghi H<sup>2\*</sup>, Bonyadian M<sup>2</sup>

1- Graduated in PhD of Food Hygiene, Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Vet.Med, Shahrekord University, Iran

2- Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Vet.Med, Shahrekord University, Iran

\*(Corresponding Author) Email: moshtaghi@sku.ac.ir

### Abstract:

Meat is one of the most important human needs and the main source of protein. Salmonellosis is one of the most common causes of food poisoning that consumption of contaminated meat is the most important way of transmitting this disease between humans and animals. Slaughterhouses as one of the critical stage in the meat supply chain, play a key role in controlling and or spread of the disease. Since poultry carcasses are an important sources of contamination of this disease, determining the frequency and the level of bacterial contamination is a criterion for sanitation hygiene assessment of the slaughterhouses to prevent possible health risks for consumers. This study aimed to to evaluate sanitary-hygienic status of the Najafabad poultry slaughterhouse in 2024. For this purpose, random sampling was performed from the water used in the equipment and the surface of the carcass skin in the chest area. In addition, 170 samples were examined in 5 times during different stages of slaughter using conventional culture method to identify *Salmonella*. The results showed that 20 out of 170 samples (11.8%) tested positive for *Salmonella*. The highest contamination (45%) was observed in the chiller. The findings of this study indicated that the chillers, emptying the inside of the carcass, and stuffing the carcass are critical points in the slaughterhouse. Generally, it can be concluded that, since the presence of *Salmonella* in poultry carcasses, proper washing of the carcass, and adherence to hygiene principles at all stages of the slaughter process are essential to ensure access to public health and hygiene.

**Keywords:** *Salmonella*, Poultry carcass, Slaughterhouse, Esfahan provinc

---

**Roster****Evaluation of the Antimicrobial Effects of Garlic Essential Oil and Nanoemulsion on Bacteria Isolated from Food Products**

Asma Azizabadi, Ashraf Ashraf Kariminik .....17

**Identification and determination of ochratoxin A in supplied cereals using HPLC**

Mohammad Reza Saebi, Elaheh Tajbakhsh, Ebrahim Rahimi.....34

**Seasonal variation in microbial quality of raw milk produced in traditional and industrial cattle farms**

Mahboobeh Ghasemi , Mojtaba Bondayian , Hamdollah Moshtaghi.....53

**Evaluation of the Antifungal Effects of Vaccinium arctostaphylos (Blackberry) Fruit Hydroalcoholic Extract on Candida albicans and Candida glabrata under Laboratory Conditions**

Ahmad Holakou, Maryam Kazemi, Maryam Rafieirad, Motahareh Eskandari.....64

**Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) in food safety: A review of pathogenicity and antibiotic resistance genes**

Elias Shahrivar, Ebrahim Rahimi, Faham Khamsipour.....75

**Investigating the microbial contamination of poultry carcasses during processing in Najafabad industrial slaughterhouse**

Amir Shafiee Dastgerdi, Hamdollah Moshtaghi, Mojtaba Bondayian.....92

