



مجله میکروب شناسی مواد غذایی

صاحب امتیاز: دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد

مدیر مسئول: دکتر مهدی رئیسی

سر دبیر: دکتر ابراهیم رحیمی

مدیر داخلی: دکتر فهام خامسی پور

اعضای هیئت تحریریه (به ترتیب حروف الفبا):

دکتر مجتبی بنیادیان (دانشیار دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد)

دکتر افشین جوادی (دانشیار دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز)

دکتر ابراهیم رحیمی (استاد دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد)

دکتر ناهید رحیمی فرد (دانشیار سازمان غذا و دارو، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی)

دکتر مهدی رئیسی (استاد دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد)

دکتر امیر شاکریان (استاد دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد)

دکتر شهرام شکر فروش (استاد دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز)

دکتر مهرداد قوامی (استاد دانشکده علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران)

دکتر گیتی کریم (استاد دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران)

دکتر محمدرضا محزونیه (استاد دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد)

کارشناس مجله: امید طاهری بروجنی

ویراستار فارسی: دکتر فهام خامسی پور

ویراستار انگلیسی: دکتر مهدی رئیسی، دکتر فهام خامسی پور

انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد

مجوز انتشار فصلنامه، طی پنجاه و یکمین جلسه کمیسیون بررسی و تأیید مجلات علمی دانشگاه آزاد اسلامی مورخ ۱۳۸۷/۹/۱۱ تصویب و طی نامه شماره ۸۷/۳۱۲۰۳۳ مورخ ۱۳۸۷/۸/۱۷ صادر گردیده است.

مجوز انتشار فصلنامه، طی جلسه مورخ ۱۳۸۹/۵/۲۵ هیأت نظارت بر مطبوعات وزارت فرهنگ و ارشاد اسلامی تصویب و طی نامه به شماره ۸۹/۱۲۶۵۲ مورخ ۱۳۸۹/۶/۱۳ صادر گردیده است.

مجله میکروب شناسی مواد غذایی طی نامه شماره ۳/۱۸/۱۸۹۵۹۳ مورخ ۱۳۹۳/۱۰/۱۵ موفق به دریافت رتبه علمی پژوهشی از کمیسیون نشریات وزارت علوم، تحقیقات و فن آوری شد.

نشانی: دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، دانشکده دامپزشکی، دفتر مجله میکروب شناسی مواد غذایی، صندوق پستی ۱۶۶.

تلفن و فاکس: ۰۳۸-۳۳۳۶۱۰۲۷ پست الکترونیکی: jfm@iaushk.ac.ir وب سایت: <http://jfm.iaushk.ac.ir>

راهنمای تنظیم و تدوین مقالات مجله میکروبی شناسی مواد غذائی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد

مقاله با برنامه Word 2003, 2007 تایپ و جداول، منحنی‌ها، نمودارها (با برنامه Excel) و تصاویر علاوه بر متن در فایل‌های جداگانه با ذکر شماره ضمیمه مقاله باشند.

فایل مقالات باید مشتمل بر عنوان، عنوان گردان (Running title)، چکیده فارسی (حداکثر ۲۵۰ کلمه)، واژگان کلیدی فارسی، مقدمه، مواد و روش کار، نتایج، بحث، منابع و چکیده انگلیسی (حداکثر ۲۵۰ کلمه) همراه با کلمات کلیدی انگلیسی باشد. توضیح هر بخش به شرح زیر می‌باشد:

۱- چکیده: به فارسی و انگلیسی باید محتوای کلی مقاله را نشان دهد و از مطالعه آن یک دید کلی در مورد مقاله بدست آید (حداکثر ۲۵۰ کلمه). در انتهای چکیده ۳ تا ۵ واژه کلیدی آورده شود. چکیده انگلیسی باید کاملاً با چکیده فارسی مطابقت داشته باشد.

۲- مقدمه: در این قسمت توضیحاتی در مورد موضوع مورد مطالعه داده می‌شود. تحقیقات دیگران و اطلاعات موجود در این مورد مرور گردیده و نواقص موجود مشخص می‌شود. لازم است منبع هر مطلبی که در این قسمت ارائه می‌شود در پایان جمله یا پاراگراف و یا حتی در صورت لزوم در وسط جمله با شماره مشخص گردد. همچنین در آخر این بخش به طور مختصر ضرورت انجام کار و اهداف تحقیق بیان می‌شوند.

۳- مواد و روش کار: در این بخش مواردی از قبیل نوع مطالعه، مواد و دستگاه‌های مورد استفاده و همچنین نوع و مشخصات نمونه‌ها، روش نمونه‌گیری، انتخاب نمونه‌ها، زمان و مکان نمونه‌گیری و نحوه گروه بندی انجام آزمایشات مختلف برای هر یک از گروه‌ها به تفکیک و با ذکر جزئیات روش، ذکر محدودیتها، نحوه جمع بندی نتایج و روشهای آماری مورد استفاده شرح داده می‌شوند. ولی نتایج تحقیق در این قسمت ارائه نمی‌گردند. توجه داشته باشید که اشاره به روش کار آماری در این بخش (در صورتیکه انجام شده باشد) ضروری است.

۴- نتایج: در این قسمت برای هر بخش از نتایج توضیحات مختصری ارائه می‌شود و نتایج تجزیه و تحلیل آماری آنها بصورت متن، شکل یا نمودار و یا جدول ارائه می‌شود. از تکرار یک نوع داده در بیش از یک شیوه ارائه نتایج خودداری گردد. شکل‌ها، نمودارها و جدول‌ها باید شماره داشته باشند، گویا باشند و مشخصات آماری و اطلاعات لازم از قبیل نام محورها، مقیاس و راهنمای نمودار روی آنها مشخص باشد. عنوان جدول‌ها در بالا و توضیح شکل‌ها و نمودارها در زیر آنها و به

فارسی نوشته می‌شود. تمام جدول‌ها و نمودارها به فارسی و از راست به چپ تهیه گردد.

- تمامی جداول باید فرمت علمی داشته باشند بطوریکه ستون‌های عمودی و همچنین ستون‌های افقی بجز بالا و پائین جدول حذف شوند.

- جدول یا نمودار باید بدون مراجعه به متن گویا و قابل فهم باشد. به همین منظور بایستی کلیه حروف اختصاری استفاده شده، علائمی مانند خط تیره (-)، ستاره (*)، عدم تفاوت معنی دار (NS)، (S.E.M یا $X \pm SD$) در توضیح زیرنویس جدول آورده شود. اعداد جدول و اطلاعات هر ستون نمودار و جداول بصورت فارسی نوشته شود.

- اصل نمودارها به صورت دو بعدی بدون حاشیه و تزئینات اضافی تنظیم شود ابعاد آنها نباید از 12×8 سانتی متر بزرگتر باشد. ارسال فایل نمودار به صورت مجزا الزامی است.

- عکس‌ها علاوه بر متن به صورت فایل‌های مجزا از نوع JPG و با کیفیت مناسب چاپ با نام‌های مشخص در فایل جداگانه ارسال گردد. عکس‌ها و تصاویر باید شماره گذاری متوالی داشته باشد و چنانچه عکس قبلاً منتشر شده باشد منبع اولیه ذکر شود و اجازه کتبی آن ارائه گردد.

۵- بحث: در این قسمت نتایج تحلیل شده و نتایج بدست آمده به طور منطقی با نتایج کارهای دیگران مقایسه شده و تفسیر می‌گردد. به عبارت دیگر در بحث، ارتباطی واضح بین این پژوهش و کارهای قبلی که در این زمینه انجام شده برقرار می‌گردد.

در اینجا می‌توان علت وقوع یا عدم وقوع مسایل را بحث کرد. یافته‌های بدست آمده را با یافته‌های حاصل از پژوهش‌های قبلی مرتبط کرده و در صورتی که این یافته با یکدیگر همخوانی ندارند علت آن را ذکر نمائید. بحث باید دارای پیشنهادات جهت مطالعات بعدی باشد. در قسمت بحث و نتیجه گیری بایستی نویسنده مشخص نماید که چه مطلب جدیدی را به مطالب قبلی اضافه کرده است.

۶- تشکر و قدردانی: در این قسمت افراد یا گروه‌هایی که در انجام تحقیق همکاری داشته‌اند و همچنین نام منابع حمایت مالی که منجر به انجام تحقیق و تهیه مقاله گردیده است تحت عنوان تشکر و قدردانی نام برده می‌شوند. در صورتی که مقاله مذکور مستخرج از طرح تحقیقاتی است مشخصات طرح ذکر گردد.

۷- منابع: منابع باید به ترتیب حروف الفبا نام خانوادگی نویسنده اول تنظیم شود. در صورتی که نویسنده در یک سال دارای چند مقاله می‌باشد، مقالات با حروف a, b, c در کنار سال انتشار مشخص شوند. نحوه نگارش منابع طبق الگوی زیر می‌باشد:

the shelf-life of sea bream (*Sparus aurata*). Biochemical and sensory attributes. J Food Chem. 100: 287-296.

مقاله همایش:

Lanktree, C. and Briere, J. 2011. Antibiotics residues in animal origin foods. The Second International Congress of Food Hygiene, Tehran, Iran.

توجه:

-نحوه ارجاع به منابع در متن، بصورت نوشتن نام نویسنده یا نویسندگان و سال انتشار است

(به عنوان مثال: **Riahi, 2009; Najafi et al., 2001; Smith and Kramer, 2012**). (رئیس و همکاران، ۱۳۹۲)

- مقاله باید ضمن رعایت قواعد نگارشی، به فارسی سلیس نوشته و به جای واژه‌هایی که معادل فارسی مشابه متداول ندارند واژه اصلی در پرانتز یا پاورقی نوشته شود.

- برای بکار بردن کلمات مخفف، اولین بار کامل کلمه نوشته شده و سپس مخفف آن داخل پرانتز قرار گیرد.

- گزارش‌های موردی (Case report) شامل چکیده غیر سازمان یافته حداکثر تا ۲۰۰ کلمه (به فارسی و انگلیسی)، واژگان کلیدی، مقدمه، گزارش مورد، بحث و فهرست منابع باشد.

-مسئولیت صحت و سقم مطالب هر مقاله برعهده نویسنده (گان) آن خواهد بود.

- هیأت تحریریه مجله حق رد، قبول، اصلاح، ویرایش و خلاصه نمودن مقاله را برای خود محفوظ می‌دارد.

-کلیه مقالات منطبق با شرایط فوق، بلافاصله پس از وصول توسط هیئت تحریریه مورد بررسی قرار گرفته و در صورت تائید اولیه مقاله ضمن اعلام به نویسنده، جهت داوری ارسال می‌گردد.

- در کلیه مراحل بررسی مقاله ایرادات و اصلاحات مورد نیاز جهت تامین نظر داوری برای نویسنده مسئول ارسال می‌شود و در صورت تائید نهایی مقاله ضمن اعلام به نویسنده مسئول، در نوبت چاپ قرار می‌گیرد.

- ارسال مقاله به منزله تعهد مؤلف مسئول در خصوص عدم ارسال مقاله به مجله دیگر تا زمان تعیین تکلیف نهایی مقاله است.

لازم به ذکر است اول منابع فارسی و سپس منابع انگلیسی ذکر شوند.

منابع فارسی:

مقاله در مجله

میرزایی، حمید، کریم، گیتی و سوری، مصطفی. (۱۳۸۴). مطالعه تأثیر دکستروز، والین، گلیسین، تیامین و دماهای مختلف بر سرعت رشد لاکتوباسیلوس کازئی در شیر. مجله علوم و صنایع غذایی ایران، سال دوم، شماره ۱، صفحه ۷۱-۶۵.

کتاب تألیفی

کریم، گیتی. (۱۳۷۴). آزمون‌های میکروبی مواد غذایی. چاپ دوم، انتشارات دانشگاه تهران، صفحه ۸۱-۵۷.

کتاب ترجمه‌ای

ویلیام، فریزیر و دنیس، وستهوف. (۱۳۸۱). میکروبیولوژی مواد غذایی. ترجمه: مرتضوی، علی، کاشانی نژاد، مهدی و ضیاءالحق، سیدحمیدرضا، چاپ دوم، مؤسسه چاپ و انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، صفحه ۲۶-۲۴.

استاندارد

سازمان ملی استاندارد ایران. (۱۳۷۵). آماده کردن نمونه‌های مواد غذایی و شمارش میکروارگانیسم‌های مختلف. استاندارد شماره ۳۵۶.

مقاله ارائه شده در همایش

جوادی، افشین، میرزایی، حمید و مقصودلو، سینا. (۱۳۸۹). مطالعه تجربی بقایای انروفلوکسازین در بافت‌های خوراکی طیور به روش FPT تغییر یافته. شانزدهمین کنگره دامپزشکی ایران، تهران، ۹-۷ اردیبهشت ۸۹، صفحه ۱۲۲.

منابع انگلیسی:

کتاب لاتین:

Hall, L. 2011. Fresh Fruit Cleanse. Ulysses Press, London, U.K.

بخشی از یک کتاب:

Kramer, J.M., and Gilbert, R.J. 1989. *Bacillus cereus*. p 68-135. In: Doyle, M.P. (ed.), Foodborne Bacterial Pathogens. Marcel Dekker, New York, pp. 22-70.

مقاله مجله:

Goulas, A.E., and Kontominas, M.G. 2007. Combined effect of light salting, modified atmosphere packaging and oregano essential oil on

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
۱	مطالعه شیوع و مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های اشیریشیا کلی O157 جدا شده از گوشت طیور در اصفهان در تابستان سال ۱۳۹۸ رضا موسوی، ابراهیم رحیمی، امیر شاکریان
۱۰	بررسی ویژگی های ساختاری و ضد میکروبی نانو ذرات اکسید مس تولید شده با استفاده از عصاره گیاه گل بنفشه ایرانی علی داوری، وحید حکیم زاده، الهام مهدیان، مصطفی شهیدی نوقابی
۱۸	تاثیر نور ماوراء بنفش بر تولید رنگدانه و خصوصیات مورفولوژیکی قارچ <i>موناسکوس پورپورئوس</i> آسیه پهلوانی نژاد، مهشید جهادی، نفیسه سادات نقوی، محمدعلی ضیاء
۳۰	بررسی فراوانی سویه های استافیلوکوکی جدا شده از مواد غذایی مختلف و الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی آن ها در اصفهان در سال ۹۵-۱۳۹۴ لاله هویدا، سینا مباشری زاده، سودابه رستمی، بهروز عطایی، عباس داعی
۴۴	ارزیابی ویژگی های پروبیوتیکی و تنوع درون گونه ای سویه های <i>Lactobacillus plantarum</i> جدا شده از مواد غذایی مختلف با روش RAPD-PCR دینا شهرام پور، مرتضی خمیری، محبوبه کشیری، سید محمد علی رضوی
۶۱	بررسی تاثیر آرد برنج بر زنده ماندن باکتری پروبیوتیک <i>لاکتوباسیلوس پارا کازئی</i> در ماست میوه ای و خواص کیفی آن به روش سطح پاسخ فرناز نبی زاده، پانیذ زین ساز
۷۴	ارزیابی آلودگی برخی از ادویه های پرمصرف ایران و کاهش بار میکروبی به روش پرتودهی با اشعه ماورای بنفش بهروز اکبری آدرگانی، معصومه سام نژاد، فائزه شیرخان
۸۷	بررسی اثرات اسانس و عصاره زیره سیاه (<i>Bunium persicum</i>) بر خواص میکروبی و شیمیایی پنیر سنتی لاکتیکی محبوبه ربانی فرد، جواد طباطبائیان نیم آورد، رضا شرافتی چالشری

Table of contents

Title	Page
Study the prevalence and antibiotic resistance of <i>Escherichia coli</i> O157 strains isolated from poultry meat in Isfahan in the summer of 2019	1
Mousavi R, Rahimi E, Shakerian A	
Investigation of structural and antimicrobial properties of copper oxide nanoparticles produced using Iranian violet extract	10
Davari A, Hakimzadeh V, Mahdian E, Shahidi-Noghabi M	
The effect of ultraviolet light on pigment production and morphological characteristics of <i>Monascus purpureus</i>	18
Pahlevaninezhad A, Jahadi M, Naghavy NS, Zia MA	
Prevalence of <i>Staphylococci</i> spp and their antibiotic susceptibility pattern isolated from foodstuffs in Isfahan in 2015-2016	30
Hoveida L, Mobasherizadeh S, Rostami S, Ataie B, Daei A	
Evaluation of probiotic characteristics and intra-species diversity of <i>Lactobacillus plantarum</i> strains isolated from different foods by RAPD-PCR	44
Shahrampour D, Khomeiri M, Kashiri M, Razavi SMA	
The effect of rice flour on survival of <i>Lactobacillus paracasei</i> in fruit yoghurt and its qualitative properties with response surface methodology	61
Nabizadeh F, Zinsaz P	
Evaluating the contamination of some Iranian most consumed spices and reduction of microbial load by UV radiation	74
Akbari-adergani B, Samnezhad M, Shirkhan F	
Effect of Cumin (<i>Bunium persicum</i>) essential oil and extract on microbial and chemical properties in traditional lactic cheese	87
Rabanifard M, Tabatabaian Nimavard J, Sharafati Chaleshtori R	

مطالعه شیوع و مقاومت آنتی بیوتیکی سویه‌های /شیریشیا کلی O157 جدا شده از گوشت طیور در اصفهان در تابستان سال ۱۳۹۸

رضا موسوی^۱، ابراهیم رحیمی^{۲*}، امیر شاکریان^۲

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

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

*نویسنده مسئول: Ebrahimrahimi55@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۸/۲۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۵/۲۴

چکیده

گوشت طیور به عنوان یکی از منابع /شیریشیا کلی O157 در نظر گرفته می‌شود. مطالعه حاضر به منظور ارزیابی شیوع و مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه‌های /شیریشیا کلی O157 از نمونه‌های گوشت طیور عرضه شده در شهر اصفهان انجام پذیرفت. در کل ۵۰۰ نمونه گوشت از انواع طیور عرضه شده در شهر اصفهان جمع آوری و با استفاده از کشت میکروبی از نظر حضور /شیریشیا کلی O157 ارزیابی شدند. جدایه‌های مشکوک با استفاده از آزمون PCR تایید شدند. الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه‌ها با استفاده از آزمون انتشار دیسکی آنتی بیوتیک بررسی شد. در کل ۴۴ نمونه از کل ۵۰۰ نمونه (۸/۸۰ درصد) آلوده به /شیریشیا کلی O157 بودند. بیشترین میزان آلودگی مربوط به گوشت اردک (۱۶ درصد) و کمترین مربوط به گوشت بلدرچین (۳ درصد) بود. اختلافات آماری معنی دار در حد $P < 0/05$ بین نوع نمونه و میزان شیوع /شیریشیا کلی O157 مشاهده شد. جدایه‌های /شیریشیا کلی O157 بیشترین میزان مقاومت آنتی میکروبی را نسبت به آنتی بیوتیک‌های تتراسیکلین (۹۷/۷۲ درصد)، آمپی سیلین (۹۵/۴۵ درصد)، پنی سیلین (۹۵/۴۵ درصد) و جنتامایسین (۷۲/۷۲ درصد) داشتند. بیشترین تنوع در مقاومت آنتی بیوتیکی مربوط به سویه‌های /شیریشیا کلی O157 جدا شده از گوشت اردک یافت شد. به دلیل شیوع بالای سویه‌های مقاوم به آنتی بیوتیک /شیریشیا کلی O157 در نمونه‌های گوشت طیور و خصوصاً گوشت اردک، مصرف این دسته از مواد غذایی به شکل خام یا نیم‌پخته علاوه بر انتقال سویه‌های مقاوم به آنتی بیوتیک به جوامع انسانی، می‌تواند منجر به بروز مسمومیت‌های غذایی مهلک شود.

کلید واژه ها: /شیریشیا کلی O157، گوشت طیور، مقاومت آنتی بیوتیکی، اصفهان.

مقدمه

گوشت طیور، امکان انتقال آلودگی‌های باکتریایی از این ماده غذایی به انسان زیاد است (Rouger et al., 2017). /شیریشیا کلی یک باکتری گرم منفی، میله‌ای شکل، بدون اسپور و بی‌هوازی اختیاری است که جزء باکتری‌های روده‌ای بوده و موجب عفونت‌های غذایی مهلک در انسان می‌گردد (Mead and Griffin, 1998; Raissy et al., 2014). چندین سویه از باکتری /شیریشیا کلی به عنوان بیماری‌زاهای بالقوه در اثر مصرف مواد غذایی آلوده، معرفی شده‌اند. یکی از سویه‌های مهم این باکتری، /شیریشیا کلی O157 می‌باشد که جز تیپ‌های تولید کننده شیکاتوکسین (STEC) است و معمولاً به عنوان عامل ایجاد کننده بیماری‌های مهم و خطرناک کولیت

امروزه تامین غذای سالم به عنوان یکی از شاخص‌های اصلی رشد و پیشرفت جوامع به حساب می‌آید. سهم بالایی از سبد غذایی جوامع مختلف از طریق پروتئین‌های حیوانی تامین می‌شود. در بین پروتئین‌های حیوانی گوشت طیور به عنوان یک منبع سرشار از اسیدهای آمینه ضروری، فسفر، آهن و ویتامین D، یکی از پرمصرف ترین اقلام غذایی است. گوشت طیور نسبت به گوشت قرمز ارزاتر است و هضم ساده‌تری دارد، چربی‌های اشباع کمتری دارد و تا حد قابل قبولی توانسته پاسخگوی نیاز غذایی جوامع باشد (Marangoni et al., 2015). علی‌رغم ارزش تغذیه‌ای بالا و ویژگی‌های غیرقابل انکار

در کل 500 نمونه گوشت طیور شامل مرغ (۱۰۰ نمونه)، بوقلمون (۱۰۰ نمونه)، بلدرچین (۱۰۰ نمونه)، شتر مرغ (۱۰۰ نمونه) و اردک (۱۰۰ نمونه)، به صورت تصادفی از مراکز فروش واقع در شهر اصفهان جمع آوری و در اسرع وقت (حداکثر ۴ ساعت) و در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مرکز تحقیقات کنترل کیفی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد منتقل شد. نمونه‌ها کاملاً سالم و از نظر خصوصیات حسی، کاملاً طبیعی بودند.

جداسازی اشریشیا کلی O157

نمونه‌ها بلافاصله بعد از انتقال به آزمایشگاه به روش کشت میکروبی مورد آزمایش قرار گرفتند. برای این منظور نمونه‌ها ابتدا به خوبی یکنواخت شده و ۲۵ گرم از هر نمونه در ۲۲۵ میلی لیتر محیط مایع آب پیتونه (مرک، آلمان) کشت و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرم خانه گذاری گردید. پس از غنی سازی اولیه باکتری، ۱۰۰ میکرولیتر از محیط مایع غنی کننده به محیط مک کانکی آگار سوربیتول دار (مرک، آلمان) حاوی مکمل‌های سفکسیم و تلوریت پتاسیم منتقل و به صورت خطی کشت و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، گرم خانه گذاری شد. پرگنه‌های سوربیتول منفی و بی رنگ رشد کرده در محیط مک کانکی آگار، با استفاده از کشت در محیط‌های سه قندی (TSI) و مجموعه تست‌های IMViC مورد ارزیابی قرار گرفتند (Chinen et al., 2001).

تایید مولکولی جدایه‌های اشریشیا کلی O157

به منظور تایید ملکولی جدایه‌های اشریشیا کلی O157، از آزمون واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) استفاده شد. برای این منظور، ابتدا جدایه‌های اشریشیا کلی O157 در محیط مایع BHI کشت و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرم خانه گذاری شدند. سپس DNA ژنومی از باکتری‌های رشد کرده در محیط BHI با استفاده از کیت استخراج DNA (سیناژن، ایران) و با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد. سپس کیفیت DNA استخراج شده روی ژل آگارز ۱ درصد

خونریزی دهنده، اسهال خونی و غیرخونی، ترومبوسیتوپنی، آنمی همولیتیک، اختلالات کلیوی و سندرم همولیتیک اورمیک (HUS) در انسان در نظر گرفته می‌شود (Berry and Wells, 2010).

بیماری‌های غذازاد امروزه یکی از عوامل مهم خطر و از شاخص‌های بهداشتی جوامع محسوب می‌شوند. در این میان یکی از چالش‌های اصلی در مورد درمان عفونت‌های غذایی، بروز مقاومت‌های آنتی بیوتیکی بر علیه طیف وسیعی از آنتی بیوتیک‌ها است (Raissy et al., 2012). در مورد اشریشیا کلی O157، مطالعات مختلف نشان داده‌اند که مقاومت زیادی نسبت به گروه‌های آنتی بیوتیکی خصوصاً پنی سیلین‌ها، تتراسایکلین‌ها، فلوروکوئینولون‌ها، سفالوسپورین‌ها و ماکرولیدها وجود دارد (Pormohammad et al., 2019; Srinivasan et al., 2007). میزان مقاومت آنتی بیوتیکی سویه‌های این باکتری در برخی از گزارشات در حدی زیاد است که درمان‌های آنتی بیوتیکی معمولاً بی‌اثر هستند (Carone et al., 2014; Mir and Kudva, 2019). از آنجایی که بررسی‌های بسیار محدودی در زمینه شیوع و الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی اشریشیا کلی O157، وجود دارد لذا بررسی حاضر به منظور مطالعه میزان شیوع و الگوی فنوتیپی مقاومت آنتی بیوتیکی اشریشیا کلی O157 جدا شده از گوشت طیور عرضه شده در شهر اصفهان انجام پذیرفت.

روش کار

نمونه گیری

مطالعه حاضر از نوع توصیفی و مقطعی می‌باشد. برای انجام این بررسی ابتدا حجم نمونه با توجه به میزان شیوع اشریشیا کلی در گوشت طیور که ۲۰ درصد گزارش گردیده (Abbasi et al., 2012) و با توجه به فرمول محاسبه حجم نمونه، محاسبه شد:

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

$$N = (1.96 \times 1.96) \frac{0.2 \times 0.8}{0.025 \times 0.025} = 500$$

(Paton, 1998). در تمام مراحل آزمایش PCR از سویه-
E. coli O157:K88ac:H19 (CAPM استاندارد (5933 به عنوان نمونه کنترل مثبت و از آب مقطر
 استریل به عنوان نمونه کنترل منفی استفاده شد. در نهایت
 محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد حاوی اتیدیوم
 برماید در ولتاژ ثابت ۹۰ ولت به مدت ۳۰ دقیقه
 الکتروفورز شدند و در انتها با استفاده از دستگاه UV
 (UVdoc, UK) از نظر حضور باند با وزن ۲۵۹ جفت
 بازی بررسی شدند.

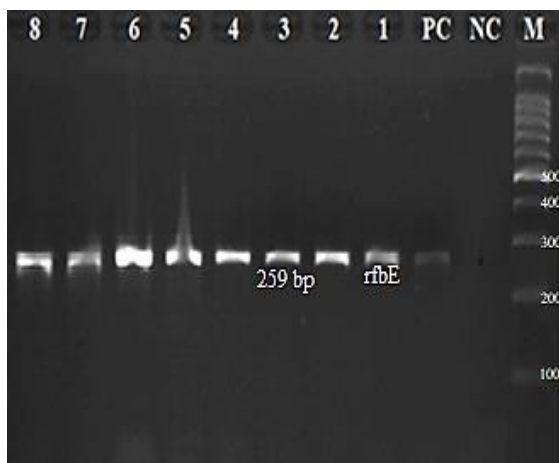
ارزیابی شد. همچنین کمیت DNA استخراج شده نیز به
 روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۲۶۰ نانومتر ارزیابی
 شد. سپس حضور ژن *rfbE* در جدایه‌های *اشریشیا کلی* با
 استفاده از پرایمرهای اختصاصی در آزمون PCR مورد
 ارزیابی قرار گرفت. جدول ۱ شرایط واکنش PCR برای
 ردیابی ژن O157 در جدایه‌های *اشریشیا کلی* را نشان
 می‌دهد. مواد مورد استفاده در واکنش های PCR از
 شرکت Thermofisher Scientific آلمان خریداری شد.
 واکنش‌های PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر
 (Flexcycler², Germany) انجام پذیرفت (Paton and)

جدول ۱. شرایط واکنش PCR برای ردیابی ژن O157 در جدایه‌های *اشریشیا کلی* جدا شده از نمونه های گوشت طیور (Paton and)
 (Paton, 1998)

ژن هدف	توالی پرایمر (5'-3')	اندازه محصول (bp)	حجم واکنش (۵۰ میکرولیتر)	فرایند دمایی
<i>rfbE</i>	F: CGGACATCCATGTGATATGG R: TTGCCTATGTACAGCTAATCC	۲۵۹	5 μL PCR buffer 10X 2 mM MgCl ₂ 150 μM dNTP 0.75 μM of each primers F & R 1.5 U Taq DNA polymerase 3 μL DNA template	1 cycle: 94 °C ----- 6 min 34 cycle: 94 °C ----- 60 s 58 °C ----- 60 s 72 °C ----- 60 s 1 cycle: 72 °C ----- 10 min

آنتی بیوتیکی مورد نظر شامل پنی سیلین (۱۰ میکروگرم/دیسک)، تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم/دیسک)، استرپتومایسین (۱۰ میکروگرم/دیسک)، کلرامفنیکل (۳۰ میکروگرم/دیسک)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم/دیسک)، انروفلوکسازین (۵ میکروگرم/دیسک)، سفالوتین (۳۰ میکروگرم/دیسک) و آمپی سیلین (۱۰ میکروگرم/دیسک) (پادتن طب، ایران)) با استفاده از پنس، روی محیط قرار گرفتند. سپس محیط ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرم خانه گذاری شدند. نتایج با اندازه گیری قطر هاله عدم رشد باکتری در اطراف هر آنتی بیوتیک و با توجه به دستورالعمل CLSI، تفسیر شد. از

الگوی فنوتیپی مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه‌های *اشریشیا کلی* O157
 الگوی فنوتیپی مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه‌های *اشریشیا کلی* O157 جدا شده از نمونه‌های گوشت طیور با استفاده از روش انتشار دیسکی روی محیط مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور از روش Kirby-Bauer طبق دستورالعمل انستیتو استاندارد آزمایشگاهی و بالینی (CLSI) استفاده شد (CLSI, 2015). برای این منظور، جدایه‌های *اشریشیا کلی* O157 از نمونه‌های گوشت طیور به صورت کشت چمنی روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شدند و دیسک‌های



شکل ۱. نتایج الکتروفورز PCR جدایه‌های مشکوک به اشریشیا کلی O157 از نظر حضور ژن O157. M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، NC: کنترل منفی (آب مقطر استریل)، PC (کنترل مثبت آزمون (E. coli O157:K88ac:H19))، ۸-۱: نمونه‌های DNA مثبت از نظر حضور ژن O157 (۲۵۹ جفت باز).

جدول ۲ شیوع اشریشیا کلی O157 در نمونه‌های گوشت طیور عرضه شده در شهر اصفهان را نشان می‌دهد. بر طبق نتایج، در کل ۴۴ نمونه از کل ۵۰۰ نمونه (۸/۸۰ درصد) آلوده به سویه‌های اشریشیا کلی O157 بودند. در این بین بیشترین میزان آلودگی مربوط به گوشت اردک (۱۶ درصد) و کمترین میزان آلودگی مربوط به گوشت بلدرچین (۳ درصد) بود. اختلافات آماری معنی دار در حد $P < 0/05$ بین نوع نمونه و میزان شیوع اشریشیا کلی O157 مشاهده شد.

E. coli O157:K88ac:H19 استاندارد CAPM 5933 به عنوان نمونه کنترل در آزمایش آنتی بیوگرام استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها داده‌های حاصل از این مطالعه با استفاده از نرم افزار آماری SPSS ver.16 و آزمون‌های آماری مربع کای و دقیق فیشر تجزیه و تحلیل شد. اختلافات آماری بین نوع نمونه و شیوع اشریشیا کلی O157 و همچنین شیوع مقاومت نسبت به انواع آنتی بیوتیکی‌ها بر پایه ضریب اطمینان ۹۵ درصد ($P < 0/05$) ارزیابی شد.

نتایج

مطالعه حاضر به منظور ارزیابی شیوع و مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه‌های اشریشیا کلی O157 از نمونه‌های گوشت طیور عرضه شده در شهر اصفهان انجام پذیرفت. در این مطالعه جدایه‌های مشکوک به اشریشیا کلی O157 از نظر حضور ژن O157 با استفاده از آزمون PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند. شکل ۱ نتایج الکتروفورز PCR جدایه‌های مشکوک به اشریشیا کلی O157 از نظر حضور ژن O157 را نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که همه ۴۴ جدایه سوربیتول منفی رشد یافته در محیط کشت مک کانکی آگار سوربیتول دار واجد ژن O157 (۲۵۹ جفت باز) بودند.

جدول ۲. شیوع اشریشیا کلی O157 در نمونه‌های گوشت طیور عرضه شده در شهر اصفهان

P value	فراوانی اشریشیا کلی O157 (درصد)	تعداد نمونه‌ها	نوع نمونه‌ها
0/036	۱۲ (۱۲)	۱۰۰	مرغ
	۵ (۵)	۱۰۰	بوقلمون
	۳ (۳)	۱۰۰	بلدرچین
	۸ (۸)	۱۰۰	شترمرغ
	۱۶ (۱۶)	۱۰۰	اردک
	۴۴ (۸/۸۰)	۵۰۰	کل

جدول ۳ الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه‌های اشریشیا کلی O157 از نمونه‌های گوشت طیور عرضه شده در شهر اصفهان را نشان می‌دهد. جدایه‌های اشریشیا

الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی ۴۴ جدایه اشریشیا کلی O157 از نمونه‌های گوشت طیور عرضه شده در شهر اصفهان با استفاده از روش انتشار ساده دیسکی ارزیابی

مقاومت آنتی بیوتیکی بین جدایه‌های نمونه‌های مختلف دیده شد. بیشترین تنوع در مقاومت آنتی بیوتیکی مربوط به سویه‌های /شیریشیا کلی O157 جدا شده از گوشت اردک بود.

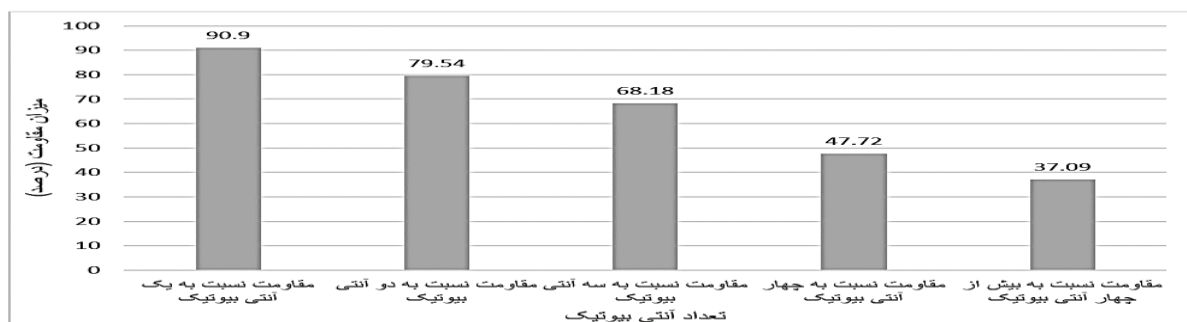
کلی O157 بیشترین میزان مقاومت آنتی میکروبی را به ترتیب نسبت به آنتی بیوتیک های تتراسیکلین (۹۷/۷۲ درصد)، آمپی سیلین (۹۵/۴۵ درصد)، پنی سیلین (۹۵/۴۵ درصد) و جنتامایسین (۷۲/۷۲ درصد) داشتند. اختلافات معنی دار آماری در حد $P < 0.05$ برای شیوع

جدول ۳. الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه‌های /شیریشیا کلی O157 جدا شده از نمونه‌های گوشت طیور عرضه شده در شهر اصفهان

P value	شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی (درصد)							نمونه‌ها (فراوانی /شیریشیا کلی O157)
	آمپی سیلین (۱۰ میکروگرم)	سفالوتین (۳۰ میکروگرم)	انروفلوکسازید (۵ میکروگرم)	جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)	کلرامفنیک (۳۰ میکروگرم)	استرپتومایسین (۱۰ میکروگرم)	تتراسیکلی (۳۰ میکروگرم)	
۰/۰۳۱	۱۲ (۱۰۰)	۵ (۴۱/۶۶)	۶ (۵۰)	۱۰ (۸۳/۳۳)	۲ (۱۶/۶۶)	۱۰ (۸۳/۳۳)	۱۲ (۱۰۰)	مرغ (۱۲)
	۵ (۱۰۰)	۲ (۴۰)	۳ (۶۰)	۵ (۱۰۰)	۲ (۴۰)	۳ (۶۰)	۵ (۱۰۰)	بوقلمون (۵)
	۳ (۱۰۰)	۱ (۳۳/۳۳)	۲ (۶۶/۶۶)	۳ (۱۰۰)	۱ (۳۳/۳۳)	۱ (۳۳/۳۳)	۳ (۱۰۰)	بلدرچین (۳)
	۸ (۱۰۰)	۳ (۳۷/۵۰)	۴ (۵۰)	۴ (۵۰)	۱ (۱۰۰)	۴ (۵۰)	۸ (۱۰۰)	شترمرغ (۸)
	۱۴ (۸۷/۵۰)	۴ (۲۵)	۴ (۲۵)	۱۰ (۶۲/۵۰)	۳ (۱۸/۷۵)	۸ (۵۰)	۱۴ (۸۷/۵۰)	اردک (۱۶)
	۴۲ (۹۵/۴۵)	۱۵ (۳۴/۰۹)	۱۹ (۴۳/۱۸)	۳۲ (۷۲/۷۲)	۹ (۲۰/۴۵)	۲۶ (۵۹/۰۹)	۴۳ (۹۷/۷۲)	کل (۴۴)

حداقل نسبت به یک آنتی بیوتیک مقاومت داشتند. همچنین ۳۷/۰۹ درصد از سویه‌های /شیریشیا کلی O157 جدا شده از نمونه‌های گوشت طیور نسبت به بیش از ۴ آنتی بیوتیک مختلف مقاومت داشتند.

شکل ۲ شیوع مقاومت چندگانه سویه‌های /شیریشیا کلی O157 جدا شده از نمونه‌های گوشت طیور را نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که ۹۰/۹۰ درصد از سویه‌های /شیریشیا کلی O157 جدا شده از نمونه‌های گوشت طیور



شکل ۲. شیوع مقاومت چندگانه سویه‌های /شیریشیا کلی O157 جدا شده از نمونه‌های گوشت طیور

بحث

مطالعه حاضر یکی از فراگیرترین تحقیقات انجام پذیرفته در ایران در زمینه اپیدمیولوژی اشریشیا کلی O157 در گوشت طیور می‌باشد. نتایج بررسی حاضر که روی ۵۰۰ نمونه مختلف گوشت طیور انجام پذیرفت نشان داد که گوشت طیور می‌توانند به عنوان منبع مناسبی برای اشریشیا کلی O157 باشد. میزان شیوع اشریشیا کلی O157 در نمونه‌های مورد بررسی ۸/۸۰ درصد بود و بیشترین آلودگی در نمونه‌های گوشت اردک (۱۶ درصد) دیده شد. دلیل بیشتر بودن میزان شیوع اشریشیا کلی O157 در گوشت اردک احتمالاً سبک زندگی و جیره غذایی (زیست در لجن زارها و مناطق مرطوب) متفاوت این پرند در مقایسه با سایر طیور مورد مطالعه می‌باشد. نتایج مطالعه حاضر همچنین نشان داد که اکثر جدایه‌های اشریشیا کلی O157 نسبت به آنتی بیوتیک‌های تتراسیکلین، آمپی سیلین، پنی سیلین و جنتامایسین مقاوم بودند. در بین جدایه‌های مورد ارزیابی، جدایه‌های گوشت اردک بیشترین تنوع را از نظر مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌های مختلف داشتند. تجویز بی رویه و غیراصولی آنتی بیوتیک‌ها، عدم توجه به نتایج آزمون انتشار دیسکی آنتی بیوتیک و استفاده بیش از حد از مواد ضد عفونی کننده دلایل اصلی بروز مقاومت در بین جدایه‌های اشریشیا کلی O157 هستند. متأسفانه تجویز آنتی بیوتیک‌ها در مزارع پرورش طیور علاوه بر کنترل و درمان بیماری‌ها، به منظور تحریک رشد جوجه‌ها نیز انجام می‌شود که می‌تواند از دیگر دلایل احتمالی افزایش میزان شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی باشد.

در یک مطالعه مشابه، Abbasi و همکاران (۲۰۱۲) میزان شیوع اشریشیا کلی O157 را در نمونه‌های گوشت قرقاوول، کبک، اردک و غاز به ترتیب ۸ درصد، ۰ درصد، ۴/۵۴ درصد و ۸/۳۳ درصد اعلام نمودند (Abbasi et al., 2012). نام بردگان نشان دادند که جدایه‌های اشریشیا کلی O157 بیشترین مقاومت را نسبت به ونکومایسین و سولفامتوکسازول داشتند. همچنین بیشترین مقاومت آنتی

بیوتیکی در بین جدایه‌های اشریشیا کلی O157 جدا شده از گوشت غاز گزارش گردید. مطالعه دیگری توسط Adzitey (۲۰۲۰) در کشور غنا نشان داد که شیوع اشریشیا کلی در نمونه‌های گوشت و فراورده‌ها، ۹۲/۷۰ درصد بود و میزان مقاومت جدایه‌های اشریشیا کلی نسبت به آنتی بیوتیک‌های آموکسی سیلین، آزیترومایسین، سفتریاکسون، کلرامفنیکل، سیپروفلوکسازین، جنتامایسین، تتراسایکلین و سولفامتوکسازول به ترتیب ۲/۲۲ درصد، ۲۴/۴۴ درصد، ۴/۴۴ درصد، ۴/۴۴ درصد، ۲/۲۲ درصد، ۰ درصد، ۲/۲۲ درصد و ۱۷/۷۸ درصد، ۲/۲۲ درصد و ۲/۲۲ درصد بود (Adzitey, 2020). در مطالعه سئو و لی (۲۰۱۸)، ۷۱۶ جدایه اشریشیا کلی از فراورده‌های طیور در کشور کره جداسازی شد. نتایج مطالعه این محققان نشان داد که شیوع مقاومت جدایه‌های اشریشیا کلی بر علیه آنتی بیوتیک‌های سفازولین، سفالکسین، سفوکسیتین، سفوروکسیم، سفوتاکسیم، سفنازیدیم، سفپیم، آمپی سیلین، آموکسی سیلین، نالیدیکسیک اسید، سیپروفلوکسازین، کلرامفنیکل، جنتامایسین، تتراسایکلین، تری متوپریم و ایمین پنم به ترتیب ۲۳/۹۰، ۵۲/۱۰، ۹/۹۰، ۵/۶۰، ۳/۵۰، ۷/۷۰، ۱/۴۰، ۶۱/۳۰، ۳۶/۶۰، ۷۱/۸۰، ۴۵/۱۰، ۴۷/۲۰، ۱۴/۱۰، ۵۳/۵۰، ۵۲/۸۰ و ۲۸/۲۰ درصد بود (Seo and Lee, 2018). شیوع قابل توجه سویه‌های اشریشیا کلی در نمونه‌های طیور و همچنین مقاومت بالای جدایه‌ها نسبت به آنتی بیوتیک‌های تتراسیکلین، آمپی سیلین، پنی سیلین و جنتامایسین در مطالعات انجام پذیرفته در کشور های آمریکا (Davis et al., 2018)، عراق (İnanç and Mustafa, 2018)، ایران (Pormohammad et al., 2019)، آفریقای جنوبی (Jaja et al., 2020) و هلند (Van den Bogaard et al., 2001) نیز گزارش شده است.

نکته قابل توجه در نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر، شیوع مقاومت بر علیه کلرامفنیکل در برخی از جدایه‌های اشریشیا کلی O157 جدا شده از نمونه‌های گوشت مرغ،

assessment of antimicrobial resistance properties in *Escherichia coli* O157 isolated from pheasant, partridge, duck and goose meat. Pajoohandeh J. 17: 210-214.

2. Adzitey F. 2020. Incidence and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from beef (meat muscle, liver and kidney) samples in Wa Abattoir, Ghana. Cogent Food Agric. 6: 1718269.

3. Altalhi A.D., Gherbawy Y.A., and Hassan S.A. 2010. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolated from retail raw chicken meat in Taif, Saudi Arabia. Foodborne Pathog Dis. 7: 281-285.

4. Berry E.D., and Wells J.E. 2010. *Escherichia coli* O157: H7: recent advances in research on occurrence, transmission, and control in cattle and the production environment. Adv Food Nutr Res. 60: 67-117. Elsevier.

5. Carone B.R., Xu T., Murphy K.C., and Marinus M.G. 2014. High incidence of multiple antibiotic resistant cells in cultures of in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. Mutation Res Mol Mech Mutagen. 759: 1-8.

6. Chinen I., Tanaro J.D., Miliwebsky E., Lound L.H., Chillemi G., Ledri S., Baschker A., Scarpin M., Manfredi E., and Rivas M. 2001. Isolation and characterization of *Escherichia coli* O157: H7 from retail meats in Argentina. J Food Prot. 64: 1346-1351.

7. CLSI, 2015. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fifth informational supplement. CLSI document M100-S125.

8. Davis G.S., Waits K., Nordstrom L., Grande H., Weaver B., Papp K., Horwinski J., Koch B., Hungate B.A., and Liu C.M. 2018. Antibiotic-resistant *Escherichia coli* from retail poultry meat with different antibiotic use claims. BMC Microbiol. 18: 174.

9. Halfaoui Z., Menoueri N.M., and Bendali L.M. 2017. Serogrouping and antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from broiler chicken with colibacillosis in center of Algeria. Vet World. 10: 830-835.

بلدرچین، بوقلمون، اردک و شترمرغ بود. استفاده از این آنتی بیوتیک به صورت غیر مجاز در مراکز پرورش طیور دلیل احتمالی ایجاد مقاومت بر علیه این آنتی بیوتیک می باشد. شیوع مقاومت بر علیه کلرامفنیکل در جدایه های /شریشیا کلی جدا شده از فراورده های طیور در مطالعات پیشین نیز گزارش شده است (Altalhi et al., 2010; Halfaoui et al., 2017; Sarker et al., 2019; Talebiyan et al., 2014; Yassin et al., 2017).

نتیجه گیری کلی

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که گوشت طیور به عنوان یک منبع بقا و انتقال سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک /شریشیا کلی O157 و ایجاد بیماری در انسان محسوب می شود. بنابراین کنترل و بازرسی دقیق تر گوشت طیور و جلوگیری از آلودگی آن در کشتارگاه و نهایتاً جلوگیری از آلودگی لاشه طیور در اثر تماس با سایر لاشه ها و همچنین دستکاری هایی که از طرف کارکنان کشتارگاه های می شود، می تواند شیوع آلودگی به /شریشیا کلی O157 را در این مواد غذایی کاهش دهد. نمونه های گوشت اردک بیشترین میزان آلودگی به /شریشیا کلی O157 را داشتند در نتیجه در مصرف این فراورده ها بایستی دقت بیشتری به عمل آید. پخت کامل گوشت و تجویز آنتی بیوتیک ها به شکل قانونمند و با توجه به نتایج آزمون های ساده ای مانند انتشار دیسکی می تواند از بروز عفونت های غذایی بوسیله سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک به /شریشیا کلی O157 جلوگیری کند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مطالعه مراتب تشکر و قدردانی خود را از کارکنان مرکز تحقیقات کنترل کیفی مواد غذایی، معاونت پژوهشی و حوزه ریاست دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، اعلام می دارند.

منابع

1. Abbasi S., Momtaz H., Rahimi E., Momeni M., and Riahi M. 2012. Detection and

10. İnanç A., and Mustafa A.S. 2018. Antibiotic Resistance of *Escherichia coli* O157: H7 Isolated from Chicken Meats. *Tarım ve Doga Derg.* 21: 7.
11. Jaja I.F., Oguttu J., Jaja C.-J.I., and Green E. (2020). Prevalence and distribution of antimicrobial resistance determinants of *Escherichia coli* isolates obtained from meat in South Africa. *Plos One.* 15: e0216914.
12. Marangoni F., Corsello G., Cricelli C., Ferrara N., Ghiselli A., Lucchin L., and Poli A. (2015). Role of poultry meat in a balanced diet aimed at maintaining health and wellbeing: an Italian consensus document. *Food Nutr Res.* 59: 27606.
13. Mead P.S., and Griffin P.M. 1998. *Escherichia coli* O157: H7. *Lancet*, 352: 1207-1212.
14. Mir R.A., and Kudva I.T. 2019. Antibiotic-resistant Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview of prevalence and intervention strategies. *Zoo Publ Health.* 66: 1-13.
15. Paton A.W., and Paton J.C. 1998. Detection and characterization of shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex pcr assays for stx 1, stx 2, eaeA, enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, rfb O111, and rfb O157. *J Clin Microbiol.* 36: 598-602.
16. Pormohammad A., Nasiri M.J., and Azimi T. 2019. Prevalence of antibiotic resistance in *Escherichia coli* strains simultaneously isolated from humans, animals, food, and the environment: a systematic review and meta-analysis. *Infect Drug Res.* 12: 1181-1197.
17. Raissy, M., Khamesipour, F., Rahimi, E., Khodadoostan, A. (2014). Occurrence of *Vibrio* spp., *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli* and *Campylobacter* spp. in crayfish (*Astacus leptodactylus*) from Iran. *Iran J Fish Sci.* 13 (4): 944-954.
18. Raissy, M., Moumeni, M., Ansari, M. and Rahimi, E. (2012). Occurrence of *Vibrio* spp. in lobster and crab from the Persian Gulf. *J Food Saf.* 32: 198-203. doi:10.1111/j.1745-4565.2012.00368.x
19. Rouger A., Tresse O., and Zagorec M. 2017. Bacterial contaminants of poultry meat: sources, species, and dynamics. *Microorganisms.* 5: 50.
20. Sarker M.S., Mannan M.S., Ali M.Y., Bayzid M., Ahad A., and Bupasha Z.B. 2019. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from broilers sold at live bird markets in Chattogram, Bangladesh. *J Adv Vet Anim Res.* 6: 272-277.
21. Seo K.W., and Lee Y.J. 2018. Prevalence of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolated from poultry in Korea. *J Prev Vet Med.* 42: 120-123.
22. Srinivasan V., Nguyen L.T., Headrick S.I., Murinda S.E., and Oliver S.P. 2007. Antimicrobial resistance patterns of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157: H7 and O157: H7- from different origins. *Microbial Drug Res.* 13: 44-51.
23. Talebiyan R., Kheradmand M., Khamesipour F., and Rabiee-Faradonbeh M. 2014. Multiple antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from chickens in Iran. *Vet Med Int.* 2014: 491418.
24. Van den Bogaard A., London N., Driessen C., and Stobberingh E. 2001. Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *J Antimicrob Chemother.* 47: 763-771.
25. Yassin A.K., Gong J., Kelly P., Lu G., Guardabassi L., Wei L., Han X., Qiu H., Price S., and Cheng D. 2017. Antimicrobial resistance in clinical *Escherichia coli* isolates from poultry and livestock, China. *Plos One.* 12: e0185326.

Study the prevalence and antibiotic resistance of *Escherichia coli* O157 strains isolated from poultry meat in Isfahan in the summer of 2019

Mousavi R¹, Rahimi E^{2*}, Sjhakerian A²

1. Ph.D. Student of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
2. Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

*Corresponding author: Ebrahimrahimi55@yahoo.com

Received: 14 August 2020

Accepted: 14 November 2020

Abstract

Poultry meat is considered one of the sources of *Escherichia coli* O157. The present study was performed to evaluate the prevalence and antibiotic resistance of *E. coli* O157 isolates of poultry meat samples presented in Isfahan. In total, 500 meat samples were collected from diverse poultry samples supplied in Isfahan and evaluated for *E. coli* O157 using microbial culture. Suspicious isolates were confirmed by PCR test. The antibiotic resistance pattern of isolates was investigated using the antibiotic disk diffusion test. Forty-four out of a total of 500 samples (8.80%) were contaminated with *E. coli* O157. The highest level of contamination was related to duck meat (16%), and the lowest was related to quail meat (3%). There was a statistically significant difference of $P < 0.05$ between the sample type and the prevalence of *E. coli* O157. *Escherichia coli* O157 isolates had the highest antimicrobial resistance to tetracycline (97.72%), ampicillin (95.45%), penicillin (95.45%), and gentamicin (72.72%) antibiotics. The highest variation in antibiotic resistance was found in *E. coli* O157 strains isolated from duck meat. Due to the high prevalence of antibiotic-resistant *E. coli* O157 strains in poultry samples, especially duck meat, consumption of these foods in raw or uncooked form, in addition to the transfer of antibiotic-resistant strains to human communities, can lead to lethal food poisoning.

Keywords: *Escherichia coli* O157, Poultry meat, Antibiotic resistance, Isfahan.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited

Copyright © 2021 Shahrekord Branch, Islamic Azad University.

بررسی ویژگی‌های ساختاری و ضد میکروبی نانو ذرات اکسید مس تولید شده با استفاده از عصاره گیاه گل بنفشه ایرانی

علی داوری^۱، وحید حکیمزاده^{۲*}، الهام مهدیان^۲، مصطفی شهیدی نوقابی^۲

۱. دانشجوی دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد قوچان، دانشگاه آزاد اسلامی، قوچان، ایران.

۲. گروه علوم و صنایع غذایی، واحد قوچان، دانشگاه آزاد اسلامی، قوچان، ایران.

۳. گروه شیمی، موسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران.

*نویسنده مسئول: V.hakimzadeh@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۱۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۷/۱۶

چکیده

تولید زیستی نانو ذرات به علت دارا بودن ویژگی‌هایی مانند عدم نیاز به مصرف انرژی و سازگاری با محیط زیست مورد توجه محققین واقع شده است. در مطالعه حاضر تولید زیستی و اثرات ضد باکتریایی نانو ذرات اکسید مس تولید شده با عصاره گیاه گل بنفشه مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا عصاره آبی گیاه گل بنفشه ایرانی با محلول نیترات مس ۵ آبه در غلظت نهایی ۱ میلی مولار مجاور شد. پس از تغییر رنگ، محلول‌های واکنش به وسیله روش‌های اسپکتروفتومتری و پراش پرتوی ایکس مورد بررسی قرار گرفتند. خاصیت ضد میکروبی نانو ذرات اکسید مس سنتز شده بر روی *اشرشیاکلی* و *استافیلوکوکوکوس اورئوس* به روش حداقل غلظت ممانعت از رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)، با دو روش میکروداپلوشن و رقت در لوله تعیین شد. وجود نانوذرات اکسید مس بوسیله پراش پرتوی ایکس تایید شد. محلول‌های حاوی نانوذرات، دارای بیشینه چگالی نوری در طول موج ۲۶۶ نانومتر بودند. بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه باکتری *اشرشیاکلی* کمترین حساسیت و باکتری‌های *استافیلوکوکوکوس اورئوس* بیشترین حساسیت را نسبت به نانو ذرات اکسید مس نشان دادند.

کلید واژه‌ها: گل بنفشه، نانوذرات، اکسید مس، ضد میکروبی.

مقدمه

زیاد و تخلیص مشکل و بی فایده اشاره نمود. از این رو نیاز به روشی با بازده بالا، قیمت کم، بدون تولید مواد سمی و بدون آسیب‌های زیست محیطی رو به افزایش می‌باشد (Chandran et al., 2006). یکی از روش‌های تولید نانوذرات، تولید به روش زیستی است و توجه به این روش برای تولید نانوذرات رو به افزایش می‌باشد. فهرستی عظیم از منابعی که در تولید زیستی نانو ذرات فلزی به کار می‌روند موجود است (Dubey et al., 2010). موادی مانند گیاهان، محصولات گیاهان، جلبک‌ها، قارچ‌ها، مخمرها، باکتری‌ها و ویروس‌ها در تولید زیستی نانو ذرات کاربرد دارند (Bar et al., 2009).

گیاهان به علت سازگاری با محیط می‌توانند به طور گسترده مورد استفاده قرار گیرند، بدون این‌که منجر به بروز آسیب‌های زیست محیطی شوند. همچنین گیاهان به

نانو یک فناوری علمی است که بر پایه نانوذرات استوار است. نانوذرات موادی با ساختار سه بعدی می‌باشند که اندازه آن‌ها از ۱ تا ۱۰۰ نانومتر متغیر است. این مواد از ده‌ها و یا صدها اتم یا مولکول تشکیل شده‌اند که اندازه و اشکال مختلفی مثل بلوری، کروی، سوزنی، بی شکل را شامل می‌شوند (Huang et al., 2007). برای تولید نانو ذرات روش‌های مختلفی مانند واکنش‌های شیمیایی و فتوشیمیایی در میسل معکوس، تجزیه حرارتی ترکیبات با کمک گرفتن از پرتوها، روش‌های الکتروشیمیایی، سونوشیمیایی، پردازش با امواج میکرو وجود دارد، اما متأسفانه در اکثر روش‌هایی که منجر به تولید نانو ذرات می‌شود استفاده از مواد خطرناک نظیر حلال‌ها یک اجبار است (Prabha Dubey et al., 2010). از معایب دیگر این روش‌ها می‌توان به تولید کم نانوذرات، اتلاف انرژی

نشان داده است که فلاونوئیدهای گوناگون مانند روتین و کرسنتین در گیاه بنفشه وجود دارد.

هدف از این پژوهش، بررسی ویژگی‌های ساختاری و ضد میکروبی نانو ذرات اکسید مس تولید شده با استفاده از عصاره گیاه گل بنفشه ایرانی می‌باشد.

روش کار

در این مطالعه تجربی، گیاه گل بنفشه به طور مستقیم از کوه‌های شهر مشهد تهیه شد. به منظور تایید جنس و گونه گیاه بنفشه، گیاه مورد نظر توسط متخصص گیاه شناسی بررسی شد. در ساخت کلیه محلول‌ها از آب مقطر دوبار تقطیر استفاده شد.

استخراج عصاره

برای تهیه عصاره آبی، ۲۰ گرم گیاه شسته شد و در دمای اتاق قرار داده شد تا کاملاً خشک شد. گیاه مورد نظر به وسیله هاون چینی خرد شد. ۵ گرم از گیاه خرد شده به وسیله ترازو توزین شد و در یک ارلن ۲۵۰ میلی لیتر ریخته شد و ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر دو بار تقطیر به آن اضافه گردید. این مخلوط برای مدت ۲ ساعت روی همزن در دمای محیط (۲۵ درجه سانتی گراد) قرار داده شد. عصاره آبی با استفاده از کاغذ صافی با منافذ ۲۵ میکرونی صاف شد و در لوله فالكون ریخته و برای استفاده‌های بعدی در یخچال در دمای ۴ درجه سانتیگراد قرار گرفت. سپس ۵۰ میلی لیتر عصاره تهیه شده را داخل یک بشر ریخته و مقدار ۱۰۰ میلی لیتر محلول سولفات مس با غلظت ۱ میلی مولار به عصاره اضافه، سپس ۱۰ دقیقه قرار دادن روی همزن قرار داده شد و در نهایت واکنش در دمای اتاق پس از مدت ۱۲ ساعت (تغییر رنگ عصاره از رنگ آبی به رنگ زرد تیره) با ایجاد کدورت نشان‌دهنده تولید نانوذرات بود (Roy and Barik, 2010).

شناسایی نانو ذرات با استفاده از اسپکتروفتومتر

تعیین چگالی نوری محلول حاوی نانوذرات اکسید مس توسط دستگاه اسپکتروفتومتر Shimadzu مدل Unicode 2100, US طول موج ۲۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر و

علت فراوانی و عدم نیاز به شرایط و مواد غذایی خاص برای رشد گزینه‌ای مناسب برای تولید نانو ذرات به روش زیستی محسوب می‌شوند (Shahverdi et al., 2007).

نانوذرات اکسید مس که به روش زیستی تولید می‌شوند، دارای خصوصیتی مانند میزان سطح بالا، اندازه کوچک و پراکندگی بالا می‌باشند. با وجود این که اثرات ضد میکروبی اکسید مس بر روی باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌ها به خوبی شناخته شده است، اما مکانیسم و روش اثر مس بر روی انواع میکروب‌ها هنوز ناشناخته است (Manonmani and Juliet, 2011). نانو ذرات اکسید مس موجب از هم گسستن اجزای ممانعت‌کننده موجود در غشای خارجی باکتری می‌شود که باعث آزاد شدن تصاعدی مولکول‌هایی نظیر لیپوپلی ساکارید و پورین از سیتوپلاسم می‌شود. نانو ذرات مس پس از نفوذ به داخل سلول باکتری آنزیم‌های آن را غیر فعال کرده و با تولید هیدروژن پراکسید باعث مرگ باکتری می‌شود (Mittal et al., 2013). روش‌های مختلفی برای سنتز نانو ذرات وجود دارد، اما روش‌های فیزیکی و روش‌های شیمیایی به دلیل ایجاد آلودگی‌های زیست محیطی می‌توانند با روش‌های سبز که در آن مواد با اثرات زیان‌بار محیطی کمتری تولید یا مصرف می‌شوند، جایگزین گردند (Gnanasangeetha and Thambavani, 2013).

گیاه بنفشه با نام علمی *VIOLA ODORATA* متعلق به گیاهان خانواده بنفشگان از گل‌های زینتی ایران به شمار می‌رود و تاکنون خواص دارویی زیادی برای این گل گزارش شده است که از جمله می‌توان به اثرات ضد التهابی، ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی، ادرارآوری و خواب‌آوری اشاره کرد. همچنین، مطالعات اخیر نشان داده‌اند که گیاه بنفشه حاوی تعدادی ترکیبات سیکلوتیدی است که اثرات کشندگی سلولی قوی ایجاد می‌کند. مرتضویان و همکاران در سال ۱۳۹۱ در مطالعه‌ی خود بر روی اثر گل بنفشه دریافتند که گیاه بنفشه قادر است تکثیر سلول‌های رده سرطان گردن رحم را مهار کند. مطالعات اخیر

با دقت ۲۰ نانومتر انجام شد. حدود ۲۰۰ میکرولیتر از محلول زرد رنگ حاصل از برهمکنش عصاره گل بنفشه و نمک مس به حجم ۱ میلی لیتر رسانده شد. پیک جذب در حدود طول موج ۲۶۶ نانومتر نشان دهنده وجود نانوذرات مس و در واقع سنتز آن است (Gardea-Torresdey et al., 2003).

بررسی ساختار نانوذرات اکسید مس توسط XRD طیف پراش اشعه ایکس (XRD) از نمونه‌های نانو ذرات اکسید مس با استفاده از Bruker AXSD8 (D8 FOCUS 2200 V Bruker AXS, Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Germany) در $1 = 1.5418 \text{ \AA}$ و در محدوده ۲۰ تا ۸۰ آنگستروم انجام شد (Guin et al., 2015).

بررسی اثر ضد باکتریایی نانوذرات سنتز شده به روش انتشار دیسک

تعیین قطر هاله

سویه های باکتری استاندارد /شریشیایی (ATCC ۱۱۳۰۳) و /استافیلوکوکوس اورئوس (6538) روی مولر هینتون آگار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد رشد داده شد، سپس غلظت‌های مختلف نانو ذرات اکسید مس سنتز شده در آب دیونیزه (۱۰۰، ۵۰، ۲۵ میکروگرم بر میکرولیتر) روی دیسک‌های ۶ میلی-متری بلانک (شرکت پادتن طب) استریل شده در اتوکلاو ریخته و پس از انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، قطر هاله عدم رشد اندازه‌گیری و بر حسب میلی‌متر گزارش گردید. دیسک‌های آنتی بیوتیک آمیکاسین، وانکومايسين ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (شرکت پادتن طب) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی بررسی حداقل غلظت مهار کننده رشد (MIC) به روش میکرو دایلوژن انجام شد. در این روش با استفاده از میکرو پلیت ۹۶ خانه غلظت‌های مختلف نانو ذرات اکسید مس در مقابل باکتری‌ها قرار داده شد و رشد باکتری‌ها در مقابل نانوذرات مس سنتز شده مورد بررسی قرار گرفت.

به این صورت که ابتدا در ۹۶ خانه میکروپلیت به مقدار مساوی ۹۵ میکرولیتر محیط مولر هینتون براث ریخته شد. به لوله اول به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر نانو ذرات اکسید مس با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میکرولیتر اضافه شد که بعد از مخلوط شدن، رقت نانو ذره مورد نظر در لوله اول به نصف رسید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از لوله اول برداشته و به لوله دوم اضافه شد. چاهک آخر حاوی ۱۹۵ میکرولیتر مولر هینتون براث و ۵ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی ولی فاقد ترکیب مورد آزمایش بود این چاهک به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. غلظت نهایی چاهک ۲۰۰ میکرولیتر بود. سپس به تمام چاهک‌ها به غیر از چاهک شماره 12، ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی معادل نیم مگ‌فارلند تلقیح شد. پس از بسته شدن درب، میکروپلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ °C انکوبه شدند. آنگاه کدورت چاهک‌ها به صورت چشمی خوانده شد و رشد یا عدم رشد باکتری در آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت (Kermanshah H et al., 2011).

جهت تعیین حداقل غلظت کشندگی نانو ذره (MBC)، چاهک‌های فاقد کدورت که در آن‌ها رشد مهار شده بود به کمک لوپ استریل بر روی محیط مولر هینتون آگار ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد و انکوبه شد. کمترین غلظتی از نانو ذره که هیچ باکتری در آن زنده نماند به عنوان MBC در نظر گرفته شد (Krishnaraj et al., 2010).

تجزیه و تحلیل آماری

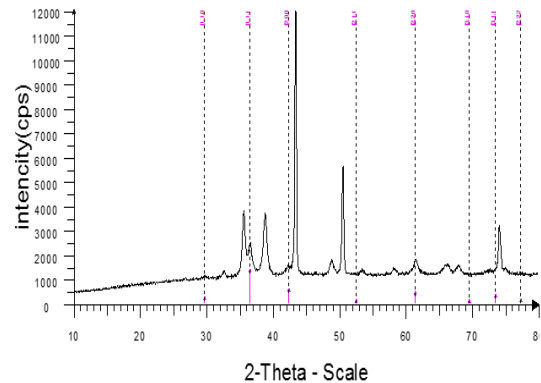
تمامی آزمایشات در سه تکرار انجام شد و مقادیر به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS ویرایش ۱۶ و آنالیز واریانس یک طرفه (oneway-ANOVA) و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون تی تست در سطح احتمال ۰/۰۵ درصد صورت گرفت.

نتایج

سنتز نانو ذرات

نتایج نشان داد در صورت استفاده از غلظت های کمتر پیش ماده محلول یون فلزی به دلیل ایجاد هسته های کوچک تر کمپلکس در نهایت منجر به ایجاد نانو ذرات با اندازه کمتر می شود.

بررسی ساختار نانوذرات اکسید مس توسط XRD طیف XRD نشان دهنده حضور نانوذرات اکسید مس سنتز شده از عصاره گل بنفشه ایرانی می باشد. پیک ۴۳/۱۵ درجه از اهمیت بیشتری برخوردار است. بر طبق طیف گزارش شده در محدوده ۵۲۰ نانومتر بیانگر حضور نانوذرات اکسید مس تشکیل شده در عصاره گیاه می باشد (شکل ۱)



شکل ۱- ساختار نانوذرات با XRD

بررسی خاصیت ضد میکروبی نتایج نشان داد که نانو ذرات اکسید مس سنتز شده از عصاره گیاه گل بنفشه دارای خاصیت ضد باکتریایی بیشتری بر باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به باکتری گرم منفی *اشریشیاکلی* می باشد. بیشترین هاله عدم رشد مربوط به غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر نانو ذرات اکسید مس سنتز شده و کمترین هاله عدم رشد مربوط به غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر می باشد (جدول ۱). میانگین قطر هاله عدم رشد نانو ذره سنتز شده در تمامی غلظت ها بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشتر از میانگین قطر هاله عدم رشد آنتی بیوتیک وانکومایسین و آمیکاسین می باشد. همچنین میانگین قطر هاله عدم رشد نانو ذره سنتز شده در تمامی غلظت ها بر باکتری *اشریشیاکلی* بیشتر از میانگین قطر هاله عدم رشد آنتی بیوتیک وانکومایسین می باشد که دارای اختلاف معنی دار است ($p < 0.05$). قطر هاله عدم رشد آنتی-بیوتیک آمیکاسین علیه باکتری *اشریشیاکلی* بیشتر از قطر هاله مربوط به نانوذرات می باشد.

جدول ۱ - نتایج میانگین قطر هاله عدم رشد نانو ذرات سنتز شده با عصاره آبی گیاه گل بنفشه بر باکتری ها

سویه باکتری		غلظت نانوذرات			آنتی بیوتیک ها
		۲۵	۵۰	۱۰۰	آمیکاسین
<i>استافیلوکوکوس اورئوس</i>		$25 \pm 0/28^e$	$26 \pm 0/34^b$	$27 \pm 0/14^a$	$14 \pm 0/5^e$
<i>اشریشیاکلی</i>		$11 \pm 0/6^c$	$12 \pm 0/22^b$	$14 \pm 0/65^a$	$21 \pm 0/3^e$

حروف مختلف در یک ردیف نشان دهنده اختلاف معنی دار است ($p < 0.05$).

نتایج تعیین MIC و MBC با دو روش میکرودايلوشن و رقت لوله در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان می دهد تاثیر نانو ذرات سنتز شده با عصاره گل بنفشه بر

جدول ۲- نتایج تعیین MIC و MBC نانوذرات سنتز شده با عصاره آبی گیاه گل بنفشه با روش میکرودايلوشن و روش رقت لوله

سویه	میکرودايلوشن		رقت لوله	
	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>استافیلوکوک اورئوس</i>	۰/۸۵	۱/۶۲	۱/۶۲	۱/۶۲
<i>اشریشیاکلی</i>	۳/۱۶	۶/۳۱	۳/۱۶	۳/۱۶

نتایج بر اساس $\mu\text{g/m}$ گزارش شده است

بحث

آنها نشان دادند که نانوذرات نقره سنتز شده از عصاره آبی گیاه *akoingii Murray* بر علیه *استافیلوکوکوکوس اورئوس* و *اشریشیاکلی* میانگین قطر هاله عدم رشد به ترتیب برابر با $14 \pm 0/13$ و $25 \pm 0/7$ را نشان دادند. بررسی خواص ضد باکتریایی نانو ذرات سنتز شده از عصاره آبی گیاه گل بنفشه نشان داد که *استافیلوکوکوکوس اورئوس* نسبت به *اشریشیاکلی* از حساسیت بیشتری برخوردار بود که با نتایج پژوهش Arokiyaraj و همکاران (2016) نیز مطابقت دارد.

از علل حساسیت پایین تر *اشریشیاکلی* می‌تواند به این دلیل باشد که غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی چون *اشریشیاکلا* به‌طور غالب از لیپو پلی‌ساکارید (LPS) مستحکم تشکیل شده‌اند که سد مقاومی در برابر نانو ذره محسوب می‌شود. اصول مکانیسم اثرات سمی نانو ذرات بخوبی شناخته نشده است ولی تحقیقات اخیر، این اثرات سمی را با سطح تماس زیاد نانو ذرات، نفوذ پذیری آنها به داخل سلولها و ارگانیزمها، ایجاد آسیب غشایی، آسیب به DNA، ایجاد التهاب در سلول و تغییر در تعاملات سلولی مرتبط می‌دانند (Sanaeimehr et al., 2018).

مکانیسم عمل ضد میکروبی اکسید مس شبیه سایر نانوذرات می‌باشد و عمدتاً از طریق تخریب دیواره باکتری عمل می‌کند (Chen et al., 2013). فعالیت ضد باکتریایی یکی از ویژگی‌های شناخته شده نانوذرات نقره است. مکانیسم فعالیت ضد باکتریایی در مطالعات متعددی گزارش شده است. نانو ذرات فلزی اکسید مس به غشای سلول باکتری‌ها متصل شده و سوراخ می‌شوند تا عملکرد و نفوذپذیری و تنفس سلول را به هم ریخته و در نتیجه سلولها را نابود کنند. ذرات اکسیژن فعال (ROS) یا گونه‌های رادیکال اکسیژن، که می‌تواند با به دست آوردن الکترون‌ها از نانوذرات مس ساخته شود، به کمک استرس اکسیداتیو، آسیب DNA را تحت تأثیر قرار داده است. یون مس ساخته شده از نانو ذرات اکسید مس همچنین ممکن است باعث اختلال در تولید ATP و تکثیر DNA شود. فسفات و تیولها در اسیدهای نوکلئیک و اسیدهای

در این پژوهش نحوه سنتز سبز نانوذرات اکسید مس با استفاده از عصاره آبی گیاه گل بنفشه ایرانی و اثرات ضد باکتریایی نانوذرات سنتز شده مورد بررسی قرار گرفت. در این پژوهش تغییر رنگ مشاهده شده از آبی کم‌رنگ به زرده تیره در اثر برهمکنش عصاره گیاهی و محلول نمک مس کاملاً با نتایج حاصل از پژوهش Reddy و همکاران (2014) مشابه بوده و اولین نشانه از تولید نانوذرات اکسید مس محسوب می‌شود. نقره در حالت توده‌ای دارای پیک جذبی در طول موج ۲۶۶ نانومتر است، نشان‌دهنده تشکیل نانو ذرات اکسید مس و مربوط به رزونانس پلاسمون سطحی نانو ذرات مس می‌باشد که به القای الکترون آزاد در نانو ذرات نسبت داده می‌شود. در این پژوهش، وجود پیک نانو ذرات مس در طول موج ۲۶۶ با نتایج حاصل از پژوهش سایر محققین همخوانی داشت (Haji Rastamloo et al., 2018).

نتایج بررسی خواص ضد باکتریایی نانوذرات سنتز شده از عصاره آبی گیاه گل بنفشه ایرانی نشان داد که فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات اکسید مس سنتز شده با افزایش غلظت نانوذرات افزایش می‌یابد به طوری که در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر علیه *استافیلوکوکوکوس اورئوس* و *اشریشیاکلی* میانگین قطر هاله عدم رشد به ترتیب برابر با $14/27$ و $65/14$ را نشان دادند. قدرت مهار آنتی بیوتیک آمیکاسین در قیاس با غلظت‌های مختلف نانوذره سنتز بیشتر بود. Etemadi و همکاران (2017) نشان دادند آنتی‌بیوتیک قطر هاله عدم رشد بیشتری نسبت به غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره سنتز شده از عصاره گیاه چای سبز بر علیه باکتری‌های *استافیلوکوکوکوس اورئوس* و *اشریشیاکلی* را نشان داد. در مطالعه‌ای که توسط Brian و همکاران (2016) انجام شد، مشاهده شد که نانوذرات اکسید مس سنتز شده از عصاره آبی گیاه *adefera Moringa* میانگین قطر هاله عدم رشد $14/15 \pm 0/10$ و $12/7 \pm 0/15$ را به ترتیب بر علیه *استافیلوکوکوکوس اورئوس* و *اشریشیاکلی* نشان داد.

یک روش سبز محسوب می‌گردد و بسیاری از مزایایی این روش مانند زیست سازگاری، مقرون به صرفه بودن، اجتناب از حضور حلال‌های سمی، زائد و فعالیت ضد میکروبی و سایر کاربردهای زیست پزشکی و علوم صنایع غذایی اجازه می‌دهد تا این روش در مقیاس بزرگ تجاری بکار رود.

منابع

1. Bar, H., Bhui, D.K., Sahoo, G.P., Sarkar, P., De, S.P., Misra, A. 2009. Green synthesis of silver nanoparticles using latex of *Jatropha curcas*. J Coll Sur A. 339: 134-139.
2. Chandran, SP., Chaudhary. M., Pasricha, R., Ahmad, A., Sastry, M. 2006. Synthesis of gold nanotriangles and silver nanoparticles using Aloe vera plant extract. Biotechnol Prog. 22, 577-83.
3. Dubey, Sh. P., Lahtinen, M., Sillanpaa, M. 2010. Tansy fruit mediated greener synthesis of silver and gold nanoparticles. Process Biochem. 45: 1065-1071.
4. Dubey, Sh., Lahtinen, M., Sillanpaa, M. 2010. Green synthesis and characterizations of silver and gold nanoparticles using leaf extract of *Rosa rugosa*. J Coll Sur A. 364: 34-41.
5. Gardea-Torresdey, J.L., Parsons, J.G., Dokken, K., Peralta-Videa, J., Troiani, H.E., Santiago, P., Jose-Yacaman., M. 2003. Alfalfa sprouts a natural source for the synthesis of silver nanoparticles, Langmuir 19: 1357-1361.
6. Huang, J., Li, Q., Sun, D, et al. 2007. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried *Cinnamomum camphora* leaf. Nanotechnol. 18:104-14.
7. Manonmani, V., Juliet, V. 2011. Biosynthesis of Ag nanoparticles for the detection of pathogenic bacteria in food. IPEDR. 14: 307- 311.

آمینه حاوی نیتروژن، اکسیژن و گوگرد (گروه‌های اهداکننده الکترونی) یک مجتمع را با یون‌های مس تشکیل می‌دهند.

تحقیقات نشان می‌دهد که عصاره‌ها و اسانس‌ها نفوذپذیری غشا را افزایش داده و ترکیبات آن در غشا حل شده و باعث تورم و کاهش عملکرد غشا می‌شوند. بطور کلی فرآورده‌های گیاهی منجر به گراندول شدن سیتوپلاسم، گسیختگی غشای سیتوپلاسمی، غیرفعال شدن یا ممانعت از فعالیت آنزیم‌های درون سلولی و برون سلولی موثر در رشد میکروارگانیسم‌ها و متلاشی شدن دیواره سلولی می‌شوند. عصاره‌ها و اسانس‌ها اثرات ضد میکروبی خود را از طریق تغییر ساختار و عمل غشاء سلولی اعمال می‌کنند. بررسی‌های صورت گرفته در خصوص مکانیسم عمل عصاره‌ها و اسانس‌ها ثابت نموده است که این ترکیبات نفوذپذیری غشا را افزایش می‌دهند. اجزاء عصاره و اسانس با نفوذ در غشا منجر به متورم شدن غشا گردیده و فعالیت آن را تحت تاثیر قرار می‌دهند و در نهایت منجر به مرگ سلول خواهند شد (Holley & Patel, 2005).

نتیجه‌گیری کلی

به طور کلی نتایج این پژوهش پتانسیل بالای عصاره آبی گیاه گل بنفشه ایرانی را در احیای یون‌های فلزی اکسید مس و تبدیل آن‌ها به اتم‌های مس در ابعاد نانومتریک نشان می‌دهد. وجود فعالیت ضد میکروبی بالای نانو ذرات اکسید مس سنتز شده به ویژه علیه باکتری‌های گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* و گرم منفی *اشرشیاکلی* استفاده از آن‌ها را در زمینه‌های مختلف به منظور از بین بردن میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا پیشنهاد می‌کند. بنابراین باتوجه به عوارض آنتی‌بیوتیک‌ها و از طرفی، تولید و نگهداری خیلی ارزان‌تر و ساده تر نانو ذرات اکسید مس از داروهای رایج، این ماده می‌تواند جایگزین مناسبی برای آن‌ها باشد. روش استفاده شده در این پژوهش برای سنتز نانو ذرات اکسید مس از عصاره گیاه گل بنفشه ایرانی به جهت استفاده از منابع زیست محیطی بی‌خطر به عنوان

8. Prabha Dubey, Sh., Lahtinen, M., Sarkka, H., Sillanpaa, M. 2010. Bioprospective of *Sorbus aucuparia* leaf extract in development of silver and gold Nanocolloids. J Coll Sur. 80, 26-33.
9. Roy, N., Barik, A. 2010. Green synthesis of silver nanoparticles from the unexploited weed resources. J Nanotechnol Appl: 95-101.
10. Shahverdi, A. R., Fakhimi, A., Shahverdi, H. R., and Minaian, S. 2007. Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Nanomedicine Nanotechnol Biol Med. 3, 168-171.
11. Guin R, Banu A, Kurian G. 2015. Synthesis of Copper Oxide Nanoparticles Using *Desmodium Gangeticum* Aqueous Root Extract. Int J Pharm Pharmace Sci. 7(1).
12. Etemadi M, Mohebbi-Kalhari D, Azizian Shermeh O, Qasemi A. 2017. Photosynthesize of nanoparticle of Ag with aqua extract of green tea and antibacterial effect. J Fasa Uni Med Sci. 7: 39- 52.
13. Mittal AK, Chisti Y, Banerjee UC. 2013. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. Biotechnol Adv; 31(2):346-56.
14. Gnanasangeetha D, Thambavani DS. 2013. One pot synthesis of zinc oxide nanoparticle chemical and green method. Razi J Med Sci. 1:1-8 30.
15. Bunghez I. 2012. Antioxidant silver nanoparticles green synthesized using ornamental plants. J Adv Mat; 14:1016-22.
16. Reddy NJ, Nagoor Vagoor Vali D, Ranimand Rani Ss. 2014. Evaluation of antioxidant, antibacterial and cytotoxic effects of green synthesized silver nanoparticles by piper longum fruit mater. Sci Eng Mater Biol. 1(34):115-122.
17. Haji Rastamloo B, Ziyani R, Omrani Sh. 2018. Biosynthesis of silver nanoparticles by using *Salvia officinalis* extract and evaluation of antioxidant activity and their antimicrobials against bacteria of food corruption. J Food Sci Technol. 11(2):108-118.
18. Brian MO, hemachitra P, Deepa R, selvi VS. 2016. Synthesis of silver nanoparticles and its antibacterial activity from *Moringa Oleifera*, *murraya Koingii* and *Ocimum sanctum* against *E.coli* and *S.aureus*. Der Pharmacia Lettre. 8(10):150-160.
19. Arokiyaraj S, Vincent S, Saravanan M. 2016. Green synthesis of silver nanoparticles using *Rheum Palmatum* root extract and Their antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. Artif Cells Nanomed Biotechnol. 45(2):372-379.
20. Chen T, Zhao T, Wei D, Wei Y, Li Y, Zhang H. 2013. Core-shell nanocarriers with Cu quantum dots-conjugated Au nanoparticle for tumor-targeted drug delivery. Carbohydr Polym. 92(2):1124-32.
21. Sanaeimehr Z, Javadi I, Namvar F. 2018. Antiangiogenic and antiapoptotic effects of green-synthesized zinc oxide nanoparticles using *Sargassum muticum* algae extraction. Cancer Nanotechnol. 9(1):3.
21. Kermanshah H, Hashemi KS, Arami S, Mirsalehian A, Kamalinejad M, Karimi M, Jabal AF. 2011. Antibacterial effect of hydro alcoholic extract of *Salvia officinalis* and *Mentha longifolia* on three bacteria cause tooth decay *in vitro*. Shaheed Beheshti Uni Den J. 4: 232-237.
22. Krishnaraj C, Jagan E.G. Jagan, S. Rajasekar, P. Selvakumar, P.T. Kalaichelvan, N. Mohan. 2010. Synthesis of silver nanoparticles using *Acalypha indica* leaf extracts and its antibacterial activity against water borne pathogens. J Coll Surf B: Biointerfaces. 76: 50-56.

Investigation of structural and antimicrobial properties of copper oxide nanoparticles produced using Iranian violet extract

Davari A¹, Hakimzadeh V^{2*}, Mahdian E², Shahidi-Noghabi M³

1. Ph.D. Student, Department of Food Science and Technology, Quchan Branch, Islamic Azad University, Quchan, Iran.
2. Department of Food Science and Technology, Quchan Branch, Islamic Azad University, Quchan, Iran.
3. Department of Food Chemistry, Research Institute of Food Science and Technology (RIFST), Mashhad, Iran.

*Corresponding Author: V.hakimzadeh@yahoo.com

Received: 7 October 2020

Accepted: 5 January 2021

Abstract

The bio-production method has been respected due to the lack of energy consumption and environmental compatibility. In this study, the green synthesis of copper oxide nanoparticles from the extract of Iranian flower and its antibacterial properties compared to two common antibiotics was investigated. First, aqueous extract of flower prepared and admixed with CuO solution at a concentration of 1 mM. After changing the color of the extract, the reaction product was examined by spectrophotometric and X-ray diffraction. Finally, the antibacterial properties of synthesized nanoparticles were investigated using the disk diffusion method. Also, the MIC and MBC were determined by microdilution and dilution in the tube. The synthesized copper oxide nanoparticles showed the most absorbance at 266 nm and had a spherical shape with an average size of 50-80 nm. The results of the antibacterial studies showed that the synthesized copper oxide nanoparticles had more antibacterial activity against *staphylococcus aureus* than *Escherichia coli*. The extract of the Iranian violet flower can reduce CuO ion to copper oxide nanoparticles. Also, synthesized copper oxide nanoparticles have good antibacterial activities.

Keywords: Nanoparticles, Iranian violet, Copper oxide, Antibacterial activity.

تاثیر نور ماوراء بنفش بر تولید رنگدانه و خصوصیات مورفولوژیکی قارچ *موناسکوس پورپورئوس*آسیه پهلوانی نژاد^۱، مهشید جهادی^{۲*}، نفیسه سادات نقوی^۳، محمدعلی ضیاء^۴

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی اصفهان، ایران.

۲. گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی اصفهان، ایران.

۳. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی اصفهان، ایران.

۴. گروه علوم پایه، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی اصفهان، ایران.

*نویسنده مسئول: m.jahadi@khuisf.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۱۸

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۷/۱۸

چکیده

توجه مصرف کنندگان مواد غذایی به استفاده از مواد و افزودنی های طبیعی، اهمیت نیاز به پژوهش های در زمینه تولید رنگدانه های طبیعی به ویژه رنگدانه های میکروبی را دو چندان نموده است. از این رو در این مطالعه، سوسپانسیون اسپوری *موناسکوس پورپورئوس* با استفاده از نور ماوراء بنفش در زمان های (20، 30، 45، 60 ثانیه) و فواصل (20، 30، 35 سانتی متر) به صورت تصادفی تیمار گردید. سپس تعداد شش کلنی مشکوک برای بررسی ویژگی مورفولوژیکی انتخاب شد و پس از آن تولید رنگدانه و رشد زیست توده آن ها در حالت مایع مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد نور ماوراء بنفش موجب ایجاد تغییر مورفولوژیکی در قارچ *موناسکوس پورپورئوس* شد. تولید رنگدانه در نمونه های تیمار شده نسبت به سویه وحشی به طور معناداری افزایش یافت ($p < 0.05$). تیمار UV6 در تولید رنگدانه های قرمز، نارنجی و زرد به ترتیب 5، 7 و 2.8 برابر نسبت به سویه وحشی افزایش داشت. تولید رنگدانه طی نسل اول و دوم در تیمارهای UV3، UV4، UV6، UV7 و UV8 با یکدیگر اختلاف آماری معناداری نشان نداد به عبارتی تیمارها در تولید رنگدانه طی گذر دو نسل پایدار بودند ($p < 0.05$). بر اساس نتایج این تحقیق، نور ماوراء بنفش یک تیمار فیزیکی موثر جهت افزایش تولید رنگدانه های قرمز، نارنجی و زرد از قارچ *موناسکوس پورپورئوس* است و عموماً تغییرات پایدار در سویه ایجاد می کند.

کلید واژه ها: *موناسکوس پورپورئوس*، رنگدانه، نور ماوراء بنفش، مورفولوژیکی.

مقدمه

کشورهای آسیایی استفاده می شود (Yang et al., 2015; Patakova, 2013). توانایی بالا در تولید رنگدانه از برجسته ترین ویژگی های *موناسکوس* است. رنگدانه های *موناسکوس* مجموعه ای از متابولیت های قارچی به نام Azaphilones هستند. رنگدانه های تولید شده توسط *موناسکوس* را می توان به سه گروه اصلی تقسیم کرد: رنگدانه های قرمز Monascorubramine و Rubropunctamine، رنگدانه های نارنجی Rubropunctatin و Monascorubrin و رنگدانه های زرد Monascin و Ankaflavin (Yuliana et al., 2017). امروزه نگرانی مصرف کنندگان نسبت به استفاده از مواد شیمیایی بیشتر شده است و تمایل مردم به استفاده از مواد غذایی طبیعی است، چراکه مواد شیمیایی اثرات نامطلوبی بر سلامت انسان دارند. استفاده از رنگدانه ها در

بر اساس مطالعات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی، جنس *موناسکوس* متعلق به نژاد Eumycota، رده ی Ascomycotina، گروه Plectomycetes، راسته ی Eurociences و خانواده ی Elaphomycetaceae یا Monascaceae می باشد (Yang et al., 2015). این قارچ برای اولین بار توسط Van tieghem در سال 1884 شناسایی گردید و تا اواخر قرن بیستم بیش از 20 سویه دیگر از آن نیز ثبت شد. سه سویه ی *M. ruber*، *M. purpureus* و *M. pilosus* نسبت به سایر سویه ها شناخته شده تر هستند (Patakova, 2013; Shao et al., 2014). کپک قرمز برنج به طور وسیعی به عنوان رنگدانه ی طبیعی غذا و نگهدارنده برای گوشت و ماهی همچنین به عنوان دارو برای بهبود سلامت قلب و عروق و نیز به عنوان استارتر در تخمیر شراب و سرکه در

جهش‌زای فیزیکی و تاثیر آن بر مورفولوژی و افزایش تولید رنگدانه‌های قرمز، نارنجی و زرد از قارچ موناسکوس پورپورئوس و همچنین بررسی پایداری ویژگی‌های میکروارگانیسم انجام شد.

روش کار

تهیه سویه

کشت *Monascus purpureus* PTCC 5303 از مرکز کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران (تهران، ایران) تهیه گردید. میسلیوم قارچ بر روی پلیت حاوی محیط کشت (Yeast Powder (YPSS Soluble Starch Agar کشت داده شد و دردمای 30 درجه سانتی‌گراد به مدت هفت روز گرمخانه‌گذاری گردید (بخشی و جهادی، 1396؛ اصغری و همکاران، 1398)

تهیه سوسپانسیون جهت اعمال تیمار

آب مقطر استریل بر روی پلیت حاوی *M.purpureus* ریخته شد و سطح اسپورهای قارچ به وسیله‌ی آنس تراشیده شد. سپس به منظور جداسازی میسلیوم‌ها، آب روی سطح پلیت، تحت شرایط استریل از کاغذ صافی عبور داده شد. غلظت سوسپانسیون، با استفاده از شمارش اسپورها توسط لام نئوبار بر روی 1×10^6 اسپور بر میلی-لیتر تنظیم شد (Babitha et al., 2007; Dikshit & Tallapragada, 2013).

اعمال نور ماوراء بنفش

سوسپانسیون تحت شرایط استریل در زمان‌های (20، 30، 45، 60 ثانیه) و فواصل (20، 30، 35 سانتی‌متر) در معرض لامپ UV (لامپ NARVA، T 30 W T8 / UVC، آلمان) قرار گرفت و به منظور جلوگیری از بازگشت نور، به مدت 12 ساعت در محیط تاریک قرار گرفت. سپس بر روی محیط آگار کشت داده شد (Arshad et al., 2010; Qi et al., 2014).

بررسی ویژگی‌های مورفولوژیکی سویه پس از اعمال تیمار پس از کشت، کلنی‌هایی با ویژگی‌های ظاهری متفاوت ایجاد شدند، هر یک از آن‌ها به صورت جداگانه کشت داده

طیف زیادی از مواد غذایی وجود دارد، پس داشتن رنگدانه با منبع طبیعی به دلیل ماهیت غیرسمی و سالم مورد توجه قرار می‌گیرد. رنگدانه‌های طبیعی نه تنها برای سلامتی انسان مفید هستند، بلکه به دلیل کاهش تولید رنگ‌های سنتزی باعث کاهش مواد شیمیایی خطرناک می‌شوند و به این ترتیب موجب حفظ محیط زیست نیز می‌شوند (Agboyibor et al., 2018). برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه از یک منبع میکروبی، تاثیر شرایط کشت و ترکیبات محیط کشت بر تولید مورد بررسی قرار می‌گیرد (Li et al., 2011). اما بهینه کردن شرایط کشت به تنهایی برای تولید محصول از سویه وحشی، در پاسخگویی به نیازهای صنعتی کافی نیست. به منظور پاسخگویی به نیازهای صنعتی، افزایش تولید رنگدانه ضروری است. رنگدانه‌های میکروبی در بازده کم تولید می‌شوند و از نظر اقتصادی با رنگدانه‌های مصنوعی قابل مقایسه نیستند. بهبود سویه یک ابزار بیولوژیکی مهم برای افزایش راندمان سویه وحشی است. ژنتیک کلاسیک و ژنتیک مولکولی دو روش کاربردی برای این منظور هستند. جهش‌های فیزیکی مانند پرتو ایکس، گاما، نور ماوراء بنفش و جهش‌های شیمیایی مانند اتیل متان سولفونات در گروه جهش‌های کلاسیک برای اصلاح سویه استفاده می‌شوند (Ahmed et al., 2014). به طور کلی هدف از ایجاد جهش، دستیابی به سویه‌ای بهتر است، که متابولیت‌های هدف را بیش از حد معمول تولید کند (Dikshit & Tallapragada, 2018). از نور ماوراء بنفش و ماده‌ی شیمیایی سدیم آزید به طور موفقیت آمیزی جهت ایجاد جهش و افزایش تولید رنگدانه‌ی کاروتنوئید از *Rhodotorula glutinis* استفاده شد (Yolme & Khomeiri, 2016). در مطالعه‌ای دیگر، از نور ماوراء بنفش و ماده‌ی شیمیایی اتیل متان سولفونات به منظور افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه *Monascus sanguineus* استفاده شد (Dikshit & Tallapragada, 2018). این پژوهش برای اولین بار با هدف بررسی استفاده از نور ماوراء بنفش (UV-C) به عنوان یک عامل

(سیگما، 3KC ،آلمان). از اسپکتروفوتومتر (UNICO2100، آمریکا) در سه طول موج 470، 400 و 505 نانومتر به ترتیب برای اندازه‌گیری غلظت رنگدانه زرد، نارنجی و رنگدانه قرمز استفاده شد (Kantifedaki et al., 2018; Agboyibor et al., 2019).

اندازه‌گیری زیست‌توده

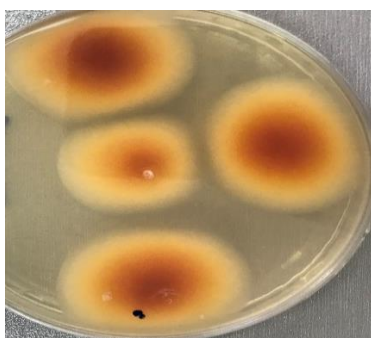
پس از پایان کشت، محتویات ارلن (10 میلی‌لیتر) با استفاده از کاغذ صافی با وزن مشخص صاف گردید و در آون با دمای 65 درجه سانتی‌گراد تا رسیدن به وزن ثابت قرار گرفت. سپس با ترازوی دیجیتال وزن شد (Dikshit & Tallapragada, 2013).

تجزیه و تحلیل آماری

ارزیابی پایداری تولید رنگدانه توسط تیمارها با استفاده از طرح بلوک کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با نرم افزار SAS9.1 و بر اساس آزمون Least Significant Difference (LSD) در سطح اطمینان 95 درصد انجام شد.

نتایج

تاثیر نور ماوراء بنفش بر ویژگی‌های ظاهری *M.purpureus* در جدول 1 و تصاویر آن در شکل‌های 1 و 2 (الف و ب) قابل مشاهده است.



و حشی

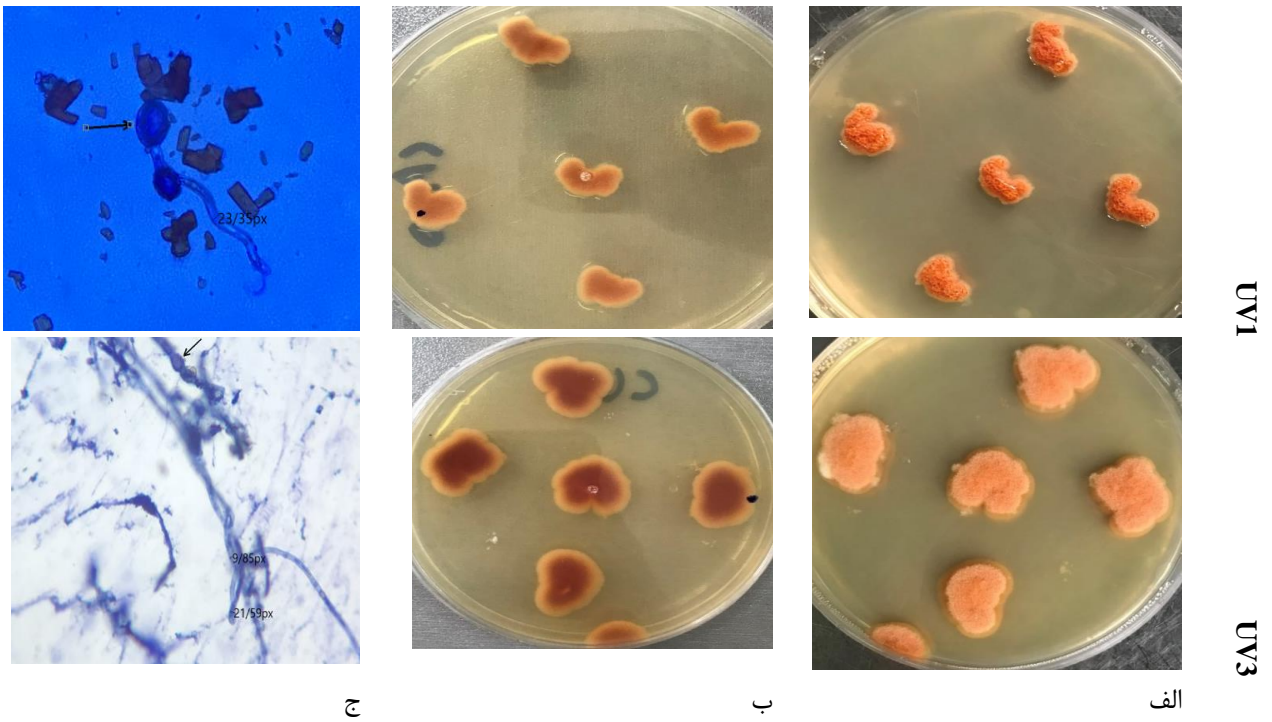
شد و تغییرات رنگ سطح و پشت کلنی، بافت کلنی و قطر کلنی ثبت شد. شکل هایف، تغییرات هایفی از نظر عریض شدن و پیچ‌خوردگی، وجود کلامیدوکنیدی و آسکوسپور و همچنین قطر هایف با میکروسکوپ نوری بررسی شدند. قطر هایف‌ها با نرم‌افزار (Toup view, Version:x64, 4.88.16143.20191216) اندازه‌گیری گردید (Yongsmith et al., 2000; Suh et al., 2007).

کشت مایع جهت اندازه‌گیری رنگدانه و زیست‌توده

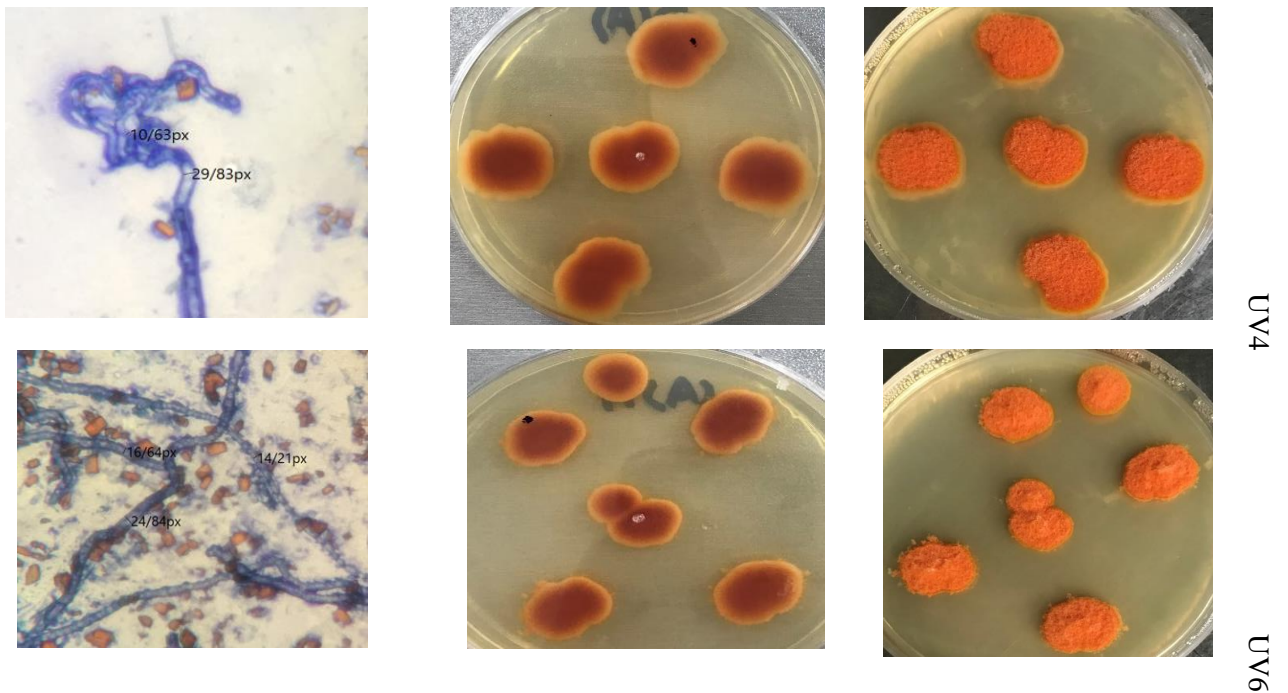
سوسپانسیون با غلظت 5×10^6 اسپور بر میلی‌لیتر تهیه گردید و یک دقیقه در حمام آب 80 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. 10 درصد از سوسپانسیون به ارلن‌های حاوی محیط کشت اضافه شد و 16 روز در انکوباتور شیکردار با دور 100 دور بر دقیقه و دمای 30 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت (Dikshit & Tallapragada, 2013; Keivani et al., 2020).

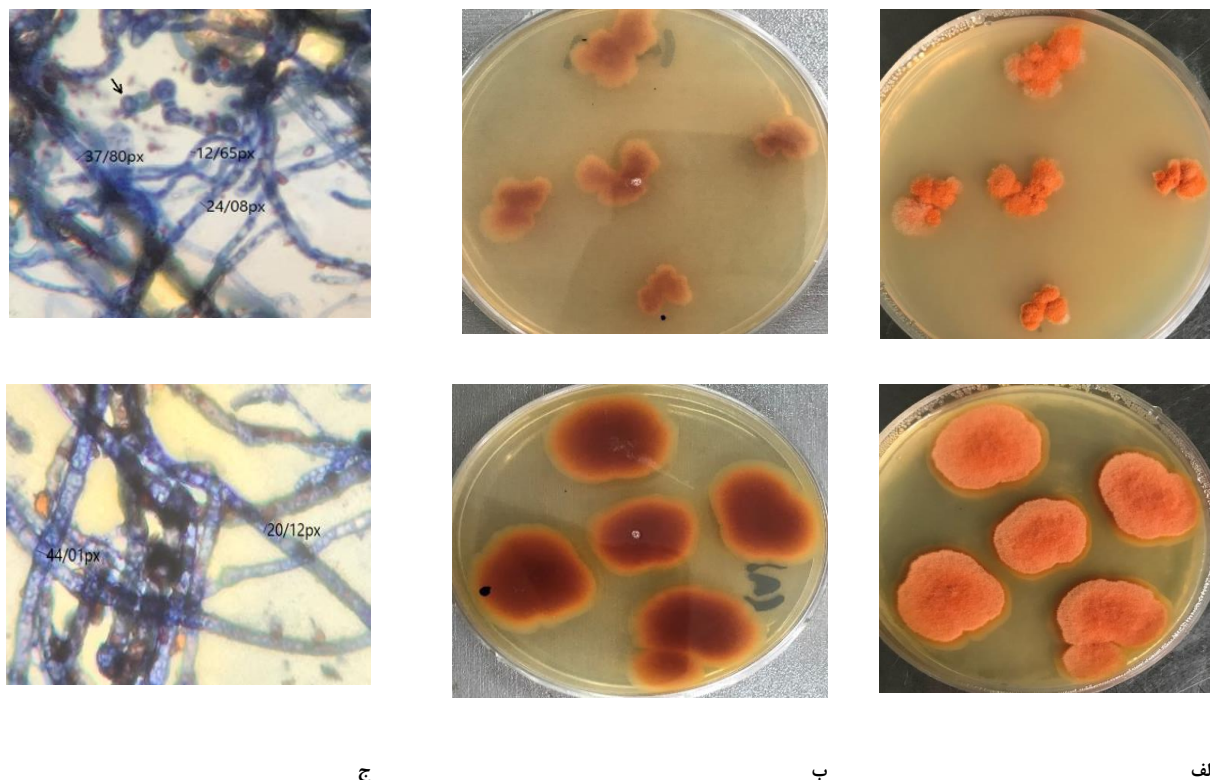
استخراج و اندازه‌گیری رنگدانه

پس از همگن کردن محیط، نمونه با الکل 70 درصد مخلوط و 30 دقیقه در حمام اولتراسونیک (پارسونیک، ایران) 25 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت سپس یک ساعت در شیکر (نور صنعت فردوس، ایران) با دور 180 (دور بر دقیقه) قرار گرفت. برای جداسازی فاز مایع از زیست‌توده، 10 دقیقه با دور 8000 دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد



شکل ۱- تصویر کلنی و میکروسکوپی *M.purpureus* تیمارهای UV1، UV3 و سویه وحشی. الف: سطح پلیت، ب: پشت پلیت، ج: عکس میکروسکوپ با عدسی 40 و بزرگنمایی 75 درصد





شکل ۲ - تصاویر ماکروسکوپی و میکروسکوپی *M. purpureus* تیمارهای UV4، UV6، UV7 و UV8. الف: سطح پلیت، ب: پشت پلیت، ج: نمای میکروسکوپ با عدسی 40 و بزرگنمایی 75 درصد

جدول ۱- تاثیر نور ماوراء بنفش بر شکل ظاهری کلنی *M. purpureus*

تیمار	زمان (s)	فاصله (cm)	رنگ سطح	رنگ پشت	بافت	قطر کلنی (cm) نسبت به زمان (روز)					
						2	3	4	5	6	7
وحشی	-	-	نارنجی کم رنگ	نارنجی، زرد، با هاله پهن سفید	پرزی/کمی برآمده	0.9	1.4	2.1	2.5	3	3.5
UV1	30	20	نارنجی خیلی پررنگ	نارنجی با هاله باریک زرد/ مات	پرزی/برآمده	0.1	0.4	0.6	0.8	1	1.1
UV3	60	20	نارنجی	قرمز با هاله زرد روشن/ مات	پرزی/برآمده	0.7	1.2	1.4	1.6	1.9	2.2
UV4	30	20	نارنجی خیلی پررنگ	نارنجی پررنگ با هاله زرد باریک/ نسبتاً شفاف	پرزی/صاف	0.5	1.3	1.5	1.7	1.9	2.1
UV6	45	35	نارنجی خیلی پررنگ	قرمز با هاله زرد/ شفاف	پرزی/برآمده	0.6	1.2	1.4	1.5	1.7	1.9
UV7	20	30	نارنجی پررنگ	قرمز، نارنجی تیره با هاله زرد/ مات	پرزی/برآمده	0.2	0.5	0.6	0.7	0.9	1
UV8	20	30	نارنجی خیلی پررنگ	قرمز، نارنجی با هاله زرد/ شفاف	پرزی/صاف	0.9	1.4	2	2.4	2.6	2.9

نداشت. توده میسلیمیومی در تیمار UV1 کم و میسلیومها کوتاه شدند. ساختار آسکوسپور دیده شد و ساختارهای کلامیدوکنیدی در حال تشکیل اند. در تیمار UV3، میسلیومها کوتاه شدند و ساختارهای کلامیدوکنیدی در حال تشکیل هستند. بر اساس شکل 2 پیچ خوردگی و قطور شدن هایف در تیمار UV4 مشاهده شد و تعداد کلامیدوکنیدی کم بود. در تیمار UV6 پیچ خوردگی هایفی و مقدار زیادی رنگدانه مشاهده شد. حجم توده میسلیمیومی در تیمار UV7 زیاد بود و همچنین قطور شدن هایف و ساختارهای کلامیدوکنیدی به تعداد زیاد به صورت زنجیری تشکیل شدند. در تیمار UV8 پهن شدگی در هایف و آسکوسپور نیز تشکیل شد.

مطابق با شکل 1 در سویه وحشی *M. purpureus*، شکل کلنی بیضی با اطراف صاف است. شکل کلنی تیمار UV1 نامنظم و برآمدگی ناهمگن در سطح کلنی وجود دارد. کلنی UV3 شکلی نامرتب با اطراف موج دار دارد. بر اساس شکل 2 کلنی تیمارهای UV4 و UV6 به شکل گرد و اطراف آن کمی موج دار است. شکل کلنی در تیمار UV7 نامنظم است و در تیمار UV8 شکل کلنی گرد مایل به بیضی با اطراف حالت دار است. نتایج حاصل از بررسی میکروسکوپی به شرح زیر است و تصاویر آن را می توان در قسمت ج شکل های 1 و 2 دید. مطابق با شکل 1، در سویه وحشی، میسلیومهایی یکپارچه با دیواره عرضی مشاهده شد. قطر هایف حدود 7 میکرومتر است. ساختار آسک دیده شد و ساختار کلامیدوکنیدی وجود

جدول 2- مقایسه میانگین اثر تیمارهای مختلف نور فرابنفش بر تولید رنگدانه قرمز، نارنجی، زرد و رشد زیست توده از *M. purpureus*

تیمار	رنگدانه قرمز AU/ml		رنگدانه نارنجی AU/ml		رنگدانه زرد AU/ml		زیست توده g/l	
	نسل دو	نسل یک	نسل دو	نسل یک	نسل دو	نسل یک	نسل دو	نسل یک
وحشی	± 0.04 ^{f A}	± 0.04 ^{f A}	± 0.04 ^{e A}	± 0.04 ^{f A}	± 0.06 ^{e B}	± 0.05 ^{ef A}	± 0.06 ^{e A}	± 0.06 ^{d A}
	0.56	0.67±0.02	0.41	0.39	0.93	1.12	4.67	4.62
UV1	± 0.01 ^{f A}	± 0.01 ^{f A}	± 0.04 ^{e B}	± 0.04 ^{e A}	± 0.08 ^{e B}	± 0.06 ^{f A}	± 0.09 ^{d A}	± 0.09 ^{d A}
	0.53	0.67±0.06	0.39	0.62	1.00	1.07	4.79	4.66
UV3	± 0.06 ^{d A}	± 0.06 ^{d A}	± 0.10 ^{d A}	± 0.06 ^{d A}	± 0.06 ^{d A}	± 0.05 ^{de A}	± 0.06 ^{c A}	± 0.04 ^{d A}
	1.04	1.17	0.89	0.79	1.32	1.26	4.90	4.92
UV4	± 0.04 ^{b A}	± 0.06 ^{b A}	± 0.04 ^{b A}	± 0.04 ^{b A}	± 0.08 ^{b A}	± 0.06 ^{b A}	± 0.06 ^{b A}	± 0.06 ^{b A}
	2.00	1.85	1.76	1.66	2.25	2.12	5.18	5.42
UV6	± 0.08 ^{a A}	± 0.03 ^{a A}	± 0.08 ^{a A}	± 0.06 ^{a B}	± 0.06 ^{a A}	± 0.04 ^{a A}	± 0.08 ^{a A}	± 0.03 ^{a A}
	2.95	2.81	2.89	2.73	3.21	3.12	5.89	5.78
UV7	± 0.04 ^{c A}	± 0.06 ^{c A}	± 0.04 ^{c A}	± 0.04 ^{c A}	± 0.08 ^{c A}	± 0.11 ^{c B}	± 0.06 ^{b A}	± 0.06 ^{b A}
	1.70	1.58	1.55	1.42	1.57	1.72	5.46±0.08 ^{b A}	5.42
UV8	± 0.08 ^{e A}	± 0.04 ^{e A}	± 0.08 ^{d A}	± 0.13 ^{d A}	± 0.05 ^{d A}	± 0.04 ^{d A}	± 0.18 ^{ab A}	± 0.18 ^{ab A}
	0.78	0.75	0.91	0.85	1.20	1.29	5.28	5.62
LSD	0.15	0.13	0.15	0.15	0.17	0.15	0.16	0.24

در هر ردیف، میانگین هایی با حروف متفاوت بزرگ، در سطح پنج درصد آزمون LSD به صورت جداگانه برای هر مشخصه اختلاف معنی دار دارند.

در هر ستون، میانگین هایی با حروف متفاوت کوچک، در سطح پنج درصد آزمون LSD اختلاف معنی دار دارند.

بررسی پایداری و میزان تولید زیست توده، رنگدانه زرد، نارنجی و قرمز مطابق با جدول 2، تولید رنگدانه قرمز در سویه وحشی و تیمارهای UV1 و UV8 به طور معناداری کمتر از سایر

بنفش، رنگ بیشتری نسبت به سویه وحشی مشاهده شد (Yongsmith et al., 2000). در استفاده از پرتو گاما برای ایجاد جهش در *موناسکوس* نشان داده شد که رنگ کلنی در سویه جهش یافته نسبت به سویه وحشی تیره تر شده است به طوری که در سویه وحشی رنگ کلنی سفید-نارنجی و در سویه جهش یافته نارنجی-قرمز بود (Suh et al., 2007). ایجاد جهش در *موناسکوس* سنگوئینوس توسط نور ماوراء بنفش و اتیل متان سولفونات نیز افزایش تولید رنگدانه در تمام جهش یافته ها را نسبت به سویه وحشی نشان داد (Dikshit, 2018 & Tallapragada). تیمارهای UV4، UV6 و UV1 بیشترین رنگ را در سطح کلنی داشتند و تیمارهای UV3، UV6، UV7 و UV1 بیشترین رنگ را در پشت کلنی نشان دادند. تیمارهای UV1، UV3 و UV7 در پشت کلنی حالت مات شدگی داشتند درحالیکه پشت کلنی سویه وحشی شفاف بود. سطح کلنی در تیمارهای UV4 و UV6 صاف و در سویه وحشی برآمدگی کمی در کل سطح کلنی دیده شد. نتایج تحقیق حاضر با نتایج Suh et al. (2007) که حاکی از کاهش قطر کلنی در نمونه های جهش یافته بود همراستا است (Suh et al., 2007). تیمارهای UV1 و UV7 کمترین قطر را بین سایر تیمارها و سویه وحشی *M. purpureus* میسلیوم های یکپارچه با دیواره ی عرضی دارد. دیواره ی عرضی در اکثر تیمارها مشاهده شد.

در طی هفت روز گرمخانه گذاری در سویه وحشی و تیمارهای UV1، UV7 و UV8، آسکوسپور تولید شد. آسکوسپور مسئول تولید مثل جنسی در آسکومیست ها است (Carels and shepherd, 1975). ولی در تیمارهای UV4، UV6 و UV3 این ساختار مشاهده نشد. علت آن را می توان تاثیر نور ماوراء بنفش بر به تعویق انداختن تشکیل آسکوسپور در این تیمارها و تاثیر بر تولید مثل جنسی دانست. در سویه هایی که آسکوسپور مشاهده نشد احتمالاً تولید مثل غیر جنسی انجام شده است. در بررسی میکروسکوپی سویه جهش یافته ی KU609 و سویه

تیمارها است ($P < 0.05$). تولید رنگدانه نارنجی در تمامی تیمارها به طور معناداری از سویه وحشی بیشتر است ($P < 0.05$) درحالیکه در تیمارهای UV8 و UV3 با یکدیگر اختلاف آماری معناداری نداشت. تولید رنگدانه زرد در تیمارهای UV6، UV4 و UV7 به طور معناداری از سویه وحشی و تیمارهای UV8، UV3 و UV1 بیشتر است ($P < 0.05$). بین تیمارهای UV8، UV3، UV1 و سویه وحشی در تولید رنگدانه زرد اختلاف آماری معناداری وجود نداشت. تیمار UV6 به طور معناداری رشد بیشتری نسبت به سایر تیمارها و سویه وحشی داشت ($P < 0.05$). تیمار UV1 و سویه وحشی کمترین رشد را نشان دادند ($P < 0.05$). بررسی پایداری تولید رنگدانه قرمز و زرد در طی نسل یک و دو، در کلیه تیمارها اختلاف آماری معناداری وجود نداشت. در تولید رنگدانه نارنجی طی دو نسل نیز، تمامی تیمارها به جز تیمار UV1، پایدار بودند. رشد زیست توده در تیمارهای UV1، UV3، UV6، UV7 و سویه وحشی با یکدیگر اختلاف آماری معناداری نداشت و تا نسل دوم تخمیر حالت مایع، زیست توده رشد نسبتاً یکسانی را از خود نشان داده است.

بحث

نادری بروجنی و همکاران (1387) در بررسی ویژگی های ظاهری سویه *M. purpureus* گزارش دادند که سطح کلنی کمی برآمده با اطراف صاف، ظاهری شفاف و رنگ سطح کلنی اغلب سفید است. قطر کلنی حدود 1.4 تا 4 سانتی متر در محیط های مختلف متغیر است. مطابق با نتایج بدست آمده، تیمارهای UV1، UV4، UV6 و UV7 بیشترین تغییر ظاهری را نسبت به سویه وحشی نشان دادند. از نظر شکل کلنی سویه وحشی بیضی و با اطراف صاف است. تیمارهای UV1، UV3 و UV7 شکل نامنظم با اطراف حالت دار داشتند و تیمارهای UV4، UV6 و UV8 شکل گرد ماندی با اطراف کمی موج دار نشان دادند. رنگ سطح کلنی در تمامی تیمارها از سویه وحشی بیشتر بود. در کلنی سویه های جهش یافته توسط نور ماوراء

بیشتر است. در سایر تیمارها متوسط قطر هایف حدود 20 میکرومتر بود. بر اساس جدول 2 می‌توان نتیجه گرفت، رشد زیست‌توده در سویه وحشی و تیمار UV1 اختلاف آماری معناداری نداشته و از سایر تیمارها در سطح آماری 5 درصد کمتر است ($P < 0.05$). تیمار UV6 به طور معناداری رشد بیشتری نسبت به سایر تیمارها از خود نشان داد و حدود 1.2 برابر بیشتر از سویه وحشی بود ($P < 0.05$). تولید رنگدانه زرد به ترتیب در تیمارهای UV6، UV4، و UV7 به طور معناداری از سویه وحشی و تیمارهای UV8، UV3، و UV1 بیشتر بود ($P < 0.05$) و بین تیمارهای UV8، UV3، و UV1 و سویه وحشی اختلاف آماری معناداری مشاهده نشد. تیمار UV6 حدود 2.8 برابر تولید رنگدانه زرد را نسبت به سویه وحشی افزایش داد. تولید رنگدانه نارنجی در تمامی تیمارها به طور معناداری سویه وحشی بیشتر بود ($P < 0.05$). تیمارهای UV8 و UV3 در تولید این رنگدانه با یکدیگر اختلاف آماری معناداری نشان ندادند. تیمار UV6 نیز در تولید رنگدانه نارنجی از سایر تیمارها بهتر و افزایش 7 برابری نسبت به سویه وحشی نشان داد. تولید رنگدانه قرمز به ترتیب در تیمارهای UV6، UV4، و UV7 و UV3 در سطح آماری 5 درصد بیشتر از سویه وحشی و تیمارهای UV8 و UV1 بود ($P < 0.05$). تیمار UV6 حدود 5 برابر نسبت به سویه وحشی در تولید رنگدانه قرمز افزایش داشت. تولید رنگدانه در سویه جهش یافته R-10847 نسبت به سویه والد به مقدار زیادی افزایش یافت. این بیش تولیدی در رنگدانه خارج سلولی در اثر افزایش نشت سلول پس از جهش ایجاد شده است با این فرض که رنگدانه‌ها با همان سرعتی که سنتز می‌شوند، دفع شوند (Lin & Iizuka, 1982). تیمار با نور ماوراء بنفش بهترین روش برای بهبود تولید رنگدانه از قارچ موناسکوس است به طوریکه جهش‌یافته‌ی KB10M16، افزایش دو برابری در تولید رنگدانه قرمز در مقایسه با سویه والد ایجاد کرد. جهش‌یافته‌ی KB20M10.2 که از جهش‌یافته‌ی KB10M16 مشتق شده غلظت 6 برابر از رنگدانه را ایجاد

وحشی، تشکیل آسکوسپور مشاهده شد با این تفاوت که قطر آسکوسپور در سویه جهش‌یافته کاهش یافته بود (Suh et al., 2007). در حالی که سویه‌ی جهش یافته‌ی R-10847 توانایی تشکیل آسکوسپور را از دست داد (Lin & Iizuka, 1982). تمام جهش یافته‌ها، تنوع در مورفولوژی اسپور را نشان دادند که به نوبه خود بر تولید متابولیت‌های ثانویه تأثیر گذاشته است. طول زندگی جنسی و غیرجنسی نیز می‌تواند عامل مهمی در سنتز رنگدانه‌ها باشد زیرا سویه آلبینو بدست آمده از تیمار نور ماوراء بنفش، قادر به تولید کلسوتوشیا به عنوان بدن بارده نبود. آلتروکنیدیا (چرخه زندگی غیرجنسی) با سویه آلبینو مشاهده شد. جهش‌های UV-4 و EMS-3 در مقایسه با سویه وحشی، آسکوسپورهای رنگی (چرخه زندگی جنسی) نشان دادند که این می‌تواند دلیل بیشتری برای تولید رنگدانه از سویه‌های جهش‌یافته باشد (Tallapragada & Dikshit, 2018). ساختارهای کلامیدوکنیدی زمانی تشکیل می‌شوند که سویه تحت تنش و شرایط خاصی قرار گرفته باشد. تشکیل این ساختار به معنای وارد شدن سویه به فاز مقاومت در برابر تنش ایجاد شده است که در سویه وحشی که تحت هیچ تیماری قرار نگرفته مشاهده نشد اما در تیمار UV7 به تعداد زیاد به صورت زنجیری تشکیل شدند. همچنین تیمار UV4 نیز دیده شد. تیمار UV3 به تعداد کمتری کلامیدوکنیدی تشکیل داد. در تیمارهای UV1 و UV3 کوتاه شدگی در هایف دیده شد. کوتاه شدن هایف در سویه‌های جهش‌یافته KB10M16 و KB20M10.2 نیز مشاهده شد (Yongsmith et al., 2000). میسلیوم‌ها در جهش‌یافته‌ی KU609 نسبت به سویه‌ی وحشی کوتاه‌تر بودند (Suh et al., 2007). تیمارهای UV4 و UV6 پیچ‌خوردگی هایفی داشتند. قطر هایف در تیمارها نسبت به سویه وحشی افزایش یافته است. بیشترین قطر هایف در تیمار UV8 دیده شد که تقریباً 4 برابر نسبت به سویه وحشی افزایش داشت و کمترین قطر هایف مربوط به تیمار UV3 است که حدود 2.5 برابر از سویه وحشی

بود. طبق نتایج حاصل، با اعمال تیمار ماوراء بنفش به عنوان یک تیمار فیزیکی موثر و کارآمد در تولید رنگدانه توسط *موناسکوس پورپورئوس* می‌توان بازده بیشتری از ترکیبات با ارزش و رنگدانه‌های طبیعی در مقیاس تجاری، از این قارچ به دست آورد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله حاضر بدینوسیله مراتب سپاس و قدرانی خود را از مرکز تحقیقات اصلاح و تولید بذر، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان اعلام می‌دارند.

منابع

1. اصغری، مهشید، جهادی، مهشید و قاسمی‌سپرو، نفیسه. (1398). ارزیابی پارامترهای زمان گرمخانه‌گذاری، میزان نمک و ضایعات خرما در تولید رنگدانه نارنجی توسط قارچ *موناسکوس پورپورئوس* با استفاده از روش سطح پاسخ. مجله میکروبیولوژی مواد غذایی، سال ششم، شماره 3، صفحه 69-60.
2. بخشی، فاطمه و جهادی، مهشید. (1396). بهینه‌سازی تولید رنگدانه نارنجی توسط قارچ *موناسکوس پورپورئوس* از ضایعات خرما به روش سطح پاسخ. مجله میکروبیولوژی مواد غذایی، سال چهارم، شماره 4، صفحه 39-31.
3. نادری بروجنی، حمدالله، نحوی، ایرج، شادزی، شهلا و اعتمادیفر، زهرا. (1387). جداسازی و شناسایی قارچ *Monascus* تولید کننده پیگمان. مجله زیست‌شناسی ایران، جلد 22، شماره 3، صفحه 534-526.
4. Aftab M.N., Haq I.U. and Baig S. 2012. Systematic mutagenesis method for enhanced production of bacitracin by *Bacillus licheniformis* mutant strain UV-MN-HN-6. Braz J Microbiol. 43: 78-88.
5. Agboyibor C., Kong W.B., Chen D., Zhang A.M. and Niu S.H.Q. 2018. *Monascus* pigments production, composition, bioactivity and its application: a review. Biocatal Agric Biotechnol. 16: 433-447.
6. Agboyibor C., Kong W.B., Zhang A.M. and Niu S.H.Q. 2019. Nutrition regulation for the

کرد (Yongsmith et al., 2000). در بحث پایداری در رشد و تولید زیست‌توده، تیمارهای UV1، UV3، UV6، UV7 طی نسل یک و دو اختلاف آماری معناداری نداشتند و تا نسل دوم کشت حالت مایع، زیست‌توده رشد نسبتاً یکسانی را از خود نشان داد. تولید رنگدانه زرد و نارنجی در کلیه تیمارها به جز UV1، در طی دو نسل اختلاف آماری معناداری نداشت این نشان دهنده‌ی ثبات در تولید کشت حالت مایع است. پایداری در تولید رنگدانه قرمز در تمام نمونه‌ها مشاهده شد. پایداری در تولید متابولیت‌های ثانویه از قارچ *موناسکوس سنگوئینوس* جهش‌یافته طی 5 نسل متوالی (Dikshit & Tallapragada, 2018). در تولید باسیتراسین توسط سویه جهش‌یافته *باسیلوس لیچنیفرمیس* طی 15 نسل (Aftab et al., 2012) در تولید ایتاکونیک اسید حاصل از سویه جهش‌یافته *آسپرژیلوس ترئوس* با استفاده از نور ماوراء بنفش (Wu et al., 2017) همراهی با نتایج تحقیق حاضر می‌باشد که احتمالاً به دلیل تغییر دائمی در توالی DNA ناشی از جهش‌زاهای مورد استفاده است (Aftab et al., 2012).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد، نور ماوراء بنفش در زمان و فواصل مختلف، سویه‌هایی با ویژگی مورفولوژیکی و توانایی تولید متفاوت ایجاد می‌کند. تیمار *موناسکوس پورپورئوس* با استفاده از نور ماوراء بنفش موجب افزایش در تولید رنگدانه‌های قرمز، نارنجی و زرد نسبت به سویه وحشی می‌شود. نمونه‌های UV3، UV4، UV6، UV7 و UV8 در تولید رنگدانه نسبت به سویه وحشی به طور معناداری برتری داشتند ($P < 0.05$). تیمار UV6 (45 ثانیه، 35 سانتی‌متر) نسبت به سایر تیمارها به طور معناداری بیشترین تولید را در هر سه رنگدانه از خود نشان داد ($P < 0.05$). طی دو نسل، تولید رنگدانه و رشد زیست‌توده توسط نمونه‌های UV3، UV4، UV6، UV7 و UV8 با یکدیگر اختلاف آماری معنادار نداشت و پایدار

- production of *Monascus* red and yellow pigment with submerged fermentation by *Monascus purpureus*. Biocatal Agric Biotechnol. 21: 1-7.
7. Ahmed A.F., AboElmagd H.I. and Housseiny M.M. 2013. Improvement of alkaline protease production by *Penicillium chrysogenum* NRRL792 through physical and chemical mutation, optimization, characterization and genetic variation between mutant and wild-type strains. Ann Microbiol. 64: 521-530.
8. Arshad R., Farooq S.H. and Ali S.SH. 2010. Improvement of penicillin G acylase expression in *Escherichia coli* through UV induced mutations. Braz J Microbiol. 41: 1133-1141.
9. Babitha S., Soccol C.R. and Pandey A. 2007. Effect of stress on growth, pigment production and morphology of *Monascus* sp. in solid cultures. J Basic Microbiol. 47: 118-126.
10. Carels M. and Shepherd D. 1975. Sexual reproductive cycle of *Monascus* in submerged shaken culture. J Bacteriol. 122: 288-294.
11. Dikshit R. and Tallapragada P. 2013. Comparative study of *Monascus sanguineus* and *Monascus purpureus* for red pigment production under stress condition. Int Food Res J. 20: 1235-1238.
12. Dikshit R. and Tallapragada P. 2018. Development and screening of mutants from *Monascus sanguineus* for secondary metabolites production. Beni-Suef univ J basic appl sci. 7: 235-240.
13. Kantifedaki A., Kachrimanidou V., Mallouchos A., Papanikolaou S. and Koutinas A.A. 2018. Orange processing waste valorisation for the production of bio-based pigments using the fungal strains *Monascus purpureus* and *Penicillium purpurogenum*. J Clean Prod. 185: 882-890.
14. Keivani H., Jahadi M. and Ghasemiseper N. 2020. Optimizing submerged cultivation for the production of red pigments by *Monascus purpureus* on soybean meals using response surface methodology. Appl Food Biotechnol. 7:143-152.
15. Li S.W., Li M., Song H.P., Feng J.L. and Tai X.S. 2011. Induction of a high-yield lovastatin mutant of *Aspergillus terreus* by 12C6+ heavy-ion beam irradiation and the influence of culture conditions on lovastatin production under submerged fermentation. Appl Biochem Biotechnol. 165: 913-925.
16. Lin C.F and Iizuka H. 1982. Production of extracellular pigment by a mutant of *Monascus kaoliang* sp. Nov. Appl Environ Microbiol. 3: 671-676.
17. Patakova P. 2013. *Monascus* secondary metabolites: production and biological activity. J Ind Microbiol Biotechnol. 40: 169-181.
18. Qi Z.H., Wang W., Yang H., Xia X. and Yu X. 2014. Mutation of *Acetobacter pasteurianus* by UV irradiation under acidic stress for high-acidity vinegar fermentation. Int J Food Sci Technol. 49: 468-476.
19. Shao Y., Lei M., Mao Z., Zhou Y. and Chen F. 2014. In sights into *Monascus* biology at the genetic level. Appl Microbiol Biotechnol. 98: 3911-3922.
20. Suh H.S., Rheem S., Mah J.H., Lee W., Byun M.W. and Hwang H.J. 2007. Optimization of production of monacolin K from γ -irradiated *Monascus* mutant by use of response surface methodology. J Med Food. 10: 408-415.
21. Wu X., Liu Q., Deng Y., Li J., Chen X., Gu Y., Lv X., Zheng Z.H., Jiang S.H. and Li H. 2017. Production of itaconic acid by biotransformation of wheat bran hydrolysate with *Aspergillus terreus* CICC40205 mutant. Bioresour Technol. 241: 25-34.
22. Yang Y., Liu B., Du X., Li P., Liang B., Cheng X., Du L., Huang D., Wang L. and Wang S.H. 2015. Complete genome sequence and transcriptomics analyses reveal pigment biosynthesis and regulatory mechanisms in an industrial strain, *Monascus purpureus* YY-1. Sci Rep. 5 :8331. 1-9.
23. Yolmeh M. and Khomeiri M. 2016. Using physical and chemical mutagens for enhanced carotenoid production from *Rhodotorula glutinis* (PTCC 5256). Biocatal Agric Biotechnol. 8: 158-166.

24. Yongsmit B., Kitprechavanich V., Chitradon L., Chairisook C.H. and Budda N. 2000. Color mutants of *Monascus* sp. KB9 and their comparative glucoamylases on rice solid culture. J Mol Catal B Enzym. 10: 263-272.

25. Yuliana A., Singgih M., Julianti E. and Blanc P.J. 2017. Derivates of azaphilone *Monascus* pigments. Biocatal Agric Biotechnol. 9: 183-194.

The Effect of ultraviolet light on pigment production and morphological characteristics of *Monascus purpureus*

Pahlevaninezhad A¹, Jahadi M^{2*}, Naghavy NS³, Zia MA⁴

1. M. Sc. Student of the Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

2. Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

3. Department of Microbiology, Faculty of Basic Science, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

4. Department of Basic Sciences, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan

*Corresponding author: m.jahadi@khuisf.ac.ir

Received: 9 October 2020

Accepted: 7 January 2021

Abstract

People's concerns about the use of synthetic additives have doubled the importance of the need for research in the field of production of natural pigments, especially microbial pigments. Therefore, in this study, the spore suspension of *Monascus purpureus* was treated using ultraviolet light at random times (20, 30, 45, 60 seconds) and intervals (20, 30, 35 cm). Then, six suspicious colonies were selected to study the morphological characteristics, and their pigment production and biomass growth were studied as liquid culture. The results showed that ultraviolet light caused morphological changes in *M. purpureus*. Pigment production in treated samples increased significantly compared to wild strain ($p < 0.05$). UV6 treatment in red, orange and yellow pigment production showed a 5, 7, and 2.8 times increase compared to wild strain significantly, respectively ($p < 0.05$). Pigment production during the first and second generations in UV3, UV4, UV6, UV7, and UV8 treatments did not show a statistically significant difference with each other: in other words, the treatments were stable significantly ($p < 0.05$). According to the results, ultraviolet light was an effective physical treatment to increase the production of red, orange, and yellow pigments from the fungus *M. purpureus* and generally causes lasting changes in the strain.

Keywords: *Monascus purpureus*, Pigment, Ultraviolet Light, Morphological.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

Noncommercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited

Copyright © 2021 Shahrekord Branch, Islamic Azad University.

بررسی فراوانی سویه‌های استافیلوکوک‌ها جدا شده از مواد غذایی مختلف و الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها در اصفهان در سال ۹۵-۱۳۹۴

لاله هویدا^۱، سینا مباحثی زاده^{۲*}، سودابه رستمی^۲، بهروز عطایی^۳، عباس داعی^۳

۱. گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

۲. مرکز تحقیقات عفونت‌های بیمارستانی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

۳. مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

*نویسنده مسئول: mobasherizadeh@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۱۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۸/۱۲

چکیده

در کشورهای در حال توسعه حضور و تنوع گونه‌های مختلف استافیلوکوکوس در مواد غذایی به طور گسترده مطالعه نشده است. بنابراین، هدف از انجام این مطالعه بررسی توزیع گونه‌های استافیلوکوکوس در مواد غذایی متنوع و ارزیابی الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها در شهر اصفهان در سال ۹۵-۱۳۹۴ بود. تعداد ۱۹۴ نمونه مختلف مواد غذایی از مناطق مختلف شهر اصفهان جمع‌آوری شد و از نظر وجود گونه‌های متنوع استافیلوکوکوس مورد بررسی قرار گرفت. آزمایشات فنوتیپی برای جداسازی اولیه و بررسی توالی ژن *16SrRNA* به منظور شناسایی گونه‌ها انجام شد. الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی نمونه‌ها با روش انتشار دیسک در سطح آگار نیز مورد بررسی قرار گرفت. از مجموع ۱۹۴ نمونه مواد غذایی، ۹۲ جدایه (۴۷/۵ درصد) کوکسی گرم مثبت شناسایی و جداسازی شد. از این بین، ۸۴ جدایه استافیلوکوکوس، ۷ جدایه ماکروکوکوس و یک جدایه میکروکوکوس تشخیص داده شد. بیشترین فراوانی جدایه‌های استافیلوکوکوس جدا شده مربوط به جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس با فراوانی ۲۵ درصد (۲۱/۸۴)، استافیلوکوکوس ویتولینوس ۱۵/۵ درصد (۱۳/۸۴) و استافیلوکوکوس سوکسینوس ۱۱/۹ درصد (۱۰/۸۴) بود. بیشترین مقاومت نسبت به پنی‌سیلین (۵۹/۵ درصد) و تتراسایکلین (۰/۲ درصد) و کمترین میزان مقاومت در برابر لووفلوکسازین، ریفامپیسین، جنتامیسین و سیپروفلوکسازین تشخیص داده شد. بررسی گونه‌های استافیلوکوکوس برای تحقیقات اپیدمیولوژی اهمیت دارد. همچنین تشخیص مقاومت آنتی‌بیوتیکی در گونه‌های استافیلوکوکوس جدا شده از مواد غذایی نشان می‌دهد که مواد غذایی به عنوان یک خطر بالقوه برای سلامتی افراد جامعه و پراکندگی هرچه بیشتر مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌باشد. با انجام روش *16SrRNA* شناسایی گونه‌های استافیلوکوکوس بهتر انجام می‌شود تا امنیت غذایی افزایش یابد و از هزینه‌های درمان اضافی جلوگیری شود.

کلید واژه‌ها: استافیلوکوکوس، مواد غذایی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، بررسی توالی DNA.

مقدمه

در سراسر جهان بیماری‌های منتقله از راه مواد غذایی به عنوان یک مسئله مهم در سلامت عمومی مطرح می‌باشند. سازمان بهداشت جهانی (World Health Organization; WHO)، بیماری‌های مرتبط با مواد غذایی را به عنوان بیماری‌های عفونی و یا سمی تعریف کرده است (Abebe et al., 2020). براساس تخمین این سازمان در سال ۲۰۱۰، بیش از ۳۰ پاتوژن موجود در مواد غذایی عامل ۶۰۰ میلیون بیماری بوده اند و آلودگی مواد غذایی با باکتری‌های مضر، انگل‌ها، ویروس‌ها و مواد شیمیایی منجر به بیش از ۲۰۰ نوع بیماری می‌شود (Griffith., 2006 ; Abebe et al., 2020). همچنین مسمومیت غذایی ممکن است به علت وجود مواد سمی شیمیایی، توکسین‌های میکروبی و یا سایر مواد مضر ایجاد شوند. در کل، بیماری‌های ناشی از مواد غذایی سالانه مسئول تقریباً ۷۶ میلیون بیماری، ۳۲۵۰۰۰ بستری شدن و ۵۲۰۰ مورد مرگ و میر می‌باشند (Ameme et al., 2016). در میان باکتری‌ها، جنس استافیلوکوکوس یکی از متداول‌ترین عوامل مسمومیت غذایی است. مسمومیت غذایی استافیلوکوکوس (Staphylococcal Food Poisoning; SFP) که بطور معمول به توکسین

در سراسر جهان بیماری‌های منتقله از راه مواد غذایی به عنوان یک مسئله مهم در سلامت عمومی مطرح می‌باشند. سازمان بهداشت جهانی (World Health Organization; WHO)، بیماری‌های مرتبط با مواد غذایی را به عنوان بیماری‌های عفونی و یا سمی تعریف کرده است (Abebe et al., 2020). براساس تخمین این سازمان در سال ۲۰۱۰، بیش از ۳۰ پاتوژن موجود در مواد غذایی عامل ۶۰۰ میلیون بیماری بوده اند و آلودگی مواد غذایی با باکتری‌های مضر، انگل‌ها، ویروس‌ها و مواد شیمیایی منجر به بیش از ۲۰۰ نوع بیماری می‌شود

زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) و تعیین توالی است. با توجه به اهمیت تشخیص وجود استافیلوکوکوس‌های مختلف در مواد غذایی، هدف از این مطالعه بررسی فراوانی گونه‌های استافیلوکوکوس با استفاده از روش‌های فنوتیپی و روش مولکولی تعیین توالی ژن *16SrRNA* و همچنین ارزیابی الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها از مواد متنوع غذایی جمع‌آوری شده در شهر اصفهان در سال ۹۵-۱۳۹۴ بوده است.

روش کار

نمونه گیری

در این مطالعه مقطعی- توصیفی تعداد ۱۹۴ نمونه مواد غذایی (متعلق به ۱۸ کارخانه متفاوت از ۲۹ مغازه و ۳۰ کارگاه شیرینی پزی) شامل ۵۷ نمونه از انواع شیرینی (۳۰ نمونه شیرینی تر، ۲۷ نمونه شیرینی دانمارکی یا کیک عصرانه)، ۶۳ نمونه از فرآورده‌های پروتئینی (۳۴ نمونه سوسیس یا کالباس مرغ و ۲۹ نمونه سوسیس یا کالباس گوشت) و ۷۴ نمونه محصولات لبنی پاستوریزه (۲۰ نمونه شیر، ۱۸ نمونه پنیر، ۱۸ نمونه ماست، ۸ نمونه دوغ، ۵ نمونه خامه و ۵ نمونه کشک) از مراکز مختلف شهر اصفهان در فاصله زمانی خرداد ۱۳۹۴ تا خرداد ۱۳۹۵ به روش خوشه ای خریداری گردید. نمونه‌ها حداکثر ظرف مدت ۲۴-۱۲ ساعت و با رعایت زنجیره سرد (برای مواد غذایی فاسد شدنی) به آزمایشگاه میکروبیولوژی مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انتقال داده شد.

جداسازی و شناسایی استافیلوکوکوس

برای جداسازی استافیلوکوکوس، ابتدا ۱۰ گرم یا ۱۰ میلی لیتر از نمونه‌های جمع‌آوری شده با ۹۰ میلی‌لیتر بافر استریل فسفات سالین (PBS) با pH برابر ۷/۴، به مدت ۱۰-۱۵ دقیقه به آرامی روی شیکر همگن شدند. سپس ۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون به لوله های حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت مابع ژئولیتی-کانتونی (Giollitti-contoni broth) حاوی ۰/۱ میلی لیتر محلول یک درصد

استافیلوکوکوس ارتباط داده می‌شود اغلب به دنبال بلعیدن غذای حاوی حداقل ۰/۱ میکروگرم از انترتوکسین استافیلوکوکوی رخ می‌دهد (Aye et al., 2014). استافیلوکوکوس‌ها معمولاً به دو گروه استافیلوکوکوس‌های کوآگولاز مثبت (Coagulase-Positive Staphylococci; CPS) و استافیلوکوکوس‌های کوآگولاز منفی (Coagulase-Negative Staphylococci; CNS) تقسیم می‌شوند. استافیلوکوکوس اورئوس گونه شاخص گروه کوآگولاز مثبت است و عامل اکثر موارد مسمومیت غذایی استافیلوکوکوی می‌باشد (Layer et al., 2017; Karimi et al., 2006). گونه‌های استافیلوکوکوس سم‌هایی تولید می‌کنند که می‌توانند علائمی از اختلالات دستگاه گوارش تا فلج و مرگ ایجاد کنند (Schmitt et al., 1990). گونه‌های استافیلوکوکوس جزئی از فلور نرمال پوست و مخاط انسان‌ها و حیوانات مختلف مانند گاو و گوسفند هستند. همچنین آن‌ها در منابع محیطی و طیف وسیعی از مواد غذایی یافت می‌شوند (Even et al., 2010). توانایی استافیلوکوکوس‌ها برای رشد در طیف‌های دمایی، pH واسمولاریته گسترده، سبب شده تا بتوان این باکتری را از مواد غذایی متفاوت مانند کالباس، سالاد و محصولات لبنی فرآوری شده جداسازی نمود (Karimi et al., 2017). افزون بر آن، اغلب استافیلوکوکوس‌ها بعنوان آغازگر (Starter) در برخی غذاهای تخمیری مانند پنیر برای ایجاد طعم و عطر استفاده می‌شوند (Ruaro et al., 2013). علاوه بر این شیرینی‌ها نیز می‌توانند منبع آلودگی و انتقال استافیلوکوکوس‌ها باشند. در بررسی مواد غذایی از نظر وجود آلودگی به این باکتری روش‌های مختلفی وجود دارد. در چندین مطالعه گزارش شده است که برای بررسی آلودگی مواد غذایی با استافیلوکوکوس‌ها روش‌های مولکولی نسبت به روش‌های فنوتیپی ارجحیت دارد (Heikens et al., 2005; Layer et al., 2006). روش‌های مولکولی مناسب، ارزیابی پلی مورفیسم در ژن‌های خانه دار مانند ژن *16SrRNA* به وسیله واکنش

27F (5'-AGAGTTTGATYMTGGCTC AG-3'
) و 15R (5'-TTA CCGCGG CKG CTG GCA
C-3')

که توسط شرکت بیونر کره سنتز شده بود استفاده شد (Bakrt et al., 2003). برای واکنش PCR در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر از بافر $10\times$ ، ۲ میکرولیتر از $MgCl_2$ (50 mM)، ۱ میکرولیتر از dNTP (2.5 mM)، ۲ میکرولیتر از هر پرایمر (20 pmol/ μ L)، ۰/۴ میکرولیتر از آنزیم Taq پلیمرز (50 μ L) (سیناکلون، تهران، ایران) و ۳۵/۶ میکرولیتر از آب استریل استفاده گردید. در ادامه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf Master cycler Gradient, Germany) با شرایط دمایی ۳ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، طولی شدن در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه و در آخر طولی شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام (Baker et al., 2003). در نهایت محصول PCR در کنار نشانگر ۱۰۰bp (شرکت Thermo، آمریکا) بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد رنگ شده با اتیدیوم بروماید منتقل و پس از الکتروفورز به وسیله دستگاه ژل داگ (شرکت Biorad، آمریکا) مورد بررسی قرار گرفت.

برای تعیین توالی کردن DNA محصولات تکثیر شده ژن *16SrRNA* محصولات به شرکت پیشگام (تهران، ایران) فرستاده شد و در آنجا با استفاده از ABI 3730 XL DNA analyzer (Applied Biosystems, USA) و روش تعیین توالی سنجر و به صورت دوطرفه توالی محصولات تعیین شد. پرایمرهای بکار رفته برای تعیین توالی ژن *16SrRNA* همان پرایمرهای PCR بودند. توالی‌ها با اطلاعات نوکلئوتیدی استافیلوکوکوس‌های تعیین توالی شده براساس *16SrRNA* که در سایت (NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)

تلوریت پتاسیم (HiMedia, India) اضافه و به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید (Aye et al., 2014; Ebrahimzadeh et al., 20). سپس ۱۰ میکرولیتر از محیط کشت مایع برداشته و بر روی محیط کشت برد پارکر آگار (Baird Parker Agar) (HiMedia, India) حاوی امولسیون تلوریت زرده تخم مرغ، به صورت خطی کشت و پلیت‌ها در ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۲۴-۱۸ ساعت انکوبه شد (Aye et al., 2014). کلنی‌های مشکوک به استافیلوکوکوس که ظاهری سیاه رنگ با هاله شفاف، براق و محدب در محیط برد پارکر آگار داشتند خالص سازی و با استفاده از تست‌های استاندارد میکروبیولوژی شامل رنگ آمیزی گرم، واکنش کاتالاز، بررسی مقاومت به باسیتراسین (۰/۴ واحد)، تست اکسیداز، واکنش کوآگولاز لوله‌ای، تست DNase و رشد روی محیط مانیتول سالت آگار (Quelab, Canada) شناسایی شدند.

(Khoori et al., 2017; Azizkhani et al., 2018). جهت کنترل کیفی آزمایش کوآگولاز لوله‌ای از استافیلوکوکوس اورئوس استاندارد ATCC25923 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد (Aye et al., 2014).

شناسایی مولکولی

استخراج DNA

استخراج DNA کروموزومی به وسیله روش ساده جوشاندن انجام شد. بطور خلاصه، چند کلنی خالص از باکتری به ۱۰۰ میکرولیتر بافر (EDTA Tris TE pH 7.8, 1Mm، اضافه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد جوشانده شد. سپس سوسپانسیون باکتری‌ها در $9000\times g$ برای ۳۰ ثانیه در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد و مایع روئی آن که حاوی DNA بود در ۲۰- درجه برای انجام PCR نگهداری شد (Sedaghat et al., 2017).

شناسایی جدایه‌های استافیلوکوکی

برای تکثیر ژن *16SrRNA* از پرایمرهای اولیگونوکلئوتیدی براساس پرایمر عمومی باکتریایی

آماری درجه معنی داری با میزان P-value کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

جداسازی و شناسایی جدایه‌ها بر اساس آزمون‌های فنوتیپی

از مجموع ۱۹۴ نمونه، ۹۲ جدایه باکتری (۴۷/۵ درصد) کوکسی گرم مثبت مشکوک به *استافیلوکوکوس* در محیط کشت برد پارکراآگار خالص سازی شد. جدایه‌های مشکوک به *استافیلوکوکوس* پس از شناسایی توسط رنگ‌آمیزی گرم به عنوان کوکسی گرم مثبت و با توجه به نتایج تست‌های بیوشیمیایی، کاتالاز مثبت، مقاوم به باسیتراسین و اکسیداز مثبت گزارش شد. جدایه‌ها توانایی تخمیر مانیتول در محیط کشت مانیتول سالت آگار و تولید آنزیم DNase بر روی محیط DNase آگار را داشتند. از مجموع ۹۲ نمونه کوکسی گرم مثبت، ۸۴ نمونه جدایه *استافیلوکوکوس* (۴۰ جدایه از شیرینی، ۳۲ جدایه از فرآورده‌های پروتئینی و ۱۲ جدایه از محصولات لبنی)، یک جدایه میکروکوکوس و ۷ جدایه ماکروکوکوس تشخیص داده شد. براساس واکنش کوآگولاز لوله‌ای ۷۵ درصد (۶۳/۸۴) از جدایه‌ها کوآگولاز منفی و ۲۵ درصد (۲۱/۸۴) از جدایه‌ها کوآگولاز مثبت بودند (جدول ۱). یافته‌ها نشان داد بین نوع مواد غذایی و حضور باکتری رابطه معنی داری وجود دارد ($P < 0/001$) که کمترین مقدار در لبنیات (۳/۱۴ درصد) و فرآورده‌های پروتئینی (۳۸ درصد) و بیشترین مقدار در شیرینی جات (۴۷/۷ درصد) مشاهده شد.

در دسترس می‌باشند، مقایسه و بلاست شدند. توالی‌های *استافیلوکوکوس* با نرم افزار Clustal Wv.20 بررسی و درخت فیلوژنی آن‌ها با نرم افزار MEGA نسخه ۶ و با روش رسم شد (Tamura et al., 2013; Argudin., 2010).

بررسی الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی

جهت بررسی الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *استافیلوکوکوس* از روش انتشار دیسک بر روی محیط مولر هینتون آگار (Biolif, Italia) مطابق با دستورالعمل موسسه استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی (CLSI 2017) استفاده شد. میزان حساسیت با استفاده از دیسک‌های استاندارد آنتی‌بیوتیک (شرکت Mast، انگلیس) شامل پنی‌سیلین ($10 \mu\text{g}$)، سفوکسیتین ($30 \mu\text{g}$)، جنتامایسین ($10 \mu\text{g}$)، تتراسیکلین ($30 \mu\text{g}$)، سیپروفلوکساسین ($5 \mu\text{g}$)، کلیندامایسین ($2 \mu\text{g}$)، تری متوپریم-سولفومتاکسازول ($1/25/23/75 \mu\text{g}$)، کلروآمفینیکل ($30 \mu\text{g}$)، ریفامپین ($5 \mu\text{g}$)، لینزولید ($30 \mu\text{g}$)، لووفلوکساسین ($5 \mu\text{g}$) و اریترومایسین ($15 \mu\text{g}$) سنجیده شد. براساس معیارهای FDA و EUCAST، در صورتی که باکتری *استافیلوکوکوس* حداقل به یک عامل در سه یا چند دسته آنتی‌بیوتیکی مقاومت داشته باشد به عنوان جدایه *استافیلوکوکوس* با مقاومت چندگانه دارویی یا MDR (Multi Drug Resistant; MDR) در نظر گرفته می‌شود (Magiorakos et al., 2012).

تجزیه و تحلیل آماری

آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ انجام گرفت. نتایج بررسی تست‌ها با استفاده از آزمون کای اسکوئر مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. در این آنالیز

جدول ۱. فراوانی جدایه‌های کوآگولاز منفی و کوآگولاز مثبت به تفکیک نوع نمونه

نوع نمونه	کوآگولاز مثبت (CPS)	کوآگولاز منفی (CNS)
درصد (تعداد)	درصد (تعداد)	درصد (تعداد)
شیرینی جات	۳۰٪ (۲۱/۴۰)	۷۰٪ (۲۸/۴۰)

۲۵٪ (۳/۱۲)

۷۵٪ (۹/۱۲)

محصولات لبنی

۸۱٪ (۲۶/۳۲)

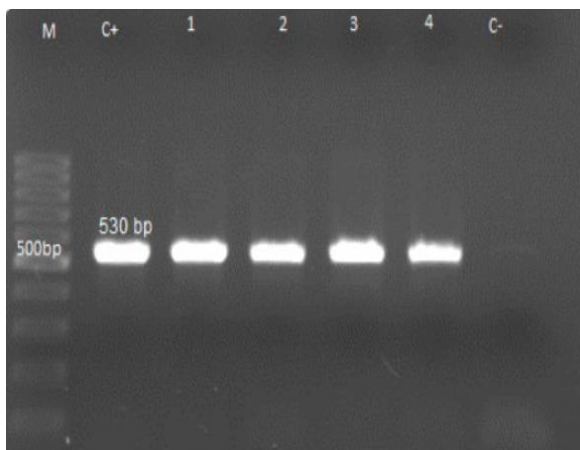
۸٪ (۶/۳۲)

فرآورده‌های پروتئینی

نزدیک باهم دارند. بعلاوه با بوت استرپ ۱۰۰ درصدی استافیلوکوکوس ویتیلینوس و استافیلوکوکوس سیوری در ارتباط کامل با یکدیگر می‌باشند (شکل ۲).

شناسایی جدایه‌های استافیلوکوکوس جدا شده براساس روش مولکولی

بعد از انجام تست‌های فنوتیپی جدایه‌های مشکوک به استافیلوکوکوس براساس تعیین توالی *16SrRNA* آنالیز شدند. محصول PCR قطعه‌ای به طول ۵۳۰ جفت باز بود (شکل ۱). از ۸۴ جدایه در مجموع ۱۵ گونه و زیرگونه شناسایی شد. مطابق با درخت فیلوژنی استافیلوکوکوس وارنری (*S. warneri*) و استافیلوکوکوس پاستوری (*S. pasteurii*) ارتباط نزدیک و تقریباً ۸۰ درصدی دارند، همه این جدایه‌ها بجز یک مورد در بین فرآورده‌های پروتئینی و شیرینی جات پراکنده شده‌اند. همچنین استافیلوکوکوس ویتولینوس (*S. vitulinus*) و استافیلوکوکوس سیوری (*S. sciuri*) ارتباط کامل نزدیکی از نظر تکاملی و فیلوژنی دارند. استافیلوکوکوس وارنری و استافیلوکوکوس پاستوری با بوت استرپ (bootstrap) ۸۴ درصد ارتباط ژنتیکی

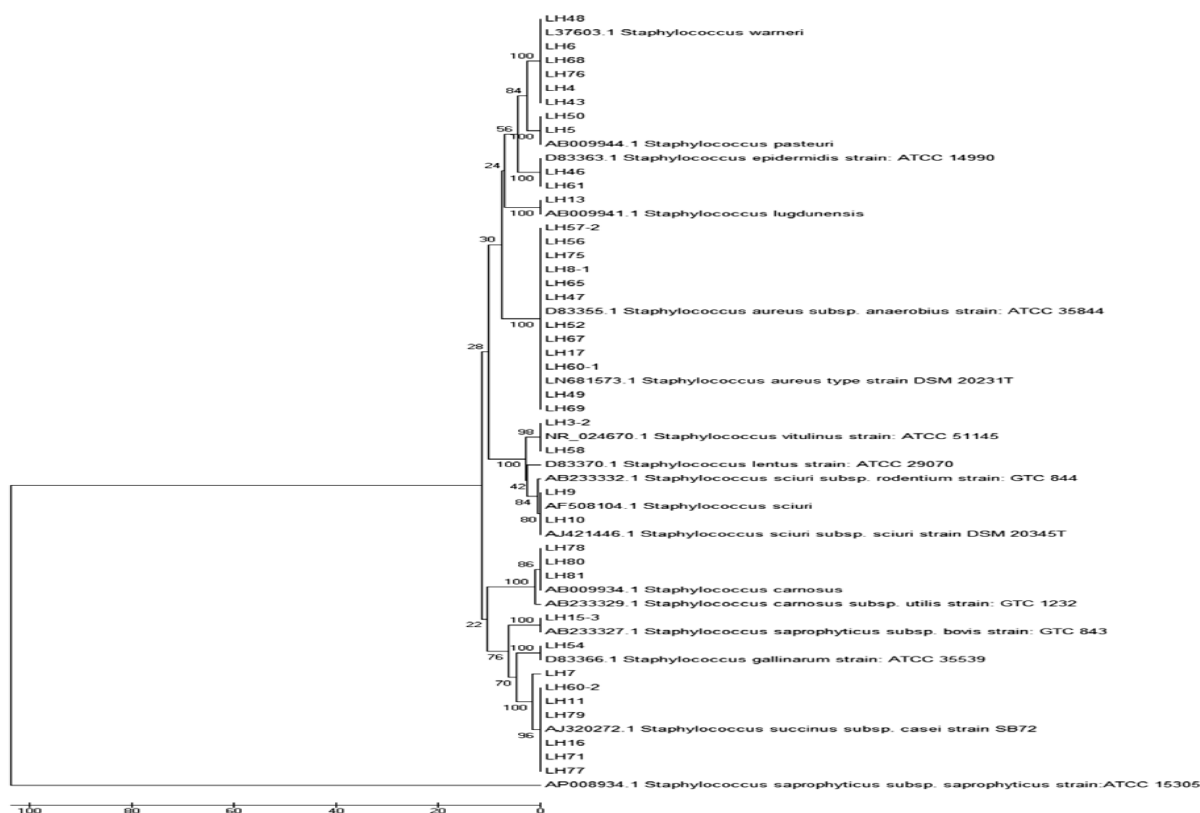


شکل ۱. تصویر الکتروفورز محصول PCR ژن *16SrRND* در

جدایه‌های استافیلوکوکوس از مواد غذایی.

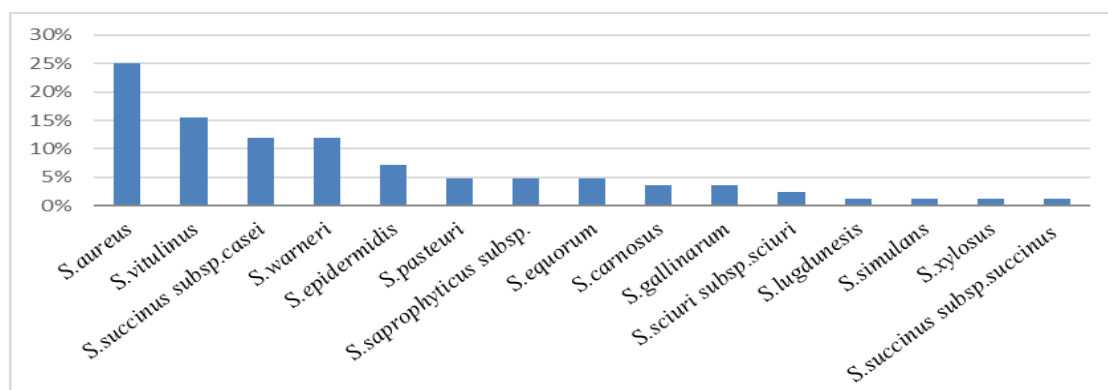
M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، C+: کنترل مثبت، تا ۴: نمونه

های مثبت، C-: کنترل منفی.



شکل ۲. درخت فیلوژنی ترسیم شده از جدایه‌های استافیلوکوکوس مواد غذایی مختلف براساس *16SrRND*

نمودار ۱. درصد فراوانی جدایه‌های استافیلوکوکوس در تمام محصولات غذایی



استافیلوکوکوس سوکسینوس زیرگونه‌ی سکیوری (*S. sciuri subsp. sciuri*) (کواگولاز منفی)، استافیلوکوکوس لوگدنسیس (*S. lugdunensis*) (کواگولاز منفی) و استافیلوکوکوس زایلوزوس (*S. xylosum*) (کواگولاز منفی) با فراوانی یک جدایه در بین محصولات غذایی کمترین جدایه‌های جداسازی شده می‌باشند.

براساس نمودار (۱) بیشترین فراوانی جدایه‌های استافیلوکوکوس جدا شده از محصولات غذایی مربوط به جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس با فراوانی ۲۵ درصد (۲۱/۸۴)، استافیلوکوکوس ویتولینوس ۱۵/۵ درصد (۱۳/۸۴) و استافیلوکوکوس سوکسینوس زیرگونه‌ی کازئی (*S. succinus subsp. casei*) ۱۱/۹ درصد (۱۰/۸۴) می‌باشد. استافیلوکوکوس سیمولنس (*S. simulans*)

جدول ۲: درصد فراوانی جدایه‌های استافیلوکوکوس در انواع محصولات غذایی

نام جدایه	شیرینی جات (تعداد=۴۰)	محصولات لبنی (تعداد=۱۲)	فراورده‌های پروتئینی (تعداد=۳۲)
<i>S. aureus</i>	۳۰٪ (۱۲)	۲۵٪ (۳)	۱۸٪/۷۵ (۶)
<i>S. vitulinus</i>	۵٪ (۲)	۲۵٪ (۳)	۲۵٪ (۸)
<i>S. epidermidis</i>	۵٪ (۲)	۱۶٪/۸۰ (۲)	۱۸٪/۷۵ (۶)
<i>S. pasteurii</i>	۵٪ (۲)	۸٪/۳۰ (۱)	۳٪/۱۰ (۱)
<i>S. gallinarum</i>	۲/۵۰ (۱)	۸٪/۳۰ (۱)	۳٪/۱۰ (۱)
<i>S. succinus subsp. casei</i>	۱۷٪/۵ (۷)	۰٪	۶٪/۲۵ (۲)
<i>S. warneri</i>	۱/۵ (۶)	۰٪	۶٪/۲۵ (۲)
<i>S. carnosus</i>	۷/۵ (۳)	۰٪	۰٪
<i>S. sciuri subsp.</i>	۵٪ (۲)	۰٪	۰٪
<i>S. succinus</i>	۲/۵۰ (۱)	۰٪	۰٪
<i>S. lugdunensis</i>	۲/۵۰ (۱)	۰٪	۰٪
<i>S. simulans</i>	۰٪	۸٪/۳۰ (۱)	۰٪
<i>S. xylosum</i>	۰٪	۸٪/۳۰ (۱)	۰٪
<i>S. saprophyticus subsp.</i>	۲/۵۰ (۱)	۰٪	۹٪/۴۰ (۳)
<i>S. equorum</i>	۰٪	۰٪	۹٪/۴۰ (۳)

آنتی‌بیوتیک‌های لووفلوکساسین، ریفامپیسین، جنتامایسین و سیپروفلوکساسین (۱۰۰ درصد) دیده شد و بیشترین مقاومت نسبت به پنی‌سیلین (۵۹/۵ درصد) و تتراسایکلین (۲۰/۲ درصد) وجود داشت. در مجموع می‌توان گفت میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین در هر سه گروه بالا بوده است. همچنین بر اساس آزمون کای اسکور میزان مقاومت به تتراسایکلین $P=0/008$ ، لینوزولاید $P=0/02$ و کلرآمفنیکل $P=0/014$ در بین استافیلوکوکوس‌های جدا شده از انواع مواد غذایی تفاوت معنی‌داری داشت اما میزان مقاومت به بقیه آنتی‌بیوتیک‌ها در بین سه دسته مواد غذایی تفاوت معنی‌داری نداشت ($P>0/05$).

بر اساس نتایج به دست آمده، ۹ جدایه (۱۰/۷ درصد) دارای مقاومت چندگانه دارویی (MDR) می‌باشند. ۵ مورد (۱۵/۶ درصد) مقاومت چندگانه در نمونه‌های پروتئینی، ۲ مورد (۵ درصد) در نمونه شیرینی و ۲ مورد (۱۶/۷ درصد) در نمونه لبنیات دیده شد که بر اساس آزمون کای اسکور اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($P=0/25$). ویژگی‌های کامل نمونه‌های MDR در جدول شماره ۴ آورده شده است.

در نمونه‌های شیرینی جات استافیلوکوکوس اورئوس با فراوانی ۳۰ درصد (۱۲/۴۰) و استافیلوکوکوس گالیناروم (*S. gallinarum*)، سوکسینوس، لوگدنسیس و استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس (*S. saprophyticus*) با فراوانی ۱ جدایه به ترتیب بیشترین و کمترین میزان فراوانی را نشان دادند. همچنین در محصولات لبنی بیشترین و کمترین میزان فراوانی مربوط به استافیلوکوکوس اورئوس ۲۵ درصد (۳/۱۲) و استافیلوکوکوس گالیناروم، استافیلوکوکوس سیمولنس، استافیلوکوکوس زایلوزوس و استافیلوکوکوس پاستوری با فراوانی یک جدایه بود. در فرآورده‌های پروتئینی بالاترین فراوانی جدایه‌های استافیلوکوکوس جداسازی شده مربوط به استافیلوکوکوس ویتولینوس ۲۵ درصد (۸/۳۲) و پایین‌ترین فراوانی جداسازی شده مرتبط با استافیلوکوکوس گالیناروم و استافیلوکوکوس پاستوری با فراوانی ۱ جدایه بود (جدول ۲).

الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی نتایج تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی برای همه جدایه‌های استافیلوکوکوس بطور خلاصه در جدول شماره ۳ آورده شده است. بیشترین حساسیت در بین جدایه‌ها نسبت به

جدول ۳: مقایسه توزیع فراوانی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در استافیلوکوکوس‌های جدا شده از نمونه‌های مواد غذایی مختلف

P-value	میزان مقاومت (درصد)			شیرینی (۴۰ نمونه) تعداد (درصد)	انواع محصولات غذایی (۸۴ نمونه) تعداد (درصد)	آنتی‌بیوتیک
	فراآورده‌های پروتئینی (۳۲ نمونه) تعداد (درصد)	لبنیات (۱۲ نمونه) تعداد (درصد)	جات			
۱	(۰)۰	(۰)۰	(۰)۰	(۰)۰	(۰)۰	سیپروفلوکساسین
۰/۷۹	(۹/۴)۳	(۱۶/۷)۲	(۱۰)۴	(۱۰)۷	(۱۰)۷	اریترومایسین
۱	(۰)۰	(۰)۰	(۰)۰	(۰)۰	(۰)۰	جنتامایسین
۰/۷۲	(۰)۰	(۰)۰	(۲/۵)۱	(۱/۲)۱	(۱/۲)۱	کلیندامایسین

۰/۰۰۸	(۳۷/۵) ۱۲	(۸/۳)۱	(۱۰) ۴	(۲۰/۳)۱۷	تتراسایکلین
۰/۷۶	(۹/۴) ۳	(۸/۳)۱	(۵) ۲	(۷/۲) ۵	کوتریموکسازول
۰/۲۹	(۶۵/۶) ۲۱	(۷۵) ۹	(۵۲/۵)۲۱	(۵۹/۵) ۵۱	پنی سیلین
۱	(۰) ۰	(۰) ۰	(۰) ۰	(۰) ۰	ریفامپیسین
۱	(۰) ۰	(۰) ۰	(۰) ۰	(۰) ۰	لوفلوکسازین
۰/۰۰۲	(۰) ۰	(۱۶/۷) ۲	(۰) ۰	(۲/۴) ۲	لینزولاید
۰/۰۱۴	(۶/۲) ۲	(۰) ۰	(۰) ۰	(۲/۴) ۲	کلروآمفینکل
۰/۹۲	(۱۲/۵) ۴	(۱۶/۷) ۲	(۱۵) ۶	(۱۴/۲)۱۲	سفو کسیتین

جدول ۴. خصوصیات جدایه‌های مقاوم به چند دارو (MDR): FOX: (Tetracycline, T), Linezolid, LZD: Erythromycin, E), Penicillin, P), Cefoxitin, CD: Clindamycin, TS: Trimethoprim & Sulfamethoxazole, C: Chloramphenicol

نام جدایه	الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی	CoPS/CoNS	نوع مواد غذایی
<i>S.pasteuri</i>	P, TS, CD	CoNS	شیرینی
<i>S.epidermidis</i>	E, P, TS, FOX	CoNS	شیرینی
<i>S.warneri</i>	E, T, P, TS, FOX	CoNS	پروتئین
<i>S.saprophyticus</i>	P, C, T	CoNS	پروتئین
<i>S.saprophyticus</i>	P, C, T	CoNS	پروتئین
<i>S.epidermidis</i>	P, E, TS, FOX	CoNS	پروتئین
<i>S.epidermidis</i>	P, E, TS, FOX	CoNS	پروتئین
<i>S.aureus</i>	P, T, LZD	CoPS	لبنیات
<i>S.epidermidis</i>	P, E, TS, FOX	CoNS	لبنیات

بحث

استافیلوکوک ها گسترش و پراکندگی بالایی در مواد غذایی دارند و سومین عامل ایجاد بیماری با مواد غذایی در سراسر دنیا به شمار می آیند (Khoori et al., 2017). نتایج مطالعه حاضر نشان می دهد میزان آلودگی به استافیلوکوکوس ها در شیرینی جات ۴۷/۷ درصد، فرآورده های پروتئینی ۳۸ درصد و محصولات لبنی ۱۴/۳ درصد بود.

در نتایج مطالعه ما، بیشترین میزان جدایه های استافیلوکوکوس در نمونه شیرینی جات (۴۷/۷ درصد) مشاهده شد. در مطالعه ی خوری و همکاران در شهر تربت حیدریه، ۱۶/۶ درصد نمونه های مواد غذایی مختلف به استافیلوکوکوس اورئوس آلوده بودند و بیشترین میزان آلودگی مربوط به نمونه های شیرینی (۱۹/۷ درصد) بود (Khoori et al., 2017). همچنین در مطالعه ای دیگر، نیک نیاز و همکاران (۲۰۱۱) در شهر تبریز، میزان آلودگی شیرینی جات به استافیلوکوکوس اورئوس را ۳۱ درصد گزارش کردند (Nikniaz et al., 2011). نتایج مطالعات فوق با نتایج ما همخوانی دارند. مطابق با گزارش موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران (شماره ۲۳۹۵)، استافیلوکوکوس اورئوس نباید از کشت شیرینی و کیک جدا شود. از آنجائی که شیرینی ها در تماس با سطوح و دست کارکنان هستند، بنابراین ممکن است به وسیله کارکنان کارگاه و محیط آلوده شوند.

در مطالعه ای نونهال و همکاران (۲۰۱۴)، شیوع آلودگی استافیلوکوکوس اورئوس در گوشت و فرآورده های گوشتی در شهر اصفهان را بررسی و در مجموع ۵۵/۶ درصد آلودگی را گزارش کردند (Nonahal et al., 2014). میزان آلودگی نمونه فرآورده های پروتئینی (۳۸ درصد) مطالعه ما کمتر از نتایج مطالعه فوق بود. اختلاف در میزان آلودگی فرآورده های پروتئینی می تواند ناشی از کشتار در فصل های مختلف سال، تعداد و نوع نمونه های مورد مطالعه و روش های متفاوت کشتار و بسته بندی آنها باشد (Sarrafzadeh Zargar et al., 2014).

در مطالعه ی دیگری که حسینی و همکاران در شهر همدان انجام دادند نتایج نشان داد که فرآورده های پروتئینی با فراوانی ۱۰/۳ درصد بیشترین آلودگی را در نمونه های جمع آوری شده داشتند و در محصولات لبنی نیز ۹/۲ درصد آلودگی میکروبی گزارش شد. یافته های این مطالعه نشان داد اختلاف معنی داری بین محصولات مختلف از نظر آلودگی استافیلوکوکوسی وجود نداشته است (Hosseini., 2015). نتایج ما با مطالعه فوق همخوانی ندارد و میزان آلودگی در محصولات و فرآورده های مختلف ما بیشتر ارزیابی شد. همچنین در مطالعه ما ارتباط معنی داری بین حضور باکتری و نوع مواد غذایی دیده شد. این اختلاف در میزان آلودگی در بین مواد پروتئینی و لبنی می تواند به دلیل روش بررسی میکروبی باشد. بطور کلی محصولات لبنی به دلیل تماس کمتر با افراد و روش های مختلف آلودگی زدایی (پاستوریزه یا استریلیزه کردن)، آلودگی میکروبی کمتری نشان می دهند (Knill and Kennedy., 2013).

مطالعات انجام شده در ایتالیا میزان آلودگی محصولات لبنی با استافیلوکوکوس، ۰/۵ درصد و در کشورهای چین و بنگلادش میزان آلودگی انواع محصولات پروتئینی با استافیلوکوکوس را به ترتیب ۱/۳ درصد و ۲۲ درصد گزارش کردند (Carfora et al., 2015; Islam et al., 2016, Yang et al., 2019). شیوع آلودگی با استافیلوکوکوس در مواد غذایی در مطالعه ما بیشتر از نتایج مطالعات در سایر کشورها است. زیرا کشورهای پیشرفته با کمک متخصصان بهداشتی اکثر بیماری های منتقله از مواد غذایی را کنترل می کنند در حالیکه کشورهای در حال توسعه از جمله ایران به علت وجود مشکلات بهداشتی و اقتصادی در سیستم تهیه مواد غذایی و عدم توانایی ارتقاء آن همچنان شاهد آلودگی با میزان بیشتری هستند (Khoori et al., 2017).

مطالعه ای ما برای اولین بار با استفاده از روش مولکولی *16SrRNA* به شناسایی طیف وسیعی از گونه های استافیلوکوکوس در بین مواد غذایی مختلف پرداخته است.

در مطالعه‌ای دیگر، بین و همکارانش (۲۰۱۷) در کشور ایتویپی آلودگی استافیلوکوکوسی را در محصولات لبنی و پروتئینی بررسی کردند. یافته‌ها نشان داد، استافیلوکوکوس اورئوس با (۱۶ درصد) و استافیلوکوکوس اینترمدیوس (*S. intermedius*) (۱۰/۸ درصد) از فراوان‌ترین جدایه‌ها بودند (Beyene et al., 2017). نتایج فراوانی جدایه‌ها در مطالعه ما با نتایج سایر گزارش‌ها متفاوت است. تفاوت در میزان فراوانی جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس در نقاط جهان می‌تواند به دلیل سطح بهداشت متفاوت، نحوه تولید و توزیع مواد غذایی، نوع مواد غذایی و منطقه جغرافیایی مورد مطالعه باشد (Knill and Kennedy., 2013). شناسایی گونه‌های استافیلوکوکوس، به غیر از استافیلوکوکوس اورئوس به طور معمول در آزمایشگاه‌های مرجع ایمنی و مواد غذایی انجام نمی‌شود. به هر حال شناسایی این گونه‌ها برای تحقیقات اپیدمیولوژی و توسعه شیوه‌های مدیریتی اختصاصی برای پیشگیری از ابتلا به مسمومیت غذایی استافیلوکوکوسی می‌تواند دارای اهمیت باشد (Beyene et al., 2017).

در مطالعه حاضر جدایه‌های استافیلوکوکوس آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (۵۹/۵ درصد)، تتراسایکلین (۲۰/۲ درصد) و سفوکسیتین (۱۴/۲ درصد) مقاوم و به آنتی‌بیوتیک‌های لوفلوکسازین، ریفامپیسین، جنتامایسین و سیپروفلوکسازین (۱۰۰ درصد) حساس بودند. علاوه بر این، مقاومت چندگانه دارویی (MDR) در ۱۰/۷ درصد جدایه‌ها وجود داشت. در تحقیق ابراهیم زاده و همکاران (۲۰۱۶)، بیشترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در فرآورده‌های لبنی شهر آذربایجان به پنی‌سیلین (۹۹/۴)، ونکومایسین (۸۸/۵ درصد)، و متی‌سیلین (۷۷/۱ درصد) گزارش شد (Ebrahimzadeh et al., 2016).

در مطالعه انجام شده در چین، یان و همکاران (۲۰۱۲) در بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های استافیلوکوکوس بدست آمده از مواد غذایی گزارش کردند که بیشترین مقاومت در برابر پنی‌سیلین (۲۸ درصد) و به دنبال آن تتراسایکلین (۲۸ درصد) ارزیابی شده است که مشابه با

در نتایج مطالعه ما ۱۵ گونه و زیرگونه را با تعیین توالی قسمتی از ژن *16SrRNA* شناسایی شد و این روش به طور موفقیت‌آمیزی قادر به شناسایی طیف وسیعی از گونه‌ها بود. مشابه با نتایج ما، مطالعه‌ی چاکراورتی و همکارانش (۲۰۰۷) بیان کردند، تعیین توالی با روش مولکولی *16SrRNA* برای تمایز در بین گونه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مناسب است (Chakravorty et al., 2007). در بسیاری از مطالعه‌ها روش توالی‌یابی جهت شناسایی سویه‌های باکتری‌ها در محصولات غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد، زیرا دقت بالایی برای تشخیص گونه‌های نزدیک بهم دارد (Islam et al., 2019, Yang et al., 2016).

در مطالعه حاضر، بیشترین فراوانی جدایه‌های استافیلوکوکوس از محصولات غذایی مربوط به جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس (۲۵ درصد)، استافیلوکوکوس ویتولینوس (۱۵/۵ درصد) و استافیلوکوکوس سوکسینوس زیرگونه‌ی کازئی (۱۱/۹ درصد) می‌باشد. استافیلوکوکوس سیمولنس، استافیلوکوکوس سوکسینوس زیرگونه‌ی سکپوری، استافیلوکوکوس لوگدنسیس و استافیلوکوکوس زایلوزوس کمترین جدایه‌های (با فراوانی یک جدایه در بین محصولات غذایی) جداسازی شده بود. در مطالعه‌ای مشابه، کازئیس نانز و همکارانش (۲۰۱۶) از روش توالی‌یابی ناحیه *V5* ژن *16SrRNA* برای شناسایی ۴۵ جدایه استافیلوکوکوس استفاده کردند. در این بین ۴۲ گونه و زیرگونه در نمونه‌های پنیر شناسایی شد که تنها ۳ گونه آن تأیید شد که در جنس استافیلوکوکوس قرار داشتند (Casaes Nunes., 2016). مطالعه‌ای در کشور برزیل توسط کانه‌ها و همکاران (۲۰۰۶) به بررسی تنوع جدایه‌های ۸۸ نمونه مواد غذایی از قبیل نان، پنیر، شیر، فرآورده‌های شیر و پروتئین پرداختند. نتایج ژنتیکی نشان داد بیشترین میزان فراوانی جدایه‌ها، مربوط به استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس (*S. epidermidis*)، استافیلوکوکوس زایلوسوس (۲۰ درصد) و استافیلوکوکوس وازنری (۲۰ درصد) بودند (Cunha MdL et al., 2006).

بین انسان و حیوان مصرف می‌شود (Pereira et al., 2009). بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری نمود که سایر گونه‌های استافیلوکوکوس نیز در آلودگی محصولات مختلف غذایی نقش دارند، از این رو بهتر است آزمایشگاه‌های مواد غذایی به شناسایی گونه‌های غیرمعمول اهمیت دهند. از آنجائی که در کشور ما، تست‌های فنوتیپی محدودی برای شناسایی گونه‌های استافیلوکوکوس در آزمایشگاه مواد غذایی استفاده می‌شود، بیشتر جدایه‌ها یا به طور کامل شناسایی نمی‌شوند یا اشتباه تشخیص داده می‌شوند. با توجه به اهمیت مسمومیت غذایی، لازم است تا با به کارگیری روش‌های مولکولی دقیق مانند *16SrRNA* به شناسایی گونه‌های استافیلوکوکوس لاقط به صورت دوره‌ای پرداخت.

نتیجه‌گیری کلی

در مطالعه اخیر، بیشترین تعداد استافیلوکوکوس جداسازی شده از فراورده‌های پروتئینی، محصولات لبنی و شیرینی متعلق به استافیلوکوکوس اورئوس بود. استافیلوکوکوس اورئوس به میزان نسبتاً زیادی (۲۵ درصد) از فراورده‌های غذایی مختلف جدا شد. مطابق با نتایج ما، بکار بردن روش *16SrRNA* برای شناسایی گونه‌های استافیلوکوکوس در محصولات غذایی مناسب و ضروری می‌باشد. بررسی گونه‌های استافیلوکوکوس برای تحقیقات اپیدمیولوژی حیاتی است. همچنین تشخیص مقاومت آنتی‌بیوتیکی در گونه‌های استافیلوکوکوسی جدا شده از مواد غذایی نشان می‌دهد که مواد غذایی ممکن است یک خطر بالقوه برای سلامتی انسان باشد.

منابع

1. Abebe, E., Gugsu, G., Ahmed, M. 2020. Review on major food-borne zoonotic bacterial pathogens. J of Tropical Medicine. 2020:19.

نتایج ما است (Yan et al., 2012). در هر دو مطالعه ذکر شده بیشترین میزان مقاومت مربوط به پنی‌سیلین بود و مشابه نتایج مطالعه ما بود. مقاومت بالای جدایه‌های استافیلوکوکوس به یک نوع آنتی‌بیوتیک می‌تواند به علت استفاده بیش از اندازه آن آنتی‌بیوتیک برای کنترل عفونت و درمان دام و طیور در آن کشور باشد (Khoori et al., 2017). همان طور که نتایج مطالعات نشان می‌دهد مقاومت نسبتاً بالا در جدایه‌های استافیلوکوکوس مواد غذایی دارای اهمیت است و نیاز به توجه دارد زیرا انتقال مقاومت آنتی‌بیوتیکی به وسیله باقیمانده آنتی‌بیوتیک‌ها در مواد غذایی و یا از طریق بلعیدن سویه‌های مقاوم موجود در مواد غذایی، یکی از مهمترین عوامل انتقال مقاومت آنتی‌بیوتیک محسوب می‌شود (Pereira et al., 2009).

مطالعه امین الاسلام و همکارانش (۲۰۱۹) در بنگلادش نشان داد که بیشترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی بین جدایه‌های استافیلوکوکوس جدا شده از انواع گوشت به ترتیب مربوط به اریترومايسين (۷۴ درصد)، سیپروفلوکساسین (۴۹ درصد)، اگزاسیلین (۳۱ درصد) بوده است. همچنین ۳۷ درصد جدایه‌ها MDR بودند (Islam et al., 2019). در مطالعه‌ی فوق میزان مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و میزان MDR با نتایج ما مغایرت دارد. مقایسه الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی گونه‌های مختلف استافیلوکوکوس در این پژوهش و سایر مطالعه‌ها نشان داده است که میزان بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی در حال افزایش است. مقاومت آنتی‌بیوتیکی مختلف در نواحی متفاوت می‌تواند به دلیل استفاده از آنتی‌بیوتیک‌هایی باشد که به عنوان محرک رشد به دام‌ها داده می‌شود، به ویژه موادی که معمولاً به طور مشترک 2. Ameme, D. K., Abdulai, M., Adjei, E. Y., Afari, E. A., Nyarko, K. M., Asante, D., & Wurapa, F. 2016. Foodborne disease outbreak in a resource-limited setting: a tale of missed opportunities and implications for response. Pan African Medical Journal. 23(1): 1-9.

3. Aye, R., Gautam, A., Reyaz, A., Vinson, H., Gibbs, P. S. 2014. Evaluation of selected toxigenic genes and antimicrobial agent susceptibility in *Staphylococcus* spp isolated from foods purchased from North Dakota grocery stores. *J. Food Nutr. Disor.* 3(3): 2-5.
4. Azizkhani, M., Tooryan, F. 2018. Contamination of Traditional Cheese in Mazandaran Province to Methicillin-resistant *Staphylococcus Aureus*. *J Mazandaran Univ Med Sci.* 28(163): 47-56.
5. Baker, G. C., Smith, J. J., & Cowan, D. A. 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of microbiological methods.* 55(3): 541-555.
6. Beyene, T., Hayishe, H., Gizaw, F., Beyi, A. F., Abunna, F., Mammo, B., Abdi, R. D. 2017. Prevalence and antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus* in dairy farms, abattoir and humans in Addis Ababa, Ethiopia. *BMC research notes.* 10(1): 1-9.
7. Carfora, V., Caprioli, A., Marri, N., Sagrafoli, D., Boselli, C., Giacinti, G., Amatiste, S. 2015. Enterotoxin genes, enterotoxin production, and methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products in Central Italy. *Int Dairy J.* 42:12-15.
8. Casaes Nunes, R.S., Pires de Souza, C., Pereira K.S., Del Aguila, E.M., Flosi Paschoalin, VM. 2016. Identification and molecular phylogeny of coagulase-negative staphylococci isolates from Minas Frescal cheese in southeastern Brazil: Superantigenic toxin production and antibiotic resistance. *J Dairy Sci,* 99: 2641-2653.
9. Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., Connell, N., Alland, D. 2007. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J microbiological methods.* 69(2): 330-339.
10. Cunha, M. D. L. R. D. S. D., Peresi, E., Calsolari, R. A. O., & Araújo Júnior, J. P. 2006. Detection of enterotoxins genes in coagulase-negative staphylococci isolated from foods. *Braz.J. Microbiol.* 37(1): 70-74.
11. Ebrahimzadeh, K., and Hanifian, S. 2016. Contamination rate, antibiotic susceptibility profile, biofilm formation and presence of TSST-1 gene in *Staphylococcus aureus* isolates. *J Food Hygiene.* 6 (24):1-14.
12. Even, S., Leroy, S., Charlier, C., Zakour, N. B., Chacornac, J. P., Lebert, I., Donnio, P. Y. 2010. Low occurrence of safety hazards in coagulase negative staphylococci isolated from fermented foodstuffs. *Int. J. Food Microbiol.* 139(1-2): 87-95.
13. Griffith, CJ. 2006. Food safety: where from and where to. *Br Food J.* 108(1): 6-15.
14. Heikens, E., Fleer, A., Paauw, A., Florijn, A., & Fluit, A. C. 2005. Comparison of genotypic and phenotypic methods for species-level identification of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* 43(5): 2286-2290.
15. Hosseini, S. M., Arabestani, M. R., Mahmoodi, H., Farhangara, E. 2015. Prevalence of G, H, I, J Enterotoxin Genes and antibacterial susceptibility pattern in *staphylococcus aureus* strains isolated from different foods. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences.* 25(123): 1-10.
16. Islam, M. A., Parveen, S., Rahman, M., Huq, M., Nabi, A., Khan, Z. U. M., Wagenaar, J. A. 2019. Occurrence and characterization of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in processed raw foods and ready-to-eat foods in an urban setting of a developing country. *Front. Microbiol.* 10: 503.
17. Karimi, M., Esfahani, B. N., Halaji, M., Mobasherizadeh, S., Shahin, M., Havaei, S. R., Havaei, S. A. 2017. Molecular characteristics and antibiotic resistance pattern of *Staphylococcus aureus* nasal carriage in tertiary care hospitals of Isfahan, Iran. *Infez Med.* 25(3): 234-240.
18. Khoori, E., Ataye Salehi, A., khoori M. 2017. Determination of antibiotic resistance pattern of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from the food samples by Multiplex PCR. *Journal of food Microbiology.* 4(4):21-30.
19. Knill, CJ, and Kennedy, JF. 2013. *Foodborne Infections and Intoxications, J.*

- Glenn Morris, ME Potter (Eds.). Academic Press/Elsevier, San Diego, CA, USA, 541 pp. 94-99.
20. Layer, F., Ghebremedhin, B., Moder, KA, Konig, W., Konig, B, 2006. Comparative study using various methods for identification of *Staphylococcus* species in clinical specimens. J. Clin. Microbiol. 44(8):2824-2830.
21. Magiorakos, AP., Srinivasan, A., Carey RB., Carmeli Y., Falagas ME., Giske CG., et al. 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect. 18(3):268-81.
22. Nikniaz, Z., Mahdavi, R., Jalilzadeh, H., Vahed, J.M. 2011. Evaluation of microbial contamination in cream filled pastries distributed in Tabriz confectionaries. J Food Technology and Nutrition. 29(1): 66 – 71.
23. Nonahal, F., Rahimi, E., AtaieSalehi, E. 2014. Prevalence of *Staphylococcus aureus* in meat and meat products. Journal of food Microbiology. 1(3):41-46.
24. Pereira, V., Lopes, C., Castro, A., Silva, J., Gibbs, P., Teixeira, P. 2009. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. Food microbiology. 26(3): 278-282.
25. Ruaro, A., Andrighetto, C., Torriani, S., Lombardi, A. 2013. Biodiversity and characterization of indigenous coagulase-negative staphylococci isolated from raw milk and cheese of North Italy. Food microbiology. 34(1):106-111.
26. Sarrafzadeh Zargar, M. H., Hosseini Doust, R., Mohebbati Mobarez, A. 2014. *Staphylococcus aureus* enterotoxin a gene isolated from raw red meat and poultry in Tehran, Iran. Int J Enteric Pathog. 2(3): 1-6.
26. Schmitt, M., Schuler-Schmid, U., Schmidt-Lorenz, W. 1990. Temperature limits of growth, TNase and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. Int. j. food microbiology, 11(1): 1-19.
27. Sedaghat, H., Esfahani, B. N., Mobasherizadeh, S., Jazi, A. S., Halaji, M., Sadeghi, P. & Havaei, S. A. 2017. Phenotypic and genotypic characterization of macrolide resistance among *Staphylococcus aureus* isolates in Isfahan, Iran. Iran j microbial. 9(5): 264.
28. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. SMBE. 30(12): 2725-2729.
29. Yang, X., Zhang, J., Yu, S., Wu, Q., Guo, W., Huang, J., Cai, S. 2016. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in retail ready-to-eat foods in China. Front microbial. 7:816.
30. Yan, X., Wang, B., Tao, X., Hu, Q., Cui, Z., Zhang, J., Grundmann, H. 2012. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning in Shenzhen, China. Am Soc Microbiol 78(18): 6637-6642.

Prevalence of *Staphylococci* spp and their antibiotic susceptibility pattern isolated from foodstuffs in Isfahan in 2015-2016

Hoveida L¹, Mobasherizadeh S^{2*}, Rostami S², Ataie B³, Daei A³

1. Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.
2. Nosocomial Infection Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
3. Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

*Corresponding author: mobasherizadeh@gmail.com

Received: 2 November 2020

Accepted: 31 January 2021

Abstract

In developing countries, the presence and diversity of *Staphylococcus* species in foodstuffs have not been comprehensively studied. So, the present study aimed to investigate the dissemination of *Staphylococcus* spp. and their antimicrobial susceptibility pattern isolated from foodstuffs in Isfahan in 2015-2016. A total of 194 foodstuff samples were collected from different parts of Isfahan city and processed for the presence of *Staphylococcus* spp. The conventional tests were used for the primary detection of bacteria, and the sequence analysis of 16S rRNA was used for the species identification. The antimicrobial susceptibility pattern of isolates was determined by the disk diffusion method. From a total of 194 food samples, 92 Gram-positive cocci (47.5%) were isolated. Of them, 84 isolates were *Staphylococcus* spp., 7 *Micrococcus* spp., and one *Micrococcus* spp. The most prevalent species were *S. aureus* 25% (21/84), *S. vitulinus* 15.5% (13/84), and *S. succinus sub casei* 11.9% (10/84). The most antibiotic resistance rates were against penicillin (59/5%) and tetracycline (20.2%), while the lowest antibiotic resistance rates were observed for levofloxacin, rifampicin, gentamicin, and ciprofloxacin. Characterization of *Staphylococcus* species is important for epidemiological investigations. Proper identification and management practices, including analysis of 16S rRNA for species identification, should be considered to increase food safety and prevent extra treatment costs.

Keywords: *Staphylococcus*; foodstuff; antibiotic resistance; DNA sequence analysis.

ارزیابی ویژگی‌های پروبیوتیکی و تنوع درون گونه‌ای سویه‌های *Lactobacillus plantarum* جدا شده از مواد غذایی مختلف با روش RAPD-PCR

دینا شهرام پور^{۱*}، مرتضی خمیری^۲، محبوبه کشیری^۲، سید محمد علی رضوی^۳

۱. دانش آموخته دکتری، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.
۲. گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.
۳. گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.

*نویسنده مسئول: shahrapour@gau.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۹/۱۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۱۱

چکیده

هدف از این مطالعه ارزیابی تنوع درون گونه‌ای ۱۰ سویه *Lactobacillus plantarum* جدا شده از مواد غذایی مختلف شامل زیتون تخمیری، پنیر کوزه، شیر شتر و خمیر ترش به کمک روش RAPD-PCR و همچنین مقایسه قابلیت پروبیوتیکی آن‌ها بود. نتایج نشان داد که الگوی بانندی متفاوتی توسط سه نوع پرایمر برای سویه‌های مختلف به وجود آمد و بر طبق ماتریس تشابه رسم شده توسط نرم‌افزار NTSYS بر اساس ضریب جاکارد، به طور کلی ۱۰ سویه در دو شاخه اصلی و ۷ زیرگروه جانبی قرار گرفتند. دو سویه KAO۱۷ و KAO۶۴ جدا شده از منشا یکسان زیتون تخمیری بیشترین شباهت را داشتند. علاوه بر این ویژگی پروبیوتیکی سویه‌های *L. plantarum* در سطح نژاد متفاوت ارزیابی شد. نتایج تست ایمنی نشان داد که همه نژادهای مختلف *L. plantarum*، گاما-همولتیک بودند و در برابر آنتی بیوتیک ونکومایسین مقاوم بودند و مقاومت آن‌ها در برابر سایر آنتی بیوتیک‌های رایج متفاوت بود. سویه‌های جدا شده از پنیر کوزه شامل KMC۳۷ و KMC۴۵ از بیشترین مقاومت در برابر اسید برخوردار بودند. از سوی دیگر مقاومت در برابر ۰/۳ درصد نمک صفراوی نشان داد که اختلاف معناداری از این نظر بین سویه‌های جدا شده از زیتون تخمیری وجود ندارد و سویه ۵ KMM بیشترین مقاومت را داشت. به علاوه فعالیت ضد میکروبی سویه‌ها در برابر باکتری‌های بیماری‌زای گرم مثبت *L. monocytogenes* و گرم منفی *E. coli* متفاوت بود و بیشترین فعالیت ضدباکتریایی به سویه KMC۴۵ تعلق داشت. بنابراین با توجه به هدف مورد نظر می‌توان هر یک از سویه‌های *L. plantarum* را به عنوان کشت پروبیوتیک در صنایع غذایی و دارویی پیشنهاد نمود.

کلید واژه‌ها: RAPD-PCR، تنوع درون گونه‌ای، ویژگی‌های پروبیوتیک.

مقدمه

لاکتوباسیلوس‌ها بزرگترین جنس در گروه باکتری‌های اسیدلاکتیک هستند که بیش از ۱۵۰ گونه باکتریایی را در خود جای می‌دهند. لاکتوباسیلوس‌ها میکروارگانیزم‌هایی گرم مثبت، میکروآئروفیل، غیراسپورزا، میله‌ای کوتاه خمیده یا میله‌ای بلند و یا تخم مرغی شکل، معمولاً غیرمتحرک، مقاوم به اسید و کاتالاز منفی هستند. این باکتری‌ها نیازهای تغذیه‌ای پیچیده‌ای دارند و از کربوهیدرات‌ها، اسیدهای چرب، پپتیدها، اسیدهای آمینه، ویتامین‌ها و مشتقات اسید نوکلئیک به عنوان منبع کربن استفاده می‌کنند. دمای بهینه رشد آن‌ها در دامنه ۳۰-۴۰ درجه سانتی‌گراد است. همچنین pH بهینه رشد آن‌ها بین

۵/۶-۵/۲ متغیر است. لاکتوباسیلوس‌ها در محصولات لبنی، غلات، گوشت، آبجو، شراب، میوه‌ها، ترشی سبزیجات، ساورکرات، خمیر ترش، آب، خاک و فاضلاب به فراوانی یافت می‌شوند، آن‌ها همچنین بخشی از فلور طبیعی دهان، روده و واژن انسان و بسیاری از حیوانات را تشکیل می‌دهند (Winslow et al., 1917). علاوه بر این فعالیت ضدباکتریایی و ضدکپکی باکتری‌های اسید لاکتیک از جمله گونه‌های مختلف *Lactobacillus* به دلیل تولید ترکیبات ضد میکروبی مختلفی مانند اسیدهای آلی، پراکسید هیدروژن، دی استیل، کربن دی اکسید و باکتریوسین در مطالعات متعددی گزارش شده است و با

و کافی (10^6 cfu/gr or ml)، اثرات مفیدی بر سلامت میزبان دارند (FAO/WHO, 2002).

بررسی ویژگی مقاومت در برابر شرایط گوارشی و فعالیت ضد میکروبی جدایه‌های لاکتیکی حاصل از مواد غذایی تخمیری مختلف شامل زیتون تخمیری (احمدی و همکاران، ۱۳۹۵)، کیمچی (Lee et al., 2016)، هوره (Vasiee et al., 2018)، شیرشتر و پنیرکوزه (محمودی و همکاران، ۱۳۹۷) که جزء مهم‌ترین معیارهای انتخاب باکتری‌های پروبیوتیک می‌باشند، نشان داد که نژادهای مختلف *L. plantarum* نسبت به سایر جدایه‌های لاکتیکی از بیشترین قابلیت پروبیوتیکی برخوردار بودند.

نخستین ضرورت برای توسعه یک محصول غذایی پروبیوتیک انتخاب سویه پروبیوتیک مناسب می‌باشد. زنده‌مانی در طول فرایند تولید و انبارمانی، زنده‌مانی طی عبور از دستگاه گوارش، ایمن بودن و پتانسیل ایجاد اثرات سلامتی‌بخش بر فرد مصرف کننده از جمله معیارهای اصلی انتخاب سویه‌های پروبیوتیک است (Tambekar and Bhutada, 2010). بسیاری از گونه‌های باکتریایی پروبیوتیک با قابلیت تکنولوژیکی مطلوب به جنس لاکتوباسیلوس اختصاص دارد زیرا مقاومت بیشتری نسبت به بیفیدوپاکترها دارند (Lee and Mättö et al, 2006؛ salminen, 2009). براساس تحقیقات انجام شده بقای باکتری‌ها در برابر عوامل مضر در طی فراوری و تولید محصول به نوع گونه و نژاد وابسته است (Tamime et al., 2005). هدف از این پژوهش بررسی تنوع نژادی سویه‌های مختلف *L. plantarum* جدا شده از مواد غذایی مختلف به روش RAPD-PCR و مقایسه ویژگی‌های پروبیوتیک آن‌ها است.

روش کار

فعال‌سازی باکتری‌ها

۱۰ سویه *Lactobacillus plantarum* که قبلاً شناسایی مولکولی آنها براساس ناحیه 16srRNA انجام گرفته و توالی آنها در NCBI تایید شده بود، از بانک

توجه به ویژگی ایمن بودن، عنوان نگهدارنده زیستی به این باکتری‌ها داده شده است (Hartmann et al., 2011؛ Blagojev et al., 2012؛ Garde et al., 2014). یکی از گونه‌های معروف لاکتوباسیلوس‌ها *Lactobacillus plantarum* است، که گونه‌ای چند کاربردی بوده و در مواد غذایی مختلف به فراوانی یافت می‌شود و به عنوان کشت آغازگر در فرایند تخمیر موثر می‌باشد (Di Cagno et al., 2010). کاربرد گسترده این گونه ممکن است که توانایی سازگاری اکولوژی آن با محیط‌های مختلف را نشان دهد. اندازه ژنوم *L. WCFS1 plantarum Mb* (۳/۳) جدا شده از بزاق انسان، بزرگترین ژنومی است که تا به امروز در باکتری‌های اسید لاکتیک توالی‌یابی شده است (Kleerebezem et al., 2003). بزرگ بودن اندازه ژنوم احتمالاً به قابلیت تخمیر کربوهیدرات‌های مختلف کمک کرده و امکان زندگی در محیط‌های مختلف را برای این گونه فراهم می‌کند (Bringel et al., 2001). آنالیز نسبی ژنوم ۲۰ نژاد مختلف *L. plantarum* جدا شده از منابع متعدد با ترکیب بازی متفاوت، نشان دهنده تکامل آن‌ها بوده است. با وجود بسیاری از مطالعات اکولوژیک انجام گرفته در مورد تایپینگ مولکولی *L. plantarum*، علاقه به این موضوع به ویژه برای درک سازگاری تکاملی این گونه به موقعیت‌های زیست محیطی مختلف، هنوز هم بسیار زیاد است. علاوه بر این، ارزیابی تمایز درون گونه‌ای گام اولیه مهمی برای انتخاب کشت‌های آغازگر است. زیرا ویژگی‌های تکنولوژیکی، پروبیوتیکی و ضد میکروبی عمدتاً به نژاد میکروارگانیسم وابسته است (Di Cagno et al., 2010). یکی از ویژگی‌های مطلوب گونه *L. plantarum* قابلیت پروبیوتیک آن می‌باشد که در پژوهش‌های متعددی گزارش شده است. در سال ۲۰۰۲، فائو و سازمان بهداشت جهانی یک تعریف واحد برای پروبیوتیک‌ها ارائه کردند که در آن پروبیوتیک‌ها را میکروارگانیسم‌های زنده و غیربیماری‌زایی معرفی نمودند، که در صورت مصرف مداوم

میکرولیتر از هریک از کشت‌های مایع باکتریایی بر روی محیط کشت MRS آگار کشت خطی داده شد و مجدد به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه قرار گرفت. پس از ظاهر شدن پرگنه‌ها در سطح محیط کشت، به منظور تایید خلوص و عدم آلودگی کشت باکتریایی آزمون‌های رنگ آمیزی گرم و کاتالاز بر روی آن‌ها انجام گرفت (Lee et al., 2016).

میکروبی گروه صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان تهیه شد. ابتدا کشت ذخیره هریک از باکتری‌ها پس از خروج از فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد در ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت MRS مایع تلقیح شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه- گذاری گردید. پس از ایجاد کدورت در محیط کشت، عمل فوق یکبار دیگر تکرار گردید تا از فعال شدن باکتری‌ها در محیط مایع اطمینان حاصل شود. در مرحله بعد، ۱۰۰

جدول ۱- سویه‌های مختلف *L. plantarum* جدا شده از مواد غذایی مختلف و نژادهای مشابه در پایگاه NCBI¹

درصد تشابه	نام نژاد مشابه در پایگاه NCBI	شماره دسترسی نژاد مشابه در پایگاه NCBI	منشاء	کد سویه
۹۷	<i>Lactobacillus plantarum subsp. plantarum strain W2</i>	KX 261527.1	زیتون تخمیری	KAO ۱۷
۹۸	<i>Lactobacillus plantarum strain CSCWL 7-3</i>	KR 055065.1	زیتون تخمیری	KAO ۸۰
۹۷	<i>Lactobacillus plantarum partial 16S rRNA gene</i>	LT 593850.1	زیتون تخمیری	KAO ۲۱
۹۷	<i>Lactobacillus plantarum strain CSI 7</i>	KM 513642.1	زیتون تخمیری	KAO ۴۱
۹۷	<i>Lactobacillus plantarum strain NBRC 15891</i>	NR 112690.1	زیتون تخمیری	KAO ۶۴
۹۸	<i>Lactobacillus plantarum strain gp 57</i>	KM 495883.1	پنیر کوزه	KMC ۴۵
۹۷	<i>Lactobacillus plantarum strain gp 46</i>	KM 495875.1	پنیر کوزه	KMC ۶۱
۹۷	<i>Lactobacillus plantarum strain KLDS 610.1</i>	EU 419598.1	پنیر کوزه	KMC ۳۷
۹۷	<i>Lactobacillus plantarum strain gp106</i>	KM 495894.1	شیر شتر	KMM ۵
۹۸	<i>Lactobacillus plantarum strain CIP 103151</i>	NR 104573.1	خمیر ترش	KES ۱۰

جدول ۲- پرایمرهای مورد استفاده در آزمون RAPD-PCR (دی کانگو و همکاران، ۲۰۱۰)

پرایمر	توالی	درصد CG	دمای ذوب (°C)
M13	GAGGGTGGCGTTCT	۶۶/۶	۵۱/۶
P7	AGCAGCGTCG	۷۰	۳۴
P4	CCGACGCGTT	۷۰	۳۴

1. National Center for Biotechnology Information

جدول ۳- شرایط دمایی برای واکنش RAPD-PCR مربوط به پرایمرهای این پژوهش

پرایمر	مرحله	نام مرحله	مدت زمان	دما (°C)	تعداد تکرار هر مرحله
M13	اول	واسرشتی اولیه	۲ دقیقه	۹۴	۱
		واسرشتی	۱ دقیقه	۹۴	۱
	دوم	اتصال	۴۵ ثانیه	۴۲	۳۵
P7 و P4	اول	طویل شدن	۲ دقیقه	۷۲	۱
		طویل شدن نهایی	۵ دقیقه	۷۲	۱
	دوم	واسرشتی اولیه	۴ دقیقه	۹۴	۱
P7 و P4	دوم	واسرشتی	۱ دقیقه	۹۴	۱
		اتصال	۱ دقیقه	۳۰	۳۰
	سوم	طویل شدن	۲ دقیقه	۷۲	۱
	سوم	طویل شدن نهایی	۵ دقیقه	۷۲	۱

این آزمون از یک سویه کلکسیونی *Lactobacillus plantarum* (PTCC 1745) با جنس و گونه تایید شده به عنوان مرجع استفاده شد. بررسی اولیه محصولات RAPD-PCR توسط الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد در ولتاژ ۱۰۰ ولت و زمان ۲ ساعت انجام شد و باندهای تشکیل شده در زیر نور UV در دستگاه ژل داگ مورد مشاهده قرار گرفتند. سپس براساس الگوی باندهای تشکیل شده (حضور یا غیاب باند) ماتریس دو گانه صفر یا یک برای هر سویه در مورد هر پرایمر ایجاد شد. در نهایت دندوگرام سویه‌های مورد آزمون با ادغام سه سری پروفایل RAPD-PCR توسط نرم‌افزار NTSYS (نسخه ۲/۲) ترسیم شد (Di Cagno et al., 2010).

بررسی ویژگی‌های پروبیوتیک نژادهای مختلف *L. plantarum* ارزیابی فعالیت همولتیک

به منظور ارزیابی ایمنی نژادهای مختلف *L. plantarum*، فعالیت همولیتیک آن‌ها پس از کشت خطی بر روی محیط کشت آگار خون دار حاوی ۵ درصد خون دفیبرینه گوسفند و گرمخانه گذاری به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت همولیتیک سویه‌ها براساس تشکیل هاله شفاف، هاله نسبتاً سبز و یا عدم تشکیل هاله در اطراف کلنی‌ها به ترتیب به

بررسی تنوع نژادی سویه‌های *L. plantarum* به کمک تکنیک^۲ RAPD-PCR

استخراج DNA از نژادهای مختلف *L. plantarum* استخراج DNA از هریک از باکتری‌ها به کمک کیت تجاری دنا زیست آسیا (ایران)، براساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت.

RAPD-PCR

واکنش‌های RAPD-PCR برای هر سویه *L. plantarum* به کمک سه پرایمر M13، P7 و P4 (جدول ۲) در سه واکنش مجزا به صورت زیر در ترموسایکلر انجام گرفت.

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر مستر میکس قرمز، ۲ میکرولیتر پرایمر با غلظت ۱۰ پیکومول، ۶ میکرولیتر آب دیونیزه مولکولی و ۲ میکرولیتر از DNA الگو انجام گرفت. در هر سری واکنش نیز از آب مقطر دیونیزه مولکولی به جای DNA الگو به عنوان کنترل منفی استفاده شد. پس از اختلاط اجزای واکنش در میکروتیوپ ۰/۲ میلی‌لیتری تکثیر تصادفی قطعات DNA توسط هر پرایمر با توجه به برنامه دمایی مندرج در جدول ۳ صورت گرفت. لازم به ذکر است که در

2. Randomly Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction

عنوان بتا-همولیزین، آلفا-همولیزین و گاما-همولیزین مشخص گردید. در این آزمون از باکتری‌های (PTCC 1399 *Escherichia coli*) و (PTCC 1431 *Staphylococcus aureus*) به عنوان کنترل مثبت به ترتیب برای آلفا-همولیزین و بتا-همولیزین استفاده شد (Taheur et al., 2016).

ارزیابی مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های رایج

مقاومت نژادهای مختلف *L. plantarum* در برابر ۱۰ آنتی‌بیوتیک رایج شامل پنی‌سیلین، جنتامایسین، ونکومایسین، آمپی‌سیلین، استرپتومایسین، کانامایسین، کلرامفنیکل، اریترومایسین، تتراسایکلین و کلیندامایسین به روش انتشار از دیسک مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور ابتدا ۵۰ میکرولیتر از کشت فعال یک شبه هریک از نژادهای مختلف *L. plantarum* در سطح پلیت‌های حاوی محیط کشت MRS آگار تلقیح و به کمک سوآپ استریل به صورت سطحی کشت داده شد. سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیک در سطح محیط کشت قرار گرفتند و پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت به گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. در پایان زمان مذکور قطر هاله عدم رشد ایجاد شده در اطراف هر دیسک توسط خط‌کش اندازه‌گیری و برحسب میلی‌متر گزارش گردید. سپس مقاومت نژادهای مختلف *L. plantarum* با توجه به قطر هاله عدم رشد تشکیل شده کمتر یا مساوی ۱۴ میلی‌متر، ۱۵ تا ۱۹ میلی‌متر و بیشتر از ۲۰ میلی‌متر به ترتیب به صورت مقاوم، حساس نسبی و حساس تعیین شد (Turchi et al., 2013).

ارزیابی مقاومت به شرایط اسیدی

بدین منظور ابتدا کشت یک شبه هریک از نژادهای مختلف *L. plantarum* به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۴۰۰۰g تحت سانتریفوژ قرار گرفت. سپس رومانند دور ریخته شد و از رسوب باکتریایی حاصل پس از دوبار شستشو با محلول سرم فیزیولوژی استریل (۵/۸ گرم کلرید سدیم در یک لیتر آب مقطر) سوسپانسیونی با غلظت معادل نیم مک فارلند (10^8 cfu/ml) تهیه و به محیط کشت MRS مایع

که pH آن توسط اسید کلریدریک ۵ نرمال معادل ۲ و ۳ تنظیم شده بود، اضافه گردید و به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. شمارش باکتری‌های زنده در لحظه صفر و پس از ۳ ساعت به روش کشت آمیخته در محیط کشت MRS آگار انجام شد. مقاومت هریک از سویه‌های *L. plantarum* در برابر شرایط اسیدی با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید (Lee et al., 2016).

$$\text{نرخ بقا} (\%) = (N_1 / N_0) \times 100$$

N_1 = تعداد کل باکتری‌های زنده بعد از قرارگیری در شرایط اسیدی (log cfu/ml)، N_0 = تعداد کل باکتری‌های زنده قبل از قرارگیری در شرایط اسیدی (log cfu/ml) ارزیابی مقاومت به نمک صفاوی

به منظور ارزیابی مقاومت سویه‌های *L. plantarum* در برابر نمک صفاوی نیز، ابتدا کشت یک شبه هریک از آن‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۴۰۰۰g تحت سانتریفوژ قرار گرفت. سپس رومانند دور ریخته شد و از رسوب باکتریایی حاصل پس از دوبار شستشو با محلول سرم فیزیولوژی استریل سوسپانسیونی با غلظت معادل نیم مک فارلند (10^8 cfu/ml) تهیه و به محیط کشت MRS مایع حاوی ۰/۳ درصد نمک صفاوی مشابه شرایط روده، تلقیح گردید و به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. شمارش باکتری‌های زنده در لحظه صفر و پس از ۴ ساعت به روش کشت آمیخته در محیط کشت MRS آگار انجام شد. مقاومت هریک از سویه‌های *L. plantarum* در مجاورت نمک صفاوی با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید (Lee et al., 2016).

$$\text{نرخ بقا} (\%) = (N_1 / N_0) \times 100$$

N_1 = تعداد کل باکتری‌های زنده بعد از قرارگیری در معرض نمک صفاوی (log cfu/ml)، N_0 = تعداد کل باکتری‌های زنده قبل از قرارگیری در معرض نمک صفاوی (log cfu/ml)

ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی به روش میکروداپلوشن

Microsoft Office Excel نسخه ۲۰۱۳ رسم شدند.

نتایج

تنوع نژادی سویه‌های مختلف *L. plantarum* تمامی سویه‌های *L. plantarum* مورد بررسی گرم مثبت و کاتالاز منفی تشخیص داده شدند. سپس به منظور بررسی تنوع درون گونه‌ای این سویه‌ها از سه آغازگر تصادفی P4، P7، M13 در آزمون RAPD-PCR استفاده شد. الگوی بانندی حاصل از همه آغازگرها باند-هایی در محدوده ۱۰۰ تا ۳۰۰۰ bp ایجاد نمود. در مجموع این آغازگرها ۴۱ باند قابل کدگذاری ایجاد کردند که از این تعداد ۳۵ باند چند شکلی و ۶ باند اختصاصی بود. تعداد باندهای چند شکلی ایجاد شده توسط این سه آغازگر مساوی بود. همچنین همه آغازگرها باند اختصاصی تولید کردند و بیشترین باند اختصاصی ایجاد شده به آغازگر P7 اختصاص داشت. علاوه بر این آغازگرها هیچ باند مشترکی را در بین سویه‌های مورد مطالعه ایجاد نکردند (شکل ۱). از سویی دیگر تعداد باندهای اختصاصی، مشترک و چندشکلی ایجاد شده توسط آغازگرها در میان نژادهای مختلفی با منشأ یکسان مانند نژادهای مختلف حاصل از پنیرکوزه به ترتیب ۱۵ و ۵ و ۲ و زیتون تخمیری به ۰، ۱۰ و ۲۲ باند بود. این ارقام نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی بالادر بین جدایه‌ها می‌باشد. در این پژوهش جهت بررسی تنوع ژنتیکی در بین جدایه‌ها و رسم دندروگرام از نرم‌افزار NTSYS (نسخه ۲/۰۲) استفاده شد. بدین منظور ابتدا ماتریس صفر و یک بر اساس مشاهده باند (۱) و یا عدم مشاهده باندها (۰) در تصاویر حاصل از الکتروفورز تهیه شد. سپس از ضرایب تطابق ساده، جاکارد و دایس و همچنین روش کلینک^۵، جفت گروه‌های نامتوازن^۶ و اسلینک^۷ به ترتیب برای به‌دست آوردن ضرایب تشابه ژنتیکی^۸ و رسم دندروگرام استفاده شد. دندروگرام‌های

به منظور تعیین حداقل غلظت بازدارنده (MIC)^۳ و حداقل غلظت کشندگی (MBC)^۴ روماند فاقد سلول هریک از سویه‌های *L. plantarum* از آزمون میکروداپلوشن استفاده شد. ابتدا ۱۸۰ میکرولیتر از محیط کشت مولر هینتون مایع حاوی درصدهای مختلف از روماند فیلتر شده (۱۰-۱۰۰ درصد) به همراه ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری بیماری‌زا با غلظتی معادل cfu/ml $10^5 \times 1/5$ به چاهک‌های موجود در میکروپلیت ۹۶ خانه اضافه شد. کنترل مثبت شامل ۱۸۰ میکرولیتر محیط کشت مولر هینتون مایع و ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری بیماری‌زا و کنترل منفی تنها شامل محیط کشت مولر هینتون مایع حاوی درصدهای مختلف از روماند فیلتر شده بود. میکروپلیت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. در پایان زمان مذکور میزان کدورت ایجاد شده در هر چاهک توسط دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۶۳۰ نانومتر ارزیابی گردید. کمترین غلظت از روماند که به صورت ماکروسکوپی رشد باکتری و کدورتی در آن دیده نشد به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی در نظر گرفته شد. همچنین به منظور تعیین حداقل غلظت کشندگی از چاهک تعیین شده به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی و غلظت‌های بالاتر آن میزان ۱۰ میکرولیتر بر روی محیط کشت MHA لکه‌گذاری گردید. کمترین غلظتی از روماند که هیچ‌گونه رشدی بر روی محیط کشت جامد مشاهده نگردید نیز به عنوان حداقل غلظت کشندگی در نظر گرفته شد (Taheur et al., 2016).

آنالیز آماری

در این پژوهش تمامی آزمون‌ها در سه تکرار انجام شد. آنالیز و تجزیه تحلیل آماری داده‌ها از طریق طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۳ صورت گرفت. جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد و نمودارها به کمک نرم افزار

5. Complete
6. Unweighted pair group method using arithmetic average (UPGMA)
7. Single linkage method
8. Simple Matching coefficient: (SM)

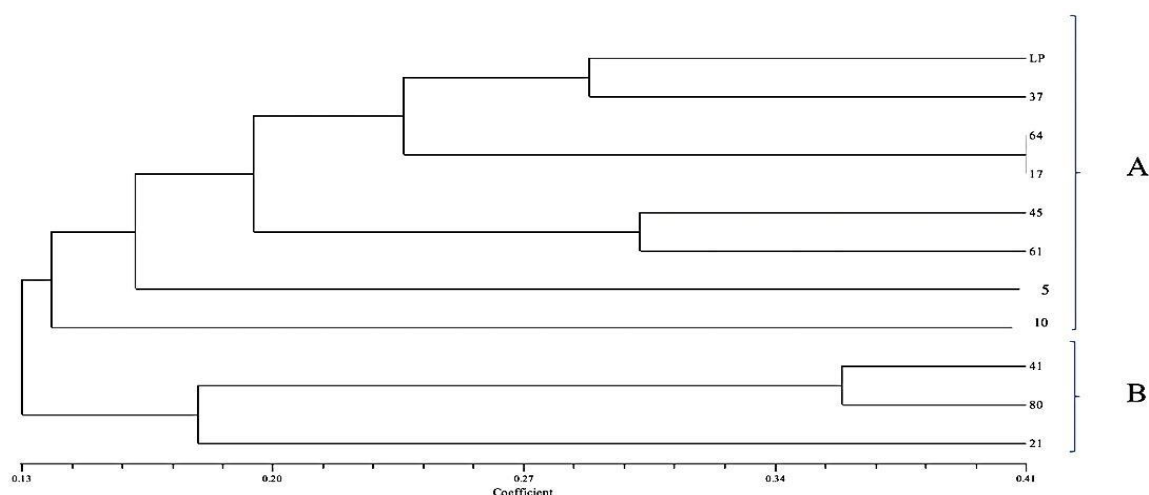
3. Minimum Inhibition Concentration
4. Minimum Bactericidal Concentration

نزدیکترین جدایه به باکتری استاندارد کلکسیونی بود. در گروه بندی ایجاد شده براساس روش کلینک دو شاخه اصلی A و B وجود داشت. شاخه اصلی A به ۵ زیرگروه شامل ۸ سویه جدا شده از زیتون تخمیری (۲)، پنیر کوزه (۳)، خمیرترش (۱)، شیر شتر (۱) و سویه استاندارد کلکسیونی و شاخه اصلی B به ۲ زیرگروه شامل ۳ سویه جدا شده از زیتون تخمیری تقسیم شدند. به طور کلی این نتایج حاکی از تنوع ژنتیکی در میان سویه های *L. plantarum* جدا شده از مواد غذایی مختلف بود.

متفاوتی به دست آمد و در نهایت با توجه به مقدار ضریب همبستگی کوفنتیک بالاتر ($r=0/83$)، ضریب جاکاراد جهت بررسی میزان شباهت و روش کلینک جهت گروه بندی افراد با استفاده از ماتریس شباهت انتخاب گردید. براساس ماتریس تشابه (شکل ۲) دو جدایه KAO ۶۴ و KAO ۱۷ بیشترین تشابه ژنتیکی را با یکدیگر نشان دادند و در دندروگرام حاصل از روش کلینک در یک گروه با کمترین فاصله قرار گرفتند. این شباهت احتمالا به دلیل یکسان بودن منبع جداسازی (زیتون تخمیری) این جدایه ها می باشد. علاوه بر این جدایه KMC ۳۷



شکل ۱- الگوی RAPD-PCR نژادهای مختلف *L. plantarum* ایجاد شده در حضور آغازگر P4 بر روی ژل آگارز پس از الکتروفورز. (ردیف ۱: کنترل منفی. ردیف ۲: الگوی حاصل از سویه *L. plantarum* مرجع. ردیف ۳ تا ۱۲: الگوی حاصل از ۱۰ جدایه مختلف *L. plantarum* مورد بررسی در این مطالعه. ردیف ۱۳: نشانگر مولکولی ۱kb)



شکل ۲- دندروگرام حاصل از ترکیب الگوهای RAPD-PCR نژادهای مختلف *L. plantarum* توسط آغازگرهای P4، M13 و P7

رشد بر روی محیط کشت خون دار فعالیت همولتیکی نشان ندادند. در واقع همه نژادهای مختلف *L. plantarum*

فعالیت همولتیک نژادهای مختلف *L. plantarum* در مطالعه حاضر هیچ یک از سویه های مورد آزمون پس از

بیوتیک جنتامایسین متفاوت بود. تمامی نژادهای مختلف *L. plantarum* در برابر مهارکننده‌های سنتز پروتئین (تتراسایکلین، اریترومایسین، کلرامفنیکل، کلیندامایسین) و مهارکننده‌های سنتز دیواره سلولی (آمپی‌سیلین و پنی‌سیلین) مشابه بود.

در این مطالعه شاخص MAR یا مقاومت چندگانه در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها برای کلیه سویه‌های مورد آزمون محاسبه گردید. این شاخص براساس نسبت تعداد آنتی‌بیوتیک‌هایی که سویه مورد بررسی به آن‌ها مقاوم است به کل تعداد آنتی‌بیوتیک‌های مورد آزمون محاسبه می‌شود. شاخص MAR برای ۵۰ درصد از نژادهای مختلف *L. plantarum* ۰/۴ محاسبه شد. علاوه بر این دو جدایه KAO ۶۴ و KMM ۵ با کمترین شاخص MAR (۰/۱) بیشترین حساسیت را در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها نشان دادند.

گاما-همولتیک بودند و سلول‌های خونی را هیدرولیز نکردند، بنابراین در اطراف کلنی‌های باکتریایی هاله‌ای مشاهده نشد.

مقاومت نژادهای مختلف *L. plantarum* در برابر آنتی‌بیوتیک‌های رایج

نتایج حاصل از ارزیابی مقاومت سویه‌های *L. plantarum* در برابر ده آنتی‌بیوتیک رایج، مشخص نمود که همه نژادهای مختلف *L. plantarum* مورد مطالعه در برابر آنتی‌بیوتیک ونکومایسین مقاوم بودند. علاوه بر این همه جدایه‌ها به جز دو جدایه KAO ۶۴ و KMM ۵ در برابر آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین و کانامایسین نیز مقاومت نشان دادند. تنها جدایه مقاوم در برابر آنتی‌بیوتیک کلیندامایسین نیز جدایه KMC ۳۷ بود. از سویی دیگر رفتار نژادهای مختلف *L. plantarum* در برابر آنتی

جدول ۴- مقاومت به آنتی‌بیوتیک نژادهای مختلف *L. plantarum*

شاخص MAR	کد نژادهای مختلف <i>L. plantarum</i> آنتی‌بیوتیک										
	E	P	C	CC	TE	K	V	S	AM	GM	<i>plantarum</i>
۰/۳	S	S	S	S	S	R	R	R	S	M	KAO۱۷
۰/۴	S	S	S	S	S	R	R	R	S	R	KAO۸۰
۰/۴	S	S	S	S	S	R	R	R	S	R	KAO۲۱
۰/۴	S	S	S	S	S	R	R	R	S	R	KAO۴۱
۰/۱	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	KAO۶۴
۰/۴	S	S	S	S	S	R	R	R	S	R	KMC۴۵
۰/۳	S	M	S	S	S	R	R	R	M	S	KMC۶۱
۰/۴	S	M	S	R	S	R	R	R	S	M	KMC۳۷
۰/۱	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	KMM۵
۰/۳	S	S	S	S	S	R	R	R	S	M	KES۱۰

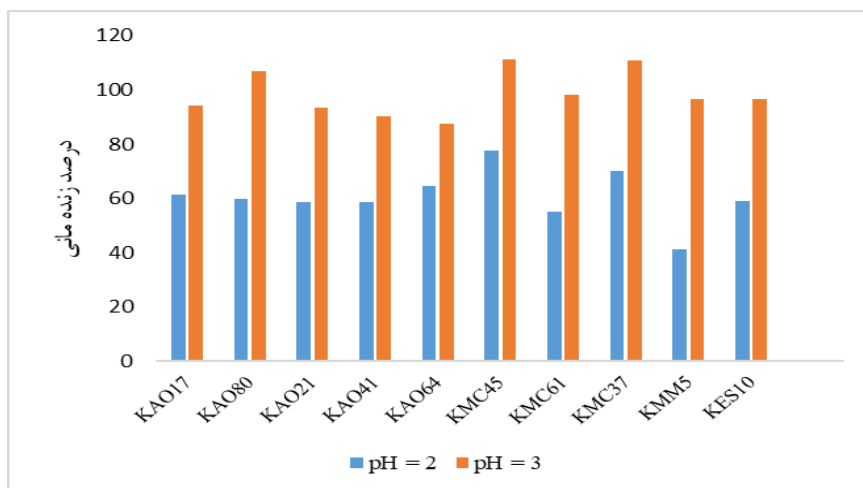
*TE=تتراسایکلین (30µg)، E=اریترومایسین (15µg)، P=پنی‌سیلین (10µg)، C=کلرامفنیکل (30µg)، CC=کلیندامایسین (2µg)، K=کانامایسین (30µg)، V=ونکومایسین (30µg)، S=استرپتومایسین (10µg)، AM=آمپی‌سیلین (10µg)، GM=جنتامایسین (10µg). **S=حساس، M=نیمه‌حساس، R=مقاوم.

مقاومت در شرایط اسیدی مورد بررسی *L. plantarum* توانستند شرایط اسیدی را تحمل کنند و در هر دو pH مورد آزمون ۲ و ۳ زنده بمانند. در مجموع طیف زنده‌مانی سویه‌های *L. plantarum* به ترتیب در pH های ۲ و ۳ بین ۷۷/۶۸-

مقاومت در شرایط اسیدی در این مطالعه تاثیر pH پایین (۲ و ۳) بر سطح زنده‌مانی ۱۰ سویه *L. plantarum* جدا شده از مواد غذایی مختلف مورد بررسی قرار گرفت. بر طبق شکل ۳ تمامی نژادهای

مایع دارای $\text{pH}=3$ در مقایسه $\text{pH}=2$ از مقاومت بیشتری برخوردار بودند و در برخی از موارد مانند نژادهای مختلف $\text{KAO}80$ ، $\text{KMC}45$ و $\text{KMC}37$ جمعیت نه تنها کاهش نیافت بلکه افزایش نشان داد.

$\text{KMC}45$ و $41/12$ و $90/23-111/38$ درصد بود. جدایه $\text{KMC}45$ بیشترین مقاومت را در برابر اسید از خود نشان داد. این سویه توانست در $\text{pH}=2$ به میزان $77/68$ درصد زنده مانده داشته باشد و تنها $1/64$ سیکل لگاریتمی کاهش نشان داد. علاوه بر این سویه‌های مورد مطالعه در محیط کشت

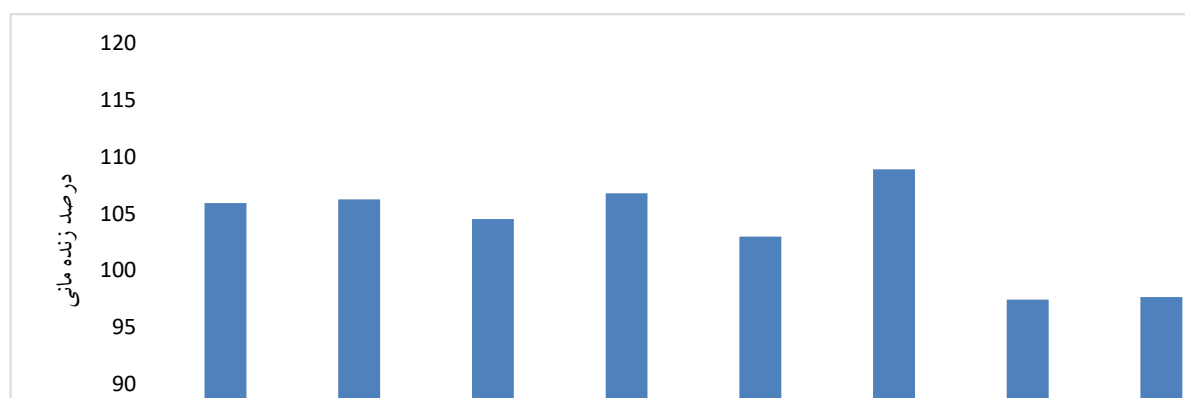


شکل ۳- زنده مانی سویه‌های مختلف *L. plantarum* در شرایط اسیدی ($\text{pH}=2$ و $\text{pH}=3$)

تعلق داشت. علاوه بر این تمامی سویه‌ها به جزء ۶۱ $\text{KMC}37$ و $\text{KMC}37$ به محیط حاوی $0/3$ درصد نمک صفراوی نه تنها مقاوم بودند بلکه توانایی رشد تقریباً برابر با نمونه شاهد (فاقد نمک صفراوی) را داشتند، بنابراین این گونه‌ها بخوبی می‌توانند در روده کوچک زنده بمانند و فعالیت کنند.

مقاومت در برابر نمک صفراوی

نتایج مربوط به آزمون مقاومت سویه‌های مختلف *L. plantarum* این پژوهش در حضور $0/3$ درصد نمک صفراوی در شکل ۴ مشاهده می‌شود. درصد زنده مانی تمامی سویه‌ها بیش از ۹۷ درصد محاسبه شد. بیشترین زنده مانی به ترتیب به سویه‌های $\text{KMM}5$ و $\text{KMC}45$



شکل ۴- زنده مانی سویه‌های مختلف *L. plantarum* در حضور $0/3$ درصد نمک صفراوی

حاصل از هر یک از نژادهای *L. plantarum* در روش میکروداپلوشن نیز در جدول ۵ مشاهده می‌گردد. طیف حداقل غلظت بازدارنده ($\text{MIC}\%$) رومانند فیلتر شده فاقد

فعالیت ضدباکتریایی نژادهای مختلف *L. plantarum* نتایج مربوط به بازدارنده از رشد دو باکتری شاخص بیماری‌زا در حضور درصدهای مختلف رومانند فیلتر شده

این درصد حداقل غلظت کشندگی برخی از سویه‌ها بیش از ۱۰۰ درصد (>۱۰۰) تعیین شد، که نشان از کم بودن غلظت ترکیبات ضد میکروبی موجود در این روماندها دارد و برای بهبود اثر بخشی تغلیظ این روماندها توصیه می‌گردد. اختلاف مشاهده شده در میان سویه‌های مختلف *L. plantarum* به دلیل تفاوت نژاد آن‌ها می‌باشد.

سلول نژادهای *L. plantarum* علیه *E. coli* و *monocytogenes* ۲۰-۸۰ درصد بود. در حالی که طیف حداقل غلظت کشندگی (MBC%) روماندهای فیلتر شده علیه دو باکتری مذکور <۱۰۰-۳۰ درصد بود. همان طور که مشاهده می‌گردد، در اغلب موارد درصد حداقل غلظت بازدارندهای روماندهای فیلتر شده از درصد حداقل غلظت کشندگی آن‌ها کمتر است. علاوه بر

جدول ۵- حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی روماندهای فیلتر شده فاقد سلول جدایه‌های *L. plantarum* در روش

میکروداپلوشن

<i>E. coli</i>		<i>L. monocytogenes</i>		سویه میکروبی
MBC(%)	MIC(%)	MBC(%)	MIC(%)	
>۱۰۰	۸۰	>۱۰۰	۸۰	KA017
>۱۰۰	۴۰	>۱۰۰	۴۰	KA08۰
۹۰	۳۰	۷۰	۳۰	KA021
>۱۰۰	۴۰	۷۰	۳۰	KA041
۸۰	۳۰	۵۰	۳۰	KA064
۳۰	۲۰	۳۰	۲۰	KMC45
>۱۰۰	۴۰	>۱۰۰	۴۰	KMC61
>۱۰۰	۳۰	>۱۰۰	۳۰	KMC37
>۱۰۰	۳۰	>۱۰۰	۳۰	KMM5
۷۰	۷۰	۶۰	۶۰	KES1۰

MIC= Minimum Inhibitory Concentration

MBC= Minimum Bactericidal Concentration

بحث

در این پژوهش RAPD-PCR به طور موفقیت آمیزی تنوع ژنتیکی سویه‌های مختلف *L. plantarum* جدا شده از مواد غذایی را نشان داد. به علاوه در مطالعات پیشین تکنیک RAPD-PCR به عنوان یک ابزار قدرتمند برای بررسی تمایز درون گونه‌های سویه‌های مختلف باکتریایی معرفی شد. دی کانکو و همکاران (۲۰۱۰)، جهت بررسی تنوع ژنتیکی ۷۲ جدایه *L. plantarum* که از میوه‌ها و سبزیجات مختلف جدا شده بودند از روش‌های فنوتایپینگ (سیستم بیولوژی) و ژنوتایپینگ (RAPD-PCR) و AFLP استفاده کردند. نتایج نشان داد که روش‌های مولکولی مثل RAPD-PCR و AFLP برای تعیین تمایز

درون گونه‌ای در بین جدایه‌ها بهتر عمل می‌کنند (Di Cagno et al., 2010). ادسولوداهونسی و همکاران (۲۰۱۷) از روش‌های مختلف مولکولی شامل RFLP⁹، RAPD و PFGE¹⁰ جهت تعیین تفاوت‌های درون گونه-ای سویه‌های مختلف *L. plantarum* جدا شده از سه نوع غذای تخمیری نیجریه‌ای استفاده نمودند. آن‌ها هر سه روش را در تعیین تمایز بین گونه‌ای موفقیت آمیز گزارش کردند (Adesulu-Dahunsi et al., 2017). تفویضی و همکاران (۱۳۹۰)، نیز تنوع ژنتیکی *lactobacillus* جدا شده از محصولات لبنی را توسط تکنیک RAPD-PCR مورد ارزیابی قرار دادند. این محققان کارایی ۲۰ آغازگر

9. Restriction Fragment Length Polymorphism

10. Pulsed-Field Gel Electrophoresis

مختلف را جهت تشخیص تنوع درون گونه‌های باکتری‌ها بررسی کردند و در نهایت روش‌های دقیق مولکولی را جایگزینی مناسب برای روش‌های وقت گیر و ابهام آمیز بیوشیمیایی دانستند. در مطالعه شعوری (۱۳۹۳) نیز به منظور شناسایی باکتری‌های اسیدلاکتیک جدا شده از پنیر لیقوان و چال ابتدا از PCR مبتنی بر تکثیر جایگاه ژنی 16srRNA استفاده شد. سپس به منظور بررسی تنوع درون گونه‌های سویه‌های شناسایی شده از ۴ آغازگر در روش RAPD-PCR استفاده گردید. در مجموع این نتایج نشان می‌دهد که روش RAPD-PCR روشی موثر در شناسایی و غربال‌گری جدایه‌ها از طریق بررسی تفاوت‌های درون گونه‌ای و شناسایی در حد نژاد می‌باشد و در مقایسه با روش‌های بیوشیمیایی نیاز به صرف وقت و هزینه کمتری دارد. از آنجا که صفات پروبیوتیکی وابسته به نژاد می‌باشند، بنابراین شناسایی و بررسی تنوع ژنتیکی آن‌ها از طریق آزمون‌های مولکولی امری ضروری به نظر می‌رسد.

عدم فعالیت همولتیک به عنوان یک پیش‌نیاز برای ایمنی سویه‌های پروبیوتیک منتخب به شمار می‌آید (FAO/WHO, ۲۰۰۲). در این مطالعه بررسی فعالیت همولتیک ده سویه *L. plantarum*، نشان داد که همه آن‌ها فاقد فعالیت همولیز سلول‌های خونی بودند. نتایج مشابهی توسط آرگوری و همکاران (۲۰۱۳) در مورد ۱۳ سویه *L. plantarum* جدا شده از زیتون تخمیری و همچنین آنگمو و همکاران (۲۰۱۶) در مورد کلیه باکتری‌های اسیدلاکتیک شامل *Lactobacillus* جدا شده از غذاها و نوشیدنی‌های تخمیری سنتی هند گزارش شد.

(Argyri et al., 2013; Angmo et al., 2016) مقاومت باکتری‌های پروبیوتیک در برابر طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها در طی درمان بیماران با آنتی‌بیوتیک‌های متعدد، می‌تواند در بهبود سریع‌تر بیماری به دلیل تشکیل و استقرار فلور میکروبی مطلوب در روده مفید باشد. مطالعات بسیاری استفاده همزمان از پروبیوتیک‌ها در درمان اسهال همراه با آنتی‌بیوتیک‌ها را پیشنهاد کرده‌اند. بنابراین مقاومت سویه‌های پروبیوتیک در برابر برخی از

آنتی‌بیوتیک‌ها می‌تواند برای مقاصد پیش‌گیرانه و درمان عفونت‌های روده‌ای مورد استفاده قرار گیرد (Tambekar & Bhutada, 2010). از سویی دیگر خطرات بالقوه انتقال جانبی ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک موجود در باکتری‌های پروبیوتیک به باکتری‌های بیماری‌زا در روده موجب افزایش نگرانی شده است. بنابراین لازمه انتخاب سویه‌های پروبیوتیک فقدان ژن‌های قابل انتقال مقاومت به آنتی‌بیوتیک در آن‌ها است (دستورالعمل EFSA, ۲۰۱۲). از این رو نوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های *Lactobacillus* جدا شده از منابع مختلف قبل از استفاده در صنایع غذایی باید مشخص شود. اساساً الگوی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در باکتری‌ها به واسطه حضور ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک در ژنوم غیرکروموزومی یا پلاسمید است. علاوه بر این حضور این ژن‌ها در نواحی حفاظت شده ژنوم کروموزومی سویه‌های مختلف باکتری‌های اسید لاکتیک نیز گزارش شده است. در مطالعات پیشین به مقاومت ذاتی *Lactobacillus* در برابر آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی مانند استرپتومایسین، کانامایسین و جنتامایسین به دلیل فقدان سیتوکروم‌های ناقل الکترون اشاره شده است. علاوه بر این مقاومت به ونکومایسین در سویه‌های *Lactobacillus* به واسطه حضور اسید آمینه D-آلانین-D-لاکتات در پپتیدوگلیکان به جای D-آلانین-D-آلانین که مورد هدف آنتی‌بیوتیک است، می‌باشد. ژن‌های مقاومت به ونکومایسین نیز کروموزومی هستند و قابلیت انتقال به سویه‌های میکروبی دیگر را ندارند (Argyri et al., 2013). در مطالعات مختلف حضور ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین، جنتامایسین، کانامایسین، استرپتومایسین و ونکومایسین در ژنوم کروموزومی سویه‌های مختلف *L. plantarum* گزارش شده است (Rojo-Bezares et al., 2006; Guo et al., 2017). در این مطالعه رفتار نژادهای مختلف *L. plantarum* در برابر آنتی‌بیوتیک جنتامایسین متفاوت بود در حالی که همگی در برابر آنتی‌بیوتیک ونکومایسین مقاومت نشان دادند. بر

این اساس می‌توان اطمینان حاصل کرد که مقاومت آنتی-بیوتیک مشاهده شده در نژادهای مختلف *L. plantarum* از نوع ذاتی و کروموزومی بوده و امکان انتقال این ژن‌ها به سایر باکتری‌ها وجود ندارد.

با توجه به این که باکتری‌های پروبیوتیک اغلب همراه مواد غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند باید بتوانند برای رسیدن به روده و اعمال اثرات سلامتی بخش‌شان بر میزبان، به صورت زنده از معده عبور نمایند. بنابراین یکی از فاکتورهای مهم در انتخاب باکتری‌های اسیدلاکتیک به عنوان پروبیوتیک حفظ بقا در شرایط گوارشی از جمله شرایط اسیدی معده (pH پایین) می‌باشد (Dunne et al., 1999). سویه‌های مورد مطالعه در این پژوهش در محیط کشت مایع دارای pH=۳ در مقایسه pH=۲ از مقاومت بیشتری برخوردار بودند. همچنین در شرایط مذکور جمعیت سویه‌های KAO۸۰، ۴۵ KMC و KMC۳۷ نه تنها کاهش نیافت بلکه افزایش نشان داد.

توانایی باکتری‌های اسیدلاکتیک در تحمل شرایط اسیدی به سنتز ترکیبات پلی‌ساکاریدی مختلف که در حفاظت از غشای سلولی آن‌ها نقش دارد نسبت داده شده‌است. از سوی دیگر به نقش ترکیبات غذایی مانند پروتئین‌ها و همچنین ترکیبات موجود در شیر معده در محافظت از باکتری‌های پروبیوتیک در برابر اسیدکلریدریک معده اشاره شده است (Maragkoudakis et al., 2006). ساهادیوا (۲۰۱۱) و تورچی و همکاران (۲۰۱۳) نیز عنوان کردند که زنده‌مانی سویه‌های مختلف باکتری‌های اسیدلاکتیک تحت تاثیر pH قرار می‌گیرد و جمعیت باکتریایی در pH های ۲ و ۳ نسبت به pH=۷ به طور معناداری افت می‌کند (Sahadeva et al., 2011). همچنین نتایج مشابه‌ای در مورد زنده‌مانی سویه‌های *L. plantarum* جدا شده از کیمچی نوعی غذای تخمیری کره‌ای، در شرایط اسیدی معده در مطالعه لی و همکاران (۲۰۱۶) به دست آمد (Lee et al., 2016). به طوری که درصد زنده‌مانی این سویه پس از ۳ ساعت قرارگیری در معرض pH=۳، ۵۲/۵ و در pH=۲ به میزان ۵/۶۲ درصد گزارش شد. کاراسو و

همکاران (۲۰۱۰) نیز طیف زنده‌مانی سویه‌های *L. plantarum* جدا شده از سبزیجات تخمیری را به ترتیب در pH های ۲ و ۳ بین ۱۸-۳۶ درصد و ۵۸-۷۹ درصد گزارش کردند (Karasu et al., 2010). این نتایج حاکی از مقاومت بالای سویه‌های *L. plantarum* در مطالعه حاضر نسبت به پژوهش‌های پیشین بود. علت تفاوت مشاهده شده در بین نژادهای مختلف در این مطالعه و دیگر پژوهش‌ها به دلیل تفاوت نژادی سویه‌های *L. plantarum* و تاثیر منشا جداسازی آن‌ها می‌باشد. مقاومت بالای نژادهای مختلف *L. plantarum* نسبت به سایر سویه‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک در مطالعات دیگر گزارش شده است. به عنوان مثال احمدی و همکاران (۱۳۹۵) در مطالعه‌ای ویژگی پروبیوتیکی باکتری‌های اسیدلاکتیک جدا شده از زیتون تخمیری را ارزیابی کردند. این محققان میزان افت جمعیت نژادهای مختلف *L. plantarum* را پس از قرارگیری در معرض pH=۲/۵ را تنها یک سیکل لگاریتمی گزارش کردند. در حالی که دیگر نژادهای مختلف *L. brevis* و *P. ethanolidurans* به ترتیب سه و چهار سیکل لگاریتمی کاهش نشان دادند.

اسیدهای صفراوی از کلسترول در کبد سنتز می‌شوند و سپس از کیسه صفرا به فرم کنژوگه به دوازدهه ترشح می‌گردد، بنابراین غلظت آن در روده بین ۰/۳ تا ۰/۵ درصد است. اثر ضد میکروبی نمک‌های صفراوی علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی حتی در غلظت‌های پایین به اثبات رسیده‌است (Dunne et al., 1999). گلیند و همکاران (۱۹۸۴) غلظت ۰/۳ درصد نمک صفراوی را به عنوان غلظت بحرانی برای ردیابی سویه‌های میکروبی مقاوم در برابر صفرا معرفی کردند (Gilliland et al., 1984).

این نتایج نشان داد که همه سویه‌های *L. plantarum* در این مطالعه نسبت به سایر گونه‌های پروبیوتیک شناخته شده *lactobacillus* در دیگر تحقیقات در برابر اسیدهای صفراوی مقاوم‌تر بودند. گایو و همکاران (۲۰۱۲) در

L. مطالعه‌ای مشابه زنده‌مانی نژادهای مختلف *L. plantarum* جدا شده از دو نوع غذای تخمیری چین را ۷/۳۲-۲/۲ درصد گزارش کردند (گایو و همکاران، ۲۰۱۲). همچنین لی و همکاران (۲۰۱۶) نرخ زنده‌مانی دو جدایه *L. plantarum* و *Leu. Mesenteroides* جدا شده از کیمچی در حضور ۰/۳ درصد نمک صفراوی را به ترتیب ۵۸/۵۳ درصد و ۴۰/۳۱ درصد تعیین کردند (Lee et al., 2016). احمدی و همکاران (۱۳۹۵) در بررسی قابلیت رشد نژادهای مختلف لاکتیکی حاصل از زیتون تخمیری در حضور غلظت‌های بالای نمک صفراوی (۶-۱ درصد) در محیط کشت MRS آگاردار، نژادی از *L. plantarum* را به عنوان مقاوم‌ترین سویه در برابر نمک صفراوی معرفی کردند. در پژوهشی دیگر کاراسو و همکاران (۲۰۱۰) بیان کردند که مقاومت بسیاری از باکتری‌های اسیدلاکتیک در برابر نمک صفراوی به توانایی هیدرولیز نمک صفراوی و در نتیجه کاهش اثر بازدارندگی آن مربوط می‌شود (Karasu et al., 2010). بسیاری از باکتری‌های اسیدلاکتیک قادرند آنزیم هیدرولیز کننده نمک صفراوی را ترشح نمایند و نمک صفراوی کنژوگه را به فرم غیرکنژوگه و اسیدآمینه (گلايسين و تائورين) در آورند. با توجه به این که مقادیر بالای نمک صفراوی به فرم غیرکنژوگه می‌تواند برای سلامت افراد مشکل آفرین باشد، از این رو هنوز اثرات مطلوب هیدرولیز نمک صفراوی باکتری‌های پروبیوتیک مورد سوال و تردید است. با این حال غالب باکتری‌های پروبیوتیک متعلق به دو جنس *Lactobacillus* و *Bifidobacteria* قادر به دهیدروکسیله کردن نمک صفراوی غیرکنژوگه نیستند. بنابراین بخش اعظم محصولات حاصل از هیدرولیز نمک صفراوی ممکن است که در مدفوع رسوب کرده و دفع گردد (Thomas et al., 2000). به علاوه دوتوت و همکاران (۱۹۹۸) و گانزل و همکاران (۱۹۹۹)، به نقش ترکیبات غذایی و ترکیبات محیط کشت در محافظت و افزایش مقاومت سویه‌های باکتریایی در برابر نمک صفراوی اشاره نموده‌اند (Du Toit et al., 1998).

Gänzle et al., 1999). در مطالعه آرگری و همکاران (۲۰۱۳) نیز ۱۲ گونه مختلف *Lactobacillus* شامل ۵ سویه *L. plantarum* و ۷ سویه *L. pentosus* از قابلیت هیدرولیز جزئی نمک صفراوی برخوردار بودند. همچنین جمعیت سویه‌های باکتریایی مذکور پس قرار گرفتن در معرض ۰/۳ درصد نمک صفراوی به مدت ۴ ساعت کمتر از یک سیکل لگاریتمی کاهش یافت (Argyri et al., 2013).

فعالیت ضد میکروبی باکتری‌های پروبیوتیک از دیگر قابلیت‌های آن‌ها به شمار می‌آید که به توانایی آن‌ها در تولید متابولیت‌های ضد میکروبی مانند اسیدهای آلی، پراکسید هیدروژن، استون، دی استیل، اسیدهای چرب، پپتیدها و باکتریوسین‌ها مربوط می‌شود (Herreros et al., 2005). در این مطالعه روماند حاصل از سویه‌های *L. plantarum* جدا شده از مواد غذایی مختلف فعالیت ضدباکتریایی متفاوتی را در آزمون میکرودايلوشن در برابر باکتری‌های بیماری‌زا شامل *L. monocytogenes* و *E. coli* نشان دادند. بر این اساس سویه ۴۵ KMC جدا شده از پنیر کوزه بیشترین خاصیت بازدارندگی را علیه باکتری‌های بیماری‌زا مورد مطالعه نشان داد. تاهور و همکاران (۲۰۱۶) نیز در بررسی فعالیت ضدباکتریایی و ضد بیوفیلم سه جدایه لاکتیکی علیه باکتری‌های عامل بیماری‌های دهان و دندان به نتایج مشابه‌ای دست یافتند (Taheur et al., 2016). این محققان نیز فعالیت ضد میکروبی روماند فیلتر شده حاصل از سویه‌های مختلف لاکتیکی را علیه باکتری‌های بیماری‌زای گرم مثبت و گرم منفی در آزمون میکرودايلوشن به دلیل قابلیت آن‌ها در تولید متابولیت‌های ضد میکروبی مختلف، متفاوت ارزیابی کردند. به طور کلی نژادهای مختلف لاکتیکی این مطالعه از قابلیت مهارکنندگی بیشتری نسبت به سایر نژادهای مختلف لاکتیکی مطالعات مشابه مانند ابراهیمی و همکاران (۱۳۹۶) و خشایی و همکاران (۱۳۹۶) در برابر باکتری‌های بیماری‌زا برخوردار بودند. از سویی دیگر در مطالعه زاگو و همکاران (۲۰۱۱) هیچ یک از ۹۸ نژاد *L. plantarum* جدا شده از

پنیرهای ایتالیایی و آرژانتینی فعالیت بازدارندگی علیه باکتری‌های مذکور نشان دادند (Zago et al., 2011).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این پژوهش نشان داد که بین ۱۰ سویه *L. plantarum* جدا شده از منابع مختلف غذایی تنوع نژادی وجود دارد و دو جدایه KAO۶۴ و KAO۱۷ با منشا یکسان جدا شده از زیتون تخمیری در آزمون RAPD-PCR بیشترین شباهت را دارند. علاوه بر این ویژگی پروبیوتیکی سویه‌های *L. plantarum* در سطح نژاد متفاوت بوده و تا حدی به منشا غذایی جداسازی شده مربوط می‌شد. نتایج تست ایمنی نشان داد که همه نژادهای مختلف *L. plantarum*، گاما-همولتیک بودند و سلول‌های خونی را هیدرولیز نکردند. همچنین همه سویه‌ها از مقاومت ذاتی در برابر آنتی بیوتیک ونکومایسین برخوردار بودند و مقاومت آن‌ها در برابر سایر آنتی بیوتیک‌های رایج متفاوت بود. نتایج نشان داد که مقاومت همه سویه‌ها در برابر شرایط اسیدی $\text{pH} = 3$ بیشتر از ۲ $\text{pH} =$ بود. سویه‌های جدا شده از پنیر کوزه شامل KMC۳۷ و KMC۴۵ از بیشترین مقاومت در برابر اسید برخوردار بودند. از سوی دیگر مقاومت در برابر ۰/۳ درصد نمک صفراوی نشان داد که اختلاف معناداری از این نظر بین سویه‌های جدا شده از زیتون تخمیری وجود ندارد و سویه ۵ KMM بیشترین مقاومت را داشت. به علاوه فعالیت ضد میکروبی سویه‌ها در برابر باکتری‌های بیماری‌زای گرم مثبت *L. monocytogenes* و گرم منفی *E. coli* متفاوت بود و بیشترین فعالیت ضدباکتریایی به سویه KMC۴۵ تعلق داشت. بنابراین با توجه به هدف مورد نظر می‌توان از هریک از سویه‌های *L. plantarum* به عنوان کشت پروبیوتیک در صنایع غذایی یا دارویی استفاده نمود.

منابع

۱. ابراهیمی، مریم. (۱۳۹۶). ارزیابی توانایی تولید باکتریوسین توسط آغازگرهای لاکتیکی جدا شده از برخی

محصولات تخمیری سنتی براساس روش‌های آزمایشگاهی و بیوانفورماتیکی. رساله دکتری. دانشکده صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. ص ۱۵۸.

۲. احمدی، زهرا. (۱۳۹۵). جداسازی و شناسایی فلور لاکتیکی غالب زیتون تخمیری وارسته زرد و فیشمی و استفاده از آنها در تولید زیتون فرآوری شده. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشکده صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. ص ۱۲۵.

۳. تفویضی، فرزانه؛ تاج آبادی ابراهیمی، مریم؛ حیدری نصرآبادی، میترا؛ بهرامی، هدی. (۱۳۹۰). بررسی تنوع ژنتیکی لاکتوباسیل‌های جدا شده از محصولات لبنی سنتی ایران توسط RAPD-PCR. تازه‌های بیوتکنولوژی سلولی و مولکولی. ۱۱(۳)، ۳۳-۴۲.

۴. خشایی، مریم؛ صادقی، علیرضا؛ خمیری، مرتضی؛ کاشانی نژاد، مهدی؛ صادقی ماهونک، علیرضا. (۱۳۹۶). ارزیابی خواص ضد میکروبی پدیوکوکوس استیلیسی جدا شده از خمیرترش آرد کامل جو. مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران. ۱۲(۳): ص ۸۹-۹۸.

۵. شعوری، سیمین. (۱۳۹۲). ارزیابی ویژگی‌های پروبیوتیکی و آنتاگونیستی برخی از باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از پنیر ليقوان و چال. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشکده صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. ص ۱۱۵.

۶. محمودی، ماندانا. (۱۳۹۷). بررسی ویژگی ضدسرطانی و سایر ویژگی‌های پروبیوتیکی باکتری‌های لاکتیک اسید جدا شده از فراورده‌های لبنی تخمیری سنتی. رساله دکتری. دانشکده صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. ص ۱۶۵.

7. Adesulu-Dahunsi, A. T., Sanni, A. I., Jeyaram, K., & Banwo, K. (2017). Genetic diversity of *Lactobacillus plantarum* strains from some indigenous fermented foods in Nigeria. LWT - Food Sci Technol, 82, 199-206.

8. Angmo, K., Kumari, A., & Bhalla, T. C. (2016). Probiotic characterization of lactic acid

- bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh. *LWT - Food Sci Technol*, 66, 428-435.
9. Argyri, A. A., Zoumpopoulou, G., Karatzas, K. A. G., Tsakalidou, E., Nychas, G. J. E., Panagou, E. Z., & Tassou, C. C. (2013). Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. *Food Microbiol*, 33(2), 282-291.
10. Blagojev, N., Škrinjar, M. A. R. I. J. A., Vesković-Moračanin, S. L. A. V. I. C. A., & Šošo, V. L. A. D. I. S. L. A. V. A. (2012). Control of mould growth and mycotoxin production by lactic acid bacteria metabolites. *Rom Biotechnol Lett*, 17(3), 7219-7226.
11. Bringel, F., Quénée, P., & Tailliez, P. (2001). Polyphasic investigation of the diversity within *Lactobacillus plantarum* related strains revealed two *L. plantarum* subgroups. *Systematic Applied Microbiol*, 24(4), 561-571.
12. Di Cagno, R., Minervini, G., Sgarbi, E., Lazzi, C., Bernini, V., Neviani, E., & Gobbetti, M. (2010). Comparison of phenotypic (Biolog System) and genotypic (random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction, RAPD-PCR, and amplified fragment length polymorphism, AFLP) methods for typing *Lactobacillus plantarum* isolates from raw vegetables and fruits. *Int J Food Microbiol*, 143(3), 246-253.
13. Du Toit, M., Franz, C. M. A. P., Dicks, L. M. T., Schillinger, U., Haberer, P., Warlies, B., Ahrens, F & Holzapfel, W. H. (1998). Characterisation and selection of probiotic lactobacilli for a preliminary minipig feeding trial and their effect on serum cholesterol levels, faeces pH and faeces moisture content. *Int J Food Microbiol*, 40(1-2), 93-104.
14. Dunne, C., Murphy, L., Flynn, S., O'Mahony, L., O'Halloran, S., Feeney, M., Morrissey, D., Thornton, G., Fitzgerald, G., Daly, C., & Kiely, B. (1999). Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. In *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications* (pp. 279-292). Springer, Dordrecht.
15. EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) (2012) Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA J* 10(6):2740 [10 pp.] doi:10.2903/j.efsa.2012.2740.
16. FAO/WHO, 2002. Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food London, Ontario, Canada, April 30 and May 1, 2002.
17. Gänzle, M. G., Hertel, C., van der Vossen, J. M., & Hammes, W. P. (1999). Effect of bacteriocin-producing lactobacilli on the survival of *Escherichia coli* and *Listeria* in a dynamic model of the stomach and the small intestine. *Int J Food Microbiol*, 48(1), 21-35.
18. Gao, Y., Li, D., Liu, S., & Liu, Y. (2012). Probiotic potential of *L. sake* C2 isolated from traditional Chinese fermented cabbage. *Eur Food Res Technol*, 234(1), 45-51.
19. Garde, S., Gómez-Torres, N., Hernández, M., & Ávila, M. (2014). Susceptibility of *Clostridium perfringens* to antimicrobials produced by lactic acid bacteria: Reuterin and nisin. *Food Control*, 44, 22-25.
20. Gilliland, S. E., Staley, T. E., & Bush, L. J. (1984). Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. *J Dairy Sci*, 67(12), 3045-3051.
21. Guo, H., Pan, L., Li, L., Lu, J., Kwok, L., Menghe, B., Zhang, W. (2017). Characterization of antibiotic resistance genes from *Lactobacillus* isolated from traditional dairy products. *J Food Sci*, 82(3), 724-730.
22. Hartmann, H. A., Wilke, T., & Erdmann, R. (2011). Efficacy of bacteriocin-containing cell-free culture supernatants from lactic acid bacteria to control *Listeria monocytogenes* in food. *Int J Food Microbiol*, 146(2), 192-199.
23. Herreros, M. A., Sandoval, H., González, L., Castro, J. M., Fresno, J. M., & Tornadijo, M. E. (2005). Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). *Food Microbiol*, 22(5), 455-459.
24. Karasu, N., Şimşek, Ö., & Çon, A. H.

- (2010). Technological and probiotic characteristics of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from traditionally produced fermented vegetables. *Annals Microbiol*, 60(2), 227-234.
25. Kleerebezem, M., Boekhorst, J., van Kranenburg, R., Molenaar, D., Kuipers, O. P., Leer, R. & Stiekema, W. (2003). Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proc Natl Acad Sci*, 100(4), 1990-1995.
26. Lee, K. W., Shim, J. M., Park, S. K., Heo, H. J., Kim, H. J., Ham, K. S., & Kim, J. H. (2016). Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potentials from kimchi, traditional Korean fermented vegetable. *LWT-Food Sci and Technol*, 71, 130-137.
27. Lee, Y. K., & Salminen, S. (2009). *Handbook of probiotics and prebiotics*. John Wiley & Sons.
28. Maragkoudakis, P. A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B., & Tsakalidou, E. (2006). Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *Int Dairy J*, 16(3), 189-199.
29. Mättö, J., Alakomi, H. L., Vaari, A., Virkajärvi, I., & Saarela, M. (2006). Influence of processing conditions on *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* functionality with a special focus on acid tolerance and factors affecting it. *Int Dairy J*, 16(9), 1029-1037.
30. Rojo-Bezares, B., Sáenz, Y., Poeta, P., Zarazaga, M., Ruiz-Larrea, F., & Torres, C. (2006). Assessment of antibiotic susceptibility within lactic acid bacteria strains isolated from wine. *Int J Food Microbiol*, 111(3), 234-240.
31. Sahadeva, R. P. K., Leong, S. F., Chua, K. H., Tan, C. H., Chan, H. Y., Tong, E. V., Wong, S.Y.W & Chan, H. K. (2011). Survival of commercial probiotic strains to pH and bile. *Int Food Res J*, 18(4).
32. Taheur, F. B., Kouidhi, B., Fdhila, K., Elabed, H., Slama, R. B., Mahdouani, K., Bakhrouf, A & Chaieb, K. (2016). Anti-bacterial and anti-biofilm activity of probiotic bacteria against oral pathogens. *Microb Pathog*, 97, 213-220.
33. Tambekar, D. H., & Bhutada, S. A. (2010). An evaluation of probiotic potential of *Lactobacillus* sp. from milk of domestic animals and commercial available probiotic preparations in prevention of enteric bacterial infections. *Recent Res Sci Technol*, 2(10).
34. Tamime, A. Y., Saarela, M. A. K. S., Sondergaard, A. K., Mistry, V. V., & Shah, N. P. (2005). Production and maintenance of viability of probiotic microorganisms in dairy products. *Probiotic Dairy Products*, 3, 39-63.
35. Thomas, L. A., Veysey, M. J., Bathgate, T., King, A., French, G., Smeeton, N. C., Murphy, G.M. & Dowling, R. H. (2000). Mechanism for the transit-induced increase in colonic deoxycholic acid formation in cholesterol cholelithiasis. *Gastroenterol*, 119(3), 806-815.
36. Turchi, B., Mancini, S., Fratini, F., Pedonese, F., Nuvoloni, R., Bertelloni, F., Ebani, V.V. & Cerri, D. (2013). Preliminary evaluation of probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Italian food products. *World J Microb Biotech*, 29(10), 1913-1922.
37. Vasiee, A., Behbahani, B. A., Yazdi, F. T., Mortazavi, S. A., & Noorbakhsh, H. (2018). Diversity and Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria Isolated from Horreh, a Traditional Iranian Fermented Food. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 10(2), 258-268.
38. Winslow, C. E., Broadhurst, J., Buchanan, R. E., Krumwiede, C., Rogers, L. A., & Smith, G. H. (1917). The Families and Genera of the Bacteria: Preliminary Report of the Committee of the Society of American Bacteriologists on Characterization and Classification of Bacterial Types. *J Bacteriol*, 2(5), 505-66.
39. Zago, M., Fornasari, M. E., Carminati, D., Burns, P., Suàrez, V., Vinderola, G & Giraffa, G. (2011). Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. *Food Microbiol*, 28(5), 1033-1040.

Evaluation of probiotic characteristics and intra-species diversity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from different foods by RAPD-PCR

Shahrampour D^{1*}, Khomeiri M², Kashiri M³, Razavi SMA⁴

1. Ph.D. graduate of Food Microbiology, Department of Food Science and Technology, Gorgan

University of Agricultural Sciences and Natural Resources.

2,3. Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources.

4. Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad.

*Corresponding author: shahrampour@gau.ac.ir

Received: 1 December 2020

Accepted: 1 March 2021

Abstract

This study aimed to evaluate the intra-species diversity of 10 strains of *Lactobacillus plantarum* isolated from different foods including fermented olives, jar cheese, camel milk, and sourdough, using the RAPD-PCR method and also to compare their probiotic potential. The results showed that different banding patterns were created by three types of primers for different strains and according to the similarity matrix drawn by NTSYS software based on Jacard coefficient, a total of 10 strains were divided into two main branches and seven subgroups. The two strains of KAO 17 and KAO 64 isolated from fermented olives were most similar. In addition, the probiotic properties of *L. plantarum* isolates were evaluated differently at strain levels. The results of immunoassay showed that all different strains of *L. plantarum* were gamma-hemolytic and resistant to vancomycin and their resistance to other common antibiotics was different. Strains isolated from jar cheese containing KMC 37 and KMC 45 had the highest acid resistance. On the other hand, resistance to 0.3% of bile salt showed that there was no significant difference in this regard between the strains isolated from fermented olives, and the KMM 5 strain had the highest resistance. In addition, the antimicrobial activity of the strains against gram-positive pathogenic bacteria *L. monocytogenes* and gram-negative *E. coli* was different, and the highest antibacterial activity belonged to the KMC 45 strain. Therefore, according to the intended purpose, each of the *L. plantarum* strains can be suggested as a probiotic culture in the food or pharmaceutical industries.

Keywords: *L. plantarum*, RAPD-PCR, intra-species diversity, probiotic properties.

بررسی تاثیر آرد برنج بر زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پاراکازئی در ماست میوه‌ای و خواص کیفی آن به روش سطح پاسخ

فرناز نبی زاده^{۱*}، پانید زین ساز^۲

۱. گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد مهاباد، دانشگاه آزاد اسلامی، مهاباد، ایران.

۲. دانش آموخته کارشناسی ارشد مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد مهاباد، دانشگاه آزاد اسلامی، مهاباد، ایران.

*نویسنده مسئول: fnabizadeh360@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۱/۰۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۰۴

چکیده

در این مطالعه تاثیر آرد برنج بر زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پاراکازئی و خواص کیفی ماست میوه‌ای با روش سطح پاسخ طی نگهداری بررسی شد. بدین منظور آرد برنج در سه سطح ۰، ۱/۵ و ۳ درصد به شیر اضافه و در دمای ۸۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه پاستوریزه شد. پس از سرد شدن، در دمای ۴۳ درجه سلسیوس استارتر ماست و باکتری پروبیوتیک به شیر تلقیح و به ظروف استریل حاوی ۱۵ درصد پوره هلو منتقل شد و تا رسیدن pH نمونه‌ها به 4.6 ± 0.1 در دمای ۴۲ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند. سپس تا ۴ درجه سلسیوس سرد و در همین دما تا روز آزمایش نگهداری شدند. زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک، pH، مقادیر رطوبت، پس دادن آب، اسیدیته، ویسکوزیته ظاهری و ویژگی‌های حسی نمونه‌ها در سه دوره زمانی ۱، ۱۱ و ۲۱ روز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آنالیز واریانس نشان داد با افزایش مقدار آرد برنج تعداد باکتری پروبیوتیک افزایش و طی نگهداری کاهش یافت ($p < 0.05$). افزودن آرد برنج pH، درصد رطوبت و پس دادن آب را کاهش و اسیدیته و ویسکوزیته ظاهری را افزایش داد ($p < 0.05$). طی نگهداری، pH و رطوبت کاهش و پس دادن آب افزایش یافت ($p < 0.05$). در ارزیابی حسی نمونه‌ها، افزایش مقدار آرد امتیاز قوام افزایش یافت ($p < 0.05$). امتیاز طعم نمونه‌ها با گذشت زمان کاهش یافت ($p < 0.05$). در نهایت مقدار آرد برنج ۳ درصد و زمان نگهداری ۷ روز به عنوان شرایط بهینه تعریف گردید.

کلید واژه‌ها: آرد برنج، باکتری لاکتوباسیلوس پاراکازئی، روش سطح پاسخ، ماست میوه‌ای.

مقدمه

نمک‌های صفراوی، قدرت چسبندگی به سلول‌های مخاط روده، مهار فعالیت باکتری‌ها و تولید مواد مضر میکروبی به اثبات رسیده است (Mirlohi et al., 2008). پروبیوتیک‌ها به عنوان ترکیبات انتخابی تخمیر شونده تعریف می‌شوند که باعث تغییر در ترکیب و یا فعالیت میکروفلور روده شده که می‌تواند برای سلامتی میزبان مفید باشد (Gibson et al., 2004). سین‌بیوتیک عبارتست از ترکیبی از پروبیوتیک و پروبیوتیک که اثرات مفیدی به واسطه بهبود بقا و تکثیر میکروبی‌های فلور روده، افزایش رشد یا فعال سازی متابولیسم باکتری‌ها در میزبان ایجاد می‌کند

پروبیوتیک‌ها به عنوان میکروارگانیسم‌های زنده‌ای که در مقادیر کافی موجب سلامتی در مصرف‌کننده می‌شوند، معرفی شده‌اند (Yeganehzad et al., 2007). در بین فراورده‌های شیری تخمیری، ماست مهم‌ترین حامل باکتری‌های پروبیوتیک و عامل انتقال آن به مصرف‌کننده می‌باشد (Mohebbi and Ghodusi, 2008., Zacarchenco and Massaguer – Roig, 2006). لاکتوباسیلوس پاراکازئی یکی از انواع پروبیوتیک‌ها است که کاربرد وسیعی در فراورده‌های لبنی دارد. در مطالعات متعدد اثرات سودمند آن از جمله مقاومت به اسید معده و

لاکتوباسیلوس بولگاریکوس در نمونه‌های دوغ محلی ترکیه تولید شده با ادویه‌های نعنای، آویشن و سیر و نمونه‌های شاهد در طول زمان نگهداری به صورت معنی‌داری کاهش می‌یابد ولی اثر ادویه‌های مذکور روی تعداد باکتری‌های آغازگر در مقایسه با نمونه شاهد معنی‌دار نمی‌باشد (Sismek et al., 2007). چاچولی و همکاران (2013) گزارش کردند که غنی سازی ماست بدون چربی و پرچرب با عصاره و دانه انگور تأثیری بر زنده مانگی لاکتوباسیلوس ها نداشت (Chouchali et al., 2013). نژاد رزمجوی اخگر و زمردی (۱۳۹۹) زنده مانگی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم لاکتیس را در ماست تهیه شده از شیر بز مطالعه کردند. به این نتیجه رسیدند که شیر بز حامل خوبی برای پروبیوتیک ها بوده و خواص حسی ماست تهیه شده از آن نیز بهبود می یابد (نژاد رزمجوی اخگر و زمردی، ۱۳۹۹). نیفل و همکاران (1993) نشان دادند که افزودن عوامل محرک رشد (اسیدهای آمینه، والین، گلیسین و هیستدین) به رشد پروبیوتیک‌ها در ماست کمک می‌کند (Kneifel et al., 1993). لوکاس و همکاران (2004) گزارش کردند که در صورت استفاده از هیدرولیزهای پروتئینی آب پنیر و کارزین رشد گونه‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس /اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس پاراکازئی کاهش یافته، و رشد استرپتوکوکوس ترموفیلوس تسریع می‌شود و اسید-سازی حین تخمیر افزایش می‌یابد (Lucas et al., 2004). تأثیر فیبرسیب و انگور در غلظت‌های مختلف بر قابلیت زنده‌مانی لاکتوباسیلوس /اسیدوفیلوس و خواص فیزیکیوشیمیایی، حسی و رئولوژیکی ماست سین‌بیوتیک بررسی شده و نتایج نشان داده که تعداد لاکتوباسیلوس /اسیدوفیلوس با افزایش درصد فیبر افزایش می‌یابد. همچنین افزایش مقدار فیبر موجب افزایش گرانبوی، کاهش هم‌افزایی و کاهش امتیاز رنگ و طعم نسبت به نمونه‌های فاقد فیبر گردیده است (زمردی و همکاران، ۱۳۹۴). به جهت بقا بهتر و رشد و فعالیت بیشتر باکتری‌های پروبیوتیک از یک‌سو و بهبود ویژگی‌های تکنولوژیکی

(Gibson and Roberfroid, 1995). در مطالعات بسیاری به اثر مواد مغذی مختلف به عنوان پروبیوتیک بر زنده‌مانی باکتری‌های آغازگر و پروبیوتیک‌ها در محصولات لبنی پرداخته شده است. سالیح و همکاران (۲۰۱۹) خواص فیزیکیوشیمیایی، میکروبیولوژیکی و حسی ماست فرآوری شده با آرد برنج را مطالعه کردند. این مطالعه با هدف بهبود ارزش تغذیه‌ای و بافت ماست با افزودن غلظت‌های متفاوت آرد برنج انجام شده است. آرد برنج با غلظت‌های ۰، ۲، ۴ و ۶ درصد به نمونه‌های ماست اضافه گردیده است. بیشترین مقدار رطوبت مربوط به نمونه کنترل و کمترین مربوط به نمونه حاوی ۶ درصد آرد برنج بوده است. محتوای پروتئینی، چربی و مقدار خاکستر نمونه‌های ماست با افزایش درصد آرد برنج افزایش یافته است. ویسکوزیته و پس دادن آب با افزایش آرد برنج کاهش یافته است. آرد برنج تأثیر معنی‌دار بر شمارش کلی باکتری‌ها، کپک و مخمر نداشته است. در ارزیابی حسی نمونه ماست حاوی ۴ درصد آرد برنج بیشترین امتیاز را دریافت کرده است (Salih et al., 2019). کاواز و همکاران (۲۰۱۶) برخی خواص ماست تولید شده از شیر شتر غنی شده با آرد برنج و پودر شیر پس چرخ را طی ۱۰ روز نگهداری مطالعه کردند. در این مطالعه سه نمونه ماست حاوی ۹ درصد پودر شیر پس چرخ، حاوی ۹ درصد آرد برنج و حاوی ۴/۵ درصد پودر شیر پس چرخ و ۴/۵ درصد آرد برنج تهیه شده است. در این مطالعه مشخص شده است که شمارش استرپتوکوکوس ترموفیلوس در مقایسه با لاکتوباسیلوس بولگاریکوس بالاتر بوده است و در ارزیابی حسی طعم آرد برنج در نمونه‌های محتوی آن، تا روز ۵ در دهان احساس نشده است. ویسکوزیته نمونه‌های حاوی ۹ درصد آرد برنج تا روز ۵ افزایش یافته و در نمونه‌های محتوی آرد برنج و پودر شیر پس چرخ طی نگهداری افزایش یافته است. مقدار اسیدیته و pH نمونه‌های ماست طی نگهداری به ترتیب افزایش و کاهش یافته است (Kavaza et al., 2016). در مطالعه‌ای نشان داده شده است که تعداد استرپتوکوکوس ترموفیلوس و

X11 (کشت مخلوط استریپتوکوکوس ترموفیلوس و لاکتوباسیلوس دلبروکی زیر گونه بولگاریکوس) و باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پاراکازئی زیر گونه پاراکازئی L. Casei 431 (بصورت خشک شده انجمادی از شرکت کریستن هانسن دانمارک) تهیه شد. برنج با آسیاب برقی (ناسیونال ساخت ایران) آسیاب شد و سپس جهت بدست آوردن ذرات با اندازه یکنواخت از الک با مش ۶۰ عبور داده شد. مشخصات شیر کامل، آرد برنج و پوره هلو در جدول ۱ آورده شده است.

ماست پروبیوتیک از سوی دیگر، ترکیبات پروبیوتیکی به فرمولاسیون آن اضافه می‌شود. هدف از این تحقیق بررسی اثر آرد برنج به عنوان پروبیوتیک بر روی ماست پروبیوتیک حاوی لاکتوباسیلوس پاراکازئی بوده است.

روش کار

مواد

شیر خام کامل گاو از دامداری در شهر ارومیه، پوره هلو بصورت استریل از شرکت ترش نارین، برنج هاشمی کشت دوم از فروشگاه محلی ارومیه، استارتر تجاری ماست YC-

جدول ۱- مشخصات شیر کامل، آرد برنج و پوره هلو

چربی (%)	پروتئین (%)	دانسیته	اسیدیته(درصد)	pH	ماده خشک (درصد)	بریکس	خاکستر
۲/۶۰±۳/۳۴	±۰/۶۳ ۰/۱۰۵	۱/۰±۰/۰۳۰/۰۰	(D) ۲/۰±۵/۱۴	±۶۴/۶ ۰/۰۲	۱۲/۰±۶۹/۰۲	-	-
۰±۱/۴	۷/۰±۵/۴/۲	-	-	-	۹۱/۰±۷۸/۰۵	-	۰/۰±۶۶/۱۷
-	-	-	۱/۰±۳/۰۷	۰±۴/۵	-	۱±۲۹	-

تهیه ماست

ابتدا شیر تا دمای ۶۰ درجه سلسیوس گرم شد. سپس مطابق طرح آزمایشی (جدول ۲) مقدار لازم از آرد برنج به شیر اضافه گردید و مدت یک دقیقه در مخلوط‌کن بطور کامل مخلوط شد. سپس در دمای ۸۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه پاستوریزه گردید و تا ۴۳ درجه سلسیوس سرد و در همین دما استارتر ماست (کشت مخلوط استریپتوکوکوس ترموفیلوس و لاکتوباسیلوس دلبروکی زیر گونه بولگاریکوس) و باکتری لاکتوباسیلوس پاراکازئی

مطابق دستورالعمل شرکت تولید کننده تلقیح شد. پس از مخلوط شدن به ظروف ماست بندی استریل حاوی ۱۵ درصد پوره هلو منتقل شد. نمونه ها در گرمخانه با دمای ۴۲ درجه سلسیوس با کنترل مداوم pH نگهداری شدند. به محض رسیدن pH به ۰/۱ ± ۴/۶ نمونه‌ها تا ۴ درجه سلسیوس سرد و در یخچال ۱ ± ۴ درجه سلسیوس تا روز آزمایش نگهداری شدند.

جدول ۲ طراحی آزمون ها بر اساس مدل (Central Composite Face-centered Design) و دو متغیر مستقل (آرد برنج و زمان

نگهداری)

ردیف	آرد برنج	زمان نگهداری	آرد برنج (درصد)	زمان نگهداری (روز)
۱	-۱	-۱	۰	۱
۲	۱	-۱	۳	۱
۳	-۱	۱	۰	۲۱
۴	۱	۱	۳	۲۱
۵	۰	-۱	۱/۵	۱

۲۱	۱/۵	۱	۰	۶
۱۱	۰	۰	-۱	۷
۱۱	۳	۰	۱	۸
۱۱	۱/۵	۰	۰	۹
۱۱	۱/۵	۰	۰	۱۰
۱۱	۱/۵	۰	۰	۱۱
۱۱	۱/۵	۰	۰	۱۲
۱۱	۱/۵	۰	۰	۱۳

pH به ۸/۳ و رطوبت نمونه‌ها به روش خشک کردن در آون معمولی در دمای 103 ± 2 درجه سلسیوس تعیین شد (AOAC, 1997).

ارزیابی حسی

نمونه‌های ماست بصورت تصادفی کدبندی شده و توسط ۲۰ نفر ارزیاب آشنا با محصول از میان کارکنان و دانشجویان گروه صنایع غذایی بر اساس روش هدونیک ۵ نقطه‌ای (۵: مطلوب‌ترین و ۱: نامطلوب‌ترین) مورد ارزیابی طعم و قوام قرار گرفت (نبی زاده و همکاران، ۱۳۹۲).

تجزیه و تحلیل آماری

در این تحقیق از روش سطح پاسخ (Response Surface Methodology)، طرح مرکب مرکزی مرکز وجه (Central Composite Face-centered Design) استفاده شد. روش سطح پاسخ جهت بررسی متغیرهای متعدد مستقل که بر روی متغیر وابسته تأثیر می‌گذارند، مفید می‌باشد و یک رویه آماری و ریاضی را جهت مطالعه ارتباط میان پاسخ‌ها و تعدادی فاکتور تأثیر گذار فراهم می‌نماید. روش سطح پاسخ دارای مزایای متعددی می‌باشد. برخی از این مزایا عبارتند از: طراحی آزمایشات با حداقل تیمار و دستیابی به اطلاعات در کوتاهترین زمان ممکن. با استفاده از تجزیه و تحلیل مدل، مقدار ضریب همبستگی و عدم برازش تعیین می‌شود. سپس توسط نرم افزار و با استفاده از این داده‌ها شرایط بهینه مشخص می‌گردد (دهقان سکاچایی و همکاران، ۱۳۹۴). در این پژوهش متغیرهای مستقل شامل میزان آرد برنج در سه سطح (۰، ۱/۵ و ۳ درصد) و زمان نگهداری در سه دوره (۱، ۱۱ و

شمارش لاکتوباسیلوس پاراکازئی

برای تهیه رقت اول مقدار ۱ گرم نمونه در نه میلی لیتر سرم فیزیولوژیک ۰/۹ درصد استریل رقیق شد. رقت‌های بعدی با افزودن ۱ میلی لیتر از رقت قبلی در ۹ میلی لیتر سرم فیزیولوژیک ۰/۹ درصد استریل تهیه شد. برای شمارش لاکتوباسیلوس پاراکازئی در نمونه‌های ماست، از محیط MRS agar حاوی ونکومایسین به مقدار ۱۰ mg/Lit و روش پورپلیت استفاده گردید. شمارش بعد از ۷۲ ساعت گرم خانه‌گذاری بصورت بی‌هوازی در ۳۷ درجه سلسیوس انجام شد (Aryana and MC Grew, 2007).

سینرزیس

مقدار ۲۵ گرم نمونه ماست بروی کاغذ صافی در داخل کیف بروی ارلن مایر قرار گرفت و مقدار سرم جدا شده به مدت ۲ ساعت در دمای یخچال تعیین و به عنوان شاخص سینرزیس تعیین شد (Tamime et al., 1996).

ویسکوزیته ظاهری

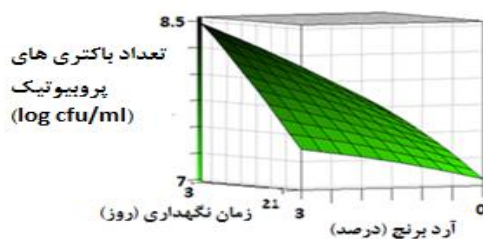
ویسکوزیته نمونه‌ها با استفاده از ویسکومتر بروکفیلد (DV-II+Pro, No.M/03-165-b0707) اندازه‌گیری شد. بدین منظور مقدار ۲۵۰ میلی لیتر نمونه و اسپندل شماره ۶۴ بکار رفت. ویسکوزیته ظاهری تمام نمونه‌ها در دمای 20 ± 1 درجه سلسیوس و سرعت ۳۰ rpm تعیین شد (قاسم پور و همکاران، ۲۰۱۲).

آزمایشات شیمیایی

pH نمونه‌ها با استفاده از pH متر دیجیتالی کالیبره شده، اسیدیته از طریق تیتراسیون با سود ۰/۱ نرمال تا رسیدن

با توجه به جدول آنالیز واریانس (جدول ۱) معادله نهایی دارای عدد F معنی دار و R^2 (ضریب تبیین) و R^2_{adj} (ضریب تبیین اصلاح شده) در حد قابل قبول است که نشان‌دهنده تطبیق داده‌ها با مدل می‌باشد. معادله پیشگویی‌کننده زیر برای تعداد لاکتوباسیلوس پاراکازئی نمونه‌های ماست با استفاده از برازش داده‌ها به دست آمد:

$$\text{Probiotic bacteria} = 7.57387 - 0.04101 * \text{TIME} + 0.035501 * \text{FLOUR} + 0.001054 * \text{TIME} * \text{TIME} - 0.040223 * \text{TIME} * \text{FLOUR} + 0.134988 * \text{FLOUR} * \text{FLOUR}$$



شکل ۱ تاثیر مقدار آرد برنج و زمان نگهداری بر تعداد باکتری لاکتوباسیلوس پاراکازئی

پس دادن آب نتایج آنالیز واریانس (جدول ۳) نشان داد تاثیر مقدار آرد و زمان نگهداری بر پس دادن آب نمونه‌ها معنی‌دار بود ($p < 0.05$). با افزایش مقدار آرد برنج درصد پس دادن آب نمونه‌ها کاهش و طی زمان نگهداری افزایش یافت (شکل ۲ الف). نمونه‌های شاهد در روز اول ۲۴/۷۴ درصد آب پس دادند در روز ۲۱ پس دادن آب در همین نمونه‌ها ۵۳/۰۳ درصد بود. در حالیکه مقدار پس دادن آب در نمونه‌های حاوی ۳ درصد آرد برنج در روز اول ۹/۴۵ درصد و در روز پایان ۳۲/۵۱ درصد بود. با توجه به جدول ۳ ضریب تبیین و ضریب تبیین اصلاح شده در حد قابل قبول بود. بنابراین معادله پیشگویی‌کننده سینترزیس نمونه‌های ماست به شرح زیر است:

$$\text{Syneresis} = 29.54366 - 0.414247 * \text{TIME} - 8.413332 * \text{FLOUR} + 0.063833 * \text{TIME} * \text{TIME} - 0.0882433 * \text{TIME} * \text{FLOUR} + 0.9854 * \text{FLOUR} * \text{FLOUR}$$

ویسکوزیته ظاهری

۲۱ روز) بودند. سطوح متغیرها و نمایش طراحی آزمون‌ها در جدول ۲ آمده است. هر فاکتور در طرح مرکب مرکزی مرکز وجه، در سه سطح مختلف (+۱، ۰، -۱) شامل دو نقطه محوری +α و -α و تکرار در نقطه مرکزی برای تخمین خطای آزمایش مطالعه می‌شود. نقاط محوری α را برابر یک در نظر بگیریم، نقاط محوری بر سطح مماس شده و طرح مرکب مرکزی مرکز وجه ایجاد می‌شود (احمدی قویدلان و امیری چایجان، ۱۳۹۵). در این پژوهش، تعداد نمونه‌های آزمایشی برابر ۱۳ عدد بود که در این میان ۵ آزمون تکرار در نقطه مرکزی بودند که از این نقاط برای تعیین خطای آزمایش استفاده شد. داده‌های به دست‌آمده توسط نرم افزار SAS 9.2.0 مدل سازی شده و شکل‌های سه‌بعدی این طرح (منحنی‌های سطح پاسخ) جهت بررسی رابطه میان پاسخ و متغیرهای مستقل رسم گردید. آنالیز رگرسیون با مدل درجه دوم زیر انجام گرفت:

$$y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum \beta_{ij} x_i x_j$$

که y پاسخ پیش بینی شده، β_0 ضریب ثابت، β_i اثر خطی، β_{ii} اثر مربعات و β_{ij} اثر متقابل متغیرها می‌باشند. معنی داری مدل‌های متفاوت با استفاده از آنالیز واریانس هر یک از پاسخ‌ها ارزیابی شد. ضرایب β ، ضرایب تبیین، عدم برازش، میانگین مربعات، اعداد P و F تعیین شد.

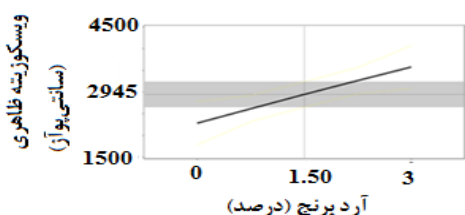
نتایج

شمارش لاکتوباسیلوس پاراکازئی

باتوجه به جدول تجزیه واریانس (جدول ۳) تاثیر مقدار آرد برنج و زمان نگهداری بر زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پاراکازئی معنی‌دار بود ($p < 0.05$). با افزایش مقدار آرد برنج تعداد باکتری‌ها افزایش یافت (شکل ۱). طی زمان نگهداری تعداد باکتری‌ها کاهش یافت ($p < 0.05$). بطوریکه بیشترین تعداد باکتری (۸/۵ سیکل لگاریتمی) مربوط به روز اول با ۳ درصد آرد برنج و کمترین تعداد باکتری (۷/۳۵ سیکل لگاریتمی) مربوط به نمونه شاهد در روز ۲۱ بود.

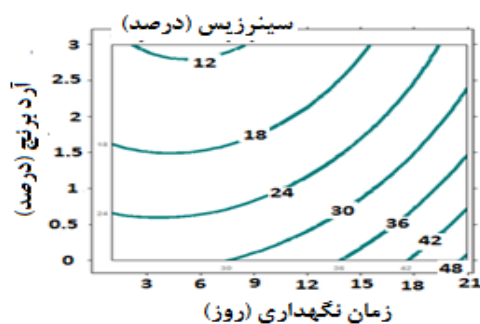
تبیین اصلاح شده در حد قابل قبول بود. بنابراین معادله پیشگویی‌کننده ویسکوزیته نمونه‌های ماست به شرح زیر است:

$$\text{Viscosity} = 1809.062 + 85.64144 * \text{TIME} + 5771.4496 * \text{FLOUR} - 3.867414 * \text{TIME} * \text{TIME} - 10.85 * \text{TIME} * \text{FLOUR} - 77.218391 * \text{FLOUR} * \text{FLOUR}$$



ب

نتایج آنالیز واریانس (جدول ۳) حاکی از تاثیر معنی‌دار مقدار آرد برنج بر ویسکوزیته نمونه‌ها بود ($p < 0.05$). شکل ۲ (ب) تاثیر مقدار آرد برنج را بر ویسکوزیته نمونه‌ها نشان می‌دهد. همانطورکه از شکل مشخص است ویسکوزیته نمونه‌ها با افزایش مقدار آرد افزایش یافت ($p < 0.05$). با توجه به جدول ۳ ضریب تبیین و ضریب



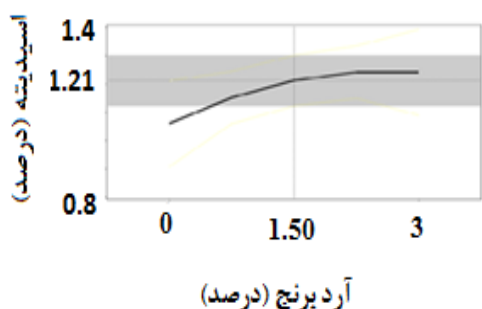
الف

شکل ۲- (الف) تاثیر مقدار آرد برنج و زمان نگهداری بر درصد پس دادن آب و (ب) تاثیر مقدار آرد برنج بر ویسکوزیته نمونه‌ها

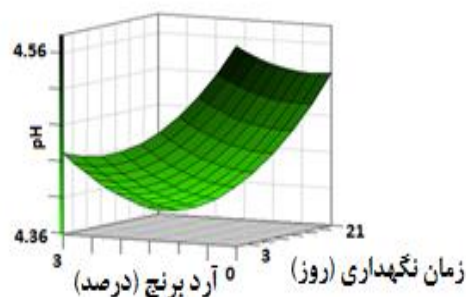
اصلاح شده در حد قابل قبول بود. بنابراین معادله پیشگویی‌کننده pH و اسیدیته نمونه‌های ماست به شرح زیر است:

$$\text{pH} = 4.585329 - 0.005094 * \text{TIME} - 0.109602 * \text{FLOUR} + 0.00011 * \text{TIME} * \text{TIME} - 0.000667 * \text{TIME} * \text{FLOUR} + 0.022682 * \text{FLOUR} * \text{FLOUR}$$

$$\text{Acidity} = 0.741299 + 0.045309 * \text{TIME} + 0.193776 * \text{FLOUR} - 0.001487 * \text{TIME} * \text{TIME} - 0.004636 * \text{TIME} * \text{FLOUR} - 0.02738 * \text{FLOUR} * \text{FLOUR}$$



آزمایشات شیمیایی مطابق نتایج آنالیز واریانس (جدول ۳) تاثیر زمان نگهداری و مقدار آرد برنج بر pH نمونه‌ها معنی‌دار بود ($p < 0.05$). همانطورکه در شکل ۳ (الف) مشخص است با افزایش مقدار آرد برنج و طی نگهداری pH نمونه‌ها کاهش یافت ($p < 0.05$). بطوریکه نمونه‌های حاوی ۳ درصد آرد برنج در روز ۲۱ کمترین pH را داشتند. نتایج آنالیز واریانس (جدول ۳) نشان داد تاثیر مقدار آرد و تاثیر مربعی زمان نگهداری بر اسیدیته نمونه‌ها معنی‌دار بود ($p < 0.05$). با افزایش مقدار آرد برنج اسیدیته نمونه‌ها افزایش یافت (شکل ۳ ب). با توجه به جدول ۳ ضرایب تبیین و تبیین



الف

شکل ۳- تاثیر مقدار آرد برنج و زمان نگهداری بر (الف) pH و (ب) اسیدیته نمونه ها

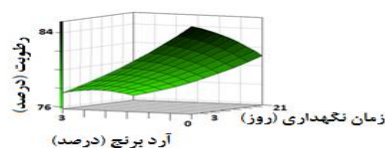
شکل ۴- تاثیر مقدار آرد برنج و زمان نگهداری بر رطوبت نمونه

ها

با توجه به جدول ۳ ضرایب تبیین و تبیین اصلاح شده در حد قابل قبول بود. بنابراین معادله پیشگویی کننده رطوبت و خاکستر نمونه های ماست به شرح زیر است:

$$\text{Moisture} = 85.34245 - 0.118913 * \text{TIME} - 3.609082 * \text{FLOUR} - 0.005145 * \text{TIME} * \text{TIME} + 0.056308 * \text{TIME} * \text{FLOUR} + 0.275022 * \text{FLUR} * \text{FLOUR}$$

مطابق نتایج آنالیز واریانس (جدول ۳) تاثیر مقدار آرد برنج و زمان نگهداری بر رطوبت نمونه ها معنی دار بود ($p < 0.05$). با گذشت زمان و با افزایش مقدار آرد مقدار رطوبت نمونه های ماست کاهش و ماده خشک افزایش یافت (شکل ۴). نمونه های حاوی ۳ درصد آرد برنج در روز ۲۱ کمترین درصد رطوبت را داشتند.

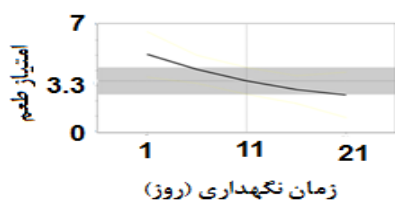


جدول ۳- تجزیه واریانس زندهمانی لاکتوباسیلوس پاراکازئی و خواص فیزیکیوشیمیایی نمونه های ما

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	اسیدیته (درصد)	pH	ویسکوزیته (سانتی پواز)	سینرزیس (درصد)	L.casei (log cfu/g)	درجه آزادی	منبع تغییرات
زمان	۱	۱۴۸۲۰۸/۲ ^{ns}	۰/۰۱۹۰۴۲ ^{ns}	۰/۰۰۸۰۶۷*	۱۴۸۲۰۸/۲ ^{ns}	۴۴۱/۴۱۵۱*	۱/۴۰۳۲۱*	۱	زمان
آرد برنج	۱	۲۵۰۱۳۱۳*	۰/۰۴۹۶۵۱*	۰/۰۳۲۲۶۷*	۲۵۰۱۳۱۳*	۵۵۷/۷۲۵۹*	۰/۵۲۹۳۳*	۱	آرد برنج
زمان*زمان	۱	۴۱۳۰۹۵ ^{ns}	۰/۰۶۱۱*	۰/۰۰۰۳۳۶ ^{ns}	۴۱۳۰۹۵ ^{ns}	۱۱۲/۵۳۹۵ ^{ns}	۰/۰۰۴۲۲۳ ^{ns}	۱	زمان*زمان
زمان*آرد برنج	۱	۱۰۵۹۵۰/۳ ^{ns}	۰/۰۱۹۳۳۹ ^{ns}	۰/۰۰۰۰۴ ^{ns}	۱۰۵۹۵۰/۳ ^{ns}	۷/۰۰۸۰۷۴ ^{ns}	۰/۰۹۴۰۵۳ ^{ns}	۱	زمان*آرد برنج
آرد برنج*آرد	۱	۷۲۸/۵۴۱۹ ^{ns}	۰/۰۱۰۴۸۲ ^{ns}	۰/۰۰۷۱۹۳ ^{ns}	۷۲۸/۵۴۱۹ ^{ns}	۱۳/۵۷۹۴۱ ^{ns}	۰/۰۰۲۶۱۳ ^{ns}	۱	آرد برنج*آرد
عدم برازش (Lack of fit)	۳	۱۷۱۶۲۰/۸ ^{ns}	۰/۰۱۲۳۳ ^{ns}	۰/۰۰۱۳۴۳ ^{ns}	۱۷۱۶۲۰/۸ ^{ns}	۷۶/۸۴۵۳۴ ^{ns}	۰/۱۱۴۶۳۱ ^{ns}	۳	عدم برازش (Lack of fit)
R ²	-	۸۴/۰۰	۷۶/۸۵	۸۱/۵۱	۸۴/۰۰	۷۶/۴۲	۷۸/۳۵	-	R ²
R ² Adj	-	۷۷/۷۱	۶۰/۳۱	۶۸/۳۱	۷۲/۵۶	۵۹/۵۸	۶۲/۸۹	-	R ² Adj

*معنی دار در سطح ۰/۰۵^{ns} غیر معنی دار

($p < 0.05$). با افزایش مقدار آرد برنج امتیاز قوام افزایش یافت (شکل ۵ ب).



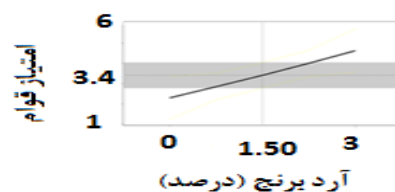
الف

ارزیابی حسی نتایج آنالیز واریانس (جدول ۴) نشان داد زمان نگهداری تاثیر معنی دار بر امتیاز طعم نمونه ها داشت ($p < 0.05$). با گذشت زمان نگهداری امتیاز طعم نمونه ها کاهش یافت (شکل ۵ الف). نتایج آنالیز واریانس (جدول ۴) نشان داد تاثیر مقدار آرد بر امتیاز قوام نمونه ها معنی دار بود ($p < 0.05$).

باتوجه به جدول ۴ ضریب تبیین و ضریب تبیین اصلاح شده در حد قابل قبول بود. بنابراین معادله پیشگویی‌کننده امتیاز طعم و قوام نمونه‌های ماست به شرح زیر است:

$$\text{Flavor score} = 5.299828 - 0.249368 * \text{TIME} + 0.04272 * \text{FLOUR} + 0.004138 * \text{TIME} * \text{TIME} + 0.016667 * \text{TIME} * \text{FLOUR} - 0.038314 * \text{FLOUR} * \text{FLOUR}$$

$$\text{Consistency score} = 2.54477 - 0.028046 * \text{TIME} + 0.708812 * \text{FLOUR} + 0.000517 * \text{TIME} * \text{TIME} + 3.22E-17 * \text{TIME} * \text{FLOUR} + 0.022989 * \text{FLOUR} * \text{FLOUR}$$



ب

شکل ۵- الف) تاثیر زمان نگهداری بر امتیاز طعم و ب)

تأثیر مقدار آرد برنج بر امتیاز قوام نمونه‌ها

جدول ۴- تجزیه واریانس خواص حسی نمونه‌های ماست

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	طعم	قوام
زمان	۱		۱۰/۶۶۶۷*	۰/۱۶۶۶۶۷ ^{ns}
آرد برنج	۱		۰/۱۶۶۶۶۷ ^{ns}	۸/۱۶۶۶۶۷ *
زمان*زمان	۱		۰/۴۷۲۹۰۶ ^{ns}	۰/۰۰۷۳۸۹ ^{ns}
زمان*آرد برنج	۱		۰/۲۵ ^{ns}	. ^{ns}
آرد برنج*آرد	۱		۰/۰۲۰۵۲۵ ^{ns}	۰/۰۰۷۳۸۹ ^{ns}
عدم برازش (lack of fit)	۳		۰/۱۵۲۶۸۲ ^{ns}	۰/۵۵۷۸۵۴ ^{ns}
R ²	-		۶۷/۱۶	۷۴/۴۱
R ² Adj	-		۵۰/۷۱	۵۶/۱۴

*معنی دار در سطح ۰/۰۵^{ns} غیر معنی دار

بحث

از نمونه‌ها مشاهده نشده است که علت آن تولید نمونه‌ها در شرایط بهداشتی و پاستوریزاسیون صحیح شیر بیان شده است (Kumari et al., 2015). در تحقیقی دیگر تأثیر مثبت اینولین و لاکتولوز بر زنده‌مانی لاکتوباسیلوس پاراکازئی گزارش شده است (Aghajani and Pourahmad, 2012). در مطالعه ای دیگر تأثیر افزودن فیبر سیب و گندم بر افزایش رشد لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس گزارش شده است (زمردی و همکاران، ۱۳۹۴). در مطالعه‌ای دیگر به این نتیجه رسیدند که با افزودن آرد عدس تا سطح ۲/۵ درصد زنده‌مانی بیفیدوباکتریوم بیفیدوم افزایش می‌یابد (نادعلی و همکاران، ۱۳۹۴). مویزداده و همکاران (۱۳۹۳) گزارش کردند افزودن کازئینات سدیم بدلیل افزایش

آرد برنج حاوی مواد مغذی مانند چربی، پروتئین، کربوهیدرات، ویتامین و مواد معدنی مانند کلسیم، پتاسیم و آهن می‌باشد. آرد برنج با تقویت رشد باکتری‌های پروبیوتیک باعث افزایش زنده‌مانی باکتری لاکتوباسیلوس پاراکازئی شد. بسیاری از محققان تأثیر کاربرد مواد مغذی در افزایش زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک را گزارش کرده‌اند. در مطالعه ای تأثیر پریبیوتیکی برنج بر زنده‌مانی بیفیدوباکتریوم لاکتیس گزارش شده است. در این مطالعه مقادیر غیرقابل قبول کپک و مخمر در نمونه‌های حاوی برنج مشاهده نشده و باکتری‌های کلی‌فرم هم در هیچ یک

این بررسی را تایید می کند (Fernandez-Garcia and MC Gregor, 1997). آرد برنج نیز حاوی کربوهیدرات می باشد. در نتیجه برهمکنش بین کربوهیدرات های آرد برنج و پروتئین های شیر می تواند دلیل افزایش ویسکوزیته ظاهری نمونه ها باشد. از طرفی جذب آب و متورم شدن آرد برنج می تواند دلیل افزایش ویسکوزیته باشد. احتمالاً آرد برنج نیز با تقویت رشد و فعالیت باکتری های آغازگر باعث توسعه تخمیر و افزایش تولید اسید شده است. علت کاهش pH طی نگهداری توسعه تخمیر است. به نظر می رسد آرد برنج با داشتن کربوهیدرات های مختلف باعث توسعه تخمیر و افزایش فعالیت متابولیکی باکتری ها و در نتیجه اسیدیته نمونه ها شده است. نادعلی و همکاران (۱۳۹۴) نیز گزارش کردند با افزودن آرد عدس تا سطح ۲/۵ درصد اسیدیته ماست میوه ای افزایش می یابد. که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. آرد برنج با جذب آب و افزایش ماده جامد کل منجر به کاهش رطوبت شد. نادعلی و همکاران نیز به نتایج مشابهی دست یافتند. آنها گزارش کردند با افزایش آرد عدس رطوبت نمونه های ماست کاهش می یابد (نادعلی و همکاران، ۱۳۹۴). مقدار آرد برنج تاثیری بر طعم نمونه ها نداشت. بنابراین افزودن پوره هلو در سطح ۱۵ درصد قادر به پوشش طعم آرد بود و از نظر ارزیابی های حسی طعم آرد برنج در هیچ نمونه ای تاثیرگذار نبود. به هر حال نادعلی و همکارانش به نتایج مغایر با این نتایج دست یافتند. آنها گزارش کردند با افزایش آرد عدس امتیاز طعم نمونه ها کاهش یافت. کاهش امتیاز طعم طی زمان نگهداری می تواند ناشی از افزایش اسیدیته و کاهش pH باشد. نمونه های حاوی آرد برنج بیشتر بعلت داشتن ویسکوزیته بالاتر و سینرزیس کمتر از نظر قوام از ارزیابها امتیاز بالاتری گرفتند. دلیل آن می تواند مشارکت اجزا آرد با میسل های کازئین در تشکیل ژلی با استحکام باشد (Zare et al, 2011). این نتایج مشابه نتایج بدست آمده توسط نادعلی و همکاران (۱۳۹۴) می باشد که نشان دادند امتیاز قوام ماست با افزایش آرد عدس افزایش یافت.

پروتئین در دسترس، رشد لاکتوباسیلوس کازئی را افزایش می دهد. احتمالاً بقای پروبیوتیکها میتواند تحت تأثیر پروتئولیز قرار گیرد. ظاهراً پروتئولیز فاکتورهای رشد اساسی همچون پپتیدها و اسیدهای آمینه را برای بهبود رشد و بقا باکتریهای پروبیوتیکی در محصولات فراهم میکند. بالاترین رشد باکتریهای پروبیوتیک در نمونه هایی با فعالیت پروتئولیتیک بالاتر مشاهده شده است (Habibi Najafi et al., 2018). کاهش تعداد پروبیوتیکها در محصولات تخمیری طی نگهداری به علت تولید اسید لاکتیک توسط استارتر و در نتیجه کاهش pH می باشد. تعداد باکتری های پروبیوتیک در پایان دوره نگهداری (۲۱ روز) در حد سلامتی ($10^8 - 10^6$ cfu) باقی ماند (Donkor et al., 2006). کاهش درصد سینرزیس نمونه های ماست پروبیوتیک با افزودن کازئینات سدیم بعلت افزایش ماده خشک و درصد پروتئین گزارش شده است (رضایی و همکاران، ۱۳۹۲). معمولاً ماده خشک شیر ماست سازی را برای جلوگیری از سینرزیس افزایش می دهند (Amatayakul et al., 2006). افزایش ماده خشک موجب افزایش اتصال آب به پروتئینها (Trachoo and Mistry, 1998) و در نتیجه کاهش سینرزیس می شود که نتایج این تحقیق را تایید می کند. نتایج مشابهی توسط سایر محققان در مورد ماست میوه ای گزارش شده است (Bakirci and Kavaz, 2008., Kucukoner and Tarakci., 2004.). عظیمی محله و همکاران (۱۳۹۲) افزایش سینرزیس در طول نگهداری را به علت شل شدن بافت ماست و آزاد شدن آب متصل به پروتئینها طی نگهداری گزارش کردند. همچنین در این تحقیق طی نگهداری pH نمونه ها کاهش یافت که می تواند باعث تغییر پروتئینها و دناتوره شدن آنها شود و در نتیجه ظرفیت نگهداری آب توسط پروتئینها کاهش و سینرزیس افزایش می یابد. فرنذگارسیا و مک گریگور (۱۹۹۷) نشان دادند که فیبرهای ذرت و برنج و جو ویسکوزیته فراورده نهایی را بدلیل برهم کنش بین اولیگوساکاریدها و پلی ساکاریدها با پروتئین های شیر افزایش می دهد که نتایج

نتیجه‌گیری کلی

آرد برنج با داشتن مواد مغذی متفاوت پروبیوتیک مناسبی برای تقویت رشد لاکتوباسیلوس پاراکازئی و افزایش فعالیت متابولیکی آن بود. نتایج آنالیز واریانس آزمون‌های شیمیایی نشان داد که تیمارهای مورد مطالعه تاثیر معنی‌دار بر شمارش باکتری‌های پروبیوتیک و خواص فیزیوشیمیایی و حسی ماست میوه‌ای هلو داشتند. مبنای بهینه‌سازی به حداکثر رساندن زنده‌مانی لاکتوباسیلوس پاراکازئی، امتیاز طعم و قوام و به حداقل رساندن سینرزیس نمونه‌های ماست بود. نمودارهای مختلف کانتور بر روی هم قرار گرفت و منطقه‌ای که مشخصات تمام پاسخ‌ها را برآورد کرد، به عنوان منطقه بهینه معرفی شد. در شرایط بهینه مقدار آرد برنج ۳ درصد و زمان نگهداری ۷ روز تعیین گردید. در این شرایط تعداد لاکتوباسیلوس پاراکازئی ۸/۱۹ سیکل لگاریتمی، امتیاز طعم و قوام به ترتیب ۴/۰۶ و ۴/۶۶ از نمره ۵ و سینرزیس ۱۱/۶۹ درصد بود.

منابع

- احمدی قویدلان، مریم و امیری چایجان، رضا. (۱۳۹۵). استفاده از روش سطح پاسخ جهت بهینه‌سازی خشک کردن فندق در بسترسیتال مادون قرمز. پژوهش‌های صنایع غذایی، جلد ۲۶، صفحات ۶۳۹-۶۵۷.
- دهقان سکاچائی، آتنا، صادقی ماهونک، علیرضا، قرباننی، محمد، کاشانی نژاد، مهدی و مقصدلو، یحیی. (۱۳۹۴). استخراج موسیلاز دانه به توسط امواج فراصوت و بهینه‌یابی آن با روش سطح پاسخ. نشریه فرآوری و نگهداری مواد غذایی، جلد ۹، شماره ۲، صفحات ۱۷-۳۲.
- زمردی، شهین، آبرون، نجمه و خسروشاهی اصل، اصغر. (۱۳۹۴). افزایش زنده‌مانی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بهبود خواص کیفی در ماست سین بیوتیک با استفاده از فیبر سیب و گندم. فصلنامه علوم و صنایع غذایی، شماره ۴۸، دوره ۱۲، صفحه ۲۱۴-۲۰۳.
- عظیمی محله، افسانه، زمردی، شهین، محمدی ثانی، علی و احمد زاده قویدل، ریحانه. (۱۳۹۱). بررسی تاثیر

فیبر پرتقال بر خواص فیزیوشیمیایی، رئولوژیکی و حسی ماست میوه‌ای توت فرنگی به روش سطح پاسخ. نشریه نوآوری در علوم و فناوری غذایی، شماره ۱، صفحه ۳۴-۲۳.

۵. قاسم پور، زهرا، علیزاده، محمد و رضازاد، محمود. (۱۳۸۹). بهینه‌سازی تولید ماست پروبیوتیک حاوی صمغ زدو. مجله الکترونیک فرآوری و نگهداری مواد غذایی، جلد دوم، شماره ۳، صفحه ۷۰-۵۷.

۶. موید زاده، ساینا، خسروشاهی، اصغر و زمردی، شهین. (۱۳۹۳). تاثیر آنزیم ترانس گلوتامیناز بر خواص کیفی ماست پروبیوتیک غنی شده با کاربونات سدیم. نشریه نوآوری در علوم و فناوری غذایی، شماره ۳، صفحه ۹۶-۸۹.

۷. نادعلی، نرجس، خسروشاهی اصل، اصغر و زمردی، شهین. (۱۳۹۴). تاثیر آرد عدس قرمز و کنسانتره انگور قرمز بر زنده‌مانی بیفیدوباکتریوم و خواص کیفی ماست قالبی. مجله پژوهش‌های صنایع غذایی، جلد ۲۵، صفحات ۱-۱۳.

۸. نژاد رزمجوی اخگر، راحله و زمردی، شهین. (۱۳۹۹). زنده‌مانی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم لاکتیس و بررسی خواص کیفی ماست تهیه شده از شیر بز. مجله میکروب‌شناسی مواد غذایی، شماره ۳، صفحات ۸۲-۹۴.

۹. نبی زاده، فرناز، خسروشاهی، اصغر و زمردی، شهین. (۱۳۹۲). مطالعه تاثیر استفاده از پرمیات حاصل از تغلیظ شیر به روش اولترافیلتراسیون و صمغ زدو بر ویژگی‌های کیفی دوغ، مجله پژوهش‌های صنایع غذایی، جلد ۲۳، شماره ۴، صفحات ۵۸۰-۵۶۸.

10. Aghajani A and Purahmad R. 2012. Effect of Lactulose and Inulin on Physicochemical and microbial Properties of Synbiotic Yogurt. Ann Biol Res, 3 (12): 5692-5696.

11. Amatayak T, sherkat F and shahan P. 2006. Physical characteristics of set yoghurt made with altered casein to whey protein ratio and EPS- producing starter culture as, and 17% total solids. Food Hydrocoll. 314-324.

12. AOAC. Official methods of analysis (14th ed) Arlington VA: Association of Official Analytical Chemists. 1997
13. Aryana K. J and MC Grew P. 2007. Quality attributes of yoghurt with lactobacillus casei and various prebiotics. Food Sci Technol. 40 (10), 1808-1814.
14. Bakirci I and Kavaz A. 2008. An investigation of some properties of banana yoghurt made with commercial ABT-2 starter culture during storage. Int J dairy technol. 61:270-276.
15. Chouchouli V, Kalogerpailos N, Konteles S. J and Karvela E. 2013. Fortification of yoghurts with grape (*Vitisvinifera*) Seedextracts. LWT – Food Sci technol. 53:522-529.
16. Donkor O. N, Nilmini S. L. I, Stolic P. V, Asiljevic T and Shah N. P. 2006. Survival and activity of selected probiotic organisms in settype yoghurt during cold storage. Int Dairy J. 17:657-665.
17. Fernandez-Garcia E, MC Gregor J. U. 1997. Fortification of sweetened plain yogurt with insoluble dietary fiber. Food Res Technol. 204, 433-437.
18. Gibson G. R and Roberfroid M. B. 1995. Dietary modulation of the human clonic microbiota: introducing the concept of probiotics. J. Nutr. 125(6):1401-1412.
19. Gibson G. R, Probert H. M, Van Loo J, Rastall R. A and Rberfroid M. B. 2004. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. Nut Res Resv. 17: 259-275
20. Habibi Najafi M.B, Fatemizadeh S.S and Tavakoli M. 2018. Release of proteolysis products with ACE-inhibitory and antioxidant activities in probiotic yogurt containing different levels of fat and prebiotics. Int J Pept Res Therapeut 1-11
21. Kavaza N and Kavaza G, 2016. Some Properties of Set Type Yoghurts Produced From Camel (*Camelus Dromedarius*) Milk Enriched With Native Rice Flour and Skim Milk Powder. Indian J of Nutrition, 3: 1-7.
22. Kneifel W, Jaros D and Erhard F. 1993. Microflora and acidification properties of yogurt and yogurt – related products fermented with commercially available starter culture. Int J food microbial. 18:179-189.
23. Kucukoner E and Tarakci Z. 2004. Influence of different fruit additivives on some properties of stirred yoghurt during storage. Milchwissenschaft. 59: 159-161.
24. Kumari A G I P. Ranadheera C S, Prasanna P H P, Senevirathne N D and Vidanarachchi J K. 2015. Int Food Res J. 22(5): 2032-2040
25. Mirlohi M, Soleimanian- zad S, Sheikh Zeinodin M, Fazeli H. 2008. Enumeration of lactobacill in the fecal flora of infant using two different modified de-man rogosa sharpe media under aerobic and aetobic incubation. Pak J Biol sci. (6) : 81-876
26. Lucas A, Sodini I, Momnet C, Jolivet P and Corrieu G. 2004. Probiotic cell counts and acidification in fermented milks supplemented with milk protein hydrolysates. Int dairy J. 14: 47-53.
27. Mohebbi M and Ghoddusi H. B. 2008. Rheological & Sensory evaluation of yogurt containing probiotic cultures. J Agric Sci technol. 10, 147-155.
28. Sismek B, Sagdic O and Ozcelik S. 2007. Survival of Escherichia coli: 0157: H7 during the storage of Aryan produced with different spices. J food Eng. 78(2): 680-696.
29. Salih Z A, Siddeeg A, Al-Farga Ammar, Ibrahim ALE and Ali AO, 2019. The Physicochemical, Microbiological and Sensory Properties of Yoghurt Processed by Addition of Rice Flour. Ann obes disord, 4: 1-6.
30. Trachoo N and Mistry V.V. 1998. Application of Ultrafiltered Sweet Buttermilk and Sweet Buttermilk Powder in the Manufacture of Nonfat and Low Fat Yogurts. J Dairy Sci. 81: 3163- 3171.
31. Zacarchenco P. B and Massaguer- Roig S. 2006. Properties of sterptococues thermophiles fermented milk containing variable concentration of bifidobacterium

longum & lactobacillus acidophilus. Braz J
microbio. 37,338-344.

32. Yeganehzad S, Mazaheri- Tehrani M and
Shahidi F. 2007. Study microbial,
physicochemical & sensory properties of

directly concentration probiotic yogurt. Afr J
of Agric Res, 2, (8), 366-369.

33. Zare F, Boye J. I, Orsat V. 2011.
Microbial, Physical and sensory properties of
yogurt supplementes with lentil flour. Food res
Int. 44: 2482-2488.

The effect of rice flour on survival of *Lactobacillus paracasei* in fruit yogurt and its qualitative properties with response surface methodology

Nabizadeh F^{1*}, Zinsaz P²

1. Department of Food Science. Faculty of Agriculture. Mahabad Branch Islamic Azad University. Mahabad. Iran.
2. Graduated of a Master of Food Science and Industry Engineering. Faculty of Agriculture. Mahabad Branch Islamic Azad University. Mahabad. Iran.

*Corresponding author: fnabizadeh360@gmail.com

Received: 24 December 2020

Accepted: 24 March 2021

Abstract

In this study, the effect of rice flour on the survival of *Lactobacillus paracasei* and the qualitative properties of fruit yogurt was investigated during storage, using the response surface method (RSM). For this, rice flour in three ranges of (0, 1.5, and 3%) was added to the milk. Then the milk and was pasteurized at 85°C for 15 minutes. After cooling, yogurt starter culture and probiotic bacterium were inoculated at 43 °C and added into sterile containers containing 15% peach puree. The samples were incubated at 42 °C until reaching pH 4.6 ±0.1. Then the samples were cooled down to 4 °C and refrigerated at the same temperature until experiment day. Survival of *lactobacillus paracasei*, pH, amount of moisture, acidity, syneresis, and apparent viscosity and sensory properties were investigated in three periods of (1, 11, and 21 days). The statistical analysis of the results showed that with the increase of rice flour, *lactobacillus paracasei* count increased and decreased during storage ($p<0.05$). The addition of rice flour decreased pH, moisture content, syneresis, and increased acidity and apparent viscosity ($p<0.05$). During storage pH and moisture content decreased and syneresis increased ($p<0.05$). In the sensorial evaluation of samples, the addition of rice flour increased the consistency score ($p<0.05$). Flavor score decreased during storage ($p<0.05$). In conclusion, using 3% of rice flour and a storage period of 7 days was determined as the optimum condition.

Keywords: Fruit yogurt, *Lactobacillus paracasei* bacterium, Response Surface Methodology, Rice flour.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited
Copyright © 2021 Shahrekord Branch, Islamic Azad University.

ارزیابی آلودگی برخی از ادویه‌های پرمصرف ایران و کاهش بار میکروبی به روش پرتودهی با اشعه ماورای بنفش

بهروز اکبری آدرگانی^{۱*}، معصومه سام نژاد^۲، فائزه شیرخان^۳

۱. مرکز تحقیقات آزمایشگاهی غذا و دارو، سازمان غذا و دارو، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران.
۲. دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده داروسازی، علوم پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۳. مرکز تحقیقات علوم تغذیه و صنایع غذایی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول: b.akbari@fda.gov.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۱/۰۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۰۷

چکیده

امکان آلودگی میکروبی ادویه در طی مراحل مختلف برداشت، خشک کردن یا حمل نقل وجود دارد. روش‌های مختلفی جهت کاهش بار میکروبی ادویه استفاده می‌شود که مشکلاتی مانند تغییر عطر و طعم به همراه دارد. هدف از این تحقیق دستیابی به شرایط بهینه پرتودهی ماورای بنفش به منظور کاهش بار میکروبی برخی از ادویه‌های پرمصرف ایران بود. بدین منظور، شش نوع ادویه شامل زردچوبه، زنجبیل، فلفل قرمز، فلفل سیاه، دارچین و سماق از بازار تهران نمونه برداری شدند. آزمایش‌ها با روش‌های موجود در استاندارد ملی ایران مورد آزمون میکروبی قرار گرفتند. سپس ادویه آلوده در کابینت ماورای بنفش با طول موج ۲۵۴ نانومتر در ضخامت‌های ۱، ۵ و ۱۰ میلی‌متر و زمان‌های ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه پرتودهی شدند. روی نمونه‌های پرتودهی شده آزمون میکروبی انجام شد. طبق نتایج حاصله، تاثیر متغیر زمان بر شمارش جمعیت مزوفیل‌های هوای زردچوبه، فلفل قرمز، فلفل سیاه و دارچین، همچنین بر شمارش کلی فرم زردچوبه و فلفل قرمز و نیز بر شمارش کپک زردچوبه، فلفل قرمز و فلفل سیاه و زنجبیل معنی دار بود ($P < 0/01$). همچنین متغیر ضخامت نمونه تاثیر کاملاً معنی داری بر شمارش جمعیت مزوفیل‌های هوای زردچوبه، زنجبیل و فلفل سیاه، بر شمارش کلی فرم زردچوبه، زنجبیل، فلفل قرمز، دارچین، بر شمارش کپک زردچوبه، زنجبیل، فلفل سیاه، فلفل قرمز و تاثیر معنی دار بر شمارش کلی میکروبی فلفل قرمز و کپک دارچین داشت ($P < 0/01$). نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که پرتودهی با اشعه ماورای بنفش در شرایط بهینه شده می‌تواند بار آلودگی ادویه را تا حد قابل قبول کاهش دهد.

کلید واژه‌ها: ادویه، آلودگی میکروبی، پرتودهی ماورای بنفش، رفع آلودگی.

مقدمه

امروزه تمایل مصرف کنندگان به سمت محصولات سالم و طبیعی حاوی گیاهان دارویی و چاشنی‌ها افزایش یافته است (Bedada, et al., 2018). ادویه و چاشنی‌ها به دلیل داشتن طعم، رنگ و رایحه متمایز بطور گسترده‌ای در تهیه و فرآوری مواد غذایی استفاده می‌شوند و ممکن است در معرض طیف گسترده‌ای از آلودگی‌های میکروبی در دوره قبل و بعد از برداشت قرار گیرند (Erdoğan and Ekiz, 2011). ادویه منبع احتمالی آلودگی میکروبی برای مواد غذایی حتی در مقادیر اندک است زیرا این ترکیبات به محصولات غذایی اضافه می‌شوند که هیچگونه فرآوری دیگری ندارند یا به صورت خام مصرف می‌شوند (Little et al., 2003). در این راستا ادویه و چاشنی‌های آلوده باعث افزایش بار میکروبی مواد غذایی و فساد مواد غذایی می‌شوند و ممکن است پس از مصرف باعث عفونت و سمیت در انسان شوند (Kara et al., 2015). روش‌های مختلفی برای فرآیند کاهش بار میکروبی ادویه گزارش شده است (Dababneh et al., 2013). از آنجا که این روش‌ها کاملاً رضایت بخش نبوده‌اند، جستجو برای یافتن روش‌های ایمن و کارآمد برای کاهش آلودگی ادویه همچنان در حال انجام است (Ha et al., 2013; Bang et al., 2020). در این زمینه یکی از روش‌های نوین فرآوری، استفاده از فرآیند غیرحرارتی با اشعه ماورای

امروزه تمایل مصرف کنندگان به سمت محصولات سالم و طبیعی حاوی گیاهان دارویی و چاشنی‌ها افزایش یافته است (Bedada, et al., 2018). ادویه و چاشنی‌ها به دلیل داشتن طعم، رنگ و رایحه متمایز بطور گسترده‌ای در تهیه و فرآوری مواد غذایی استفاده می‌شوند و ممکن است در معرض طیف گسترده‌ای از آلودگی‌های میکروبی در دوره قبل و بعد از برداشت قرار گیرند (Erdoğan and Ekiz, 2011). ادویه منبع احتمالی آلودگی میکروبی برای مواد غذایی حتی در مقادیر اندک است زیرا این ترکیبات به محصولات غذایی اضافه می‌شوند که هیچگونه فرآوری دیگری ندارند یا به صورت خام مصرف می‌شوند (Little et al., 2003). در این راستا ادویه و چاشنی‌های آلوده باعث افزایش بار میکروبی مواد غذایی و فساد مواد غذایی می‌شوند و ممکن است پس از مصرف باعث عفونت و سمیت در انسان شوند (Kara et al., 2015). روش‌های مختلفی برای فرآیند کاهش بار میکروبی ادویه گزارش شده است (Dababneh et al., 2013). از آنجا که این روش‌ها کاملاً رضایت بخش نبوده‌اند، جستجو برای یافتن روش‌های ایمن و کارآمد برای کاهش آلودگی ادویه همچنان در حال انجام است (Ha et al., 2013; Bang et al., 2020). در این زمینه یکی از روش‌های نوین فرآوری، استفاده از فرآیند غیرحرارتی با اشعه ماورای

مواد در معرض آلودگی‌های میکروبی و سایر آلودگی‌ها مانند مدفوع پرندگان، جوندگان و حشرات وجود دارد. از اینرو به رغم اینکه بسیاری از ادویه‌های افزوده شده در غذاها فرآیند حرارتی را طی می‌کنند و اکثر باکتری‌های بیماریزا نسبت به حرارت حساس هستند، با این وجود برخی از سموم مترشحه توسط برخی از قارچ‌ها مثل آفلاتوکسین و نیز اسپور باکتری‌ها به حرارت مقاوم هستند (شعبانی و زجاجی، ۱۳۹۰) و می‌توانند سلامت عمومی را به خطر بیندازند. بدین جهت با توجه به پتانسیل کاربرد اشعه ماورای بنفش در کاهش آلودگی میکروبی و وجود منابع محدود در خصوص تأثیر تیمار این اشعه بر ادویه و لزوم ارزیابی و کنترل بهداشتی آن، مطالعه حاضر ابتدا به بررسی میزان آلودگی میکروبی در ادویه پرداخته است. سپس با هدف ارزیابی تأثیر اشعه ماورای بنفش در کاهش جمعیت بار میکروبی و پاتوژن‌های ناشی از مواد غذایی مانند کلی‌فرم‌ها (Coliform)، اشریشیاکلی (*Escherichia coli*) و کپک در نمونه‌های ادویه، فاکتورهای موثر کیفیت بر کارایی اشعه را مورد بررسی قرار داده است.

روش کار

روش نمونه برداری
نمونه‌های مورد آزمون شامل ادویه زردچوبه، زنجبیل، فلفل سیاه، فلفل قرمز، دارچین و سماق بصورت فله از بازار مولوی تهران تهیه شد. نمونه برداری مطابق استاندارد ملی ایران به شماره ۵۱۲ انجام شد (استاندارد ملی ایران، ۱۳۹۰). نمونه کلی که از ترکیب نمونه‌ها که از تعداد ۵ کیسه (بهر) که ظاهری مشابه داشت انتخاب شد. از همه ۵ کیسه توسط بامبو نمونه برداری شد. سپس نمونه‌ها توسط قاشق استریل درون ظروف شیشه‌ای استریل ریخته شد. برای هر نمونه ادویه ۲ شیشه ۱۰۰۰ گرمی نمونه آزمایشگاهی تهیه شد. هر ظرف نمونه در شرایط خشک و بدون نور در درون کابینت و دمای محیط قرار گرفت. لازم بذکر است ضخامت هر نمونه در این

بنفش می‌باشد. امروزه تأثیر این اشعه در کاهش میکروارگانیسم‌های مختلف ثابت شده است لذا این روش به عنوان یک روش ضدعفونی‌کننده سطوح مواد غذایی تأیید شده است (Watson et al., 2020). اشعه ماورای بنفش یک تابش الکترومغناطیسی می‌باشد و عموماً به سه نوع UV-A، UV-B و UV-C، تقسیم می‌شود و به ترتیب دارای محدوده طول موج‌های ۳۱۵ تا ۴۰۰ نانومتر، ۲۸۰ تا ۳۱۵ نانومتر و ۱۰۰ تا ۲۸۰ نانومتر می‌باشد. بیشترین آثار بیولوژیک این اشعه بر میکروارگانیسم‌ها مربوط به اشعه UV-C بخصوص طول موج ۲۵۴ نانومتر می‌باشد (Keyser et al., 2008). اثر ضدعفونی‌کنندگی اشعه عمدتاً به دلیل توانایی نور در نفوذ به دیواره سلولی است، در نتیجه توانایی رشد و تکثیر میکروارگانیسم‌ها را مهار می‌کند. این اشعه ارزان قیمت و به راحتی قابل اجرا است و بقایای شیمیایی ایجاد نمی‌کند و تأثیر کشنده‌ای را در برابر طیف گسترده‌ای از میکروارگانیسم‌ها نشان می‌دهد (Watson et al., 2020). همچنین در صنایع غذایی برای ضدعفونی کردن مواد خوراکی کاربرد دارد و برای کاهش آلودگی در مواد غذایی و با کمترین میزان از دست دادن طعم، رنگ، ارزش غذایی و کیفیت محصول استفاده می‌شود. سایر کاربردهای آن را در ضدعفونی کردن آب آشامیدنی (Falguera et al., 2011)، کاهش بار میکروبی میوه و سبزیجات (Shankar et al., 2014) و تأثیر بر برخی سموم مانند آفلاتوکسین می‌توان مشاهده کرد (Koutchma, 2008). از آنجایی که بخش اعظم ادویه مصرفی جهان در فضاهای باز و با ابزارهای ابتدایی تولید و عرضه می‌شوند در نتیجه این مواد مستعد آلودگی با باکتری‌ها، مخمرها و کپک‌ها هستند از سوی دیگر میل و اشتیاق مصرف‌کنندگان باعث افزایش درخواست برای تولید و پخش گیاهان با خاصیت دارویی و ادویه‌ای شده و این امر منجر به کاهش توجه به رعایت موازین بهداشتی توسط برخی از تولیدکنندگان شده است. از طرف دیگر از آنجایی که برخی از ادویه‌ها در کشور ما موجود نمی‌باشند و باید از خارج از کشور وارد گردند لذا امکان قرارگیری این

عصاره مخمر با گلوکز و کلرامفینیکل (Yeast Extract)
 Glucose Chloramphenicol Agar) استفاده شد و
 پلیت‌ها به مدت ۳ تا ۵ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد
 گرمخانه‌گذاری شدند (استاندارد ملی ایران، ۱۳۸۷).
 تمامی آزمایشات در ۳ تکرار و قبل و بعد از پرتودهی انجام
 شد. نتایج شمارش بصورت تعداد کلنی در گرم (Cfu/gr)
 (Log) گزارش شد.

نحوه آماده‌سازی نمونه جهت پرتودهی با اشعه ماورای
 بنفش و انجام آزمون‌های میکروبی

برای پرتودهی، نمونه‌ها بصورت یک، دو و سه لایه توسط
 قاشق استریل داخل پلیت‌های استریل ریخته شدند سپس
 به مدت ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه در داخل کابینت دستگاه با
 اشعه UV (Camage, Switzerland) با طول ۴۴
 سانتی‌متر و عرض ۳۴ سانتی‌متر، فاصله لامپ از سینی ۱۵
 سانتی‌متر، طول موج ۲۵۴ نانومتر، دوز اشعه بازای واحد
 انرژی به سطح در واحد زمان برابر با 16122 J/m^2 و توان
 لامپ ۸ وات تحت پرتودهی با اشعه فرابنفش قرار گرفتند
 (اکبری آدرگانی و همکاران، ۱۳۹۹). به لحاظ انتخاب
 ضخامت اندک برای تیمارها حین پرتو دهی و در نظر
 داشتن مشابهت این بررسی با بزرگ سازی فرایند برای
 عبور نمونه‌ها از روی نوار نقاله و پرتودهی در مقیاس
 صنعتی، صرفاً از سطح بالای کابینت پرتودهی انجام شد.
 هر نمونه ادویه در ضخامت‌ها و زمان‌های مختلف پرتو داده
 شد. بطوریکه L_1T : ضخامت ۱ میلی‌متر و زمان ۵ دقیقه;
 L_1T_2 : ضخامت ۱ میلی‌متر و زمان ۱۰ دقیقه; L_1T_3 :
 ضخامت ۱ میلی‌متر و زمان ۱۵ دقیقه; L_2T_1 : ضخامت ۵
 میلی‌متر و زمان ۵ دقیقه; L_2T_2 : ضخامت ۵ میلی‌متر و
 زمان ۱۰ دقیقه; L_2T_3 : ضخامت ۵ میلی‌متر و زمان ۱۵
 دقیقه; L_3T_1 : ضخامت ۱۰ میلی‌متر و زمان ۵ دقیقه
 L_3T_2 : ; ضخامت ۱۰ میلی‌متر و زمان ۱۰ دقیقه; L_3T_3 :
 ضخامت ۱۰ میلی‌متر و زمان ۱۵ دقیقه، B: نمونه شاهد در
 نظر گرفته شد. آزمون‌های میکروبی در تیمارهای پرتودهی
 شده شامل شمارش جمعیت مزوفیل‌های هوازی، کلی‌فرم،
 /شریشیاکلی و کپک مطابق روش ذکر شده انجام شد.

مطالعه به عنوان فاصله بین سطح خارجی نمونه و سطح
 ظرف شیشه‌ای در نظر گرفته شد و به صورت لایه‌های ۱، ۲
 و ۳ لایه (میلی‌متر) با $L_{1,2,3}$ و زمان پرتودهی ۵، ۱۰ و
 ۱۵ (دقیقه) با $T_{1,2,3}$ نامگذاری گردید. لازم بذکر است
 هدف اصلی از بررسی این متغیرها دستیابی به شرایط
 بهینه از نظر زمان پرتودهی، ضخامت ماده حین عملیات
 پرتودهی و زمان بهینه برای دستیابی به بهترین کاهش بار
 میکروبی می‌باشد.

آماده سازی نمونه جهت ارزیابی میزان آلودگی نمونه با
 آزمون‌های میکروبی

برای آماده‌سازی نمونه طبق استاندارد ملی ایران به شماره
 ۸۹۲۳، ۱۰ گرم از نمونه در ۹۰ میلی‌لیتر محلول رقیق
 کننده رینگر سترون (Merck, Germany) حل شد و
 مواد با یک مخلوط‌کن با دور کم به مدت ۱ تا ۲ دقیقه
 مخلوط و یکنواخت شد پس از تهیه سوسپانسیون،
 رقت‌های متوالی تهیه شدند. برای تهیه محیط کشت از
 محیط کشت مرک ساخت کشور آلمان (Merk, Germany)
 استفاده شد و آزمون به روش کشت آمیخته
 انجام شد (استاندارد ملی ایران، ۱۳۸۶). برای شمارش
 جمعیت مزوفیل‌های هوازی مطابق استاندارد ملی ایران به
 شماره ۱-۵۲۷۲ از محیط کشت نوترینت آگار (Nutrient
 Agar) استفاده شد و پلیت‌ها به مدت ۷۲ ساعت در دمای
 ۳۰ درجه گرمخانه‌گذاری شدند (استاندارد ملی ایران،
 ۱۳۹۳). برای شمارش مجموع کلی‌فرم‌ها مطابق استاندارد
 ملی ایران به شماره ۹۲۶۳ از محیط کشت مک کانکی
 آگار (MacConkey Agar) استفاده شد و پلیت‌ها ۲۴ تا
 ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری
 شدند (استاندارد ملی ایران، ۱۳۸۶). برای شمارش
 اشریشیاکلی مطابق استاندارد ملی ایران به شماره ۲۹۴۶
 از محیط کشت لوریل سولفات آگار (Lauryl Sulfate
 Agar) استفاده شد و پلیت‌ها در دمای ۳۰ درجه
 سانتی‌گراد به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری
 شدند (استاندارد ملی ایران، ۱۳۸۶). برای شمارش کپک
 مطابق استاندارد ملی ایران به شماره ۱۰۸۸۹۲ از محیط

آزمون آماری

برای آنالیز داده‌ها، از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۲ استفاده شد. از میانگین و انحراف معیار برای روش توصیفی و برای روش تحلیلی از آنالیز واریانس جهت مقایسه تیمارها استفاده شد. کلیه آزمایشات در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. آزمایشات بصورت ۲ فاکتوریل بود که فاکتور P (زمان پرتودهی) در ۳ سطح (۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه) و فاکتور Z (ضخامت) در ۳ سطح (۵، ۱۰ و ۱۵ میلی-متر) بود. برای مقایسه میانگین داده‌ها از روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن (Duncan) در سطح ($p < 0.05$) استفاده شد.

ارزیابی میزان آلودگی میکروبی در نمونه‌های ادویه قبل از پرتودهی

میانگین نتایج آزمون‌های میکروبی در نمونه ادویه قبل از پرتودهی در جدول ۱ ارائه شده است. جهت بررسی میزان آلودگی میزان مجاز ادویه در استاندارد ملی ایران ارائه شده است همانطور که مشاهده می‌شود میانگین شمارش جمعیت مزوفیل‌های هوازی در نمونه‌های ادویه به غیر از سماق، شمارش کپک به غیر از سماق و شمارش کلی‌فرم زنجبیل و فلفل قرمز بالاتر از حد مجاز استاندارد ملی ایران به شماره ۳۶۷۷ است (استاندارد ملی ایران، ۱۳۸۷) همچنین نتایج شمارش اشریشیاکلی منفی گزارش شد.

نتایج

جدول ۱- نتایج ارزیابی میزان آلودگی میکروبی نمونه‌های ادویه و مقایسه آن با مقادیر مجاز استاندارد ملی ایران (Log cfu/gr)

ویژگی	زردچوبه	زنجبیل	فلفل قرمز	فلفل سیاه	دارچین	سماق	استاندارد ایران
جمعیت میکروبی	۶/۸۱۲±۰/۰۱ ^d	۶/۴۷±۰/۰۰ ^e	۷/۶۶±۰/۰۰ ^c	۷/۹۳±۰/۰۰ ^b	۵/۹۸±۰/۰۲ ^a	منفی	۵/۶۹ ^a
کلی‌فرم	۳/۰۰±۰/۰۰ ^a	۴/۳۳±۰/۰۳ ^b	۳/۹۰±۰/۰۰ ^c	منفی	منفی	منفی	۳ ^a
اشریشیاکولای کپک	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی
	۳/۷۲±۰/۰۰ ^e	۶/۴۷±۰/۰۰ ^b	۳/۹۲±۰/۰۲ ^d	۴/۲۲±۰/۰۴ ^c	۳/۹۶±۰/۰۲ ^a	منفی	۳/۶۹ ^a

ارزیابی اثر پرتودهی بر نمونه‌های ادویه و فاکتورهای موثر در کارایی اشعه ماورای بنفش

بر اساس نتایج بدست آمده از نمونه‌های مورد بررسی میانگین شمارش جمعیت میکروارگانسیم های مزوفیل هوازی به ترتیب عبارتند از: سماق، دارچین، زنجبیل، زردچوبه، فلفل قرمز، فلفل سیاه. مطابق جدول ۲ در شمارش جمعیت میکروبی در نمونه شاهد و تیمار مشاهده

شد که برترین تیمار، تیمار L₁T₃ نمونه پرتودهی شده با زمان ۱۵ دقیقه و ضخامت نمونه ۱ میلی‌متر می‌باشد. علاوه بر این مقایسه تأثیر ضخامت و زمان پرتودهی تیمار برتر در نمونه‌ها نشان داد که با توجه به سطح آلودگی اولیه بیشترین تأثیر پرتودهی در نمونه دارچین است و زنجبیل، زردچوبه، فلفل سیاه و فلفل قرمز در مرتبه‌های بعدی قرار دارند.

جدول ۲- اثر زمان پرتودهی و ضخامت نمونه مورد آزمون بر شمارش جمعیت میکروبی (Log cfu/g)

تیمار	زردچوبه	دارچین	زنجبیل	فلفل قرمز	فلفل سیاه
L ₁ T ₁	۶/۴۷۶±۰/۰۱ ^c	۵/۴۶±۰/۱۵ ^a	۶/۱۴±۰/۳۲ ^c	۷/۵۵±۰/۰۱ ^{bc}	۷/۱۹±۰/۰۱ ^{cd}
L ₁ T ₂	۶/۳۴۸±۰/۰۱ ^d	۳/۵۱±۳/۰۵ ^b	۶/۱۶±۰/۱۵ ^{bc}	۷/۵۲±۰/۰۲ ^{bc}	۷/۱۵±۰/۰۲ ^{de}
L ₁ T ₃	۶/۳۴۲±۰/۰۲ ^d	۰/۰۰±۰/۰۰ ^c	۶/۱۲±۰/۱۵ ^c	۷/۳۹±۰/۰۹ ^d	۷/۰۹±۰/۰۹ ^e
L ₂ T ₁	۶/۵۵۵±۰/۰۲ ^b	۵/۵۹±۰/۱۱ ^a	۶/۳۷±۰/۰۳ ^{abc}	۷/۵۶±۰/۰۰ ^b	۷/۲۵±۰/۰۰ ^c
L ₂ T ₂	۶/۵۰۰±۰/۰۱ ^c	۵/۲۰±۰/۱۷ ^{ab}	۶/۳۲±۰/۰۵ ^{abc}	۷/۵۵±۰/۰۰ ^{bc}	۷/۱۹±۰/۰۰ ^{cd}
L ₂ T ₃	۶/۴۹۸±۰/۰۴ ^c	۵/۰۰±۰/۰۰ ^{ab}	۶/۱۹±۰/۱۳ ^{bc}	۷/۴۸±۰/۰۸ ^c	۷/۱۸±۰/۰۸ ^{cd}
L ₃ T ₁	۶/۵۹۴±۰/۰۱ ^b	۵/۹۳±۰/۰۲ ^a	۶/۴۲±۰/۰۲ ^{ab}	۷/۵۷±۰/۰۰ ^b	۷/۳۳±۰/۰۰ ^b

۷/۲۵±۰/۰۱ ^c	۷/۵۵±۰/۰۱ ^{bc}	۶/۳۴±۰/۰۶ ^{abc}	۵/۸۳±۰/۰۱ ^a	۶/۵۷۸±۰/۰۳ ^b	L ₃ T ₂
۷/۲۵±۰/۰۰ ^c	۷/۵۳±۰/۰۰ ^{bc}	۶/۳۵±۰/۰۱ ^{abc}	۵/۷۹±۰/۰۲ ^a	۶/۵۶۹±۰/۰۵ ^b	L ₃ T ₃
۷/۹۳±۰/۰۰ ^a	۷/۶۶±۰/۰۰ ^a	۶/۴۷±۰/۰۰ ^a	۵/۹۸±۰/۰۲ ^a	۶/۸۱۲±۰/۰۱ ^a	B(شاهد)

نمونه ۱ میلی‌متر می‌باشد. مقایسه تأثیر ضخامت و زمان پرتو دهی تیمار برتر نشان داد که با توجه به سطح آلودگی اولیه بیشترین تأثیر پرتو دهی در نمونه‌های فلفل قرمز و زردچوبه بود که پرتو دهی باعث از بین رفتن کامل کلی‌فرم‌ها شد و در زنجبیل کاهش تعداد کلی‌فرم دیده شد.

بر اساس نتایج بدست آمده از نمونه‌های مورد بررسی بر اساس میانگین شمارش کلی‌فرم به ترتیب زردچوبه، فلفل قرمز، زنجبیل می‌باشد. ضمن این که نمونه‌های فلفل سیاه، دارچین، سماق کلی‌فرم نداشتند. مطابق جدول ۳ برترین تیمار از بین ۹ تیمار تعریف شده و شاهد، تیمار L₁T₃ نمونه پرتو دهی شده با زمان ۱۵ دقیقه و ضخامت

جدول ۳- اثر زمان پرتو دهی و ضخامت نمونه مورد آزمون بر شمارش کلی‌فرم (Log cfu/g)

زنجبیل	زردچوبه	تیمار
۳/۷۹±۰/۰۸ ^{bc}	۰/۰۰±۰/۰۰ ^f	L ₁ T ₁
۳/۷۱±۰/۰۱ ^{cd}	۰/۰۰±۰/۰۰ ^f	L ₁ T ₂
۳/۵۰±۰/۰۱ ^d	۰/۰۰±۰/۰۰ ^f	L ₁ T ₃
۳/۹۳±۰/۰۲ ^{bc}	۲/۶۳±۰/۰۵ ^c	L ₂ T ₁
۳/۸۲±۰/۰۱ ^{bc}	۲/۴۷±۰/۰۰ ^d	L ₂ T ₂
۳/۸۴±۰/۰۲ ^{bc}	۲/۲۰±۰/۰۱ ^e	L ₂ T ₃
۴/۰۳±۰/۰۱ ^b	۲/۸۸±۰/۰۶ ^{ab}	L ₃ T ₁
۳/۸۸±۰/۰۱ ^{bc}	۲/۷۹±۰/۰۱ ^b	L ₃ T ₂
۳/۹۸±۰/۰۲ ^{bc}	۲/۸۱±۰/۰۱ ^b	L ₃ T ₃
۴/۳۳±۰/۰۳ ^a	۳/۰۰±۰/۰۰ ^a	B(شاهد)

بود. مقایسه تأثیر ضخامت نمونه و زمان پرتو دهی تیمار برتر در نمونه‌های ادویه نشان داد که بیشترین تأثیر با توجه به سطح آلودگی اولیه به ترتیب زردچوبه، فلفل قرمز، زنجبیل، دارچین و فلفل سیاه بود.

بر اساس نتایج بدست آمده نمونه‌های شاهد، میانگین شمارش کپک به ترتیب عبارتند از: سماق، زردچوبه، فلفل قرمز، زنجبیل، دارچین، فلفل سیاه. مطابق جدول ۴ برترین تیمار از بین تیمارها و شاهد، تیمار L₁T₃ نمونه پرتو دهی شده با زمان ۱۵ دقیقه و ضخامت ۱ میلی‌متر

جدول ۴- اثر زمان پرتو دهی و ضخامت نمونه مورد آزمون بر شمارش کپک (Log cfu/g)

فلفل سیاه	فلفل قرمز	زنجبیل	دارچین	زردچوبه	تیمار
۳/۵۸±۰/۰۲ ^{fg}	۰/۰۰±۰/۰۰ ^f	۳/۶۰±۰/۰۰ ^c	۳/۷۷±۰/۰۰ ^{bc}	۲/۳۵±۰/۰۱ ^{ab}	L ₁ T ₁
۳/۵۱±۰/۰۰ ^g	۰/۰۰±۰/۰۰ ^f	۳/۳۰±۰/۰۰ ^d	۳/۸۱±۰/۰۰ ^{abc}	۰/۰۰±۰/۰۰ ^d	L ₁ T ₂
۳/۴۷±۰/۰۰ ^g	۰/۰۰±۰/۰۰ ^f	۳/۵۴±۰/۰۰ ^c	۳/۷۱±۰/۰۲ ^c	۰/۰۰±۰/۰۰ ^d	L ₁ T ₃
۳/۸۹±۰/۰۱ ^{bcd}	۳/۴۶±۰/۰۱ ^d	۳/۷۴±۰/۰۰ ^{bc}	۳/۹۰±۰/۰۰ ^{ab}	۲/۶۳±۰/۰۰ ^a	L ₂ Z ₁
۳/۷۲±۰/۰۰ ^{def}	۳/۲۰±۰/۰۱ ^e	۳/۷۱±۰/۰۰ ^{bc}	۳/۹۰±۰/۰۰ ^{ab}	۱/۴۳±۰/۰۰ ^{bc}	L ₂ T ₂
۳/۶۹±۰/۰۰ ^{ef}	۳/۳۰±۰/۰۰ ^e	۳/۶۶±۰/۰۰ ^c	۳/۸۵±۰/۰۰ ^{abc}	۱/۳۳±۰/۰۱ ^c	L ₂ T ₃
۴/۰۴±۰/۰۰ ^b	۳/۶۳±۰/۰۰ ^b	۳/۹۵±۰/۰۰ ^a	۳/۹۵±۰/۰۰ ^a	۲/۷۲±۰/۰۰ ^a	L ₃ T ₁
۳/۹۵±۰/۰۰ ^{bc}	۳/۴۷±۰/۰۰ ^{cd}	۳/۸۷±۰/۰۰ ^{ab}	۳/۸۸±۰/۰۰ ^{ab}	۲/۴۶±۰/۰۱ ^a	L ₃ T ₂
۳/۸۰±۰/۰۰ ^{cde}	۳/۶۰±۰/۰۰ ^{bc}	۳/۸۷±۰/۰۰ ^{ab}	۳/۹۵±۰/۰۰ ^a	۲/۴۳±۰/۰۰ ^a	L ₃ T ₃
۴/۲۲±۰/۰۰ ^a	۳/۹۲±۰/۰۰ ^a	۳/۹۶±۰/۰۰ ^a	۳/۹۶±۰/۰۰ ^a	۳/۷۲±۰/۰۰ ^a	B(شاهد)

جهت بررسی متغیرهای زمان پرتودهی و ضخامت نمونه بر شمارش جمعیت میکروبی، کلی‌فرم و کپک‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد که نتایج آن در جدول ۵

جدول ۵- مقایسه‌ی میانگین اثر زمان پرتودهی و ضخامت نمونه بر شمارش جمعیت میکروبی، کلی‌فرم و کپک با آزمون چند دامنه‌ای دانکن

نمونه	زمان پرتودهی		ضخامت نمونه			
	۱۰ دقیقه	۵ دقیقه	۱۵ دقیقه	۱ میلی لیتر	۵ میلی لیتر	
زردچوبه	۶/۴۷۳±۰/۱۰ ^b	۶/۵۴۲±۰/۰۵ ^a	۶/۴۷۲±۰/۱۰ ^b	۶/۳۸۹±۰/۰۶ ^c	۶/۵۱۸±۰/۰۳ ^b	۶/۵۸۱±۰/۰۳ ^a
زنجبیل	۶/۲۸±۰/۱۲ ^a	۶/۳۱±۰/۲۰ ^a	۶/۲۲±۰/۱۴ ^a	۶/۱۴±۰/۱۹ ^b	۶/۳۰±۰/۱۱ ^a	۶/۳۷±۰/۰۵ ^a
لفل قرمز	۷/۵۴±۰/۰۱ ^a	۷/۵۶±۰/۰۱ ^a	۷/۴۷±۰/۰۸ ^b	۷/۴۹±۰/۰۸ ^b	۷/۵۳±۰/۰۵ ^{ab}	۷/۵۵±۰/۰۲ ^a
لفل سیاه	۷/۵۴±۰/۰۱ ^b	۷/۵۶±۰/۰۱ ^a	۷/۴۷±۰/۰۸ ^b	۷/۴۹±۰/۰۸ ^c	۷/۵۳±۰/۰۵ ^b	۷/۵۵±۰/۰۲ ^a
دارچین	۴/۸۵±۱/۸۵ ^a	۵/۶۶±۰/۲۳ ^a	۳/۵۹±۲/۷۲ ^b	۲/۹۹±۲/۸۴ ^b	۵/۲۶±۰/۲۸ ^a	۵/۸۵±۰/۱۶ ^a
زردچوبه	۱/۷۵±۱/۳۲ ^b	۱/۸۳±۱/۳۸ ^a	۱/۶۷±۱/۲۸ ^c	۰/۰۰±۰/۰۰ ^c	۲/۴۳±۰/۲۱ ^b	۲/۸۳±۰/۰۸ ^a
زنجبیل	۳/۸۰±۰/۱۴ ^a	۳/۹۲±۰/۱۴ ^a	۳/۷۷±۰/۲۸ ^a	۳/۶۷±۰/۱۷ ^b	۳/۸۷±۰/۱۴ ^a	۳/۹۶±۰/۱۸ ^a
لفل قرمز	ND	ND*	ND	ND	ND	ND
لفل سیاه	ND	ND	ND	ND	ND	ND
دارچین	ND	ND	ND	ND	ND	ND
زردچوبه	۱/۲۹±۱/۲۴ ^b	۲/۵۷±۰/۱۷ ^a	۱/۲۵±۱/۲۱ ^b	۱/۱۸±۰/۷۸ ^c	۱/۸۰±۰/۰۵ ^b	۲/۵۳±۰/۲۴ ^a
زنجبیل	۳/۶۳±۰/۲۶ ^b	۳/۷۶±۰/۱۶ ^a	۳/۶۹±۰/۲۰ ^{ab}	۳/۴۸±۰/۱۹ ^c	۳/۷۱±۰/۰۸ ^b	۳/۹۰±۰/۰۷ ^a
لفل قرمز	۲/۲۲±۱/۶۷ ^b	۲/۳۶±۱/۷۷ ^a	۲/۳۰±۱/۷۳ ^{ab}	۰/۰۰±۰/۰۰ ^c	۳/۳۲±۰/۱۶ ^b	۳/۵۷±۰/۰۷ ^a
لفل سیاه	۳/۷۳±۰/۱۹ ^b	۳/۸۳±۰/۲۵ ^a	۳/۶۵±۰/۱۴ ^b	۳/۵۲±۰/۱۴ ^c	۳/۷۷±۰/۱۰ ^b	۳/۹۳±۰/۱۰ ^a
دارچین	۳/۸۶±۰/۰۶ ^a	۳/۸۷±۰/۰۸ ^a	۳/۸۴±۰/۱۵ ^a	۳/۷۷±۰/۱۲ ^b	۳/۸۸±۰/۰۵ ^b	۳/۰±۹۲/۰۵ ^a

*ND: Not Detected

میکروبی‌های هوا می‌باشد (Bakobie et al., 2017).

همچنین بررسی مطالعات در زمینه آلودگی و مقایسه با تحقیق حاضر از نظر نوع آلودگی در ادویه نشان داد که فلفل قرمز و فلفل سیاه در اکثر گزارشات بالاتر از حد مجاز استانداردهای ملی و بین‌المللی می‌باشند و این مسئله می‌تواند ناشی از بالابودن میزان میکروفلور طبیعی این ادویه نسبت به سایر نمونه‌ها باشد و کمتر بودن روغن‌های فرار و ترکیبات ضد میکروبی مثل پلی‌فنول‌ها می‌تواند موثر باشد (صداقت و همکاران، ۱۳۹۴). همچنین میزان کلی‌فرم در نمونه‌های فلفل و زنجبیل در مقایسه با استاندارد ملی ایران معنی‌دار می‌باشد ($p < 0.05$) لذا از آنجایی که آلودگی به کلی‌فرم‌ها نشان دهنده شرایط غیربهداشتی در مراحل کاشت، برداشت، فرآوری، بسته بندی و توزیع ادویه می‌باشد و با توجه به این که کود دامی جهت پرورش گیاهان استفاده می‌شود از اینرو حضور

بحث

بررسی کیفیت میکروبیولوژیکی نمونه‌های ادویه قبل از پرتودهی در جدول ۱ نشان می‌دهد که شمارش جمعیت مزوفیل‌های هوازی در نمونه‌های ادویه به غیر از سماق، شمارش کپک در نمونه‌ها به غیر از سماق و شمارش کلی‌فرم زنجبیل و فلفل قرمز معنی‌دار می‌باشد ($p < 0.05$) و در مقایسه با استاندارد بالاتر از حد مجاز قرار دارد. در این راستا مروری بر پژوهش‌ها در ایران حاکی از وجود آلودگی میکروبی و قارچی در نمونه‌های ادویه بود بطوری‌که مقایسه تحقیق حاضر با سایر مطالعات از نظر وجود آلودگی میکروبی در این زمینه همخوانی داشت (منصوری و همکاران، ۱۳۹۴)، (صداقت و همکاران، ۱۳۹۴)، (مولادوست و حنیفیان، ۱۳۹۷). برخی نایع بالقوه آلودگی ادویه‌ها شامل تجهیزات ذخیره سازی، جابجایی، محیط‌های غیربهداشتی انبار و ذخیره، ذرات اتمسفر و

کاهش لگاریتمی را در نمونه‌های در زردچوبه $\log \text{cfu/g}$ $1/44$ ، زنجبیل $\log \text{cfu/g}$ $0/66$ ، فلفل قرمز $\log \text{cfu/g}$ $0/72$ ، دارچین $\log \text{cfu/g}$ $0/75$ ، نشان داد و همخوانی با مطالعات در زمینه اثرگذاری این اشعه در کاهش لگاریتم شمارش کپک مشاهده شد (Begum Santhirasegaram et al., 2015; et al., 2009). در سال‌های اخیر نیز مطالعاتی در زمینه اثرگذاری تابش ماورای بنفش بر بار میکروبی ادویه‌جات مورد توجه قرار گرفته است بطوری که در مطالعه‌ای پتانسیل پرتودهی با اشعه ماورای بنفش برای کاهش بار طبیعی میکروبی آویشن مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که کاربرد UV-C می‌تواند یک فناوری مؤثر برای کاهش و بار میکروبی آویشن بدون ایجاد تغییرات چشمگیر در کیفیت فیزیکی، شیمیایی و حسی باشد بطوریکه این روش می‌تواند به عنوان یک روش جایگزین برای رفع آلودگی‌های احتمالی آویشن و ادویه‌های مشابه از نظر صنعتی باشد (Dogu-Baykut & Gunes 2019). همچنین در پژوهش دیگری در زمینه اثر گذاری پرتودهی بر نمونه‌های فلفل تند، رازپانه و گشنیز بود مشاهده شد که تیمارهای UV-C به طور معنی داری باعث کاهش بار میکروبی، سالمونلا و حذف اشرشیاکلی در همه نمونه‌ها شد (Hassan et al., 2020). از اینرو با توجه به نتایج تحقیق حاضر و مطالعات ارائه شده در زمینه اثرگذاری تابش ماورای بنفش بر بار میکروبی علت اثرگذاری را می‌توان به از بین بردن میکروارگانیسم‌ها توسط اشعه ماورای بنفش مرتبط نمود به طوری که اسید نوکلئیک موجود در باکتری اشعه را جذب می‌کند و سازواره اولیه غیرفعالسازی با این پرتو ایجاد دیمر پیریمیدین می‌کند و در نهایت از سنتز پروتئین جلوگیری کرده و سلول غیرفعال می‌شود (اجاق و همکاران، ۱۳۹۱). همچنین در این جداول برترین تیمارها مربوط به نمونه‌های با ضخامت کم و زمان تیماردهی بیشتر بود. در این راستا ارزیابی فاکتورهای مؤثر بر کارایی اشعه با مقایسه میانگین شمارش جمعیت میکروبی، کلی فرم و

کلی فرم‌ها در ادویه و گیاهان معطر بسیار محتمل می‌باشد (مولادوست و حنیفیان، ۱۳۹۷). افزون بر این، ادویه سماق از نظر بار میکروبی در تمام آزمون‌های مندرج در جدول ۱ منفی گزارش شد و با حد مجاز ارائه شده استاندارد ملی ایران مطابقت داشت. همچنین ادویه دارچین آلودگی کمتری بویژه در شمارش جمعیت میکروبی داشت که احتمالاً وجود ترکیبات ضد میکروبی مانند سینامیک آلدئید که خاصیت ضد میکروبی دارد دلیل بر این امر باشد (شهرزاد و همکاران، ۱۳۸۷). مطابق نتایج جداول ۲ تا ۴ ارزیابی اثر پرتودهی بر شمارش جمعیت مزوفیل‌های هوازی نمونه‌های ادویه نشان داد که بار میکروبی در نمونه‌های شاهد بیشتر از نمونه‌های پرتو دیده در زمان و ضخامت‌های مختلف است و مقایسه میانگین شمارش جمعیت میکروبی بین نمونه‌های شاهد و بهترین تیمارهای ادویه در زردچوبه $\log \text{cfu/g}$ $0/47$ ، زنجبیل $\log \text{cfu/g}$ $0/35$ ، فلفل قرمز $\log \text{cfu/g}$ $0/27$ ، فلفل سیاه $\log \text{cfu/g}$ $0/84$ و دارچین $\log \text{cfu/g}$ $2/47$ کاهش شمارش جمعیت میکروبی را نشان دادند و این اثرگذاری اشعه در مطالعات برخی محققین نیز مشاهده شد (Tran Fine and Lacivita et al., 2016; et al., 2004; Gervais, 2004). همچنین شمارش کلی فرم در ادویه نیز نشان داد که کلی فرم در نمونه‌های شاهد بیشتر از نمونه‌های پرتو دیده در زمان و ضخامت‌های مختلف است و در نمونه شاهد فلفل سیاه و دارچین کلی فرم دیده نشد. مقایسه میانگین شمارش کلی فرم در نمونه‌های شاهد و تیمارها کاهش لگاریتم را در نمونه‌های زردچوبه $\log \text{cfu/g}$ $0/8$ ، زنجبیل $\log \text{cfu/g}$ $0/83$ و فلفل قرمز $\log \text{cfu/g}$ $3/9$ نشان داد و در مطالعات محققین نیز اثرگذاری اشعه بر کاهش کلی فرم مشاهده شد (Cheon et al., 2015)، (خیامی و همکاران، ۱۳۸۲) و (یلمه و همکاران، ۱۳۹۴). اندازه‌گیری شمارش کپک در ادویه نیز نشان داد که کپک در نمونه‌های شاهد بیشتر از نمونه‌های پرتو دیده در زمان و ضخامت‌های مختلف است و مقایسه میانگین شمارش کپک بین نمونه‌های شاهد و تیمارها

کپک با آزمون دانکن نشان داد که زمان‌های مختلف تأثیر کاملاً معنی‌داری در شمارش جمعیت میکروب‌های مزوفیل هوازی زردچوبه، فلفل قرمز، فلفل سیاه، دارچین و شمارش کلی فرم زردچوبه، فلفل قرمز، فلفل سیاه، دارچین و شمارش کلی فرم زردچوبه، فلفل قرمز، فلفل سیاه داشته ($P < 0.01$) و با افزایش زمان پرتودهی میزان جمعیت میکروبی کاهش پیدا کرد. همچنین نتایج مقایسه میانگین شمارش کپک زنجبیل نشان داد که زمان‌های مختلف تأثیر معنی‌داری در کاهش تعداد کپک داشت و نتایج مشابهی از سوی سایر محققان نیز به دست آمده است که در آن تناسب میزان تخریب توسط اشعه ماورای بنفش با مدت زمان پرتودهی گزارش شده است (اکبری آدرگانی و همکاران، ۱۳۹۹)، (علیخانی و همکاران، ۱۳۹۰). لذا این نتیجه حاصل شد که افزایش زمان پرتودهی موجب افزایش تخریب ایجاد شده توسط این پرتو می‌باشد و بهترین نتیجه در تحقیق حاضر در زمان ۱۵ دقیقه به دست آمد و این اثرگذاری را می‌توان با آسیب ژنتیکی در باکتری مرتبط نمود بطوری که پرتودهی با اشعه ماورای بنفش نیاز به زمان دارد به همین دلیل طی ساعات اولیه رشد باکتری مشاهده می‌شود ولی با گذشت زمان کاهش بیشتری در شمارش جمعیت میکروبی مزوفیل‌های هوازی حاصل می‌شود (یلمه و همکاران، ۱۳۹۴). همچنین مشاهده شد که متغیر زمان در شمارش کپک دارچین، شمارش جمعیت میکروبی زنجبیل و شمارش کلی فرم زنجبیل تأثیر معنی‌داری نداشت که در مقایسه با پژوهشی در زمینه تأثیر متغیر زمان در شمارش کپک در نمونه پسته همخوانی دیده شد (اکبری آدرگانی و همکاران، ۱۳۹۹). همچنین متغیر زمان در شمارش جمعیت میکروبی و کلی فرم زنجبیل تأثیری نداشت که علت آن را می‌توان با بالا بودن بار میکروبی اولیه و نیاز به افزایش مدت زمان پرتودهی برای افزایش کارایی و تأثیر بر بار میکروبی مرتبط دانست (علیخانی و همکاران، ۱۳۹۰). در زمینه متغیر ضخامت نمونه، آزمون دانکن نشان داد که ضخامت‌های مختلف تأثیر کاملاً معنی‌داری در شمارش

جمعیت میکروبی مزوفیل‌های هوازی زردچوبه، زنجبیل، فلفل سیاه، به دنبال آن شمارش کلی فرم زردچوبه، زنجبیل، فلفل قرمز، دارچین و همچنین شمارش کپک زردچوبه، زنجبیل، فلفل قرمز و فلفل سیاه و متعاقباً تأثیر معنی‌داری بر شمارش کلی میکروبی فلفل قرمز، کپک و دارچین داشت ($P < 0.01$) و با کاهش ضخامت لایه تأثیر اشعه بر کاهش جمعیت میکروبی بیشتر بوده است. محققین در بررسی تأثیر پالس ماورای بنفش در کاهش بار میکروبی محصولات پودری تا ضخامت ۵ میلی‌متر کاهش ۷ لگاریتم را با دز 58 J/cm^2 اشعه به دست آوردند (Fine and Gervais, 2004) و در تحقیق حاضر بهترین تأثیر در برترین تیمارها با ضخامت ۱ میلی‌متر کاهش ۲/۵ تا ۶ لگاریتم در آزمون‌های مختلف میکروبی بدست آمد. لذا طبق نتایج حاضر و مطالعات محققان رابطه مستقیمی بین مقدار تخریب ایجاد شده توسط اشعه ماورای بنفش و در نتیجه میزان تأثیر فرآیند ضدعفونی در ضخامت کم گزارش نشد (Stoops et al., 2003). در هر حال کاهش ضخامت تأثیر به سزایی در کارایی بیشتر عملیات پرتودهی آزمایش‌ها دارد. بهترین اثرگذاری در مطالعه حاضر ضخامت ۱ میلی‌متر تعیین شد. در این راستا مشخص شد که فاکتور ضخامت نقش بسیار مهمی در میزان اثرگذاری اشعه ماورای بنفش در کاهش بار میکروبی نمونه‌های مورد آزمون دارد. مطابق جدول ۵ در زمینه اثر متغیر زمان پرتودهی و ضخامت نمونه بر شمارش کلی فرم و کپک‌ها مشاهده شد که در نمونه زردچوبه با افزایش زمان و افزایش ضخامت پرتودهی میزان جمعیت باکتری کلی فرم کاهش معنی‌داری دارد ($P < 0.05$). این درحالی‌است که کلی فرم در زردچوبه‌های پرتودهی شده با ضخامت ۱ میلی‌متر مشاهده نشد. همچنین با افزایش زمان پرتودهی میزان جمعیت کپک در زردچوبه کاهش پیدا کرد. بین شمارش کپک نمونه زردچوبه‌های پرتودهی شده در زمان ۱۰ و ۱۵ دقیقه اختلاف معنی‌دار وجود نداشت ولی به نسبت نمونه‌های پرتودهی شده در زمان ۵ دقیقه، تفاوت معنی‌داری داشتند ($P < 0.05$). بعلاوه با افزایش ضخامت،

در میزان جمعیت کپک افزایش معنی‌داری مشاهده شد ($P < 0/05$). در ادویه زنجبیل مشاهده شد با افزایش زمان پرتودهی میزان جمعیت باکتری کلی‌فرم کاهش پیدا کرد ولی این کاهش معنی‌دار نبود و با افزایش ضخامت میزان جمعیت باکتری کلی‌فرم افزایش پیدا کرد. همچنین در زنجبیل با افزایش زمان پرتودهی از ۵ به ۱۰ دقیقه میزان جمعیت کپک کاهش معنی‌دار داشت ($P < 0/05$). همچنین با افزایش ضخامت میزان جمعیت کپک در زنجبیل افزایش معنی‌داری را از خود نشان داد ($P < 0/05$). نتایج شمارش کلی‌فرم فلفل قرمز نشان داد که هیچ نوع میکروارگانیسمی در نمونه‌های پرتودهی شده مشاهده نشد ولی نمونه شاهد دارای میزان جمعیت کلی‌فرم ($3/90 \log cfu/g$) بود. با افزایش زمان پرتودهی از ۵ به ۱۰ دقیقه میزان جمعیت کپک کاهش معنی‌دار داشت ($P < 0/05$). همچنین با افزایش ضخامت میزان جمعیت کپک افزایش معنی‌دار داشت ($P < 0/05$). نتایج شمارش کلی‌فرم فلفل سیاه در نمونه شاهد و نمونه‌های پرتودهی شده مشاهده نشد. میانگین اثر اصلی ضخامت بر شمارش کپک فلفل سیاه نشان داد با افزایش ضخامت میزان جمعیت کپک افزایش معنی‌دار داشت ($P < 0/05$). نتایج شمارش کلی‌فرم دارچین نشان داد که کلی‌فرم در نمونه شاهد و تیمار مشاهده نشد. همچنین با افزایش زمان پرتودهی، میزان جمعیت کپک کاهش داشت اما این کاهش معنی‌دار نبود و با افزایش ضخامت میزان جمعیت کپک افزایش داشت اما در بین نمونه‌ها دارچین با ضخامت ۱ و ۵ میلی‌متر تفاوت معنی‌داری در شمارش کپک وجود نداشت.

نتیجه‌گیری کلی

مطابق نتایج مطالعه حاضر مبنی بر پرتودهی نمونه‌های ادویه با اشعه ماورای بنفش می‌توان بیان داشت از آنجایی که شمارش جمعیت میکروبی مزوفیل‌های هوازی ادویه و کپک در اکثر نمونه‌ها غیر سماق و شمارش کلی‌فرم زنجبیل و فلفل قرمز بالاتر از حد مجاز استاندارد ملی ایران

می‌باشد اهمیت و الزام استفاده از روشی جهت کاهش بار میکروبی ادویه بسیار ضروری است. همچنین اشعه ماورای بنفش به طور مؤثری موجب از بین رفتن یا کاهش کلی‌فرم با توجه به تعداد اولیه در نمونه شاهد می‌شود و بر روی کاهش کپک و شمارش جمعیت میکروبی مزوفیل‌های هوازی نیز مؤثر است. در بررسی عوامل مؤثر کاهش بار میکروبی تحت فرآوری با این اشعه، عواملی مانند ضخامت نمونه، زمان پرتودهی و آلودگی اولیه نمونه و نوع میکروارگانیسم نقش مهمی دارند. با توجه به این که اغلب موارد، ادویه در مراحل پایانی تهیه مواد غذایی به غذا اضافه می‌شود و به احتمال زیاد تحت تأثیر حرارت کشنده قرار نمی‌گیرد، لذا در صورت وجود شرایط لازم تکثیر پیدا کرده و موجبات مسمومیت غذایی را فراهم می‌آورد. بنابراین لازم است ارزیابی‌های میکروبیولوژیکی با هدف بررسی وضعیت آلودگی میکروبی در ادویه عرضه شده در بازار صورت گیرد. همچنین برای کاهش آلودگی‌های میکروبی بخصوص نمونه‌های وارداتی با امکان عبور روی سطح نقاله و پرتودهی با اشعه ماورای بنفش با زمان کوتاه می‌توان از پتانسیل این روش برای کاربرد در صنعت غذا استفاده نمود. لازم بذکر است یافته‌های حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد که فرآیند پرتودهی با اشعه ماورای بنفش پتانسیل مناسبی را به عنوان روشی جهت ضدعفونی ادویه دارد لذا استفاده از این اشعه در کاهش بار میکروبی در کارخانجات مواد غذایی توصیه می‌گردد. از آنجایی که مزایای متعددی برای استفاده از پرتو UV-C مانند کاهش آلودگی میکروبی، سادگی روش، وابستگی کم به pH و دما، عدم وجود هرگونه ماده شیمیایی سمی به کار رفته و عدم وجود مواد باقی‌مانده از واکنش‌های شیمیایی در مطالعات پژوهشگران گزارش شده است با اینحال توانایی نفوذ محدود اشعه UV-C از معایب آن بشمار می‌آید لذا نمونه‌ی مورد نظر اگر به صورت لایه‌ی نازک پرتودهی شود یا با روش‌های دیگر همراه گردد اثرگذاری آن بیشتر خواهد بود از اینرو نتایج این پژوهش می‌تواند برای استفاده از اشعه

ماورای بنفش در کاهش بار میکروبی ادویه و معرفی شرایط بهینه پرتودهی مؤثر باشد.

منابع

۱. اجاق، مهدی؛ رضائی مسعود؛ رضوی، هادی؛ حسینی، محمدهاشم. (۱۳۹۱). مطالعه اثر ضد باکتریایی اسانس پوست دارچین در شرایط آزمایشگاهی در برابر پنج باکتری عامل فساد غذایی. فصلنامه علوم و صنایع غذایی، شماره ۳۵، دوره ۹، صفحه ۷۶-۶۷.
۲. اکبری، بهروز؛ صادقی، صبا؛ همایون، مسعود؛ شیرخان، فائزه. (۱۳۹۹). ارزیابی کارایی روش فرآوری با اشعه فرابنفش در کاهش بار میکروبی برخی از دانه‌های آجیلی پرمصرف. علوم و صنایع غذایی ایران، شماره ۱۷، دوره ۱۰۱، صفحه ۴۳-۳۱.
۳. خیامی دانشیار، مسعود؛ رضوی روحانی، مهدی؛ سیاسی، زهرا. (۱۳۸۲). اثر دما و پرتو فرابنفش در کاهش تعداد باکتری‌های کلی‌فرم در زعفران، مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی، شماره ۲، صفحه ۵۰-۴۳.
۴. سازمان ملی استاندارد ایران. (۱۳۸۴). میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام - روش جستجو و شمارش اشریشیاکلی با استفاده از روش بیشترین تعداد احتمالی. استاندارد شماره ۲۹۴۶.
۵. سازمان ملی استاندارد ایران. (۱۳۸۶). میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام - روش جامع شمارش کلی‌فرم‌ها - روش شمارش کلنی، استاندارد شماره ۹۲۶۳.
۶. سازمان ملی استاندارد ایران. (۱۳۸۶). میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام - آماده‌سازی آزمایش، سوسپانسیون اولیه و رقت‌های اعشاری برای آزمون‌های میکروبیولوژی - قسمت اول: مقررات کلی برای آماده‌سازی سوسپانسیون اولیه و رقت‌های اعشاری. استاندارد شماره ۱-۸۹۲۳.
۷. سازمان ملی استاندارد ایران. (۱۳۸۷). میکروبیولوژی انواع ادویه-ویژگی‌ها، استاندارد شماره ۳۶۷۷.
۸. سازمان ملی استاندارد ایران. (۱۳۸۷). میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام - روش جامع برای شمارش کپک -
- ها و مخمرها-قسمت دوم: روش شمارش کلنی در فرآورده‌های با فعالیت آبی (aw) مساوی یا کمتر از ۰/۹۵، استاندارد شماره ۲-۱۰۸۹۹.
۹. سازمان ملی استاندارد ایران. (۱۳۹۰). ادویه و چاشنی - نمونه‌برداری. استاندارد شماره ۵۱۲.
۱۰. سازمان ملی استاندارد ایران. (۱۳۹۳). میکروبیولوژی زنجیره غذایی - روش جامع برای شمارش میکروارگانسیم‌ها - قسمت ۱: شمارش کلنی در 30°C درجه با استفاده از روش کشت آمیخته. استاندارد شماره ۱-۵۲۷۲.
۱۱. شعبانی، شاهرخ؛ زجاجی، مهدی. (۱۳۹۰). بررسی میزان آلودگی اولیه ادویه‌های مصرفی در تولید مواد غذایی به اسپوره‌های مقاوم به حرارت. مجله علوم غذایی و تغذیه، سال ۸، شماره ۴، صفحه ۸۹-۸۳.
۱۲. شهرزاد، فرزانه؛ کامران، منیژه؛ خاکسار، رامین؛ حسینی، هدایت؛ کارگر، ساره؛ انتشاری، مریم. (۱۳۸۸). بررسی آلودگی میکروبی ادویه‌های بسته بندی عرضه شده در فروشگاه‌های زنجیره ای شهروند شهر تهران در سال ۸۶. علوم و صنایع غذایی ایران، شماره ۲، دوره ۶، صفحه ۱۳۱-۱۲۵.
۱۳. صداقت، زینب؛ محسنی، مهران؛ کمالی، کوروش؛ حسن، مریم؛ شعبانی، شاهرخ؛ فردوسی، نیکتا. (۱۳۹۴). بررسی میزان آلودگی ادویه‌های عرضه‌شده به صورت فله و بسته‌بندی (لفل‌سیاه، فلفل‌قرمز، سماق و دارچین) به اسپوره‌های هوازی در استان زنجان. مجله علوم غذایی و تغذیه، شماره ۲، سال ۱۲، صفحه ۴۸-۴۱.
۱۴. علیخانی، یوسف؛ خراسانی، محمود؛ پیری دوگانه، محمود؛ شیرزاد سبینی، مهدی. (۱۳۹۰). بررسی کارایی پرتو فرابنفش در گندزدایی اشریشیاکلی از محیط‌های آبی: مطالعه سینیتیکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، شماره ۲، دوره ۱۱، صفحه ۱۶۵-۱۵۸.
۱۵. منصوری محمد؛ زبایف انسیه؛ هاشمی سید جمال؛ گرامی‌شعار محسن؛ داعی قزوینی روشنگر. (۱۳۹۴). بررسی آلودگی با گونه‌های قارچی در سه نوع ادویه مصرفی رایج: گزارش کوتاه. مجله دانشکده پزشکی،

25. Erdoğdu, S.B. and Ekiz, H.I. 2011. Effect of ultraviolet and far infrared radiation on microbial decontamination and quality of cumin seeds. *J. Food Sci*, 76(5): M284-M292.
26. Falguera, V., Pagan, J., Garza, S., Garvin, A. and Ibraiz, A. 2011. Ultraviolet processing of liquid food: A Review. Part 2: Effects on microorganisms and on food components and properties. *FOOD RES INT* 2011, 44: 1580-1588.
27. Fine, F. and Gervais, P. 2004. Efficiency of pulse UV light for microbial decontamination of food powders. *JFP*, 67(4): 787-792.
28. Ha, J.W. and Kang, D.H. 2013. Simultaneous near-infrared radiant heating and UV radiation for inactivating *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in powdered red pepper (*Capsicum annuum* L.). *AEM*, 79(21): 6568-6575.
29. Hassan, A. B., Al Maiman, S. A., Elkhatim, K. A. S., Elbadr, N. A., Alsulaim, S., Osman, M. A., and Ahmed, I. A. M. 2020. Effect of UV-C radiation treatment on microbial load and antioxidant capacity in hot pepper, fennel and coriander. *LWT*, 134, 109946.
30. Kara, R., Gökmen, M., Akkaya, L., and Gök, V. 2015. Microbiological quality and salmonella spp/listeria monocytogenes of spices in Turkey. *Res J Microbiol*, 10 (9): 440-446.
31. Keyser, M., Müller, I.A., Cilliers, F.P., Nel, W. and Gouws, P.A. 2008. Ultraviolet radiation as a non-thermal treatment for the inactivation of microorganisms in fruit juice. *IFSET*, 9(3): 348-354.
32. Koutchma, T. 2008. UV Light for Processing Foods. *OS&E*, 30(1):1-6.
33. Lacivita, V., Conte, A., Manzocco, L., Plazzotta, S., Zambrini, V.A. and Nicoli MC. 2016. Surface UVC light treatments to prolong the shelf-life of fiordilatte cheese. *IFSET* 2016, (36):150-155.
34. Little, C.L., Omotoye, R. and Mitchell, R. T. 2003. The microbiological quality of ready-to-eat foods with added spices. *IJEHR*, 13(1): 31-42.
- دانشگاه علوم پزشکی تهران، شماره ۷۳، دوره ۷، صفحه ۲۲۶-۲۳۰.
۱۶. مولادوست، سولماز؛ حنیفیان، شهرام. (۱۳۹۷). آلودگی ادویه و سبزی‌های معطر عرضه شده در تبریز: جمعیت میکروبی و تنوع گونه‌ای باکتری‌های روده‌ای. بهداشت مواد غذایی، شماره ۲، دوره ۸، صفحه ۶۷-۵۵.
۱۷. یلمه، محمود؛ حبیبی‌نجفی، محمدباقر؛ نجف‌زاده، محمود. (۱۳۹۴). ارزیابی اثر پرتو فرابنفش بر رشد اشرشیاکلی و باسیلوس سرئوس جدا شده از شیرخام و برنج خام. نشریه پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران، شماره ۴، صفحه ۳۲۴-۳۱۹.
18. Bang, I.H., Kim, Y.E., Lee, S.Y. and Min, S.C. 2020. Microbial decontamination of black peppercorns by simultaneous treatment with cold plasma and ultraviolet C. *IFSET*, 102392.
19. Bakobie, N., Addae, A. S., Duwiejuah, A. B., Cobbina, S. J., and Miniyila, S. 2017. Microbial profile of common spices and spice blends used in tamale, Ghana. *Int. J. Food Contam*, 4(1), 10.
20. Bedada, T.L., Derra, F.A., Gebre, S.G., Sima, W.G., Edicho R.M., Maheder, R.F. and Asefa, Y. B. 2018. Microbial evaluation of spices in ethiopia. *TOMICROJ*, 12(1).
21. Begum, M., Hocking, A.D. and Miskelly, D.I. 2009. Inactivation of food spoilage fungi by ultraviolet (UVC) irradiation. *IJFM*, 129 (1): 74-77.
22. Cheon, H.L., Shin, J.Y., Park, K.H., Chung, M.S. and Kang, D.H. 2015. Inactivation of foodborne pathogens in powdered red pepper (*Capsicum annuum* L.) using combined UV-C irradiation and mild heat treatment. *FCJ*, 50: 441-445.
23. Dababneh, B.F. 2013. An innovative microwave process for microbial decontamination of spices and herbs. *Afr. J. Microbiol. Res*, 7(8): 636-645.
24. Dogu-Baykut, E. and Gunes, G. 2019. Ultraviolet (UV-C) radiation as a practical alternative to decontaminate thyme (*Thymus vulgaris* L.). *J. Food Process. Preserv*, 43(6): e13842.

35. Santhirasegaram, V., Razali, Z., George, D.S. and Somasundram, C. 2015. Comparison of UV-C treatment and thermal pasteurization on quality of Chokanan mango (*Mangifera indica* L.) juice. *FOOD BIOPROD PROCESS*, 94: 313–321.
36. Shankar, R., Kaushik, U. and Bhat, SA. 2014. The Emerging Technology in The Sector of Food Technology-The Non-Thermal Technology. *IJIAS* 2014, 6(4): 941-958.
37. Stoops, J., Jansen, M., Claes., J. and Campenhout, L.V. 2013. Decontamination of powdery and granular foods using continuous wave UV radiation in a dynamic process. *J. Food Eng*, 119: 254-259.
38. Tran, Mtt. and Farid, M. 2004. Ultraviolet Treatment of Orange Juice. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol*, 5(4): 495-502.
39. Watson, I., Kamble, P., Shanks, C., Khan Z. and El Darra, N. 2020. Decontamination of chilli flakes in a fluidized bed using combined technologies: Infrared, UV and ozone. *Innov. Food Sci. Emerg*, 59:1-8.

Evaluating the contamination of some Iranian most consumed spices and reduction of microbial load by UV radiation

Akbari-adergani B^{1*}, Samnezhad M², Shirkhan F³

1. Food and Drug Laboratory Research Center, Food and Drug Administration, Ministry of Health and Medical Education, Tehran, Iran.
2. Food Science and Technology, Pharmacy Faculty, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
3. Nutrition and Food Sciences Research Center, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

*Corresponding author: b.akbari@fda.gov.ir

Received: 27 December 2020

Accepted: 27 March 2021

Abstract

Spices may be contaminated during various stages of harvesting, drying, or transporting. Different methods are used to reduce the microbial level of spices, which has problems such as flavor changes. The purpose of this study was to introduce optimized conditions for UV-radiation on the reduction of microbial load of some high-consumption spices. Six types of spices, including turmeric, ginger, red pepper, black pepper, cinnamon, and sumac, were sampled from the Tehran market. Tests were carried out based on reference standards. Infected spices were then exposed to ultraviolet cabinets at 254 nm in thicknesses of 1, 5, 10 mm and 15, 10, and 5 minutes. A microbial test was performed on irradiated samples. According to the results, It was revealed that the time factor on the total count of aerobic mesophilic bacteria of turmeric, red pepper, black pepper, cinnamon, and also on the coliform count of turmeric and red pepper, as well as on the mould count of turmeric, red pepper, and black pepper had a quite significant effect ($P < 0.01$). It was observed that the thickness effect was quite significant on the total count of aerobic mesophilic bacteria, total coliform, and count of mould. It significantly impacted the total count ($p < 0.01$). The results of this study show that irradiation with UV radiation in the optimized condition can reduce the microbial content of spices to an acceptable level.

Keywords: Spice, Microbial contamination, Ultraviolet irradiation, Decontamination.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited

Copyright © 2021 Shahrekord Branch, Islamic Azad University.

بررسی اثرات اسانس و عصاره زیره سیاه (*Bunium persicum*) بر خواص میکروبی و شیمیایی

پنیر سنتی لاکتیکی

محبوبه ربانی فرد^۱، جواد طباطبائیان نیم آورد^۲، رضا شرافتی چالستری^{۳*}

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد اردستان، دانشگاه آزاد اسلامی، اردستان، ایران.

۲. گروه علوم و صنایع غذایی، واحد اردستان، دانشگاه آزاد اسلامی، اردستان، ایران.

۳. مرکز تحقیقات بیوشیمی و تغذیه در بیماری های متابولیک، دانشگاه علوم پزشکی کاشان.

*نویسنده مسئول: sharafati.reza@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۱/۱۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۱۷

چکیده

هدف از این مطالعه بررسی عصاره متانولی و اسانس زیره سیاه (*Bunium persicum*) بر ویژگی‌های شیمیایی، میکروبی و حسی پنیر لاکتیکی سنتی بود. در این مطالعه تجربی، اسانس و عصاره متانولی زیره تهیه شد. ترکیبات موجود در اسانس به روش گاز کروماتوگرافی با طیف سنج جرمی و محتوی فنولی عصاره و اسانس به روش فولین سیوکالتیو بررسی شد. پس از تهیه تیمارهای پنیر حاوی اسانس (۱۲۵ و ۲۵۰ پی پی ام) و عصاره (۱ و ۲ درصد) زیره، آزمون‌های میکروبی شامل شمارش کلیفرم‌ها، *اشرشیاکلی*، *استافیلوکوکوس کواگولاز* مثبت، کپک و مخمر و همچنین آزمون‌های شیمیایی شامل چربی، رطوبت، pH، اسیدیته و نمک در شرایط یخچالی در مدت زمان ۶۰ روز انجام شد. بیشترین ترکیبات موجود در اسانس زیره شامل cumin aldehyde (۳۰/۴۰ درصد)، phenylglycol (۱۸/۹۹ درصد) و γ -terpinene (۱۵/۵۲ درصد) بودند. میزان ترکیبات فنولی و آنتی‌اکسیدانی در عصاره زیره با اختلاف معنی‌داری بیشتر از اسانس زیره بود. اضافه کردن اسانس و عصاره به پنیر سبب جذب آب و نمک کمتری نسبت به گروه کنترل شد، اما درصد چربی افزایش پیدا کرد. در طی زمان نگهداری اسیدیته کاهش و pH افزایش یافت. نتایج حاکی از عدم آلودگی میکروبی شامل شمارش کلی فرم‌ها، کپک و مخمر، *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس ارئوس* در تمامی گروه‌های پنیر سنتی لاکتیکی بود. ارزیابی حسی پنیر حاکی از تفاوت معنادار گروه کنترل و گروه‌های حاوی اسانس زیره با گروه‌های حاوی عصاره بود. نتایج این مطالعه نشان داد که اسانس و عصاره زیره سیاه دارای فعالیت ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی بالایی در پنیر سنتی لاکتیکی بودند.

کلید واژه‌ها: پنیر سنتی لاکتیکی، زیره، اسانس، عصاره.

مقدمه

های عامل فساد، موجب به کارگیری آنها به عنوان نگهدارنده‌های غذایی شده است (Roman et al., 2017; Burt, 2004).

شیر و محصولات تهیه شده از آن، به ویژه فراورده‌های تخمیری لبنی به عنوان یکی از مواد غذایی عملگرا و حاوی آنتی‌اکسیدان، نقش مهمی در جلوگیری از تخریب اکسیداتیو در بدن ایفا می‌کنند. فرآیندهای پروتولیز و اکسیداسیون در این محصولات می‌تواند ایجاد بو و طعم

در دهه‌های اخیر، دیدگاه عمومی مصرف‌کنندگان مواد غذایی به سلامت نگهدارنده‌های شیمیایی و عکس‌العمل منفی آنها به این نوع ترکیبات، باعث افزایش تمایل به استفاده از ترکیبات طبیعی شده است. عصاره‌ها، اسانس‌های با منشأ گیاهی و همچنین اجزای تشکیل‌دهنده آنها دارای آثار بیولوژیکی مانند اثر ضد میکروبی و آنتی-اکسیدانی هستند. کاربردهای فراوان آنها به منظور کنترل رشد باکتری‌های بیماری‌زا با منشأ غذایی و یا باکتری

مزه نیز می‌باشند (Sharafati Chaleshtori et al., 2015; 2018).

زیره سیاه (*Bunium persicum*) یکی از گیاهان دارویی، گیاهی چند ساله، از خانواده چتریان (Apiaceae) و پر مصرف در ایران است که به صورت وحشی و پرورشی در مناطقی از ایران که آب و هوای خشک دارند، مانند استان‌های کرمان، فارس، اصفهان و یزد می‌روید. دانه زیره سیاه غنی از اسانس گیاهی است و از دیرباز به طور گسترده‌ای در طب سنتی برای درمان نفخ، اسهال، تب و سوء هاضمه استفاده می‌شده است. همچنین به عنوان چاشنی و طعم‌دهنده در انواع غذاها مانند گوشت و فراورده های آن، شکلات، پنیر و غیره استفاده می‌شود (فضل آرا و همکاران، ۱۳۹۱؛ Sharafati Chaleshtori et al., 2016).

در مطالعه های گذشته اثرات انواع مختلفی از اسانس ها و عصاره ها بر خواص فیزیکی شیمیایی انواعی از پنیر ها گزارش شده است (جوانمرد و مهدوی، ۱۳۹۷؛ صادقی و همکاران، ۱۳۸۹). Marcial و همکاران (۲۰۱۶) اثر اسانس پونه بر روی پنیر های سنتی آرژانتینی را بررسی و نشان دادند که اسانس پونه سبب مهار رشد کلی فرم ها، *استافیلوکوکوس/رئوس* و رشد کپک و مخمر شد. Licon و همکاران نیز (۲۰۲۰) تاثیر استفاده از اسانس های آویشن، ریحان و بادرنجبویه را بر مهار رشد کلستریدیوم تایروبوتریکوم و پنی سیلیوم وروکوزوم در پنیر را نشان دادند. محمودی و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند، اسانس پونه کوهی همراه با باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی دارای بالاترین اثر علیه لیستریا مونوسیتوژنز در پنیر سفید ایرانی بود.

بنابراین با توجه به میزان تولید پنیر های سنتی لاکتیکی در ایران و همچنین جهت افزایش زمان ماندگاری این فراورده بدون استفاده از نگهدارنده های شیمیایی، تحقیق حاضر به استفاده از اسانس و عصاره متانولی زیره سیاه و تاثیر آن بر ویژگی های شیمیایی، میکروبی و حسی پنیر سنتی لاکتیکی پرداخت.

تند نامطلوب ایجاد کرده و منجر به کاهش کیفیت تغذیه- ای می‌شوند. بنابراین به‌کار بردن ترکیباتی که موجب افزایش پایداری پروتئین ها و چربی شیر و محصولات لبنی شود از اهمیت ویژه ای برخوردار می‌باشد. پنیر به عنوان یکی از فرآورده های لبنی پر مصرف، از این قاعده مستثنی نمی‌باشد. مطالعات زیادی در مورد فعالیت آنتی-اکسیدانی شیر و محصولات لبنی انجام شده (Alaa et al., 2020; Khan et al., 2019)، با این وجود هنوز تحقیقات جهت استفاده از آنتی اکسیدان‌های طبیعی در این محصولات و به خصوص انواع پنیرها، جهت ارتقای پایداری و ایمنی میکروبی این فرآورده ها وجود دارد. پنیر به‌دلیل داشتن مواد مغذی، محیط مناسبی برای رشد انواع میکروارگانیسم‌ها است. در دنیا انواع زیادی از پنیر ها تولید می‌شود (بیش از ۱۰۰۰ نوع) که هر یک پروفایل میکروبی منحصر به خود را دارد. پنیر یک فرآورده لبنی دینامیک است و طول مدت زمان نگهداری آن در شرایط مختلف سبب تغییرات فیزیکی شیمیایی و میکروبی به ویژه در طی دوران رسیدن آن می‌شود (طاهرخانی و همکاران، ۱۳۹۴؛ Sihufe et al., 2006 ; Fuka et al., 2013). پنیر لاکتیکی یکی از انواع پنیرهاست که از انعقاد شیر تازه همراه با گرمادهی پس از کاهش pH پس از افزودن ماست حاصل می‌شود و این فرآورده پس از تهیه و بسته-بندی آماده استفاده است (استاندارد ملی ایران، ۱۳۹۰).

امروزه تولیدکنندگان مواد غذایی توجه زیادی به افزایش زمان ماندگاری محصولات غذایی دارند و استفاده از نگهدارنده های طبیعی با منشأ گیاهی و میکروبی به جای نگهدارنده های شیمیایی در محصولات خود را با توجه به دیدگاه مصرف کنندگان ارجح می‌دانند. اکثر عصاره ها و اسانس های گیاهی به دلیل داشتن ترکیبات فیتوشیمیایی از قبیل ترکیبات فنولی، فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروارگانیسمی قابل توجهی نشان می‌دهند. این ترکیبات به طور گسترده در گیاهان وجود داشته و علاوه بر افزایش کیفیت ماده غذایی، از عوامل ایجاد رنگ، طعم و

روش کار

در این مطالعه تجربی، اسانس و دانه های زیره سیاه از شرکت فیض کاشان (کاشان، ایران) تهیه شدند. سپس دانه ها در دمای اتاق و به دور از تابش مستقیم نور خورشید خشک شدند و با استفاده از آسیاب پودر شدند. استخراج عصاره متانولی با روش پرکولاسیون و در مرکز تحقیقات تغذیه و بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی کاشان انجام شد. ۱۰۰ گرم از پودر خشک شده را در داخل پرکولاتور که انتهای آن پنبه بود، قرار داده و سپس به آن ۵۰۰ سی سی متانول ۸۰٪، اضافه شد. آنقدر این کار ادامه یافت با دیگر محلول رنگی از پرکولاتور خارج نشود. سپس عصاره بدست آمده، توسط کاغذ صافی فیلتر شده و عصاره متانولی بدست آمده در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد در انکوباتور خشک شد و تا زمان استفاده در شیشه عایق در یخچال نگهداری شد (حاجی مهدی پور و همکاران، ۱۳۸۸).

جهت بررسی اجزاء اسانس، ۲ میکرولیتر از اسانس نمونه به دستگاه گازکروماتوگرافی با طیف سنج جرمی مدل Agilent 6890A مجهز به ستون BPX5 به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلیمتر و ضخامت لایه ۰/۲۵ میکرومتر متصل به طیف نگار جرمی مدل Agilent 5973N تزریق شد. دمای ابتدایی آن ۵۰ درجه سلسیوس و گرادیان حرارتی ۳ درجه سلسیوس در هر دقیقه (۴ °C/min)، افزایش دما تا ۳۰۰ درجه سانتی گراد، دمای اتاقت تزریق ۲۹۰ درجه سلسیوس، گاز هلیوم با درجه خلوص ۹۹/۹۹٪ به عنوان فاز متحرک (گاز حامل) با سرعت جریان ۰/۵ میلی لیتر در دقیقه انتخاب شد. طیف نگار جرمی با ولتاژ ۷۰ الکترون ولت، روش یونیزاسیون EI و دمای منبع یونیزاسیون ۲۲۰ درجه سلسیوس بود. پس از تزریق اسانس، کروماتوگرام حاصله و طیفهای جرمی ترکیبات مختلف موجود در آن بررسی شد. شناسایی طیف ها به کمک بانک اطلاعات جرمی، زمان بازداری (R_t)، اندیس کواتس (KI) و مقایسه با طیف های جرمی استاندارد و استفاده از منابع معتبر و اطلاعات

موجود در کتابخانه دستگاه GC/MS (Wiley & NIST) صورت گرفت. همچنین با توجه به سطح زیر منحنی هر یک از پیک های کروماتوگرام GC و مقایسه آن با سطح کل زیر منحنی، درصد نسبی هر یک از اجزاء متشکله اسانس تعیین گردید (Ahmadi-Dastgerdi et al., 2007; Adams, 2017).

میزان ترکیبات فنلی کل براساس روش رنگ سنجی فولین-سیوکالتیو و بر حسب اسید گالیک و همچنین تعیین میزان خاصیت آنتی اکسیدانی با روش احیا آهن بر حسب میلی مول Fe^{+2} در گرم گیاه خشک توصیف شده در مطالعه جدی و همکاران (۱۳۹۸) انجام شد.

جهت تهیه پنیر سنتی لاکتیکی، ابتدا شیر به دمای ۹۰ درجه رسانده شد. سپس توسط سرکه سفید به pH ایزوالکتریک رسانده شده و روی پارچه صافی که روی آبکشی قرار داده شده ریخته شد. بعد از آگیری لخته، تیمار های مورد نظر شامل: پنیر شاهد (پنیر فاقد اسانس و عصاره زیره)، تیمار ۱ (پنیر لاکتیکی حاوی ۱۲۵ ppm اسانس)، تیمار ۲ (پنیر لاکتیکی حاوی ۲۵۰ ppm اسانس)، تیمار ۳ (پنیر لاکتیکی حاوی ۱ درصد عصاره) و تیمار ۴ (پنیر لاکتیکی حاوی ۲ درصد عصاره) تهیه شدند. سپس به مدت ۲ ساعت تحت فشار جسم سنگینی قرار گرفتند. در مرحله آخر برش های پنیر به محلول آب نمک جوشیده ۷ درصد اضافه شدند. نمونه های پنیر به مدت ۶۰ روز در دمای یخچال نگهداری شدند و با فواصل ۱۵ روزه آزمون های شیمیایی، میکروبی و حسی روی آنها انجام گرفت (استاندارد ملی ایران، ۱۳۹۰؛ استاندارد ملی ایران، ۱۳۹۵).

آزمون های شیمیایی طبق استاندارد ملی ایران شامل: رطوبت (۱۷۵۳)، چربی (۷۶۰)، pH (۲۸۵۲)، اسیدیته (۲۸۵۲) و نمک (۱۸۰۹) و آزمون های میکروبی نیز شامل: شناسایی کلی فرم ها (۱۱۱۶۶)، شناسایی/شریشیا کلی (۵۲۳۴)، استافیلوکوکوس/رئوس کواگولاز مثبت (۳-۶۸۰۶) و کپک و مخمر (۱۰۱۵۴) در روز های صفر، ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ بر روی نمونه های پنیر انجام شدند

ترکیبات شیمیایی اسانس و عصاره زیره سیاه: بر اساس نتایج بدست آمده میزان ماده خشک بدست آمده عصاره متانولی برابر ۷/۵ درصد بود. نتایج مربوط به ترکیبات موجود در اسانس زیره به روش کروماتوگرافی گازی- طیف سنج جرمی در جدول ۱ قابل مشاهده است. طبق نتایج بدست آمده میزان ترکیبات شناسایی شده ۹۶/۸۸ درصد بود. بیشترین ترکیبات موجود در اسانس زیره شامل cumin aldehyde (۳۰/۴۰ درصد)، γ -terpinene (۱۵/۵۲ درصد)، phenylglycol (۱۸/۹۹ درصد)، α -terpinyl acetate (۸/۹۲ درصد)، β -pinene (۵/۳۵ درصد) و (۴/۷۶ درصد) بود. کروماتوگرام اسانس در شکل شماره ۱ قابل مشاهده است.

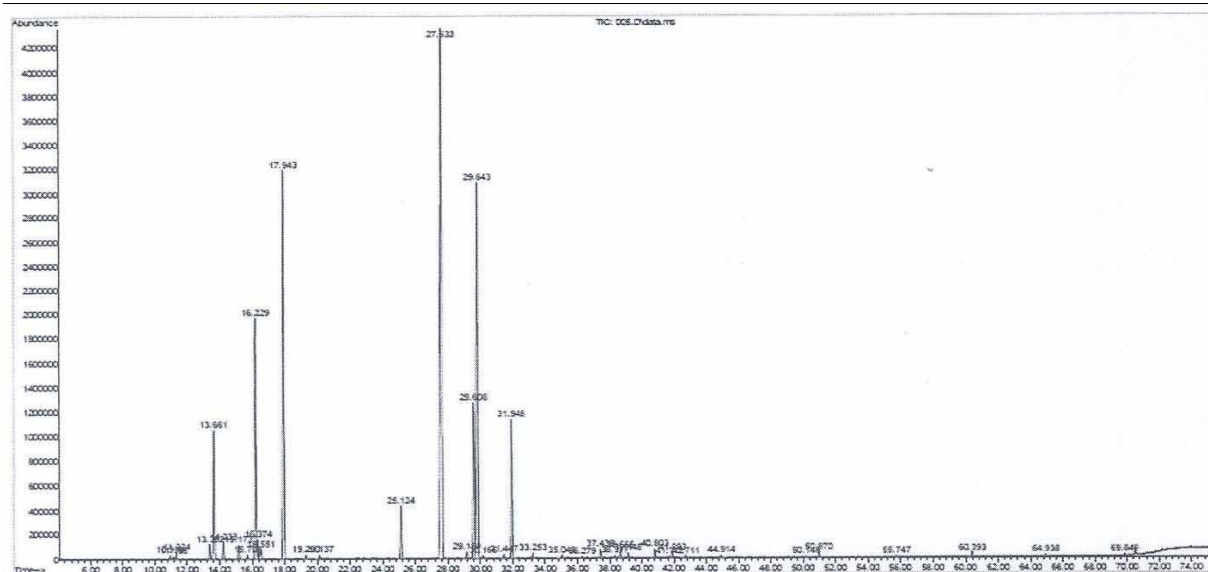
(استاندارد ملی ایران، ۱۳۹۵). همچنین جهت ارزیابی حسی با استفاده از یک گروه ارزیاب ده نفره آموزش دیده از کارشناسان آزمایشگاه کنترل غذای دانشگاه علوم پزشکی کاشان (در محدوده سنی ۲۲ تا ۵۰ سال)، طعم، بو، رنگ و پذیرش کلی طبق روش هدونیک پنج نقطه ای انجام گرفت (جدی و همکاران، ۱۳۹۸). کلیه آزمایش‌ها در سه تکرار انجام گرفت و مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون ANOVA در سطح معنی داری $p < 0.05$ انجام گرفت. رسم منحنی‌ها با نرم‌افزار Excel نسخه ۲۰۱۰ انجام شد. برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از نرم افزار SAS V 9.1 استفاده شد.

نتایج

جدول ۱: ترکیبات شناسایی شده در اسانس زیره به روش کروماتوگرافی گازی- طیف سنج جرمی

ردیف	نام ترکیب	RT (Retention time)	KI (Kovats index)	درصد	نوع
۱	α -Thujene	۱۰/۹۴	۹۲۶	۰/۱۳	MH
۲	α -Pinene	۱۱/۳۲	۹۳۴	۰/۲۶	MH
۳	sabinene	۱۳/۳۹	۹۷۵	۰/۵۶	MH
۴	β -Pinene	۱۳/۳۶	۹۸۱	۴/۷۶	MH
۵	Myrcene	۱۴/۲۳	۹۹۲	۰/۵۸	MH
۶	α -phellandrene	۱۵/۱۸	۱۰۱۰	۰/۵۴	MH
۷	α -Terpinene	۱۵/۷۱	۱۰۲۱	۰/۱۵	MH
۸	o-cymene	۱۶/۲۳	۱۰۳۱	۸/۹۲	MH
۹	Limonene	۱۶/۳۶	۱۰۳۳	۰/۶۹	MH
۱۰	Eucalyptol	۱۶/۵۵	۱۰۳۷	۰/۵۴	MO
۱۱	γ -Terpinene	۱۷/۹۴	۱۰۶۴	۱۵/۵۲	MH
۱۲	α -Terpinolene	۱۹/۲۹	۱۰۹۰	۰/۱۵	MH
۱۳	Linalool	۲۰/۱۴	۱۱۰۶	۰/۱۲	MO
۱۴	Cumin aldehyde	۲۷/۶۳	۱۲۶۱	۳۰/۴۰	Other
۱۵	phellandral	۲۹/۱۶	۱۲۹۳	۰/۲۹	Other
۱۶	R-Benzenemethanol, α -(1-methylethyl)	۲۹/۶۱	۱۳۰۲	۶/۸۰	Other
۱۷	phenylglycol	۲۹/۸۴	۱۳۰۸	۱۸/۹۹	Other
۱۸	Carvacrol	۳۰/۱۷	۱۳۱۵	۰/۱۱	MO
۱۹	p-Mentha-1,4-dien-7-o1	۳۱/۴۵	۱۳۴۴	۰/۱۷	MO
۲۰	α -Terpinyl acetate	۳۱/۹۴	۱۳۵۵	۵/۳۵	MO
۲۱	Geranyl acetate	۳۳/۲۵	۱۳۸۵	۰/۱۹	MO
۲۲	Caryophyllene	۳۵/۰۴	۱۴۲۶	۰/۱۳	SH
۲۳	Cis- β -Farnesene	۳۶/۲۸	۱۴۵۶	۰/۰۶	SH

SH	۰/۳۲	۱۵۱۴	۳۸/۶۷	β bisabolene	۲۴
SH	۰/۲۱	۱۵۲۶	۳۹/۱۵	δ-Cadinene	۲۵
SO	۰/۳۳	۱۵۶۸	۴۰/۸۰	Nerolidol	۲۶
SO	۰/۰۷	۱۵۹۱	۴۱/۷۱	Spathulenol	۲۷
SO	۰/۲۰	۱۵۹۶	۴۱/۸۹	Ceryophyllene oxide	۲۸
SO	۰/۱۲	۱۶۱۷	۴۲/۷۱	Carotol	۲۹
SO	۰/۲۲	۱۸۴۶	۵۰/۹۴	Hexahydrofarnesyl acetone	۳۰
-	۹۶/۸۸	-	-	Total identified	
				Monoterpene	
	۳۲/۲۶	-	-	Hydrocarbons (MH)	
	۶/۴۸	-	-	Oxygenated	
				Monoterpenes (MO)	
	۰/۷۲	-	-	Sesquiterpene	
				Hydrocarbons (SH)	
	۰/۹۴	-	-	Oxygenated Sesquiterpenes (SO)	
	-	-	-	Diterpene Hydrocarbons (DH)	
	-	-	-	Oxygenated Diterpenes (DO)	
	۵۶/۴۸	-	-	Other	



شکل ۱: کروماتوگرام اسانس زیره

نتایج، میزان ترکیبات فنولی در عصاره زیره به طور معنی داری بیشتر از اسانس زیره بود ($P < 0/05$).

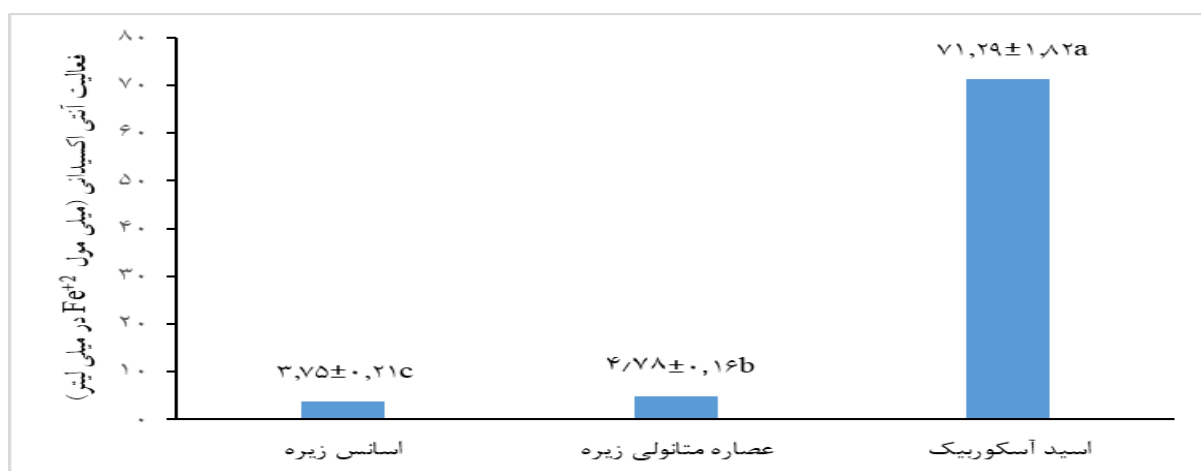
میزان ترکیبات فنولی در اسانس و عصاره متانولی زیره سیاه در شکل شماره ۲ قابل مشاهده است. بر اساس



شکل ۲: میزان فنول تام به روش فولین سیوکالتیو در عصاره متانولی و اسانس زیره حروف نامتشابه (a,b) در هرروز نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری در $p < 0/05$ می‌باشد.

بالاتر از اسانس زیره بود ($P < 0/05$). همچنین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسید آسکوربیک به عنوان مرجع بسیار بالاتر از عصاره متانولی و اسانس زیره بود.

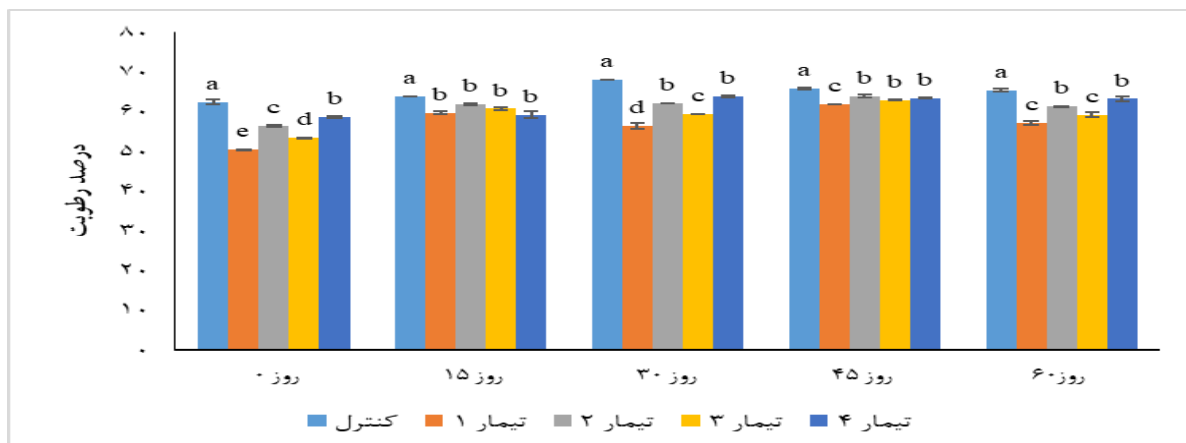
نتایج فعالیت آنتی‌اکسیدانی بر اساس روش احیا آهن در شکل شماره ۳ قابل مشاهده است. تفاوت معنی‌داری بین خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره و اسانس زیره مشاهده شد به طوری که فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی زیره



شکل ۳: میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش احیا آهن در عصاره متانولی زیره، اسانس زیره و آنتی‌اکسیدان اسید آسکوربیک حروف نامتشابه (a,b,c) در هرروز نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری در $p < 0/05$ می‌باشد.

مشاهده است. طبق نتایج بدست آمده در روز صفر بیشترین میزان درصد رطوبت مربوط به گروه کنترل با $62/5 \pm 0/7$ درصد بود. کمترین میزان رطوبت نیز مربوط به تیمار ۱ (پنیر حاوی ۱۲۵ ppm اسانس زیره) با $0/2$ درصد بود.

بررسی ویژگی‌های شیمیایی، میکروبی و حسی پنیر سنتی لاکتیکی میزان بازدهی تولید پنیر در روش سنتی تولید لاکتیکی پنیر به واسطه استفاده از اسید استیک (سرکه) ۱۰ درصد بود. میزان رطوبت نمونه‌های پنیر در شکل شماره ۴ قابل

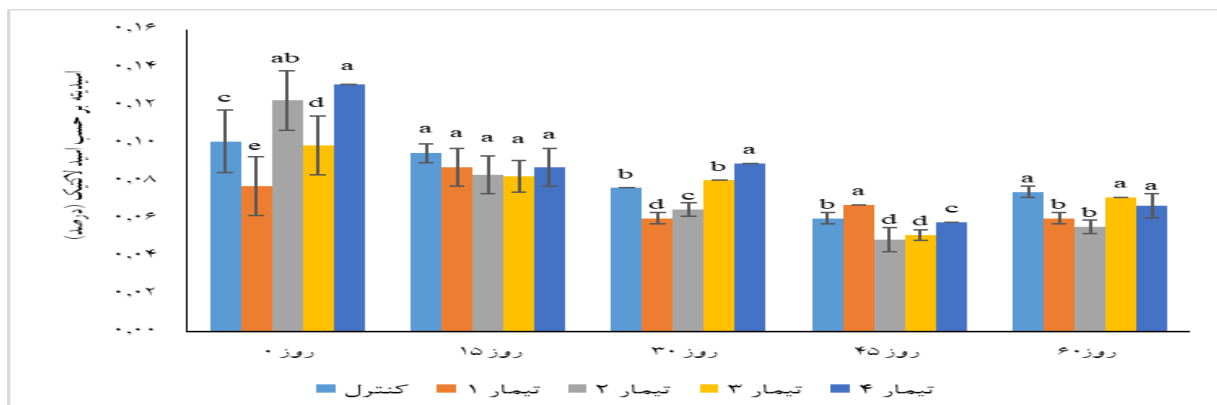


شکل ۴: درصد رطوبت گروه های مختلف پنیر تهیه شده با غلظت های مختلف اسانس و عصاره زیره. کنترل: پنیر فاقد اسانس و عصاره زیره، تیمار ۱: پنیر حاوی ۱۲۵ ppm اسانس زیره، تیمار ۲: پنیر حاوی ۲۵۰ ppm اسانس زیره، تیمار ۳: پنیر حاوی ۱ درصد عصاره زیره، تیمار ۴: پنیر حاوی ۲ درصد عصاره زیره.

حروف نامتشابه (a,b,c,d) در هر روز نشان دهنده تفاوت معنی داری در $P < 0.05$ می باشد

گزارش شد. با این وجود در طی زمان نگهداری میزان اسیدیته کاهش محسوسی نشان داد و در محدوده ۰/۰۶ تا ۰/۰۷ درصد بود.

نتایج مربوط به اسیدیته گروه های مختلف پنیر لاکتیکی سنتی در شکل ۵ قابل مشاهده است. بر اساس نتایج میزان اسیدیته در روز صفر بین ۰/۱ تا ۰/۱۳ درصد

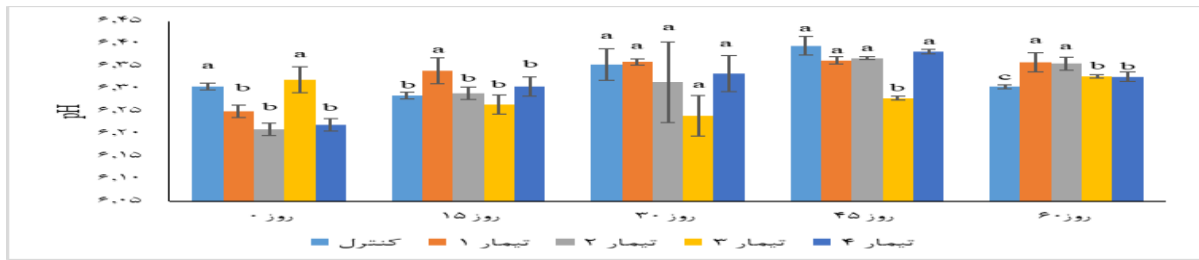


شکل ۵: میزان اسیدیته بر حسب درصد اسید لاکتیک در گروه های مختلف پنیر تهیه شده با غلظت های مختلف اسانس و عصاره زیره. کنترل: پنیر فاقد اسانس و عصاره زیره، تیمار ۱: پنیر حاوی ۱۲۵ ppm اسانس زیره، تیمار ۲: پنیر حاوی ۲۵۰ ppm اسانس زیره، تیمار ۳: پنیر حاوی ۱ درصد عصاره زیره، تیمار ۴: پنیر حاوی ۲ درصد عصاره زیره.

حروف نامتشابه (a,b,c,d) در هر روز نشان دهنده تفاوت معنی داری در $P < 0.05$ می باشد.

معنادار بین گروه کنترل و تیمار ها مشاهده شد ($P < 0.05$). ولی در روز ۳۰ و ۶۰ این تغییرات معنادار نبودند.

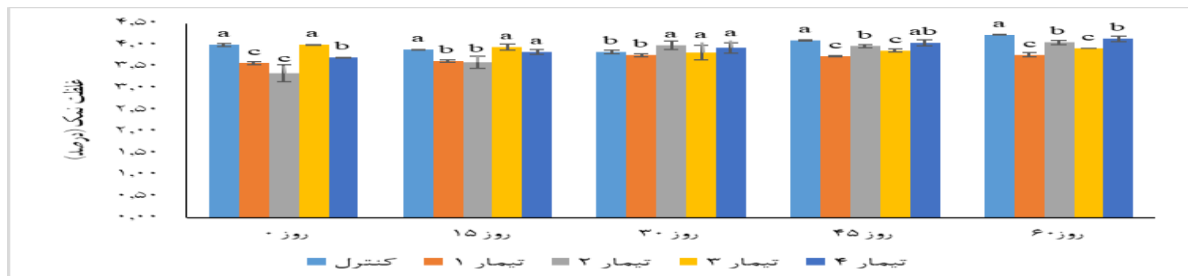
نتایج بدست آمده از pH با نتایج اسیدیته مطابقت داشت. میزان pH در طی زمان نگهداری کمی افزایش داشته است (شکل ۶). با این وجود در هر روز نیز تفاوت های



شکل ۶: میزان pH در گروه های مختلف پنیر تهیه شده با غلظت های مختلف اسانس و عصاره زیره. کنترل: پنیر فاقد اسانس و عصاره زیره، تیمار ۱: پنیر حاوی ۱۲۵ ppm اسانس زیره، تیمار ۲: پنیر حاوی ۲۵۰ ppm اسانس زیره، تیمار ۳: پنیر حاوی ۱ درصد عصاره زیره، تیمار ۴: پنیر حاوی ۲ درصد عصاره زیره.

حروف نامتشابه (a,b,c,d) در هر روز نشان دهنده تفاوت معنی داری در $P < 0.05$ می باشد.

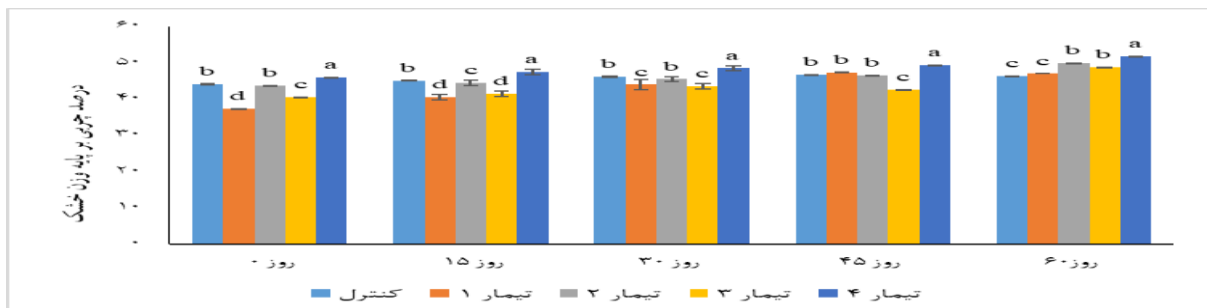
نتایج میزان غلظت نمک در شکل ۷ مشخص شده است. بر اساس نتایج در روز صفر تفاوت معناداری بین گروه کنترل و تیمار های ۱، ۲ و ۴ مشاهده می شود.



شکل ۷: میزان غلظت نمک بر پایه وزن مرطوب در گروه های مختلف پنیر تهیه شده با غلظت های مختلف اسانس و عصاره زیره. کنترل: پنیر فاقد اسانس و عصاره زیره، تیمار ۱: پنیر حاوی ۱۲۵ ppm اسانس زیره، تیمار ۲: پنیر حاوی ۲۵۰ ppm اسانس زیره، تیمار ۳: پنیر حاوی ۱ درصد عصاره زیره، تیمار ۴: پنیر حاوی ۲ درصد عصاره زیره. حروف نامتشابه (a,b,c,d) در هر روز نشان دهنده تفاوت معنی داری در $P < 0.05$ می باشد.

۴۵ درصد چربی افزایش پیدا کرده است. به طوری که این افزایش در روز ۶۰ به طور واضح مشهود است و تمامی تیمار ها دارای درصد چربی بالاتری نسبت به گروه کنترل بودند. در روز ۶۰ بیشترین میزان چربی مربوط به تیمار ۲ پنیر حاوی ۲ درصد عصاره زیره بود.

نتایج میزان چربی بر پایه وزن خشک در شکل ۸ قابل مشاهده است. طبق نتایج بیشترین میزان چربی در روز صفر مربوط به تیمار ۴ و کمترین میزان مربوط به تیمار ۱ می باشد. هرچند که تیمارهای ۲ و ۳ نیز میزان چربی کمتری نسبت به گروه کنترل داشتند. با این حال در روز



شکل ۸: میزان درصد چربی بر پایه وزن خشک در گروه های مختلف پنیر تهیه شده با غلظت های مختلف اسانس و عصاره زیره. کنترل: پنیر فاقد اسانس و عصاره زیره، تیمار ۱: پنیر حاوی ۱۲۵ ppm اسانس زیره، تیمار ۲: پنیر حاوی ۲۵۰ ppm اسانس زیره، تیمار ۳: پنیر حاوی ۱ درصد عصاره زیره، تیمار ۴: پنیر حاوی ۲ درصد عصاره زیره. حروف نامتشابه (a,b,c,d) در هر روز نشان دهنده تفاوت معنی داری در $P < 0.05$ می باشد.

درصد عصاره خواص آنتی اکسیدانی مشاهده شد ($p < 0/05$). در تیمار حاوی ۲ درصد عصاره زیره این خواص بیشتر بود. همچنین در طی زمان نیز خاصیت آنتی اکسیدانی کاهش پیدا کرد ($p < 0/05$).

نتایج خواص آنتی اکسیدانی پنیر در طی زمان نگهداری ۶۰ روزه نشان داد که در گروه کنترل و تیمار های حاوی اسانس در روز صفر تا ۶۰ هیچ گونه فعالیتی مشاهده نشد (جدول ۲). با این وجود در تیمار های حاوی ۱ درصد و ۲

جدول ۲: میزان خاصیت آنتی اکسیدانی پنیر حاوی اسانس و عصاره متانولی زیره در طی زمان نگهداری ۶۰ روزه در شرایط یخچالی

روز					
۶۰	۴۵	۳۰	۱۵	۰	گروه ها
.	کنترل
.	پنیر حاوی ۱۲۵ ppm اسانس زیره
.	پنیر حاوی ۱۲۵ ppm اسانس زیره
۰.۰۸±۰.۸۸۷ Ad	۱.۳۱ ۰.۰۸± Ac	۲.۰۵ ۰.۰۷± Ab	۳.۸ ۰.۱۴± Aa		پنیر حاوی ۱ درصد عصاره زیره
۰.۳۰۷ ± ۰.۲۴ Bd	۳.۴۷ ± ۰.۱۸ Bc	۴ ۰.۱۴± Bb	۴.۳۱ ± ۰.۱۲ Ba		پنیر حاوی ۲ درصد عصاره زیره

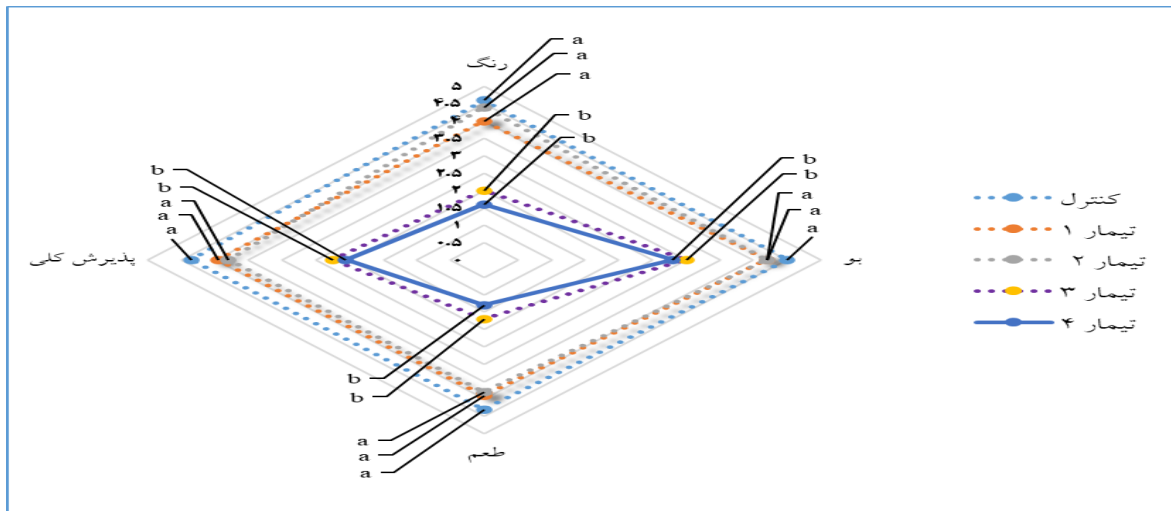
حروف نامتشابه (A,B) در هر روز (ستون) نشان دهنده تفاوت معنی داری در $p < 0/05$ می باشد.

حروف نامتشابه (a,b,...) در هر ردیف نشان دهنده تفاوت معنی داری در $p < 0/05$ می باشد.

پذیرش کلی بین گروه کنترل و گروه های حاوی اسانس ۱۲۵ و ۲۵۰ ppm اسانس زیره تفاوت معنا داری مشاهده نشد و همه شاخص های مذکور از نظر مصرف کنندگان در حد خوب تا بسیار خوب قرار داشتند. همچنین طبق نتایج پنیر با میزان اسانس کمتر پذیرش کلی بهتری نسبت به پنیر با غلظت بالاتر اسانس داشت. از طرفی پنیر های حاوی عصاره ها در همه شاخص های رنگ، بو، طعم و پذیرش کلی به طور معنا داری با گروه کنترل و گروه های حاوی اسانس تفاوت داشتند و کمترین نمرات را از نظر مصرف کنندگان دریافت کردند.

نتایج این مطالعه نشان داد که در روز صفر تمامی نمونه های گروه های کنترل، تیمار ۱ (پنیر به همراه ۱۲۵ ppm اسانس زیره)، تیمار ۲ (پنیر به همراه ۲۵۰ ppm اسانس زیره)، تیمار ۳ (پنیر به همراه ۱ درصد عصاره زیره) و تیمار ۴ (پنیر به همراه ۲ درصد عصاره زیره) آلودگی میکروبی نداشتند. همچنین نتایج در روزهای ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ نیز نشان از عدم آلودگی میکروبی شامل شمارش کلی فرم ها، شمارش کپک و مخمر، جستجوی اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس ارتوس در تمامی گروه های مذکور بود.

نتایج خواص حسی در شکل ۹ قابل مشاهده است. بر اساس نتایج بدست آمده در شاخص های رنگ، بو، طعم و



شکل ۹: خواص ارگانولپتیک گروه های مختلف پنیر تهیه شده با غلظت های مختلف اسانس و عصاره زیره. کنترل: پنیر فاقد اسانس و عصاره زیره، تیمار ۱: پنیر حاوی ۱۲۵ ppm اسانس زیره، تیمار ۲: پنیر حاوی ۲۵۰ ppm اسانس زیره، تیمار ۳: پنیر حاوی ۱ درصد عصاره زیره، تیمار ۴: پنیر حاوی ۲ درصد عصاره زیره.

حروف نامتشابه (b,a) در هر روز نشان دهنده تفاوت معنی داری در $P < 0.05$ می باشد.

شیمیایی اسانس تحت تاثیر فاکتورهای مختلف همچون شرایط محیطی و جغرافیایی، زمان رشد گیاه، زمان جمع-آوری گیاه، نور، رطوبت، ویژگی های فیزیکی و شیمیایی خاک، شرایط آب و هوایی، روش خشک کردن گیاه، روش استخراج اسانس، سن گیاه و ... است (Ahmadi-Dastgerdi et al., 2017).

ترکیبات فنولی، متابولیت های ثانویه گیاهی با تاثیرات بیولوژیکی متعدد همچون فعالیت آنتی اکسیدانی و فعالیت ضد باکتریایی هستند (Ghasemi Pirbalouti et al., 2011). شکوه صارمی و همکاران، (۱۳۹۷). اسانس و عصاره گیاه زیره سبز به ترتیب دارای ۳۱/۶ و ۴۱۷/۱ میلی گرم در میلی لیتر معادل اسید گالیک ترکیبات فنولی بودند. این ترکیبات با خاصیت مهار رادیکال های آزاد یا محدود کردن چرخه تولیدی آنها، اثرات آنتی اکسیدانی خود را اعمال می کنند. همچنین ترکیبات موثره گیاهان علاوه بر اثر روی رادیکال های آزاد، به واسطه واکنش با فلزات و دیگر ترکیبات که باعث راه اندازی فرآیند اکسیداسیون می شوند و همچنین فرونشاندن ترکیبات فعال اکسیژن دار، باعث به تاخیر انداختن یا ممانعت از اکسیداسیون می گردند (قاسمی و همکاران، ۱۳۹۶). نتایج بدست آمده از تست

بحث

ترکیبات شیمیایی اسانس و عصاره زیره سیاه مطالعه حاضر به بررسی خواص بیولوژیکی اسانس و عصاره زیره سیاه در شرایط آزمایشگاهی و مدل غذایی پنیر پرداخت. بر اساس نتایج بدست آمده ۳۰ ترکیب در اسانس شناسایی شد که بالاترین مقدار آنها برای ترکیبات cumin phenylglycol aldehyde ، γ -terpinene ، α -terpinyl acetate و β -pinene بود. طاهرخانی و همکاران (۱۳۹۴)، تعداد ۲۱ ترکیب را در اسانس زیره سیاه شناسایی کردند و بیشترین ترکیبات نیز شامل پروپانال ۲- متیل ۳- فنیل (۲۶/۰۵ درصد) و گاما تر پینن (۲۱/۸۶ درصد) بودند. در مورد ترکیبات شیمیایی اسانس زیره سیاه گزارش های مختلفی وجود دارد زیرا کیفیت اسانس آن تحت تاثیر شرایط محیطی و ساختار ژنتیکی است که در مناطق مختلف، می تواند متفاوت باشد. در مطالعه دیگری مشابه با مطالعه حاضر بیشترین میزان ترکیبات اسانس زیره سیاه، cumin aldehyde (۳۸/۴ درصد)، γ -terpinene (۱۸/۳۲ درصد)، p-cymene (۱۵/۴۷ درصد) و β -pinene (۱۱/۷۲ درصد) بودند (Sharafati Chaleshtori et al., 2018). ترکیبات

نتایج این تحقیق نشان داد در روز اول تقریباً اسیدیته نزدیک به مقدار تعریف شده در استاندارد ملی (۱۵/۱۰- درصد) به شماره ۱۳۸۶۳ بودند. ولی از روز پانزدهم نگهداری، کاهش اسیدیته در تمامی گروه‌ها مشخص شد. نتایج حاصل از اندازه‌گیری pH در مراحل مختلف رسیدن و نگهداری پنیر نشان داد این مقادیر در طول نگهداری افزایش یافت. مقایسه نتایج pH با استاندارد ملی (۶- pH=۵/۲) به شماره ۱۳۸۶۳ حاکی از بالاتر بودن pH تمامی نمونه‌ها بود. به نظر می‌رسد زمان استفاده از اسید سیتریک (سرکه) جهت تهیه لخته و خارج شدن آن سریعاً بعد از آب‌گیری لخته‌ها یکی از دلایل بالا بودن pH باشد. بعلاوه با توجه به قرارگیری ۶۰ روزه پنیر در آب پنیر نیز خروج اسیدلاکتیک اتفاق افتاده و سبب افزایش pH شده است که همراستا با نتایج اسیدیته می‌باشد.

نتایج مطالعه حاضر در توافق با نتایج Guinee و همکاران (۲۰۰۷) بود. آنها دلیل افزایش pH در پنیر را به علت کاهش نسبت لاکتات- پروتئین گزارش کردند که موجب کاهش خواص بافنی لخته پنیر می‌شود، به طوری که حذف اسید لاکتیک موجب افزایش حلالیت کلسیم و فسفر می‌شود. کلسیم و فسفر عوامل اصلی ایجادکننده خواص بافنی در پنیر بوده و سبب افزایش pH می‌شوند.

مقایسه نتایج غلظت نمک با استاندارد ملی (حداکثر ۴ درصد بر پایه وزن مرطوب) به شماره ۱۳۸۶۳ حاکی از پایین تر بودن تمامی گروه‌های تیمار در روزهای صفر تا ۴۵ روز بود، ولی در روز ۶۰ تیمارهای ۲ و ۴ بالاتر از حد مجاز استاندارد شدند. این احتمال وجود دارد که افزودن اسانس و عصاره سبب کاهش جذب نمک شده باشد. با این وجود در طی زمان نگهداری با به تعادل رسیدن نمک موجود در لخته و آب پنیر نهایتاً روند افزایشی جذب نمک صورت گرفته است. ولی در گروه‌های تیمار این میزان کمتر مشاهده شد.

نتایج میزان چربی بر پایه وزن خشک در شکل ۸ قابل مشاهده است. طبق نتایج به جز در تیمار ۱، در تمامی

خاصیت آنتی‌اکسیدان اسانس و عصاره زیره سیاه نشان داد که اسانس و عصاره این گونه، دارای خواص آنتی‌اکسیدانی خوبی می‌باشد (به ترتیب ۳/۷۵ و ۴/۷۸ میلی-مول آهن بر میلی‌لیتر). حقیر السادات و همکاران در سال ۱۳۹۳، نشان داد که میزان ترکیبات فنولی اسانس زیره سیاه ۱۱۷/۰۹ میلی گرم معادل گالیک اسید بر گرم بود و خاصیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH با IC50 برابر ۲/۸۵ میکروگرم در لیتر بود. همچنین احمدی و همکاران (۱۳۹۵) میزان ترکیبات فنولی در عصاره هیدرو الکلی زیره سیاه را برابر ۹۲/۴ میلی گرم معادل گالیک اسید بر گرم گزارش دادند. در مطالعه دیگری مقدار ترکیبات فنولی در عصاره متانولی-آبی زیره سیاه، ۹۵۵/۷۷ میلی گرم در کیلوگرم و خاصیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH با IC50 برابر ۱۰۴/۷۶ میکروگرم در میلی لیتر بود (سلیمانی فر و همکاران، ۱۳۹۴).

ویژگی‌های پنیر سنتی لاکتیکی

نتایج میزان رطوبت نشان می‌دهد که در طول زمان نگهداری در گروه کنترل تا روز ۳۰ ام، افزایش جذب آب توسط لخته پنیر اتفاق افتاده و بعد از آن دوبار از لخته آب‌گیری شده است که نشان دهنده به تعادل رسیدن فشار اسمزی و جذب نمک در لخته و آب نمک می‌باشد. در سایر تیمارها نیز این شرایط قابل مشاهده است. اضافه کردن اسانس و عصاره به پنیر سبب جذب آب کمتری نسبت به گروه کنترل شده است. این تغییرات به ویژه در تیمار ۱ و ۳ دیده می‌شود. طبق نتایج تمامی گروه‌های تیمار در تمامی روزها از نظر این شاخص طبق استاندارد ملی ایران (حداکثر ۶۵ درصد) شماره ۱۳۸۶۳ بودند. روشی و همکاران (۱۳۹۶) دریافتند درصدهای مختلف اسانس آویشن تاثیر معنی‌داری بر درصد رطوبت بر پنیر موزارلا نداشت، اما نمونه‌های حاوی درصدهای بالاتر اسانس، رطوبت بالاتری از دست داده‌اند. احتمالاً کاهش هیدروژن موجود در کارژین در این دوره زمانی نگهداری سبب کاهش رطوبت بوده است.

نتایج میکروبی مطالعه حاضر حاکی از آن است که پنیر سنتی لاکتیکی تهیه شده قابلیت ماندگاری ۲ ماهه در شرایط نگهداری دمای یخچالی را داشت و تفاوت معنی داری در افزودن اسانس و عصاره زیره به پنیر سنتی لاکتیکی مشاهده نشد. به نظر می‌رسد نحوه تولید پنیر سنتی لاکتیکی در زمان آماده سازی اولیه شیر در دمای ۹۰ درجه سانتیگراد و همچنین استفاده از آب نمک ۷ درصد و شرایط دمای یخچالی سبب مهار رشد میکروبی شده است.

طاهرخانی و همکاران (۱۳۹۴) فعالیت ضد میکروبی اسانس زیره سیاه کرمانی در سامانه پنیر گودا را بررسی کردند و نشان دادند که اسانس زیره سیاه کرمانی سبب کاهش در تعداد گروه‌های میکروبی مختلف (مزوفیل، هوازی، آنتروکوک‌ها، لاکتوباسیل‌های مزوفیل، آنتروباکتریاسه، لاکتوکوکوس و مخمرها) شد. در مطالعه ای اثر ضد لیستریا مونوسیژنوز و استافیلوکوکوس ارئوس اسانس پونه کوهی و همچنین در ترکیب با لاکتوباسیلوس کازئی در طی فرایند تولید، رسیدن و نگهداری پنیر سفید ایرانی نشان داده شد (Ehsani and Mahmoudi, 2013). عزیزخانی و همکاران (۱۳۹۵) با بررسی تاثیر اسانس های ریحان و مریم گلی بر رشد لیستریا مونوسیژنوز، اسپرژیلوس فلاووس در پنیر سفید ایرانی مشاهده کردند تاثیر اسانس ریحان در مقایسه با اسانس مریم گلی در برابر باکتری لیستریا مونوسیژنوز در پنیر طی دوره نگهداری ۲۱ روز پایین تر بود. با این وجود توجه به اینکه در مواد غذایی نه تنها عوامل داخلی نظیر مقادیر pH، نمک، پروتئین، آب و غیره می‌توانند بر روی حساسیت باکتری‌ها تاثیر بگذارند، بلکه عوامل خارجی مانند درجه حرارت، نوع بسته‌بندی و غیره نیز می‌توانند فعالیت باکتری‌ها را تحت تاثیر قرار دهند (قاسمی و همکاران، ۱۳۹۶).

ترکیبات آروماتیک و فنولیک اثرات ضد میکروبی خود را در غشای سیتوپلاسمی با تغییر ساختار و عملکرد آن انجام می‌دهند. توانایی ترکیبات فنولی در مداخله در

تیمارها درصد چربی بالاتر از ۴۰ درصد طبق استاندارد ملی ایران بود. بیشترین میزان چربی در تیمارهای ۲ و ۴ با ۴۹/۸۶ و ۵۱/۷۲ درصد در روز ۶۰ بود. نیز میزان چربی کمتری نسبت به گروه کنترل داشتند. احتمالاً تعادل بین آب پنیر و لخته پنیر و افزایش وزن خشک لخته پنیر که می‌تواند ناشی از افزودن اسانس‌ها و عصاره‌ها باشد درصد چربی در طی زمان افزایش پیدا کرده است. به طوری که این افزایش در روز ۶۰ به طور واضح مشهود است. تمامی تیمارها دارای درصد چربی بالاتری نسبت به گروه کنترل بودند. برخلاف مطالعه حاضر، بررسی دیگری نشان داد که بدلیل افزایش رطوبت پنیر موزارلا و کاهش درصد چربی نسبت پروتئین به چربی افزایش می‌یابد (Guinee et al., 2007).

نتایج خواص آنتی‌اکسیدانی پنیر نشان داد که تیمارهای حاوی اسانس و نمونه شاهد هیچ گونه فعالیت آنتی‌اکسیدانی ندارند. اما در تیمارهای حاوی عصاره خواص آنتی‌اکسیدانی مشاهده شد و با افزایش غلظت عصاره این خاصیت افزایش یافت. روشنی و همکاران (۱۳۹۶) نشان دادند با افزودن غلظت‌های مختلف اسانس آویشن به پنیر شاهد کاهش اندیس پراکسید بودند. در مطالعه دیگری تاثیر آنتی‌اکسیدانی اسانس مریم گلی کبیر و ریحان در پنیر سفید ایرانی نشان داده شد که اسانس ریحان تاثیر بیشتری در مقایسه با اسانس مریم گلی کبیر در کاهش اندیس پراکسید و تیوباربیتوریک نمونه‌های پنیر سفید ایرانی داشت. نتایج آنها نشان داد که این تاثیر دارای الگوی وابسته به دوز بوده و با افزایش غلظت اسانس‌ها اثر آنتی‌اکسیدانی افزایش یافت (توریان و عزیزخانی، ۱۳۹۶). در بررسی دیگری تاثیر عصاره‌های گیاهان مختلف را در پنیر، در طی دوره نگهداری بر روی تغییرات تیوباربیتوریک اسید در دمای محیط مورد مطالعه قرار دادند که در مطالعه آنان تمامی عصاره‌های طبیعی، به طور موثری فساد اکسایشی پنیر را به تعویق انداختند. آنها علت این امر را بالاتر بودن ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در عصاره‌ها گزارش کردند (Shan et al., 2011).

۱۳۸۶۳. چاپ اول، موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران.

۲. سازمان ملی استاندارد ایران. (۱۳۹۵). استاندارد پنیرلاکتیکی، ویژگی‌ها و روش آزمون. استاندارد شماره ۱۳۸۶۳. چاپ اول، اصلاحیه شماره ۱. موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران.

۳. احمدی الهه، عبداللهی عباس، نجفی پور سهراب، مشکی باف محمد حسین، فصیحی رامندی مهدی، نامدار نجمه و همکاران. (۱۳۹۵). بررسی تأثیر ترکیبات فنلی بر فعالیت ضدباکتریایی عصاره گیاهان دارویی: ارزیابی *in vitro* گیاهان دارویی شهرستان فسا- فارس. مجله دانشگاه علوم پزشکی فسا. جلد ۶، شماره ۲، صفحه ۲۱۰-۲۲۰.

۴. توریان فهیمه، عزیزخانی مریم. (۱۳۹۶). بررسی تأثیر آنتی‌اکسیدانی اسانس بخش‌های هوایی مریم‌گلی کبیر (*Salvia sclarea*) و ریحان (*Ocimum basilicum*) در پنیر سفید ایرانی. پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران. دوره ۱۳، شماره ۲، صفحه ۳۶۲-۳۴۶.

۵. جدی زهرا سادات، احمدی دستگردی آسیه، شرافتی چالشتی رضا. (۱۳۹۸). تولید نوشیدنی فراسودمند حاوی باسیلوس کواگولانس با استفاده از شیر انگور و عرق پوست لیموترش. بهداشت مواد غذایی. دوره ۹، شماره ۴، صفحه ۳۳-۴۷.

۶. جوانمرد راحله، مهدوی سامان. (۱۳۹۷). مطالعه اثر ضدباکتریایی عصاره‌های الکی و آبی آویشن (*Thymus persicus*) و پونه (*Mentha longifolia*) بر روی باکتریهای جدا شده از پنیرهای محلی شهر مراغه. مجله دانشگاه علوم پزشکی فسا. جلد ۸، دوره ۳، صفحه ۹۱۱-۹۱۷.

۷. حاجی‌مهدی پور هما، خانوی مهناز، شکرچی مریم، عابدی زهرا، پیرعلی‌همدانی مرتضی. (۱۳۸۸). بررسی بهترین روش استخراج ترکیبات فنلی موجود در گیاه سرخارگل. فصلنامه گیاهان دارویی. سال ۸، دوره ۳۲، صفحه ۱۴۵-۱۵۲.

متابولیسم سلولی از طریق مکانیسم‌هایی مانند شکستن غشا، غیرفعالسازی آنزیمی و شلاته کردن فلزات است. همچنین توانایی آن‌ها در نفوذ به غشا فاکتور مهمی در مقاومت یا حساسیت سلول می‌باشند. نفوذپذیری غشای سیتوپلاسمی عامل مرگ سلول است. همچنین ترکیبات غیر فنولیک اسانس‌ها نیز موثر می‌باشند (Sharafati, Chaleshtori et al., 2018; Burt, 2004).

ارزیابی ویژگی‌های ارگانولپتیک مواد غذایی پس از کاربرد اسانس و عصاره ضروری است. یک چالش برای کاربرد عملی اسانس و عصاره ترکیب کردن دوز کم اپتیمم شده برای حفظ ایمنی و عمر نگهداری ماده غذایی است تا تغییرات حسی نامطلوب و طعم نامطلوب را که در نتیجه افزودن غلظت‌های بالا ایجاد شده است به حداقل برساند. به طور کلی افزودن اسانس و عصاره زیره سیاه در غلظت‌های مختلف باعث بهبود خواص حسی و پذیرش کلی نمونه‌های پنیر لاکتیکی شد. در مطالعه‌ای افزودن زیره سیاه کرمانی در هیچ یک از غلظت‌ها اثر معنی‌داری بر بافت و رنگ نداشت، همچنین افزودن غلظت اسانس زیره سیاه نه تنها اثر نامطلوبی بر عطر ندارد بلکه باعث بهبود عطر محصول نیز می‌شود. این مسأله در مورد فاکتور طعم نیز صدق می‌کند.

تقدیر و تشکر

این مقاله منتج از پایان‌نامه مقطع کارشناسی ارشد با کد رهگیری ۱۰۷۷۰۷ دانشگاه آزاد اسلامی اردستان بود. نویسندگان از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی اردستان و همکاران معاونت و آزمایشگاه کنترل غذا دانشگاه علوم پزشکی کاشان به دلیل همکاری در اجرای این تحقیق تشکر و قدردانی بعمل می‌آورند.

منابع

۱. سازمان ملی استاندارد ایران. (۱۳۹۰). استاندارد پنیرلاکتیکی، ویژگی‌ها و روش آزمون. استاندارد شماره

۸. حقیرالسادات فاطمه، ازدری مریم، عروجعلیان فاطمه، امید میثم، عظیم زاده مصطفی. (۱۳۹۳). بررسی ترکیبات شیمیایی اسانس بذر سه گیاه دارویی بومی استان یزد (زیره سیان، زیره سیاه و زنیان) و مقایسه قدرت آنتی‌اکسیدانی آنها. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد. دوره ۲۲، شماره ۶: صفحه ۱۵۹۲-۱۶۰۳.
۹. روشنی سحر، گوهری اردبیلی اشرف، آریان فر اکرم. (۱۳۹۴). بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی اسانس آویشن بر پنیر موزارلای نگهداری شده در دمای یخچال. نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی. دوره ۴، شماره ۳، صفحه ۲۳۳-۲۴۶.
۱۰. سلیمانی فر متین، نیازمند راضیه، شهیدی نوقابی مصطفی. (۱۳۹۴). مطالعه و مقایسه فعالیت مهارکنندگی و ضدکاسپاشی عصاره‌های متانولی-آبی بذر زیره سیاه، گشنیز و شوید. علوم و صنایع غذایی ایران. دوره ۱۲، شماره ۴۶، صفحه ۱۰۵-۱۱۸.
۱۱. شکوه صارمی الهام، حبیبی نجفی محمد باقر، حداد خداپرست محمد حسین، بحرینی معصومه. (۱۳۹۷). بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی عصاره اناریجه در افزایش عمر ماندگاری ماهی کیلکای چرخ شده تلقیح شده با لیستریا مونوسیتوژنز. نشریه نوآوری در علوم و فناوری غذایی. دوره ۱۰، شماره ۴، ۴۳-۵۴.
۱۲. صادقی احسان، اخوندزاده بستی افشین، میثاقی علی، زهرایی صالحی تقی، بهلولی اسگویی سمیه. (۱۳۸۹). ارزیابی آثار اسانس زیره سبز و پروبیوتیک لاکتوباسیلوس/سیدوفیلوس بر رشد استافیلوکوک اورئوس در پنیرسفیدایرانی. فصلنامه گیاهان دارویی. سال ۹، شماره ۳۴، صفحه ۱۳۱-۱۴۱.
۱۳. طاهرخانی پگاه، نوری نگین، اخوندزاده بستی افشین، گندمی نصرآبادی حسن، علی محمدی محمود. (۱۳۹۴). ارزیابی فعالیت ضد میکروبی اسانس زیره سیاه کرمانی (*Bunium persicum* Boiss) در سامانه پنیر گودا.
- فصلنامه گیاهان دارویی. دوره ۱۴، شماره ۵۴، صفحه ۷۶-۸۵.
۱۴. عزیزخانی مریم، توریان فهیمه، بریری مریم. (۱۳۹۵). بررسی تاثیر اسانس‌های ریحان و مریم گلی کبیر بر رشد لیستریا مونوسیتوژنز و اسپرژیلوس فلاووس در پنیر سفید ایرانی. پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران. دوره ۱۲، شماره ۲، صفحه ۲۸۶-۲۹۵.
۱۵. فضل ارا علی، صادقی احسان، رستمی سلیمانی پگاه. (۱۳۹۱). مطالعه تأثیر ضد باکتریایی اسانس گیاه زیره سبز بر باکتری لیستریامونوسیتوژنز در پنیر سفید ایرانی. فصلنامه علوم و صنایع غذایی. دوره ۹، شماره ۳۵، صفحه ۳۵-۴۴.
۱۶. قاسمی ژبلا، مهستی پیمان، نوری سعیدلو سکینه، قاسمی آوات، نصیری سیده لیلا، ایرملو پروین. (۱۳۹۶). بررسی اثر عصاره رزماری بر ممانعت از اکسیداسیون چربی‌ها و رشد باکتری استافیلوکوک اورئوس در گوشت چرخ کرده گاو. علوم و صنایع غذایی. دوره ۱۴، شماره ۶۳، صفحه ۳۲۵-۳۳۶.
۱۷. محمودی رزاق، احسانی علی، تاجیک حسین، اخوندزاده بستی افشین. (۱۳۹۰). بررسی فعالیت ضد میکروبی اسانس پونه کوهی و باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی بر رشد لیستریا مونوسیتوژنز در روند تولید، رسیدن و نگهداری پنیر سفید ایرانی. فصلنامه گیاهان دارویی. سال ۱۰، شماره ۳۹، صفحه ۱۱۲-۱۲۲.
18. Adams R.P. (2007). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry (Vol. 456). Carol Stream, IL: Allured publishing corporation.
19. Ahmadi-Dastgerdi A., Ezzatpanah H., Asgary S., Dokhani S., and Rahimi E. 2017. Phytochemical, Antioxidant and Antimicrobial Activity of the Essential Oil from Flowers and Leaves of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium*. J Essent Oil Bear Pla. 20: 395-409.
20. Alaa A. E. F., Mohamed A., Hany E., and Ahmed E. 2020. Antioxidant Properties of

- and Heat Treatments. Int J Dairy Sci. 15: 1-9.
21. Burt S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in food-a review. Int J Food Microbiol. 94 (2): 223-253.
22. Guinee T. P., Mulholland E. O., Kelly J., and Callaghan D. J. O. (2007). Effect of protein-to-fat ratio of milk on the composition, manufacturing efficiency, and yield of Cheddar cheese. J Dairy Sci. 90(1): 110-123.
23. Ehsani A, and Mahmoudi R. 2013. Effects of *Mentha longifolia* L. essential oil and *Lactobacillus casei* on the organoleptic properties and on the growth of *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* during manufacturing, ripening and storage of Iranian white-brined cheese. Int J Dairy Technol. 66(1): 70-76.
24. Ghasemi Pirbalouti A., Pirali E., Pishkar Gh., Jalali MA., Raissy M., Jafarian Dehkordi M., Hamed B. (2011). The essential oils of some medicinal plants on the immune system and growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). J Med Herbs. 2: 149-155.
25. Khan I. T., Nadeem M., Imran M., Ullah R., Ajmal M., and Jaspal M. H. 2019. Antioxidant properties of Milk and dairy products: a comprehensive review of the current knowledge. Lipids Health Dis. 18(1): 1-13.
26. Fuka M.M., Wallisch S., Engel M., Welzl G. Havranek, J., and Schloter, M. (2013). Dynamics of bacterial communities during the ripening process of different croatian cheese types derived from raw Ewe's milk cheeses. PLoS One. 11 (8): e80734.
27. Roman S., Sánchez-Siles L. M., and Siegrist, M. (2017). The importance of food naturalness for consumers: Results of a systematic review. Trends Food Sci Technol. 67: 44-57.
- Milk: Effect of Milk Species. Milk Fractions
28. Sharafati Chaleshtori F., Saholi M., and Sharafati Chaleshtori R. (2018). Chemical composition, antioxidant and antibacterial activity of *Bunium persicum*, *Eucalyptus globulus*, and Rose Water on multidrug-resistant *Listeria* species. J Evid Based Integr Med. 23: 2515690X17751314.
29. Sharafati Chaleshtori F., Taghizadeh M., Rafieian-kopaei M., and Sharafati-chaleshtori R. (2016). Effect of chitosan incorporated with cumin and eucalyptus essential oils as antimicrobial agents on fresh chicken meat. J Food Process Preserv. 40(3): 396-404.
30. Sharafati Chaleshtori R., Rafieian-Kopaei M., and Salehi E. (2015). Bioactivity of *Apium petroselinum* and *Portulaca oleracea* essential oils as natural preservatives. Jundishapur J Microbiol. 8(3): e20128.
31. Shan R., CAI Y., John Brooks D., and Corke H. (2011). Potential Application of Spice and Herb Extracts as Natural Preservatives in Cheese. J Med Food. 14: 284-290.
32. Sihufe G. A., Zorrilla S. E., and Rubiolo A. C. (2006). Secondary proteolysis of Fynbo cheese salted with NaCl/KCl brine and ripened at various temperatures. Food Chem. 96(2): 297-303.
33. Marcial G. E., Gerez C. L., de Kairuz M. N., Araoz V. C., Schuff C., and de Valdez G. F. (2016). Influence of oregano essential oil on traditional Argentinean cheese elaboration: Effect on lactic starter cultures. Rev Argent Microbiol. 48(3): 229-235.

Effect of umin (*Bunium persicum*) essential oil and extract on microbial and chemical properties in traditional lactic cheese

Rabanifard M¹, Tabatabaian Nimavard J^{2*}, Sharafati Chaleshtori R^{3*}

1. Master Graduated, Department of Food Science and Technology, Ardestan Branch, Islamic Azad University, Ardestan, Iran.
2. Department of Food Science and Technology, Ardestan Branch, Islamic Azad University, Ardestan, Iran.
3. Research Center for Biochemistry and Nutrition in Metabolic Diseases, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran.

*Corresponding author: sharafati.reza@gmail.com

Received: 6 January 2021

Accepted: 6 April 2021

Abstract

This study aimed to evaluate methanolic extract (ME) and essential oil (EO) of cumin (C) on the chemical, microbial, and sensory properties of traditional lactic cheese. In this experimental study, the CEO and CME were prepared. The compounds in the CEO were analyzed by gas chromatography/mass spectrometer and the phenolic content of the CME and CEO by the Folin Ciocalteu method. The cheese treatments containing CEO (125 and 250 ppm), CME (1 and 2%), and control group were prepared. Then, during 60 days of storage of samples, microbial tests including coliform counts, *Escherichia coli*, *Staphylococcus coagulase*-positive, mould, and yeast, as well as chemical tests including fat, moisture, pH, acidity, and salt were performed. Most compounds in CEO were cumin aldehyde (30.40 %), phenyl glycol (18.99 %), and γ -terpinene (15.52 %). The phenolic content and antioxidant activity in CME were significantly higher than CEO. Adding CEO and CME to the cheese absorbed less water and salt than the control group, but the fat content increased. During storage, the acidity decreased significantly. The pH has increased slightly during storage and was by the results obtained by the acidity. The results showed no microbial contamination, including coliforms, mould, and yeast, *E. coli*, and *S. aureus* in all groups. Sensorial results demonstrated that there was a significant difference between the control group and the CEO groups with the CME groups. The results of this study showed that CEO and CME had high antimicrobial and antioxidant activity in traditional lactic cheese.

Keywords: Traditional Lactic Cheese, Cumin, Essential oil, Extract.