نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۰، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۳، ص. ۹۸-۹۱

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 10, No. 2, Suumer 2014, p. 91-98

تاثیر ازن بر کیفیت میکروبی کاهو و کاهش اشرشیا کلی O157:H7 و سالمونلا

معصومه بحرینی[۱] - محمدباقر حبیبی نجفی[۲*] - محمدرضا باسامی[۳] - عیسی جاهد[٤]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۶/۲۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۲/۴

چکیده

ازن امروزه بعنوان یک عامل اکسید کننده قوی که دارای خاصیت ضد میکروبی است شناخته شده است و در صنعت غذا کاربرد زیادی پیدا کرده است و با وجود تحقیقات زیادی که بر روی مواد غذایی انجام شده است هنوز اطلاعات کمی در مورد اثر آن بر میوه و سبزیجات تازه وجود دارد. هدف از این مطالعه بررسی اثر پنج غلظت آب ازنه (ppm ۲ و ۱/۶، ۱/۲، ۰/۸، ۰/۶) در چهار زمان مختلف (۱، ۳، ۵ و ۱۰ دقیقه) بر روی کیفیت میکروبی کاهو و کاهش جمعیت باکتریهای بیماریزای *اشرشیا کلی* O157:H7 (ATCC 35150 و NCTC 12900)، باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* (ATCC 14028 و NCTC 12023) و *سالمونلا انتریکا* زیر گونه انتریکا (PTCC 1709) تلقیح شده بر روی کاهو بود. نتایج نشان داد که آب ازنه در بهترین شرایط باعث کاهش بیش از ۲ سیکل لگاریتمی از جمعیت باکتریهای تلقیح شده *اشرشیا کلی* O157:H7 و سالمونلا می‌شود. همچنین مشخص شد آب ازنه میتواند جمعیت باکتریهای مزوفیل هوازی، کپک و مخمر، باکتریهای کلی فرمی و باکتریهای اسید لاکتیک را به ترتیب ۱/۵۴، ۰/۹۴، ۱/۹۴ و ۱/۳۵ سیکل لگاریتمی کاهش دهد.

واژه های کلیدی: ازن، سبزیجات تازه، *اشرشیا کلی* O157:H7 ، سالمونلا، ضد عفونی کننده، کاهو

مقدمه [۱]

در سالهای اخیر رشد زیادی در صنعت تولید میوه و سبزیجات بسته بندی (سالانه حدود ۱۰ درصد) رخ داده است. فاکتورهای متعددی در این رشد سریع نقش دارند، که یکی از آنها افزایش تقاضا توسط مصرف کنندگان بخاطر خواص خوب آنها در سلامت انسان و راحتی تولید و مصرف میباشد (Rico *et al*., 2007). این مسئله باعث شده است که تعداد بیماریهای عفونی اپیدمیک که در اثر خوردن محصولات آلوده ایجاد می شود زیاد گردد. سازمان کنترل و پیشگیری از بیماریها در امریکا اعلام کرده است اپیدمیهای مربوط به مصرف محصولات تازه در سالهای ۱۹۸۷-۱۹۷۳ و ۱۹۹۲-۱۹۸۸ در هر سال دو برابر شده است و یکی از این محصولات که مسئول بسیاری از اپیدمیها می باشد مصرف سالاد است (De Roever, 1998). به عنوان مثال در سال ۲۰۰۶ در آرژانتین و در سال ۱۹۹۸ در امریکا یک اپیدمی با اشرشیاکلی O157:H7 رخ داد که در اثر خوردن سالاد و کاهوی آلوده ایجاد شده بود (Ackers *et al*., 1998 ، Hilborn *et al*., 1999 و Leotta *et al*., 2006).

اشرشیا کلی بعنوان شاخص آلودگی مدفوعی در مواد غذایی شناخته شده است. این باکتری توسط سویه های توکسیکوژنیک و انتروهموراژیک خود میتواند میوه و سبزیجات تازه را آلوده کند و باعث ایجاد اپیدمی شود (Ackers *et al*., 1998 و Leotta *et al*., 2006). در نتیجه امروزه توجه زیادی به محصولات تازه بسته بندی شده است تا محصولاتی تولید شود که سلامت عمومی جامعه را به خطر نیندازد.

علت افزایش آلودگی توسط محصولات تازه و بسته بندی شده، وجود شرایط مناسب برای رشد و ماندگاری میکروبهای بیماریزا می باشد. بررسیها نشان داده است که باکتریهای *اشرشیا کلی O157:H7* و *لیستریا منوسایتوژنز* می توانند به سطوح برش خورده برگهای کاهو اتصال یابند و یا به درون بافت آن وارد شوند و در آنجا از موادغذایی تراوش شده از سلولهای کاهو، تغذیه کرده و رشد کنند و از استرسهای محیطی در امان بمانند (Hilborn *et al*., 1999).

فاکتورهایی که منجر به افزایش بار آلودگی میکروبی محصولات تازه می شوند خیلی زیاد هستند (Beuchat, and Ryu, 1997،

۱- دانشجوی سابق دکتری گروه علوم و صنایع غذایی و استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد
۲ و ۴- استاد و دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(* - نویسنده مسئول: Email: habibi@ferdowsi.um.ac.ir)
۳- استادیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد

Narciso, and Plotto, 2006 و ;Wright *et al.*, 2000). منابع آلودگی در مرحله قبل از برداشت شامل خاک، آب، حیوانات، حشرات و دستهای کارگران و بعد از برداشت شامل کارگران، تجهیزات، وسایل نقل و انتقال، سیستم تولید و توزیع می باشد (Gorny, 2006). بیشتر میوه ها و سبزیجات بعد از برداشت شسته می شوند تا خاک، زائدات، باقیمانده آفت کشها و میکروبها از سطح آنها حذف شود. حذف این زائدات با غوطه ورکردن محصول در آب حاوی یک یا چند ماده ضدعفونی کننده انجام می شود (Sapers, 2006). این شستشو باعث میشود بار میکروبی سبزیجات بخصوص عوامل ایجاد کننده فساد کم شود و نیمه عمر ماندگاری محصول افزایش یابد.

یکی از مواد ضدعفونی کننده که برای این منظور استفاده میشود هیپوکلریت سدیم میباشد. تاثیر این ماده در کاهش میکروبهای مولد فساد و بیماریزا در مراحل بعد از برداشت به خوبی بررسی و شناخته شده است. هیپوکلریت سدیم جزو پر مصرف ترین مواد ضدعفونی کننده در صنعت بسته بندی میوه و سبزیجات تازه است، اما استفاده از آن بخاطر تولید محصولات جانبی مضر وسمی مثل تری هالومتانها و هالواستیک اسیدها که موتانزا و سرطانزا هستند کاهش یافته است و حتی در بعضی از کشورهای اروپایی ممنوع شده است (Artes *et al.*, 2009 ; Betts and Everis, 2005 ;Guzel-Seydim *et al.*, 2009).

ازن یکی از ترکیبات اکسید کننده قوی میباشد که اخیرا مطالعات زیادی در جهت استفاده از آن بعنوان یک ضدعفونی کننده مناسب در بسته بندی میوه و سبزیجات تازه انجام شده است و ثابت شده است که بر طیف وسیعی از میکروبها اثر بازدارنده دارد (Kim *et al.*, 1999). ازن امروزه به مقدار زیادی در ضدعفونی آب و مواد غذایی استفاده میشود (Guzel-Seydim *et al.*, 2009). یکی از مزیتهای استفاده از ازن این است که پیش ساز آن یعنی اکسیژن به مقدار فراوانی در محیط وجود دارد و مزیت دیگر آن این است که هیچ ترکیب مضری در انتهای فرایند شستشو تولید نمی کند و به دو فرم گازی و مایع بسته به نوع محصول میتواند استفاده شود.

در این مطالعه از آب ازنه بعنوان یک جایگزین مناسب هیپوکلریت سدیم استفاده شد و تاثیر آن در کاهش میکروفلور طبیعی کاهو و باکتری *اشرشیا کلی* O157:H7 و *سالمونلا تیفی موریوم* و *سالمونلا انتریکا* زیر گونه انتریکا تلقیح شده بر روی آن و نیز اثر آن بر کیفیت ظاهری کاهو بررسی گردید.

مواد و روش ها

تهیه نمونه

کاهو تازه از سبزی فروشیهای سطح شهر مشهد خریداری و به آزمایشگاه انتقال داده شد. سپس برگهای خارجی و آسیب دیده و خراب و گل ولای چسبیده به آنها حذف شده و برگها به قطعات کوچکتر در صورت نیاز بریده شد تا بهتر در محلول ماده ضدعفونی کننده غوطه ور شوند. قبل از هر تیمار برگهای کاهو از نظر آلودگی به باکتریهای *اشرشیا کلی O157:H7* و *سالمونلا* بررسی شدند.

تهیه آب ازنه

ازن توسط دستگاه ژنراتور ازن که از شرکت ازن آب ایران تهیه شده بود (مدل AS- 1200M) و به یک دستگاه اکسیژن ساز جهت تغذیه اکسیژن خالص وصل شده بود، تولید گردید و خروجی آن ۸ گرم در ساعت بود. میزان ازن بر اساس مقدار ورودی اکسیژن به دستگاه ازن ساز تنظیم و مقدار ppm آن با دستگاه پرتابل به روش رنگ سنجی با استفاده از کیت DPD No.4 اندازه گیری شد. گاز ازن تولید شده به درون یک محفظه از جنس استنلس استیل که حاوی ۵۰ لیتر آب بود وارد و توسط یک همزن بصورت حبابهای ریز درون محفظه آب پخش میگردید.

بررسی اثر ضد میکروبی آب ازنه بر کاهو

ابتدا دستگاه ژنراتور ازن را روشن نموده و اجازه داده شد تا آب از ازن اشباع شود و سپس کاهوی بدون تلقیح و تلقیح شده در مخزن ازن دهی ریخته شد و بعد از طی زمانهای ۱، ۳، ۵ و ۱۰ دقیقه مقداری از کاهو از ظرف ازن دهی برداشته و در محلول تیوسولفات سدیم ۱٪ قرار داده شد تا ازن باقیمانده خنثی گردد و سپس در سبد در شرایط بهداشتی قرار داده شد تا خشک شود.

قبل از بررسی اثر ازن بر روی باکتریها، تاثیر آن بر کاهو بررسی گردید. کاهو به علت ضخامت کمی که دارد جزو سبزیهای حساس میباشد، به همین خاطر غلظت های مختلف ازن بر کاهو اثر داده شد و بعد از ازن دهی کاهو به مدت یک هفته در یخچال نگهداری شد تا میزان آسیب ایجاد شده بر آن مشخص گردد. آسیب ایجاد شده بر اساس تغییرات حسی و ظاهری کاهو که با چشم قابل مشاهده بود بررسی گردید و سپس غلظت مناسب ازن انتخاب شد و از غلظت‌های مناسب جهت بررسی اثر ضدعفونی کنندگی ازن استفاده شد و آزمایشات میکروبی روی آنها انجام گردید.

تهیه و آماده سازی باکتریها

باکتریهای استاندارد *اشرشیا کلی* O157:H7 سویه های NCTC و باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* ATCC 35150 و 12900 از اداره نظارت بر NCTC 12023 و ATCC 14028 سویه‌های مواد غذایی تهیه شدند و *سالمونلا انتریکا* زیر گونه انتریکا سویه از مرکز کلکسیون قارچها و باکتریهای صنعتی و PTCC 1709 عفونی ایران، سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران خریداری شد.

نمونه‌های تهیه شده که به صورت استوک لیوفیلیزه بودند در محیط تریپتیکاز سوی براث و در دمای ۳۷°C احیا شدند. پس از آن باکتریها در محیط تریپتیکاز سوی آگار برای اثبات خلوص باکتری کشت شدند.

تهیه باکتری در فاز لگاریتمی

از کلنی خالص باکتریها در محیط تریپتیکاز سوی آگار برداشته و در محیط تریپتیکاز سوی براث به مدت ۱۸ ساعت کشت نموده و سپس کدورت آنها در طول موج ۶۲۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری و زمانیکه کدورت آن در محدوده لوله نیم مک فارلند قرار گرفت جهت تلقیح استفاده شد. علاوه بر باکتریهای استاندارد، ازیک نمونه *اشرشیا کلی O157:H7* و *سالمونلا تیفی موریوم* جدا شده از سطح سبزیجات در آزمایشگاه تحقیقاتی میکروبیولوژی دانشگاه فردوسی نیز مطابق بالا کشت و همراه با باکتریهای استاندارد در تلقیح استفاده گردید (Bahreini *et al*., 2011a; 2011b).

تلقیح باکتریهای بیماریزا به کاهو

هر یک از باکتریها بعد از رشد به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفوژ شدند و مایع رویی دور ریخته شد و رسوب حاصل دو بار با سرم فیزیولوژی شستشو داده شد و سپس در سرم فیزیولوژی حل گردید و کدورت آن با دستگاه اسپکتروفتومتر در کدورت ۰/۵ تنظیم شد. در این کدورت جمعیت باکتری بین 10^{8}–10^{9} cfu/ml بود. بعد از تعیین کدورت، ۵ میلی لیتر از هر باکتری به ۵ لیتر آب مقطر اضافه و خوب همگن شد، سپس ۵۰۰ گرم از برگهای تقریبا یک اندازه (هر یک حدود ۱۰ گرم) که قبلا با یک دترژنت ملایم شسته وخشک شده بود به آب حاوی باکتریهای بیماریزا اضافه شد و ۲ دقیقه در این سوسپانسیون باقی ماند تا باکتریها به برگهای کاهو اتصال یابند و در ضمن با دست به آرامی هم زده شد تا تمام قسمتهای برگ با سوسپانسیون باکتریها در تماس باشد. سپس برگهای کاهو در شرایط بهداشتی از سوسپانسیون خارج و در زیر هود خشک شد. در ضمن جهت تعیین تعداد باکتریهای اتصال یافته به سطح کاهو از آن طبق روش های ذکر شده در آزمایشات میکروبی سوسپانسیون تهیه و در محیط های اختصاصی کشت و تعداد باکتری های تلقیح شده شمارش گردید.

آزمایشات میکروبی

نمونه های کاهو چه بعد از تلقیح باکتریهای بیماریزا و چه بعد از تیمار با ازن آب اضافه ان گرفته و تا حدودی خشک شده و سپس ۱۰ گرم از آن وزن و با ۹۰ میلی لیتر بافر پپتون سالین در مخلوط کن به مدت ۲ دقیقه خوب مخلوط شد و از آن در بافر پپتون سالین رقت‌های ده تایی تا 10^{-4} تهیه شد. سپس از هر رقت ۱۰ میکرولیتر برداشته و در روی یک قسمت از محیط کشت که قبلا از پشت پتری با ماژیک قسمت بندی شده بود، قرار داده و اجازه داده شد تا نمونه کاملا جذب محیط شود و بعد در گرمخانه گذاشته شد تا باکتریها رشد کنند. از محیط های کشت پلیت کانت آگار، YGC آگار، ویوله رد بایل لاکتوز آگار و MRS آگار به ترتیب برای کشت باکتریهای مزوفیل هوازی، کپک ومخمر، باکتریهای کلی فرمی و باکتریهای اسید لاکتیک استفاده شد که هر کدام به ترتیب در دمای ۳۰ °C به مدت ۴۸-۲۴ ساعت، ۲۵ °C به مدت ۵-۳ روز، ۳۷ °C به مدت ۲۴ ساعت و ۳۰ °C به مدت ۴۸-۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند. باکتری *اشرشیا کلی O157:H7* در محیط سفکسیم- تلوریت مک کانکی آگار و باکتری سالمونلا در محیط XLD کشت و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ °C گرمخانه گذاری شدند(Bahreini *et al*., 2011a).

بررسی خواص حسی و ظاهری کاهو

خواص حسی و ظاهری کاهو بر اساس مشاهدات چشمی و چشایی توسط پنج نفر تست و بررسی شد و بر اساس میزان تغییرات ایجاد شده که قابل مشاهده بودند از صفر تا پنج درجه بندی گردیدند. خواص ظاهری مورد بررسی عبارت بودند از تغییر رنگ، بیرنگ و شفاف شدن، لزجی، پلاسیدگی و خواص حسی آن بر اساس تغییر طعم و مزه بود (Bahreini *et al*., 2011a).

نتایج

تاثیر آب ازنه بر فلور طبیعی کاهو

نتایج تاثیر آب ازنه در غلظتها و زمانهای تیمار مختلف بر روی فلور طبیعی کاهو و باکتری *اشرشیا کلی* O157:H7 و سالمونلا تلقیح شده در جدول ۱ ارائه شده است. تجزیه و تحلیل های لازم با استفاده از نرم افزار MSTAT-C[1] و آزمون LSD در سطح آلفا برابر ۰/۰۵ انجام شده است.

برای تعیین غلظت موثر ازن، ابتدا غلظتهای مختلف ازن در زمانهای متعدد بر روی کاهو اثر داده شد و به مدت یک هفته کاهوهای تیمار شده در یخچال نگهداری شدند و هر روز از نظر خواص ظاهری و حسی بررسی گردیدند. غلظتهای مورد استفاده عبارت بودند از ۰/۲ ppm، ۰/۴ ppm، ۰/۶ ppm، ۰/۸ ppm، ۱/۲ ppm، ۱/۶ ppm، ۲ ppm، ۲/۵ ppm و ازن تحت فشار جهت ایجاد غلظت زیاد. غلظتهای بالاتر از ۲ ppm حتی در زمانهای کوتاه به شدت به شکل ظاهری کاهو آسیب میرساندند و برگهای کاهو به شدت سیاه رنگ و پلاسیده می شدند در نتیجه برای استفاده مناسب

1- Michigan State University version 1.42

نبودند. غلظتهای ۰/۲ ppm و ۰/۴ ppm بر روی خواص حسی و ظاهری کاهو مشکلی ایجاد نمیکردند و حتی در زمانهای بیشتر از ۱۰ دقیقه نیز قابل استفاده بودند ولی تاثیر زیادی در حذف باکتریها نداشتند. نتایج خواص حسی و ظاهری کاهوهای بررسی شده نشان داد که استفاده از غلظتهای ۰/۶ ppm تا ۲ ppm حداکثر تا ۱۰ دقیقه تاثیری بر خواص حسی و ظاهری کاهو ندارد و بعنوان یک ضدعفونی کننده قابل استفاده است ولی از غلظت ۲/۵ppm به بعد بر روی خواص حسی و ظاهری کاهو تاثیر داشت و در نتیجه کار با غلظتهای ppm ۲ و ۱/۶، ۱/۲، ۰/۸، ۰/۶، ۰/۴ ادامه یافت.

آب ازنه در بالاترین غلظت حداکثر تا ۱/۵۴ سیکل لگاریتمی قادر بود جمعیت باکتریهای مزوفیل هوازی را کاهش دهد. در بیشتر غلظتهای مورد بررسی، بین زمانهای ۵ و ۱۰ دقیقه تفاوت معنی داری وجود نداشت ولی بین زمانهای ۳ و ۵ دقیقه در تمام غلظتها اختلاف معنی دار دیده شد. در غلظتهای مختلف نیز بین دو غلظت ۰/۶ ppm و ۰/۸ ppm میزان کاهش جمعیت باکتریهای مزوفیل هوازی تفاوت معنی داری نداشتند.

تاثیر آب ازنه بر جمعیت کپک ومخمر بسیار کم بود و در بهترین شرایط کمتر از یک سیکل لگاریتمی جمعیت کپک و مخمر را کاهش داد (۰/۹۴ $\log_{10}$ cfu/g). هر چه غلظت آب ازنه و زمان تیمار افزایش می‌یافت میزان کاهش جمعیت کپک و مخمر افزایش پیدا میکرد ولی تاثیر آن خیلی زیاد نبود. بین غلظتهای ۱/۶ ppm و ۲ ppm آب ازنه در تمام زمانهای تیمار اختلاف معنی داری وجود نداشت.

طبق نتایج حاصل از این پژوهش، باکتریهای کلی فرمی به آب ازنه حساستر بودند و نسبت به سایر باکتریها کاهش بیشتری پیدا کردند. حداکثر کاهش جمعیت کلی فرمی در غلظت ۲ ppm آب ازنه در مدت ۱۰ دقیقه بود که ۱/۹۴ سیکل لگاریتمی کاهش یافت. در غلظتهای ۱/۲ ppm و ۱/۶ ppm در زمانهای ۳ و ۵ دقیقه و در غلظت ۲ ppm در تمام زمانها تفاوت معنی داری وجود داشت.

جدول ۱- میزان کاهش ($\log_{10}$ cfu/g) فلور طبیعی کاهو در زمانهای مختلف تیمار با ازن

باکتریهای مورد آزمایش	زمان تیمار (دقیقه)	میزان کاهش باکتری ($\log_{10}$ cfu/g)				
		۰/٦ ppm	۰/۸ ppm	۱/۲ ppm	۱/٦ ppm	۲ppm
باکتریهای مزوفیل هوازی	۱	*** B۰/۲۵ d**	C۰/۳۲ d	C۰/۵۲ c	B۰/۹۸b	B۱/۲ a
	۳	B۰/۳۸ c	B۰/۷۲ b	B۰/۷۲ b	A۱/۰۸ab	A۱/۱۸b
	۵	A۰/۷۴ d	AB۰/۸۶ cd	A۰/۹۷ c	B۱/۱۸a	A۱/۴۸a
	۱۰	A۰/۸c	A۰/۹۷ bc	A۱/۰۳ b	B۱/۱۳ab	A۱/۵۴a
کپک و مخمر	۱	B۰/۰۶a	B۰/۱c	A۰/۲۸c	A/۳c	A۰/۳۵c
	۳	C۰/۰۸a	BC۰/۱۹bc	B۰/۳۱c	A۰/۴۹b	A/۶۵b
	۵	B۰/۱۳a	B۰/۲۹ab	A۰/۵۶b	A۰/۶۸a	A۰/۷۳b
	۱۰	C۰/۲۱a	B۰/۴۵a	A۰/۹۲a	A۰/۸۳a	A۰/۹۴a
کلی فرم	۱	C۰/۴۲b	BC۰/۶۶b	AB۰/۸۴b	B۰/۶۹c	A۰/۹۸d
	۳	C۰/۳۶b	AB۱/۲۳a	B۱/۰۳b	AB۱/۰۸b	A۱/۳۱c
	۵	D۰/۹a	C۱/۳۵a	AB۱/۶۵a	BC۱/۴۱a	A۱/۶۷b
	۱۰	C۱/۰۶a	C۱/۳a	AB۱/۷۵a	B۱/۶۵a	A۱/۹۴a
باکتریهای اسید لاکتیک	۱	C۰/۰۷c	BC۰/۰۹c	B۰/۳b	A۰/۵۸c	A۰/۵۵c
	۳	C۰/۱bc	C۰/۰۷c	B۰/۴۳b	A۰/۷bc	A۰/۷۲c
	۵	B۰/۳b	B۰/۵b	A۱a	A۰/۸۵ab	A۱b
	۱۰	C۰/۶۵c	B۱a	B۱/۰۵a	B۱a	A۱/۳۵a

*- حروف بزرگ لاتین (از A تا C) اختلاف بین میانگین های هر ستون را برای هر باکتری نشان میدهد.

**- حروف کوچک لاتین (از a تا d) اختلاف بین میانگین های هر ردیف را برای هر باکتری نشان میدهد.

جدول ۲- میزان کاهش (log_{10} cfu/g) باکتریهای بیماریزای تلقیح شده به کاهو در زمانهای مختلف تیمار با ازن

باکتریهای بیماریزا*	زمان تیمار (دقیقه)	میزان کاهش باکتری (log_{10} cfu/g)				
		۰/٦ ppm	۰/۸ ppm	۱/۲ ppm	۱/٦ ppm	۲ppm
اشرشیا کلی O157:H7	۱	*** C۰/۳b **	BC۰/۴۵b	BC۰/۴۵c	AB۰/۸c	C۱c
	۳	B۰/۳۷b	B۰/۳۱B	A۰/۷۵Bc	A۱Bc	C۱c
	۵	C۰/۴۵b	B۱/۰۵A	B۱/۰۵Ab	B۱/۲b	B۱/۷۲b
	۱۰	A۰/۵۵a	C۱/۰۵a	C۱/۱۵a	B۱/۷۲a	A ۲/۲ a
سالمونلا	۱	C۰/۴۸c	B۰/۶۹c	B۱b	C۱/۳a	B۱/۴۶b
	۳	BC۰/۶c	A۰/۹۷b	B۱b	B۱/۷a	B۱/۵۲b
	۵	B۰/۷۸c	A۰/۹۴bc	B۱/۱۸b	B۱/۸a	B۱/۶b
	۱۰	A۱/۳۳c	A۱/۱۸c	A۱/۸۲b	A۲/۲۲a	A۲/۴a

*- جمعیت هر یک از باکتریهای تلقیح شده به کاهو حدود log_{10} cfu/g ۶ بود.

**- حروف بزرگ لاتین (از A تا C) اختلاف بین میانگین های هر ستون را برای هر باکتری نشان میدهد.

***- حروف کوچک لاتین (از a تا d) اختلاف بین میانگین های هر ردیف را برای هر باکتری نشان میدهد.

آب ازنه بر باکتریهای اسید لاکتیک تاثیر کمتری نسبت به باکتریهای کلی فرمی داشت و در بهترین شرایط جمعیت باکتریهای اسید لاکتیک را تا ۱/۳۵ سیکل لگاریتمی کاهش داد (غلظت ppm ۲ و زمان ۱۰ دقیقه). بین غلظتهای ppm ۱/۶ و ppm ۲ تفاوت معنی داری دیده نشد ولی بین زمانهای مختلف تیمار در تمام غلظتها اختلاف معنی داری وجود داشت.

تاثیر آب ازنه بر باکتریهای بیماریزای تلقیح شده به کاهو

آب ازنه در غلظت ppm ۲ و مدت زمان ۱۰ دقیقه توانست تا ۲/۲ سیکل لگاریتمی جمعیت *اشرشیا کلی O157:H7* تلقیح شده را در کاهو کاهش دهد. نتایج نشان داد که هر چه زمان تیمار افزایش مییابد تاثیر ازن بیشتر میشود و بین زمانهای ۵ و ۱۰ دقیقه در تمام غلظتها اختلاف معنی داری وجود داشت. این باکتری نسبت به فلور طبیعی به ازن حساسیت بیشتری نشان داد.

تاثیر آب ازنه بر جمعیت *سالمونلا* بیشتر از دو باکتری بیماریزای قبلی بود و توانست در بهترین شرایط تا ۲/۴ سیکل لگاریتمی جمعیت *سالمونلا* را کاهش دهد. با افزایش غلظت مشابه سایر باکتریهای آزمایش شده *سالمونلا* نیز بیشتر کاهش یافت. بین غلظتهای ppm ۱/۶ و ppm ۲ تفاوت معنی داری دیده نشد ولی بین زمانهای تیمار ۵ و ۱۰ دقیقه در غلظتهای مختلف اختلاف معنی داری وجود داشت.

بحث

تاثیر مواد ضدعفونی کننده در کاهش بار میکروبی سبزیجات بسته بندی پذیرفته شده است و ثابت شده است که برای بهبود کیفیت و افزایش نیمه عمر محصولات تازه بسته بندی باید یک مرحله ضدعفونی را بکار برد. شستشوی سبزیجات با آب تنها نمی تواند تاثیر زیادی در کاهش بار آلودگی داشته باشد. طبق بررسیهای انجام شده توسط محققین مختلف ثابت شده است که شستشوی تنها با آب می تواند بین ۰/۲ تا ۱/۱ سیکل لگاریتمی جمعیت باکتریهای بیماریزا را از سطح سبزیجات کم کند (Behrsing *et al*., 2000، Velazquez *et al*., Sapers, and Jones, 2006 2009)، منتهی این نتایج در شرایط ایده ال بدست میاید طوریکه برای هر نمونه یک محلول شستشو با آب مقطر تهیه شده و چند بار شستشو داده شده است که چنین شرایطی عملا در صنعت ممکن نمی باشد. بنابر این جهت استفاده مداوم از آب شستشو و کاهش تعداد دفعات شستشو لازم است که از مواد ضدعفونی کننده استفاده شود تا هم پساب تولیدی کاهش یابد و هم تعداد بیشتری از میکروبها بخصوص انواع بیماریزا از سطح سبزیجات حذف و یا کشته شوند.

از طرف دیگر مشخص شده است که میکروبها قادرند به سطوح سبزیجات متصل شوند و این اتصال بیشتر در مناطق محافظت شده گیاه می باشد تا بتوانند خود را از استرسهای محیطی حفظ کنند. این مناطق شامل روزنه ها، قسمتهای برش خورده، قسمتهای ترک خورده ویا زخمها و کرکهای سطح گیاه می باشد. علاوه بر این فاکتورهای دیگری مثل واکنشهای هیدروفوبیک، بار الکتریکی سطح باکتریها، وجود فیمبریا و یا پلی ساکاریدهای خارج سلولی نیز در اتصال باکتریها به سطوح سبزیجات و میوه ها نقش دارند (Solomon *et al*., 2002 و Heaton, and Jones, 2008). همچنین در سایر بررسیهای انجام شده مشخص شده است که رشد میکروبها در سطح سبزیجات و میوه‌ها میتواند در نتیجه تشکیل بیوفیلم باشد (Burnett, and Beuchat, 2001).

در مطالعات انجام شده ثابت شده است که میکروبهای بیماریزا

مثـل *لیـستریا منوسـایتوژنز*، *اشرشـیا کلـی O157:H7* و *یرسـینیا انتروکولیتیکا* ممکن است بطور طبیعی در سطح میوه ها و سـبزیجات آلوده یافت شوند و اگر زمان کافی و شرایط محیطـی مناسـب داشـته باشند، میتوانند در سطح این محصولات رشد کنند و جمعیـت شـان را بـه حـدود 10^7 cfu/g برسـانند (Waller, 2002) کـه تقریبـا مـشابه جمعیت تلقیح شده بر سطح سبزیجات در پژوهش حاضر می باشد. بـا توجه به این مسائل شستشوی با آب به تنهایی نمیتوانـد میکروبهـای اتصال یافته را از سطح سبزیجات، شستـشو داده و حـذف کنـد، پـس لازم است که از مواد ضدعفونی کننـده اسـتفاده شـود تـا باکتریهـای اتصال یافته کشته و حذف شوند.

در بررسیهای انجام شده مشخص گردید که بـا افـزایش غلظـت، تاثیر ازن بر روی میکروبهای فلور طبیعی و بیماریزا بیشتر مـی شـود. میکروفلور طبیعی کاهو کمتر از باکتریهـای بیمـاریزا تحـت تـاثیر ازن قرار گرفت. تیمار کاهو با آب ازنه باعث کـاهش ۱/۵۴، ۰/۹۴، ۱/۹۴ و ۱/۳۵ سیکل لگاریتمی به ترتیب در باکتریهای مزوفیل هوازی، کپـک و مخمر، باکتریهای کلی فرمی و باکتریهـای اسـید لاکتیـک شـد. در تیمار با آب از نه کپکها و مخمرها مقاومت بیشتری را نـشان دادنـد و کمترین کاهش را نسبت به سایر میکروبها داشتند.

باکتریهای بیماریزا حساسیت بیشتری به ازن داشتند و حـداکثر تـا ۲/۲ و ۲/۴ سـیکل لگـاریتمی بـه ترتیـب از جمعیـت *اشرشـیا کلـی O157:H7* و *سالمونلا* تلقیح شـده بـه کـاهو کـاهش یافـت کـه در مقایسه با هیپوکلریت سدیم و سایر ترکیبات ضـدعفونی کننـده تـاثیر مشابه و یا بهتری داشت (Abadiasa *et al*., 2011 ، Behrsing *et al*., 2000 ،Crowe *et al*., 2007 ; Ukuku, 2006 Waller, 2002).

گزارشات متعـددی در ارتبـاط بـا تـاثیر ازن بـر علیـه باکتریهـای بیمـاریزای تلقـیح شـده بـر روی سـطح کـاهو وجـود دارد. Selma و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند که گاز ازن بـا غلظـت ppm ۲۰۰۰۰ میتوانـد حـداکثر تـا ۱/۶، ۰/۷ و ۱/۱ سـیکل لگـاریتمی از جمعیـت باکتریهای کلی فرمـی، کپـک ومخمـر و باکتریهـای اسـید لاکتیـک موجود در سطح طالبی را کاهش دهـد و جمعیـت *سـالمونلای* تلقـیح شده به سطح آن بسته به رطوبت سـطح میـوه از ۱/۴ تـا ۲/۸ سـیکل لگاریتمی کاهش می یابد. Rodgers و همکاران (۲۰۰۴) نشان دادنـد *لیستریا منوسایتوژنز* Selma تلقیح شده به کـاهو وقتـی تحـت تیمـار ppm ۳ ازن به مدت ۵ دقیقه قرار گرفت تا حدود ۳ سیکل لگـاریتمی کاهش یافت. از طـرف دیگـر Beuchat and Ryu (۱۹۹۷) گـزارش کردند که بکار بردن ppm ۵ ازن به مدت ۵ دقیقه تاثیری در کـاهش *لیستریا منوسایتوژنز* تلقیح شده بر روی کاهو ندارد امـا بطـور مـوثری *اشرشیا کلی O157:H7* را کاهش میدهد. ایـن تفاوتهـا بخـاطر ایـن است که اثر ازن تحت تاثیر فاکتورهای متعددی قرار مـی گیـرد. نـوع واریته کاهو، میکروبهای مورد بررسی، غلظت اولیه باکتری تلقیح شده، حالتهای فیزیولوژیکی سـلولهای باکتریـایی و روشـهای تولیـد ازن از جمله فاکتورهـای مهمـی هـستند کـه باعـث تفـاوت در تـاثیر تیمـار می شوند. دو فاکتور غلظت ازن و زمان عرضه به آن نیز تاثیر زیـادی بر روی خواص ظاهری و حسی کـاهو دارنـد. Ölmez, and Akbas (۲۰۰۹) گزارش کردند که تا سطح ppm ۲ ازن باعث بهبـود کیفیـت ظاهری کاهو می شـود و بـالاتر از ppm ۲/۵ خـواص ظـاهری آن را تحت تاثیر قرار داده و باعث کاهش کیفیت رنگ و تـازه گـی کـاهو و قهوه ای شدن آن میشود که در نهایت منجر بـه کـاهش نیمـه عمـر ماندگاری محصول می گردد. کاهش کیفیت ظاهری کاهو با افـزایش غلظت ازن میتواند ناشی از قدرت اکـسیداسیون بـالای آن باشـد کـه باعث صدمه رسیدن به بافت کاهو می شود و احتمـالا ایـن صـدمات بخاطر افـزایش فعالیـت آنـزیم فنیـل آلانـین آمونیـا لیـاز مـی باشـد (Koseki, and Isobe, 2006). در مطالعات انجام شده مشخص شده است که افزایش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز منجر به کـاهش خواص ظاهری و حسی کاهو و در نتیجه نیمه عمـر مانـدگاری کـاهو فرایند شده می شود (Lopez-Galvez *et al*., 1996).

نمونه های تیمار شده با ppm ۲/۵ ازن و یا بیشتر کـاهش سـریع خواص ظاهری کاهو را در طی روزهای اول نشان دادند که با کـاهش مشخص رنگ سبز و تازگی بافت کـاهو همـراه بـود و در قـسمتهای سبزتر برگ یک حالت شفاف و بیرنگی کامل ایجـاد شـد. بـا در نظـر گرفتن تغییرات کیفیت ظاهری کـاهو و کـاهش باکتریهـا در تحقیـق حاضر غلظت ppm ۲ آب ازنـه بـه مـدت ۱۰ دقیقـه بعنـوان بهتـرین شرایط انتخاب شد. تحت ایـن شـرایط بیـشتر از ۲ سـیکل لگـاریتمی کاهش در *سالمونلا* و *اشرشیا کلی O157:H7* ایجـاد شـد و خـواص ظاهری و حسی کاهو در بهترین حالت باقی ماند. Lopez-Galvez و همکاران (۱۹۹۶) نیز مشابه همین نتایج را در غلظت ppm ۲ آب ازنه در مدت ۲ دقیقه بدست آوردند.

با توجه به نتایج بدست آمده آب ازنه می تواند جایگزین مناسـبی برای هیپوکلریت سدیم که به علت تولید ترکیبات مضر در بـسیاری از کشورها استفاده از آن ممنوع شده است، باشد.

منابع

Abadiasa, M., Alegreb, I., Usall, J., Torresa, R., and Viñasb, I., 2011, Evaluation of alternative sanitizers to chlorine disinfection for reducing food-borne pathogens in fresh-cut apple. Postharvest Biology and Technology, 59: 289–297.

Ackers, M. L., Mahon, B. E., Leahy, E., Damrow, T., and Hayes, P. S., 1998, An outbreak of *Escherichia coli*

O157:H7 infections associated with leaf lettuce consumption. Journal of Infectious Diseases, 177: 1588-1593.

Artes, F., Gomez, P., Aguayo, E., Escalona, V., and Artez-hernandez, F., 2009, Sustainable sanitation techniques for keeping quality and safety of fresh-cut plant commodities. Postharvest Biology and Technology. 51:287-296.

Bahreini, M., Habibi Nagafi, M. B., Bassami, M. R., and Abbaszadegan, M., 2011, Screening, isolation and identification of enteric bacteria and viruses from the ready-to-eat vegetables in Mashhad, Khorasan Razavi (Ph.D dissertation). Ferdowsi University of Mashhad. Faculty of agriculture.

Bahreini, M., Habibi Najafi, M. B., Bassami, M. R., Abbaszadegan, M., Bahrami, A. R., Ejtehadi, H., 2011, Microbial load evaluation of fresh-cut vegetables during processing steps in a vegetable processing plant using minimally processing approach. Iranian Food Science and Technology Research Journal, 7(3), 235-242.

Behrsing, J., Winkler, S., Franz, P., and Premier, R., 2000, Efficacy of chlorine for inactivation of *Escherichia coli* on vegetables. Postharvest Biology and Technology 19: 187–192.

Betts, G. and Everis, L., 2005, Alternatives to hypochlorite washing systems for the decon-

tamination of fresh fruit and vegetables. In: Jongen, W. (Ed.), Improving the Safety of Fresh Fruit and Vegetables.Wageningen, The Netherlands.

Beuchat, L. R. and Ryu, J-H., 1997, Produce Handling and Processing Practices. Emerging of Infectious Diseases. 3:459-465.

Boyer, R. R., Summer, S. S., Williams, R. C., Pierson, M. D., Popham D. L., and Kniel, K. E., 2007, Influence of curli expression by *Escherichia coli O157:H7* on the cell's overall hydrophobicity, charge, and ability to attach to lettuce. Journal of Food Protection, 70: 1339-1345.

Burnett, S. L., and Beuchat, L. R., 2001, Food-borne pathogens. Human pathogens associated with raw produce and unpasteurized juices, and difficulties in decontamination. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 27: 104-110.

Crowe, K. M., Bushway, A. A., Bushway, R. J., Davis-Dentici, K., and Hazen, R. A., 2007, A comparison of single oxidants versus advanced oxidation processes as chlorinealternatives for wild blueberry processing (*Vaccinium angustifolium*). International Journal of Food Microbiology, 116: 25–31.

De Roever, C., 1998, Microbiological safety evaluations and recommendations on fresh produce. Food Control. 9(6): 321-347.

Gorny, J. R., 2006, Microbial contamination of fresh fruits and vegetables. In: Microbiology of Fruits and Vegetables, G.M. Sapers, J.R. Gorny, A.E. Yousef (eds). CRC Press, Taylor and Francis, Boca Raton, FL, USA, pp. 3–32.

Guzel-Seydim, Z., Bever, P. I. and Greene, A., 2004, Efficacy of ozone to reduce bacterial populations in the presence of food components. Food Microbiology. 21: 475–479.

Heaton, J. C. and Jones, K., 2008, Microbial contamination of fruit and vegetables and the behaviour of enteropathogens in the phyllosphere: a review. Journal of Applied Microbiology, 104: 613–626.

Hilborn, E. D., Mermin, J. H., Mashar, P. A., Hadler, J. L., Voetsch A. and Wojtkunski, C., 1999, A multistate outbreak of Escherichia157:H7 infections associated with consumption of misclun lettuce. Archives of Internal Medicine, 159: 1758-1764.

Kim, J. G., Yousef, A. E. and Chism, G.W., 1999, Use of ozone to inactivate microorganisms on lettuce. Journal of Food Safety. 19:17–34.

Koseki, S., and S. Isobe, 2006. Effect of ozonated water treatment on microbial control and on browning of iceberg lettuce (*Lactuca sativa L.*). Journal of Food Protection, 69: 154–160.

Leotta, G. A., Oteiza, J. M., Refi, M. S., Manfredi, E., Galli, L. and Deza, N., 2006, Microbiological study of foods associated to two food-transmitted outbreaks in La Plata city. (p. 67). Third Argentina Congress of Microbiology of foods. Buenos Aires, Argentina.

Lopez-Galvez, G., Saltveit, M. E. and Cantwell, M. I., 1996, The visual quality of minimally processed lettuce stored in air or controlled atmospheres with emphasis on romaine and iceberg types. Postharvest Biology and Technology, 8: 179-190.

Narciso, J. and Plotto, A., 2006, A comparison of sanitation systems for fresh-cut mango. Horticulture Technology. 15: 837–842.

Ölmez, H., and Akbas, M. Y., 2009, Optimization of ozone treatment of fresh-cut green leaf lettuce. Journal of Food Engineering, 90: 487–494.

Rico, D., Martın-Dianaa, A. B., Barat J. M., and Barry-Ryan, C., 2007, Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables: a review. Trends in Food Science and Technology. 18: 373- 386.

Rodgers, S. T., Cash, J. N., Siddiq, M., and Ryser, E. T., 2004, A comparison of different chemical sanitizers for inactivating *Escherichia coli O157:H7* and *Listeria monocytogenes* in solution and on apples, lettuce, strawberries, and cantaloupe. Journal of Food Protection. 67:721-731.

Sapers, G. M., 2006, Washing and sanitizing treatments for fruits and vegetables. In: Microbiology of Fruits and Vegetables, G.M. Sapers, J.R. Gorny, A.E. Yousef (eds). CRC Press, Taylor and Francis, Boca Raton, FL, pp. 375–400.

Sapers, G. M. and Jones, D. M., 2006, Improved sanitizing treatments for fresh tomatoes. Journal of Food Science,

71: 252-256.

Selma, M. V., Iba´nez, A. M., Cantwell, M., and Suslowa, T., 2008, Reduction by gaseous ozone of *Salmonella* and microbial flora associated with fresh-cut cantaloupe. Food Microbiology, 25: 558– 565.

Solomon, E. B., Yaron, S., and Matthews, K. R., 2002, Transmition of *Escherichia coli O157:H7* from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization. Applied and Environmental Microbiology, 68: 397-400.

Ukuku, D. O., 2006, Effect sanitizing treatments on removal of bacteria from cantaloupe suface, and re-contamination with *Salmonella*. Food Microbiology 23:289-293.

Velazquez, L. D. C., Barbini, N. B., Escudero, M. S., Estrada, C. L. and De Guzman, M. S., 2009, Evaluation of chlorine, benzalkonium chloride and lactic acid as sanitizers for reducing *Eschreichia coli O157:H7* and *Yersinia entrocolitica* on fresh vegetables. Food Control, 20: 262-268.

Waller, J. M., 2002, Postharvest diseases. In: Plant Pathologist's Pocketbook, J.M. Waller, J.M. Lenne, S.J. Waller (eds). CAB International, Oxford, UK, pp. 39–54.

Wright, J. S., Summer, S., Hackney, C., Pierson M., and Zuecklein, B., 2000, Reduction of *Escherichia coli O157:H* on apples using water and chemical sanitizer treatments. Dairy Food and Environmental Sanitation, 20: 120-126.