Archive of SID

شیلات، مجله منابع طبیعی ایران

دوره ۷۲، شماره ۱، بهار ۱۳۹۸

صفحات ۴۵-۵۵

اثر دما، pH و اسانس نارنج بر کاهش جمعیت *لیستریا مونوسیتوژنز* در فیله کپور نقره‌ای دودی شده به روش گرم و سرد

بهنوش شکرچی قطب‌آبادی[۱]، لاله رومیانی[۲*]

۱-گروه علوم و صنایع غذایی، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران

۲-گروه شیلات، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۱/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۹/۰۹

چکیده

این مطالعه با هدف بررسی تاثیرات دما، pH و اسانس میوه نارنج روی کاهش میزان رشد *Listeria monocytogenes* مورد بررسی قرار گرفت. متغیرهای مورد بررسی شامل دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد (برای ۱۴۴ ساعت)، ۵۰ درجه سانتی‌گراد (برای ۷۲ ساعت)، ۵۵ درجه سانتی‌گراد (برای ۶ ساعت)، سه سطح pH (۴،۵،۶) و اسانس نارنج (*Citrus aurantium L.*) در سطوح ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۶ بود که روی میزان رشد باکتری در فیله کپور نقره‌ای دودی شده به روش سرد و گرم انجام شد. نتایج نشان داد که با افزایش pH در دماهای مورد بررسی تعداد باکتری افزایش می یابد ($P<0/05$) و بین تعداد باکتری و سطح pH عدم همبستگی مشاهده شد. افزایش دما به شکل معنی‌داری توانست تعداد باکتری فیله کپور نقره‌ای دودی شده سرد و گرم را کاهش دهد، به شکلی که کمترین تعداد باکتری در هر دو روش سرد و گرم در تیمار دمایی ۵۵ درجه سانتی‌گراد شمارش شد. بررسی همبستگی بین تعداد باکتری و دما نیز این موضوع را تایید کرد. در مورد میزان تاثیرگذاری اسانس نارنج روی تعداد باکتری، نتایج نشان داد در شرایط pH و دمای ثابت، با افزایش درصد اسانس نارنج، تعداد *باکتری* کاهش دارد و این کاهش بخصوص در تیمار ۰/۶ درصد اسانس نارنج به شکل معنی‌داری بیشتر بود. همچنین در دما وpH یکسان، دودی کردن گرم در مقایسه با دودی کردن سرد کارایی بالاتری در کاهش تعداد *باکتری* داشت. با توجه به اینکه تعداد باکتری شمارش شده در هر دو روش دودی کردن در دماها وpHهای مختلف، از استاندارد $۱۰^{۷}$Log cfu/g بالاتر نبود، می‌توان عنوان کرد که دودی کردن روشی مطمئن برای افزایش ماندگاری فیله کپور نقره‌ای است. در این پژوهش، بهترین شرایط دودی‌کردن در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد، pH برابر با ۴ و سطح اسانس۰/۶ درصد به مدت ۶ ساعت به دست آمد.

واژگان کلیدی: اسانس نارنج، pH، دما، *L. monocytogenes*، فیله دودی سرد و گرم.

* نویسنده مسئول: لاله رومیانی

Email: l.roomiani@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

۱. مقدمه

امروزه مصرف آبزیان به دلیل کالری و پروتئین زیاد که قابلیت هضم ۹۶ درصدی دارد و همچنین به دلیل دارا بودن اسیدهای چرب امگا-۳ رو به افزایش است (Adeli, 2013). مدت‌های بسیار طولانی است که از دودی کردن به عنوان روشی جهت افزایش زمان نگهداری ماهی استفاده می‌شود. ماهیان پرورشی یا دریایی دودی قابلیت نگهداری در خارج از دستگاه‌های خنک کننده را دارند (Akhondzadeh Basti *et al*., 2006). بر حسب دمای بکار گرفته شده، فرآیند دودی کردن به روش‌های گرم و سرد انجام می‌شود و به دلیل اینکه این ماهی‌ها به صورت خام یا نیم پز مصرف می‌شوند، لذا آلودگی این فرآورده‌های با ارزش به پاتوژن‌هایی چون *Listeria monocytogenes* می‌تواند خطر بالقوه‌ای را برای مصرف کنندگان به همراه داشته باشد (Rahimi *et al*., 2015). گونه‌های لیستریا از جمله باکتری‌هایی هستند که در میکروبیولوژی پزشکی و مواد غذایی اهمیت زیادی دارد. در بین گونه‌های مختلف لیستریا، *L. monocytogenes* مهمترین عامل بیماری‌زایی محسوب می‌شود (Stavru *et al*., 2011). باکتری *L.monocytogenes* یک باکتری با منشاء غذایی است که در انواع متنوعی از غذاها شامل سبزیجات، گوشت و شیر جدا شده و نسبت به حرارت‌دهی مقاوم است (Brandt *et al*., 1990). استراتژی‌ها برای کنترل *L. monocytogenes* در غذاهای آماده مانند فیش‌برگر، فیش‌فینگر، سوریمی و فرآورده‌های دریایی مانند آبزیان نمک سود و دودی شده نیازمند کاهش جدی پاتوژن‌های غذایی است. مطالعات اخیر *L. monocytogenes* را در میان ۵ پاتوژن اول بیماری‌زا که زندگی انسان‌ها را تهدید می‌کند، قرار دادند (Hoffmann *et al*., 2012). در مطالعه‌ای در داخل ایران شیوع *L. monocytogenes* در سطح خرده فروشی‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان،کپور نقره‌ای و کپور معمولی به ترتیب ۱۲/۵، ۱۰ و ۱۷/۵ درصد و میزان شیوع این باکتری در سطح استخرهای پرورش ماهی گرمابی ۸/۵ درصد گزارش شد (Akhondzadeh *et al*., 2011). طبق آمار سازمان بهداشت جهانی در سال ۲۰۱۰، تعداد ۲۳۱۵۰ نفر در اثر این باکتری بیمار شدند که ۲۳/۶ درصد از آنها (۵۴۶۳ نفر) فوت کردند (De Noordhout *et al*., 2014; Bialvaei *et al*., 2018). همچنین در اتحادیه اروپا ۲۱۹۴ مورد ابتلا به این باکتری در سال ۲۰۱۴ گزارش شده است، که معادل ۰/۶ در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر است (European Centre for Disease Prevention and Control, 2016; Bialvaei *et al*., 2018). از این رو لیستریوزیس انسانی با اینکه شیوع کمی دارد، ولی در عفونت‌های جدی عامل مرگ و میر ۳۰-۲۰ بیماران به شمار می‌آید.

امروزه مردم با توجه به اثرات مضر نگهدارنده‌های شیمیایی و سنتتیک خواهان استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی مشتق شده از منابع گیاهی، حیوانی و میکروبی هستند تا علاوه بر افزایش زمان ماندگاری غذا از اثرات مضر نگهدارنده‌های غذایی شیمیایی مصون باشند (Nasser Al-Jabri and Amzad Hossain, 2014). در این میان انواع مختلفی از اسانس‌های گیاهی مورد آزمایش قرار گرفتند. اسانس نارنج دارای ۳۳ ترکیب است که ۲۷/۵ درصد آن لیمون، ۱۷/۵ درصد آن E- نرولیدول و ۱۴ درصد آن آلفا ترپینول است (Ammar *et al*., 2012). در مطالعات مختلف از جمله Hsouna و همکاران (۲۰۱۳) و Essadik و همکاران (۲۰۱۵) فعالیت آنتی باکتریایی اسانس *Citrus aurantium* بررسی شده است و فعالیت ضد باکتریایی این اسانس مورد تایید قرار گرفته است. از طرفی دما و pH جز عوامل تاثیرگذار بر جمعیت *L. monocytogenes* محسوب می‌شوند (Juneja and Eblen, 1999). مدل‌های پیش بینی غذایی امکان بررسی رفتار میکروارگانیسم‌ها را به وسیله بر هم کنش بین دو یا چند عامل را فراهم می‌سازد. این مدل‌ها به درک و تعیین عواملی که روی تعداد میکروبی غذاها موثر هستند کمک می‌کند (Buchanan, *et al*., 1993). از جمله مطالعات انجام شده در این زمینه می‌توان به Li و

www.SID.ir

Archive of SID

همکاران (۲۰۱۷)، اشـــاره کرد که در مطالعه‌ای تاثیر دما (۶۵-۵۷/۷ درجه سـانتی‌گراد) و نمک (۴/۵-۰ درصـد) را روی غیرفعـال کردن *L. monocytogenes* فیلـه مـاهی سـالمون بررسـی کردند و مشـخص شـد که سالمون‌های دودی شده حدود 10^{5}-10^{6} cfu/ g *L. monocytogenes* داشتند. تعداد کمی از لیستریوزیس انسانی شناسایی شده مربوط بـه مـاهیان دودی سـرد بودند. تکنولوژی‌ها برای کنترل *L. monocytogenes* در سـالمون‌های دودی شـده شـامـل روش‌هـایی اسـت کـه اثرات کشـنـدگی یـا متوقف‌کننـدگی بـاکتری را دارنـد. از این رو هدف از این تحقیق بررسـی تاثیرات دما، pH و اسـانس نارنج به عنوان یـک سـیسـتـم Hurdle روی مـیـزان رشـد *L. monocytogenes* در فـیلـه کـپـور نـقـره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) بود.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. طراحی آزمایش

در این آزمایش از فاکتوریل (۳×۳×۳) برای نمونه های فیله کپور نقره‌ای دودی‌شـده گرم و سـرد، برای بررسـی تمام جنبه‌های مطالعه استفاده شد که شامل تیمار دمایی (۴۵ درجـه سـانتی‌گراد برای ۱۴۴ سـاعـت، ۵۰ درجه سـانتی‌گراد برای ۷۲ ساعت، ۵۵ درجه سانتی‌گراد برای ۶ سـاعت)(Sung, *et al*., 2000) و تیمار pH (۴، ۵، ۶) بود. برای بدست آوردن pH مطلوب مقادیر ۱۰ میلی‌مول اسید اسـتیک و ۱۰ میلی‌مول اسـتات سـدیم بکار رفت و با دسـتگاه pH متر اندازه‌گیری شـد (Sung *et al*., 2000). لازم به ذکر است تمامی تیمارها دارای سه تکرار بودند.

۲.۲. استخراج اسانس نارنج (*L. Citrus aurantium*)

در بهـار ۱۳۹۶، میوه گیـاه نـارنج از مرکز تحقیقـات کشـاورزی صـفی‌آباد در شـهر دزفول تهیه شـد، سپس به جهاد دانشـگاهی دانشـگاه تهران جهت تأیید گونه ارسـال شد. نارنج‌ها چندین بار با آب تمیز شسته و پس از پوست کندن به قطعات کوچک بریده شـدند. اسـانس آنها به روش تقطیر با آب و به کمک دسـتگاه کلونجر به مدت ۳ سـاعت اسـتخراج و در دمای ۴ درجه سـانتی‌گراد نگهداری شـد. آنالیز اسـانس توسـط دستگاه کروماتوگراف متصل به طیف نگـار جرمی (GC/MS) مـدل Agilent 5973 بـا سـتون BPX5 بـه طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میکرومتر بـا برنـامـه دمایی ۵۰ تا ۳۰۰ درجه سـانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای شـناسـایی ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس، نمونه که توسط n - هگزان رقیق شـده بود بـه مقـدار یـک میکرولیتر بـه دسـتگاه GC/MS تزریق شد (Essadik and Habsaoui, 2015).

۳.۲. دودی‌کردن گرم

تعدادی فیله خام کپور نقره‌ای به قطعات مساوی بریده و در حمـام آب ۶۳ درجـه سـانتی‌گراد و برای ۳۰ دقیقه برای غیرفعال‌کردن میکروب‌ها پخته شـد. فیله پخته شده با اسـتفاده از قاشـق‌های استریل تکه‌تکه و به مدت ۷ روز در معرض دود با دمای ۱۰۴-۸۵ درجه سـانتی‌گراد قرار گرفتنـد. دود از سـوختن نـاقص مخلوطی از خـاک اره چـوب‌هـای درخـتـان مـمـرز و راش تـولـیـد شـد (Alipour *et al*., 2009).

۴.۲. دودی کردن سرد

به میزان کافی فیله ماهی به قطعات مسـاوی بریده و پس از شـسـتشـو در آب نمک اشـباع شور شده و پس از خروج آب اضافی به سالن دودخانه منتقل و در مرحله اول به مدت ۳ ساعت در معرض هوای گرم بدون دود در دمای ۳۵ درجه سـانتی‌گراد قرار گرفتند تا نیم‌پز و برای دریافت دود آماده شـوند. در مرحله بعد نمونه‌ها در معرض دود در دمای ۲۵ درجه سـانتی‌گراد قرار گرفتند. برای حفظ دما و اطمینان از خشـک شـدن یکنواخت محصـول و رنگ مطلوب، دود دادن کـامل در کمتر از ۲۴ سـاعت متوقف شـد. محصـولات دودی بـه مـدت ۳۰ روز در دمـای یـخـچـال (بـرابـر ۴ درجـه سـانـتی‌گراد) نگهـداری

www.SID.ir

Archive of SID

شدند (Hedayati Fard *et al*., 2016).

۵.۲. کشت *لیستریا مونوسیتوژنز* (*L. monocytogenes*)

نمونه لیوفلیزه باکتری *L. monocytogenes* (ATCC 19114) از گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران جهت این بررسی مورد استفاده قرار گرفت. در ابتدا این کشت لیوفلیزه در ۱۰ میلی‌لیتر محیط براث (BHI) دردمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ ساعت، دو مرتبه بطور متوالی تجدید کشت شد. سپس کشت دوم به میزان ۵ به ۱ با گلیسیرین مخلوط و در قسمت‌های مساوی در لوله‌های میکروسانتریفیوژ اپندروف استریل در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Sung *et al*., 2000).

۶.۲. آلوده‌کردن با ماهی به باکتری *L. monocytogenes* و اضافه‌کردن اسانس نارنج

برای تهیه میزان دوز تلقیح باکتری مورد آزمایش، با انتقال باکتری از لوله میکروسانتریفیوژ اپندروف به محیط آبگوشت قلب و مغز (مرک، آلمان) و نگهداری به مدت ۲۴ ساعت در ۳۳ درجه سانتی‌گراد و کشت دومی از این کشت‌های ۲۴ ساعته در براث دیگر انجام گرفت. سپس لوله‌های کووت حاوی ۵ میلی‌لیتر آبگوشت قلب و مغز (مرک، آلمان) استریل تهیه شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از این کووت برداشت شد و در شیشه زیمکس، به ۳۹ میلی‌لیتر از آب پپتونه استریل افزوده شد. در زمان تلقیح باکتری به ماهی‌های دودی از ۱۰۰ میکرولیتر محتویات شیشه زیمکس استفاده شد تا در هر سانتیمتر مربع از فرآورده‌های شیلاتی ۱×۱۰^{۳} باکتری موجود باشد (APHA, 2001). سپس سه سطح ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۶ درصد اسانس نارنج به ماهی‌های دودی اضافه شد.

۷.۲. اندازه‌گیری میزان رشد میکروبی

۱۰ گرم نمونه ماهی در یک کیسه استومیکر قرار گرفت و سپس ۹۰ میلی‌لیتر محلول نمک استریل (mL ۱۰۰ /g ۰/۸۵) به آن اضافه شد. بعد از هموژنیزه کردن به مدت ۱ دقیقه با استفاده از دستگاه استومیکر رقتی از ۱۰+ تا ۱۰- تهیه شد. شمارش میکروبی در محیط کشت کانت آگار در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد انجام و تعداد باکتری به صورت Log cfu/g در ساعات ۶، ۷۲ و ۱۴۴ رشد بیان شد (APHA, 2001).

۸.۲. تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های حاصل از این پژوهش با استفاده از نرم‌افزار $SPSS_{23}$ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. جهت تجزیه و تحلیل آماری نتایج حاصل از ارزیابی نمونه‌ها، از آزمون فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سطح اطمینان ۹۹ درصد و نیز آزمون واریانس دو طرفه استفاده شد. پیش از شروع آنالیز نرمال بودن داده‌های با استفاده آزمون K-S مورد بررسی قرار گرفت. تمامی نمودارها با استفاده از نرم‌افزار اکسل ۲۰۱۵ رسم گردید.

۳. نتایج

نتایج حاصل از آنالیز اسانس نارنج نشان داد که بیشترین ترکیب موجود در اسانس ترکیبات کارن (۳۴/۶۸ درصد) و آلفا تریپنئول (۷/۵۳درصد) بودند (جدول و شکل ۱).

تغییرات *L. monocytogenes* در فیله کپور نقره‌ای در جدول ۲ نشان داد که تعداد باکتری با افزایش میزان pH در هر سه تیمار دارای اسانس نارنج روند افزایشی دارد. همچنین در pH یکسان، تیمار دارای درصد اسانس نارنج بالاتر (۰/۶ درصد)، میزان باکتری کمتری را نشان داد. در فیله کپورنقره‌ای دودی شده به روش گرم میزان رشد این باکتری در تمام غلظت‌های اسانس نارنج با افزایش pH، افزایش و در تمام تیمارها بالاترین تعداد باکتریایی در pH =۶ اندازه‌گیری شد. همچنین با افزایش درصد اسانس نارنج در هر سه سطح pH مورد بررسی، تعداد باکتری کاهش یافت. کمترین تعداد باکتری در تیمار ۰/۶ درصد اسانس نارنج و pH=۴ (۳/۵۷±۰/۰۱ Log CFU/ g) و

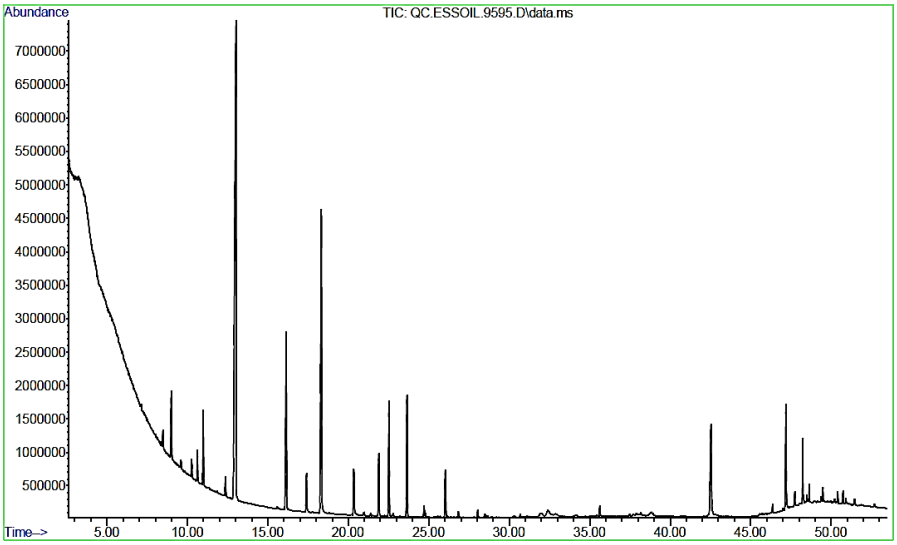
www.SID.ir

Archive of SID

بالاترین تعداد باکتری در تیمار ۰/۲ درصد اسانس نارنج و pH=۶ (۴/۳۵±۰/۰۴ Log CFU/ g) اندازه‌گیری شد.

جدول ۱- ترکیبات شیمیایی اسانس نارنج (*Citrus aurantium L*) با استفاده از GC-MS.

ترکیبات	درصد	زمان جداسازی (دقیقه)
beta.-Myrcene 1,6-Octadiene, 7-methyl-3-methylene- (CAS) Myrcene	۲/۰۳۲	۹
Ethyl 2-(N-Benzylamino)-4-chloro-3,3-dimethylbutanoate	۰/۳۰۴	۹/۶۱
1, 3, 6-Octatriene, 3,7-dimethyl-, (E)- (CAS).BETA. OCIMENE Y (E)-Ocimene	۲/۳۲۴	۱۰/۹۹
DELTA.3-Carene Bicyclo[4.1.0]hept-3-ene, 3,7,7-trimethyl- (CAS)	۳۴/۶۸	۱۳/۰۲
3-Cyclohexene-1-methanol, .alpHa.,.alpHa.,4-trimethyl-, (S)- (CAS) Terpineol	۷/۵۳۰	۱۶/۱۴
DELTA.3-Carene Bicyclo[4.1.0]hept-3-ene, 3,7,7-trimethyl- (CAS)	۱/۶۰۷	۱۷/۴۰
DELTA.3-Carene Bicyclo[4.1.0]hept-3-ene, 3,7,7-trimethyl- (CAS)	۱۴/۷۵	۱۸/۳۳
2-Methoxy-4-vinylpHenol PHenol, 4-ethenyl-2-methoxy- p-Vinylguaiacol	۱/۸۲۲	۲۰/۳۴
DELTA.3-Carene Bicyclo[4.1.0]hept-3-ene, 3,7,7-trimethyl- (CAS)	۲/۲۲۲	۲۱/۸۹
DELTA.3-Carene Bicyclo[4.1.0]hept-3-ene, 3,7,7-trimethyl- (CAS)	۴/۱۸۴	۲۲/۵۳
CaryopHyllene.beta.-CaryopHyllen.beta.-CaryopHyllene	۴/۵۸۴	۲۳/۶۵
Bicyclogermacrene -Lepidozene	۱/۸۲۳	۲۶/۰۴
NeopHytadiene 7,11,15-Trimethyl,3-Methylene-1-Hexadecene	۵/۷۳۰	۳۸/۸۱
1,2-Benzenedicarboxylic acid, diisooctyl ester Diisooctyl pHthalate DIOP	۴/۳۶۱	۴۷/۰۳
1,2-Benzenedicarboxylic acid, mono(2-ethylhexyl) ester Mehp	۱/۸۱۶	۴۷/۷۴



شکل ۱- نمودار کروماتوگرافی اسانس نارنج.

در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد، تغییرات رشد *L. monocytogenes* در فیله کپورنقره‌ای دودی شده به روش سرد در جدول ۳ نشان داده شده است. روند کاهش تعداد باکتری با افزایش درصد اسانس نارنج در دو pH ۴ و ۶ به شکل معنی‌داری قابل مشاهده بود (P< ۰/۰۵). همچنین روند افزایش رشد باکتری به شکل معنی‌داری

www.SID.ir

Archive of SID

در تیمارهای ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۶ اسانس با افزایش pH اتفاق افتاد (P< ۰/۰۵). کمترین تعداد باکتری در تیمار ۰/۶ درصد اسانس نارنج و pH=۴ (۳/۱۹±۰/۰۳ Log CFU/ g) و بالاترین تعداد باکتریای در تیمار ۰/۲ درصد اسانس نارنج و pH=۶ (۳/۶۹±۰/۰۲ Log CFU/ g) اندازه‌گیری شد. در فیله کپورنقره‌ای دودی شده به روش گرم در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد در تیمار ۰/۲ و ۰/۴ درصد اسانس نارنج، افزایش رشد باکتری با افزایش pH قابل مشاهده بود، اما بین دو pH ۵ و ۶ اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵).

جدول ۲- تعداد (Log CFU/ g) *L. monocytogenes* در فیله کپور نقره‌ای دودی شده به روش سرد و گرم در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱۴۴ ساعت در غلظت‌های مختلف اسانس نارنج و pH

	غلظت / pH	۴	۵	۶
		دودی سرد		
اسانس نارنج	۰/۲ درصد	۴/۱۸±۰/۱۰^{Aa}	۴/۲۶±۰/۰۶^{Ab}	۴/۳۹±۰/۰۵^{Ab}
	۰/۴ درصد	۳/۹۹±۰/۱۶^{Aa}	۴/۱۴±۰/۰۳^{Bab}	۴/۲۱±۰/۰۲^{Bc}
	۰/۶ درصد	۳/۶۶±۰/۱۴^{Ba}	۳/۸۸±۰/۰۵^{Ca}	۳/۹۲±۰/۰۴^{Cb}
		دودی گرم		
	۰/۲ درصد	۴/۰۹±۰/۰۴^{Aa}	۴/۱۶±۰/۰۲^{Ab}	۴/۳۵±۰/۰۴^{Ac}
	۰/۴ درصد	۳/۸۲±۰/۰۳^{Ba}	۴/۱۰±۰/۰۲^{Bb}	۴/۲۰±۰/۰۳^{Bc}
	۰/۶ درصد	۳/۵۷±۰/۰۱^{Ca}	۳/۷۳±۰/۰۴^{Cb}	۳/۸۲±۰/۰۱^{Cc}

حروف کوچک به معنی اختلاف معنی‌دار بین ستون‌ها در سطح ۰/۰۵ است.
حروف بزرگ به معنی اختلاف معنی‌دار بین ردیف‌ها در سطح ۰/۰۵ است.

جدول۳ – مقایسه میانگین تعداد (LogCFU/g) *L. monocytogenes* در فیله کپورنقره‌ای دودی شده به روش سرد در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد برای ۷۲ ساعت در غلظت‌های مختلف اسانس نارنج و pH

	غلظت / pH	۴	۵	۶
		دودی سرد		
اسانس نارنج	۰/۲ درصد	۳/۴۸±۰/۰۴^{Aa}	۳/۵۶±۰/۰۶^{Aa}	۳/۶۹±۰/۰۲^{Ab}
	۰/۴ درصد	۳/۳۲±۰/۰۲^{Ba}	۳/۴۹±۰/۰۵^{Ab}	۳/۵۸±۰/۰۲^{Bc}
	۰/۶ درصد	۳/۱۹±۰/۰۳^{Ca}	۳/۴±۰/۰۴^{Ab}	۳/۴۶±۰/۰۲^{Cc}
		دودی گرم		
	۰/۲ درصد	۳/۴۱±۰/۰۰۷^{Aa}	۳/۵۰±۰/۰۶^{Ab}	۳/۵۸±۰/۰۳^{Ab}
	۰/۴ درصد	۳/۳۰±۰/۰۲^{Ba}	۳/۴۹±۰/۰۲^{Ab}	۳/۵۱±۰/۰۱^{Bb}
	۰/۶ درصد	۳/۱۶±۰/۰۲^{Ca}	۳/۲۶±۰/۰۱^{Bb}	۳/۳۴±۰/۰۱^{Cc}

حروف کوچک به معنی اختلاف معنی‌دار بین ستون‌ها در سطح ۰/۰۵ است.
حروف بزرگ به معنی اختلاف معنی‌دار بین ردیف‌ها در سطح ۰/۰۵ است.

www.SID.ir

Archive of SID

در تیمار ۰/۶ درصد اسانس نارنج روند افزایش رشد باکتری با افزایش pH معنی‌دار بود (P< ۰/۰۵). نتایج بررسی رشد *L. monocytogenes* در جدول ۴ نشان داد که در تیمار ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۶ درصد اسانس نارنج رشد باکتری در pH=۶ به ترتیب با مقادیر ۳/۳۹±۰/۰۱، ۳/۳۵±۰/۰۱ و ۳/۳۱±۰/۰۱ در مقایسه با دو pH، ۴ و ۵ رشد باکتری بالاتری را نشان دادند.

جدول ۴- تغییرات (Log CFU/ g) *L. monocytogenes* در فیله کپورنقره‌ای دودی شده به روش سرد و گرم در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد برای ۶ ساعت در غلظت‌های مختلف اسانس نارنج و pH.

		دودی سرد		
	غلظت \ pH	۴	۵	۶
اسانس نارنج	۰/۲ درصد	۳/۲۳±۰/۰۲^{Aa}	۳/۳۵±۰/۰۰۷^{Ab}	۳/۳۹±۰/۰۱^{Ac}
	۰/۴ درصد	۳/۱۹±۰/۰۰۷^{Ba}	۳/۳۲±۰/۰۱^{Bb}	۳/۳۵±۰/۰۱^{Bc}
	۰/۶ درصد	۳/۱۴±۰/۰۰۷^{Ca}	۳/۲۶±۰/۰۱^{Cb}	۳/۳۱±۰/۰۱^{Cc}
		دودی گرم		
	۰/۲ درصد	۳/۱۹±۰/۰۲^{Aa}	۳/۳۳±۰/۰۱^{Ab}	۳/۳۴±۰/۰۱^{Bc}
	۰/۴ درصد	۳/۱۶±۰/۰۱^{Ba}	۳/۲۸±۰/۰۱^{Bb}	۳/۲۶±۰/۰۲^{Ab}
	۰/۶ درصد	۳/۱۱±۰/۰^{Ca}	۳/۲±۰/۰۲^{Cb}	۳/۲۴±۰/۰۳^{Ab}

حروف کوچک به معنی اختلاف معنی‌دار بین ستون‌ها در سطح ۰/۰۵ است
حروف بزرگ به معنی اختلاف معنی‌دار بین ردیف‌ها است

همچنین نتایج نشان داد با افزایش سطح اسانس نارنج از ۰/۲ درصد به ۰/۶ درصد میزان رشد باکتری کاهش دارد. تغییرات رشد *L. monocytogenes* در فیله کپورنقره‌ای دودی شده به روش گرم نشان داد که با افزایش درصد اسانس نارنج استفاده شده در فیله کپورنقره‌ای رشد باکتری در هر سه pH ۴، ۵ و ۶ کاهش می یابد. از طرفی در هر سه تیمار اسانس نارنج افزایش pH سبب افزایش رشد باکتری *L. monocytogenes* شد. کمترین تعداد باکتریایی در تیمار ۰/۶ درصد اسانس نارنج و pH=۴ (۳/۱۱±۰/۰ Log CFU/ g) و بالاترین تعداد باکتریایی در تیمار ۰/۲ درصد اسانس نارنج و pH=۶ (۳/۳۴±۰/۰۱ Log CFU/ g) اندازه‌گیری شد.

با توجه به جدول ۵ در فیله کپورنقره‌ای دودی سرد و گرم همبستگی منفی بین دما و تعداد باکتری و نیز غلظت اسانس و تعداد باکتری به ترتیب در سطح ۰/۰۱ و ۰/۰۵ درصد مشاهده شد.

جدول ۵- همبستگی بین دما، pH و تعداد باکتری فیله کپورنقره‌ای دودی سرد و گرم.

		pH	درجه حرارت	غلظت اسانس
تعداد باکتری	دودی سرد	۰/۲۳۸	-۰/۸۶۹**	-۰/۲۳۵*
	دودی گرم	۰/۱۰۶	-۰/۵۸۹**	-۰/۱۴۷*

** همبستگی در سطح ۰/۰۱ *همبستگی در سطح ۰/۰۵

www.SID.ir

Archive of SID

۴. بحث و نتیجه‌گیری

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که دما و pH هر دو عامل موثری در کنترل *L. monocytogenes* در کپورنقره‌ای دودی گرم و سرد بودند. با افزایش pH در تمام دماهای مورد بررسی تعداد باکتریایی افزایش یافت، هر چند در دماهای مختلف این اختلاف معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$). در واقع باکتری‌ها به دلیل تولید ترکیبات قلیایی از قبیل آمونیاک، تری‌متیل‌آمین و غیره pH محیط را افزایش داده و شرایط مساعدی را برای رشد خود فراهم می‌کنند (Goulas and Kontominas, 2004).

همبستگی بین تعداد باکتری *L. monocytogenes* با pH وجود نداشت. Singh و همکاران (۲۰۰۱)، در بررسی اثرات عصاره سیر و نیسین بر سویه‌های لیستریا، نشان دادند که با افزایش pH تاثیر دو ماده نیسین و سیر کاهش یافت و این امر به معنی افزایش تعداد باکتری بود که با یافته‌های تحقیق حاضر هم‌خوانی دارد. همچنین با افزایش pH محیط، شرایط برای رشد باکتری‌ها بهبود پیدا می‌کند(Singh *et al.*, 2001). Sung و همکاران (۲۰۰۰) تاثیر pH روی غیرفعال‌کردن *Mycobacterium avium* موجود در پنیر را مورد بررسی قرار دادند و عنوان کردند که با کاهش این عامل تعداد باکتری کاهش دارد. همچنین Glass و همکاران (۱۹۹۸) گزارش کردند که جمعیت *L. monocytogenes* در pH ۶/۵ - ۵/۸۴ به حدود $6\ \log_{10}\ CFU/g$ رسید. با توجه به اینکه pH بهینه برای رشد باکتری‌ها محدوده بین ۵/۷ - ۵/۶ است و در واقع باکتری‌ها محیط‌های اسیدی را برای رشد ترجیح می‌دهند (Glass *et al.*, 1998; Sung, *et al.*, 2000). بنابراین، این فاکتور یکی از عوامل اصلی مورد توجه در ساخت مواد ضدباکتریایی محسوب می‌شود (Pourbaghi *et al.*, 2013). ولی افزایش مشاهده شده در رشد باکتری‌ها با افزایش pH در برخی پژوهش ها دیده شده است که با پژوهش حاصر مطابقت دارد.

افزایش دما به شکل معنی‌داری توانست تعداد باکتری فیله کپور نقره‌ای دودی شده سرد و گرم را کاهش دهد، به شکلی که کمترین تعداد باکتری در هر دو فیله کپور نقره‌ای سرد و گرم در تیمار دمایی ۵۵ درجه سانتی‌گراد به دست آمد. بررسی همبستگی بین تعداد باکتری و دما نیز این موضوع را تایید کرد. Rotariu و همکاران (۲۰۱۴)، در بررسی هایشان روی تعداد *L. monocytogenes* در ماهی سالمون، عنوان کردند در ماهیان دودی بین میزان شیوع بالا یا پایین لیستریا با دما ارتباط معنی‌داری وجود ندارد که با یافته‌های تحقیق حاضر مغایرت دارد. Hwang و همکاران (۲۰۰۹)، تاثیر نمک، ترکیبات دودی و دما روی بقای *L. monocytogenes* موجود در سالمون دودی را مورد بررسی قرار دادند. آنها عنوان کردند که در دماهای ۴۰، ۴۵، ۵۰ و ۵۵ درجه سانتی‌گراد (دودی کردن سرد و گرم)، جمعیت *L. monocytogenes* را تحت تاثیر قرار می دهند و در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد میزان غیر فعال شدن باکتری به کمتر از $10\ \log\ CFU/h$ رسید.

در پژوهش حاضر در دماهای ۴۵، ۵۰ و ۵۵ میزان رشد باکتری به ترتیب به ۰/۰۱ تا ۰/۰۳، ۰/۱۵ تا ۰/۳۰ و ۲/۸ تا ۳/۵ $\log\ CFU/h$ رسید که با روند تحقیقات Hwang و همکاران (۲۰۰۹) هم‌خوانی دارد. همچنین عنوان شد که دما کارآمدترین عامل برای غیر فعال‌سازی *L. monocytogenes* است. همچنین Li و همکاران (۲۰۱۷)، تاثیر دما و نمک را برای غیرفعال‌سازی *L. monocytogenes* در فیله ماهی سالمون مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد با افزایش دما از ۵۷/۵ تا ۶۵ درجه سانتی‌گراد تعداد باکتری‌های لیستریا کاهش خطی را نشان می دهد که با یافته‌های تحقیق حاضر هم‌خوانی دارد. البته بررسی‌ها نشان می‌دهد که میزان مقاومت باکتری به دما، نژاد، و عوامل دیگری نیز بستگی دارد (Stavru, *et al.*, 2011; Li, *et al.*, 2017; Juneja and Eblen, 1999).

بیماری لیستریوزیس در نتیجه مصرف فرآورده‌های آلوده به باکتری *L. monocytogenes* در افراد مستعد ایجاد می‌شود. استفاده از نگهدارنده‌های شیمیایی در صنایع غذایی از بروز این بیماری جلوگیری می‌کنند، اما

www.SID.ir

Archive of SID

به دلیل خطرات سرطان‌زایی و عدم تمایل مردم به مصرف غذاهای دارای نگهدارنده شیمیایی، گرایش به سمت استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی افزایش یافته است. مطالعات مختلف (Jam Zad *et al*., 1994; Vazquez-Boland *et al*., 2001; Hamon *et al*., 2005; Nguefack *et al*., 2009) نشان داده است که عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی سرشار از مواد آنتی-کسیدانی و آنتی‌باکتریال هستند که این موضوع این مواد را به یک نگه‌دارنده مناسب تبدیل کرده است. در پژوهش حاضر در مورد میزان تاثیرگذاری اسانس نارنج روی تعداد باکتری، نتایج نشان داد در شرایط pH و دمای ثابت، با افزایش درصد اسانس نارنج، میزان *L. monocytogenes* کاهش دارد و این کاهش بخصوص در تیمار ۰/۶ درصد اسانس نارنج به شکل معنی‌داری بیشتر بود ($P< ۰/۰۵$). Essadik و همکاران (۲۰۱۵)، در بررسی ای که روی فعالیت ضد میکروبی عصاره نارنج (*Citrus aurantium*) انجام دادند، به این نتیجه رسیدند که ۵۰ ترکیب موجود در عصاره نارنج ۹۹/۸۶ درصد از کل اسانس نارنج را تشکیل می‌دهند. در میان آنها لیمون با ۹۰/۹۰ درصد، لینالول ۲/۵۲ درصد، میرسین ۱/۵۱ درصد و بتاپینن ۱/۴۱ درصد بشترین فراوانی را داشتند. در مطالعه Barakat و همکاران (۲۰۰۶) که روی تعداد باکتری فیله *Cyprinus capia* تحت تاثیر اسانس‌های گیاهی با نیم درصد کاروکرول و نیم درصد تیمول انجام شد، ثابت گردید که با کاهش تعداد باکتری ماندگاری ماهی افزایش دارد که با یافته‌های تحقیق حاضر هم‌خوانی دارد. زیرا اسانس نارنج دارای درصد بالایی از این ترکیبات است و این موضوع خاصیت ضدباکتریایی این اسانس را تایید می‌کند. از جمله مکانسیم‌های ضد میکروبی اسانس‌ها را می توان به اثر آنها بر ساختار دیواره سلولی باکتری ها ارتبا ط داد. ویژگی آبگریزی اسانس‌ها سبب نفوذ آنها در لپید غشاء سلولی و افزایش نفوذپذیری آن‌ها می‌گردد که این امر سبب اختلال در کلیه فعالیت‌های حیاتی وابسته به غشاء سلولی، خروج یون‌ها، ترکیبات حیاتی، کاهش شدید ATP داخل سلولی و در نهایت مرگ سلول خواهد شد (Burt, 2004). اثرات سمی روی ساختار و عملکرد غشاء به طور کلی توجیه‌کننده عملکرد ضد میکروبی اسانس‌های گیاهی و ترکیبات مونوترپنیدهای آن‌ها است.

همچنین عامل دیگری که در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفت، شیوه دودی کردن سرد و گرم بود. نتایج نشان داد در دما و pH یکسان، دودی کردن گرم در مقایسه با دودی کردن سرد کارایی بالاتری در کاهش تعداد باکتری *L. monocytogenes* دارد. همچنین با توجه به اینکه تعداد باکتری شمارش شده در هر دو روش دودی کردن و در دماها وpHهای مختلف، از استاندارد 10^7 Log cfu/g بالاتر نبود. می‌توان عنوان کرد که دودی کردن روشی مطمئن برای حذف باکتری‌ها در فیله و افزایش ماندگاری آن است. در مطالعه Hedayati Fard و همکاران (۲۰۱۶)، که روی اثر فرآیند دودی سرد روی تعداد باکتری *Cyprinus carpio* انجام شد، تعداد باکتری در ماهی دودی سرد Log cfu/g $۲/۸\times۱۰^۳$ بود که در مقایسه با نتایج پژوهش حاضر مقدار کمتری را نشان داد. البته این امر به دمای دودی کردن نیز بستگی دارد. آنها عنوان کردند که به محض دودی کردن، تعداد باکتری‌های ماهی کاهش دارد که با نتایج تحقیق حاضر هم سو است. از دیگر دلایل موثرتر بودن دودی گرم روی تعداد باکتری *L. monocytogenes* را می‌توان به گستره دمایی تحمل (۴۰-۴ درجه سانتی‌گراد) این پاتوژن اشاره کرد. زیرا در فرآیند دودی کردن قطعات ماهی پیش از دودی کردن در حمام آب گرم (در تحقیق حاضر ۶۳ درجه سانتی‌گراد) قرار می‌گیرند و در واقع زمان پخت در فیله ماهی دودی گرم بیشتر از دودی سرد است. این کار تعداد باکتری را در مقایسه با روش دودی سرد بسیار کاهش می‌دهد. در پژوهش Anderson و همکاران (۱۹۹۱)، که روی غیرفعال کردن *L. monocytogenes* تحت تاثیر دما و نمک انجام شد، دما به عنوان یک عامل بازدارنده موثر روی جلوگیری از رشد این باکتری معرفی شد.

با توجه به یافته‌های تحقیق حاضر، نشان داده شد که

www.SID.ir

Archive of SID

دمـای عمـل‌آوری عـامـل موثری در کاهش تعداد باکتری اســـت و فیلـه‌هـای تولید شـــده به روش دودی گرم بار بـاکتریـایی کمتری داشـــتنـد. علاوه بر این عامل افزودن اســـانس نارنج به میزان ۰/۶ درصـــد به عنوان ماده‌ای با خاصـیت ضـدمیکروبی توانست تعداد باکتری را در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد برای ۶ ساعت کاهش دهد. لذا، از دو روش دودی گرم و ســرد می‌توان به عنوان اســتراتژی‌های مناســب جهت کاهش تعداد *L. monocytogenes* در فیله کپور نقره‌ای دودی استفاده کرد.

۵. منابع

Adeli, A., 2013. Marketing and Packaging of Aquaculture. Publishing Binahayat, 204 p.

Akhondzadeh Basti, A., Misaghi, A., Zahraei Salehi, T., Kamkar, A. 2006. Bacterial pathogens in fresh smoked and salted Irainian fish. *Food Control* 17(3), 183-188.

Akhondzadeh, A., Zahraie Salehi, T., Misaghi, A., 2003. The survey of *Listeria monocytogenes* in fresh and smoked fish and ice used in fish markets for retaining the freshness of the fish in Tehran and Gilan. *Iranian Journal of Veterinary Research* 57(4), 9-12 (in Persian).

Alipour, G.H., Shabanpour, B., Shabani, A., Imanpour, M., 2009 Effects of Concentration and Temperature of Salt on the Quality of Whitefish (*Rutilus frisii Kutum*) Smoked by the Traditional Method. *Journal of Agricultural Science and Natural Resources* 210 p. (in Persian).

Ammar, A., Bouajil, J., Lebrihi, A., Mathieu, F., Romdhane, M., Zagrouba, F. 2012. Chemical composition and in vitro antimicrobial and antioxidant activities of Citrus aurantium l. flowers essential oil (Neroli oil). *Pakistan Journal of Biological Sciences* 15(21), 1034-1040.

Anderson, W.A, Hedges, N.D., Jones, M.V., Cole, M.B., 1991. Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* studied by differential scanning calorimetry. *Journal of General Microbiology* 137, 1419-1424.

APHA., 2001. Compendium of methods for the microbiological examination. Forth ed. Washington. *American public Health Association*. Pp.105-119,325-367, 371-415, 637-658.

Barakat, S.M., Mahmoud, M., Yamazaki, K., Miyashita, K., Shin, L., Suzuki, T., 2006. A new technology for fish preservation by combined treatment with electrolyzed NaCl solutions and essential oil compounds. Food Chemistry 99, 656-662.

Bialvaei, A.Z., Sheikhalizadeh, V., Mojtahedi, A., Irajian, G., 2018. Epidemiological burden of *Listeria monocytogenes* in Iran. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 21, 770-780.

Brandt, A.L., Castillo, A., Harris, K.B., Keeton, J.T., Hardin, M.D., Taylor, T.M., 2010. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by food antimicrobials applied singly and in combination. *Journal Food Science* 75(9), 557-563.

Buchanan, R.L., Golden, M.H., Whiting, R.C., 1993. Differentiation of the effects of pH and lactic or acetic acid concentration on the kinetics of *Listeria monocytogenes* inactivation. *Journal Food Protection* 56, 474–478.

Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. International Journal of Food Microbiology 94, 223–253.

De Noordhout, C.M., Devleesschauwer, B., Angulo, F.J., Verbeke, G., Haagsma, J., Kirk, M., 2014. The global burden of listeriosis: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases* 14, 1073-1082.

Essadik, F.Z., Haida, S., Kribi, A., Kribi, A.R., Ounine, K., Habsaoui, A., 2015. Antioxidant activity of *Citrus aurantium L. var. amara* Peel from western of Morocco, identification of volatile compounds of its essential oil by GC-MS and a preliminary study of their antibacterial activity. *International Journal of Innovation and Scientific Research* 16, 425-432.

European Centre for Disease Prevention and Control., 2016. *Isteriosis*. Stockholm: ECDC.

www.SID.ir

Archive of SID

Glass, K.A., Kaufman, K.M., Johnson, E.A., 1998. Survival of bacterial pathogens in pasteurized process cheese slices stored at 30°C. *Journal Food Protection* 61, 290–294.

Goulas, A.E., Kontominas, M.G., 2004. Effect of salting and smoking-method on the keeping quality of chub mackerel (*Scomber japonicus*): biochemical and sensory attributes. *Journal of Food Chemistry* 93, 511-520.

Hamon, M., Bierne, H., Cossart, P., 2006. *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. *Nature Reviews Microbiology* 4, 423–434.

Hedayati Fard, M., Ariaei, P., Hosni Moghadam, U., 2016. The effect of cold smoked process on the production of aromatic polycyclic hydrocarbons, qualitative, microbial and omega-3 fatty acids changes of *Cyprinus carpio*. *Journal of Fisheries Science and Technology* 3, 93-73 (in Persian).

Hsouna, A., Hamdi, N., Ben Halima, N., Abdelkafi, S., 2013. Characterization of essential oil from *Citrus aurantium* L. flowers: antimicrobial and antioxidant activities. *Journal of Oleo Science* 62 (10), 763-772.

Hwang, C.A., Sheen, S., Juneja, K., 2009. Effect of Salt, Smoke Compound, and Temperature on the Survival of *Listeria monocytogenes* in Salmon during Simulated Smoking Processes. *Food Microbiology and Safety* 74, 522-529.

Jam Zad, M., 1994. Carvacrol Zataria Multiflora Boiss Shirazi Avishan Southern Regions of Iran. Avishan Research Institute of Forests and Rangelands. Tehran. pp. 1-7.

Juneja, V., Eblen, B., 1999. Predictive Thermal Inactivation Model for Listeria monocytogenes with Temperature, pH, NaCl, and Sodium Pyrophosphate as Controlling Factors. *Journal of Food Protection* 62, 986–993.

Li, C., Hung, L., Hwang, C.A., 2017. Effect of temperature and salt on thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in salmon roe. *Food Control* 73, 406-410.

Mason, P., 2007. *Dietary supplements*. Pharm Press. London, 278 p.

Nasser, A., Amzad, N., Hossain, M., 2014. Comparative chemical composition and antimicrobial activity study of essential oils from two imported lemon fruits samples against pathogenic bacteria. Bwni-suff University. *Journal of Basic and Applied sciences* 3, 247-253.

Nguefack, J., Lekagne Dongmo, J.B., Dakole, C.D., Leth, V., Vismer, H.F., 2009. Food preservative potential of essential oils and fractions from Cymbopogon 75itrates, *Ocimum gratissimum* and Thymus vulgaris against mycotoxigenic fungi. *International Journal of Food Microbiology* 131, 151–156.

Pourbaghi, A., Issa Zadeh, J., Anvari, M., Director, L., Theory, R., 2013. Effect of Environmental Factors on Antagonistic Activity of Pumilus Bacillus Isolated Culture Extract. *Journal of Cellular Biotechnology and Molecular* 66-61(in Persian)

Rahimi, A., Safarpour, Dehkordi, F., Yahaghi, A., Khorvardi Darian, A. 2015. Antimicrobial prevalence and resistance of Listeria species isolated from smoked fish and salt. *Iranian Journal of Microbiology* 3, 37-31 (in Persian)

Rezaei, A., 2016. The role of heavy metals on human health. Second International Conference on Recent Findings in Chemistry and Chemical Engineering, Tehran, International Confederation of Inventions World (IFIA). University of Applied Science.

Rotariu, O., Thomas, D.J., Goodburn, K.E., Hutchison, M., Strachan, N.J.C., 2014. Smoked salmon industry practices and their association with *Listeria monocytogenes*. *Food Control* 35, 284-292.

Singh, B.F., Bernadette, M., Adams, M.R., 2001. Synergistic inhibition of *Listeria monocytogenes* by Niasin and Garlic extract. *Journal Food Microbiology* 18, 133-139.

Stavru, F., Archambaud, C., Cossart, P., 2011. Cell biology and immunology of *Listeria monocytogenes* infections: novel insights. *Immunology Review* 240 (1), 160-184.

Sung, N., Collins, M., 2000. Effect of Three Factors in Cheese Production (pH, Salt, and Heat) on *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Viability. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 1334–1339.

Vazquez-Boland, J.A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Dominguez-Bernal, G., Goebel, W., 2001. *Listeria pathogenesis* and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Reviews* 14, 584–640.

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir