

بررسی استفاده از روش‌های مختلف شستشوی کاهو در کاهش بار میکروبی شیگلا فلکسنری و ماندگاری کاهو در طی نگهداری در دمای محیط

زهره دیدار^{*}

۱- استادیار گروه صنایع غذایی، واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۶/۱۰/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۶/۱۳)

چکیده

یکی از مشکلات مصرف سبزیجات خام، احتمال آلودگی آن‌ها به میکروب‌های بیماری‌زا است. شستشوی صحیح، نقش مهمی در کاهش جمعیت میکروبی و افزایش ایمنی این محصولات دارد. آب الکترولیز شده به عنوان یک ماده ضدعفونی کننده جدید در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته است. این ضدعفونی کننده، بی خطر، ارزان و ایمن است که بر روی گونه‌های مختلف میکروب‌ها مؤثر است. در این مطالعه استفاده از انواع مختلف آب شستشو بر کاهش جمعیت باکتریایی شیگلا فلکسنری در کاهو مورد بررسی قرار گرفته است. انواع آب مورد استفاده شامل آب دیونیزه، آب دیونیزه اسیدی شده، آب دیونیزه کلر زنی شده با غلظت کلر باقیمانده ۵۰ و ۲۵ میلی گرم در لیتر، آب الکترولیز شده خنثی، آب الکترولیز شده اسیدی با غلظت کلر باقیمانده ۵۰ و ۲۵ میلی گرم در لیتر بود. زمان‌های شستشو (۶۰ و ۱۸۰ ثانیه) و دماهای مختلف شستشو (۴ و ۲۵ درجه سلسیوس) در نظر گرفته شد. نتایج این پژوهش نشان داد، آب الکترولیز شده بیشترین کارایی در کاهش بار میکروبی شیگلا فلکسنری در کاهو را داشته است (۷۷٪) و اسیدی کردن آب الکترولیز شده سبب افزایش راندمان ضدعفونی کنندگی آن می شود (۷۸/۵٪). بعلاوه، بررسی جمعیت میکروبی کاهو در طی زمان-های ماندگاری ۱ تا ۴ روز در دمای محیط نشان داد که روند افزایش جمعیت میکروبی، در نمونه‌های کاهو شستشو شده با آب الکترولیز نسبت به سایر روش‌های شستشو آهسته‌تر است.

کلید واژگان: شیگلا فلکسنری، کاهو، آب شستشو، زمان ماندگاری، بار میکروبی

* مسئول مکاتبات: z_didar57@yahoo.com

۱- مقدمه

سبزیجات به علت داشتن ترکیبات مغذی و فیبر خوراکی دارای ارزش غذایی زیادی هستند [۱]. البته مصرف سبزیجات به صورت خام به دلیل احتمال وجود آلودگی میکروبی، ممکن است منجر به بروز بیماری شود [۲] به علاوه، ماندگاری سبزیجات خام نیز محدود است که علت آن وجود میکروارگانیسم‌های مختلف بر روی سبزیجات خام است. ماندگاری سبزیجات خام بستگی به عواملی مانند میزان رطوبت، پتانسیل اکسایش- احیا و اسیدیته آنها دارد [۳]. سالادهای آماده شامل انواع مختلف سبزیجات خام است که به صورت بسته بندی به بازار عرضه می‌گردد. کاهو یکی از متداول‌ترین سبزیجات خام در سالادهای آماده است. وجود میکروب‌های بیماری‌زا نظیر *اشرشیاکلی*، *سالمونلا*، *شیگلا*، گونه های مختلف *کلبسیلا*، *لیستریا* و *آئروموناس* در کاهو گزارش شده‌اند [۴].

بر اساس گزارش مرکز کنترل و پیشگیری بیماری‌ها در سال ۱۹۹۰، محصولات خام، عامل بروز ۱۲٪ از بیماری‌های ناشی از غذا بوده‌اند [۵]. در پژوهش انجام شده بر روی ۱۰۰۳ نمونه از ۲۱ کشور، ۴۴ نمونه به باکتری‌های بیماری‌زا آلوده بوده‌اند و ۲۰٪ از کل آلودگی متعلق به باکتری گونه *شیگلا* بوده است [۶].

شیگلا گونه باکتریایی متعلق به خانواده انتروباکتریاسه است و عامل بروز شیگلوزیس در انسان است که این بیماری در کشورهای در حال توسعه خصوصاً آسیا شایع است. تخمین زده شده است که سالیانه در آسیا ۱۲۵ مورد بروز شیگلوزیس و ۱۴۰۰۰ مورد مرگ رخ می‌دهد [۷]. *شیگلا* از طریق مصرف غذاهای آلوده (عمدتاً سالاد سیب زمینی، سبزیجات خام، گوشت و شیر) و نیز از طریق شرایط نامناسب بهداشتی در محل تولید و رخ می‌دهد [۸]. علت اهمیت شیگلوزیس به دلیل شیوع فراوان شیگلوزیس در جهان و میزان عفونت زایی بالا (۲۰۰-۱۰۰۰ عدد سلول میکروبی) است [۹]. در میان انواع *شیگلا*، *شیگلا فلکسنری* حدود ۶۶٪ و *شیگلا سونی* حدود ۱۸٪ از کل *شیگلا* ایزوله شده از مواد غذایی را شامل می‌شوند [۱۰]. برخی پژوهش‌ها وجود باکتری‌های بیماری‌زا در سالاد- های آماده نظیر *شیگلا*، *سالمونلا*، *سودوموناس*، *اشرشیاکلی*، *لیستریا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* را نشان داده‌اند [۴، ۱۱]. خاک، کود، آبیاری، دستگاه‌ها و انسان از عوامل انتقال

میکروب‌ها به سبزیجات از جمله کاهو هستند [۱۲]. فرآوری‌ها نیز با صدمه به بافت برگ، احتمال رشد میکروب‌ها را افزایش می‌دهند [۱۳]. جهت بهبود شرایط بهداشتی کاهو از طریق روش‌های فیزیکی و شیمیایی مختلف صورت گرفته است نظیر پرتوتابی و امواج فراصوت [۱۴]. عدم تمایل برخی مصرف کنندگان به استفاده از غذاهای پرتوتابی شده و امکان رادیولیز شدن ماده غذایی، سبب محدود شدن کاربرد عمل پرتوتابی شده است. استفاده از ضد عفونی کننده ها نیز به دلیل باقیمانده ترکیبات ضد عفونی کننده در مواد غذایی همچنین اثرات منفی زیست محیطی، محدودیت‌هایی دارد [۱۴]. آب الکترولیز شده از جمله روش‌هایی است که جهت شستشو و نابودی برخی باکتریهای بیماری‌زا مورد توجه قرار گرفته است. آب الکترولیز شده توسط الکترولیز محلول رقیق نمک کلرید سدیم تهیه می‌شود. آژانس حفاظت محیط زیست آمریکا و سازمان غذا و داروی آمریکا، استفاده از آب الکترولیز شده را برای شستشوی مواد غذایی فرآوری نشده، شستشوی میوه ها و سبزیجات و نیز به صورت اسپری و غوطه وری برای تیمار گوشت گاو، مرغ و خوک قبل از فراوری مجاز اعلام نموده است [۱۵]. تاکنون اثر استفاده از آب الکترولیز شده در کاهش و یا حذف باکتریهای بیماری‌زا و نیز کاهش بار میکروبی مواد غذایی مختلف مورد بررسی قرار گرفته است از جمله کاهش *اشرشیاکلی* در سبب [۱۶]، *اشرشیاکلی*، *لیستریا مونوسیژنز*، *سالمونلا تیفی* موریوم و *باسیلوس سرئوس* در قارچ [۱۷]، کپک و مخمر در تربچه [۱۸]. هدف از انجام این پژوهش، بررسی اثر استفاده از شستشو با انواع مختلف آب بر روی جمعیت میکروبی *شیگلا فلکسنری* در کاهو است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- آماده سازی سویه میکروبی

باکتری *شیگلا فلکسنری* (PTCC 1234) از مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شده و در شرایط استریل، به محیط نوترینت براث منتقل گردید. سپس در دمای ۳۲ درجه سلسیوس برای مدت ۲۴ ساعت، گرمخانه‌گذاری شد. سلول‌های میکروبی توسط سانتریفوژ مدل ALC4232 با دور ۴۰۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه جدا شدند. جهت تعیین جمعیت میکروبی از روش مک‌فارلند استفاده شد (میزان

کاهو، با استفاده از سوآپ استریل نمونه برداری شده و نمونه-ها بر روی محیط کشت سالمونلا شیگلا آگار منتقل شده و برای مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شدند. سپس شمارش سلولی انجام شد.

۲-۵- ماندگاری برگ‌های کاهو در دمای محیط

نمونه های کاهو شستشو شده، در ظروف پلی اتیلن با روکش پلی پروپیلن مشابه با سالاد های آماده بسته بندی شد و در زمان های ۱، ۲، ۳ و ۴ روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شد. به منظور بررسی میکروبی شیگلا فلکسنری در طی مدت ماندگاری کاهو، با استفاده از سوآپ استریل از تمام بخش های برگ کاهو، نمونه برداری شده و نمونه ها بر روی محیط کشت سالمونلا شیگلا آگار منتقل شده و برای مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شدند. سپس شمارش سلولی صورت گرفت.

۲-۶- آنالیزهای آماری

تمامی آزمایش ها، در سه تکرار صورت گرفت. آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار STATISTICA نسخه ۱۰ انجام شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- ویژگی های انواع مختلف آب مورد

استفاده جهت شستشو

در این پژوهش جهت شستشو از انواع مختلف آب استفاده گردید که شامل آب دیونیزه، آب دیونیزه اسیدی شده، آب دیونیزه کلرزی شده، آب الکترولیز شده خنثی و آب الکترولیز شده اسیدی است. بررسی ها نشان داد ویژگی های شیمیایی شامل میزان pH و پتانسیل اکسایش- احیاء در انواع مختلف آب شستشوی مورد استفاده در این پژوهش، متفاوت هستند. جدول ۱ خلاصه ای از مقادیر اندازه گیری شده را نشان می دهد. همانطور که در جدول ۱ نشان داده شده است، کلرزی و الکترولیز نمودن آب سبب کاهش میزان pH و افزایش میزان پتانسیل اکسایش- احیاء می گردد.

دانشیته نوری در طول موج ۶۲۵ نانومتر برابر با ۰/۱۳-۰/۰۸ بود که معادل با نیم مک فارلند و جمعیت تقریبی $10^8 \times 1/5$ (بود)، سپس با رقیق سازی توسط سرم فیزیولوژی، کدورت 10^6 باکتری در هر میلی لیتر به دست آمد [۱۹].

۲-۲- آماده سازی نمونه های آب

برای تولید آب الکترولیز، محلول رقیق کلرید سدیم (حدود ۱/۰٪) و با جریان ۱۴ آمپر به مدت ۱ دقیقه الکترولیز شد و از قسمت آند (فلز مس) آب الکترولیز برداشت گردید. کاتد مورد استفاده در این آزمایش، فلز روی بود. با اضافه کردن اسید سیتریک با غلظت ۱۰ گرم در لیتر، آب الکترولیز اسیدی به دست آمد. با رقیق کردن آب الکترولیز شده اولیه با آب دیونیزه تا زمانی که باقی مانده کلر در آب به میزان ۲۵ میلی گرم در لیتر برسد، آب الکترولیز شده رقیق با غلظت حدود ۲۵ میلی گرم کلر در هر لیتر تهیه شد [۲۰].

pH و پتانسیل کاهش اکسایش- احیاء آب با استفاده از دستگاه های pH متر مدل Jenway 3520 و دستگاه Jenway 4520 اندازه گیری شد. غلظت کلر توسط روش یدومتری [۲۱] تعیین شد.

۲-۳- تلقیح میکروبی نمونه های کاهو

۵۰ گرم از کاهو توزین گردید و قبل از تلقیح جهت اطمینان از استریل بودن نمونه های کاهو، شستشو شد. هر یک از نمونه ها با میزان ۱۰۰ میکرولیتر از مایه تلقیح شیگلا فلکسنری در تمام قسمت های برگ کاهو، تلقیح شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس در شرایط استریل، قرار داده شد تا اتصال سلول میکروبی بر روی سطح برگ کاهو صورت گیرد.

۲-۴- شستشوی برگ های کاهو

شستشوی برگ های کاهو توسط انواع مختلف آب شامل آب دیونیزه، آب دیونیزه اسیدی شده، آب الکترولیز شده خنثی، آب الکترولیز شده اسیدی، آب کلره با غلظت ۵۰ میلی گرم در لیتر و آب کلره با غلظت ۲۵ میلی گرم در لیتر در دماهای ۴ و ۲۵ درجه سلسیوس و زمان های ۶۰ و ۱۸۰ ثانیه و با سرعت هم- زدن ۱۰۰ rpm انجام شد. سپس، از تمام قسمت های برگ

Table 1 The properties of different washing water

	pH	Oxidation-reduction potential (mV)
Deionized water	6.8±0.02 ^a	520±4 ^g
Acidified deionized water	4.5±0.03 ^b	550±5 ^f
Chlorinated water (50mg/l Cl ⁻)	3 ±0.04 ^d	1018±5 ^b
Chlorinated water (25mg/L Cl ⁻)	3.04±0.02 ^d	980±4 ^e
Neutral electrolyzed water (50mg/L Cl ⁻)	2.97±0.03 ^c	1022±6 ^a
Acidified electrolyzed water (50 mg/L Cl ⁻)	2.32±0.02 ^g	1025±4 ^a
Neutral electrolyzed water (25 mg/L Cl ⁻)	3.4±0.03 ^c	1000±5 ^d
Acidified electrolyzed water (25 mg/L Cl ⁻)	2.8±0.02 ^f	1005±5 ^c

Means, within each column, followed by the same letter (s) are not significantly different at the 0.05 probability level using Duncan's Multiple Range Test.

بررسی‌ها نشان داد تمامی فاکتورهای مورد بررسی شامل دمای آب شستشو، زمان و نوع آب مورد استفاده برای شستشو و مدت زمان ماندگاری اثر معنی‌داری بر میزان جمعیت نهایی شیگلا فلکسنری در کاهو داشته است (جدول ۲)

۲-۳- بررسی اثر عوامل مختلف بر میزان جمعیت میکروبی شیگلا فلکسنری در کاهو

Table 2 Analysis of Variance (ANOVA) of different factors on *Shigella Flexneri* population

Source	(d.f)	(MS)	(F)	(P-value)
Temperature	1	5.778 **	75.565	0.000
Time	1	30.656 **	400.936	0.000
Shelf life (day)	3	2.501 **	10.901	0.000
Water type	8	626.755 **	1024.630	0.000
Error	418	31.961	---	---

افزودن اسید سیتریک در تمامی تیمارها سبب افزایش راندمان میکروب کشی می‌شود (جدول ۲). سایر پژوهش‌ها نیز اثر اسیدی نمودن آب شستشو در نابودی میکروارگانیسم‌های مختلف را نشان داده‌اند. رحمان و همکاران (۲۰۱۰) گزارش نمودند شستشوس اسفناج با آب الکترولیز اسیدی اثر بیشتری در کاهش جمعیت میکروبی نسبت به آب الکترولیز خنثی دارد [۲۲].

پتانسیل اکسایش- احیاء یک عامل اصلی در خاصیت میکروب-کشی محلول‌ها است [۲۳]. گرچه مکانیسم دقیق اثر این فاکتور بر خاصیت میکروب کشی مشخص نیست اما فرضیه مطرح شده در این زمینه بدین صورت است که پتانسیل اکسایش- احیاء سبب تغییر در جریان الکترون در داخل سلول‌ها می‌شود در نتیجه احتمالاً سبب تغییراتی در میزان شار متابولیت‌های سلولی و اختلالاتی در تولید آدنوزین تری فسفات می‌گردد. مکانیسم غیر فعال شدن میکروب‌ها توسط آب الکترولیز شده به دلیل وجود اسید هیپوکلرو و نیز میزان بالای پتانسیل اکسایش- احیاء در این نوع آب است. مطالعات نشان داده است که اسید هیپوکلرو سبب اکسیداسیون ترکیبات سولفیدریل سطح سلول باکتری، غیرفعال شدن آنزیم‌های تنفسی و غیرفعال شدن تشکیل آدنوزین تری فسفات در سلول میکروب می‌شود [۲۴].

۳-۳- اثر نوع آب مورد استفاده جهت شستشوی کاهو در میزان بار میکروبی شیگلا فلکسنری

نتایج نشان داد که شستشو با آب الکترولیز شده خنثی و اسیدی نسبت به سایر انواع آب شستشو اثر بیشتری در کاهش جمعیت میکروبی شیگلا باقیمانده بر سطح کاهو دارد (جدول ۳). این اثر با افزایش غلظت کلر آب الکترولیز و نیز اسیدی نمودن آب، افزایش پیدا می‌کند. بیشترین میزان کاهش بار میکروبی شیگلا فلکسنری در کاهو در شرایط شستشو با آب الکترولیز اسیدی مشاهده گردید که در این شرایط جمعیت میکروبی به میزان ۷۸/۵ درصد کاهش نشان داد. آب کلره نیز اثر خوبی در کاهش میزان بار میکروبی شیگلا در کاهو داشته است به طوری که در غلظت ۵۰ میلی گرم در لیتر کلر، لگاریتم جمعیت میکروبی به ۱/۴۶ در هر گرم می‌رسد. با وجود یکسان بودن غلظت کلر در آب الکترولیز و آب کلره، اما آب الکترولیز شده، اثر بیشتری در کاهش جمعیت میکروبی نشان داد که این اثر به علت میزان pH کمتر آب الکترولیز شده و پتانسیل کاهش اکسیداسیون بیشتر نسبت به آب کلره است (جدول ۱).

Table 3 Descriptive statistics of variables of *Shigella flexneri* responses based on water type at different times and temperature

Temperature (°C)		Survival (log CFU/g)																	
Time(s)		Initial population (log CFU/g)		Deionized water		Acidified deionized water		Chlorinated water (50mg/l)		Chlorinated water (25mg/l)		Neutral electrolyzed water (50mg/l)		Acidified electrolyzed water (50mg/l)		Neutral electrolyzed water (25mg/l)		Acidified electrolyzed water (25mg/l)	
25	180	5.4667±.05774 ^a	5.4667±.05774 ^a	5.4667±.05774 ^a	2.1067±.01155 ^b	1.6467±.01528 ^d	1.4633±.01528 ^e	2.0533±.03055 ^c	1.2400±.01000 ^b	1.1233±.00577 ⁱ	1.4267±.02887 ^f	1.3767±.01155 ^g							
		2.2333±.01155 ^b	3.8333±.05774 ^b	2.0267±.02082 ^c	1.9633±.01528 ^e	2.1067±.00577 ^d	1.5600±.01000 ^b	1.2300±.01000 ⁱ	1.6933±.00577 ^f	1.5933±.00577 ^g									
	60	5.4667±.05774 ^a	5.4667±.05774 ^a	5.4667±.05774 ^a	3.7033±.00577 ^b	3.0833±.00577 ^c	2.2600±.06083 ^e	2.4300±.02646 ^d	1.5133±.01155 ^h	1.3433±.02082 ⁱ	1.7600±.01000 ^f	1.5833±.01155 ^g							
		2.6333±.02082 ^d	2.4133±.00577 ^e	2.6333±.02082 ^d	1.7867±.00577 ^g	1.5200±.02646 ⁱ	1.8667±.00577 ^f	1.6667±.02082 ^h											

Means, within each column, followed by the same letter (s) are not significantly different at the 0.05 probability level using Duncan's Multiple Range Test.

۳-۵- اثر زمان شستشو بر میزان بار میکروبی کاهو

زمان طولانی‌تر شستشو منجر به کاهش بیشتر بار میکروبی در کاهوی شستشو شده در تمام تیمارهای مورد بررسی گردید و بیشترین کاهش جمعیت باکتری شیگلا فلکسنری در شرایط شستشوی کاهو با آب الکترولیز اسیدی برای مدت زمان ۱۸۰ ثانیه بود (جدول ۳). اثر زمان شستشو توسط پارک (۲۰۰۲) نیز گزارش شده است که مطابق این تحقیق، زمان ۳۰ ثانیه شستشوی گوشت مرغ اثر بیشتری در کاهش جمعیت میکروبی کمپیلوباکتر ژرونی نسبت به زمان ۱۰ ثانیه داشته است [۲۴].

۳-۴- اثر دمای آب شستشو بر میزان بار میکروبی کاهو

نتایج نشان داد شستشوی کاهو در دمای پایین‌تر (۴°C) اثر بیشتری در نابودی شیگلا فلکسنری دارد (جدول ۳). پارک (۲۰۰۲) اثر دمای پایین‌تر آب شستشوی گوشت مرغ در کاهش میزان باکتری کمپیلوباکتر ژرونی را گزارش نموده است [۲۴] که این اثر را به میزان پتانسیل اکسایش- احیاء بالاتر در دمای کم نسبت داده است.

۳-۶- اثر شرایط مختلف شستشوی کاهو بر ماندگاری کاهو

نتایج بررسی جمعیت میکروبی نشان داد استفاده از آب الکترولیز جهت شستشوی کاهو سبب کاهش بیشتری در جمعیت میکروبی گردید. که این اثر با افزودن اسید سیتریک و اسیدی نمودن آب الکترولیز، افزایش نشان داد (جدول ۳). در سایر پژوهش‌ها نیز اثر بیشتر آب اسیدی شده بر نابودی میکروارگانیسم‌ها گزارش شده است. اکسی (۲۰۱۲) اثر استفاده از آب الکترولیز شده اسیدی در کاهش ویبرو پاراهمولیتیکوس و لیستریا مونوسیتوزنز را به میزان ۳/۱۱ و ۱/۹۶ لگاریتم اعلام نموده است [۲۵].

pH پایین سبب حساس شدن غشاء بیرونی سلول‌های باکتریایی و نفوذ بهتر اسید هیپوکلرو به داخل آن‌ها می‌شود. اسید هیپوکلرو به طرق مختلف سبب نابود شدن باکتری‌ها می‌شود که شامل ممانعت از فعالیت برخی آنزیم‌های دخیل در متابولیسم کربوهیدرات‌ها، دکربوکسیلاسیون اکسیداتیو اسیدهای آمینه به نیتريت‌ها و آلدهیدها، تخریب سنتز پروتئین‌ها، واکنش با اسیدهای نوکلئیک، پورین‌ها و پیریمیدین‌ها، متابولیسم غیر متعادل پس از تخریب آنزیم‌های کلیدی و القاء تجزیه DNA است. آب اسیدی سبب چروکیده شدن و ایجاد منافذ مدوری در دیواره سلولی می‌شود که ساختارهای سیتوپلاسمیک از آن خارج می‌شوند [۲۶]. علاوه بر این، افزودن اسید بر میزان قدرت ضدعفونی کنندگی اسید هیپوکلرو مؤثر است زیرا در pH کمتر، غلظت اسید هیپوکلرو نسبت به غلظت یون هیپوکلریت افزایش پیدا می‌کند و به دلیل اینکه قدرت ضدعفونی کنندگی اسید هیپوکلرو ۴۰ تا ۸۰ برابر یون هیپوکلریت است، لذا غلظت

بیشتر اسید هیپوکلرو منجر به افزایش قدرت میکروب‌کشی می‌گردد [۲۷]. لذا با افزودن اسید سیتریک به دلیل کاهش میزان pH، اثر ضدعفونی کنندگی اسید هیپوکلرو افزایش می‌یابد که سبب افزایش خاصیت ضد میکروبی می‌شود.

۳-۷- بررسی ماندگاری کاهو شستشو شده در زمان‌های مختلف نگهداری

جهت بررسی اثر مدت زمان نگهداری، کاهو شستشو شده برای مدت زمانهای ۱، ۲، ۳ و ۴ روز در دمای محیط (۲۵ درجه سلسیوس) در بسته‌بندی پلی‌اتیلن با روکش از جنس پلی-پروپیلن نگهداری شد و جمعیت میکروبی شیگلا فلکسنری در پایان هر روز پس از نمونه برداری، کشت و شمارش شد. نتایج بیانگر افزایش جمعیت میکروبی شیگلا فلکسنری در تمامی نمونه‌های کاهو شسته شده در طی مدت نگهداری بود. روند افزایش جمعیت میکروبی در مورد آب الکترولیز و آب کلره با غلظت ۵۰ میلی گرم در لیتر، نسبت به سایر تیمارها کمتر بود (شکل ۱). دلایل احتمالی این موضوع، وجود اسید هیپوکلرو در این دو نوع آب شستشو است. pH پایین سبب کارایی بیشتر اثر ضد میکروبی آب الکترولیز اسیدی می‌باشد. استاندارد ملی ایران حداکثر مجاز کلر باقیمانده در آب آشامیدنی را ۴۰۰-۲۵۰ میلی گرم در لیتر اعلام نموده است [۲۸] که با توجه به میزان کمتر کلر باقی‌مانده در آب الکترولیز مورد مطالعه، خطر سلامتی برای انسان ایجاد نخواهد کرد. رحمان و همکاران (۲۰۱۰) اثر بیشتر شستشوی اسفناج با آب الکترولیز اسیدی بر نابودی باکتری‌های اشرشیاکلی، لیستریا مونوسیتوزنز و نیز کپک و مخمر را گزارش نموده اند [۲۲].

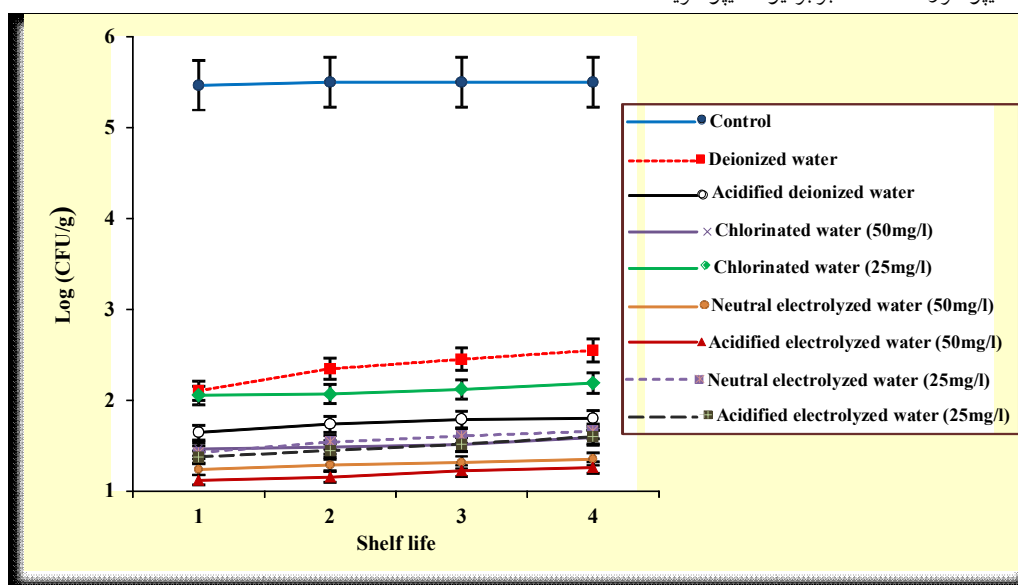


Fig 1 Microbial population of *Shigella flexneri* at different shelf life times after washing at 4°C, 180s.

isothermal amplification assay for rapid detection of *Shigella* species. *Tropical Biomedicine*. 31(4): 709–720.

- [9] DuPont Herbert L; Levine Myron M; Hornick Richard B; Formal SB. Inoculum Size in Shigellosis and Implications for Expected Mode of Transmission Author (s): Herbert L. DuPont, Myron M. Levine, Richard B. Hornick and Samuel B. Formal Reviewed work (s): Published by: Oxford University Press Stable URL: <http://www.jinfected.com/content/159/6/1126>. J Infect Dis. 1989; 159(6):1126±8. PMID: 2656880.
- [10] Ahmed, A.M., Shimamoto, T. 2015. Molecular characterization of multidrug-resistant *Shigella* spp. of food origin. *International Journal of Food Microbiology*. 194:78-82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.11.013> PMID: 25485847.
- [11] Castro-Rosas, J., Cerna-Cortés, J. F., Méndez-Reyes, E., Lopez-Hernandez, D., Gómez-Aldapa, C. A., & Estrada-Garcia, T. 2012. Presence of fecal coliforms, *Escherichia coli* and diarrheagenic *E. coli* pathotypes in ready-to-eat salads, from an area where crops are irrigated with untreated sewage water. *International Journal of Food Microbiology*. 156, 176–180.
- [12] Jackson, C. R., Randolph, K. C., Osborn, S. L., & Tyler, H. L. 2013. Culture dependent and independent analysis of bacterial communities associated with commercial salad leaf vegetables. *BMC Microbiology*. 13, 274-286.
- [13] Gleeson, E., O'Beirne, D. 2005. Effects of process severity on survival and growth of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* on minimally processed vegetables. *Food Control*. 16, 677–685.
- [14] Gil, M. I., Selma, M. V., López-Gálvez, F., & Allende, A. 2009. Fresh-cut product sanitation and wash water disinfection: Problems and solutions. *International Journal of Food Microbiology*. 134, 37–45.
- [15] USDA. 2015. <http://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/bab10e09-ae6a-483b-8be8-09a1f051d4c/7120.1.pdf?MOD=AJPERES>.
- [16] Graça, A., Abadias, M., Salazar, M., Nunes, C. 2011. The use of electrolyzed water as a disinfectant for minimally processed apples. *Postharvest Biology and Technology*. 61, 172-177
- [17] Ding, T., Rahman, S.M.E., Oh, D.H. 2011. Inhibitory effects of low concentration

۴- نتیجه گیری

شستشوی کاهو می تواند نقش مهمی در کاهش بار میکروبی آن داشته باشد. آب الکترولیز شده به عنوان یک ضدعفونی کننده ایمن و ارزان قیمت اثر زیادی در جمعیت باقیمانده شیگلا فلکسنری در کاهو پس از شستشو دارد. افزودن اسید سیتریک سبب افزایش کارایی آب الکترولیز شده در حذف میکروب های کاهو می گردد. بیشترین راندمان حذف میکروب ها در شرایط استفاده از آب الکترولیز شده اسیدی در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۸۰ ثانیه حاصل شد (۷۸/۵٪ کاهش جمعیت میکروبی).

۵- منابع

- [1] Wachtel, M.R., Whitehand, L.C. and Mandrell, R.E. 2002. Association of *Escherichia coli* O157:H7 with preharvest leaf lettuce upon exposure to contaminated irrigation water. *Journal of Food Protection*. 65(1): 18-25.
- [2] Starutch, D. 1991. Survival of pathogenic microorganisms and parasites in excreta, manure sand sewage sludge. *Revue scientifique et technique*. 10(3): 813-846.
- [3] Bibek R.. 2005. Fundamental of Food Microbiology, CRC press, Boca Raton: London New York Washington D.C..
- [4] Feroz, F., Senjuti, J.D., Noor, R. 2013. Determination of microbial growth and survival in salad vegetables through *in vitro* challenge test. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2(6):312-319
- [5] CFSAN/Office of Plant and Dairy Foods. 2004. Produce safety from production to consumption: 2004 action plan to minimize foodborne illness associated with fresh produce consumption. October 2004. Available at: <http://www.cfsan.fda.gov/dms/prodpla2.html>
- [6] Beru, N., and P. A. Salsbury. 2002. FDA's produce safety activities. *Food Safety Magazine*. 8(No.1 Feb/Mar):14–19.
- [7] Bardhan, P., Faruque, A.S., Naheed, A. & Sack, D.A. 2010. Decrease in shigellosis-related deaths without *Shigella* spp.-specific interventions, Asia. *Emerging Infectious Diseases*. 16: 1718-1723.
- [8] Liew, P.S., Teh, C.S.J. Lau, Y.L. Thong, K.L. 2014. A real-time loop-mediated

- in electrolyzed oxidizing and chemically modified water for the inactivation of food-related pathogens. *Journal of Food Protection*. 63, 19–24.
- [24] Park, H., Hung, Y.C., Brackett, R.E. 2002. Antimicrobial effect of electrolyzed water for inactivating *Campylobacter jejuni* during poultry washing. *International Journal of Food Microbiology*. 72 : 77-83.
- [25] Xie, J.; Sun, X.H.; Pan, Y.J. and Zhao, Y. 2012. Physicochemical properties and bactericidal activities of acidic electrolyzed water used or stored at different temperatures on shrimp. *Food Research International*. 47(2): 331-336.
- [26] Hati, S., Mandal, S., Minz, P.S., Vij, S., Khetra, Y., Singh, B.P. 2012. Electrolyzed Oxidized Water (EOW): Non-Thermal Approach for Decontamination of Food Borne Microorganisms in Food Industry. *Food and Nutrition Sciences*. 3: 760-768.
- [27] Didar, Z. 2017. Food waste water treatment. Neyshabur Islamic azad university publication. 110-112.
- [28] Institute of Standards and Industrial Research of Iran. 2009. ISIRI 1053. Drinking water -Physical and chemical specifications.
- electrolyzed water and other sanitizers against foodborne pathogens on oyster mushroom. *Food Control*. 22, 318-322.
- [18] Zhang, C., Cao, W., Hung, Y. C., & Li, B. 2016. Application of electrolyzed oxidizing water in production of radish sprouts to reduce neutral micro biota. *Food Control*. 67, 177-182.
- [19] Zapata, A., Ramirez-Arcos, S. 2015. A Comparative Study of McFarland Turbidity Standards and the Densimat Photometer to Determine Bacterial Cell Density. *Current Microbiology*. 70: 907-909.
- [20] Maktabi, S., Fazlara, A., Mohammadyari, S. 2017. Effect of electrolyzed oxidizing water and citric acid on reduction of bacterial contamination in shrimps during storage in ambient and refrigerator and survey of bactericidal effects on surface contact. *Iranian Veterinary Journal*. 12(4): 118-129.
- [21] Didar, Z. 2014. Water and wastewater quality control. Neyshabur Islamic azad university publication. 51-56.
- [22] Rahman, S.M.E., Ding, T., Oh, D.H. 2010. Inactivation effect of newly developed low concentration electrolyzed water and other sanitizers against microorganisms on spinach. *Food Control*. 21, 1383-1387.
- [23] Kim, C., Hung, Y.-C., Brackett, R.E. 2000. Roles of oxidation–reduction potential

Investigating the use of different methods of lettuce washing in *Shigella Flexneri* microbial load during storage at ambient temperature

Didar, Z.^{1*}

1. Assistant professor of food science, Islamic azad university, Neyshabur branch, Neyshabur, Iran

(Received: 2018/01/12 Accepted:2018/09/04)

Contamination with pathogenic bacteria is an important issue of raw vegetable consumption. Washing plays an important role in reducing the microbial load of raw vegetables and increasing the safety of these products. Electrolyzed water has been considered as a new disinfectant in last decades. It is antiseptic, inexpensive and safe component that has antimicrobial effects on different microorganisms. In this study, usage of different types of washing water has been studied on the reduction of *Shigella Flexneri* population in lettuce. The studied washing water included deionized water, acidified deionized water, chlorinated water with chlorine concentrations of 50 and 25 mg / L, neutralized electrolyzed water, acidified electrolyzed water with a chlorine concentration of 50 and 25 mg / L. Different washing times (60 and 180 seconds) and different washing temperatures (4 and 25 °C) also were assessed. The results showed that electrolyzed water had the best efficiency in reducing the microbial load of lettuce (77%) and the acidification of electrolyzed water increased its disinfection efficiency (78.5%). Lettuce washed by electrolyzed water showed slower microbial growth rate during storage than other ones.

Keywords: *Shigella flexneri*, Lettuce, Washing water, Shelf life, Microbial load

*Corresponding Author E-Mail Address: z_didar57@yahoo.com