بررسی جمعیت میکروبی ارقام خرمای استعمران، زاهدی، شاهانی، کبکاب، مردارسنگ، مضافتی و هلیله

لیلا نصرت آبادی[۱]، حمیدرضا کاوسی[۲]، رضا حاجی محمدی فریمانی[۳و۴*]، محمد بلوردی[۴]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، بخش بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنرکرمان، ایران.
۲- استادیار، بخش بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنرکرمان، کرمان، ایران.
۳- پژوهشکده فناوری تولیدات گیاهی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.
٤- استادیار، بخش علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.
(تاریخ دریافت: ۹۷/۰۹/۲٤ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰٤/۰۲)

چکیده

مطالعه جمعیت میکروبی مواد غذایی از نظر بهداشت، فساد و فناوری تولید مواد غذایی، مهم می‌باشد.از آنجایی که برداشت، درجه‌بندی و بسته‌بندی خرما (*Phoenix dactylifera* L.)اغلب به صورت دستی انجام می‌شود، حضور باکتری‌های با منشاء انسانی در آن دور از ذهن نیست. از طرف دیگر میکروب‌های موجود در خرما، بخصوص ارقام با رطوبت بالا، علاوه بر اینکه می‌توانند عاملی برای ترشیدگی تلقی شوند، ممکن است در تخمیر و تولید سرکه مفید باشند. در این پژوهش هفت رقم خرما از جنبه جمعیت میکروبی و ویژگی‌های شیمیایی بررسی شد. ماده خشک و اسیدیته ارقام مختلف خرما به ترتیب بین ۷۲ تا ۸٦ درصد و ۰/۰٦ تا ۰/۷۸ درصد متغیر بود. باکتری‌های جدا شده، با کمک تکثیر ناحیه 16S rDNA، تحلیل برش آنزیمی DNA ریبوزومی تکثیر یافته (ARDRA)، توالی‌یابی و در نهایت مقایسه ژن‌های16S rRNA، شناسایی شدند. نتیجه این پژوهش بر حضور *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*،*ائروکوکوس*،*باسیلوس* و *لوکونوستوک مزنتروییدس* در ارقام خرمای محلی دلالت داشت.

کلید واژگان: خرما، 16S rDNA، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، PCR، ARDRA

* مسئول مکاتبات: r-farimani@uk.ac.ir

۱- مقدمه

ایران با تولید بیش از یک میلیون تن خرما در سال، دومین تولید کننده بزرگ این محصول باغی در جهان می‌باشد [۱]. بیش از ۹۸/۷ درصد خرمای کشور در استان‌های جنوبی (کرمان، سیستان و بلوچستان، خوزستان، بوشهر، فارس و هرمزگان) تولید می‌شود [۲]. بخش قابل توجهی از محصول تولیدی به استان‌های دیگر یا خارج از کشور ارسال می‌شود. به دلیل وسعت جغرافیایی بازار مصرف و اهمیت آن بخصوص از جنبه اقتصاد مقاومتی، توجه به مطالعه جمعیت میکروبی خرمااز منظر بهداشت، فساد و فناوری تولید، مهم می‌باشد.

از جنبه بهداشتی، میوه‌ها در هر مرحله‌ای از رشد، برداشت، فرآوری، توزیع، خرده‌فروشی و آماده‌سازی نهایی ممکن است به عوامل بیماری‌زا بخصوص بیماری‌زاهای مدفوعی آلوده شوند [۳]. مواردی همچون مصرف ضایعات آلی به عنوان کود، آلودگی آب مورد استفاده برای آبیاری به مدفوع انسان و حیوانات، تماس مستقیم چهارپایان، حیوانات وحشی و پرندگان و مسائل پس از برداشت همچون بهداشت کارگران از جمله مسیرهای انتقال آلودگی می‌باشد [٤]. خرما اغلب به صورت تازه مصرف می‌شود و فرآوری خاصی با هدف کاهش جمعیت یا مرگ عوامل بیماری‌زا صورت نمی‌گیرد. بنابراین شناخت عوامل بیماری‌زای احتمالی، راه‌های انتقال و کنترل، تعیین شاخص‌ها و روش‌های مناسب پایش، از جنبه سلامت مصرف کننده و تضمین صادرات پایدار ضروری می‌باشد. در مطالعه‌ای به سال ۲۰۱۰ میلادی، مشخص شد که بیش از نیمی از خرماها و محصولات خرمایی مورد بررسی، دارای مخمرهای اسموفیل و کپک در مقادیری بالاتر از استاندارد ۱۰۱٦ (۲۰۰۲) امارات متحده عربی می‌باشد. با این وجود حضور دو باکتری *اشریشیا کلی* و *سالمونلا* تشخیص داده نشد [۵]. با این حال تحقیقی دیگر بر حضور *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* در خرما دلالت داشت [٦]. در بررسی خرما در سه مرحله مختلف رشد و رسیدگی، *آسپرژیلوس فلاووس*تولید کننده آفلاتوکسین تنها در مرحله نارسی[1]برخی ارقام خرما مشاهده شد [۷].

یکی از علائم واضح فساد در مواد غذایی، پدیده‌ای به نام ترشیدگی است که بر اثر مصرف مواد قندی توسط میکروب‌ها و تولید اسیدهای آلی به وجود می‌آید. حضور باکتری‌های اسید لاکتیک و باکتری‌های اسید استیک به همراه مخمرها، عامل اصلی ترشیدگی میوه‌ها و آبمیوه‌ها می‌باشد [۸]. در خرما، مهم‌ترین پدیده فساد، ترشیدگی می‌باشد[۹]. علاوه بر ترشیدگی، تولید الکل بر اثر تخمیر و رشد سطحی کپک‌از دیگر موارد فساد خرما است [۱۰]. مطالعه فساد میکروبی رطب نشان داد که گونه‌های مختلفی از جنس‌های *لاکتوباسیلوس*، *زیگوساکارومایسس*، *کاندیدا*، *پیچیا*، *آسپرژیلوس* و *پنیسیلیوم*در آن حضور دارند که محتوای رطوبت خرما و دمای نگهداری، عاملی تعیین کننده در ایجاد فساد می‌باشد [۱۱].

حضور میکروب‌های عامل ترشیدگی و اثرات آن، یک روی سکه است. روی دیگر سکه، کاربردهای بالقوه این موجودات در تولید فرآورده‌های تخمیری می‌باشد. از جنبه فرآوری، سرکه مهم‌ترین محصول تخمیری حلال به دست آمده از خرما است. این محصول که خاستگاه تاریخی آن منطقه خاورمیانه و شمال آفریقاست، در کشورهای حاشیه خلیج فارس و حاشیه شرقی و جنوبی دریای مدیترانه طرفداران بسیاری دارد [۱۲ و ۱۳]. بنابراین، یکی از زمینه‌های مطرح شده، جداسازی و شناسایی نژادهای جدید با ویژگی‌های مطلوب فناورانه از میوه‌های گرمسیری و نیمه‌گرمسیری و به کارگیری آن در تولید

1. Kimri

قندالکل‌ها، قنداسیدها و اسیدهای آلی می‌باشد [۱۴].

هدف این پژوهش،مطالعه تنوع جمعیت میکروبی ارقام مختلف خرماو کشف احتمالی نژادهای دارای کاربرد فناورانه است. علاوه بر این با درک بهتر از جنس‌های حاضر در این میوه، می‌توان سازوکارهای موثرتری برای مقابله با عوامل میکروبی فسادزا و افزایش زمان ماندگاری یافت. در نهایت شناسایی عوامل بیماری‌زای احتمالی، هدف دیگری بود که در این تحقیق دنبال شد.

۲- مواد و روش

۲-۱- نمونه‌برداری

ارقام خرما در فاصله زمانی شهریور تا مهر ۱۳۹۵تهیه و تا زمان آزمایش‌هایشیمیایی و میکروبی در شرایط سرد (دمای ٤ تا ٦ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شد.ارقام مختلف خرمای مورد بررسی در این پژوهش، در مرحله تمر[۲] برداشت شدند.دو رقم خرمای کبکاب و زاهدی از شهر بهبهان خریداری شد. همچنین سه رقم شاهانی، مردارسنگ و مضافتی از شهرستان جیرفت تامین شد. رقم‌های استعمران، هلیله و یک رقم دیگر مضافتی نیز به ترتیب از شهرهای شادگان، اندوهجرد و بم تهیه شدند.لازم به ذکر است که مقدار نمونه تهیه شده از ارقام مختلف خرما، بین ۵۰۰ تا ۱۰۰۰ گرم بود.

۲-۲-بررسی ویژگی‌های فیزیکوشیمایی نمونه‌های خرما

اندازه‌گیری ماده خشک بر اساس استاندارد ملی ایران به شماره ٦٧٢ انجام شد [۱۵]. برای تعیین pH، از دستگاه pH متر (مدل PTR79، مهندسی زاگ شیمی) استفاده شد. مقدار اسیدیته با روش تیتراسیون به کمک محلول استاندارد هیدروکسید سدیم ۰/۱ نرمال و شناساگر فنل‌فتالئین تعیین و اسیدیته بر حسب درصداسید مالیک گزارش شد.

۲-۳- کشت میکروبی و جداسازی باکتری‌ها

مقدار ۱۰ گرم نمونه خرما به ۹۰ میلی لیتر رقیق کننده پپتون واتر[۳] (pH = ۷/۰ ± ۰/۲) اضافه شد (رقت 10^{-1}) و رقیق‌سازی تا رقت 10^{-3} صورت گرفت[۱٦ و ۱۷]. از هر کدام از رقت‌ها به مقدار یک دهم میلی لیتر به سطح محیط کشت MRS آگار[٤] (برای باکتری‌های اسید لاکتیک) و محیط کشت GYC آگار[٥] (برای رشد باکتری‌های اسیداستیک) منتقل و گرمخانه‌گذاری در شرایط هوازی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲٤ تا ۷۲ ساعت انجام شد. کپک و مخمر روی محیط کشت YGCآگار[٦]در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤٨ ساعت تا ۵ روز رشد یافت و سپس کلنی‌ها شمارش شد[۱۸].حد تشخیص، مساوی یا بالاتر از یک سیکل لگاریتمی در نظر گرفته شد. وضعیت ظاهری کلنی،رنگ‌آمیزی گرم و مشاهده میکروسکوپی، آزمون کاتالاز و ایجاد هاله روشن (مربوط به تولید اسید) روی محیط کشت GYC از دیگر مواردی بود که بررسی شد. جدایه‌های باکتریایی به دست آمده از ارقام خرما برای مطالعات بعدی و شناسایی با کمک روش‌های مولکولی در محیط کشت مشابه حاوی ۲۰ درصد گلیسرول در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند. مشخصات رقیق کننده و محیط کشت‌های مصرفی در جدول ۱ ارائه شده است.

2. Tamr

3. Peptone water
4. De Man, Rogosa and Sharp (MRS) Agar
5. Glucose, Yeast extract, Calcium Carbobonate (GYC) Agar
6.Yeast extract, Glucose, Chloramphenicol (YGC) Agar

Table 1 Culture media and diluent components

Components (g)	GYC	MRS	YGC	Peptone water
Glucose	100	20	20	---
Yeast extract	10	10	5	---
Peptone	---	10	---	10
Calcium carbonate	20	---	---	---
Sodium acetate	---	5	---	---
Dipotassium hydrogen phosphate	---	2	---	---
Diammonium hydrogen citrate	---	2	---	---
Magnesium sulphate	---	0.2	---	---
Sodium chloride	---	---	---	5
Chloramphenicol	---	---	0.1	---
Agar	15	15	15	---
Water (ml)	1000	1000	1000	1000

۲-٤-استخراج DNAکل میکروبی

جدایه‌های باکتریایی ذخیره شده، در محیط کشت MRS یا GYC آگار به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد رشد کردند. سپس DNA ژنومی با کمک کیت استخراج DNA از باکتری‌های گرم مثبت (سیناکلون، ایران) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده، استخراج و خالص شد و تا زمان بررسی‌های بعدی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. ارزیابی کیفیت و کمیت DNA استخراجی با کمک الکتروفورز ژل آگارز یک درصد و دستگاه نانودراپ (NanoDrop^{TM} One^{C}, Thermo Scientific, USA) انجام شد.

۲-۵- تکثیرDNA 16S rDNA به کمک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

ژن 16S rRNA به کمک دو آغازگر[۷] 27FYM و 1492R تکثیر شد [۱۹]. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۲ ارائه شده است.واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم ۵۰ میکرولیتر حاوی ۲۵ میکرولیتر Master Mix RED (2X)(Amplicon, Denmark)، یک میکرولیتر از هر آغازگر رفت و برگشت (Macrogen, South Korea) با غلظت ۱۰ پیکومول بر میکرولیتر، ۵ تا ۱۵ میکرولیتر DNA استخراجی (تقریبا ۱۰ تا ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر) و مابقی آب با درجه مولکولی[۸] بود.

واکنش‌ها در دستگاه ترمال سایکلر (Master Cycler Gradiant, Eppendurf, Germany) با استفاده از چرخه حرارتی زیر انجام شد. واسرشت[۹] اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه تکثیر (واسرشت در ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤۵ ثانیه و تکثیر در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه) و در پایان توسعه نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. موفقیت تکثیر 16S rDNA با الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز روی ژل آگارز یک درصد در بافر TBE 0.5X و اختلاف پتانسیل ۸۰ ولت به مدت ٦۰ دقیقه تایید شد. محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تا زمان واکنش هضم آنزیمی در یخچال نگهداری شد.

Table 2 Primers used for 16S rDNA amplification

Primer Name	Sequence
27FYM	5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3'
1492R	5'GGTTACCTTGTTACGACTT-3'

۲-٦- تحلیل قطعات برشی DNA ریبوزومی تکثیر یافته

برای تحلیل قطعات برشی (محدود شده) DNA ریبوزومی تکثیر یافته[۱۰]، محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در دو واکنش جداگانه به کمک آنزیم‌های برشی HinfI و TaqI(Thermo Scientific, USA) هضم شد.واکنش هضم حاوی ۱ میکرولیتر آنزیم (10 U/µL)، ۲ میکرولیتر بافر (10X)، محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به حجم ۱۰ میکرولیتر

7. Primer
8. Molecular grade water
9. Denaturation
10. Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA)

(تقریبا ۰/۱ تا ۰/۵ میکروگرم DNA) و آب با درجه مولکولی به حجم ۱۸ میکرولیتربود. مخلوط واکنش حاوی آنزیمبرشی HinfI به مدت ۱۲۰-۹۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در حمام آبگرم نگهداری شد. واکنش حاوی آنزیم برشی TaqIنیز به مدت ۱ ساعت در دمای ٦٥ درجه سانتیگراد در حمام آب داغ نگهداری شد. محصولات واکنشهضمهر یک از آنزیم‌ها به کمک الکتروفورز با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد و تحت ولتاژ ثابت ۸۰ ولت به مدت ۹۰ دقیقه از یکدیگر جدا شدند. از خطکش مولکولی 100bp (سیناژن، ایران) برای تعیین اندازه محصول PCR و محصولات هضم آنزیمی استفاده شد. در نهایت ژل‌ها با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و تحت تابش فرابنفش عکس برداری شدند.

۲-۷- توالی‌یابی و مقایسه توالی‌های ژن 16S rRNA

بر اساس نتایج هضم آنزیمی، از هرجدایه با الگوی متفاوت هضمی، یک نمونه محصول PCR برای تعیین توالیبه شرکت ماکروژن (کره جنوبی) ارسال گردید. انطباق و تعیین مشابهت توالی به دست آمده از طریق الگوریتم BLASTn در پایگاه اطلاعاتیNCBI صورت گرفت [۲۰].

۲-۸- تحلیل آماری

آزمون‌های شیمیایی در سه تکرار انجام شد و نتیجه به صورت میانگین± انحراف معیار بیان گردید.آنالیز واریانس در سطح معنی‌داری ($p < 0.05$) و مقایسه میانگین با کمک آزمون دانکن به وسیله نرم‌افزار SAS انجام شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی خرما

ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی ارقام خرمای مورد بررسی در این پژوهش در جدول ۳ گزارش شده است.

Table 3 physicochemical properties of different date fruit cultivars

Variety	Total Solids (%)	pH	Acidity (%)
Estamaran	86.2±0.9[a]	6.06±0.02[e]	0.35±0.04[d]
Halileh	76.2±1.6[b,c]	7.37±0.03[a]	0.06±0.03[f]
Kabkab	85.0±2.1[a]	5.72±0.01[g]	0.64±0.03[b]
Mazafati (Bam)	79.1±2.4[b]	6.90±0.03[c]	0.23±0.05[e]
Mazafati (Jiroft)	71.7±0.5[d]	7.03±0.03[b]	0.31±0.07[d,e]
Mordarsang	86.1±0.6[a]	5.95±0.06[f]	0.78±0.06[a]
Shahani	73.1±3.5[c,d]	6.82±0.01[d]	0.50±0.05[c]
Zahedi	75.3±1.2[c]	6.88±0.01[c]	0.53±0.03[c]

Values are mean±SD: DMRT, Duncan's Multiple Range Test ($p < 0.05$).
Values within the same column with different letter differ significantly ($p < 0.05$).

۳-۲- ویژگی‌های میکروبی خرما

نتیجه ویژگی‌های میکروبی ارقام خرمای مطالعه شده در این تحقیق در جدول ٤ ارائه شده است.

Table 4 Microbial counts of various date fruit cultivars (Log CFU/g)

Date fruit variety	Mold and yeast (YGC)	Total counts (MRS)	Total counts (GYC)
Estamaran	<1	2.65	3.15
Halileh	5.69	4.96	5.42
Kabkab	4.25	3.25	4.68
Mazafati (Bam)	<1	<1	<1
Mazafati (Jiroft)	<1	2	2.30
Mordarsang	3.83	<1	2
Shahani	4.07	<1	<1
Zahedi	1.18	1.7	2.54

کمترین مقدار کپک و مخمر در ارقام استعمران، مضافتی بم، مضافتی جیرفت و زاهدی مشاهده گردید. در مقابل رقم

خرمای هلیله دارای بیشترین بار باکتریایی و کپک و مخمر بود. چنین به نظر می‌رسد که بالا بودن رطوبت، حضور مواد قندی بالا، قرار گرفتن در معرض آلودگی‌های میکروبی محیطی و احتمالا شرایط دمایی نگهداری پس از برداشت تا زمان نمونه‌برداری از جمله عواملی باشند که به بالاتر بودن بار میکروبی این رقم خرما منجر شده است. مشاهدات آزمایشگاهی هم بر این موضوع صحه می‌گذارد به گونه‌ای که این رقم مدت کوتاهی پس از مطالعه جمعیت میکروبی و در شرایطی که در یخچال نگهداری می‌شد به سرعت ترش شد و عوارض کپک‌زدگی در آن مشاهده گردید.

بررسی جمعیت باکتریایی ارقام خرما روی دو محیط کشت GYC و MRS نشان داد دو رقم خرمای شاهانی و مضافتی بم دارای کمترین بار میکروبی و در عوض خرمای هلیله با جمعیت باکتریایی $۲/٦ \times ۱۰^{۵}$ و $۹/۲ \times ۱۰^{٤}$ که به ترتیب روی دو محیط کشت GYC و MRS رشد کرده بودند، حاوی بیشترین بار میکروبی بودند.

نتایج پژوهش شناسی و همکاران (۲۰۰۲) نشان دادشمارش کل ارقام مختلف خرما متفاوت و بین ٦/۸ تا کمتر از ۱ ($\log_{10}$ CFU/g) می‌باشد. علاوه بر این معلوم شد که ارقام مختلف خرما در مرحله رطب نسبت به سایر مراحل رسیدگی، دارای بیشترین مقدار شمارش کل می‌باشند ونگهداری ارقام مختلف خرما به مدت دو هفته تحت رطوبت نسبی ۹۸ درصد و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به افزایش شمارش کل می‌انجامد[۷].در پژوهشی دیگر مشخص شد که بار میکروبی اولیه خرما بر حسب Log_{10}CFU/g بین ۲/۵۵ تا ۳/٦۹ و شمارش کپک و مخمر بین ۲/۳۹ تا ۳/٤۱ در نوسان بود[۲۱].

شمارش صفر باکتری یا کپک و مخمر برای ارقام استعمران، شاهانی، مردارسنگ و مضافتی بم، لزوما به معنای استریل بودن و عدم حضور میکروب‌ها نیست. مطالعات مختلف نشان می‌دهد تحت تاثیر تنش‌های مختلف، میکروب‌ها به حالت «زنده اما غیر قابل کشت[11]» در می‌آیند[۲۲].

از ارقام مختلف خرما در مجموع ۳٤ جدایه شامل ۲٦ جدایه از محیط کشت GYC و مابقی از محیط کشت MRS جدا و کشت ذخیره از آن‌ها برای مطالعات بعدی تهیه شد. مطالعه ویژگی‌های فنوتیپی جدایه‌ها شامل آزمون کاتالاز، رنگ‌آمیزی گرم، ریخت میکروسکوپی و ظاهر کلنی روی محیط کشت نشان داد که ۱۹ جدایه کاتالاز مثبت و ۹ جدایه کاتالاز منفی بودند. از مجموعه جدایه‌ها، ۲۵ جدایه گرم مثبت به دست آمد. بررسی میکروسکوپی نشان داد که ٦ جدایه مخمر می‌باشند و ۳ جدایه ذخیره شده در فریزر ۷۰- نیز بازیابی نشد (جدول ۵).دو محیط کشت GYC و MRS، جزو محیط کشت‌های غیر اختصاصی می‌باشند. ترکیبات مورد استفاده در این دو محیط کشت بخصوص محیط کشت GYC به محیط کشت YGC شباهت بسیار دارد. به همین دلیل رشد مخمر روی دو محیط کشت GYC و MRS دور از انتظار نیست و تعدادی جدایه مخمر از دو محیط کشت یاد شده به دست آمد. مورد مشابهی توسطحاجی‌محمدی گزارش شده است[۲۳].

حضور باکتری‌های خوشه‌ای شکل کروی، بر وابستگی آن‌ها به جنس *استافیلوکوکوس* دلالت داشت. از نظر وضعیت ظاهری رشد باکتری‌ها روی محیط کشت GYC، تعدادی از جدایه‌ها با تولید اسید، کربنات کلسیم محیط کشت را حل کردند و هاله روشن در اطراف کلنی‌ها شکل گرفت.

Table 5 The total number of bacteria and yeasts isolated from date fruit cultivars

Variety	Bacteria	Yeasts	Total
Estamaran	9	-	9
Halileh	3	3	6
Kabkab	11	2	13
Mazafati (Jiroft)	4	-	4
Mordarsang	1	-	1
Zahedi	-	1	1
Total	28	6	34

۳-۳- نتایج آزمایش‌های مولکولی

ژن 16S rRNA جدایه‌های باکتریایی به طول تقریبی ۱۵۰۰ جفت باز (bp) با کمک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تکثیر شد (شکل ۱). ژن تکثیر شده در مرحله بعد با کمک دو آنزیم HinfI و TaqI هضم شد و الگوی برشی با کمک الکتروفورز مشخص گردید (شکل ۲).

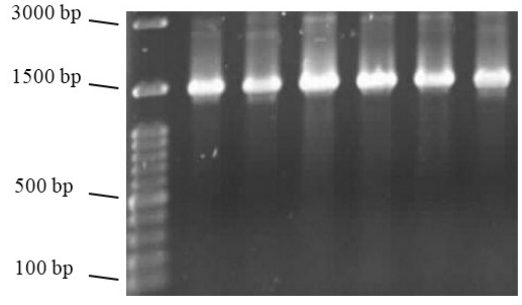

Fig 1 Amplified 16S rRNA genes and 100 bp DNA ladder

11. Viable but Not Culturable (VBNC)

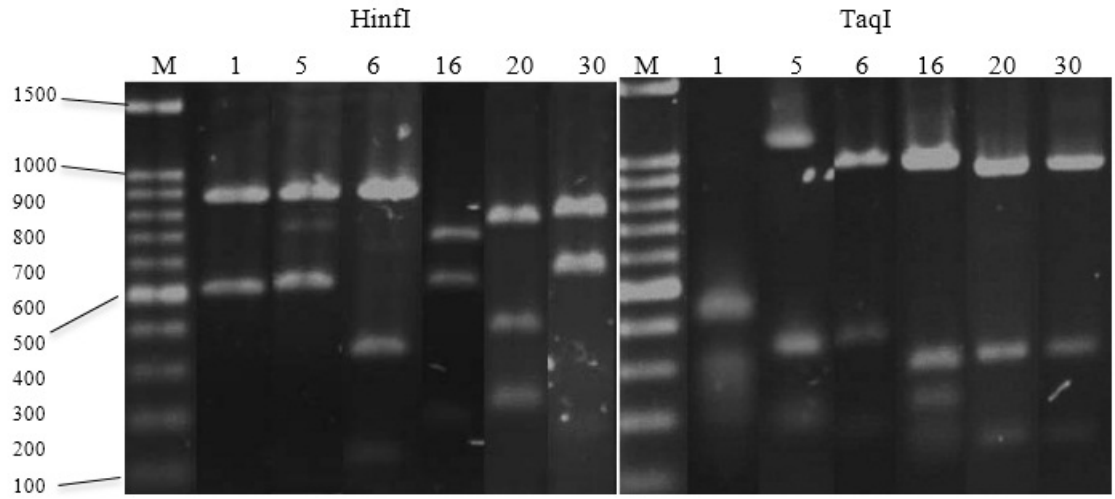

Fig 2 ARDRA profiles of bacterial isolates with the restriction enzymes HinfI and TaqI. (M) Molecular weight marker; (1) *Bacillus*; (5) *Staphylococcus*; (6) *Staphylococcus epidermidis*; (16) *Aerococcus*; (20) *Leuconostoc mesenteroides*; (30) *Staphylococcus*.

نماینده‌ای از هر الگوی هضمی متفاوت، برای توالی‌یابی انتخاب شد. نتیجه توالی‌یابی نماینده انگشت‌نگاره‌ها[12] و نتیجه بلاست[13] نشان داد که جدایه‌ها به گونه‌های *باسیلوس*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، *لوکونوستوک مزنتروییدس* و *ائروکوکوس* تعلق دارند. *ائروکوکوس* جزو باکتری‌های اسید لاکتیک طبقه‌بندی می‌شود که دارای هشت گونه مختلف می‌باشد[۲۴]. جدایه‌های *ائروکوکوس* به دست آمده در این پژوهش، بر اساس نتیجه بلاست به یکی از دو گونه *اورینکی*[14] یا *ویریدنس*[15] تعلق دارند. *ائروکوکوس ویریدنس* در هوا، گرد و خاک، گیاهان و حتی محیط‌های بیمارستانی مشاهده شده است و در شرایط نادر می‌تواند سبب عفونت‌های انسانی همچون عفونت مجاری ادراری و منتژیت حاد کودکان شود[۲۵]. *ائروکوکوس اورینکی* با نام قبلی *پدیوکوکوس اورینکی* نیز برای نخستین بار از ادرار اسب جدا شده است[۲۶]. ترادف ژن 16S rRNA گونه *اورینکی* با شماره دسترسی MH329637.1 و گونه *ویریدنس* با شماره دسترسی MF429593.1 در یک وبگاه مخصوص بررسی ترادف مقایسه شد[۲۷]. این دو گونه در موقعیت شماره ۱۱۴۰ در یک نوکلئوتید تفاوت دارند. به گونه‌ای که *ائروکوکوس اورینکی* دارای نوکلئوتید C و *ائروکوکوس ویریدنس* دارای نوکلئوتید T می‌باشد. برای شناسایی گونه جدایه‌های به دست آمده در این تحقیق، توالی‌یابی با کمک پرایمر 1492R پیشنهاد می‌شود. بر اساس مطالعه‌ای که توسط دلخواه و همکاران (۱۳۹۴) صورت گرفت، کلیه نمونه‌های خرمای تهیه شده از کارگاه‌های بسته‌بندی استان بوشهر دارای مخمر و کپک بودند. منشاء این آلودگی، پدیده گرد و غبار می‌باشد. بر اساس نتایج این پژوهش با وجود آنکه شست‌وشوی خرما موجب کاهش بار کپک در مقایسه با نمونه‌های شسته نشده شد؛ با این وجود بار کپک همچنان بالاتر از حد مجاز استاندارد ($۱۰^۳$ × ۱) بود. علاوه بر این بار مخمر در نمونه‌های شسته شده بالاتر بود که به دلیل افزایش رطوبت خرما و فعالیت بیشتر مخمرها بود [۲۸].

هوا، منشاء احتمالی حضور دو جنس *ائروکوکوس* و *باسیلوس* در نمونه‌های خرما می‌باشد. تاثیر مستقیم پدیده گرد و غبار بر افزایش بار میکروبی هوا در پژوهش‌های مختلف گزارش شده است [۲۹ و ۳۰]. جریانات هوایی، بار میکروبی را از بیابان، اقیانوس و مراکزی که فعالیت انسانی در آن وجود دارد به مناطق دیگر جابجامی‌کنند. در نتیجه وقوع این پدیده، میکروب‌ها از خاک و سایر منابع به گیاهان و میوه آن‌ها منتقل می‌شوند و حتی خطر انتقال عوامل بیماری‌زا وجود دارد [۳۰ و ۳۱]. در مورد میوه‌هایی همچون خرما که اغلب بدون شست و شو یا فرآوری خاص و به صورت خام مصرف می‌شود، ضروری است به مخاطرات احتمالی توجه شود. کارایی اثر شست و شو در حذف عوامل میکروبی نامطلوب و نیز میزان بقا و فعالیت عوامل بیماری‌زا در زمان نگهداری نیز از

12. Fingerprints
13. Blast
14. *A. urinaeequi*
15. *A. viridans*

دیگر مواردی است که باید در تحقیقات پیش رو مورد توجه جدی قرار گیرد.

با توجه به اینکه بسته‌بندی خرما به صورت دستی انجام می‌شود، حضور باکتری‌های با منشاء پوستی همچون *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* در خرما دور از انتظار نمی‌باشد. این موضوع در پژوهش الهزانی نیز مورد تایید قرار گرفته است[٦]. *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* یک باکتری بیماری‌زای فرصت طلب می‌باشد که می‌تواند عفونت مجاری ادراری و زخم‌ها و نیز عفونت پس از عمل جراحی را در پی داشته باشد[٣٢].

حضور *لوکونوستوک مزنتروئیدس* به عنوان یک باکتری اسید لاکتیک، در منابع گیاهی مختلف گزارش شده است. این باکتری دارای سه زیرگونه مختلف است که در تخمیر برخی فرآورده‌های لبنی (دوغ کره و پنیر گودا) و فرآورده‌های گیاهی (ساورکراوت و خیارشور) نقش دارد [٣٣].

٤- نتیجه‌گیری

در این پژوهش، باکتری *لوکونوستوک مزنتروئیدس* به عنوان تنها باکتری دارای ارزش فناورانه، جداسازی و شناسایی شد. حضور *ائروکوکوس واستافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، بر ضرورت بررسی عوامل میکروبی دیگر در خرما همچون *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* صحه می‌گذارد. خرما اغلب به صورت تازه مصرف می‌شود و فرایند خاصی که منجر به مرگ یا حذف عوامل بیماری‌زای میکروبی شود، بر آن اعمال نمی‌شود. بهداشت کارگران به عنوان مساله‌ای که به برداشت و بسته‌بندی خرما مربوط می‌شود نیز باید مورد توجه جدی قرار گیرد. از طرف دیگر شست و شوی کامل خرما توسط مصرف کننده توصیه می‌شود. علاوه بر این، باید استفاده از کشت‌های غنی کننده و رویکردهای مولکولی مستقل از کشت را برای شناسایی عوامل میکروبی در محصولاتی همچون خرما مد نظر قرار داد.

٥- تشکر و سپاسگزاری

این پژوهش با استفاده از اعتبارات پژوهشکده فناوری تولیدات گیاهی دانشگاه شهید باهنر کرمان انجام شده است و حقوق مادی و معنوی این طرح (به شماره ٩٠٠/١٠٦/پ) متعلق به پژوهشکده فناوری تولیدات گیاهی می‌باشد.

٦- منابع

[1] FAOSTAT (2018): http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize.Visited at November, 7, 2018.

[2] Anonymous, 2017. The totalarea under cultivation, production and yield per hectare of horticultural products of Iran in 2017. Ministry of Agriculture-Jahad. Department of Economy and Planning Affairs. ITC center. Available at http://amar.maj.ir/Dorsapax/userfiles/Sub65/baghi1396.pdf

[3] USFDA, 2001. Outbreaks Associated with Fresh and Fresh-Cut Produce. Incidence, Growth, and survival of Pathogens in Fresh and Fresh-Cut Produce. Chapter 1V, Analysis and Evaluation of Preventive Control Measurers for the Control and Reduction of Microbiological Hazards on Fresh and Fresh-Cut Produce, Center for Food Safety and Applied nutrition, U.S. Food and Drug Administration. Available: http://www.cfsan.fda.gov/~comm/ift3-4i.html

[4] 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.

[5] Al Jawally, E.A.K. 2010. Microbiological analysis of date palm fruit sold in ABU DHABI EMIRATE. Acta Hortic. 882, 1209-1212.

[6] Al Hazzani, A.A., Shehata, A.I., Rizwana, H., Moubayed, N.M.S., Alshatwi, A.A., Munshi, A., Elgaaly, G. 2014. Postharvest fruit spoilage bacteria and fungi associated with date palm (Phoenix dactylifera L) from Saudi Arabia. African Journal of Microbiology Research, 8(11): 1228-1236.

[7] Shenasi, M., Aidoo, K.E., Candlish, A.A.G. 2002. Microflora of date fruits and production of aflatoxins at various stages of maturation. International Journal of Food Microbiology, 79: 113–119.

[8] Hutkins, R.W. 2006. Microbiology and Technology of Fermented Foods, Blackwell publishing. 393-395.

[9] Karimi Pourfard, H. 2002. A look at the causes of rot and sourness of date palm fruit

and its control strategies. Date Palm and Tropical Fruits Research Institute of Iran. Agricultural Research, Education & Extension Organization (AREEO), Ministry of Agriculture-Jahad. 81: 1-11. (In Persian)
[10] Barreveld, W.H. 1993. Date palm products. FAO Agricultural services bulletin No. 101.
[11] Hamad, S.H. 2008. Microbial Spoilage of Date Rutab Collected from the Markets of Al-Hofuf City in the Kingdom of Saudi Arabia. Journal of Food Protection, 71 (7): 1406-1411.
[12] Conner, H. A., Algeier, R. J. 1976. Vinegar: Its History and Development,*In:* Advances in Applied Microbiology, 20: 81-133.
[13] Solieri, L., Giudici, P. 2009. Vinegars of the world, Milan, Springer-Verlag Italia S.r.l., p. 19.
[14] Saichana, N., Matsushita, K., Adachi, O., Frébort, I., Frebortova, J. 2015. Acetic acid bacteria: A group of bacteria with versatile biotechnological applications, Biotechnology Advances 33: 1260-1271.
[15] Dry fruits –Determination of the moisture content- test methods. 2015. Iranian National Standard Organization, INSO 672. (In Persian)
[16] Microbiology of the food chain - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination. Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions. 2018. Iranian National Standard Organization, INSO 8923-1. (In Persian)
[17] Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination. Part 4: Specific rules for the preparation of miscellaneous products. 2019. Iranian National Standard Organization, INSO 8923-4. (In Persian)
[18] Wu, J.J., Ma, Y.K., Zhang, F.F., Chen, F.S., 2012. Biodiversity of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in the fermentation of "Shanxi aged vinegars", a traditional Chinese vinegar. Food Microbiology, 30: 289-297.
[19] Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. and Lane, D.J. 1991 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Journal of Bacteriology, 173(2): 697-703.
[20] NCBI: http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
[21] Al Jasser, M.S. 2010. Effect of storage temperatures on microbial load of some dates palm fruit sold in Saudi Arabia market. African Journal of Food Science, 4(6): 359 – 363.
[22] Giraffa, G. 2004. Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. FEMS Microbiology Reviews, 28: 251-260.
[23] Hajimohammadi Farimani, R. 2015. Isolation, Phenotypic and Genotypic Characterization of Lactic Acid Bacteria from Artisanal Yoghurts in Khorasan and Study the Technological Properties of Yoghurt Producing Strains. Ph.D. Dissertation. Ferdowsi university of Mashhad. (In Persian)
[24] Annon. List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature: Retrieved October 28, 2018, from http://www.bacterio.net/aerococcus.html
[25] Collins, M.D., Falsen, E. 2009. *Aerococcus*,*In:* Bergey's manual of systematic bacteriology. Dordrecht, New York: Springer. Volume 3: 534.
[26] Felis, G.E., S. Torriani and F. Dellaglio. 2005. Reclassification of *Pediococcus urinaeequi* (ex Mees 1934) Garvie 1988 as *Aerococcus urinaeequi* comb. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55: 1325–1327.
[27] Annon. http://multalin.toulouse.inra. fr/multalin
[28] Delkhah, H., Mohebbi, G., Hasanzadeh, N., Kohan, G., Tahmasebi, R., Sadri, S., Rezaei, Y., Vahdat, K., Hasanzadeh, A., & Darabi, H. The effect of dust on the chemical and microbiological qualities of the date palm fruits from Bushehr-Iran. ISMJ, 18(1), 80-91. (In Persian)
[29] Jeon, E.M., Kim, H.J., Jung, K., Kim, J.H., Kim, M.Y., Kim, Y.P., Ka, J.O. 2011. Impact of Asian dust events on airborne bacterial community assessed by molecular analyses. Atmospheric Environment, 45: 4313-4321.
[30] Polymenakou, P.N., Mandalakis, M., Stephanou, E.G., Tselepides, A., 2008. Particle size distribution of airborne microorganisms and pathogens during an intense African dust event in the eastern Mediterranean. Environmental Health Perspectives, 116: 292-296.
[31] Griffin, D.W., 2007. Atmospheric movement of microorganisms in clouds of

desert dust and implications for human health. Clinical Microbiology Reviews, 20: 459-477.

[32] Vos, P.D., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K-H., Whitman, W.B. Eds. (2009). *Staphylococcus epidermidis*,*In:* Bergey's manual of systematic bacteriology. Dordrecht, New York: Springer. Volume 3: 405-406.

[33] Holzapfel, W.H., Björkroth, J.A., Dicks, L.M.T. 2009. *Leuconostoc*,*In:* Bergey's manual of systematic bacteriology. Dordrecht, New York: Springer. Volume 3: 628.

Study of microbial population in date fruit cultivars of Estamaran, Zahedi, Shahani, Kabkab, Mordarsang, Mazafati and Halileh

Nosratabadi, L.[1], Kavousi, H. R.[2], Hajimohammadi-Farimani, R.[3,4*], Balvardi, M.[4]

1. M.Sc. Graduate, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.
2. Assistant professor, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.
3. Research and Technology Institute of Plant Production (RTIPP), Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.
4. Assistant professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

(Received: 2018/12/15 Accepted:2019/06/23)

Studying the microbiota of food materials is important from sanitary, spoilage and technological perspectives. Due to manual harvesting, grading and packaging of date fruit (*Phoenix dactylifera* L.), it's not surprising to find bacteria of human origin in date fruit products. On the other hand, microbes present in date palm, especially high moisture content fruits, could produce lactic acid and acetic acid and make the fruit sour, so this kind of microbes potentially could be useful especially in food fermentation and vinegar production. In this project, seven varieties of date fruits were examined chemically and microbiologically. Total solid and acidity of dates were between 72% to 86% and 0.06% to 0.78% respectively. Isolated bacteria were identified by 16S rDNA amplification and restriction analysis (ARDRA), sequencing and 16S rRNA gene comparison. The results show *Staphylococcus epidermidis*, *Aerococcus*, *Bacillus* and *Leuconostoc mesenteroides* are the present bacteria in local date fruits.

Keywords: Date fruit, 16S rDNA, Polymerase Chain Reaction, PCR, ARDRA

* Corresponding Author E-mail address: r-farimani@uk.ac.ir