بررسی آلودگی میکروبی و میزان خلوص دوازده نوع ادویهٔ طب سنتی ایرانی در سطح شهر تهران در سال ۱۳۹۵

زهرا هادی‌دخت[الف]، محسن امین[الف*]، الماس عراقی[ب]، غلامرضا امین[ج]

[الف]گروه کنترل دارو و غذا، دانشکدهٔ داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
[ب]گروه میکروبیولوژی، دانشکدهٔ علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران
[ج]گروه فارماکوگنوزی، دانشکدهٔ داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: مسمومیت غذایی ناشی از ادویه‌های توصیه‌شده در طب سنتی پیوسته در سراسر جهان اعلام می‌شود و از این طریق سلامت عمومی جامعه را به‌خطر می‌اندازد. پرسش مهم در این حوزه این است که این محصولات تا چه اندازه دارای آلودگی میکروبی هستند و آیا از نظر مواد خوراکی در محدودهٔ سلامت می‌باشند.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق، راستی‌آزمایی نمونه، آلودگی میکروبی و میزان خلوص ۱۲ نوع ادویهٔ مختلف توصیه‌شده در طب سنتی ایرانی شامل ۷۹ نمونهٔ جمع‌آوری‌شده به‌صورت کاملاً تصادفی از نقاط مختلف شهر تهران در سال ۱۳۹۵، به روش‌های خرده‌نگاری و حساسیت آنتی‌بیوتیکی انجام شد که با به‌کارگیری ۸ نوع آنتی‌بیوتیک به شکل دیسک و با استفاده از جدول استاندارد NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) صورت گرفت.

یافته‌ها: نتایج شمارش تعداد کل باکتری‌ها نشان داد که ۲۶ درصد ادویه‌های بسته‌بندی‌شده و ۳۵ درصد نمونه‌های فلّه‌ای، آلودگی بالاتر از حد مجاز داشتند و نمونه‌های آلوده اغلب شامل باکتری‌های مزوفیل هوازی کوکسی گرم مثبت و باسیل گرم مثبت و مخمر و کپک بودند. همچنین تست‌های تشخیصی و بیوشیمیایی تأیید کرد که نمونه‌ها به باسیلوس آنتراسیس و باسیلوس سرئوس آلوده نبودند. دو مورد آلودگی مربوط به آسپرژیلوس نایجر در ادویه‌های آویشن و زیرهٔ سیاه و ۱۰ مورد آلودگی مربوط به ریزوپوس در ادویه‌های زیرهٔ سبز، پودر سیر و زردچوبه مشاهده شد. نتایج آنتی‌بیوگرام از نمونه‌هایی که آلودگی بالاتر از حد مجاز داشتند نشان داد که ۱۲ درصد باکتری‌ها به تتراسایکلین، ۹۴ درصد به پنی‌سیلین، ۲۴ درصد به ونکومایسین، ۱۲ درصد به جنتامایسین، ۸۲ درصد به سفکسیم، ۶ درصد به ایمی‌پنم، ۳۵ درصد به سیپروفلوکساسین و ۳۰ درصد به سفازولین مقاومت نشان دادند.

نتیجه‌گیری: بررسی‌های انجام‌شده نشان دادند با وجودی که نمونهٔ ادویه‌های بررسی‌شده کاملاً خالص بودند، درصد قابل‌توجهی آلودگی میکروبی داشتند که این نتایج جهت انجام مطالعات بیشتر قابل‌پیگیری هستند.

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۴۰۰
تاریخ پذیرش: مهر ۱۴۰۰

کلیدواژه‌ها: ادویه‌ها، آلودگی میکروبی، میزان خلوص

مقدمه:

ادویه تمام یا بخشی از یک گیاه است که اثر طعم‌دهندگی، اشتهاآوری یا هضم‌کنندگی و ایجاد رنگ و بو در غذا دارد که به‌صورت خشک یا تازه مصرف می‌شود و در طب سنتی ایرانی نیز همراه با اثرات درمانی معرفی شده‌اند (۱). سازمان جهانی استاندارد (International Organization for Standardization (ISO)) ادویه‌ها را چنین تعریف می‌کند: ادویه‌ها فرآورده‌های گیاهی هستند که جهت طعم و مزه‌بخشیدن به غذا استفاده می‌شوند (۲). سازمان غذا و داروی آمریکا (Food and Drug Administration (FDA)) نیز ادویه‌ها را این‌چنین معرفی می‌کند: ادویه‌ها به‌عنوان گیاهان معطر هستند که به‌صورت کامل یا پودرشده عرضه می‌شوند و

* فرد مسئول مکاتبات: m-amin@tums.ac.ir

البته به‌جز آنهایی هستند که به‌صورت سنتی به‌عنوان مواد غذایی، مورد مصرف قرار می‌گیرند؛ از قبیل پیاز و سیر و کرفس که نقش قابل‌توجهی در تغذیه دارند (۳).

برخی ادویه‌ها اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی دارند که ناشی از دارابودن روغن، آلکالوئیدها و مواد تخمیری آنهاست و به‌دلیل این اثرات به آنها گیاهان دارویی گفته می‌شود (۴، ۵). براساس مطالعات انجام‌شده دربارهٔ عملکرد اسانس‌های روغنی علیه باکتری‌های مولد فساد در مواد غذایی و باکتری‌های بیماری‌زا، نتایجی به‌دست آمده که نشان می‌دهد مواد ضدمیکروبی ادویه‌ها بر باکتری‌های گرم مثبت، به‌دلیل ساختار غشای سلولی‌شان، در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی، اثرات بازدارندگی بیشتری دارند (۶، ۷، ۸). مصرف ادویه‌جات تأثیر بسزایی در پیشگیری و درمان سرطان‌های گوارشی، افزایش سوخت‌وساز بدن، کاهش میزان قند و کلسترول خون دارد، به همین جهت سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) ادویه‌جات را در لیست GRAS (Generally recognized as safe) قرار داده است. مسمومیت غذایی ناشی از ادویه‌ها دلایل مختلفی دارد از جمله، آب غیرآشامیدنی که در برخی فرآیندها مانند خیساندن فلفل سیاه و تبدیل آن به فلفل سفید مصرف می‌شود و باعث آلودگی میکروبی ادویه می‌گردد. همچنین ادویه‌هایی که به‌صورت خام و بدون حرارت‌دیدن به مصرف می‌رسند ممکن است حاوی میکروارگانیسم‌هایی نظیر سالمونلا، ای کلای (E. coli)، استافیلوکوک و غیره باشند که اغلب باسیل‌های اسپورزای هوازی هستند (۹).

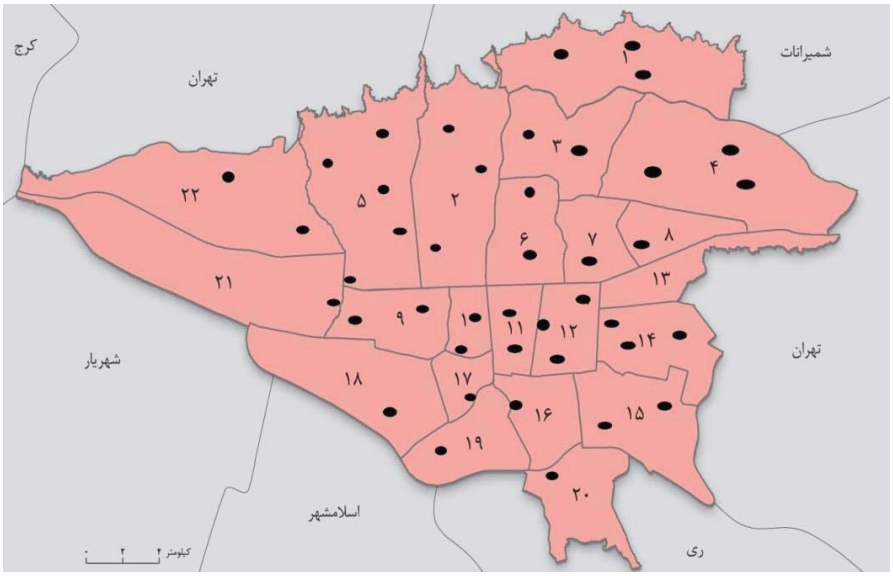
مسمومیت غذایی ناشی از ادویه‌ها موضوعی است که در سراسر جهان بسیار اهمیت دارد؛ خصوصاً در کشورهایی مانند آمریکا که تقریباً تمام ادویه‌ها را وارد می‌کند آن هم از کشورهایی مانند هند و ونزوئلا و اندونزی که از نظر سطح بهداشت در ردهٔ پایینی قرار دارند. همان‌طور که اشاره شد ادویه‌ها ترکیباتی با اثرات ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی دارند، اما این اثر آنها به عواملی از جمله کشت و برداشت، خشک‌کردن و بسته‌بندی، نگهداری و میزان ادویهٔ مصرفی بستگی دارد. اغلب میزان ادویه‌ای که به غذاها افزوده می‌شود برای اثر ضدمیکروبی خیلی مقدار کمی است و همچنین اثرات مفید این ترکیبات می‌تواند با سایر ترکیبات موجود در غذا مانند نمک و اسید و نگهدارنده‌ها تداخل ایجاد کند و از بین برود یا افزایش یابد؛ درنتیجه نمی‌شود همیشه اثرات ضدمیکروبی از ادویه‌ها انتظار داشته باشیم. طی آزمایش‌هایی مشاهده شده که ادویه‌ها می‌توانند به بروز مسمومیت غذایی منجر شوند که اکثراً ناشی از حضور باکتری سالمونلا باشند. طبق مطالعاتی که سازمان FDA بر روی ۲۰۰۰۰ نمونه ادویهٔ واردشده در بین سال‌های ۲۰۰۶ تا ۲۰۰۹ انجام داده مشخص شده است که حدود ۷ درصد از ادویه‌ها به باکتری سالمونلا آلوده بوده‌اند که این باکتری‌ها طی فرآیند جداکردن گیاه از خاک (Picking) و خشک‌کردن آن در محیط آلوده که در معرض پرندگان و سایر حیوانات و خاک بوده وارد ادویه‌جات شده‌اند.

البته این میکروب‌ها را می‌توان طی فرآیند پاستوریزه‌کردن (حرارت‌دادن در دمای ۱۶۰ درجهٔ سانتی‌گراد) و اشعه‌دادن با پرتوی گاما ۱۰ کیلوگری و استفاده از گاز اتیلن‌اکساید کاهش داد یا از بین برد (۱۰– ۱۳). در سال‌های اخیر، استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی مشتق‌شده از ادویه‌جات و گیاهان معطر، هم در زمینهٔ صنعت مواد غذایی و هم در زمینهٔ تحقیقات علمی افزایش یافته است که علت آن خواص ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی این مواد است که علاوه‌بر داشتن تأثیر مثبت بر افزایش زمان ماندگاری غذا، فاقد اثرات مضر نگهدارنده‌های شیمیایی هستند؛ بنابراین اگر این محصولات به‌طور صحیحی تهیه، فرآورده و نگهداری شوند، به‌ندرت دچار فساد میکروبی می‌شوند که علت اصلی آن فعالیت آبی پایین این فرآورده‌ها و کافی‌نبودن رطوبت لازم برای رشد میکروارگانیسم‌هاست. همچنین به‌علت ماهیت ادویهٔ پودرشده، امکان تقلب در آن بسیار زیاد است. هدف از این تحقیق، بررسی وضعیت آلودگی میکروبی موجود در ادویه‌های بسته‌بندی و فلّه در سطح شهر تهران، جهت ارتقای سلامت بهداشتی مواد غذایی در سطح جامعه می‌باشد.

مواد و روش‌ها:

نمونه‌برداری

تعداد ۷۹ نمونه از ۱۲ نوع ادویه، از پرمصرف تا کم‌مصرف، به روش نمونه‌برداری تصادفی ساده از مناطق مختلف شهر تهران در سال ۱۳۹۵ تهیه شد. تفاوت این نمونه‌ها در کارخانهٔ تولیدکننده، نوع ادویه، نحوهٔ بسته‌بندی و فلّه‌بودن آنها بود (شکل ۱). این ادویه‌ها شامل: فلفل سیاه (Black pepper)، فلفل قرمز (Chili pepper)، زردچوبه (Turmeric)، دارچین(Cinnamon)، سماق (Sumac)، آویشن (Thyme)، سیر (Garlic)، زیرهٔ سبز (Cumin)، زیرهٔ سیاه (Caraway)، خردل (Mustard)، مرزه (Savory) و زنجبیل (Ginger) بودند. از این میان خردل و زیرهٔ سبز و سیاه با مصارف کمتر و مرزه با مصرف متوسط در ایران مطرح هستند. محاسبهٔ حجم نمونه در این تحقیق بلاموضوع است به این دلیل که هدف این تحقیق تعمیم‌دادن نتایج به‌دست‌آمده به‌کل ادویه‌های تولیدشده در تهران یا ایران نیست. بنا به ملاحظات اخلاق در پژوهش از ذکر نام برندها در این تحقیق پرهیز شده است. همچنین این تحقیق منتج از پایان‌نامه با شماره ۵۵۸۳ در معاونت پژوهشی دانشکدهٔ داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران داوری و تأیید شده است.



شکل ۱. نقشهٔ محل‌های تهیهٔ نمونه‌های ادویه از ۲۲ منطقهٔ شهر تهران

آزمون میکروبی

ادویه‌ها پس از کدگذاری و درج خصوصیات نمونه، مطابق روش‌های استاندارد میکروبی مورد آزمون قرار گرفتند. موارد آزمون شامل شمارش کلی باکتری‌های مزوفیل هوازی و شمارش کپک و مخمرها بود. به‌طور خلاصه آزمون میکروبی به‌صورت زیر بوده است:

تهیهٔ سریال‌های رقّت

مقدار ۱ گرم از نمونهٔ توزین و کاملاً پودرشده در ۹ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل به‌صورت سوسپانسیون کاملاً هموژن شد و طبق استاندارد سازمان جهانی استاندارد ۴ رقت سریالی متوالی ۱:۱۰ تهیه گردید (۱۴).

کشت میکروبی نمونه‌های رقیق‌شده

بعد از تهیهٔ رقت‌های متوالی، از هر رقت ۱ میلی‌لیتر درون پلیت حاوی محیط TSA (Trypticase soy Agar) آگاردار و ۱ میلی‌لیتر روی پلیت حاوی محیط SDA (Sabouroud dextrose agar) که به آن کلرآمفنیکل اضافه شده بود، به روش Pour plate method ریخته و کشت داده شدند. سپس پلیت میکروبی را به‌مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در گرمخانهٔ ۳۰ تا

۳۵ درجه و پلیت قارچی را در گرمخانهٔ ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۷۲ ساعت قرار دادیم و بعد از مدت زمان طی‌شده، نتایج طبق استاندارد ملی بررسی و پس از انتخاب پلیت مناسب جهت شمارش کلنی‌ها (دارای ۳۰ تا ۳۰۰ کلنی)، اقدام به شمارش و محاسبهٔ میزان آلودگی نمونه‌ها شد.

فریزکردن کلنی‌ها

تعداد ۱۷ نوع تیپ کلنی میکروبی و ۱۳ نوع تیپ کلنی قارچی به‌دست آمد که این کلنی‌ها جهت جداسازی از پلیت اولیه روی محیط TSA و SDA جدید جداگانه کشت داده شدند و بعد از رشدکردن کلنی‌ها، جهت انجام قسمت‌های تأییدی و تست‌های مقاومت میکروبی، تحت شرایط استریل به کرایوتیوب‌های حاوی ۱ میلی‌لیتر محیط (حاوی) ۲۰ درصد گلیسرول و ۸۰ درصد محیط SDB جهت ذخیره‌کردن در فریزر ۸۰- درجهٔ سانتی‌گراد انتقال داده شدند.

تست‌ها و آزمایش‌های تشخیصی

از هر ۱۷ نوع تیپ کلنی میکروبی و ۱۳ نوع تیپ کلنی قارچی یک گسترش میکروبی بر روی لام میکروسکوپی تهیه و رنگ‌آمیزی گرم انجام شد. سپس زیر میکروسکوپ نوری زمینه‌روشن با لنز شیء x۱۰۰ (Objective) مشاهده شدند. جهت اطمینان از نبود دو باکتری باسیلوس سرئوس و باسیلوس آنتراسیس تست‌های تأییدی- تشخیصی مانند لسیتیناز، حرکت و سیترات انجام شد، همچنین با کشت کلنی‌های قارچی و بررسی آنها نیز نوع کلنی‌های قارچی مشخص شدند (۱۵).

خرده‌نگاری

خرده‌نگاری شامل بررسی میکروسکوپیک و ماکروسکوپیک ۱۲ نمونه ادویه با میکروسکوپ نوری زمینه روشن است. خرده‌نگاری برای شناسایی گونه‌های دارویی موجود در بازار استفاده می‌شود که اصولاً به شکل خرد یا پودرشده هستند. این نمونه‌ها فقط شامل اندام‌های مورد مصرف گیاه مانند پوست تنه، برگ، گل، دانه، ریشه یا ریزوم گیاه می‌باشد. اجرای روش خرده‌نگاری براساس صفات ماکروسکوپیک گیاه مانند رنگ، بو، مزه و سایز ذرات و تطابق آنها با نمونه‌های استانداردشده در هربوراتوم دانشکدهٔ داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شد و سپس در مطالعهٔ میکروسکوپیک ساختار اندام گیاه طبق مراحل زیر صورت گرفت.

رنگ‌بری

در این فرآیند از محلول‌های مختلفی مانند آب ژاول، پتاس الکلی و کلرال هیدرات جهت بی‌رنگ‌کردن بافت نمونه برای مشاهدهٔ اندام گیاهی می‌توان استفاده کرد. در این تحقیق از کلرال هیدرات استفاده کردیم. به تناسب حجم نمونهٔ مورد بررسی، محلول کلرال هیدرات روی نمونه ریخته و دو برابر این حجم، آب مقطر اضافه کردیم، سپس این محلول را حرارت دادیم تا به مرحلهٔ جوش رسید. بعد از تکان‌دادن و همگن‌کردن، یک قطره روی لام قرار داده شد و با میکروسکوپ نوری زمینه روشن با بزرگنمایی ۱۰ برابر و ۴۰ برابر مشاهده شدند. کلرال هیدرات به‌طور کامل کلروفیل ساختار گیاهی را از بین برد و سطح اندام‌های گیاهی و دیواره‌ها به شکل کاملاً شفاف قابل‌مشاهده شد. تصاویر میکروسکوپی صفات تشخیصی نمونه‌های مشاهده‌شده با تصویر نمونه‌ها در استانداردها مقایسه شد. صفات تشخیصی در نمونه‌های مختلف متفاوت است؛ برای مثال در نمونهٔ دارچین باید به‌دنبال مشاهدهٔ بافت‌هایی مانند چوب‌پنبه و اسکلرانشیم بود؛ زیرا این بافت‌ها از پوست تنهٔ درخت تهیه می‌شوند که جزء ساختارهای پسین گیاه (ساختارهایی که بعد از رشد گیاه مورد استفاده قرار می‌گیرند) هستند یا در نمونهٔ مرزه که از برگ گیاه استفاده می‌شود باید در تصویر بافتی آن روزنه‌ها و دسته‌جات آوندی و انواع پارانشیم را مشاهده کرد. اغلب نمونه‌های مورد بررسی در این تحقیق به شکل پودر بودند و قطعات بافتی به شکل پراکنده و جداشده مطابق با استانداردها بررسی شدند.

تهیهٔ الگوی مقاومت میکروبی

روش‌های مختلفی برای تعیین حساسیت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها وجود دارد. در این بررسی از تست روتین و سادهٔ دیسک استفاده شد. بعد از فریز و ذخیره‌کردن کلنی انواع

باکتری‌ها، مقداری از کلونی هر باکتری به‌وسیلهٔ لوپ میکروبی برداشته و در سرم فیزیولوژی استریل به‌صورت سوسپانسیون درآورده شد. در تست آنتی‌بیوگرام میزان کدربودن خیلی مهم است؛ بنابراین در انتخاب مقدار نمونه باید دقت شود تا نمونه بیشتر یا کمتر از نیم مک فارلند (محیط نیم مک فارلند محیطی در تست آنتی‌بیوگرام است که میزان کدربودن نمونهٔ خود را با آن مقایسه می‌کنیم. این محیط حاوی $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ باکتری است. غلظت سوسپانسیون میکروبی مورد نظر جهت تست باید مطابق با استاندارد نیم مک فارلند باشد.) نباشد. اگر میزان کدورت کمتر از نیم مک فارلند باشد، مقداری دیگر از نمونه را در سرم فیزیولوژی استریل حل می‌کنیم یا اگر میزان کدربودن، بیشتر از نیم مک فارلند باشد در این صورت باید مقداری سرم فیزیولوژی استریل اضافه کرد تا به کدورت مناسب و برابر با نیم مک فارلند برسد. بعد از تهیهٔ محلول هموژن، محلول را با سواب استریل به‌هم زده و بعد از آب‌کشی‌کردن سواب به جدار لولهٔ محیط کشت، بر روی محیط کشت به‌صورت چمنی کشت دادیم به‌طوری‌که هیچ نقطه‌ای در محیط از قلم نیفتد. بعد از کشت، ۸ نوع دیسک آنتی‌بیوگرام را که نیم ساعت قبل از تست، بیرون یخچال قرار داده شده بود انتخاب و بر روی محیط کشت انتقال قرار داده شد. نحوهٔ قراردادن دیسک‌ها در محیط کشت و به‌صورت دایره‌ای و با فاصله از همدیگر حدود ۱۲ میلی‌متر بود که از دیوارهٔ هم فاصله داشتند. دیسک‌های مورد استفاده اغلب شامل آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر بر باکتری‌های گرم مثبت بودند. بعد از قراردادن دیسک‌ها، در پلیت را بسته و به‌مدت ۲۴ ساعت آنها را در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد، انکوبه کردیم. بعد از ۲۴ ساعت پلیت را بررسی کردیم. سپس قطر هالهٔ عدم رشد با خط‌کش اندازه‌گیری شد و با توجه به جدول استاندارد CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)، گزارش تست آنتی‌بیوگرام برای هریک از آنتی‌بیوتیک‌ها به‌صورت حساس (Susceptible)، مقاوم (Resistant) یا نیمه‌حساس (Intermediate) گزارش شد.

جدول۱. دیسک‌های آنتی‌بیوتیک استفاده‌شده در تست‌های حساسیت آنتی‌بیوتیکی

شماره	آنتی‌بیوتیک	غلظت آنتی‌بیوتیک (میلی‌گرم)
۱	تتراسایکلین	۳۰
۲	پنی‌سیلین	۱۰
۳	ونکومایسین	۳۰
۴	جنتامایسین	۱۰
۵	سفکسیم	۵
۶	آمپی‌سیلین	۱۰
۷	سیپروفلوکساسین	۵
۸	سفازولین	۳۰

آنالیز آماری

یافته‌های میزان آلودگی میکروبی نمونه‌ها به‌صورت درصد بیان شده و مقایسهٔ آماری بین گروه‌ها صورت نگرفته است. همچنین تعداد کلنی‌های میکروبی شمارش‌شده برای هر نمونه به‌صورت میانگین ± انحراف‌معیار در جدول شمارهٔ ۲ درج شده است.

یافته‌ها:

شمارش تعداد کل میکروارگانیسم‌ها

طبق استانداردهای سازمان استاندارد ملی ایران، حد مجاز آلودگی میکروبی ادویه‌ها $۱۰^{۵}$ (کلنی در هر گرم نمونه) است (۱۶) و براساس جدول شمارهٔ ۲ به‌طور میانگین، آلودگی میکروبی نمونه‌های مورد آزمون در حد $۱۰^{۶}$ (کلنی در هر گرم

نمونه) بود. با توجه به کشت میکروبی ۷۹ نمونهٔ مورد آزمون، تعداد کلنی‌های رشدکرده که بالاتر از حد مجاز بودند و به‌عنوان «آلودگی میکروبی» گزارش می‌شوند به شرح ذیل می‌باشد: ۴ نمونه فلفل قرمز (۲ نمونهٔ فلّه‌ای و ۲ نمونهٔ بسته‌بندی‌شده)، ۲ نمونه مرزهٔ بسته‌بندی‌شده، ۵ نمونه زنجبیل (۳ نمونهٔ فلّه‌ای و ۲ نمونهٔ بسته‌بندی‌شده)، ۶ نمونه زیرهٔ سیاه (۳ نمونهٔ فلّه‌ای و ۳ نمونهٔ بسته‌بندی‌شده)، ۴ نمونه فلفل سیاه (۳ نمونهٔ فلّه‌ای و ۱ نمونهٔ بسته‌بندی‌شده)، ۲ نمونه زیره (۱ نمونهٔ فلّه‌ای و ۱ نمونهٔ بسته‌بندی‌شده)، ۲ نمونه سماق فلّه‌ای، ۴ نمونه آویشن فلّه‌ای، ۸ نمونه سیر (۴ نمونهٔ فلّه‌ای و ۴ نمونهٔ بسته‌بندی‌شده)، ۱۰ نمونه زردچوبه (۵ نمونهٔ فلّه‌ای و ۵ نمونهٔ بسته‌بندی‌شده). از این میان بار میکروبی در نمونه‌های زردچوبه بالاترین حد را نشان داد و به‌طور کلی ۶۰ درصد از نمونه‌ها آلودگی میکروبی داشتند (۳۲ درصد نمونه‌های فلّه‌ای و ۲۸ درصد از نمونه‌های بسته‌بندی‌شده).

جدول۲. میانگین کلنی‌های شمارش‌شده در نمونهٔ ادویه‌های دارای آلودگی میکروبی

میانگین کلنی‌های شمارش‌شده (کلنی در هر گرم نمونه) ± انحراف معیار	نمونهٔ ادویه	شماره
$۱/۵۶ \times ۱۰^{۶} \pm ۲/۰۸$	فلفل سیاه	۱
$۴/۵۱ \times ۱۰^{۶} \pm ۳/۶۶$	فلفل قرمز	۲
$۱/۱۱ \times ۱۰^{۷} \pm ۰/۴۷$	زردچوبه	۳
$۱/۶۳ \times ۱۰^{۶} \pm ۲/۵۵$	سیر	۴
$۴/۱۸ \times ۱۰^{۵} \pm ۳/۳۰$	آویشن	۵
$۲/۶۰ \times ۱۰^{۵} \pm ۲/۸۲$	سماق	۶
$۴/۰۲ \times ۱۰^{۵} \pm ۰/۱۵$	زیره	۷
$۷/۰۵ \times ۱۰^{۶} \pm ۰/۸۵$	زیرهٔ سیاه	۸
$۷/۴۶ \times ۱۰^{۶} \pm ۲/۳۵$	زنجبیل	۹
$۵/۰۰ \times ۱۰^{۵} \pm ۳/۳۱$	مرزه	۱۰

انواع میکروارگانیسم‌ها

از انواع میکروارگانیسم‌های یافت‌شده در نمونه‌های آلوده ۹۰ درصد شامل باسیل‌های گرم مثبت و ۱۰ درصد شامل کوکسی‌های گرم مثبت بودند. طی تست‌های تأییدی_ تشخیصی صورت‌گرفته (تست سیترات، لسیتیناز و حرکت) در نمونه‌های باسیلوس آزموده‌شده، این تست‌ها همگی منفی بودند. بر این اساس هیچ کلنی از نمونه‌های باسیلوس شامل Bacillus cereus و Bacillus anthracis مشاهده نشد. همچنین با توجه به آزمایش‌هایی که روی کلنی‌های قارچی صورت گرفت، مشخص شد که ۹۵ درصد گونه‌ها شامل مخمر (Yeast) و ۵ درصد شامل Aspergillus niger و Rizopus بودند.

تست مقاومت آنتی‌بیوتیکی

بعد از مشاهدهٔ میزان آلودگی میکروبی و نوع میکروارگانیسم‌ها در ۷۹ نوع نمونه که آزموده شدند (۱۷ تیپ کلنی میکروبی و ۱۳ تیپ قارچی یافت شد)، الگوی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در باکتری‌های منتخب طی روش AST (Antimicrobial susceptibity test) به‌دست آمد و براساس استانداردهای ذکرشده در CLSI مقاوم یا حساس‌بودن میکروارگانیسم‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها گزارش شد.

با بررسی قطر هاله‌های عدم رشد و سنجش میزان حساسیت این میکروارگانیسم‌ها به ۸ آنتی‌بیوتیک منتخب (اغلب مؤثر بر باکتری‌های گرم مثبت) نتایج قرائت شد. اغلب آنتی‌بیوتیک‌ها بر باکتری‌های گرم مثبت مؤثر بودند. نتایج نشان دادند که ۱۲ درصد باکتری‌ها به تتراسایکلین‌ها، ۹۴ درصد به پنی‌سیلین، ۲۴ درصد به ونکومایسین، ۱۲ درصد به جنتامایسین، ۸۲ درصد به سفکسیم، ۶ درصد به ایمی پنم، ۳۵ درصد به سیپروفلوکساسین و ۳۰ درصد به سفازولین مقاومت نشان دادند.

خرده‌نگاری

از آنجایی که اغلب ادویه‌ها به شکل پودر آسیاب‌شده هستند، احتمال وجود ناخالصی بسیار بالاست. طی آزمایش‌های خرده‌نگاری انجام‌شده بعد از تهیهٔ فرم محلول ادویه‌ها با استفاده از محلول کلرال هیدراته، بافت گیاهی این نمونه‌ها زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰ و ۴۰ مشاهده شد و بعد از مطابقت‌دادن با نمونه‌های استاندارد، نتیجهٔ حاصل‌شده نشان داد که این نمونه‌ها هیچ‌گونه آلودگی از گیاهان دیگر یا مواد اضافهٔ خارجی نداشتند و همگی قابل‌قبول بودند.

بحث:

با وجود اینکه هیچ‌یک از نمونه‌ها از نظر مشخصات میکروپیک دارای آلودگی به‌صورت همراهی با گیاهان دیگر یا مواد زائد دیگر نبودند، طبق یافته‌های این تحقیق ۶۰ درصد از نمونه‌ها آلودگی میکروبی بالاتر از حد مجاز داشتند که ۳۲ درصد شامل نمونه‌های فلّه‌ای و ۲۸ درصد شامل نمونه‌های بسته‌بندی بود. در صنایع غذایی، بسته‌بندی‌کردن ادویه‌ها خود به‌نوعی به کاهش بار میکروبی منجر می‌شود. علاوه بر آن طی مراحل فرآوری ادویه‌ها از روش‌هایی مانند اشعه‌دادن (توسط پرتوی گاما KGray ۱۰)، بهره‌گیری از گاز اتیلن‌اکساید، جوشاندن در دمای ۱۰۰ درجه به‌مدت ۲۰ دقیقه با حلال فرمالدئید و از حرارت خشک آون استفاده می‌کنند (۱۰– ۱۳، ۱۷)؛ بنابراین کم‌بودن میزان آلودگی میکروبی ادویه‌های بسته‌بندی قابل‌درک است. با این حال گزارش‌هایی از آلودگی میکروبی ادویه در جهان وجود دارد (۲۲، ۲۳).

بسیاری از ادویه‌های افزوده‌شده در غذا فرآیند حرارت را طی می‌کنند و اکثر باکتری‌های بیماری‌زا به حرارت حساس هستند. با وجود این بعضی از سموم ترشح‌شده توسط بعضی قارچ‌ها مانند آفلاتوکسین و نیز اسپور باکتری‌ها به حرارت مقاوم‌اند. از طرفی بعضی ادویه‌ها مانند سماق، آویشن، فلفل و دارچین به‌صورت خام نیز مصرف می‌شوند؛ بنابراین لزوم کنترل کیفی این فرآورده‌ها مهم است.

در کلیهٔ جوامع از جمله ایران مبحث مسمومیت غذایی و متعاقب آن مقاومت آنتی‌بیوتیکی حائز اهمیت است. موضوعی که در تحقیق‌ها به آن کمتر پرداخته شده، تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی می‌باشد که در این تحقیق بر روی نمونه‌هایی انجام شده است که میزان آلودگی آنها بالاتر از حد مجاز بود. براساس نتایج حاصل از این تست بر روی باکتری‌های جداشده که عمدتاً باسیل گرم مثبت بودند، مشاهده شد که درصد قابل‌توجهی از نمونه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های پرمصرف مانند پنی‌سیلین و سفکسیم مقاوم بودند که این امر از لحاظ بهداشت عمومی حائز اهمیت است. با وجود این، نمونه‌های آلوده، نسبت به آنتی‌بیوتیک ایمی‌پنم به‌طور قابل‌توجهی حساس هستند؛ بنابراین انتظار می‌رود که در صورت وقوع مسمومیت غذایی ناشی از مصرف ادویه‌های آلوده از تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی جهت رسیدن به پاسخ مؤثر به درمان استفاده شود.

در تحقیقی که Krishnaswamy و همکاران در سال ۱۹۷۴ انجام دادند، شمارش کلی باکتری‌ها در فلفل سیاه cfu/g $۱۰^{۴}$–$۱۰^{۷}$ گزارش شد (۱۸). نتایج این تحقیق نشان داد که تمامی موارد شمارش کلی باکتری‌های مزوفیل هوازی در نمونه‌های فلفل سیاه بالاتر از حد استاندارد بود که احتمالاً ناشی از بالابودن میکروب‌های طبیعی این ادویه نسبت به سایر ادویه‌ها یا کمتربودن مواد ضدمیکروبی آن، مانند پلی‌فنول‌های آروماتیک یا روغن‌های فرار است که خاصیت ضدمیکروبی به ادویه می‌دهند.

در تحقیق حاضر طی بررسی‌ها این نتیجه حاصل شد که دارچین کمترین میزان آلودگی را دارد که این اثر می‌تواند ناشی از حضور سینامیک اسید با خاصیت ضدمیکروبی بالا در این ادویه باشد. همچنین زردچوبه بالاترین میزان آلودگی را نشان داد که می‌تواند ناشی از روند تهیه و فرآوری این ادویه باشد. به این صورت که معمولاً ریزوم را پس از خارج‌کردن از زمین تمیز می‌کنند و ریشه‌های آن را جدا کرده و خوب با آب می‌شویند، پس از آن در آب جوش قرار می‌دهند و کمی می‌جوشانند سپس آن را خارج و پهن می‌کنند تا در مدت چند روز خشک شود. در این مراحل سه‌چهارم وزن ریزوم خام از دست می‌رود. سطح خارجی ریزوم خشک و آماده‌شده به رنگ خاکستری مایل به زرد یا قهوه‌ای مایل به زرد است و بوی آن معطر و طعم آن تلخ است که پس از قطعه‌قطعه‌کردن به دو صورت به بازار عرضه می‌شوند. یکی به‌صورت استوانه‌ای به طول ۴ تا ۸ سانتی‌متر و قطر ۱ تا ۲ سانتی‌متر و دیگری نوع گرد است که از ریزوم اولیه به‌دست می‌آید و مشاهده می‌شود این روش آماده‌سازی باعث آلودگی می‌شود. طی مطالعاتی که Paster انجام داده است، مشخص شده که ادویه‌ها به‌دلیل وجود ترکیبات مؤثری دارای فعالیت‌های آنتی‌میکروبی هستند که این فعالیت در دارچین و خردل بسیار قوی، در زیرهٔ سبز، زیرهٔ سیاه و آویشن، متوسط و در انواع فلفل‌ها و زنجبیل کم می‌باشد. فعالیت ضدمیکروبی ادویه‌ها به ترکیبات مؤثر آنها بستگی دارد؛ به‌طور مثال فعالیت سیر ناشی از ترکیبی به نام آلیسین (allicin) است. خردل حاوی ماده‌ای به نام آلیل ایزو دی‌تیوسیانات و دارچین حاوی cinnamaldehyde و eugenol می‌باشد (۱۹).

در تحقیقی که شعبانی و همکارش در سال ۱۳۹۰ انجام دادند، از مجموع ۹۰ نمونهٔ تهیه‌شده از مراکز عرضهٔ مواد غذایی شهر تهران، بیشترین شمارش باکتری‌ها همواره مربوط به زردچوبه، پودر سیر، دارچین، فلفل سیاه و قرمز و جوز هندی بود که اغلب این باکتری‌ها، باسیل مزوفیل گرم مثبت اسپوردار بودند. شهراز و همکارانش در مطالعه‌ای با عنوان بررسی آلودگی‌های میکروبی ادویه‌های بسته‌بندی‌شدهٔ عرضه‌شده در فروشگاه‌های زنجیره‌ای شهروند در سطح شهر تهران در سال ۱۳۸۶ نشان دادند، میانگین شمارش تعداد باکتری‌های مزوفیل هوازی در زردچوبه $۶/۳\times۱۰^{۷}$ cfu/g در فلفل سیاه ۷×۱۰^{۶} cfu/g و در دارچین $۹۲/۱\times۱۰^{۴}$ cfu/g بوده است. در تحقیق حاضر نیز تعداد شمارش‌شدهٔ کل میکروارگانیسم‌ها از حد مجاز بالاتر بود (۲).

زارع و همکارانش در مطالعه‌ای نشان دادند بیشترین آلودگی در میان ادویه‌جات مربوط به انواع فلفل بود. طی مطالعهٔ آنها بیشترین شمارش باکتری‌های هوازی مربوط به فلفل سیاه، سفید، قرمز، ادویهٔ مخلوط، زنجبیل، پودر سیر و زردچوبه بوده است.

این آلودگی بین $۸/۲\times۱۰^{۸}$ cfu/g – $۲/۵\times۱۰^{۷}$ شمارش شده و کمترین میزان آلودگی در میخک و دانهٔ کرفس به میزان ۴×۱۰^{۳} cfu/g بود که اغلب این میکروارگانیسم‌ها اسپوردار هوازی مزوفیل بودند (۲۰).

در مطالعه‌ای که Banerjee و همکارانش در هند انجام دادند، مشخص شد که شمارش باکتری‌های مزوفیل هوازی در ۵۱ درصد از نمونه‌ها مطابق با دستور عمل ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods) در سطح غیرقابل‌قبولی قرار داشت که بیشترین شمارش مربوط به فلفل ۸×۱۰^{۷} cfu/g و کمترین مربوط به پودر سیر ۵×۱۰^{۳} بود (۱۲).

مطابق با استاندارد ICMSF حد مجاز آلودگی میکروبی ادویه‌ها $۱۰^{۶}$ است که این حد مجاز طبق استاندارد ملی ایران $۱۰^{۵}$ می‌باشد؛ بنابراین در ایران که یک کشور در حال توسعه است و از طرفی نقش مهمی در واردات و خصوصاً صادرات ادویه‌ها دارد، رعایت اصول با سختگیری‌های بیشتری نسبت به سطح بین‌المللی انجام می‌شود (۱۶، ۲۱).

نتیجه‌گیری:

مطالعهٔ انجام‌شده برای راستی‌آزمایی میزان آلودگی ۱۲ نمونه ادویه شامل فلفل سیاه (Black pepper)، فلفل قرمز (Chili pepper)، زردچوبه (Turmeric)، دارچین (Cinnamon)، سماق (Sumac)، آویشن (Thyme)، سیر

(Garlic)، زیرهٔ سبز (Cumin)، زیرهٔ سیاه (Caraway)، خردل (Mustard)، مرزه (Savory) و زنجبیل (Ginger) انجام شد که در ۶ تکرار از ۲۲ نقطهٔ تهران جمع‌آوری شده بود و نشان داد که هرچند در مطالعهٔ خرده‌نگاری این نمونه‌ها هیچ‌گونه آلودگی از نظر سایر گیاهان همراه یا دیگر مواد دیده نشد، مطالعهٔ میکروبی نشان داد که ۶۱ درصد از نمونه‌ها آلودگی میکروبی بالاتر از حد مجاز داشتند که ۳۵ درصد شامل نمونه‌های فلّه‌ای و ۲۶ درصد شامل نمونه‌های بسته‌بندی بود. نمونه‌های آلوده اغلب شامل باکتری‌های مزوفیل هوازی کوکسی گرم مثبت و باسیل گرم مثبت و مخمر و کپک بودند. همچنین تست‌های تشخیصی و بیوشیمیایی تأیید کردند که نمونه‌ها به باسیلوس آنتراسیس و باسیلوس سرئوس آلوده نبودند. دو مورد آلودگی مربوط به آسپرژیلوس نایجر در ادویه‌های آویشن و زیرهٔ سیاه و ۱۰ مورد آلودگی مربوط به ریزوپوس در ادویه‌های زیرهٔ سبز، پودر سیر و زردچوبه مشاهده شد. نتایج آنتی‌بیوگرام از نمونه‌هایی که آلودگی بالاتر از حد مجاز داشتند نشان داد که ۱۲ درصد باکتری‌ها به تتراسایکلین، ۹۴ درصد به پنی‌سیلین، ۲۴ درصد به ونکومایسین، ۱۲ درصد به جنتامایسین، ۸۲ درصد به سفکسیم، ۶ درصد به ایمی‌پنم، ۳۵ درصد به سیپروفلوکساسین و ۳۰ درصد به سفازولین مقاومت نشان دادند.

این تحقیق نشان می‌دهد که به‌علت افزایش روزافزون جمعیت در کشور ایران با سرعت ۱/۶ درصد و درنتیجه وسعت‌گرفتن استفاده از ادویه، تأمین و عرضهٔ بهداشتی مواد غذایی موردنیاز مردم اعم از ادویه‌جات امری سخت و دشوار است و لذا انجام مستمر این‌گونه تحقیقات و نظارت و کنترل بیشتر سازمان‌های مربوطه بر روی مراحل تولید و بسته‌بندی و نگهداری این ادویه‌ها امری بسیار ضروری می‌باشد.

References:

1. Shahraz F, Kamran M, Khaksar R, Hosseini H, Kargar S, Enteshari M. Assessment of the microbiological quality of packed spices in the chain stores, shahrvand, in Tehran in 1386. Iranian Journal of Food Science and Technology. 2009;6(2):125-131.
2. Shabani SH, Zojaji M. Assessment of contaminated spices employed in food preparation concerned with the heat resistant spores. Journal of Food Technology and Nutrition. 2011;8(4):83-89.
3. Raghavan S. Handbook of spices, seasonings, and flavorings. CRC press; 2006 Oct 23.
4. Karim G. Microbial food tests. Tehran: University of Tehran Publishing; 1995. [In Persian].
5. Kaefer CM, Milner JA. The role of herbs and spices in cancer prevention. The Journal of Nutritional Biochemistry. 2008 Jun 1;19(6):347-61.
6. Karapinar M, Aktug ŞE. Inhibition of foodborne pathogens by thymol, eugenol, menthol and anethole. International Journal of Food Microbiology. 1987 Mar 1;4(2):161-6.
7. Raccach M. The antimicrobial activity of phenolic antioxidants in foods: A review 1. Journal of Food Safety. 1984 Sep;6(3):141-70.
8. Kalemba DA, Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Current Medicinal Chemistry. 2003 May 1;10(10):813-29.
9. Downes FP, Ito K. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. American Public Health Association; 1992.
10. Qasemian Safaei H. Diagnostic microbiology of food. Isfahan: Isfahan University of Medical Sciences; 2001. [In Persian].
11. Jay JM, Loessner MJ, Golden DA. Modern food microbiology. Springer Science & Business Media; 2008 Feb 5.
12. Banerjee M, Sarkar PK. Growth and enterotoxin production by sporeforming bacterial pathogens from spices. Food Control. 2004 Sep 1;15(6):491-6.
13. Carlin F. Origin of bacterial spores contaminating foods. Food Microbiology. 2011 Apr 1;28(2):177-82.
14. World Health Organization. Quality control methods for herbal materials. World Health Organization; 2011.
15. Doumith M, Day M, Ciesielczuk H, Hope R, Underwood A, Reynolds R, *et al*. Rapid identification of major Escherichia coli sequence types causing urinary tract and bloodstream infections. Journal of Clinical Microbiology. 2015 Jan;53(1):160-6.
16. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. Standard 3677, Microbiology of spices – Specifications. 1st revision. 2008. [In Persian].
17. Variyar PS, Bandyopadhyay C, Thomas P. Effect of τ-irradiation on the volatile oil constituents of some Indian spices. Food Research International. 1998 Mar 1;31(2):105-9.
18. Krishnaswamy MA, Patel JD, Nair KK, Muthu M. Microbiological quality of certain spices. Indian Spices. 1974;11(1/2):6-11.
19. Paster N, Menasherov M, Ravid U, Juven B. Antifungal activity of oregano and thyme essential oils applied as fumigants against fungi attacking stored grain. Journal of Food Protection. 1995 Jan;58(1):81-5.
20. Zare Z, Ghotbi K, Parto K. Processed spices in Iran. Proceedings of the 9th National Congress of Iranian Food Industries (Food and Standards); 1996. [In Persian].
21. Thatcher FS. Microorganisms in foods 2: Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications. University of Toronto Press; 1974. Vol.2.
22. Bakobie N, Addae AS, Duwiejuah AB, Cobbina SJ, Miniyila S. Microbial profile of common spices and spice blends used in Tamale, Ghana. International Journal of Food Contamination. 2017 Dec;4(1):1-5.
23. Mathot AG, Postollec F, Leguerinel I. Bacterial spores in spices and dried herbs: The risks for processed food. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 2021 Jan;20(1):840-62.