

## مطالعه و مدل سازی مرحله رشد تاخیری سالمونلا تیفی موریم متأثر از عوامل رشد انتخابی

دکتر افشین آخوندزاده<sup>۱</sup> دکتر ودود رضویله<sup>۱</sup>

مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۵، شماره ۲، ۸۳ - ۷۹، (۱۳۷۹)

سالمونلا تیفی موریم مورد مطالعه (به عنوان یک متغیر وابسته) متأثر از درجات مختلف فاکتورهای pH، نمک طعام و سوربات پتاسیم (به عنوان متغیرهای مستقل) در محدوده مورد مطالعه، آرایه داده شد.

### مواد و روش کار

**طرح آزمایش:** برای ارزیابی اثرات pH، نمک طعام، سوربات پتاسیم و درجه حرارت بر روی مدت زمان رشد تاخیری (Lag) سالمونلا تیفی موریم، از یک طرح بررسی اثرات ترکیبی چند فاکتوری، مشتمل بر چهار سطح pH (۰/۵، ۰/۳، ۰/۱، ۰) و سه غلظت نمک (۰/۵، ۰/۳، ۰) و سه سطح سوربات پتاسیم (۰/۳، ۰/۱، ۰) و سه درجه حرارت نگهداری (۲۵، ۳۵، ۴۵) درجه سانتیگراد) در یک محیط کشت مدل برات (BHI) استفاده شده در ضمن برای بررسیهای رشدی بعدی از جمله محاسبه لگاریتم درصد احتمال (Lag Probability, LP %) شروع رشد یک سلول سالمونلا تیفی موریم در برات (Brain Heart Infusion Broth, BHI) مشاهدات وضعیت رشدی در طی ۱۸ مرتبه به مدت ۴۳ روز تکرار گردید.

**باکتری مورد مطالعه:** کشت لیوفیلیزه، سالمونلا تیفی موریم شماره ۱۳۸ فاز تایپ ۲، گرفته شده از گروه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی تهران جهت این بررسی مورد استفاده قرار گرفت. در ابتدا این کشت لیوفیلیزه در محیط برات BHI در ۳۷ درجه به مدت ۴۸ ساعت، حداقل دو مرتبه به طور متوالی کشت داده شده سپس از کشت دوم بر روی آگار BHI که به صورت شیب دار در لوله بوده برده و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه نگهداری شد. از این کشت به عنوان کشت مورد استفاده در تحقیق استفاده گردید. این کشت در ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد و ماهیانه تجدید کشت گردید.

**تهیه میزان تلقیح باکتریایی:** تهیه میزان تلقیح سالمونلا، با انتقال باکتری از لوله های کشت شیب دار BHI (ماهیانه تجدید کشت می شد) به محیط برات BHI انجام گرفت. بعد از ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه، مجدداً کشت دومی از این کشت آبگوشت ۲۴ ساعت اولی بر روی برات BHI به مدت ۱۸ ساعت ۳۵ درجه داده شد. سپس لوله های استریل Cuvett تهیه گردید و به آنها ۵ میلی لیتر از محیط برات BHI استریل اضافه گردید سپس ابتدا برای بار اول مقدار مختلفی از کشت آبگوشت ۱۸ ساعته دومی بر روی لوله های Cuvett مختلف، حاوی ۵ میلی لیتر برات BHI برده، با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (Milton Roy Company, USA) در طول موج ۶۰۰ نانومتر، جذب نوریشان خوانده شد. سپس از این لوله های Cuvett جهت شمارش تعداد باکتریها استفاده شد، تا در نهایت، لوله Cuvett که دارای  $10^7 \times 2$  باکتری در هر میلی لیتر می باشد، مشخص گردد. بدین ترتیب در دفعات بعدی انجام آزمایش، در هر بار با مشخص شدن جذب نوری مورد نظر، به طور تقریبی مقدار  $10^7 \times 2$  باکتری در هر میلی لیتر مشخص گردد (که بعداً با کشت بر روی آگار شمارش نیز تأیید می شد) سپس همان گونه که بعداً بیان می شود از این لوله Cuvett حاوی  $10^7 \times 2$  باکتری در هر میلی لیتر سرریالهای رقت  $10^5$  تا  $10^{-2}$  باکتری در هر میلی لیتر با استفاده از برات BHI با ترکیب فاکتورهای مورد نظر آزمایش (که در قسمت بعدی توضیح داده خواهد شد)، تهیه گردید. از لوله حاوی بالاترین

در یک مطالعه چند فاکتوری، اثرات مقادیر مختلف pH (۵ تا ۷/۴)، غلظتهای مختلف نمک طعام (۰/۵ تا ۳ درصد)، سوربات پتاسیم (صفر تا ۰/۳ درصد) و حرارت نگهداری (۱۵ تا ۳۵ درجه سانتیگراد) بر روی زمان رشد تاخیری (Lag time) سالمونلا تیفی موریم (*Salmonella typhimurium*) در محیط مدل برات (Brain Heart Infusion) مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت. مدت زمان رشد تاخیری سالمونلا تیفی موریم به طور معنی داری تحت تاثیر مقادیر عوامل رسوبات پتاسیم، pH و درجه حرارت نگهداری قرار گرفت ( $P < 0/002$ ) ولی غلظتهای نمک طعام به کار گرفته شده در این مطالعه تاثیر معنی داری بر روی آن نداشت ( $P = 0/5$ ) با استفاده از معادله رگرسیون خطی و ترانسفورماسیونهای مناسب ارتباط زمان رشد تاخیری (به عنوان یک متغیر وابسته) با مقادیر pH، سوربات پتاسیم، حرارت نگهداری و نمک طعام (به عنوان متغیرهای مستقل) به صورت مدل پیشگو (Predictive model) تهیه گردید. با استفاده از این مدل طول زمان رشد تاخیری در محدوده دامنه مقادیر متغیرهای به کار گرفته شده در این مطالعه با مقدار  $R^2 = 0/82$  قابل محاسبه و پیشگویی خواهد بود. واژه های کلیدی: سالمونلا تیفی موریم، فاکتورهای رشد، رشد تاخیری، مدل سازی.

با وجود گزارشهای روزافزون بیماریهای ناشی از مصرف مواد غذایی آلوده به اجرام بیماریزای غذایی سراسر دنیا متأسفانه هیچ گونه راه شناخته شده ای جهت جلوگیری آلودگی اتفاقی فرآورده های غذایی با انواع مختلف میکروبیها از قبیل سالمونلا، کلاستریدیوم بوتولینم (*C. botulinum*)، کمپیلوباکتر (*Campylobacter*) و ... آرایه نشده است (۱۹، ۱۰، ۷). تولیدکنندگان مواد غذایی باید همیشه به فکر این گونه آلودگیها در مواد غذایی تولید شده بوده و راههای کنترل آنها را در نظر داشته باشند (۹). در سالهای اخیر آرایه مدل های ریاضی جهت پیشگویی رشد و بقای باکتریها گسترش زیادی پیدا کرده است (۱۵ و ۱۳، ۵، ۴). این چنین مدلها یک زمینه علمی پیشنهاد جهت کامپیوتری کردن بهداشت فرآوری تولید مواد غذایی مورد توجه صنایع غذایی می باشد که سبب صرفه جویی در انجام آزمایشات میکروبیولوژیکی گران قیمت می شود (۴). مدل های ریاضی که رشد اجرام بیماریزای غذایی در محیط های آزمایشگاهی متأثر از فاکتورهای درون اثر (PH، آب فعال و نگهدارنده ها) و بیرون اثر (حرارت و رطوبت) را پیشگویی می نماید. تخمین بسیار مناسب و قابل قبولی از رفتار باکتری در مواد غذایی را در اختیار ما قرار می دهند (۱۸، ۱۵).

مدلهای پیشگوی متعددی از رفتار رشد گونه های مختلف سالمونلا در محیط های آزمایشگاهی متأثر از درجه حرارت، pH و آب فعال آرایه شده است (۱۵، ۸، ۴). این مطالعه جهت آرایه مدلی برای اثرات درجات حرارت نگهداری (T) (۱۵ تا ۳۵ درجه سانتیگراد) مقادیر مختلف pH (۵ تا ۷/۴)، نمک طعام (NaCl) (۰/۵ تا ۳ درصد) و سوربات پتاسیم (KS) (صفر تا ۰/۳ درصد) بر روی زمان رشد تاخیری (Lag time, Lag) سالمونلا تیفی موریم در محیط کشت مدل برات (Brain Heart Infusion, BHI) انجام پذیرفته است. با انجام آزمون رگرسیون خطی، مدلی پیشگو جهت پیشگویی مدت زمان رشد تاخیری

۱) گروه آموزشی بهداشت و کنترل مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.



همانگونه که در جدول ۱ نشان داده شده است،  $pH \geq 6/5$  همراه با مقدار غلظت سوربات پتاسیم کوچکتر و یا مساوی ۰/۳ درصد، مقدار غلظت نمک طعام کوچکتر و یا مساوی ۳ درصد و درجه حرارت نگهداری بزرگتر یا مساوی ۱۵ درجه سانتیگراد بر روی رشد ارگانسیم تأثیر نداشت. مدت زمان رشد تاخیری از ۰/۵ تا ۲/۶۹ روز بود. البته در ۳ درصد نمک طعام همراه با ۰/۳ درصد سوربات پتاسیم در سطح  $pH = 6/5$  و حرارت ۱۵ درجه سانتیگراد رشد باکتری به طور قابل توجهی کاهش پیدا کرد و زمان Lag تا ۱۸ روز افزایش پیدا کرد. همچنین با کاهش  $pH$  به سطح مساوی یا کمتر از ۵/۷۵ همراه با مقادیر در نظر گرفته شده از فاکتورهای مورد بحث یعنی  $NaCl \leq 3\%$ ،  $KS \leq 3\%$  و درجه حرارت مساوی یا بزرگتر از ۱۵ درجه سانتیگراد از رشد باکتری به طور قابل توجهی کاسته شد و زمان Lag تا ۴۳ روز افزایش پیدا کرد. در سطح  $pH = 5$  و درجه حرارت  $T \geq 15$  همراه با  $NaCl \leq 3\%$  و  $KS = 3\%$  رشد ارگانسیم در طی ۴۳ روز مطالعه کاملاً متوقف شد ( $Lag > 43$ ).

**آنالیزهای آماری:** از آنالیز واریانس (Analysis of Variance, ANOVA) جهت بررسی اثرات سطوح مختلف  $pH$ ،  $NaCl$ ،  $T$  و  $KS$  و تداخلهای (Interactions) دو فاکتوری و ۳ فاکتوری آنها بر روی Lag استفاده شد. جدول ۲ بیانگر این اثرات می باشد.

مدت زمان رشد تاخیر سالمونلا تیفی موریم به طور معنی داری ( $P < 0/02$ )  $< 0/0001$ ) تحت تاثیر  $pH$ ،  $T$ ،  $KS$  و تداخلهای دو فاکتوری یعنی  $NaCl \times KS$ ،  $NaCl \times T$ ،  $KS \times T$ ،  $NaCl \times pH$ ،  $KS \times pH$ ،  $T \times pH$  و تداخلهای ۳ فاکتوری آنها یعنی  $NaCl \times KS \times T$ ،  $NaCl \times pH \times T$ ،  $KS \times pH \times T$  و  $NaCl \times KS \times pH$  قرار گرفت.

مدل سازی رفتار سالمونلا تیفی موریم (متغیر وابسته) متأثر از متغیرهای مستقل و ترانسفورمسیونهای آنها صورت گرفت. با استفاده از برنامه رگرسیون چند مرحله‌ای (SPSS/PC) بهترین مدل با بالاترین مقدار  $R^2 = 0/82$  به شرح ذیل به دست آمد:

$$\sqrt{1/Lag} = -0.646 - 2.577 \sqrt{KS} + 2.797 \sqrt{KS^2} - 0.273 \sqrt{NaCl} - 9.470 \times 10^{-3} \sqrt{NaCl^2} + 1.027 \sqrt{pH} + 2.368 \times 10^{-2} \sqrt{pH^2} - 0.406 \sqrt{T} + 2.031 \times 10^{-3} \sqrt{T^2} \cdot R^2 = 0.82$$

### بحث

توانایی رشد سالمونلا تیفی موریم در غذا و محیطهای آزمایشگاهی تحت یکسری از شرایط طراحی شده توسط محققین مختلف مورد ارزیابی و بررسی قرار گرفته است (۱۹، ۱۷، ۱۶، ۱۵، ۱۴، ۱۲، ۱۱، ۸، ۶، ۵). در این مطالعه یکی از ارزشهای رشدی یعنی زمان رشد تاخیری (۱۵، ۱۲، ۸، ۶، ۵) که در بهداشت و صنایع غذایی برای ارزیابی بهداشتی و قابلیت نگهداری غذا دارای اهمیت فوق العاده می باشد جهت بررسی کمی اثر سوربات پتاسیم،  $pH$ ، نمک طعام و درجه حرارت نگهداری بر روی سالمونلا تیفی موریم مورد مطالعه قرار گرفت.

آنالیزهای آماری نمایانگر، اثر معنی دار  $KS$ ،  $pH$ ،  $T$  و برخی از تداخلهای دو فاکتوری و سه فاکتوری آنها بر روی زمان رشد تاخیری بود با افزایش مقادیر  $KS$  زمان رشد تاخیری افزایش پیدا کرد که این اثر همراه با کاهش مقدار  $pH$  و درجه حرارت نگهداری تشدید گردید این مشاهدات مطابق با گزارش Park and Marth (۱۶). این محققین که چگونگی رشد سالمونلا تیفی موریم را در یک مدل کشت آبگوشت مغذی (Nutrient broth)، شیر بدون چربی (Skim milk) و شیرهای تغلیظ شده (Evaporated milk) در  $pH$ ، ۵، ۵/۵ و مقادیر سوربات ۲۰۰۰ و ۳۰۰۰ ppm در درجات حرارت نگهداری ۷ تا ۳۷ مورد بررسی قرار دادند، نتایج مشابهی با این تحقیق به دست آوردند (۱۶).

تلقیح یعنی  $10^5$  باکتری در هر میلی لیتر جهت بررسی مدت زمان Lag و از مجموعه رقتهای  $10^5$  تا  $10^{-2}$  باکتری در هر میلی لیتر جهت بررسیهای رشدی بعدی از قبیل % LP استفاده شد.

**تهیه سوبسترای برات BHI و تنظیم مقادیر مختلف فاکتورهای مورد نظر در آن:** ابتدا جهت تهیه برات پایه، ۳/۷ گرم از پودر محیط کشت BHI را در ۹۰ میلی لیتر آب مقطر در یک ارلن با حرارت ملایم حل نموده سپس بعد از سرد شدن، نمک طعام و سوربات پتاسیم در مقادیر مورد نظر جهت مطالعه اضافه گردید و سپس مقادیر  $pH$  ۷/۴ تا ۵ برای هر مجموعه ترکیب (۹۰ ml) مورد نظر با استفاده از اسید کلریدریک یک نرمال تنظیم گردید و حجم نهایی با استفاده از آب مقطر به ۱۰۰ ml رسید. سپس از محتویات ارلن با مجموعه ترکیبی مورد نظر در لوله‌های در پیچدار، هر یک به میزان ۹ میلی لیتر ریخته و سپس لوله‌های در پیچدار در اتوکلاو ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه استریل شدند سپس جهت صحت میزان سطح  $pH$  هر یک از لوله‌ها بعد از اتوکلاو، در لوله شاهد اتوکلاو شده میزان  $pH$  اندازه گیری شد و در صورت تغییر  $pH$  بعد از اتوکلاو، با استفاده از اسید کلریدریک یک نرمال استریل سطح  $pH$  هر یک از لوله‌های در پیچدار مورد استفاده در آزمون را در حد مورد نظر برای مطالعه، تنظیم گردید.

**تلقیح سوبسترای برات و گرمخانه گذاری:** همانگونه که گفته شد سریالهای رقت  $10^5$  تا  $10^{-2}$  از هر یک از لوله‌های Cuvett حاوی برات باکتریایی، با جذب نوری ۰/۳ (طول موج ۶۰۰ نانومتر) که مشخص کننده  $10^7$  باکتری در هر میلی لیتر محیط کشت داخل آن لوله‌های Cuvett می باشد. با استفاده از ۸ لوله در پیچدار حاوی برات BHI استریل، با مجموعه ترکیبی مورد نظر از هر یک از فاکتورهای  $NaCl$  -  $KS$  -  $pH$  مورد مطالعه تهیه گردید. بدین ترتیب سریالهای رقت  $10^5$  تا  $10^{-2}$  از  $10^5$  باکتری در هر میلی لیتر به دست آمده سپس محتویات (۹ میلی لیتری) هر یک از لوله‌های در پیچدار به طور استریل در قسمتهای ۳ میلی لیتری در داخل ۳ لوله سرپوشدار (Becton  $16 \times 100^{\text{mm}}$ ) Dickinson استریل ریخته و بدین ترتیب مجموعه  $8 \times 3 = 24$  لوله برای هر یک از مجموعه ترکیب ( $pH$  -  $NaCl$  -  $KS$  -  $T$ ) مورد نظر به دست آمد هر مجموعه ۲۴ تایی لوله‌ها در هر یک از حرارت‌های مورد نظر در مطالعه یعنی ۱۵، ۲۵، ۳۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴۳ روز نگهداری شد. در طی این مدت ۱۸ دفعه تمام لوله‌ها جهت مشاهده کدورت رشدی قابل رویت مورد بررسی قرار گرفتند.

**تعیین زمان رشد تاخیری (Lag time) در مطالعه:** مدت زمان رشد تاخیری برای بالاترین تلقیح در این مطالعه ( $10^5 / \text{ml}$ ) با استفاده از تعیین نزدیکترین زمان مشاهده کدورت قابل رویت در طی ۴۳ روز مورد مطالعه به دست آمد.

**آنالیز آماری و انتخاب مدل پیشگو:** اثرات مستقل و تداخلی مقادیر مختلف  $pH$ ،  $NaCl$ ،  $T$ ،  $KS$  بر روی مدت زمان رشد تاخیری (Lag) با استفاده از آنالیز واریانس با کمک از نرم افزار SPSS / PC+ ارزیابی گردید. از برنامه رگرسیون چند مرحله‌ای، جهت انتخاب مدل پیشگو، و پیشگویی (Lag) بعنوان یک متغیر وابسته متأثر از متغیرهای مستقل  $NaCl$ ،  $KS$  و  $T$  در طی ۴۳ روز مورد مطالعه، همراه با ترانسفورمسیونهای مربوطه، استفاده گردید. ضریب تعیین  $R^2$  (Coefficient of determination) به دست آمده، بیانگر میزان همخوانی مقادیر پیشگویی شده، متغیر وابسته مورد نظر (Lag) با مقادیر به دست آمده در تحقیق، در محدود مورد مطالعه تغییرات متغیرهای مستقل می باشد.

### نتایج

جدول ۱ نشان دهنده مدت زمان رشد تاخیری (Lag) سالمونلا تیفی موریم بر حسب روز، در محیط BHI متأثر از مجموعه ترکیب  $pH$   $NaCl$  و  $KS$  می باشد.

جدول ۳ - مقایسه مدت زمان رشد تاخیری (Lag) سالمونلاتیفی موریم برحسب روز به صورت مطالعه شده در آزمایش و پیش بینی شده از مدل در محیط برات BHI با pH برابر با ۵/۷۵ و مقادیر مختلفی از فاکتورهای KS, NaCl, T و pH

| pH<br>۵/۷۵         |                  | pH<br>۶/۵ |      | pH<br>۷/۴ |      | pH<br>۵ |      |
|--------------------|------------------|-----------|------|-----------|------|---------|------|
| Lag (پیش بینی شده) | Lag (مطالعه شده) | KS        | NaCl | KS        | NaCl | KS      | NaCl |
| ۰/۱۴               | ۰/۰۹             | ۰         | ۰/۵  | ۰         | ۰/۵  | ۰       | ۰/۵  |
| ۰/۱۸               | ۰/۱۲             | ۰         | ۱/۵  | ۰         | ۱/۵  | ۰       | ۱/۵  |
| ۰/۲                | ۰/۱۷             | ۰         | ۳    | ۰         | ۳    | ۰       | ۳    |
| ۰/۴۱               | ۰/۸۳             | ۰/۱۵      | ۰/۵  | ۰/۱۵      | ۰/۵  | ۰/۱۵    | ۰/۵  |
| ۰/۵۱               | ۱                | ۰/۱۵      | ۱/۵  | ۰/۱۵      | ۱/۵  | ۰/۱۵    | ۱/۵  |
| ۰/۷                | ۲/۸۷             | ۰/۱۵      | ۳    | ۰/۱۵      | ۳    | ۰/۱۵    | ۳    |
| ۰/۵۶               | ۴/۱۶             | ۰/۳       | ۰/۵  | ۰/۳       | ۰/۵  | ۰/۳     | ۰/۵  |
| ۰/۷۳               | ۹                | ۰/۳       | ۱/۵  | ۰/۳       | ۱/۵  | ۰/۳     | ۱/۵  |
| ۱/۰۶               | ۹                | ۰/۳       | ۳    | ۰/۳       | ۳    | ۰/۳     | ۳    |
| ۰/۳۷               | ۰/۴۵             | ۰         | ۰/۵  | ۰         | ۰/۵  | ۰       | ۰/۵  |
| ۰/۴۵               | ۰/۴۵             | ۰         | ۱/۵  | ۰         | ۱/۵  | ۰       | ۱/۵  |
| ۰/۹۸               | ۰/۴۶             | ۰         | ۳    | ۰         | ۳    | ۰       | ۳    |
| ۲                  | ۱/۵              | ۰/۱۵      | ۰/۵  | ۰/۱۵      | ۰/۵  | ۰/۱۵    | ۰/۵  |
| ۳/۳۵               | ۳/۹۲             | ۰/۱۵      | ۱/۵  | ۰/۱۵      | ۱/۵  | ۰/۱۵    | ۱/۵  |
| ۸/۴۷               | > ۴۳             | ۰/۱۵      | ۳    | ۰/۱۵      | ۳    | ۰/۱۵    | ۳    |
| ۴/۲۹               | > ۴۳             | ۰/۳       | ۰/۵  | ۰/۳       | ۰/۵  | ۰/۳     | ۰/۵  |
| ۹/۶                | > ۴۳             | ۰/۳       | ۱/۵  | ۰/۳       | ۱/۵  | ۰/۳     | ۱/۵  |
| > ۴۳               | > ۴۳             | ۰/۳       | ۳    | ۰/۳       | ۳    | ۰/۳     | ۳    |
| ۰/۶۲               | ۰/۸۳             | ۰         | ۰/۵  | ۰         | ۰/۵  | ۰       | ۰/۵  |
| ۰/۷۹               | ۰/۹۶             | ۰         | ۱/۵  | ۰         | ۱/۵  | ۰       | ۱/۵  |
| ۱/۱۷               | ۱/۶۲             | ۰         | ۳    | ۰         | ۳    | ۰       | ۳    |
| ۸۳                 | ۲/۹۱             | ۰/۱۵      | ۰/۵  | ۰/۱۵      | ۰/۵  | ۰/۱۵    | ۰/۵  |
| > ۴۳               | > ۴۳             | ۰/۱۵      | ۱/۵  | ۰/۱۵      | ۱/۵  | ۰/۱۵    | ۱/۵  |
| > ۴۳               | > ۴۳             | ۰/۱۵      | ۳    | ۰/۱۵      | ۳    | ۰/۱۵    | ۳    |
| > ۴۳               | > ۴۳             | ۰/۳       | ۰/۵  | ۰/۳       | ۰/۵  | ۰/۳     | ۰/۵  |
| > ۴۳               | > ۴۳             | ۰/۳       | ۱/۵  | ۰/۳       | ۱/۵  | ۰/۳     | ۱/۵  |
| > ۴۳               | > ۴۳             | ۰/۳       | ۳    | ۰/۳       | ۳    | ۰/۳     | ۳    |

جدول ۱ - مدت زمان رشد تاخیری (Lag) سالمونلاتیفی موریم برحسب روز در میزان تلقیح ۱۰<sup>۴</sup> باکتری در هر میلی لیتر در مدل برات BHI متأثر از فاکتورهای pH, NaCl, KS, T

| pH<br>۵ |      | pH<br>۵/۷۵ |      | pH<br>۶/۵ |      | pH<br>۷/۴ |      |
|---------|------|------------|------|-----------|------|-----------|------|
| Lag     | Lag  | Lag        | Lag  | KS        | NaCl | KS        | NaCl |
| ۰/۱۴    | ۰/۰۹ | ۰/۰۹       | ۰/۰۵ | ۰         | ۰/۵  | ۰         | ۰/۵  |
| ۰/۱۴    | ۰/۱۲ | ۰/۰۹       | ۰/۰۹ | ۰         | ۱/۵  | ۰         | ۱/۵  |
| ۰/۱۷    | ۰/۱۷ | ۰/۱۵       | ۰/۱۳ | ۰         | ۳    | ۰         | ۳    |
| > ۴۳    | ۰/۸۳ | ۰/۱۶       | ۰/۱۴ | ۰/۱۵      | ۰/۵  | ۰/۱۵      | ۰/۵  |
| > ۴۳    | ۱    | ۰/۲۴       | ۰/۱۴ | ۰/۱۵      | ۱/۵  | ۰/۱۵      | ۱/۵  |
| > ۴۳    | ۲/۸۷ | ۰/۴۲       | ۰/۱۹ | ۰/۱۵      | ۳    | ۰/۱۵      | ۳    |
| > ۴۳    | ۴/۱۶ | ۰/۳۳       | ۰/۱۷ | ۰/۳       | ۰/۵  | ۰/۳       | ۰/۵  |
| > ۴۳    | ۹    | ۰/۴۲       | ۰/۱۹ | ۰/۳       | ۱/۵  | ۰/۳       | ۱/۵  |
| > ۴۳    | ۹    | ۰/۵        | ۰/۲۷ | ۰/۳       | ۳    | ۰/۳       | ۳    |
| ۰/۸۷    | ۰/۴۵ | ۰/۳۹       | ۰/۱۷ | ۰         | ۰/۵  | ۰         | ۰/۵  |
| ۰/۶۲    | ۰/۴۵ | ۰/۴۲       | ۰/۲۸ | ۰         | ۱/۵  | ۰         | ۱/۵  |
| ۰/۶۷    | ۰/۴۶ | ۰/۴۵       | ۰/۳۴ | ۰         | ۳    | ۰         | ۳    |
| > ۴۳    | ۱/۵  | ۰/۷۵       | ۰/۳۴ | ۰/۱۵      | ۰/۵  | ۰/۱۵      | ۰/۵  |
| > ۴۳    | ۳/۹۲ | ۰/۸۳       | ۰/۳۳ | ۰/۱۵      | ۱/۵  | ۰/۱۵      | ۱/۵  |
| > ۴۳    | > ۴۳ | ۱/۰۸       | ۰/۸۳ | ۰/۱۵      | ۳    | ۰/۱۵      | ۳    |
| > ۴۳    | > ۴۳ | ۰/۹۷       | ۰/۳۷ | ۰/۳       | ۰/۵  | ۰/۳       | ۰/۵  |
| > ۴۳    | > ۴۳ | ۱/۰۸       | ۰/۸۷ | ۰/۳       | ۱/۵  | ۰/۳       | ۱/۵  |
| > ۴۳    | > ۴۳ | > ۴۳       | ۱/۴۵ | ۰/۳       | ۳    | ۰/۳       | ۳    |
| ۱/۴۶    | ۰/۸۳ | ۰/۸۷       | ۰/۴۶ | ۰         | ۰/۵  | ۰         | ۰/۵  |
| ۱/۸۷    | ۰/۹۶ | ۰/۹۱       | ۰/۸  | ۰         | ۱/۵  | ۰         | ۱/۵  |
| ۱/۹۱    | ۱/۶۲ | ۱/۴۱       | ۱/۱۲ | ۰         | ۳    | ۰         | ۳    |
| > ۴۳    | ۲/۹۱ | ۱/۰۱       | ۰/۹۵ | ۰/۱۵      | ۰/۵  | ۰/۱۵      | ۰/۵  |
| > ۴۳    | > ۴۳ | ۱/۹۱       | ۰/۹۵ | ۰/۱۵      | ۱/۵  | ۰/۱۵      | ۱/۵  |
| > ۴۳    | > ۴۳ | ۲/۹۶       | ۲/۱۲ | ۰/۱۵      | ۳    | ۰/۱۵      | ۳    |
| > ۴۳    | > ۴۳ | ۱/۹۵       | ۰/۹۷ | ۰/۳       | ۰/۵  | ۰/۳       | ۰/۵  |
| > ۴۳    | > ۴۳ | ۲/۹۶       | ۲/۱۴ | ۰/۳       | ۱/۵  | ۰/۳       | ۱/۵  |
| > ۴۳    | > ۴۳ | ۱۸         | ۳/۰۴ | ۰/۳       | ۳    | ۰/۳       | ۳    |

همان گونه که در جدول ۱ نشان داده شده است در یک pH مورد نظر، تاثیر سوربات پتاسیم بر روی رشد سالمونلاتیفی موریم با افزایش غلظت نمک طعام، افزایش پیدا کرد. این نتیجه با نتایج گزارش شده توسط Martin و Laocco (۱۹۸۱) مطابقت دارد (۱۱).

Gibson و همکاران (۱۹۸۸) رفتار سالمونلا (مخلوطی از گونه های St. Stanley, S. infants S. thompson) را در یک محیط آزمایشگاهی متأثر از مقادیر مختلف نمک طعام، pH و درجه حرارت نگهداری مورد مطالعه قرار داده و از مدل پیشگوی Gompertz جهت تخمین رفتار باکتری با به کارگیری معیارهای اندازه گیری رشد (زمان دو برابر شدن و زمان رشد تاخیری) استفاده کردند و گزارش نمودند که این چنین مدل هایی یک رهیافت اقتصادی و موثری در درک و بنابراین کنترل پاسخ رشد میکروبی در مواد غذایی می باشد (۸). نتیجه گیریهای مشابه توسط محققین دیگر گزارش شده است (۱۳، ۱۰، ۳). مقدار ضریب تعیین R<sup>2</sup> به دست آمده که در جدول ۳ نشان داده شده است. بیانگر میزان تطابق خوب مقادیر پیشگویی شده و مشاهدات تجربی می باشد که این مطلب در مقایسه مقادیر مشاهده شده و پیشگویی شده Lag در جدول ۳ مشهود است.

جدول ۲ - آنالیز واریانس (P - values) زمان رشد تاخیری (Lag) سالمونلاتیفی موریم در برات BHI متأثر از مقادیر مختلف KS, pH, NaCl, T.

| Source of value             | p - values |
|-----------------------------|------------|
| <b>Main effects</b>         |            |
| pH                          | ۰/۰۰۰      |
| KS                          | ۰/۰۰۰      |
| NaCl                        | ۰/۵۶۲      |
| T                           | ۰/۰۰۲      |
| <b>2 - Way interactions</b> |            |
| pH × NaCl                   | ۰/۲۳۲      |
| pH × KS                     | ۰/۰۰۱      |
| pH × T                      | ۰/۰۰۰      |
| NaCl × KS                   | ۰/۰۰۱      |
| T × NaCl                    | ۰/۴۰۹      |
| T × KS                      | ۰/۰۱۳      |
| <b>3 - Way interactions</b> |            |
| pH × KS × NaCl              | ۰/۰۰۰      |
| pH × KS × T                 | ۰/۰۱۵      |
| pH × T × NaCl               | ۰/۱۰۷      |
| T × NaCl × KS               | ۰/۰۰۱      |



### تشکر و قدردانی

بدین وسیله از حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تهران و دانشکده دامپزشکی در انجام این طرح قدردانی بعمل می‌آید.

### منابع

۱. رضویار، و. آخوندزاده، ا. مدل‌سازی تأثیرات حرارت، pH، سوربات پتاسیم، نمک و زمان نگهداری در احتمال رشد سالمونلا تیفی موریم در سیستم برات. مجله دانشکده دامپزشکی تهران، دوره ۵۳ شماره ۳ و ۴.
۲. Altekuse, S. F., M. L., Cohen, and D. L. Swerdlow, Emerging Foodborne Disease. Emerging Infections Disease. 3 (3). Center for Disease Control and prevention, Atlanta, Georgia, USA, (1997).
۳. Broughall, J. M., P. A. Anslow, and D. C. Kilsby, Hazard analysis applied to microbial growth in foods : Development of mathematical models describing the effect of water activity. J. Appl. Bacteriol 55 : 101 - 110, (1983).
۴. Davey, K. R. Modelling the combined effect of temperature and pH on the rate coefficient for bacterial growth. Int. J. Food Microbiol. 23 : 295 - 303, (1994).
۵. Davey, K. R. and B. J. Daughtry, Validation of a model for predicting the combined effect of three environmental factors on both exponential and lag phases of bacterial growth : temperature , salt concentration and pH. Food Research International 28 (3) : 233 - 237, (1995).
۶. Dickson, J. S. G. R. Siragusa, and J. E. Wary, Predicting the growth of Salmonella typhimurium on beef by using the temperature function integration technique. Applied And Environmental Microbiology p. 3482 - 3487, (1992).
۷. Gerigk, K. WHO surveillance programme for control of foodborne infection and intoxications, in Europe Proc. 3<sup>rd</sup>. World congress of food borne infections and intoxications, Berlin, (1992).
۸. Gibson, A. M. N. Bratchell, and T. A. Robert, predicting microbial growth responses of Salmonella in laboratory medium as affected by pH, sodium chloride and storage temperature. Int. J. Food Microbiol. 6 : 155 - 178, (1988).
۹. Gibson, A. M. and T. A. Roberts, The effect of pH, sodium chloride, Sodium nitrite and storage temperature on the growth of C. perfringens and faecal streptococci in laboratory media. Int. J. Food. Microbiol. 3 : 195 - 210, (1986).
۱۰. Golden, D. A. E. Jeffery Rhodehamel, and D. A. Kautter, Growth of Salmonella spp. in cantaloupe, Watermelon, and honeydew melon. J. Food Pro. 56 : 194 - 196 , (1993).
۱۱. Laocco, K. A. and S. E. Martin, Effects of potassium sorbate alone and in combination with sodium chloride on the growth of Salmonella typhimurium 7136. Journal of Food Sciences. 46 : 568 - 570, (1981).
۱۲. Little, C. L. S. Knochel, Growth and survival of Yersinia enterocolitica, Salmonella and Bacillus cereus in Brie stored at 4, 8

با استفاده از این مدل طول زمان رشد تأخیری در محدوده دامنه مقادیر متغیرهای به کار گرفته شده در این مطالعه با  $R^2 = 0.82$  قابل محاسبه و پیشگویی خواهد بود.

- and 20°C Int. J. Food. Microbiol 24 : 137 - 145, (1994).
۱۳. McClure, P. J. C. de Blackum, M. B. Cole, P. S. Curtis, J. E. Jones, J. D. Legan, I. D. Ogden, M. N. Peck, T. A. Robert, J. P. Sutherland, and S. J. Walker, Modelling the growth, survival and death of microorganism in foods the UK Food Micromodel approach. Int. J. Food. Microbiol. 23 : 265 - 275, (1994).
  ۱۴. McKay, A. L. and A. C. Peters, The effect of sodium chloride concentration and pH on the growth of Salmonella typhimurium colonies on solid medium. O Appl. Bacteriol. 79 : 353 - 359, (1995).
  ۱۵. Oscar, T. P. Response surface models for effects of temperature, pH, and previous growth pH on growth kinetics of Salmonella typhimurium in brain heart infusion broth. J. Food. prot. 62 (2) : 106 - 111, (1999).
  ۱۶. Park, H. S., and Marth E. H. Inactivation of Salmonella typhimurium by sorbic acid. J. Milk Food Technol. 35 (9), (1972).
  ۱۷. Radfort, S. A. and R. G. Board, The influence of sodium chloride and pH on the growth of Salmonella enteritidis PT4. Letters in Applied Microbiology. 20 : 11 - 13, (1995).
  ۱۸. Razavilar, V., C. Genigorgis. Prediction of Listeria spp. growth as affected by various levels of chemicals, pH, temperature and storage time in a model broth. Int. J. of Food Microbiol. 40 : 149 - 157, (1998).
  ۱۹. Thayer, D. W., W. S. Muller, R. L. Buchanan, and J. G. Philips Effect of NaCl, pH, Temperature, and Atmosphere on growth of Salmonella typhimurium in Glucose - Mineral Salts Medium. Applied And Environmental Microbiology. p : 1311 - 1315, (1987).
  ۲۰. Whiting, R. C., Microbial modeling in foods. Critical Review in Food Science and Nutrition. 35 (6) : 467 - 494, (1995).

### Models for the effects of selected growth factors on the length of Lag phases of growth of Salmonella typhimurium

Akhondzadeh, A.<sup>1</sup>, Razavilar, V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran - Iran.

The effects of pH (5 to 7.4) , sodium chloride (NaCl, 0.5 to 3%), potassium sorbate (KS, 0.0 to 3%) and temperature (T, 15 to 35°C) on Lag time (Lag) of growth of Salmonella typhimurium in a model



broth (Brain Heart Infusion, BHI) were evaluated in a factorial design study. The lag time of growth of *S. typhimurium* was affected significantly ( $P < 0.002$ ) by the values of KS, pH, T but not by NaCl concentration used in this study ( $p = 0.5$ ). Regression equation was derived relating Lag to KS, NaCl, T and pH. From this model the values of predicted Lag time of *S. typhimurium* can be calculated from any combination of KS, NaCl, pH and T within the limits studied ( $R^2 = 0.82$ ).

**Key words** : *Salmonella typhimurium* , Lag time, Growth factors, Modeling.

