Archive of SID

مطالعه و مدل سازی میزان رشد *استافیلوکوکوس آرئوس* در سوپهای آماده تجارتی متأثر از عوامل انتخابی رشد

دکتر ودود رضویلر[1] دکترعلی فضل آرا[1]

هدف: این مطالعه جهت ارایه مدل پیشگوی رشد *استافیلوکوکوس آرئوس* متأثر از عوامل انتخابی رشد (حرارت نگهداری، pH و میزان اینوکولوم) در دو نوع سوپ تجارتی (سوپ جو و سوپ قارچ) طراحی شده است.

طرح: آنالیز چندفاکتوری.

روش: در طی یک مطالعه تلقیحی چندفاکتوری، اثرات مقادیر مختلف pH (۵، ۴/۵، ۴)، میزان تلقیح اولیه باکتری (10^2 و 10^4 در میلی لیتر سوپ)، درجه حرارت نگهداری (۵، ۱۵، ۲۵، ۳۵ و ۴۵ درجه سانتیگراد) و نیز نوع سوپ تجارتی (سوپ قارچ و سوپ جو) بر روی زمان دوبرابر شدن باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* مورد بررسی قرار گرفته است. تعیین میزان رشد باکتری (زمان دوبرابر شدن) از طریق کشت نمونه های سوپ تلقیح شده در شرایط مختلف و شمارش باکتری در محیط بردپارکر **Baird parker** صورت گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری: آنالیز واریانس جهت ارزیابی اثرات مستقل و تداخلی، pH ، حرارت نگهداری، میزان تلقیح باکتری و نوع سوپ و مدل رگرسیون چندفاکتوری نیز جهت تهیه مدل پیشگوی رشد در شرایط آزمایش شده مورد استفاده قرار گرفت. قدرت پیشگویی مدل با محاسبه R^2 (ضریب تعیین) مشخص گردید.

نتایج: مدت زمان دوبرابر شدن باکتری به طور معنی داری تحت تاثیر نوع سوپ، حرارت و نیز اثرات تداخلی این دو قرار گرفت ($P\leq ۰/۰۵$). ولی میزان تلقیح اولیه باکتری در این مطالعه تأثیر معنی داری در میزان رشد باکتری نداشت ($P=۰/۱۸۲$). با استفاده از معادله رگرسیون و ترانسفورماسیونهای مناسب، ارتباط زمان دوبرابر شدن باکتری (g) به عنوان متغیر وابسته با مقادیر مختلف عوامل موردنظر رشد و نیز اثرات تداخلی آنها به عنوان متغیرهای مستقل به صورت مدل پیشگو تهیه گردید.

نتیجه گیری: با استفاده از مدل تهیه شده در این مطالعه زمان دوبرابر شدن *استافیلوکوکوس آرئوس* در محدوده دامنه مقادیر متغیرهای به کار گرفته شده با قدرت پیشگویی بسیارخوب قابل محاسبه و پیشگویی می باشد. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، (۱۳۸۱)، دوره ۵۷، شماره ۳، ۷۲-۶۵.

واژه های کلیدی: *استافیلوکوکوس آرئوس*، زمان دوبرابر شدن باکتری، میزان رشد باکتری، مدل سازی ریاضی، سوپ.

The factorial study of growth rate of *staphylococcus aureus* in commercial soups affected by selected growth factors

Razavilar, V.,[1] Fazlara, A.[1]

[1] *Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran - Iran.*

Objective: To Produce a predictive model of *S. aureus* growth, the effects of selected growth factors (storoge temperature, pH and inoculum levels) in 2 kinds of commercial soup (barley and mushroom) have been evaluated.

Design: Multiple factorial design.

Procedure: The effects of pH (4, 4.5 and 5), inoculum levels (10^2 and 10^4 / ml of soup), storage temperature (5, 15, 25, 35 and 45C) and type of soup (barley and mushroom) on the generation time (g) and growth rate (k) of *S. aureus* on commercial Iranian soups were evaluated in a factorial design study.

Statistical analysis: To evaluate the main and inter active effects of pH, storage temperature, inoculum levels and type of soup, analysis of variance was used. Multiple regression model was derived relating generation time to the effects of growth factors used in this study.

Results: The generation time (g) of the organism was affected significantly by the type of soup and storage temprature and their interactive effects ($P<0.053$), but not by the inoculum level of the organism ($P=0.182$). Predictive model was produced with R^2 value equal to 0.90.

Conclusion: From the model produced in this study the predictive values of generation time of *S. aureus* can be calculated from any combination of the growth factors used within the limits of this study ($R^2=0.90$). ***J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran. 57, 3: 65-72, 2002.***

Key words: *S. aureus*, Mathematical modeling, Generation time, Growth rate, Soup.

استافیلوکوکوس آرئوس انتروتوکسین زا یکی از عوامل بسیار شایع مسبب مسمومیت غذایی (Food intoxication) در بسیاری از کشورها می باشد. این باکتری به عنوان دومین یا سومین عامل شیوع مسمومیتهای غذایی در سراسرجهان مطرح است که میزان شیوع مسمومیت حاصله از این باکتری با سایر عوامل مسمومیت زا نظیر *سالمونلاها* (Salmonella spp) و *کلستریدیوم پرفرینجنس* (Clostridium perfringens) در رقابت می باشد (۲۶، ۱۸، ۷، ۶). علایم این مسمومیت شامل استفراغ، درد شکم و اسهال است که معمولاً متعاقب ۲ تا ۶ ساعت از مصرف غذای حاوی انتروتوکسین این باکتری رخ می دهند (۲۳،۲۷). معمولاً این مسمومیت کشنده نمی باشد هر چند که موارد بسیار نادری از مرگ و میر نیز گزارش شده است (۲۶). کانون و مخزن اصلی و عمده *استافیلوکوکوس آرئوس* پوست و غشأهای مخاطی به ویژه ناحیه حلق و بینی در پرندگان و پستانداران می باشد. این باکتری به نحو بسیار گسترده ای در طبیعت پراکنده است و حتی در ۳۰ الی ۸۰ درصد افرادسالم به عنوان فلور طبیعی بدن در نواحی فوق الذکر و نیز مو، پوست دست و صورت، لاله گوش و نیز ناخنها وجود دارد که حدود یک سوم تا دو سوم افراد مذکور، ناقل سویه های انتروتوکسین زای این باکتری هستند (۲۹، ۱۵، ۸). بنابراین آماده سازی و دستکاری غیربهداشتی موادغذایی به عنوان یک عامل بسیار مهم در اشاعه این باکتری و بروز مسمومیتهای غذایی حاصله می باشد و مواد غذایی نظیر فرآورده های نانوایی، سسها، خامه و فرآورده های لبنی، تخم مرغ، گوشت قرمز و فرآورده های آن، مرغ، سالادها و سوپ ها از جمله موادغذایی هستند که بارها به عنوان مسبب شیوع و بروز مسمومیت غذایی استافیلوکوکی گزارش شده اند. همچنین غذاهای پخته و آماده بسته بندی شده نظیر سوپهای تجارتی با توجه به حجم بالایی مصرف و نحوه بازسازی آنها در اماکن عمومی و حتی منازل از پتانسیل بسیار بالایی در بروز این مسمومیت برخوردارند. آلودگی این سوپها به هنگام آماده سازی توسط افراد ناقل باکتری صورت می گیرد. رشد و تکثیر استافیلوکوک در این سوپها به علت عدم وجود فلور میکربی مزاحم با سرعت انجام یافته، با ایجاد توکسین در آنها منجر به اشاعه مسمومیت غذایی در

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

www.SID.ir

Archive of SID

افراد جامعه و مصرف کنندگان می گردد (۲۸، ۱۴، ۱۰، ۱.۸).

رشد و تکثیر این باکتری و نیز تولید انتروتوکسین آن توسط عوامل محیطی نظیر pH ، دما، ساختار و ترکیب غذایی تحت تاثیر قرار می گیرد (۱۶). تحقیقات گسترده ای در این زمینه انجام پذیرفته و مدلهای پیشگوی متعددی از رفتار رشد گونه های مختلف استافیلوکوکوس در محیط های آزمایشگاهی و نیز مواد غذایی مختلف متأثر از درجه حرارت، pH و میزان تلقیح باکتریایی ارایه شده است (۳۰، ۲۴، ۲۱، ۱۹، ۱۳، ۹، ۵، ۴). ارایه این گونه مدل های ریاضی در سالهای اخیر که درخصوص پیشگویی رشد و بقای باکتریها در مواد غذایی طرح شده اند، تشکیل دهنده زمینه علمی پیش نیاز جهت کامپیوتری کردن بهداشت فرآوری تولید موادغذایی هستند که موردتوجه صنایع غذایی بوده و در عین حال سبب صرفه جویی در انجام آزمایشات میکروبیولوژیک کنترل کیفی گران قیمت نیز می باشد. علاوه بر آن چنین مدلهایی می توانند تخمین بسیار مناسب و قابل قبولی از رفتار باکتری در مواد غذایی را در اختیار ما قرار دهند (۱۱).

هدف مطالعه

این مطالعه جهت ارایه مدلی برای اثرات بعضی عوامل درون اثر (pH ، نوع ماده غذایی و موادمغذی موجود در آن) و برون اثر (میزان تلقیح، حرارت و مدت زمان نگهداری) بر روی میزان رشد *استافیلوکوکوس آرئوس* در سوپهای تجاری آماده جو و قارچ انجام پذیرفته است که در طی این مطالعه و بررسی از ۵ دمای نگهداری (۵، ۱۵، ۲۵، ۳۵ و ۴۵ درجه سانتیگراد)، ۳ میزان pH (۴، ۴/۵ و ۵)، ۲ میزان تلقیح باکتریایی ($۱۰^۲$ و $۱۰^۴$ باکتری در هر میلی لیتر از غذا) و نیز ۲ نوع سوپ تجاری آماده وبسته بندی شده (سوپ قارچ و سوپ جو) استفاده گردید. با انجام آزمون رگرسیون خطی، مدلی پیشگو جهت پیشگویی میزان رشد *استافیلوکوکوس آرئوس* مورد مطالعه (به عنوان یک متغیر وابسته) متأثر از مقادیر مختلف عوامل به کار گرفته شده (به عنوان متغیرهای مستقل) در محدوده موردمطالعه تهیه می گردد.

مواد و روش کار

طرح آزمایش: برای ارزیابی اثرات pH ، حرارت میزان تلقیح باکتریایی و نیز نوع سوپ به عنوان ماده مغذی بر روی سرعت رشد *استافیلوکوکوس آرئوس* از روش بررسی اثرات ترکیبی چندفاکتوری که در فوق ذکر گردید، استفاده شد. در ضمن به منظور بررسیهای رشد بعدی و رسم منحنی رشد باکتری در سوپها در زمانهای مختلف در شرایط استریل از سوپها نمونه برداری گشته، پس از تهیه سریال رقت ده برابر (Serial ten fold dilution) به روش کشت سطحی (Surface plate count) بر روی محیط بردپارکر کشت داده و در انکوباتور ۳۷ درجه به مدت ۴۸ ساعت نگهداری گردید. پس از شمارش پرگنه ها در پلیت ها، نتایج حاصله در زمانهای مختلف ثبت گردید پس از رسیدن رشدباکتری به حداکثر و رسیدن به مرحله توقف رشد (Staionary phase)، نسبت به رسم منحنی وضعیت رشد باکتری و انجام محاسبات بعدی از نظر میزان رشد و نیز زمان دوبرابر شدن باکتری (Doubling time) در هر حالت اقدام شد. به منظور دستیابی به دقت بالاتر، هر یک از مراحل طرح و حالات ترکیبی فاکتورها با ۳ بار تکرار انجام پذیرفت و منحنی وضعیت رشد باکتری برمبنای میانگین نتایج ثبت شده از ۳ بار تکرار در هر حالت رسم گردید.

باکتری مورد مطالعه: کشت لیوفیلیزه *استافیلوکوکوس آرئوس* به شماره RTCC۱۸۹۶ تهیه شده از بخش میکروبیولوژی انستیتو تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی واقع در حصارک کرج جهت این بررسی مورد استفاده قرار گرفت. باکتری مذکور از نوع کوآگولاز مثبت و انتروتوکسین زا بوده که با استفاده از واکنشهای رسوبی در آگار (Agar get difusion test) انتروتوکسین زا بودن آن مورد تأیید واقع گردید. در ابتدا از این کشت لیوفیلیزه در محیط برات BHI (Brain heart infusion) در ۳۷ درجه به مدت ۴۸ ساعت، حداقل دو مرتبه به طور متوالی کشت داده شده پس از کشت دوم بر روی BHI آگار در لوله منتقل کرده، به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری شد. از این کشت به عنوان کشت مورد استفاده در تحقیق استفاده گردید. این کشت در چهار درجه سانتیگراد نگهداری شد و به صورت ماهیانه تجدید کشت گردید.

تهیه میزان تلقیح باکتریایی: تهیه میزان تلقیح *استافیلوکوکوس آرئوس* با انتقال باکتری از لوله های کشت شیبدار BHI به محیط برات BHI انجام گرفت بعد از ۲۰ ساعت در ۳۷ درجه مجدداً کشت دومی از این کشت آبگوشت ۲۰ ساعت اولی بر روی برات BHI به مدت ۲۰ ساعت در دمای ۳۷ درجه داده شد (دوکشت متوالی در برات BHI در دمای ۳۷ درجه به مدت ۲۰ ساعت). سپس در لوله های کووت (Cuvett) استریل حاوی ۵ میلی لیتر برات BHI ابتدا برای بار اول مقادیر مختلفی از کشت آبگوشت، ۲۰ ساعته دوم را اضافه نموده و با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (Milton Roy Company USA) در طول موج ۶۰۰ نانومتر جذب نوریشان خوانده شد. سپس از لوله های کووت اسپکت شده جهت شمارش تعداد باکتریها استفاده گردید تا در نهایت، لوله کووت که دارای ۴×۱۰^۸ باکتری در هر میلی لیتر بود مشخص گردید. بدین ترتیب در دفعات بعدی انجام آزمایش، در هربار با مشخص شدن جذب نوری موردنظر (Absorbant = ۱ و Transmitant=٪۱۰) به طور تقریبی ۴×۱۰^۸ مقدار باکتری در هر میلی لیتر مشخص گردید که بعداً با کشت بر روی آگار شمارش باکتری مورد تأیید نهایی قرار می گرفت. از لوله کووت حاوی مقدار تقریبی ۴×۱۰^۸ باکتری در هر میلی لیتر، رقتهای سریال ده برابر از $۱۰^۸$ تا $۱۰^۴$ باکتری در هر میلی لیتر از برات BHI تهیه شد و از رقتهای حاصل جهت تلقیح نمودن به سوپهای مورد آزمایش به نحوی که دو مقدار تلقیح آزمایشی را ($۱۰^۲$ و $۱۰^۴$ باکتری در هر میلی لیتر از سوپ) فراهم می نمود، استفاده گردید.

تهیه سوپها و تنظیم pH های موردنظر: ابتدا سوپهای بسته بندی شده و آماده قارچ و جو که به صورت تجاری تهیه و عرضه می شوند به تعداد کافی تهیه شدند. این سوپها همگی از یک بهر تولیدی و دارای تاریخ مصرف یکسان بودند. سوپها براساس دستورالعمل آماده سازی آنها در آزمایشگاه آماده و بازسازی شدند (افزودن آب مقطر استریل به میزان یک لیتر به محتوی هربسته از سوپ آماده و حرارت دادن آن ضمن به هم زدن به مدت ۲۰ دقیقه) پس از سرد کردن تا دمای محیط با کمک آب مقطر استریل به حجم اولیه رسانیده و نسبت به اندازه گیری pH نرمال سوپ اقدام می گردید که در اکثر موارد مساوی ۵±۰/۱ بود. همچنین بسته به حالات موردنظر با کمک آب لیمو (آب لیمو تهیه شده صنعتی از یک بهر تولید و دارای تاریخ مصرف یکسان) نسبت به تنظیم pH سوپها در مقادیر موردنظر (۵، ۴/۵ و ۴) اقدام گشته، در مقادیر ۱۰۰ میلی لیتر در ظروف در پیچدار قابل اتوکلا و تقسیم شدند سپس با اتوکلا و نمودن ظروف مذکور در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه نسبت به استریل سازی سوپها و نابودن نمودن میکروارگانیسمهای رقیب و آلودگیهای احتمالی که منجر به خطا در آزمایش

www.SID.ir

Archive of SID

می گردد، اقدام گردید و پس از سرد شدن، جهت صحت میزان سطح pH هر یک از ظروف بعد از اتوکلاو، در ظرف شاهد اتوکلاو شده میزان pH اندازه گیری می شد و در صورت تغییر pH بعد از اتوکلاو با استفاده از آب لیمو فیلتر استریل شده سطح pH هر یک از ظروف در پیچدار مورد استفاده در آزمون در حد موردنظر برای مطالعه تنظیم می گردید.

تلقیح باکتری به سوپها، گرمخانه گذاری و بررسی رشد باکتری: همان گونه که گفته شد رقتهای سریال ده برابر از هر یک از لوله های کووت حاوی برات باکتریایی با جذب نوری مساوی یک (در طول موج ۶۰۰ نانومتر) که مشخص کننده ۴×۱۰^{۸} باکتری در هر میلی لیتر از برات BHI موجود در کووت می باشد، تهیه گردید. بدین ترتیب رقتهای سریال ده برابر از $۱۰^{۸}$ تا $۱۰^{۴}$ باکتری در هر میلی لیتر از برات BHI به دست آمد. از رقتهای حاصل جهت تلقیح نمودن به سوپهای آماده شده فوق الذکر استفاده گردید به طوری که با افزودن یک میلی لیتر از رقت $۱۰^{۶}$ به ظرف حاوی ۱۰۰ میلی لیتر سوپ، میزان تلقیح $۱۰^{۴}$ باکتری در هر میلی لیتر سوپ و نیز با افزودن یک میلی لیتر از رقت $۱۰^{۴}$ به ظرف حاوی ۱۰۰ میلی لیتر سوپ، میزان تلقیح $۱۰^{۲}$ باکتری در هر میلی لیتر سوپ حاصل گردید. بعد از مخلوط کردن محتوی هر ظرف توسط دستگاه شیکرارلن . بالن به مدت ۵ دقیقه، ظروف مذکور در هر یک از حرارتهای موردنظر در این مطالعه یعنی ۵، ۱۵، ۲۵، ۳۵ و ۴۵ درجه سانتیگراد قرار گرفت. از این کشتها در زمانهای مختلف نمونه برداری و رقتهای سریال ده برابر تهیه گردیده و در پلیتهای حاوی محیط بردپارکر به روش سطحی جهت شمارش کشت گردید. کشتها در حرارت ۳۷ درجه به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری شدند و پلیتهایی که بین ۳۰ تا ۳۰۰ پرگنه داشتند مورد شمارش قرار گرفته و نتایج حاصله در زمانهای مختلف تا رسیدن به حداکثر جمعیت میکربی در سوپها ثبت گردید. به منظور برخورداری از دقت مطلوبتر، تمامی مراحل کار با ۳ بار تکرار مورد آزمایش قرار گرفت و در نهایت برمبنای میانگین نتایج ثبت شده از ۳ بار تکرار در هر حالت نسبت به رسم منحنی رشد باکتری اقدام گردید که بدین منظور از برنامه نرم افزاری Microsoft Excel 2000/PC استفاده شد.

ذکر این نکته ضروری است که زمانهای نمونه برداری ا ز سوپها در هر حالت با توجه به مطالعات مقدماتی انجام شد. ضمناً به علت اختلاف رفتار باکتری در هر حالت بررسی، حداقل از ۱۰ زمان نمونه برداری و در مواردی تا ۳۵ زمان نمونه برداری در طول حداکثر ۵۰ روز جهت بررسی روند رشد باکتری استفاده گردید.

محاسبه میزان رشد یا K (Growth Rate) و زمان دوبرابر شدن باکتری یا g (Generation time or doubling time) : پس از انجام مطالعات مدنظر در طرح، نتایج اثرات ترکیبی فاکتورهای موردبحث ثبت گردید و منحنی رشد باکتری در هر حالت رسم شد و با کمک فرمولهای محاسباتی ذیل نسبت به محاسبه میزان رشد یا K و نیز زمان دوبرابر شدن باکتری یا در هر حالت اقدام گردید که عبارتند از:

۱) محاسبه K: $\log_{10} N - \log_{10} N_0 = \frac{K}{۲/۳۰۳}(t-t_0)$ که در این فرمول N_0 میزان تلقیح اولیه باکتری در زمان t_0 ، N افزایش میزان باکتری تلقیح شده در زمان t زمان انجام تلقیح اولیه باکتری، t زمان تعیین میزان افزایش باکتری تلقیح شده و K میزان رشد باکتری است.

۲) محاسبه g: $K = \frac{Ln\ 2}{g} = \frac{۰/۶۹۳}{g}$ که در این فرمول K میزان رشد باکتری، g زمان دوبرابر شدن باکتری در شرایط مختلف و Ln_2 لگاریتم طبیعی عدد ۲ یعنی دوبرابر شدن میزان باکتری می باشد.

برای محاسبه K در مرحله رشد تصاعدی یا لگاریتمی (Exponential phase) که باکتری دارای سریعترین حالت تکثیر می باشد، نسبت به انتخاب دو نقطه و قراردادن مختصات مربوطه در فرمول محاسبه K اقدام گردید. پس از محاسبه K یا میزان رشد، با کمک فرمول محاسبه g مدت زمان دوبرابر شدن باکتری نیز محاسبه گردید.

آنالیز آماری و انتخاب مدل پیشگو: اثرات مستقل و تداخلی pH ، دمای نگهداری، میزان تلقیح باکتریایی و نوع ماده غذایی بر روی مدت زمان دوبرابر شدن باکتری بااستفاده از آنالیز واریانس با کمک از نرم افزار SPSS/PC ارزیابی گردید. از برنامه رگرسیون Enter جهت انتخاب مدل پیشگو و پیشگویی زمان دوبرابر شدن باکتری یا g به عنوان یک متغیر وابسته متأثر از متغیرهای مستقل (pH، دمای نگهداری، میزان تلقیح باکتریایی و نوع ماده غذایی) مورد مطالعه، همراه با ترانسفورماسیونهای مربوطه استفاده گردید. ضریب تعیین R^2 (Coefficient of determination) بیانگر میزان همخوانی مقادیر پیشگویی شده متغیر وابسته مورد نظر g با مقادیر به دست آمده در تحقیق، در محدوده مورد مطالعه تغییرات متغیرهای مستقل می باشد.

نتایج

در نمودارهای ۱ و ۲ به ترتیب نمودارهای رشد *استافیلوکوکوس آرئوس* متأثر از مقادیر مختلف دما و میزان تلقیح باکتریایی در pH مساوی ۵ در سوپهای قارچ و جو ارایه شده اند. هر یک از این نمودارها از میانگین نتایج حاصله از ۳ بار تکرار مطالعه در هر یک از حالتهای ترکیبی موردنظر رسم شده اند. درمواردی به منظور رسم منحنیهای مذکور تا ۳۵زمان نمونه برداری در طی مدت ۷۱۷ ساعت جهت بررسی وضعیت رشد باکتری اقدام گردید تا در نهایت تراکم باکتریایی به حداکثر جمعیت میکربی رسید. برمبنای میانگین نتایج حاصله از شمارش تراکم با کتریایی در زمانهای مختلف نمونه برداری و با کمک برنامه نرم افزاری Microsoft Excel 2000/PC نسبت به رسم نمودارهای رشد باکتری در حالات مختلف درج شده در نمودارهای ۱ و ۲ اقدام گردید. براساس توضیحات قبلی مقدار g و K نیز در هر حالت مورد محاسبه قرار گرفت که نتایج آن در جداول ۱ و ۲ ارایه شده اند و همان طور که در جداول مذکور مشاهده می گردد، از مجموع حالات ترکیبی فاکتورهای موردنظر در مطالعه صرفاً ۱۶ حالت منجر به رشد باکتری و افزایش تعداد آنها و محاسبه K و g گردید که تمامی حالات منجر به رشد مربوط به pH مساوی۵ می باشد و درطی مطالعات انجام شده در هیچ کدام از حالات ترکیبی فاکتورهای موردنظر درpH مساوی ۴/۵ و ۴ رشدی ملاحظه نگردید و در طی مدت ۵۰ روز بررسی وضعیت باکتری اولیه تلقیح شده در این حالات، ملاحظه گردید که به تدریج از تراکم باکتریایی اولیه نیز کاسته شده است. همچنین در ۵ درجه سانتیگراد در pH مساوی ۵ نیز رشدی از باکتری ملاحظه نشد و لذا در جداول ۱ و ۲ صرفاً نتایج مربوط به حالات منجر به رشد باکتری مورد مطالعه (pH =۵) ارایه شده است. براساس نتایج ثبت شده در جداول مذکور مدت زمان دوبرابر شدن باکتری یا g از ۱/۰۰ تا ۱۲/۹۰ ساعت در سوپ قارچ نیز از ۱/۲۰ تا ۲۴/۰۸ ساعت در سوپ جو متفاوت بوده است. در دمای ۱۵ درجه سانتیگراد مدت زمان دو برابر شدن باکتری یا g به طور قابل توجهی افزایش یافته به حداکثر مقدار خود در طی این مطالعه رسیده است. با افزایش حرارت تا ۳۵ درجه سانتیگراد، مدت زمان دو برابر شدن باکتری یا g کاهش یافته به نحوی که در ۳۵ درجه

www.SID.ir

Archive of SID

سانتیگراد به حداقل مقدار ممکن در طی این مطالعه رسیده است. در واقع در حالت اخیر بهترین شرایط رشد باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* وجود داشته و لذا مدت زمان دو برابر شدن باکتری به حداقل کاهش یافته است (شرایط اپتیمم). همچنین با دور شدن از دمای ۳۵ درجه سانتیگراد به طرف ۴۵ درجه سانتیگراد مجدداً به علت دور شدن از شرایط مناسب یا اپتیمم، مدت زمان دوبرابر شدن باکتری افزایش یافته است.

آنالیز آماری: از آنالیز واریانس (Analysis of Variance. ANOVA) جهت بررسی اثرات مقادیر مختلف فاکتورهای حرارت، میزان تلقیح اولیه باکتریایی و نوع سوپ در pH مساوی ۵ و تداخلهای (Interactions) دو فاکتوری و سه فاکتوری آنها بر روی زمان دوبرابر شدن باکتری یا g استفاده شد. جدول ۳ بیانگر این اثرات می باشد. مدت زمان دوبرابر شدن یا g در باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* به طور معنی داری $P \leq ۰/۰۵۳$ تحت تأثیر Soup ،Temp و نیز تداخل دوفاکتوری Temp×Soup قرار داشت.

مدل سازی رفتار *استافیلوکوکوس آرئوس* مورد مطالعه (متغیر وابسته) متأثر از متغیرهای مستقل و ترانسفورماسیونهای آنها صورت گرفت و با استفاده از برنامه رگرسیون Enter (SPSS/PC) بهترین مدل با بالاترین مقدار $R^2 = ۰/۸۹۸$ به شرح ذیل به دست آمد:

Generation Time = _ ۱۵/۳۴۰ + (۶۳۹/۸۱۲:Temp) _ ۱۳/۰۹۸ Soup
+۰/۳۵۱ (Temp×Soup)

جدول ۱ - حالات منجر به رشد *استافیلوکوکوس آرئوس* در pH = ۵ در سوپ قارچ و مقادیر k و g در هر حالت

	Temperature (C)	Inoculum (N/mL)	Max. Population (N/mL)	K	G. Time (H)
۱	۱۵	۴۰۰	۸۵۰۰۰۰۰۰۰	۰/۰۵۳۷۴	۱۲/۹۰
۲	۱۵	۲۲۶۰۰	۷۸۰۰۰۰۰۰۰	۰/۰۶۹۰۹	۱۰/۰۳
۳	۲۵	۳۰۰	۳۲۲۰۰۰۰۰۰	۰/۲۳۰۳۰	۳/۰۱
۴	۲۵	۲۱۴۰۰	۱۴۷۰۰۰۰۰۰	۰/۲۶۸۶۸	۲/۵۸
۵	۳۵	۲۰۰	۴۹۰۰۰۰۰۰	۰/۴۹۳۵۰	۱/۴۰
۶	۳۵	۱۷۸۰۰	۱۹۲۰۰۰۰۰۰	۰/۶۹۰۹۰	۱/۰۰
۷	۴۵	۶۰۰	۲۹۲۰۰۰۰۰	۰/۱۸۲۴۲	۳/۸۰
۸	۴۵	۳۵۲۰۰	۱۴۲۰۰۰۰۰	۰/۲۳۰۳۰	۳/۰۱

جدول ۲ - حالات منجر به رشد *استافیلوکوکوس آرئوس* در pH = ۵ در سوپ جو و مقادیر K و g در هر حالت

	Temperature (C)	Inoculum (N/mL)	Max. Population (N/mL)	K	G. Time (H)
۱	۱۵	۲۰۰	۵۳۰۰۰۰۰۰۰	۰/۰۲۸۷۹	۲۴/۰۸
۲	۱۵	۲۸۰۰۰	۸۶۰۰۰۰۰۰	۰/۰۴۱۴۵	۱۶/۷۲
۳	۲۵	۴۰۰	۱۲۳۰۰۰۰۰۰	۰/۲۰۴۷۱	۳/۳۹
۴	۲۵	۲۳۷۰۰	۱۹۶۰۰۰۰۰۰	۰/۲۳۰۳۰	۳/۰۱
۵	۳۵	۳۰۰	۱۱۸۰۰۰۰۰۰	۰/۴۰۰۵۲	۱/۷۳
۶	۳۵	۳۰۲۰۰	۳۰۲۰۰۰۰۰۰	۰/۵۷۵۷۵	۱/۲۰
۷	۴۵	۵۰۰	۲۲۰۰۰۰۰۰	۰/۱۵۳۵۳	۴/۵۱
۸	۴۵	۳۲۵۰۰	۲۶۶۰۰۰۰۰	۰/۱۹۱۹۲	۳/۶۱

بحث

توانایی رشد *استافیلوکوکوس آرئوس* در محیط های آزمایشگاهی و غذاهای مختلف تحت یکسری از شرایط طراحی شده توسط محققین مختلف مورد ارزیابی و بررسی قرار گرفته است (۳۰، ۲۴، ۲۱، ۱۹، ۱۳، ۱۲، ۹، ۵، ۴). در این مطالعه یکی از ارزشهای رشدی یعنی مدت زمان دوبرابر شدن باکتری یا g که در بهداشت و صنایع غذایی برای ارزیابی بهداشتی و قابلیت نگهداری غذا دارای اهمیت فوق العاده می باشد، جهت بررسی اثرات دمای نگهداری، میزان تلقیح اولیه باکتریایی pH ، و نوع ماده غذایی و مواد مغذی بر روی *استافیلوکوکوس آرئوس* مورد مطالعه قرار گرفت.

جدول ۳ - آنالیز واریانس (P-Values) زمان دوبرابر شدن یا g *استافیلوکوکوس آرئوس* در pH = ۵ متأثر از مقادیر مختلف Inoculum. Soup و Temp.

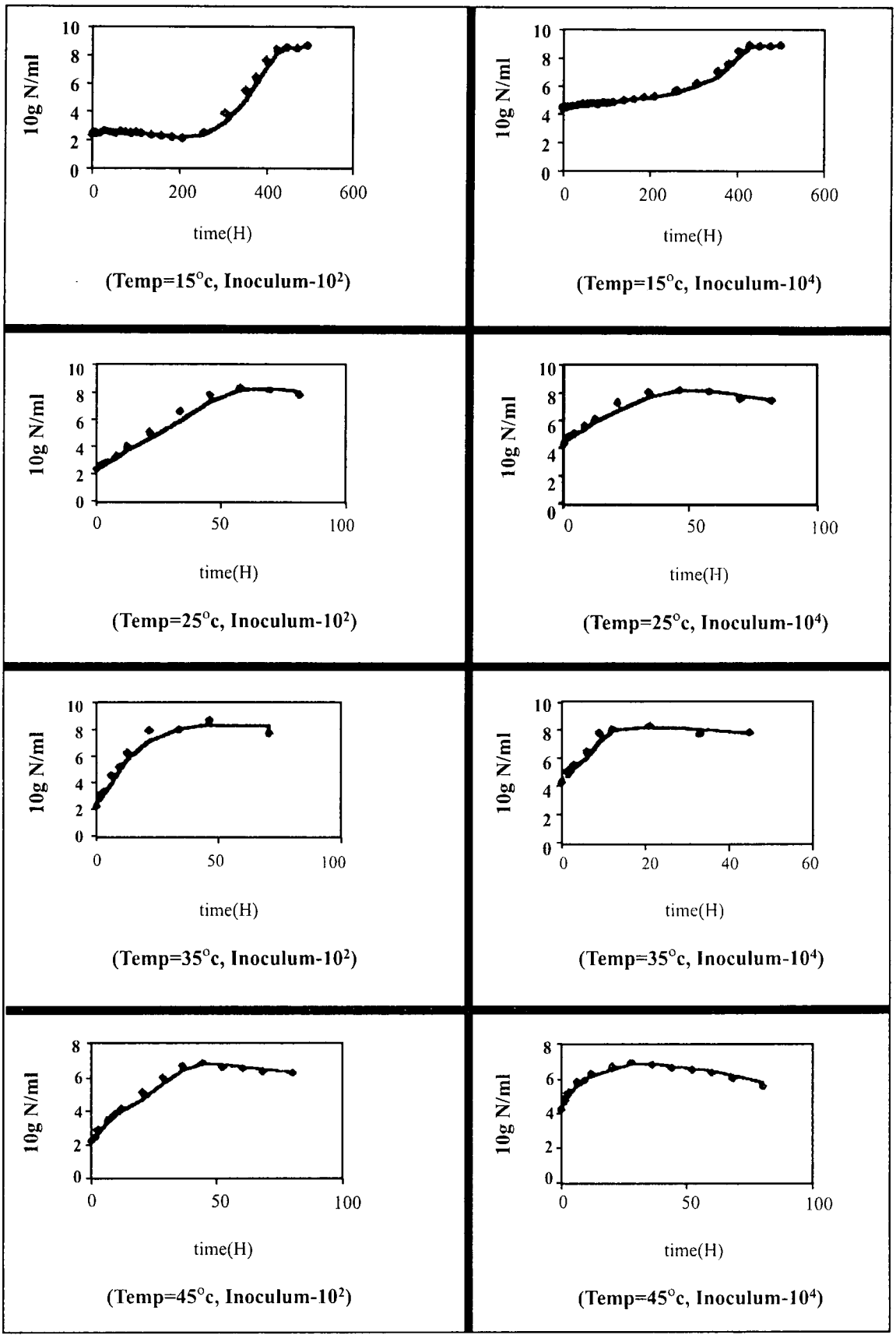
Source of Value	P - Values
1- Main Effects	
Soup	۰/۰۵۳
Temp	۰/۰۰۳
Inoculum	۰/۱۸۲
2- Way Interactions	
Inoclum × Temp	۰/۳۸۴
Temp × Soup	۰/۰۴۱
Inoculum × Soup	۰/۶۰۲
3- WayInteractions	
Inoculum × Soup × Temp	۰/۲۷۰

آنالیزهای آماری نمایانگر اثر معنی دار Temp×Soup،Temp. Soup بر روی مدت زمان دوبرابر شدت باکتری یا g بوده با افزایش دمای نگهداری از ۵ درجه سانتیگراد به ۳۵ درجه سانتیگراد، مدت زمان دوبرابر شدن باکتری یا g کاهش یافته و در واقع باکتری در حداقل زمان ممکن تکثیر می یابد که گویای شرایط ایده آل رشد باکتری و تکثیر سریع آن بوده. باکتری در این شرایط از پتانسیل بالایی جهت تکثیر و افزایش تراکم باکتریایی تا بیش از ۱۰۵، توکسین زایی و ایجاد مسمومیت غذایی برخوردار است. همچنین با افزایش دمای نگهداری از ۳۵ درجه سانتیگراد به ۴۵ درجه سانتیگراد مجدداً بر مدت زمان دوبرابر شدن باکتری یا g افزوده می شود که نشانگر دور شدن شرایط از حالت اپتیمم رشد باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* در سوپها می باشد. این مشاهدات مطابق با نتایج تحقیقات وگزارشات Shu-Er Yang و همکاران بود (۳۰). این محققین که چگونگی رشد *استافیلوکوکوس آرئوس* را در تخم مرغ آب پز شده و نیز املت در درجات حرارت ۵، ۱۸، ۲۲، ۳۷، ۵۵ و ۶۰ درجه سانتیگراد مورد بررسی قرار دادند. نتایج مشابهی با این تحقیق به دست آوردند (۳۰). همچنین نتایج مشابهی توسط Thomas and Wimpenny درخصوص چگونگی رشد *استافیلوکوکوس آرئوس* تحت شرایط مختلف دما وpH به دست آمده است که با کاهش دما از ۳۵ درجه سانتیگراد به سمت ۲۰ درجه سانتیگراد از سرعت رشد باکتری کاسته شده است و در pH پایینتر از ۵ رشد باکتری متوقف گردیده است.

همان طور که در جداول ۱ و ۲ نشان داده شده است در pH مساوی ۵ همواره مقادیر g یا زمان دوبرابر شدن باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* در شرایط یکسان از نظر میزان تلقیح اولیه باکتری و نیز درجه حرارت نگهداری، در سوپ قارچ کمتر از سوپ جو بوده است و در واقع همواره سرعت تکثیر باکتری در سوپ قارچ از نظر زمانی سریع تر و کوتاه تر از سوپ جو بوده است که این موضوع نشان دهنده تاثیر نوع غذا و مواد مغذی متشکله آن برمدت زمان دوبرابر شدن باکتری یا g می باشد. این نتیجه با نتایج گزارش شده توسط Manninen و همکاران مطابقت دارد (۲۰) نتیجه گیری های مشابه توسط محققین دیگر گزارش شده است (۲۲، ۱۷، ۳، ۲).

www.SID.ir

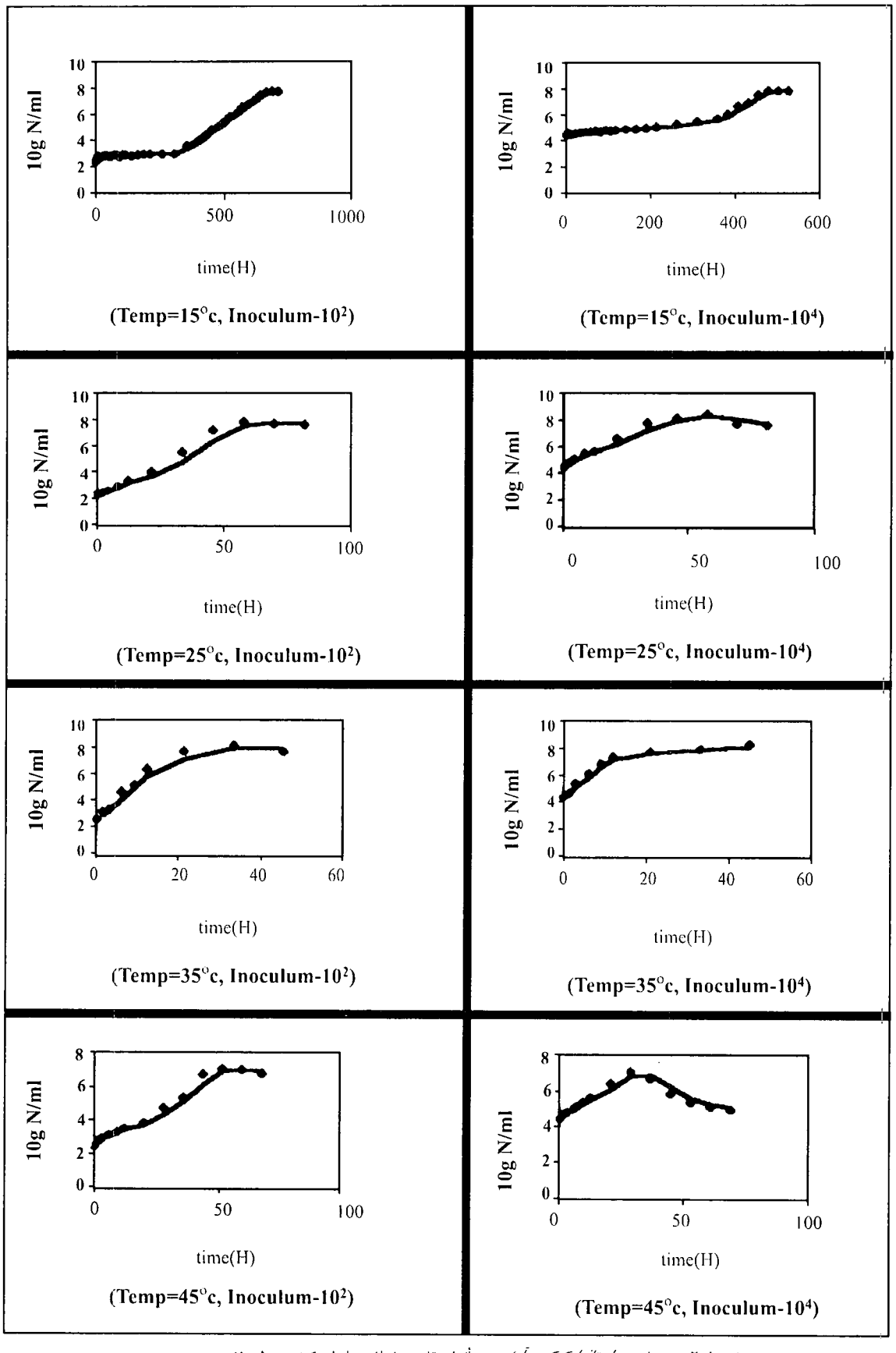
Archive of SID



نمودار ۱ - نمودار رشد *استافیلوکوکوس آرئوس* متأثر از مقادیر مختلف دما و اینوکونوم در pH =۵ در سوپ قارچ.

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۲ - نمودار رشد *استافیلوکوکوس آرئوس* متأثر از مقادیر مختلف دما و اینوکونوم در pH = ۵ در سوپ جو.

www.SID.ir

Archive of SID

Sutherland و همکاران در سال ۱۹۹۴ رفتار *استافیلوکوکوس آرئوس* را در شرایط مختلف pH، نمک و دمای نگهداری مورد مطالعه قرار دادند و از مدل پیشگوی Gompertz جهت تخمین رفتار باکتری و زمان دوبرابر شدن آن استفاده کردند و گزارش نمودند که این چنین مدلهایی یک رهیافت اقتصادی و مؤثری در درک و بنابراین کنترل پاسخ رشد میکربی در مواد غذایی است (۲۴).

نتیجه گیری

مقدار ضریب تعیین R^2 به دست آمده در طی این مطالعه بیانگر میزان تطابق خوب مقادیر پیشگویی شده و مشاهدات تجربی می باشد، با استفاده از این مدل، مدت زمان دوبرابر شدن باکتری یا g در محدوده دامنه مقادیر متغیرهای به کار گرفته شده در این مطالعه با $R^2 = ۰/۸۹۸$ قابل محاسبه و پیشگویی خواهد بود.

References

1. Adesiyun, A. A., Lenz., W. and Schaal, K. P. (1992): Phage susceptibility and entrotoxin production by *Staphylococcus aureus* stains isolated from Nigerian foods. J. Food Prot. 55 (887): 871-873.
2. Anderson, J. E. (1997): Survival of the serological and biological activities of Staphylococcal entrotoxin A in canned mushrooms. Dissertation Abstracts International. 57 (8): 4803.
3. Anderson, J. E., Beelman, R. B. and Doores, S. (1997): Enhanced production and thermal stability of Staphylococcal entrotoxin A in the presence of chitin. J. Food Prot. 60 (11): 1351-1357.
4. Baird - Parker, A.D. and Kilsby, D. (1987): Principles of predictive food microbiology. J. Appl. Bacteriol. 63: 435-495.
5. Baranyi, J., Roberts, T. A and McClure, P. (1993): A nonautonomous differential equation to model bacterial growth.J. Food Microbiol.10:43-59.
6. Bean, N.H., Goulding, J.S., Lao, C. and Anguto, F. J. (1996): Surveillance for foodborne disease outbreaks United State, 1988-1992, Morb. Mortal. W. Rep. 45 (5): 1-66.
7. Bean, N.H. and Griffin, P.M. (1990): Foodborne disease outbreaks in the United State. 1973-1987, pathogens, vehicles and trends. J. Food prot. 53: 804-817.
8. Bergdoll, M.S. (1989): Foodborn Bacterial Pathogens. Marcel Dekker, New York, pp: 463-523.
9. Broughall, J. M., Anslow, P.A. and Kilsby, D.C. (1983): Hazard analysis applied to microbial growth in foods, development of mathematical model describing the effect of water activity. J. Appl. Bacteriol. 55: 101-110.
10. Bryan, F.L. (1988): Risks associated with vehicles of foodborne pathogens and toxins. J. Food Prot. 51 (6): 498-508.
11. Davey, K.R. (1994): Modelling the combined effects of temperature and pH on the rate coefficient for bacterial growth. Int. J. Food Microbiol. 23: 295-303.
12. Dengremont, E. and Membre, J.M. (1995): Statistical approach for comparision of the growth rates of fire strains of *Staphylococcus aureus*. Appl. Environ. Microbiol. 67 (12): 4389-4395.
13. Gomez. Lucia, E., Goyache, J., Orden, J.A., Domenech, A., Hernandez., F.J., Ruiz, Sania Quiteria, J.A. and Suarez, G. (1990): Influence of temperature of incubation on *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production in home - made mayonnaise. J. Food Prot. 53: 386-390.
14. Hirooka, E.Y., De Salzberg, S.P. and Bergdoll, M.S. (1987): Production of Staphylococcal entrotoxin A and thermonuclease in cream pies. J. Food Prot. 50: 952-955.
15. Isigidi, B.K., Mathieu, A.M., Devriese, L.A., Giodard, C. and Van Hoof, J. (1992): Enterotoxin production in different *Staphylococcus aureus* biotypes isolated from food and meat plants. J. Appl. Bacteriol. 72 (1): 16-20.
16. Jay, J-M. (1992): Modern Food Microbiology 4th Edition, Chapman and Hall, New York, pp: 465-469.
17. Jermini, M., Domeniconi, F. and Jaeggli, M. (1997): Food safety at home, a hazard analysis. J. Food Hygiene. 88 (2): 151-153.
18. Knabel, S.J. (1995): Foodborne illness, Role of home food handling practices. Food Technol. 49 (4): 119-131.
19. Magrini, R.C., Chirife, J. and Parada, J. L. (1983): A study of *Staphylococcus aureus* growth in model systems and processed cheese. J. Food Sci. 48: 882-885.
20. Manninen, M., Wirtanen, G., Ahvenainen, R. and Mattila, T. (1990): Automated turbidometry in assessing the bacterial content of food products inoculated with pathogens. Lebensmittel Wissenschaft und Technol. 23 (1): 20-24.
21. Ross, T. and McMeekin, T.A. (1991): Predictive Microbiology Food Aust. 43: 202-207.
22. Sinde, E., Gallardo, C.S., Andres, A., Saa. A.I. and Rodriguez, L.A. (1998): Packet soups hygiene evaluation. Alimentaria 294: 81-94.
23. Smith, J.L., Buchanam, R.L. and Palumbo, S.A. (1983): Effect of food environment on Staphylococcal enterotoxin synthesis. J. Food Prot. 46: 545-555.
24. Sutherland, J.P., Bayliss, A.J. and Roberts, T.A. (1994): Predictive modeling of growth of *Staphylococcus aureus*, the effects of temperature, pH and sodium chloride. Int. J. Food Microbiol. 21: 217-236.

www.SID.ir

Archive of SID

25. Thomas, L.V. and Wimpenny, J.W.T. (1996): Investigation of the effect of combined variations in temperature, pH. and Nact concentration on Nisin inhibition of Listeria monocytogense and *Staphylococcus aureus*. Appl. Environ. Microbiol. 62 (6): 2006-2012.

26. Todd, E.C.D. (1983): Foodborne disease in Canada. 25 Years summary. J. Food Prot. 46: 650-657.

27. Tranter, H. S. (1990): Foodborne Staphylococcal illness. Lancet 336 (8722): 1044-1046.

28. Umoh, V.J., Adesiyun, A.A. and Gomwalk. N.E. (1988): Enterotoxin production by Staphylococcal isolates from Nigerian fermented milk products. J. Food Prot. 51, 534-537.

29. Wieneke, A.A., Roberts, D. and Gilbert, R.J. (1993): Staphylococcal food poisoning in the United kingdom, 1969-1990. Epidemiol. Infect. 110: 519-531.

30. Yang, S. E., Yu, R.C. and chou, C. C. (2001): Influence of holding temperature on the growth and survival of *Salmonella spp*. And *Staphylococcus aureus* and the production of Staphylococcal entrotoxin in egg products. Int. J. Food Microbiol 63: 99-107.

www.SID.ir