

مطالعه و مدل سازی میزان رشد استافیلوکوکوس آرنوس در سوپهای آماده تجارتي

متأثر از عوامل انتخابی رشد

دکتر ودود رضویبلر^۱ دکتر علی فضل آرا^۱

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

Razavilar, V.,^۱ Fazlara, A.^۱

^۱Department 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 (storage 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 45°C) 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 temperature 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.

هدف: این مطالعه جهت ارائه مدل پیشگوی رشد استافیلوکوکوس آرنوس متأثر از عوامل انتخابی رشد (حرارت نگهداری، pH و میزان اینوکولوم) در دو نوع سوپ تجارتي (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)، میزان تلقیح اولیه باکتری (10^2 و 10^4 در میلی لیتر سوپ)، درجه حرارت نگهداری (۵، ۱۵، ۲۵، ۳۵، ۴۵ درجه سانتیگراد) و نیز نوع سوپ تجارتي (سوپ قارچ و سوپ جو) بر روی زمان دوبرابر شدن باکتری استافیلوکوکوس آرنوس 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 تأثیر نوع سوپ، حرارت و نیز اثرات تداخلی این دو قرار گرفت ($P \leq 0.05$). ولی میزان تلقیح اولیه باکتری در این مطالعه تأثیر معنی داری در میزان رشد باکتری نداشت ($P = 0.182$). با استفاده از معادله رگرسیون و ترانسفورماسیونهای مناسب، ارتباط زمان دوبرابر شدن باکتری (g) به عنوان متغیر وابسته با مقادیر مختلف عوامل مورد نظر 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 آرنوس در محدوده دامنه مقادیر متغیرهای به کار گرفته شده با قدرت پیشگویی بسیار خوب قابل محاسبه و پیشگویی می باشد. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، (۱۳۸۱)، دوره ۵۷، شماره ۳، ۶۵-۷۲.

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

استافیلوکوکوس آرنوس 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 مسمومیت های غذایی در سراسر جهان مطرح است که میزان شیوع مسمومیت حاصله از این باکتری با سایر عوامل مسمومیت زا نظیر سالمونلاها (*Salmonella spp*) و کلوستریدیوم پرفرینجنس (*Clostridium perfringens*) در رقابت می باشد (۲۶، ۱۸، ۱۷، ۱۶). علائم 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 (۲۷، ۲۳). 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 آرنوس پوست و غشاهای مخاطی به ویژه ناحیه حلق و بینی در پرندگان و پستانداران می باشد. این

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

باکتری به نحو بسیار گسترده ای در طبیعت پراکنده است و حتی در ۳۰ الی ۸۰ درصد افراد سالم 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 غیر بهداشتی مواد غذایی به عنوان یک عامل بسیار مهم در اشاعه این باکتری و بروز مسمومیت های غذایی حاصله می باشد و مواد غذایی نظیر فرآورده های نانوائی، سسها، خامه و فرآورده های لبنی، تخم مرغ، گوشت قرمز و فرآورده های آن، مرغ، سالادها و سوپ ها از جمله مواد غذایی هستند که بارها به عنوان مسبب شیوع و بروز مسمومیت غذایی استافیلوکوکوی گزارش شده اند. همچنین غذاهای پخته و آماده بسته بندی شده نظیر سوپهای تجارتي 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



RTCC ۱۸۹۶ 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/رنوس با انتقال باکتری از لوله های کشت شیدار 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 (دو کشت 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 4×10^8 باکتری در هر میلی لیتر بود مشخص گردید. بدین ترتیب در دفعات بعدی انجام آزمایش، در هر بار با مشخص شدن جذب نوری مورد نظر ($Absorbant = 1$) و $Transmittant = 10\%$ به طور تقریبی 4×10^8 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 4×10^8 باکتری در هر میلی لیتر، رقتهای سریال ده برابر از 10^4 تا 10^8 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 (10^4 و 10^6) باکتری در هر میلی لیتر از سوپ) فراهم می نمود، استفاده گردید.

تهیه سوپها و تنظیم pH های مورد نظر: 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 هر بسته 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 5 ± 0.1 بود. همچنین بسته به حالات مورد نظر با کمک آب لیمو (آب لیمو تهیه شده صنعتی از یک بهر تولیدی و دارای تاریخ مصرف یکسان) نسبت به تنظیم pH سوپها در مقادیر مورد نظر (۵، ۴/۵ و ۴) اقدام گشته. در مقادیر ۱۰۰ میلی لیتر در ظروف در پیچدار قابل اتوکلاو تقسیم شدند سپس با اتوکلاو نمودن ظروف مذکور در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه نسبت به استریل سازی سوپها و نابود نمودن میکروارگانیسمهای رقیب و آلودگیهای احتمالی که منجر به خطا در آزمایش

افراد جامعه و مصرف کنندگان می گردد (۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱).

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 ارائه شده است (۳۰، ۲۴، ۲۱، ۱۹، ۱۳، ۹، ۵، ۴). ارائه این گونه مدل های ریاضی در سالهای اخیر که در خصوص پیشگویی رشد و بقای باکتریها در مواد غذایی طرح شده اند، تشکیل دهنده زمینه علمی پیش نیاز جهت کامپیوتری کردن بهداشت فرآوری تولید مواد غذایی هستند که مورد توجه 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 ارائه مدلی برای اثرات بعضی عوامل درون اثر (pH، نوع ماده غذایی و مواد مغذی موجود در آن) و برون اثر (میزان تلقیح، حرارت و مدت زمان نگهداری) بر روی میزان رشد/استافیلوکوکوس/رنوس 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 (۴/۵، ۵ و ۶)، ۲ میزان تلقیح باکتریایی (10^4 و 10^6 باکتری در هر میلی لیتر از غذا) و نیز ۲ نوع سوپ تجاری آماده بسته بندی شده (سوپ قارچ و سوپ جو) استفاده گردید. با انجام آزمون رگرسیون خطی، مدلی پیشگو جهت پیشگویی میزان رشد/استافیلوکوکوس/رنوس مورد مطالعه (به عنوان یک متغیر وابسته) متأثر از مقادیر مختلف عوامل به کار گرفته شده (به عنوان متغیرهای مستقل) در محدوده مورد مطالعه 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/رنوس 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 بردپار کر 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 رشد باکتری به حداکثر و رسیدن به مرحله توقف رشد (Stationary 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 بر مبنای میانگین نتایج ثبت شده از ۳ بار تکرار در هر حالت رسم گردید.

باکتری مورد مطالعه: کشت لیوفیلیزه/استافیلوکوکوس/رنوس به شماره



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 با استفاده 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 آئروس 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 مورد نظر رسم شده اند. در مواردی به منظور رسم منحنیهای مذکور تا ۳۵ زمان نمونه برداری در طی مدت ۷۱۷ ساعت جهت بررسی وضعیت رشد باکتری اقدام گردید تا در نهایت تراکم باکتریایی به حداکثر جمعیت میکروبی رسید. بر مبنای میانگین نتایج حاصله از شمارش تراکم باکتریایی 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. بر اساس 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 مورد نظر 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 مساوی ۵ می باشد و در طی مطالعات انجام شده در هیچ کدام از حالات ترکیبی فاکتورهای مورد نظر در pH 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. بر اساس 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

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 مورد نظر برای مطالعه تنظیم می گردید.

تلقیح باکتری به سوپها، گرمخانه گذاری و بررسی رشد باکتری: همان گونه که گفته شد رفتهای 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 4×10^8 باکتری در هر میلی لیتر از برات BHI موجود در کووت می باشد، تهیه گردید. بدین ترتیب رفتهای سریال ده برابر از 10^8 تا 10^4 باکتری در هر میلی لیتر از برات BHI به دست آمد. از رفتهای حاصل جهت تلقیح نمودن به سوپهای آماده شده فوق الذکر استفاده گردید به طوری که با افزودن یک میلی لیتر از رقت 10^6 به ظرف حاوی ۱۰۰ میلی لیتر سوپ، میزان تلقیح 10^4 باکتری در هر میلی لیتر سوپ و نیز با افزودن یک میلی لیتر از رقت 10^4 به ظرف حاوی ۱۰۰ میلی لیتر سوپ، میزان تلقیح 10^2 باکتری در هر میلی لیتر سوپ حاصل گردید. بعد از مخلوط کردن محتوی هر ظرف توسط دستگاه شیکر لرزان، بالن به مدت ۵ دقیقه، ظروف مذکور در هر یک از حرارت‌های مورد نظر در این مطالعه یعنی ۵، ۱۵، ۲۵، ۳۵ و ۴۵ درجه سانتیگراد قرار گرفت. از این کشتهای در زمانهای مختلف نمونه برداری و رفتهای سریال ده برابر تهیه گردیده و در پلیتهای حاوی محیط بردپارکر به روش سطحی جهت شمارش کشت گردید. کشتهای 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 میکروبی در سوپها ثبت گردید. به منظور برخورداری از دقت مطلوبتر، تمامی مراحل کار با ۳ بار تکرار مورد آزمایش قرار گرفت و در نهایت بر مبنای 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 از 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 مورد بحث 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: $\log_{10} N - \log_{10} N_0 = \frac{K}{2.303} (t-1)$ که در این فرمول N_0 میزان تلقیح اولیه باکتری در زمان N_0 ، افزایش میزان باکتری تلقیح شده در زمان t ، t_0 زمان انجام تلقیح اولیه باکتری، t زمان تعیین میزان افزایش باکتری تلقیح شده و K میزان رشد باکتری است.

(۲) محاسبه g: $g = \frac{\ln 2}{K} = \frac{0.693}{g}$ 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.



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 آرنوس* مورد مطالعه قرار گرفت.

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

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

آنالیزهای آماری نمایانگر اثر معنی دار *Temp*×*Soup*، *Temp*، *Soup* بر روی مدت زمان دوبرابر شدن 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 ۱۰^۵، 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 آرنوس* در سوپها می باشد. این مشاهدات مطابق با نتایج تحقیقات و گزارشات *Shu-Er Yang* و همکاران بود (۳۰). این محققین که چگونگی رشد *استافیلوکوکوس آرنوس* 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* در خصوص چگونگی رشد *استافیلوکوکوس آرنوس* تحت شرایط مختلف دما و pH 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 آرنوس* 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 بر مدت 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).

سانتیگراد به حداقل مقدار ممکن در طی این مطالعه رسیده است. در واقع در حالت اخیر بهترین شرایط رشد باکتری *استافیلوکوکوس آرنوس* 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 آرنوس* به طور معنی داری $P \leq 0/053$ تحت تأثیر *Soup*×*Temp* و نیز تداخل دو فاکتوری *Temp*×*Soup* قرار داشت.

مدل سازی رفتار *استافیلوکوکوس آرنوس* 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 $R^2 = 0/898$ به شرح ذیل به دست آمد:

$$\text{Generation Time} = - 15/340 + (639/812 \cdot \text{Temp}) - 13/098 \text{ Soup} + 0/351 (\text{Temp} \times \text{Soup})$$

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

G. Time (H)	K	Max. Population (N/mL)	Inoculum (N/mL)	Temperature (C)	
۱۲/۹۰	۰/۰۵۳۷۴	۸۵۰۰۰۰۰۰	۴۰۰	۱۵	۱
۱۰/۰۳	۰/۰۶۹۰۹	۷۸۰۰۰۰۰۰	۲۲۶۰۰	۱۵	۲
۳/۰۱	۰/۲۲۰۳۰	۳۲۲۰۰۰۰۰	۳۰۰	۲۵	۳
۲/۵۸	۰/۲۶۸۶۸	۱۴۷۰۰۰۰۰۰	۲۱۴۰۰	۲۵	۴
۱/۴۰	۰/۴۹۳۵۰	۴۹۰۰۰۰۰۰	۲۰۰	۳۵	۵
۱/۰۰	۰/۶۹۰۹۰	۱۹۲۰۰۰۰۰۰	۱۷۸۰۰	۳۵	۶
۳/۸۰	۰/۱۸۲۴۲	۲۹۲۰۰۰۰۰	۶۰۰	۴۵	۷
۳/۰۱	۰/۲۲۰۳۰	۱۴۲۰۰۰۰۰۰	۲۵۲۰۰	۴۵	۸

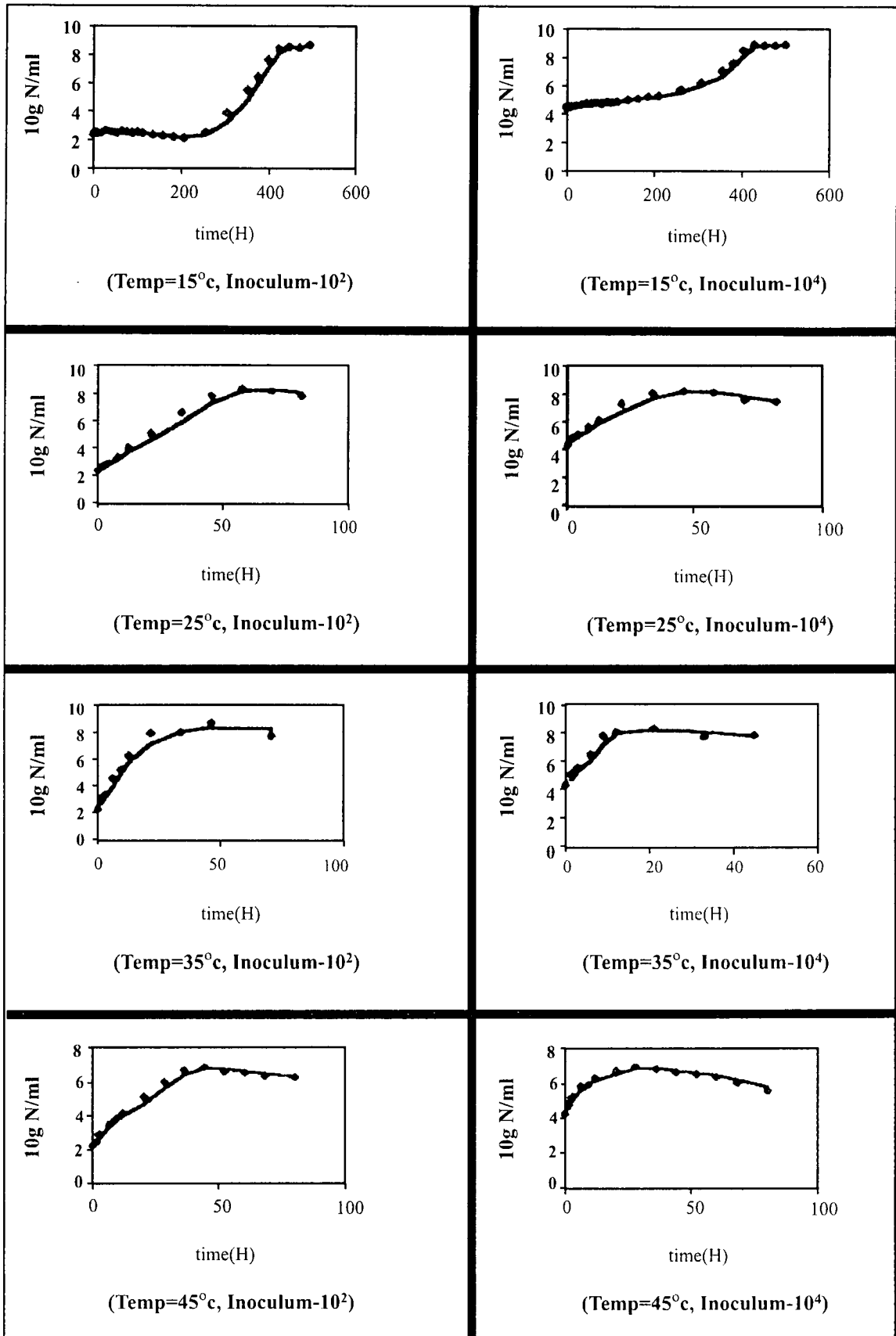
جدول ۲ - حالات منجر به رشد *استافیلوکوکوس آرنوس* در pH = ۵ در سوپ جو و مقادیر *g* و هر حالت

G. Time (H)	K	Max. Population (N/mL)	Inoculum (N/mL)	Temperature (C)	
۲۴/۰۸	۰/۰۲۸۷۹	۵۳۰۰۰۰۰۰	۲۰۰	۱۵	۱
۱۶/۷۲	۰/۰۴۱۴۵	۸۶۰۰۰۰۰۰	۲۸۰۰۰	۱۵	۲
۳/۲۹	۰/۲۰۴۷۱	۱۲۳۰۰۰۰۰۰	۴۰۰	۲۵	۳
۳/۰۱	۰/۲۲۰۳۰	۱۹۶۰۰۰۰۰۰	۲۳۷۰۰	۲۵	۴
۱/۷۲	۰/۴۰۰۵۲	۱۱۸۰۰۰۰۰۰	۳۰۰	۳۵	۵
۱/۲۰	۰/۵۷۵۷۵	۳۰۲۰۰۰۰۰۰	۳۰۲۰۰	۳۵	۶
۴/۵۱	۰/۱۵۳۵۳	۲۲۰۰۰۰۰۰۰	۵۰۰	۴۵	۷
۳/۶۱	۰/۱۹۱۹۲	۲۶۶۰۰۰۰۰۰	۲۲۵۰۰	۴۵	۸

بحث

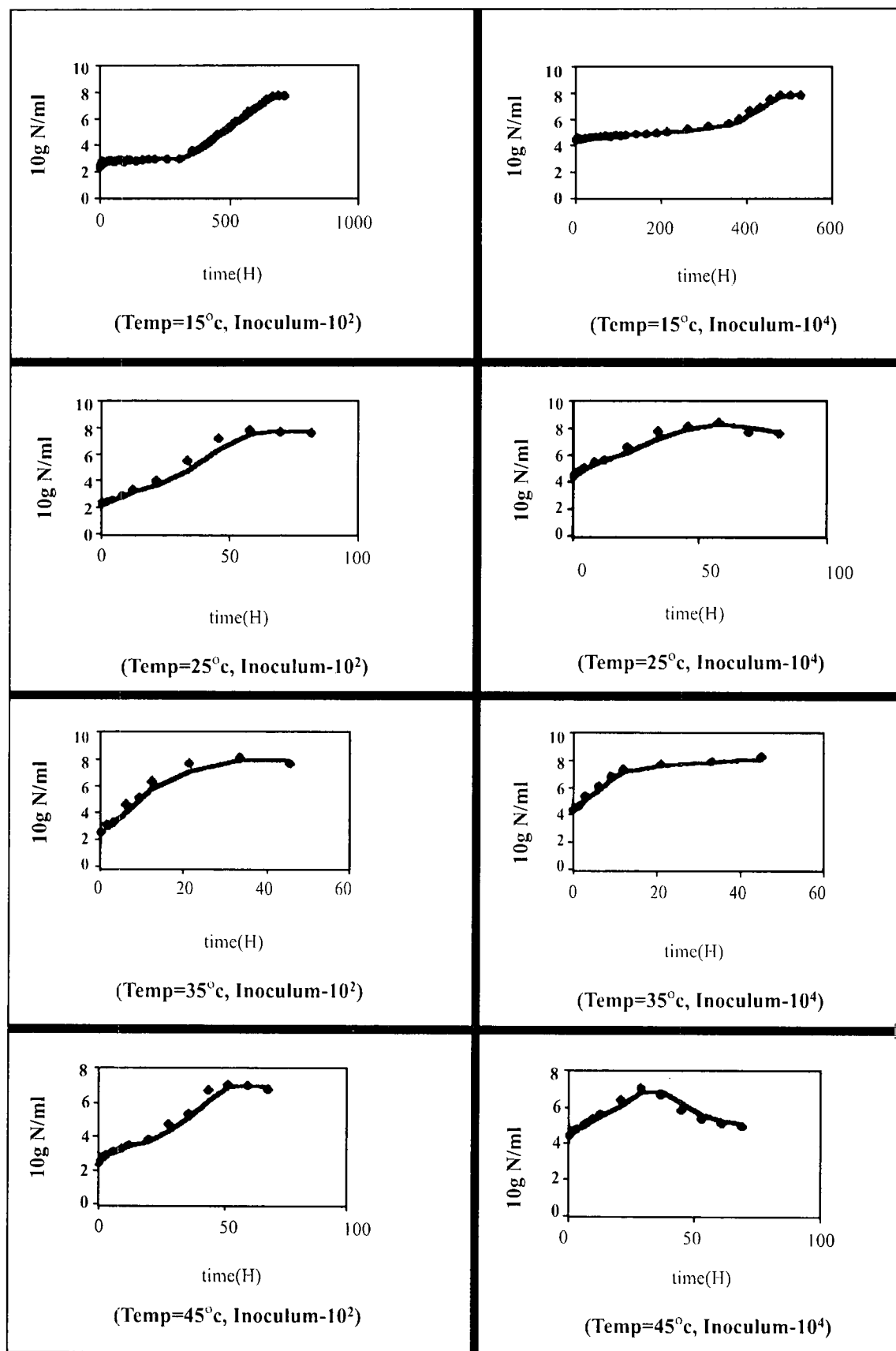
توانایی رشد *استافیلوکوکوس آرنوس* در محیط های آزمایشگاهی و غذاهای مختلف تحت یکسری از شرایط طراحی شده توسط محققین مختلف مورد ارزیابی و بررسی قرار گرفته است (۳۰، ۲۴، ۲۱، ۱۹، ۱۳، ۱۲، ۹، ۵، ۴). در این مطالعه یکی از ارزشهای رشدی یعنی مدت زمان دوبرابر شدن باکتری یا *g* که در بهداشت و صنایع غذایی برای ارزیابی بهداشتی و





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





نمودار ۲ - نمودار رشد/استایلیکوباکتریوس/زئوس متأثر از مقادیر مختلف دما و اینوکولوم در pH = ۵ در سوپ جو.



References

1. Adesiyun, A. A., Lenz, W. and Schaal, K. P. (1992): Phage susceptibility and enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* strains 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 enterotoxin 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 enterotoxin 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 comparison of the growth rates of five 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 enterotoxin 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.

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 $R^2 = 0/898$ قابل محاسبه و پیشگویی خواهد بود.



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.

