مدل سازی رشد فاکتوریال *استافیلوکوکوس آرئوس*، متأثر از عوامل pH، غلظت نمک، میزان تلقیح، حرارت و زمان نگهداری

دکتر ودود رضویلر[1] دکتر عبدالله جمشیدی[2] دکتر افشین آخوندزاده[1]

هدف: بررسی رفتار *استافیلوکوکوس آرئوس* متأثر از عوامل pH، غلظت نمک، میزان تلقیح باکتری، حرارت و زمان نگهداری با استفاده از مدل پیشگوی ریاضی.

طرح: مطالعه تجربه‌ای با استفاده از آنالیز چند فاکتوری.

روش: رشد باکتری در محیط مایع Brain heart infusion با سه غلظت نمک (۹، ۴/۵، ۰/۵ درصد)، سه میزان pH (۷، ۶، ۵)، تنظیم شده با اسید سیتریک و سه رقم درجه حرارت نگهداری (۳۵، ۲۵، ۱۵ درجه سانتیگراد) تا مدت ۳۰ روز مورد مطالعه قرار گرفت. میزان باکتری تلقیح شده به محیط از 10^{5} تا 10^{-2} در میلی‌لیتر تنظیم گردید. شمارش باکتری براساس روش MPN صورت گرفت و لگاریتم احتمال رشد باکتری به‌صورت درصد (Log probability percentage) محاسبه گردید.

تجزیه و تحلیل آماری: با استفاده از مدل رگرسیون چند فاکتوری و رگرسیون مرحله‌ای، مدل ریاضی پیشگو برای رشد باکتری تهیه گردید.

نتایج: مدل پیشگویی رشد باکتری با ضریب تعیین برابر $R^2 = 0/83$ تعیین گردید. آنالیز آماری بیانگر تأثیر معنی دار غلظت نمک، میزان pH، حرارت و زمان نگهداری مورد استفاده در این مطالعه بر رشد باکتری بود ($P<0/01$).

نتیجه گیری: مدل پیشگوی با ضریب تعیین بالای به دست آمده به طور مؤثری قادر به پیشگویی رشد یا عدم رشد *استافیلوکوکوس آرئوس* در دامنه مقادیر عوامل به کار گرفته شده در این تجربه می‌باشد. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، (۱۳۸۰)، دوره ۵۷، شماره ۱، ۳۶-۳۱.

واژه‌های کلیدی: *استافیلوکوکوس آرئوس*، حرارت، نمک، pH، میکروب شناسی پیشگو، احتمال رشد.

Modeling of growth of *S. aureus* as affected by pH, Nacl concentration, inoculum levels, temperature and storage time

Razavilar, V.[1], Jamshidi, A.[2], Akhondzadeh, A.[1]

[1]*Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran – Iran.* [2]*Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Ferdowsi Mashhad, Mashhad – Iran.*

Objective: To evaluate the fate of *S.Aureus* affected by PH, nacl. Inoculum levels, temperature, storage time using predictive model.

Design: Experimental study using multiple factorial analysis.

Procedure: The effects of nacl (0.5, 4.5, 9%), Temperature (15, 25, 35c°), pH (5, 6, 7) adjusted by citric acid, storage time (up to 30 days), inoculum (10^{-2}-10^{5}/ml) on the log probability percentage of one cell of *S. aureus* to initiate growth (log P%) in brain heart infusion broth were evaluated in a factorial design study.

Statistical analysis: Regression equation with stepwise method.

Results: A predictive growth model was created to predict the growth of S. aureus with coefficient of determination (R^2), Equal to 0.83. The statistical analysis showed that the growth of organism (log p%) was affected significantly by Nacl, pH, Temperature and storage time ($P<0.01$). The effectiveness of factors on the growth of organism was according to the order of temperature > time > pH> Nacl. The combination of temperature ≤ 15c°, pH ≤ 5, Nacl ≥ 9% was the only condition which completely inhibited the grouth of *S. aureus* in this study.

Conclusion: The created growth model in this study with a coefficient of determination equal to 0.83 can be used to predict the growth of organism affected by the ranges of factor levels used in this study. ***J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran. 57, 1: 31-36, 2002.***

Key words: *S. Aureus*, Temperature, Nacl, pH, Predictive microbiology, Probability of growth.

جنس استافیلوکوکوس دارای بیش از ۲۳ گونه و تحت گونه است (۲۶، ۱۵، ۵). شایعترین گونه که عامل ایجاد اغلب بیماریهای استافیلوکوکسی می‌باشند، *استافیلوکوکوس آرئوس* است (۱۵). این باکتری مسمومیت غذایی با علایم تهوع، استفراغ، کرامپ شکمی و اسهال با دوره کمون ۳۰ دقیقه تا ۸ ساعت در انسان ایجاد می‌کند (۲۶، ۱۵). این علایم معمولا خود به خود بر طرف می‌گردد و بیشتر از ۲۴ ساعت دوام ندارد. در موارد شدید، دهیدراتاسیون منجر به شکوک، نبض ضعیف و تنفس کم عمق می‌گردد (۲۱،۲۶).

به طور کلی شناسایی رفتار باکتری و مدل سازی در میکروب شناسی مواد غذایی در سال ۱۹۲۰ با ابداع روشهایی جهت محاسبه زمان مرگ باکتری آغاز گردید. این مدلها موجب دگرگونی در صنعت کنسرو سازی گردید. امروزه استفاده از مدل پیشگو به علت استفاده زیاد از غذاهای نگهداری شده در سرما و دارای مدت زمان نگهداری محدود و نیز توسعه سیستمهای نگهدارنده چندگانه (Preservation systems multiple hurdle) و همچنین استفاده از کامپیوتر بسیار رایج گردیده است. مدلها شامل فاکتورهایی مانند درجه حرارت، pH، غلظت نمک، a_w، نیتریت سدیم، اسیدهای آلی و اتمسفر هوازی یا بیهوازی می‌باشند. این فاکتورها قادر به تشریح رفتار میکروبی در غذا می‌باشند (۵،۱۰).

با استفاده از فرمول رگرسیون می‌توان یک مدل ریاضی ساخت که قادر به پیش بینی رفتار باکتری تحت تأثیر عوامل درون اثر و برون اثر باشد، که اولین بار در سال ۱۹۷۱ توسط Genigeorgis و همکاران در تشریح شرایط رشد باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* مورد استفاده قرار گرفت (۸). این مطالعات بر روی سایر باکتریها شامل لیستریا (۱۹، ۱۸) *باسیلوس سرئوس* (۱۷) سالموند (۷) و نیز شرایط مسمومیت زایی *کلستریدیوم بوتولینوم* (۱۲، ۱۱) صورت گرفت.

در این بررسی رفتار باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* متأثر از عوامل pH غلظت نمک، میزان تلقیح، حرارت و زمان نگهداری همراه با مدل سازی رشد آن مورد مطالعه قرار گرفت.

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

۲) گروه آموزشی بهداشت و کنترل مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد -ایران.

جدول ۱- لگاریتم درصد احتمال رشد (Lg p%) و تعداد سلول مورد نیاز جهت شروع به رشد (CN) *استافیلوکوکوس آرئوس* در زمان حداکثر رشد، متأثر از غلظت نمک، pH، حرارت و زمان نگهداری تا مدت ۳۰ روز.

درجه حرارت	غلظت نمک	PH= ۵			PH= ۶			PH= ۷		
		روز	Log%	CN	روز	Log%	CN	روز	Log%	CN
۳۵ C°	٪۰/۵	۲۷	۰/۶	۸۷/۳۴	۸	۱/۷۲	۱/۹۰	۲	۱/۷۲	۱/۹۰
	٪۴/۵	۱۲	-۰/۲۸	۱۹۰/۹۹	۴	۱/۷۲	۱/۹۰	۲	۱/۷۲	۱/۹۰
	٪۹	۱۰	-۰/۵۹	۳۸۵	۴	۱/۷۲	۱/۹۰	۲	۱/۷۲	۱/۹۰
۲۵ C°	٪۰/۵	۲۴	۰/۴۱	۳۸/۵۵	۵	۱/۷۲	۱/۹۰	۲	۱/۷۲	۱/۹۰
	٪۴/۵	۲۱	-۰/۹۴	۸۷/۹۷	۵	۱/۷۲	۱/۹۰	۳	۱/۷۲	۱/۹۰
	٪۹	۱۶	-۰/۵۹	۳۸۵/۴۸ ۰	۵	۱/۷۲	۱/۹۰	۴	۱/۷۲	۱/۹۰
۱۵ C°	٪۰/۵	۲۴	-۲/۵۹	۳۸۵۵۰/۵۰	۲۷	-۲/۲۸	۱۹۰۹۸/۵۵	۲۴	۱/۷۲	۱/۹۰
	٪۴/۵	۲۷	-۲/۹۴	۸۷۲۶۰/۰۳	۲۴	-۲/۵۹	۳۸۵۵۰/۵۰	۲۴	۱/۷۲	۱/۹۰
	٪۹	۳۰	-۴/۲۷	۱۹۲۳۰۷۷	۱۸	-۳/۲۸	۱۹۲۳۰۷/۷	۲۴	۰/۰۶	۸۷/۳۴

مواد و روش کار

باکتری مورد آزمایش و تهیه کشت مادر جهت مطالعات تلقیحی: *استافیلوکوکوس آرئوس* کواگولاز مثبت سویه ۹۶/۱۸ (RTCC) تهیه شده از موسسه واکسن و سرم سازی رازی پس از انجام آزمایشهای تأییدی مورد استفاده قرار گرفت. باکتری ابتدا در محیط BHI آگارشیب دار در داخل لوله آزمایش کشت داده شد و سپس دو کشت متوالی ۲۴ ساعته از آن در محیط مایع BHI در درجه حرارت ۳۷C° تهیه گردید. با شمارش باکتری در کشت ۲۴ ساعته دوم به روش شمارش سطحی، تعداد تقریبی آن در هر میلی‌لیتر تعیین گردید. تعداد باکتری پس از سه بار تکرار برابر $۱/۲\times۱۰^{۹}$/ml برآورد گردید. برای تهیه کشت مادر جهت مطالعات تلقیحی (Inoculation study)، در یک لوله کووت (Cuvet) حاوی ۵ میلی‌لتیر BHI برات استریل مقدار ۵۰µl از دومین کشت متوالی اضافه گردیدکه مقدار تقریبی آن با روش شمارش سطحی (Plate count) $۱/۲\times۱۰^{۷}$ تعیین گردید، با قرار دادن این لوله کووت در دستگاه اسپکتروفتومتر میزان جذب (Absorbance) آن نیز در حدود ۰/۱ مشخص گردید و از این عدد به دست آمده، جهت تعیین میزان تلقیح میکروبی در طی مطالعه استفاده گردید.

تهیه محیط سوبسترای مدل جهت رشد باکتری: محیط برات BHI به عنوان سوبسترای پایه جهت رشد باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* مورد استفاده قرار گرفت. پودر برات BHI (۳/۷ گرم) با استفاده از حرارت ملایم در ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر داخل یک فلاسک حل گردید. بعد از سرد شدن جهت انجام آزمایش به آن نمک (Nacl) به میزان مورد نظر (۰/۵-۴/۵-۹ درصد) و نیز اسید سیتریک یک نرمال جهت تنظیم pH مورد نظر (۵-۶-۷) اضافه نموده و در پایان حجم نهایی برات در حد ۱۰۰ میلی‌لیتر تنظیم گردید. محتوای هر یک از فلاسکها در داخل لوله‌های آزمایش در پیچدار به حجم ۹ میلی‌لیتر تقسیم گردیده و در درجه حرارت ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو گردید. (لوله مورد استفاده جهت تهیه اولین رقت حاوی ۹/۹ میلی‌لیتر برات BHI بود). در هر دوره آزمایش تعداد ۷ لوله هر یک حاوی ۹ میلی‌لیتر و نیز یک لوله جهت تهیه اولین رقت حاوی ۹/۹ میلی‌لیتر برات BHI با مشخصات تنظیم شده از نظر pH و غلظت نمک انتخاب نموده و از کووت حاوی $۱۰^{۷}$ باکتری در میلی‌لیتر به میزان ۰/۱ میلی‌لیتر در لوله اول تلقیح نموده و رقتهای سریال تا لوله هشتم تهیه گردید ($۱۰^{۵}$/ml تا $۱۰^{-۲}$) سپس محتوای هر یک، از لوله‌ها را در سه لوله کوچک (از نوع ونوجکت Venoject) به میزان ۳ میلی‌لیتر در هر لوله تقسیم نموده و به مدت ۳۰ روز در درجه حرارتهای مورد نظر (۱۵-۲۵-۳۵ درجه سانتیگراد) قرار گرفت. طی مدت گرمخانه گذاری به تعداد ۱۶ بار، در روزهای ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۴، ۱۶، ۱۸، ۲۱، ۲۴، ۲۷ و ۳۰ تمام لوله‌ها از نظر رشد (کدورت قابل رؤیت) مورد مشاهده قرار گرفت و نتایج در تاریخ مورد نظر ثبت گردید.

محاسبه Log P% رشد باکتری: براساس تعداد لوله‌هایی که رشد در آنها صورت گرفته بود با استفاده از جدول MPN (Most probable number) تعداد باکتری با بیشترین احتمال در هر میلی‌لیتر سوبسترا مشخص گردید (۱۳). سپس لگاریتم پایه ۱۰ آن محاسبه و با استفاده از فرمول Log P% =2-(log *I*-log *G*) لگاریتم درصد احتمال رشد یک سلول باکتری در هر یک از شرایط محیطی در برات طراحی شده در زمان مشخص محاسبه گردید، که در آن: log p%= لگاریتم درصد احتمال رشد یک سلول باکتری، log I= لگاریتم تعداد باکتری تلقیح شده در هر میلی‌لیتر سوبسترای اولین لوله (بالاترین غلظت تلقیح شده)، log G= لگاریتم (MPN) در هر میلی‌لیتر سوبسترا می‌باشد.

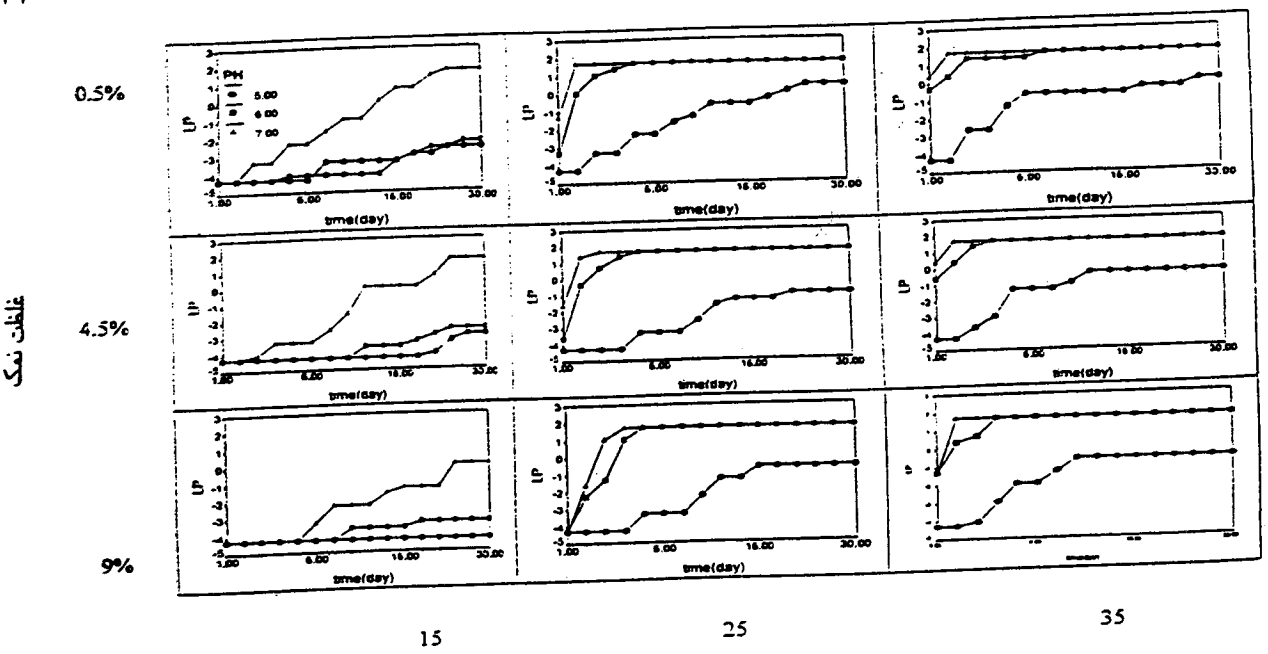
در صورت مشاهده عدم رشد در تمامی ۲۴ لوله مورد آزمایش G برابر ۰/۱۷ سلول و لگاریتم آن ۱/۲۵- در نظر گرفته شد (۱۸). جهت محاسبه تعداد سلول مورد نیاز CN (Cells needed) جهت شروع رشد در هر یک از شرایط مورد آزمایش از فرمول $CN=^{100}/_{P\%}$ استفاده گردید که در آن CN تعداد سلول مورد نیاز جهت شروع رشد و P احتمال رشد یک سلول باکتری به صورت درصد می‌باشد.

تهیه مدل پیشگوی رشد باکتری: جهت تهیه مدل پیشگویی پس از انجام تغییرات لازم، از مدل رگرسیون چند تایی (Multiple regression) استفاده گردید، و بدین ترتیب فرمول پیش بینی احتمال رشد باکتری تحت تأثیر عوامل مختلف، طراحی شده در محیط برات BHI به دست آمده ($\log p\% = a + b_1x_1 + b_2x_2 + \ldots b_nx_n$) که در آن (x) متغییر مستقل، (b) ضریب رگرسیون و (a) میزان عرض از مبدأ می‌باشد.

نتایج

جدول ۱ مقادیر لگاریتم درصد احتمال رشد یک سلول باکتری و حداقل تعداد باکتری مورد نیاز جهت شروع رشد تحت شرایط مختلف و در روزی که احتمال رشد به حداکثر خود رسیده است را نشان می‌دهد. در مواردی که شرایط محیطی تا ۳۰ روز پس از انکوباسیون به باکتری امکان رشد نداده بود و رشد روز اول و روز آخر برابر بود، نتیجه روز آخر منظور گردید.

در آنالیز آماری مشخص گردید که فاکتورهای pH، درجه حرارت نگهداری و غلظت نمک در دامنه مورد آزمایش اثر معنی‌داری بر رشد سلول باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* دارند (P< ۰/۰۰۰) و بالاترین ضریب همبستگی مربوط به فاکتور درجه حرارت نگهداری می‌باشد



نمودار ۱- مقایسه اثر pHهای مختلف بر لگاریتم درصد احتمال رشد (logp%) یک سلول *استافیلوکوکوس آرئوس* متأثر از غلظتهای مختلف نمک، حرارت و مدت زمان نگهداری تا ۳۰ روز.

جدول ۲- پارامترهای مدل رگرسیون با بیشترین میزان ضریب همبستگی R^2 (R square =۰/۸۳۳)

مدل	ضریبهای رگرسیون غیر استاندارد شده		ضریبهای رگرسیون استاندارد شده	t	معنی‌دار
	B	خطای انحراف معیار	Beta		
عدد ثابت مدل رگرسیون (Constant)	-۴۲/۶۱۱	۳/۸۶۵		-۱۱/۰۲۳	۰/۰۰۰
درجه حرارت، pH (TP)	۱/۴۵۵ E -۰۲	۰/۰۰۷	۰/۳۲۰	۲/۰۰۳	۰/۰۴۶
درجه حرارت × درجه حرارت ($TEMP_2$)	-۱/۳۹۷ E -۰۲	۰/۰۰۱	-۲/۳۶۰	-۱۳/۵۹۵	۰/۰۰۰
درجه حرارت (TEMP)	۰/۸۰۲	۰/۰۶۹	۲/۶۹۴	۱۱/۶۹۹	۰/۰۰۰
زمان در زمان D_2	-۵/۲۴۸ E -۰۳	۰/۰۰۱	-/۵۹۲	-۷/۶۷۹	۰/۰۰۰
زمان نگهداری DATE	۰/۲۹۷	۰/۰۲۷	۱/۰۹۹	۱۱/۲۰۱	۰/۰۰۰
pH	۸/۲۷۵	۱/۲۴۷	۲/۷۷۸	۶/۶۳۳	۰/۰۰۰
(pH_2) pH+ pH	-۰/۵۹۷	۰/۱۰۳	-۲/۴۰۹	-۵/۸۱۳	۰/۰۰۰
نمک طعام (NACL)	-۰/۱۴۷	۰/۰۴۵	-۰/۲۰۹	-۳/۲۶۲	۰/۰۰۱
درجه حرارت × زمان (TD)	-۲/۲۶۳ E -۰۳	۰/۰۰۱	-۰/۲۴۰	-۳/۴۳۶	۰/۰۰۱
درجه حرارت × نمک طعام (TN)	۳/۵۰۹ E -۰۳	۰/۰۰۲	۰/۱۴۳	۲/۰۵۵	۰/۰۴۱

(r = ۰/۴۹۵). مقدار R^2 (۰/۸۳۳) نشان دهنده میزان همبستگی بسیار بالا بین مقادیر مشاهده شده متغییر وابسته و مقدار پیش بینی شده آن از روی مدل پیشگو می‌باشد. همچنین نشان می‌دهد که مدل حاضر به خوبی می‌تواند جهت پیش بینی لگاریتم درصد احتمال رشد باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* در شرایط مختلف محیطی مورد استفاده قرار گیرد.

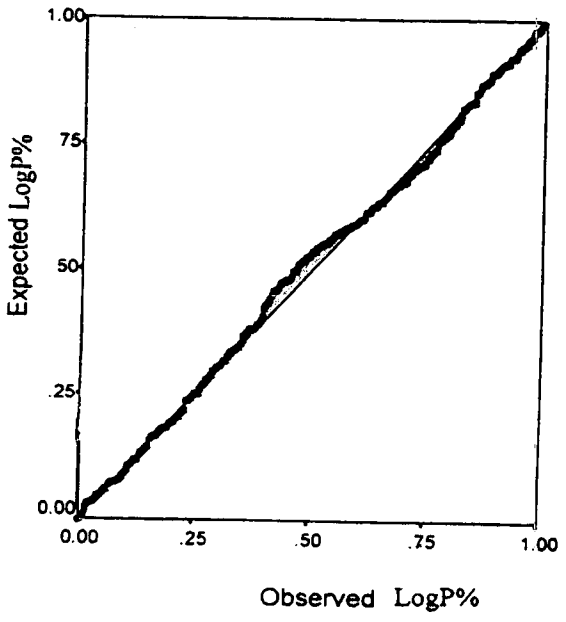
نمودار ۱ نشان دهنده اثر pHهای مختلف بر لگاریتم درصد احتمال رشد (logp%) یک سلول باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* در محیط برات (BHI) تحت تأثیر شرایط مورد استفاده در این مطالعه می‌باشد.

جدول ۲ نشان دهنده مدل رگرسیونی با بیشترین میزان R^2 (R-square) بوده، که مشخص کننده ضرایب مدل رگرسیون می‌باشد. همچنین در نمودار ۲ میزان همبستگی بین پیش بینی احتمال رشد باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* با استفاده از مدل ساخته شده و نتایج مشاهده شده آمده است.

بحث

اطمینان از سلامت غذا از نظر میکروبی و نیز اطمینان از مدت زمان نگهداری آن بستگی به کاهش آلودگی اولیه، جلوگیری و یا محدود نمودن رشد و یا نابود سازی جمعیت میکروبی دارد. رشد باکتری استافیلوکوکوس آرئوس و نیز تولید انتروتوکسین توسط این باکتری در شرایط مختلف محیطی، شامل عوامل درون اثر و برون اثر و نیز تهیه مدل پیشگو توسط محققین زیادی مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته است (۲۷، ۲۴، ۱۹، ۱۸، ۱۷، ۸، ۶). در این مطالعه احتمال رشد سلول باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* تحت تأثیر غلظت نمک، pH، درجه حرارت و مدت زمان انکوباسیون مورد بررسی قرار گرفته و براساس نتایج به دست آمده مدل سازی گردید.

در این بررسی دمای انکوباسیون بر رشد باکتری تأثیر معنی‌داری داشت (P= ۰/۰۰۰) بدین معنی که در شرایط یکسان با کاهش دما احتمال رشد باکتری کاهش یافت، که با یافته محققین دیگر مطابقت دارد (۲۶، ۲۲، ۱۵، ۹، ۵). به طور کلی کنترل درجه



نمودار۲- میزان همبستگی پیش بینی احتمال رشد یک سلول *استافیلوکوکوس آرئوس* با استفاده از مدل ساخته شده و نتایج مشاهده شده.

حرارت در پروسس، توزیع و نگهداری بسیاری از انواع مواد غذایی که اصطلاحا زنجیره سرد (Cold chain) نامیده می‌شود، جهت اطمینان از سلامت غذا و نیز مدت زمان نگهداری آن از اهمیت ویژه برخوردار است (۱۴). در این بررسی دما بیشترین تأثیر را در رشد باکتری داشت و ضریب همبستگی آن با احتمال رشد باکتری برابر ۰/۵۹۴ بود. براساس برآورد تاتینی Tatini در سال ۱۹۷۳ دامنه درجه حرارت رشد °۷-۴۷/۸C و اپتیمم آن در °۳۷C گزارش گردیده است (۱۴). در برخی منابع دیگر این دامنه °۱۰-۴۵ C و اپتیمم رشد °۳۵-۳۷C ذکر شده است (۱۵). در یک بررسی دیگر بر روی ۷۷ سویه *استافیلوکوکوس آرئوس* کواگولاز مثبت که به صورت تازه از غذا جدا گردیده بودند، حداقل درجه حرارت رشد و تولید TNase بین °۶/۵-۱۲/۵C و حداکثر آن °۳۹/۵-۴۸/۵C گزارش گردیده است (۲۲). به طور کلی تعیین این درجه حرارتها براساس کشت خالص باکتری در برات به دست آمده است و باید به عنوان راهنما در بررسی رفتار میکروارگانیسم در غذا و در حضور سایر عوامل مؤثر بر رشد مورد استفاده قرار گیرد تا ارتباط با درجه حرارت مشخص گردد (۲۶، ۹). همچنین سویه‌های مختلف از نظر مقاومت نسبت به حرارت تفاوت قابل ملاحظه‌ای دارند. علاوه بر نوع سویه، عوامل دیگر مانند سن سلول باکتری و نیز آداپته شدن به رشد در درجه حرارت بالا در میزان مقاومت نسبت به حرارت مؤثر است (۲۶).

غلظتهای مورد استفاده نمک، اثر معنی‌داری بر رشد باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* داشت (P= ۰/۰۰۰) همچنین رشد در غلظتهای مختلف نمک (۰/۵-۴/۵-۹ درصد) اختلاف معنی‌داری با یکدیگر داشتند، که با افزایش غلظت نمک از میزان رشد کاسته می‌شد. به طور کلی مکانیسم ممانعت از رشد به وسیله Nacl به علت اثر پلاسمولتیک (Plasmolytic) آن است که از طریق کاهش a_w موجب ایجاد شوک اسموتیک (Osmotic shock) می‌گردد (۵). *استافیلوکوکوس آرئوس* یک ارگانیسم مقاوم به نمک (Halotolerant) بوده و دامنه رشد آن در محیط آزمایشگاهی از ۰ تا ۲۰ درصد نمک می‌باشد. دامنه رشد باکتری در غذا نیز مشابه شرایط فوق می‌باشد. هر چند که محدوده حداکثر غلظت که در آن رشد صورت می‌گیرد ممکن است به علت حضور عوامل ممانعت کننده دیگر پایینتر باشد (۵). دامنه قابل تحمل جهت تولید انتروتوکسین محدودتر از دامنه قابل تحمل جهت رشد باکتری می‌باشد (۱۲).

نتایج این بررسی به طور کلی با یافته محققین دیگر در مورد اثر ممانعت کننده غلظتهای مختلف نمک از رشد باکتری مطابقت دارد (۱۰، ۶، ۵). ضریب همبستگی غلظت نمک با لگاریتم درصد احتمال رشد باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* برابر (۰/۱۵۷-) می‌باشد که عدد منفی نشان دهنده همبستگی معکوس غلظت نمک و لگاریتم درصد احتمال رشد می‌باشد. بدین معنی که با افزایش غلظت نمک در محیط، رشد باکتری کاهش می‌یابد.

در آنالیز آماری مشخص گردید که pH محیط، اثر معنی‌داری بر لگاریتم درصد رشد *استافیلوکوکوس آرئوس* دارد (P= ۰/۰۰۰). رشد *استافیلوکوکوس آرئوس* در دامنه‌ای از pH بین ۹/۸ تا ۴ اتفاق می‌افتد، که اپتیمم رشد در pH برابر ۷ تا ۶ می‌باشد (۲۶، ۱۵). رشد و تولید انتروتوکسین در pHهای مختلف شدیدا تحت تأثیر سایر عوامل مانند نوع محیط، غلظت نمک، مقدار تلقیح و بخصوص اتمسفر رشد قرار می‌گیرد. در مقایسه اثر pHهای مختلف بر رشد باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* در این بررسی، مشخص گردید که تفاوت معنی‌داری بین اثر هر یک از pHهای (۷، ۶، ۵) وجود دارد، (P= ۰/۰۰۰) و ضریب همبستگی آن با رشد باکتری برابر (r = ۰/۳۰۸) می‌باشد، بدین معنی که رشد در pH=۷ بهتر از pH=۶ و در pH=۶ بهتر از pH=۵ صورت می‌گیرد، به عبارت دیگر با کاهش pH محیط از حالت خنثی میزان رشد باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* کاهش می‌یابد. نتایج بررسی محققین نشان می‌دهد که در شرایط هوازی رشد و تولید انتروتوکسین در pH=۴ نیز صورت می‌گیرد، در حالی که این محدوده در شرایط بیهوازی به pH=۴/۶ در مورد رشد و pH=۵/۳ در مورد تولید انتروتوکسین تغییر می‌یابد (۲۶، ۱۵). در تعمیم نتایج به دست آمده به شرایط کلی باید دقت نموده و تأثیر عوامل مختلف دیگر را نیز در نظر گرفت، به عنوان مثال تفاوت حساسیت نسبت به pH در بین سویه‌های مختلف وجود دارد. در این ارتباط Salamah در سال ۱۹۹۰ مشخص نمود که سویه‌های کواگولاز منفی نسبت به pH و حرارت حساستر از سویه‌های کواگولاز مثبت می‌باشند (۲۰). در تعیین حداقل pH رشد *استافیلوکوکوس آرئوس* نوع ماده اسیدی کننده از اهمیت ویژه برخوردار است. این دو عامل در فرموله کردن سیستم نگهدارنده نیز بسیار حایز اهمیت می‌باشد (۲۶، ۱۵). در این بررسی از اسید سیتریک جهت تنظیم pH استفاده گردید، این اسید به عنوان طعم دهنده به غذا اضافه می‌گردد و فعالیت ضد میکروبی اندکی دارد. این اسید همچنین موجب شیلاته شدن یونهای فلزی می‌گردد و یک عمل آنتی اکسیدانی دارد و نسبت به سایر اسیدهای آلی، مانند اسید سیتریک، اسید پروپیونیک و اسید سوربیک از قدرت ممانعت کنندگی کمتری برخوردار است. نتایج به دست آمده از این بررسی با نتایج به دست آمده از سایر تحقیقات در مورد اثر pH مطابقت داشت (۲۵، ۲۳، ۱۶، ۵، ۴، ۳، ۱).

مدت زمان نگهداری اثر معنی‌داری بر لگاریتم درصد رشد باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* داشت (P= ۰/۰۰۰) که ضریب همبستگی مدت زمان انکوباسیون با لگاریتم درصد احتمال رشد برابر ۰/۴۷۹ بود که نشان می‌دهد در دامنه درجه حرارت مورد استفاده، با افزایش دما، درصد احتمال رشد باکتری نیز افزایش می‌یابد. با استفاده از محیطهای طراحی شده شامل غلظتهای مختلف نمک، pH و درجه حرارت نگهداری، که در واقع یک سیستم چند مانعی (Multiple hurdle) را برای باکتری تشکیل می‌دهد، موجب طولانیتر

شدن فاز تأخیری و نیز کندی رشد می‌گردد (۲۶، ۱۴، ۱۰، ۵). بنابراین رسیدن به میزانی از رشد که موجب کدورت لوله حاوی محیط برات BHI گردد، طولانیتر می‌گردد.

اولین بار در سال ۱۹۷۱ Genigeorgis و همکارانش، از مفهوم احتمال شروع رشد به وسیله یک سلول باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* به عنوان متغیر وابسته تحت تأثیر عوامل درون اثر (غذا یا محیط کشت) و برون اثر (عوامل محیطی) به عنوان متغییر مستقل استفاده نمودند، و با استفاده از فرمول رگرسیون، یک مدل ریاضی ساختند که قادر بود رفتار باکتری را تحت تأثیر عوامل مختلف پیش بینی کند (۸). سپس این مطالعات بر روی سایر باکتریها شامل *لیستریا* (۱۹، ۱۸) *باسیلوس سرئوس* (۱۷) *سالمونلا* (۷) و *کلستریدیوم بوتولینوم* (۱۱، ۲) نیز انجام گردید.

در این بررسی رفتار باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* از نظر رشد تحت تأثیر برخی عوامل درون اثر و برون اثر مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از رگرسیون خطی برای آن مدلی ساخته شد که ضریب تعیین آن R^2=۰/۸۳۳ برآورد گردید. بدین معنی که ۸۳ درصد تغیرات در متغییر وابسته (درصد احتمال رشد باکتری) مربوط به متغیر مستقل طراحی شده می‌باشد و قابل پیش بینی است. با استفاده از این مدل می‌توان احتمال رشد باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* را تحت تأثیر مقادیر مختلف نمک (در دامنه ۰/۵ تا ۹ درصد)، pH محیط (در دامنه بین ۵ تا ۷) و دمای انکوباسیون (در دامنه ۱۵ تا ۳۵ درجه سانتیگراد) و تأثیر متقابل آنها را پیش بینی نمود. همچنین با استفاده از فرمول مربوطه می‌توان در شرایط مختلف حداقل تعداد باکتری مورد نیاز (CN)، جهت شروع رشد را برآورد نمود. تعیین میزان همبستگی بین شرایط به کار گرفته شده در محیط آزمایشگاهی (محیط BHI مدل در این مطالعه) و انواع غذاهای مختلف در مطالعه بعدی به وسیله همین تیم صورت خواهد گرفت.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، و نیز همکاری سرکار خانم نسرین طیار و سرکار خانم صفورا نوروزی کارشناسان آزمایشگاه کنترل بهداشتی مواد غذایی، تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1. Adams, M.R., Little, C.L., Easter, M.C. (1991): Modeling the effect of pH, acidulant and temperature on the growth rate of Yersinia enterocolitica. J. Appl. Bacteriol, 71: 66-71.
2. Backer, D.A. and Gengeorgis, C. (1990): Prediction of the safe storage of fresh fish under modified atmospheres with respect to Clostridium botulinum toxigenesis by modeling length of the lag phase of growth. J. Food. Prot, 53: 131-140.
3. Brock lehurst, T.F., Lund, B.M. (1990): The influence of pH, temperature and organic acids on the initiation of growth of Yersinia enterocolitica. J. Appl. Bacteriol, 69: 390-397.
4. Domenech, A., Hernandez, F.J., Orden, J.A., Goyache, J., Lopez, B., Suarez, G., Gomez-Lucia, E. (1992): Effect of six organic acids on staphylococcal growth and enterotoxin production. Zlebensm Unters Forch, 194: 124-128.
5. Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T. J. (1999): Food Microbiology. Fundamentals and frontiers. ASM press.Washington, D.C.
6. Eifert, J.O., Gennings, C., Carter, W.H., Duncan. S.E., Hackney, C.R. (1996): Predictive model with improved statistical analysis of interactive factors affecting the growth of *Staphylococcus aureus* 196 E, 59: 608-614.
7. Genigeorgis, C., Nychas, A. and Loullis, C. (1977): Interaction of Salmonella with food environments. In 7 th International Symposium of the World Association of Veterinary Food Hygienists, Frankfurt. PP: 269-276.
8. Genigeorgis, C., Savoukidis, M, and Martin, S. (1971): Initiation of staphylococcal growth in processed meat environment. Appl. Microbiol, 21: 940-942.
9. Hughes, A., Hurst, A. (1980): The effect of Nacl on the upper temperature limit for growth of and enterotoxin synthesis by *Staphylococcus aureus*. Can, J. Microbil. 26: 507-510.
10. Jay, J.M. (2000): Modern Food Microbiology. 6 th ed. Chapman and Hall, New York.
11. Lindroth, S. and Genigeorgis, C. (1986): Probability of growth and toxin production by non proteolytic Clostridium botulinum in rock fish stored under modified atmospheres. Int. J. Food. Microbiol. 3: 167-181.
12. Lotter, L.p., Listener, L. (1978): Minimal water activity of enterotoxin a production and growth of *Staphylococcus aureus* Appl. Environ Microbiol. 36: 377-380.
13. Marvin, L.S. (1984): Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods. APHA. Washington, D.C.
14. Mc Meekin, T. A., Brown, J.,Krist, k., Miles, D., Neumyer, K., Nichols, D.S., Olley, J., Presser, K., Ratkowsky, D.A., Ross, T., Salter, M., Sontranon, S. (1998): Quantitative Microbiology: A basis for food safety. Suggested citation (pub med).
15. Michael, P. (1989): Doyle. Food Borne Bacterial Pathogens. MAREL DERER, INC.
16. Naidu, A.S. (2000): Natural Food Antimicrobial Systems. CRC press LLC.
17. Raevuor, M., Genigeorgis, C. (1975): Effect of pH and sodium chloride on growth of Bocillus cereus in laboratory media and certain foods. Appl. Microbiol. 29: 68-73,
18. Razavilar, V., Genigeorgis, C. (1998): Prediction of Listeria spp. growth as affected by various levels of chemicals, pH, temperature and storage time in a model broth. Int. J. Food. Microbiol. 40: 149-157.
19. Razavilar, V. and Genigeorgis, C. (1993): probability of growth initiation of Listeria spp in a model broth as affected by species, pH, temperature, sodium chloride, potassium sorbate and storage time. J. Fac. Vet. Med. Tehran Uni. 47: 49-46.
20. Salamah, A.A. (1990): Effect of heat and pH stresses

on the recovery of Staphylococcus aureus on medium – 110. Microbiologica. 13:274-252.

21. Salyers, A.A., Whitt, D.D. (1994): Bacterial pathogenesis. A molecular approach. ASM Press.Washington, D.C.
22. Schmitt, M., schuler-schmid, U., Schmidt-Lorena, (1990): Limits of growth, TN ase and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* strains isolated frome foods. Int. J. Food Microbiol, 11: 1-19.
23. Smittle, R.B. (2000): Microbilogical safety of mayonnaise, salad dressings, and sauces produced in the United States: A review. J. Food prot, 63: 1144-1153.
24. Sutherland, J.P., Bayliss. A.J. and Roberts, T.A. (1994): Predictive modeling of growth of *Staphylococcus aureus*: the effect of temperature, pH and Sodium Chloride. Int. J. Food Microbiol, 21: 217-236.
25. Taniguchi, M., Nakazawa, H., Takeda, D., Kameko, T., Hoshino, K., Tanaka, T. (1999): Production of mixture of antimicrobial organic acids from lactose by co culture of Bifidobacterium longum and Propioni bacterium frecdenreichii. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 62: 1522-1527.
26. Varnam, A.H. and Evans, M.G. (1991): Foodborne Pathogens. Wolf, London.
27. Walls, I., Scott, V.N., Bernard, D.T. (1996): Validation of predictive mathematical models describing growth of *Staphylococcus aureus*. Journal of Food Protection, 59: 11-15.