مطالعه فاکتوریال مرحله رشد تأخیری (Lag Phase) استافیلوکوکوس آرئوس در سوپهای تجارتی بسته بندی شده

علی فضل آرا[1*]، ودود رضویلر[2]

۱- استادیار گروه بهداشت موادغذایی، دانشکده دامپزشکی ، دانشگاه شهیدچمران اهواز

۲- استاد گروه بهداشت موادغذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

چکیده

در طی یک مطالعه چند فاکتوری ، اثرات مقادیر مختلف pH (۵، ۴/۵، ٤)، میزان تلقیح اولیه باکتریایی (۱۰۲ و ۱۰٤)، درجه حرارت نگهداری (۵، ۱۵، ۲۵، ۳۵ و ٤۵ درجه سانتیگراد) و نیز نوع ماده غذایی از نظر وجود عوامل مغذی در آنها (سوپ قارچ و سوپ جو) بر روی مدت زمان مرحله رشد تأخیری باکتری استافیلوکوکوس آرئوس[1] در سوپهای آماده و بسته بندی شده تجاری ایران مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت. مدت زمان مرحله رشد تأخیری باکتری به طور معنی داری تحت تأثیر فاکتورهای "دما" ، "میزان تلقیح" و نیز تداخل دو فاکتوری "دما × میزان تلقیح" قرار گرفت ($P<۰/۰۵$). نوع سوپ در این مطالعه تأثیر معنی داری بر روی آن نداشت ($P=۰/۵$). بااستفاده از معادله رگرسیون خطی و ترانسفورماسیونهای مناسب ارتباط مدت زمان مرحله رشد تأخیری باکتری (به عنوان یک متغیر وابسته) با مقادیر مختلف فاکتورهای مورد نظر درمطالعه و نیز اثرات تداخلی آنها (به عنوان متغیرهای مستقل) به صورت مدل پیشگو[2] تهیه گردید. با استفاده از این مدل مدت زمان مرحله رشد تأخیری باکتری در محدوده دامنه متغیرهای به کار گرفته شده در این مطالعه با مقدار $R2=۰/۹۵۲$ قابل محاسبه و پیشگویی خواهد بود.

کلیدواژگان: استافیلوکوکوس آرئوس، مرحله رشد تأخیری[3]،فاکتورهای رشد، مدل سازی ، سوپ

۱- مقدمه

استافیلوکوکوس آرئوس انتروتوکسین زا یکی از عوامل بسیار شایع مسبب مسمومیت غذایی[4] در بسیاری از کشورها می‌باشد. این باکتری به عنوان دومین یا سومین عامل شیوع مسمومیتهای غذایی در سراسر جهان مطرح است که میزان شیوع مسمومیت حاصله از این باکتری با سایر عوامل مسمومیت زا نظیر *سالمونلاها*[5] *وکلستریدیوم پرفرینجنس*[6] در رقابت می‌باشد[۱، ۲، ۳، ٤]. علائم این مسمومیت شامل استفراغ، درد شکمی و اسهال است که معمولاً متعاقب ۲ تا ٦ ساعت بعد از مصرف غذای حاوی انتروتوکسین این باکتری رخ می‌دهند[۵، ٦]. معمولاً این مسمومیت کشنده نمی‌باشد، هر چند که موارد بسیار نادری از مرگ و میر نیز گزارش شده است[٤]. کانون و مخزن اصلی و عمده *استافیلوکوکوس آرئوس* پوست و غشاءهای مخاطی به ویژه ناحیه حلق و بینی در پرندگان و پستانداران می‌باشد. این باکتری به نحو بسیار گسترده‌ای در طبیعت پراکنده است و حتی در ۳۰ الی ۸۰ درصد

* مسؤول مکاتبات: E-mail: fazlara2000@yahoo.com

1- Staphylococcus aureus
2- Predictive model
3- Lag phase
4- Food intoxication
5- Salmonella spp
6- Clostridium perfringens

افراد سالم به عنوان فلور طبیعی بدن در نواحی فوق الذکر و نیز مو، پوست دست و صورت، گوش و نیز زیر ناخنها وجود دارد که حدود یک سوم تا دو سوم افراد مذکور، ناقل سویه‌های انتروتوکسین زای این باکتری هستند [۷، ۸، ۹]. بنابراین آماده سازی و دستکاری غیربهداشتی مواد غذایی به عنوان یک عامل بسیار مهم در اشاعه این باکتری و بروز مسمومیتهای غذایی حاصله می‌باشد و مواد غذایی نظیر فرآورده‌های نانوایی، سسها، خامه و فرآورده‌های شیر، تخم مرغ، گوشت قرمز و فرآورده‌های آن، مرغ،سالادها و سوپها از جمله مواد غذایی هستند که بارها به عنوان مسبب شیوع و بروز مسمومیت غذایی استافیلوکوکی گزارش شده‌اند. همچنین غذاهای پخته و آماده بسته بندی شده، نظیر سوپهای تجارتی با توجه به حجم بالای مصرف و نحوه بازسازی آنها در اماکن عمومی و حتی منازل از توان بسیار بالایی در بروز این مسمومیت برخوردارند.آلودگی این سوپها به هنگام‌آماده سازی، توسط افراد ناقل باکتری صورت می‌گیرد. 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 افراد جامعه و مصرف کنندگان می‌گردد [۷، ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱٤، ۱۵].

رشد و تکثیر این باکتری و نیز تولید انتروتوکسین آن توسط عوامل محیطی نظیر pH ، دما، ساختار و ترکیب غذایی تحت تأثیر قرار می‌گیرد[۱٦، ۱۷]. تحقیقات گسترده‌ای در این زمینه انجام پذیرفته و مدلهای پیشگوی متعددی از رفتار رشد گونه‌های مختلف استافیلوکوکوس در محیطهای آزمایشگاهی و نیز مواد غذایی مختلف، متأثر از درجه حرارت، pH و میزان تلقیح باکتریایی ارائه شده است [۱۸، ۱۹، ۲۰، ۲۱، ۲۲، ۲۳، ۲٤، ۲۵]. ارائه این گونه مدلهای ریاضی در سالهای اخیر که در خصوص پیشگوئی رشد و بقای باکتریها در مواد غذایی طرح شده‌اند، تشکیل دهندهٔ زمینه علمی پیش‌نیاز جهت کامپیوتری کردن بهداشت فرآوری تولید مواد غذایی هستند که مورد توجه صنایع غذایی بوده و در عین حال سبب صرفه جویی در انجام آزمایشهای میکروبیولوژیک کنترل کیفی گران قیمت نیز می‌باشد. علاوه بر آن چنین مدلهایی می‌توانند تخمین بسیار مناسب و قابل قبولی از رفتار باکتری در مواد غذایی را در اختیار ما قرار دهند [۲٦].

این مطالعه جهت ارائه مدلی برای تأثیر بعضی عوامل درون اثر (pH و نوع ماده غذایی) و بیرون اثر (میزان تلقیح اولیه، حرارت و مدت زمان نگهداری) برروی مرحله رشد تأخیری *استافیلوکوکوس آرئوس* در ..یهای تجاری آماده و بسته بندی شده جو و قارچ انجام پذیرفته است که در طی این مطالعه و بررسی از ۵ دمای نگهداری (۵، ۱۵، ۲۵، ۳۵ و ٤۵ درجه سانتیگراد)،۳ میزان pH (٤، ٤/۵ و ۵) ، ۲ میزان تلقیح باکتریایی (۱۰۲ و ۱۰٤ باکتری در هر میلی لیتر از غذا) و نیز ۲ نوع سوپ تجاری آماده و بسته بندی شده (سوپ قارچ و سوپ جو) استفاده گردید. با انجام آزمون رگرسیون خطی ، مدلی پیشگو جهت پیشگویی زمان رشد تأخیری *استافیلوکوکوس آرئوس* 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 گردید.

۲- مواد و روش کار

۲-۱- طرح آزمایش

برای ارزیابی اثرات pH ، حرارت، میزان تلقیح باکتریایی و نیز نوع سوپ به عنوان ماده مغذی برروی مدت زمان رشد تأخیری *استافیلوکوکوس آرئوس*، از روش بررسی اثرات ترکیبی چندفاکتوری که درفوق 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 شد، پس از تهیه سریال رقت ده برابر[1]، به روش کشت سطحی (SPC) [2]

1- Serial ten fold dilution
2- Surface plate count

بر روی محیط برد پارکر[1] کشت داده و در انکوباتور ۳۷ درجه به مدت ٤۸ ساعت نگهداری گردید. پس از شمارش پرگنه‌ها در پلیتها، نتایج حاصله در زمانهای مختلف ثبت گردید پس از رسیدن رشد باکتری به حداکثر و رسیدن به مرحله توقف رشد[2] (Stationary Phase)، نسبت به رسم منحنی وضعیت رشد باکتری و تعیین مرحله و مدت زمان رشد تأخیری باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* 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 شد. و منحنی وضعیت رشد باکتری بر مبنای میانگین نتایج ثبت شده در هر حالت رسم گردید.

۲-۲- باکتری مورد مطالعه

کشت لیوفیلیزه استافیلوکوکوس آرئوس به شماره ۱۸۹٦ RTCC[3] 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[4]، انتروتوکسین زا بودن آن مورد تأیید واقع شد. در ابتدا از این کشت لیوفیلیزه در محیط مایع BHI[5] در ۳۷ درجه به مدت ٤۸ ساعت ،حداقل دو مرتبه به طور متوالی کشت داده شد، سپس ازکشت دوم بر روی آگار BHI در لوله منتقل کرده، به مدت ۲٤ ساعت در ۳۷ درجه نگهداری شد. از این کشت، به عنوان کشت مورد استفاده در تحقیق استفاده گردید. این کشت، در چهاردرجه سانتیگراد نگهداری شد و به صورت ماهیانه تجدید کشت گردید.

۲-۳- تهیه میزان تلقیح باکتریایی

تهیه میزان تلقیح استافیلوکوکوس آرئوس با انتقال باکتری از لوله‌های کشت شیبدار آگار BHI به محیط مایع BHI انجام گرفت. بعد از ۲۰ ساعت در ۳۷ درجه؛ مجدداً کشت دومی از این کشت آبگوشت ۲۰ ساعت اولی بر روی محیط مایع BHI به مدت ۲۰ ساعت در دمای ۳۷ درجه داده شد (دوکشت متوالی در محیط مایع BHI ؛ در دمای ۳۷ درجه به مدت ۲۰ ساعت). سپس در لوله‌های کووت[6] استریل حاوی ۵ میلی لیتر محیط مایع BHI، ابتدا برای بار اول مقادیر مختلفی از کشت آبگوشت ۲۰ ساعته دوم را اضافه نموده، و با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (ساخت شرکت میلتون رُوی آمریکا)[7]، در طول موج ٦۰۰ نانومتر؛ جذب نوریشان خوانده شد. سپس از لوله‌های کووت اسپکت شده، جهت شمارش تعداد باکتریها استفاده گردید. تا در نهایت ، لوله کووت که دارای ٤×۱۰۸ 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 =۱ و Transmitant =۱۰٪)، به طور تقریبی مقدار ٤×۱۰۸ باکتری در هر میلی لیتر به دست آمد که بعداً با کشت بر روی آگار، شمارش باکتری مورد تأیید نهایی قرار می‌گرفت. از لوله کووت حاوی مقدارتقریبی ٤×۱۰۸ باکتری در هر میلی لیتر، رقتهای سریال ده برابر از ۱۰۸ تا ۱۰٤ باکتری در هر میلی لیتر از محیط مایع BHI تهیه شد واز رقتهای حاصل، جهت تلقیح نمودن به سوپهای مورد آزمایش به نحوی که دومقدار تلقیح آزمایش را (۱۰۲ و ۱۰٤ باکتری در هر میلی لیتر از سوپ) فراهم می‌نمود، استفاده گردید.

۲-٤- تهیه سوپها و تنظیم pHهای مورد نظر

ابتدا سوپهای بسته بندی شده و آماده قارچ و جو که به صورت تجاری تهیه و عرضه می‌شوند؛ به تعداد کافی تهیه شدند. این سوپها همگی از یک بهر تولیدی ودارای تاریخ مصرف یکسان بودند. سوپها بر اساس دستورالعمل

1- Baird Parker
2- Stationary phase
3- Razi type culture collection
4- Agar gel diffusion test
5- Brain heart infusion

6- Cuvett
7- Milton Roy Company, USA

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 بهم زدن به مدت ۲۰ دقیقه). پس از سرد کردن تا دمای محیط، با کمک آب مقطر استریل به حجم اولیه رسانیده، نسبت به اندازه گیری pH نرمال سوپها اقدام گردید که در اکثر موارد مساوی ۰/۱ ±۵ بود. همچنین بسته به حالات مورد نظر، با کمک آب لیمو(آب لیمو تهیه شده صنعتی از یک بهر تولید ودارای تاریخ مصرف یکسان) نسبت به تنظیم pH سوپها در مقادیر مورد نظر (۵، ٤/۵ و ٤) اقدام گشته، در مقادیر ۱۰۰ میلی لیتر در ظروف درپیچ دار 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 می‌گردد، اقدام گردید. و پس از سرد شدن، جهت صحت میزان سطح pH هر یک ازظروف بعد از اتوکلاو ، در ظرف شاهد اتوکلاو شده میزان pH اندازه گیری شد.

۲-۵- تلقیح باکتری به سوپها، گرمخانه گذاری و بررسی رشد تأخیری باکتری

همان گونه که قبلاً اشاره شد، به ظروف حاوی سوپ، مقدار مناسبی سوسپانسیون باکتریایی تلقیح شد؛ به طوری که میزان تلقیح ۱۰۲ و ۱۰٤ باکتری در هر میلی لیتر سوپ حاصل آمد. بعد از مخلوط کردن محتوی هر ظرف، توسط دستگاه شیکرارلن ـ بالن به مدت ۵ دقیقه، ظروف مذکور در هر یک از حرارتهای مورد نظر در این مطالعه یعنی ۵، ۱۵، ۲۵ ،۳۵ و ٤۵ درجه سانتیگراد قرار گرفت. از این کشتها در زمانهای مختلف؛ نمونه برداری و رقتهای سریال ده برابر تهیه شد و در پلیتهای حاوی محیط بردپارکر به روش سطحی جهت شمارش، کشت گردید. کشتها در حرارت ۳۷ درجه به مدت ٤۸ 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 شد. به منظور برخورداری از دقت مطلوب تر، تمامی مراحل کار با ۳ بار تکرار، مورد آزمایش قرار گرفت. در نهایت بر مبنای میانگین نتایج ثبت شده، منحنی رشد رسم شد که بدین منظور از برنامه نرم افزاری اکسل[1] 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 از۱۰زمان نمونه برداری و در مواردی تا ۳۵ زمان نمونه برداری در طول حداکثر ۵۰ روز، جهت بررسی روند رشد باکتری استفاده گردید.

۲-٦- تجزیه آماری و انتخاب مدل پیشگو

اثرات مستقل و تداخلی pH، دمای نگهداری، میزان تلقیح اولیه باکتریایی و نوع ماده غذایی بر روی مدت زمان مرحله رشد تأخیری 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 رشد تأخیری باکتری به عنوان یک متغیر وابسته متأثر از متغیرهای مستقل (pH ، دمای نگهداری ، میزان تلقیح باکتریایی و نوع ماده غذایی) مورد مطالعه، همراه با ترانسفورماسیونها ی[1] مربوطه استفاده گردید.ضریب تعیین $R2$[2] بیانگر میزان همخوانی مقادیر پیشگویی شده متغیر وابسته مورد نظر (مدت زمان مرحله رشد تأخیری) با مقادیر بدست آمده در تحقیق در محدوده مورد مطالعه تغییرات متغیرهای مستقل می‌باشد.

۳- نتایج

در شکل ۱ منحنی مربوط به رشد باکتری استافیلوکوکوس آرئوس رسم شده بر مبنای میانگین نتایج حاصله از ۳ بار

1- Microsoft Excel 2000/PC
1- Transformations
2- Coefficient of determination

تکرار مطالعه در یکی از حالات ترکیبی فاکتورهای مورد نظر (سوپ جو، دمای ۱۵ درجه سانتیگراد، pH مساوی ۵ ومیزان تلقیح اولیه باکتریایی معادل 10^2 باکتری در هر میلی لیتر سوپ) ارائه شده است. همانطور که در این منحنی ملاحظه می‌شود، مدت زمان رشد تأخیری در این حالت، حدود ۳۲۰ ساعت می‌باشد و پس از آن باکتری به مرحله رشدتصاعدی یا لگاریتمی که درواقع سریعترین حالت تکثیر است، وارد می‌گردد.

ازمجموع حالات ترکیبی فاکتورهای مورد نظر در مطالعه، صرفاً ١٦ حالت، منجر به رشد باکتری و افزایش تعداد آن تا رسیدن به حداکثر جمعیت میکربی گردید. تمامی این حالات منجر به رشد، مربوط به pH مساوی ۵ بود. در طی مطالعات انجام شده؛ در هیچکدام از حالات ترکیبی فاکتورهای مورد نظر در pH مساوی ٤/٥ و ٤، رشدی ملاحظه نگردید. درطی مدت ۵۰ روز بررسی وضعیت باکتری اولیه تلقیح شده در این حالات، ملاحظه شد 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. در واقع در تمام حالاتی که رشدی از باکتری ملاحظه نگردید و یا به عبارت دیگر بر تراکم باکتریایی افزوده نشد، شرایط حالات ترکیبی فاکتورهای موردنظر در مطالعه به نحوی بوده است که امکان فعالیت باکتری ورشد یا تکثیر آن وجود نداشته است.

در جداول ۱و۲ صرفاً نتایج مربوط به مرحله رشد تأخیری قبل از وارد شدن باکتری به مرحله رشد تصاعدی یا لگاریتمی ارائه شده است و همانطور که در فوق بیان گردید، این نتایج، صرفاً مربوط به حالات منجر به رشد باکتری مورد مطالعه (pH =۵) می‌باشد. بر اساس نتایج ثبت شده در جداول مذکور، مدت زمان مرحله رشد تأخیری باکتری، از ۲ تا ۲۸۰ ساعت در سوپ قارچ و نیز از ۲ ساعت تا ۳۲۰ ساعت در سوپ جو متفاوت بوده است.

دردمای ۱۵ درجه سانتیگراد، مرحله رشد تأخیری باکتری طولانی است. با افزایش درجه حرارت تا ٤٥ درجه سانتیگراد، از طول این زمان کاسته شده و به حداقل مقدار ممکن در طی این مطالعه رسیده است.

۳-۱- تجزیه آماری

آنالیز واریانس (ANOVA)[1] ارائه شده در جدول ۳ بیانگر تأثیر عوامل اصلی (دما، میزان تلقیح باکتریایی و نوع سوپ در pH مساوی۵) و اثر متقابل۲ آنها بر مرحله رشد تأخیری باکتری می‌باشد. مدت زمان مرحله رشد تأخیری در باکتری استافیلوکوکوس آرئوس به طور معنی داری با $P<0/05$ تحت تأثیر"دما" و "میزان تلقیح" و نیز تداخل دوفاکتوری"دما × میزان تلقیح" قرار داشت.

مدل سازی رفتار استافیلوکوکوس آرئوس مورد مطالعه (متغیر وابسته)، متأثر از متغیرهای مستقل وترانسفورماسیونهای آنها صورت گرفت. با استفاده از برنامه رگرسیون Enter (SPSS/PC)، بهترین مدل با بالاترین مقدار$R2 = 0/952$ به شرح ذیل به دست آمد:

$$\text{Lag Phase} = -٦٦٣/٠٦٤ - (٥/٢٠٦\times١٠^{-٣} \text{ Inoculum}) + ٨/٧٥٥\ \text{Temp} + (١٢١٥٩/٤٢٢ : \text{Temp}) + ١/٢٩٨\times١٠^{-٤}\ (\text{Inoculum} \times \text{Temp})$$

که در این فرمول:

Lag Phase = مدت زمان مرحله رشد تأخیری باکتری

Inoculum = میزان تلقیح اولیه باکتریایی

Temp = دما بر حسب درجه سانتیگراد

مرحله رشد تأخیری و رفتار استافیلوکوکوس آرئوس در محیطهای آزمایشگاهی و غذاهای مختلف؛ تحت یکسری از شرایط طراحی شده توسط محققین مختلف مورد ارزیابی و بررسی قرار گرفته است [۱۸، ۱۹، ۲۰، ۲۱، ۲۲، ۲۳، ۲٤، ۲۵، ۲۷، ۲۸].

1 - Analysis of Variance
2 - Interactions

در این مطالعه، یکی از ارزشهای رشدی یعنی مدت زمان رشد تأخیری باکتری که در بهداشت و صنایع غذایی برای ارزیابی بهداشتی و قابلیت نگهداری غذا دارای اهمیت فوق العاده می‌باشد، جهت بررسی اثرات دمای نگهداری، میزان تلقیح اولیه باکتریایی، pH و نوع ماده غذایی ومواد مغذی برروی استافیلوکوکوس آرئوس مورد مطالعه قرار گرفت. آنالیزهای آماری، نمایانگر اثر معنی دار"دما" ، "میزان تلقیح" و نیز تداخل دوفاکتوری "دما × میزان تلقیح" برروی مدت زمان مرحله رشد تأخیری باکتری بود. با افزایش دمای نگهداری از ۵ درجه سانتیگراد به ٤٥ درجه سانتیگراد، مدت زمان مرحله رشد تأخیری باکتری کاهش یافته و در واقع باکتری در حداقل زمان ممکن، وارد مرحله رشد تصاعدی یا لگاریتمی می‌گردد که گویای شرایط مناسب تر برای رشد باکتری و تکثیر سریع آن بوده، باکتری در این شرایط از توان بالایی جهت تکثیر و افزایش تراکم باکتریایی تا بیش از ۱۰۵ ، توکسین زایی و ایجاد مسمومیت غذایی برخوردار است. این مشاهدات مطابق با نتایج تحقیقات و گزارشهای شو- ار یانگ و همکاران بود. این محققین که چگونگی رشد استافیلوکوکوس آرئوس را در تخم مرغ آب پز شده و نیز املت در حرارتهای ۵، ۱۸، ۲۲، ۳۷، ۵۵ و ٦۰ درجه مورد بررسی قرار دادند، نتایج مشابهی با این تحقیق به دست آوردند [۲۵]. همچنین نتایج مشابهی توسط توماس و ویمپنی در خصوص چگونگی رشد استافیلوکوکوس آرئوس تحت شرایط مختلف دما و pH به دست آمده است که با کاهش دما از ۳۵ درجه سانتیگراد به سمت ۲۰ درجه سانتیگراد، ضمن افزایش مدت زمان رشد تأخیری باکتری، از سرعت رشد باکتری کاسته شده است ودر pH پایین تر از ۵، رشد باکتری متوقف گردیده است[۲۹].

همانطور که در جداول ۱و۲ نشان داده شده است، در pH مساوی ۵ و در دمای ۱۵ و ۲۵ درجه سانتیگراد، همواره مقادیر مدت زمان مرحله رشد تأخیری باکتری استافیلوکوکوس آرئوس در شرایط یکسان از نظر میزان تلقیح اولیه باکتری، در سوپ قارچ کمتر از سوپ جو بوده است. با افزایش دما به ۳۵ و ٤٥ درجه سانتیگراد، درمدت زمان مرحله رشد تأخیری بین دو نوع سوپ مورد مطالعه، تفاوتی وجود ندارد که با توجه به مقدار P[1] بدست آمده در خصوص سوپ (جدول ۳)، نشانگر عدم ارتباط معنی دار نوع سوپ با مدت زمان مرحله رشد تأخیری باکتری می‌باشد. این نتایج نیز مشابه با نتایج توماس و ویمپنی بود [۲۹]. نتیجه گیریهای مشابه توسط محققین دیگر نیز گزارش شده است [۲٦، ۲۷].

در pH مساوی ۵ و دمای ۱۵ و ۲۵ درجه سانتیگراد، ارتباط ویژه‌ای بین مدت زمان مرحله رشد تأخیری با مقدار تلقیح اولیه باکتری مشهود است. بدین نحو که در شرایط یکسان از نظر pH ، نوع سوپ و دمای نگهداری (۱۵ و ۲۵ درجه سانتیگراد)، همواره مدت زمان مرحله رشد تأخیری در میزان تلقیح اولیه معادل ۱۰۲، طولانی تر از مدت زمان مشابه در میزان تلقیح اولیه معادل ۱۰٤ بوده است. در واقع با افزایش میزان تلقیح اولیه باکتریایی، از مدت زمان مرحله رشد تأخیری کاسته شده است ولی در درجه حرارت نگهداری ۳۵ و ٤٥ درجه سانتیگراد، این ارتباط وجود ندارد. به عبارت دیگر، میزان تلقیح اولیه باکتریایی با افزایش درجه حرارت و نزدیک شدن به حرارت اپتیمم رشد باکتری، تأثیری بر روی مدت زمان مرحله رشد تأخیری ندارد و تأثیر آن صرفاً در دماهای پایین تر (۱۵ و ۲۵ درجه سانتیگراد) مشهود می‌باشد. این نتیجه با نتایج گزارش شده توسط ماگرینی و همکاران (۱۹۸۳) که بر روی وضعیت رفتاری باکتری استافیلوکوکوس آرئوس در سیستم مدل و بر روی پنیرهای عمل آمده انجام گرفته بود، مطابقت دارد [۲۲].

1- P- Value

ساترلند و همکاران (۱۹۹٤) رفتار استافیلوکوکوس آرئوس را در شرایط مختلف pH، نمک ودمای نگهداری مورد مطالعه قرار دادند و از مدل پیشگوی گمپرتز جهت تخمین رفتار باکتری (مرحله رشد تأخیری و زمان دو برابر شدن باکتری) استفاده کردند و گزارش نمودند که این چنین مدلهایی، یک رهیافت اقتصادی و مؤثری در درک و بنابراین کنترل پاسخ رشد میکروبی در مواد غذایی است [۲٤].

مقدار ضریب تعیین R2 به دست آمده در طی این مطالعه، بیانگر میزان تطابق خوب مقادیر پیشگویی شده و مشاهدات تجربی می‌باشد. با استفاده از این مدل، مدت زمان مرحله رشد تأخیری در محدوده دامنه مقادیر متغیرهای به کار گرفته شده در این مطالعه با R2=۰/۹۵۲ قابل محاسبه و پیشگویی خواهد بود.

جدول ۱ مدت زمان مرحله رشد تأخیری استافیلوکوکوس آرئوس در pH= ۵ درسوپ قارچ در مقادیر مختلف دما و میزان تلقیح اولیه باکتریایی

	دما (0c)	تلقیح اولیه باکتریایی (N/ml)	حداکثر جمعیت باکتریایی (N/ml)	مدت زمان مرحله رشد تأخیری باکتری (H)
۱	۱۵	۱۰۲	۸/۵ ×۱۰۸	۲۸۰
۲	۱۵	۱۰٤	۷/۸ ×۱۰۸	۱٦۰
۳	۲۵	۱۰۲	۳/۳۲ ×۱۰۸	۵
٤	۲۵	۱۰٤	۱/٤۷ ×۱۰۸	٤/۵
۵	۳۵	۱۰۲	٤/۹ ×۱۰۸	۲/۵
٦	۳۵	۱۰٤	۱/۹۲ ×۱۰۸	۲/۵
۷	٤۵	۱۰۲	۲/۹۲ ×۱۰۷	۲
۸	٤۵	۱۰٤	۱/٤۲ ۱۰۷	۲

جدول ۲ مدت زمان مرحله رشد تأخیری استافیلوکوکوس آرئوس در pH= ۵ در سوپ جو در مقادیر مختلف دما و میزان تلقیح اولیه باکتریایی

	دما (0c)	تلقیح اولیه باکتریایی (N/ml)	حداکثر جمعیت باکتریایی (N/ml)	مدت زمان مرحله رشد تأخیری باکتری (H)
۱	۱۵	۱۰۲	۵/۳ ×۱۰۷	۳۲۰
۲	۱۵	۱۰٤	۸/٦ ×۱۰۷	۲۰۰
۳	۲۵	۱۰۲	۱/۲۳ ×۱۰۸	۷
٤	۲۵	۱۰٤	۱/۹٦ ×۱۰۸	٦
۵	۳۵	۱۰۲	۱/۱۸ ×۱۰۸	۲/۵
٦	۳۵	۱۰٤	۳/۰۲ ×۱۰۸	۲/۵
۷	٤۵	۱۰۲	۲/۲ ×۱۰۷	۲
۸	٤۵	۱۰٤	۲/٦٦ ×۱۰۷	۲

جدول ۳ آنالیز واریانس (P-Values) مدت زمان مرحله رشد تأخیری استافیلوکوکوس آرئوس در pH=۵ متأثر از مقادیر مختلف دما، میزان تلقیح اولیه باکتریایی و نوع سوپ

متغیرها	مقادیر P
اثرات مستقل	
سوپ	۰/۵۰۳
دما	۰/۰۰٤
میزان تلقیح اولیه باکتریایی	۰/۰۱۱
اثرات تداخلی دو فاکتوری	
دما × میزان تلقیح اولیه باکتریایی	۰/۰۲۸
سوپ × دما	۰/۵۵٤
سوپ × میزان تلقیح اولیه باکتریایی	۰/۷۵۹
اثرات تداخلی سه فاکتوری	
دما × سوپ × میزان تلقیح اولیه باکتریایی	۰/۸٤۱

٤- منابع

[1] Bean, N.H., Goulding, J.S., Lao, C. and Angulo, F.J. (1996). Surveillance for foodborne disease outbreaks in the United State, 1988-1992, Morbidity and Mortality in Western Republic. 45: 1-66

[2] Bean, N.H. and Griffin, P.M. (1990). Foodborne disease outbreaks in the United State, 1973- 1987, pathogens, vehicles and trends. Journal of Food Protection. 53: 804-817

[3] Knable ,S.J. (1995). Foodborne illness, Role of home food handling practices. Food Technology. 49: 119-131

[4] Todd , E.C.D. (1983).Foodborne disease in Canada, a 5 year. summary.Journal of Food Protection. 46: 650-657

[5] Smith, J.L., Buchanam, R.L. and Palumbo, S.A. (1983).Effect of food environment on Staphylococcal enterotorin synthesis. Journal of Food Protection. 46: 545-555

[6] Tranter, H.S. (1990). Foodborne Staphylococcal illness. Lancet 336: 1044-1046

[7] Bergdoll, M.S. (1989). Foodborne bacterial pathogens. Marcel Dekker, New York, pp: 463-523

[8] Isigidi, B.K., Mathieu, A.M., Derriese, L.A., Godard, C.and Van Hoof , J. (1992).Enterotoxin production in different *Staphylococcus aureus* biotypes isolated from food and meat plants.Journal of Applied Bacteriology. 72: 16-20

[9] Wieneke, A.A., Roberts, D. and Gilbert, R.J. (1993). Staphylococcal food poisoning in the United Kingdom, 1969-1990. Epidemiology of Infecttions. 110: 519-531

[10] Adesiyun, A.A., Lenz, W. and Schaal, K.P. (1992). Phage susceptibility and entrotoxin production by *Staphylococcus aureus* strains isolated from Nigerian foods. Journal of Food Protection. 55: 871-873

[11] Bryan, F.L. (1988).Risks associated with vehicles of foodborne pathogens and toxins. Journal of Food Protection. 51: 498-508

[12] Hirooka, E.Y,De Salzber, S.P. and Bergdoll, M.S. (1987).Production of Staphylococcal entrotoxin A and thermonuclease in cream pies. Journal of Food Protection. 50: 952-955

[13] Jermini, M., Domeniconi, F. and Jaeggli, M. (1997). Food safety at home ,a hazard analysis. Journal of Food Hygiene . 88: 151-153

[14] Sinde, E., Gallardo, C.S., Andres, A., Saa, A.I. and Rodriguez, L.A. (1998).Packet soups hygiene evaluation. Alimentaria 294: 81-84

[15] Umoh, V.J., Adesiyun, A.A., and Gomwalk, N.E. (1998). Enterotoxin production by Staphylococcal isolates from Nigerian fermented milk products. Journal of Food Protection. 51,534-537

[16] Anderson, J.E., Beelman, R.B. and Doores, S. (1997). Enhanced production and thermal stability of Staphylococcal entrotoxin A in the presence of chitin. Journal of Food Protection. 60: 1351-1357

[17] Jay, J.M. (1992). Modern food microbiology. 4th Edition, Chapman and Hall, New york, PP: 465-469

[18] Baird – Parker, A.D. and Kilsby, D. (1987). Principles of predictive food microbiology. Journal of Applied Bacteriology. 63: 435-495

[19] Baranyi, J., Roberts, T.A. and McClure, P. A. (1993). Non –autonomous differential equation to model bacterial growth . Journal of Food Microbiology. 10:43-59

[20] 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. Journal of Applied Bacteriology 55: 101-110

[21] 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, Journal of Food Protection. 53: 386-390

[22] Magrini, R.C., Chirife, J. and Parada, J.L. (1983). A study of *Staphylococcus aureus* growth in model systems and processed cheese.Journal of Food Science. 48:882-885

[23] Ross,T. and McMeekin,T.A.(1991).Predictive microbiology. Food Austria.43:202-207

[24] Suthrland, J.P., Bayliss, A.J. and Roberts, T.A. (1994). Predictive modelling of growth of *Staphylococcus aureus*, the effects of temperature, pH and sodium

chloride. International Journal of Food Microbiology. 21: 217- 236

[25] Yang, Shu-Er., 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 products. International Journal of Food Microbiology. 63:99-107

[26] Dovey, K.R. (1994). Modelling the combined effects of temperature and pH on the rate coefficient for bacterial growth. International Journal of Food Microbiology. 23:295-303

[27] Dengremont, E. and Membre, J.M. (1995). Statistical approach for comparison of the growth rates of five strains of *Staphylococcus aureus*. Applied. Environmental Microbiology. 61: 4389-4395

[28] 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 Technology. 23: 20-24

[29] Thomas, L.V. and Wimpenny, J.W.T. (1996). Investigation of the effect of combined variations in temperature, pH and NaCl concentration on Nisin inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. Applied Environmental Microbiology. 62: 2006 – 2012

A Factorial Study on the Lag Phase Length of Growth of Staphylococcus Aureus in Packet Commercial Soups

Ali Fazlara[1*], Vadood Razavilar[2]

1- Assistant Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Ahvaz Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran
2- Professor, Department of Food Hygiene ,Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran, Iran

The effects of pH (4,4.5 and 5) , inoculum level (102 and 104), temperature (5,15,25,35 and 45 0C) and type of the food (barley or mushroom soup) on lag phase of growth of Staphylococcus aureus in packet commercial Iranian soups (barley and mushroom) were evaluated as a factorial design study. The lag phase of growth of this bacteria was affected significantly ($P<0.05$) by the variables of "Temperature" , "Inoculum" and 2-way interaction of "Inoculum × Temperature" but not by kind of soup used in this study. Regression equation was derived relating lag phase of growth to "Temperature", "Inoculum" and 2-way interaction of "Inoculum × Temperature". From this model the values of predicted lag phase of growth of Staphylococcus aureus can be calculated from any combination of the factors in this study
($R2 = 0.952$).

Keywords: Staphylococcus aureus, lag phase, growth factors, modelling , soup

* Corresponding author E-mail: fazlara2000@yahoo.com