مدل سازی تأثیرات مجموعه فاکتورهای حرارت، pH، سوربات پتاسیم، نمک و زمان نگهداری در احتمال رشد سالمونلا تایفی موریوم در سیستم برات

دکتر ودود رضویلر[1] دکتر افشین آخوندزاده[1]

مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۳، شماره ۳ و ۴، ۸۲ ـ ۷۷، (۱۳۷۷)

تأثیرات pH (۵، ۵/۷۵، ۶/۵ و ۷/۴)، سوربات پتاسیم (صفر، ۰/۱۵، ۰/۳۰ درصد)، نمک طعام (۰/۵، ۱/۵، ۳ درصد)، حرارت (۱۵، ۲۵ و ۳۵ درجه سانتیگراد)، زمان (تا ۴۳ روز) و میزان اینوکولوم (10^{-2} تا 10^{5}) روی لگاریتم احتمال درصد رشد یک سلول (LP%) از سلولهای اینوکوله شده سالمونلا در محیط آبگوشت (Brain heart infusion broth) با طرح ریزی فاکتوریال مورد مطالعه قرار گرفت. در شرایط مجموعه فاکتورهای صفر درصد سوربات پتاسیم، نمک برابر و یا کمتر از ۳ درصد، حرارت برابر و یا بالاتر از ۱۵ درجه سانتیگراد و pH برابر و یا بالاتر از ۵، رشد اورگانیسم تحت تأثیر قرار نگرفته و حتی ۱ تا ۷ سلول سالمونلا توانست رشد نماید (۲ تا ۱/۹ = LP%). وقتی که به مجموعه فوق مقدار ۰/۱۵ درصد سوربات پتاسیم اضافه گردید، مقادیر pH برابر و یا بالاتر از ۶/۵ تأثیری در رشد اورگانیسم نداشت ولی با کاهش مقدار pH به ۵/۷۵، تنها در شرایط حرارتی برابر یا کمتر از ۲۵ درجه رشد اورگانیسم متوقف گردید (۴/۵۱ - تا ۱/۵۱- = LP%). با کاهش pH به رقم ۵ در مجموعه فاکتورهای فوق، در شرایط حرارتی برابر یا بالاتر از ۱۵ درجه و سوربات ۰/۱۵ درصد رشد تمام سلولهای اینوکوله شده در طول ۴۳ روز نگهداری متوقف گردید (۴/۵۱- = LP%). با افزایش مقدار سوربات پتاسیم به ۰/۳ درصد، در شرایط pH برابر یا بالاتر از ۶/۵ و حرارت برابر یا بالاتر از ۱۵ درجه، رشد اورگانیسم تحت تأثیر قرار نگرفت بجز در شرایط حرارتی ۱۵ درجه و نمک ۳ درصد که رشد اورگانیسم به شدت کاهش پیدا نمود (۳/۵۱- = LP%). در حالیکه با کاهش pH به رقم ۵/۷۵ و حرارت برابر یا بالاتر از ۱۵ درجه، دامنه رشد اورگانیسم به LP% برابر با ۱/۵۱- تا ۴/۵۱- کاهش پیدا نمود. در pH برابر با ۵ و حرارت برابر یا بالاتر از ۱۵ درجه و غلظت نمک برابر یا کمتر از ۳ درصد نمک و ۰/۳ درصد سوربات پتاسیم، رشد اورگانیسم در طول ۴۳ روز به کلی متوقف گردید. به طور کلی مقدار LP% سالمونلا به طور معنی‌داری ($p<0/003$) به وسیله فاکتورهای pH، حرارت، سوربات پتاسیم و زمان نگهداری تحت تأثیر قرار گرفت ولی غلظت نمک به کار برده شده در این مطالعه تأثیر معنی‌داری در مقدار LP% اورگانیسم نداشت. با استفاده از معادله ریگرسیون مدلی تهیه گردید که در آن مقادیر LP% در مقابل اثرات سوربات، نمک، pH، حرارت و زمان نگهداری قابل محاسبه است و با استفاده از این مدل تعداد سلولهای مورد نیاز برای شروع به رشد در دامنه مقادیر فاکتورهای مطالعه شده، قابل محاسبه می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: سالمونلا، حرارت، سوربات، نمک، میکروب‌شناسی پیشگو

تنوع آلودگیهای باکتریایی در مواد غذایی بسیار وسیع بوده و از دو نظر حائز اهمیت است یکی از نظر باکتریهای عامل فساد و دیگری باکتریهای بیماریزاکه از نظر اقتصادی و بهداشتی حائز اهمیت فوق‌العاده‌ای می‌باشد. بهداشت مواد غذایی بطور سنتی در طول سالهای گذشته بیشتر بر پایه جداسازی میکربهای بیماریزای مختلف و اثرات فاکتورهای ضد میکربی آن هم بصورت منفرد روی این میکروبها محدود بوده و نهایتاً حاصل چنین تحقیقاتی به استفاده از یک سری اطلاعات ابتدایی محدود می‌شد و کاربرد مؤثری در کنترل نقاط بحرانی (Hazard analysis) آلودگیهای مواد غذایی به عوامل بیماریزا نداشت. با توسعه سیستم فراگیر کنترل بهداشتی مواد غذایی تحت عنوان (Hazard analysis and Critical Control Points) HACCP اخیراً با استفاده از مدلهای ریاضی پیشگو تحت عنوان Predictive Food Microbiology و با بهره‌گیری از تجربیات چند فاکتوری (Multiple Factorial Analysis)، نه تنها کیفیت بهداشتی مواد غذایی مورد ارزیابی وسیعی قرار می‌گیرد، بلکه با استفاده از مدلهای ریاضی مناسب تهیه شده می‌توان سرنوشت غذای مورد آزمایش را از تولید تا موقع مصرف در شرایط مختلف از نظر بهداشتی پیش بینی نمود. با توجه به تنوع فورمولاسیونهای غذایی تهیه مدلهای اختصاصی برای این فورمولاسیون‌های مختلف غیرممکن می‌باشد لذا استفاده از محیطهای کشت میکربی در این سیستم بسیار اهمیت پیدا می‌کند (۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۵، ۲۱، ۲۲، ۲۳، ۲۴).

رفتارهای مربوط به رشد چندین میکرب بیماریزای غذایی در محیطهای کشت آزمایشگاهی در حضور ترکیبات مختلفی از مواد نگهدارنده، مقادیر مختلف pH و حرارت نگهداری مورد مطالعه قرار گرفته است که از آن جمله می‌توان کلستریدیوم بوتولینوم، (۱ و ۲)، ویبریو پاراهمولیتیکوس (۳)، استافیلوکوکوس آرئوس (۴) شریشیا کولای، سالمونلا، کلستریدیوم پرفرینجنس، استرپتوکوک مدفوعی (۷ و ۸) و لیستریا مونوسایتوجنز (۱۶، ۱۷، ۱۸، ۱۹، ۲۰) را نام برد.

عفونتهای غذایی سالمونلایی پیوسته در جهان در حال افزایش است (۶ و ۷). با توجه به اینکه پیشگویی سالمونلوزیس غذایی به علت کثرت منابع آلودگی عملاً غیرممکن بوده و بایستی احتمال آلودگی مواد غذایی به این میکروب را همیشه در نظر داشت لذا مطالعه عوامل مؤثر در بقا و رشد این میکروب در مواد غذایی اهمیت خاصی پیدا میکند.

در این مطالعه رفتار سالمونلا تایفی موریوم که یکی از شایع‌ترین گونه‌های سالمونلا در بروز عفونتهای غذایی سالمونلایی محسوب می‌شود، در یک مدل برات با دامنه‌های مختلفی از مقادیر فاکتورهای pH، نمک و سوربات طراحی شده و با تلقیح تعداد مختلفی از سلولهای این میکروب در شرایط مختلفی از فاکتورهای حرارت و زمان نگهداری مورد ارزیابی قرار میگیرد که در نهایت با تهیه مدل ریاضی مناسب احتمال رشد میکروب در دامنه شرایط و فاکتورهای مورد مطالعه قابل پیشگویی و کنترل خواهد بود.

مواد و روش کار

طراحی مطالعه

جهت ارزیابی تأثیر pH، نمک (NaCl)، سوربات پتاسیم، حرارت و زمان نگهداری در احتمال رشد سلول سالمونلا تایفی موریوم تجربیات انجام شده بصورت طرح فاکتوریال درمحیط آبگوشت BHI (Brain Heart Infusion Broth) صورت گرفت. طرح بصورت ۳×۳×۴ شامل چهار مقدار pH (۵، ۵/۷۵، ۶/۵ و ۷/۴) سه مقدار نمک (۰/۵، ۱/۵ و ۳ درصد)، سه مقدار سوربات (۰/۵، ۰/۱۵ و ۰/۳ درصد)، سه مقدار حرارت (۱۵، ۲۵ و ۳۵ درجه سانتیگراد) و با

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

ردیابی احتمال رشد میکروب در BHI تا ۴۳ روز نگهداری بصورت مشاهدات تکراری (۱۸ بار) انجام گرفت.

میکرب مورد آزمایش

سالمونلا تایفی موریوم (۱۳۸ فاز تایپ ۲) که از کلکسیون میکروبی گروه میکروب‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه گردیده بود. به‌عنوان میکروب این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت. کشتهای مورد استفاده از این میکروب در محیط جامد BHI نگهداری گردید.

آماده سازی تلقیح میکروبی

تلقیح میکروبی با انتقال سلولهای میکروبی از کشت جامد BHI به محیط آبگوشت BHI تهیه گردیده و پس از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری در ۳۵ درجه سانتیگراد کشت دومی مجدداً در محیط آبگوشت BHI به مدت ۲۴ ساعت در ۳۵ درجه گرمخانه گذاری گردید. با استفاده از روش شمارش میکربی صفحه‌ای تعداد تقریبی سلولهای سالمونلا در کشت دوم مشخص گردیده و سپس در یک لوله کووت (Cuvet) حاوی ۵ میلی لیتر محیط آبگوشت BHI استریل مقدار ۰/۱ میلی لیتر از کشت دوم به آن اضافه نموده و با استفاده از اسپکتروفوتومتر (Spectronic 20, Milton Roy Co.,U SA) و تنظیم آن به OD (Opticaldensiyt) برابر با ۶۰۰ نانومتر و A (Absorbance) برابر با ۰/۳، غلظت تقریبی ۲×۱۰^{۷} سلول سالمونلا در هر میلی لیتر از لوله کووت تهیه گردید. با انجام شمارش میکربی صفحه‌ای تعداد مذکور مورد تأیید قرار گرفته و در مطالعات تلقیح میکربی مورد استفاده قرار گرفت.

تهیه سوبستراهای آبگوشت BHI

محیط آبگوشت BHI به‌عنوان سوبسترای پایه مورد استفاده قرار گرفت. پودر آبگوشت BHI (۳/۷ گرم) با استفاده از حرارت ملایم در ۹۰ میلی لیتر از آب مقطر در داخل فلاسک حل گردید. بعد از سرد شدن از نمک، سوربات پتاسیم به حدی که مقادیر طراحی شده در این مطالعه را تنظیم نماید در آبگوشت حل گردید (W/V) و سپس pH آبگوشت با استفاده از اسید کلریدریک یک نرمال در مقادیر اشاره شده تنظیم گردیده و در پایان حجم نهایی آبگوشت به ۱۰۰ میلی‌لیتر با اضافه کردن آب مقطر تنظیم گردید. اندازه‌گیری pH با استفاده از pH متر (pH meter M220, Corning, NY, USA) انجام گردید. محتویات هر کدام از فلاسکها در داخل لوله‌های آزمایش در پیچ دار به حجم ۹ میلی‌لیتر تقسیم گردیده و سپس در ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو گردید.

تلقیح میکرب و نگهداری سوبستراهای BHI

رقتهای ۱۰ برابر سریال از کشت سالمونلا (OD_{600nm}=0.30) با استفاده از ۸ لوله (۳۲×۲۰۰ mm) حاوی آبگوشت BHI با ترکیب طراحی شده از فاکتورهای pH، نمک، سوربات و حرارت تهیه گردید. محتویات هر کدام از این لوله‌ها در سه لوله استریل کوچک (۱۶×۱۰۰ mm) به مقادیر ۳ میلی‌لیتر در هر لوله و مجموعاً ۲۴ لوله (۸×۳) تقسیم گردیده و در گرمخانه‌های ۱۵، ۲۵ و ۳۵ درجه و تا مدت ۴۳ روز گرمخانه گذاری گردید. در طول این مدت تمام لوله‌ها از نظر رشد (کدورت قابل رؤیت در آبگوشت BHI) به تعداد ۱۸ بار بررسی و تعداد لوله‌های مثبت از نظر رشد در تاریخ مربوط ثبت گردید.

محاسبه میزان احتمال رشد (Probability of growth) و تعداد سلول‌های میکروبی مورد نیاز

از بین کلیه لوله‌ها (۲۴ لوله) تعدادی از لوله‌هایی که از سیستم ترکیبی pH، نمک، سوربات، حرارت از نظر رشد در زمان خاصی از بررسی مثبت بودند و با استفاده از سیستم ۸×۳ لوله MPN (Most Probable Number)، بخشی از سلولهای تلقیح شده، سالمونلا که توسط ترکیب خاصی از آبگوشت BHI در زمان خاص بررسی از رشدشان جلوگیری شده با استفاده از فرمول Log_{10} I/G تخمین زده شد. در این فرمول I عبارت از تعداد سلولهای تلقیح شده سالمونلا در لوله حاوی بالاترین غلظت سلولی و G عبارت از MPN سلولهای سالمونلا در همان لوله که از نظر رشد مثبت بوده است (۵). احتمال درصد (P%) هر سلولی از کل سلولهای تلقیح شده که در شرایط موجود آبگوشت BHI و در طول زمان خاصی شروع به رشد می‌کرد بصورت فرمول P%=100/antilog(logI-logG) تعریف می‌شد. بر پایه مقیاسهای سیستم MPN، وقتی که هیچ‌گونه رشدی در هیچ‌کدام از لوله‌ها مشاهده نمی‌گردید مقدار G در فرمول فوق با عدد ۰/۱۷ سلول مشخص می‌گردید. تعداد سلول‌های مورد نیاز CN (Cells needed) جهت رشد قابل رؤیت در آبگوشت BHI برای هر کدام از سیستمهای ترکیبی pH، نمک، سوربات، حرارت، زمان، از فرمول CN=100/P% تخمین زده شد.

تجزیه و تحلیل آماری و تهیه مدل ریاضی پیشگو

برنامه آماری ریگرسیون SPSS/PC+ (Stepwise Multiple Regression Program) جهت انتخاب مناسب‌ترین مدلها برای پیشگویی لگاریتم احتمال رشد یک سلول سالمونلا (Log p% of growth inithiation) که از این به بعد بصورت LP معرفی خواهد شد، بعنوان متغیر وابسته متأثر از متغیرهای غیروابسته (pH، نمک، سوربات، حرارت و زمان نگهداری) و ترانسفورماسیون‌های مربوطه مورد استفاده قرار گرفت. پارامتر (Coefficient of determination) R^2 جهت نشان دادن نسبت تغییرات متغیر وابسته بیان شده با تغییرات در متغیرهای غیروابسته مورد استفاده قرار گرفت. پارامترهای b (Regression Coeffcients) محاسبه شده در معادله جهت نشان دادن تغییر در LP سالمونلا روی یک واحد تغییر در متغیرهای غیروابسته مورد استفاده قرار گرفت. منابع تغییرات (متغیرهای غیروابسته) حاوی پارامترهای b با احتمال کمتر از ۵ درصد ($p<۰/۰۵$) بعنوان تغییرات معنی‌دار مورد تأیید قرار گرفت.

نتایج

احتمال رشد و تعداد سلولهای مورد نیاز میکروب

اثرات حرارت، نمک، سوربات پتاسیم، pH و زمان نگهداری برای رسیدن به حداکثر مقدار لگاریتم درصد احتمال رشد سالمونلاتایفی موریوم (LP%) و تعداد سلولهای مورد نیاز میکروب (CN)، که حاصل انتخاب ۱۰۸ مورد از ۱۹۴۴ مورد مطالعه شده است در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود در شرایط بدون استفاده از ماده شیمیایی نگهدارنده (سوربات پتاسیم) با مقادیر نمک تا ۳ درصد و حرارت نگهداری ۱۵ تا ۳۵ درجه سانتیگراد و pH ۵ تا ۷/۴ رشد میکرب حتی با تعداد قلیل ۱ تا ۷ سلول در هر میلی‌لیتر از آبگوشت BHI توانست بدون مشکل رشد نماید طوری که لگاریتم درصد احتمال رشد یک سلول سالمونلا (LP%) برابر با ۱/۹ تا ۲ محاسبه گردید. زمانی که به مجموعه فاکتورهای فوق مقدار ۰/۱۵ درصد سوربات پتاسیم اضافه گردید، شرایط pH برابر یا بالاتر از ۶/۵، حرارت ۱۵ تا ۳۵ درجه و نمک تا ۳ درصد تأثیری در رشد میکروب نداشت ولی وقتی مقدار ۰/۱۵ درصد رسوبات همراه با pH ۵/۷۵ مورد استفاده قرار گرفت تنها در حرارت برابر یا کمتر از ۲۵ درجه رشد میکروب کاهش پیدا نموده و یا متوقف گردید (LP% = -۱/۵۱ تا -۴/۵۱) و تعداد سلولهای مورد نیاز (CN) بین $۳/۲\times۱۰^{۳}$ تا $۳/۲\times۱۰^{۶}$< باکتری در هر میلی‌لیتر آبگوشت BHI برآورد گردید. با کاهش مقدار pH به ۵ در این شرایط از مقدار سوربات، حتی در حرارت نگهداری ۲۵ تا ۳۵ درجه رشد کلیه سلولهای میکربی اینوکوله شده در طول ۴۳ روز نگهداری متوقف گردید (LP%=-۴/۵۱).

با افزایش مقدار سوربات پتاسیم به ۰/۳ درصد در شرایط pH برابر یا بالاتر از

۶/۵ و حرارت بین ۱۵ تا ۳۵ درجه اثر جلوگیری کننده قابل توجهی مشاهده نگردید به جز ۱۵ درجه با مقدار نمک ۳ درصد که کاهش شدیدی در رشد میکرب صورت گرفت و مقدار LP% به ۳/۵۱- کاهش و تعداد سلولهای مورد نیاز به $۳/۲\times۱۰^{۵}$ در میلی لیتر افزایش پیدا نمود. در حالی که کاهش مقدار pH به ۵/۷۵ و ۵ با همین مقدار سوربات توانست در حرارت ۱۵ تا ۳۵ درجه و نمک تا ۳ درصد رشد اورگانیسم را در طول ۴۳ روز نگهداری به شدت کاهش و یا کاملاً متوقف نماید.

بطور کلی مقدار LP% سالمونلا بطور معنی داری بوسیله pH، حرارت، سوربات پتاسیم و زمان نگهداری تحت تأثیر قرار گرفت ($p<۰/۰۰۳$) ولی غلظت نمک بکار برده شده در این مطالعه (۰/۵ تا ۳ درصد) تأثیر معنی‌داری در مقدار LP% سالمونلا نداشت ($p>۰/۰۵$).

تجزیه و تحلیل آماری و تهیه مدل پیشگو

با استفاده از مدل ریگرسیون چند فاکتوری و تجزیه و تحلیل مرحله‌ای و تبدیلات مختلف ریاضی بهترین مدل پیشگو با R^2 برابر با ۰/۷۳ به شرح ذیل تهیه گردید.

جدول ۱ ـ مقادیر لگاریتم احتمال رشد (LP%) یک سلول سالمونلاتایفی موریوم و سلول‌های مورد نیاز (CN) برای رشد در محیط آبگوشت BHI در زمان (روز) رسیدن به حداکثر مقدار LP% متأثر از فاکتورهای pH، حرارت نمک، سوربات پتاسیم (۱۰۸ مورد از ۱۹۴۴ مورد مطالعه شده)

				PH ۷/۴			PH ۶/۵			PH ۵/۷۵			PH ۵		
حرارت(°C)	نمک(٪)	سوربات (٪)	روز	LP%	CN	روز	LP%	CN	روز	LP%	CN	روز	LP%	CN
۳۵	۰/۵	۰	۱	۲	۱	۱	۱/۸۴	۱/۵	۱	۲	۱	۲	۱/۸۴	۱/۵
	۱/۵	۰	۱	۲	۱	۱	۲	۱	۱	۱/۸۴	۱/۵	۲	۲	۱
	۳	۰	۱	۱/۷۳	۱/۹	۱	۲	۱	۱	۱/۸۴	۱/۵	۱	۲	۱
	۰/۵	۰/۱۵	۱	۲	۱	۱	۲	۱	۳	۱/۸۴	۱/۵	>۴۳	-۴/۵۱	$>۳/۲\times۱۰^{۶}$
	۱/۵	۰/۱۵	۱	۱/۸۴	۱/۵	۲	۲	۱	۱۶	۱/۴۹	۳/۲	>۴۳	-۴/۵۱	$>۳/۲\times۱۰^{۶}$
	۳	۰/۱۵	۱	۲	۱	۲	۲	۱	۴	۱/۸۴	۱/۵	>۴۳	-۴/۵۱	$>۳/۲\times۱۰^{۶}$
	۰/۵	۰/۳	۲	۲	۱	۲	۲	۱	۱۶	-۱/۵۱	$۳/۲\times۱۰^{۳}$	>۴۳	-۴/۵۱	$>۳/۲\times۱۰^{۶}$
	۱/۵	۰/۳	۴	۲	۱	۲	۲	۱	۲۸	-۲/۵۱	$۳/۲\times۱۰^{۴}$	>۴۳	-۴/۵۱	$>۳/۲\times۱۰^{۶}$
	۳	۰/۳	۲	۲	۱	۲	۴	۱	۲۸	-۳/۵۱	$۳/۲\times۱۰^{۵}$	>۴۳	-۴/۵۱	$>۳/۲\times۱۰^{۶}$
۲۵	۰/۵	۰	۲	۲	۱	۲	۱/۸۴	۱/۵	۲	۲	۱	۲	۲	۱
	۱/۵	۰	۲	۲	۱	۲	۲	۱	۳	۱/۸۴	۱/۵	۳	۲	۱
	۳	۰	۲	۱/۷۳	۱/۹	۳	۲	۱	۳	۱/۸۴	۱/۵	۳	۲	۱
	۰/۵	۰/۱۵	۲	۱/۷۳	۱/۹	۲	۲	۱	۲	۲	۱	>۴۳	-۴/۵۱	$>۳/۲\times۱۰^{۶}$
	۱/۵	۰/۱۵	۳	۱/۸۴	۱/۵	۴	۲	۱	۲۸	۲	۱	>۴۳	-۴/۵۱	$>۳/۲\times۱۰^{۶}$
	۳	۰/۱۵	۲	۲	۱	۴	۱/۴۹	۳/۲	>۴۳	-۴/۵۱	$۳/۲\times۱۰^{۶}$	>۴۳	-۴/۵۱	$>۳/۲\times۱۰^{۶}$
	۰/۵	۰/۳	۳	۲	۱	۵	۲	۱	>۴۳	-۴/۵۱	$>۳/۲\times۱۰^{۶}$	>۴۳	-۴/۵۱	$>۳/۲\times۱۰^{۶}$
	۱/۵	۰/۳	۴	۱/۸۴	۱/۵	۴	۲	۱	>۴۳	-۴/۵۱	$>۳/۲\times۱۰^{۶}$	>۴۳	-۴/۵۱	$>۳/۲\times۱۰^{۶}$
	۳	۰/۳	۵	۱/۸۴	۱/۵	۲۲	۱/۴۹	۳/۲	>۴۳	-۴/۵۱	$>۳/۲\times۱۰^{۶}$	>۴۳	-۴/۵۱	$>۳/۲\times۱۰^{۶}$
۱۵	۰/۵	۰	۴	۲	۱	۴	۱/۸۴	۱/۵	۴	۲	۱	۵	۱/۴۹	۳/۲
	۱/۵	۰	۴	۲	۱	۴	۲	۱	۴	۱/۸۴	۱/۵	۷	۱/۸۴	۱/۵
	۳	۰	۵	۲	۱	۵	۲	۱	۵	۱/۴۹	۳/۲	۱۳	۱/۱۹	۶/۵
	۰/۵	۰/۱۵	۴	۲	۱	۵	۲	۱	۲۲	-۰/۵۱	$۳/۲\times۱۰^{۲}$	>۴۳	-۴/۵۱	$>۳/۲\times۱۰^{۶}$
	۱/۵	۰/۱۵	۵	۲	۱	۱۰	۲	۱	>۴۳	-۴/۵۱	$۳/۲\times۱۰^{۶}$	>۴۳	-۴/۵۱	$>۳/۲\times۱۰^{۶}$
	۳	۰/۱۵	۵	۱/۸۴	۱/۵	۱۰	۲	۱	>۴۳	-۴/۵۱	$۳/۲\times۱۰^{۶}$	>۴۳	-۴/۵۱	$>۳/۲\times۱۰^{۶}$
	۰/۵	۰/۳	۱۰	۲	۱	۱۳	۲	۱	>۴۳	-۴/۵۱	$>۳/۲\times۱۰^{۶}$	>۴۳	-۴/۵۱	$>۳/۲\times۱۰^{۶}$
	۱/۵	۰/۳	۱۰	۱/۸۴	۱/۵	۱۳	۲	۱	>۴۳	-۴/۵۱	$>۳/۲\times۱۰^{۶}$	>۴۳	-۴/۵۱	$>۳/۲\times۱۰^{۶}$
	۳	۰/۳	۱۳	۱/۸۴	۱/۵	۱۹	-۳/۵۱	$۳/۲\times۱۰^{۵}$	>۴۳	-۴/۵۱	$>۳/۲\times۱۰^{۶}$	>۴۳	-۴/۵۱	$>۳/۲\times۱۰^{۶}$

$$LP\% = -۴۲/۳۶۵۱ + ۰/۰۰۵۵\, PH^{۲} \sqrt{D} = -۲۵/۴۶۸۸ \sqrt{KS} + ۰/۴۶۴۳\, PH^{۲} \times \sqrt{KS} + ۰/۱۷۸۴T \times \sqrt{KS} + ۰/۰۰۸۶T \times NaCl^{۲} - ۰/۲۵۹۰D + ۲/۵۲۸۰ \sqrt{D} - ۰/۳۲۸۳NaCl^{۲} - ۰/۱۷۱۰\, NaCl^{۲} \times \sqrt{KS} - ۰/۰۱۶۳T \times \sqrt{D} + ۰/۱۵۵۰T - ۰/۰۰۲۲T \times pH^{۲} + ۱۱/۸۶۹۰\, pH - ۰/۹۰۳۲\, pH^{۲} - ۵/۴۵۹۰KS + ۰/۰۱۶۵ \sqrt{D} \times NaCl^{۲}$$

با استفاده از مدل فوق رفتار و سرنوشت سالمونلاتایفی موریوم در شرایط مختلفی از مقادیر pH، نمک (NaCl)، حرارت نگهداری (T)، سوربات پتاسیم (KS) و زمان نگهداری (D) قابل پیشگویی است. جدول ۲ مقایسه مقادیر LP% مطالعه شده و پیش بینی شده از مدل را در pH برابر ۵/۷۵ پس از ده روز نگهداری در شرایط مختلف نشان می‌دهد.

بحث

در حال حاضر روشهایی که بتوان آلودگیهای احتمالی فرآورده‌های غذایی را با بسیاری از میکروبهای بیماریزای غذایی خصوصاً سالمونلا جلوگیری نمود شناخته نشده است. لذا تولیدکنندگان مواد غذایی بایستی همیشه تصور وجود چنین میکروبهایی را در فرآورده‌های غذایی تولید خودشان داشته باشند و معیارهایی که باعث مرگ و یا جلوگیری از رشد این میکروب باشند بکار گیرند. به همین دلیل محققین مختلف رفتارهای مربوط به رشد میکروبهای مختلف بیماریزای غذایی را در شرایط مختلفی از تأثیر فاکتورهای دورن اثر و برون اثر، مانند حرارت، pH، مواد نگهدارنده، طول مدت نگهداری و غیره مورد مطالعه قرار داده و با استفاده از مدلهای ریاضی رفتار این میکروبها را در دامنه شرایط مطالعه شده پیشگویی کرده و اقدامات لازم را جهت کنترل بهداشتی بکار می‌گیرند.

جدول ۲ ـ مقایسه مقادیر لگاریتم رشد یک سلول سالمونلاتایفی موریوم (LP%) به فورم مطالعه شده در آزمایش و پیش‌بینی شده از مدل در محیط آبگوشت BHI با pH برابر ۵/۷۵ و مقادیر مختلفی از فاکتورهای حرارت، نمک، سوربات پتاسیم پس از ۱۰ روز نگهداری

حرارت (°C)	نمک (٪)	سوربات پتاسیم (٪)	LP (٪) مطالعه شده	LP (٪) پیش‌بینی شده
۳۵	۰/۵	۰	۲	۲
	۱/۵	۰	۱/۸۴	۲
	۳	۰	۱/۸۴	۲
	۰/۵	۰/۱۵	۱/۸۴	۰/۷۲
	۱/۵	۰/۱۵	۱/۴۹	۰/۶۴
	۳	۰/۱۵	۰/۱۹	۰/۳۷
	۰/۵	۰/۳	-۲/۵۱	-۰/۷۳
	۱/۵	۰/۳	-۱/۱۷	-۰/۸۷
	۳	۰/۳	-۳/۲۰	-۱/۳۲
۲۵	۰/۵	۰	۲	۲
	۱/۵	۰	۱/۸۴	۲
	۳	۰	۱/۸۴	۲
	۰/۵	۰/۱۵	۲	-۰/۲۹
	۱/۵	۰/۱۵	۱/۸۴	-۰/۵۵
	۳	۰/۱۵	-۴/۵۱	-۱/۴۰
	۰/۵	۰/۳	-۴/۵۱	-۲/۰۳
	۱/۵	۰/۳	-۴/۵۱	-۲/۳۴
	۳	۰/۳	-۴/۵۱	-۳/۳۷
۱۵	۰/۵	۰	۲	۲
	۱/۵	۰	۱/۸۴	۲
	۳	۰	۱/۴۹	۱/۱۳
	۰/۵	۰/۱۵	-۲/۵۱	-۱/۳۰
	۱/۵	۰/۱۵	-۴/۵۱	-۱/۷۳
	۳	۰/۱۵	-۴/۱۵	-۳/۱۷
	۰/۵	۰/۳	-۴/۵۱	-۳/۳۲
	۱/۵	۰/۳	-۴/۵۱	-۳/۷۷
	۳	۰/۳	-۴/۵۱	-۳/۸۵

گیبسون (Gibson) و همکاران (۱۹۸۸) رشد مخلوط سه گونه سالمونلا را (سالمونلا تامپسون، سالمونلا استانلی و سالمونلا اینفانتیس) تحت تأثیر فاکتورهای نمک، pH و حرارت به میزانهای مختلف در محیط آبگوشت تریپتون سویا مورد ارزیابی قرار داد. مقادیر نمک در این تجربه ۰/۵ تا ۴/۵ درصد، pH ۵/۶ تا ۶/۸ و حرارت ۱۰ تا ۳۰ درجه سانتیگراد تنظیم گردیده بود. مدل سازی آنها بر پایه استفاده از منحنی‌های زیگموئیدال گومپرتز (Gompertz) انجام پذیرفت و پارامترهای بدست آمده از این منحنی‌ها جهت تهیه یک مدل پولی نومیال (Polynomial model) مورد استفاده قرار گرفت که با استفاده از این مدل پیشگویی رشد سالمونلا در دامنه مطالعات انجام گرفته امکان‌پذیر گردید. از منحنی‌های رشد بدست آمده پارامترهای ضریب رشد (Growth rate)، زمان دو برابر شدن (Generation time)، رشد تأخیری (Lag phase) و سایر ارزشها مانند زمان رسیدن به ۱۰۰۰ برابر افزایش در تعداد میکروب تعیین گردید. آنها گزارش کردند که استفاده از چنین مدلهایی از نظر درک پاسخهای رشد میکروبی در مواد غذایی می‌تواند فوق العاده با ارزش و مقرون به صرفه باشد (۹). گزارشهای مشابهی نیز توسط محققین دیگر و لزوم ایجاد یک بانک اطلاعاتی (Data bank) جهت ثبت داده‌های بدست آمده از چنین تجربیاتی توسط محققین مختلفی که در زمینه مدل سازی مطالعه می‌کنند پیشنهاد گردیده است (۱۴، ۲۳ و ۲۴).

پارامتری از رشد میکروبی که در این تجربه جهت مدل سازی محاسبه گردید پارامتر لگاریتم احتمال درصد رشد یک سلول میکروبی (سالمونلا تایفی موریوم) از کل سلولهای اینوکوله شده (LP%) در محیط آبگوشت BHI بود که تحت‌تأثیر فاکتورهای نمک، pH، حرارت، سوربات پتاسیم، زمان نگهداری و میزان اینوکولوم قرار گرفت که بخشی از نتایج حاصله در جداول ۱ و ۲ آمده است. همانطور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود کاهش مقدار pH از ۶/۵ به ۵/۷ و ۵ همراه با افزایش مقدار سوربات از ۰/۱۵ به ۰/۳ درصد توانست بطور مؤثری رشد میکروب را کند و یا کاملاً متوقف نماید. تعداد سلول مورد نیاز که میزان آلودگی اولیه را منعکس می‌کند (CN) از فرمول CN=۱۰۰/P% قابل محاسبه است که در آن P% درصد احتمال رشد یک سلول سالمونلا در شرایط بکار برده شده در این تجربه می‌باشد. همچنین با کاهش درجه حرارت نگهداری نیز اثر ضدمیکروبی کاهش pH و افزایش سوربات تقویت گردید و افزایش مدت نگهداری در شرایط سخت رشد باعث افزایش احتمال رشد میکروبی (LP) گردید. برای یک تولید کننده مواد غذایی با توجه به امکان آلودگی غذای تولید شده به میکروب‌های بیماریزای غذایی از جمله سالمونلا بسیار با اهمیت خواهد بود اگر بتوان سرنوشت میکروب در یک محیط غذایی با شرایط مختلف از نظر ترکیب، میزان آلودگی و شرایط نگهداری و غیره مورد پیش بینی قرار گیرد. جدول شماره ۲، با استفاده از مدل بدست آمده مقادیر LP% پیش‌بینی شده را پس از ۱۰ روز نگهداری آبگوشت اینوکوله شده در حرارت‌های ۳۵، ۲۵ و ۱۵ درجه، مقادیر نمک ۰/۵، ۱/۵ و ۳ درصد و مقادیر سوربات صفر و ۰/۱۵ و ۰/۳ درصد در pH برابر با ۵/۷۵ نشان داده و مقادیر آن را با مقادیر LP% آزمایش شده مقایسه می‌نماید. لازم به ذکر است که محاسبه مقادیر پیش‌بینی شده در دامنه بین تمام مقادیر مورد مطالعه از فاکتورهای نمک، pH، حرارت، سوربات، زمان نگهداری با استفاده از مدل بدست آمده امکان‌پذیر می‌باشد. همان‌طور که ملاحظه می‌شود با توجه به مقدار R^2 مدل که برابر با ۰/۷۳ می‌باشد هماهنگی نسبتاً خوبی بین مقادیر LP% آزمایش شده و پیش‌بینی شده از مدل وجود دارد. به‌نظر می‌رسد چنانچه مقادیر نمک مورد استفاده (۰/۵ تا ۳ درصد) در این آزمایش به‌طور معنی‌داری در رشد میکروبی مؤثر بود مقدار R^2 بیشتر و هماهنگی بین مقادیر LP% آزمایش شده و پیش‌بینی شده، احتمالاً بیشتر می‌شد.

با توجه به فورمولاسیون بسیار متنوع مواد غذایی که در آن تهیه مدلهای اختصاصی برای این فورمولاسیون غیرممکن است، استفاده از این‌گونه تجربیات که در آن خصوصیات مواد غذایی خاصی در محیط‌های کشت میکروبی طرح ریزی می‌شود بسیار باارزش خواهد بود و همان‌طور که توسط کیبسون و همکاران و سایر محققین گزارش گردیده است. استفاده از چنین تجربیاتی می‌تواند از نظر تعیین رفتار میکروبهای بیماریزای غذایی در شرایط موردنظر فوق‌العاده با ارزش و در عین حال مقرون به صرفه باشد. توسعه مدلهای رشد میکروبی در شرایط طبیعی و غیرطبیعی که مواد غذایی را تحت تأثیر قرار می‌دهد می‌تواند وسیله‌ای پرقدرت در دست میکروبیولوژیستهای مواد غذایی باشد که آنها را جهت پیش‌بینی دقیق کیفیت و سلامتی مواد غذایی یاری می‌دهد. با کاربرد چنین تجربیاتی به‌طور اختصاصی در مورد مواد غذایی مختلف و تهیه مدلهای ریاضی مناسب میکروب‌شناسان مواد غذایی می‌توانند تجربیات و تخصص خودشان را به‌طور مؤثر حتی در خارج از آزمایشگاه در مورد اوضاع حاکم بر مواد غذایی به نفع مصرف کننده از یک طرف و تولید کننده از طرف دیگر بکار گرفته و مورد پیش بینی قرار داده و اقدامات مؤثر کنترل را انجام دهند.

References

1. Babaker, D.A., Genigeorgis, C., Glover, J. and Razavilar, V. 1990: Growth and toxigenesis of C. botulinum type E in fishes packaged under modified atmosphers. Int. J. Food Microbiol. 10: 269-290.
2. Baird Parker, A.C. and Freame, B. 1967: Comined effect of water activity, pH and temperature on the growth of C. botulinum from spore and vegetative cell inocula. J. Appl. Bacteriol. 30:420-429.
3. Beuchat, L.R. 1973: Interacting effects of pH, temperature and salt concentration on growth and survival of V. parahaemolyticus. Appl. Microbiol. 25: 844-846.
4. Bean, P. and Roberts,T.A. 1974: The effect of pH, Nacl and sodium nitrite on heat resistance of S. aureus and growth of damaged cells in laboratory media. Proc. 4th Int. Congress of Food Science and Technology PP:93-104.
5. Fisher, R.A. and Yates, F. 1975: Statistical tables for Biological, Agricultural and Medical Research, 5th. ed. Oliver Boyd, London.
6. Gerock, K. 1992: WHO surveillance programme for control of foodbone infections and intoxications in Europe. Proc. 3rd. world Congress Foodborne Infections and Intoxications, Berlin.
7. Gibsin, A.M. and Roberts. T.A. 1996a: The effect of pH, water activity, sodium nitrite and storage temperature on the growth of E. coli and Salmonella in a laboratory media. Int. J.Food Microbiol. 3: 183-194.
8. Gibson, A.M. and Roberts, T.A. 1986b: The effect of pH, sodium chloride, sodium nitrite and storage temperature on the growth of C. perfrirgens and faecal streptococci in laboratory media. Int. J. Food Microbiol. 3: 195-210.
9. Gibson, A.M., Bratchll, N. and Roberts, T.A. 1988: Predicting microbial growth: Growth responses of

Salmonellae in a laboratory medium as affected by pH, sodium chloride and storage temperature. Int. J. of Food Microbiol. 6: 155-178.

10. Golden, D.A., Jeffery Rhodehamel, E. and Kauttetr, D.A. 1993: Growth of Salmonella spp. in contaloupe, watermelon, and honeydew melons. J. Food Prot. 56: 194-196.

11. Hudson, J.A. 1993: Construction and comparison of response surface kinnetic models for the Y. enterocoitica and a food isolate under aerobic conditions. Int. J. of Food Microbiol. 18:201-209.

12. Huss, H.H. 1992: Development and use of the HACCP concept in fish processing, Int. J. of food Mictrobiol. 15: 33-44.

13. JAY, J.M. 1996: Modern Food Microbiology. AVI, USA.

14. McMeekin, T.A. and Olley, T. 1986: Predictive microbiology. Food Technology in Australia. 38:331-334.

15. McMeekin, T.A., Ross, T. and Olley, J. 1992: Application of predictive microbiology to assure the quality and safety of fish and products. Int. J. of Food. Microbiol 15: 13-32.

16. Razavilar, V. and Genigeorgis, C. 1992: Probability of growth of Listeria spp. as affected by species, pH, acids temperature and storage time in a model broth. Proc. 3rd World Congress Foodborne Infections and Intoxications, Berlin.

17. Razavilar, V. and Genigeorgis, C. 1992: Interactive effect of temperature, atmosphere and storage time on the probability of colony formation on blood agar by four Listeria species. J. of Food Prot. 55:88-92.

18. Razavilar, V. and Genigeorgis, C.1993: Probablity of growth initiation of L. monocytogenes in a model as affected by temperature, storage time, inoculum and pH using various levels of glucono delta lactone. Proc. 11th. Inter. Symp. WAVFH, Thailand. pp: 249-253.

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 storagetime. J. of the Faculty of Vet. Med. Univ. of Tehran. 47:49-76.

20. Razavilar, V. and 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. of Food Microbiol. (accepted for publication).

21. Snedecor, G.W. and Cochran, W.G. 1979: Statistical Methods. The Iowa State Univ. Press., USA.

22. Synder, O.P. 1991: HACCP in the retoil food industry. Dairy Food and Environ. Sanitation. 11:73-81.

23. Varnam, A.H. and Evans, M.G.1991: Foodborne pathogenes: wolfe Science Book. The Netherland.

24. Zwietering, M.H., Jongenbutrger, I., Rombouts, F.M. and RIET, K.1990: Modeling of the bacterial growth curve. Appl. and Environ. Microbiol. 56: 1875-1881.

Model for a combined effects of temperature, pH, K-sorbate, salt and storage time on probability of growth initation of Salmonella typhimurium in broth

Razavilar, V[1] and Akhoondzadeh, A[1].

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

The effects of pH (5, 5.75, 6.5, 7.4), K-sorbate (KS, 0.0, 0.15, 0.3%), NaCl (0.5, 1.5, 3.0%), temperature (T, 15, 25, 35°C), time (D, up to 43 days) and inoculum (10^{-2}-10^{5}) on the log probability percentage (LP%) of one cell of S. typhimurium to initiate growth in brain heart infusion broth were evaluated in a factorial design study. At 0% KS with $\leq$ 3% NaCl, pH level $\geq$ 5 and T of $\geq$ 15°C did not affect the growth of organism and 1-7 cells of Salmonella inoculum could initiate growth in 1-13d (LP% 1.9 to 2). When 0.15% KS was added to the combination, pH levels of $\geq$ 6.5 also did not affect the growth of organism, but reduction of pH value to 5.75, only at T $\leq$ 25°C the growth of organism was inhibited (LP% -1.15 to -4.15). At pH level of 5.0 with combination of T $\geq$ 15°C and 0.15% KS, the growth of the all of inoculated cells were innibited after 43d (LP% -4.51). When the concentration of KS was increased to 0.3%, pH levels of $\geq$ 6.5 and T of $\geq$ 15°C, could not affect the growth of the organism except for 3% NaCl at 15°C, which the growth was strongly diminished (LP% - 3.51). Whereas by reduction of pH to 5.75 at T levels of $\geq$ 15°C, the range of LP% reached to -1.51 to -4.51 (strong inhibitory action). At pH level of 5.0 and T of $\geq$ 15°C with concentration of $\leq$ 3% NaCl and 0.3% KS, the growth of the organism was completely inhibited after 43d. Overall the LP% of Salmonella was affected significantly ($P<0.003$) by pH, T, KS and D but not by NaCl concentration used in this study. Regression equation was derived relating LP% to KS, NaCl, pH, T and D. From the equation the number of cells needed to initiate growth can be calculated.

Key words: salmonella grouth, Predictive Food Microbiology