مطالعه رشد فاکتوریال هاگهای کلستریدیوم پرفرینجنس تیپ A با استفاده از مجموعه عوامل رشد حرارت، غلظت نمک، pH، نوع اسید و زمان نگهداری

دکتر ودود رضویلر[۱] دکتر شهرام شکرفروش[۲]

مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۴، شماره ۳ ، ۷۷ ـ ۷۱، (۱۳۷۸)

ارزیابی چالش کلستریدیوم پرفرینجنس تیپ A که یکی از عوامل مهم مسمومیتهای غذایی در سطح جهان می‌باشد، تحت تأثیر عوامل مختلف، هدف این مطالعه بوده و طی آن تأثیر عوامل حرارت (۴۲، ۳۵، ۲۵ و ۱۵ درجه)، غلظت نمک (۴، ۲ و ۰/۲۵ درصد)، pH (۷/۲، ۶/۵، ۵/۹ و ۵/۳)، اسید مورد استفاده (اسید کلریدریک و اسید استیک) و زمان نگهداری (تا ۴۴ روز) با تلقیح 10^{4} تا 10^{-2} هاگ باکتری، در محیط مدل برای BHI در شرایط هوازی مورد بررسی قرار گرفت. معیار سنجش رشد باکتری در این مطالعه احتمال جرمینه شدن یک هاگ باکتری (Log p%) در محیط مدل BHI بود. Log P% باکتری به طور معنی‌داری تحت تأثیر حرارت، غلظت نمک، pH، نوع اسید و زمان نگهداری قرار گرفت. همچنین تأثیر متقابل غلظت نمک با pH، حرارت با pH، غلظت با حرارت و غلظت نمک با زمان نگهداری، در رشد باکتری معنی‌دار بود (p <۰/۰۲ >۰/۰۰۰۱). با افزایش حرارت، زمان نگهداری و pH محیط احتمال جرمینه شدن و رشد باکتری افزایش یافته و با افزایش غلظت نمک، احتمال جرمینه شدن و رشد باکتری کاهش پیدا نمود (p < ۰/۰۰۱). در pH برابر، استفاده از اسید استیک بیش از اسید کلریدریک احتمال جرمینه شدن و رشد باکتری را کاهش داد. عامل حرارت بیشترین و زمان نگهداری کمترین تأثیر را در مهار رشد باکتری نشان داد و به دنبال آن، pH و غلظت نمک مورد استفاده در این مطالعه به ترتیب در درجه بعدی اهمیت قرار گرفتند. نتایج مطالعه نشان داد که رشد باکتری در شرایط مطلوب بسیار سریع بوده و در زمان کوتاه به حداکثر رشد خود می‌رسد در حالی که در شرایط نسبتاً نامطلوب رشد باکتری به طور کامل متوقف می‌شود و بر عکس بسیاری از باکتریها، رشد آهسته در شرایط نامطلوب مشاهده نمی‌شود. بنابراین با استفاده مناسب از عوامل رشد، می‌توان از جرمینه شدن و رشد آن در مواد غذایی به طور مؤثر جلوگیری نمود که شرح آن در بحث آمده است. ضمناً ممکن است تکرار این تجربه که در شرایط هوازی (اتمسفر معمول در نگهداری مواد غذایی) انجام گرفت، در شرایط بی‌هوازی نتایج متفاوتی داشته باشد و رشد میکروب با ممانعت کمتری از شرایط عوامل نامطلوب صورت پذیرد. مدل ریگرسیون که در آن log% رشد کلستریدیوم پرفرینجنس در مقابل عوامل حرارت، غلظت نمک، pH، نوع اسید و زمان نگهداری مورد ارزیابی ریاضی قرار می‌گیرد تشکیل گردید. از این مدل تعداد هاگهای مورد نیاز باکتری جهت جوانه زدن و شروع به رشد قابل محاسبه می‌باشد (R^2 =۰/۸۶).

واژه‌های کلیدی: کلستریدیوم پرفرینجنس تیپ A، فاکتورهای رشد، مدلهای ریاضی رشد، مطالعه فاکتوریال

در بین ۵ تیپ مختلف کلستریدیوم پرفرینجنس، تیپ A یکی از عوامل مهم مسمومیتهای غذایی در دنیا محسوب می‌شود. این باکتری در سالهای ۱۹۸۰ تا ۱۹۹۰ بعد از کمپیلوباکتر و سالمونلا مهمترین عامل مسمومیت غذایی در کشور انگلیس بوده است. همچنین گزارشهایی از بروز اپیدمی این نوع مسمومیت در ایران وجود دارد (۳۳، ۲۶ و ۱). این میکروب در انواع زیادی از غذاها یافت می‌شود و معمولاً شیوع مسمومیت آن به دنبال تهیه غذا در حجم زیاد و در غذاخوریهای عمومی صورت می‌گیرد.باکتری در غذاهای پخته شده، بخصوص غذاهای گوشتی و نگهداری شده برای مدت طولانی در شرایطی که سرد شدن آن به کندی صورت پذیرد و یا در خارج از یخچال نگهداری شود، به سرعت رشد و تکثیر پیدا نموده و بلع تعداد زیاد میکروب به صورت زنده همراه غذا باعث بروز مسمومیت غذایی می‌گردد. تولید توکسین توسط باکتری در روده صورت گرفته و موجب صدمات هیستوپاتولوژیک در مخاط روده و بروز اسهال می‌گردد (۲۳).

در سالهای اخیر مطالعات وسیعی در مورد چالش میکروبهای مختلف بیماریزای غذایی متأثر از عوامل مختلف مؤثر در رشد میکروبها، در مدلهای محیط کشت میکروبی مواد غذایی صورت می‌گیرد که طی آن اطلاعات مفیدی حاصل می‌گردد. از این اطلاعات جهت فرمولاسیون مواد غذایی در صنایع و اماکن عمومی تهیه و تولید مواد غذایی جهت پیشگیری از رشد و بروز مسمومیتهای غذایی استفاده می‌گردد (۳۲،۲۲،۲۱،۲۰،۱۹،۱۵،۱۴،۱۳،۱۲،۱۱،۱۰،۸،۷، ۶). در این مطالعه برای اولین بار با استفاده از پارامتر احتمال شروع به رشد (Probability of Growth Initiation) یک اسپور کلستریدیوم پرفرینجنس تیپ A در مدل محیط کشت مایع BHI (Brain Heart Infusion Broth) و چالش هاگها و فرم رویای باکتری در مقابل عوامل میزان حرارت، مقدار نمک، میزان pH، نوع اسید مورد استفاده و زمان نگهداری، به صورت Inoculation Study مورد ارزیابی قرار گرفته و نتایج حاصله مدل سازی می‌گردد.

مواد و روش کار

میکروب مورد آزمایش: در این مطالعه از کلستریدیوم پرفرینجنس تیپ A که به صورت لیوفیلیزه از مؤسسه سرم و واکسن سازی رازی حصارک تهیه شده بود استفاده گردید. از میکروب لیوفیلیزه سوسپانسیون میکروبی تهیه و در محیط SPS آگار (Sulfite Polymyxin Sulfadiazine agar) کشت داده و به صورت بی‌هوازی با استفاده از Anaerocult A در جار بی هوازی به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه گرمخانه‌گذاری گردید. از پرگنه‌های سیاه خالص رشد کرده در محیط SPS آگار به عنوان کشت مادر در مطالعات چالش میکروبی، استفاده گردید.

طرح مطالعه: جهت مطالعه اثرات مستقل و متقابل عوامل حرارت (۱۵، ۲۵، ۳۵ و ۴۲درجه سانتی‌گراد)، غلظت نمک (۰/۲۵، ۲ و ۴ درصد)، pH (۷/۲، ۶/۵، ۵/۹ و ۵/۳) با استفاده از دو اسید هیدروکلریک و استیک یک نرمال و زمان نگهداری (تا ۴۴ روز در ۱۶ زمان بررسی ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۹، ۱۲، ۱۵، ۱۸، ۲۱، ۲۴، ۲۷، ۳۰، ۳۷ و ۴۴ روز)، مجموعاً ۱۵۳۶ = ۱۶ × ۲ × ۴ × ۳ × ۴ حالت زیستی مختلف در محیط مدل BHI مایع تهیه گردید و چالش میکروبی با تلقیح تعداد 10^{4} تا 10^{-2} هاگ باکتری مورد ارزیابی قرار گرفت.

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

تهیه سوسپانسیون هاگ باکتری: در این مطالعه پس از ارزشیابی روشهای تهیه سوسپانسیون هاگ باکتری به روش کیم و همکاران و دانکن و همکاران (۱۷ و ۴)، هاگ سازی باکتری در دو محیط BHI حاوی تیوگلیکولات (۱۰۰ میلی‌گرم تیوگلیکولات در صد میلی‌لیتر محیط BHI)، در شرایط هوازی و در محیط BHI فاقد تیوگلیکولات، در شرایط هوازی نیز مورد ارزیابی قرار گرفت و با توجه به اینکه شمارش هاگها در روشهای ابداعی این مطالعه (محیطهای BHI) بهتر از روشهای کیم و دانکن بود و از طرفی بین دو محیط BHI با شرایط بی‌هوازی و BHI حاوی تیوگلیکولات با شرایط هوازی تفاوت چندانی مشاهده نگردید لذا جهت تهیه سوسپانسیون هاگ باکتری از محیط آبگوشت BHI در شرایط بی هوازی با گرمخانه گذاری ۳۷ درجه به مدت ۶۰ ساعت به شرح ذیل استفاده گردید:

از سوسپانسیون کشت باکتریها در ارلنهای ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی آبگوشت BHI کشت گردیده، به مدت ۶۰ ساعت در حرارت ۳۷ درجه و در شرایط بی هوازی قرارگرفت. این کشتها به مدت ۲۰ دقیقه در حرارت ۷۵ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد تا تمام فرمهای رویای باکتری از بین بروند. سپس در شرایط کاملاً استریل آن را چندین بار با استفاده از فسفات بافر با pH برابر ۷، سانتریفوژ و شستشو نموده و نهایتاً سوسپانسیون هاگ باکتری در فسفات بافر تهیه گردید.

جهت بررسی عدم آلودگی سوسپانسیون به سایر باکتریها، از سوسپانسیون مذکور در پلیتهای BHI آگار کشت داده و در شرایط هوازی و بی هوازی و در ۳۷ درجه گرمخانه‌گذاری گردید. عدم رشد باکتری در شرایط هوازی و عدم رشد باکتری غیر کلستریدیم پرفرینجنس در شرایط بی‌هوازی، به عنوان عدم آلودگی سوسپانسیون مورد تأیید قرار گرفت.

برای تعیین تعداد هاگ باکتری در سوسپانسیون تهیه شده، رقتهای متوالی ۱۰ برابر سوسپانسیون در محیط BHI آگار کشت و در شرایط بی‌هوازی در ۳۷ درجه گرمخانه‌گذاری گردید. بر اساس تعداد پرگنه‌های تولید شده، تعداد هاگ باکتری در واحد حجم سوسپانسیون (CFU/ml) مشخص گردید.

در پایان با افزودن حجم مناسبی از فسفات بافر استریل به سوسپانسیون، تعداد هاگ در هر میلی‌لیتر از سوسپانسیون به رقم حدود 1×10^{6} هاگ تنظیم گردید. این سوسپانسیون برای آزمایشهای بعدی در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

تهیه محیطهای آبگوشت مدل BHI وتلقیح هاگ باکتری: محیط آبگوشت BHI به حجم کافی طبق دستور شرکت سازنده تهیه گردیده و به عنوان مدل مغذی متأثر از عوامل مورد مطالعه مورد استفاده قرار گرفت. مقادیر مورد نظر نمک به محیط اضافه و پس از تقسیم آنها در لوله‌های درپیچ دار (۲۰۰ × ۳۲ میلی‌متر) در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه استریل گردیده و پس از سرد شدن با استفاده از اسیدهای کلریدریک و استیک یک نرمال استریل، pHهای مورد نظر با استفاده از pH متر M220 , pH meter) Corning , Ny, USA) تنظیم گردید. برای pH برابر ۷/۲ اسیدی اضافه نگردید. با استفاده از سوسپانسیون هاگ باکتری که قبلاً تحت شوک حرارتی ۷۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفته بود، سری اول لوله‌های حاوی محیط BHI مدل طوری تلقیح شدند که هر لوله حاوی 10^{4} هاگ در میلی‌لیتر گردید و سپس با استفاده از رقتهای متوالی ۱۰ برابر، لوله‌های حاوی محیط BHI مدل به طور متوالی طوری تلقیح شدند که دامنه رقت در هر میلی‌لیتر از BHI در 10^{4} تا 10^{-2} هاگ تنظیم گردیده و محتوی لوله‌ها هر کدام در سه لوله استریل کوچکتر (۱۰۰ × ۱۶ میلی‌متر) با درپوش کائوچویی (لوله‌های آزمایش ونوجکت) تقسیم گردید و بدین ترتیب سیستم MPN سه لوله‌ای در ۷ رقت تهیه شد (هر سری حاوی ۲۱ لوله). سری لوله‌های تهیه شده در چهار دمای مورد نظر تا زمان ۴۴ روز در شرایط هوازی گرمخانه گذاری گردید.

محاسبه احتمال جرمینه شدن و رشد باکتری: با مشاهده رشد باکتری (کدورت قابل رؤیت) در ۱۶ زمان (روزهای ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۹، ۱۲، ۱۵، ۱۸، ۲۱، ۲۴، ۲۷، ۳۰، ۳۷ و۴۴) و ثبت نتایج و با استفاده از فرمول Log P% = (Log I - Log MPN) - 2 و جدول MPN (۵، ۹، ۲۷، ۲۸، ۲۹ و ۳۰) لگاریتم احتمال (درصد) جرمینه شدن و رشد یک هاگ باکتری در شرایط مورد آزمایش محاسبه گردید. در این فرمول Log P% عبارت از لگاریتم احتمال (درصد) تبدیل یک هاگ باکتری به فرم رویاو رشد آن، Log I لگاریتم تعداد هاگ تلقیح شده در هر میلی‌لیتر از محیط آبگوشت BHI مدل (غلیظ‌ترین لوله با 10^{4} هاگ در میلی‌لیتر) و Log MPN لگاریتم مقدار MPN در هر میلی‌لیتر از محیط آبگوشت BHI مدل می‌باشد. در صورت عدم رشد در هیچ یک از لوله‌های سری MPN، مقدار MPN برابر ۰/۱۷ و لگاریتم ۱/۲۵- منظور گردید (۳۱). برای محاسبه تعداد هاگ مورد نیاز جهت جرمینه شدن و رشد در شرایط مورد آزمایش (Spors needed) از فرمول Spors needed (SN) = 100 / P% استفاده می‌شود که در آن P%، احتمال تبدیل یک هاگ باکتری (درصد) به فرم رویا و رشد آن می‌باشد. در مواردی که مقدار Log P% بالاتر از رقم ۲ (جرمینه شدن صد درصد هاگهای اینوکوله شده) بود، در محاسبات همان رقم ۲ در نظر گرفته شد.

آنالیز آماری و مدل سازی: آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS، با روش آنالیز واریانس صورت گرفت تا اثرات مستقل و متقابل هر کدام از عوامل مورد استفاده در رشد میکروب مشخص گردد. تغییرات با احتمال کمتر از یک درصد (P< ۰/۰۱) به عنوان تغییرات معنی‌دار تأیید گردید. مدل ریگرسیون جهت پیش‌بینی رشد باکتری (Log P%) به عنوان متغیر وابسته، در مقابل اثرات عوامل مورد استفاده (حرارت، غلظت نمک، pH، نوع اسید و زمان نگهداری) به عنوان متغیرهای غیر وابسته مورد استفاده قرار گرفت. جهت انتخاب بهترین مدل از تکنیک Stepwise regression و ترانسفورماسیونهای مناسب ریاضی استفاده گردید.

نتایج

جداول ۱ و ۲ لگاریتم احتمال (درصد) جرمینه شدن و رشد یک هاگ باکتری (Log P%) و حداقل تعداد هاگهای مورد نیاز برای شروع به رشد کلستریدیوم پرفرینجنس (SN)، تحت شرایط مختلف از تأثیر عوامل حرارت، غلظت نمک، مقدار pH، نوع اسید، در زمان (روز) رسیدن به حداکثر رشد را نشان می‌دهد. در مواردی که شرایط حاکم بر محیط تا ۴۴ روز پس از گرمخانه‌گذاری، جرمینه شدن اسپورهای اینوکوله شده را حمایت نمی‌کند، زمان ۴۴ روز (حداکثر زمان نگهداری در این مطالعه) به عنوان زمان رسیدن به حداکثر رشد (که صفر بوده) در نظر گرفته شده است.

تأثیر عوامل مورد استفاده در رشد باکتری

الف - اثر حرارت: تأثیر حرارت بر رشد باکتری معنی‌دار بود به طوری که با افزایش حرارت، جرمینه شدن و رشد باکتری بهتر صورت گرفت. در بین چهار میزان حرارت مورد استفاده اختلاف معنی‌داری بین حرارتهای ۱۵ و ۲۵ با حرارتهای ۳۵ و ۴۲ درجه مشاهده گردید و لی بین ۳۵ و ۴۲ درجه اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (P = ۰/۱۷۵). حرارت نگهداری با pH محیط و غلظت کلرور سدیم اثر متقابل معنی‌دار نشان داد (P < ۰/۰۰۱).

ب - اثر نمک: اثر غلظتهای نمک مورد استفاده بر رشد باکتری معنی‌دار بود و با افـــــزایش

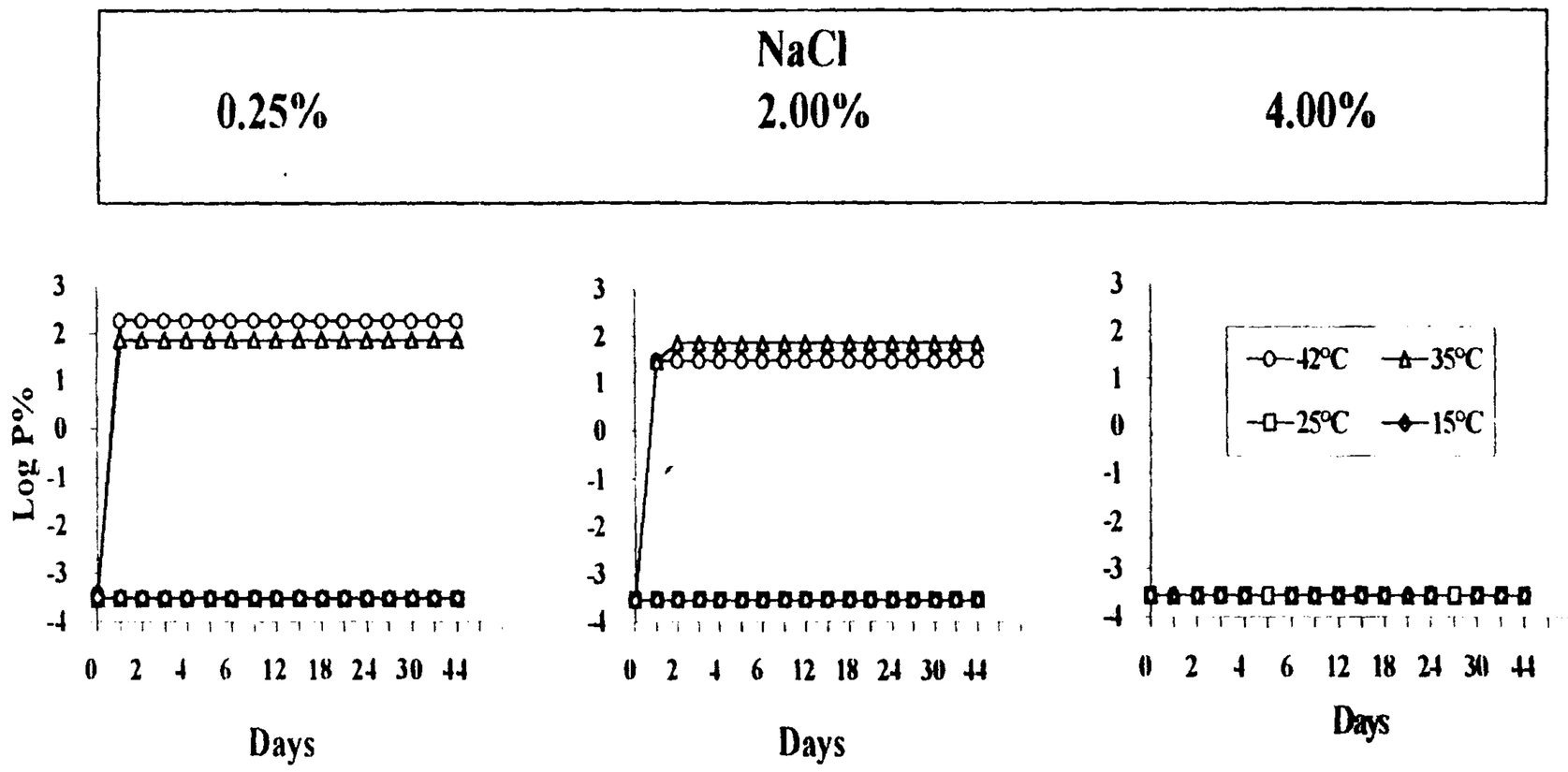
جدول ۱ـ لگاریتم درصد احتمال رشد (Log P%) یک هاگ کلستریدیوم پرفرینجنس در زمان (روز) حداکثر رشد و تعداد هاگ مورد نیاز برای شروع به رشد (SN)، تحت تأثیر حرارت و غلظت نمک در pH برابر ۷/۲ در محیط آبگوشت BHI در مدت ۴۴ روز

حرارت (°C)	نمک (٪)	pH*	روز	Log P%	SN
۴۲	۰/۲۵	۷/۲	۱	۲/۶	۱
	۲	۷/۲	۱	۱/۴۸	۴
	۴	۷/۲	۴۴	-۳/۵۴	$۳/۵\times۱۰^{۵}$
۳۵	۰/۲۵	۷/۲	۱	۱/۸۵	۲
	۲	۷/۲	۲	۱/۸۵	۲
	۴	۷/۲	۴۴	-۳/۵۴	$۳/۵\times۱۰^{۵}$
۲۵	۰/۲۵	۷/۲	۴۴	-۳/۵۴	$۳/۵\times۱۰^{۵}$
	۲	۷/۲	۴۴	-۳/۵۴	$۳/۵\times۱۰^{۵}$
	۴	۷/۲	۴۴	-۳/۵۴	$۳/۵\times۱۰^{۵}$
۱۵	۰/۲۵	۷/۲	۴۴	-۳/۵۴	$۳/۵\times۱۰^{۵}$
	۲	۷/۲	۴۴	-۳/۵۴	$۳/۵\times۱۰^{۵}$
	۴	۷/۲	۴۴	-۳/۵۴	$۳/۵\times۱۰^{۵}$

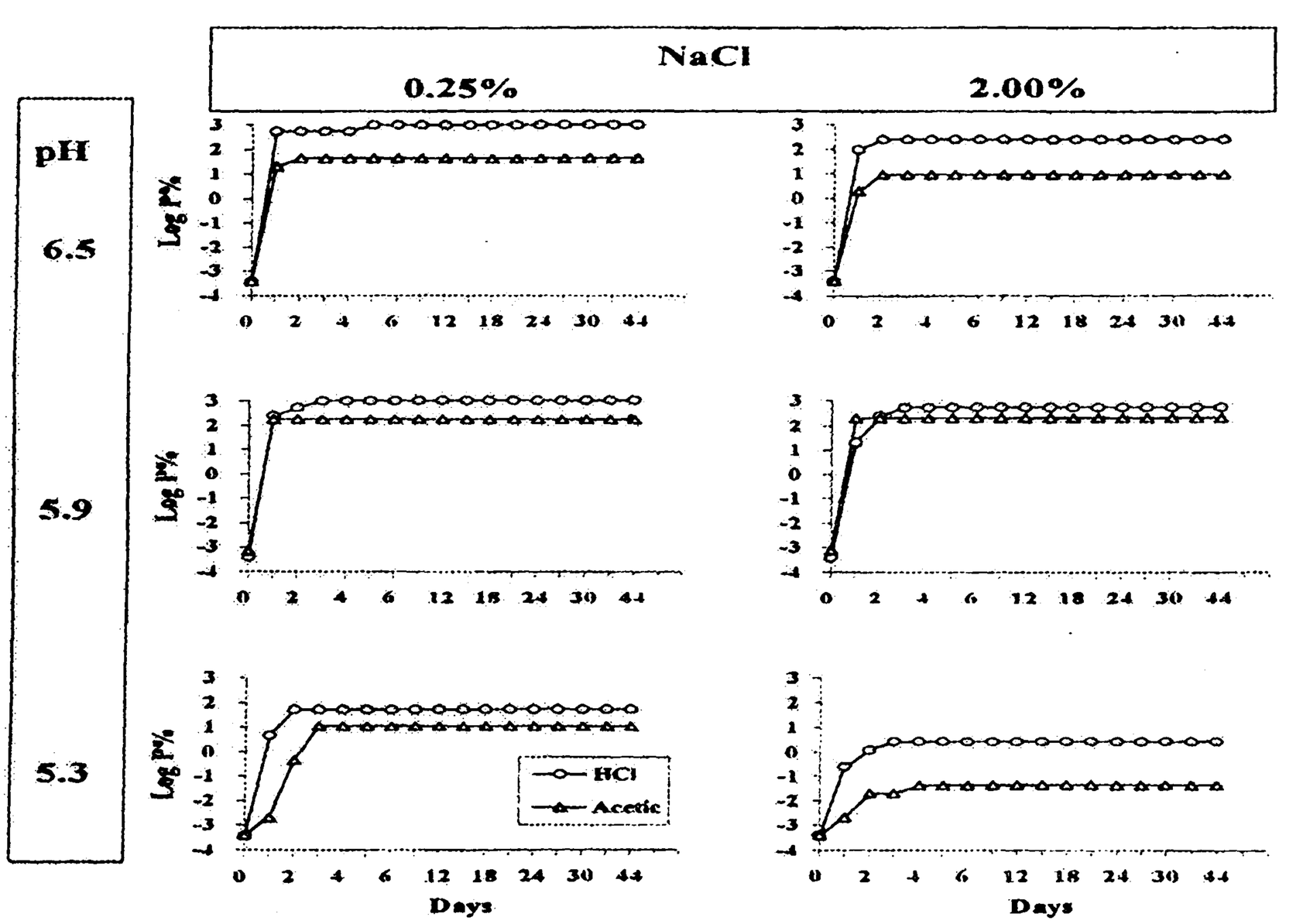
* برای pH برابر ۷/۲ هیچ نوع اسید یا قلیایی اضافه نگردید (pH طبیعی محیط آبگوشت BHI)

جدول ۲ـ لگاریتم درصد احتمال رشد (Log P%)یک هاگ کلستریدیوم پرفرینجنس در زمان (روز) حداکثر رشد و تعداد هاگ مورد نیاز برای شروع به رشد(SN)، تحت تأثیر حرارت و غلظت نمک، pH و نوع اسید در محیط آبگوشت BHI در مدت ۴۴ روز

حرارت (°C)	نمک (٪)	pH	روز	Log P%	SN	روز	Log P%	SN
۴۲	۰/۲۵	۶/۵	۱	۳	۱	۱	۲/۴۱	۱
	۲	۶/۵	۱	۲/۲۶	۱	۲	۳	۱
	۴	۶/۵	۴۴	-۳/۵۴	$۳/۵\times۱۰^{۵}$	۴۴	-۳/۳۹	$۲/۵\times۱۰^{۵}$
۳۵	۰/۲۵	۶/۵	۵	۳	۱	۲	۱/۶۳	۳
	۲	۶/۵	۲	۲/۳۸	۱	۲	۰/۹۶	۱۱
	۴	۶/۵	۴۴	-۳/۴۲	$۲/۶\times۱۰^{۵}$	۴۴	-۳/۳۹	$۲/۵\times۱۰^{۵}$
۴۲	۰/۲۵	۵/۹	۱	۲/۲۶	۱	۱	۱/۸۸	۲
	۲	۵/۹	۱	۱/۸۵	۲	۴	۱/۶۰	۳
	۴	۵/۹	۴۴	-۳/۵۴	$۳/۵\times۱۰^{۵}$	۴۴	-۳/۱۵	$۱/۴\times۱۰^{۵}$
۳۵	۰/۲۵	۵/۹	۳	۳	۱	۱	۲/۲۵	۱
	۲	۵/۹	۳	۲/۷۲	۱	۱	۲/۲۹	۱
	۴	۵/۹	۴۴	-۳/۴۲	$۲/۶\times۱۰^{۵}$	۴۴	-۳/۱۵	$۱/۴\times۱۰^{۵}$
۴۲	۰/۲۵	۵/۳	۲	۱/۳۴	۵	۳	۱/۰۲	۱۰
	۲	۵/۳	۵	-۲/۸۵	$۷/۱\times۱۰^{۴}$	۴	-۲	۱×۱۰^{۴}
	۴	۵/۳	۴۴	-۳/۵۴	$۳/۵\times۱۰^{۵}$	۴۴	-۳/۳۹	$۲/۵\times۱۰^{۵}$
۳۵	۰/۲۵	۵/۳	۲	۱/۷۱	۲	۳	۱/۰۲	$۱۰^{۴}$
	۲	۵/۳	۳	۰/۴	۴۰	۴	-۱/۳۵	$۲/۲\times۱۰^{۵}$
	۴	۵/۳	۴۴	-۳/۴۴	$۲/۶\times۱۰^{۵}$	۴۴	-۳/۳۹	$۲/۵\times۱۰^{۵}$



نمودار ۱ - مقایسه اثر دماهای مختلف انکوباسیون بر لگاریتم درصد احتمال رشد (Log p%) یک هاگ کلستریدیوم پرفرینجنس تیپ A تحت تأثیر غلظتهای مختلف نمک در محیط آبگوشت BHI مدل با pH = ۷/۲ در مدت ۴۴ روز انکوباسیون.



نمودار ۲ - مقایسه اثر دو اسید استفاده شده جهت تنظیم مقادیر مختلف pH در محیط آبگوشت BHI مدل بر لگاریتم درصد احتمال رشد (Log P%) یک هاگ کلستریدیوم پرفرینجنس تیپ A تحت تأثیر غلظتهای مختلف نمک در مدت ۴۴ روز نگهداری در دمای ۳۵°C.

غلظت نمک از ۰/۲۵ درصد به ۴ درصد، تأثیر منفی در جرمینه شدن و رشد باکتری مشاهده گردید. همچنین غلظت کلرور سدیم با pH محیط، حرارت نگهداری و زمان نگهداری اثر متقابل معنی دار نشان داد.

ج - اثر pH: میزانهای pH مورد استفاده در این مطالعه نیز اثر معنی داری روی رشد باکتری نشان داد. با افزایش pH از ۵/۳ به ۷/۲ رشد باکتری تقویت گردید. همچنین مقدار pH با غلظت نمک، حرارت نگهداری اثر متقابل معنی‌داری نشان داد ولی با زمان نگهداری معنی دار نبود ($P = ۰/۹۹$).

د - اثر نوع اسید: نوع اسید مورد استفاده در تنظیم pH محیط تأثیر معنی‌داری در رشد باکتری نشان داد. بدین معنی که در یک pH برابر، کاهش pH به وسیله اسید استیک به طور معنی‌داری بیش از اسید کلریدریک رشد باکتری را کاهش داد. نمودار ۱ تأثیر سه غلظت نمک را در pH برابر ۷/۲ در مقادیر مختلف حرارت و زمان نگهداری و نمودار ۲ تفاوت اثر دو اسید را در حرارت ۳۵ درجه و مقادیر مختلف pH، غلظت نمک و زمان نگهداری در رشد باکتری، نشان می‌دهد.

ه - اثر زمان نگهداری: تأثیر زمان نگهداری در رشد باکتری معنی‌دار بوده و عمده رشد باکتری در همان روز اول و دوم پس از گرمخانه گذاری اتفاق افتاد. همچنین زمان نگهداری با غلظت نمک اثر متقابل نسبتاً معنی‌داری نشان داد ($P < ۰/۰۱۷$)، در حالی‌که با حرارت نگهداری و با میزان pH اثر متقابل معنی‌دار نشان نداد. جداول ۱ و ۲، اثر حرارت، نمک، pH، نوع اسید و زمان نگهداری را در جرمینه شدن باکتری نشان می‌دهند.

و - مدل سازی: مدل ریاضی پیشگو با مقدار R^2 برابر با ۰/۸۶، با قدرت بالای پیشگویی به شرح ذیل تهیه گردید که در آن D زمان (روز)، S غلظت نمک (درصد) و T میزان حرارت (سانتی‌گراد)، A نوع اسید (اسید استیک = ۱ و اسید هیدروکلریک = ۲) و Log P% لگاریتم احتمال رشد (درصد) یک هاگ کلستریدیوم پرفرینجنس می‌باشد:

$$\text{Log P\%} = -44.939 - 0.107A - 0.231\frac{1}{D} - 26.83\frac{1}{pH} \times \sqrt{T} - 17.83\sqrt{pH} - 0.44\frac{1}{S} + 0.108\,S \times pH + 4.36T + 729.79\frac{1}{T} - 0.061T \times S - 0.044T^2$$

بحث

مطالعه اثرات عوامل حرارت، غلظت نمک، pH در محیطهای کشت باکتریولوژیک و مواد غذایی در جرمینه شدن و رشد کلستریدیوم پرفرینجنس توسط محققین مختلف در سالهای اخیر انجام گرفته است (۳۴، ۳۲، ۲۵، ۲۴، ۲۳، ۱۸، ۱۶، ۲) ولی هیچ کدام از این مطالعات با استفاده از پارامتر احتمال جرمینه شدن و رشد یک هاگ باکتری (Log P%) به صورت فاکتوریال انجام نگرفته است. به علاوه در این مطالعه از دو اسید مختلف جهت تنظیم pHهای مورد نظر استفاده و مقایسه گردیده است و نتایج حاصل از تجربیات انجام شده به صورت معادله ریگرسیون جهت پیشگویی مدل سازی گردید.

در این بررسی عامل حرارت، بیشترین تأثیر را در مهار رشد باکتری نشان داد و رشد سریع باکتری در دمای مطلوب ۳۵ و ۴۲ درجه اتفاق افتاد در حالی که حرارتهای ۱۵ و ۲۵ رشد باکتری را حمایت نکرد. مطالعات انجام گرفته توسط سایر محققین نشان می‌دهد که در محیط کشت مناسبترین دما برای جرمینه شدن هاگ این باکتری در pH برابر ۶ پس از ۲۰ دقیقه شوک حرارتی ۷۵ درجه سانتی‌گراد، برابر با ۳۰ درجه سانتی‌گراد بوده است که با نتایج این مطالعه قرابت نشان می‌دهد (۲). با توجه به نتایج این مطالعه و تحقیقات انجام شده، مناسبترین عامل کنترل رشد این باکتری حرارت می‌باشد (۳۴، ۳۳، ۲۴، ۱۲، ۲). تأثیر متقابل دما با عوامل میزان pH و غلظت نمک، مؤید تأثیر مثبت Hurdle effect که در آن عوامل متعدد با میزان مناسب اثرات ضدمیکروبی همدیگر را تقویت می‌کند، نشان‌داد (جداول ۱ و ۲).

کلرور سدیم نیز حتی با مقدار ۲ درصد تأثیر معنی‌داری در جرمینه شدن و رشد باکتری نشان داد و افزایش آن به مقدار ۴ درصد موجب مهار کامل رشد باکتری گردید. این جلوگیری به علت کاهش میزان آب آزاد (Water activity) محیط صورت می‌گیرد طوری که در شرایط مطلوب با کاهش میزان آب آزاد از ۰/۹۶ به پایین، رشد باکتری کاهش و متوقف می‌شود که با دخالت سایر عوامل مثل حرارت نامناسب و pH نامناسب شرایط رشد باکتری نامساعدتر نیز می‌گردد (جداول ۱ و ۲).

اثر چهار مقدار pH ۷/۲، ۶/۵، ۵/۹ و ۵/۳ در جرمینه شدن و رشد باکتری معنی‌دار بود. با کاهش pH رشد باکتری نیز کاهش پیدا می‌کرد طوری که رشد در pH برابر ۵/۳ متوقف گردید. نوع اسید استفاده شده (اسید کلریدریک و اسید استیک) نیز در رشد باکتری، اثر معنی‌داری نشان داد و این به خاطر اختلاف Pka این دو اسید است بدین معنی که Pka اسید استیک که یک اسید آلی و ضعیفی است بالاتر است و لذا در pH بالاتر هنوز اسید تجزیه نشده بیشتری نسبت به اسید کلریدریک دارد. با توجه به اینکه اثر میکروب کشی اسید تجزیه نشده خیلی بیشتر از یون هیدروژن است لذا تأثیر جلوگیری کننده و میکروب‌کشی بیشتر اسید استیک در این مطالعه مشخص می‌شود. در صنایع غذایی با توجه به اینکه پایین آوردن زیاد pH غذا با مشکلاتی همراه است و باعث تغییر بافت غذا می‌شود لذا استفاده از اسیدهای آلی که اسیدهای غذایی نیز هستند و به علت بالا بودن Pka، در مقادیر pH بالاتری نسبت به اسیدهای معدنی اثر جلوگیری کنند قابل توجهی بدون لطمه زدن به بافت غذا نشان می‌دهند، بسیار حائز اهمیت است و از این نظر اسید استیک که به عنوان طعم دهنده به مواد غذایی افزوده می‌شود و از نظر بهداشتی و حد مجاز، اضافه کردن آن به مواد غذایی محدودیتی ندارد، از اهمیت بیشتری برخوردار است.

مدت زمان نگهداری در رشد باکتری اثر معنی‌داری نشان داد، یعنی باافزایش مدت زمان گرمخانه‌ای، احتمال رشد باکتری نیز افزایش پیدا می‌کرد ولی در شرایط مطلوب، رشد باکتری در همان یکی دو روز اول مشاهده شد و در غیر این صورت جرمینه شدن باکتری تا روز ۴۴ متوقف ماند. با توجه به اینکه این باکتری در حرارتهای ۱۵ و ۲۵ درجه رشدی نشان نداد، بنابراین عدم ادامه رشد باکتری در زمانهای طولانی‌تر که خاص رشد باکتری در حرارتهای پایین می‌باشد، طبیعی می‌باشد. به نظر می‌رسد که در این باکتری برای جرمینه شدن و رشد دو حالت اتفاق می‌افتد. حالت اول رشد بسیار سریع میکروب با زمان دو برابر شدن بسیار کوتاه، در شرایط مطلوب رشد می‌باشد و حالت دوم عدم رشد باکتری در شرایط نامطلوب می‌باشد و در حقیقت حالت بینابینی رشد ضعیف میکروب در شرایط نسبتاً نامطلوب بر خلاف بسیاری از باکتریها به طور واضح مشاهده نمی‌شود.

اولین بار در سال ۱۹۷۱ جنی‌جورجیس و همکاران از پارامتر احتمال شروع به رشد توسط یک سلول باکتری استافیلوکوکوس آرئوس به عنوان متغیر وابسته تحت تأثیر عوامل مختلف (متغیرهای غیر وابسته) استفاده نموده و با تهیه مدل ریگرسیون توانستند رفتار باکتری را تحت تأثیر دامنه عوامل به کاربرده شده پیش‌بینی کنند (۹). این نوع مطالعه در مورد باکتریهای دیگری از جمله کلستریدیوم بوتولینوم (توکسین‌زایی) و لیستریا مونوسایتوجنز (۳۱، ۳۰ و ۱۹) نیز انجام گرفت. در این مطالعه احتمال جرمینه شدن و شروع به رشد یک هاگ کلستریدیوم پرفرینجنس تحت تأثیر بعضی عوامل درون اثر و برون اثر مورد بررسی قرار گرفت و با استفاده از مدل ریگرسیون با مقدار R^2 برابر با ۰/۸۶، پیشگویی رشد هاگهای باکتری در دامنه مقادیر به کار برده شده عوامل مورد استفاده بادقت بالا (۸۶ درصد) امکان‌پذیر گردید.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تهران برای انجام امور مربوط به این پروژه تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1 . Adams, M.R. and Mos, M.O., Food Microbiology . The Royal Society of Chemistry, (1999).

2 . Ahmaed, M. and Walker, H.W., Germination of Spores of Clostridium Perfringens. J. Milk and Food Thechnol. 34: 370 - 384. (1999).

3 . Baird-Parker, A.C. and Kilsby D.C., Principles of predictive fodd microbiolgoy. J. Appl. Bacteriol. symposium supplement. 43S - 49S, (1999).

4 . Duncan, C.L. and Strong, D.H, . Improved medium for sporulation od Clostridium perfringens. Appl. Microbiol. 16 : 82-89, (1999).

5 . Fisher, R.A. and Yates, F., Statistical tavles for biological, agricultrueal and medical reserch , 5th ed. Olover and Boyd, London, (1999).

6 . Garcia , G., and Genigeorgis , C., Quantitative evaluation of Clostridium botulinum nonproteolytic types B, E nad F growth rish in fresh salmon tissue homogentes stored under modified atmospheres at low temperatures, J. Food prot. 50: 390 - 397, (1999).

7 . Garcia, g., Gernigeorgis , C. and Lindroth, S., Risk of growth and toxin production by clostridium botulinm types B, E and F in sa;mon fillets stored under modified atmospheres at low and abused temperatures. J. Food Prot. 50: 330-336, (1999).

8 . Genigeorgis , C., Kasrazadeh, M. and Razavilar, V., Growth and control of selected pathogens in soft hipacic type cheese. XXIV World Veterinary Congress, Brazil.

9 . Genigeorgis, C., Martin, S., Franti, C.E. and Riemann, Hl, Initiation of staphylococcal growth in Laboratory media. Appl. Microbiol. 21: 934 - 939, (1999).

10 . Genigeorgis ,C., Meng , J.H. and Baker, D.A. , Behavior of nonproteolytic Clostridium botulinum type B and E spores in cooked turkey and modeling lag phase and probabilty of toxigenesis. J. Feed Sci, 56: 373-379, (1999).

11 . Genigeorgis , C., Razavilar , V. and Sutan Assin , A., Quantitation of the effect of select preservation variables on the growth of *L. monocytogenes* in foods, XXII World Veterinay Congress, Canada, (1999).

12 . Gibson, A.M. and Roberts , T. A. , The effect of pH, sodium chloride, sodum nitrite and storage temperature on the growth of Clostridium perfringens and faecal streptococci in laboratory media. Int, J. Food Microbiol. 3: 195 - 210, (1999).

13 . I.C.M.S.F., Microorganisms in Foods 5. Characteristics of Microbial Pathogens, Blackie Academic & Professional , London, (1999).

14 . Ikawa, J.Y. and Genigeorgis C., Probabitliy of growth and toxin production by nonproteolytic Clostridum botulinum in rockfish fillets stored under modified atmospher, Int, J. Food Microbiol. 4: 167 - 181, (1999).

15 . Jensen, M.J. Genigeorgis , C. and Lindroths, S., Probability of growth of Clostridimn botulinum as affectef by strain, cell and serologic type , inoculum size and temperature and time of incubation in a model broth system. J. Food Saf, 8: 109 - 126, (1999).

16 . Juneja, V.K., Marmer, B.S. and Miller, A. J., Growth and sporulation potential of clostridium perfringens in arrobic and vacum packaged cooked beef , J. Food Prot. 57: 393 - 398, (1999).

17 . Kim, C.H., Cheney , R. and Woodburn , M. , Sporulation of Clostridium perfringens in a modifed medium and selected feeds , appl. Microbiol, 15: 871 - 876, (1999).

18 . Labbed , R. G. and Duncan, C.L., Growth from spores of Clostridium perfringens in the presence of sodumn nitrite, Appl. Microbiol . 16: 353 - 359, (1999).

19 . Lindroth, S. and Genigeorgis, C., Probability of grwth and toxin production by non - proteolytic Clostridium botulinum in rosh fish storded under modkfied atmospheres. Int. H. Food Microbil 3: 167-181, (1999).

20 . Lund , B.M., Graham. A. F., George , S.M. and Brown, D., The combined effect of incubation temperature , pH, and sorbic acid on the probability of growth of non - proteolytic, type B Clostridium botulinum. J. Appl. Bacteriol , 69. 481 - 492, (1999).

21 . Meng, J. and Genigeorgis , C., Modeling lag phase of nonproteolytic Clostridium botulinum toxigenesis in cooked tukey and chicken breast as affected by temperature , Sodium lactate , sodium chloride and spore inoculum. Int. J. Food Microbil. 19: 109 - 122, (1999).

22 . Montville, T.J., Quantitation of pH - and salt - tolerant subpopulations from Clostridium botulinum . Appl. Environ ,. Microbiol. 47: 28-30, (1999).

23 . parekh , K.C. and Soberg, M. Comprative growth of Clostridium perfringen in carvon dioxide and nitrogen atmospheres . J. Food Sci. 35: 156-159, (1999).

24 . Park , Y. and Milolajcik, E.M, Effect of temperature on growht and alpha toxin production by Clostridium perfringens. J. Food Prot. 42:848 - 851, (1999).

25 . Ray, C.R., Waller, H.W., and Rohrbaug , P.L., The influence of temperature on growth , sprulation and heat resistance of spores of six strains of Clostridum Perfringens. J. Milk and Food Technol . 38: 461 - 465, (1999).

26 . Razavilar , V., Epidemiological survey of C. Perfringens food posioning out brak at a factory in Tehran area, J. Vet. Fac. Univ. Tehran, 42 : 24 -42, (1999).

27 . Razavilar, V., Epidemiological survey of C. Perfringens food

Factorial growth of C. perfringens as affected by temperature, salt, pH, acid type and storage time

Razavilar V.[1], Shekarforoush S.[2]

[1]*Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran - Iran.* [2]*Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Shiraz, Shiraz - Iran.*

This study was initiated to evaluate the fate of Clostridium perfringens type A spores in a molel broth system affected by various growth factors. The effects of temperature (42, 35, and 15°C), salt concentration (0.25 , 2 and 4%), pH (7.2, 6.5, 5.9 and 5.3) , kind of acid (hydrochloric and acetic acid), and storage time (up to 44 days), with inoculum levels of 10^{-2} to 10^{4}/ml spores in Brain Heart Infusion (BHI) broth was evaluate. Growth measurement was conducted using the log probability percentage (log P%) of C. perfringens type A spore growth in the BHI broth model. The log P (%) of C. perfringens was effect of salt x pH, temperature x pH, salt x temperature and salt x storage time also was significaht (00.0001 <p <0.02). The log P% of bacteria increased by increasing pH, temperature and storage time and decreased by increasing concentration of salt (p<0.001). Acetic acid showed more inhibitory effect than hydrochloric acid. Among the levels of factors uesd in this study , temperature (25 and 15°C) showed the highest and salt (4%) showed the lowest bacteriostatic effect. this study was made in aerobic condition (normal atmosphere in food storage), but the results may be different (less inhibitory effects) if the experiment be repeated in anaerobic condition. Regression equation was derived relating log P% to temperature , salt concentration, pH, type of acid and storage time. From this equation the number of spores needed to germinate and initiate growth can be calculated (R^2 = 0.86).

Key words: C.perfringens type A, Growth factors, Mathematical growth models, Factorial design study.

posioning out break at a factory in Trhran area. J. Vet. Fac. Univ. Tehran, 42: 27-42, (1999).

28 . Razavilar, V. and Genigeorgias, C., Interactive effect of tempeature, atmosphere and storage time on the probability of colony formation on blood agar by four Listeria species. J. Feed Prot. 55: 88-92, (1999).

29 . Razavilar, V. and Gengeorgis, C., Probability of growth initiation of L. Monocytogenes in a model broth 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, (1999).

30 . Razavilar , V. and Genigeorgis ,C., Probability of growth initation of Listeria spp. in a model broth as affected species, pH, temperaturd, Sodum chloride, potassium sorbate and storage time . J. of the Faculty of Veterinary Medicne, University of Tehran. 47: 49-76, (1999).

31 . Razavilar, V. and Genigeorgis, C., predication of Listeria spp. growthe as affected by various level of chemicals , pH, temperature and storage time in a model broth . Int. Food Microbiol. 40: 149 - 157, (1999).

32 . Roberts, T.A. and Derrick , C.M., The effect of curing salts on the growth of Clostridium perfringens (Welchii) in labratory medium. J. Food Technol, 13: 349-353, (1999).

33 . Varnam, A.H. and Evans, M.G., Foodborne pathogens. Wolfe, London, (1999).

34 . Willardsen, R.R., Busta, F.F., Allen, C.E. and Smith, L.B. Growth and surviral of Clostridium perfringens during constantly rising temperatures. J. Food Sci. 43: 470-475, (1999).