بررسی مدلسازی رشد باکتری اشریشیاکلی در عصاره تجاری گوشت مرغ متأثر از فاکتورهای حرارت و اسیدیته

آنا قاسمی نژاد*[1]، علی فضل آرا[2]، ابراهیم رحیمی[3]

۱. گروه علوم و صنایع غذایی، علوم و تحقیقات خوزستان، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران.

۲. گروه علوم و صنایع غذایی، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران.

۳. گروه بهداشت و ایمنی مواد غذایی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

*** نویسنده مسئول:** *annaghaseminezhad@yahoo.com*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۸/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۱/۲۳

چکیده

هدف این مطالعه، ارائه مدل پیشگوی رشد باکتری *اشریشیاکلی* متأثر از عوامل انتخابی رشد شامل: حرارت نگهداری (دمای ۸ و ۳۷ درجه سانتی گراد) و pH (۴، ۵ و ۶) در عصاره تجاری گوشت مرغ بود. برای این منظور عصاره تجاری گوشت مرغ آماده شده با استفاده از اسید استیک و سود ۱ مولار بر روی pHهای مورد نظر تنظیم گردید. سپس میزان 10^5 cfu/ml از باکتری *اشریشیاکلی* به عصاره‌های آماده شده تلقیح شد. عصاره‌ها در دو دمای ۸ و ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شدند و در زمان‌های مختلف نسبت به نمونه گیری از آنها، رقت سازی و در نهایت کشت سطحی بر روی محیط کشت مک کانکی آگار اقدام گردید. نتایج به دست آمده نشان داد رشد باکتری در pH برابر ۴ به طور معنی داری کمتر از pHهای ۵ و ۶ بود و کاهش رشد باکتری در دماهای ۸ و ۳۷ درجه سانتی گراد با یکدیگر تفاوت معنی دار نداشت.

واژگان کلیدی: *اشریشیاکلی*، عصاره تجاری گوشت مرغ، حرارت، pH.

مقدمه

در طول دهه‌ی گذشته، وقوع بیماری‌های ناشی از مواد غذایی، نه تنها در کشورهای در حال توسعه و با فقر بهداشتی بلکه در کشورهای توسعه یافته با استانداردهای بالای بهداشتی نیز رو به افزایش بوده است. بیماری‌های ناشی از مواد غذایی در اثر فرایندهای غیربهداشتی تهیه مواد غذایی رخ می‌دهد و شامل عفونت‌ها و مسمومیت‌ها می‌شود. باکتریها، ویروس‌ها، قارچها، انگل‌ها، فلزات سنگین و مواد شیمیایی باعث مسمومیت‌های غذایی می‌شوند. باکتری‌ها عمومی‌ترین عامل در ارتباط با مسمومیت‌های غذایی هستند. یکی از جنس‌های مهم خانواده آنتروباکتریاسه جنس اشریشیا است. این جنس متشکل از ۶ گونه می‌باشد و در این میان *اشریشیاکلی* گونه‌ای است که بیشترین اهمیت را دارد. سایر گونه‌ها شامل *اشریشیا آداکربوکسیلاتا*، *فرگوسونی*، *هرمانی*، *ولنری* و *بلاته* هستند (رضویلر، ۱۳۸۱؛ بنیادیان، ۱۳۸۲؛ استوارت والکر، ۱۳۸۳).

باکتری *اشریشیاکلی* باسیل گرم منفی، بدون هاگ با طول ۲ تا ۶ میکرون و عرض ۱ تا ۱/۵ میکرون است. پیلی یا فیمبریه در اغلب آنها وجود دارد و در بیماریزایی باکتریایی نقش دارد. برخی گونه‌های آن دارای کپسول و برخی دیگر فاقد کپسول می‌باشند. بعضی از آنها فاقد حرکت و بعضی متحرک با تاژک پیرامونی می‌باشند. این باکتری هوازی بی هوازی اختیاری بوده و جزء باکتری‌های روده ای است (Georges & Michael, 1998).

آلودگی‌های ناشی از این باکتری در بین انسان و حیوانات در همه جا موجود است. ارتباط این باکتری با بیماری‌های انسانی در سال ۱۹۴۰ روشن شد و آن را میکروب فرصت طلب نام نهادند. از مدت‌ها پیش مشخص شد که برخی از سروتیپ‌های این باکتری در کودکان ایجاد آنتریت می‌کند. البته بزرگسالان نیز در اثر آلودگی به عوامل فوق که حدود ۱۵ سروتیپ آن تا کنون شناخته شده است می‌توانند به بیماری و اسهال مبتلا شوند (Collee et.al., 1990؛

Ercole et.al., 2003؛ Tzschoppe et.al., 2012؛ توکلی و همکاران، ۱۳۸۷).

انتقال بیماری معمولاً از طریق انسان – مواد غذایی – انسان صورت می‌گیرد و مهمترین ماده غذایی به عنوان منبع آلودگی سبزی‌های خام هستند که بیشتر به صورت سالاد تهیه و مصرف می‌شوند. علاوه بر آن، غذاهای آماده همراه با گوشت، شیر، لبنیات، نان و شیرینی نیز می‌توانند در انتقال بیماری مهم باشند (توکلی و همکاران، ۱۳۸۷).

در دو دهه اخیر، رویکرد وسیعی به استفاده از مواد غذایی آماده و آسان مصرف شده است و طبیعی است که در بازار رقابت مواد غذایی متنوع و با کیفیت بالا و استفاده و راحت همواره پیروز خواهند بود. از جمله این مواد انواع عصاره‌های غذایی است که هم به سبب تنوع طعم (مرغ، گوشت، سبزیجات) و هم بهبود طعم و قابلیت استفاده در انواع مواد غذایی و نیز راحتی مصرف، طرفداران بسیاری دارد. از این محصولات جهت تهیه سوپ (بطور عمده)، به عنوان غذای کمکی کودکان و چاشنی و طعم دهنده استفاده می‌شود (لک، ۱۳۸۶).

بطور کلی هر باکتری خواهان یکسری شرایط بهینه برای زندگانی است که در صورت عدم تامین آن شرایط، زیست آن با مشکل مواجه می‌شود و از بین خواهد رفت. دو مورد از عوامل موثر بر رشد باکتری‌ها در مواد غذایی دما و pH می‌باشند. هر میکروارگانیسمی برای رشد به یک محدوده pH و دمای خاص احتیاج دارند. از آنجا که میکروارگانیسم‌ها برای تنظیم pH داخلی خود ساختار خاصی ندارند به شدت تحت تأثیر pH ماده ی غذایی قرار می‌گیرند. معمولاً غذاهایی با pH پایین به راحتی توسط باکتری‌ها فاسد نمی‌شوند. رشد میکرواورگانیسم‌ها در درجه حرارت‌های مختلف صورت می‌گیرد بنابراین نمی توان دمای مناسبی را برای نگهداری انواع مواد غذایی انتخاب کرد. حرارت مناسب برای رشد باکتری *اشریشیاکلی* ۳۷ درجه سانتی گراد و pH مناسب بین ۴/۴ تا ۹ می‌باشد (فرج زاده، ۱۳۸۲؛ توکلی و همکاران، ۱۳۸۷).

رضویلر و همکاران در سال ۱۳۸۱ رفتار *استافیلوکوکوس آرئوس* را تحت تاثیر عوامل pH، غلظت نمک، میزان تلقیح باکتری، حرارت و زمان نگهداری با استفاده از مدل پیشگوی ریاضی بررسی کردند نتیجه آنالیز آماری بیانگر تاثیر معنی دار غلظت نمک، میزان pH، حرارت و زمان نگهداری مورد استفاده بر رشد باکتری بود. سالدانا و همکاران در سال ۲۰۱۲ تأثیر دما و pH را درحضور نیسین بر روی رشد *سالمونلا تیفی موریوم* و *اشریشیاکلی* O157:H7 توسط امواج میدان الکتریکی بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که افزایش دما بیشترین اثر را در غیر فعال کردن این دو گونه داشته و در همه pHها افزایش دما از ۴ تا ۵۰ درجه سانتی گراد باعث مرگ آنها به میزان ۴ سیکل لگاریتمی شده است. افزودن نیسین به محیط کشت به طور مستقل با دما تاثیری بر گونه‌ها نداشت. زنجیربند و همکاران در سال ۱۳۸۸ باکتری های نمک دوست نسبی را از آب خلیج فارس و کارخانه جداسازی و شناسایی و اثر تغییرات دما و pH محیط کشت بر رشد آن‌ها را بررسی کردند. نتایج به دست آمده حاکی از آن بود که درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد مناسب ترین درجه حرارت، برای باکتری های جدا شده از آب خلیج فارس است. از طرف دیگر، مناسبترین درجه حرارت برای رشد باکتری های جدا شده از کارخانه، ۲۸ درجه سانتی گراد و بهترین درجه pH برای رشد باکتری‌های جدا شده از آب خلیج فارس و کارخانه ۷/۲ بوده است. لذا با توجه به نتایج تحقیقات محققین بر روی رشد و عدم رشد برخی از باکتری‌ها تحت تاثیر فاکتورهای رشد مختلف، برخی از این تحقیقات نشان از تاثیر دما و pH بالا در افزایش رشد و برخی دیگر از تحقیقات حاکی از تاثیر دما و pH پایین در کاهش رشد باکتری بود. بنابراین دما و pH از عوامل رشد زیست محیطی مهم هستند که اغلب به دلیل اهمیت آنها در تحقیقات بنیادی (طبقه بندی، متابولیسم میکروبی) و کاربردهای عملی (تولید محصولات امن بخصوص در کشاورزی و صنایع غذایی) استفاده می‌شوند. به همین دلیل هدف این مطالعه، ارائه مدل پیشگوی رشد باکتری *اشریشیاکلی* متأثر از عوامل انتخابی رشد شامل:

حرارت نگهداری (دمای ۸ و ۳۷ درجه سانتی گراد) و pH (۴، ۵ و ۶) در عصاره تجاری گوشت مرغ بود.

مواد و روش کار

کشت لیوفیلیزه باکتری *E. coli* (PTCC1399) تهیه شده از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران جهت این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا این کشت لیوفیلیزه در محیط کشت Tryptic Soy broth (TSB) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از این محیط به محیط Tryptic Soy Agar (TSA) جهت کشت سطحی انتقال داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید تا کلنی‌های باکتری مورد مطالعه در سطح محیط ظاهر شوند. از این کشت به عنوان کشت مورد استفاده در تحقیق استفاده شد. کشت مذکور در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد و هر هفته تجدید کشت گردید. برای رفتارشناسی باکتری *E.coli* (PTCC1399) با انتقال یک کلنی به کمک لوپ حلقوی از محیط کشت TSA به داخل لوله حاوی ۱۰ میلی لیتر محیط کشت TSB و گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ ساعت، پس از گذشت این مدت زمان، مجدداً از محیط گرمخانه گذاری شده ۰/۱ میلی لیتر (۱۰۰ میکرولیتر) برداشته و به ۱۰ میلی لیتر محیط کشت TSB انتقال داده شد و گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ ساعت انجام گردید. (دو کشت متوالی در محیط کشت TSB در گرمخانه ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ ساعت که اصطلاحاً two overnight culture نامیده می‌شود.)

سپس نسبت به شمارش جمعیت باکتریایی کشت دوم با تهیه سریال رقت‌های ده برابر و کشت سطحی بر روی محیط کشت TSA و قرار دادن در گرمخانه ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت اقدام گردید. پس از شمارش، پلیتی که بین ۳۰ تا ۳۰۰ کلنی داشت، حداکثر تعداد باکتری در هر میلی لیتر محیط کشت مشخص شد. در ضمن جهت دستیابی به دقت بالاتر، رقت سازی و شمارش با ۳ بار تکرار انجام گردید و میانگین نتایج حاصله برابر Colony forming unit per mili liter (cfu/ml) $۱/۲\times۱۰^{۹}$ بدست آمد.

جهت بدست آوردن میزان تلقیح مورد نظر یعنی (cfu/ml) $۱۰^{۵}$، از لوله‌ی TSB که جمعیت باکتریایی آن شمارش شده بود (کشت دوم TSB) سریال رقت‌های ده برابر تا $۱۰^{۷}$ تهیه شد. در نهایت با انتقال ۱ میلی لیتر از رقت $۱۰^{۷}$ به ۱۰۰ میلی لیتر عصاره تهیه شده، تلقیح باکتریایی هدف فراهم شد.

عصاره‌ی گوشت مرغ آماده‌ی تجاری به تعداد مورد نیاز جهت انجام آزمایش خریداری و تهیه شد. عصاره‌ها همگی از یک بهر تولیدی و دارای تاریخ تولید و مصرف یکسان بودند. ترکیبات تشکیل دهنده عصاره‌ی گوشت مرغ شامل: نمک طعام، نشاسته، مونوسدیم گلوتامات، روغن هیدروژنه گیاهی، مالتودکسترین، پودر پروتئین گیاهی، ادویه، عصاره گوشت مرغ، سبزیجات و عصاره مخمر بود.

عصاره‌ها براساس دستورالعمل روی بسته آماده‌سازی شدند (خرد کردن عصاره با دست و افزودن آن به نیم لیتر آب جوش و حرارت دهی به کمک هیتر توأم با هم زدن به مدت ۳ تا ۵ دقیقه). پس از خنک شدن عصاره به دمای محیط عصاره تهیه شده در ظروف ارلن ۱۰۰ میلی لیتری به کمک استوانه مدرج توزیع شده و با قراردادن پنبه و فویل آلومینیومی روی درب، جهت نابودسازی میکروارگانیسم‌های احتمالی موجود در آنها با قراردادن در اتوکلاو اقدام گردید. دما و زمان اتوکلاو گذاری ۱۲۱ درجه سانتیگراد و به مدت ۱۵ دقیقه بود. پس از اتوکلاو گذاری، عصاره به دمای محیط سرد شده و نسبت به اندازه‌گیری pH آن اقدام گردید. میزان pH به دست آمده در اکثر موارد معادل ۵±۰/۲ بود. با افزودن اسید استیک و سود یک مولار آماده شده جهت تنظیم pH عصاره اقدام گردید.

بررسی در سه pH ۴، ۵، ۶ و دو دمای ۸ و ۳۷ درجه سانتیگراد و نیز با انجام ۳ تکرار در راستای افزایش دقت انجام شد و جمعاً نسبت به آماده‌سازی ۱۸ حالت در کل طول مطالعه اقدام گردید.

بدست آوردن میزان تلقیح باکتری مورد نظر یعنی 10^5 (cfu/ml) با انتقال ۱ میلی لیتر از کشت دوم محیط TSB که جمعیت باکتریایی آن شمارش و دارای جمعیت باکتریایی $1/2\times10^9$ cfu/ml بود، به لوله آزمایش حاوی ۹ میلی لیتر محیط TSB و پس از حل آن با انتقال ۱ میلی لیتر از آن به لوله آزمایش دیگر حاوی ۹ میلی لیتر محیط TSB تهیه شد. سپس جهت به دست آوردن تلقیح هدف میزان ۱ میلی لیتر از رقت 10^7 به ظروف حاوی ۱۰۰ میلی لیتر عصاره انتقال داده شد. بدین ترتیب تلقیح اولیه برابر 10^5 (cfu/ml) به دست آمد.

پس از مخلوط نمودن محتوی هر ظرف توسط دستگاه شیکر ارلن- بالن به مدت ۵ دقیقه ظروف مذکور در دماهای مورد مطالعه یعنی ۸ و ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. از این ظروف با توجه به دما در فواصل زمانی مختلف اقدام به نمونه‌برداری و رقت سازی و در نهایت کشت سطحی بر روی محیط Mac-Conkey Agarجهت شمارش کلنی های حاصله شد.

فواصل زمانی نمونه برداری در دمای ۸ درجه سانتیگراد معادل:

صفر (بلافاصله پس از افزودن تلقیح)، ۲۴، ۴۸،۷۲، ۹۶، ۱۲۰، ۱۴۴ و ۱۶۸ساعت (یک هفته)

و در دمای ۳۷درجه سانتیگراد معادل:

صفر (بلافاصله پس از افزودن تلقیح)، ۳، ۶، ۹، ۱۲، ۲۱، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ (چهار روز) بودند.

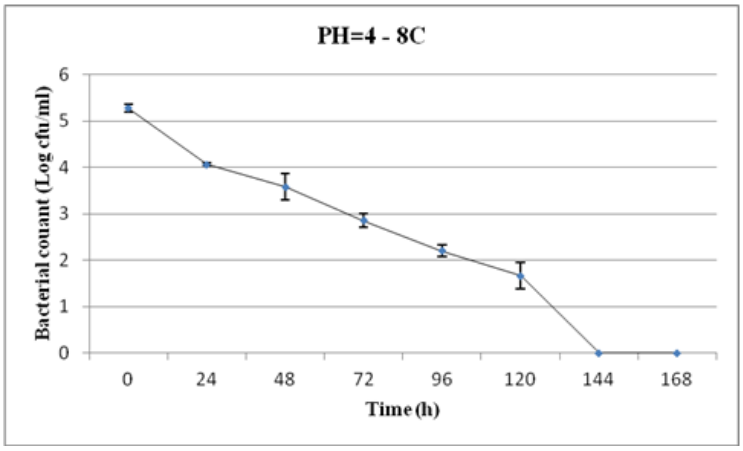
کشت‌های تهیه شده بر روی محیط Mac-Conkey Agar در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند و پلیت‌هایی که بین ۳۰ تا ۳۰۰ کلنی داشتند مورد شمارش قرار گرفتند. جهت افزایش دقت، کلیه مراحل مطالعه با ۳ تکرار انجام شد و سپس منحنی رشد باکتری در هر دما بر مبنای میانگین نتایج حاصل از ۳ تکرار به کمک برنامه نرم افزاری اکسل ۲۰۰۳ رسم گردید و به مقایسه انواع pHها در دو دمای ۸ و ۳۷ درجه سانتیگراد اقدام شد. در نهایت با بررسی و تجزیه و تحلیل نتایج حاصل از مطالعه‌ی حاضر با استفاده از نرم افزار آماری SPSS16 با بهره‌گیری از آزمون One-way ANOVA نتایج آن نشان می‌دهد که میانگین رشد باکتری اشریشیاکلی در عصاره تجاری گوشت مرغ تحت تأثیر pHهای ۴، ۵ و ۶ در دو دمای ۸ و ۳۷ درجه سانتیگراد در pH برابر ۴ با میانگین آن تحت pHهای ۵ و ۶ تفاوت معنی دار دارند ($P \leq ۰/۰۵$). که با استفاده از آزمون تکمیلی Duncan , scheffe نیز به تأیید رسیدند.

نتایج

نتایج به دست آمده از شمارش باکتری *اشریشیاکلی* در گروه‌های تیمار با pH برابر ۴ پس از طی ۱۶۸ ساعت که در دمای ۸ درجه سانتیگراد نگهداری شده بودند نشان می‌دهد که میانگین لگاریتم cfu/ml رشد باکتری با سه تکرار در زمان شروع ۵/۲۸ بوده است. با گذشت زمان تدریجاً از رشد باکتری کاسته شده و در زمان ۱۴۴ ساعت به صفر رسید که نشان دهنده کاهش جمعیت باکتری به میزان log ۵/۲۸ است.

جدول ۱- رشد باکتری *اشریشیاکلی* در عصاره تجاری گوشت مرغ تحت تأثیر pH برابر ۴ در دمای ۸ درجه سانتیگراد

شاخص آماری	۰	۲۴	۴۸	۷۲	۹۶	۱۲۰	۱۴۴	۱۶۸
میانگین	۵/۲۸	۴/۰۷	۳/۵۸	۲/۸۵	۲/۲۰	۱/۶۷	۰	۰
انحراف معیار	۰/۱۳	۰/۰۵	۰/۵۰	۰/۲۵	۰/۲۲	۰/۴۸	۰	۰
خطای معیار	۰/۰۸	۰/۰۳	۰/۰۳	۰/۱۵	۰/۱۳	۰/۲۸	۰	۰

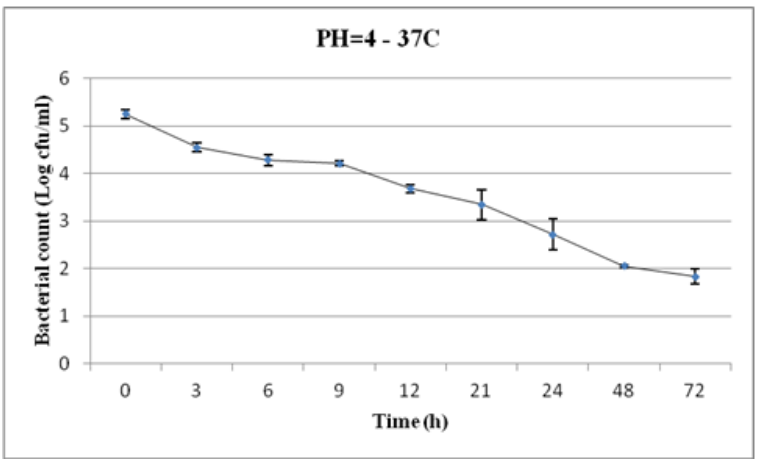


نمودار ۱- رشد باکتری *اشریشیاکلی* در عصاره تجاری گوشت مرغ تحت تأثیر pH برابر ۴ در دمای ۸ درجه سانتیگراد

همچنین در گروه‌های تیمار دیگر با همان pH پس از طی ۷۲ ساعت که در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری شده بودند نشان می‌دهد میانگین لگاریتم cfu/ml رشد باکتری با سه تکرار در زمان شروع ۵/۲۵ بوده و پس از گذشت ۷۲ ساعت میانگین به ۱/۸۳ کاهش پیدا کرده است که نشان دهنده کاهش جمعیت باکتری به میزان log ۳/۴۲ است.

جدول ۲- رشد باکتری *اشریشیاکلی* در عصاره تجاری گوشت مرغ تحت تأثیر pH برابر ۴ در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد

شاخص آماری	۰	۳	۶	۹	۱۲	۲۱	۲۴	۴۸	۷۲
میانگین	۵/۲۵	۴/۵۵	۴/۲۸	۴/۲۱	۳/۶۸	۳/۳۵	۲/۷۱	۲/۰۵	۱/۸۳
انحراف معیار	۰/۱۵	۰/۱۶	۰/۲۱	۰/۱۱	۰/۱۶	۰/۵۵	۰/۵۶	۰/۰۵	۰/۲۷
خطای معیار	۰/۰۹	۰/۰۹	۰/۱۲	۰/۰۶	۰/۰۹	۰/۳۲	۰/۳۲	۰/۰۳	۰/۱۵



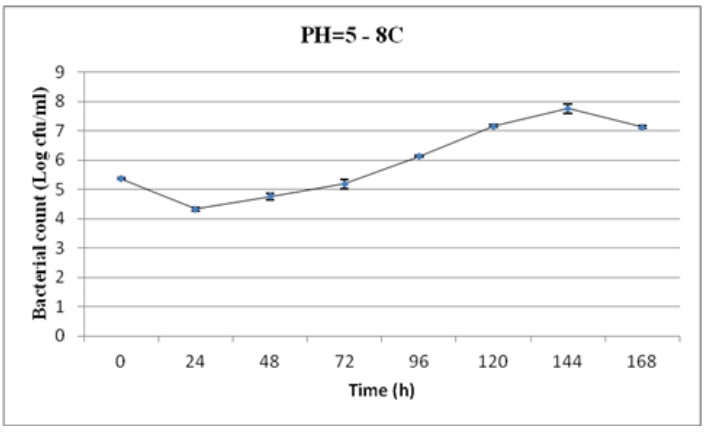
نمودار ۲- رشد باکتری *اشریشیاکلی* در عصاره تجاری گوشت مرغ تحت تأثیر pH برابر ۴ در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد

نتایج به دست آمده از شمارش باکتری *اشریشیاکلی* در گروه‌های تیمار بعدی با pH برابر ۵ پس از طی ۱۶۸ ساعت که در دمای ۸ درجه سانتیگراد نگهداری شده بودند نشان می‌دهد که میانگین لگاریتم cfu/ml رشد باکتری با سه تکرار در زمان شروع ۵/۳۷ بوده و پس از گذشت ۲۴ ساعت به ۴/۳۳ کاهش یافته است. پس از

آن به طور تدریجی تا زمان ۱۴۴ ساعت با میانگین ۷/۷۶ افزایش داشته اما در زمان آخر یعنی ۱۶۸ ساعت میانگین به ۷/۱۲ کاهش پیدا کرده است که به ترتیب نشان دهنده کاهش جمعیت باکتری به میزان log ۱/۰۴ و ۰/۶۴ است.

جدول ۳- رشد باکتری *اشریشیاکلی* در عصاره تجاری گوشت مرغ تحت تأثیر pH برابر۵ در دمای ۸ درجه سانتیگراد

شاخص آماری	۰	۲۴	۴۸	۷۲	۹۶	۱۲۰	۱۴۴	۱۶۸
میانگین	۵/۳۷	۴/۳۳	۴/۷۶	۵/۱۹	۶/۱۳	۷/۱۶	۷/۷۶	۷/۱۲
انحراف معیار	۰/۰۷	۰/۰۹	۰/۱۸	۰/۲۸	۰/۰۴	۰/۰۷	۰/۲۹	۰/۰۷
خطای معیار	۰/۰۴	۰/۰۵	۰/۱۰	۰/۱۶	۰/۰۲	۰/۰۴	۰/۱۶	۰/۰۴

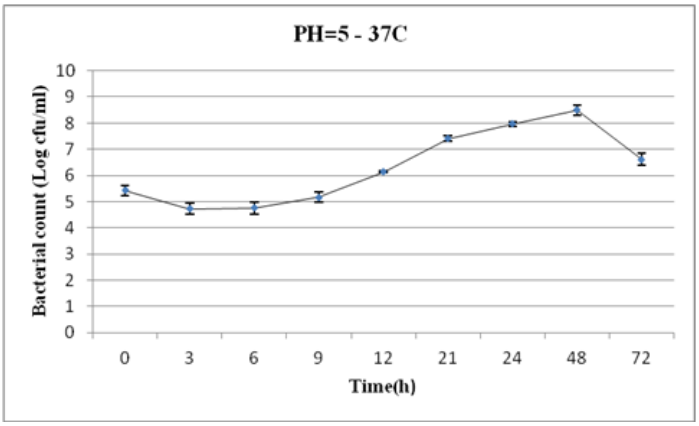


نمودار ۳- رشد باکتری *اشریشیاکلی* در عصاره تجاری گوشت مرغ تحت تأثیر pH برابر۵ در دمای ۸ درجه سانتیگراد

همچنین در گروه‌های تیمار دیگر با همان pH پس از طی ۷۲ ساعت که در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری شده بودند نشان می‌دهد میانگین لگاریتم cfu/ml رشد باکتری با سه تکرار در زمان شروع ۵/۴۲ بوده و پس از گذشت ۳ ساعت به ۴/۷۳ کاهش یافته است. پس از آن به طور تدریجی تا زمان ۴۸ ساعت با میانگین ۸/۴۹ افزایش داشته اما در زمان آخر یعنی ۷۲ ساعت میانگین به ۶/۶۱ کاهش پیدا کرده است که به ترتیب نشان دهنده کاهش جمعیت باکتری به میزان log ۰/۶۹ و .۱/۸۸ است.

جدول ۴- رشد باکتری *اشریشیاکلی* در عصاره تجاری گوشت مرغ تحت تأثیر pH برابر ۵ در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد

شاخص آماری	۰	۳	۶	۹	۱۲	۲۱	۲۴	۴۸	۷۲
میانگین	۵/۴۲	۴/۷۳	۴/۷۶	۵/۱۷	۶/۱۴	۷/۴۱	۷/۹۷	۸/۴۹	۶/۶۱
انحراف معیار	۰/۳۵	۰/۳۹	۰/۳۹	۰/۳۲	۰/۰۷	۰/۲۱	۰/۱۶	۰/۳۴	۰/۴۱
خطای معیار	۰/۲۰	۰/۲۳	۰/۲۳	۰/۱۹	۰/۰۴	۰/۱۲	۰/۰۹	۰/۱۹	۰/۲۴

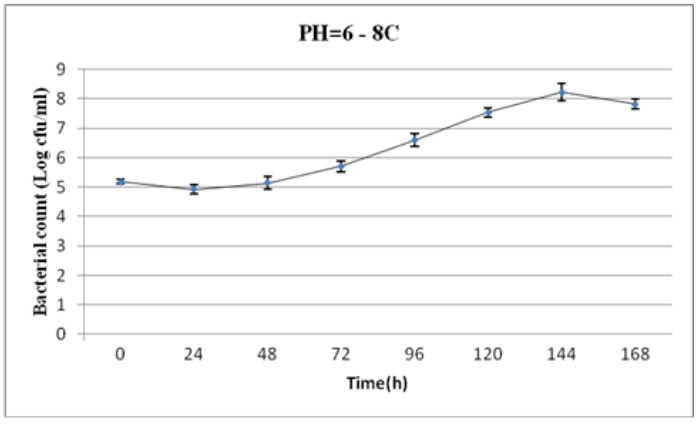


نمودار ۴- رشد باکتری *اشریشیاکلی* در عصاره تجاری گوشت مرغ تحت تأثیر pH برابر ۵ در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد

نتایج به دست آمده از شمارش باکتری *اشریشیاکلی* در گروه‌های تیمار آخر با pH برابر ۶پس از طی ۱۶۸ ساعت که در دمای ۸ درجه سانتیگراد نگهداری شده بودند نشان می‌دهد که میانگین لگاریتم cfu/ml رشد باکتری با سه تکرار در زمان شروع ۵/۱۹ بوده و پس از گذشت ۲۴ ساعت به ۴/۹۲ کاهش یافته است. پس از آن به طور تدریجی تا زمان ۱۴۴ ساعت با میانگین ۸/۲۲ افزایش داشته اما در زمان آخر یعنی ۱۶۸ساعت میانگین به ۷/۸۲ کاهش پیدا کرده است که به ترتیب نشان دهنده کاهش جمعیت باکتری به میزان log ۰/۲۷ و ۰/۴ است.

جدول ۵- رشد باکتری *اشریشیاکلی* در عصاره تجاری گوشت مرغ تحت تأثیر pH برابر ۶ در دمای ۸ درجه سانتیگراد

شاخص آماری	۰	۲۴	۴۸	۷۲	۹۶	۱۲۰	۱۴۴	۱۶۸
میانگین	۵/۱۹	۴/۹۲	۵/۱۴	۵/۷۰	۶/۵۹	۷/۵۴	۸/۲۲	۷/۸۷
انحراف معیار	۰/۱۲	۰/۲۸	۰/۳۷	۰/۳۴	۰/۳۹	۰/۲۶	۰/۵۲	۰/۲۹
خطای معیار	۰/۰۷	۰/۱۶	۰/۲۱	۰/۲۰	۰/۲۲	۰/۱۵	۰/۳۰	۰/۱۷



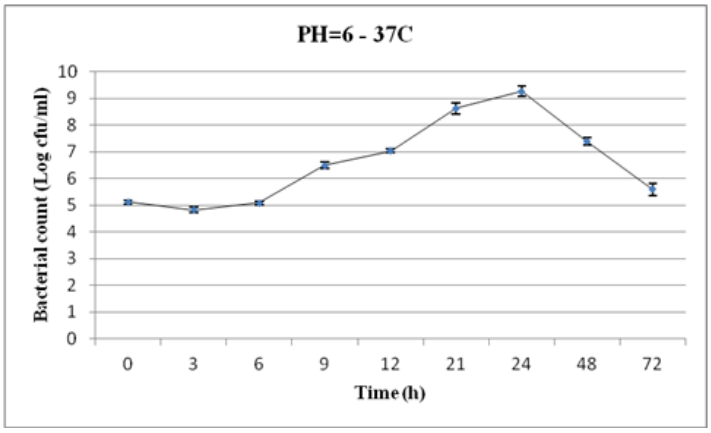
نمودار ۵- رشد باکتری *اشریشیاکلی* در عصاره تجاری گوشت مرغ تحت تأثیر pH برابر ۶ در دمای ۸ درجه سانتیگراد

همچنین در گروه‌های تیمار دیگر با همان pH پس از طی ۷۲ ساعت که در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری شده بودند نشان می‌دهد میانگین لگاریتم cfu/ml رشد باکتری با سه تکرار در زمان شروع ۵/۱۱ بوده و پس از گذشت ۳ ساعت بعد به ۴/۸۳ کاهش یافته است. پس از آن به طور تدریجی تا زمان ۲۴

ساعت با میانگین ۹/۲۶ افزایش داشته اما در زمان آخر یعنی ۷۲ ساعت میانگین به ۵/۵۹ کاهش پیدا کرده است که به ترتیب نشان دهنده کاهش جمعیت باکتری به میزان log ۰/۲۸ و ۳/۶۷ است.

جدول ۶- رشد باکتری *اشریشیاکلی* در عصاره تجاری گوشت مرغ تحت تأثیر pH برابر ۶ در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد

شاخص آماری	۰	۳	۶	۹	۱۲	۲۱	۲۴	۴۸	۷۲
میانگین	۵/۱۱	۴/۸۳	۵/۰۸	۶/۴۹	۷/۰۴	۸/۶۳	۹/۲۶	۷/۳۹	۵/۵۹
انحراف معیار	۰/۰۹	۰/۱۸	۰/۱۲	۰/۲۲	۰/۱۴	۰/۳۷	۰/۳۵	۰/۲۳	۰/۳۹
خطای معیار	۰/۰۵	۰/۱۰	۰/۰۷	۰/۱۳	۰/۰۸	۰/۲۲	۰/۲۰	۰/۱۳	۰/۲۳



نمودار ۶- رشد باکتری *اشریشیاکلی* در عصاره تجاری گوشت مرغ تحت تأثیر pH برابر ۶ در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد

بحث

نتایج تحقیق حاضر مطابق با انتظار نشان داد که رشد باکتری *اشریشیاکلی* در عصاره تجاری گوشت مرغ تحت تأثیر pH برابر ۴ با گذشت زمان کاهش معنی داری نشان داده است، اما تحتpH های ۵ و ۶ کاهش نشان نداده است. این نتیجه با تحقیقات گذشته که تاثیر pH را روی رشد باکتری‌های مختلف بررسی کرده اند همسو و هماهنگ است (مانند: رضویلر و همکاران، ۱۳۸۱؛ رضویلر و فضل آرا،۱۳۸۱؛ Valero et.al., 2009).

رضویلر و همکاران در سال ۱۳۸۱، میزان pH مرز رشد و عدم رشد و مرز بقا و مرگ *استافیلوکوکوس اورئوس* را با استفاده از اسیدهای آلی و معدنی در حرارت‌های مختلف نگه‌دای تعیین کردند. آن‌ها خاصیت ضد میکروبی(pH مرز رشد و عدم رشد و مرز بقا و مرگ) سه اسید آلی(استیک، لاکتیک، سیتریک) و یک اسید معدنی (هیدروکلریک) را در مقابل استافیلوکوکوس اورئوس مورد مقایسه قرار دادند. آنها در این تحقیق رفتار *استافیلوکوکوس اورئوس* از نظر رشد درpH های مختلف (۴ تا ۶ با اختلاف‌های ۰/۲ واحد) با استفاده از اسیدهای آلی و معدنی در محیط آبگوشت (BHI) در حرارت‌های مختلف(۱۵، ۲۵ و ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد) به مدت ۱۴ روز جهت تعیین مرزهای رشد و عدم رشد و نیز مرزهای بقا و مرگ سلول باکتری مورد مطالعه‌ی آنالیز چند فاکتوری قرار دادند. بالاترین pH حد مرز رشد و عدم رشد در مورد اسید استیک با مقایر مختلف ۵ و ۵/۲، ۵/۲ و ۵/۴، ۵/۶ و ۵/۸ به ترتیب در حرارت‌های ۳۵، ۲۵ و ۱۵ مشاهده شده است. پایین‌ترین pH حد مرز رشد و عدم رشد در مورد اسید هیدروکلریک در حرارت‌های ۳۵ و ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد برابر با ۴> و ۴ و در حرارت ۱۵ درجه‌ی سانتی‌گراد برابر با ۴/۸ و ۵ تعیین گردید. در

این مطالعه قدرت باکتری اسیدی اسید استیک بیش از سایر اسیدها بود و پس از آن به ترتیب اسید لاکتیک، سیتریک و در نهایت هیدروکلریک قرار داشتند. کاهش درجه حرارت نگه‌داری در تمامی اسیدهای مورد استفاده باعث افزیش pH رشد و نیز بقا و مرگ سلول باکتری گردیده است.

رضویلر و فضل آرا در سال ۱۳۸۱، میزان رشد *استافیلوکوکوس آرئوس* متأثر از عوامل انتخابی رشد را در سوپ‌های آماده‌ی تجاری مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها در طی یک مطالعه‌ی تلقیحی چند فاکتوری، اثرات مقادیر مختلف pH (۵، ۴/۵ و ۴)، میزان تلقیح اولیه‌ی باکتری ($۱۰^{۲}$ و $۱۰^{۴}$ میلی‌لیتر سوپ) درجه حرارت نگه‌داری(۵، ۱۵،۲۵، ۳۵ و ۴۵ درجه‌ی سانتی‌گراد) و نیز نوع سوپ تجارتی(سوپ جو و سوپ قارچ) بر روی زمان دو برابر شدن باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* را بررسی کردند. در این تحقیق مدت زمان دو برابر شدن باکتری به طور معناداری تحت تاثیر نوع سوپ، حرارت و نیز اثرات تداخلی این دو قرار گرفت ($P\leq ۰/۰۵$). ولی میزان تلقیح اولیه باکتری در این مطالعه تاثیر معنی‌داری در میزان رشد باکتری نداشت($P=۰/۱۸۲$). آن‌ها با استفاده از معادله‌ی رگرسیون و ترانسفورماسیون‌های مناسب، ارتباط زمان دو برابر شدن باکتری به عنوان متغیر وابسته با مقادیر مختلف عوامل مورد نظر رشد و نیز اثرات تداخلی آن‌ها به عنوان متغییرهای مستقل به صورت مدل پیشگو تهیه کردند و در نهایت با استفاده ار مدل تهیه شده، زمان دو برابر شدن *استافیلوکوکوس اورئوس* در محدوده‌ی دامنه‌ی متغیرهای به کار گرفته شده با قدرت پیشگویی، به نحو مطلوبی قابل محاسبه و پیشگویی بود.

Valero و همکارانش در سال ۲۰۰۹، رفتار میکروبی پنج گونه انتروتوکسیژنیک از *استافیلوکوکوس اورئوس* را تحت تاثیر دما، pH و فعالیت آبی را بر روی احتمال رشد یا عدم رشد مورد مطالعه قرار دادند. معادله رگرسیون لوجستیک چند جمله ای با استفاده از یک روش گام به گام برای بررسی اثر دما (۸، ۱۰، ۱۳، ۱۶ و ۱۹ درجه سلسیوس)، pH (۴/۵، ۵، ۵/۵، ۶، ۶/۵، ۷ و ۷/۵) و فعالیت آبی(۱۹ در سطوح بین۰/۸۶۷ تا۰/۹۹۹) روی احتمال رشد در نظر گرفتند. پیش بینی‌ها نشان دادند سطح مشترک رشد و عدم رشد تنها در شرایط بهینه و در دماهای بالاتر از ۱۳ درجه شکل می‌گیرد. مقدار pH بهینه ۶/۵ بوده ودر محدوده ۷ تا ۷/۵ احتمال رشد قدری کاهش پیدا می‌کرد. در pHبرابر ۷ و دمای ۱۹ درجه سلسیوس مقدار بهینه فعالیت آبی برای شروع رشد. *استافیلوکوکوس آرئوس* برابر ۰/۸۶۷ بدست آمده است. در نهایت بین نتایج حاصل از پیش بینی و داده‌های تئوریک در شرایط طبیعی گوشت و گوشت پخته مقایسه انجام دادند. در نتیجه این مقایسه در حالت‌های شامل رشد تطابق۹۴٪ و در شرایط عدم رشد تطابق۶۲٪ بین داده‌ها مشاهده شد. پایین تر بودن تطابق در حالت اخیر را می‌توان به انداره عوامل محیطی نسبت داد. انجام این مطالعه به تصمیم گیری بهتر در مورد فرمولاسیون‌های محصولات غذایی برای پیشگیری از رشد *استافیلووکوکوس آرئوس* و تولید انتروتوکسین در جریان ماندگاری مواد غذایی کمک کرد.

نتایج تحقیقات مذکور حاکی از این است که انواع باکتری در pHهای پایین معمولا رشد کمتری دارند. دلیل این امر آن است که مطابق با گزارش توکلی و همکاران (۱۳۸۷) رشد بهینه باکتری *اشریشیاکلی* در دامنه pH برابر ۹-۴/۴ رخ می‌دهد. معمولا باکتری‌ها و از جمله باکتری *اشریشیاکلی* در محیط‌های اسیدی تر مانند محیط با pH برابر ۴ رشد کمتری دارند. تحلیل‌های بیشتر روی داده‌های تحقیق حاضر نشان دادند که pH برابر ۴ نسبت به pHهای ۵ و ۶ اثر معنی داری بر لگاریتم رشد باکتری *اشریشیاکلی* دارد اما بر خلاف انتظار رشد باکتری *اشریشیاکلی* در دو دمای ۸ و ۳۷ درجه سانتی گراد با یکدیگر تفاوت معنی دار ندارد.

هر چند این یافته خلاف انتظار است و مطابق با فرضیه تحقیق که دما بر رشد باکتری تأثیر دارد پس باید رشد باکتری در دمای ۸ درجه سانتی گراد کمتر از رشد آن در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد باشد، اما این یافته با تحقیقات قبلی ناهماهنگ است و لازم است پژوهش‌های بیشتری انجام گیرد تا بهینه دمای رشد این باکتری مشخص شود.

منابع

۱. استوارت، والکر. (۱۳۸۳). مروری بر میکروب شناسی باکتری‌ها و بیماری‌های باکتریایی. ترجمه: موسویان. مجتبی، انتشارات دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز.

۲. بنیادیان، مجتبی. (۱۳۸۲). تولید پنیر سفید معطر ایرانی با استفاده از عصاره ی برخی گیاهان سنتی و مطالعه تـأثیرآنها بر چگونگی بقا و رشد باکتری اشریشیاکلی در این فرآورده ها. پایان نامه دکترای تخصصی.دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران.

۳. توکلی، حمیدرضا.، دباغ مقدم، آراسب.، آقازاده مشکی، مهزاد و قناتی، کیاندخت. (۱۳۸۷). میکروبیولوژی مواد غذایی(نظری و عملی) و کنترول بهداشتی مراکز تهیه و توزیع غذا. انتشارات مرز دانش، چاپ دوم، صفحه: ۲۲-۲۷.

۴. رضویلر، ودود. (۱۳۸۱). میکروب‌های بیماریزا در موادغذایی و اپیدمیولوژی مسمومیت‌های غذایی. موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران، صفحه ۸۴-۹۰,

۵. رضویلر، ودود.، جمشیدی، عبدالله و آخوندزاده، افشین. (۱۳۸۱). مدل سازی رشد فاکتوریل استافیلوکوکوس آرئوس, متاثر از عوامل pH, غلظت نمک, میزان تلقیح, حرارت و زمان نگهداری. مجله دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه تهران، شماره ۱، صفحه: ۳۱-۳۶.

۶. رضویلر، ودود.، جمشیدی، عبدالله و شمشادی، بهار. (۱۳۸۱). تعیین میزان pH رشد و عدم رشد و مرز بقا و مرگ استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از اسیدهای آلی و معدنی در حرارت‌های مختلف نگه‌داری. مجله دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه تهران، صفحه: ۴۱-۳۸.

۷. رضویلر، ودود و فضل آرا، علی. (۱۳۸۱). مطالعه و مدلسازی میزان رشد استافیلوکوکوس اورئوس در سوپ‌های آماده تجاری متاثر از عوامل انتخابی رشد را در سوپ‌های آماده‌ی تجاری. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران. شماره ۳، صفحه: ۶۵-۷۲.

۸. زنجیربند، مریم.، کسری کرمانشاهی، روحا و گلبانگ، ناصر. (۱۳۸۸). جداسازی و شناسایی باکتری‌های نمک دوست نسبی و بررسی اثر تغییرات دما و pH محیط کشت بر رشد آن ها. مجله تاکسونومی و بیوسیستماتیک، شماره اول، صفحه: ۳۲-۲۱.

۹. فرج زاده، داوود. (۱۳۸۲). آشنایی با میکروب‌های مهم مواد غذایی. انتشارات نور دانش با همکاری مرکز و نشر دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، چاپ دوم، صفحه: ۳۱۶.

۱۰. لک، الناز. (۱۳۸۶). مطالعه تأثیر ضد میکروبی گیاهان آویشن شیرازی، زیره و نعنا بر باکتری O157:H7 *E.coli* در سوپ تجاری عصاره مرغ. پایان نامه دکترای عمومی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز.

11. Collee, J.G., duguid, J.P., Fraser, A.G., and Marmion, B.P. 1990. Machie and MacCartney. Practical Medical Microbiology. Churchill Livingstone. 456-481.

12. Ercole, C., Gallo, M., Mosiello, L., Baccella, S., and Lepidi, A. 2003. Escherichia coli detection in vegetable food by a potentiometric biosensor. Sensors and Actuators B: Chemical. 91: 163-168.

13. Saldana, G., Monfort, S., Condon, S., Raso, J., and Alvarez, I. 2012. Effect of temperature, pH and presence of nisin on inactivation of Salmonella typhimurium and Escherichia coli O157:H7 by pulsed electric field. Food Res Int. 45: 1080-1086.

14. Tzschoppe, M., Martin, A., and Beutin, L. 2012. A rapid procedure for the detection

and isolation of enterohaemorrhagic Escherichia coli EHEC serogroup O26, O103, O111, O118, O121, O145 and O157 strains and the aggregative EHEC O104:H4 strain from ready-to-eat vegetables. Int J Food Microbiol. 152:19-30.

15. Valero, A., Perez-Rodríguez, A.F., Carrasco, A.E., Fuentes-Alventosa, J.M., García-Gimeno, R. M., and Zurera, G. 2009. Modelling the growth boundaries of Staphylococcus aureus: Effect of temperature, pH and water activity. Int J Food Microbiol. 133. 186-194.
16. Georges, K., and Michael, A. 1998. Medical microbiology, Mosby publishers, PP: 227-233.

The growth modelling of *Escherichia coli* in commercial chicken meat extract affecting by temperature and pH factors

Ghaseminezhad A[1*], Fazlara A[2], Rahimi E[3]

1. Department of Food Science and Thechnology, Khuzestan Science and research Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran.

2. Department of Food Science and Thechnology, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran.

3. Department of Food Hygiene and Safety, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, shahrekord, Iran.

***Corresponding Author:** *annaghaseminezhad@yahoo.com*

Received: 2015.11.04 Accepted: 2016.02.12

Abstract

The purpose of this study is to provide a predictive model of *Escherichia coli* growth undr different conditions such as heat storage (8 ° and 37 ° C) and pH (4, 5 and 6) in a commercial chicken extract. For this purpose, a commercial extract of chicken prepared using acetic acid and 0/1 normal profit on the desired pH was adjusted. The level of 10^5 cfu / ml of *E. coli* extracts prepared to be inseminated. 8 and 37 ° C extracts were kept at two different temperatures and at different times of the sampling, dilution and the surface culture on Mac conkey Agar was developed. The results showed growth at pH 4 to 5 and 6 was significantly less than pH and reduces the growth of bacteria at temperatures of 8 and 37 ° C with no significant difference.

Keywords: *Escherichia coli*, chicken extract, Ttemperature, pH.