مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره ۱۳، اسفند ۱۳۹۳، ۱۱۱٤-۱۱۰۵

ارزیابی کفایت محیط‌های غنی‌کننده هم‌زمان به منظور بازیافت استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا منوسایتوژنز و اشریشیاکلی انتروهموراژیک

رحیمه عباسلو[۱]، محمد کارگر[۲]، اکرم نجفی[۳]

دریافت مقاله: ۹۳/۴/۱۸ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۳/۷/۲۶ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۳/۱۲/۲ پذیرش مقاله: ۹۳/۱۲/۳

چکیده

زمینه و هدف: با توجه به مقدار کم پاتوژن‌ها در غذا، طراحی یک محیط غنی‌کننده که بتواند همزمان چند پاتوژن را در زمان مناسب و به میزان کافی بازیافت نماید، یکی از اهداف مهم میکروب‌شناسی است. هدف از این پژوهش، غنی‌سازی همزمان سه پاتوژن غذایی لیستریا منوسایتوژنز، استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی انتروهموراژیک در نمونه شیر می‌باشد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه به صورت تجربی در سال ۱۳۹۱ در کرمان انجام شد. در ابتدا ۵ محیط غنی‌کننده هم زمان شامل TSB، TB، TSBYE، SEB و TSB (1.5%NaCl) تهیه گردید. این محیط ها برای بازیافت *لیستریا منوسایتوژنز*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیاکلی انتروهموراژیک* توسط روش کشت بررسی شدند. سپس نمونه‌های شیر استریلیزه و پاستوریزه با سوسپانسیون‌های تکی و سه تایی پاتوژن‌های هدف و غیر هدف به طور مصنوعی آلوده گردیدند. سپس بازیافت ۵ محیط غنی‌کننده هم زمان برای نمونه‌های آلوده شده در سه زمان ۸، ۱۸ و ۲۴ ساعت به صورت کیفی توسط روش کشت ارزیابی شد.

یافته‌ها: تمام محیط‌ها قادر به بازیافت تکی و سه تایی پاتوژن‌های مورد مطالعه بودند. با توجه به مواد غذایی موجود در شیر محیط‌ها در زمان ۸ ساعت نیز موفق به بازیافت شدند. اما به علت ترکیبات مهاری نمونه شیر، رشد باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا منوسایتوژنز مهار گردید.

نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش نشان داد محیط SEB بر اساس ۱۸ ساعت گرمخانه‌گذاری بهترین بازیافت را برای پیدایش همزمان باکتری‌های مورد پژوهش دارد. از طرفی محیط TB نیز برای اولین بار در بازیافت همزمان سه پاتوژن مورد مطالعه ارزیابی شد و در بازیافت موفق گردید.

واژه‌های کلیدی: تشخیص همزمان، اشریشیاکلی انتروهموراژیک، استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا منوسایتوژنز

۱- کارشناس ارشد گروه آموزشی میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، جهرم، ایران
۲-(نویسنده مسئول) دانشیار گروه آموزشی میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، جهرم، ایران
تلفن: ۰۷۱۱-۶۴۷۶۱۰۱، دورنگار: ۰۷۱۱-۶۴۷۶۱۰۱، پست الکترونیکی: mkargar@jia.ac.ir
۳- دانشجوی دکتری مرکز تحقیقات زیست فن‌آوری دریایی خلیج فارس، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1393.13.12.2.5]

مقدمه

پاتوژن‌های منتقله از غذا به عنوان یکی از عوامل اصلی مسمومیت‌های غذایی می‌باشند و آلودگی ناشی از آنها مشکل عمده سلامت عمومی جهان است [۱]. از جمله اصلی‌ترین پاتوژن‌های مسبب مسمویت‌های غذایی می‌توان به استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا منوسایتوژنز و اشریشیاکلی انتروهموراژیک اشاره نمود [۲]. بنابراین بحث شناسایی و تشخیص پاتوژن‌های غذایی یکی از مسائل مهم سازمان بهداشت جهانی است. لذا انواعی از روش‌های شناسایی پاتوژن‌های غذایی وجود دارد که گذشته از حساس و گران بودن می‌توانند اطلاعاتی از کمیت و کیفیت حضور میکروارگانیسم در نمونه غذا ارائه دهند [۴-۳]. از آنجایی که معمولاً مقدار پاتوژن‌های غذایی در غذاها بسیار کم است، روش غنی سازی یکی از نیازهای تشخیص این پاتوژن‌ها است [۳]. از طرف دیگر بحث زمان و هزینه در شناسایی این پاتوژن‌ها بسیار حائز اهمیت است. همچنین، تشخیص همزمان چند نوع پاتوژن غذایی و مصرف چند نوع محیط غنی‌کننده انتخابی زمان بر، پر هزینه و دشوار است [۵]. بنابراین طراحی یک محیط غنی‌کننده همزمان که بتواند چند پاتوژن را در زمان مناسب به میزان کافی رشد دهد یکی از اهداف میکروب شناسی است [۶]. یک غنی‌کننده مناسب باید بتواند در مقابل ترکیبات مهارکننده نمونه غذا، اثر فلور طبیعی و پاتوژن‌های غیر هدف، دارای کیفیت بازیافت مناسبی از پاتوژن‌ها در زمان مناسب باشد [۱۰-۷]. در چند سال گذشته مطالعاتی به منظور تهیه محیط‌های غنی‌کننده همزمان برای رشد برخی گونه‌های بیماری زا صورت گرفته است. از این جمله می‌توان به محیط UPB (Universal Preenrichment Broth) [۱۱]، SEL (Selective Enrichment Broth) [۹]، SSL (Selective Enrichment Broth) [۱۲] اشاره نمود. از بین این موارد، محیطی ارزشمند است که بر روی رشد پاتوژن‌های هدف بی‌تأثیر یا کم اثر باشد و رشد ارگانیسم‌های غیر هدف را مهار نماید. مواد غذایی ممکن است به فراوانی به باکتری اشریشیاکلی آلوده شوند. بنابراین حضور این ارگانیسم در مواد غذایی می‌تواند نشان دهنده آلودگی مواد غذایی به مدفوع باشد [۱۴-۱۳]. لیستریا منوسایتوژنز به عنوان یکی از پاتوژن‌های منتقله از طریق غذا، می‌تواند محصولات لبنی را آلوده نماید. این ارگانیسم دارای فاکتورهای بیماری‌زای متعدد بوده و می‌تواند سبب ایجاد بیماری شدید لیستریوز به ویژه در افراد در معرض خطر مانند زنان باردار، نوزادان، افراد مسن و افراد دارای ضعف سیستم ایمنی گردد [۱۵].

استافیلوکوکوس اورئوس می‌تواند گستره وسیعی از بیماری‌ها از جمله عفونت‌های پوستی شامل جوش‌ها، سلولیت، سندرم شوک توکسیک، زرد زخم و آبسه‌ها تا بیماری‌های تهدید کننده حیات از قبیل پنومونی، مننژیت، اندوکاردیت و سپتی‌سمی ایجاد نماید [۱۴، ۱۱]

این مطالعه با هدف ارزیابی ۵ محیط غنی‌کننده همزمان تحت شرایط یکسان آزمایشگاهی، جهت جداسازی سه پاتوژن مهم غذایی شامل لیستریا منوسایتوژنز، استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی انتروهموراژیک انجام شد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش به صورت تجربی بر روی سویه‌های استاندارد اشریشیاکلی $O_{157}:H_7$ (PTCC 43889)، استافیلوکوکوس اورئوس (PTCC 51740) و لیستریا منوسایتوژنز (PTCC 1163) تهیه شده از مجموعه میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران انجام گرفت. در این مطالعه به منظور ارزیابی غنی‌سازی همزمان از ۵ محیط کشت استفاده شد. این محیط‌ها شامل: SEB

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1393.13.12.2.5]

(Simultaneous Enrichment Broth) پیشنهاد شده به وسیله Kobayashi و همکارش[۱۰]؛ TSB (Tryptic Soy Broth) پیشنهاد شده به وسیله Jiang و همکاران [۶] و Omiccioliو همکاران[۱۶]؛ TSBYE (TSB with 6% Yeast Extract) پیشنهاد شده به وسیله Lei و همکاران[۱۷]؛ TSB واجد ۱/۵٪ نمک طعام و TB (Tryptose Broth) مربوط به شرکت مرک آلمان بوده است.

برای کشت باکتری‌ها در محیط‌های غنی کننده همزمان ابتدا سوسپانسیون‌های جداگانه اشریشیا کلی $O_{157}:H_7$ (PTCC 43889)، استافیلوکوکوس اورئوس (PTCC 51740) و لیستریا منوسایتوژنز (PTCC 1163) و مخلوط هر سه پاتوژن ذکر شده با رقت 10^{-1} cfu/ml تهیه گردید. سپس این سوسپانسیون‌ها به طور جداگانه در پنج محیط غنی‌کننده همزمان کشت داده شد و در دمای ۳۶±۱°C به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند [۱۸، ۱۶]. جهت تلقیح باکتری‌ها در نمونه شیر استریل و کشت با استفاده از محیط‌های غنی‌کننده همزمان ابتدا نمونه‌های شیر استریلیزه به طور مصنوعی آلوده گردید. به طوری که هر یک از لوله‌ها حاوی 10^{-1} cfu/ml از سوسپانسیون‌های تکی و سه تایی باکتری‌های هدف بود. سپس با کشت در محیط‌های غنی‌کننده همزمان در دمای ۳۶±۱°C به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند [۱۵، ۱۰].

مرحله بعد تلقیح باکتری‌ها در نمونه شیر پاستوریزه و کشت در محیط‌های غنی‌کننده همزمان بود برای این منظور ابتدا لوله‌های شیر پاستوریزه به طور مصنوعی آلوده گردید [۱۲، ۶]، به طوری که هر یک از نمونه‌ها حاوی 10^{-1} cfu/ml از سوسپانسیون‌های تکی و سه تایی باکتری‌های هدف بود. سپس با کشت در محیط‌های غنی‌کننده همزمان در دمای ۳۶±۱°C به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند

جهت بررسی اثر تلقیح باکتری‌های غیر هدف در شیر برای بازیافت این باکتری‌ها در محیط‌های غنی‌کننده همزمان، نمونه شیر استریلیزه علاوه بر باکتری‌های هدف با باکتری‌های غیر هدف (سراشیا مارسنس، سالمونلا تایفی و باسیلوس سرئوس) با نسبت ۱:۱۰ (10^{-1}cfu/ml) به طور مصنوعی آلوده گردید [۱۹، ۳].

هر یک از سوسپانسیون‌های تهیه شده در تمامی مراحل در سه زمان ۸، ۱۸ و ۲۴ ساعت بر روی محیط‌های اختصاصی، مانیتول سالت آگار (کیولب) برای استافیلوکوکوس اورئوس، سوربیتول مک کانکی آگار (مرک) برای اشریشیاکلی انتروهموراژیک و پالکام آگار (مرک) برای لیستریا منوسایتوژنز کشت گردیدند. همچنین، کفایت بازیافت هر پاتوژن به صورت کیفی بررسی شد [۱۹، ۳]. این پژوهش به صورت تجربی انجام گرفت و نتایج به صورت کیفی گزارش گردید.

نتایج

تمامی پاتوژن‌های مورد پژوهش به صورت جداگانه و سه‌تایی در هر پنج محیط غنی‌کننده همزمان بازیافت شدند. در مقایسه با نتایج مرحله اول مشخص گردید که در بازیافت پاتوژن‌ها به صورت جداگانه، محیط TSB دارای ۱/۵ درصد نمک توانایی بازیافت استافیلوکوکوس اورئوس را ندارد . همچنین، محیط TB نیز توانایی بازیافت لیستریا منوسایتوژنز را نداشت (جدول ۱). در بازیافت پاتوژن‌ها به صورت مخلوط سه‌تایی، محیط TSB و TB توانایی بازیافت لیستریا منوسایتوژنز و محیط SEB نیز توانایی بازیافت استافیلوکوکوس اورئوس را نداشت.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1393.13.12.2.5]

جدول ۱- ارزیابی اثر ترکیبات شیر استریل بر بازیافت باکتری های مورد پژوهش به صورت مخلوط سه تایی

باکتری های مورد بررسی	زمان (ساعت)	TSB	YE	NaCl	TB	SEB
استافیلوکوکوس اورئوس	۸	+	++	-	+	+
	۱۸	-	-	-	+	-
	۲۴	++	+++	++	+	-
اشریشیا کلی انتروهموراژیک	۸	+++	+++	+++	+++	+++
	۱۸	+++	+++	+++	+++	+++
	۲۴	+++	+++	++	+++	+++
لیستریا منوسایتوژنز	۸	+++	+++	+++	++	++
	۱۸	+	-	+	-	++
	۲۴	++	-	+	-	+

-: عدم بازیافت +: بازیافت کم ++: بازیافت متوسط +++: بازیافت زیاد

در مقایسه با نتایج مرحله دوم مشخص گردید که در بازیافت پاتوژن‌ها به صورت جداگانه، محیط‌های TSB و TSBYE توانایی بازیافت لیستریا منوسایتوژنز را در مدت ۲۴ ساعت نداشتند. در بازیافت پاتوژن‌ها به صورت مخلوط سه‌تایی بازیافت لیستریا منوسایتوژنز در محیط TSB همراه با ۱/۵٪ نمک و SEB در زمان ۲۴ ساعت مشاهده نشد، اما در زمان ۱۸ ساعت هر پنج محیط توانایی بازیافت را داشتند (جدول ۲).

جدول ۲- ارزیابی اثر فلورای طبیعی شیر پاستوریزه بر بازیافت باکتری های مورد پژوهش به صورت سه تایی

باکتری های مورد بررسی	زمان (ساعت)	TSB	YE	Nacl	TB	SEB
استافیلوکوکوس اورئوس	۸	+++	+	-	-	++
	۱۸	+++	+++	+++	+++	+++
	۲۴	+++	+++	+++	+++	+++
اشریشیا کلی انتروهموراژیک	۸	+++	+++	+++	+++	+++
	۱۸	+++	+++	+++	+++	+++
	۲۴	+++	+++	+++	+++	+++
لیستریا منوسایتوژنز	۸	+++	+++	+++	+++	++
	۱۸	+++	++	++	+++	+
	۲۴	+	+	-	+	-

-: عدم بازیافت +: بازیافت کم ++: بازیافت متوسط +++: بازیافت زیاد

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1393.13.12.2.5]

در مقایسه با نتایج مرحله سوم مشخص شد که در بازیافت پاتوژن‌ها به صورت تکی، در نمونه شیر خام آلوده (شیر استریل آلوده شده به باکتری‌های هدف و غیرهدف) به پاتوژن‌های هدف به صورت جداگانه، باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی انتروهموراژیک با حضور پاتوژن‌های غیر هدف (سراشیا مارسنس، سالمونلا تایفی و باسیلوس سرئوس) بازیافت شدند. باکتری لیستریا منوسایتوژنز تنها در محیط SEB در زمان ۲۴ و ۱۸ ساعت توانایی بازیافت را داشت. در بازیافت پاتوژن‌ها به صورت مخلوط سه‌تایی، محیط SEB و TSB همراه با ۱/۵ درصد نمک موفق به بازیافت لیستریا منوسایتوژنز در زمان ۱۸ و ۲۴ ساعت شدند و دو محیط SEB و TB نیز توانستند دو باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی انتروهموراژیک را بازیافت نمایند (جدول ۳).

جدول ۳- ارزیابی اثر ترکیبات شیر استریل بر بازیافت باکتری های مورد پژوهش به صورت مخلوط سه‌تایی

باکتری های مورد بررسی	زمان (ساعت)	TSB	YE	Nacl	TB	SEB
استافیلوکوکوس اورئوس	۸	+	++	-	+	+
	۱۸	-	-	-	+	-
	۲۴	++	+++	++	+	-
اشریشیا کلی انتروهموراژیک	۸	+++	+++	+++	+++	+++
	۱۸	+++	+++	+++	+++	+++
	۲۴	+++	+++	++	+++	+++
لیستریا منوسایتوژنز	۸	+++	+++	+++	++	++
	۱۸	+	-	+	-	++
	۲۴	++	-	+	-	+

-: عدم بازیافت +: بازیافت کم ++: بازیافت متوسط +++: بازیافت زیاد

بحث

در مطالعه حاضر بازیافت سوسپانسیون‌های جداگانه و سه تایی پاتوژن‌های مورد مطالعه در هر پنج محیط غنی‌کننده همزمان، در سه زمان ۸، ۱۸ و ۲۴ ساعت مشاهده شد. این یافته‌ها تایید کننده قدرت بازیافت پاتوژن‌های مورد بررسی توسط محیط‌های مورد مطالعه می‌باشد.

امروزه یکی از مسائل مهم در سطح جهان کنترل بهداشت و سلامت مواد غذایی می‌باشد. از این رو در پژوهش حاضر و سایر مطالعات پیشین به دنبال یافتن روش‌های شناسایی آسان‌تر، کم هزینه‌تر، دقیق‌تر، سریع‌تر به منظور حفظ سلامت بوده اند. روش‌های مختلف غنی‌سازی مزایایی مانند ترمیم و بازیافت سلول‌های آسیب دیده، رقیق‌سازی مهارکننده‌های موجود در ماتریکس غذا، افزایش تعداد سلول‌های هدف و در نتیجه افزایش حساسیت روش PCR را دارند [۲۳-۲۰، ۹].

Jiang و همکاران نشان دادند محیط‌های غنی‌کنندهBPW، TSB، NB وUPB قادر به بازیافت سه پاتوژن غذایی اشریشیاکلی مولد وروتوکسین (VTEC) و سالمونلا اس پی پی و لیستریا منوسایتوژنز می‌باشند. همچنین، محیط UPB به دلیل محتوای بافری فراوان و

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1393.13.12.2.5]

عدم حضور عوامل انتخابی و مهاری قادر به بازیافت باکتری‌های آسیب دیده و حساس به pH می‌باشد [۶].

Wang و همکاران از TSBYE به منظور بازیافت ۱۳ پاتوژن غذایی و Lei و همکاران از TSBYE جهت بازیافت ۶ پاتوژن غذایی استفاده نمودند [۲۴، ۱۷] Kawasaki و همکاران از محیط No.17 در مدت ۲۰ ساعت به منظور بازیافت سه پاتوژن سالمونلا اس پی‌پی، لیستریا منوسایتوژنز و اشریشیاکلی $O_{157}:H_7$ استفاده کردند [۲۵، ۸-۷]. دلیل موفقیت این محیط در بازیافت لیستریا منوسایتوژنز کاهش محتوای کربوهیدارتی این محیط بود. Omiccioli و همکاران غلظت‌های متفاوتی از دکستروز را در محیط No.17 جهت بازیافت سه پاتوژن سالمونلا اس‌پی‌پی، لیستریا منوسایتوژنز و اشریشیاکلی $O_{157}:H_7$ بررسی نمودند. از این میان محیط بدون دکستروز موفق‌تر بود [۱۶]. Kobayashi و همکارش از محیط‌های TSB با غلظت‌های متفاوت نمک (۰٪، ۱/۵٪ و ۳٪) و SEB جهت بازیافت ۶ پاتوژن غذایی استفاده کرد. محیط TSB به دلیل کاهش pH رشد لیستریا منوسایتوژنز را حمایت نکرد. اما محیط SEB به دلیل جایگزینی گلوکز با عصاره مخمر قادر بود در مدت ۱۸ ساعت ۶ پاتوژن غذایی را بازیافت نماید [۱۰].

در پژوهش حاضر بازیافت سوسپانسیون‌های جداگانه و سه تایی پاتوژن‌های مورد مطالعه در هر پنج محیط غنی‌کننده همزمان، در سه زمان ۸، ۱۸ و ۲۴ ساعت مشاهده شد. این یافته‌ها تأیید می‌کنند که محیط‌های مورد مطالعه قدرت بازیافت پاتوژن‌های مطالعه را داشته اند. همچنین، در این پژوهش محیط TB برای اولین بار به منظور بازیافت سه پاتوژن مذکور به صورت جداگانه و سه تایی مورد ارزیابی قرار گرفت و بازیافت را موفق نشان داد. این مطالعات بیانگر آن است که محیط‌های غنی‌کننده همزمان به دلیل عدم حضور عوامل انتخابی و مهاری موجود در محیط‌های غنی‌کننده انتخابی توانسته نسبت به بازیافت همزمان کفایت نشان دهد. Eyassu و همکاران پروتئین‌های ضد میکروبی شیر را بررسی و آنها را به صورت آنتی‌بیوتیک‌ها، نیاسین، باقیمانده مواد پاک‌کننده و استریل‌کننده، اسیدهای چرب آزاد و پروتئین‌های ضدمیکروب طبیعی شیر معرفی نمودند [۳].

Mullan پروتئین‌های طبیعی ضد میکروبی شیر را به صورت سیستم لاکتوپراکسیداز (آنزیم لاکتوپراکسیداز، یون تیوسیانات و پراکسید هیدروژن)، ایمونوگلوبولین‌ها، لیزوزیم، لاکتوفرین و پروتئین‌های متصل شونده به ویتامین شناسایی نمود [۱۵]. علاوه بر موارد یادشده، شایان یادآوری است که شیر حاوی پپتیدهای زیست فعالی است که خاصیت ضد میکروبی خاصی نیز دارند. ارگانیسم‌های گرم منفی و کاتالاز مثبت نظیر سودوموناس، کلی فرم‌ها، سالمونلا، شیگلا نه تنها سیستم لاکتوپراکسیداز مانع از فعالیت آنها می‌گردد، بلکه تحت شرایطی آنها را نیز نابود می‌نماید. غشای داخلی باکتری‌های گرم منفی بیش از انواع گرم مثبت توسط سیستم لاکتوپراکسیداز آسیب می‌بینند. سیستم لاکتوپراکسیداز در برابر استافیلوکوکوس اورئوس دارای خاصیت باکتری‌کشی و باکتریواستاتیک می‌باشد [۳]. لیستریا منوسایتوژنز بلافاصله پس از فعال‌سازی سیستم لاکتوپراکسیداز با سرعت بیشتری نابود می‌گردد [۵]. در بخش دوم پژوهش حاضر نمونه شیر استریل با سوسپانسیون‌های تکی و سه تایی پاتوژن‌های مورد مطالعه آلوده شد.

در سه زمان گرمخانه‌گذاری بازیافت محیط‌ها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد محیط غنی‌کننده TB برای لیستریا منوسایتوژنز و TSB با ۱/۵٪ نمک برای

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1393.13.12.2.5]

استافیلوکوکوس اورئوس به دلیل اثر مهاری ترکیبات شیر قادر به بازیافت نیستند؛ اما سه محیط SEB، TSB و TSBYE در بازیافت موفق بودند. این یافته‌ها با نتایج به دست آمده در مطالعات Eyassu، Gaya و Mullan همخوانی دارد [۱۵، ۵، ۳]. در پژوهش حاضر اشریشیاکلی و لیستریا منوسایتوژنز در هر سه زمان بازیافت داشتند اما بیشترین بازیافت در زمان ۸ گزارش گردید. این امر می‌تواند به دلیل حضور ترکیبات مغذی شیر در ۸ ساعت بعد از گرمخانه‌گذاری باشد. بنابراین شاید بتوان سرعت فساد شیر را نیز به حضور این ترکیبات مغذی نسبت داد.

در مرحله سوم پژوهش، تأثیر فلور طبیعی شیر پاستوریزه بر بازیافت پاتوژن‌های هدف مورد ارزیابی قرار گرفت.

بازیافت پاتوژن‌های باکتریایی غذاها از جمله شیر خام و محصولات لبنی غالباً به دلیل حضور شمار زیادی از میکرو فلورای طبیعی و سایر پاتوژن‌ها پیچیده است، زیرا پاتوژن‌های مورد نظر در زمان آزمون ممکن است به دلایل متعددی آسیب دیده و با رشد نمایی فلورا و کاهش pH محیط، رشد پاتوژن‌های غذایی مهار گردد [۱۰، ۷-۶]. یافته‌های پژوهش حاضر هماهنگ با نتایج به دست آمده در سایر مطالعات [۱۰، ۷-۶] نشان می‌دهند که فلورای شیرخام بر روی رشد پاتوژن‌های غذایی سالم و آسیب دیده در محیط‌های غنی‌کننده اثر مهاری دارند، زیرا با رشد فلورا و کاهش pH رشد پاتوژن‌های غذایی به ویژه لیستریا منوسایتوژنز مهار می‌شود.

در این مطالعه محیط SEB در بازیافت همزمان سه پاتوژن در زمان ۱۸ و ۲۴ ساعت در برابر فلور طبیعی شیر موفق بود. این امر را می‌توان به فرمولاسیون محیط SEB و جایگزینی قند با عصاره مخمر و به دنبال آن تغییرات pH کمتر نسبت به سایر محیط‌ها نسبت داد. به همین دلیل این محیط می‌تواند لیستریا منوسایتوژنز حساس به کاهش pH را بازیافت نماید. بر اساس نتایج پژوهش حاضر و مطالعه Kobayashi و همکارش [۱۰]، محیط SEB با این فرمولاسیون در مدت ۱۸ ساعت به جای ۲۴ ساعت بازیافت را انجام می‌دهد. که موجب صرفه جویی در زمان آزمون نیز می‌گردد. همچنین، در این مطالعه برای اولین بار محیط TB به عنوان یک محیط غنی‌کننده همزمان مورد ارزیابی قرار گرفت. که بر اساس نتایج به دست آمده در بازیافت سه پاتوژن به صورت مخلوط سه‌تایی در برابر فلورای طبیعی شیر موفق بوده است.

Jiang و همکاران همچنین، Yu و همکاران نقش پاتوژن‌های غیر هدف را در بازیافت محیط‌های غنی‌کننده بررسی نمودند [۱۲، ۶]. یافته‌های آنها نشان داد پاتوژن‌ها بر رشد یکدیگر اثر مهاری دارند که این مسأله در بازیافت و طراحی یک محیط غنی‌کننده حائز اهمیت است. در مطالعه حاضر از بین محیط‌های غنی‌کننده همزمان SEB، TB و TSBYE تنها محیط SEB در برابر اثر رقابتی پاتوژن‌های غیر هدف موفق به بازیافت پاتوژن‌های هدف گردیدند. این موضوع بیانگر این است که این محیط‌ها توانایی بازیافت این سه باکتری را بیشتر از سایر پاتوژن‌ها دارند و برای تشخیص همزمان این سه باکتری با توجه به متغیرهای مختلف، محیط SEB موفق‌تر از بقیه عمل کرد.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد ترکیبات، فلورای نمونه و پاتوژن‌های غیر هدف در کیفیت بازیافت غنی‌سازی موثر می‌باشند. با توجه به یافته‌های این مطالعه مشخص گردید محیط SEB با مدت زمان ۱۸ ساعت گرمخانه‌گذاری مناسب‌ترین محیط و مناسب‌ترین زمان برای بازیافت پاتوژن‌های مورد مطالعه در نمونه شیر می‌باشند. همچنین،

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1393.13.12.2.5]

پیشنهاد می‌گردد مطالعات بیشتری بر روی استفاده از محیط TB جهت غنی‌سازی همزمان انجام گیرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاون پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی جهرم به دلیل همکاری صمیمانه در انجام این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

[1] Carp-Cărare C, Alina VS, Viorel-Cezar F. Detection and serotyping of *Listeria monocytogenes* in some food products from North-East of Romania. *Revista Română de Medicină de Laborator* 2013; 21(3): 285-92.

[2] Feng P. Rapid methods for the detection of foodborne pathogens: current and next- generation technologies. In: Doyle MP, Beuchat LR. Food Microbiology, Fundamentals And Frontiers. 3rd ed, Washington, ASM Press, 2007; pp: 911–34.

[3] Eyassu S, Elna MB, Donkin EF. Significance of the lactoper -oxidase system in the dairy industry and its potential applications: a review. *Trend Food Sci Technol* 2005; 16(4): 1–18.

[4] Ertas N, Gonulalan Z, Yildirim Y, Karadal F, Abay S, Al S. Detection of Escherichia coli O157:H7 using immunomagnetic separation and mPCR in Turkish foods of animal origin. *Lett Appl Microbiol* 2013; 57(4): 373-9.

[5] Gaya P, Media M, Nunez M. Effect of the lactoperoxidase system on *Listeria monocytogenes* behavior in raw milk at refrigeration temperatures. *Appl Environ Microbiol* 1991; 57(11): 3355–60.

[6] Jiang J, Larkin C, Steele M, Poppe C, Odumeru JA. Evaluation of universal pre-enrichment broth for the recovery of foodborne pathogens from milk and cheese. *J Dairy Sci* 1998; 81(11): 2798-3803.

[7] Kawasaki S, Fratamico P M, Horikoshi N, Okada Y, Takeshita K, Sameshima T, et al. Evaluation of a multiplex PCR system for simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7 in foods and in food subjected to freezing. *Foodborne Pathogen Dis* 2009; 6(1): 81-9.

[8] Kawasaki S, Horikoshi N, Okada Y, Takeshita K, Sameshima T, Kawamoto S. Multiplex PCR for simultaneous detection of *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7 in meat samples. *J Food Protect* 2005; 68: 551–6.

[9] Kim H, Bhunia AK. SEL, a selective enrichment broth for simmultaneous growth of *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74(15): 4853-66.

[10] Kobayashi H, Kubota J**.** Simultaneous enrichment of *Salmonella* spp, *Escherichia coli* O157:H7, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, and *Listeria monocytogenes* by single broth and screening of the pathogens by Multiplex Real-Time PCR. *J Food Sci Technol* 2009; 15(4): 427-38 .

[11] Nam HM, Murinda SE, Nguyen LT, Oliver SP. Evaluation of universal pre-enrichment broth for

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1393.13.12.2.5]

isolation of *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* from dairy farm environmental samples. *Foodborne Pathogen Dis* 2004; 1: 37-44.

[12] Yu YG, Wu H, Liu YY, Li SL, Yang XQ, Xiao XL. A multipathogen selective enrichment broth for simultaneous growth of *Salmonella enterica serovar Enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, and *Listeria monocytogenes*. *Can J Microbiol* 2010; 56(7): 585-97.

[13] Liu D. Identification, subtyping and virulence dete of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *J Med Microbil* 2006; 55: 645-59.

[14] Mandal PK, Biswas AK, Pal UK. Methods for rapid detection of foodborne pathogens: An overview. *Am J Food Technol* 2011; 6(2): 87-102.

[15] Mullan WMA. Dairy science. 2014; Available at: http: // www. dairyscience.info/inhibitors-in-milk/51-inhibitors-in-milk.html. February 11, 2014.

[16] Omiccioli N, Amagliani G, Brandi G, Magnani M. A new platform for Real-Time PCR detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157 in milk. *J Food Microbiol* 2009; 26(6): 615-22.

[17] Lei IF, Roffey P, Blanchard C, Gu K. Development of a multiplex PCR method for the detection of six common food borne pathogens. *J Food Drug Analysis* 2008; 10(4): 37-43.

[18] Anonymous. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs– Preparation of Test Samples, Initial Suspension and Decimal Dilutions for Microbiological Examination– Part 5: Specific Rules for the Preparation of Milk and Milk Products. DIN EN ISO. 2008; 6887–95.

[19] Naravaneni R, Jamil K. Rapid detection of food-borne pathogens by using molecular techniques *J Med Microbiol* 2005; 54(Pt 1): 51-4.

[20] Ge B, Meng J. Advanced technologies for pathogen and toxin detection in foods: Current applications and future directions. *J Assoc Lab Automat* 2009; 14: 235

[21] Jantzen MM, Navas J, dePaz M, Rodríguez B, daSilva WP. Evaluation Of ALOA plating medium for its suitability to recover high pressure-injured *Listeria monocytogenes* from ground chicken meat. *Lett Appl Microbiol* 2006; 43: 313–7.

[22] Mousavi SL, Rasooli I, Nazarian S, Amani J. Simultaneous detection of *E.coli* O157:H7 ,*Toxigenic vibrio cholera* and *Salmonella typhimurium* by multiplex PCR. *Iran J Clin Infect Dis* 2009; 4(2): 97-103.

[23] Wu VCH. A review of microbial injury and recovery methods in food. *Food Microbiol* 2008; 25: 735-44.

[24] Wang RF, Cao WW, Cernilia CE. A universal protocol for PCR detections of 13 species of foodborne pathogens in foods. *J Appl Microbiol* 1997; 83(6): 727-36.

[25] Kawasaki S, Fratamico PM, Horikoshi N, Okada Y, Takeshita K, Sameshima T, Kawamoto S. Multiplex Real-Time Polymerase Chain Reaction assay for simultaneous detection and quantification of *Salmonella* species, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7 in ground pork samples. *Foodborne Pathogen Dis* 2010; 7: 549-54.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1393.13.12.2.5]

Efficiency Assessment of Simultaneous Media to Enrich *Listeria Monocytogenes, Staphylococcus Aureus* and *Enterohaemorrhagic Escherichia Coli*

R. Abbaslou[1], M. Kargar[2], A. Najafi[3]

Received: 09/07/2014 Sent for Revision: 18/10/2014 Received Revised Manuscript: 21/02/2015 Accepted: 22/02/2015

Background and Objective: Due to low quantity of pathogens in foods, designing a broth medium to enrich simultaneously several pathogens through a suitable time to a detectable level is one of point of interest of many microbiologists. This study aimed to enrich simultaneously three food-borne pathogens (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Enterohaemorrhagic Escherichia coli*) transferred by milk products.

Materials and Methods: This experimental study was carried out in Kerman in 2013. First, a mixture of five enrichment media, including TSB, TB, TSBYE, SEB and TSB (NaCl 1.5%) was provided. These mediums were evaluated to enrich of *L.monocytogenes*, *S.aureus* and *Enterohaemorrhagic E. coli* using culture method. Then sterilized and pasteurized milk samples were artificially contaminated with these bacteria, separately and in a mixture. The enrichment ability of these five broth media was evaluated in three times (8, 18 and 24 hours).

Results: All five media were able to enrich the pathogens in both single and triple contaminated tubes. The bacteria in the contaminated milk were enriched through 8 hours, probably due to use of the nutrients in the milk. However, growth of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* were inhibited in the mentioned condition due to the inhibitory components of milk.

Conclusion: Based on results of this study, incubation of the bacteria in SEB broth for 18 hours showed the highest simultaneous enriching ability. Furthermore, it is the first report in which Tryptose Broth was able to show a simultaneous enriching ability for these pathogens.

Key words: Simultaneous, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*

Funding: This research was funded by personal costs.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Ethics Committee of Kerman University approved the study.

How to cite this article: Abbaslou R, Kargar M, Najafi A. Efficiency Assessment of Simultaneous Media to Enrich *Listeria Monocytogenes*, *Staphylococcus Aureus* and *Enterohaemorrhagic Escherichia Coli*. *J RafsanjanUniv Med Sci* 2015; 13(12): 1105-14. [Farsi]

1- MSc Dept., of Microbiology, Jahrom branch, Islamic Azad University of Jahrom, Jahrom, Iran
2- Associate Prof., Dept. of Microbiology, Jahrom branch, Islamic Azad University of Jahrom, Iran (Corresponding Author), Tel: (0711) 6476101, Fax: (0711) 6476101, E-mail: mkargar@jia.ac.ir
3- PhD Student, The Persian Gulf Marine Biotechnology Research Center, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1393.13.12.2.5]