بررسی بار میکروبی کل و جداسازی باکتری *باسیلوس سرئوس* در گوشت های خام (گوسفند، گوساله، شتر، مرغ و بوقلمون) عرضه شده در مراکز توزیع شهرستان شیراز

مهرداد ورنان [۱]* ، امیر سالاری [۲]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
۲- استادیار گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

Email:)varnanm2012@yahoo.com(

چکیده

باسیلوس سرئوس یکی از انواع میکروارگانیسم های قابل انتقال از طریق گوشت و فرآورده های گوشتی است که از عوامل مسمومیت زای مواد غذایی به شمار می رود و دو نوع سم در غذا تولید می کند که فرم اسهال زای آن بیشتر مربوط به گوشت و فرآورده های آن است. هدف از این تحقیق، بررسی بار میکروبی کل و میزان آلودگی گوشت های خام عرضه شده در فروشگاه های محلی به *باسیلوس سرئوس* و ارائه راهکارهای مناسب جهت پیشگیری از آلودگی این منابع مهم غذایی و بهبود وضع بهداشت و سلامت جامعه می باشد. در مطالعه حاضر تعداد ۲۵ نمونه گوشت های خام و تازه گوسفند، گوساله، شتر، مرغ و بوقلمون (هرکدام ۵ تکرار) از فروشگاه ها، کشتارگاه ها و قصابی های مختلف شهرستان شیراز جمع آوری و پس از بسته بندی مجزا در ظروف استریل، نمونه ها به منظور جستجوی باکتری مسمومیت زای *باسیلوس سرئوس* مورد بررسی قرار گرفت که در هیچ یک از آن ها باکتری مذکور یافت نشد. همچنین ۲۴ ساعت و ۷۲ ساعت پس از نمونه گیری، بررسی بار میکروبی کل باکتری های سرمادوست و مزوفیل بر روی تمامی نمونه ها انجام گردید که طبق تحلیل توسط آنالیز واریانس یک طرفه، بار میکروبی کل در گوشت های خام تازه دارای اختلاف معناداری طی ۲۴ ساعت و ۷۲ ساعت پس از نمونه‌گیری بودند.

واژه‌های کلیدی:

***Bacillus Cereus* ، Fresh Meat، Camel Meat ، Calf Meat ، Chicken Meat، Food Poisoning ، Turkey Meat ، Sheep Meat ، Total Count**

۱. مقدمه

در طول دهه ی گذشته، وقوع بیماری های میکروبی ناشی از مواد غذایی نه تنها در کشورهای درحال توسعه بلکه در کشورهای توسعه یافته نیز رو به افزایش بوده است. لذا غذا می تواند به عنوان یک ناقل فعال نقش مهمی را در ایجاد بیماری‌های با منشاء غذایی ایفا نماید. از مهمترین بیماری های غذایی می توان به مسمومیت های غذایی اشاره نمود که طی آن بیمار به عوارض معده ای-روده ای دچار می گردد.

باسیلوس سرئوس یکی از انواع میکروارگانیسم قابل انتقال از طریق گوشت و فرآورده های گوشتی است. این باکتری مخاطره آمیز هوازی و بی هوازی اختیاری، میله ای شکل و اسپورزاست که معمولا در خاک، گرد و غبار و آب یافت می شود. حداقل دمای رشد *باسیلوس سرئوس* حدود ۵ـ۴ درجه ی سانتیگراد و حداکثر آن حدود۵۰-۴۸ درجه ی سانتیگراد و در دامنه pH ۹/۳-۴/۹ گزارش شده است. *باسیلوس سرئوس* از عوامل مسمومیت زای مواد غذایی است و دو نوع سم در غذا تولید می کند و قادر است دو نوع مسمومیت غذایی حاد را در انسان ایجاد کند که فرم اسهال زای آن بیشتر مربوط به گوشت و فرآورده های آن است. شرط ایجاد بیماری مصرف غذای آلوده به سم باکتری است. فرم اسهالی مسمومیت همانند مسمومیت غذایی حاصل از کلستریدیوم پرفرینجنس بوده و علائم آن پس از ۸ تا ۱۶ ساعت ظاهر شده و به مدت ۶ تا ۱۲ ساعت به طول می انجامد. علائم بیماری شامل اسهال، درد های شکمی، درد روده و به ندرت تهوع و استفراغ می باشد. فرم استفراغی آن مشابه مسمومیت غذایی حاصل از استافیلوکوکوس اورئوس می باشد. این نوع انتروتوکسین نسبت به حرارت مقاوم بوده و پس از ۱ تا ۶ ساعت دوره کمون (معمولا ۲ تا ۵ ساعت) موجب استفراغ گردیده و اغلب پس از مصرف برنج آلوده در مصرف کنندگان بروز می کند. تهوع و استفراغ از علائم اصلی این نوع مسمومیت است. این حالت از مسمومیت غذایی باسیلوس سرئوس شدیدتر و حادتر از عارضه ی اسهال می باشد. یکی از مهمترین مواد غذایی ناقل توکسین *باسیلوس سرئوس*، محصولات گوشتی خصوصا گوشت خام می باشد که با توجه به مصرف قابل توجه محصولات گوشتی عرضه شده در فروشگاه ها به عنوان منبع پروتئینی و احتمال وجود باکتری مسمومیت زای *باسیلوس سرئوس* در آنها بایستی اقدامات پیشگیرانه جهت جلوگیری از آلودگی این منابع مهم غذایی به عمل آید که این کار علاوه بر جلوگیری از زیان های اقتصادی و کاهش هزینه های درمان، باعث ارتقای بهداشت و سلامت جامعه و نیز بهبود و تضمین سلامت و ایمنی محصولات گوشتی می گردد. در رابطه با کنترل مسمومیت *باسیلوس سرئوس* می توان به این نکته اشاره نمود که اغلب، وقوع بیماری ناشی از وضعیت نادرست نگهداری غذا در مراکز عمل آوری می باشد. این مشکل در مورد نگهداری گوشت های خام بسته بندی شده می تواند با سردکردن سریع محصول به زیر ۱۰ درجه ی سانتیگراد برطرف شود. تولید هر دو نوع توکسین با رشد باکتری در غذا در ارتباط است. بنابراین شرط ایجاد بیماری، خوردن غذای آلوده به سم باکتری است. تولید توکسین اسهالی در طول رشد لگاریتمی و تولید توکسین استفراغی در طول اسپورزایی میکروب صورت می گیرد. اخیرا تولید این توکسین ها را به پلاسمید نسبت می دهند. توکسین عامل اسهال احتمالا مسئول چرک زایی و تب زایی در خارج از روده توسط این باکتری می باشد ولی مکانیسم عمل توکسین عامل استفراغ این باکتری هنوز مشخص نشده است. عوارض هر دو نوع مسمومیت مذکور معمولا پس از حدود ۱۲ ساعت از بین می رود و همچنین احتمال مسمومیت توسط هر دو نوع انتروتوکسین(همزمان) وجود دارد که در این صورت علامت بیماری، اسهال و استفراغ خواهد بود. طی مطالعاتی که توسط محققین روی برخی از مواد غذایی انجام شد، این باکتری در ۶/۶ درصد از ۵۳۴ نمونه انواع گوشت خام یافت شد. به عنوان مثال با بررسی بیش از ۷۰۰ مورد شیوع بیماری ناشی از مواد غذایی که در فاصله سال های ۱۹۶۱ تا ۱۹۷۲ توسط برایان صورت گرفت، مشخص شد که از لحاظ عوامل موثر در شیوع، سرد کردن ناکافی به تنهایی ۲۵/۵ درصد عوامل آلودگی محصول را در بر می گیرد. برای تهیه غذای سالم، لازم است از آغاز تا پایان کار، دقت و نظارت بهداشتی کافی وجود داشته باشد و اکتفا کردن به محصول نهایی یا بازرسی های گاه به گاه، ناکافی و غیرقابل اطمینان است، به همین دلیل امروزه بسیاری از کشورهای جهان به سیستم تجزیه و تحلیل خطر و کنترل نقاط بحرانی (HACCP[1]) مجهز هستند(۱، ۲، ۳ و ۹).

هدف از این مطالعه، بررسی بار میکروبی کل و میزان آلودگی باسیلوس سرئوس در گوشت های خام عرضه شده در فروشگاه های محلی شهرستان شیراز و ارائه راهکارهای مناسب جهت پیشگیری از آلودگی این منابع مهم غذایی و ارتقاء بهداشت و سلامت جامعه می باشد. هشدار به تولیدکنندگان، مراکز عمل آوری، توزیع کنندگان و مصرف کنندگان جهت رعایت موازین بهداشتی به منظور کنترل نقاط بحرانی و کاهش آلودگی از دیگر اهداف پیش روست.

۲. مواد و روش کار

نمونه های گوشت به صورت تصادفی از فروشگاه ها، قصابی ها و کشتارگاه های شیراز به تعداد ۲۵ نمونه تهیه شد. این نمونه ها از ناحیه سر دست گوشت خام تازه گوسفند، گوساله، شتر و همچنین سینه ی مرغ و بوقلمون (از هر نوع ۵ تکرار) تهیه گردید. هریک از نمونه ها به صورت مجزا درون کیسه فریزرهای استریل قرار داده و تحت شرایط استریل و در دمای ۰ تا ۴ درجه ی سانتیگراد در اسرع وقت به

[1] Hazard analysis critical control points

آزمایشگاه مرکز انتقال داده شد. سپس نمونه ها به صورت مجزا درون ظروف یکبار مصرف استریل قرار گرفته و اطراف آنها به طور کامل سلفون پیچیده شد به طوریکه هوا یا هرگونه آلودگی وارد آن نشود سپس در دمای ۴ تا ۷ درجه ی سانتیگراد نگهداری شد.

به منظور جستجوی باکتری *باسیلوس سرئوس*، ۲۴ ساعت پس از نمونه گیری، نیمی از کل نمونه ها را از یخچال خارج کرده و هر یک از قطعات گوشت های مختلف به صورت جداگانه و تحت شرایط استریل توسط دستگاه استوماکر کاملا هموژن شد. سپس از هر نمونه هموژن شده مقدار ۲ گرم وزن کرده و درون ۱۵ سی سی محیط TSB [۲] گذاشته و به مدت ۴۸ ساعت در اینکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد. پس از ۷۲ ساعت، نمونه های غنی سازی شده در محیط TSB را از اینکوباتور خارج و کاملا هموژن کرده سپس تحت شرایط استریل، یک لوپ از محتویات هر یک از لوله ها برداشته و آن ها را به صورت مجزا روی محیط های سرئوس سلکتیو آگار [۳] حاوی پلی میکسین B و زرده تخم مرغ کشت خطی داده و به مدت ۲۴ ساعت در اینکوباتور ۳۷ درجه ی سانتیگراد قرار داده شد.

همچنین کشت و شمارش بار میکروبی کل باکتری های مزوفیل طی دو مرحله (۲۴ ساعت و ۷۲ ساعت پس از نمونه گیری) طبق استاندارد شماره ۲-۵۲۷۲ سازمان ملی استاندارد ایران انجام شد. کشت و شمارش بار میکروبی کل باکتری های سرمادوست نیز طی دو مرحله (۲۴ ساعت و ۷۲ ساعت پس از نمونه گیری) طبق استاندارد مذکور به روش کشت سطحی انجام و پلیت ها در شرایط هوازی به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور با دمای ۵ تا ۷ درجه ی سانتیگراد قرار داده شد. تعداد کلنی ها به کمک دستگاه کلنی‌کانتر شمارش شد و نتایج توسط برنامه نرم افزار آماری SPSS و انجام آنالیز واریانس یک طرفه مورد بررسی قرار گرفت.

۳. نتایج و بحث

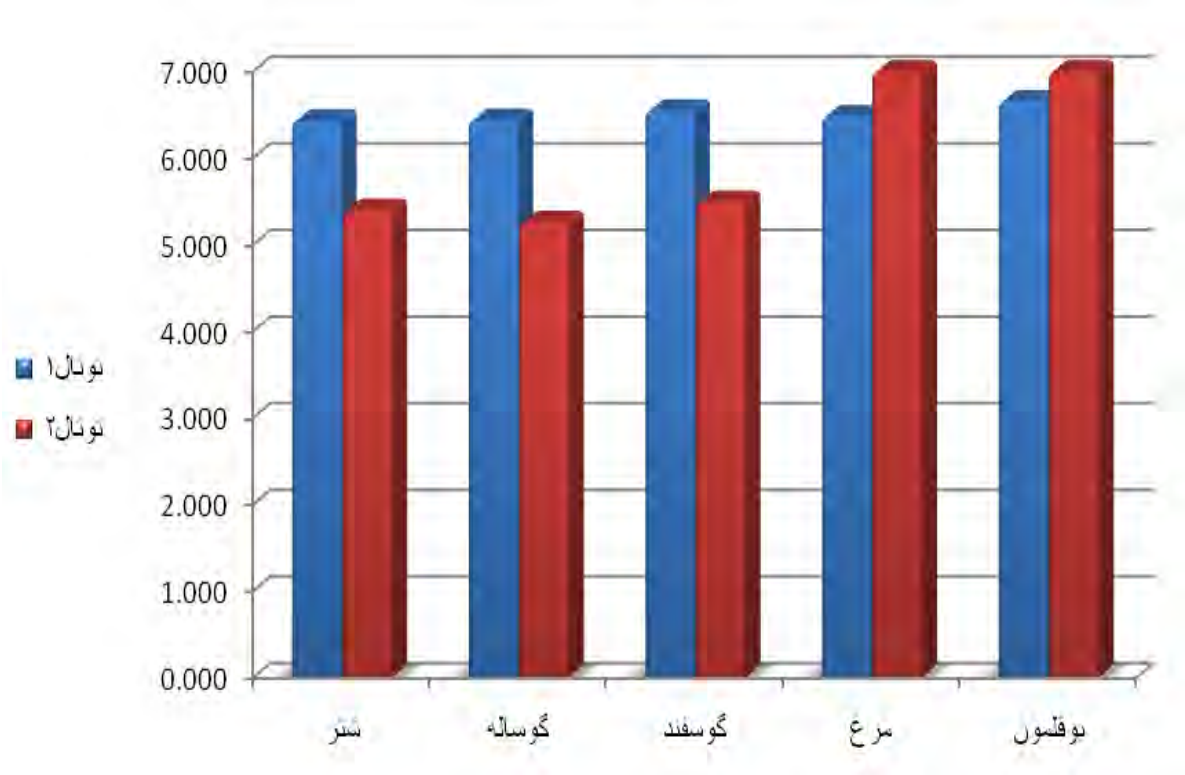
طبق آزمایشات صورت گرفته به منظور جستجوی باکتری مسمومیت‌زای *باسیلوس‌سرئوس* در ۲۵ نمونه از انواع گوشت‌های خام گوسفند، گوساله، شتر، مرغ و بوقلمون، این میکروارگانیسم در هیچ یک از نمونه های مورد بررسی یافت نشد و نتایج آزمون تمامی نمونه ها منفی بود. اما در پی آزمون شمارش کلی میکروبی که در روزهای اول و سوم در دو حالت سرمادوست و مزوفیل بر روی تمامی نمونه ها انجام گرفت، نتایج به صورت ذیل حاصل شد.

---

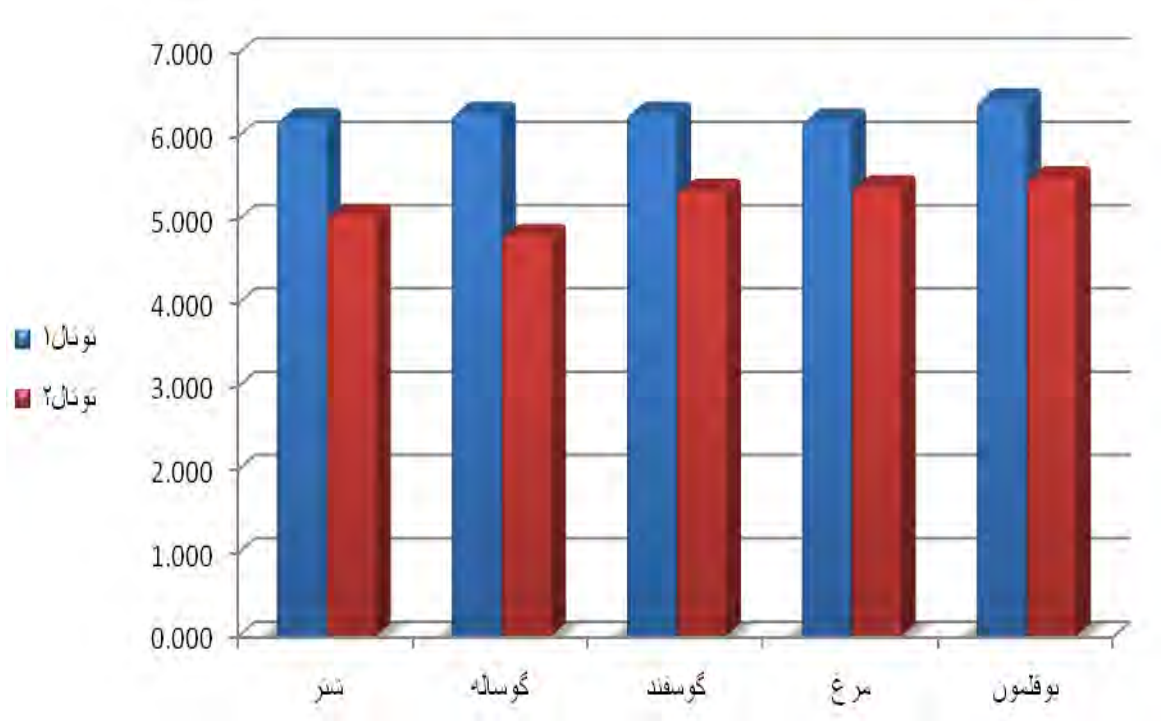
[۲] Trypticase Soy Broth

[۳] Cereus Selective *Agar*

نمودار ۱- مقایسه ی شمارش کلی باکتری های سرمادوست در روزهای اول و سوم در انواع گوشت خام تازه



نمودار ۲- مقایسه ی شمارش کلی باکتری های مزوفیل در روزهای اول و سوم در انواع گوشت خام تازه



* توتال ۱: شمارش کلی میکروبی در روز اول

*توتال ۲: شمارش کلی میکروبی در روز سوم

نمونه ها پس از مقایسه ی میانگین و آنالیز واریانس در سطح ۹۵ /۰ > P مورد بررسی قرار گرفت. طبق آنچه در نمودار شماره ۱، ملاحظه می‌گردد در روز یک (۲۴ ساعت پس از نمونه گیری)، میزان باکتری‌های سرمادوست کم بوده و اختلاف معناداری بین انواع نمونه ها وجود ندارد اما به مرور زمان و با نگهداری نمونه‌ها به مدت سه روز در دمای ۴ تا ۷ درجه‌ی سانتیگراد، باکتری های سرمادوست با سرعت بیشتری رشد و تکثیر کرده به طوری که در شمارش کلی دوم (۷۲ساعت پس از نمونه گیری)، میزان آن‌ها در نمونه گوشت های مرغ و بوقلمون افزایش یافته و اختلاف معناداری بین شمارش کلی میکروبی روز اول و روز سوم در تمامی نمونه ها مشاهده می شود اما کاهش شمارش کلی باکتری های سرمادوست در روز سوم در خصوص گوشت های گوسفند، گوساله و شتر را می توان به کاهش pH بیشتر در این گوشت ها طی جمود نعشی نسبت به گوشت مرغ و بوقلمون نسبت داد و همچنین دیگر دلیل آن می تواند احتمال رشد و تکثیر باکتری های سرماگرا (باکتری‌های مزوفیلی که می توانند در دماهای پایین هم رشد کنند) در نمونه گوشت های گوسفند، گوساله و شتر باشد. از سوی دیگر طبق نمودار شماره ۲، در روز اول (۲۴ ساعت پس از نمونه گیری) تعداد باکتری‌های مزوفیل در نمونه ها بیش از تعداد باکتری‌های سرمادوست مشاهده شد. بنابراین به مرور زمان و طی سه روز نگهداری نمونه‌ها در دمای ۴ تا ۷ درجه‌ی سانتیگراد، شرایط برای رشد باکتری های مزوفیل نامطلوب شده و تعداد آن‌ها طی ۷۲ ساعت رو به کاهش گذاشت که این نتیجه در مورد تمامی نمونه های مورد آزمایش صادق بود. همچنین مقایسه ی بین شمارش کلی باکتری های مزوفیل در انواع گوشت های خام تازه در روز اول با روز سوم، کاهش معناداری را نشان می دهد. در پی تحقیق بدی (۲۰۰۵) بر روی ۷۱ نمونه گوشت و فرآورده های گوشتی شامل جوجه مرغ، گوشت گوسفند یکساله و بالاتر از یکسال، کره مرغ، سوپ مرغ و سوپ گوشت گوسفند یکساله و بالاتر جمعا میزان شیوع *باسیلوس سرئوس* ۵۶/۳ درصد بود. در پژوهش ویلیات (۲۰۰۷) بر روی ۲۰۰ نمونه گوشت گوسفند یکساله و بالاتر از یکسال که به دو صورت خام و پخته شده بود، جمعا ۴۷ نمونه آلوده به *باسیلوس سرئوس* بود که این آلودگی در مورد گوشت خام گوسفند یکساله و بالاتر، ۳۰ درصد بود. طی تحقیق سمیر (۲۰۱۲) بر روی ۱۰۰ نمونه گوشت قیمه شده (خرد شده) شامل کوفته، برگر، خمیر پاسترما و شاورما میزان وقوع *باسیلوس سرئوس* به ترتیب بین ۲۰ تا ۵۰ درصد در نمونه کوفته به دست آمد. طی مطالعه‌ی کانوما (۱۹۹۸) روی برخی از موادغذایی، *باسیلوس سرئوس* در ۶/۶ درصد از ۵۳۴ نمونه انواع گوشت خام، در ۱۸/۳ درصد از ۸۲۰ نمونه‌ی فرآورده های گوشتی و در ۳۹/۱ درصد از ۶۰۹ نمونه‌ی افزودنی های غذایی به میزان 10^{4}-10^{2} در هر گرم یافت شد(۷ و ۸).

۴. نتیجه‌گیری

در مجموع درصدهای به دست آمده در رابطه با میزان بروز و شیوع *باسیلوس سرئوس* در فرآورده‌های گوشتی، منطقه به منطقه می تواند متفاوت باشد و عوامل مختلفی چون شرایط اقلیمی، نحوه فرآوری و بسته بندی محصول، میزان رعایت شرایط و موازین بهداشتی تولید، نگهداری و توزیع، مدت زمان نگهداری محصولات گوشتی، سرعت و دمای سردکردن به عنوان مثال سردکردن گوشت و فرآورده های آن به طور خیلی آهسته پیش از قرار دادن در یخچال که خود مشکل زاست و عدم تخصیص مدت زمان کافی برای خروج ازحالت انجماد گوشت و مرغ یخ زده و نیز ذخیره سازی در دمای نامناسب، می تواند علل اختلاف نتایج پژوهش های مختلف در این رابطه باشد. نظر به این که منشاء مواد اولیه غذا با خاک و آب در ارتباط است لذا تعدادی از باکتری های موجود در این دو عامل محیطی به مواد غذایی راه می یابند و باقی می مانند مگر این که در مراحل تهیه غذا، این باکتری‌ها حذف گردند. علاوه بر این، به طور خاص بعضی از پاتوژن های انسانی از منابع آلوده حیوانی و نیز افراد مرتبط با مواد غذایی سرچشمه می‌گیرند. بررسی ها نشان داده که فقط تعداد کمی از باکتری های فراوانی که در خاک وجود دارد، در مواد غذایی تهیه شده از منشاء گیاهی و حیوانی یافت می شوند، اما در مواد غذایی به دست آمده از آب تازه، دریاها و اقیانوس ها درصد بالاتری از آن ها مشاهده می شود. تعداد کمی از گونه های باکتریایی را می توان در تعدادی از محصولات غذایی نظیر غذاهای تازه و فرآوری شده یافت. در مجموع تحقیقات منتشر شده ی کمی در خصوص بررسی باکتری *باسیلوس سرئوس* در گوشت و فرآورده های آن در دسترس می باشد. یکی از دلایل عمده آن می تواند میزان آلودگی کمی باشد که در این فرآورده ها دیده می شود. مطالعات نشان می دهد که هرچه قطعات گوشت بزرگتر باشد میزان آلودگی هم کمتر می باشد، از این حیث بیشترین آلودگی در گوشت های چرخ شده مشاهده شده است(۱، ۲ و ۵).

مراجع

۱. رضویلر، ودود، **میکروبهای بیماریزا در موادغذایی و اپیدمیولوژی مسمومیت های غذایی**، چاپ سوم، تهران، موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران، (۱۳۸۷)، ص ص ۹-۲ و ۱۵۷-۱۵۳.

۲. جی، **میکروبیولوژی غذایی مدرن**، ترجمه ی مرتضوی، سید علی و مهندس ضیاءالحق، سید حمید رضا، **جلد دوم** (۲۰۰۵) ، ویرایش هفتم، چاپ سوم، مشهد، موسسه چاپ و انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، (۱۳۹۰)، ص ۸۳ و ۱۴۹ و۱۵۷ و ص ص ۱۸۸-۱۸۵.

۳. رکنی، نوردهر، **اصول بهداشت موادغذایی**، چاپ هفتم، تهران، موسسه انتشارات دانشگاه تهران، ۱۳۸۹، ص ۲۸ و ۲۹.

۴. مهدیزاده،م .ا . و علیپور،م .م .(۱۳۷۷) .**آلودگیهای باکتریایی وقارچی مواد غذایی**، انتشارات ارکان، اصفهان، ۸۱-۷۸،۹۳-۹۱.

۵. رکنی، نوردهر(۱۳۸۲)،**علوم و صنایع گوشت**، ویرایش دوم، چاپ سوم، تهران، موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران، ص ص ۲۲-۱و ص۲۳۲،۲۳۱،۲۲۷،۲۲۶.

6. M.M. Willayat, and G.N, Sheikh, G.R. Misgar, "Prevalence of *Bacillus cereus* Biotypes in Raw and Cooked Mutton," Journal of Veterinary Public Health, 2007, 5(2): 123-125.

7. JM. Kramer, and RJ. Gilbert, "*Bacillus cereus* and other *Bacillus species*.In M. P. Doyle (ed.), Foodborne bacterial pathogens". Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y. 1989, pp: 21 – 70.

8. H.K. konuma, M. Shinagawa, Y. Tokuomaru, S. Onoue, N. Konno, T. Fujino, H. Shigehisam, Y. Kurate, Kuwabara, and C.A.M. Lopes, "Occurrence of Bacillus cereus in mmeat products, raw meat and maet product additives," J. Food Prorect, 1988, 51:324-356.

9. F.L. Bryan, "Microbiological food hazards today_based on epidemiological information," Food Technol, 1974, 28(9):52-59.