

بررسی میزان شیوع آلودگی باکتریایی و عوامل مرتبط در آب میوه های بسته بندی، شهرکرد ۱۳۸۵

فرهاد شرافتی چالشتی*^۱، رضا شرافتی چالشتی**

*مربی گروه میکروبیولوژی - دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، **دانشجوی دکتری دامپزشکی - دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد.

تاریخ دریافت: ۱۳۸۷/۴/۲۳ تاریخ تایید: ۱۳۸۷/۱۱/۲۸

چکیده:

زمینه و هدف: آب میوه ها بخش مهمی از رژیم های غذایی مدرن در بسیاری از کشورها و جوامع بشری می باشند که در صورت آلوده بودن به پاتوژنهای باکتریایی می توانند باعث عفونت های مختلف دستگاه گوارشی گردند. مطالعه حاضر با هدف بررسی میزان شیوع آلودگی باکتریایی در آب میوه های سیب و پرتقال و ارتباط آن با برخی عوامل دیگر انجام شد.

روش بررسی: این مطالعه توصیفی - تحلیلی بر روی ۳۶۰ نمونه آب میوه بسته بندی از نوع سیب و پرتقال تولیدی سه کارخانه داخلی در زمان های شش ماهه اول و شش ماهه دوم پس از تولید در سال ۱۳۸۵ انجام شد. پس از کشت نمونه ها در محیط های کشت مختلف، در صورت رشد کلنی های باکتریایی، تعداد کلنی ها شمارش و با استفاده از تست های تشخیصی مورد شناسایی قرار گرفت. داده های جمع آوری شده با استفاده از آزمون کای دو تجزیه و تحلیل شدند.

یافته ها: میزان شیوع آلودگی در این مطالعه برابر با ۴/۴ درصد و میانگین شمارش کلی باکتری ها در نمونه های آلوده (colony formation unit/milliliter) 1.45×10^3 بود. باکتری های جدا شده شامل: استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس ۱۰ مورد (۶۲/۵٪)، استافیلوکوکوس ائروس ۳ مورد (۱۹٪)، باسیلوس سوبتیلیس ۲ مورد (۱۲/۵٪) و باسیلوس سرئوس ۱ مورد (۶٪) بود. شیوع آلودگی به نوع آب میوه و نوع کارخانه بستگی نداشت ($P > 0.05$) ولی با زمان تولید ارتباط معنی داری داشت ($P < 0.01$).

نتیجه گیری: با توجه به درصد کم آلودگی آب میوه ها و ارتباط معنی دار آن صرفاً با زمان تولید، توصیه می گردد شرایط نگهداری و انتقال این محصولات بهبود یافته و در زمان کمتر از شش ماه پس از تولید مصرف شوند.

واژه های کلیدی: آب میوه، آلودگی باکتریایی، بسته بندی.

مقدمه:

کنترل بهداشتی مواد غذایی در سیستم های پیشرفته آماده سازی مواد غذایی متکی به کاربرد صحیح اصول HACCP (Hazard analysis and critical control points) و سایر سیستم هایی است که طی آن خطرات موجود شناسایی شده و مراحل مختلف آماده سازی و شرایط نگهداری مواد غذایی جهت کنترل تعریف می گردند (۳،۲). لذا درک واقعی از خصوصیات عوامل بیماریزای میکروبی که ممکن است در مواد غذایی و

در طول دهه گذشته وقوع بیماری های میکروبی ناشی از مواد غذایی نه تنها در کشورهای در حال توسعه با فقر بهداشتی، بلکه در کشورهای توسعه یافته با استاندارد بالای بهداشتی نیز رو به افزایش بوده است. این در حالی است که وقوع عفونت ها و مسمومیت های غذایی اغلب گزارش نشده باقی مانده و لذا آمار دقیق از میزان ابتلاء خصوصاً در کشورهای در حال توسعه امکان پذیر نمی باشد (۲،۱).

^۱ نویسنده مسئول: شهرکرد - رحمتیه - دانشکده پزشکی - گروه میکروبی شناسی - تلفن: ۰۳۸۱-۳۳۳۴۶۹۱-۳۳۳۴۶۹۱ - E-mail: sharafati33@skums.ac.ir

یا محیط آماده سازی مواد غذایی یافت شوند و همچنین شناسایی سریع شیوع بیماری ها جهت محافظت جامعه در مقابل بیماری های ناشی از مواد غذایی آلوده از اهمیت فوق العاده ای برخوردار می باشد (۲).

آب میوه ها بخش مهمی از رژیم های غذایی مدرن در بسیاری از کشورها و جوامع می باشند که در صورت آلوده بودن به پاتوژنهای باکتریایی می توانند سلامت جامعه را به خطر اندازند (۴).

وجود پاتوژنهای باکتریایی نظیر *اشرشیاکلی*، *سالمونلا*، *میکروکوکوس*، *باسیلوس سوتیلیس*، *باسیلوس سرئوس*، *استریتوکوکوس پایورتر* و *استافیلوکوکوس ارتوس* در آب میوه ها به عنوان شاخص سلامت مورد توجه قرار گرفته است و در صورت آلودگی و مصرف توسط انسان عامل بیماری های گوارشی می گردند (۷،۶،۵). با توجه به جدول حد مجاز میکروبی موسسه استاندارد که شمارش کلی باکتری ها در آب میوه های بسته بندی غیر آسپتیک را حداکثر ۵۰۰ cfu/ml ارایه نموده لذا هر گونه آلودگی با میکروارگانسیم ها در حین پروسه های آماده سازی بیش از ۵۰۰ cfu/ml در چنین فرآورده های آشامیدنی (آب میوه ها) غیر قابل قبول بوده و سلامت و کیفیت آنها را تحت الشعاع قرار داده و خطرات بالقوه ای را به همراه دارند (۸،۵).

از آنجایی که آلودگی های باکتریایی در آب میوه ها خصوصاً در آب میوه های سیب و پرتقال در مطالعات مختلف در کشورهای خارجی نظیر نیجریه، ایالات متحده آمریکا، کلمبیا و کانادا مورد بررسی قرار گرفته و به عنوان عوامل عفونت با منشا آب میوه اثبات گردیده اند لیکن چنین مطالعه ای در ایران صورت نگرفته، لذا این مطالعه با هدف بررسی میزان شیوع آلودگی بر روی فرآورده های داخلی انجام شد.

روش بررسی:

این مطالعه توصیفی- تحلیلی بر روی ۳۶۰ نمونه آب میوه بسته بندی از نوع سیب و پرتقال تولیدی سه کارخانه داخلی در شش ماهه اول و شش ماهه دوم بعد

از تولید در شهرکرد انجام شد.

روش نمونه گیری به این صورت بود که تعداد ۱۸۰ نمونه آب میوه سیب و ۱۸۰ نمونه آب میوه پرتقال (از هر کارخانه ۶۰ نمونه) در دو مقطع زمانی شش ماهه اول و شش ماهه دوم پس از تولید (زمان انقضا بر روی آنها بین ۱۵ تا ۱۸ ماه پس از تولید درج گردیده بود) به صورت تصادفی از مراکز توزیع آب میوه نظیر سوپر مارکت ها خریداری و به تدریج مورد آزمایش قرار گرفت. لازم به ذکر است کلیه نمونه های تهیه شده در درجه حرارت محیط و خارج از یخچال و بدور از نور نگهداری می شدند.

به منظور بررسی میزان آلودگی باکتریایی نمونه های آب میوه از محیط های کشت اولیه Plate count agar و Orange serum agar و همچنین جهت بررسی وجود باکتری های سالمونلا از محیط های کشت Selenite F و S.S agar استفاده گردید (۹).

جهت بررسی شمارش کلی باکتری ها در نمونه های آب میوه با استفاده از رقت های متوالی (Serial dilution) از روش استاندارد Pour plate در شرایط کاملاً استریل استفاده گردید (۹،۸).

پس از کشت نمونه ها در محیط های Plate count agar و Orange serum agar به روش Pour plate به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در درجه حرارت ۳۵ تا ۳۷ درجه گرمخانه انکوبه شدند. پس از این مدت محیط های کشت مورد ارزیابی قرار گرفته و در صورت رشد کلنی های باکتریایی (نمونه های مثبت)، تعداد کلنی ها شمارش و با توجه به ضریب رقت، شمارش کلی باکتری ها (Total count) در هر یک از نمونه ها ثبت و سپس نمونه های مثبت طبق جدول حد مجاز میکروبی تحت عنوان حد مجاز ($<500 \text{ cfu/ml}$) و حد غیر مجاز ($>500 \text{ cfu/ml}$) دسته بندی گردید (۸،۵)، سپس بر اساس مورفولوژی کلنی ها و مورفولوژی باکتری ها در اسمیرهای رنگ آمیزی گرم، متناسب با آنها از محیط های کشت افتراقی و تست های تشخیصی کاتالاز، کواگولاز، O-F، اکسیداز، تولید

آلودگی باکتریایی مشاهده نشد و همه موارد آلوده در آب میوه هایی که بیش از ۶ ماه از تاریخ تولید آنها گذشته بود دیده شد. بر این اساس شیوع آلودگی باکتریایی در آب میوه هایی که بیش از ۶ ماه از تاریخ تولید آنها گذشته بود ۸/۹ درصد بدست آمد.

در کل ۹ مورد از آلودگی های باکتریایی در آب میوه های پرتقال و ۷ مورد در آب میوه های سیب مشاهده شد. بنابراین شیوع آلودگی در آب میوه های پرتقال ۵ درصد و در آب میوه های سیب ۳/۹ درصد بود. آزمون مجذور کای نشان داد که در همه کارخانه ها شیوع آلودگی ارتباطی با نوع آب میوه نداشت ($P > 0/05$).

از ۱۶ مورد آلودگی مشاهده شده ۷ مورد متعلق به آب میوه های کارخانه ۱، ۲ مورد متعلق به آب میوه های کارخانه ۲ و ۷ مورد متعلق به آب میوه های کارخانه ۳ بود که این اختلاف از نظر آماری معنی دار نبود ($P < 0/05$). لذا شیوع آلودگی باکتریایی آب میوه ها ارتباطی با کارخانه تولیدی نداشت.

پیگمان، حساسیت به نوویوسین و حساسیت به پنی سیلین استفاده گردید و باکتری های جدا شده مورد شناسایی قرار گرفت (۱۰).

داده های جمع آوری شده با استفاده از آزمون کای دو مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته ها:

از مجموع ۳۶۰ نمونه بررسی شده، در ۳۱۶ نمونه موردی از آلودگی باکتریایی مشاهده نشد. در ۲۸ مورد آلودگی باکتریایی با شمارش کلی باکتری ها، کمتر یا مساوی ۵۰۰ باکتری در هر میلی لیتر با میانگین $3/2 \times 10^2$ cfu/ml و در ۱۶ مورد تعداد باکتری های جدا شده بیش از ۵۰۰ باکتری در هر میلی لیتر با میانگین $1/45 \times 10^3$ cfu/ml بود. لذا بر مبنای شاخص مؤسسه استاندارد مواد غذایی شیوع آلودگی برابر با ۱۶ مورد از ۳۶۰ مورد (۴/۴) درصد بدست آمد (جدول شماره ۱). شیوع آلودگی به زمان تولید آب میوه بستگی داشت ($P < 0/01$). به طوری که در آب میوه هایی که کمتر از ۶ ماه تاریخ تولید آنها گذشته بود موردی از

جدول شماره ۱: فراوانی باکتری های جدا شده در آب میوه های سیب و پرتقال بر اساس جدول حد مجاز میکروبی

میزان آلودگی		مجاز (<500cfu/ml)		غیر مجاز (>500cfu/ml)	
نوع باکتری		تعداد	درصد	تعداد	درصد
استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس		۱۸	۵	۱۰	۲/۸
استافیلوکوکوس ارئوس		۱	۰/۲۸	۳	۰/۸۳
باسیلوس سرئوس		۲	۰/۵۶	۱	۰/۲۸
باسیلوس سوبتیلیس		۳	۰/۸۳	۲	۰/۵۶
فلاوو باکتریوم		۴	۱/۱	۰	۰
جمع		۲۸	۷/۸	۱۶	۴/۴

بحث:

نتایج بدست آمده از این پژوهش نشان داد که شیوع آلودگی باکتریایی در آب میوه های سیب و پرتقال از نظر آماری اختلاف معنی داری با نوع آب میوه و کارخانه تولیدی نداشت ولی ارتباط معنی دار با زمان تولید آب میوه ها وجود داشت به طوری که تمامی موارد آلودگی بیش از حد مجاز در نمونه هایی مشاهده گردید که بیش از شش ماه از زمان تولید آنها گذشته بود.

تمامی باکتری های جدا شده، باکتری هایی هستند که از محیط اطراف در حین تولید، زمان نگهداری و حمل و نقل و جابجایی، توسط افراد، وسایل و تجهیزات غیر استریل و آسیب های وارده به ظروف آب میوه قابل انتقال به آب میوه ها می باشند که در تمامی این مراحل با دقت بیشتر، شرایط تولید و نقل و انتقال و نگهداری بهتر قابل کنترل می باشد.

در مطالعه مشابهی که در سال ۲۰۰۴ در کشور نیجریه بر روی ۴۰ نمونه از محصولات آب پرتقال انجام شده تمامی نمونه ها آلودگی باکتریایی داشته اند و شمارش کلی باکتری ها در آنها بین $2/15 \times 10^5$ - $3/5 \times 10^4$ cfu/ml گزارش گردیده و ارگانسیم های جدا شده شامل *اشرشیا کلی*، *میکروکوکوس*، *باسیلوس سوبتیلیس*، *باسیلوس سرئوس*، *استرپتوکوکوس پایوژنز* و *استافیلوکوکوس ارتوس* بوده اند (۵). در بررسی حاضر میزان آلودگی ۴/۴ درصد و میانگین شمارش کلی باکتری ها در نمونه های آلوده $1/45 \times 10^3$ cfu/ml بود که بسیار کمتر می باشد.

در بررسی دیگری در سال ۲۰۰۴ در کشور لیبی ۱۴۶ نمونه از محصولات آب میوه از نظر باکتریولوژیکی مورد آزمایش قرار گرفته که شمارش کلی باکتری ها در نمونه های مورد آزمایش بین 5×10^4 cfu/ml و $1-3 \times 10^5$ cfu/ml بوده که ۸ مورد *استافیلوکوکوس ارتوس* (۵/۵)، ۴ مورد *استرپتوکوک* (۲/۷)، ۳۳ مورد کلی فرم (۲۲/۶)، ۳ مورد *اشرشیا کلی* (۲/۱)، ۱۷ مورد *کلبسیلا*

پنومونیا (۱۱/۶)، ۳ مورد *آئروموناس* (۲/۱) و ۶ مورد *پزودوموناس آئروژینوزا* (۴/۱) جدا گردیده است. (۴) که در بررسی حاضر میانگین شمارش کلی باکتری ها در نمونه های آلوده کمتر بوده و باکتری هایی مانند *استرپتوکوک*، کلی فرم، *اشرشیا کلی*، *کلبسیلا*، *آئروموناس* و *پزودوموناس* نیز جدا نگردید.

در گزارشات دیگری در کشور ایالات متحده آمریکا موارد زیادی از بیماریهای اسهالی در ارتباط با عفونت های ناشی از *سالمونلا موئنچن* با منشا آب پرتقال در کانادا و پانزده ایالت دیگر گزارش شده است (۱۱). لیکن در این بررسی هیچ گونه موردی از *سالمونلا* جدا نگردید.

در غرب ایالات متحده و کلمبیا و کانادا عفونت های ناشی از *اشرشیا کلی* (*E.coli o157:H7*) با منشا آب میوه های سیب گزارش گردیده است (۱۲).

همچنین در سال ۱۹۹۵ یک مورد شیوع اسهال ناشی از *اشرشیا کلی آنتروتوکسیژنیک* با منشا آب پرتقال گزارش گردیده است (۱۳) که موردی از *اشرشیا کلی* در این بررسی یافت نگردید.

مقایسه مطالعه حاضر با مطالعات انجام شده در سایر کشورها نشان می دهد که اولاً میزان شیوع آلودگی آب میوه ها در این مطالعه بسیار پائین تر بوده و ثانیاً شمارش کلی باکتری ها نیز در نمونه های آلوده بسیار کمتر می باشد.

از نظر نوع باکتری های جدا شده در این مطالعه در بعضی موارد شباهت و در بعضی موارد اختلاف وجود دارد به طوری که در مطالعه حاضر هیچ گونه موردی از *سالمونلا*، *اشرشیا کلی*، *کلبسیلا*، *آئروموناس*، *پزودوموناس* و *استرپتوکوک* مشاهده نگردید.

نتایج این تحقیق نشان می دهد که آلودگی باکتریایی در نمونه های بررسی شده نسبت به مطالعات مشابه در کشورهای لیبی، نیجریه، ایالات متحده آمریکا، کلمبیا و کانادا کاهش واضحی داشته که می تواند دلیل بر رعایت بهتر اصول بهداشتی و نظارت بیشتر ارگان های

نتیجه گیری:

با توجه به درصد کم آلودگی آب میوه ها و ارتباط معنی دار آن صرفاً با زمان تولید، توصیه می گردد شرایط نگهداری و انتقال این محصولات بهبود یافته و در زمان کمتر از شش ماه پس از تولید مصرف شوند.

تشکر و قدردانی:

از معاونت محترم پژوهشی و مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد جهت تامین هزینه و امکانات و همچنین آقای دکتر سلیمان خیری مشاور آماری این طرح تشکر و قدردانی به عمل می آید.

مسئول در کارخانجات تولیدی باشد. با توجه به اینکه باکتری های ایزوله شده غیر مجاز در آب میوه ها از همان گونه های ایزوله شده در حد مجاز می باشند به نظر می رسد شرایط نگهداری نامناسب احتمالاً باعث افزایش شمارش کلی باکتری ها در آب میوه ها گردیده و تعداد باکتری های اولیه در حد مجاز در شرایط نامناسب نگهداری افزایش یافته و به حد غیر مجاز رسیده اند لذا توصیه می گردد که شرایط حمل و نقل و نگه داری آب میوه ها بهبود یافته و در زمان کمتر از شش ماه تولید مصرف گردند.

منابع:

۱. شجاعی آرانی ابوالفتح. در کتاب: میکروب شناسی کاربردی و مواد غذایی. تهران: انتشارات دستان. ۱۳۷۸، ۹-۳.
۲. رضویلر و دود. در کتاب: میکروب های بیماریزا در مواد غذایی و اپیدمیولوژی مسمومیت های غذایی. تهران: انتشارات دانشگاه تهران. ۱۳۸۱، ۶-۲.
۳. جی، جیمز- مون، رو. در کتاب: میکروبیولوژی غذایی مدرن. ترجمه: مرتضوی سیدعلی، معتمدزادگان علی، اعلمی مهران، گوهری اردبیلی اشرف. مشهد: انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد. ۱۳۷۶، ۴۸-۱۴۶.
4. Ghenghesh KS, Belhaj K, El-Amin WB, El-Nefathi SE, Zalmum A. Microbiological quality of fruit juices sold in Tripoli Libya. *Food Control*. 2005 Dec; 16(10): 855-8.
5. Lateef A, Oloke JK, Gueguim-Kana EB. Antimicrobial resistance of bacterial strains isolated from orange juice products. *Afr J Biotechnol*. 2004 June; 3(6): 334-8.
6. Nzeako BC, Al-Hashmi S. The effect of preservatives on the sterility of microorganisms introduced into different fruit juices. *Med Sci Monit*. 2006 May; 12(5): 179-86.
7. Ram S, Khurana S, Khurana SB, Vadehra DV, Sharma S, Chhina RS. Microbiological quality & incidence of organisms of public health importance in food & water in Ludhiana. *Indian J Med Res*. 1996 May; 103: 253-8.
۸. موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. شماره استاندارد ایران ۶۳۳۲. ویژگی های میکروبی انواع آب میوه در بسته بندی های اسپتیک و غیر اسپتیک. ۱۳۸۶ (<http://www.isiri.org/asp/est/IranSTDFormtest.asp>)
۹. کریم گیتی. در کتاب: آزمون های میکروبی مواد غذایی. تهران: انتشارات دانشگاه تهران. ۱۳۷۸، ۴۲-۳۰.
10. Forbes BA, Sahm DF, Weissfled AS. Staphylococcus, Bacillus and similar organisms. In: Forbes BA, Sahm DF, Weissfled AS. *Baily & Scott's diagnostic microbiology*. 11th ed. C.V St. Louis: Mosby Co; 2002. p: 285-324.
11. Boase J, Lipsky S, Simani P, Smith S, Skilton C, Greenman S, et al. Outbreak of Salmonella serotype muenchen infections associated with unpasteurized orange Juice. *MMWR*. 1999; 48(27): 582-5.

12. Sara HC, Kathleen Glynn M, Jeff AF, Lisa Cairns K, Patricia MG, Kobayashi J, et al. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 Infection from unpasteurized commercial apple Juic. *Ann Intern Med.* 1999; 130(3): 202-9.
13. Singh BR, Kulshreshtha SB, Kapoor KN. An orange juice –borne diarrhoeal outbreak due to enterotoxigenic *E.coli*. *J Food Sci Technol.* 1995; 32(10): 504-6.