

بررسی اثر رشد و تکثیر تعدادی از باکتری‌های لاكتیک بر روی تحول میکروبی گوشت چرخ کرده گاو در شرایط صنعتی

شعله درویشی^۱، سید حسن لامع^۲، فخر اکبری نخجوانی^۳ و فخر درویش^۴

چکیده

اثر رشد و تکثیر یک سویه از لاکتوپاسیلوس کازئی زیرگونه کازئی و یک سویه از لاکتوکوکوس لاکتیس زیرگونه لاکتیس وارینه دی استی لاکتیس جدا شده از فرآورده‌های شیر که فعالیت آنتی بیوژ آنها بر روی استافیلکوکوس ثورئوس واشریشیا کلی بروزی و تأثیر شده بود، بر فلور طبیعی گوشت چرخ کرده گاو، در شرایط صنعتی، مورد بررسی قرار گرفت. سویه‌های مذکور به طور جداگانه و با غلظت $10^5 CFU/g$ گوشت چرخ کرده اضافه شدند. نمونه‌های تلقیح شده و شاهد در بسته‌های نیم کیلویی و در ظروف پلاستیکی بسته‌بندی شده و در $5-10^\circ C$ به مدت ۵ روز نگهداری گردیدند. شمارش گروه‌های مختلف میکروبی (شمارش کلی میکرواگانیسم‌های هوایی، باکتری‌های لاکتیک، سودوموناس‌ها، استافیلکوکوس ثورئوس، کلی فرم‌ها، قارچ‌ها و جستجوی (اشریشیاکلی) در طول مدت نگهداری انجام شد. نتایج بررسی نشان می‌داد که تعداد باکتری‌های لاكتیک در نمونه‌های تلقیح شده با لاکتوپاسیلوس کازئی، در طول مدت نگهداری (۵ روز) افزایش می‌یابد، در حالی که تعداد کل میکرواگانیسم‌های هوایی، سودوموناس‌ها، کلی فرم‌ها و مخمرا، در شرایط مذکور، کاهش می‌یابند. در نمونه‌هایی که با لاکتوکوکوس لاکتیس تلقیح شده بودند، فقط تعداد مخمرا کاهش قابل توجهی نشان می‌دهند. سویه اخیر روی تعداد سایر گروه‌های میکروبی شمارش شده اثر قابل توجهی نداشته است. بدین ترتیب مشخص گردید که لاکتوپاسیلوس کازئی، می‌تواند یک سویه آنتاگونیست مناسب با توان بازدارندگی در برابر میکرواگانیسم‌های عامل فساد و بیماری‌زای گوشت خامی که در بسته‌بندی‌های قابل نفوذ به هوا، در دمای بین $1-5^\circ C$ قرار گرفته است، مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: لاکتوپاسیلوس کازئی، لاکتوکوکوس لاکتیس، فلور طبیعی گوشت گاو، فعالیت بازدارندگی باکتری‌های لاكتیک

مقدمه

غذایی گزارش شده، در دهه گذشته زیاد است. نخستین بار در اوایل سال‌های ۱۹۰۰ پدیده آنتاگونیسم میکروبی شناخته شد و نتایج پژوهش‌های انجام شده در سال‌های ۱۹۹۵ و ۱۹۹۶ نشان داد که نگهداری بیولوژیکی (Biopreservation) با وجود پیشرفت‌های اخیر در بیوتکنولوژی مواد غذایی و به کار بستن فن آوری‌های جدید، هنوز مسئله عدم اطمینان از سلامت مواد غذایی حل نشده است. تعداد عفونت‌ها و مسمومیت‌های

۱. استادیار صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سنترج، سنترج

۲. استاد صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، تهران

۳. استادیار میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران

۴. استاد زراعت، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران

بازدارندگی کشت‌های لاكتیکی تاکنون به‌طور دقیق روش نشده است. از بین ترکیبات بازدارنده‌ای که به‌وسیله این باکتری‌ها تولید می‌شود، می‌توان به آنتی بیوتیک‌ها، دی‌استیل (Dyacetyl)، روترین (Reuterin)، استوئین (Acetoin)، ۲-۳-بوتان‌دی‌ال (2,3-butandiol)، استالدئید (Acetaldehyde)، اسیدهای آلی مانند اسیدهای لاكتیک، استیک، پروپیونیک و فرمیک، اسیدهای چرب آزاد، آمونیاک، آنزیم‌های تجزیه کننده باکتری‌ها، اتانول، پراکسید ئیدروژن، باکتریوسین‌ها، مواد مشابه باکتریوسین‌ها، ترکیبات آنتاگونیست ناشناخته، تجمع D-آمینو اسیدها، کاهش پتانسیل اکسیداسیون احیا، کاهش pH، تراکم جمعیت و رقبابت در مصرف مواد غذایی اشاره نمود (۷، ۹، ۱۳، ۱۴، ۱۵، ۱۶، ۱۷، ۱۸، ۲۰، ۲۷، ۲۸، ۳۱، ۳۲ و ۳۳).

یکی از روش‌های معمول در عرضه گوشت به مصرف‌کننده، بسته‌بندی آن در پلاستیک‌های قابل نفوذ به هوا و قرار دادن آن در قفسه‌های یخچال دار روابز برای انتخاب راحت‌تر مصرف‌کنندگان است (۳۰). در چنین شرایطی گوشت، معمولاً در معرض تغییرات و نوسانات دما (دما نزدیک به انجماد تا چند درجه بالاتر از آن) قرار می‌گیرد. پژوهش‌های نسبتاً زیادی با هدف استفاده از سویه‌های لاكتیک یا باکتریوسین‌های آنها در یک دمای خاص و در مقیاس آزمایشگاهی به‌منظور کاهش تعداد میکروارگانیسم‌های نامطلوب و طولانی نمودن ماندگاری انجام گرفته است. ولی نشو و نمای باکتری‌های لاكتیک و چگونگی اثر آنها بر فلور میکروبی طبیعی گوشت با نوسان دما، و در مقیاس صنعتی مورد بررسی قرار نگرفته است. در این پژوهش سعی شده است که اثر مذکور در شرایط تولید صنعتی و نگهداری در سردخانه با نوسانات دمایی بررسی گردد.

مواد و روش‌ها

مواد

۱. گوشت

در این پژوهش، از گوشت گاو چرخ کرده استفاده شد. برای این منظور، گوشت قلوه گاه لاشه گاو، پس از قطعه قطعه کردن و گذرانیدن فقط یکبار از چرخ گوشت صنعتی با پنجره‌ای که

از مواد غذایی با استفاده از باکتری‌های لاكتیک باعث افزایش ایمنی آنها می‌گردد (۱۹).

گوشت به دلیل ویژگی‌های اکولوژیکی خاصی که دارد a_w ، pH و مواد مغذی) به فساد میکروبی بسیار حساس است (۱۸). رایج‌ترین روش نگهداری گوشت از زمان ذبح دام تا عرضه به مصرف‌کننده، نگهداری آن در یخچال است. در این شرایط امکان نشو و نما برای میکروارگانیسم‌های سرما دوست از جمله میکروب‌های مولد فساد و بیماری‌زا فراهم می‌باشد. مهم‌ترین باکتری‌های عامل فساد گوشت، باکتری‌های جنس سودوموناس هستند که بسیاری از گونه‌ها و سویه‌های آن، سرما گرا هستند (۶) و هم‌چنین استافیلوکوکوس θورئوس، اشریشیا کلی، کلستریدیوم پرفنزانس و لیستربا مونوسیتوژنس از مهم‌ترین باکتری‌های بیماری‌زا گوشت هستند (۴)، در گوشت‌های مختلف، باکتری‌های لاكتیک، بخشی از فلورای میکروبی اولیه را تشکیل می‌دهند، که پس از قراردادن گوشت در سردخانه، به منظور نگهداری، سویه‌های سرمادوست آنها به سهولت نشو و نما می‌کنند (۳۰). باکتری‌های لاكتیک، باکتری‌هایی هستند گرم مثبت، میکروآتروفیل و غیراسپورزا، که در طی تخمیر، کربوهیدرات‌ها را به لاكتات به عنوان محصول اصلی تبدیل می‌کنند. از مهم‌ترین جنس‌های متعلق به باکتری‌های لاكتیک می‌توان لاکتوکوکوس، لاکتوسیلوس، استرپتوکوکوس، کارنو باکتریوم، لوکونوستوک و پدیوکوکوس را نام برد (۱۴).

باکتری‌های لاكتیک، هنگامی که در محیط‌های کشت همراه با میکروب‌های دیگر قرار می‌گیرند، باعث بازدارندگی یا از بین رفت آنها می‌گردند. استفاده از این پدیده که آنتاگونیسم لاكتیکی خوانده می‌شود، به عنوان یک روش مطلوب به جای استفاده از افزودنی‌های شیمیایی به‌منظور کنترل میکروارگانیسم‌های نامطلوب در مواد غذایی مورد توجه متخصصان قرار دارد. برخی از باکتری‌های لاكتیک روی بسیاری از میکروارگانیسم‌های عامل فساد بخصوص سرمادوست گرم منفی و هم‌چنین برخی از بیماری‌زاها اثر بازدارندگی دارند. با این که فرضیه‌های زیادی مطرح گردیده، ولی مکانیسم دقیق اثر

روش‌ها

۱. روش اندازه‌گیری غلظت معلقه‌های (سوپانسیون‌های) باکتری‌های لاكتیک

برای این منظور با استفاده از روش کدورت سنجی (Turbidimetry)، میزان جذب نور در طول موج ۶۰۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفوتومتر با مشخصات ذکر شده اندازه‌گیری شد. سپس براساس اعداد بدست آمده و با استفاده از میزان جذب لوله‌های ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳، ۰/۴ و ۰/۵ مک فارلیند (Mc. Farlained)، تعداد باکتری‌ها در معلقه‌های مورد استفاده محاسبه گردید.^(۸)

دارای منافذی به قطر ۵ میلی‌متر بود، و با رعایت شرایط اسپتیک مورد استفاده قرار گرفت. چربی گوشت مورد استفاده ۲۳ درصد و pH آن حدود ۵/۷۵ بود.

۲. سویه‌های میکروبی لاكتیک

باکتری‌های لاكتیک مورد استفاده در این پژوهش عبارت‌اند از: لاکتوباسیلوس کازئی زیرگونه کازئی سویه ۱۰۲ و لاکتوکوکوس لاکتیس زیرگونه لاکتیس واریته دی استی لاکتیس سویه ۲۰۲ که قبلاً از فرآورده‌های شیری بومی ایران جداسازی (۳) و در مجتمع آزمایشگاهی واحد علوم و تحقیقات شناسایی و نام‌گذاری گردیدند.

۳. محیط‌های کشت

گوشت چرخ کرده به غلظت $^{10} \text{CFU/g}$ از باکتری‌های لاكتیک مورد استفاده، تلقیح گردید. برای این منظور غلظت کشت‌های تهیه شده در محیط مایع MRS با محلول رینگر یک چهارم سترون تنظیم شد و مقدار ۵ میلی‌لیتر از آنها به طور جداگانه، به یک کیلو گوشت اضافه، و به مدت ۵ دقیقه به دقت مخلوط و یکنواخت گردید. به نمونه‌های شاهد نیز، ۵ میلی‌لیتر محلول رینگر یک چهارم سترون در کیلوگرم، اضافه شد. گوشت چرخ کرده تلقیح شده با لاکتو باسیلوس کازئی، تیمار ۱، و گوشت چرخ کرده تلقیح شده با لاکتوکوکوس لاکتیس، تیمار ۲، نام‌گذاری گردیدند.

به منظور شمارش کلی میکروارگانیسم‌های هوازی، باکتری‌های لاكتیک، سودوموناس‌ها، کلی فرم‌ها، استافیلوکوکوس-ثورئوس، قارچ‌ها (پک‌ها و مخمرها)، جستجوی اشريشیا کلی به ترتیب MRS، آگار (Plate count agar)، Cetrimide (CFC)، deMan Rogosa and Sharp (VRBL)، Crystal violet neutral (fucidin cephaloridine)، (Baird Parker agar)، red bile lactose حاوی عصاره مخمر- لاکتوز- کلرامفینیکل آگار، (CGA) و Yeast extract - dextrose - chloramphenicol agar) استفاده گردید. برای اندازه‌گیری غلظت معلقه‌های باکتری‌های لاكتیک از دستگاه Shimadzu (P/N 204-00010-02-UV- 120-02) Kyoto, Japan استفاده شد.

۴. بسته‌بندی

برای بسته‌بندی گوشت، از ظروف پلاستیکی نیم کیلویی پلی‌استیرن (PS) موسوم به ظروف یکبار مصرف و Low density poly ethylene کم (LDPE) و قابل نفوذ به اکسیژن ($550 \text{ cc}/24\text{h}/100 \text{ in}^2$) استفاده شد.

۳. نمونه‌برداری و تهیه رقت‌های مختلف برای آزمایش‌های میکروبی

نمونه‌برداری و تهیه رقت‌های مختلف از گوشت تلقیح شده با استفاده از استانداردهای شماره ISO 3100-1، ISO 3100-2، ISO 6887 انجام گرفت (۲۱، ۲۲، ۲۴).

۴. آزمایش‌های میکروبیولوژیکی

شمارش کلی میکروارگانیسم‌های هوازی، شمارش باکتری‌های لاكتیک، شمارش سودوموناس‌ها، شمارش کلی فرم‌ها به ترتیب با استفاده از استانداردهای ISO 13721، ISO 2293 و ISO 3100-1

هم‌چنین در روز سوم اختلاف معنی‌داری با شاهد نداشته‌اند ($P < 0.05$).

تجزیه واریانس تعداد باکتری‌های لاکتیک نمونه‌های مورد آزمایش نشان می‌دهد که اختلاف بین شاهد و تیمارها، در روزهای مختلف نگهداری (۵-۱ روز)، همواره معنی‌دار است ($P < 0.01$). روند تغییرات تعداد باکتری‌های لاکتیک در مورد نمونه شاهد ابتدا به آرامی، افزایشی و سپس کاهشی است، در صورتی که نمونه‌های تیمار ۱ و ۲ روند تغییرات تعداد این باکتری‌ها همواره افزایشی و طبق جدول ۲، لگاریتم تعداد آنها در تیمار ۱، از $4/8 \text{ CFU/g}$ در ابتدای نگهداری، به 6 CFU/g در روز پنجم رسیده است. این نتایج نشان می‌دهند که باکتری‌های لاکتیک به خوبی در گوشت چرخ کرده نشو و نما کرده‌اند. لازم به یادآوری است که به نمونه‌های شاهد، باکتری لاکتیک اضافه نشده است و باکتری‌های لاکتیک شمارش شده مربوط به باکتری‌هایی است که به طور طبیعی در گوشت وجود دارند.

نتایج شمارش سودوموناس‌های گوشت چرخ کرده (جدول ۳) نشان می‌دهد که لگاریتم تعداد این باکتری‌ها در تیمار ۱، از $6/1 \text{ CFU/g}$ بلافاصله پس از بسته‌بندی به $4/4 \text{ CFU/g}$ در روز پنجم رسیده است، در صورتی که تعداد آنها در شاهد و تیمار ۲ حتی در روز سوم، بیشتر از تیمار ۱ می‌باشد. نتایج تجزیه واریانس بیانگر این واقعیت است که اختلافات موجود بین شاهد و تیمارهای مورد آزمایش در روزهای مختلف (۵-۱ روز) همواره معنی‌دار است.

طبق جدول ۴، تعداد کلی فرم‌های نمونه‌های گوشت مربوط به تیمار ۱، از $10^3 \times 10^4 \text{ CFU/g}$ بلافاصله پس از بسته‌بندی، به 10^2 CFU/g در روز پنجم رسیده است که نشان دهنده کاهش شدید تعداد آنهاست. محاسبات آماری نشان می‌دهند که اختلافات موجود بین شاهد و تیمارها معنی‌دار است ($P < 0.01$).

تعداد مخمرها در نمونه‌های تیمار ۱ و ۲، در روزهای اول، دوم و سوم به طور معنی‌داری ($P < 0.01$)، کمتر از شاهد بود (جدول ۵)، به ویژه در تیمار ۲ که تعداد آنها در روز سوم، در

ISO 13720 و ISO 4832 انجام گرفتند (۲۰، ۲۳، ۲۵، ۲۶). برای شمارش استافیلوکوکوس θورئوس و شمارش قارچ‌ها (کپک‌ها و مخمرها) از استانداردهای ایران به ترتیب با شماره‌های ۹۹۷ و ۱۱۹۴ استفاده گردید (۱، ۲). جستجوی اشیشیا کلی نیز طبق روش ارائه شده به وسیله کاپاسینو و شرمن انجام شد (۱۱).

۵. روش تجزیه و تحلیل آماری

در مورد تغییرات هر یک از گروه‌های میکروبی، تجزیه واریانس بین سه تیمار در ۶ تکرار و مقایسه میانگین‌ها بین شاهد و تیمار ۱ و ۲ به کمک نرم افزار Excel 97 انجام گرفت.

نتایج

میانگین تعداد کل پرگنهای میکروارگانیسم‌های هوایی، باکتری‌های لاکتیک، سودوموناس‌ها، کلی فرم‌ها و قارچ‌های مربوط به نمونه‌های آزمایشی و هم‌چنین شاهد تیمارهای مختلف در طول مدت نگهداری (۵ روز) به ترتیب در جداول شماره ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ برحسب CFU/g (Colony forming unit) و لگاریتم آنها گنجانیده شده است. در طی مدت نگهداری نمونه‌های آزمایشی، پرگنه کپک و استافیلوکوکوس θورئوس در هیچ‌یک از نمونه‌های مشاهده نشد.

بحث

طبق جدول ۱، لگاریتم تعداد میکروارگانیسم‌های هوایی نمونه‌های گوشت تلقیح شده با لاکتوبراسیلوس کازئی (تیمار ۱)، $6/9 \text{ CFU/g}$ بلافاصله پس از بسته‌بندی به $5/9 \text{ CFU/g}$ در روز پنجم نگهداری کاهش پیدا کرده است. در طول مدت نگهداری گوشت در سردخانه ($4-5^\circ\text{C}$)، تغییرات تعداد این میکروارگانیسم‌ها در نمونه‌های تیمار ۱ همواره به طور معنی‌داری ($P < 0.01$) کمتر از نمونه‌های شاهد بوده است، در صورتی که تعداد آنها در نمونه‌های تلقیح شده بالاکتوکوکوس لاکتیس (تیمار ۲)، در زمان صفر یعنی قبل از نگهداری و

جدول ۱. میانگین تعداد کلی میکروارگانیسم‌های هوایی گوشت در طول مدت نگهداری

تیمار ***۲	تیمار **۱	شاهد*	مدت نگهداری (روز)		
CFU/g	Log CFU/g	CFU/g	Log CFU/g	CFU/g	Log CFU/g
$8/1 \times 10^6$	6/9	$7/0 \times 10^6$	6/9	$7/0 \times 10^6$	6/8
$7/2 \times 10^6$	6/9	$9/6 \times 10^5$	6/0	$3/6 \times 10^7$	7/6
$8/0 \times 10^5$	5/9	$6/8 \times 10^5$	5/8	$6/9 \times 10^7$	7/8
$5/6 \times 10^6$	6/7	$8/8 \times 10^5$	5/9	$8/0 \times 10^6$	6/9
-	-	$8/1 \times 10^5$	6/9	-	-
-	-	$7/3 \times 10^5$	5/9	-	-
					۵

*: گوشت چرخ کرده تلقیح نشده

**: گوشت چرخ کرده تلقیح شده بالاکتوپاسیلوس کازئی

***: گوشت چرخ کرده تلقیح شده بالاکتوکوکوس لاکتیس

-: توضیح این که در روزهای چهارم و پنجم نمونه‌های شاهد و تیمار ۲ فاسد شدند و بنابراین مورد آزمایش قرار نگرفتند.

جدول ۲. میانگین تعداد باکتری‌های لاکتیک گوشت در طول مدت نگهداری

تیمار ***۲	تیمار **۱	شاهد*	مدت نگهداری (روز)		
CFU/g	Log CFU/g	CFU/g	Log CFU/g	CFU/g	Log CFU/g
$6/3 \times 10^4$	4/8	$5/7 \times 10^4$	4/8	$1/3 \times 10^3$	3/1
$1/1 \times 10^5$	5/0	$4/7 \times 10^4$	4/7	$2/0 \times 10^3$	3/3
$2/9 \times 10^5$	5/5	$1/9 \times 10^5$	5/3	$1/7 \times 10^3$	3/2
$4/7 \times 10^5$	5/7	$2/7 \times 10^5$	5/4	$1/3 \times 10^3$	3/1
-	-	$4/3 \times 10^5$	5/6	-	-
-	-	$9/6 \times 10^5$	6/0	-	-
					۵

*: گوشت چرخ کرده تلقیح نشده

**: گوشت چرخ کرده تلقیح شده بالاکتوپاسیلوس کازئی

***: گوشت چرخ کرده تلقیح شده بالاکتوکوکوس لاکتیس

-: توضیح این که در روزهای چهارم و پنجم نمونه‌های شاهد و تیمار ۲ فاسد شدند و بنابراین مورد آزمایش قرار نگرفتند.

جدول ۳. میانگین تعداد سودوموناس‌های گوشت در طول مدت نگهداری

تیمار ***۲	تیمار **۱	شاهد*	مدت نگهداری (روز)		
CFU/g	Log CFU/g	CFU/g	Log CFU/g	CFU/g	Log CFU/g
$1/3 \times 10^6$	6/1	$1/2 \times 10^6$	6/1	$1/0 \times 10^6$	6/0
$2/3 \times 10^6$	6/5	$7/6 \times 10^5$	5/9	$1/6 \times 10^6$	6/2
$3/1 \times 10^6$	6/5	$5/0 \times 10^5$	5/7	$4/3 \times 10^6$	6/6
$4/7 \times 10^5$	5/7	$5/3 \times 10^4$	4/7	$9/0 \times 10^5$	6/0
-	-	$3/7 \times 10^4$	4/6	-	-
-	-	$2/7 \times 10^4$	4/4	-	-
					۵

*: گوشت چرخ کرده تلقیح نشده

**: گوشت چرخ کرده تلقیح شده بالاکتوپاسیلوس کازئی

***: گوشت چرخ کرده تلقیح شده بالاکتوکوکوس لاکتیس

-: توضیح این که در روزهای چهارم و پنجم نمونه‌های شاهد و تیمار ۲ فاسد شدند و بنابراین مورد آزمایش قرار نگرفتند.

جدول ۴. میانگین تعداد کلی فرم‌ها در گوشت در طول مدت نگهداری

تیمار ***۲		تیمار **۱		شاهد*		مدت نگهداری
CFU/g	Log CFU/g	CFU/g	Log CFU/g	CFU/g	Log CFU/g	(روز)
$۳/۳ \times 10^4$	۴/۵	$۳/۱ \times 10^4$	۴/۵	$۱/۲ \times 10^4$	۴/۴	صفر
$۶/۷ \times 10^4$	۴/۸	$۲/۰ \times 10^4$	۲/۳	$۳/۲ \times 10^4$	۴/۵	۱
$۵/۶ \times 10^4$	۴/۷	$۸/۳ \times 10^4$	۲/۹	$۹/۰ \times 10^4$	۴/۰	۲
$۸/۶ \times 10^4$	۴/۹	$۱/۳ \times 10^4$	۲/۱	$۱/۹ \times 10^4$	۴/۳	۳
-	-	$۷/۰ \times 10^4$	۲/۸	-	-	۴
-	-	$۱/۰ \times 10^4$	۲/۰	-	-	۵

* : گوشت چرخ کرده تلقیح نشده

** : گوشت چرخ کرده تلقیح شده بالاکتوپاسیلوس کازئی

*** : گوشت چرخ کرده تلقیح شده بالاکتوکوکوس لاتکیس

- : توضیح این که در روزهای چهارم و پنجم نمونه‌های شاهد و تیمار ۲ فاسد شدند و بنابراین مورد آزمایش قرار نگرفتند.

جدول ۵. میانگین تعداد مخمرهای گوشت در طول مدت نگهداری

تیمار ***۲		تیمار **۱		شاهد*		مدت نگهداری
CFU/g	Log CFU/g	CFU/g	Log CFU/g	CFU/g	Log CFU/g	(روز)
$۵/۷ \times 10^4$	۴/۸	$۶/۱ \times 10^4$	۴/۸	$۸/۱ \times 10^4$	۴/۹	صفر
$۸/۳ \times 10^4$	۳/۹	$۶/۳ \times 10^4$	۴/۸	$۸/۴ \times 10^4$	۴/۹	۱
$۷/۵ \times 10^4$	۳/۹	$۹/۵ \times 10^4$	۴/۰	$۹/۲ \times 10^4$	۵/۰	۲
$۵/۲ \times 10^4$	۳/۷	$۱/۳ \times 10^4$	۴/۱	$۸/۵ \times 10^4$	۴/۹	۳
-	-	$۸/۶ \times 10^4$	۳/۹	-	-	۴
-	-	$۷/۰ \times 10^4$	۳/۸	-	-	۵

* : گوشت چرخ کرده تلقیح نشده

** : گوشت چرخ کرده تلقیح شده بالاکتوپاسیلوس کازئی

*** : گوشت چرخ کرده تلقیح شده بالاکتوکوکوس لاتکیس

- : توضیح این که در روزهای چهارم و پنجم نمونه‌های شاهد و تیمار ۲ فاسد شدند و بنابراین مورد آزمایش قرار نگرفتند.

سردخانه، همگی از نظر وجود این باکتری مثبت هستند. در پایان روز اول نگهداری نیز، در نمونه‌های شاهد و تیمار ۲، این میکروارگانیسم‌ها همچنان وجود دارند. در حالی که در نمونه‌های مربوط به تیمار ۱، یعنی گوشت تلقیح شده با لاکتوپاسیلوس کازئی از بین رفته و نتیجه کشت منفی است. این حالت احتمالاً نتیجه اثر بازدارندگی سویه فوق بر اشریشیاکلی است. ضریب تغییرات میکروبی گوشت (C.V.) در طول مدت نگهداری٪۲۶/۷ محاسبه شده است.

پایین‌ترین حد خود نسبت به نمونه‌های شاهد و تیمار ۱ قرار داشت. در نتیجه به نظر می‌رسد که لاکتوکوکوس لاتکیس در این مورد، از لاکتوپاسیلوس کازئی تأثیر بازدارندگی بیشتری داشته است. در هیچ‌یک از نمونه‌ها در طی مدت نگهداری در شرایط پژوهش، نشو و نمای کپک دیده نشد. این موضوع نتایج پژوهش‌های گذشته را در مورد گوشت چرخ کرده تأیید می‌نماید (۷).

نتایج جستجوی اشریشیا کلی (جدول ۶)، نشان می‌دهد که نمونه‌ها بلافاصله پس از بسته‌بندی و قبل از نگهداری در

جدول ۶. جستجوی اشريشيا کلى در گوشت در طول مدت نگهداری

مدت نگهداری (روز)	شاهد*	تیمار ***۱	تیمار ***۲	تیمار
صفر	مشت	مشت	مشت	مشت
۱	مشت	منفی	مشت	منفی
۲	مشت	منفی	منفی	منفی
۳	مشت	منفی	منفی	منفی
۴	-	منفی	منفی	-
۵	-	منفی	-	-

*: گوشت چرخ کرده تلقیح نشده

**: گوشت چرخ کرده تلقیح شده بالاکتوپاسیلوس کازئی

***: گوشت چرخ کرده تلقیح شده بالاکتوکوکوس لاکتیس

-: توضیح این که در روزهای چهارم و پنجم نمونه‌های شاهد و تیمار ۲ فاسد شدند و بنابراین مورد آزمایش قرار نگرفتند.

اشريشيا، سالمونلا و استرپتوميسين‌ها. البته نتایج تحقیقات مختلف نشان داده است که در گوشت‌های فاسد، برخلاف گوشت‌های سالمونلا، جنس‌های باکتریایی معلوم نبوده استند. بررسی‌های مختلف نشان داده‌اند که هر گاه در گوشت چرخ کرده تازه گاو، ۹ جنس باکتریایی وجود داشته باشد، در صورت نگهداری آن در یخچال تا زمانی که فاسد گردد، تنها ۴ جنس، فلور غالب را تشکیل خواهند داد (۱۴، ۷، ۴).

نتایج پژوهش‌ها نشان داده‌اند که فرآورده‌های نهایی عمدۀ متابولیسم سودوموناس‌ها، مواد لزج (Slime)، سولفیدها، استرها و اسیدهای آمینه هستند. در صورتی که لاکتوپاسیلوس‌ها عمدتاً اسید لاتکتیک، مواد فرار و اسیدهای چرب تولید می‌کنند. زمان تقسیم سلولی برخی از لاکتوپاسیلوس‌ها در 2°C ، حدود $8/4$ ساعت گزارش گردیده است (۲۹)، که با نتایج این مطالعه مطابقت دارد.

سیلان و همکاران گزارش داده‌اند که لاکتوپاسیلوس ساکی و پدیوکوکوس اسیدی لاتکتیسی در طی تخمیر و خشک کردن سوسیس خشک ترکی موجب از بین رفتان یرسینیا آنتروکولیتیکا در دمای یخچال می‌شوند. این پژوهش‌گران هم‌چنین مشاهده کرده‌اند که در طی نگهداری این فرآورده، pH به شدت کاهش می‌یابد. نتایج برخی پژوهش‌ها نشان داده‌اند که باکتری‌های لاکتیک در دماهای پایین قادر به نشو و نما هستند و به دلیل تولید ترکیبات بازدارنده رشد در دماهای مذکور، قادر به رقابت

گوشت چرخ کرده گاو و همیرگر، برخلاف لشه‌های تازه ذبح و شقه شده، معمولاً منحصراً به‌وسیله باکتری‌ها مورد تهاجم قرار گرفته و فاسد می‌شوند. گوشت معمولاً بلافضله پس از تولید، در سردخانه با دمای صفر تا 2°C و یا حداقل $+4^{\circ}\text{C}$ نگهداری می‌شود. از این رو مهم‌ترین مسئله از نظر میکروبی، سرم‌آگراها و سرما دوست‌ها هستند که نشو و نمایشان در این طیف حرارتی اجتناب ناپذیر است. در این رابطه جنس‌هایی چون سودوموناس دارای اهمیت زیادتری هستند. در بین سودوموناس‌ها، سودوموناس فراجی، نقش مهم‌تری در آلدگی گوشت داراست. و به همین سبب، تحت عنوان «میکرووارگانیسم ویژه گوشت» شناخته شده است. برخلاف تصورات گذشته، یافته‌های جدید حاکی از آن است که گونه‌های مختلف اسیتوباکتر نقش چندانی در فساد گوشت گاو ندارند. در شرایط نگهداری در سردخانه ($+2^{\circ}\text{C}$) از باکتری‌های خانواده آنتروباکتریا، سویه‌های سرم‌آگرا آنتروباکتروکلبسیلا، نیز می‌توانند در گوشت نشو و نما کنند. ولی سالمونلاها فقط وقتی که درجه حرارت محیط از $+5^{\circ}\text{C}$ بالاتر رود، شروع به تکثیر خواهند نمود. در سردخانه‌های بالای صفر، یرسینیا آنتروکولیتیکا نیز می‌تواند، سه‌می در آلدگی گوشت داشته باشد. به هر حال، مهم‌ترین باکتری‌هایی که در آلدگی گوشت نقشی دارند، عبارت‌اند از: سودوموناس، اسیتوباکتر، موراکسلا، آلکالی ژنس، میکروکوکوس، استرپتوکوکوس، باسیلوس، کلسیتریدیوم،

خوک را پس از تلقيح بباكتيرى‌های لاكتيك در دماهای ۲، ۵، ۶ درجه سلسیوس تحت شرایط خلاء نگه‌داری نمودند. نتایج اين پژوهش نشان داد که تفاوت بين سطوح مختلف درجه حرارت‌های مختلف فوق تأثير زيادي بر رشد و تكثير باكتيری‌های لاكتيك ندارد. در بخشی از پژوهشی دیگر شهیدی همکارانش، گوشت چرخ کرده گوساله غير استريل را با باكتيری‌های لاكتيك کارنو باكتريوم دیورژنس و لاكتوباسيلوس فرمانتوم بالغاظت‌های به ترتیب $CFU/g \times 10^4$ و $CFU/g \times 10^6$ در ۴ و ۱۰ درجه سلسیوس در شرایط هوازی تلقيح کردند. نتایج نشان می‌دهد که قابلیت مهار کنندگی فلور میکروبی طبیعی گوشت در ۴ درجه به مراتب بيشتر بوده است. اين پژوهش در مورد گوشت خام استريل نيز انجام شده است. نتایج نشان می‌دهد که باكتيری‌های لاكتيك مورد استفاده در اين پژوهش در ۴ درجه سلسیوس توانسته‌اند از رشد و تكثير باكتيری‌های شاخص جلوگیری کنند.^(۵)

ارتباط تولید باكتريوسين‌ها با دماي محيط نيز اثبات گردیده است. به عنوان مثال مشخص شده است که با واريسين MN به وسیله لاكتوباسيلوس ساكه‌اي MN (لاكتوباسيلوس باواريكوس) توليد می‌شود، در درجه حرارت‌های پاين و در برودت يخچال توليد می‌شود.^(۱۹)

همان طوری که در مقدمه نيز اشاره شد، با اين که مكانيسم اثر بازدارندگی کشت لاكتيكی، به طور دقیق روشن نشده است، ولی تولید ترکيباتی مانند آنتي بيويتك‌ها، دي استيل، اتانول، پراكسید، ئيدروژن، استالدئيد، اسيدهای آلی مانند اسيدهای لاكتيك، استيك، پروپيونيك و فرميك، اسيدهای چرب آزاد، آمونياک، بنزووات، باكتريوسين‌ها، شبه باكتريوسين‌ها، آنزيم‌های تجزيه کاهش pH، تراكم جمعيت و رقابت در مصرف مواد غذائي را از عوامل ضدميکروبی آنها می‌دانند. با توجه به ويژگی‌های سويه‌های مورد استفاده در اين پژوهش، به نظر می‌رسد، توليد باكتريوسين‌ها و مواد مشابه باكتريوسين، ترکيبات آنتاگونيست ناشناخته، مواد ضدقارچی،

با ميكروارگانيسم‌های عامل فساد در سرما می‌باشند (۳، ۷، ۱۲، ۱۴، ۲۹). به طور کلي، استرپتوکوكسی‌های لاكتيك در ۱۰ درجه سلسیوس و كمتر از آن رشد و تكثير می‌كنند ولی در ۴۵ درجه قادر به رشد نیستند.^(۱۰) بيشتر لاكتوباسيل‌ها نيز در حرارت‌های مزو菲ليک بهتر رشد و تكثير می‌نمایند. بعضی از آنها در پاين تر از ۱۵ درجه و بعضی سويه‌ها حتی کمتر از ۵ درجه سلسیوس نيز نشو و نما می‌كنند.^(۱۰)

پژوهش‌های بسياری انجام گرفته است که در آنها از باكتيری‌های لاكتيك مزو菲尔 به عنوان محافظت کننده بیولوژيکی مواد غذائي تحت شرایط سرد کردن استفاده شده است. نتایج اين پژوهش‌ها نشان داده است که در چنین شرایطي باكتيری‌های لاكتيك با عوامل بيماري زا رقابت کرده، جلوتر از آنها رشد و تكثير می‌نمایند.^(۱۹) به عنوان مثال زويتن و همکارانش باكتيری‌های لاكتيك را با غلط $\log_5 CFU/cm^2$ روی گوشت مرغ در ۲ درجه سلسیوس تلقيح نمودند.^(۳۳) همچنین له ايسنر (Leisner) و همکارانش از کارنو باكتريوم UAL187-22 و لوکونوستوک ژليدوم LV17 با دانسيته اوليه $\log_2 CFU/cm^2$ از قطعات گوشت گاو در برودت ۲ درجه سلسیوس استفاده نمودند.^(۳۰) وين کوسکي و همکاران اثبات نمودند که لاكتوباسيلوس باواريكوس (لاكتوباسيلوس ساكه‌اي) می‌تواند از رشد سه سويه ليستريامونو سيتورژنس در گوشت گاو سترون نگه‌داری شده در برودت يخچال جلوگيری نماید. يوسف و همکاران در يافتند که پديوكوكوس اسيدي لاكتيسی H قادر است تمام سويه‌های ليستريا مونوسيتورژنس را در سوسيس وينر (Wiener) نگه‌داری شده در دمای ۴ درجه سلسیوس بعد از گذشت ۲۹ روز غير فعال نماید. در پژوهش دیگر گروه بری اثبات کردنده پديوكوكوس اسيدي لاكتيسی تلقيح شده به سوسيس فرانکفورتر در غلظت‌های 10^7 ، 10^4 ، 10^3 در دمای ۴ درجه سلسیوس می‌تواند باعث از بين رفتن يا حداقل طولاني شدن فاز تأخير رشد ليستريامونوسيتورژنس شود. چلينگر (Schillinger) و همکارانش نمونه‌های گوشت گوساله و

نتیجه‌گیری

با توجه به این‌که لاکتوپاسیلوس کازئی قابلیت بازدارندگی خوبی از خود نشان می‌دهد، در نتیجه این باکتری می‌تواند، یک سویه آناتاگونیست با پتانسیل (توان) مناسب از بین بردن یا متوقف کردن نشو و نمای باکتری‌های مهم مولد فساد و بیماری‌زای گوشت بسته‌بندی شده‌ای، که در شرایط هوایی و

در دماهای بین ۱- و ۵°C عرضه می‌گردد، باشد.

پراکسید ئیدروژن، استالدئید، اسید لاکتیک و آنزیم‌های تجزیه کننده باکتری‌ها در بازدارندگی از رشد میکروارگانیسم‌های مورد بررسی (کل میکروارگانیسم‌های هوایی، قارچ‌ها (مخمرها)، باکتری‌های لاکتیک، سودوموناس‌ها و کلی فرم‌ها) بیشتر مؤثر بوده‌اند. گرچه سایر عوامل نیز ممکن است در این زمینه دارای نقش باشند.

منابع مورد استفاده

- استاندارد ملی ایران، شماره ۹۹۷، ۱۳۷۴. روش جستجو و شمارش قارچ‌ها (کپک‌ها و مخمرها) به روش شمارش پرگنه در ۲۵°C. تجدید نظر دوم، چاپ دهم، مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، کرج.
- استاندارد ملی ایران، شماره ۱۱۹۴، ۱۳۷۴. روش شناسایی و شمارش استافیلوکوکوس θورθوس کواگلаз (+) در مواد غذایی. چاپ هشتم، تجدید نظر اول، مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، کرج.
- اکبری نخجوانی، ف. ۱۳۷۴. تهیه کشت‌های آغازگر لاکتیک مقاوم به باکتریوفاژ و تعیین توان آنتی باکتریال آنها، رساله دکترای تخصصی (Ph.D) در رشته میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، تهران.
- رکنی، ن. ۱۳۷۷. علوم و صنایع گوشت. چاپ دوم، انتشارات دانشگاه تهران، تهران، ۱۸۰-۲۳۰.
- شهیدی، ف. ۱۳۷۵، نگهداری بیولوژیکی گوشت، نقش خرد میکروبی باکتری‌های اسید لاکتیک. انتشارات بارثا، مشهد.
- مرتضوی، ع.، م. ح. حداد خداپرست، ر. فرهوش، ب. ناصحی و ر. رضایی مکرم. ۱۳۷۲. میکروبیولوژی غذایی مدرن. جلد اول، نشر مشهد.
- مرتضوی، ع.، ع. معتمدزادگان، م. اعلمی و ک. نایب‌زاده. ۱۳۷۶. میکروبیولوژی غذایی مدرن. جلد دوم، انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد.
- Baron, E.J.D., L.R., Peterson. 1994. Diagnostic Microbiology. 9th ed., Bailey and Scotts, Mosby, Sydney.
- Bozoglu, T.F. and B. Ray. 1996. Lactic Acid Bacteria. Current Advances in Metabolism, Genetics and Applications. Nato ASI series H: Cell Biology, vol. 98, Springer Verlag, Berlin, Germany, PP:5-86.
- Buchanan, R. E. and N.E. Gibbon. 1984. Bergey's manule of determinatives Bacteriology, 9th ed., The Williams & Wilkins Co.
- Cappuccino, J.G., N. Sherman. 1998, Microbiology. A Laboratory Manual. 5th ed., the Benjamin Cummings Publishing Company, Redwood City, California.
- Ceylan, E. and D. Y. C. Fung. 2000, Destruction of *Yersinia enterocolitica* by *Lactobacillus sake* and *Pediococcus acidilactici* during low temperature fermentation of turkish dry sausage (Sucuk), J.Food Sci. 65 (5): 876-879.
- Degnan, A.J., C. W. Kasper, W. S. otwell, M. L. Tamplin and J. B. Luchansky. 1994. Evaluation of lactic acid bacterium fermentation products and food-grade-chemical to control *Listeria monocytogenes* in blue crab (*Callinectes sapidus*) meat . J. Appl. Environ. Microbiol. 60(9): 3198-3203.
- De Vuyst, L.D. and E. J. Vandamme. 1994. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and Applications. Chapman and Hall, Glasgow, UK.
- EL-Khateib, T., A. E. Yousef and H. W. Ockerman. 1993. Inactivation and attachment of *Listerial monocytogenes* on beef muscle treated with lactic acid bacteria and selected bacteriocins. J. Food Prot. 56(1): 29-33.
- Foegeding, P.M., A. B. Thomas, D. H. Pilkington and T. R. Klaenhammer. 1992. Enhanced control of *Listeria monocytogenes* by in situ-produced pediocin during dry fermented sausage production. J.Appl. Environ. Microbiol. 58(3): 884-890.

17. Gill, C.O. and K. G. Newton. 1982. Effect of lactic acid bacteria on growth of gram-negative psychrothrops from a meatworks. *J. Appl. Environ. Microbiol.* 43(2): 284-288.
18. Gould, G.W. 1996. *New Methods of Food Preservation*, Blackie Academic and Professional. Chapman and Hall, Britain.
19. Hugas, M. 1998. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. *J. Meat Sci.* 49: 5139-5150.
20. International Standard, ISO 2293: 1988. Meat and meat products. Enumeration of micro-organisms colony count technique at 30°C (Reference method), 2nd ed., International Organization for Standardization, Switzerland.
21. International Standard, ISO 3100-1: 1991. Meat and meat products. Sampling and preparation of test samples, part 1: sampling, 2nd ed., International Organization for Standardization, Switzerland.
22. International Standard, ISO 3100-2: 1988. Meat and meat products. Sampling and preparation of test samples, part 2: preparation of test samples for microbiological examination, first edition, International Organization for Standardization, Switzerland.
23. International Standard, ISO 4832: 1991. General guidance for the enumeration of coliforms. Colony count technique, International Organization for Standardization, Switzerland.
24. International Standard, ISO 6887: 1983. Microbiology. General guidance for the preparation of dilutions for microbiological examination, first edition, International organization for Standardization, Switzerland.
25. International Standard, ISO 13720: 1995. Meat and meat products. Enumeration of Pseudomonas Spp., first edition, International Organization for Standardization, Switzerland.
26. International Standard, ISO 13721: 1995. Meat and meat products. Enumeration of lactic acid bacteria, colony count technique at 30°C, International Organization for Standardization, Switzerland.
27. Itoh, T., Y. Fujimoto, Y. Kawal, T. Toba and T. Saito. 1995. Inhibition of food-borne pathogenic bacteria by bacteriocins from *Lactobacillus gasseri*. *J. Lett. Appl. Microbiol.* 21: 137-141.
28. Kyzink, V. 1990. *Developments in Food Science, Principles of food preservation*. Elsevier Pub. Czechoslovakia.
29. Lambert, A.N., J. P. Smith and K. L. Dodds. 1991. Shelf life extention and microbiological safety of fresh meat. A review, *J. food Microbiol.* 8: 267-297.
30. Leisner, J.J., G. G. Greer, B. D. Dilts and M. E. Stiles. 1995. Effect of growth of selected lactic acid bacteria on storage life of beef stored under vacuum and in air. *Int. J. Food. Micobiol.* 26: 231-243.
31. Nader De Macias, M.E., N. C. Remore, M. C. Apella, S.N. Gonzalez and G. Liver. 1993. Prevention of infections produced by *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by feeding milk fermented with lactobacilli. *J. Food prot.* 56(5): 401-495.
32. Okeereke, A. and T. J. montville. 1991. Bacteriocin- mediated inhibition of *Clostridium botulinum* spores by lactic acid bacteria at refrigeration and abuse temperatures. *J. Appl. Environ. Microbiol.* 57(12): 3423-3428.
33. Zeuthen, P., J. C. Cheftel, C. Erikson, T. R. Gormley and K. Paulus. 1990. *Food Biotechnology: Avenues to healthy and nutritions products, processing and quality of foods*, vol. 2, Elsevier Pub. Applied Science, Northern Ireland.