

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

شعله درویشی<sup>۱</sup>، سید حسن لامع<sup>۲</sup>، فرخ اکبری نخجوانی<sup>۳</sup> و فرخ درویش<sup>۴</sup>

### چکیده

اثر رشد و تکثیر یک سویه لاکتوباسیلوس کازئی زیرگونه کازئی و یک سویه از لاکتوکوکوس لاکتیس زیرگونه لاکتیس وارینه دی استی لاکتیس جدا شده از فرآورده‌های شیر که فعالیت آنتی بیوز آنها بر روی استافیلوکوکوس نورئوس و اشیریشیا کلی بررسی و تأیید شده بود، بر فلور طبیعی گوشت چرخ کرده گاو، در شرایط صنعتی، مورد بررسی قرار گرفت. سویه‌های مذکور به‌طور جداگانه و با غلظت  $10^4$  CFU/g گوشت چرخ کرده اضافه شدند. نمونه‌های تلقیح شده و شاهد در بسته‌های نیم کیلویی و در ظروف پلاستیکی بسته‌بندی شده و در  $5-1^\circ\text{C}$  به مدت ۵ روز نگهداری گردیدند. شمارش گروه‌های مختلف میکروبی (شمارش کلی میکروارگانسیم‌های هوازی، باکتری‌های لاکتیک، سودوموناس‌ها، استافیلوکوکوس نورئوس، کلی فرم‌ها، قارچ‌ها و جستجوی (اشیریشیاکلی) در طول مدت نگهداری انجام شد. نتایج بررسی نشان می‌دهد که تعداد باکتری‌های لاکتیک در نمونه‌های تلقیح شده با لاکتوباسیلوس کازئی، در طول مدت نگهداری (۵ روز) افزایش می‌یابد، در حالی که تعداد کل میکروارگانسیم‌های هوازی، سودوموناس‌ها، کلی فرم‌ها و مخمرها، در شرایط مذکور، کاهش می‌یابند. در نمونه‌هایی که با لاکتوکوکوس لاکتیس تلقیح شده بودند، فقط تعداد مخمرها کاهش قابل توجهی نشان می‌دهند. سویه اخیر روی تعداد سایر گروه‌های میکروبی شمارش شده اثر قابل توجهی نداشته است. بدین ترتیب مشخص گردید که لاکتوباسیلوس کازئی، می‌تواند یک سویه آنتاگونیست مناسب با توان بازدارندگی در برابر میکروارگانسیم‌های عامل فساد و بیماری‌زای گوشت خامی که در بسته‌بندی‌های قابل نفوذ به هوا، در دمای بین  $-1$  و  $5^\circ\text{C}$  قرار گرفته است، مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: لاکتوباسیلوس کازئی، لاکتوکوکوس لاکتیس، فلور طبیعی گوشت گاو، فعالیت بازدارندگی باکتری‌های لاکتیک

### 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 به‌کار بستن فن‌آوری‌های جدید، هنوز مسئله عدم اطمینان از سلامت مواد غذایی حل نشده است. تعداد عفونت‌ها و مسمومیت‌های

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

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

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

گوشت به دلیل ویژگی‌های اکولوژیکی خاصی که دارد (pH،  $a_w$  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 میکرووب‌های 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 اورئوس، اشریشیا کلی، کلستریدیوم پرفرنزانس و لیستریا مونوسیتوزنس از مهم‌ترین باکتری‌های بیماری‌زای گوشت هستند (۴)، در گوشت‌های مختلف، باکتری‌های لاکتیک، بخشی از فلورای میکروبی اولیه را تشکیل می‌دهند، که پس از قراردادن گوشت در سردخانه، به منظور نگهداری، سویه‌های سرمادوست آنها به‌سهولت نشو و نما می‌کنند (۳۰). باکتری‌های لاکتیک، باکتری‌هایی هستند گرم مثبت، میکروآئروفیل و غیراسپورزا، که در طی تخمیر، کربوهیدرات‌ها را به لاکتات به عنوان محصول اصلی تبدیل می‌کنند. از مهم‌ترین جنس‌های متعلق به باکتری‌های لاکتیک می‌توان لاکتوکوکوس، لاکتوباسیلوس، استرپتوکوکوس، کارنو باکتریوم، لوکونوستوک و پدیوکوکوس را نام برد (۱۴).

باکتری‌های لاکتیک، هنگامی که در محیط‌های کشت همراه با میکرووب‌های دیگر قرار می‌گیرند، باعث بازدارندگی یا از بین رفتن آنها می‌گردند. استفاده از این پدیده که آنتاگونیسم لاکتیکی خوانده می‌شود، به‌عنوان یک روش مطلوب به‌جای استفاده از افزودنی‌های شیمیایی به‌منظور کنترل میکروارگانیسم‌های نامطلوب در مواد غذایی مورد توجه متخصصان قرار دارد. برخی از باکتری‌های لاکتیک 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

بازدارندگی کشت‌های لاکتیکی تاکنون به‌طور دقیق روشن نشده است. از بین ترکیبات بازدارنده‌ای که به‌وسیله این باکتری‌ها تولید می‌شود، می‌توان به آنتی بیوتیک‌ها، دی‌استیل (Diacetyl)، روترین (Reuterin)، استتوئین (Acetoin)، ۲ و ۳- بوتان‌دی‌ال (2,3-butandiol)، استالدئید (Acetaldehyde)، اسیدهای آلی مانند اسیدهای لاکتیک، استیک، پروپیونیک و فرمیک، اسیدهای چرب آزاد، آمونیاک، آنزیم‌های تجزیه‌کننده باکتری‌ها، اتانول، پراکسید تیدروژن، باکتریوسین‌ها، مواد مشابه باکتریوسین‌ها، ترکیبات آنتاگونیست ناشناخته، تجمع D- آمینو اسیدها، کاهش پتانسیل اکسیداسیون احیا، کاهش pH تراکم جمعیت و رقابت در مصرف مواد غذایی اشاره نمود (۷، ۹، ۱۳، ۱۴، ۱۵، ۱۶، ۱۷، ۱۸، ۱۹، 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 روباز برای انتخاب راحت‌تر مصرف‌کنندگان است (۳۰). در چنین شرایطی گوشت، معمولاً در معرض تغییرات و نوسانات دما (دمای نزدیک به انجماد تا چند درجه بالاتر از آن) قرار می‌گیرد. پژوهش‌های نسبتاً زیادی با هدف استفاده از سویه‌های لاکتیک 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 لاکتیک 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

## روش‌ها

### ۱. روش اندازه‌گیری غلظت معلقه‌های (سوسپانسیون‌های) باکتری‌های لاکتیک

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 به دست آمده و با استفاده از میزان جذب لوله‌های ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳، ۰/۴ و ۰/۵ مک فارلند (Mc. Farland)، تعداد باکتری‌ها در معلقه‌های مورد استفاده محاسبه گردید (۸).

### ۲. تلقیح گوشت

گوشت چرخ کرده به غلظت  $10^4$  CFU/g از باکتری‌های لاکتیک 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 لاکتوباسیلوس کازئی، تیمار ۱، و گوشت چرخ کرده تلقیح شده با لاکتوکوکوس لاکتیس، تیمار ۲، نام‌گذاری گردیدند.

### 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 میکروارگانیزم‌های هوازی، شمارش باکتری‌های لاکتیک، شمارش سودوموناس‌ها، شمارش کلی فرم‌ها به ترتیب با استفاده از استانداردهای ISO 2293، ISO 13721،

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 لاکتیک

باکتری‌های لاکتیک 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

به منظور شمارش کلی میکروارگانیزم‌های هوازی، باکتری‌های لاکتیک، سودوموناس‌ها، کلی فرم‌ها، استافیلوکوکوس-ئورئوس، قارچ‌ها (کپک‌ها و مخمرها)، جستجوی اشریشیا کلی به ترتیب از محیط‌های کشت پلیت کانت آگار (Plate count agar)، MRS آگار (CFC آگار)، (deMan Rogosa and Sharp)، Crystal violet neutral آگار (VRBL)، (fucidin cephaloridine)، (red bile lactose)، بردپارکر آگار (Baird Parker agar)، محیط حاوی عصاره مخمر-لاکتوز-کلرامفنیکل آگار، (CGA)، (Yeast extract - dextrose - chloramphenicol agar) و EMB (Eosin- methylene blue agar) استفاده گردید. برای اندازه‌گیری غلظت معلقه‌های باکتری‌های لاکتیک از دستگاه اسپکتروفوتومتر مدل Shimadzu (P/N 204-00010-02-UV- Kyoto, Japan) (120-02) استفاده شد.

### ۴. بسته‌بندی

برای بسته‌بندی گوشت، از ظروف پلاستیکی نیم کیلویی پلی‌استیرن (Polystyrene (PS)) موسوم به ظروف یک‌بار مصرف و فیلم پلی‌اتیلن با دانسیته کم (Low density poly ethylene (LDPE)) و قابل نفوذ به اکسیژن ( $55 \text{ cc}/24 \text{ h}/100 \text{ in}^2$ ) استفاده شد.

ISO 4832 و ISO 13720 انجام گرفتند (۲۰، ۲۳، ۲۵، ۲۶). برای شمارش استافیلوکوکوس ثورئوس و شمارش قارچ‌ها (کپک‌ها و مخمرها) از استانداردهای ایران به ترتیب با شماره‌های ۱۱۹۴ و ۹۹۷ استفاده گردید (۱، ۲). جستجوی اشرفیسا 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 پرگنه‌های میکروارگانسیم‌های هوازی، 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 /g) و لگاریتم آنها گنجانیده شده است. در طی مدت نگهداری نمونه‌های آزمایشی، پرگنه کپک و استافیلوکوکوس ثورئوس در هیچ‌یک از نمونه‌های مشاهده نشد.

## بحث

طبق جدول ۱، لگاریتم تعداد میکروارگانسیم‌های هوازی نمونه‌های گوشت تلقیح شده با لاکتوباسیلوس کازئی (تیمار ۱)، CFU/g ۶/۹ بلافاصله پس از بسته‌بندی به CFU/g ۵/۹ در روز پنجم نگهداری کاهش پیدا کرده است. در طول مدت نگهداری گوشت در سردخانه (۵-۱°C)، تغییرات تعداد این میکروارگانسیم‌ها در نمونه‌های تیمار ۱ همواره به‌طور 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

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 ( $P < 0/01$ ) است. 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 CFU/g ۴/۸ در ابتدای نگهداری، به CFU/g ۶ 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 به‌طور طبیعی در گوشت وجود دارند.

نتایج شمارش سودوموناس‌های گوشت چرخ کرده (جدول ۳) نشان می‌دهد که لگاریتم تعداد این باکتری‌ها در تیمار ۱، از CFU/g ۶/۱ بلافاصله پس از بسته‌بندی به CFU/g ۴/۴ 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 ( $P < 0/01$ ) است.

طبق جدول ۴، تعداد کلی فرم‌های نمونه‌های گوشت مربوط به تیمار ۱، از CFU/g  $10^4 \times 3/1$  بلافاصله پس از بسته‌بندی، به CFU/g  $10^2$  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 به‌طور معنی‌داری ( $P < 0/01$ )، کمتر از شاهد بود (جدول ۵)، به ویژه در تیمار ۲ که تعداد آنها در روز سوم، در

جدول ۱. میانگین تعداد کلی میکروارگانیسم‌های هوازی 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	
$8/1 \times 10^6$	۶/۹	$7/5 \times 10^6$	۶/۹	$7/0 \times 10^6$	۶/۸	صفر
$7/2 \times 10^6$	۶/۹	$9/6 \times 10^5$	۶/۰	$3/6 \times 10^7$	۷/۶	۱
$8/0 \times 10^5$	۵/۹	$6/8 \times 10^5$	۵/۸	$6/9 \times 10^7$	۷/۸	۲
$5/6 \times 10^6$	۶/۷	$8/8 \times 10^5$	۵/۹	$8/0 \times 10^6$	۶/۹	۳
-	-	$8/1 \times 10^5$	۶/۹	-	-	۴
-	-	$7/3 \times 10^5$	۵/۹	-	-	۵

\* : گوشت چرخ کرده تلقیح نشده  
 \*\* : گوشت چرخ کرده تلقیح شده بالاکتوباسیلوس کازئی  
 \*\*\* : گوشت چرخ کرده تلقیح شده بالاکتوکوکوس لاکتیس  
 - : توضیح این‌که 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	
$6/3 \times 10^4$	۴/۸	$5/7 \times 10^4$	۴/۸	$1/3 \times 10^3$	۳/۱	صفر
$1/1 \times 10^5$	۵/۰	$4/7 \times 10^4$	۴/۷	$2/0 \times 10^3$	۳/۳	۱
$2/9 \times 10^5$	۵/۵	$1/9 \times 10^5$	۵/۳	$1/7 \times 10^3$	۳/۲	۲
$4/7 \times 10^5$	۵/۷	$2/7 \times 10^5$	۵/۴	$1/3 \times 10^3$	۳/۱	۳
-	-	$4/3 \times 10^5$	۵/۶	-	-	۴
-	-	$9/6 \times 10^5$	۶/۰	-	-	۵

\* : گوشت چرخ کرده تلقیح نشده  
 \*\* : گوشت چرخ کرده تلقیح شده بالاکتوباسیلوس کازئی  
 \*\*\* : گوشت چرخ کرده تلقیح شده بالاکتوکوکوس لاکتیس  
 - : توضیح این‌که 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	
$1/3 \times 10^6$	۶/۱	$1/2 \times 10^6$	۶/۱	$1/0 \times 10^6$	۶/۰	صفر
$3/3 \times 10^6$	۶/۵	$7/6 \times 10^5$	۵/۹	$1/6 \times 10^6$	۶/۲	۱
$3/1 \times 10^6$	۶/۵	$5/0 \times 10^5$	۵/۷	$4/3 \times 10^6$	۶/۶	۲
$4/7 \times 10^5$	۵/۷	$5/3 \times 10^4$	۴/۷	$9/0 \times 10^5$	۶/۰	۳
-	-	$3/7 \times 10^4$	۴/۶	-	-	۴
-	-	$2/7 \times 10^4$	۴/۴	-	-	۵

\* : گوشت چرخ کرده تلقیح نشده  
 \*\* : گوشت چرخ کرده تلقیح شده بالاکتوباسیلوس کازئی  
 \*\*\* : گوشت چرخ کرده تلقیح شده بالاکتوکوکوس لاکتیس  
 - : توضیح این‌که 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 (روز)
CFU/g	Log CFU/g	CFU/g	Log CFU/g	CFU/g	Log CFU/g	
$3/3 \times 10^4$	۴/۵	$3/1 \times 10^4$	۴/۵	$1/2 \times 10^4$	۴/۴	صفر
$6/7 \times 10^4$	۴/۸	$2/0 \times 10^3$	۳/۳	$3/2 \times 10^4$	۴/۵	۱
$5/6 \times 10^4$	۴/۷	$8/3 \times 10^2$	۲/۹	$9/0 \times 10^3$	۴/۰	۲
$8/6 \times 10^4$	۴/۹	$1/3 \times 10^3$	۳/۱	$1/9 \times 10^4$	۴/۳	۳
-	-	$7/0 \times 10^2$	۲/۸	-	-	۴
-	-	$1/0 \times 10^2$	۲/۰	-	-	۵

\*: گوشت چرخ کرده تلقیح نشده  
 \*\*: گوشت چرخ کرده تلقیح شده بالاکتوباسیلوس کازئی  
 \*\*\*: گوشت چرخ کرده تلقیح شده بالاکتوکوکوس لاکتیس  
 -: توضیح این‌که 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 (روز)
CFU/g	Log CFU/g	CFU/g	Log CFU/g	CFU/g	Log CFU/g	
$5/7 \times 10^4$	۴/۸	$6/1 \times 10^4$	۴/۸	$8/1 \times 10^4$	۴/۹	صفر
$8/3 \times 10^3$	۳/۹	$6/3 \times 10^4$	۴/۸	$8/4 \times 10^4$	۴/۹	۱
$7/5 \times 10^3$	۳/۹	$9/5 \times 10^3$	۴/۰	$9/2 \times 10^4$	۵/۰	۲
$5/2 \times 10^3$	۳/۷	$1/3 \times 10^4$	۴/۱	$8/5 \times 10^4$	۴/۹	۳
-	-	$8/6 \times 10^3$	۳/۹	-	-	۴
-	-	$7/0 \times 10^3$	۳/۸	-	-	۵

\*: گوشت چرخ کرده تلقیح نشده  
 \*\*: گوشت چرخ کرده تلقیح شده بالاکتوباسیلوس کازئی  
 \*\*\*: گوشت چرخ کرده تلقیح شده بالاکتوکوکوس لاکتیس  
 -: توضیح این‌که 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 حالی‌که در نمونه‌های مربوط به تیمار ۱، یعنی گوشت تلقیح شده با لاکتوباسیلوس 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.) (Coefficient of variability) 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 لاکتیس در این مورد، از لاکتوباسیلوس 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 اشریشیا کلی در گوشت در طول مدت نگهداری

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

\*: گوشت چرخ کرده تلقیح نشده

\*\* : گوشت چرخ کرده تلقیح شده بالاکتوباسیلوس کاژنی

\*\*\* : گوشت چرخ کرده تلقیح شده بالاکتوکوکوس لاکتیس

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

اشریشیا، سالمونلا و استرپتومیسس‌ها. البته نتایج تحقیقات مختلف نشان داده است که در گوشت‌های فاسد، برخلاف گوشت‌های سالم، جنس‌های باکتریایی معدود هستند. 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 (۴، ۷، ۱۴).

نتایج پژوهش‌ها نشان داده‌اند که فرآورده‌های نهایی عمده متابولیسم سودوموناس‌ها، مواد لزج (Slime)، سولفیدها، استرها و اسیدهای آمینه هستند. در صورتی که لاکتوباسیلوس‌ها عمدتاً اسید لاکتیک، مواد فرار و اسیدهای چرب تولید می‌کنند. زمان تقسیم سلولی برخی از لاکتوباسیلوس‌ها در  $2^{\circ}\text{C}$ ، حدود ۸/۴ ساعت گزارش گردیده است (۲۹)، که با نتایج این مطالعه مطابقت دارد.

سیلان و همکاران گزارش داده‌اند که لاکتوباسیلوس ساکی و پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی در طی تخمیر و خشک کردن سوسیس خشک ترکی موجب از بین رفتن 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 همبرگر، برخلاف لاشه‌های تازه ذبح و شقه شده، معمولاً منحصراً به وسیله باکتری‌ها مورد تهاجم قرار گرفته و فاسد می‌شوند. گوشت معمولاً بلافاصله پس از تولید، در سردخانه با دمای صفر تا  $2^{\circ}\text{C}$  و یا حداکثر  $4^{\circ}\text{C}+$  نگهداری می‌شود. از این رو مهم‌ترین مسئله از نظر میکروبی، سرماگراها 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 فراژی، نقش مهم‌تری در آلودگی گوشت داراست. و به همین سبب، تحت عنوان «میکروارگانیزم ویژه گوشت» شناخته شده است. برخلاف تصورات گذشته، یافته‌های جدید حاکی از آن است که گونه‌های مختلف اسپیتوباکتر نقش چندانی در فساد گوشت گاو ندارند. در شرایط نگهداری در سردخانه ( $2^{\circ}\text{C}+$ ) از باکتری‌های خانواده آنتروباکتریاسه، سویه‌های سرماگرای آنتروباکتر و کلبسیلا، 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 آلودگی گوشت داشته باشد. به هر حال، مهم‌ترین باکتری‌هایی که در آلودگی گوشت نقشی دارند عبارت‌اند از: سودوموناس، اسپیتوباکتر، موراکسلا، آلكالی ژنس، میکروکوکوس، استرپتوکوکوس، باسیلوس، کلسترییدیوم،

با میکروارگانیزم‌های عامل فساد در سرما می‌باشند (۳، ۷، ۱۲، ۱۴، ۲۹). به طور کلی، استرپتوکوک‌های لاکتیک در ۱۰ درجه سلسیوس و کمتر از آن رشد و تکثیر می‌کنند ولی در ۴۵ درجه قادر به رشد نیستند (۱۰). بیشتر لاکتوباسیل‌ها نیز در حرارت‌های مزوفیلیک بهتر رشد و تکثیر می‌نمایند. بعضی از آنها در پایین‌تر از ۱۵ درجه و بعضی سویه‌ها حتی کمتر از ۵ درجه سلسیوس نیز نشو و نما می‌کنند (۱۰).

پژوهش‌های بسیاری انجام گرفته است که در آنها از باکتری‌های لاکتیک مزوفیل به عنوان محافظت‌کننده بیولوژیکی مواد غذایی تحت شرایط سرد کردن استفاده شده است. نتایج این پژوهش‌ها نشان داده است که در چنین شرایطی باکتری‌های لاکتیک با عوامل بیماری‌زا رقابت کرده، جلوتر از آنها رشد و تکثیر می‌نمایند (۱۹). به عنوان مثال زویتن و همکارانش باکتری‌های لاکتیک را با غلظت  $\log 5 \text{ CFU/cm}^2$  روی گوشت مرغ در ۲ درجه سلسیوس تلقیح نمودند (۳۳). هم‌چنین له ایسنر (Leisner) و همکارانش از کارنو باکتریوم مالتارومیکوس LV17 و لوکونوستوک ژلیدوم UAL187-22 با دانسیته اولیه  $\log 2 \text{ CFU/cm}^2$  از قطعات گوشت گاو در برودت ۲ درجه سلسیوس استفاده نمودند (۳۰). وین کوسکی و همکاران اثبات نمودند که لاکتوباسیلوس باواریکوس (لاکتوباسیلوس ساکه‌ای) می‌تواند از رشد سه سویه لیستریامونو سیتوژنس در گوشت گاو سترون نگه‌داری شده در برودت یخچال جلوگیری نماید. یوسف و همکاران دریافتند که پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی H قادر است تمام سویه‌های لیستریا مونوسیتوژنس را در سوسیس وینر (Wiener) نگه‌داری شده در دمای ۴ درجه سلسیوس بعد از گذشت ۲۹ روز غیر فعال نماید. در پژوهش دیگر گروه بری اثبات کردند که پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی تلقیح شده به سوسیس فرانکفورتر در غلظت‌های  $10^3$ ،  $10^4$ ،  $10^7 \text{ CFU/g}$  در دمای ۴ درجه سلسیوس می‌تواند باعث از بین رفتن یا حداقل طولانی شدن فاز تأخیر رشد لیستریا مونوسیتوژنس شود. چلینگر (Schillinger) و همکارانش نمونه‌های گوشت گوساله و

خوک را پس از تلقیح با باکتری‌های لاکتیک در دماهای ۵، ۲، و ۰ درجه سلسیوس تحت شرایط خلاء نگه‌داری نمودند. نتایج این پژوهش نشان داد که تفاوت بین سطوح مختلف درجه حرارت‌های مختلف فوق تأثیر زیادی بر رشد و تکثیر باکتری‌های لاکتیک ندارد. در بخشی از پژوهشی دیگر شهیدی و همکارانش، گوشت چرخ کرده گوساله غیر استریل را با باکتری‌های لاکتیک کارنو باکتریوم دیورژنس و لاکتوباسیلوس فرماتوم با غلظت‌های به ترتیب  $2 \times 10^4 \text{ CFU/g}$  و  $4/8 \times 10^6 \text{ CFU/g}$  در ۴ و ۱۰ درجه سلسیوس در شرایط هوای تلقیح کردند. نتایج نشان می‌دهد که قابلیت مهار کنندگی فلور میکروبی طبیعی گوشت در ۴ درجه به مراتب بیشتر بوده است. این پژوهش در مورد گوشت خام استریل نیز انجام شده است. نتایج نشان می‌دهد که باکتری‌های لاکتیک مورد استفاده در این پژوهش در ۴ درجه سلسیوس توانسته‌اند از رشد و تکثیر باکتری‌های شاخص جلوگیری کنند (۵).

ارتباط تولید باکتریوسین‌ها با دمای محیط نیز اثبات گردیده است. به عنوان مثال مشخص شده است که با واریسین MN که به وسیله لاکتوباسیلوس ساکه‌ای MN (لاکتوباسیلوس باواریکوس) تولید می‌شود، در درجه حرارت‌های پایین و در برودت یخچال تولید می‌شود (۱۹).

همان‌طوری که در مقدمه نیز اشاره شد، با این‌که مکانیسم اثر بازدارندگی کشت لاکتیکی، به طور دقیق روشن نشده است، ولی تولید ترکیباتی مانند آنتی بیوتیک‌ها، دی استیل، اتانول، پراکسید نیدروژن، استالید، اسیدهای آلی مانند اسیدهای لاکتیک، استیک، پروپیونیک و فرمیک، اسیدهای چرب آزاد، آمونیاک، بنزوات، باکتریوسین‌ها، شبه باکتریوسین‌ها، آنزیم‌های تجزیه کننده باکتری‌ها، و هم‌چنین کاهش پتانسیل اکسیداسیون- احیاء، کاهش pH، تراکم جمعیت و رقابت در مصرف مواد غذایی را از عوامل ضد میکروبی آنها می‌دانند. با توجه به ویژگی‌های سویه‌های مورد استفاده در این پژوهش، به نظر می‌رسد، تولید باکتریوسین‌ها و مواد مشابه باکتریوسین، ترکیبات آنتاگونیست ناشناخته، مواد ضد قارچی،

### نتیجه‌گیری

با توجه به این‌که لاکتوباسیلوس کازئی قابلیت بازدارندگی خوبی از خود نشان می‌دهد، در نتیجه این باکتری می‌تواند، یک سویه آنتاگونیست 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 هوازی در دماهای بین ۱- و ۵°C عرضه می‌گردد، باشد.

پراکسید ئیدروژن، استالئید، اسید لاکتیک و آنزیم‌های تجزیه‌کننده باکتری‌ها در بازدارندگی از رشد میکروارگانیزم‌های مورد بررسی (کل میکروارگانیزم‌های هوازی، قارچ‌ها (مخمرها)، باکتری‌های لاکتیک، سودوموناس‌ها و کلی‌فرم‌ها) بیشتر مؤثر بوده‌اند. گرچه سایر عوامل نیز ممکن است در این زمینه دارای نقش باشند.

### منابع مورد استفاده

۱. 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.
۲. استاندارد ملی ایران، شماره ۱۱۹۴، ۱۳۷۴. روش شناسایی و شمارش استافیلوکوکوس ئورئوس کواگولاز (+) در مواد غذایی. چاپ هشتم، تجدید نظر اول، مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، کرج.
۳. 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.
۴. رکنی، ن. ۱۳۷۷. علوم و صنایع گوشت. چاپ دوم، انتشارات دانشگاه تهران، تهران، ۲۳۰-۱۸۰.
۵. شهیدی، ف. ۱۳۷۵. نگاه‌داری بیولوژیکی گوشت، نقش ضد میکروبی باکتری‌های اسید لاکتیک. انتشارات بارثاوا، مشهد.
۶. مرتضوی، ع، م. ح. حداد خدایپرست، ر. فرهوش، ب. ناصحی و ر. رضایی مکرّم. ۱۳۷۲. میکروبیولوژی غذایی مدرن. جلد اول، نشر مشهد.
۷. مرتضوی، ع، ع. معتمدزادگان، م. اعلمی و ک. نایب‌زاده. ۱۳۷۶. میکروبیولوژی غذایی مدرن. جلد دوم، انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد.
8. Baron, E.J.D., L.R., Peterson. 1994. Diagnostic Microbiology. 9<sup>th</sup> ed., Bailey and Scotts, Mosby, Sydney.
9. 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.
10. Buchanan, R. E. and N.E. Gibbon. 1984. Bergey's manule of determinatives Bacteriology, 9<sup>th</sup> ed., The Williams & Wilkins Co.
11. Cappuccino, J.G., N. Sherman. 1998, Microbiology. A Laboratory Manual. 5<sup>th</sup> ed., the Benjamin Cummings Publishing Company, Redwood City, California.
12. 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.
13. 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.
14. De Vuyst, L.D. and E. J. Vandamme. 1994. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and Applications. Chapman and Hall, Glasgow, UK.
15. 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.
16. 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 on meat of gram-negative psychrotrophs 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), 2<sup>nd</sup> 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, 2<sup>nd</sup> 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 gasserii*. *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 extension 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. Microbiol.* 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 nutritious products, processing and quality of foods*, vol. 2, Elsevier Pub. Applied Science, Northern Ireland.