

مطالعه پتانسیل رشد و توکسین‌زایی کلستریدیوم بوتولینوم و اشیریشیا کولای متاثر از

فرمولاسیونهای مختلف نمک و مواد نگهدارنده مورد پیش‌بینی در فرآوری خاویار

دکتر دودود رضوی^۱، دکتر رضا صفری^۲، دکتر رضا پورغلام^۲

مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۶، شماره ۲، ۱۴-۹، ۱۳۸۰

شده در حوالی دریای مازندران (ایران) به‌صورت نیمه تجارتي (۱۳) گزارش شده است. علاوه بر امکان آلودگی خاویار به‌وسیله اسپورهای کلستریدیوم بوتولینوم، باکتریهای بیماری‌زای دیگری که در طول فرآوری خاویار دان از امکان آلوده‌سازی بالایی برخوردار می‌باشند می‌توان استافیلوکوک، لیستریا و اشیریشیا کولای را نام برد که در بین آنها اشیریشیا کولای به‌عنوان باکتری شاخص آلودگی منشأ مدفوعی و بیماری‌زایی آن از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد (۱۹).

برای محافظت خاویار دان از رشد میکروبهای عامل بیماری و فساد علاوه بر نگهداری آن در سرمای زیر صفر درجه سانتیگراد در طول نگهداری به‌عنوان مکمل از مواد نگهدارنده نیز استفاده می‌شود. در حال حاضر مواد نگهدارنده مورد استفاده در خاویار دان از نوع بوراکس و اسید بوریک می‌باشد که در بازار اتحادیه اروپا مدتهاست که به‌عنوان ماده نگهدارنده غیرمجاز شناخته شده است (۱۸ و ۲)، گرچه استفاده از آن هنوز به‌خاطر مصرف محدود این فرآورده به‌عنوان یک غذای فانتزی عملاً تا حدودی قابل دفاع و اغماض می‌باشد. با اجرای سیستم HACCP در تولید فرآوری مواد غذایی دریایی صادراتی از جمله خاویار در ایران، یکی از مواردی که باید در بهبود کیفیت خاویار مورد توجه قرار گیرد، تغییر فرمول خاویار از نظر ماده نگهدارنده و تعیین یک جایگزین مناسب و مجاز به‌جای ماده نگهدارنده قدیم می‌باشد. بدین منظور در این مطالعه دو باکتری مهم کلستریدیوم بوتولینوم (تیپ E) و اشیریشیا کولای (تیپ O₁₁₁) از طریق مطالعه تلقیحی (Inoculation study) در محیط کشت مدل آزمایشگاهی با استفاده از چندین فرم ترکیبی نمک و مواد نگهدارنده، فرمول جدید و مناسب خاویار از نظر ماده نگهدارنده پیش‌بینی خواهد شد. مضافاً اینکه پس از تعیین فرمول مناسب، تجربیات بعدی با استفاده از همین سیستم مطالعاتی در خود خاویار به روش مدل‌سازی پیشگو (Predictive Food Microbiology) انجام خواهد گرفت.

مواد و روش کار

الف) میکروبه‌ها: میکروبه‌های مورد آزمایش شامل کلستریدیوم بوتولینوم تیپ E-Beluga تهیه شده از پروفیسور جنی جورجیس استاد دانشگاه دیویس کالیفرنیا و اشیریشیا کولای تیپ RITCC1177 تهیه شده از مؤسسه تحقیقاتی سرم و واکسن‌سازی رازی می‌باشند.

ب) تهیه سوسپانسیونهای میکروبی جهت Inoculation study:
۱- تهیه سوسپانسیون اسپورهای کلستریدیوم بوتولینوم: با استفاده از تک کلنی خالص کلستریدیوم بوتولینوم در محیط کشت egg yolk agar کشتهای متعددی در همین محیط به‌صورت سطحی و پر حجم در شرایط بی‌هوازی (با استفاده از سیستم Gaspak) در ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۴-۱۲ روز تا تولید اسپورهای آزاد تهیه گردید. اسپورهای آزاد از طریق تهیه لام و مشاهدات میکروسکوپی مداوم مشخص گردید. پس از تولید حداکثر اسپورهای آزاد، جهت جمع‌آوری اسپورها از پلیتهای egg yolk از آب مقطر استریل حاوی ۰/۱ درصد tween 80 از طریق شستشوی کلنی‌ها استفاده گردید. سوسپانسیون تهیه شده در اتانول ۵۰ درصد فیلتر استریل شده به مدت یک ساعت جهت کشتن سلولهای رویای باقیمانده باکتری در حرارت آزمایشگاه قرار گرفت. اسپورها حداقل چهار بار با استفاده از سانتریفوژ ۱۵۰۰۰g شستشو و تجدید

تهیه خاویار دان خام در ایران از قدیم از نظر افزودنی به دو صورت (۱) حاوی نمک و بدون نگهدارنده و (۲) حاوی نمک توأم با نگهدارنده (اسید بوریک و بوراکس) صورت می‌گیرد. با توجه به ضعیف‌بودن خاصیت ضد میکروبی اسید بوریک و بوراکس و غیرمجاز بودن مصرف عمومی آن در اغلب کشورهای غربی و ضرورت پیش‌بینی یک فرمول مناسب، نگهدارنده برای خاویار، در این مطالعه ۱۶ فرمولاسیون مختلف از نظر غلظتهای مختلف نمک (۵/۵ و ۵، ۴/۵ درصد) و مواد نگهدارنده شامل (۱) مخلوطی از ۰/۳ درصد اسید بوریک و ۰/۴ درصد بوراکس، (۲) مخلوطی از ۲۶ درصد رسوبات پتاسیم و ۸۰ppm نیتريت سدیم، (۳) متیل پارابن با غلظت ۰/۱ درصد و (۴) متیل پارابن با غلظت ۰/۲ درصد جهت مطالعه رشد و توکسین‌زایی دو باکتری مهم کلستریدیوم بوتولینوم تیپ E و اشیریشیا کولای تیپ O₁₁₁ در یک محیط کشت مدل به‌صورت Inoculation study مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت. میزان اینوکولوم اولیه در مورد اسپورهای کلستریدیوم بوتولینوم و سلولهای اشیریشیا کولای ضریبی از ۱۰^۵ باکتری در هر میلی‌لیتر BHI انتخاب گردید. ارزیابی رشد در مورد کلستریدیوم بوتولینوم علاوه بر شمارش باکتری با آزمایش توکسین‌زایی آن نیز همراه بود. نتایج مطالعه نشان داد که رشد و توکسین‌زایی دو باکتری در BHI مدل کنترل (بدون نمک و نگهدارنده) و در BHI حاوی نمک تنها با غلظتهای ۴/۵ تا ۵/۵ درصد مثبت بود. گرچه فرم ترکیبی نوع ۲ مواد نگهدارنده توأم با نمک خاصیت ضد میکروبی بهتر از نوع اول نشان داد ولی در نهایت تأثیر آنها صرفاً به‌صورت باکتریواستاتیک (جلوگیری از رشد جمعیت باکتری اینوکوله شده ولی بقا یافته) نمایان گردید. در حالی‌که استفاده از متیل پارابن با غلظت ۰/۱ تا ۰/۲ درصد (نوع ترکیبی ۳ و ۴) علاوه بر توقف رشد دو باکتری به‌صورت باکتریوسید قوی (انهدام تماس جمعیت میکروبی اینوکوله شده نمایان گردید). با افزایش غلظت نمک از ۴/۵ به ۵/۵ درصد اثر ضد میکروبی نگهدارنده به‌طور ملایمی افزایش پیدا نمود. ضعیف‌ترین اثر ضد میکروبی مربوط به ترکیب اسید بوریک و بوراکس توأم با نمک ۴/۵ تا ۵/۵ درصد و قویترین آن مربوط به ترکیب متیل پارابن (۰/۱ تا ۰/۲ درصد) توأم با نمک ۴/۵ تا ۵/۵ درصد بود. لذا متیل پارابن که یک نگهدارنده مجاز و از گروه Generally Recognized As (GRAS Safe) بوده و برخلاف بسیاری از نگهدارنده‌های دیگر در pH نزدیک خنثی (مانند pH خاویار) نیز اثر ضد میکروبی قوی نشان می‌دهد، برای آزمایش در خاویار (مطالعه بعدی) انتخاب گردید.

واژه‌های کلیدی: مواد نگهدارنده، کلستریدیوم بوتولینوم، اشیریشیا کولای، رشد میکروب.

با وجودی که خاویار دان غیرپاستوریزه علی‌رغم دقت‌های بهداشتی زیاد در مواقع فرآوری آن، از نظر امکان آلودگی به عوامل میکروبی بیماری‌زا و فساد از منابع محیطی و ابزار فرآوری آن، از ریسک نسبتاً بالایی برخوردار است، لیکن این فرآورده علی‌رغم برخورداری از پتانسیل فساد میکروبی بالا در طول نگهداری و موارد گزارش حضور کلیفرمها به مقدار بیش از حد استاندارد، از نظر بیماری‌زایی از سابقه سلامتی نسبتاً خوبی برخوردار می‌باشد (۹). در این خصوصیت میزان aw پایین، غلظت نمک و حضور مواد نگهدارنده و نگهداری مداوم این فرآورده در سرمای زیر صفر تا موقع مصرف و همچنین مصرف مقادیر کم آن نقش بسزایی دارند با این حال مواردی از بوتولیسم خاویار (۱۵، ۱۰، ۸) و تخم ماهی خام و تخمیر شده (۴) و همچنین تخم ماهی خام و نمک سود شده خانگی و تهیه

۱) گروه آموزشی بهداشت و کنترل مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
۲) مؤسسه تحقیقات شیلای استان مازندران، ساری - ایران.



مدل ($10^5/ml$) انجام گرفت. لوله‌های حاوی محیط BHI مدل تا مدت ۷ روز در ۳۰ درجه سانتیگراد گرمخانه‌گذاری گردید. گرمخانه‌گذاری E. Coli هوازی و کلاستریدیوم بوتولینوم بی‌هوازی (با استفاده از سیستم gas pack) انتخاب گردید. (د) بررسی رفتار میکروبیهای اینوکوله شده در فرمولاسیونهای مختلف: به‌منظور بررسی رفتار باکتریهای اینوکوله شده، کشت و شمارش آنها به روش سطحی در محیطهای جامد BHI agar و Egg yolk به‌ترتیب برای E. coli در شرایط هوازی و کلاستریدیوم بوتولینوم در شرایط بی‌هوازی انجام گرفت (۱۹ و ۳) و نتایج حاصله ثبت گردید.

۵) آزمایش تولید سم در کشتهای کلاستریدیوم بوتولینوم: آزمایش ارزیابی تولید توکسین به‌وسیله کلاستریدیوم بوتولینوم اینوکوله شده در فرمولاسیونهای مختلف با استفاده از روش USDA به طریق Bioassay انجام گرفت. بدین ترتیب که پس از استخراج توکسین از لوله‌های BHI رشد کرده از فرمولاسیونهای مختلف از طریق سانتریفیوژ $1200 \times g$ به مدت ۲۰ دقیقه و تهیه مایع رویی زلال در ۴ فرم مختلف تزییق داخل صفای به موشهای ۲۰ گرمی انجام گرفت. pH توکسین استخراج شده قبل از تزییق در ۶/۵ تنظیم گردیده بود. ۴ فرم مختلف تزییقی شامل (۱) آب مقطر استریل به‌عنوان شاهد، ۲) توکسین استخراج شده تریپسینه شده خام (یک میلی‌لیتر از توکسین با ۰/۱ میلی‌لیتر تریپسین یک درصد از محلول تریپسین $\frac{1}{25}$ دیفکو)، ۳) توکسین استخراج شده تریپسینه شده حرارت دیده در ۱۰۰ درجه به مدت ۲۰ دقیقه، ۴) توکسین استخراج شده تریپسینه شده خنثی شده با آنتی‌توکسین اختصاصی (آنتی‌توکسین E) بودند. تزییق از هر فرم به مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر به‌صورت داخل صفای انجام گرفت و موشهای تزییق شده تا ۹۶ ساعت از نظر بروز علائم بوتولیسم و مرگ ناشی از مسمومیت تحت مراقبت قرار گرفتند. مرگ موش در اثر فرم خام توکسین (فرم شماره ۲) و بقای سایر موشها، تولید توکسین به‌وسیله کلاستریدیوم بوتولینوم تیپ E اینوکوله شده را تأیید می‌کرد (۳).

نتایج

تأثیر ۱۶ فرمول مختلف از نظر ترکیب غلظتهای مختلف نمک و مواد نگهدارنده تهیه شده در محیط آنگوش BHI به‌صورت مدل حاوی، در رفتار و باکتری E. coli و کلاستریدیوم بوتولینوم نگهداری شده تا مدت ۷ روز در ۳۰ درجه، در جداول و نمودارهای ۱ و ۲ نشان داده شده است.

هر دو میکروب در محیط BHI کنترل بدون هیچ‌گونه مواد نگهدارنده (فرمول ۱) در فاصله ۲ تا ۷ روز خوب رشد نموده و به اندازه ۳ لوگ در میلی‌لیتر BHI به جمعیت آنها اضافه گردید. افزایش نمک با غلظت ۴/۵ تا ۵/۵ درصد (فرمولهای ۲، ۳ و ۴) به محیط BHI، رشد E. coli را حدود یک لوگ و کلاستریدیوم بوتولینوم را تا ۲ لوگ کاهش داد ولی رشد میکروب ادامه پیدا نمود به‌طوری‌که آزمایش تولید سم توسط کلاستریدیوم بوتولینوم نیز در هر چهار فرمول (۴-۱) علی‌رغم کاهش رشد بیشتر نسبت به E. coli مثبت بود و موشهای تزییق شده تلف گردید. افزایش مواد نگهدارنده مختلف به محیطهای حاوی نمک با غلظتهای مختلف باعث توقف رشد تا انهدام کلیه میکروبیهای اینوکوله‌شده به‌شرح ذیل گردید:

فرمولهای شماره ۵ تا ۱۰ که در ترکیب آنها نمک توأم با بوراکس و اسیدبوریک و (نگهدارنده فعلی) و یا سوربات با نیتريت (نگهدارنده جدید) مورد استفاده قرار گرفت، توانست رشد میکروب را متوقف کند ولی تمامی باکتریهای اینوکوله‌شده در این شرایط حیات خود را حفظ نمودند به جز فرمول شماره ۸ تا ۱۰ در مورد کلاستریدیوم بوتولینوم (محیط BHI مدل، حاوی ۵/۵ تا ۴/۵ درصد نمک توأم با ۰/۲۶ درصد سوربات پتاسیم و ۸۰ ppm نیتريت سدیم) و فرمول شماره ۱۰ در مورد E. coli (محیط BHI مدل، حاوی ۵/۵ درصد نمک توأم با ۰/۲۶ درصد سوربات پتاسیم و ۸۰ ppm نیتريت سدیم) که به اندازه کم و بیش یک لوگ کاهش در جمعیت اولیه اینوکوله‌شده این دو باکتری ایجاد گردید. (جداول و نمودارهای ۱ و ۲).

سوسپانسیون گردید. با استفاده از محلول tureen 80 و دانه‌های شیشه‌ای (Glass bead) استریل و ورکس نمودن سوسپانسیون از چسبندگی اسپورها جلوگیری گردید. تهیه سوسپانسیون مادر با تعداد معلوم اسپور در هر میلی‌لیتر از طریق کشت سطحی و شمارش آن در محیط egg yolk در شرایط بی‌هوازی انجام گرفت. قبل از انجام هر نوع مطالعه Inoculation study با برداشت ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون مذکور و کشت و شمارش در محیط egg yolk تعداد اسپور مجدداً تعیین و تأیید گردید. سوسپانسیون تا موقع آزمایش در صفر درجه نگهداری گردید (۱۹ و ۳). ۲- تهیه سوسپانسیون اشریشیاکولای: ابتدا باکتری در محیط آنگوش " Brain Heart Infusion " کشت و به‌صورت هوازی در حرارت ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. با استفاده از این کشت مجدد در محیط آنگوش BHI انجام و مدت ۲۴ ساعت دیگر در ۳۰ درجه گرمخانه‌گذاری گردید. از کشت دوم با استفاده از تهیه رقتهای سریال ۱۰ برابر در محیط کشت جامد BHI به‌صورت سطحی کشت و شمارش گردید (۱۸). همین کشت به‌عنوان سوسپانسیون مادر بلافاصله در مطالعه اینوکولاسیون مورد استفاده قرار گرفت و نتیجه شمارش سطحی به‌عنوان میزان اینوکولوم اولیه (با احتساب یک دهم رقیق‌سازی در موقع اینوکولاسیون) تعیین گردید.

ج) فرمولاسیون محیط آنگوش BHI و انجام اینوکولاسیون: با استفاده از محیط آنگوش BHI به‌صورت مدل به مقدار ۹ میلی‌متر در لوله‌های آزمایش استریل در پیچ‌دار اینوکولاسیون دو باکتری E. Coli و کلاستریدیوم بوتولینوم در ۱۶ فرمول آزمایشی با ترکیبات مورد نظر از غلظتهای نمک (CLNa) و مواد نگهدارنده مختلف (بوراکس، اسید بوریک، نیتريت، سوربات و متیل پارابن) انجام گرفت. غلظتهای نمک مورد نظر همان غلظتهای مورد استفاده در خاویازدان (۴/۵ تا ۵/۵ درصد بسته به نوع ماهی خاویاری و غیره) انتخاب گردید ولی مواد نگهدارنده از انواع مختلف از جمله ماده نگهدارنده مورد استفاده فعلی (بوراکس و اسید بوریک) جهت انتخاب بهترین نوع و در عین حال مجاز در بازار اروپا و امریکا به شرح ذیل انتخاب گردید:

فرمول ۱) محیط BHI کنترل بدون هیچ‌گونه پرزرواتیو (نگهدارنده)
فرمول ۲) محیط BHI حاوی ۴/۵ درصد نمک
فرمول ۳) محیط BHI حاوی ۵ درصد نمک
فرمول ۴) محیط BHI حاوی ۵/۵ درصد نمک
فرمول ۵) محیط BHI حاوی ۴/۵ درصد نمک + مخلوطی از ۰/۳ درصد اسید بوریک و ۰/۴ درصد بوراکس
فرمول ۶) محیط BHI حاوی ۵ درصد نمک + مخلوطی از ۰/۳ درصد اسید بوریک و ۰/۴ درصد بوراکس
فرمول ۷) محیط BHI حاوی ۵/۵ درصد نمک + مخلوطی از ۰/۳ درصد اسید بوریک و ۰/۴ درصد بوراکس
فرمول ۸) محیط BHI حاوی ۴/۵ درصد نمک + مخلوطی از سوربات پتاسیم (۰/۲۶ درصد) و نیتريت سدیم (۸۰ میلی‌گرم در لیتر)
فرمول ۹) محیط BHI حاوی ۵ درصد نمک + مخلوطی از سوربات پتاسیم (۰/۲۶ درصد) و نیتريت سدیم (۸۰ میلی‌گرم در لیتر)
فرمول ۱۰) محیط BHI حاوی ۵/۵ درصد نمک + مخلوطی از سوربات پتاسیم (۰/۲۶ درصد) و نیتريت سدیم (۸۰ میلی‌گرم در لیتر)
فرمول ۱۱) محیط BHI حاوی ۴/۵ درصد نمک + ۰/۱ درصد متیل پارابن
فرمول ۱۲) محیط BHI حاوی ۵ درصد نمک + ۰/۱ درصد متیل پارابن
فرمول ۱۳) محیط BHI حاوی ۵/۵ درصد نمک + ۰/۱ درصد متیل پارابن
فرمول ۱۴) محیط BHI حاوی ۴/۵ درصد نمک + ۰/۲ درصد متیل پارابن
فرمول ۱۵) محیط BHI حاوی ۵ درصد نمک + ۰/۲ درصد متیل پارابن
فرمول ۱۶) محیط BHI حاوی ۵/۵ درصد نمک + ۰/۲ درصد متیل پارابن
اینوکولاسیون هر کدام از دو باکتری مورد آزمایش با رقیق‌سازی قبل از اینوکولاسیون به نسبت ضریبی از غلظت ۵ لوگ باکتری در هر میلی‌لیتر BHI



جدول ۱ - رفتار اشریشیاکلی تیپ O₁₁₁ در محیط BHI حاوی نمک به همراه مواد نگهدارنده مختلف در زمانهای ۰، ۲، ۴ و ۷ روز و درجه حرارت ۳۰ درجه سانتیگراد

زمان انکوباسیون				نوع تیمار
۷ روز	۴ روز	۲ روز	صفر	
۳/۴×۱۰ ^۸	۲/۵×۱۰ ^۸	۲×۱۰ ^۸	۴×۱۰ ^۵	۱: نمونه کنترل بدون هیچگونه پرزواتیو
۹/۵×۱۰ ^۷	۸/۵×۱۰ ^۷	۸/۳×۱۰ ^۷	۴×۱۰ ^۵	۲: نمک با غلظت ۴/۵ درصد
۲/۱×۱۰ ^۷	۲×۱۰ ^۷	۱/۱×۱۰ ^۷	۴×۱۰ ^۵	۳: نمک با غلظت ۵ درصد
۲/۵×۱۰ ^۷	۲/۵×۱۰ ^۷	۱/۳×۱۰ ^۷	۴×۱۰ ^۵	۴: نمک با غلظت ۵/۵ درصد
۲/۲×۱۰ ^۵	۴/۶×۱۰ ^۵	۵/۲×۱۰ ^۵	۴×۱۰ ^۵	۵: نمک با غلظت ۴/۵ درصد + اسید بوریک ۰/۳ درصد + بوراکس ۰/۴ درصد
۳×۱۰ ^۵	۳/۶×۱۰ ^۵	۴/۱×۱۰ ^۵	۴×۱۰ ^۵	۶: نمک با غلظت ۵ درصد + اسید بوریک ۰/۳ درصد + بوراکس ۰/۴ درصد
۱/۳×۱۰ ^۵	۲/۱×۱۰ ^۵	۲/۴×۱۰ ^۵	۴×۱۰ ^۵	۷: نمک با غلظت ۵/۵ درصد + اسید بوریک ۰/۳ درصد + بوراکس ۰/۴ درصد
۱/۱×۱۰ ^۴	۱/۲×۱۰ ^۵	۱/۵×۱۰ ^۵	۴×۱۰ ^۵	۸: نمک با غلظت ۴/۵ درصد + سوربات پتاسیم ۰/۲۶ درصد + نیتريت ۸۰ میلیگرم بر لیتر
۴/۲×۱۰ ^۴	۱×۱۰ ^۵	۱×۱۰ ^۵	۴×۱۰ ^۵	۹: نمک با غلظت ۵ درصد + سوربات پتاسیم ۰/۲۶ درصد + نیتريت ۸۰ میلیگرم بر لیتر
۱/۳×۱۰ ^۴	۲×۱۰ ^۴	۶/۴×۱۰ ^۴	۴×۱۰ ^۵	۱۰: نمک با غلظت ۵/۵ درصد + سوربات پتاسیم ۰/۲۶ درصد + نیتريت ۸۰ میلیگرم بر لیتر
۰	۰	۰	۴×۱۰ ^۵	۱۱: نمک با غلظت ۴/۵ درصد + متیل پارابن ۰/۱ درصد
۰	۰	۰	۴×۱۰ ^۵	۱۲: نمک با غلظت ۵ درصد + متیل پارابن ۰/۱ درصد
۰	۰	۰	۴×۱۰ ^۵	۱۳: نمک با غلظت ۵/۵ درصد + متیل پارابن ۰/۱ درصد
۰	۰	۰	۴×۱۰ ^۵	۱۴: نمک با غلظت ۴/۵ درصد + متیل پارابن ۰/۲ درصد
۰	۰	۰	۴×۱۰ ^۵	۱۵: نمک با غلظت ۵ درصد + متیل پارابن ۰/۲ درصد
۰	۰	۰	۴×۱۰ ^۵	۱۶: نمک با غلظت ۵/۵ درصد + متیل پارابن ۰/۲ درصد

جدول ۲ - رفتار کلستریدیوم بوتولینوم تیپ E در محیط BHI حاوی نمک به همراه مواد نگهدارنده مختلف در زمانهای ۰، ۲، ۴ و ۷ روز و درجه حرارت ۳۰ درجه سانتیگراد

زمان انکوباسیون				نوع تیمار
۷ روز	۴ روز	۲ روز	صفر	
۴×۱۰ ^۸	۸×۱۰ ^۷	۴/۵×۱۰ ^۷	۱/۳×۱۰ ^۵	۱: نمونه کنترل بدون هیچگونه پرزواتیو
۶/۷×۱۰ ^۶	۶/۳×۱۰ ^۶	۴/۳×۱۰ ^۶	۱/۳×۱۰ ^۵	۲: نمک با غلظت ۴/۵ درصد
۵/۴×۱۰ ^۶	۵/۲×۱۰ ^۶	۳/۴×۱۰ ^۶	۱/۳×۱۰ ^۵	۳: نمک با غلظت ۵ درصد
۱/۷×۱۰ ^۶	۲/۷×۱۰ ^۶	۲/۴×۱۰ ^۶	۱/۳×۱۰ ^۵	۴: نمک با غلظت ۵/۵ درصد
۱/۷×۱۰ ^۵	۲×۱۰ ^۵	۲/۶×۱۰ ^۵	۱/۳×۱۰ ^۵	۵: نمک با غلظت ۴/۵ درصد + اسید بوریک ۰/۳ درصد + بوراکس ۰/۴ درصد
۱/۲×۱۰ ^۵	۱×۱۰ ^۵	۱/۳×۱۰ ^۵	۱/۳×۱۰ ^۵	۶: نمک با غلظت ۵ درصد + اسید بوریک ۰/۳ درصد + بوراکس ۰/۴ درصد
۲/۳×۱۰ ^۵	۱/۱×۱۰ ^۵	۱/۱×۱۰ ^۵	۱/۳×۱۰ ^۵	۷: نمک با غلظت ۵/۵ درصد + اسید بوریک ۰/۳ درصد + بوراکس ۰/۴ درصد
۵/۱×۱۰ ^۴	۵/۲×۱۰ ^۴	۵/۱×۱۰ ^۴	۱/۳×۱۰ ^۵	۸: نمک با غلظت ۴/۵ درصد + سوربات پتاسیم ۰/۲۶ درصد + نیتريت ۸۰ میلیگرم بر لیتر
۴/۵×۱۰ ^۴	۵×۱۰ ^۴	۵/۲×۱۰ ^۴	۱/۳×۱۰ ^۵	۹: نمک با غلظت ۵ درصد + سوربات پتاسیم ۰/۲۶ درصد + نیتريت ۸۰ میلیگرم بر لیتر
۳/۶×۱۰ ^۴	۴/۲×۱۰ ^۴	۴/۵×۱۰ ^۴	۱/۳×۱۰ ^۵	۱۰: نمک با غلظت ۵/۵ درصد + سوربات پتاسیم ۰/۲۶ درصد + نیتريت ۸۰ میلیگرم بر لیتر
۰	۰	۰	۱/۳×۱۰ ^۵	۱۱: نمک با غلظت ۴/۵ درصد + متیل پارابن ۰/۱ درصد
۰	۰	۰	۱/۳×۱۰ ^۵	۱۲: نمک با غلظت ۵ درصد + متیل پارابن ۰/۱ درصد
۰	۰	۰	۱/۳×۱۰ ^۵	۱۳: نمک با غلظت ۵/۵ درصد + متیل پارابن ۰/۱ درصد
۰	۰	۰	۱/۳×۱۰ ^۵	۱۴: نمک با غلظت ۴/۵ درصد + متیل پارابن ۰/۲ درصد
۰	۰	۰	۱/۳×۱۰ ^۵	۱۵: نمک با غلظت ۵ درصد + متیل پارابن ۰/۲ درصد
۰	۰	۰	۱/۳×۱۰ ^۵	۱۶: نمک با غلظت ۵/۵ درصد + متیل پارابن ۰/۲ درصد

شامل نمک و مواد شیمیایی نگهدارنده شامل اسید بوریک و بوراکس (تتراپورات سدیم) می باشد. اثرات ضد میکروبی نمک (به غیر از طعم دهی) که در غلظتهای مختلف و شرایط حرارتی و نوع میکروب متفاوت است، شامل پلاسیمولیز سلولی، کاهش aw یا کاهش آب آزاد غذا، ایجاد یون کلر، کاهش قابلیت حل اکسیژن در غذا، تداخل در فعالیت آنزیمهای پروتئولیتیک و غیره می باشد.

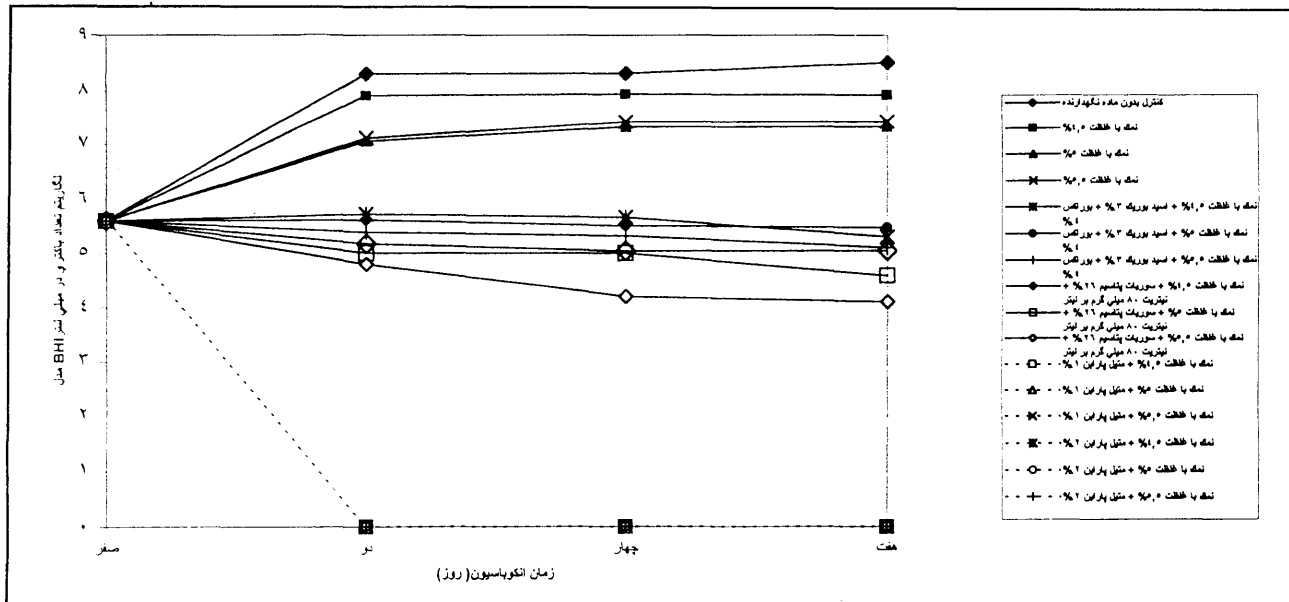
اسید بوریک و بوراکس که در بعضی از کشورها هنوز به عنوان مواد نگهدارنده مورد استفاده قرار می گیرد در کشورهای اتحادیه اروپا و امریکا ممنوع می باشد (۵ و ۲). این ماده به صورت پودر در بعضی از مواد غذایی از جمله فرآورده های گوشتی

فرمولهای شماره ۱۱ تا ۱۶ با غلظتهای نمکی ۴/۵ تا ۵/۵ درصد توأم با نگهدارنده جدید (متیل پارابن به مقدار ۱ درصد تا ۰/۲ درصد) باعث انهدام کلیه باکتریهای اینوکوله شده (هر دو باکتری) گردید. ضمناً نتیجه آزمایش سمی بودن نمونه از نظر کلستریدیوم بوتولینوم در فرمولهای ۵ تا ۱۶ همگی منفی بوده و موشهای تزریق شده تلف نگردید.

بحث

موادی که برای طعم دادن و محافظت از فساد به خواهرپاران اضافه می شود





نمودار ۱ - رفتار اشریشیاکلی تیپ O₁₁₁ متأثر از فرمولاسیونهای مختلف از نظر غلظت نمک و نوع نگهدارنده در محیط BHI مدل.

فوق العاده با اهمیت در مواد غذایی کنسروی با pH بالای ۴/۶ می باشد و اصولاً اولین باکتری که از نظر پتانسیل رشد و تولید توکسین در چنین غذاهایی باید مورد مطالعه قرار گیرد، این باکتری می باشد. به علاوه مواردی از بوتولیسم نیز از مصرف خاویار آلوده گزارش شده است (۱۷، ۱۵، ۱۰، ۸، ۴). لذا در این بررسی پتانسیل رشد این دو باکتری در محیط BHI مدل مشابه خاویاری مورد مطالعه قرار گرفته تا امکان رشد و توکسین زایی (کلستریدیوم بوتولینوم) در شرایط موجود خاویار و نیز فرمولاسیون جدید آن مشخص گردیده و امکان جایگزینی مواد نگهدارنده جدید و مجاز و مناسب به جای نگهدارنده فعلی فراهم شود.

مطالعات قابل توجهی در مورد اشریشیاکولای و کلستریدیوم بوتولینوم در محیطهای مدل آزمایشگاهی انجام شده است ولی متأسفانه به جز موارد نادر هیچ کدام از این مطالعات مشابهتی با مطالعه ما نداشته و در واقع این بررسی در نوع خود به علت مدل غذایی خاص آن (خاویاردان) منحصر به فرد می باشد.

تهیه خاویاردان خام در ایران از قدیم به دو صورت خاویار حاوی نمک (CLNa) و بدون مواد نگهدارنده، و خاویار حاوی نمک و مواد نگهدارنده (اسید بوریک و بوراکس) تهیه می شود که در مطالعه فعلی ما در محیط کشت BHI مدل منظور گردیده است و علاوه بر آن سه ترکیب نمکی و مواد نگهدارنده دیگر شامل مخلوطی از سوربات پتاسیم (۲۶٪ درصد) و نیتريت سدیم (۸۰ ppm) توأم با غلظتهای مختلف نمک (۴/۵ تا ۵/۵ درصد)، متیل پارابن (۱٪ درصد) توأم با غلظتهای مختلف نمک و متیل پارابن (۲٪ درصد) توأم با غلظتهای مختلف نمک مورد ارزیابی قرار گرفته است.

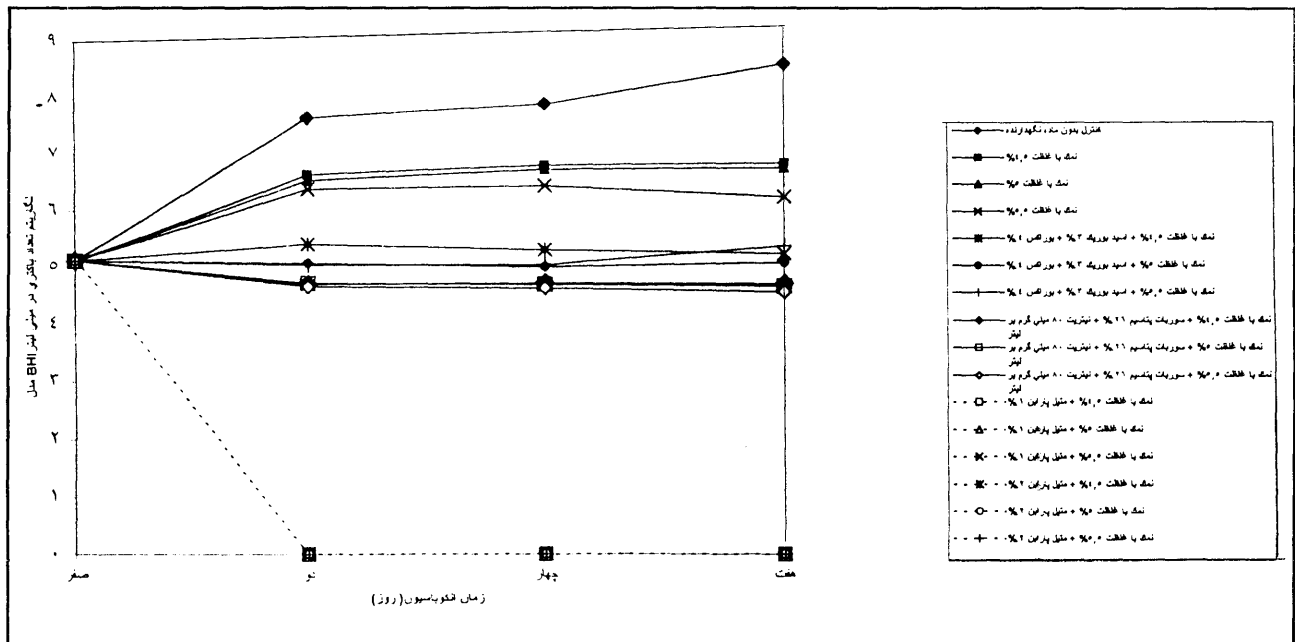
نتایج مربوط به اینوکولاسیون اشریشیاکولای با غلظت ۱۰^۵/ml در محیط BHI (جدول و نمودار ۱) نشان داد که باکتری در محیط حاوی نمک (۴/۵ تا ۵/۵ درصد) بدون ماده نگهدارنده به خوبی رشد کرده و حدود ۲ لوگ به جمعیت آن پس از ۲ تا ۷ روز گرمخانه گذاری در ۳۰ درجه سانتیگراد اضافه می شود. با اضافه کردن مواد نگهدارنده (اسید بوریک و بوراکس) و همچنین مخلوط سوربات و نیتريت رشد باکتری متوقف شده ولی باکتری از بین نمی رود. زمانی که متیل پارابن (۱٪ تا ۲٪ درصد) به عنوان نگهدارنده مورد استفاده قرار گرفت کلیه جمعیت اینوکوله شده منهدم گردید. در یک مطالعه میکروبی که Mrochov و Arapova (۱۹۷۳) روی خاویاردان حاوی ۴/۷ درصد نمک و ۰/۲ درصد بنزوات انجام داد پس از یک ماه نگهداری مشاهده کرد که خاویار حاوی نمک خالی دارای

و خاویار مورد استفاده قرار می گیرد. اصولاً بوراکس و اسید بوریک یک ماده ضد میکروبی بسیار ضعیف بوده و در عین حال به عنوان مواد نگهدارنده سالم محسوب نمی شوند (۵) و لذا باید از مصرف در مواد غذایی خارج و مواد نگهدارنده مناسب و مجاز و در عین حال با اثر ضد میکروبی بهتر جایگزین آنها گردد.

از مواد نگهدارنده جدید که به عنوان (Generally Recognized As Safe) GRAS در صنایع غذایی مطرح هستند و برای سلامتی انسان سالم می باشند می توان اسید سوربیک و املاح آنها، اسید بنزویک و املاح و استرهای آنها، پارابن ها (استرهای اسید بنزویک) و نیتريت (به مقدار محدود) را نام برد. اسید سوربیک و اسید بنزویک فقط در pH های پایین خصوصاً pH ۲/۵ تا ۴ بیشترین اثر ضد میکروبی خود را بروز می دهند، گرچه اسید سوربیک نسبت به اسید بنزویک در pH های بالاتر نیز مؤثر نشان داده است. این دو ماده نگهدارنده بر ضد اغلب باکتریها و قارچها عمل می کند ولی همان طور که اشاره گردید محدودیت pH در عمل ضد میکروبی آنها موجود می باشد. نیتريتها به علت واکنش با آمینها و تولید نیتروز آمین که به عنوان مواد سرطانزا شناخته شده اند هنوز مورد مصرف قرار می گیرند ولی به دلیل سرطانزا بودن آن به موش محدودیت مصرف بیشتری وجود دارد. در بین این مواد نگهدارنده متیل پارابن که استر اسید بنزویک می باشد با دارا بودن خواص ضد میکروبی مشابه اسید بنزویک به دلیل مزیت مؤثر بودن آنها در pH های بالاتر (حتی بالای pH خنثی) که در اثر استریفیکاسیون گروه کاربوکسیل آنها حاصل می گردد و مولکول دیسوسیته نشده آنها در دامنه وسیعی از pH عمل می کند برای استفاده در خاویار که pH آن بین ۵ تا ۶ می باشد، می تواند بسیار مناسب باشد (۵، ۶، ۷، ۱۲، ۱۸، ۱۹).

میکروبیهای مختلفی در بهداشت و فساد خاویار دخیل هستند و مطالعه روی تک تک آنها در مواد غذایی زمان و امکانات بسیار بیشتری را طلب می کند ولی در بین این میکروبیها دو باکتری اشریشیاکولای و کلستریدیوم بوتولینوم از اهمیت ویژه ای برخوردار می باشند. اشریشیاکولای ضمن اینکه یک پاتوژن بالقوه در مواد غذایی محسوب می شود و حداقل عامل ۵ نوع عفونت غذایی در انسان می باشد، به عنوان یک باکتری شاخص آلودگی مواد غذایی از طریق مدفوعی حایز اهمیت بهداشت فراوانی می باشد و امکان آلودگی مواد غذایی از جمله خاویار به آن زیاد می باشد. باکتری کلستریدیوم بوتولینوم نیز یک باکتری





نمودار ۲ - رفتار کلوستریدیوم بوتولینوم متأثر از فرمولاسیونهای مختلف از نظر غلظت نمک و نوع نگهدارنده در محیط BHI مدل.

رشد و توکسین‌زایی باکتری وجود دارد و با توجه به اینکه pH محیط کشت BHI در مطالعه ما نزدیک خنثی بود لذا نتایج محیط BHI مدل ما در شرایط استفاده از نمک خالی (۴/۵ تا ۵/۵ درصد) در حرارت ۳۰ درجه با نتایج این مطالعه مطابقت دارد (۹). در مطالعه دیگری توسط Baker و Razavilar در سال ۱۹۹۰ که اسپورهای کلوستریدیوم بوتولینوم تیپ E در نسج ماهی اینوکوله و در اتمسفرهای مصنوعی و حرارت ۴ تا ۳۰ درجه نگهداری گردید مشاهده شد که باکتری در اتمسفرهای خلأ و ۱۰۰ درصد CO₂ و حرارت ۸ تا ۳۰ درجه رشد کرده و تولید توکسین نمود. لذا مشاهده می‌شود که این باکتری در شرایط یخچالی ۸ درجه نیز قادر به رشد و تولید توکسین می‌باشد ولی در ۴ درجه در هیچ کدام از اتمسفرهای خلأ و یا CO₂ تولید توکسین صورت نگرفت (۳). در مطالعه دیگری که توسط Genigeorgis و Ikawa در سال ۱۹۸۷ صورت گرفت گزارش گردید که اینوکولاسیون مخلوطی از اسپورهای کلوستریدیوم بوتولینوم غیر پروتئولیتیک (تیپهای E, B, F) در محیط BHI مدل و نگهداری شده در دو نوع اتمسفر خلأ و ۱۰۰ درصد CO₂ در حرارت ۴ تا ۳۰ درجه منتهی به رشد و تولید توکسین در حرارت ۸ تا ۳۰ درجه در هر دو اتمسفر گردید ولی هیچ‌گونه توکسین در حرارت ۴ درجه تولید نگردید (۱۱). این دو مطالعه بیانگر تطابق نتایج محیط BHI مدل یا محیط واقعی غذا (ماهی) می‌باشد که می‌تواند برای مطالعات چند فاکتوری در محیطهای کشت مدل از جمله مطالعه ما با ارزش باشد.

به‌طور کلی نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از نمک تنها برای نگهداری و محافظت خاویار کافی نیست و ضمناً مواد نگهدارنده موجود (بوراکس و اسید بوریک) که در خاویاردان استفاده می‌شود، ضمن اینکه یک نگهدارنده غیرمجاز محسوب می‌شود از نظر خاصیت ضد میکروبی نیز بسیار ضعیف عمل می‌کند و تنها به‌عنوان یک باکتریواستاتیک از رشد باکتری جلوگیری می‌کند در حالی که نتایج حاصل از استفاده متیل پارابن که قادر به بروز خواص ضد میکروبی قوی خود حتی در pHهای بالا (خنثی) نیز می‌باشد و در عین حال جزئی از مواد نگهدارنده مجاز محسوب می‌شود بسیار قابل توجه بوده و خواص ضد میکروبی قوی در حد یک باکتریوسید از خود نشان داد و لذا می‌تواند در فرمولاسیون جدید خاویار از نظر نگهدارنده مورد توجه قرار گیرد. به همین دلیل مطالعات بعدی اینوکولاسیون این دو میکروب در خود خاویاردان انجام خواهد گرفت.

۸۰۰ کلیرم (باکتریهای E. coli و مشابه آن) بود در حالی که با اضافه شدن بنزوات کلیرم جدا نگردید (۱۳). با توجه به اینکه متیل پارابن دارای اثرات ضد میکروبی مشابه بنزوات (استر این ماده نگهدارنده) می‌باشد به‌نظر می‌رسد نتیجه مشابه این مطالعه در مطالعه ما روی خاویار به‌دست آمده است. همچنین در مطالعه دیگری توسط رضوی و جنی‌جورجیس (۱۹۹۸) تأثیر متیل پارابن در رشد لیستریا در محیط مدل BHI (بدون نمک) مورد ارزیابی قرار گرفت و مشاهده گردید که رشد لیستریا مونوسیتوجنز گرچه در غلظت ۰/۱ تا ۰/۱۵ درصد متیل پارابن و در حرارت ۳۰ درجه نگهداری، تحت تأثیر چندانی قرار نگرفت ولی با افزایش غلظت متیل پارابن به ۰/۲ درصد رشد بیش از ۱۰^۵ لیستریا در میلی‌لیتر BHI مدل متوقف و قسمت اعظم جمعیت، آن منهدم گردید (۱۵). لذا نتیجه این دو مطالعه تأثیر ضد میکروبی متیل پارابن را روی باکتریهای گرم منفی و مثبت هر دو نشان می‌دهد. نتایج مربوط به اینوکولاسیون کلوستریدیوم بوتولینوم با غلظت ۱۰^۵ > اسپور در میلی‌لیتر BHI و نگهداری شده در شرایط بی‌هوازی به مدت ۲ تا ۷ روز در ۳۰ درجه (جدول و نمودار ۲) نشان داد که باکتری در محیط حاوی نمک (۴/۵ تا ۵/۵ درصد) بدون ماده نگهدارنده بیشتر از E. coli تحت تأثیر نمک قرار گرفته و پس از ۲ تا ۷ روز گرمخانه‌گذاری در ۳۰ درجه تعداد باکتری تنها حدود ۱/۵ لوگ افزایش پیدا نمود. با اضافه شدن مواد نگهدارنده (اسید بوریک و بوراکس) رشد باکتری متوقف شده ولی تعداد باکتری اینوکوله شده تقریباً همگی بقا پیدا نمود در صورتی که نگهدارنده بعدی (مخلوط سوربات و نیتريت) نه تنها رشد باکتری را متوقف می‌کند بلکه حدود ۵/۵ لوگ از جمعیت اسپورهای اینوکوله‌شده باکتری منهدم گردید و بالاخره نگهدارنده دیگر (متیل پارابن به غلظت ۰/۱ تا ۰/۲ درصد) همانند مورد اشریشیا کولای تمامی جمعیت اینوکوله شده کلوستریدیوم بوتولینوم را از بین برد. Hauschild و Hilsheimer در سال ۱۹۷۹ در مطالعه‌ای گزارش نمودند که اینوکولاسیون اسپورهای کلوستریدیوم بوتولینوم (تیپ A و B) در نوعی خاویار از ماهی Lumpfish و نگهداری آن در ۳۰ درجه رشد و توکسین‌زایی باکتری را در حضور نمک کمتر از ۲/۹۵ درصد pH بالاتر از ۵/۲ و نیز نمک از ۴/۶۷ درصد و pH بالاتر از ۵/۶ اتفاق افتاد. در حالی که در غلظت نمکی بیش از ۵/۵۶ درصد و یا pH کمتر از ۵ این اتفاق صورت نگرفت لذا مشاهده می‌شود که در خود خاویار نیز زمانی که غلظت نمک کمتر از ۵/۵ و pH آن بالاتر از ۵/۶ باشد امکان



pH, temperature and storage time in a model broth. *J. of Food Microbiol.* 40: 149-157.

16. Sebal, M. (1970): Sur le botulisme en France de 1956a 1970. *Bull. Acad. Nat. Med.* 154: 703-707.
17. Sofos, J.N. (1989): *Sorbate Food Presrvatives*. CRC Press, Inc. Florida.
18. Sternin, V. and Dore, I. (1993): *CAVIAR*. Cultra, Moscow, Russia.
19. Vanderzant, C. and Splittstoesser, D.F. (1992): *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. American Public Health Association. Washington, D.C.

Growth and toxigenesis study of *C. botulinum* and *E. coli* affected by various formulations of salt and Preservatives expected for processing of caviar

Razavilar V.¹, Safari, R.², Pourgholam, R.², Nayerani, M.²

¹Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran - Iran. ²Fishery Research Institute of Mazandaran, Mazandaran - Iran.

The Persian granular caviar traditionally is made in two forms of additives (1) with salt but without any preservative and (2) with salt and preservative (Boric acid and Borax). This preservative has a very weak antimicrobial activity and beside its use is illegal in most western countries. Therefore because of an urgent need for a new formulation of additive in this product, 16 formulations of additives were used and evaluated in this study. These formulations, contained 3 concentrations of salt (4.5, 5 and 5.5%) and 4 combinations of preservatives including (1) a mixture of 0.3% Boric acid with 0.4% of Borax, (2) a mixture of 0.26% K- sorbate with 80 ppm of Na-nitrite, (3) 0.1% of methyl paraben and (4) 0.2% of methyl paraben. All of these formula were made in Brain Heart Infusion (BHI) broth and inoculated with 2 bacteria (*C. botulinum* type E spores and *E. coli* type O₁₁₁ cells) using >10⁵ spores or cells per ml of broth and stored for up to 7d at 30°C. *Clostridium botulinum* was examined for both growth and toxicity testing using bioassay technic. The results indicated that the lowest antimicrobial activity belonged to the combination of Boric acid and Borax plus salt concentration of 4.5 to 5.5% with only bacteriostatic activity. The highest antimicrobial activity belonged to the combination of 0.1 to 0.2% methylparaben plus salt concentration of 4.5 to 5.5% with a strong bacteriocidal activity. Increasing of salt from 4.5 to 5.5 concentration slightly increased the antimicrobial activity of the additive combination. Therefore methyl paraben which is a GRAS (Generally Recognized As Safe) preservative, and has a strong antimicrobial activity at high pH values, was selected for use in caviar.

Key words : Food preservatives, *C. botulinum*, *E. coli*, Microbial growth.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی و آزمایشگاهی و پرسنل تحقیقاتی مؤسسه تحقیقات شیلانی ایران (مازندران) و حمایت پژوهشی دانشگاه تهران (دانشکده دامپزشکی) به انجام رسید و بدین وسیله از حمایت‌های بیدریغ آنها خصوصاً جناب آقای دکتر سهراب رضوانی ریاست محترم مؤسسه تحقیقاتی شیلان ایران تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

۱. رضویلو، و. (۱۳۷۸): میکروبیهای بیماریزا در مواد غذایی و اپیدمیولوژی مسمومیت‌های غذایی، انتشارات دانشگاه تهران، تهران، ایران.
2. Barthelemy, M., Arzauyan, C. and Estieme, J. (1993): Determination of Boric acid in caviar by HPLC. *Annales- des- falsifications, de- 1, Expertise- chimique- et- Toxicologique-* 86: 275-282.
3. Baker, D.A., Genigeorgis, C., Glover, J., and Razavilar, V. (1990): Growth and toxigenesis of *C. botulinum* type E in fishes packaged under modified atmospheres. *Int. J. of Food Microbiol* 10: 269-290.
4. Dolman, C.E. and Iida, H. (1963): Type E botulism: It's epidemiology, prevention and specific treatment. *Can. J. Publ. Health.* 54: 293-308.
5. Frazier, W.C. and Westhoff, D.C. (1988): *Food Microbiology*. McGraw-Hill Book Company, New York.
6. Freeze, E., Sheu, C.W. and Galliers, E. (1973): Function of lipo- philic acids as antimicrobial food additives. *Nature.* 241: 321-325.
7. Furia, T.E. (1975): *Handbook of food additives* (2nd ed.) CRC Press Inc. Ohio.
8. Fukuda, T., Kitao, T., Tanikawa, H. and Sakaguchi, G. (1970): An Outbreak of type B botulism occurring in Miyazaki prefecture. *Japan. J. Med. Sci. Biol.* 23: 243-248.
9. Hauschild, A.H.W. and Hilsheimer, R. (1979): Effect of salt content and PH on toxigenesis by *C. botulinum* in caviar. *J. of Food port.* 42: 245-248.
10. Health and Welfare Canada (1997): *Botulism in Canada- Sammary for 1976*. *Can. Dis. Weekly Rep.* 3:46-47.
11. Ikawa, J.Y. and Genigeorgis, C. (1987): Probability of growth and toxin production by nonproteolytic *C. botulinum* in rock fish fillets stored under modified atmospheres. *Int. J. of Food Microbiol.* 4: 167-181.
12. Jay, J.M. (1996): *Modern Food Microbiology* (5th ed.). The AVI Publishing. Co., Westport, Connecticut.
13. Mrochov, K.A., and Aropova, I.R. (1973): Effect of preservatives on membran strength of sturgeon fish caviar. *Voprosy-Pitaniya.* 5: 79-81.
14. Pourtaghva, M., Machoun, A., Fatollah-Zadeh, A., Khodadoust, H., Farzam, Z. and Farhangui (1975): *Le botulisme en Iran*. *Med. Malad. Infect.* 5: 536-539.
15. Razavilar, V., and Genigeorgis, C. (1998): Prediction of *Listeria spp.* growth as affected by various levels of chemicals,

