اثر دمای نگهداری و تعداد میکرب اولیه تلقیح شده بر مدت زمان بقای اشریشیا کلی O111:B4 درماست

دکترگیتی کریم [۱]*، دکترسعید بکایی[۲]، دکترمظفر اسماعیل پور[۳]

چکیده

ماست به عنوان یک فرآورده تخمیری شیر مورد علاقه مردم کشور ما است و باور همگان براین است که امکان آلوده شدن ماست از سایر فرآورده های شیر بسیار کمتراست و میکروارگانیسم های بیماریزا نمی توانند دوام و بقای طولانی در ماست داشته باشند

. با توجه به اینکه اکثر میکروارگانیسم ها به ویژه باکتری های روده ای نمی توانند pH کمتر از ٤/٥ را تحمل نمایند ولی شواهد نشان می دهد که برخی از ماست ها ی موجود دربازار آلوده به کلیفرم ها ازجمله *اشریشیا کلی* می باشند. لذا جهت مطالعه مدت زمان بقای میکروارگانیسم براساس تعداد تلقیح اولیه ودمای نگهداری ماست، نمونه های ماست در شرایط مناسب و بهداشتی در کارخانه شیر پاستوریزه تهران تهیه و سپس به دو گروه تقسیم گردید ، به گروه اول هیچ گونه حرارتی بعد از فرایند تولید داده نشد و گروه دوم به مدت ٥ دقیقه دردمای ۷۰ درجه سانتی گراد پاستوریزه شدند تا میکروارگانیسم های مایه ماست تا حدی کاهش یافته و تغییر چشمگیری از نظر اسیدیته و pH در نمونه های ماست گروه دوم ایجاد نگردد.

هر نمونه ماست از نظر کلیفرم ها، اسیدیته و pH مورد آزمایش قرار گرفت و به نمونه های عاری از کلیفرم تعداد ۱۰۳، ۱۰۲ و۱۰۰ cfu/g اشریشیا کلی سویه O111 : B4 تلقیح گردید. کلیه نمونه ها در دمای ۲۲، ٤ و ۳۰ درجه سانتی گراد نگهداری و هرروز از نظر تعداد اشریشیا کلی، pH و اسیدیته آزمایش شدند.

نتایج نشان داد که اشریشیا کلی مورد آزمایش می تواند pH کمتر از ٤/٥ را تحمل نماید. زنده و فعال بودن میکروارگانیسم های مایه ماست اثر منفی برروی بقای میکروارگانیسم داشته و لذا نوع مایه ماست و آلوده شدن این فرآورده درخط تولید بر ماندگاری و بقای اشریشیا کلی تاثیردارند و درنهایت با استفاده از آنالیزواریانس دوطرفه مشخص گردید که دمای نگهداری برمدت زمان بقای میکروارگانیسم بسیار موثرمی باشد($P<0.001$) به طوریکه برای مثال در تلقیح اولیه ۱۰۰ میکروب از میانگین بقای ٤/٥ روز دردمای ٤ درجه سانتیگراد به میانگین ۲/۱۷ روز دردمای ۳۰ درجه سانتیگراد تقلیل پیدا کرده است.

واژگان کلیدی: *ماست ، اشریشیا کلی O111 :B4 ، زمان ، دما .*

Effect of storage Temperature and initial inoculated microorganism population on the Survival time of *Escherichia coli O111:B4* in yoghurt

Karim. G[1], Bokaie.S[2], Esmaeelpour.M[3]

1-Department of Food Hygiene, Faculty of Specialised Veterinary Science ,Islamic Azad UniversityScience & Research Branch,Tehran,Iran

2- Department of Food Control and Hygiene , Faculty of Veterinary Medicine, Tehran university,Tehran,Iran

3– Graduated of Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Karaj Branch,karaj,Iran

Yoghurt is a popular dairy product in Iran which is produced by dairy plants or small dairy workshops where production condition in the latter is not usually hygienic. The general belief is that the possibility of yoghurt contamination is less than other dairy products and pathogens can not survive in yoghurt for a long time. Considering that the majority of microorganisms especially *Entrobacteriacae* do not tolerate pH less than 4.5, evidences show that yoghurt in the market sometimes is contaminated with coliforms and *E-coli*. The objective of this study was to determine the possibility of survival of *E.coli* based on primary inoculation size and temperature of yoghurt storage. For this perpose the samples of yoghurt were made in a dairy plant under hygienic condition and divided into two groups, group I without any further heat treatment after processing and group II were pasteurized at 70°C for 5 minutes to discourage the growth of starter microorganisms (control).Each sample was tested for coliform count, moulds, staphylococci and acidity after production. The coliforms, moulds and staphylococci free samples were inoculated with 10^3, 10^2 and 10^0 cfu/ml of *E.coli* O_{111}: B_4. All samples stored at 4, 22 and 30 °C and tested every day for *E.coli* count, pH and acidity. The results showed that *E.coli* O_{111}: O_4 can tolerate pH less than 4.5 and time and temperature affect on the survival of microorganism. Viability and activity of starter microorganisms had a negative effect on the growth of *E. coli*. It was concluded that storage temperature is the effective factor on the microorganism survival time ($P<0.001$). For example the mean value for survival time of initial inoculation of 10° cfu/ml reduced from 4.50 days at 4° C to 2.17 days at 30°centigrade.

Key words: *Yoghurt, E-coli, O111:B4 Time, Temperature*

۱- گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات،تهران،ایران

۲ – گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهرا ن،تهران،ایران

۳- دانش آموخته دکتری دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی کرج،کرج،ایران

مقدمه

فرآیند تولید ماست یک هنر باستانی است که به هزاران سال پیش و احتمالا حتی به زمان اهلی کردن گـاو و گوسـفند و بز برمی گردد. پیشرفت این فـن آوری در طـول تـاریخ بـه دلیل سادگی آن بـوده کـه درنتیجـه ایـن هنـر از پـدران بـه فرزندان رسیده است. احتمالا منشا تولید ماسـت خاورمیانـه است و تغییر و تحول در تولید این فرآورده تخمیـری شـیر نتیجه سعی و کوشش مردمان و عشایر ساکن درایـن منطقـه از جهان بوده است (۲).

درتولید ماست از دوباکتری مولد اسـید لاکتیـک بـه عنـوان مایه[1] استفاده می شود :

۱ – استرپتوکوکوس سالیواریوس تحت گونه ترموفیلوس [2]

۲– لاکتوباسـیلوس دلبروکـی سـالیواریس تحـت گونـه بولگاریکوس [3]

نسبت این دو میکروارگانیسم در یـک مایـه ماسـت خـوب معمولا مساوی بوده و مقدار آن معمـولا ۳ –۲ درصـدحجم شیر است. درشرایط مطلوب رشد، ایـن دو میکروارگانیـسم در شیر تکثیر نموده، اسید لاکتیک ایجاد می کنندکه با پـایین آوردن pH شیر و ایجاد لخته همـراه اسـت (۳). اگـر اسـید لاکتیک موجود درشیر های تخمیری برای توقـف رشـد یـا نـابودی میکروارگانیـسم هـا کـافی باشـد معمـولا عوامـل بیماریزایی چون اشریشیا کلی[4]، سالمونلا[5] و شیگلا[6] از بـین خواهند رفت. از طرفی این میکروارگانیسم هـا بـه سـهولت می توانند در مراحل اولیه تولید ماست را آلوده سـازند (۳). اشریشیا کلـی میکروارگانیـسمی از خـانواده آنتروباکتریاسـه است که فلـورطبیعی حیوانـات خـونگرم بـوده، بـه عنـوان شاخص آلودگی مواد غذایی با مدفوع محسوب مـی شـود . ایـن میکروارگانیـسم موجـب گاسـتروآنتریت و اخـتلالات گوارشـی درانـسان شـده و عامـل متـداول ورم پـستان در گاوهای شیرده است (۳). اشریشیا کلی $O_{111}:B_4$ به کـرات از شیر و فرآورده هـای آن جـدا شـده اسـت (۱۳). دریـک مطالعـه کـه تعـداد 10^3 و 10^7 CFU درهـر میلـی لیتـر میکروارگانیسم اشریشیا کلی O157 : H7 به شیرگاو تلقیح و ازآن ماست معمولی و ماست پروبیوتیک تهیه شده بودبعد از ۷ روز نگهداری درتعداد باکتری کاهش شدید دیـده شـد کـه ایـن کـاهش درماسـت پروبیوتیـک بیـشتر بـود (۱۰). درمطالعه دیگری که اثرات باکتری کشی و مهار باکتری های ماست برروی سه سویه اشریشیا کلی بررسی گردیـد نـشان داده شد که زنده بودن میکروارگانیسم هـای مایـه و کـاهش pH ماست درمهار رشد بیماریزاها بسیار موثراست. گـزارش ها و شـکایات ارسـالی بـه ادارات نظـارت برمـواد غـذایی وزارت بهداشت در منطقه تهران نشان می دهـد کـه ماسـت های تولید شـده درکارگاههـا، دارای آلـودگی بـه کلیفـرم و اشریشیا کلی می باشند. با توجه به ماهیت و ویژگی ماسـت باور براین است که امکان آلودگی آن به کلیفرم ها بسیار کم و حتی ناممکن است (۹) لذا دراین مطالعه سعی گردید کـه امکان بقا و دوام اشریشیا کلی در ماست در زمـان و دمـای نگهداری آن مورد بررسی قرار گیرد .

1- Starter
2- Str. salivarius sub sp. thermophilus
3- Lac. delbruecki sub sp. bulgaricus
4- Escherichia coli
5- Salmonella
5- Shigella

مواد و روش کار

- محیط کشت Violet Red Bile (Merck) VRBA Agar
- محیط کشت BHI جامد و مایع Brain (Merck) Heart Infusion
- باکتری *اشریشیا کلی* $O_{111}:B_4$ *تهیه* شده از موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی
- اسپکتروفتومتر
- سایر وسایل و مواد متداول درآزمایشگاه کنترل کیفی مواد غذایی

روش آزمایش:

- نمونه های ماست تهیه شده درکارخانه ٢٤ ساعت بعد از تولید انتخاب و بعد از مخلوط کردن هر نمونه بوسیله مخلوط کن نمونه ها به دو گروه تقسیم شدند، گروه اول بلافاصله بعد از یکنواخت کردن ازنظر آزمایش های میکربی (شمارش کلیفرم– شمارش استافیلوکوکهای کواگولاز مثبت– شمارش کپک ها) و pH و اسیدیته آزمایش گردیدند. گروه دوم بعد از اینکه به مدت ۵ دقیقه دردمای ۷۰ درجه سانتی گراد پاستوریزه شدند مورد آزمایش های فوق قرار گرفتند(۵).

- گروه اول به عنوان گروه نمونه و گروه دوم به عنوان گروه کنترل (شاهد) درنظر گرفته شدند نمونه های عاری از کلیفرم ، کپک و استافیلوکوک جهت مطالعه انتخاب گردیدند. باکتری *اشریشیا کلی* به محیط مایع BHI منتقل گردید و بعد از نگهداری در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۸ ساعت با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر میزان جذب نور توسط تعداد معین از باکتریها در محیط BHI تعیین و رقت های متوالی از آن تهیه شد. همزمان از باکتری به محیط جامد BHI با سطح شیب دار منتقل و کشت سطحی تهیه گردید که در آزمایش های بعدی از آن استفاده شد. میزان جذب نور در طول موج ٦۰۰ نانومتر اندازه گیری گردید و باتکرار حداقل ۱۰ بار میزان جذب نور و برابری آن باتعداد مشخص میکرب بدست آمد.

- هردوگروه ماست های مورد مطالعه به سه زیر گروه تقسیم شدند که بعداز اندازه گیری pH و اسیدیته به زیر گروه اول تعداد10^3 cfu/ml، به زیرگروه دوم 10^2 cfu/ml، به زیر گروه سوم 10^0 cfu/ml باکتری تلقیح گردید. نتیجتا شش زیرگروه ماست تلقیح شده مورد مطالعه قرار گرفت که دارای یک شاهد بودند (نمونه ماست بدون تلقیح باکتری درهرگروه در نظر گرفته شد). حجم نمونه ها درهر بار آزمایش ۲۰۰ میلی لیتر انتخاب گردید که بتوان درطی دوران آزمایش همه روزه از یک نمونه برداشت نمود. درهر شش زیر گروه بلافاصله بعد از تلقیح کشت درمحیط VRBA به صورت دولایه انجام(۴) و بعد از نگهداری به مدت ٢٤ ساعت در۳۲ درجه سانتی گراد، شمارش انجام شد.و سپس هر سری از نمونه ها ی تلقیح شده در سه دمای ٤ درجه سانتی گراد (یخچال) ۲۲ درجه سانتی گراد (دمای محیط) و ۳۰ درجه سانتی گراد (دمای غیر متعارف) نگهداری گردیدند آزمایش درهردما دارای سه تکرار بود و هرروزه آزمایش های شمارش تعداد میکروارگانیسم، pH و اسیدیته انجام شد.بنابراین دراین تحقیق متغیروابسته مدت زمان ماندگاری E.coli و تعداد تلقیح اولیه و دمای نگهداری به عنوان متغیرهای مستقل مورد تجزیه و تحلیل آماری (Two way Anova) قرار گرفتند.

نتایج

طبق بررسی های انجام شده در این تحقیق، باکتری *اشریشیا کلی* میکروارگانیسمی تقریبا مقاوم در برابراسید موجود در ماست بوده و قادراست تا مدت زیادی اسید ماست را تحمل کرده و در این محیط زنده بماند. مدت ماندگاری *اشریشیا کلی* سویه $O_{111}:B_4$ با توجه به میزان درجه حرارت نگهداری نمونه، میزان pH و اسیدیته اولیه و مقدار تلقیح باکتری در جدول شماره ۱ ارائه میگردد. اسیدیته مطلوب ماست با توجه به ذائقه ایرانیان که ماست را بصورت خیلی شیرین نمی پسندند در حدود ۱۲۰–۱۱۰ درجه دورنیک می باشد و با توجه به این اسیدیته و با در نظر گرفتن اینکه ماست در یخچال و در درجه حرارت حدود ۴ درجه سانتی گراد نگهداری می شود زمان ماندگاری اشریشیا کلی با مقادیر متفاوت تلقیح در این شرایط درهمان جدول ۱ ارائه گردیده است.

جدول ۱ : آماره های مربوط به زمان ماندگاری *اشریشیا کلی* در ماست برحسب تعداد تلقیح و دمای نگهداری (سانتیگراد)

تعداد تلقیح باکتری اولیه آماره های مربوط به زمان ماندگاری(به روز)E.coli درجه حرارت pH اسیدیته (درنیک)			10^{0}	10^{2}	10^{3}
			خطای معیار± میانگین تعدادنمونه	خطای معیار± میانگین تعدادنمونه	خطای معیار± میانگین تعداد نمونه
٤	٣/٧٧ - ٤/٠٣	١٠٨ -١٥٠	٤/٥٠ ± ١/٢ ٦	٦/٥٠±١/٥٤ ٦	٧/٣٣ ± ١/٨٠ ٦
٢٢	٣/٨٤ -٤/٠٣	١٠٩ -١٢٣	٢/٣٣ ± ٠/٢١ ٦	٢/٣٣ ±٠/٢١ ٦	٢/٣٣ ±٠/٢١ ٦
٣٠	٣/٨٢ – ٤/٣٣	٩٢ -١٣٤/٥	٢/١٧ ± ٠/١٧ ٦	٢/١٧ ± ٠/١٧ ٦	٢/٦٧ ± ٠/٢١ ٦

بحث

ماست یکی از فرآورده های تخمیری حاصل از شیر است که فرآیند حرارتی یکی از شرایط فرآوری آن است. و با توجه به حرارتی که شیر ماست درحین تولید متحمل می شود میکروبهای موجود در آن ازبین رفته و غیر فعال می شوند و وجود میکروارگانیسم های غیر از باکتری های استارتر در ماست نشانه آلودگی های بعد از تولید می باشد که ممکن است از طرق مختلف وارد ماست شده باشد(۳). وجود *اشریشیا کلی* در ماست (بعنوان باکتری شاخص) حاکی از آلودگی های بعدی این محصول است و طبق استاندارد ملی ویژگیهای ماست محصول نهایی باید عاری از میکروب اشریشیا کلی باشد(۵). بررسی انجام شده نشان می دهد که میکروب اشریشیا کلی تا حدودی قدرت ماندگاری در ماست را دارد که زمان این ماندگاری به عوامل مختلفی وابسته است از جمله:

الف-pH و اسیدیته اولیه ماست

جهت وجود خاصیت باکتری کشی در ماست pH کمتراز ۴/۵ ضروری است. چنین شرایطی برای رشد کلی فرمها مطلوب نیست(۹) اما سویه های گوناگون اشریشیا کلی می توانند خود را با حضور اسید لاکتیک تطبیق دهند و ممکن است تا مرحله توزیع ماست به بازار در آن زنده باقی بمانند. هرچه محیط اسیدی تر باشد قدرت ماندگاری اشریشیا کلی کمتر خواهد بود و وجود اسید در ماست بعنوان عامل باکتری کشی این محصول به حساب می آید. طبق مطالعات انجام شده برروی فرآورده های تخمیری شیر مثل دوغ و کفیر زمان بقای *اشریشیا کلی* در محصولات ترش شیر بسیار کوتاه تر است(۱۴). دریک مطالعه مشاهده گردیده که میکروارگانیسم در طی تخمیر شیر تکثیرمی یابد و درنتیجه شیر تخمیر شده آلوده است ولی بتدریج دراثر گذشت زمان ازتعداد آن کاسته می شود. دراین مطالعه *اشریشیا کلی* به مدت ۲۱ روز در فرآورده های تخمیری شیر زنده بود(۶). باید توجه داشت که اسیدیته بالا (در حدود ۱۵۰-۱۴۰ درجه دورنیک) اگرچه تاثیر مثبتی از نظر نابودی

میکروارگانیسم ها بر جای خواهد گذارد اما محصول را بقدری ترش خواهد کرد که در واقع غیر قابل مصرف می گردد و در این رابطه باید به بازار پسندی و کام پذیری محصول نیز توجه کرد. طبق ویژگیهای استاندارد ملی ماست حداقل اسیدیته ماست باید معادل ۸۰ درجه دورنیک باشد اما در مورد حداکثر میزان اسیدیته هیچ قانونی وضع نشده است(۵).

ب- تعداد اشریشیا کلی در ماست

تعداد اشریشیا کلی موجود در هر میلی لیتر از محصول نیز یک عامل محسوب می گردد که با توجه به بررسی های انجام شده هرچه تعداد میکروارگانیسم در محصول بیشتر باشد زمان ماندگاری آن بیشتر خواهد بود(۱۲) بطوریکه در نتایج ما آمده است تلقیح۱۰۳ میکروارگانیسم از تلقیح های۲ ۱۰ و۰ ۱۰ زمان ماندگاری بیشتری را نشان داد و به همین ترتیب درتلقیح ۲ ۱۰ نسبت به تلقیح ۰ ۱۰ ماندگاری میکروارگانیسم از زمان طولانی تری برخوردار بود.

ج- دمای نگهداری محصول

آزمایشهای نجام شده دراین بررسی نشان داد که مدت ماندگاری اشریشیا کلی تا حدود زیادی به دمای نگهداری محصول وابسته است بطوریکه نگهداری ماست در یخچال($4^{\circ}C$) موجب طولانی ترشدن مدت ماندگاری میکروارگانیسم میگردد. دلیل عمده آن فعالیت آهسته تر باکتری های طبیعی ماست و افزایش کند اسیدیته در این دما می باشد(۹) و در دماهای بالاتر (۲۲ و۳۰ درجه سانتی گراد) فعالیت میکرو ارگانیسم های استارتر ماست شدیدتر بوده و تولید اسید سریع تر انجام میگیرد (۱۱). همچنین در دماهای بالاتر فعالیت میکرو ارگانیسم اشریشیاکلی نیز بیشتر شده و باکتری با رشد و تکثیر بالا سریعا وارد مرحله رشد سریع باکتری می شود با وجود این اغلب شاهد هستیم که در کارگاه های کوچک تولید ماست امکانات سرد خانه ای وجود ندارد و ماست های تولید شده گاهی تا زمان طولانی در دمای محیط نگهداری می شوند که این امر باعث کیفیت نا مطلوب ماست و افزایش سریع اسیدیته آن می گردد.

د- وجود میکروارگانیسم های مایه ماست بطور زنده و فعال در محصول

زنده بودن میکروارگانیسم های مایه ماست نقش مهمی در افزایش اسیدیته محصول دارد و این عامل باعث نابودی سریع تر میکروارگانیسم های ناخواسته اشریشیا کلی در ماست می شود. در یک تحقیق میکروارگانیسم به شیری که pH آن به pH ماست (حدود ۴/۴-۴/۱) رسانده شده بود تلقیح شد و درشرایط pH پایین میکروارگانیسم زنده ماند و برتعداد آن افزوده شد (۸). در مطالعه Saadi و همکاران (۱۹۸۷)، اشریشیا کلی در ماست های پاستوریزه که میکروارگانیسم های طبیعی ماست در آن غیر فعال شده بودند زمان ماندگاری بیشتری نشان دادند البته شایان ذکر است که فعالیت میکرو ارگانیسم های طبیعی ماست علاوه بر تولید اسید احتمالا تولید مواد دیگری می کنند مانند پادزی ها(آنتی بیوتیک ها) که در نابودی میکروبهای ناخواسته سهیم می باشند(۱۴) بطوریکه ماست های معمولی با اسیدیته اولیه پایین در مقایسه با ماست های پاستوریزه ای که دارای اسیدیته بالا بودند، خواص میکروب کشی بیشتری از خود نشان دادند. علاوه براین طبق تعریف موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران از ماست، میکروارگانیسم های طبیعی ماست باید در فرآورده نهایی بصورت زنده و فعال و به مقدار متناسب موجود باشندکه ماست هایی که پس از تولید پاستوریزه می گردند شامل تعریف فوق نمی باشند.

ه- مرحله آلوده شدن ماست به E-coli

زمان و مرحله آلوده شدن ماست توسط میکروب در مدت ماندگاری آن بسیار مهم است بطور مثال در صورتیکه ماست، در مرحله تلقیح ماست در خط تولید، توسط اشریشیا کلی آلوده شود این باکتری فرصت کافی برای رشد

و تکثیر خواهد داشت زیرا در این شرایط میکروارگانیسم های استارتر هنوز از خود هیچ فعالیتی نشان نداده اند و اشریشیا کلی در این مرحله به راحتی افزایش پیدا کرده و ماست را کاملا آلوده می نماید، درصورتیکه آلوده شدن در مراحل بعدی صورت گیرد رفته رفته با توجه به افزایش اسیدیته ای که در اثر ماندن ماست حاصل می شود طول مدت ماندگاری اشریشیا کلی کوتاهتر می گردد و میکروارگانیسم قدرت تکثیر نخواهد داشت(۸).

اگرچه براساس مطالعات انجام شده اشریشیا کلی B4 : O111 قادر به زندگی در pH ماست در زمان نگهداری این فرآورده دریخچال می باشد و میزان آلودگی اولیه ماست که معمولا بعد از فرآیند ایجاد شده است، نوع مایه و فعالیت آن و مرحله آلوده شدن ماست و همچنین سویه اشریشیا کلی دربقای میکروارگانیسم موثر می باشد(۷) اما دراین مطالعه مشخص گردید که دما موثرترین نقش را برمدت زمان بقای اشریشیا کلی داشته و با افزایش حرارت مدت ماندگاری به طور قابل توجهی کاهش می یابد ($P<0.001$)

فهرست منابع

۱- شیمی، ا. (۱۳۷۶)، باکتری شناسی دامپزشکی و بیماریهای باکتریایی، انتشارات موسسه نشر جهاد، صفحه ۱۰۳.

۲- فرخنده، ع.(۱۳۵۶)، اصول بهداشت و صنایع شیر، چاپ دوم، انتشارات دانشگاه تهران، صفحه ۱۸۹-۱۸۸.

۳- کریم، گ. (۱۳۷۹)، شیر و فرآورده های آن، چاپ دوم، انتشارات نشر سپهر (نیکخواه صفحه ۱۳۷- ۱۳۰).

۴- کریم، گ. (۱۳۷۸)، آزمون های میکربی مواد غذایی، چاپ سوم، انتشارات دانشگاه تهران، صفحات ۶۷- ۶۴.

۵- موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران (۱۳۷۵). ویژگیها و روش های آزمون ماست پاستوریزه استاندارد شماره ۶۹۵.

6- Gulmeg, M. Guven, A. (2003) Survival of E. coli O157: H7, Listeria monocytogenes 4b and Yersinia enterocolytica O3 in ayran and modified Kefir as pre and post fermentation contaminant. Vet. Med. Czeck 48(5) : 126-132.

7 - Hsin, Y., Chou, C.C. (2001). Acid adaption and temperature effect on the survival of E. coli O157 : H7 in acidic fruit juice and lactic fermented milk product. International journal of Food Microbiology. 70 (1-2): 189-195.

8 - Issa, M. Ryser, S. Elliot, T. (2000). Fate of Listeria monocytogenes, Salmonella typhimurum and E. coli O157 :H7 in labneh as a pre and post fermentation contaminanats. J. Food Protection. 63(5) : 608-612

9-Kotz, C.M.,(1990). In vitro antibacterial effect of yoghurt on E. coli. Dig. Dis. Sci. 35(5): 630-632.

10- Massa, S.(1997). Survival of E. coli O157 : H7 in yoghurt during preparation and storage at4°C. Letters in Applied Microbiology. 24(5): 347-350.

11-Ogwaro, B.A., Gibson, H. Whitehead , M., Hill, D.J.(2002). Survival of *E. coli* O_{157}: H_7 in traditional African yoghurt fermentation. International Journal of Food Microbiology 79(1-2) 105-112.

12- Preixens, S. Sancho, F. (1987). Development of coliforms in natural yoghurt. Alimantaria , 187: 33-37

13- Singh, R. S., Batish, V.K., Chander, H.(1985). Reactivation of heat injured *E. coli* cells in milk. Milchwissenschaft 40(7) : 398-401.

14 – Tamime, A.y. Robinson , R.K(1983), Yoghurt, Science and Technology, Pergamon. press, Oxford. PP, 371-372.