بررسی اثر *Lactococcus lactis , Lactobacillus casei* بر باکتری‌های لاکتیک گوشت و ویژگیهای حسی آن

دکتر شعله درویشی [1]

چکیده

تأثیر رشد و تکثیر *Lactobacillus. casei*، *Lactococcus. lactis* بر باکتری‌های گوشت گاو پس از بسته‌بندی در بسته‌های قابل نفوذ به هوا، بررسی گردید. این سویه‌ها از فرآورده‌های شیری بومی ایران جداسازی شدند و در تست آنتی‌بیوز، فعالیت ضد میکروبی در برابر *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus* نشان دادند. این دو سویه *L. lactis* subsp. *lactis var. diacetylactis 202* , *Lactobacillus casei* subsp. *casei 102* بودند که با دانسیته‌ی 10^6 CFU/Cm^2 به برش‌های گوشت افزوده شدند. نمونه‌های تلقیح شده در شرایط هوازی در سردخانه‌ای که دمای آن بین ۱- و ۵ درجه سلسیوس متغیر بود، به مدت ۵ روز نگهداری گردیدند. ماندگاری نمونه‌ها با ارزیابی ویژگیهای حسی (رنگ، بو و ویژگیهای ظاهری) تعیین شد. در ضمن شمارش باکتریهای لاکتیک و اندازه‌گیری pH نیز در طول مدت نگهداری انجام گردید.

در مورد برش‌های گوشت تلقیح شده با *Lb. casei* (تیمار۱) تعداد باکتریهای لاکتیک در طول مدت نگهداری افزایش نشان داد و فساد گوشت به تعویق افتاد. در برش‌های گوشت تلقیح شده با *L. lactis* (تیمار۲)، نیز تعداد باکتریهای لاکتیک افزایش حاصل نمود. عمر ماندگاری نمونه‌های تیمار۲، حتی نسبت به نمونه‌های شاهد نیز کاهش یافت. در نتیجه سویه‌ی *Lb. casei* subsp. *casei 102* می‌تواند به عنوان یک سویه آنتاگونیست مناسب با توان افزایش ماندگاری گوشت خامی که در بسته‌های قابل نفوذ به هوا در دمای بین ۱- و ۵ درجه سلسیوس نگهداری شده است، مورد استفاده قرار بگیرد.

۱- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج

Effects of growth of *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis* on the LAB of beef and its Sensory characters

Dr. Sh. Darvishi

Assis. Prof. of Food Science & Technol., Sanandaj Islamic Azad Univ. Sanandaj, Iran

Abstract

The effects of growth of *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis* on the lactic acid bacteria of beef after packaging in air permeable packs were studied. The strains isolated from Iranian dairy products were added to the slices of beef at a density of 10^6 CFU/Cm^2 after identification and antibiosis test against indicator bacteria *(Escherichia coli, and Staphylococcus aureus)*. The two strains were Lactobacillus casei subsp. casei 102, and Lactococcus lactis subsp. lactis var. diacetylactis 202. Inoculated and control samples were stored for up to five days under aerobic conditions in cold storage facilities with temperature variation between of -1 to 5 ^{o}C.

Enumeration of the lactic acid bacteria and pH were carried out during storage period. The number of lactic acid bacteria in samples inoculated with *Lactobacillus casei* subsp. *casei* 102 (treatment no.1) increased during storage period.

As a result, *Lactobacillus casei* subsp. *casei* 102 can be used as a suitable antagonist of spoilage in beef under aerobic conditions in cold storage facilities with a temperature variation between -1 to 5 ^{o}C.

Keywords: *Lactobacillus casei*, beef, *Lactococcus lactis*, LAB.

واژگان کلیدی: *Lactobacillus casei*، گوشت، *Lactococcus lactis* ، LAB،

مقدمـه

باکتریهای لاکتیک مثل لاکتوباسیلوس‌ها، در تخمیرهای غذایی، نقش اصلی را ایفا می‌کنند و باعث ایجاد تغییرات طعم و بافت همراه با اثر نگهدارندگی و در نتیجه افزایش ماندگاری فرآورده تغییر شکل یافته می‌شوند. باکتریهای لاکتیک در گوشت تازه، فرآیند تخمیر ملایمی[1] ایجاد می‌کنند که هیچگونه تغییری در ویژگیهای حسی، بدلیل وجود کربوهیدرات به‌مقدار کم، و ظرفیت بافری قوی گوشت، تولید نمی‌شود. گر چه رشد و تکثیر کنترل نشده‌ی برخی گونه‌های باکتریهای لاکتیک می‌تواند سبب فساد انواع گوشت و فرآورده‌های آن گردد. رشد و تکثیر باکتریهای لاکتیک ممکن است باعث ایجاد بوهای نامطلوب و پارگی بسته‌بندی گوشت ناشی از تولید دی‌اکسید کربن شود (۷).

باکتریهای لاکتیک قادر به تولید مواد ضد میکروبی طبیعی بر علیه میکروارگانیسم‌های مولد فساد و بیماریزا هستند. تمایل به‌استفاده از مواد ضدمیکروبی طبیعی نظیر باکتریوسین‌ها در حال افزایش است، زیرا امروزه مصرف کنندگان به مصرف مواد غذایی طبیعی و با حداقل فرآوری علاقه نشان می‌دهند(٦).

هدف از انجام این پژوهش، بررسی رشد و تکثیر یک سویه از *lactococcus* و یک سویه از *lactobacillus* با فعالیت ضد میکروبی و تأثیر آنها بر ویژگیهای حسی برشهای گوشت گاو در شرایط تولید صنعتی و نگهداری در سردخانه با دمای حداقل ۱- و حداکثر ۵ درجه سلسیوس در شرایط هوازی است.

۱ – مـواد و روشهـا

۱-۱- مواد

۱-۱-۱- گـوشت

در این مطالعـه، از برشهـای گـوشت لخم گـاو استفاده گردید. منبـع تأمیـن گـوشت، کشتارگاه‌های وابسته به بنیاد مستضعفان طرف قرارداد باکارخانه فرآورده‌های گوشتی گوشتیران بوده که به صورت لاشه های گرم به شرکت مذکور تحویل داده می‌شد. برشهای گوشت از مغز ران لاشهٔ گاو و پس از قطعه قطعه کردن و جداکردن بافت پیوندی و چربی به صورت گوشت بی چربی با pH معمولی (۵/۶) به صورت قطعات با مساحت ۱۲ cm ×۱۸ cm در شرایط کاری کارخانه طبق روال معمول تهیه شد.

۱-۱– ۲- سویه‌های میکروبی لاکتیک مولد ترکیبات بازدارنده

باکتریهای لاکتیک مورد استفاده در این مطالعه عبارتند از:

Lactobacillus casei subsp. *casei 102* و *lactis Lactococcus* subsp. *lactis var. diacetilactis 202* که قبلاً از فرآورده‌های شیری بومی ایران جداسازی و دراین مطالعه شناسایی و نامگذاری گردیدند. نتایج تست آنتی بیوز در مقابل *Staphylococcus aureus,* *Escherichia coli* نشان داد که این دو سویه مولد ترکیبات بازدارنده هستند.

۱-۱-۳- محیط‌های کشت

به منظور شمارش باکتریهای لاکتیک در گوشت از محیط کشت اختصاصی MRS[2] آگار استفاده گردید.

۱-۱– ۴- بسته بندی

برای بسته بندی گـوشت، از ظروف پلاستـیکی نیم کیلویی از جنس پلی استیرن[3] موسوم به ظروف

1. Mild fermentaton

2. deMan , Rogosa and Sharpe.
3. Poly styrene(PS)

یکبار مصرف وفیلم پلی‌اتیلن با دانسیته‌ی کم[4] قابل نفوذ به‌اکسیژن($cc/24\ h\ /100in^2$ ۵۵۰) استفاده شد.

۱-۱- ۵ – سایر مواد و لوازم

دستگاهها و لوازم موجود در آزمایشگاه میکروبیولوژی و شیمی. برای اندازه‌گیری pH از دستگاهpHسنج دیجیتالی (MEIJI Model –5002) و جهت‌اندازه‌گیری دانسیته‌ی میکروبی سوسپانسیون (معلقه) باکتریهای لاکتیک از دستگاه اسپکتروفتومتر Shimadzu (p/N 204-00010– 02 … -uv 02 –102) Kyoto, Japan استفاده گردید.

۱-۲ – روش‌هـا

۱-۲-۱- روش اندازه‌گیری غلظت سوسپانسیون (معلقه) باکتریهای لاکتیک

برای این منظور با استفاده از روش کدورت سنجی[5] میزان جذب نور در طول موج ۶۰۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر با مشخصات ذکر شده اندازه‌گیری شده، سپس بر اساس اعداد حاصله و با استفاده از میزان جذب لوله‌های ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳، ۰/۴، ۰/۵ مک فارلند[6] ، تعداد باکتریها در معلقه‌های مورد استفاده محاسبه گردید.

۱-۲- ۲ – تلقیح گوشت

برش‌های گوشت در سوسپانسیون باکتریهای لاکتیک مولد ترکیبات بازدارنده که در محیط کشت آبگوشت MRS جهت رساندن دانسیته اولیه باکتریایی به $Log^{10^6}\ CFU/cm^2$ از سطح گوشت لخم با محلول رینگر یک چهارم سترون رقیق شده بودند، به مدت ۱۵ ثانیه فرو برده شدند و سپس در یک آبکش سترون به مدت ۲ دقیقه قرار گرفتند. همچنین به عنوان شاهد،قطعات گوشت فقط به محلول رینگر یک چهار آغشته گردیدند، ولی سایر مراحل یکسان بود.

۱-۲- ۳ – نمونه برداری وتهیه رقت‌های مختلف

نمونه‌برداری و تهیه رقتهای مختلف جهت شمارش باکتریهای لاکتیک از گوشت تلقیح شده با استفاده از استانداردهای بین‌المللی با شمـــاره‌های ISO 3100 – 1 ، ISO 3100-2 و ISO 6887 انجـــام گرفت (۱۰، ۱۱ و۱۲).

۱-۲- ۴- ارزیابی عمر نگهداری گوشت بر اساس ویژگیهای حسی

هر بسته گوشت (نمونه‌های مورد آزمایش و شاهد)، برای ارزیابی عمر نگهداری از نظر مقبولیت بو، رنگ و ویژگیهای ظاهری با استفاده از استاندارد شماره ISO 4121 توسط گروه ارزیاب مورد سنجش قرار گرفت(۸).

۱-۲- ۵ – اندازه‌گیری pH گوشت

pH سطحی برش‌های گوشت (نمونه‌های مورد آزمایش وشاهد) طبق روش ارائه شده در استاندارد ایران شماره ۱۰۲۸ اندازه‌گیری گردید(۱).

۱-۲- ۶ – شمارش باکتریهای لاکتیک

بر طبق روش ارائه شده در استاندارد بین‌المللی شماره ISO 13721 انجام گردید(۹).

۱-۲- ۷- روش تجزیه وتحلیل آماری

تجزیه واریانس بین سه تیمار در شش تکرار و

4. Low density polyethylene
5. Turbidimetry
6. Mc. Farlaind

مقایسه میانگین بین شاهد و تیمار ۱ و ۲ به کمک نرم افزار Spss ver.14 انجام گرفت.

۲- نتایـج

۲-۱- نتایج ارزیابی عمر نگهداری برش‌های گوشت براساس ویژگیهای حسی

نمودارهای ۱، ۲ و۳ روند تغییرات میانگین امتیازهای داده شده به وسیلهٔ گروه ارزیاب ویژگیهای حسی به بو، رنگ و ویژگیهای ظاهری نمونه‌های شاهد و تیمارهای مورد آزمایش را در طول مدت نگهداری نشان می‌دهند.

۲-۲- نتایج اندازه‌گیری pH سطحی

نمودار شماره ۴، روند تغییرات میانگین pH سه تکرار نمونه‌های شاهد و تیمارهای مورد آزمایش را نشان می‌دهد.

۲-۳- نتایج شمارش باکتریهای لاکتیک

نمودار شماره ۵، روند تغییرات میانگین تعداد پرگنه‌های باکتریهای لاکتیک مربوط به نمونه‌های آزمایشی و همچنین شاهد تیمارهای مختلف را بر حسب $\text{Log } \text{CFU}/\text{cm}^2$ [۷] در طول مدت آزمایش نشان می‌دهد.

۳- بحـث

۳-۱ – تغییرات ویژگیهای حسی

اصولاً تغییرات ویژگیهای حسی گوشت نظیر بوجود آمدن بوهای نامطلوب یا تغییر رنگ و یا ایجاد لزاجت سطحی، معمولاً به عنوان نشانه‌های فساد مطرح می‌شود. علیرغم پیشرفتهای حاصله در طی سالهای گذشته، هنوز جزئیات نقش میکروارگانیسمها در فساد گوشت دقیقاً روشن نیست(۴).

از نظر ارزیابی بوی گوشت، همانطور که در نمودار ۱ ملاحظه می‌شود، همواره نمونه‌های مربوط به تیمار ۱، از کیفیت بالاتری نسبت به نمونه‌های شاهد وتیمار ۲ برخوردار بوده‌اند. پس از آن شاهد و سپس تیمار ۲ قراردارد.

از نظر ارزیابی رنگ گوشت، با توجه به نمودار۲، نمونه‌های تیمار ۱ همواره امتیاز بیشتری نسبت به شاهد و تیمار ۲ دریافت کرده‌اند. نمونه‌های تیمار ۲، از نظر رنگ گوشت، پایینترین امتیاز را دریافت نموده‌اند. از نظر ویژگیهای ظاهری نیز، نمونه‌های تیمار ۱ ، از کیفیت بالاتری برخوردار بوده‌اند. پس از آن نمونه‌های شاهد و بعد نمونه‌های تیمار ۲ قرار دارند.

مدت زمانی که مصرف کننده می‌تواند گوشت را در شرایط مناسبی نگهداری کند، به شرایط قبلی آن بستگی دارد. در هرحال حتی در شرایط مناسب در یخچال، گوشت تازه به مدت ۴ روز پس از خرید قابل استفاده است(۳).

نتایج این پژوهش یافته‌های Leisner و همکارانش را در زمینه کوتاهتر بودن عمر نگهداری برش‌های گوشت بر اساس ظاهر گوشت، در مقایسه با عمر نگهداری آن براساس تشکیل بوهای نامطلوب تأیید می‌نماید(۱۲). نتایج مطالعه این پژوهشگران نشان می‌دهد که از باکتریهای لاکتیک مولد باکتریوسین Leuconostoc gelidum UAL 187 – 22 به عنوان سویه آنتاگونیست مناسب با توان افزایش عمر نگهداری گوشت بسته‌بندی شده تحت شرایط هوازی می‌توان استفاده نمود. زیرا در شرایط یکسان، در گوشت تلقیح شده با باکتری مذکور، سه روز دیرتر بوهای نامطلوب

7. Colony forming unit

ایجاد می‌گردد.(۱۳)

نتایج حاصل از پژوهش حاضر همچنین نشان می دهد که نمونه‌های تیمار ۲ در مقایسه با شاهد، در روزهای مختلف نگهداری همواره از کیفیت بالاتر و امتیاز بیشتر برخوردار بوده‌اند وتیمار ۱، عملاً دیرتر فاسد شده است.

۳-۲- تغییرات pH

در نمودار شماره ۴، تغییرات pH نمونه شاهد با روند افزایشی ملاحظه می‌شود، در صورتیکه در مورد نمونه‌های تیمار ۱، pH از روز سوم روند کاهشی نشان می‌دهد. در روز سوم اختلاف موجود بین شاهد و تیمارهای مورد آزمایش معنی دار ($P<۰/۰۱$) می‌گردد. تیمار ۲، به استثناء روز سوم نگهداری، در روزهای دیگر اختلاف معنی دار ($P<۰/۰۵$) با شاهد نشان نمی‌دهد. ضریب تغییرات (c.v.) در مورد pH برشهای گوشت، ۰/۷٪ محاسبه شده است.

pH گوشت تازه گاو در منابع مختلف حدود ۵/۶ گزارش گردیده است (۴). در این پژوهش نیز pH سطحی گوشت قبل از نگهداری در نمونه‌های شاهد، تیمار ۱ و تیمار ۲ به ترتیب ۵/۶۰، ۵/۶۱ اندازه‌گیری شده است. نتایج تغییرات pH نمونه‌های شاهد، مشاهدات سایر پژوهشهای انجام شده را مبنی بر افزایش تدریجی pH سطحی در طول مدت نگهداری تأیید می نماید(۴).

باکتریهای لاکتیک باعث کاهش pH وایجاد شرایط نامساعد برای سایر میکروبها، نظیر باکتریهای گرم منفی و بیشتر باکتریهای بیماری‌زا غذایی می‌گردد(۴). در سالهای اخیر پژوهشگران مختلف روی اسید لاکتیک و استفاده از آن در نقش نگهدارندگی مطالعاتی انجام داده اند. نتایج مربوطه نشان می‌دهد که پاشیدن آن روی لاشه‌ها سبب نزول سریع pH می‌شود و در نتیجه از رشد و تکثیر بسیاری از میکروارگانیسم‌ها جلوگیری می‌نماید(۲).

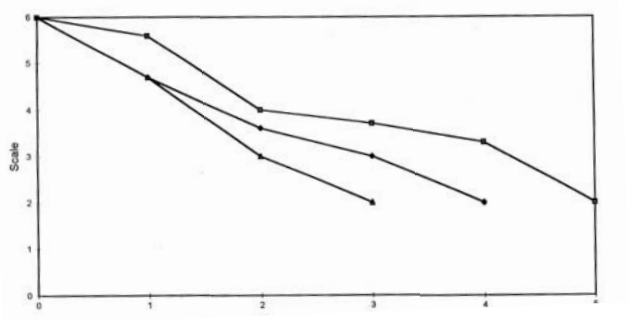
نتایج پژوهش‌های Gill و همکارانش نشان می‌دهد که حدود ۲۰٪ از باکتریهای خانواده آنتروباکتریاسه[8]، ۶۵٪ از سویه‌های *Moraxella*، ۶۰٪ از سویه‌های *Aeromonas*، ۵۵٪ از سویه‌های *Acinetobacter*، ۵۷٪ از سویه‌های *Flavobacterium* و۱۰۰٪ از سویه‌های *Alteromonas* جدا شده از گوشت در ۲ درجه سلسیوس درمحیط نوترنیت آگار با pH معادل ۵/۵ (تنظیم شده با اسید لاکتیک) رشد و تکثیر نمی‌کنند.

نتایج این پژوهش نشان دهنده کاهش pH سطحی گوشت گاو در اثر رشد وتکثیر باکتریهای لاکتیک در نمونه‌های تیمارهای ۱ و ۲ می‌باشد که مشاهدات Leisner و همکارانش را تأیید می‌نماید(۱۳)..

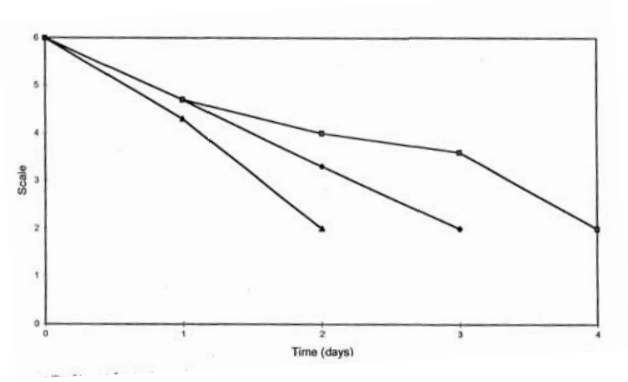
۳-۳- تغییرات تعداد باکتریهای لاکتیک

تجزیه واریانس تعداد باکتریهای لاکتیک نمونه‌های مورد آزمایش نشان می‌دهد که اختلاف موجود بین شاهد و تیمارها در روزهای مختلف نگهداری، معنی‌دار ($P<۰/۰۱$) است. طبق نمودار ۵، روند تغییرات تعداد باکتریهای لاکتیک در نمونه‌های شاهد، ابتدا منفی است، سپس نوسانات ضعیفی در تغییرات آن دیده می‌شود، در صورتی که در نمونه‌های ۱ و ۲، تعداد آنها ابتدا ثابت و سپس به سرعت افزایش یافته است. این پدیده می‌تواند نشانه فعالیت وتکثیر این باکتریها در سطح گوشت باشد.

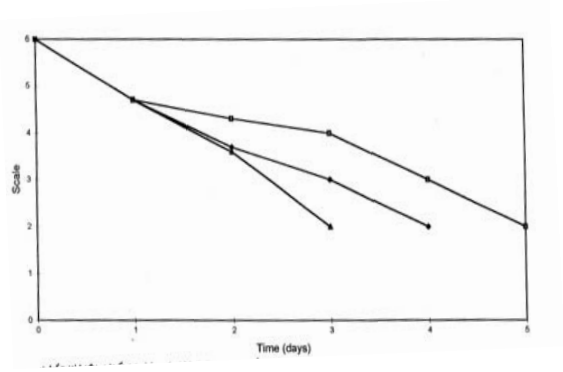
[8]. Enterobacteriaceae



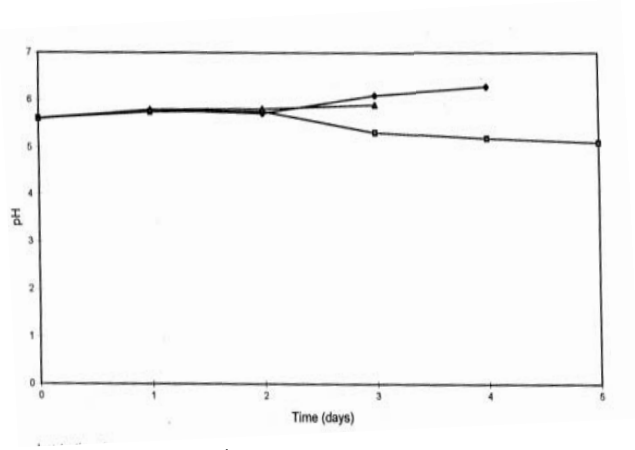
نمودار۱- تغییرات میانگین امتیازهای داده شده مربوط به بوی برش‌های گوشت (لخم) براساس معیار ۱ تا ۶ امتیاز در طول مدت نگهداری (♦) شاهد= گوشت چرخ کرده تلفیح نشده (■) تیمار۱= گوشت چرخ کرده تلفیح شده بالاکتوباسیلوس- کازئی زیر گونه کازئی سویه ۱۰۲، (▲) تیمار ۲= گوشت چرخ کرده تلفیح شده بالاکتوکوکوس- لاکتیس زیر گونه لاکتیس واریته دی‌استی لاکتیس سویه ۲۰۲



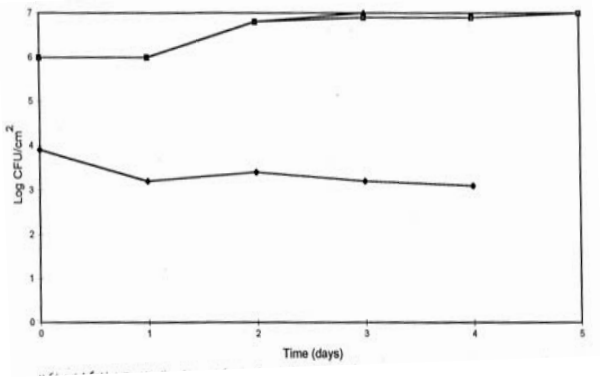
نمودار۲- تغییرات میانگین امتیازهای داده شده مربوط به رنگ برش‌های گوشت (لُخم) براساس معیار ۱ تا ۶ امتیاز در طول مدت نگهداری (♦) شاهد= گوشت چرخ کرده تلفیح نشده (■) تیمار۱= گوشت چرخ کرده تلفیح شده بالاکتوباسیلوس- کازئی زیر گونه کازئی سویه ۱۰۲، (▲) تیمار ۲= گوشت چرخ کرده تلفیح شده بالاکتوکوکوس- لاکتیس زیر گونه لاکتیس واریته دی‌استی لاکتیس سویه ۲۰۲



نمودار ۳- تغییرات میانگین امتیازهای داده شده مربوط به ویژگی های ظاهری برش گوشت (لُخم) براساس معیار ۱ تا ۶ امتیاز در طول مدت نگهداری (♦) شاهد= گوشت چرخ کرده تلفیح نشده (■) تیمار۱= گوشت چرخ کرده تلفیح شده بالاکتوباسیلوس- کازئی زیر گونه کازئی سویه ۱۰۲، (▲) تیمار ۲= گوشت چرخ کرده تلفیح شده بالاکتوکوکوس- لاکتیس زیر گونه لاکتیس واریته دی‌استی لاکتیس سویه ۲۰۲



نمودار ۴- تغییرات میانگین PH برش‌های گوشت (لُخم) براساس معیار ۱ تا ۶ امتیاز در طول مدت نگهداری (♦) شاهد= گوشت چرخ کرده تلفیح نشده (■) تیمار۱= گوشت چرخ کرده تلفیح شده بالاکتوباسیلوس- کازئی زیر گونه کازئی سویه ۱۰۲، (▲) تیمار ۲= گوشت چرخ کرده تلفیح شده بالاکتوکوکوس- لاکتیس زیر گونه لاکتیس واریته دی‌استی لاکتیس سویه ۲۰۲



نمودار ۵- تغییرات میانگین تعداد باکتریهای لاکتیک برش‌های گوشت (لُخم) براساس معیار ۱ تا ۶ امتیاز در طول مدت نگهداری (♦) شاهد= گوشت چرخ کرده تلفیح نشده (■) تیمار۱= گوشت چرخ کرده تلفیح شده بالاکتوباسیلوس- کازئی زیر گونه کازئی سویه ۱۰۲، (▲) تیمار ۲= گوشت چرخ کرده تلفیح شده بالاکتوکوکوس- لاکتیس زیر گونه لاکتیس واریته دی‌استی لاکتیس سویه ۲۰۲

۴- نتیجه گیری

Lactobacillus casei subsp. *casei 102*، یک سویه آنتاگونیست مناسب با پتانسیل افزایش عمر نگهداری گوشت بسته‌بندی شده است که در شرایط هوازی ودر دماهای بین۱– و ۵ درجه سلسیوس بدون هیچگونه تغییرات حسی نامطلوب قابل عرضه به مصرف‌کننده می‌باشد.

۵- تشکر و سپاسگزاری

از گروه محترم میکروبیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران برای همکاری در کشت و شناسایی باکتریهای لاکتیک و شرکت محترم فرآورده‌های گوشتی گوشتیران (آرزومان سابق) به خاطر کمکهای ارزنده در انجام آزمایشها در مقیاس صنعتی صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

منابع

۱- استاندارد ملی ایران، شماره ۱۰۲۸،(۱۳۷۴) استاندارد تعیین pH در گوشت و فرآورده‌های آن (روش مرجع)، چاپ سوم مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، کرج.

۲- رکنی، ن. (۱۳۷۷) علوم و صنایع گوشت، چاپ دوم، انتشارات دانشگاه تهران، تهران.

۳- فلاحی، م. (۱۳۷۵) صنایع گوشت، جلد دوم، انتشارات بارثاوا، مشهد.

۴- مرتضوی، ع. حداد خداپرست، م. ح . فرهوش، ر. ناصحی، ب. رضایی مکرم، ر.(۱۳۷۲)، میکروبیولوژی غذایی مدرن، جلد اول، نشر مشهد، مشهد.

5- Adams, M.R. and Hope, C.F.A. (1989) Rapid methods in food microbiology, Elsevier, New york.

6- Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F. and Chikindas, M.L. (2001) Bacteriocins safe, natural antimicrobials for food presservation, *Int. J.Food Microbiol*., 71: 1-20.

7- Hugas M. (1998) Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the bioperservation of meat and meat products, *J. Meat Sci*., 49: 5139-5150.

8- International Standard, ISO 4121 (1987) Sensory analysis methodology. Evaluation of food products by methods using scales, first edition, International Organization for Standardization, Switzerland.

9- International Standard, ISO 13721 (1995) Meat and meat products. Enumeration of lactic acid bacteria. Colong count technique at 30°c, International Organization for Standardization, Switzerland.

10- International Standard, ISO 3100-1 (1991) Meat and meat products. Sampling and preparation of test samples. Part 1: Sampling, second edition, International Organization for Standardization, Switzerland.

11- International Standard, ISO 3100-2 (1998) 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.

12- International Standard, ISO 6887 (1983 Microbiology. General guidance for the preparation of dilutions for microbiological examination, first edition, International Organization for Standardization, Switzerland.

13- Leisner, J.J., Greer, G.G., Dilts, B.D. and Stiles, M.E. (1995) Effect of growth of selected lactic acid bacteria on storage of beef stored under vacuum and in air. *Int. J. Food Microbiol*., 26:231-243.