# مطالعه پتانسیل رشد و توکسین‌زایی کلستریدیوم بوتولینوم و اشریشیا کولای متأثر از فرمولاسیونهای مختلف نمک و مواد نگهدارنده مورد پیش‌بینی در فرآوری خاویار

دکتر ودود رضویلر[1] دکتر رضا صفری[2] دکتر رضا پورغلام[2]

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

**تهیه خاویاردان 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 ضدمیکروبی اسید بوریک و بوراکس و غیرمجازبودن 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 (۴/۵، ۵ و ۵/۵ 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 نیتریت 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 اشریشیاکولای تیپ $O_{111}$ در یک محیط کشت مدل به‌صورت Inoculation study مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت. میزان اینوکولوم اولیه در مورد اسپورهای کلستریدیوم بوتولینوم و سلولهای اشریشیاکولای ضریبی از $10^5$ باکتری در هر میلی‌لیتر BHI انتخاب گردید. ارزیابی رشد در مورد کلستریدیوم بوتولینوم علاوه‌بر 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 ضدمیکروبی 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) علاوه‌بر 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 ضدمیکروبی نگهدارنده به‌طور ملایمی افزایش پیدا نمود. ضعیف‌ترین اثر ضدمیکروبی 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 Safe) GRAS بوده و برخلاف بسیاری از نگهدارنده‌های دیگر در pH نزدیک خنثی (مانند pH خاویار) نیز اثر ضدمیکروبی قوی نشان می‌دهد، برای آزمایش در خاویار (مطالعه بعدی) انتخاب گردید.**

**واژه‌های کلیدی** :موادنگهدارنده،کلستریدیوم‌بوتولینوم،اشریشیاکولای،رشدمیکروب.

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

برای محافظت خاویاردان از رشد میکروبهای عامل بیماری و فساد علاوه‌بر 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 خاویاردان 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. بدین‌منظور در این مطالعه دو باکتری مهم کلستریدیوم بوتولینوم (تیپ E) و اشریشیاکولای (تیپ $O_{111}$) از طریق مطالعه تلقیحی (Inoculation study) در محیط کشت مدل آزمایشگاهی بااستفاده 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) میکروبها :** میکروبهای مورد آزمایش شامل کلستریدیوم بوتولینوم تیپ E-Beluga تهیه شده از پروفسور جنی‌جورجیس استاد دانشگاه دیویس کالیفرنیا و اشریشیاکولای 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 ۱۲-۴ 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

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

سوسپانسیون گردید. با استفاده از محلول tueen 80 و دانه‌های شیشه‌ای (Glass beed) استریل و ورتکس‌نمودن 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 آبگوشت " Brain Heart Infusion " BHI کشت و به‌صورت هوازی در حرارت ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. با استفاده از این کشت مجدد در محیط آبگوشت 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 آبگوشت BHI و انجام اینوکولاسیون :** با استفاده از محیط آبگوشت BHI به‌صورت مدل به مقدار ۹ میلیمتر در لوله‌های آزمایش استریل در پیچ‌دار اینوکولاسیون دو باکتری E. Coli و کلستریدیوم بوتولینوم در ۱۶ فرمول آزمایشی با ترکیبات مورد نظر از غلظتهای نمک (CLNa) و مواد نگهدارنده مختلف (بوراکس، اسید بوریک، نیتریت، سوربات و متیل پارابن) انجام گرفت. غلظتهای نمک مورد نظر همان غلظتهای مورد استفاده در خاویاردان (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 نیتریت سدیم (۸۰ میلیگرم در لیتر)
فرمول ۹) محیط BHI حاوی ۵ درصد نمک + مخلوطی از سوربات پتاسیم (۰/۲۶ درصد) و نیتریت سدیم (۸۰ میلیگرم در لیتر)
فرمول ۱۰) محیط BHI حاوی ۵/۵ درصد نمک + مخلوطی از سوربات پتاسیم (۰/۲۶ درصد) و نیتریت 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 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 کلستریدیوم بوتولینوم بی‌هوازی (با استفاده از سیستم gas pack) انتخاب گردید.

**د) بررسی رفتار میکروبهای 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 کلستریدیوم بوتولینوم در شرایط بی‌هوازی انجام گرفت (۱۹ و ۳) و نتایج حاصله ثبت گردید.

**ه) آزمایش تولید سم در کشتهای کلستریدیوم بوتولینوم :** آزمایش ارزیابی تولید توکسین به‌وسیله کلستریدیوم بوتولینوم اینوکوله شده در فرمولاسیونهای مختلف با استفاده از روش USDA به طریق Bioassay انجام گرفت. بدین‌ترتیب که پس از استخراج توکسین از لوله‌های BHI رشد کرده از فرمولاسیونهای مختلف از طریق سانتریفوژ ۱۲۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه و تهیه مایع رویی زلال در ۴ فرم مختلف تزریق داخل صفاقی به موشهای ۲۰ گرمی انجام گرفت. pH توکسین استخراج شده قبل از تزریق در ۶/۵ تنظیم گردیده بود. ۴ فرم مختلف تزریقی 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 $\frac{1}{250}$ 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. تزریق از هر فرم به مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر به‌صورت داخل صفاقی انجام گرفت و موشهای تزریق شده تا ۹۶ ساعت از نظر بروز علایم 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 کلستریدیوم برتولینوم 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 آبگوشت BHI به‌صورت مدل خاویار، در رفتار و باکتری E. coli و کلستریدیوم 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 کلستریدیوم بوتولینوم را تا ۲ لوگ کاهش داد ولی رشد میکروب ادامه پیدا نمود به‌طوری‌که آزمایش تولید سم توسط کلستریدیوم بوتولینوم نیز در هر چهار فرمول (۴-۱) علی‌رغم کاهش رشد بیشتر نسبت به E. coli مثبت بود و موشهای تزریق شده تلف گردید. افزایش مواد نگهدارنده مختلف به محیطهای حاوی نمک با غلظتهای مختلف باعث توقف رشد تا انهدام کلیه میکروبهای 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 نیتریت (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 کلستریدیوم بوتولینوم (محیط BHI مدل، حاوی ۵/۵ تا ۴/۵ درصد نمک توأم با ۰/۲۶ درصد سوربات پتاسیم و ۸۰ppm نیتریت 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 ۸۰ppm نیتریت 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).

**جدول ۱** – رفتار اشریشیاکلی تیپ $O_{III}$ در محیط BHI حاوی نمک به همراه مواد نگهدارنده مختلف در زمانهای ۰، ۲، ۴ و ۷ روز و درجه حرارت ۳۰ درجه سانتیگراد

| نوع تیمار | زمان انکوباسیون | | | |
|---|---|---|---|---|
| | صفر | ۲ روز | ۴ روز | ۷ روز |
| ۱ : نمونه کنترل بدون هیچ‌گونه پرزواتیو | $۴\times۱۰^{۵}$ | $۲\times۱۰^{۸}$ | $۲/۵\times۱۰^{۸}$ | $۳/۴\times۱۰^{۸}$ |
| ۲ : نمک با غلظت ۴/۵ درصد | $۴\times۱۰^{۵}$ | $۸/۳\times۱۰^{۷}$ | $۸/۵\times۱۰^{۷}$ | $۹/۵\times۱۰^{۷}$ |
| ۳ : نمک با غلظت ۵ درصد | $۴\times۱۰^{۵}$ | $۱/۱\times۱۰^{۷}$ | $۲\times۱۰^{۷}$ | $۲/۱\times۱۰^{۷}$ |
| ۴ : نمک با غلظت ۵/۵ درصد | $۴\times۱۰^{۵}$ | $۱/۳\times۱۰^{۷}$ | $۲/۵\times۱۰^{۷}$ | $۲/۵\times۱۰^{۷}$ |
| ۵ : نمک با غلظت ۴/۵ درصد + اسید بوریک ۰/۳ درصد + بوراکس ۰/۴ درصد | $۴\times۱۰^{۵}$ | $۵/۲\times۱۰^{۵}$ | $۴/۶\times۱۰^{۵}$ | $۲/۲\times۱۰^{۵}$ |
| ۶ : نمک با غلظت ۵ درصد + اسید بوریک ۰/۳ درصد + بوراکس ۰/۴ درصد | $۴\times۱۰^{۵}$ | $۴/۱\times۱۰^{۵}$ | $۳/۶\times۱۰^{۵}$ | $۳\times۱۰^{۵}$ |
| ۷ : نمک با غلظت ۵/۵ درصد + اسید بوریک ۰/۳ درصد + بوراکس ۰/۴ درصد | $۴\times۱۰^{۵}$ | $۲/۴\times۱۰^{۵}$ | $۲/۱\times۱۰^{۵}$ | $۱/۳\times۱۰^{۵}$ |
| ۸ : نمک با غلظت ۴/۵ درصد + سوربات پتاسیم ۰/۲۶ درصد + نیتریت ۸۰ میلیگرم بر لیتر | $۴\times۱۰^{۵}$ | $۱/۵\times۱۰^{۵}$ | $۱/۲\times۱۰^{۵}$ | $۱/۱\times۱۰^{۴}$ |
| ۹ : نمک با غلظت ۵ درصد + سوربات پتاسیم ۰/۲۶ درصد + نیتریت ۸۰ میلیگرم بر لیتر | $۴\times۱۰^{۵}$ | $۱\times۱۰^{۵}$ | $۱\times۱۰^{۵}$ | $۴/۲\times۱۰^{۴}$ |
| ۱۰ : نمک با غلظت ۵/۵ درصد + سوربات پتاسیم ۰/۲۶ درصد + نیتریت ۸۰ میلیگرم بر لیتر | $۴\times۱۰^{۵}$ | $۶/۴\times۱۰^{۴}$ | $۲\times۱۰^{۴}$ | $۱/۳\times۱۰^{۴}$ |
| ۱۱ : نمک با غلظت ۴/۵ درصد + متیل پارابن ۰/۱ درصد | $۴\times۱۰^{۵}$ | ۰ | ۰ | ۰ |
| ۱۲ : نمک با غلظت ۵ درصد + متیل پارابن ۰/۱ درصد | $۴\times۱۰^{۵}$ | ۰ | ۰ | ۰ |
| ۱۳ : نمک با غلظت ۵/۵ درصد + متیل پارابن ۰/۱ درصد | $۴\times۱۰^{۵}$ | ۰ | ۰ | ۰ |
| ۱۴ : نمک با غلظت ۴/۵ درصد + متیل پارابن ۰/۲ درصد | $۴\times۱۰^{۵}$ | ۰ | ۰ | ۰ |
| ۱۵ : نمک با غلظت ۵ درصد + متیل پارابن ۰/۲ درصد | $۴\times۱۰^{۵}$ | ۰ | ۰ | ۰ |
| ۱۶ : نمک با غلظت ۵/۵ درصد + متیل پارابن ۰/۲ درصد | $۴\times۱۰^{۵}$ | ۰ | ۰ | ۰ |

**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

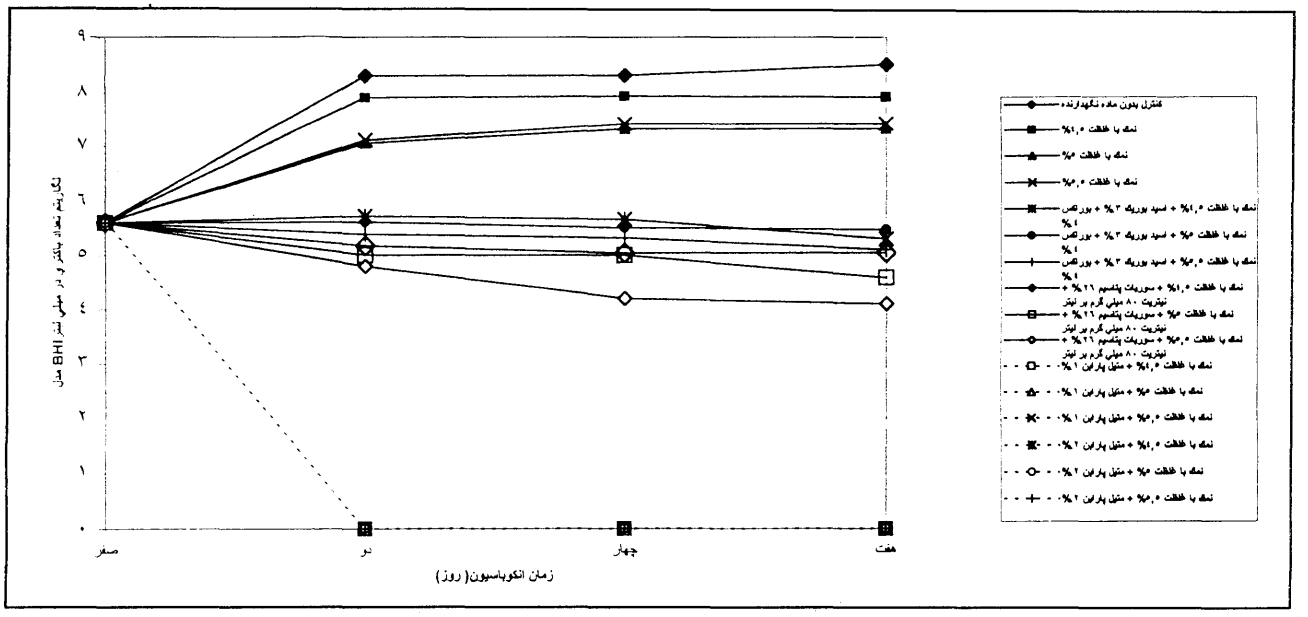
| نوع تیمار | زمان انکوباسیون | | | |
|---|---|---|---|---|
| | صفر | ۲ روز | ۴ روز | ۷ روز |
| ۱ : نمونه کنترل بدون هیچ‌گونه پرزواتیو | $۱/۳\times۱۰^{۵}$ | $۴/۵\times۱۰^{۷}$ | $۸\times۱۰^{۷}$ | $۴\times۱۰^{۸}$ |
| ۲ : نمک با غلظت ۴/۵ درصد | $۱/۳\times۱۰^{۵}$ | $۴/۳\times۱۰^{۶}$ | $۶/۳\times۱۰^{۶}$ | $۶/۷\times۱۰^{۶}$ |
| ۳ : نمک با غلظت ۵ درصد | $۱/۳\times۱۰^{۵}$ | $۳/۴\times۱۰^{۶}$ | $۵/۲\times۱۰^{۶}$ | $۵/۴\times۱۰^{۶}$ |
| ۴ : نمک با غلظت ۵/۵ درصد | $۱/۳\times۱۰^{۵}$ | $۲/۴\times۱۰^{۶}$ | $۲/۷\times۱۰^{۶}$ | $۱/۷\times۱۰^{۶}$ |
| ۵ : نمک با غلظت ۴/۵ درصد + اسید بوریک ۰/۳ درصد + بوراکس ۰/۴ درصد | $۱/۳\times۱۰^{۵}$ | $۲/۶\times۱۰^{۵}$ | $۲\times۱۰^{۵}$ | $۱/۷\times۱۰^{۵}$ |
| ۶ : نمک با غلظت ۵ درصد + اسید بوریک ۰/۳ درصد + بوراکس ۰/۴ درصد | $۱/۳\times۱۰^{۵}$ | $۱/۲\times۱۰^{۵}$ | $۱\times۱۰^{۵}$ | $۱/۲\times۱۰^{۵}$ |
| ۷ : نمک با غلظت ۵/۵ درصد + اسید بوریک ۰/۳ درصد + بوراکس ۰/۴ درصد | $۱/۳\times۱۰^{۵}$ | $۱/۱\times۱۰^{۵}$ | $۱/۱\times۱۰^{۵}$ | $۲/۳\times۱۰^{۵}$ |
| ۸ : نمک با غلظت ۴/۵ درصد + سوربات پتاسیم ۰/۲۶ درصد + نیتریت ۸۰ میلیگرم بر لیتر | $۱/۳\times۱۰^{۵}$ | $۵/۱\times۱۰^{۴}$ | $۵/۲\times۱۰^{۴}$ | $۵/۱\times۱۰^{۴}$ |
| ۹ : نمک با غلظت ۵ درصد + سوربات پتاسیم ۰/۲۶ درصد + نیتریت ۸۰ میلیگرم بر لیتر | $۱/۳\times۱۰^{۵}$ | $۵/۲\times۱۰^{۴}$ | $۵\times۱۰^{۴}$ | $۴/۵\times۱۰^{۴}$ |
| ۱۰ : نمک با غلظت ۵/۵ درصد + سوربات پتاسیم ۰/۲۶ درصد + نیتریت ۸۰ میلیگرم بر لیتر | $۱/۳\times۱۰^{۵}$ | $۴/۵\times۱۰^{۴}$ | $۴/۲\times۱۰^{۴}$ | $۳/۶\times۱۰^{۴}$ |
| ۱۱ : نمک با غلظت ۴/۵ درصد + متیل پارابن ۰/۱ درصد | $۱/۳\times۱۰^{۵}$ | ۰ | ۰ | ۰ |
| ۱۲ : نمک با غلظت ۵ درصد + متیل پارابن ۰/۱ درصد | $۱/۳\times۱۰^{۵}$ | ۰ | ۰ | ۰ |
| ۱۳ : نمک با غلظت ۵/۵ درصد + متیل پارابن ۰/۱ درصد | $۱/۳\times۱۰^{۵}$ | ۰ | ۰ | ۰ |
| ۱۴ : نمک با غلظت ۴/۵ درصد + متیل پارابن ۰/۲ درصد | $۱/۳\times۱۰^{۵}$ | ۰ | ۰ | ۰ |
| ۱۵ : نمک با غلظت ۵ درصد + متیل پارابن ۰/۲ درصد | $۱/۳\times۱۰^{۵}$ | ۰ | ۰ | ۰ |
| ۱۶ : نمک با غلظت ۵/۵ درصد + متیل پارابن ۰/۲ درصد | $۱/۳\times۱۰^{۵}$ | ۰ | ۰ | ۰ |

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 سمی‌بودن نمونه از نظر کلستریدیوم بوتولینوم در فرمولهای ۵ تا ۱۶ همگی منفی بوده و موشهای تزریق شده تلف نگردید.

## بحث

موادی که برای طعم‌دادن و محافظت از فساد به خاویاردان اضافه می‌شود شامل نمک و مواد شیمیایی نگهدارنده شامل اسید بوریک و بوراکس (تترابورات سدیم) می‌باشد. اثرات ضدمیکروبی نمک (به غیر از طعم‌دهی) 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 می‌باشد.

اسید بوریک و بوراکس که در بعضی از کشورها هنوز به‌عنوان مواد نگهدارنده مورد استفاده قرار می‌گیرد در کشورهای اتحادیه اروپا و امریکا ممنوع می‌باشد (۵ و ۲). این ماده به‌صورت پودر در بعضی از مواد غذایی از جمله فرآورده‌های گوشتی




**نمودار ۱** – رفتار اشریشیاکلی تیپ $O_{111}$ متأثر از فرمولاسیونهای مختلف از نظر غلظت نمک و نوع نگهدارنده در محیط BHI مدل.

و خاویار مورد استفاده قرار می‌گیرد. اصولاً بوراکس و اسید بوریک یک ماده ضدمیکروبی بسیار ضعیف بوده و در عین حال به‌عنوان مواد نگهدارنده سالم محسوب نمی‌شوند (۵) و لذا باید از مصرف در مواد غذایی خارج و مواد نگهدارنده مناسب و مجاز و در عین حال با اثر ضدمیکروبی بهتر جایگزین آنها گردد.

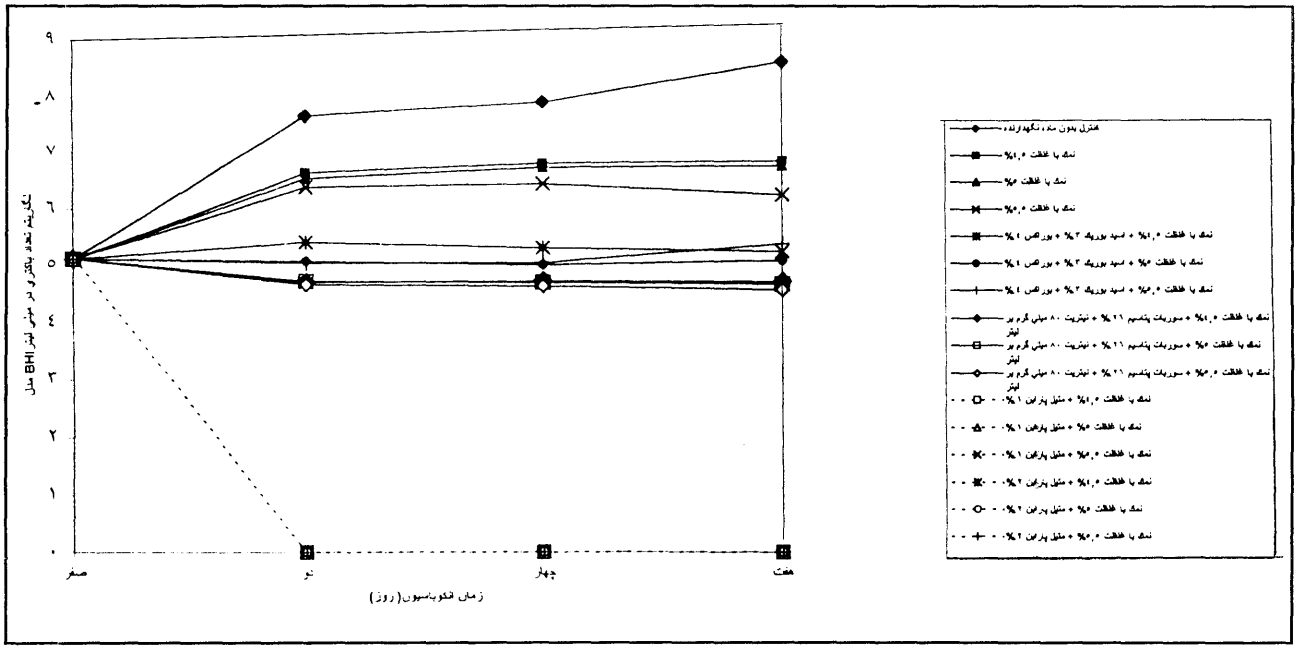
از مواد نگهدارنده جدید که به‌عنوان (Generally Recognized As Safe) GRAS در صنایع غذایی مطرح هستند و برای سلامتی انسان سالم می‌باشند می‌توان اسید سوربیک و املاح آنها، اسید بنزوئیک و املاح و استرهای آنها، پارابن‌ها (استرهای اسید بنزوئیک) و نیتریت (به مقدار محدود) را نام برد. اسید سوربیک و اسید بنزوئیک فقط در pHهای پایین خصوصاً pH ۲/۵ تا ۴ بیشترین اثر ضدمیکروبی خود را بروز می‌دهند، گرچه اسید سوربیک نسبت به اسید بنزوئیک در pHهای بالاتر نیز مؤثر نشان داده است. این دو ماده نگهدارنده بر ضد اغلب باکتریها و قارچها عمل می‌کند ولی همان‌طور که اشاره گردید محدودیت pH در عمل ضدمیکروبی آنها موجود می‌باشد. نیتریتها به‌علت واکنش با آمینها و تولید نیتروزآمین که به‌عنوان مواد سرطانزا شناخته شده‌اند هنوز مورد مصرف قرار می‌گیرند ولی به‌دلیل سرطانزا بودن آن به موش محدودیت مصرف بیشتری وجود دارد. در بین این مواد نگهدارنده متیل پارابن که استر اسید بنزوئیک می‌باشد با دارابودن خواص ضدمیکروبی مشابه اسید بنزوئیک به‌دلیل مزیت مؤثربودن آنها در pHهای بالاتر (حتی بالای pH خنثی) که در اثر استریفیکاسیون گروه کاربوکسیل آنها حاصل می‌گردد و مولکول دیسوسیه نشده آنها در دامنه وسیعی از pH عمل می‌کند برای استفاده در خاویار که pH آن بین ۵ تا ۶ می‌باشد، می‌تواند بسیار مناسب باشد (۱۹، ۱۸، ۱۲، ۷، ۶، ۵).

میکروبهای مختلفی در بهداشت و فساد خاویار دخیل هستند و مطالعه روی تک‌تک آنها در مواد غذایی زمان و امکانات بسیار بیشتری را طلب می‌کند ولی در بین این میکروبها دو باکتری اشریشیاکولای و کلستریدیوم بوتولینوم از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشند. اشریشیاکولای ضمن اینکه یک پاتوژن بالقوه در مواد غذایی محسوب می‌شود و حداقل عامل ۵ نوع عفونت غذایی در انسان می‌باشد، به‌عنوان یک باکتری شاخص آلودگی مواد غذایی از طریق مدفوعی حایز اهمیت بهداشت فراوانی می‌باشد و امکان آلودگی مواد غذایی از جمله خاویار به آن زیاد می‌باشد. باکتری کلستریدیوم بوتولینوم نیز یک باکتری فوق‌العاده بااهمیت در مواد غذایی کنسروی با pH بالای ۴/۶ می‌باشد و اصولاً اولین باکتری که از نظر پتانسیل رشد و تولید توکسین در چنین غذاهایی باید مورد مطالعه قرار گیرد، این باکتری می‌باشد. به‌علاوه 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 توکسین‌زایی (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 هیچ‌کدام از این مطالعات مشابهتی با مطالعه ما نداشته و در واقع این بررسی در نوع خود به‌علت مدل غذایی خاص آن (خاویاردان) منحصر به فرد می‌باشد.

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 می‌شود که در مطالعه فعلی ما در محیط کشت BHI مدل منظور گردیده است و علاوه‌بر آن سه ترکیب نمکی و مواد نگهدارنده دیگر شامل مخلوطی از سوربات پتاسیم (۰/۲۶ درصد) و نیتریت سدیم (۸۰ppm) توأم با غلظتهای مختلف نمک (۴/۵ تا ۵/۵ درصد)، متیل پارابن (۰/۱ درصد) توأم با غلظتهای مختلف نمک و متیل پارابن (۰/۲ درصد) توأم با غلظتهای مختلف نمک مورد ارزیابی قرار گرفته است.

نتایج مربوط به اینوکولاسیون اشریشیاکولای با غلظت $10^5$/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 گرمخانه‌گذاری در ۳۰ درجه سانتیگراد اضافه می‌شود. با اضافه کردن مواد نگهدارنده (اسید بوریک و بوراکس) و همچنین مخلوط سوربات و نیتریت رشد باکتری متوقف شده ولی باکتری از بین نمی‌رود. زمانی که متیل پارابن (۰/۱ تا ۰/۲ درصد) به‌عنوان نگهدارنده مورد استفاده قرار گرفت کلیه جمعیت اینوکوله‌شده منهدم گردید. در یک مطالعه میکروبی که Mrochkov 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




**نمودار ۲** – رفتار کلستریدیوم بوتولینوم متأثر از فرمولاسیونهای مختلف از نظر غلظت نمک و نوع نگهدارنده در محیط BHI مدل.

۸۰۰ کلیفرم (باکتریهای E. coli و مشابه آن) بود در حالی‌که با اضافه‌شدن بنزوات کلیفرم جدا نگردید (۱۳). با توجه به اینکه متیل پارابن دارای اثرات ضدمیکروبی 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 رضویلر 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 مونوسایتوجنز 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 $10^5$ لیستریا در میلی‌لیتر BHI مدل متوقف و قسمت اعظم جمعیت، آن منهدم گردید (۱۵). لذا نتیجه این دو مطالعه تأثیر ضدمیکروبی متیل پارابن را روی باکتریهای گرم منفی و مثبت هر دو نشان می‌دهد.

نتایج مربوط به اینوکولاسیون کلستریدیوم بوتولینوم با غلظت $10^5$< 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 اضافه‌شدن 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 نیتریت) نه تنها رشد باکتری را متوقف می‌کند بلکه حدود ۰/۵ لوگ از جمعیت اسپورهای اینوکوله‌شده باکتری منهدم گردید و بالاخره نگهدارنده دیگر (متیل پارابن به غلظت ۰/۱ تا ۰/۲ درصد) همانند مورد اشریشیاکولای تمامی جمعیت اینوکوله شده کلستریدیوم بوتولینوم را از بین برد. Hauschild و Hilsheimer در سال ۱۹۷۹ در مطالعه‌ای گزارش نمودند که اینوکولاسیون اسپورهای کلستریدیوم 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 ۳/۹۵ درصد pH بالاتر از ۵/۲ و نیز نمک از ۴/۶۷ درصد و pH بالاتر از ۵/۶ اتفاق افتاد. در حالی‌که 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 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 کلستریدیوم 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 $CO_2$ 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 $CO_2$ تولید توکسین صورت نگرفت (۳). در مطالعه دیگری که توسط Ikawa و Genigeorgis در سال ۱۹۸۷ صورت گرفت گزارش گردید که اینوکولاسیون مخلوطی از اسپورهای کلستریدیوم بوتولینوم غیر پروتئولیتیک (تیپهای E، B و F) در محیط BHI مدل و نگهداری شده در دو نوع اتمسفر خلأ و ۱۰۰ درصد $CO_2$ در حرارتهای ۴ تا ۳۰ درجه منتهی به رشد و تولید توکسین در حرارتهای 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 ضدمیکروبی نیز بسیار ضعیف عمل می‌کند و تنها به‌عنوان یک باکتریواستاتیک از رشد باکتری جلوگیری می‌کند در حالی‌که نتایج حاصل از استفاده متیل پارابن که قادر به بروز خواص ضدمیکروبی قوی خود حتی در pHهای بالا (خنثی) نیز می‌باشد و در عین حال جزیی از مواد نگهدارنده مجاز محسوب می‌شود بسیار قابل توجه بوده و خواص ضدمیکروبی 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.

## تشکر و قدردانی

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

## منابع

۱. رضویلر، و. (۱۳۷۸) : میکروبهای 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- chemique- 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. Frazeier, W.C. and Westhoff, D.C. (1988): Food Microbiology. Mc-Graw-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 occuring 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 Walfare 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. Mrochkov, 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, pH, temperature and storage time in a model broth It. J. of Food Microbiol. 40: 149-157.

16. Sebald, 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]**

[1]*Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran - Iran.* [2]*Fishery 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 incuding (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 $O_{111}$ ells) using $>10^5$ spores or cells per ml of broth and stared 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 bacteriocidic activity. Increasing of salt from 4.5 to 5.5 concentration slightly icreased the antimicrobil activity of the additive combination. Therefore methyl paraben which is a GRAS (Generally Recognized As Safe) preservative, and has a strog antimicrobial activity at high pH values, was selected for use in caviar.

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