Archive of SID

پاتوبیولوژی مقایسه‌ای، علمی ـ پژوهشی، سال هجدهم، بهار، شماره ۱، ۱۴۰۰، ۳۴۷۶-۳۴۶۷

بررسی اثر سویه پروبیوتیک لاکتوکوکوس لاکتیس تولید کننده نایسین بر کاهش تعداد عوامل میکروبی بیماری‌زا

فهیمه فیروز بخت[۱]، ودود رضویلر*[۱]، سید امیرعلی انوار[۱]

چکیده

هدف از این مطالعه ارزیابی اثر سویه لاکتوکوکوس لاکتیس (ل. لاکتیس) تولید کننده نایسین بر روی رشد و بقای باکتری های پاتوژن در محیط کشت و گوشت مرغ خام در دمای ۱۲ درجه سانتیگراد بوده است. بدین منظور، تعداد ۱۰۸×۱/۵ ل. لاکتیس به محیط کشت و قطعات گوشت مرغ حاوی ۱۰۵×۱/۵ از هر سویه پاتوژن تلقیح شد. تعداد باکتری های مورد مطالعه، مقادیر پروتئین و pH در گروه‌های کنترل و مواجهه در روزهای صفر، سه، پنج و هفت روز پس از تلقیح اندازه‌گیری شد و نیز وجود ژن نایسین در ل. لاکتیس مورد بررسی قرار گرفت. داده ها نشان داد که ل. لاکتیس اثرات ممانعت کنندگی قابل توجهی ($p\leq۰/۰۵$) بر روی پاتوژنهای مورد مطالعه در BHI مایع و گوشت مرغ داشته است. pH گوشت مرغ تلقیح شده با ل. لاکتیس طی ۷ روز نگهداری در ۱۲ درجه سانتی‌گراد به طور معنی‌داری ($p\leq۰/۰۵$) افزایش پیدا کرد و از ۹/۱±۵/۰ در روز صفر به ۰/۲±۶/۹ در روز ۷ رسید. مقدار متوسط پروتئین در گوشت مرغ تلقیح شده با ل. لاکتیس در ۱۲ درجه سانتی‌گراد از ۱/۰۵±۱۷/۹۳ در روز صفر به ۲۳/۲۵±۱۴/۱ در روز هفت رسید و این کاهش مقدار پروتئین از نظر آماری معنی دار بود ($p\leq۰/۰۵$). با توجه به فراگیر شدن غذاهای پروبیوتیک و بروز پتانسیل مثبت این نوع فراورده های غذایی، مطالعه حاضر نشان داد که ل. لاکتیسهای تولید کننده نایسین میتوانند با جلوگیری از رشد سایر جمعیت‌های باکتریایی باعث حفظ تازگی مرغ شده و از فساد آن در اثر افزایش جمعیت باکتری های پاتوژن جلوگیری نمایند.

واژگان کلیدی: نایسین، لاکتوکوکوس لاکتیس، گوشت مرغ، پروبیوتیک.

تاریخ دریافت:: ۱۴۰۰/۲/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۷/۴

مقدمه

امروزه مشخص شده است که گوشت مرغ به علت داشتن پروتئین با کیفیت بالا و اسیدهای آمینه ضروری مورد نیاز بدن انسان، یکی از عمده ترین منابع گوشتی در تمام دنیاست(۱). اما این محصول مغذی نه تنها به فساد حساس است بلکه در گسترش بیماری های با منشاء غذایی نیز دخیل است. به طور کلی گوشت مرغ به عنوان یک غذای ارزان، سالم و دارای پروتئین بالا و چربی کم شناخته شده و علاوه بر آن برخلاف گوشت گاو و خوک محدودیتی برای مصرف ندارد همچنین فرآیند تولید آن نیز نسبت به سایر منابع گوشتی آسان‌تر است(۲). این ویژگی ها و عوامل دیگر گوشت مرغ را تا حد زیادی محبوب ترین محصول غذایی در سراسر جهان کرده است. با توجه به ارتباط ذاتی گوشت مرغ با پاتوژن های غذایی مانند گونه های سالمونلا و کمپیلوباکتر نگرانی های روز افزون در مورد ایمنی مرغ ها وجود دارد(۳). مطالعات مختلف نشان داده اند که آلودگی متقاطع در طی فرآوری گوشت مرغ و متعاقب آن افزایش تعداد باکتری در محصول نهایی ممکن است اتفاق بیافتد. تاکنون بیش از ۳۰ جنس میکروارگانیسم شامل هفت پاتوژن کمپیلوباکتر، سالمونلا، یرسینیا انتروکولیتیکا، کلستریدیوم پرفرینژنس، لیستریا مونوسایتوژنز، استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلای O157:H7 در ارتباط با آلودگی محصولات مرغ شناسایی شده اند(٤). امروزه در طی مطالعات متعدد مشخص شده است که لاشه طیور به عنوان یک منبع مهم آلودگی به پاتوژن‌های سالمونلا، اشرشیاکلای و استافیلوکوکوس اورئوس مطرح است و تعیین فراوانی و میزان آلودگی باکتری در این فرآورده معیاری برای ارزیابی وضعیت بهداشتی کشتارگاه و تعیین مخاطرات بهداشتی گوشت مرغ برای مصرف کننده محسوب می‌شود و هم مسئولان بهداشتی را در تدوین و اعمال برنامه های کنترلی و پیشگیرانه و در نهایت کاهش یا حذف آلودگی باکتریایی یاری می‌رساند(۵). در ارتباط با کیفیت میکروبی اولیه گوشت مرغ در فرایند فراوری، استفاده از مواد بازدارنده بیولوژیک از جمله باکتری‌های اسید لاکتیک به‌جای استفاده از افزودنی‌های شیمیایی حائز اهمیت است(٦).

۱- گروه بهداشت مواد غذایی واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی تهران ایران(vrazavi@ut.ac.ir)

www.SID.ir

Archive of SID

مطالعات اثبات کرده اند که باکتری های اسید لاکتیک (LAB) دارای اثر ممانعت کنندگی علیه باکتری های پاتوژن و ارگانیسم های عامل فساد هستند. این اثر در نتیجه تولید اسید، پراکسید هیدروژن و باکتریوسین اتفاق می‌افتد. اثر ممانعت کنندگی LAB در غذاهای تخمیری مثل ماست و سوسیس تخمیری در طول رشد آن دیده می‌شود، ولی در غذاهای غیر تخمیری در شرایط نگه‌داری در شرایط یخچالی اتفاق می‌افتد. هرچند رشد LAB در گوشت تازه مطلوب نیست اما افزودن این باکتری‌ها به گوشت در شرایط یخچالی به علت تولید مواد ممانعت کننده توسط آنها بسیار مفید است. بعضی LAB ها در شرایط یخچالی رشد نمی‌کنند اما مواد ممانعت کننده تولید می‌کنند، بنابراین می‌توانند جایگزین مواد ضد میکروبی باشند که فقط یک بار اثر می-کنند و مضرات جبران ناپذیری به همراه دارند(۷).

لاکتوکوکوس لاکتیس یک باکتری اسید لاکتیک است که به طور پروبیوتیک در صنایع غذایی کاربرد دارد. برخی سویه‌های جدا شده از این باکتری توانایی تولید نایسین را دارند(۸). نایسین یک باکتریوسین با خاصیت ضد باکتریایی علیه چندین میکروارگانیسم و به خصوص باکتری های گرم مثبت است(۹). مطالعات اثبات نموده است که استفاده از سویه تولید کننده نایسین در صنعت غذایی دارای فواید ایمنی بخش است چرا که این پروبیوتیک باعث ممانعت از آلودگی مواد غذایی به وسیله پاتوژن‌ها میگردد و از سوی دیگر به بافت انسانی آسیب نمی‌رساند(۱۰). امروزه استفاده از پروبیوتیک‌ها به عنوان یک روش کارآمد برای بهبود سلامت روده و جایگزینی برای آنتی‌بیوتیک‌ها به شمار میرود. البته پروبیوتیک‌ها، مخصوصا سویه های LAB، به طور گسترده ای در صنایع غذایی برای تخمیر استفاده می‌شوند، اما از سوی متخصصان بهداشت به دلیل تاثیرات بالقوه آن، توجه زیادی را به عنوان نگه‌دارنده غذایی به خود جلب کرده اند. مطالعه حاضر بر آن بوده است تا در شرایط آزمایشگاهی به بررسی اثرات سویه های پروبیوتیک لاکتوکوکوس لاکتیس تولید کننده نایسین بر کاهش تعداد عوامل میکروبی بیماری‌زای گوشت مرغ بپردازد.

مواد و روش‌کار

تهیه و کشت سویه های میکروبی

میکروارگانیسم های مورد مطالعه در این تحقیق شامل: *Lactococcus lactis* subsp. Lactis ATCC 11454، *Salmonella enterica* ATCC1306، *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 و *E. Coli* ATCC25929 از سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران تهیه شدند. سپس کشت‌های لیوفیلیزه پاتوژن‌ها در Brain Heart Infusion (BHI) Broth مایع و کشت لیوفیلیزه لاکتوکوکوس لاکتیس در محیط MRS مایع به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. برای تهیه دوز تلقیح باکتری‌های مورد مطالعه، از روش سنجش جذب نوری به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد و از باکتری های گرمخانه‌گذاری شده برای تهیه سوسپانسیون با جذب نوری معادل نیم مک فارلند ($۱/۵\times۱۰^{۸}$) استفاده شد (۱۱).

اثر پروبیوتیک بر روی نمودار رشد باکتری‌ها در محیط کشت BHI مایع

سویه *لاکتوکوکوس لاکتیس* نیسین مثبت ATCC 11454 با دوز $۱/۵\times۱۰^{۸}$ CFU/ml به محیط BHI مایع حاوی $۱/۵ \times ۱۰^{۵}$ CFU/ml پاتوژن تلقیح شد و از محیط فاقد پاتوژن به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. لوله‌های مورد مطالعه تلقیح شده در دمای ۱۲ درجه سانتی‌گراد گرمخانه-گذاری شد و در روزهای صفر، سه، پنج و هفت پس از تلقیح، جمعیت *لاکتوکوکوس لاکتیس* و پاتوژن‌ها پس از رقت سازی، کشت و شمارش *استافیلوکوکوس اورئوس* در محیط برد پارکر آگار، *اشرشیاکلای* در محیط VRBA (Violet Red Bile Agar) ، *سالمونلا اینتریتیدیس* در محیط

www.SID.ir

Archive of SID

سالمونلا شیگلا آگار و *لاکتوکوکوس لاکتیس* در محیط MRS آگار انجام می‌شد(۱۲).

اثر پروبیوتیک بر روی نمودار رشد باکتری‌ها در گوشت مرغ

گوشت سینه مرغ بدون آنتی‌بیوتیک از کشتارگاه بلافاصله پس از کشتار در شرایط نگه‌داری در سرما تهیه گردید. قبل از استفاده از گوشت مرغ برای مطالعه، ابتدا نمونه‌ها از نظر وجود پاتوژن و نیز شمارش کلی میکروب‌ها مورد آزمایش قرار گرفت و مرغ عاری از پاتوژن و با شمارش کلی باکتری‌ها با تعداد زیر ۱۰۰۰ برای مطالعه انتخاب شد. تعداد ۱۲۸ نمونه برش‌های سینه مرغ بدون پوست توسط چاقوی استریل زیر هود استریل لامینار به بخش‌های کوچکتر به وزن تقریبی ۱۰ گرم تقسیم شده و نمونه‌ها در ظروف استریل جداگانه قرار گرفتند تا با سویه ها درگیر شوند. نمونه ها در ٤ گروه شامل ۱:گروه کنترل پروبیوتیک: نمونه تلقیح شده با $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ *لاکتوکوکوس لاکتیس*، گروه ۲: گروه کنترل پاتوژن ها: نمونه تلقیح شده با $۱/۵\times ۱۰^{۵}$ از هر یک از پاتوژن های مورد مطالعه، ۳:گروه مواجهه پروبیوتیک و پاتوژن: شامل نمونه‌های تلقیح شده با *لاکتوکوکوس لاکتیس* و $۱/۵\times ۱۰^{۵}$ از هر یک از پاتوژن ها). و گروه ٤:گروه بدون تلقیح به منظور شمارش LAB بومی قرار گرفتند. قبل از تلقیح به گوشت هر دو سویه پاتوژن و حمایتی بعد از یک کشت شبانه و شستشو در بافر PBS استریل با pH=7/2 حالت تعلیق در آمدند. تلقیح با پیپت انجام شد و بعد از اطمینان از تماس خوب باکتریها به سطح گوشت نمونه‌ها در ۱۲ درجه سانتیگراد قرار گرفت. در این مطالعه از آن جایی که رشد بهینه لاکتوکوکوس لاکتیس در ۱۰ تا ٤٥ درجه گزارش شده است و با توجه به دمای مراکز بسته بندی در ایران که ۱۲ درجه سانتیگراد است و نیز با توجه به هدف کاربردی این مطالعه که استفاده از کشت حمایتی روی گوشت مرغ از مبداء مراکز بسته‌بندی می‌باشد دمای ۱۲ درجه سانتی‌گراد به عنوان دمایی که امکان رشد بهتر به *لاکتوکوکوس لاکتیس* میدهد انتخاب گردید. رشد و بقای *لاکتوکوکوس لاکتیس* و پاتوژن ها در روزهای صفر، ۳، ۵ و ۷ روز پس از تلقیح و بعد از رقت‌سازی و کشت و شمارش در محیط‌های جامد اختصاصی هر میکروارگانیسم بررسی شد.

اندازه گیری تغییرات pH و پروتئین

به منظور بررسی اثرات فساد احتمالی *لاکتوکوکوس لاکتیس* روی گوشت مرغ نمونه‌های گوشت مرغ در طول انکوباسیون با کشت *لاکتوکوکوس لاکتیس* از نظر تغییرات pH و پروتئین خام آنالیز شدند. تعیین میزان پروتئین با روش کلدال و مقدارش به صورت (6.25×N) اندازه‌گیری شد. برای اندازه گیری pH ۱۰ میلی گرم نمونه در ٤۰ میلی‌لیتر آب مقطر به مدت ۱ دقیقه در بلندر وارینگ مخلوط شده و pH محلول توسط pH متر دیجیتال (Woon-socket, RI, USA) اندازه‌گیری می‌شد(۱۳).

بررسی مولکولی

برای تائید حضور ژن نایسین در لاکتوکوکوس لاکتیس، استخراج DNA به وسیله کیت High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Germany) و طبق دستورالعمل سازنده صورت گرفت. سکانس حفاظت شده‌ی ژن هدف *لاکتوکوکوس لاکتیس* در سایت NCBI تعیین شد. پرایمرها با استفاده از سکانس شناسایی شده طراحی شدند (جدول ۱). سپس واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf, Germany) انجام شد. سکانس هدف به کمک روش PCR با شرایط زیر و در ۳۵ چرخه تکثیر شد. مراحل شامل ۹۵ درجه برای ۳۰ دقیقه، یک دقیقه در٥٦ درجه، یک دقیقه در ۷۲ درجه و سنتز پایانی در ۷۲ درجه برای ۵ دقیقه. تفکیک قطعات DNA توسط الکتروفورز بر روی ژل آگاروز دو درصد و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم برماید انجام شد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱: پرایمرهای اختصاصی استفاده شده در این مطالعه برای ژن nisin

سایز	توالی پرایمر $(5' \rightarrow 3')$	محصول	ژن
۱۵۵ جفت باز	F: TTCGAAGAAAGATTCAGGTGC R: TTGATTTGGTTATTTGCTTACGTG	Nisin Structural Gene	nisin A

نتایج

نتایج اثر ضد میکروبی پروبیوتیک در محیط کشت

مطالعه اثر لاکتوکوکوس لاکتیس روی منحنی رشد باکتری-های *اشرشیاکلای* O157:H7، *سالمونلا اینتریتیدیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در ۱۲ درجه سانتی‌گراد در محیط BHI مایع نشان داد که تعداد *اشرشیاکلای* در گروه مواجه با پروبیوتیک از روز صفر تا هفت به طرز معنی داری کاهش یافته بود ($p<0.05$). اختلاف آماری معنی‌دار در تعداد سالمونلا و *استافیلوکوکوس اورئوس* در گروه‌های کنترل و مواجه با لاکتوکوکوس در روزهای سه و هفت نشان دهنده اثر ممانعت کنندگی لاکتوکوکوس بر روی این پاتوژن‌ها بود ($p<0.05$). در حالی که در سایر روزها اختلاف آماری معنی داری مشاهده نشد (نگاره ۱).

نتایج اثر ضد میکروبی لاکتوکوکوس لاکتیس بر گوشت مرغ

مطالعه اثر *لاکتوکوکوس لاکتیس* روی منحنی رشد باکتری-های پاتوژن استاندارد در ۱۲ درجه سانتی‌گراد در گوشت مرغ، به روش کشت سطحی انجام شد و نشان داد که کاهش معنی‌دار تعداد اشرشیاکلای در مواجه با لاکتوکوکوس در روزهای پنج و هفت روز پس از تلقیح در مقایسه با گروه کنترل دیده شد ($p<0.05$). علی رغم افزایش رشد معنی‌دار لاکتوکوکوس در گروه مواجه با اشرشیاکلای از روز صفر تا پنج تعداد لاکتوکوکوس در این گروه در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌دار نشان می‌دهد که ناشی از اثر رشد رقابتی میکروارگانیسم ها است. علاوه بر این داده ها نشان داد که سالمونلا در گروه مواجه با لاکتوکوکوس طی هفت

نگاره ۱: نتایج مواجهه پروبیوتیک لاکتوکوکوس لاکتیس با پاتوژنهای استاندارد اشرشیاکلای O157:H7 (بالا)، سالمونلا اینتریتیدیس (وسط) و استافیلوکوکوس اورئوس (پایین) در ۱۲ درجه سانتیگراد در محیط BHI مایع.

www.SID.ir

Archive of SID

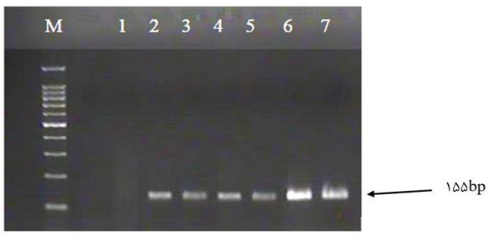
روز نگه‌داری به طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد با این حال کاهش معنی‌دار تعداد سالمونلا در گروه مواجه با لاکتوکوکوس در روزهای پنج و هفت نسبت به گروه کنترل مشاهده گردید ($p<0.05$). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت، سالمونلا در شرایط رشد رقابتی با *لاکتوکوکوس لاکتیس* در گوشت مرغ، از توانایی رشد کمتری برخوردار بود. علاوه بر این کاهش معنی‌دار تعداد استافیلوکوکوس در گروه مواجه با لاکتوکوکوس نسبت به گروه کنترل طی هفت روز مشاهده شد ($p<0.05$) (نگاره ۲).

بررسی اثرات شیمیایی لاکتوکوکوس لاکتیس روی گوشت مرغ

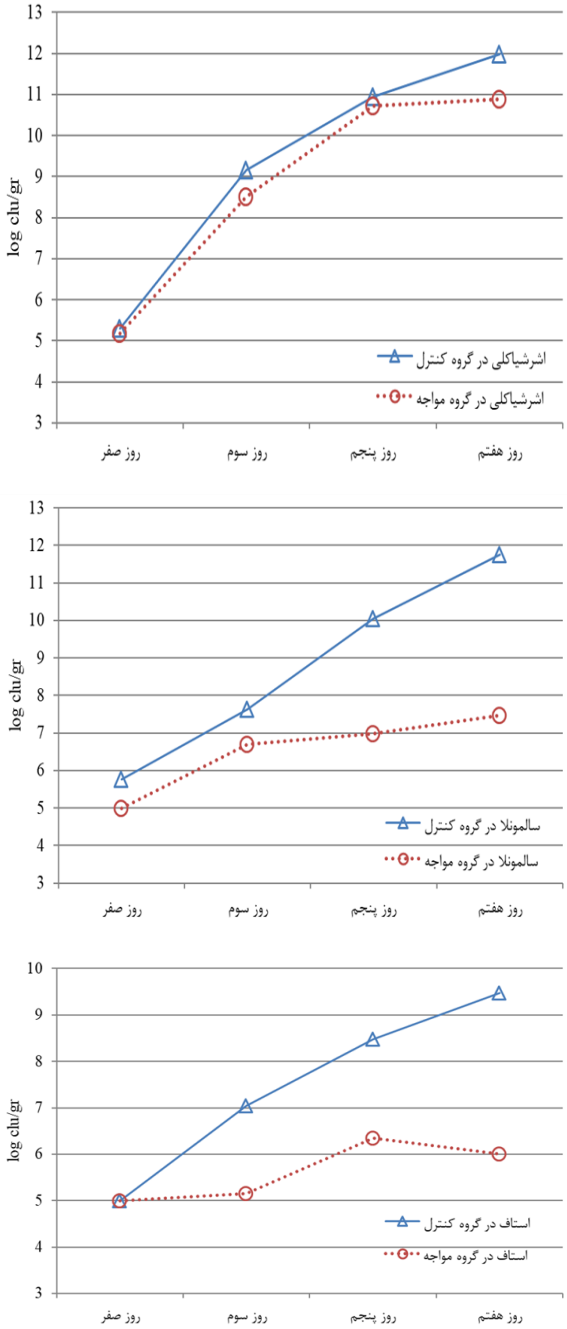
مقادیر pH گوشت مرغ در این مطالعه در اثر پروبیوتیک بررسی شده است. با توجه به نتایج pH گوشت تلقیح شده با *لاکتوکوکوس لاکتیس* طی ۷ روز نگهداری در گروه کنترل *لاکتوکوکوس لاکتیس* در ۱۲ درجه سانتیگراد از ۰/۱±۵/۹ در شروع دوره نگه‌داری بود که به‌طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد ($P \leq 0.05$) و در پایان دوره نگهداری به ۰/۲ ±۶/۹ رسید.

نتایج بررسی مولکولی

علیرغم اینکه در زمان خرید باکتری *Lactococcus lactis* subsp. Lactis ATCC 11454 سویه نایسین مثبت خریداری شده بود، وجود این ژن به روش PCR معمولی (conventional PCR) مورد تائید قرار گرفت (نگاره ۳).



نگاره ۳- تصویر ژل الکتروفورز محصولات PCR ۶ سویه *لاکتوکوکوس لاکتیس* که از نظر حضور ژن nisin A مورد بررسی قرار گرفته اند. (ستون M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون ۲-۷ : محصول PCR ژن nisin A، ستون ۱: کنترل منفی)



نگاره ۲: منحنی رشد *اشرشیا کلای* (بالا)، سالمونلا (وسط) و *استافیلوکوکوس اورئوس* (پایین) در گروه کنترل و مواجه در دمای ۱۲ درجه سانتی‌گراد در گوشت مرغ

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲: مقادیر pH گوشت مرغ در طول نگهداری در دمای ۱۲ درجه سانتی‌گراد

گروه	مقادیر pH روز های نگهداری شده			
	صفر	سه	پنج	هفت
کنترل لاکتوکوکوس در ۱۲C°	5.9 ± 0.1 c	6.1 ± 0.1 c	6.5 ± 0.2 b	6.9 ± 0.2 a

حروف کوچک غیر مشابه در هر ردیف نشان دهنده اختلاف آماری معنی دار در حد P ≤۰/۰۵ می باشند.

جدول ۳: محتوی پروتئین در نمونه‌های گوشت مرغ طی ۷ روز نگه‌داری

گروه	مقدار پروتئین (٪) در روزهای نگهداری شده			
	صفر	سه	پنج	هفت
کنترل لاکتوکوکوس در ۱۲C°	1.05 a±17.93	1.72 b±16.89	1.19 c±15.41	1.25 d±14.29

حروف کوچک غیر مشابه در هر ردیف نشان دهنده اختلاف آماری معنی دار در حد P ≤۰/۰۵ می باشند.

مقدار متوسط پروتئین در گوشت مرغ در ۱۲ درجه سانتی‌گراد در گروه کنترل *لاکتوکوکوس لاکتیس* در ابتدای دوره نگه‌داری ۱/۰۵ ± ۱۷/۹۳ بود و در انتهای دوره نگه داری به ۱/۲۵ ± ۱٤/۲۹رسید. این کاهش مقدار پروتئین از نظر آماری معنی‌دار بود ($P \leq 0.05$).

بحث

گوشت مرغ از اصلی ترین مواد غذایی مورد مصرف انسان است و مسمومیت با آن از مهمترین مواد مسمومیت غذایی به شمار میرود که سالیانه هزاران نفر را در بیمارستان بستری مینماید(١٤). castellano و همکاران در سال ۲۰۱۹ در مطالعه ای مروری در زمینه تحقیق حاضر اعلام کردند که بیشتر میکروارگانیسم های مورد مطالعه برای جایگزینی مواد نگهدارنده لاکتوکوک ، انتروکوک ، پدیوکوک و لاکتوباسیلوس هستند که باکتریوسین هایی مانند نیسین ، انتروسین ، پدیوسین ، پنتوسین و ساکاسین تولید می کنند و بسیاری از آنها می توانند در حفظ و نگهداری مواد غذایی استفاده شوند(۱۵). در این مطالعه، ظرفیت لاکتوکوکوس لاکتیس ATCC11454 تولیدکننده باکتریوسین نایسین در ممانعت از رشد اشرشیاکلای O157:H7، سالمونلا اینتریتیدیس، استافیلوکوکوس اورئوس در BHI مایع و گوشت مرغ در دمای پایین ۱۲ درجه سانتی‌گراد مطالعه شد. از خصوصیات یک پروبیوتیک مناسب جهت استفاده در غذا این است که پروبیوتیک برای فعالیت ممانعت‌کنندگی به خوبی با سوبسترای غذایی آداپته شود. بنابراین این باکتری‌ها باید توانایی بقا و ترجیحا رشد در دمای پایین و بیان ژن‌های ضد میکروبی را داشته باشند. در مطالعه ما تعداد میکروارگانیسم‌های گرم منفی و به طور بخصوص سالمونلا اینتریتیدیس در گوشت مرغ در مواجه با لاکتوکوکوس لاکتیس، کاهش رشد معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل، نشان داد. کاهش سالمونلا اینتریتیدیس و اشرشیاکلای در گوشت مرغ نسبت به BHI مایع را می‌توان با توجه به اثرات رشد رقابتی میکروارگانیسم‌ها و تاثیر pH و سایر عوامل تاثیرگذار بر روی فعالیت باکتریوسین‌ها توجیه کرد. این

www.SID.ir

Archive of SID

فرضیه وجود دارد که حضور عوامل مختلف در گوشت از جمله شلاته‌کننده‌ها می‌تواند باعث اثرگذاری باکتریوسین بر روی رشد باکتری‌های گرم منفی باشد. هرچند تاثیر گذاری عوامل شلاته کننده بر روی میکروارگانیسم های گرم منفی بستگی به حساسیت سویه و نوع باکتریوسین و هم چنین pH محیط دارد. در این مطالعه تاثیر کاهشی مشاهده شده بر روی اشرشیاکلای نسبت به سالمونلا کمتر است. این نتایج مشابه نتایج مشاهده شده توسط Castellano و همکاران است. این محققان در مطالعه ای اثر ممانعت کنندگی باکتری های LAB بر روی میکروارگانیسم‌های گرم منفی در دو دمای ٦ و ٢١ درجه سانتی‌گراد و در محیط TSB مشاهده کردند افزودن باکتریوسین‌های تولید شده توسط لاکتوباسیلوس کورواتوس یعنی لاکتوسین همراه با EDTA و سدیم لاکتات اثر ممانعت کنندگی بیشتری روی اشرشیاکلای در مقایسه با ترکیب عوامل شلاته کننده و نایسین تولید شده توسط لاکتوکوکوس لاکتیس داشت. علاوه بر این اثر گذاری باکتری‌های LAB روی اشرشیاکلای بستگی زیادی به حساسیت سویه و pH محیط دارد به طوریکه اشرشیاکلای مقاومت غیر عادی به شرایط اسیدی دارد. از سوی دیگر طیف فعالیت نایسین علیه گرم منفی‌ها همراه با آنزیم‌های food grade از جمله لیزوزیم یا سیستم لاکتوپراکسیداز یا همراه با تیمار فیزیکی افزایش پیدا می‌کند (١٦) .مطالعات متعدد نشان داده است که تولید باکتریوسین‌ها در محیط‌های آزمایشگاهی نشان‌دهنده اثر بخشی آن‌ها در غذا نیست چرا که گوشت و محصولات گوشتی سیستم‌های پیچیده با تعدادی از فاکتورهای تاثیرگذار روی رشد باکتری‌ها و تولید متابولیت‌های باکتری‌ها هستند. در مطالعه castellano و همکاران نیز نتیجه گرفته شده است که فاکتورهای متعددی از جمله مواد مغذی، خواص محیط کشت، رقابت تغذیه‌ای در محیط کشت، تجمع اسید لاکتیک، کاهش pH و اثر حمایتی محیط کشت روی باکتری‌های پاتوژن، بر روی فعالیت نایسین تاثیر گذارند. در مطالعه ما نیز کاهش قابل ملاحظه‌ای در تعداد استافیلوکوکوس اورئوس در BHI مایع از روز سه تا پنج، در مواجه با لاکتوکوکوس لاکتیس در مقایسه با گروه کنترل، مشاهد شد. این نتایج مشابه نتایج مشاهده شده توسط میراندا و همکاران در سال ٢٠١٨ می باشد (١٧) که کاهش تعداد لیستریا مونوسیتوژنز را در گروه مواجه با لاکتوکوکوس لاکتیس در BHI مشاهده کردند و نایسین تولید شده را مسئول کاهش تعداد دانستند. در گوشت مرغ نیز کاهش تعداد این پاتوژن از روز صفر تا هفت از نظر آماری معنی دار است. با توجه به کاهش رشد مشاهده شده می‌توان نتیجه گرفت که احتمالا این اثر کاهشی در نتیجه تولید و اثرگذاری باکتریوسین است بهرحال در ماتریکس پیچیده گوشت ظرفیت باکتری‌کشی باکتریوسین‌ها از طریق واکنش با پروتئین‌ها و لیپیدها و پروتئولیز تحت تاثیر قرار می‌گیرد. بیان ژن‌های مقاومت در لیستریا مونوسیتوژنز در حضور لاکتوکوکوس لاکتیس تولید کننده نایسین در مطالعه میراندا و همکاران در سال ٢٠١٨ نوسانات کمتری را در BHI نسبت به شیر نشان داد که نشان دهنده بقای بهتر لیستریا در شیر می‌باشد. علی رغم اینکه تولید نایسین در شیر بیشتر است بنابراین بقای استافیلوکوکوس اورئوس در مرغ ممکن است به علت اثر حمایتی ترکیبات محیط کشت از قبیل چربی، پروتئین ها و کربوهیدرات‌ها و یا بیان ژن‌های مقاومت در آن باشد.

در مطالعه میراندا و همکاران در سال ٢٠١٨ بالاترین مقدار کاهش pH در BHI مایع بین ساعت ١٢ تا ١٥ در ٢٠ درجه سانتی‌گراد به اندازه ١/٣١ و در ٦ تا ٩ ساعت در ٣٠ درجه سانتی‌گراد به مقدار ١/٦٣ اتفاق افتاد. مقدار pH پس از ٢٤ ساعت به ٥/٦٨ در ٢٠ درجه سانتی‌گراد و ٥/٣٩ در ٣٠ درجه سانتی‌گراد رسید. تغییرات pH شیر با دامنه تغییرات ٠/٢٢ و ٠/٧٧ پس از ٢٤ ساعت به pH نهایی ٦/٤٦ و ٥/٩٢

www.SID.ir

Archive of SID

به ترتیب در ۲۰ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد رسید(۱۷). در مطالعه ما مقدار متوسط pH در نمونه‌های گوشت تلقیح شده با لاکتوکوکوس در ۱۲ درجه سانتی‌گراد به طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد و از ۰/۱ ± ۵/۹ در شروع دوره نگه‌داری به۰/۲ ± ٦/۹ رسید. این مسئله در کنار کاهش معنی دار مقدار پروتئین از ۱/۰۵ ± ۱۷/۹۳ به ۱/۲۵ ± ۱٤/۲۹ طی هفت روز نگهداری نشان دهنده این است که احتمالا لاکتوکوکوس ابتدا با مصرف ذخایر کربوهیدرات باعث ایجاد شرایط اسیدی شده ولی طی دوره نگه‌داری همزمان با اتمام ذخایر کربوهیدراتی توسط لاکتوکوکوس، احتمالا باکتری‌های بومی موجود در گوشت شامل میکروارگانیسم های گرم منفی و باکتری های اسید لاکتیک، پروتئین را لیز کرده و تولید ترکیباتی می‌کنند که pH را افزایش می‌دهد. Pothakosو همکاران در سال ۲۰۱۵ اعلام کردند که LAB ها اگر چه دارای نقش های مثبت هستند اما میتوانند با ترشح متابولیت های تخریبگر موجب فساد گوشت شوند (۱۸). در مطالعه حاضر نیز نشان داده شد که ممکن است لاکتوکوکوس موجب ایجاد شرایط اسیدی شود که باید مورد بررسی های بیشتر قرار گیرد. با توجه به فراگیر شدن غذاهای پروبیوتیک و بروز پتانسیل مثبت این نوع فراورده های غذایی، مطالعه حاضر نشان داد که لاکتوکوکوس های تولید کننده نایسین میتوانند تا زمان مشخصی باعث حفظ تازگی مرغ شده و از فساد آن در اثر افزایش جمعیت باکتری های پاتوژن جلوگیری نمایند

فهرست منابع

1. Sharma J, Kumar D, Hussain S, Pathak A, Shukla M, Kumar VP, et al. Prevalence, antimicrobial resistance and virulence genes characterization of nontyphoidal Salmonella isolated from retail chicken meat shops in Northern India. Food Control. 2019;102:104-11.
2. Maung AT, Mohammadi TN, Nakashima S, Liu P, Masuda Y, Honjoh K-i, et al. Antimicrobial resistance profiles of Listeria monocytogenes isolated from chicken meat in Fukuoka, Japan. Int J Food Microbiol. 2019;304:49-57.
3. Saud B, Paudel G, Khichaju S, Bajracharya D, Dhungana G, Awasthi MS, et al. Multidrug-resistant bacteria from raw meat of buffalo and chicken, Nepal. Vet Med Int. 2019;2019.
4. Casella T, Nogueira MCL, Saras E, Haenni M, Madec J-Y. High prevalence of ESBLs in retail chicken meat despite reduced use of antimicrobials in chicken production, France. Int J Food Microbiol. 2017;257:271-5.
5. Rahman M, Rahman A, Islam M, Alam M. Antimicrobial resistance of Escherichia coli isolated from milk, beef and chicken meat in Bangladesh. Bangladesh Journal of Veterinary Medicine. 2017;15(2):141-6.
6. Abraham S, O'Dea M, Sahibzada S, Hewson K, Pavic A, Veltman T, et al. Escherichia coli and Salmonella spp. isolated from Australian meat chickens remain susceptible to critically important antimicrobial agents. PLoS One. 2019;14(10):e0224281.
7. Kačániová M, Terentjeva M, Kántor A, Tokár M, Puchalski C, Ivanišová E, editors. Antimicrobial effect of sage (Salvia officinalis L.) and rosemary (Rosmarinus officinalis L.) essential oils on microbiota of chicken breast. Proceedings of the Latvian Academy of Sciences; 2017: De Gruyter Poland.
8. Braïek OB, Smaoui S, Ennouri K, Morandi S, Cremonesi P, Hani K, et al. RAPD-PCR characterisation of two Enterococcus lactis strains and their potential on Listeria monocytogenes growth behaviour in stored chicken breast meats: Generalised linear mixed-effects approaches. LWT. 2019;99:244-53.
9. Akbar A, Sadiq MB, Ali I, Anwar M, Muhammad N, Muhammad J, et al.

www.SID.ir

Archive of SID

Lactococcus lactis subsp. lactis isolated from fermented milk products and its antimicrobial potential. CyTA-Journal of Food. 2019;17(1):214-20.
10. Juturu V, Wu JC. Microbial production of bacteriocins: Latest research development and applications. Biotechnology advances. 2018;36(8):2187-200.
11. Melgar-Lalanne G, Rivera-Espinoza Y, Méndez AIR, Hernández-Sánchez H. In vitro evaluation of the probiotic potential of halotolerant lactobacilli isolated from a ripened tropical Mexican cheese. Probiotics and antimicrobial proteins. 2013;5(4):239-51.
12. Todorov S, Botes M, Danova S, Dicks L. Probiotic properties of Lactococcus lactis ssp. lactis HV219, isolated from human vaginal secretions. Journal of Applied Microbiology. 2007;103(3):629-39.
13. Haghshenas B, Abdullah N, Nami Y, Radiah D, Rosli R, Khosroushahi AY. Different effects of two newly-isolated probiotic Lactobacillus plantarum 15HN and Lactococcus lactis subsp. Lactis 44Lac strains from traditional dairy products on cancer cell lines. Anaerobe. 2014;30:51-9.
14. Mills S, Ross RP, Hill C. Bacteriocins and bacteriophage; a narrow-minded approach to food and gut microbiology. FEMS Microbiol Rev. 2017;41(Supp_1):S129-S53.
15. da Costa RJ, Voloski FL, Mondadori RG, Duval EH, Fiorentini ÂM. Preservation of meat products with bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from meat. J Food Qual. 2019;2019.
16. Castellano P, Belfiore C, Fadda S, Vignolo G. A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. Meat Science. 2008;79(3):483-99.
17. Miranda RO, Campos-Galvão MEM, Nero LA. Expression of genes associated with stress conditions by Listeria monocytogenes in interaction with nisin producer Lactococcus lactis. Food Research International. 2018;105:897-904.
18. Pothakos V, Devlieghere F, Villani F, Björkroth J, Ercolini D. Lactic acid bacteria and their controversial role in fresh meat spoilage. Meat science. 2015;109:66-74.

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir