جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی لاکتوباسیلوس‌ها از گوشت گاو و ارزیابی اثر ضدباکتریایی آن‌ها بر لیستریا مونوسیتوژنز

سرور خلیلی صدقیانی*[1]،حسین تاجیک [2]، جواد علی اکبرلو[3]

تاریخ دریافت 1394/10/22 تاریخ پذیرش 1394/12/25

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: با افزایش مصرف غذاهای آماده نگهداری شده در یخچال به‌منظور حفظ خصوصیات حسی، فرآوری‌های کمتری بر روی آن‌ها انجام می‌گیرد، که این می‌تواند منجر به ظهور خطرات میکروبی شود. در بین باکتری‌های با منشأ غذایی *لیستریا مونوسیتوژنز* ازنظر سلامت عمومی حائز اهمیت می‌باشد و منجر به بیماری و حتی مرگ در افراد مسن، باردار و دارای ضعف سیستم ایمنی می‌شود. باکتری‌های اسیدلاکتیک به دلیل اینکه برای انسان بی‌خطر هستند به‌عنوان کنترل زیستی در مواد غذایی مطرح‌اند. هدف این مطالعه استفاده از لاکتوباسیل در کنترل رشد *لیستریامونوسیتوژنز* می‌باشد.

مواد و روش کار: 65 نمونه گوشت از کشتارگاه ارومیه تهیه شد. سویه‌های جداشده ابتدا با روش‌های فنوتیپی(مورفولوژی، رنگ‌آمیزی گرم و تست کاتالاز) مورد ارزیابی قرار گرفتند. به‌منظور شناسایی دقیق‌تر از تست تخمیر قندها و روش مولکولی نیز استفاده گردید. سپس خاصیت ضدباکتریایی آن‌ها برعلیه *لیستریا مونوسیتوژنز* با دو روش چاهک و نقطه‌گذاری مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: 6 سویه از باکتری‌های اسیدلاکتیک به روش مولکولی شناسایی شدند،که در تست‌های ضدباکتریایی اثر خوبی در کنترل رشد *لیستریا مونوسیتوژنز* نشان دادند.

بحث و نتیجه‌گیری: لاکتوباسیل‌ها به‌طور طبیعی در اغلب مواد غذایی وجود دارند و از زمان‌های قدیم به‌عنوان نگه‌دارنده‌های طبیعی در مواد غذایی مطرح بودند. نتایج نشان داد که می‌توان از لاکتوباسیل‌ها به‌عنوان یک عامل زیستی در کنترل رشد *لیستریا مونوسیتوژنز* استفاده نمود.

کلیدواژه‌ها: گوشت، لاکتوباسیل، PCR،خاصیت ضدباکتریایی، لیستریا مونوسیتوژنز

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و هفتم، شماره دوم، ص 139-130، اردیبهشت 1395

آدرس مکاتبه: ارومیه، کیلومتر 11 جاده سرو، پردیس نازلو، دانشکده دامپزشکی، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، تلفن: 09143491911 صندوق پستی: 571531177

Email: sururkhalili@yahoo.com

مقدمه

در بین باکتری‌های با منشأ غذایی *لیستریا مونوسیتوژنز* مسئول لیستریوز می‌باشد که منجر به بیماری‌های متعدد و یا مرگ بخصوص در افراد مسن، زنان باردار، نوزادان و افراد با ضعف سیستم ایمنی می‌شود(1). کنترل *لیستریا مونوسیتوژنز*، به علت اینکه می‌تواند در گستره وسیعی از محیط‌ها زنده باقی بماند به‌عنوان یک چالش مطرح است. همین مسئله می‌تواند مشکل مقابله با حضور و رشد *لیستریا مونوسیتوزنز* را در مواد غذایی مخصوصاً در غذاهایی که کمترین فراوری را طی می‌کنند و غذاهای آماده مصرف توجیه کند(2). کنترل این خطرات میکروبیولوژیکی و توسعه ابزارهای جدید برای کنترل زیستی، توجه به استفاده از باکتری‌های اسیدلاکتیک را در بیست سال اخیر به خود جلب کرده است(3). مطالعات متعددی نشان داده‌اند که باکتری‌های اسیدلاکتیک می‌توانند رشد *لیستریا مونوسیتوژنز* را در گوشت و غذاهای دریایی کاهش دهد و سایر عوامل پاتوژن با منشأ غذایی (*اشریشیاکلی*، *سودوموناس آئروژنز*، *سالمونلا تیفی موریوم*، *سالمونلا انتریتیدیس* و *استافیلوکوکوس*

[1]دانشجوی دکتری تخصصی بهداشت مواد غذایی،دانشکده دامپزشکی،دانشگاه ارومیه (نویسنده مسئول)

[2]استاد گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی،دانشکده دامپزشکی،دانشگاه ارومیه

[3]دانشیارگروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی،دانشکده دامپزشکی،دانشگاه ارومیه

اورئوس) را مهار کند(4). باکتری‌های اسیدلاکتیک یک گروه بزرگی از باکتری‌های گرم مثبت غیر اسپورزا، کاتالاز و اکسیداز منفی را تشکیل می‌دهند که اسیدلاکتیک را به‌عنوان اصلی‌ترین متابولیت تخمیر کربوهیدرات‌ها تولید می‌کنند. باکتری‌های اسیدلاکتیک عموماً میکروآئروفیل بوده و به شرایط پیچیده‌ی غذایی به‌ویژه برای آمینواسیدها و ویتامین‌ها نیاز دارند(5). گونه‌های *لاکتوباسیلوس* نقش عمده‌ای را در فراورده‌های تخمیری گوشتی و لبنی در صنعت غذا و در جنبه‌های درمانی سلامت انسان ایفا می‌کنند(6 و7). همچنین به دلیل نقش مهم آن‌ها در مهار رشد باکتری‌های عامل فساد مواد غذایی توجه بیشتری را از جانب صنعت غذایی به خود جلب کرده‌اند(۸،۹،۱۰،۱۱). بیش از 150 گونه از *لاکتوباسیل‌ها* اخیراً شناسایی‌شده‌اند و کاربردهای بسیاری ازجمله به‌عنوان کشت استارتر در صنعت گوشت و لبنیات پیداکرده‌اند که تعدادی از این لاکتوباسیل‌ها به دلیل توانایی‌های متابولیکی‌شان مواد فعال و معطر تولید می‌کنند و همچنین بافت محصولات تخمیری را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهند(12و13). گونه‌های لاکتوباسیلوس به دلیل حضورشان در غذا و نقش آن‌ها در مکانیسم دفاع سیستم ایمنی لوله گوارشی ازلحاظ مصرف غذایی مانعی ندارند(14). به همین دلیل لاکتوباسیل‌ها ازلحاظ سلامت ایمن (GRAS)[1] در نظر گرفته می‌شوند و به‌طور گسترده بیولوژی مولکولی آن‌ها به‌منظور بهبود ویژگی‌های سودمند آن‌ها موردمطالعه قرار می‌گیرد(15و16). تاکنون مطالعات زیادی در مورد جداسازی و شناسایی گونه‌های مختلف باکتری‌های اسیدلاکتیک از فراورده‌های مختلف لبنی و گوشتی و ارزیابی خواص مفید این باکتری‌ها ازجمله پروبیوتیک بودن و دارا بودن خاصیت ضدباکتریایی علیه پاتوژن‌های با منشأ غذایی صورت گرفته است. ازجمله می‌توان به جداسازی229 گونه از لاکتوباسیل‌ها را از گوشت قرمز و 9 گونه را از فراورده‌های گوشتی در سال 1987 توسط Schallinger و lucke، بر اساس تخمیر قندها و سایر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی اشاره نمود(17). امروزه تقاضای مصرف‌کنندگان به مصرف غذاهای ایمن، پایدار با کمترین میزان استفاده از افزودنی‌ها و نگه‌دارنده‌ها روز به روز افزایش یافته است. فن‌های زیادی به‌منظور حفظ خصوصیات حسی گوشت خام در طول مدت نگهداری(به‌ویژه رنگ و طعم) و همچنین به‌منظور تأخیر انداختن رشد میکروارگانیسم‌های عامل فساد بدون اینکه ویژگی‌های محصول تازه را تحت تأثیر قرار دهد اعمال می‌شود(18،19). محققان بر روی اثرات" روش‌های حرارتی ملایم" به‌خصوص به استفاده از کشت‌های حفاظتی تأکید دارند(19). نگه‌دارندگی زیستی شامل تلقیح گونه‌های خاصی از میکروب‌ها به محصولات غذایی می‌باشد که به‌طور مستقیم و یا با تولید متابولیت‌های خاصی رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و عامل فساد را مهار می‌کنند(20). باکتری‌های اسیدلاکتیک پتانسیل اصلی را به‌عنوان کشت حفاظتی با تاریخچه طولانی در مورد بی‌خطر بودن ایفا می‌کنند، همچنین آن‌ها به‌عنوان میکروفلور غالب در فراورده‌های گوشتی، سبزیجات، شیر و محصولات تازه در طول مدت نگهداری می‌باشند(21). توانایی آنتاگونیستی باکتری‌های اسیدلاکتیک را می‌توان به رقابت تغذیه‌ای و همچنین از طریق تولید ترکیبات ضد میکروبی مثل باکتریوسین‌ها، روترین، اسیدهای آلی (مخصوصاً اسید استیک و اسیدلاکتیک)، دی اکسیدکربن، دی استیل، اتانول، هیدروژن پراکسید و آنزیم‌ها توسط باکتری‌های اسیدلاکتیک نسبت داد. برای اینکه بتوان باکتری‌های اسیدلاکتیک را به‌عنوان کشت حفاظتی در گوشت خام استفاده نمود باید این باکتری‌ها بتوانند در درجه حرارت‌های یخچالی (4-0 درجه سانتی‌گراد) زنده بمانند و با بار میکروبی بالای خود گوشت رقابت و رشد عوامل بیماری‌زا و فساد را مهار کنند. علاوه بر این موارد خصوصیات حسی گوشت را تغییر ندهند. مطالعات زیادی نه‌تنها موارد فوق را تأیید کرده‌اند، بلکه فعالیت مثبت آنزیم‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک را در بهبود طعم، تردی و کیفیت تغذیه‌ای گوشت را در طول مدت نگهداری گوشت در شرایط مختلف (خلأ، اتمسفر تغییریافته) بیان نموده‌اند(22). شناسایی لاکتوباسیل‌های جداشده به‌وسیله روش‌های فنوتیپی مشکل می‌باشد، همچنین نیازمند مشخص نمودن ویژگی‌های باکتری‌ها، علاوه بر تست‌های تخمیری می‌باشد(23). زمان‌بر بودن روش‌های کلاسیک استفاده‌شده برای دسته‌بندی لاکتوباسیل‌ها بر اساس معیارهای بیوشیمیایی و فیلوژنیک همیشه مطابق با ژنتیک گونه‌ها نبوده و متمایزکننده دقیق سویه‌ها در یک‌گونه یکسان نمی‌باشد(24). به دلیل حساسیت و صحت نتایج روش‌های ژنتیکی، امروزه به‌منظور شناسایی باکتری‌های لاکتیک اسید توجه بیشتر به سمت روش‌های ژنتیکی نسبت به روش‌های فنوتیپی صورت می‌گیرد(25و26). توسعه روش‌های شناسایی با اساس PCR امکانات تازه‌ای را به‌منظور شناسایی سریع و واضح لاکتوباسیل‌ها فراهم نموده است(27). هدف از این پژوهش جداسازی و شناسایی لاکتوباسیل‌ها از گوشت گاو و ارزیابی خواص ضدباکتریایی آن‌ها می‌باشد.

[1]. Generally recognized as safe

مواد و روش کار

65 نمونه گوشت گاو در سه ماه تابستان سال 1394 از کشتارگاه ارومیه تهیه گردید و در شرایط کاملاً استریل و در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل شد. 25 گرم از هر نمونه تحت شرایط استریل به زیب پک‌های استریل حاوی 225 میلی‌لیتر MRSبراث (شرکت Merck آلمان) اضافه گردید و در داخل استومکر به مدت 2دقیقه با دور 260 rpm به‌طور کامل مخلوط گردید و به مدت 6 ساعت در دمای اتاق انکوبه گردید. سپس رقت سازی در محلول MRS براث تهیه گردید و بر روی محیط کشت های MRS آگار(حاوی 25میلی‌گرم بر میلی‌لیتر معرف بروموکروزول گرین) کشت داده شد. پلیت‌ها به مدت 48 ساعت در دمای 30 درجه سانتی‌گراد در شرایط میکروآئروفیل انکوبه گردیدند (28). پس از انکوباسیون سه نوع کلنی در پلیت‌ها مشاهده شد: 1.کلنی‌های سفیدرنگ محدب و ریز 2.کلنی های سبز روشن بزرگ و 3.کلنی‌های سبز تیره. کلنی‌ها به روش رنگ‌آمیزی گرم رنگ‌آمیزی شدند و زیر میکرو سکوپ موردبرر سی قرار گرفتند. سپس تست کاتالاز بر روی هر یک از کلنی های انتخاب‌شده انجام گردید، بدین صورت که چند قطره از محلول هیدروژن پراکسید 3درصد بر روی کلنی‌ها ریخته می‌شد. کلنی‌های که تست کاتالاز آن‌ها منفی بود، انتخاب می‌شدند(29). کلنی‌های انتخاب‌شده خالص‌سازی شدند و در دمای 70 – درجه سانتی‌گراد در محیط MRSبراث حاوی 30درصد(حجمی/ حجمی) گلیسرول نگهداری شدند.

آزمایشات مولکولی:

استخراج DNA:

با استفاده از کیت استخراج DNA و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده سیناژن DNA^{TM} انجام گردید. به‌این‌ترتیب که ابتدا 1/5 سی‌سی از کشت 24 ساعته MRS براث باکتری‌ها به میکروتیوب‌های 2 میلی‌لیتر انتقال یافت و به مدت 10 دقیقه با دور 7500g سانتریفوژ گردید. به رسوب باکتری100میکرولیتر از بافر پروتئیناز K و 5 میکرولیتر از پروتئیناز K اضافه گردید و به مدت نیم ساعت در دمای 55 درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس 400میکرولیتر از محلول لیز کننده به هر یک از نمونه‌ها اضافه شد و به مدت20-15 ثانیه ورتکس گردید. در مرحله بعد 300میکرولیتر محلول رسوب‌دهنده اضافه و به مدت 5 ثانیه ورتکس شده و با دور g 12000 به مدت 10 دقیقه سانتریفوژ گردید و سپس مایع رویی دور ریخته شد. یک میلی‌لیتر بافر شستشو دهنده به رسوب اضافه گردید و به مدت 5-3 ثانیه ورتکس شده و با دور g 12000 به مدت 5 دقیقه سانتریفوژ گردید. 50 میکرولیتر از بافر حل‌کننده اضافه شد و در دمای 65 درجه سانتی‌گراد به مدت 5 دقیقه انکوبه گردید. در مرحله آخر با دور 12000g به مدت 30 ثانیه سانتریفوژ گردید. کیفیتDNA استخراج‌شده با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل آگارز1/ درصد موردبررسی و تأیید قرار گرفت(7).

تکثیر قطعه ژن16SrRNA:

در این مطالعه از پرایمرهای طراحی‌شده توسط دوبرنت و همکارانش استفاده گردید(7)

(5́-CTC AAA ACT AAA CAA AGT TTC-3́́)
(5́-CTT GTA CAC ACC GCC CGT CA-3́)

بعد از آماده‌سازی پرایمرها با اساس دستورالعمل شرکت سازنده(تکاپوزیست) ، برنامه PCR مطابق مراحل زیر انجام گردید.

25 میکرولیتر مخلوط واکنش PCR شامل: 1 میکرولیتر از DNA باکتری‌های استخراج‌شده و 24 میکرو لیتر از محلول Master Mix تهیه‌شده(1 میکرولیترdNTP ، 2/5 میکرولیترBuffer Complete، 1 میکرولیترF. Primer ، 1 میکرو لیترR. Primer ، 0/3 میکرولیتر Taq DNA پلی مراز و 18/2 میکرولیتر آب مقطر دو بار استریل بود(7).

واکنش زنجیره‌ای پلی مراز با مراحل دناتوراسیون اولیه در 95 درجه سانتی‌گراد به مدت 5 دقیقه، به دنبال آن دناتوراسیون در 95 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 ثانیه، مرحله اتصال پرایمر در 55 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 ثانیه و بسط در 72 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 ثانیه و سرانجام یک مرحله بسط نهایی در 72 درجه سانتی‌گراد به مدت 7 دقیقه انجام شد(7).

تفکیک قطعات تکثیر یافته:

به‌منظور تفکیک قطعات تکثیر یافته از ژل آگارز 1/5 درصد استفاده شد. ژل مذکور توسط سایبر گرین رنگ‌آمیزی گردید. سپس نمونه‌های تکثیرشده به نسبت 4 به 1 با بافر بارگذاری مخلوط و در چاهک‌های ژل آگارز بارگذاری شدند. پس از اتمام الکتروفورز، نوارهای تکثیر یافته DNA در همه نمونه‌ها به‌صورت تک نوار و با اندازه تقریبی 220-208 جفت نوکلئوتید و با غلظت‌های مناسب با استفاده از نور UVمشاهده و عکس‌برداری شد(7).

تست تخمیر قندها:

بعد از جداسازی باکتری‌ها به‌منظور تشخیص گونه‌های لاکتو باسیل‌ها، تست تخمیر قندها انجام گردید. در این آزمایش از محیط کشت MRS براث واجد قند موردنظر، معرف فنل رد و لوله دورهام استفاده شد. پس از تلقیح باکتری به مدت 24 ساعت در 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه شد، بعد از طی دوره انکوباسیون تغییر

رنگ محیط از قرمز به زرد و تولید گاز نشـــان‌دهنده مثبت بودن تخمیر قند مربوطه بود(30).

آزمایشات میکروبی:

انتشار در چاهک:

فعالیت ضد باکتریایی لاکتوباسیل‌ها به روش چن و همکارانش با تغییرات جزئی انجام گرفت(31). کشت شبانه باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* با غلظت 10^6 CFU/ml به میزان100 میکرولیتر بر روی محیط BHI آگار پخش گردید، چاهک‌هایی به فطر 6 میلی‌متر بر روی محیط کشت ایجاد گردید و 30 میکرولیتر از مایع رویی کشت شبانه لاکتوباسیل‌ها فاقد سلول (سانتریفوژ شده با دور 6000 rpm به مدت 10 دقیقه) در هر چاهک ریخته شد. سپس به مدت 72-48 ساعت در درجه حرارت 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند . قطر هاله‌های شفاف ایجادشده اطراف چاهک‌ها با استفاده از کولیس اندازه گردید.

روش نقطه‌گذاری:

این تست بر اساس کارهای فلمینگ و همکارانش با اندکی تغییر انجام گردید. بدین‌صورت که 100 میکرولیتر از کشت شبانه *لیستریا مونوسیتوژنز* بر روی محیط کشت BHI آگار پخش گردید سپس مقدار 10 میکرولیتر از لاکتوباسیل‌های کشت داده‌شده در MRS براث به روش نقطه‌گذاری کشت داده شدند. بعد از 72-48 ساعت انکوبه گذاری قطر منطقه مهاری با استفاده از کولیس اندازه‌گیری شد(32).

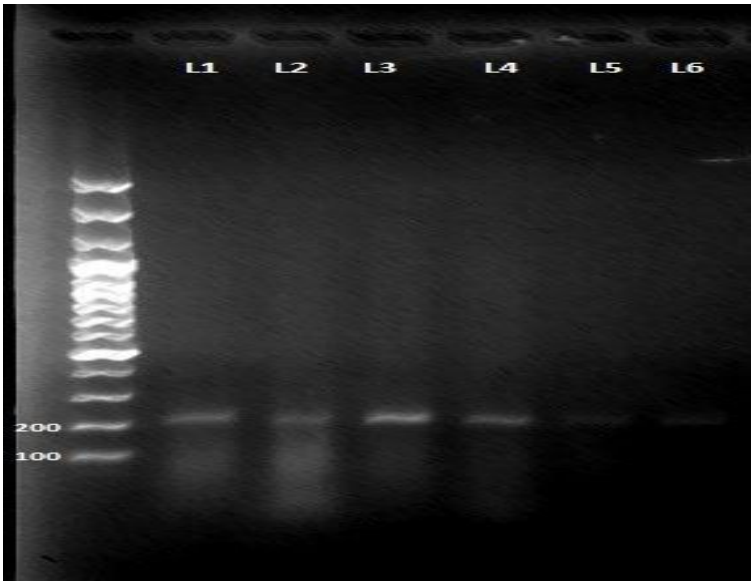
یافته‌ها

بر اساس نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش ، از 65 نمونه گوشت گاو در مرحله اول 21 نمونه با توجه به مورفولوژی کلنی‌ها، رنگ‌آمیزی گرم و تست کاتالاز به‌عنوان گونه‌های لاکتوباسیلوس انتخاب شدند و در ادامه از این 21 نمونه، با روش مولکولی تعداد6 نمونه مورد تأیید نهایی قرار گرفتند و درنهایت به‌منظور تشخیص گونه‌ها از الگوی تخمیری قندهای لاکتوباسیل‌ها استفاده گردید.

تصویر شماره 1 الکتروفورز محصولات تکثیری توالی 16SrRNA را نشان می‌دهد که در این تحقیق 6 گونه لاکتوباسیل از گوشت گاو جداسازی گردید.

جدول شماره 1 نتایج حاصل از تست تخمیر قند سویه‌های جداشده را نشان می‌دهد. بر طبق جداول استاندارد تست تخمیر قندها توسط گونه‌های لاکتوباسیل نمونه‌های L1 وL2 به الگوی تخمیری *لاکتوباسیلوس کازئی* و نمونه‌های L4,L6,L5 به الگوی تخمیری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و نمونه L3 به *لاکتوباسلوس اسیدوفیلوس* شباهت دارند.

جدول شماره 2 نتایج خاصیت ضدباکتریایی لاکتوباسیل‌های جداشده از گوشت گاو علیه پاتوژن *لیستریا مونوسیتوژنز* و دو آنتی‌بیوتیک سفالکسین و اریترومایسین به روش چاهک را به‌صورت قطر هاله مهاری برحسب میلی‌متر نشان می‌دهد.



شکل (۱): الکترفورز محصولات تکثیری توالی‌های ژن 16SrRNA برای سویه‌های لاکتوباسیل

ستون اول:DNA Ladder ستون سوم: نمونه 2(L_2) ستون پنجم: نمونه 4 (L_4) ستون هفتم: نمونه 6(L_6)

ستون دوم: نمونه 1 (L_1) ستون چهارم: نمونه 3 (L_3) ستون ششم: نمونه 5(L_5)

جدول (۱): نتایج تست تخمیر قند

نمونه‌ها	زایلوز	نره هالوز	ساکارز	سوربیتول	سالیسین	رامنوز	رافینوز	ملیبیوز	مانوز	مانیتول	مالتوز	لاکتوز	گلوکز	فروکتوز	سلوبیوز	آرابینوز	ارگانیسم احتمالی
L_1,L_2	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	*لاکتوباسیلوس کازئی*
L_4,L_5,L_6	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	*لاکتوباسیلوس پلانتاروم*
L_3	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*

جدول (۲): قطر هاله ممانعت از رشد پاتوژن *لیستریا مونوسیتوژنز* توسط سویه‌های لاکتوباسیل برحسب میلی‌متر به روش انتشار در چاهک

قطر هاله مهاری	لاکتوباسیل
10/71	L_1
10/19	L_2
12/12	L_3
13/44	L_4
10/79	L_5
12/36	L_6
20/6	Cephalexin
23/2	Erythromycin

جدول (۳): قطر هاله ممانعت از رشد پاتوژن *لیستریا مونوسیتوژنز* توسط سویه‌های لاکتوباسیل برحسب میلی‌متر به روش نقطه‌گذاری

قطر هاله مهاری	لاکتوباسیل
8/14	L_1
7/3	L_2
7/79	L_3
7/15	L_4
8/5	L_5
8/82	L_6

بحث و نتیجه‌گیری

امروزه باکتری‌های اسیدلاکتیک در صنایع غذایی و سلامت انسان موردتوجه بسیاری از محققان قرار گرفته است. شناسایی باکتری‌های اسیدلاکتیک با استفاده از روش‌های کلاسیک شامل روش‌های بیوشیمیایی و مورفولوژی نمی‌تواند برای شناسایی دقیق گونه‌ها بکار رود، به همین دلیل امروز شناسایی مولکولی در کنار روش‌های سنتی استفاده می‌گردد. روش‌های مولکولی زیادی ازجمله PCR برای شناسایی باکتری‌های اسیدلاکتیک استفاده می‌شود. در مطالعه انجام‌شده در مرحله اول 21 نمونه بر اساس شکل کلنی‌ها، رنگ‌آمیزی گرم و تست کاتالاز انتخاب شدند و در مرحله بعد 6 گونه از لاکتوباسیل‌ها با روش PCRمورد تأیید نهایی قرار گرفتند. بر طبق نتایج تست‌های ضدباکتریایی لاکتوباسیل‌های جداشده از گوشت گاو دارای اثر مهاری بر روی رشد پاتوژن *لیستریا مونوسیتوژنز* می‌باشد. این پاتوژن یکی از مشکلات اساسی در صنایع مواد غذایی بخصوص

مواد غذایی نگهداری شده در یخچال می‌باشد که نقش مهمی در سلامت عمومی ایفا می‌کند(33).

در سال 1987 Schallingerو lucke، 229 گونه از لاکتوباسیل‌ها را از گوشت قرمز و 9 گونه را از فراورده‌های گوشتی بر اساس تخمیر قندها و سایر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی جداسازی کردند(17). در مطالعه‌ای که توسط آنا و همکارانش بر روی فعالیت ضد باکتریایی لاکتیک اسید باکتری‌های جداسازی شده از پنیر گولکا در سال 2012 صورت گرفت دارای خاصیت ضد باکتریایی علیه پاتوژن *لیستریا مونوسیتوژنز* بود که با نتایج حاصل از مطالعه حاضر هماهنگی دارد(34). در مطالعه دیگری که توسط آنا و همکارانش در سال 2006 صورت گرفت نشان دادند که باکتری‌های اسیدلاکتیک جداشده از سالامی ایتالیایی دارای فعالیت ضدباکتریایی علیه *لیستریا مونوسیتوژنز* می‌باشند(35). همچنین کاستلانو و همکارانش در سال 2008 باکتریوسین‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک را به‌عنوان کشت‌های حفاظتی در محصولات گوشت تازه در آرژانتین استفاده کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که باکتریوسین‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک نقش مهمی در کنترل میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و عامل فساد مثل *لیستریا اینوکوا*، *بروکوتریکس ترموسفاکتا* دارند(36).Petros و همکارانش در 2009 خصوصیات حفاظتی باکتری‌های اسیدلاکتیک و استفاده آن‌ها در گوشت خام مرغ علیه *لیستریا مونوسیتوژنز و سالمونلا انتریدیس* بررسی کردند. در این مطالعه 635 باکتری اسیدلاکتیک با منشأ غذایی به‌منظور توانایی کشت حفاظتی در غذاها مورد ارزیابی قرار گرفتند. از بین این باکتری‌ها *Enterococcus faecium PCD71* و *Lactobacillus fermentum ACA-DC179* به‌عنوان کشت حفاظتی در گوشت مرغ استفاده شدند و کاهش قابل‌توجهی در تعداد این پاتوژن‌ها مشاهده گردید(37). در سال 2014، Thelma و همکاران نیز مهار *اشیرشیاکی* O157: H7 در اسفناج به‌وسیله‌ی مواد ضدمیکروبی تولیدشده توسط باکتری‌های اسیدلاکتیک را بررسی کردند، آن‌ها برگ‌های اسفناجی که پاتوژن‌های مذکور و باکتری‌های اسیدلاکتیک را به آن‌ها تلقیح کرده بودند، را به مدت 12 روز در دمای 7 درجه سانتی‌گراد نگهداری کردند و نشان دادند که مواد ضدمیکروبی تولیدی توسط باکتری‌های اسیدلاکتیک به میزان چشمگیری رشد *اشیرشیاکی* O157: H7 و *سالمونلا انتریتیکا* را مهار می‌کنند(38). مطالعات دیگری نیز اخیراً در مورد مهار پاتوژن‌ها توسط لاکتوباسیل‌ها انجام شده است. در سال 2016 Malheiros و همکارانش اثر مهار رشد *لیستریا مونوسیتوژنز* را در محیط آزمایشگاهی و مدل غذایی (شیر بز) توسط باکتریوسین‌های تولیدشده *Lactobacillus sakei* بررسی کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که باکتریوسین‌های تولیدشده توسط این گونه از لاکتوباسیل‌ها توانایی کاهش رشد پاتوژن را هم در محیط آزمایشگاهی و هم در مدل غذایی را دارا می‌باشد(39).

Quinto و همکارانش در سال 2016 اثر رقابتی رشد *Lactobacillus sakei* MN را بر روی رشد *Listeria monocytogenes* Scott A در مدل گوشت ارزیابی کردند. یافته‌های آن‌ها نشان داد *Lactobacillus sakei* MN یکی از گونه-های تولیدکننده باکتریوسین لاکتوباسیل‌ها، توانایی کنترل رشد *لیستریا مونوسیتوژنز* را دارا می‌باشد(40). در مطالعه دیگری که توسطMartinez و همکارانش در 2015 بر روی باکتریوسین‌های تولیدشده توسط *Lactobacillus sakei subsp. sakei 2a* علیه رشد *لیستریا مونوسیتوژنز* در پنیر انجام شد نتایج آن‌ها نشان داد که باکتریوسین‌های تولیدشده توسط گونه *لاکتوباسیلوس ساکائی* میزان رشد *لیستریا مونوسیتوژنز* را در طول مدت نگهداری 28 روزه پنیر در دو درجه حرارت نگهداری (4و15 درجه سانتی‌گراد) به‌طور قابل‌توجهی در مقایسه با گروه کنترل کاهش داده است(41).

بر اساس یافته‌های این پژوهش و مطالعات انجام شده در گذشته می‌توان نتیجه گرفت لاکتوباسیل‌های جداسازی شده از گوشت و فراورده‌های آن می‌توانند به‌عنوان یک عامل زیستی مهم در کنترل پاتوژن‌ها ازجمله *لیستریا مونوسیتوزنز* مطرح باشند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله لازم می‌دانند تا از جناب آقای مهندس علی کاظم نیا، سرکار خانم دکتر شادیه محمدی، جناب آقای دکتر خاصه خان، دکتر مهدی برهانی، مهندس رضا حدادی سلماسی و مهندس سهیلا دیبا به خاطر زحماتشان در انجام مراحل مختلف این تحقیق تشکر و قدردانی نمایند.

References:

1. Gialamas H, Zinoviadou KG, Biliaderis CG, Koutsoumanis KP. Development of a novel bioactive packaging based on the incorporation of Lactobacillus sakei into sodium-caseinate films for controlling Listeria monocytogenes in foods. Food Res Int 2010; 43(10): 2402-8.
2. Lehrke G, Hernaez L, Mugliaroli SL, Von Staszewski M, Jagus RJ. Sensitization of Listeria innocua to inorganic and organic acids by natural

antimicrobials Food Sci Technol 2011; 44(4): 984-91.

3. Scannell AGM, Hill C, Ross RP, Marx S, Hartmeier W, Arendt EK. Development of bioactive food packaging materials using immobilized bacteriocins Lacticin 3147 and Nisaplin. Int J Food Microbiol 2000; 60(2-3): 241-9.
4. Trias R, Baneras L, Badosa E, Montesinos E. Bioprotection of golden delicious apples and iceberg lettuce against food borne bacterial pathogens by lactic acid bacteria. Int J Food Microbiol 2008;123: 50-60.
5. Hwanhlem N, Chobert J-M, Aran H. Bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from mangrove forests in southern Thailand as potential bio-control agents in food: Isolation, screening and optimization. Food Control 2014;41:202-11.
6. Narwade RB, Kasare JD, Choudhary RS. Isolation, screening and characterization of lactobacilli from cow milk. IJAIR 2015; 3: 1635-7.
7. Dubernet S, Desmasures N, Gueguen M. A PCR-based method for identication of lactobacilli at the genus level. FEMS Microbiol Lett 2002; 271-5.
8. Kwon Oh-Sik. Characterization of isolated Lactobacillus spp and classification by RAPD-PCR analysis. J Microbiol 2000; 38(2): 137-44.
9. Abdullah SA, Osman MM. Isolation and identification of Lactic acid bacteria from raw cow milk, white cheese and rob in Sudan. Pak. J. Nutr 2010; 9(12): 1203-6.
10. Kermanshahi RK, Peymanfar Sh. Isolation and Identification of Lactobacilli From Cheese, Yoghurt and Silageby 16S rDNA Gene and Study of Bacteriocin and BiosurfactantProduction. Jundishapur J. Microbiol 2012; 5(4): 528-32.
11. Bassyouni RH, Abdel-All WS, Abdel-All M.G.FS, Kamel Z. Characterization of lactic acid bacteria isolated from dairy products in Egypt as a probiotic. Life Sci J 2012; 9(4): 2924-33.
12. Casaburi A, Di Monacoa R, Cavella S, Toldrá F, Ercolini D, Villani F. Proteolytic and lipolytic starter cultures and their effect on traditional fermented sausages ripening and sensory traits. Food Microbiol 2008;25: 335-47.
13. Kant R, Blom J, Pavla A, Siezen R, de Vos W.M. Comparative genomics of Lactobacillus. Microb Biotechnol 2011; 4: 323-32.
14. ValanArasu M, Jung M-W, Ilavenil S, Jane M, Kim D-H, Lee K-D et al. Isolation and characterization of antifungal compound from Lactobacillus plantarumKCC-10from forage silage with potential beneficial properties. J Appl Microbiol 2013; 115:1172–85.
15. Auputinan P, Tragoolpua Y, Pruksakorn S, Thongwai N. Profiles of Plasmids in Lactobacilli Isolated from Fermented Foods. Chiang Mai. J. Sci 2011; 38(4): 648-52.
16. Jafari B, Rezaie A, Alizadeh S. Isolation and identification of potentially probiotic bacteria from traditional dairy productsof Ardabil region in Iran. Ann. Biol. Res 2011; 2(6): 311-7.
17. Schillinger U, Lücke F-K. Identification of Lactobacilli from meat and meat product. Food Microbiol 1987; 4:199-208.
18. Østergaard N, Eklöw A, Dalgaard P. Modelling the effect of lactic acid bacteria from starter-and aroma culture on growth of Listeria monocytogenes in cottage cheese. Int J Food Microbiol 2014;188:15-25.
19. Castellano P, Vignolo G. Inhibition of Listeria innocua and Brochothrix thermosphacta in vacuum-packaged meat by the addition of bacteriocinogenic Lactobacillus curvatus CRL705 and its bacteriocins. Lett Appl Microbiol 2006; 43: 194-9.
20. Lücke F-K. Utilization of microbes to process and preserve meat. Meat sci 2000; 56: 105-15.

21. Aguirre M, Collins MD. Lactic acid bacteria and human clinical infection. J Appl bacteriol 1993;75:95-107.
22. Castellano P, Gonzáles C, Carduza F, Vignolo G. Protective action of Lactobacillus curvatus CRL705 on vacuum-packaged raw beef. Effect on sensory and structural characteristics. Meat Sci 2010; 85: 394-401.
23. Tannock GW, Tilsala-Timisjarvi A, Rodtong S, Munro K, Alatossava T. Identification of Lactobacillus isolates from thegastro intestinal tract, silage and yoghurt by 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region sequence comparisons. Appl. Environ Microbiol 1999; 65(9): 4264-7.
24. Dimitonova SP, Bakalov BV, Aleksandrova-Georgieva RN, Danova1 S T. Phenotypic and molecular identification of lactobacilli isolated from vaginal secretions. J Microbiol Immunol Infect 2008; 41:469-77.
25. Lick S. Typing systems for lactobacilli. Milchwissenschaft 2003; 58: 256-60.
26. Callon C, Mille L, Montel M-C. Diversity of lactic acid bacteria isolated from AOC salers cheese. J Dairy Res 2004; 71: 231-44.
27. Torriani S, Zapparoli G, Dellaglio F. Use of PCR-Based Methods for Rapid Differentiation of Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus and L. delbrueckii subsp. lactis. Appl Environ Microbiol 1999; 65(10): 4351-56.
28. Dal Bello F, Hertel Ch. Oral cavity as natural reservoir for intestinal lactobacilli. Syst Appl Microbiol 2006; 29: 69–76.
29. Gibson T, Abdel-Malek T. The formation of carbon dioxide by lactic acid bacteria and Bacillus licheniformis and a cultural method of detecting the process. J Dairy Res 1945; 14:35–44.
30. Sambrook J, Russel DW In vitro mutagenesis using double-stranded DNA templates: selection of mutants with DpnI. J Mol Cloning 2001; 2:19-25.
31. Chen T, Wu Q, Li Sh, Xiong Sh, Jiang S, Tan Q et al. Microbiological quality and characteristics of probiotic products in China. J Sci Food Agric 2014; 94:131–8.
32. Fleming HP, Etchells JL, Costilow RN. Microbial inhibition by an isolate of Pediococcus from cucumber brines. Appl Environ Microbiol 1985; 30:1040-2.
33. Puniya M, Sangu K, Bhardwaj A, Kumar S, Dhewa T. Isolation and Characterization of Lactobacillus spp. of Human Origin for Studying their Prevalence. Dairy Sci Technol 2014; 2(3): 7-15.
34. Sip A, Wie¸ckowicz M, Olejnik-Schmidt A, Grajek W. Anti-Listeria activity of lactic acid bacteria isolated from golka, a regional cheese produced in Poland. Food Control 2012; 26: 117-24.
35. De Carvalhoa AA, De Paulaa RA, Mantovania HC, De Moraesa CA. Inhibition of Listeria monocytogenes by a lactic acid bacterium isolated from Italian salami. Food Microbiol 2006; 23: 213-9.
36. 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 Sci 2008; 79:483–99.
37. Maragkoudakis PA, Mountzouris KC, Psyrras D, Cremonese S, Fischer J, Cantor MD et al. Functional properties of novel protective Lactic acid bacteria and application in raw chicken meat against Listeria monocytogenes and Salmonella entritidis. Int J Food Microbiol 2009; 130: 219-26.
38. Cálix-Lara TF, Rajendran M, Talcott ST, Smith SB, Miller RK, Castillo A et al. Inhibition of Escherichia coli O157:H7 and Salmonella enterica on spinach and identification of antimicrobial substances produced by a commercial Lactic Acid Bacteria food safety intervention. Food Microbiol 2014; 38:192-200.
39. Malheiros PS, Cuccovia IM, Franco B. Inhibition of Listeria monocytogenes in vitro and in goat milk

by liposomal nanovesicles containing bacteriocins produced by Lactobacillus sakei subsp. sakei 2a. Food Control 2016; 63: 158-64.

40. Quinto EJ, Marín JM, Schaffner DW. Effect of the competitive growth of Lactobacillus sakei MN on the growth kinetics of Listeria monocytogenes Scott A in model meat gravy. Food Control 2016;63: 34-45.

41. Martinez R, Staliano CD, Vieira AD, Villarreal MLM, Todorov SD, Saad SM et al. Bacteriocin production and inhibition of Listeria monocytogenes by Lactobacillus sakei subsp. sakei 2a in a potentially synbiotic cheese spread. Food Microbiol 2015;48:143-52.

Original Article

ISOLATION, BIOCHEMICAL AND MOLECULAR HARACTERIZATION OF LACTOBACILLUS ISOLATED FROM BEEF AND EVALUATING THEIR ANTIBACTERIALEFFECTS ON *LISTERIA* MONOCYTOGENES

Surur Khalili Sadagiani[1]*, Hossein Tajik[2], Javad Aliakbarlu[3]

Received: 12 Jan, 2016; Accepted: 16 Mar, 2016

Abstract

Background & Aims: Increasing consumption of ready to eat foods which usually receive low heating process can cause the emergence of microbial hazards. Listeria monocytogenes is one of the most dangerous foodborne bacteria which can result in disease and death in old, pregnant and immunosuppressed individuals. Lactobacilli are naturally present in most foods. Since ancient times, they were regarded as natural preservatives in food. The aim of this study was to evaluate the biochemical and molecular characterization of Lactobacillus isolates and investigate their antibacterial effects on Listeria monocytogenes

Materials & Methods: Sixty five meat samples were obtained from slaughter house in Urmia city. First, isolated bacteria were evaluated using phenotypic methods (morphology, Gram stain and catalase test). Then, polymerase chain reaction (PCR) and sugar fermentation tests were used. Finally, their antibacterial properties against Listeria monocytogenes were tested by two methods (agar wells diffusion and spot on plate).

Results: Six strains of lactobacilli were identified using PCR. The antibacterial tests showed moderate effects of lactobacilli on Listeria monocytogenes growth.

Conclusion: The results indicated that lacobacilli can be used as a biocontrol agent to inhibit of Listeria monocytogenes growth.

Key Words: Lactobacillus, Meat, Polymerase chain reaction, Antibacterial, Listeria monocytogenes

Address: Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
Tel: +9844-32770508
Email: sururkhalili@yahoo.com

SOURCE: URMIA MED J 2016: 27(2): 139 ISSN: 1027-3727

[1] PhD Student, Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran (Corresponding Author)
[2] Professor, Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
[3] Associate Professor, Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, University, Urmia, Iran