

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

سرور خلیلی صدقیانی\*<sup>۱</sup>، حسین تاجیک<sup>۲</sup>، جواد علی اکبرلو<sup>۳</sup>

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 از نظر 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 لیستریا مونوسیتوژنز می‌باشد.

**مواد و روش کار:** 65 نمونه گوشت از کشتارگاه ارومیه تهیه شد. سویه‌های جداسازی شده 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 بر علیه 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 مونوسیتوژنز 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 (شیشیاکلی، سودوموناس آئروژنز، سالمونلا تیفی موریوم، سالمونلا انتریتیدیس و استافیلوکوکوس

<sup>1</sup> دانشجوی دکتری تخصصی بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه (نویسنده مسئول)

<sup>2</sup> استاد گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

<sup>3</sup> دانشیار گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

کشت‌های حفاظتی تأکید دارند (19). نگه‌دارندگی زیستی شامل تلقیح گونه‌های خاصی از میکروارگانیسم‌ها 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)، دی‌اکسیدکربن، دی‌استیل، 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 (خلاً، اتمسفر تغییر یافته) بیان نموده‌اند (22). شناسایی لاکتوباسیل‌های جدا شده به‌وسیله روش‌های فنوتیپی مشکل می‌باشد، همچنین نیازمند مشخص نمودن ویژگی‌های باکتری‌ها، علاوه بر تست‌های تخمیری می‌باشد (23). زمان بر بودن روش‌های کلاسیک استفاده شده 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 (25 و 26). 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.

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 میکروآتروفیل 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 و 7). 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 شناسایی شده‌اند و کاربردهای بسیاری از جمله به‌عنوان کشت استارتر در صنعت گوشت و لبنیات پیدا کرده‌اند 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 (12 و 13). گونه‌های لاکتوباسیلوس به دلیل حضورشان در غذا و نقش آن‌ها در مکانیسم دفاع سیستم ایمنی لوله گوارشی از لحاظ مصرف غذایی مانعی ندارند (14). به همین دلیل لاکتوباسیل‌ها از لحاظ سلامت ایمن (GRAS)<sup>1</sup> در نظر گرفته می‌شوند و به‌طور گسترده بیولوژی مولکولی آن‌ها به‌منظور بهبود ویژگی‌های سودمند آن‌ها مورد مطالعه قرار می‌گیرد (15 و 16). تاکنون مطالعات زیادی در مورد جداسازی و شناسایی گونه‌های مختلف باکتری‌های اسیدلاکتیک از فراورده‌های مختلف لبنی و گوشتی و ارزیابی خواص مفید این باکتری‌ها از جمله پروبیوتیک بودن و دارا بودن خاصیت ضدباکتریایی علیه پاتوژن‌های با منشأ غذایی صورت گرفته است. از جمله می‌توان به جداسازی 229 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 فیزیکیوشیمیایی 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

<sup>1</sup>. 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 MRS برات (شرکت Merck آلمان) اضافه گردید و در داخل استومکر به مدت 2 دقیقه با دور 260 rpm به‌طور کامل مخلوط گردید و به مدت 6 ساعت در دمای اتاق انکوبه گردید. سپس رقت‌سازی در محلول MRS برات تهیه گردید و بر روی محیط کشت‌های MRS آگار (حاوی 25 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر معرف بروموکروزول گرین) کشت داده شد. پلیت‌ها به مدت 48 ساعت در دمای 30 درجه سانتی‌گراد در شرایط میکروآتروفیل انکوبه گردیدند (28). پس از انکوباسیون سه نوع کلنی در پلیت‌ها مشاهده شد: 1. کلنی‌های سفید رنگ محدب و ریز 2. کلنی‌های سبز روشن بزرگ و 3. کلنی‌های سبز تیره. کلنی‌ها به روش رنگ‌آمیزی گرم رنگ‌آمیزی شدند و زیر میکرو سکوپ مورد بررسی قرار گرفتند. سپس تست کاتالاز بر روی هر یک از کلنی‌های انتخاب‌شده انجام گردید، بدین صورت که چند قطره از محلول هیدروژن پراکسید 3 درصد 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 MRS برات حاوی 30 درصد (حجمی/حجمی) گلیسرول نگهداری شدند.

**آزمایشات مولکولی:****استخراج DNA:**

با استفاده از کیت استخراج DNA و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده سیناژن DNA<sup>TM</sup> انجام گردید. به این ترتیب که ابتدا 1/5 سی‌سی از کشت 24 ساعته MRS برات باکتری‌ها به میکروتیوب‌های 2 میلی‌لیتر انتقال یافت و به مدت 10 دقیقه با دور 7500g سانتریفوژ گردید. به رسوب باکتری 100 میکرولیتر 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 400 میکرولیتر از محلول لیز کننده به هر یک از نمونه‌ها اضافه شد و به مدت 20-15 ثانیه ورتکس گردید. در مرحله بعد 300 میکرولیتر محلول رسوب‌دهنده اضافه و به مدت 5 ثانیه ورتکس شده و با دور 12000 g 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 12000 g 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. کیفیت DNA استخراج‌شده با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل آگارز 7، درصد مورد بررسی و تأیید قرار گرفت (7).

**تکثیر قطعه ژن 16SrRNA:**

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



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 میکرولیتر dNTP، 2/5 میکرولیتر Buffer Complete، 1 میکرولیتر F. Primer، 1 میکرو لیتر R. 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 208-220 جفت نوکلئوتید و با غلظت‌های مناسب با استفاده از نور UV مشاهده 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 برات واجد قند مورد نظر، 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 نشان دهنده 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 میزان 100 میکرولیتر بر روی محیط BHI آگار پخش گردید، چاهک‌هایی به قطر 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 48-72 ساعت در درجه حرارت 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند. قطر هاله‌های شفاف ایجاد شده اطراف چاهک‌ها با استفاده از کولیس اندازه گردید.

##### روش نقطه‌گذاری:

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

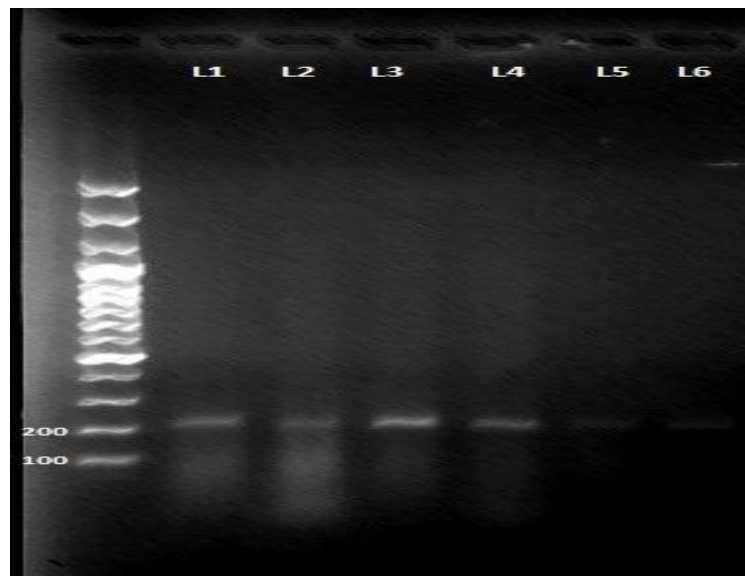
#### یافته‌ها

بر اساس نتایج به دست آمده در این پژوهش، از 65 نمونه گوشت گاو در مرحله اول 21 نمونه با توجه به مورفولوژی کلنی‌ها، رنگ‌آمیزی گرم و تست کاتالاز به عنوان گونه‌های لاکتوباسیلوس انتخاب شدند و در ادامه از این 21 نمونه، با روش مولکولی تعداد 6 نمونه مورد تأیید نهایی قرار گرفتند و در نهایت به منظور 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 جدا شده را نشان می‌دهد. بر طبق جداول استاندارد تست تخمیر قندها توسط گونه‌های لاکتوباسیل نمونه‌های L1 و L2 به الگوی تخمیری لاکتوباسیلوس کازئی و نمونه‌های L3, L4, L5, L6 به الگوی تخمیری لاکتوباسیلوس پلانتاروم و نمونه L3 به لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس شباهت دارند.

جدول شماره 2 نتایج خاصیت ضدباکتریایی لاکتوباسیل‌های جدا شده از گوشت گاو علیه پاتوژن لیستریا مونوسیتوژنز و دو آنتی‌بیوتیک سفالکسین و اریترومايسين به روش چاهک را به صورت قطر هاله مهارى برحسب میلی‌متر نشان می‌دهد.



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

ستون اول: DNA Ladder: ستون سوم: نمونه 2 (L2) ستون پنجم: نمونه 4 (L4) ستون هفتم: نمونه 6 (L6)  
ستون دوم: نمونه 1 (L1) ستون چهارم: نمونه 3 (L3) ستون ششم: نمونه 5 (L5)

جدول (۱): نتایج تست تخمیر قند

نمونه‌ها	زایلوز	تره هالوز	ساکارز	سوربیتول	سالیسین	راموز	رافینوز	ملیوز	مانوز	مانیتول	مالوز	لاکتوز	گالاکتوز	آرابینوز	ارگانسیم احتمالی
L <sub>1</sub> , L <sub>2</sub>	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	لاکتوباسیلوس کارژی
L <sub>4</sub> , L <sub>5</sub> , L <sub>6</sub>	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	لاکتوباسیلوس پلانتروم
L <sub>3</sub>	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس

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

لاکتوباسیل	قطر هاله مهارى
L <sub>1</sub>	10/71
L <sub>2</sub>	10/19
L <sub>3</sub>	12/12
L <sub>4</sub>	13/44
L <sub>5</sub>	10/79
L <sub>6</sub>	12/36
Cephalexin	20/6
Erythromycin	23/2

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

لاکتوباسیل	قطر هاله مهارى
L <sub>1</sub>	8/14
L <sub>2</sub>	7/3
L <sub>3</sub>	7/79
L <sub>4</sub>	7/15
L <sub>5</sub>	8/5
L <sub>6</sub>	8/82

### بحث و نتیجه‌گیری

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 PCR مورد تأیید نهایی قرار گرفتند. بر طبق نتایج تست‌های ضدباکتریایی لاکتوباسیل‌های جداشده از گوشت گاو دارای اثر مهارى بر روی رشد پاتوژن لیستریا مونوسیتوژنز می‌باشد. این پاتوژن یکی از مشکلات اساسی در صنایع مواد غذایی بخصوص

امروزه باکتری‌های اسیدلاکتیک در صنایع غذایی و سلامت انسان مورد توجه 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 از جمله

میزان چشمگیری رشد/شیرشیاکی 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 مونوسیوتوزنز 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 *Listeria sakei* MN را بر روی رشد *monocytogenes* Scott A در مدل گوشت ارزیابی کردند. یافته‌های آن‌ها نشان داد *Lactobacillus sakei* MN یکی از گونه‌های تولیدکننده باکتریوسین لاکتوباسیل‌ها، توانایی کنترل رشد لیستریا مونوسیوتوزنز را دارا می‌باشد(40). در مطالعه دیگری که توسط Martinez و همکارانش در 2015 بر روی باکتریوسین‌های تولیدشده توسط *Lactobacillus sakei subsp. sakei 2a* علیه رشد لیستریا مونوسیوتوزنز در پنیر انجام شد نتایج آن‌ها نشان داد که باکتریوسین‌های تولیدشده توسط گونه لاکتوباسیلوس ساکائی میزان رشد لیستریا مونوسیوتوزنز را در طول مدت نگهداری 28 روزه پنیر در دو درجه حرارت نگهداری (4 و 15 درجه سانتی‌گراد) به‌طور قابل توجهی 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 از جمله لیستریا مونوسیوتوزنز 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.

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

در سال 1987 Schallinger و 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 مونوسیوتوزنز 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 مونوسیوتوزنز 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 میکروارگانیزم‌های بیماری‌زا و عامل فساد مثل لیستریا اینوکوا، بروکوتریکس ترموسافتا دارند(36). Petros و همکارانش در 2009 خصوصیات حفاظتی باکتری‌های اسیدلاکتیک و استفاده آن‌ها در گوشت خام مرغ علیه لیستریا مونوسیوتوزنز 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 قابل توجهی در تعداد این پاتوژن‌ها مشاهده گردید(37). در سال 2014 Thelma و همکاران نیز مهار/شیرشیاکی O157: H7 در اسفناج به‌وسیله‌ی مواد ضد میکروبی 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 ضد میکروبی تولیدی توسط باکتری‌های اسیدلاکتیک به

### References:

- 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.
- 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, Desmasure N, Gueguen M. A PCR-based method for identification 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 Silage by 16S rDNA Gene and Study of Bacteriocin and Biosurfactant Production. 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 Monaco R, Cavella S, Toldrà 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 plantarum KCC-10 from 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 products of 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, Eklöv 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, Alatosava T. Identification of *Lactobacillus* isolates from the gastro 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, Danova 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, Więckowicz 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 Carvalho AA, De Paulaa RA, Mantovania HC, De Moraes 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 enteritidis*. *Int J Food Microbiol* 2009; 130: 219-26.
38. Cáliz-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.

## ISOLATION, BIOCHEMICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF LACTOBACILLUS ISOLATED FROM BEEF AND EVALUATING THEIR ANTIBACTERIAL EFFECTS ON *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Surur Khalili Sadagiani<sup>1\*</sup>, Hossein Tajik<sup>2</sup>, Javad Aliakbarlu<sup>3</sup>

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 lactobacilli 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

<sup>1</sup> PhD Student, Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran (Corresponding Author)

<sup>2</sup> Professor, Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

<sup>3</sup> Associate Professor, Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, University, Urmia, Iran