نقش باکتریوسین‌های استخراجی از سویه های استاندارد به عنوان نگهدارنده بیولوژیکی در برابر باکتری‌های بیماری‌زای جدا شده از انواع گوشت

مریم بهبودی پور[1]، نیما بهادر[2]*

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد زیست شناسی میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، کشاورزی و فناوری های نوین، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران.

۲. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، کشاورزی و فناوری های نوین، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران.

***نویسنده مسئول:** *bahador@iaushiraz.ac.ir*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۹/۰۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۲/۰۴

چکیده

با توجه به افزایش روز افزون تقاضا برای تولید محصولات گوشتی با کیفیت بالا، ماندگاری طولانی و با حداقل فرآوری، از این رو هدف از این تحقیق بررسی فعالیت ضد میکروبی دو سویه استاندارد *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیر گونه *دلبروکی* PTCC 1333 و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* PTCC 1744 بر روی شایع‌ترین باکتری‌های جدا شده از انواع گوشت می‌باشد. در این تحقیق ۵۰ نمونه گوشت شامل: ماهی، چرخ کرده و گوشت قرمز از مناطق مختلف شهر شیراز جمع آوری شد، نمونه‌ها به محیط‌های کشت نوترینت براث و بلاد آگار منتقل گردید سپس جدایه‌ها خالص‌سازی شدند وبه کمک آزمون‌های بیوشیمیایی مورد شناسایی اولیه قرار گرفتند. فعالیت مهارکنندگی سوپرناتانت دو سویه *لاکتوباسیل* علیه شایع‌ترین جدایه‌ها به روش چاهک در آگار بررسی شد. همچنین به منظور جلوگیری کردن از اثرات بازدارندگی اسیدهای ارگانیک و هیدروژن پراکسید، سوپرناتانت با سدیم هیدروکسید و آنزیم کاتالاز تیمار شد. در نهایت شایع‌ترین جدایه‌ها توسط تکنیک مولکولی PCR مورد شناسایی نهایی قرار گرفتند. باکتری‌های شایع توسط آزمون مولکولی به صورت *اشریشیاکلی* (۱۶/۶ درصد)، *انتروباکترکلوآکه*(۱۶/۶ درصد)، *هافنیا آلویی* (۵۰ درصد) و *آئروموناس سالمونیسیدا* (۱۶/۶ درصد) گزارش شدند. بیشترین اثر باکتری‌های اسید لاکتیک بر روی *اشریشیاکلی*، *هافنیا آلویی*، *آئروموناس سالمونیسیدا* مشاهده شد. از بین دو سویه استاندارد *لاکتوباسیل*، *لاکتوباسیلوس دلبروکی* تاثیر بیشتری بر روی باکتری‌های جداسازی شده داشت و سوپرناتانت دو *لاکتوباسیل* بدون خنثی شدن توسط سدیم هیدروکسید وآنزیم کاتالاز دارای فعالیت ضد میکروبی علیه شایع‌ترین جدایه‌ها بود.

کلید واژه ها: باکتریوسین، *لاکتوباسیلوس دلبروکی*، *لاکتو باسیلوس فرمنتوم*، گوشت، نگهدارنده بیولوژیکی.

مقدمه

گوشت یکی از مهم‌ترین منابع پروتئینی به شمار می‌آید. غنی بودن گوشت از پروتئین‌های ارزشمندی حاوی اسیدهای آمینه ضروری برای بدن، مواد معدنی به ویژه آهن و روی، انواع ویتامین‌ها و نیز انرژی کافی سبب می‌شود تا آن را در زمره کامل‌ترین مواد غذائی طبقه‌بندی نمود (شکرفروش و همکاران، ۱۳۹۱). از طرف دیگر ماهی نیز به دلیل داشتن پروتئین زیاد و ارزش غذایی بالا به عنوان یکی از مهم‌ترین موادغذایی در کشورهای در حال توسعه محسوب می‌شود. ماهی بیش از ۵۰ درصد از پروتئین حیوانی را در ۳۴ کشور فراهم می‌کند. اما با این وجود، ماهی از جمله غذاهای سریع الفساد بوده که مکانیسم‌های مختلف فیزیکی، شیمیایی و میکروبیولوژیکی در فرآیند فساد آن دخیل هستند (Pal et al., 2016). رشد میکروبی مهم‌ترین دلیل فساد گوشت و فرآورده‌های گوشتی است که ضمن تغییر بافت و مزه فرآورده خسارت اقتصادی و مسمومیت نیز به دنبال دارد (صداقت و همکاران، ۱۳۹۳). منبع اصلی آلودگی گوشت نیز، دام زنده می‌باشد. آلودگی در لاشه می‌تواند در اثر بیماری‌های میکروبی دام هنگام کشتار به وجود آمده باشد و یا

اینکه در اثر عدم رعایت موازین بهداشتی در طول زنجیره کشتار انجام یافته باشد. بنابراین با توجه به مخاطرات بهداشتی ناشی از حضور باکتری‌های بیماری-زا در مواد غذایی، اطلاع از وضع گذشته و حال آلودگی باکتریایی مواد غذایی با منشاء دامی به باکتری‌های غذازاد و ارزیابی روند این آلودگی‌ها و ارائه راهکارهای مناسب در جهت حذف یا کاهش آنها ضروری می‌باشد (شکرفروش و همکاران، ۱۳۹۱). باکتری‌های اسید لاکتیک و متابولیت‌های ضد میکروبی آن‌ها دارای پتانسیلی بعنوان مواد نگهدارنده طبیعی برای کنترل رشد باکتری‌های بیماری‌زا و فاسد کننده در مواد غذایی هستند (Jeevaratnam et al., 2005). این باکتری‌ها، متابولیت‌های مختلفی مانند اسید لاکتیک، اسید استیک، هیدروژن پراکسید و باکتریوسین‌ها تولید می‌کنند، که می‌توانند از رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و فاسد کننده جلوگیری کنند، و مدت زمان ماندگاری را افزایش دهند و ایمنی محصولات غذایی را ارتقا بخشند (Aymerich et al., 2000). از آنجایی‌که اکثر باکتریوسین‌ها در برابر حرارت پایدار و به غیر فعال‌سازی توسط پروتئولیتیک‌ها مقاوم می‌باشند اخیراً باکتریوسین‌ها و نقش بالقوه آن‌ها به عنوان مواد نگهدارنده خوراکی جدید، توجهات بیشتری را بخود جلب کرده است (Jeevaratnam et al., 2005).

باکتریوسین‌ها، پپتیدها یا کمپلکس‌های پپتیدی بیواکتیو هستند که بوسیله ریبوزوم سنتز شده و بصورت خارج سلولی رها شده، و دارای فعالیت باکتریوسیدالی و یا باکتریواستاتیک می‌باشند. در تمام موارد، سلول‌های تولید کننده، ایمنی خاصی به فعالیت باکتریوسین خود نشان می‌دهند. باکتریوسین‌های باکتری‌های اسید لاکتیک بعنوان نگهدارنده های زیستی ایمن در نظر گرفته می‌شوند زیرا فرض می‌شود بوسیله‌ی پروتئازها در دستگاه گوارش تجزیه شوند (Cleveland et al., 2001). تقاضای فزاینده برای مواد غذایی فرآوری شده با ایمنی و کیفیت بالا، موقعیت مناسبی را برای مواد نگهدارنده خوراکی طبیعی بوجود آورده است. مواد نگهدارنده خوراکی طبیعی ایده‌آل باید معیارهای زیر را برآورده کنند: ۱ - سمیت پایین قابل قبول، ۲- پایداری در طی پردازش و نگه داری، ۳-اثربخشی در غلظت پایین، ۴- فاقد اثر مضر روی غذا و ۵- صرفه اقتصادی. اکثر باکتریوسین‌ها این معیارها را برآورده می‌کنند، اما تا به امروز، نایسین تنها باکتریوسینی است که در مقیاس بزرگ از نظر تجاری بکار گرفته شده است (Cleveland et al., 2001; Sakala et al., 2002). بنابراین باتوجه به ایمنی وکارایی باکتری‌های اسید لاکتیک و مواد ضد میکروبی حاصل از آنها و همچنین به دلیل اهمیت بالای گوشت و فرآورده‌های آن در زنجیره غذایی انسان، تحقیق حاضر به دنبال جداسازی و شناسایی ارگانیسم-هایی است که باعث آلودگی گوشت شده و پس از آن با معرفی لاکتوباسیل‌های تولید کننده باکتریوسین بتوان این مواد غذایی را از نظر کیفی به صورت مناسب نگهداری نمود.

روش کار

جمع آوری نمونه‌ها و جداسازی میکروارگانیسم‌ها از گوشت

جهت تعیین و غربالگری باکتری‌ها از گوشت، ۵۰ نمونه از گوشت‌های مختلف شامل: ماهی (۱۰ نمونه)، گوشت چرخ کرده (۲۰ نمونه) و غیر چرخ کرده (۲۰ نمونه) از چندین مغازه قصابی سطح شهر شیراز به طور تصادفی جمع آوری گردید و با حفظ زنجیره سرد به آزمایشگاه انتقال داده شد. جهت تعیین و غربالگری باکتری‌ها از گوشت، به میزان ۲۵ گرم از نمونه‌ها با استفاده از ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری شد و به محیط کشت نوترینت براث و گرم نگاتیو براث در شرایط استریل انتقال داده شد و پس از تقلیح شبانه روزی، روی محیط کشت بلاد آگار به صورت سه بخشی کشت داده شد و پس از گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه

سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت، جدایه ها مورد شناسایی اولیه قرار گرفتند (Vindigni et al., 2007).

خالص سازی و شناسایی اولیه جدایه‌ها

جدایه‌های بدست آمده از محیط بلاد آگار (۱۰ جدایه) به محیط کشت مکانکی آگار، ائوزین متیلن بلو و سالمونلا شیگلا آگار انتقال داده شدند. سپس پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند، پس از آن به کمک رنگ آمیزی گرم و ویژگی‌های مورفولوژیکی بررسی شدند. سپس به کمک آزمون‌های کاتالاز، اکسیداز، تست TSI و تست IMViC مورد شناسایی قرار گرفتند(باصری صالحی و بهادر، ۱۳۹۲).

احیاء سویه‌های مولد باکتریوسین

ایزوله‌های درخواستی از مرکز کلکسیون‌های میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، شامل *لاکتوباسیلوس دلبروکی زیر گونه دلبروکی* (PTCC 1333) و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* (PTCC 1744) تهیه گردیدند و بر طبق پروتکل مرکز، جهت احیاءسازی به محیط MRS براث انتقال داده شدند و پس از آن در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در جار بی‌هوازی به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند.

استخراج سوپرناتانت

سویه های *لاکتو باسیل* مورد نظر به پنج میلی‌لیتر از محیط (MRS) براث تلقیح و ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند . پس از سپری شدن این زمان، سوسپانسیون باکتریایی با استفاده از سانتریفیوژ در g ۱۴۰۰۰ به مدت پنج دقیقه رسوب داده شدند و برای اطمینان از عدم وجود سلول در محلول، مایع رویی جدا شده از طریق فیلتر سرسرنگی استریل ۰/۲۲ میکرون (Membrane solutions)، فیلتر شده و مورد استفاده قرار گرفت(Bonade et al., 2001; Herreros et al., 2005).

اثر باکتریوسین‌ها بر جدایه‌ها

به منظور بررسی فعالیت ضد باکتریایی سویه‌های *لاکتو باسیل*، بر باکتری‌های جدا شده از گوشت به روش انتشار در چاهک میزان ۵۰ میکرولیتر از سوپرناتانت بدست آمده به محیط نوترینت آگار کشت شده توسط باکتری‌های جدا شده از گوشت در ۳ چاهک اضافه شد. بطوریکه در چاهک اول سوپرناتانت عادی، و چاهک‌های بعدی به منظور جلوگیری کردن از اثرات بازدارندگی به علت اسیدهای ارگانیک، سوپرناتانت باقیمانده با یک مول در لیتر سدیم هیدروکسید در pH شش تنظیم شده و به چاهک بعدی منتقل گردید. از طرف دیگر سوپرناتانت خنثی شده، با یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر از کاتالاز در ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه جهت حذف عمل بازدارندگی هیدروژن پراکسید (H_2O_2) نیز تیمار شد و پس از فیلتراسیون به سومین چاهک منتقل گردید. جهت جذب محلول به داخل محیط، پلیت‌ها به مدت دو ساعت در دمای محیط قرار گرفتند. پس از مرحله جذب، پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. سپس اندازه هاله‌های مهاری تشکیل شده با استفاده از خط‌کش بر اساس میلی‌متر اندازه‌گیری و نتایج ثبت گردید (Bonade et al., 2001; Herreros et al., 2005).

شناسایی مولکولی شایع‌ترین جدایه‌های بدست آمده از گوشت

پس از شناسایی اولیه، شایع ترین جدایه های بدست آمده از انواع گوشت به کمک آزمون مولکولی مورد شناسایی نهایی قرار گرفتند. در این مطالعه استخراج DNA باکتری از نمونه‌های مورد نظر با استفاده از کیت استخراج DNA (یکتا تجهیز) به روش ستونی صورت گرفت. جدایه‌ها با استفاده از قطعه ۱۵۰۶جفت بازی ژن *16S rRNA* و پرایمر اشاره شده P1: 5-AGA GTT TGA TCC TGG TCA GAA CGC T-3), P6: 5-TAC GGC TAC CTT GTT ACG ACT TCA CCC C-3) و سیکل دمایی

زمانی جدول ۱ مورد آنالیز مولکولی قرار گرفتند و بعد از PCR محصول آن روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شد (Adzitey et al., 2013; El-Hadedy et al., 2012). پس از تعیین توالی قطعات تکثیر شده به وسیله شرکت ماکروژن کره، در نهایت ترادف جدایه‌ها با استفاده از نرم افزار Chromas و با استفاده از سایت NCBI- BLAST به آدرس http:/www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST بررسی و باکتری‌ها شناسایی شدند.

جدول ۱: برنامه PCR ژن 16s rRNA

تعدادسیکل	زمان (دقیقه)	دما درجه سلسیوس	مرحله
۱	۵ دقیقه	۹۵	واسرشت اولیه
۳۰	۳۰ ثانیه	۹۵	واسرشت
	۲۰ ثانیه	۵۸	اتصال
	۳۰ ثانیه	۷۲	توسعه
۱	۴ دقیقه	۷۲	توسعه نهایی

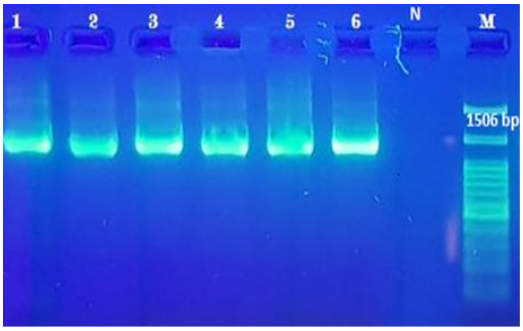
آنالیز آماری داده ها

نتایج حاصل از پژوهش در سه تکرار توسط نرم افزار آماری SPSS و آزمون Independent- samples T- Test در سطح معنی داری ۰/۰۵ آنالیز گردید.

نتایج

شناسایی شایع‌ترین جدایه‌ها

جدایه‌های خالص‌سازی شده (۱۰ جدایه)، پس از رنگ آمیزی گرم، همگی گرم منفی، کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی (به جز یک جدایه) تعیین گردیدند که به کمک سایر آزمون‌های بیوشیمیایی مورد شناسایی اولیه قرار گرفتند و در نهایت شایع‌ترین جدایه‌ها (شش جدایه) توسط تکنیک مولکولی PCR وتعیین توالی مورد شناسایی نهایی قرارگرفتند. نتایج حاصل از آزمون مولکولی PCR در تصویر ۱ در کنار مارکر با سایز ۱۰۰ جفت بازی نشان داده شده است. جدایه شماره یک با ۸۹ درصد شباهت مربوط به زیر گونه باکتری *انتروباکتر کلوآکه*، و جدایه‌های دو، سه و پنج با ۹۴ درصد شباهت مربوط به باکتری *هافنیا آلویی* استری FC2951، و جدایه شماره شش با ۹۸ درصد شباهت مربوط به باکتری *آئروموناس سالمونیسیدا* استرین A527 بودند. اگر چه جدایه شماره چهار توسط آزمون مولکولی غیر قابل شناسایی بود اما توسط نتایج حاصل از آزمون‌های بیوشیمیایی به عنوان *اشریشیاکلی* مورد شناسایی قرار گرفت. همچنین باکتریهای شناسایی شده توسط آزمون مولکولی تاییدی بر شناسایی جدایه ها با آزمونهای بیوشیمیایی بود.



تصویر ۱: ژل آگارز محصول PCR. M مارکر ۱۰۰ جفت بازی، N کنترل منفی، چاهک های یک تا شش به ترتیب DNA استخراجی شایع‌ترین جدایه‌های حاصل از گوشت

اثر باکتریوسین‌های استخراجی از سویه‌های استاندارد بر شایع‌ترین جدایه‌ها

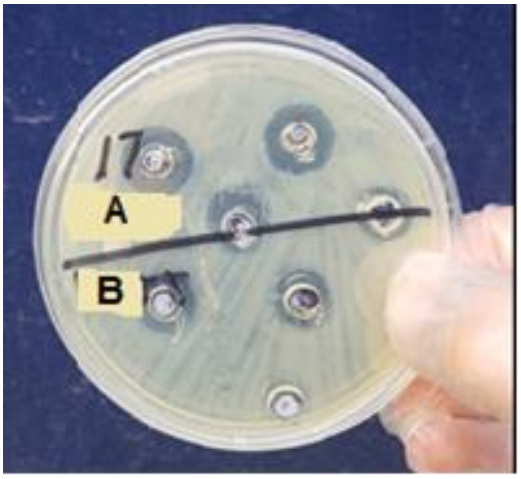
میانگین قطر هاله‌های عدم رشد ناشی از *لاکتوباسیل*‌ها بر جدایه‌ها در(جدول ۲) بیان شده است. از لحاظ آماری بین میانگین قطر هاله‌های ایجاد شده توسط دو سویه *لاکتوباسیل* استاندارد در سطح اطمینان ۹۵ درصد تفاوت معناداری وجود داشت (p <۰/۰۵). واین بدان معنا بود که دو سویه *لاکتوباسیل* بر روی جدایه‌ها

تاثیر یکسانی نداشتند، واز بین دو سویه استاندارد، *لاکتوباسیلوس دلبروکی* تاثیر بیشتری بر جدایه‌ها داشت. همچنین بزرگترین قطر هاله عدم رشد تحت تاثیر *لاکتوباسیلوس دلبروکی* و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* علیه باکتری *اشریشیاکلی* به ترتیب برابر با ۱۳/۶۶ و ۱۲ میلی‌متر مشاهده گردید (تصویر ۲). باکتری *آئروموناس سالمونیسیدا* نیز تحت تاثیرمتابولیت *لاکتوباسیلوس دلبروکی* میانگین قطر هاله ای برابر با ۱۲/۳۳ ایجاد کرد، بیشترین قطر هاله عدم رشد ایجاد شده توسط *لاکتوباسیلوس دلبروکی* نیز بر *هافنیا آلویی* برابر با ۱۲/۳۳ میلی‌متر گزارش گردید (تصویر ۳). لازم بذکر است که مایع رویی باکتری‌های اسید لاکتیک مورد استفاده نیز با سدیم هیدروکسید و آنزیم کاتالاز تیمار شد و پس از عبور از فیلتر بر روی باکتری‌های مذکور اثر داده شد اما بر هیچ یک از جدایه‌ها اثر گذار نبود.

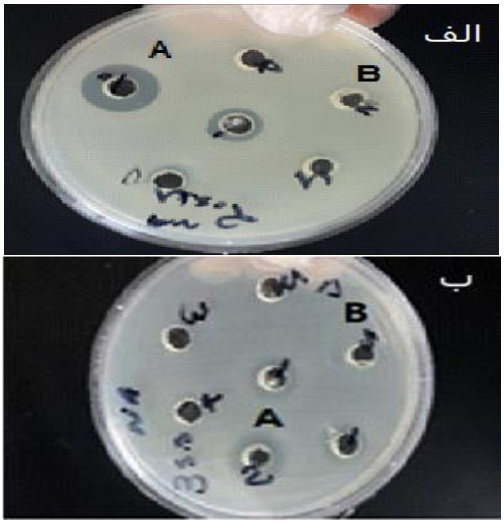
جدول۲: ارزیابی اثر باکتریو سین‌های استخراجی بر جدایه‌های حاصل از انواع گوشت

نمونه	*لاکتوباسیلوس دلبروکی*	*لاکتوباسیلوس فرمنتوم*
۱	۸/۳۳ ±۰/۵۷	-
۲	۱۲/۳۳ ± ۱/۵۱	-
۳	-	-
۴	۱۳/۶۶ ± ۰/۵۷	۱۲ ±۱
۵	۱۰/۳۳ ± ۲/۰۸	-
۶	۱۲/۳۳ ± ۲/۵۱	-

علامت (-) بیانگر عدم اثر گذاری *لاکتوباسیل*ها بر نمونه‌های مورد مطالعه می‌باشد.



تصویر۲:هاله عدم رشد *اشریشیاکلی*
A: هاله ایجاد شده توسط *لاکتوباسیلوس دلبروکی*
B: هاله ایجاد شده توسط *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*



تصویر ۳: هاله ایجاد شده توسط *لاکتوباسیلوس دلبروکی* (A)
و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* (B) بر *آئروموناس سالمونیسیدا*(الف) و *هافنیا آلویی* (ب).

بحث

علیرغم معرفی تکنولوژی‌ها مدرن و مفاهیم ایمنی، تعداد گزارشات بیماری‌ها و مسمومیت‌های غذازاد درحال افزایش است. با توجه به مطالب بالا و ارتقاء دانش در مورد فعل و انفعالات میکروبی پیچیده، گرایش به استفاده از مواد نگهدارنده زیستی به شکل کشت‌های محافظتی یا متابولیت‌های آن‌ها، یعنی آنزیم‌ها و باکتریوسین‌ها افزایش یافته است (Jeevaratnam et al., 2005). تحقیقات به طور گسترده ای برای کشف زمینه‌های نوظهور نگهدارنده-های بیولوژیکی در حال انجام است. بر همین اساس دانشمندان در سراسر جهان علاقه‌مندی خود را به جداسازی انواع سویه‌های تولید کننده باکتریوسین و تشخیص باکتریوسین تولید شده توسط آنها، برای حفظ مواد غذایی نشان می‌دهند (Gautam and Sharma, 2009).

به طور کلی، متابولیسم باکتری‌های اسید لاکتیک منجر به بهبود ویژگی‌های طعم لبنیات، سبزیجات، ماهی و محصولات گوشتی می‌گردد و برخی از سویه‌ها حتی ممکن است موجب مهار رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و فسادزا شوند و همچنین به گسترش ایمنی و افزایش ماندگاری این محصولات کمک کنند (Lopez et al., 2007; Castellano et al., 2008; Minei et al., 2008; Guerrieri et al., 2009; Hammami et al., 2009). نسبت به تعدادی مطالعه چالش برانگیز علیه باکتری‌های بیماری‌زا و فاسد کننده در چندین سیستم غذایی، مطالعات کمی در مورد کاربردهای *لاکتوباسیلوس دلبروکی* و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* گزارش شده است. در تحقیق حاضر، جداسازی باکتری‌های شایع گوشت و تاثیر مایع رویی دو سویه استاندارد *لاکتوباسیلوس دلبروکی* و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* بر آنها مورد آزمون قرار گرفت.

در طی تحقیقی صادقی و همکاران (۱۳۹۱) میزان آلودگی میکروبی انواع مختلف فرآورده‌های گوشتی شهر کرمانشاه را به صورت ۱۰۰ درصد کپک و مخمر، ۵۸ درصد *کلیفرم*، ۵۳ درصد *استافیلوکوک*، ۱۷درصد *اشریشیاکلی* و سه درصد *سالمونلا* گزارش دادند. در سه درصد از نمونه‌های جمع آوری شده تمامی میکروارگانیسم‌ها حضور داشتند (صادقی و همکاران، ۱۳۹۱). در تحقیق حاضر برخلاف تحقیق فوق آلودگی میکروبی انواع مختلف گوشت و نه فرآورده‌های گوشتی مورد بررسی قرار گرفت و باکتری‌های شایع توسط آزمون مولکولی و بیوشیمیایی به صورت *اشریشیاکلی* (۱۶/۶ درصد)، *انتروباکترکلوآکه* (۱۶/۶ درصد)، *هافنیا آلویی* (۵۰ درصد) و *آئروموناس سالمونیسیدا* (۱۶/۶ درصد) گزارش شدند که بیشترین فراوانی در بین این باکتری‌ها به باکتری *هافنیا آلویی* (۵۰ درصد) تعلق داشت. در تحقیق حاضر بیشترین آلودگی در گوشت ماهی و گوشت چرخ شده مشاهده گردید و همچنین بیشترین تاثیر سوپرناتانت استخراجی از *لاکتوباسیل*‌ها بر روی باکتری‌های جدا شده از گوشت ماهی مشاهده گردید. بنابراین استفاده از *لاکتوباسیلوس دلبروکی* می‌تواند یک راه حل مناسب جهت کنترل پاتوژن‌ها در آبزیان از جمله ماهی‌ها باشد. توانایی فسادزایی باکتری *آئروموناس سالمونیسیدا*، *سودوموناس فلورسنس*، *سودوموناس فراژی*، *سراشیا لیکوئیفسینس* توسط تست های رقابتی و آزمایشات حسی مورد بررسی قرار گرفته است (Wang et al., 2017) . *آئروموناس هیدروفیلا* و *سوربیا* به عنوان ارگانیسم‌های سرماگرایی که توانایی ایجاد فساد و بیماریی‌زایی برای انسان را دارند گزارش شده‌اند (Hinton et al., 2004). رومیانی و همکاران نیز در طی یک مطالعه به بررسی آلودگی باکتریایی پنج گونه از ماهیان دریایی عرضه شده در بازار اهواز و آبادان پرداختند در نهایت نتایج آنان نشان داد که گونه‌های *آئروموناس* با ۱۷/۴ درصد فراوان‌ترین باکتری-های موجود در این مطالعه بودند (رومیانی و همکاران، ۱۳۹۱). نتایج مطالعه ما نیز نشان داد که باکتری

آئروموناس سالمونیسیدا با ۱۶/۶ درصد فراوانی جزء شایع‌ترین باکتری‌های جداسازی شده بود.

سودوموناس‌ها (*فراژی، لاندنسیس، فلورسنس*) از جمله باکتری‌های شایع در گوشت مرغ می‌باشند همچنین در بین انتروباکتریاسه‌ها جنس‌های اصلی *هافنیا*(*آلویی،پارآلویی*)، *سراشیا*(*فونتیکولا، گریمسی، لیکوئیفسینس، کوئینی ووارنس، پروتاماکولان*) *راهنلا، یرسینیا، بوتیا اکسلا* جز اصلی‌ترین میکروارگانیسم‌های گوشت مرغ می‌باشند (Rouger et al., 2017).

فروهاتا و همکاران در طی مطالعه‌ای به جداسازی و شناسایی انتروباکتریاسه‌ها از گوشت اسب که برای مصرف انسان در نظر گرفته شده بود پرداختند. نتایج مطالعه‌ی آنان نشان داد که در بین ۱۴ گونه شناسایی شده، *هافنیا آلویی* با ۳۳ سویه (۱۹/۸ درصد)، *کلبسیلا پنومونیه* با ۲۷ سویه (۱۶/۲ درصد) و *انتروباکترکلوآکه* با ۲۶ سویه (۱۵/۶ درصد) سه گونه غالب در این مطالعه بودند که بیشترین فراوانی به باکتری *هافنیا آلویی* تعلق داشت(Furuhata et al., 2014). در مطالعه حاضر نیز شایع‌ترین سویه جداشده، باکتری *هافنیا آلویی* بود که از نمونه گوشت چرخ شده و گوشت ماهی جدا گردید.

در تحقیق حاضر بیشترین اثر سوپرناتانت باکتری‌های اسید لاکتیک بر روی باکتری‌های *اشریشیاکلی*، *آئروموناس سالمونیسیدا* و *هافنیا آلویی* مشاهده گردید. همچنین از بین دو سویه استاندارد بکار گرفته شده در پژوهش باکتری *لاکتوباسیلوس دلبروکی* بیشتر از *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* بر روی باکتری‌های جداسازی شده اثر گذار بود. نتایج ما نشان داد که سوپرناتانت دو سویه *لاکتوباسیلوس* مورد آزمایش هنگامی که تحت تاثیر سدیم هیدروکسید و کاتالاز بود فعالیت ضد باکتریایی بر علیه سوش‌های شایع جدا شده از گوشت نداشته، این درحالی است که در حالت فعال یعنی زمانی که باکتری توانایی تولید ترکیب‌هایی نظیر اسید و آب اکسیژنه را داشته و یا تحت چنین شرایطی قرار گیرد می‌تواند خاصیت ضد باکتریایی داشته باشد. در مطالعه‌ای مشابه داوود آبادی و همکاران نشان دادند که *لاکتوباسیلوس فرمنتوم، پاراکازئی، پلانتاروم* و *رامنوسوس* فعالیت مهاری خفیفی را علیه سویه‌های اسهال‌زای *اشریشیاکلی* دارند. همچنین در مطالعه آنان سوپرناتانت *لاکتوباسیل*‌ها وقتی با سود خنثی گردید و تحت تاثیر کاتالاز قرار گرفت فعالیت ضد میکروبی خود را از دست داد اما تیمار سوپرناتانت با پروتئاز و گرما تاثیری بر فعالیت ضد میکروبی آنها نداشت. بنابراین مکانیسم مهاری سویه‌های *لاکتوباسیل* در این پژوهش به پراکسید هیدروژن و اسیدهای آلی نسبت داده شد (Davoodabadi et al., 2015).

از طرف دیگر کوهساری و همکاران در طی مطالعه‌ای به جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک از محصولات لبنی محلی شهرستان گرگان با توان مهار رشد برخی از پاتوژن‌های گوارشی پرداختند. نتایج مطالعه آنان نشان داد که *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* جدا شده از دوغ و پنیر گوسفندی و *لاکتوباسیلوس دلبروکی* و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* جدا شده از دوغ گوسفندی علیه تمامی باکتری‌های پاتوژن مورد مطالعه یعنی *اشریشیاکلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس* و *سیتروباکتر فروندی* فعالیت ضدباکتریایی قابل توجهی دارند (کوهساری و همکاران، ۱۳۹۷). در تحقیق حاضر نیز *لاکتوباسیلوس دلبروکی* دارای تاثیر ضد میکروبی بر اکثر باکتری‌های جداسازی شده بود. بدنبال آن دری و همکاران بیشترین اثر ضد میکروبی سویه‌های *لاکتوباسیل* جدا شده از مدفوع کودکان را علیه *اشریشیاکلی* و *سالمونلا* گزارش کردند (دری و همکاران، ۱۳۸۹). در این بررسی نیز *لاکتوباسیل*‌ها بیشترین اثر را بر باکتری *اشریشیاکلی* نشان دادند.

اوسوکوارتنگ و همکاران (۲۰۱۵) در طی یک تحقیق نشان دادند که باکتری *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* جدا شده از خمیر ارزن تخمیری از منطقه غرب آفریقا دارای فعالیت ضد میکروبی علیه دو باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز و استافیلوکوکوس آرئوس* است اما در برابر *اشریشیاکلی وسالمونلا انترایتیدیس* هیچ گونه اثر ضد میکروبی ندارد (Owusu-Kwarteng et al., 2015).

در تحقیق حاضر نیز باکتری *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* مورد استفاده نسبت به *لاکتوباسلوس دلبروکی* تاثیر قابل توجهی بر باکتری‌های گرم منفی جدا شده از انواع گوشت نداشته که از این نظر با مطالعه فوق مطابقت دارد.

یاسمین و همکاران نیز در طی مطالعه ایی چهار گونه از باکتری‌های اسید لاکتیک (*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، لاکتو باسیلوس دلبروکی، لاکتو باسیلوس بولگاریکوس، لاکتوباسیلوس پلانتاروم*) را از ماست جداسازی کردند و باکتریوسین آنها را به روش بارش آمونیوم از کشت مایع استخراج کردند و فعالیت ضد قارچی آنها را بر علیه قارچ‌های *پنی سیلیوم، موکور، وآسپرژیلوس نایجر* جدا شده از نان، برنج، پرتقال، لیمو، به روش انتشار در چاهک در pH بین ۲تا ۱۲ و شرایط نگهداری (۲۰-،۴ و ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ روز) و درجه حرارت (۶۰، ۱۰۰، ۱۲۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵دقیقه) مورد بررسی قرار دادند، که بیشترین تاثیر مربوط به باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بود و به طورکلی باکتری‌های اسیدلاکتیک در محدوده pH چهار تا هشت و شرایط دمایی ۲۰- درجه سلسیوس بیشترین اثر را داشتند (Yasmin et al., 2015). برخلاف مطالعه فوق در مطالعه حاضر فقط تاثیر دو سویه استاندارد *لاکتوباسیلوس* بر علیه باکتری‌های جداسازی شده از گوشت مورد بررسی قرار گرفت که بیشترین تاثیر بر باکتری های جدا شده از گوشت مربوط به *لاکتوباسیلوس دلبروکی* گزارش گردید. همچنین در مطالعه یاسمین و همکاران از چهار گونه باکتری جداشده از ماست برعلیه چند نوع قارچ جدا شده از نان، برنج، پرتقال و لیمو در شرایط متفاوت استفاده شد که از این لحاظ با مطالعه حاضر همخوانی ندارد.

نتیجه گیری کلی

با توجه به اثرات زیان‌آور نگهدارنده‌های شیمیایی بر سلامت انسان و نگرانی جوامع در این خصوص، استفاده از باکتری‌های اسیدلاکتیک و متابولیت‌های آنها مانند باکتریوسین‌ها در کنترل باکتری‌های بیماری‌زا و فسادزا می‌تواند گزینه مناسب جهت نگهداری موادغذایی باشد. همچنین استفاده از باکتریوسین‌ها می‌تواند راهکاری جهت جلوگیری از بروز سویه‌های مقاوم به آنتی-بیوتیک‌ها باشد. بنابراین با توجه به اثرگذاری *لاکتوباسیل*‌های مورد مطالعه در این پژوهش بر باکتری‌های جداسازی شده از گوشت، به منظور تایید بیشتر تاکید می‌شود که اثر این *لاکتوباسیل*‌ها در سیستم‌های غذایی دیگر و بر روی سایر باکتری‌ها مورد مطالعه قرار گیرد.

منابع

۱. باصری صالحی، مجید.، بهادر، نیما. ۱۳۹۱. باکتری شناسی تشخیصی. چاپ اول. نوید شیراز.صفحه ۸۳-۳۰.

۲. دری، کرامت اله.، حمایت خواه جهرمی، وحید.، نامدار، نجمه.، کارگر جهرمی، حسین. (۱۳۸۹). بررسی اثر بازدارندگی گونه های *لاکتوباسیلوس* جدا شده از مدفوع کودکان بر رشد برخی از باکتری های بیماریزای روده و معده .فصلنامه علمی پژوهشی دنیای میکروب ها، دوره سوم، شماره ۴، صفحه ۲۳۷-۲۲۹.

۳. رومیانی، لاله.، قائنی، منصوره.، احمدی، سارا. (۱۳۹۱). بررسی آلودگی باکتریایی پنج گونه از ماهیان دریایی عرضه شده در بازار اهواز و آبادان. مجله زیست شناسی دریا، دوره چهارم، شماره ۴، صفحه ۷۹-۷۱.

۴. شکرفروش، سید شهرام.، رکنی، نوردهر.، کریم، گیتی.، رضوی روحانی، سید مهدی.، مهدی کیایی، سید محمد.، عباس والی، مریم. (۱۳۹۱). بررسی مطالعات انجام شده در زمینه آلودگی مواد غذایی با منشاء دامی به باکتری‌های بیماری‌زا در ایران؛ بخش دوم: گوشت و فرآورده‌های گوشتی. بهداشت مواد غذایی، دوره دوم، شماره ۳، صفحه ۱۴-۱.

۵. صادقی، احسان.، هاشمیان، امیر حسین.، محمدی، میترا.، محمدی، رضا. (۱۳۹۱). بررسی خصوصیات شیمیایی و میکروبیولوژیکی فراورده‌های گوشتی مورد استفاده در شهر کرمانشاه. علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران، سال هفتم، شماره ۵، صفحه ۲۸۷- ۲۸۱.

۶. صداقت، ناصر.، محمد، حسینی مهدی.، خشنودی نیا، سارا.، حبیبی نجفی، محمد باقر.، کوچکی، آرش. (۱۳۹۳). بررسی خواص ضد میکروبی فیلم کربوکسی متیل سلولز حاوی اسانس گشنیز و پوست لیموترش و تأثیر آن بر افزایش زمان ماندگاری گوشت گوسفند در دمای یخچال. مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران، دوره نهم، شماره ۴، صفحه۶۲-۵۳.

۷. کوهساری، هادی.، رشتی، زینب.، عرب، شهره. (۱۳۹۸). جداسازی باکتری‌های اسیدلاکتیک از محصولات لبنی محلی شهرستان گرگان با توان مهار رشد برخی از بیماریزاهای گوارشی. فصلنامه میکروب شناسی مواد غذایی، دوره ششم، شماره ۳، صفحه ۳۶-۲۲.

8. Adzitey, F., Nurul, H., Rusul, G. 2013. Molecular techniques for detecting and typing of bacteria, advantages and application to foodborne pathogens isolated from ducks. 3 Biotech. 3:97–107.

9. Aymerich, M. T., Garriga, M., Monfort, J. M., Nes, I and Hugas., M. 2000. Bacteriocin-prouducing lactobacilli in Spanish-style fermented sausage, characterization of bacteriocins, Food Microbiol, 17: 33-45.

10. Bonade, A., Murelli, F., Vescovo, M., Scolari, G. 2001.Partial characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* . Lett Appl Microbiol, 33:153–158.

11. Castellano, P., Belfiore, C., Fadda, S., Vignolo, G. 2008. A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. Meat Science. 79: 483-499.

12. Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F., Chikindas, M. L. 2001. Bacteriocins: Safe, natural antimicrobials for food preservation, Int J Food Microbiol. 71: 1-20.

13. Davoodabadi, A., Soltan Dallal, M.M., Lashani, E., Tajabadi Ebrahimi, M. 2015. Antimicrobial Activity of *Lactobacillus* spp. Isolated From Fecal Flora of Healthy Breast-Fed Infants Against Diarrheagenic *Escherichia coli*. Jundishapur J Microbiol. 8: e27852.

14. El-Hadedy, D., El-Nour, SA. 2012. Identification of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* isolated from Egyptian food by conventional and molecular methods.J Genetic Eng Biotech. 10: 129-135.

15. Furuhata, K., Ishizaki, N., Sugi, Y., Fukuyama, M. 2014. Isolation and Identification of Enterobacteriaceae from Raw Horsemeat intended for Human Consumption (Basashi). Biocontrol Sci. 19: 181-8.

16. Gautam, N., Sharma, N. 2009. Bacteriocin: safest approach to preserve food products. Indian J Microbiol . 49:204–211.

17. Guerrieri, E., Niederhausern, S., Messi, P., Sabia, C., Iseppi, R., Anacarso, I. 2009. Use of lactic acid bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes* in a small-scale model. Food Control. 20: 861-865.

18. Hammami, I., Rhouma, A., Jaouadi, B., Rebai, A., Nesme, X. 2009. Optimization and biochemical characterization of a bacteriocin from a newly isolated *Bacillus*

subtilis strain 14B for biocontrol of *Agrobacterium* spp. strains. LETT APPL MICROBIOL. 48: 253-260.
19. Herreros, M.A., Sandoval, H., Gonzalez, L., Castro, J.M., Fresno, J.M., Tornadijo, M.E. 2005.Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). Food Microbiol. 22:455–459.
20. Hinton, A., Jr., Cason, J.A., Ingram, K.D. 2004. Tracking spoilage bacteria in commercial poultry processing and refrigerated storage of poultry carcasses. Int J Food Microbiol. 91: 155–165.
21. Jeevaratnam, K., Jamuna, M., Bawa, A. S. 2005. Biological preservation of foods-Bacteriocins of lactic acid bacteria, IJBT, 4: 446-454.
22. Lopez, R. L., Garcia, M. T., Abriouel, H., Omar, N. B., Grande, M. J., Martinez-Canamero, M., et al. 2007. Semi-preparative scale purification of enterococcal bacteriocin enterocin EJ97, and evaluation of substrates for its production. J Ind Microbiol Biotechnol, 34: 779-785.
23. Minei, C. C., Gomes, B. C., Ratti, R. P., D'Angelis, C. E. M., De Martinis, E. C. P. 2008. Influence of peroxyacetic acid and nisin and coculture with *Enterococcus faecium* on *Listeria monocytogenes* biofilm formation. J Food Prot. 71: 634-638.
24. Owusu-Kwarteng, J., Tano-Debrah, K., Akabanda, F., Jespersen, L. 2015. Technological properties and probiotic potential of Lactobacillus fermentum strains isolated from West African fermented millet dough. BMC Microbiol. 15: 261.
25. Pal, M., Ketema, A., Anberber, M., Mulu, S., Dutta, Y. 2016. Microbial Quality of Fish and Fish Products. Beverage & Food World. 43. 46-49.
26. Rouger, A., Tresse, O., Zagorec, M. 2017. Bacterial Contaminants of Poultry Meat: Sources, Species, and Dynamics. Microorganisms. 5: 50.
27. Sakala, R. M., Hayashidani, H., Kato, Y., Kaneuchi, C. Ogawa, M.2002. Isolation and characterization of *Lactococcus piscium* strains from vacuum packaged refrigerated beef. J Appl Microbiol, 92. 173-179.
28. Vindigni, S.M., Srijan, A., Wongstitwilairoong, B., Marcus, R., Meek, J., Riley, P.L. Mason, C. 2007. Prevalence of foodborne microorganisms in retail foods in Thailand, Foodborne Pathog Dis, 4: 208-15.
29. Wang, G.Y., Wang, H.H., Han, Y.W., Xing, T., Ye, K.P., Xu, X.L., Zhou, G.H. 2017. Evaluation of the spoilage potential of bacteria isolated from chilled chicken in vitro and in situ. Food Microbiol. 63: 139–146.
30. Yasmin, A., Ashraf, M., Arshad, M., Ghulam Muhammad, Gh., Zahid, M.E., Mustafa, B. 2015. Determination of biopreservative effects of bacteriocins isolated from lactic acid producing bacteria against food spoiling fungi . IJCMAS. 4: 88-96.

Role of extracted bacteriocins from standard isolates as biological preservatives against isolated pathogenic bacteria from different types of fresh meat

Behboudipour M[1], Bahador N[2*]

1. Graduated of Biology Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Science, Agriculture and Modern Technology, Shiraz Branch, Islamic Azad university, Shiraz, Iran.

2. Department of Microbiology, Faculty of Science, Agriculture and Modern Technology, Shiraz Branch, Islamic Azad university, Shiraz, Iran.

[*]**Corresponding author:** *bahador@iaushiraz.ac.ir*

Received: 25 November 2019 Accepted: 23 February 2020

Abstract

Due to the increasing demand for the high quality of meat products, long shelf life, and minimum processing, therefore, this study aimed to evaluate the antimicrobial activity of the two standard strains *Lactobacillus delbrukii* subspp delbrukii (PTCC 1333) and *Lactobacillus fermentum* (PTCC 1744) on the most common isolated bacteria from meat. In this study, 50 meat samples including red meat, minced meat, and fish were purchased from different areas of Shiraz city. The samples were transferred to the lab and cultivated in Nutrient Broth as well as blood agar. Then the isolates were purified and the most common isolates identified using biochemical tests. The inhibitory activity of the two strains *lactobacillus* supernatant against the most common isolates was investigated by the good diffusion agar method. As well as to prevent the inhibitory effects of organic acids and H_2O_2, the supernatant was treated with sodium hydroxide and catalase enzyme. Finally, the most common isolates were identified by PCR molecular technique. Common bacteria were reported by the molecular test as *Escherichia coli* (16.6%), *Enterobacter cloacae* (16.6%), *Hafnia alvei* (50%), and *Aeromonas salmonicida* (16.6%). The greatest effect of lactic acid bacteria on *Escherichia coli*, *Hafnia alvei*, and *Aeromonas salmonicida* was observed. Among the two standard strains of lactobacillus, *Lactobacillus delbrukii* has a greater effect on isolated bacteria. The supernatant of the two lactobacilli, without neutralizing with Sodium Hydroxide and catalase, had antimicrobial activity against the most common isolates**.**

Keywords: Bacteriocin**,** *Lactobacillus*, meat, Biological preservation.