

بررسی اثر سویه پروبیوتیک لاکتوکوکوس لاکتیس تولید کننده نایسین

بر کاهش تعداد عوامل میکروبی بیماری‌زا

فهیمة فیروز بخت^۱، ودود رضویلر^{۱*}، سید امیرعلی انوار^۱

چکیده

هدف از این مطالعه ارزیابی اثر سویه لاکتوکوکوس لاکتیس (L. لاکتیس) تولید کننده نایسین بر روی رشد و بقای باکتری‌های پاتوژن در محیط کشت و گوشت مرغ خام در دمای ۱۲ درجه سانتیگراد بوده است. بدین منظور، تعداد $1/5 \times 10^8$ L. لاکتیس به محیط کشت و قطعات گوشت مرغ حاوی $1/5 \times 10^5$ از هر سویه پاتوژن تلقیح شد. تعداد باکتری‌های 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 L. لاکتیس مورد بررسی قرار گرفت. داده‌ها نشان داد که L. لاکتیس اثرات ممانعت‌کنندگی قابل توجهی ($p \leq 0/05$) بر روی پاتوژن‌های مورد مطالعه در BHI مایع و گوشت مرغ داشته است. pH گوشت مرغ تلقیح شده با L. لاکتیس طی ۷ روز نگهداری در ۱۲ درجه سانتی‌گراد به طور معنی‌داری ($p \leq 0/05$) افزایش پیدا کرد و از $5/0 \pm 0/1$ در روز صفر به $6/9 \pm 0/2$ در روز ۷ رسید. مقدار متوسط پروتئین در گوشت مرغ تلقیح شده با L. لاکتیس در ۱۲ درجه سانتی‌گراد از $17/93 \pm 1/05$ در روز صفر به $14/1 \pm 23/25$ در روز هفت رسید و این کاهش مقدار پروتئین از نظر آماری معنی‌دار بود ($p \leq 0/05$). با توجه به فراگیر شدن غذاهای پروبیوتیک و بروز پتانسیل مثبت این نوع فراورده‌های غذایی، مطالعه حاضر نشان داد که L. 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 باکتری‌های 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 عمده‌ترین منابع گوشتی در تمام دنیاست (۱). اما این محصول مغذی نه تنها به فساد حساس است بلکه در گسترش بیماری‌های با منشأ 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 ویژگی‌ها و عوامل دیگر گوشت مرغ را تا حد زیادی محبوب‌ترین محصول غذایی در سراسر جهان کرده است. با توجه به ارتباط ذاتی گوشت مرغ با پاتوژن‌های غذایی مانند گونه‌های سالمونلا و کمپیلوباکتر نگرانی‌های روز افزون در مورد ایمنی مرغ‌ها وجود دارد (۳). مطالعات مختلف نشان داده‌اند که آلودگی متقاطع در طی فرآوری گوشت مرغ و متعاقب آن افزایش تعداد باکتری در محصول نهایی ممکن است اتفاق بیفتد. تاکنون بیش از ۳۰ جنس میکروارگانیسم شامل هفت پاتوژن کمپیلوباکتر، سالمونلا، یرسینیا انتروکولیتیکا، کلاستریدوم پرفرینژنس، لیستریا مونوسایتوژنز، استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلاسی O157:H7 در ارتباط با آلودگی محصولات مرغ شناسایی شده‌اند (۴). امروزه در طی مطالعات متعدد مشخص شده است که لاشه طیور به عنوان یک منبع مهم آلودگی به پاتوژن‌های سالمونلا، اشرشیاکلاسی و استافیلوکوکوس اورئوس مطرح است و تعیین فراوانی و میزان آلودگی باکتری در این فراورده 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 برنامه‌های 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 (۶).

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

آزمایشگاهی به بررسی اثرات سویه های پروبیوتیک لاکتوکوکوس لاکتیس تولید کننده نایسین بر کاهش تعداد عوامل میکروبی بیماری زای گوشت مرغ پردازد.

مواد و روش کار

تهیه و کشت سویه های میکروبی

میکروارگانسیم های مورد مطالعه در این تحقیق شامل: *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* ATCC 11454، *Staphylococcus*، *Salmonella enterica* ATCC1306، *aureus* ATCC 25923 و *E. Coli* ATCC25929 از سازمان پژوهش های علمی صنعتی ایران تهیه شدند. سپس کشت های لیوفیلیزه پاتوژن ها در (Brain Heart Infusion) BHI (Broth) مایع و کشت لیوفیلیزه لاکتوکوکوس لاکتیس در محیط MRS مایع به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انجام شد. برای تهیه دوز تلقیح باکتری های مورد مطالعه، از روش سنجش جذب نوری به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر استفاده شد و از باکتری های گرمخانه گذاری شده برای تهیه سوسپانسیون با جذب نوری معادل نیم مک فارلند ($1/5 \times 10^8$) استفاده شد (۱۱).

اثر پروبیوتیک بر روی نمودار رشد باکتری ها در محیط

کشت BHI مایع

سویه لاکتوکوکوس لاکتیس نایسین مثبت ATCC 11454 با دوز $1/5 \times 10^8$ CFU/ml به محیط BHI مایع حاوی $1/5 \times 10^5$ CFU/ml پاتوژن تلقیح شد و از محیط فاقد پاتوژن به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. لوله های مورد مطالعه تلقیح شده در دمای ۱۲ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد و در روزهای صفر، سه، پنج و هفت پس از تلقیح، جمعیت لاکتوکوکوس لاکتیس و پاتوژن ها پس از رقت سازی، کشت و شمارش استافیلوکوکوس اورئوس در محیط برد پارکر آگار، اشرشیاکلاهی در محیط VRBA (Violet Red Bile Agar)، سالمونلا/اینتریتیدیس در محیط

مطالعات اثبات کرده اند که باکتری های اسید لاکتیک (LAB) دارای اثر ممانعت کنندگی علیه باکتری های پاتوژن و ارگانسیم های عامل فساد هستند. این اثر در نتیجه تولید اسید، پراکسید هیدروژن و باکتریوسین اتفاق می افتد. اثر ممانعت کنندگی LAB در غذاهای تخمیری مثل ماست و سوسیس تخمیری در طول رشد آن دیده می شود، ولی در غذاهای غیر تخمیری در شرایط نگه داری در شرایط یخچالی اتفاق می افتد. هرچند رشد LAB در گوشت تازه مطلوب نیست اما افزودن این باکتری ها به گوشت در شرایط یخچالی به علت تولید مواد ممانعت کننده توسط آنها بسیار مفید است. بعضی LAB ها در شرایط یخچالی رشد نمی کنند اما مواد ممانعت کننده تولید می کنند، بنابراین می توانند 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 سویه های جدا شده از این باکتری توانایی تولید نایسین را دارند (۸). نایسین یک باکتریوسین با خاصیت ضد باکتریایی علیه چندین میکروارگانسیم 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 پاتوژن ها می گردد و از سوی دیگر به بافت انسانی آسیب نمی رساند (۱۰). امروزه استفاده از پروبیوتیک ها به عنوان یک روش کارآمد برای بهبود سلامت روده و جایگزینی برای آنتی بیوتیک ها به شمار می رود. البته پروبیوتیک ها، مخصوصا سویه های LAB، به طور گسترده ای در صنایع غذایی برای تخمیر استفاده می شوند، اما از سوی متخصصان بهداشت به دلیل تاثیرات بالقوه آن، توجه زیادی را به عنوان نگه دارنده غذایی به خود جلب کرده اند. مطالعه حاضر بر آن بوده است تا در شرایط

درجه سانتی‌گراد به عنوان دمایی که امکان رشد بهتر به لاکتوکوکوس لاکتیس می‌دهد انتخاب گردید. رشد و بقای لاکتوکوکوس لاکتیس و پاتوژن‌ها 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.

اندازه‌گیری 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 $(6.25 \times N)$ اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری pH ۱۰ میلی‌گرم نمونه در ۴۰ 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

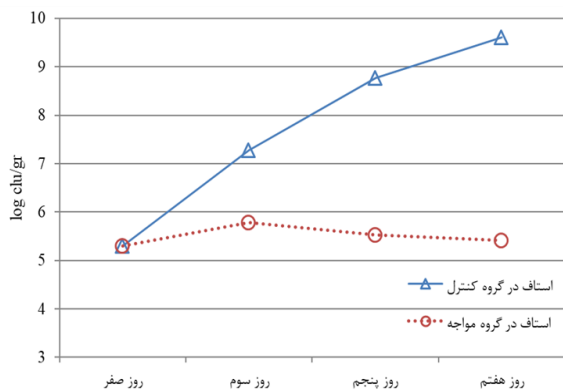
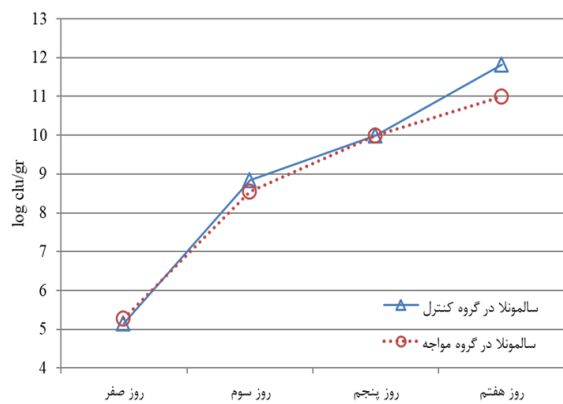
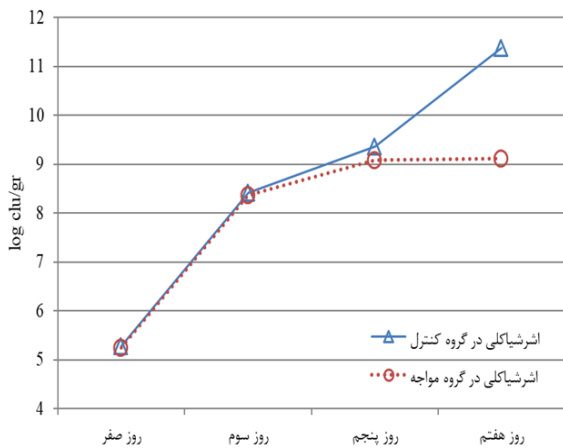
برای تأیید حضور ژن نایسین در لاکتوکوکوس لاکتیس، استخراج DNA به وسیله کیت High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Germany) و طبق دستورالعمل سازنده صورت گرفت. سکانس حفاظت شده‌ی ژن هدف لاکتوکوکوس لاکتیس در سایت NCBI تعیین شد. پرایمرها با استفاده از سکانس شناسایی شده طراحی شدند (جدول ۱). سپس واکنش 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 در ۵۶ درجه، یک دقیقه در ۷۲ درجه و سنتز پایانی در ۷۲ درجه برای ۵ دقیقه. تفکیک قطعات DNA توسط الکتروفورس بر روی ژل آگاروز دو درصد و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم برامید انجام شد.

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 سویه‌ها درگیر شوند. نمونه‌ها در ۴ گروه شامل ۱: گروه کنترل پروبیوتیک: نمونه تلقیح شده با $10^8 \times 1/5$ لاکتوکوکوس لاکتیس، گروه ۲: گروه کنترل پاتوژن‌ها: نمونه تلقیح شده با $10^5 \times 1/5$ از هر یک از پاتوژن‌های مورد مطالعه، ۳: گروه مواجهه پروبیوتیک و پاتوژن: شامل نمونه‌های تلقیح شده با لاکتوکوکوس لاکتیس و $10^5 \times 1/5$ از هر یک از پاتوژن‌ها. و گروه ۴: 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 ۴۵ درجه گزارش شده است و با توجه به دمای مراکز بسته‌بندی 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

رقابتی میکروارگانیسم‌ها است. علاوه بر این داده‌ها نشان داد که سالمونلا در گروه مواجهه با لاکتوکوکوس طی هفت



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

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

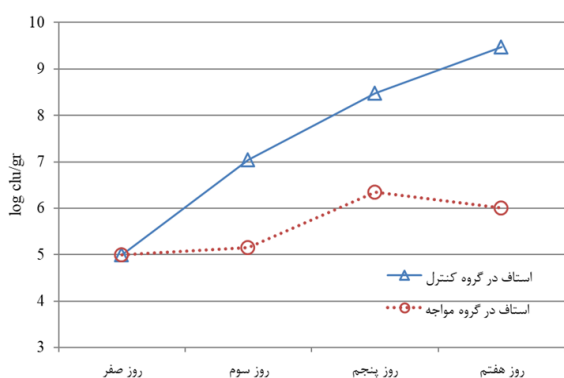
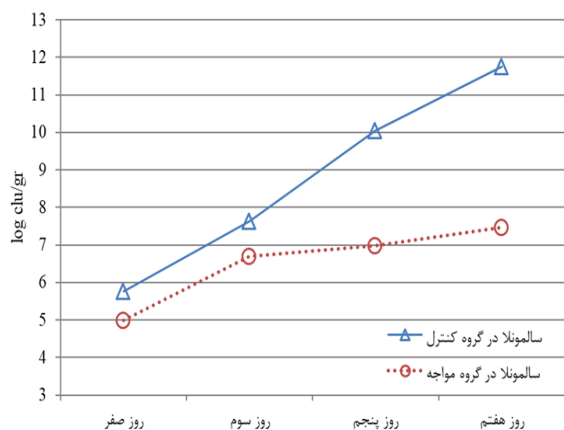
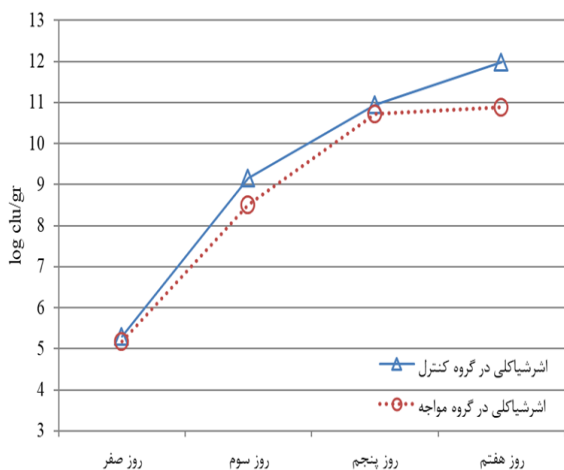
ژن	محصول	توالی پرایمر (5' → 3')	سایز
nisin			
nisin A	Nisin Structural Gene	F: TTCGAAGAAAGATTCAGGTGC	۱۵۵
		R: TTGATTGGTTATTGGCTTACGTG	جفت
			باز

نتایج

نتایج اثر ضد میکروبی پروبیوتیک در محیط کشت

مطالعه اثر لاکتوکوکوس لاکتیس روی منحنی رشد باکتری-های اشرشیاکلاهی O157:H7، سالمونلا اینتریتیدیس و استافیلوکوکوس اورئوس در ۱۲ درجه سانتیگراد در محیط BHI مایع نشان داد که تعداد اشرشیاکلاهی در گروه مواجهه با پروبیوتیک از روز صفر تا هفت به طرز معنی داری کاهش یافته بود ($p < 0.05$). اختلاف آماری معنی دار در تعداد سالمونلا و استافیلوکوکوس اورئوس در گروه‌های کنترل و مواجهه با لاکتوکوکوس در روزهای سه و هفت نشان دهنده اثر ممانعت‌کنندگی 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 معنی دار تعداد اشرشیاکلاهی در مواجهه با لاکتوکوکوس در روزهای پنج و هفت روز پس از تلقیح در مقایسه با گروه کنترل دیده شد ($p < 0.05$). علی‌رغم افزایش رشد معنی دار لاکتوکوکوس در گروه مواجهه با اشرشیاکلاهی از روز صفر تا پنج تعداد لاکتوکوکوس در این گروه در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی دار نشان می‌دهد که ناشی از اثر رشد



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

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 تلفیح شده با لاکتوکوکوس لاکتیس طی ۷ روز نگهداری در گروه کنترل لاکتوکوکوس لاکتیس در ۱۲ درجه سانتی‌گراد از 5.9 ± 0.1 در شروع دوره نگه‌داری بود که به طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد ($P \leq 0.05$) و در پایان دوره نگهداری به 6.9 ± 0.2 رسید.

نتایج بررسی مولکولی

علیرغم اینکه در زمان خرید باکتری 11454 *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* ATCC شده بود، وجود این ژن به روش PCR معمولی (conventional PCR) مورد تأیید 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)

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 $P \leq 0.05$ 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 $P \leq 0.05$ می باشند.

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 اشرشیاکالای 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 ترجیحاً رشد در دمای پایین و بیان ژن‌های ضد میکروبی را داشته باشند. در مطالعه ما تعداد میکروارگانسیم‌های گرم منفی و به طور بخصوص سالمونلا اینتریتیدیس در گوشت مرغ در مواجهه با لاکتوکوکوس لاکتیس، کاهش رشد معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل، نشان داد. کاهش سالمونلا اینتریتیدیس و اشرشیاکالای در گوشت مرغ نسبت به BHI مایع را می‌توان با توجه به اثرات رشد رقابتی میکروارگانسیم‌ها و تاثیر pH و سایر عوامل تاثیرگذار بر روی فعالیت باکتریوسین‌ها توجیه کرد. این

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 نگهداری به ۱/۲۵ ± ۱۴/۲۹ رسید. این کاهش مقدار پروتئین از نظر آماری معنی‌دار بود ($P \leq 0.05$).

بحث

گوشت مرغ از اصلی‌ترین مواد غذایی مورد مصرف انسان است و مسمومیت با آن از مهمترین مواد مسمومیت غذایی به شمار میرود که سالانه هزاران نفر را در بیمارستان بستری مینماید (۱۴). castellano و همکاران در سال ۲۰۱۹ در مطالعه ای مروری در زمینه تحقیق حاضر اعلام کردند که بیشتر میکروارگانسیم‌های مورد مطالعه برای جایگزینی مواد نگهدارنده لاکتوکوک ، انتروکوک ، پدیوکوک و لاکتوباسیلوس هستند که باکتریوسین‌هایی مانند نایسین ، انتروسین ، پدیوسین ، پنتوسین و ساکاسین تولید می‌کنند و

فعالیت نایسین تاثیر گذارند. در مطالعه ما نیز کاهش قابل ملاحظه‌ای در تعداد استافیلوکوکوس اورئوس در BHI مایع از روز سه تا پنج، در مواجهه با لاکتوکوکوس لاکتیس در مقایسه با گروه کنترل، مشاهده شد. این نتایج مشابه نتایج مشاهده شده توسط میراندا و همکاران در سال ۲۰۱۸ می باشد (۱۷) که کاهش تعداد لیستریا مونوسیژنوز را در گروه مواجهه 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 احتمالاً 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 مونوسیژنوز در حضور لاکتوکوکوس لاکتیس تولید کننده نایسین در مطالعه میراندا و همکاران در سال ۲۰۱۸ نوسانات کمتری را در BHI نسبت به شیر نشان داد که نشان دهنده بقای بهتر لیستریا در شیر می‌باشد. علی‌رغم 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، پروتئین‌ها و کربوهیدرات‌ها و یا بیان ژن‌های مقاومت در آن باشد.

در مطالعه میراندا و همکاران در سال ۲۰۱۸ بالاترین مقدار کاهش pH در BHI مایع بین ساعت ۱۲ تا ۱۵ در ۲۰ درجه سانتی‌گراد به اندازه ۱/۳۱ و در ۶ تا ۹ ساعت در ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مقدار ۱/۶۳ اتفاق افتاد. مقدار pH پس از ۲۴ ساعت به ۵/۶۸ در ۲۰ درجه سانتی‌گراد و ۵/۳۹ در ۳۰ درجه سانتی‌گراد رسید. تغییرات pH شیر با دامنه تغییرات ۰/۲۲ و ۰/۷۷ پس از ۲۴ ساعت به pH نهایی ۶/۴۶ و ۵/۹۲

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 شلاته‌کننده بر روی میکروارگانیسم‌های گرم منفی بستگی به حساسیت سویه و نوع باکتریوسین و هم چنین pH محیط دارد. در این مطالعه تاثیر کاهشی مشاهده شده بر روی اشرشیاکلاهی نسبت به سالمونلا کمتر است. این نتایج مشابه نتایج مشاهده شده توسط Castellano و همکاران است. این محققان در مطالعه ای اثر ممانعت‌کنندگی باکتری‌های LAB بر روی میکروارگانیسم‌های گرم منفی در دو دمای ۶ و ۲۱ درجه سانتی‌گراد و در محیط TSB مشاهده کردند افزودن باکتریوسین‌های تولید شده توسط لاکتوباسیلوس کورواتوس یعنی لاکتوسین همراه با EDTA و سدیم لاکتات اثر ممانعت‌کنندگی بیشتری روی اشرشیاکلاهی در مقایسه با ترکیب عوامل شلاته‌کننده و نایسین تولید شده توسط لاکتوکوکوس لاکتیس داشت. علاوه بر این اثرگذاری باکتری‌های LAB روی اشرشیاکلاهی بستگی زیادی به حساسیت سویه و pH محیط دارد به طوریکه اشرشیاکلاهی 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 (۱۶). 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

- 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.

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 $0/1 \pm 5/9$ در شروع دوره نگهداری به $0/2 \pm 6/9$ رسید. این مسئله در کنار کاهش معنی‌دار مقدار پروتئین از $1/05 \pm 17/93$ به $1/25 \pm 14/29$ طی هفت روز نگهداری نشان دهنده این است که احتمالاً لاکتوکوکوس ابتدا با مصرف ذخایر کربوهیدرات باعث ایجاد شرایط اسیدی شده ولی طی دوره نگهداری همزمان با اتمام ذخایر کربوهیدراتی توسط لاکتوکوکوس، احتمالاً باکتری‌های بومی موجود در گوشت شامل میکروارگانیسم‌های گرم منفی و باکتری‌های اسید لاکتیک، پروتئین را لیز کرده و تولید ترکیباتی می‌کنند که pH را افزایش می‌دهد.

Pothakos و همکاران در سال ۲۰۱۵ اعلام کردند که LAB ها اگر چه دارای نقش‌های مثبت هستند اما می‌توانند با ترشح متابولیت‌های 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 بررسی‌های بیشتر قرار گیرد. با توجه به فراگیر شدن غذاهای پروبیوتیک و بروز پتانسیل مثبت این نوع فراورده‌های غذایی، مطالعه حاضر نشان داد که لاکتوکوکوس‌های تولیدکننده نایسین می‌توانند تا زمان مشخصی باعث حفظ تازگی مرغ شده و از فساد آن در اثر افزایش جمعیت باکتری‌های 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

- 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.

