

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

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 آمده نگهداری شده در یخچال به منظور 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 مونوسیتوژن 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 به عنوان کنترل زیستی در مواد غذایی مطرح‌اند. هدف این مطالعه استفاده از لاکتوباسیل در کنترل رشد لیستریا مونوسیتوژن می‌باشد.

**مواد و روش کار:** 65 نمونه گوشت از کشتارگاه ارومیه شد. سویه‌های جداشده ابتدا با روش‌های فنوتیپی (مورفولوژی، رنگ‌آمیزی گرم و تست کاتالاز) مورد ارزیابی قرار گرفتند. به منظور شناسایی دقیق‌تر از تست تخمیر قندها و روش مولکولی نیز استفاده گردید. سپس خاصیت ضدباکتریایی آن‌ها بر اعلیه لیستریا مونوسیتوژن 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 مونوسیتوژن نشان دادند.

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

**کلیدواژه‌ها:** گوشت، لاکتوباسیل، PCR، خاصیت ضدباکتریایی، لیستریا مونوسیتوژن

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

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

Email: sururkhalili@yahoo.com

فراوری را طی می‌کنند و غذاهای آمده مصرف توجیه کند.<sup>(۲)</sup> 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.<sup>(۳)</sup> مطالعات متعددی نشان داده‌اند که باکتری‌های اسیدلاکتیک می‌توانند رشد لیستریا مونوسیتوژن را در گوشت و غذاهای دریابی کاهش دهد و سایر عوامل پاتوژن با منشأ غذایی (شریشیاکلی، سودوموناس آئروژن، سالمونلا تیفی موریوم، سالمونلا انتریتیدیس و استافیلکوکوس

### مقدمه

در بین باکتری‌های با منشأ غذایی لیستریا مونوسیتوژن 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.<sup>(۱)</sup> کنترل لیستریا مونوسیتوژن، به علت اینکه می‌تواند در گستره وسیعی از محیط‌ها زنده باقی بماند به عنوان یک چالش مطرح است. همین مسئله می‌تواند مشکل مقابله با حضور و رشد لیستریا مونوسیتوژن را در مواد غذایی مخصوصاً در غذاهایی که کمترین

<sup>۱</sup> دانشجوی دکتری تخصصی بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه (نویسنده مسئول)

<sup>۲</sup> استاد گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

<sup>۳</sup> دانشیار گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

کشت‌های حفاظتی تأکید دارند(19). نگهدارنده‌ی زیستی شامل تلچیق گونه‌های خاصی از میکروبها به محصولات غذایی می‌باشد که به طور مستقیم و یا با تولید متابولیتهای خاصی رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و عامل فساد را مهار می‌کنند(20). باکتری‌های اسیدلاکتیک پتانسیل اصلی را به عنوان کشت حفاظتی با تاریخچه طولانی در مورد بی خطر بودن ایفا می‌کنند، همچنین آن‌ها به عنوان 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، روتین، 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 به عنوان کشت حفاظتی در گوشت خام استفاده نمود باید این باکتری‌ها بتوانند در درجه حرارت‌های یخچالی (0-4 درجه سانتی‌گراد) زنده بمانند و با بر 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 نه تنها 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). زمان بر بودن روش‌های کلاسیک استفاده شده برای دسته‌بندی لاکتوباسیل‌ها بر اساس معیارهای بیوشیمیایی و فیلوزنیک همیشه مطابق با ژنتیک گونه‌ها نبوده و متمایز‌کننده دقیق سویه‌ها در یک‌گونه یکسان نمی‌باشد(24). به دلیل حساسیت و صحت نتایج روش‌های ژنتیکی، امروزه به منظور شناسایی باکتری‌های لاکتیک اسید توجه بیشتر به سمت روش‌های ژنتیکی نسبت به روش‌های فنوتیپی صورت PCR می‌گیرد(25).

توسعه روش‌های شناسایی با اساس امکانات تازه‌ای را به منظور شناسایی سریع و واضح لاکتوباسیل‌ها فراهم نموده است(27). هدف از این پژوهش جدادسازی 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 به عنوان اصلی ترین 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 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(11، 10، 9، 8). بیش از 150 گونه از لاکتوباسیل‌ها اخیراً شناسایی شده‌اند و کاربردهای بسیاری از جمله به عنوان کشت استارتتر 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 مانع ندارند(14). به همین دلیل لاکتوباسیل‌ها از لحاظ سلامت ایمن (GRAS)<sup>1</sup> در نظر گرفته می‌شوند و به طور گسترده بیولوژی مولکولی آن‌ها به منظور بهبود ویژگی‌های سودمند آن‌ها موردمطالعه قرار می‌گیرد(15 و 16).

تاكنوں مطالعات زیادی در مورد جدادسازی 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 جدادسازی 229 گونه از لاکتوباسیل‌ها را از گوشت قرمز و 9 گونه را از فراورده‌های گوشتی در سال 1987 توسط lucke و Schallinger<sup>1</sup>، 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 به منظور حفظ خصوصیات حسی گوشت خام در طول مدت نگهداری (بهویژه رنگ و طعم) و همچنین به منظور 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" به خصوص به استفاده از

<sup>1</sup>. Generally recognized as safe

5 دقیقه سانتریفوژ گردید. 50 میکرولیتر از بافر حل کننده اضافه شد و در دمای 65 درجه سانتی گراد به مدت 5 دقیقه انکوبه گردید. در مرحله آخر با دور 12000g به مدت 30 ثانیه سانتریفوژ گردید. کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل آگارز 7/ درصد موردنظری و تأیید قرار گرفت(7).

#### تکثیر قطعه ژن 16S rRNA

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



بعد از آماده سازی پرایمروها با اساس دستورالعمل شرکت سازنده (تکاپوزیست)، برنامه PCR مطابق مراحل زیر انجام گردید. 25 میکرولیتر مخلوط واکنش PCR شامل: 1 میکرولیتر از DNA باکتری های استخراج شده و 24 میکرولیتر از محلول 2/5 Master Mix میکرولیتر تهیه شده (1 میکرولیتر dNTP ، 1 میکرولیتر Buffer Complete، 1 میکرولیتر F. Primer ، 0/3 میکرولیتر Taq DNA پلی مراز و 18/2 R. Primer میکرولیتر آب مقدار دو بار استریل بود(7).

واکنش زنجیره ای پلی مراز با مراحل دنا تواریسیون اولیه در 95 درجه سانتی گراد به مدت 5 دقیقه، به دنبال آن دنا تواریسیون در 95 درجه سانتی گراد به مدت 30 ثانیه، مرحله اتصال پرایمر در 55 درجه سانتی گراد به مدت 30 ثانیه و بسط در 72 درجه سانتی گراد به مدت 30 ثانیه و سرانجام یک مرحله بسط نهایی در 72 درجه سانتی گراد به مدت 7 دقیقه انجام شد(7).

#### تفکیک قطعات تکثیر یافته:

به منظور تفکیک قطعات تکثیر یافته از ژل آگارز 1/5 درصد استفاده شد. ژل مذکور توسط سایبر گرین رنگ آمیزی گردید. سپس نمونه های تکثیر شده به نسبت 4 به 1 با بافر بارگذاری مخلوط و در چاهک های ژل آگارز بارگذاری شدند. پس از اتمام الکتروفورز، نوارهای تکثیر یافته DNA در همه نمونه ها به صورت تک نوار و با اندازه تقریبی 208-220 جفت نوکلئوتید و با غلظت های مناسب با استفاده از نور UV مشاهده و عکس برداری شد(7).

#### تست تخمیر قندها:

بعد از جداسازی باکتری ها به منظور تشخیص گونه های لاکتو باسیل ها، تست تخمیر قندها انجام گردید. در این آزمایش از محیط کشت MRS براث واجد قند موردنظر، معرف فنل رد و لوله دوره امام استفاده شد. پس از تلقیح باکتری به مدت 24 ساعت در 37 درجه سانتی گراد انکوبه شد، بعد از طی دوره انکوباسیون تغییر

#### 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 بیخ به آزمایشگاه منتقل شد. 25 گرم از هر نمونه تحت شرایط استریل به زیب پک های استریل حاوی 225 میلی لیتر MRS برات (شرکت Merck آلمان) اضافه گردید و در داخل استومکر به مدت 2 دقیقه با دور 260 rpm به طور کامل مخلوط گردید و به مدت 6 ساعت در دمای اتفاق انکوبه گردید. سپس رقت سازی در محلول MRS برات تهیه گردید و بر روی محیط کشت های MRS آگار (حاوی 25 میلی گرم بر میلی لیتر معرف برومکروزول گرین) کشت داده شد. پلیت ها به مدت 48 ساعت در دمای 30 درجه سانتی گراد در شرایط میکرو آئرووفیل انکوبه گردیدند (28). پس از اینکوباسیون سه نوع کلینی در پلیت ها مشاهده شد: 1. کلینی های سفیدرنگ محدب و ریز 2. کلینی های سبز روشن بزرگ و 3. کلینی های سبز تیره. کلینی ها به روش رنگ آمیزی گرم رنگ رنگ آمیزی شدند و زیر میکرو سکوپ موردنظر سی قرار گرفتند. سپس تست کاتالاز بر روی هر یک از کلینی های انتخاب شده انجام گردید، بدین صورت که چند قطره از محلول هیدروژن پراکسید 3 درصد بر روی کلینی ها ریخته می شد. کلینی های که تست کاتالاز آن ها منفی بود، انتخاب می شدند (29). کلینی های انتخاب شده خالص سازی شدند و در دمای 70- درجه سانتی گراد در محیط MRS برات حاوی 30 درصد (حجمی / حجمی) گلیسیرون 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 سی سی از کشت 24 ساعته MRS براث باکتری ها به میکروتیوب های 2 میلی لیتر انتقال یافت و به مدت 10 دقیقه با دور 7500g سانتریفوژ گردید. به رسوب باکتری 100 میکرولیتر از بافر پروتئیز K و 5 میکرولیتر از پروتئیز K اضافه گردید و به مدت نیم ساعت در دمای 55 درجه سانتی گراد انکوبه گردید. سپس 400 میکرولیتر از محلول لیز کننده به هر یک از نمونه ها اضافه شد و به مدت 20-15 ثانیه ور تکس گردید. در مرحله بعد 300 میکرولیتر محلول رسوب دهنده اضافه و به مدت 5 ثانیه ور تکس شده و با دور 12000g به مدت 10 دقیقه سانتریفوژ گردید و سپس مایع رویی دور ریخته شد. یک میلی لیتر بافر شستشو دهنده به رسوب اضافه گردید و به مدت 3-5 ثانیه ور تکس شده و با دور 12000g به مدت

رنگ محیط از قرمز به زرد و تولید گاز نشان دهنده مشیت بودن

تخمیر قند مربوطه بود(30).

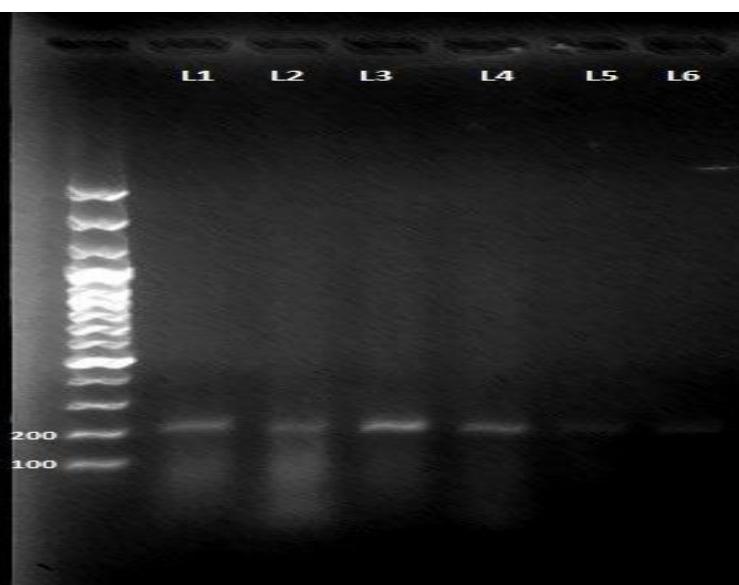
**آزمایشات میکروبی:**

**انتشار در چاهک:**

فعالیت ضد باکتریایی لاکتوباسیل‌ها به روش چن و همکارانش با تغییرات جزئی انجام گرفت(31). کشت شبانه باکتری لیستریا مونوسیتیوژنر با غلظت  $10^6$  CFU/ml به میزان 100 میکرولیتر بر روی محیط BHI آگار پخش گردید، چاهک‌هایی به فتر 6 میلی‌متر بر روی محیط کشت ایجاد گردید و 30 میکرولیتر از مایع رویی کشت شبانه لاکتوباسیل‌ها فاقد سلول (سانتریفیوژ 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 مونوسیتیوژنر 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 مهاری با استفاده از کولیس اندازه‌گیری شد(32).



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

ستون اول: DNA Ladder      ستون سوم: نمونه 2 (L<sub>2</sub>)      ستون پنجم: نمونه 4 (L<sub>4</sub>)      ستون هفتم: نمونه 6 (L<sub>6</sub>)  
 ستون دوم: نمونه 1 (L<sub>1</sub>)      ستون چهارم: نمونه 3 (L<sub>3</sub>)      ستون ششم: نمونه 5 (L<sub>5</sub>)

**جدول (۱): نتایج تست تخمیر قند**

نمونه ها	ساقچه	پودر	لیکن	ارگانیسم احتمالی													
L <sub>1</sub> , L <sub>2</sub>	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	لاکتوباسیلوس کانزی
L <sub>4</sub> , L <sub>5</sub> , L <sub>6</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	پلاتارتام	
L <sub>3</sub>	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس	

**جدول (۲): قطر هاله ممانعت از رشد پاتوژن لیستریا مونوسیتوژنر توسط سویه های لاکتوباسیل بر حسب میلی متر به روش انتشار در چاهک**

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

**جدول (۳): قطر هاله ممانعت از رشد پاتوژن لیستریا مونوسیتوژنر توسط سویه های لاکتوباسیل بر حسب میلی متر به روش نقطه گذاری**

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

PCR برای شناسایی باکتری های اسید لاکتیک استفاده می شود. در مطالعه انجام شده در مرحله اول 21 نمونه بر اساس شکل کلی ها، رنگ آمیزی گرم و تست کاتالاز انتخاب شدند و در مرحله بعد 6 گونه از لاکتوباسیل ها با روش PCR مورد تأیید نهایی قرار گرفتند. بر طبق نتایج تست های ضد باکتریایی لاکتوباسیل های جدایشده از گوشت گاو دارای اثر مهاری بر روی رشد پاتوژن لیستریا مونوسیتوژنر می باشد. این پاتوژن یکی از مشکلات اساسی در صنایع مواد غذایی بخصوص

### بحث و نتیجه گیری

امروزه باکتری های اسید لاکتیک در صنایع غذایی و سلامت انسان مورد توجه بسیاری از محققان قرار گرفته است. شناسایی باکتری های اسید لاکتیک با استفاده از روش های کلاسیک شامل روش های بیوشیمیابی و مورفولوژی نمی تواند برای شناسایی دقیق گونه ها بکار رود، به همین دلیل امروز شناسایی مولکولی در کنار روش های سنتی استفاده می گردد. روش های مولکولی زیادی از جمله

میزان چشمگیری رشد/شیرشیاکی H7: 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 مونوسیتوژنر 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* را بر روی رشد *Lactobacillus sakei* MN و *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 مونوسیتوژنر را دارا می‌باشد(40). در مطالعه دیگری که توسط Martinez و همکارانش در 2015 بر روی باکتریوسین‌های *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a تولیدشده توسط Martinez و همکارانش در 2015 بر روی باکتریوسین‌های *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a تولیدشده توسط گوشه از گونه لاکتوباسیلوس ساکائی که باکتریوسین‌های تولیدشده توسط گوشه لاکتوباسیلوس ساکائی میزان رشد لیستریا مونوسیتوژنر را در طول مدت نگهداری 28 روزه پنیر در دو درجه حرارت نگهداری (15 درجه سانتی‌گراد) به طور 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 به عنوان یک عامل زیستی مهم در کنترل پاتوژن‌ها از جمله لیستریا مونوسیتوژنر مطرح باشند.

### تشکر و قدردانی

نویسنده‌گان 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:

- 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

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

در سال 1987 Lucke و Schallinger 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 گرفت دارای خاصیت ضد باکتریایی علیه پاتوژن لیستریا مونوسیتوژنر بود که با نتایج حاصل از مطالعه حاضر همانگی دارد(34). در مطالعه دیگری که توسط آنا و همکارانش در سال 2006 صورت گرفت نشان دادند که باکتری‌های اسیدلاکتیک جداسده از سلامی ایتالیایی دارای فعالیت ضدباکتریایی علیه لیستریا مونوسیتوژنر می‌باشند(35). همچنین کاستلانو و همکارانش در سال 2008 باکتریوسین‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک را به عنوان 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 اینکوا، بروکوتیریکس ترموفاکتا دارند(36). و همکارانش در 2009 Petros گوصیات حفاظتی باکتری‌های اسیدلاکتیک و استفاده آن‌ها در گوشت خام مرغ علیه لیستریا مونوسیتوژنر و سالمونلا انتریدیس بررسی کردند. در این مطالعه 635 باکتری اسیدلاکتیک با منشأ غذایی به منظور توانایی کشت حفاظتی در غذاها مورد ارزیابی قرار گرفتند. از بین این باکتری‌ها *Enterococcus faecium PCD71* و *Lactobacillus fermentum ACA-DC179* به عنوان کشت حفاظتی در گوشت مرغ استفاده شدند و کاهش قابل توجهی در تعداد این پاتوژن‌ها مشاهده گردید(37). در سال 2014 Thelma 12 روز در دمای 7 درجه سانتی‌گراد نگهداری کردند و نشان دادند که مواد ضدمیکروبی تولیدی توسط باکتری‌های اسیدلاکتیک به

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, Desmasures 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 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 Monaco 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 plantarum*KCC-10from forage silage with potential beneficial properties. *J Appl Microbiol* 2013; 115:1172-85.
  15. Auputinan P, Tragoonrua 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, González 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 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, 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, Wiećkowicz 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 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 enteritidis*. *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 symbiotic cheese spread. *Food Microbiol* 2015;48:143-52.

# ISOLATION, BIOCHEMICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF LACTOBACILLUS ISOLATED FROM BEEF AND EVALUATING THEIR ANTIBACTERIALEFFECTS 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 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

---

<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, Urmia University, Urmia, Iran