

بررسی اثر باکتری تولید کننده باکتریوسین روی لیستریا منوسایتوژنز و باسیلوس سرئوس

محبوبه میرحسینی (M.Sc.)⁺ ایرج نحوی (Ph.D.)^{**}

روحاکسری کرمانشاهی (M.D.)^{**} منوچهر توسلی (M.D.)^{***}

چکیده

سابقه و هدف: محصولات لبنی اغلب با مشکلاتی مثل دوره نگهداری کوتاه در قفسه‌ها و فقر بهداشتی همراه هستند. از دستاوردهای جدید، استفاده از باکتریوسین‌ها یا سویه‌های تولید کننده باکتریوسین (Bacteriocin) برای کنترل فلور میکروبی غیر مطلوب مثل لیستریا منوسایتوژنز (*Listeria monocytogenes*) و باسیلوس سرئوس (*Bacillus cereus*) در غذاها می‌باشد. در این رابطه اثر مهاري باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس (*Lactococcus Lactis*) تولید کننده مواد شبه نازین (nisin) که جداسازی و شناسایی شده بود، بر لیستریا منوسایتوژنز و باسیلوس سرئوس بررسی شد تا سویه جداسازی شده با سویه های جداسازی شده در کشورهای دیگر مقایسه شود.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق به روش کشت نقطه‌ای و با استفاده از مایع رویی حاصل از کشت ۲۴ ساعته باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس اثر مهاري این باکتری بررسی شد و در نهایت اثر باکتریوسین تولید شده بر روی منحنی رشد لیستریا منوسایتوژنز و باسیلوس سرئوس ارزیابی شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که باکتریوسین تولید شده توسط باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس در محیط مایع بر روی لیستریا منوسایتوژنز و باسیلوس سرئوس اثر مهاري بیش تری دارد.

استنتاج: توجه به اثر مهاري مشاهده شده، استفاده از باکتریوسین این باکتری به صورت مستقیم در مواد غذایی یا کشت آغازگر در محیط مایع برای محافظت از مواد غذایی توصیه می‌شود تا مسمومیت ناشی از فعالیت باکتری‌های نامطلوب در مواد غذایی کاهش یابد.

واژه های کلیدی: لاکتوکوکوس لاکتیس، باسیلوس سرئوس و لیستریا منوسایتوژنز

مقدمه

محصولات لبنی و شیر اغلب با مشکلاتی مثل دوره نگهداری کوتاه در قفسه‌ها و فقر بهداشتی همراه هستند. استفاده از کشت‌های آغاز کننده که قادر به تولید باکتریوسین هستند، یک مسأله عمومی نیست و یک

* دانشجوی دکتری میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان

** استاد گروه زیست شناسی، بخش میکروبیولوژی دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان

*** استادیار گروه زیست شناسی، بخش میکروبیولوژی دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان

تاریخ دریافت: ۸۵/۶/۴ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۸۵/۸/۶ تاریخ تصویب: ۸۶/۴/۱۲

داده شد. بعد به وسیله سانتریفوژ مایع رویی آن جدا شد. سپس طبق منابع معتبر، مایع رویی خنثی شد و سری رقت از آن تهیه شد. پس ۱۰ میکرولیتر از این مایع رویی روی پلیت حاوی ۸ میلی لیتر از محیط TSA YE با ۰/۶ درصد آگار که با 10^6 cfu/ml از باکتری لیستریا یا باسیلوس تلقیح شده بود، قرار گرفت. بعد ایجاد هاله عدم رشد بعد از ۲۴ ساعت بررسی شد. با این روش فعالیت باکتریوسین تولید شده در مقابل این باکتری ها تعیین شد (۵ تا ۳). همین کار در مقابل 10^4 cfu/ml از باکتری لیستریا یا باسیلوس با شرایط قبلی انجام شد.

۳) بررسی اثر مهارى باکتریوسین تولید شده توسط لاکتوکوکوس لاکتیس بر روی منحنی رشد لیستریا و باسیلوس

۲۰ میلی لیتر از مایع رویی تهیه شده به روش قبلی به 10^6 cfu/ml از باکتری لیستریا یا باسیلوس تلقیح شده بود، اضافه شد و طی ۲۴ ساعت رشد این دو باکتری در 600 نانومتر کنترل شد (۵).

بحث

۱- نتایج بررسی اثر باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس به صورت نقطه‌ای نشان داد که باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس در برابر 10^6 cfu/ml از دو باکتری لیستریا منوسایتوزنز و باسیلوس سرئوس، اثر مهارى ندارد که این نتایج با نتایج به دست آمده توسط مارتینز و همکاران (۲۰۰۱) برای لیستریا منوسایتوزنز و لويس (Lewis) و همکاران (۱۹۹۱) برای باسیلوس سرئوس متفاوت است (۶) که شاید به این علت باشد که میزان تولید باکتریوسین در باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس جدا شده در مطالعه ماکم بود و میزان تولید باکتریوسین در سویه مورد استفاده توسط این محققان بیشتر بود. تولید

طرح در حال بررسی است. باکتریوسین می‌تواند ابزاری برای بهبود امنیت و کیفیت غذاهای تخمیر شده باشد. باکتریوسین به صورت یک ماده افزودنی در غذاها می‌تواند از رشد باکتری‌های بیماری‌زا و اسپورهای آن‌ها جلوگیری کند. این استراتژی در مقایسه با کاربرد باکتریوسین‌ها یا مواد محافظ دیگر در کشورهای صنعتی، کم‌تر استفاده شده است و ممکن است به عنوان ابزار انعطاف پذیری برای بهبود محافظت از غذاها در محیط به کار گرفته شود و منجر به کاهش مسمومیت‌های غذایی مربوط به غذاهای تخمیر شده شود (۴ تا ۱). در این رابطه اثر لاکتوکوکوس لاکتیس تولید کننده مواد شبه نیزین که در مراحل قبل جدا شده است (۵) بر روی لیستریا منوسایتوزنز و باسیلوس سرئوس بررسی شد تا معلوم شود اثر مهارى سویه جدا شده تا چه حد است و باکتری جدا شده از محیط با سویه‌های جدا شده در جاهای دیگر مقایسه شود.

مواد و روش‌ها

بررسی اثر مهارى باکتری تولید کننده مواد باکتریوسین مانند روی لیستریا و باسیلوس
(۱) روش نقطه‌ای:

ابتدا باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس در MRS برات کشت داده شد و ۲ میکرولیتر از آن بر روی محیط TSA YE قرار داده شد بعد از رشد آن در شرایط بی‌هوای، یک لایه رویی از محیط برین هرت اینفیوژن که با 10^6 cfu/ml از لیستریا منوسایتوزنز PTCC1164 یا باسیلوس سرئوس PTCC1015 تلقیح شده بود، بر روی آن اضافه شد. بعد از ۲۴ ساعت، تشکیل هاله عدم رشد بررسی شد (۶).

(۲) با استفاده از مایع رویی از کشت ۲۴ ساعته از لاکتوکوکوس

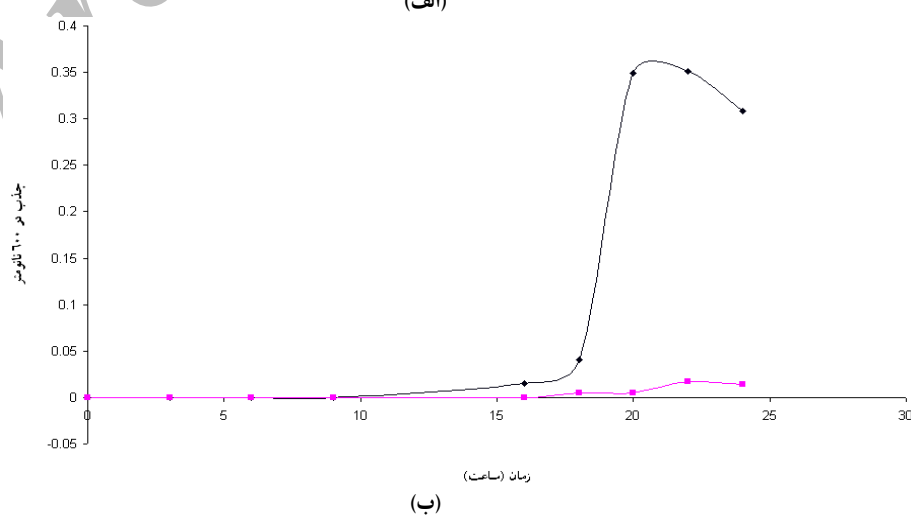
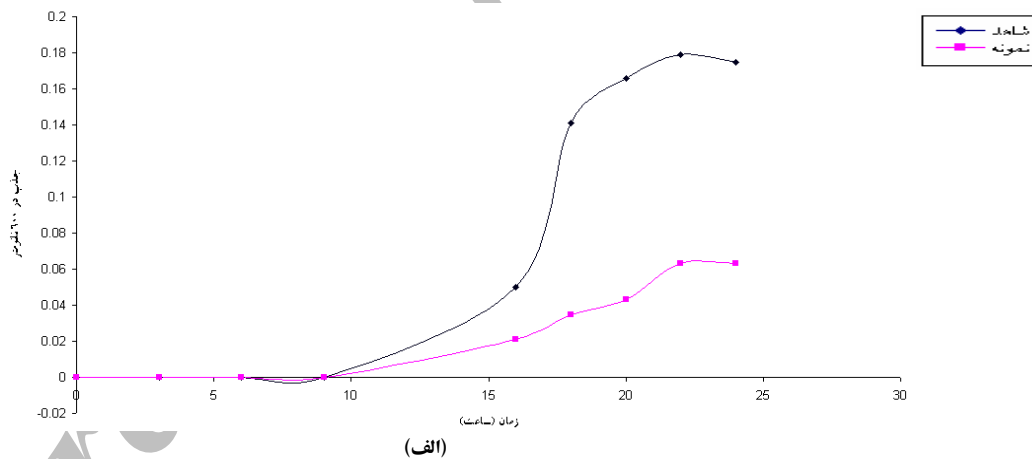
باکتری لاکتوکوکوس در محیط MRS برات کشت

باکتریوسین توسط باکتری جداسازی شده یا مقاومت بیشتر باسیلوس و لیستریا در محیط جامد باشد. ولی وقتی تعداد باسیلوس و لیستریا به 10^4 cfu/ml کاهش یافت، نتایج نشان داد که هر دو باکتری در این روش به باکتریوسین تولید شده توسط لاکتوکوکوس حساس بودند و فعالیت باکتریوسین تولید شده در مقابل این ۲ باکتری 1600 AU/ml بود. این نتایج نشان می‌دهد که میزان تلقیح اولیه باکتری بر روی اثر مهار باکتریوسین تولید شده، موثر بوده است.

۳- در نهایت رشد 10^6 cfu/ml از باسیلوس و لیستریا در محیط مایع در حضور باکتریوسین تولید شده بررسی شد (شکل شماره ۱).

باکتریوسین در این سویه‌ها 12800 AU/ml ولی تولید باکتریوسین در سویه جدا شده در مطالعه حاضر ما 1600 AU/ml بود. بنابراین تفاوت در سویه‌های به کار رفته ممکن است باعث ایجاد نتایج متفاوت شده باشد. در نتیجه این باکتری، وقتی تعداد باسیلوس و لیستریاها 10^6 cfu/ml است، اثر مهار بر رویشان ندارد (۵).

۲- نتایج بررسی اثر باکتریوسین تولید شده توسط روش استفاده از مایع رویی حاصل از باکتری لاکتوکوکوس بر روی باسیلوس و لیستریا نشان داد که باکتریوسین تولید شده توسط لاکتوکوکوس بر روی باسیلوس و لیستریا وقتی تعداد آنها 10^6 cfu/ml است، اثر مهار نداشت که این شاید به علت میزان تولید کم



شکل شماره ۱: بررسی اثر باکتریوسین تولید شده توسط لاکتوکوکوس لاکتیس روی لیستریا منوسایتوزنز (الف) و باسیلوس سرئوس (ب)

لاکتوکوکوس در کلاس باکتری‌های امن برای انسان قرار دارد (۲،۱) شاید بتوان نتیجه گرفت که این باکتری و باکتریوسین تولید شده توسط آن در محیط مایع و تا حدودی محیط جامد وقتی تعداد باکتری‌ها کم باشد به عنوان مادهٔ محافظ قابل استفاده می‌باشد.

همچنین می‌توان از این باکتری به عنوان کشت آغازگر در تخمیر استفاده کرد تا از رشد باکتری‌های غیر مطلوب مثل باسیلوس سرئوس و لیستریامنوسایتوزنز در غذاهای تخمیر شده جلوگیری شود و باعث کاهش آلودگی و مسمومیت غذایی ناشی از باسیلوس سرئوس و لیستریا منوسایتوزنز شود (۴،۳).

نتایج نشان داد که باکتریوسین تولید شده طی ۲۴ ساعت تقریباً به طور کامل اثر مهاري روی رشد لیستریا دارد و اثر بازدارندگی آن روی رشد باسیلوس خیلی زیاد است. این نتایج، کمی با نتایج به دست آمده توسط اولاساپو (olasapo) و همکاران (۱۹۹۹) برای باسیلوس سرئوس و ایوانووا (Ivanova) و همکاران (۲۰۰۰) برای لیستریا اینوکوا متفاوت است که شاید به علت تفاوت در نوع سویه‌های به کار رفته باشد. به علت وجود اثر مهاري باکتریوسین تولید شده توسط لاکتوکوکوس در مقابل 10^4 cfu/ml باسیلوس و لیستریا در محیط جامد و همچنین اثر مهاري آن در مقابل 10^6 cfu/ml باسیلوس و لیستریا در محیط مایع و با توجه به این موضوع که

فهرست منابع

1. Chen H. Bacteriocins and their food applications. *CRFSFS*; 2003; 82-100.
2. Guinane CM. Microbial solutions to microbial problems; lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota in food. *J Appl Microbiol* 2005; 1316-1325.
3. Nandakumar R. Quantification of nisin in flow-injection immunoassay system. *Biosens Bioelec* 1999; 241-247.
4. Olasapo NA. Occurrence of nisin z production in *Lactococcus lactis* BFE 1500 isolated from wara, a traditional Nigerian cheese product. *Int J Food Microbiol* 1999; 141-152.
5. Mirhossaini M, Nahvi I. Isolation of bacteriocin producing *Lactococcus lactis* strain, from dairy products. *Int J Dairy Sci* 2006; 51-56.
6. Lewis CB, Montville T J. Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *J Microbiol Methods* 1991; 145-150.
7. Ivanova I. Detection, purification and partial characterization of a novel bacteriocin substance from Boza-Bulgarian Cereal beverage. Biocata- 2000. *Fundam Appl* 2000; 47-53.