بررسی بازدارندگی مایع رویی حاصل از کشت ۱۰ سویه بومی منتخب اسید لاکتیک علیه باکتری‌های شاخص عامل مسمومیت غذایی

پریسا پورعبدی سرابی[۱]، علیرضا تاری نژاد[۲*]، محمد امین حجازی[۳]

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، دانشکده کشاورزی، تبریز، ایران
۲. دانشیار گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، دانشکده کشاورزی، تبریز، ایران
۳. فوق دکتری، دانشیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمال غرب و غرب کشور، تبریز، ایران
*نویسنده مسئول مکاتبات: atarinejad@yahoo.com
(دریافت مقاله: ۹۵/۱۰/۱۷ پذیرش نهایی: ۹۶/۸/۲۰)

چکیده

شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک تولیدکننده باکتریوسین مورد توجه محققین بسیاری قرار گرفته است. بررسی‌ها نشان داده است که باکتریوسین‌های باکتری‌های اسید لاکتیک دارای خواص ضدباکتریایی قابل توجهی در برابر باکتری‌های عامل مسمومیت می‌باشند و می‌توان این باکتریوسین‌ها را به‌عنوان نگه‌دارنده‌های طبیعی مواد غذایی به‌کار برد.در این پژوهش فعالیت ضدباکتریایی مایع رویی کشت ۱۰ سویه اسید لاکتیک موجود در پژوهشکده بیوتکنولوژی شمال غرب و غرب علیه ۷ باکتری عامل مسمومیت غذایی *لیستریا اینوکوا*، *باسیلوس سرئوس*، *شیگلا فلکسنری*، *اشریشیا کولای*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *یرسینیا انتروکلی تیکا*، *کلبسیلا پنومونیه* با روش انتشار از دیسک (disk diffusion assay) مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس ماهیت پروتئینی عامل ضدباکتریایی با استفاده از آنزیم تریپسین بررسی گردید. به‌منظور کاهش خطا هر آزمون در سه تکرار انجام و قطر هاله عدم رشد اندازه‌گیری و توانایی ضدباکتریایی آن‌ها با هم مقایسه شدند. سویه‌های اسید لاکتیک توان ضدباکتریایی خوبی را در مقابل ۷ باکتری شاخص عامل مسمومیت غذایی نشان دادند. هم‌چنین سویه 15E با قطر هاله عدم رشد ۶/۰۳ میلی‌متر علیه *شیگلا فلکسنری* و با قطر هاله عدم رشد ۰/۱۶۷ میلی‌متر علیه *یرسینیا انتروکلی تیکا* به‌ترتیب بیشترین و کمترین بازدارندگی را نشان داد. *اشریشیا کولای* و *شیگلا فلکسنری* حساس‌ترین و *باسیلوس سرئوس* مقاوم‌ترین سویه‌های شاخص در برابر مایع رویی کشت باکتری‌های اسید لاکتیک بومی شناخته شد. هم‌چنین نتایج تیمار آنزیمی ماهیت پروتئینی عامل ضدباکتریایی را تأیید کرد. سویه بومی T_2 سویه‌ای با پتانسیل بسیار بالا برای مهار رشد باکتری‌های گرم منفی نظیر شیگلا، اشریشیا، کلبسیلا و یرسینیا می‌توان در نظر گرفت.

واژه‌های کلیدی: پروبیوتیک، باکتری‌های اسید لاکتیک، قطر هاله عدم رشد، انتشار از دیسک

مقدمه

در سال‌های اخیر، وقوع تعداد زیادی از مسمومیت‌های غذایی و افزایش نگرانی در مورد حفظ غذاهای فراوری شده منجر به آگاهی روزافزونی در زمینه اهمیت ایمنی مواد غذایی شده و این امر موجب توسعه‌ی روش‌های جدیدی برای مهار پاتوژن‌های غذایی گردیده است (Fernandez *et al*., 2013). از جمله شایع‌ترین بیماری‌های منتقل شونده از طریق مواد غذایی می‌توان به بیماری‌های ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus*)، *اشرشیا کولای* (*Escherichia coli*)، سویه‌های سالمونلا و *لیستریا منوسایتوژنز* (*Listeria monocytogenes*) اشاره کرد. مرکز کنترل بیماری‌های آمریکا در سال ۱۹۹۹ اعلام کرد که سالیانه ۷۶ میلیون مورد بیماری ناشی از مصرف مواد غذایی رخ می‌دهد که حدود ۵۰۰۰ مورد آن‌ها به مرگ ختم می‌شود (Cleveland *et al*., 2001). از طرفی افزایش مطالبات مصرف کنندگان برای استفاده از محصولات طبیعی، توجه محققان را به ترکیبات نگه‌دارنده طبیعی (bio-preservative) جایگزین نگه‌دارنده‌های شیمیایی، معطوف کرده است. نگه‌دارنده‌های طبیعی اشاره به استفاده از میکروارگانیسم‌ها یا متابولیت‌های تولیدی آن‌ها دارد. پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که با فعالیت خود در محیط روده مانع از فعالیت میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا می‌شوند (Narimani *et al*., 2013). باکتری‌های گرم مثبت اسید لاکتیک (Lactic acide bacteria) مهم‌ترین گروه باکتریایی شناخته شده در میان میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک (probiotic) هستند که در این میان دو جنس لاکتوباسیلوس و انتروکوکوس جزء فلور طبیعی دستگاه گوارش و غذاهای تخمیری بوده و گزینه‌های خوبی برای پروبیوتیک‌ها محسوب می‌شوند (Miller *et al*., 2005). در طی دهه گذشته مطالعات زیادی بر روی متابولیت‌های ضدباکتریایی باکتری‌های تخمیرکننده مواد غذایی صورت گرفته است تا بتوان از این مواد طبیعی به‌عنوان جایگزین نگه‌دارنده‌های شیمیایی استفاده کرد. برخی متابولیت‌های تولیدشده توسط باکتری‌های اسید لاکتیک شامل اسیدهای آلی (لاکتیک اسید و استیک اسید)، هیدروژن پراکسید و موادی با خاصیت آنتی‌باکتریایی به نام باکتریوسین‌ها هستند (Liu *et al*., 2014). باکتریوسین‌ها به‌عنوان پپتیدها، پروتئین‌ها یا کمپلکس پروتئینی ضدباکتریایی سنتز شده توسط ریبوزوم‌ها معرفی شده‌اند که از باکتری‌ها علیه باکتری‌های خویشاوند نزدیک با هدف باکتری‌کشی یا مهارکنندگی تولید می‌شوند (Pandey *et al*., 2013). باکتریوسین‌های خاص تولید شده توسط باکتری‌های اسید لاکتیک انواع پاتوژن‌های عامل مسمومیت غذایی شامل *باسیلوس سرئوس* (*Bacillus cereus*)، *کلستریدیوم پرفرنژنس* (*Clostridium perfringens*)، گونه‌های لیستریا و *استافیلوکوکوس اورئوس* را مهار می‌کنند (Harris *et al*., 1989). روش‌های مبتنی بر انتشار باکتریوسین در محیط کشت، به منظور غربالگری باکتری‌های اسید لاکتیک تولید کننده باکتریوسین توسعه یافته است که عبارت‌اند از: روش نقطه‌گذاری پلیت (spot-on-lawn)، روش انتشار از چاهک (agar well diffusion)، روش انتشار از دیسک (disk diffusion assey) (Pingitore *et al*., 2007). در تحقیقی سی و پنج باکتری اسید لاکتیک جداسازی شده از منابع

مختلف برای تولید باکتریوسین در برابر ۱۲ سویه شاخص مورد آزمایش قرار گرفتند. این سویه‌ها بازدارندگی وسیعی را در برابر بسیاری از سویه‌های شاخص از جمله *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین، شیگلا، سالمونلا، لیستریا از خود نشان دادند. تنها مایع رویی کشت خنثی شده و تیمار شده با کاتالاز شش سویه، در برابر سویه‌های شاخص از خود بازدارندگی نشان دادند (Sifour *et al.*, 2012). در تحقیقی دیگر آزمون‌های آنزیمی برای ٤ سویه از لاکتوباسیلوس پلانتاروم با کدهای AA110، AA125، AA135 و AA140 انجام گرفت و نتیجه به‌این ترتیب بود که باکتریوسین‌های تولید شده به لیزوزیم و کاتالاز مقاوم بود. اما با تریپسین و پپسین تجزیه و غیرفعال گردید(Abo-Amer, 2007). در بررسی فعالیت ضدلیستریایی ۸۰۰ سویه از باکتری‌های اسید لاکتیک جداسازی شده از گلکا (نوعی پنیر که در مناطق مرزی لهستان تولید می‌شود) بر روی باکتری هدف *لیستریا منوسایتوژنز* نشان دادند که *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* Lab 572 یکی از مؤثرترین گونه‌های باکتری‌های اسید لاکتیک می‌باشد و هم‌چنین گزارش کردند که سویه نامبرده پتانسیل کاربرد به‌عنوان کشت آغازگر محافظتی را دارد (Sip *et al.*, 2012). با توجه به افزایش تقاضا برای مواد نگه‌دارنده طبیعی و لزوم امنیت غذایی بیشتر، شناسایی سویه‌های تولید کننده باکتریوسین یک ضرورت محسوب می‌شود. هدف از این پژوهش شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک تولید کننده باکتریوسین می‌باشد، بنابراین به این منظور فعالیت آنتاگونیستی ۱۰ باکتری اسید لاکتیک موجود در بانک میکروبی پژوهشکده بیوتکنولوژی شمال‌غرب و غرب علیه ۷ باکتری شاخص عامل مسمومیت غذایی با روش انتشار از دیسک بررسی شد و ماهیت پروتئینی عامل ضدباکتریایی با آنزیم تریپسین مشخص شد.

مواد و روش‌ها

- سویه‌ها و محیط‌های کشت

در این تحقیق از ۱۰ باکتری اسید لاکتیک و یک سویه استاندارد بومی *لاکتوباسیلوس پلنتاروم* (*Lactobacillus plantarum*) L_{28} موجود در مجموعه میکروبی پژوهشکده بیوتکنولوژی شمال غرب و غرب استفاده گردید. یک سویه استاندارد *لاکتوباسیلوس پلنتاروم* (ATCC14917) نیز از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران به‌صورت لیوفیلیزه تهیه شد. باکتری‌های اسیدلاکتیک به‌کار رفته در این پژوهش قبلاً از محصولات شیر و ماست محلی مناطق مختلف آذربایجان شرقی جداسازی شده و در محیط کشت MRS مایع (Man, Rogosa and Sharp) (Sigma-Aldrich) و حاوی ۳۰٪ حجمی گلیسرول در فریزر۸۰- نگهداری شده بودند. در این پژوهش هفت سویه شاخص عامل مسمویت غذایی موجود در مجموعه میکروبی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمال غرب و غرب کشور شامل *لیستریا اینوکوا* (ATCC 33090)، *شیگلا فلکسنری* (*Shigella flexneri*) (PTCC 1234)، *باسیلوس سرئوس* (ATCC 1431)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 29213)، *کلبسیلا پنومونیه* (*Klebsiella pneumoniae*) (PTCC 1290)، *اشریشیا کولای* (ATCC 1399)، *یرسینیا انتروکلی تیکا* (*Yersinia enterocolitica*) (ATCC 35669) نیز مورد استفاده قرار گرفت. سویه‌های شاخص

به‌کار رفته در این پژوهش در محیط کشت مولر هینتون مایع (Merck, Germany) و حاوی ۳۰٪ حجمی گلیسرول در فریزر ۸۰- نگهداری شده بودند.

- فعال‌سازی و آماده‌سازی کشت‌های باکتری

قبل از انجام آزمایش، به منظور دستیابی به کشت تازه و فعال، باکتری‌های اسید لاکتیک فریز شده در دمای آزمایشگاه روی یخ، از انجماد خارج و پس از کشت سطحی آن‌ها بر روی محیط کشت MRS آگار (Sigma-Aldrich, Germany)، به‌مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری (Heraeus, Germany) گردید. سپس از کشت‌های ۱۸ ساعته، مقادیر مختلف به محیط کشت MRS مایع منتقل و جذب نوری با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ٦٢٥ نانومتر تعیین گردید، سپس سوسپانسیون باکتری با کدورتی معادل نیم مک فارلند تهیه شد. باکتری‌های شاخص عامل مسمومیت غذایی نیز پس از کشت سطحی بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار (Merck, Germany)، به‌مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردید. سپس از کشت‌های ۱۸ ساعته، مقادیر مختلف به محیط کشت مولر هینتون مایع منتقل و جذب نوری با استفاده از اسپکتروفتومتر (GENESYS 5, USA) در طول موج ٦٢٥ نانو تعیین گردید، سپس سوسپانسیون باکتری با کدورتی معادل نیم مک فارلند تهیه شد (Akhondzade *et al.*, 2003).

- تولید عامل ضدباکتریایی

برای تولید عامل ضدباکتریایی از کشت‌های فعال شده باکتری‌های اسید لاکتیک به نسبت ۱۰٪ حجمی محیط کشت MRS مایع تلقیح داده شد و در شرایط کم هوازی (در فالکون‌های در بسته) و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٤٨ ساعت گرمخانه گذاری گردید، تمامی این مراحل در زیر هود لامینار (Jel) Tajhiz, Iran و شرایط استریل انجام شد.

- جداسازی مایع رویی کشت حاوی عامل ضدباکتریایی

به‌منظور جداسازی مایع رویی کشت حاوی عامل ضدباکتریایی و حذف سلول‌های باکتری، محیط کشت ٤٨ ساعت حاوی سلول‌های باکتریایی با دور ٦٠٠٠RPM در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ (Heraeus, Germany) گردید.

- تیمار مایع رویی کشت با سدیم هیدروکسید ٤ مولار

مایع رویی کشت باکتری‌های اسیدلاکتیک با استفاده از ٤NaoH نرمال به شش تنظیم شد تا اثر ضدباکتریایی حاصل از اسیدهای آلی تولید شده در طی فرایند تخمیر خنثی گردد. برای اطمینان از عدم حضور باکتری، مایع رویی کشت تنظیم pH شده از فیلتر غشایی ۰/۲۲ میکرومتر (Jet-Biofil,Canada) عبور داده شد. سپس فعالیت ضدباکتریایی مایع رویی کشت حاصل بر روی باکتری‌های شاخص با روش انتشار از دیسک مورد ارزیابی قرار گرفت (Liu *et al.*, 2014).

- تعیین اثر ضدباکتریایی مایع رویی کشت

برای تعیین فعالیت ضدباکتریایی از روش انتشار از دیسک با جزئی تغییرات استفاده شد (Campos *et al.*, 2006). به‌این‌ترتیب که ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری شاخص با کدورت معادل نیم مک فارلند در پلیت‌های حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت مولر هینتون آگار نرم (حاوی ٪۰/۸ آگار) پورپلیت گردید. دیسک‌های کاغذی استریل (Padtan Teb, Iran)، با فاصله مناسب از یکدیگر و از لبه پلیت بر سطح محیط

کشت جامد قرار داده شد و سپس ۲۰ میکرولیتر از مایع رویی کشت تهیه شده از باکتری‌های اسید لاکتیک بر روی دیسک‌ها قرار داده شد. به منظور انتشار باکتریوسین از دیسک بر روی محیط کشت، پلیت‌ها به‌مدت ۱ ساعت در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه-گذاری شدند. بعد از ۱۲ ساعت فعالیت آنتی‌باکتریایی مایع رویی کشت با اندازه‌گیری قطر هاله مهار رشدی با استفاده از کولیس تعیین شد. به‌این ترتیب فعالیت ضدباکتریایی ۱۰ سویه اسید لاکتیک علیه هفت باکتری شاخص عامل مسمومیت غذایی بررسی گردید.

- تیمار مایع رویی کشت با آنزیم کاتالاز

به‌منظور خنثی کردن اثر ضدباکتریایی حاصل از پراکسید هیدروژن تولید شده در طی فرایند تخمیر، مایع رویی کشت تنظیم pH شده با آنزیم کاتالاز (Sigma-Aldrich, Germany) تیمار گردید. ابتدا مقدار یک میلی‌گرم از آنزیم پودری کاتالاز طبق پروتکل محلول سازی سیگما- آلدریچ، در یک میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار حل شد و محلول آنزیمی حاصل به نسبت ۰/۱ میلی‌لیتر به تیوب‌های حاوی مایع رویی کشت (با pH=٦) افزوده گردید. مایع رویی کشت به‌مدت یک ساعت در بن‌ماری (GFL, Germny) ۳۷ درجه سانتی‌گراد تیمار گردید و سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد جوشانده شد تا آنزیم کاتالاز افزوده شده غیرفعال گردد (Hernandez *et al.*, 2005). سپس فعالیت ضدباکتریایی مایع رویی کشت تیمار شده با روش انتشار از دیسک مطابق روش ذکر شده سنجیده شد.

- تیمار مایع رویی کشت با آنزیم تریپسین

به‌منظور تأیید ماهیت پروتئینی ماده ضدباکتریایی موجود در مایع رویی کشت باکتری‌های اسید لاکتیک، مایع رویی کشت خنثی شده و تیمار شده با آنزیم کاتالاز با آنزیم تریپسین (Sigma-Aldrich, Germany) تیمار گردید. ابتدا مقدار یک میلی‌گرم از آنزیم تریپسین، در یک میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی مولار pH=۷ حل شد و محلول آنزیمی حاصل به نسبت ۰/۱ میلی‌لیتر به میکروتیوب‌های حاوی ۲۰۰ میکرولیتر مایع رویی کشت افزوده گردید. مایع رویی کشت به‌مدت یک ساعت در بن ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد تیمار گردید و سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد جوشانده شد تا آنزیم تریپسین افزوده شده غیرفعال گردد (Hernandez *et al.*, 2005). سپس فعالیت ضدباکتریایی مایع رویی کشت تیمار شده با روش انتشار از دیسک مطابق روش ذکر شده سنجیده شد.

- تجزیه آماری و مقایسات میانگین‌ها

قبل از انجام تجزیه آماری نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آماره‌های چولگی و کشیدگی مورد بررسی قرار گرفت و برای تجزیه آماری داده‌ها به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی از نرم‌افزار آماری MSTAT-C استفاده شد. مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ انجام گرفت (Alizadeh and Tarinejad, 2010). گراف‌ها با نرم‌افزار Excel 2013 ترسیم شدند.

یافته‌ها

تجزیه واریانس فاکتوریل اثرات سویه‌های مختلف باکتری اسید لاکتیک و پاتوژن نشان داد جدول (۱) بین پاتوژن‌ها، بین سویه‌ها و نیز اثر متقابل پاتوژن × سویه در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار می‌باشد. بنابراین، با توجه به معنی‌دار بودن اثر متقابل، مقایسه میانگین برای هرکدام از پاتوژن‌ها به‌طور جداگانه انجام گرفت (شکل ۱ تا ۷).

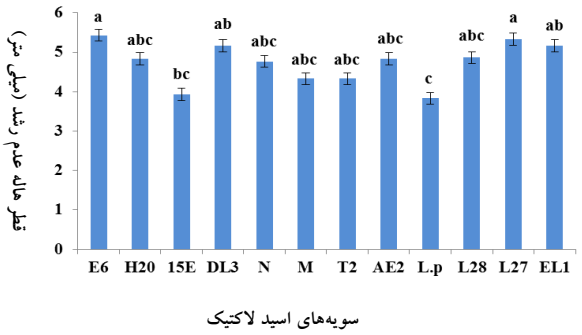
جدول (۱)- تجزیه واریانس فاکتوریل پاتوژن×سویه باکتری اسید لاکتیک

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	مقادیر آماره F
پاتوژن	٦	٢٧/٥٤	١٣٣/٢٨**
سویه باکتری اسید لاکتیک	١١	٥/٧٩	٢٨/٠٢**
پاتوژن × سویه	٦٦	٣/٢٧	١٥/٨٢**
خطا	١٦٨	٠/٢٠٧	

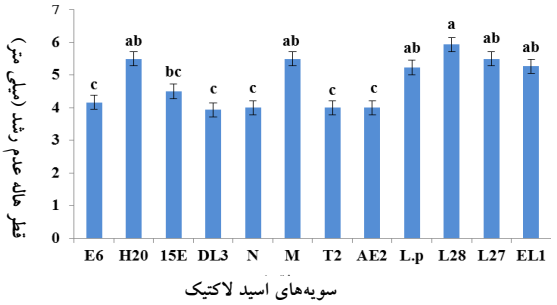
** به مفهوم معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪

در این مطالعه با روش انتشار از دیسک فعالیت ضدباکتریایی ۱۰ سویه اسید لاکتیک بومی موجود در پژوهشکده بیوتکنولوژی شمال‌غرب و غرب کشور، علیه ۷ باکتری شاخص عامل مسمومیت غذایی بررسی گردید. فعالیت ضدباکتریایی مایع رویی حاصل از کشت ۱۰ سویه اسید لاکتیک بومی و دو سویه اسید لاکتیک شاهد با pH خنثی علیه ۷ باکتری شاخص عامل مسمومیت غذایی مورد ارزیابی قرار گرفت که به‌صورت نمودار مقایسه میانگین نشان داده شده است شکل‌های (۱ تا ۷). از میان سویه‌های بررسی شده سویه‌های H_{20}، M، L.p، L_{28}، L_{27} و EL_1 بیشترین بازدارندگی را علیه لیستریا شکل (۱)، سویه‌های DL_3، E_6، L_{27} و EL_1 بیشترین بازدارندگی را علیه استافیلوکوکوس شکل (۲)، سویه‌های H_{20}، M، L_{27}، E_6، 15E و T_2 بیشترین بازدارندگی را علیه *اشریشیا کولای* داشتند شکل (۳)، سویه‌های H_{20}، L.p، 15E و T_2 بیشترین بازدارندگی را علیه کلبسیلا شکل (٤)، سویه‌های L_{27}، M و 15E بیشترین بازدارندگی را علیه باسیلوس نشان دادند شکل (٥)، سویه‌های H_{20}، M، T_2، L_{27}، EL_1، L_{28}، AE_2 و L.p بیشترین بازدارندگی را علیه یرسینیا شکل (٦) و سویه‌های L_{28}، 15E و EL_1 بیشترین بازدارندگی را علیه شیگلا شکل (۷) داشتند. نتایج نشان داد که سویهM علیه تمام سویه‌های شاخص و سویه‌های T_2، L_{27} علیه شش باکتری شاخص دارای اثر بازدارندگی هستند. با توجه به نتایج حاصل *لیستریا اینوکوا* (ATCC 33090)، *اشریشیا کولای* (ATCC 1399) و *شیگلا فلکسنری* (PTCC1234) به‌عنوان حساس‌ترین سویه و باکتری‌های شاخص *یرسینیا انتروکولی تیکا* (ATCC 35669) و *باسیلوس سرئوس* (ATCC1431) به‌عنوان مقاوم‌ترین سویه‌های شاخص تشخیص داده شدند. هم‌چنین سویه ۱۵E با قطر هاله عدم رشد ٦/٠٣ میلی‌متر علیه *شیگلا فلکسنری* و با قطر هاله عدم رشد ٠/١٦٧ میلی‌متر علیه *یرسینیا انتروکولی تیکا* به ترتیب بیشترین و کمترین بازدارندگی را نشان داد. فعالیت بازدارندگی مایع رویی به‌دست آمده از کشت باکتری‌های اسید لاکتیک بومی بعد از تیمار با آنزیم پروتئولیتیک تریپسین

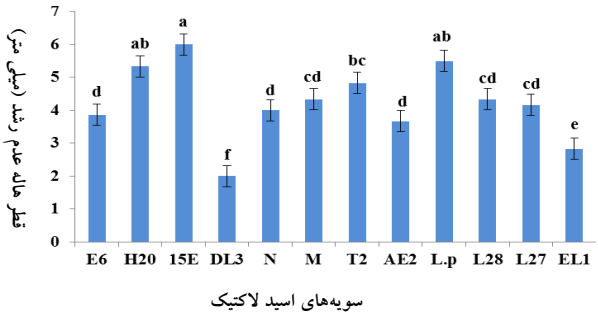
متوقف گردید. که ماهیت پروتئینی عامل فعـال را نشـان می‌دهد (شکل ۹).



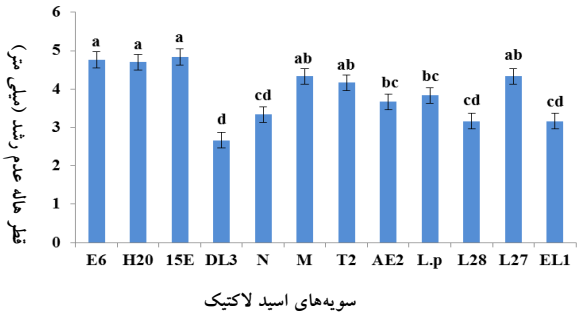
شکل (۲)- مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۲ سـویه اسـید لاکتیـک در pH خنثی علیه باکتری شاخص *استافیلوکوکوس اورئوس*



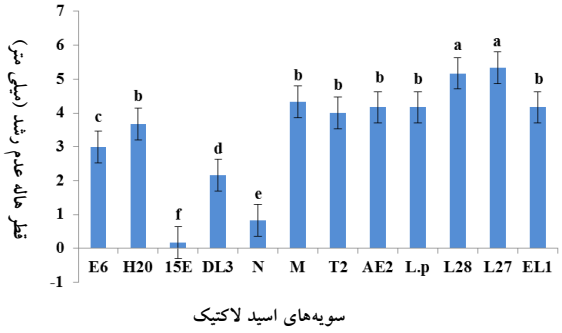
شکل (۱)- مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۲ سـویه اسـید لاکتیـک در pH خنثی علیه باکتری شاخص *لیستریا اینوکو*



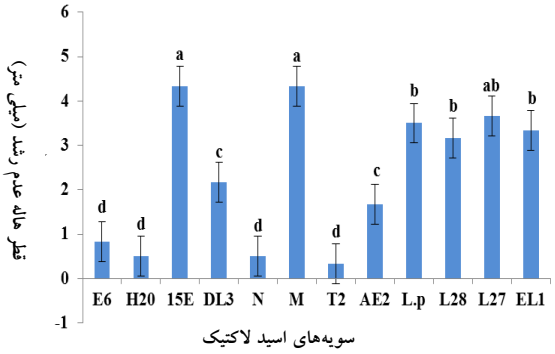
شکل (٤)- مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۲ سـویه اسـید لاکتیـک در pH خنثی علیه باکتری شاخص *کلبسیلا پنومونیه*



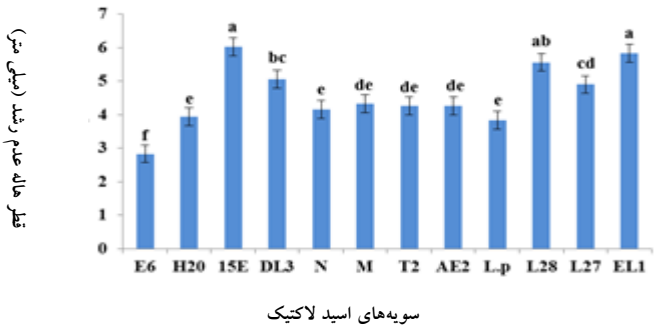
شکل (۳)- مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۲ سـویه اسـید لاکتیـک در pH خنثی علیه باکتری شاخص *اشرشیا کولای*



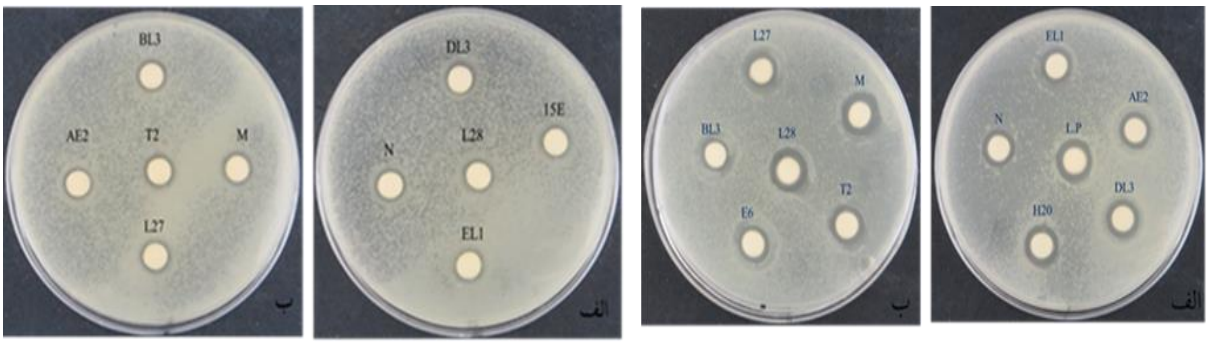
شکل (٦)- مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۲ سویه اسید لاکتیـک در pH خنثی علیه *یرسینیا انتروکلی تیکا*



شکل (۵)- مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۲ سویه اسید لاکتیـک در pH خنثی علیه *باسیلوس سرئوس*



شکل (۷)- مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۲ سـویه اسـید لاکتیـک در pH خنثی علیه *شیگلا فلکسنری*



شکل (۸)- بررسی هاله عدم رشد مایع رویی سویه‌های گزینش شده علیه *لیستریا اینوکوا* الف و ب) ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی مایع رویی خنثی شده ۱۰ سویه اسید لاکتیـک گـزینش شـده علیـه *لیستریا اینوکوا* را نشـان می‌دهد. دو سویه L_{28} و L.p: شاهد کنترل مثبت.

شکل (۹)- بررسی هاله عدم رشد مـایع رویـی کشـت تیمـار شـده بـا آنـزیم تریپسین علیه *S. flexneri* سویه L_{28}: شاهد کنترل مثبت.

مقایسات گروهی اثر هرکدام از سویه‌ها بـه‌تنهـایی روی باکتری‌های گرم مثبت و منفی نشان داد جـدول (۲) کـه مایع رویی کشت خنثی شده هر کدام از سویه‌ها از نظـر تأثیر بر روی قطر هاله عدم رشد در باکتری‌ها گرم مثبت و منفی به استثنای سویه T2 یکسان است و نشان دهنده این موضوع است که سویه‌ها از نظر قطر عدم هاله رشد روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفـی یکسـان عمـل نموده‌اند. به عبارت دیگر توانستند هر دو نوع باکتری را از نظر رشدی مهار نمایند و ایـن یکـی از ویژگـی‌هـای خوب سویه بومی جداسازی شـده از محصـولات لبنـی می‌باشد. سویه بومی T_2 سویه‌ای با پتانسـیل بسـیار بـالا برای مهار رشد باکتری‌های گرم منفی نظیـر شـیگلا، ای کولای، کلبسیلا و یرسینیا می‌توان در نظر گرفت.

جدول (۲)- مقایسه گروهی در درون هر سویه بین باکتری‌های گرم مثبت و منفی از نظر اندازه قطر هاله عدم رشد

مقایسه گروهی	سویه E6	سویه H20	سویه 15E	سویه DL3	سویه N	سویه M
میانگین قطر عدم هاله رشد گرم +	۳/٤۸±۰,٦۹۲	۳/٦۱±۰/۷۹۳	٤/۲٦±۰/۱۲۹	۳/۷۸±۰/٤۰۹	۳/۰۹±۰/٦٦۸	۳/۹±۰/٤۳۰
میانگین قطر عدم هاله رشد گرم −	۳/٦۲±۰/۲۳۹	٤/٤۱±۰/۲۱۵	٤/۲٦±۰/۷۲۸	۲/۹۷±۰/۳۸۰	۳/۰۸±۰/٤۱۲	۳/۷۱±۰/۲٤۸
آماره t	−۰/۱۹ns	−۰/۹٦۹ns	−۰/۰۰٤ns	۱/۳۲ns	۰/۰۰۷ns	۰/٤۱۲ns
مقایسه گروهی	سویه T2	سویه AE2	سویه L.P	سویه L28	سویه L27	سویه EL1
میانگین قطر عدم هاله رشد گرم +	۲/۸۹±۰/٦٤٥	۳/٥±۰,٥۰۷	٤/۱۹±۰/۳۰٤	٤/٦٦±۰/٤٤	٤/۸۳±۰/۳٥۳	٤,٥۸۹±۰/۳۷
میانگین قطر عدم هاله رشد گرم −	٤/۳۲±۰/۱٤٦	۳/۹٤±۰/۱۱۸	٤/۳۳±۰/۲۲٤	٤/٥٦±۰/۳۱	٤/٦۸±۰/۱۷۰	٤/۰۰±۰/۳٥۹
آماره t	−۲/٤٦٤*	−۰/۸٤۸ns	−۰/۳۹ns	۰/۱۸٥ns	۰/٤۱٤ns	۱/۱۲۳ns

ns، * به ترتیب به مفهوم غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

فرضیه‌های بسیاری در مورد دلیل خواص آنتی‌باکتریایی پروبیوتیک‌ها مطرح است که از آن جمله می‌توان به رقابت برای اتصال به مناطق ویژه در اپیتلیال روده، کاهش نفوذپذیری سلول‌های روده، رقابت برای جذب مواد غذایی، تخریب گیرنده‌های سم، تحریک سیستم ایمنی، تولید مواد مختلف مهارکننده از جمله: اسیدهای آلی، تولید سورفکتانت‌های زیستی، پر اکسید هیدروژن، ترشح ترکیبات سیگنالی و اسیدهای چرب زنجیره کوتاه، نیتریک اکسید و باکتریوسین‌ها اشاره کرد (Chen and Hoover, 2003; Van Reenen *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2014). در میان این مواد ضدباکتریایی، تولید باکتریوسین‌ها معیار مهمی در انتخاب سویه‌های باکتری‌های پروبیوتیک در نظر گرفته شده و یکی از صفات پروبیوتیک‌ها محسوب می‌شود. تحقیقات نشان داده تولید باکتریوسین توسط باکتری‌های پروبیوتیک بر توانایی رقابت پروبیوتیک‌ها با باکتری‌های روده و در نهایت بر سلامتی میزبان خود تأثیر مثبتی داشته است (Dobson *et al.*, 2012). در پژوهش حاضر ۵ سویه‌ی لاکتوباسیل و ۵ سویه انتروکوک بومی جداسازی شده از شیر و ماست موجود در پژوهشکده بیوتکنولوژی شمال‌غرب و غرب از نظر خاصیت آنتاگونیستی مقایسه شدند. یک سویه شاهد اسید لاکتیک به نام *لاکتوباسیلوس پلنتاروم* (ATCC14917) که تولید کننده باکتریوسین گروه IIa می‌باشد به‌عنوان سویه شاهد کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفت (Liu *et al.*, 2014). هم‌چنین سویه *لاکتوباسیلوس پلنتاروم* L_{28} که به‌عنوان یکی از سویه‌های بومی تولید کننده باکتریوسین گروه IIb شناسایی شده است به‌عنوان باکتری شاهد کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفت (Gholamzadeh *et al.*, 2017). هریک از باکتری‌های اسید لاکتیک بومی الگوی مهار رشد متفاوتی علیه سویه‌های شاخص عامل مسمومیت غذایی نشان دادند. نتایج نشان داد که سویه‌های M، T_2 و L_{27} طیف میزبانی وسیعی داشتند، به‌این ترتیب که سویه M علیه تمام سویه‌های شاخص و سویه‌های T_2 و L_{27} علیه شش باکتری شاخص دارای اثر بازدارندگی بودند. هم‌چنین *لیستریا اینوکوا* (ATCC 33090)، *اشریشیا کولای* (ATCC 1399)، *شیگلا فلکسنری* (PTCC 1234) به‌عنوان حساس‌ترین سویه‌ها و سویه‌های *یرسینیا*

انتروکلی تیکا (ATCC 35669) و *باسیلوس سرئوس* (ATCC1431) به‌عنوان مقاوم‌ترین سویه‌های شاخص شناخته شدند.

بر اساس مطالعات صورت گرفته توسط سایر محققین، باکتری‌های شاخص گرم مثبت نسبت به باکتری‌های شاخص گرم منفی در برابر مایع رویی باکتری‌های اسید لاکتیک حساس‌تر می‌باشند. مقاومت باکتری‌های گرم منفی به دلیل ماهیت غشای سلولی آن‌ها می‌باشد (Ivanova *et al*., 2000). غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی نسبت به باکتریوسین‌ها غیرقابل نفوذ است (Garneau *et al*., 2002). که معمولاً از فعالیت ضدباکتریایی این پپتیدها جلوگیری می‌کند. نتایج به‌دست آمده در تحقیق حاضر با نتایج برخی محققین و همکاران وی مغایرت داشت (Inanov *et al*., 2000; Garneau *et al*., 2002). نتایج تحقیق حاضر حساسیت بالای باکتری‌های گرم منفی *شیگلا فلکسنری*، *کلبسیلا پنومونیه* و *اشریشیا کولای* را در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت *باسیلوس سرئوس* و گرم منفی *یرسینیا انتروکلی تیکا* نشان داد.

تأثیر مثبت عامل ضدباکتریایی ۱۰ سویه اسید لاکتیک بر روی باکتری‌های گرم مثبت و هم‌چنین تأثیر مثبت عامل ضدباکتریایی سویه E_6 بر روی باکتری شاخص گرم منفی *اشریشیا کولای*، سویه H_{20} بر روی باکتری شاخص گرم منفی *اشریشیا کولای* و *کلبسیلا پنومونیه*، سویه 15E و L_{27} بر روی باکتری شاخص گرم منفی *اشریشیا کولای*، *کلبسیلا پنومونیه* و *شیگلا فلکسنری*، سویه DL_3 و N بر روی باکتری شاخص گرم منفی *شیگلا فلکسنری*، سویه M بر روی باکتری شاخص گرم منفی *اشریشیا کولای*، *یرسینیا انتروکلی تیکا*، *کلبسیلا پنومونیه* و *شیگلا فلکسنری*، سویه T_2 بر روی باکتری شاخص گرم منفی *اشریشیا کولای*، *یرسینیا انتروکلی تیکا*، *کلبسیلا پنومونیه*، سویه AE_2، EL_1 بر روی باکتری شاخص گرم منفی *یرسینیا انتروکلی تیکا*، *شیگلا فلکسنری*، مشابه تأثیر مثبت باکتری *لاکتوباسیلوس پلنتاروم* Lp6SH بر روی باکتری‌های شاخص گرم مثبت و گرم منفی مطالعه شده توسط Marie و همکاران می‌باشد (Marie *et al*., 2012).

این در حالی است که تحقیقات نشان داده باکتریوسینی نظیر نایسین بر روی گونه‌های مختلف باسیلوس و کلستریدیوم اثر باکتری‌کشی دارد. اما به‌طور خاص بر روی باکتری‌های گرم منفی بی‌تأثیر است (Tafreshi *et al*., 2010). نایسین به همراه مواد شماته کننده و متابولیت‌های دیگر در مواد غذایی به خوبی رشد باکتری‌های گرم منفی را نیز مهار می‌نماید. لذا می‌توان امیدوار بود که این باکتریوسین‌ها نیز با سایر هردل‌ها اثر بیشتری بر تمام سویه‌های داشته باشد.

در تحقیقی توانایی تولید باکتریوسین در ۳۵ باکتری اسید لاکتیک جدا شده از منابع مختلف را با استفاده از آزمون انتشار از چاهک در برابر ۱۲ باکتری شاخص اندازه‌گیری کردند. این سویه‌ها طیف بازدارندگی گسترده‌ای را در برابر بسیاری از سویه‌های شاخص مانند *کلبسیلا پنومونیه*، *لیستریا منوسایتوژنز*، سالمونلا (*Salmonella sp*)، *باسیلوس سوبتیلیس*، *اشریشیا کولای*، *سودوموناس آئروژینوزا* (*Pseudomonas aeruginosa*) و *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان دادند که ممکن است به دلیل تولید چندین ترکیب ضدباکتریایی مانند اسیدهای آلی، پراکسید هیدروژن و یا باکتریوسین‌ها باشد (Sifour *et al*., 2012). به همین

دلیل فعالیت عامل بازدارنده در شرایطی که اثرات بازدارندگی احتمالی اسیدهای آلی با تنظیم pH بر روی ٦ از بین می‌رفت مورد سنجش قرار گرفت که در این شرایط هفت سویه از سی و پنج سویه *لاکتوباسیلوس پلنتاروم* F12، *لاکتوباسیلوس کورواتوس* (*Lactobacillus curvatus*)، *لاکتوباسیلوس گاسری* (*lactobacillus gasseri*)، *لاکتوباسیلوس پلنتاروم* و *لاکتوباسیلوس کازئی* (*Lactobacillus casei* sp) در شرایط مایع رویی کشت خنثی در برابر سویه‌های شاخص MRSA، *باسیلوس سوبتیلیس*، *کلبسیلا پنومونیه* و *لیستریا منوسایتوژنز* از خود بازدارندگی نشان دادند. در شرایطی که اثرات بازدارندگی احتمالی پراکسید هیدروژن با کاتالاز یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از بین رفت، شش گونه اسید لاکتیک فعالیت بازدارندگی خود را تنها در برابر سه گونه شاخص MRSA، *باسیلوس سوبتیلیس* و *لیستریا منوسایتوژنز* حفظ کردند. در بررسی حاضر بعد از تیمار محلول رویی با آنزیم تریپسین غیرفعال سازی کامل فعالیت آنتی‌باکتریایی مشاهده گردید شکل (۹)، که ماهیت پروتئینی عامل فعال را تأیید می‌کند نتایج به‌دست آمده با نتایج انتشار یافته مطابقت داشت. در تحقیقی با روش انتشار از چاهک برای به دست آوردن باکتری‌های اسید لاکتیک تولیدکننده باکتریوسین در برابر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی استفاده گردید. مشخص شد که ۱۲۳ باکتری اسید لاکتیک در برابر باکتری‌های شاخص مختلف پپتیدهای ضدباکتریایی تولید می‌کنند. مایع رویی کشت خنثی شده ١٤ سویه فعالیت آنتی میکروبی متمایزی را در برابر *L. monocytogenes* ATCC19111، *E. coli* ATCC25922، *B. subtilis* ATCC 6633 نشان دادند. بعد از تیمار با کاتالاز تمام ١٤ سویه فعالیت ضدباکتریایی خود را حفظ کردند. زمانی که مایع رویی کشت خنثی شده این ١٤ سویه با پروتئیناز k، پپسین و تریپسین تیمار شدند. فعالیت ضدباکتریایی ۸ سویه یا کاهش یافت و یا حذف شد(Liu *et al*., 2014).

این در حالی است که نتایج متفاوتی توسط برخی محققین برای باکتریوسین‌های تولید شده توسط *Lc. plantarum* ST 13BR ثبت شده است. این گروه مشاهده کردند که تریپسین، کیموتریپسین و رنین هیچ تأثیری بر باکتریوسین تولید شده توسط باکتری جدا شده از غلات سنتی بلغارستان نظیر *Lc. lactis subsp. Lactic* b14 نداشت (Todorov and Dicks, 2006). در تحقیق حاضر تمامی ۱۰ سویه بعد از تیمار با آنزیم کاتالاز یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر فعالیت خود را علیه شیگلا حفظ کردند. فعالیت ضدباکتریایی بعد از تیمار با کاتالاز ثابت باقی ماند که نشان دهنده عدم ارتباط این خاصیت بازدارندگی با هیدروژن پراکساید احتمالی در مایع رویی کشت باکتری‌های اسید لاکتیک می‌باشد. هم‌چنین با تیمار آنزیمی ماهیت پروتئینی عامل بازدارنده تأیید شد. با توجه به فعالیت ضدباکتریایی و ماهیت پروتئینی عامل بازدارنده موجود در مایع رویی کشت سویه‌های اسید لاکتیک بومی، برای تأیید بیشتر باکتریوسینی بودن عامل بازدارنده، HPLC، خالص‌سازی باکتریوسین و بررسی سکانس آن در تحقیقات آتی مورد بررسی قرار خواهد گرفت. اهمیت تحقیق حاضر برای یافتن سویه‌های بومی که در محافظت از فراورده‌ها و مواد غذایی تخمیری سنتی نقش به سزایی دارند پرواضح است.

سپاسگزاری

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان و نیز ریاست محترم پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمال‌غرب و غرب کشور به‌خاطر در اختیار قرار دادن امکانات مالی و پژوهشی این تحقیق تقدیر و تشکر می‌گردد.

منابع

- Abo-Amer AE. (2007). Characterization of a bacteriocin-like inhibitory substance produced by Lactobacillus plantarum isolated from Egyptian home-made yogurt. Sci. Asia 33:313-319.
- Akhondzade, A., Razavi, V., Misaghi, A., AbbasiFar, R., Radmehr, B., and Khalighi, F. (2003). Effect of thyme essential oils on *Salmonella typhimurium* in brain and heart broth. Journal of Medicinal Plants. 8: 84-91.
- Alizadeh, B., and Tarinejad, A. (2010). Application of MSTATC software in statistical analysis: Setoodeh Pub. Tabriz. [In Persian]
- Campos, C. A., Rodríguez, Ó., Calo-Mata, P., Prado, M., and Barros-Velázquez, J. (2006). Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis, Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (*Psetta maxima*). Food Research International. 39(3): 356-364.
- Chen, H., and Hoover, D. (2003). Bacteriocins and their food applications. Comprehensive reviews in food science and food safety. 2(3): 82-100.
- Cleveland, J., Montville, T. J ,.Nes, I. F., and Chikindas, M. L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. International journal of food microbiology. 71(1): 1-20.
- Dobson, A., Cotter, P. D., Ross, R. P., and Hill, C. (2012). Bacteriocin production: a probiotic trait? Applied and environmental microbiology. 78(1): 1-6.
- Fernandez, B., Le Lay, C., Jean, J., and Fliss, I. (2013). Growth, acid production and bacteriocin production by probiotic candidates under simulated colonic conditions. Journal of applied microbiology. 114(3): 877-885.
- Garneau, S., Martin, N. I., and Vederas, J. C. (2002). Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. Biochimie. 84(5): 577-592.
- Gholamzadeh, M. A., Hejazi, M. A., and Hosseinzadeh Gharaje, N. (2017). Determination of bacteriocin encoding gene in six native strains of *Lactobacillus plantarum* Journal of Food Science and Technology. 66(14): 17-25. [in persian]
- Harris, L., Daeschel, M., Stiles, M., and Klaenhammer, T. (1989). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against Listeria monocytogenes. Journal of Food Protection. 52(6): 384-387.
- Hernandez, D., Cardell, E., and Zarate, V. (2005). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711. Journal of applied microbiology. 99(1): 77-84.
- Ivanova, I., Kabadjova, P., Pantev, A., Danova, S., and Dousset, X. (2000). Detection, purification and partial characterization of a novel bacteriocin substance produced by *Lactococcus lactis* subsp. lactis B14 isolated from boza-Bulgarian traditional cereal beverage. Biocatalysis. 41(6): 47-53.

- Liu, W., Zhang, L., Yi, H., Shi, J., Xue, C., Li, H., et al. (2014). Qualitative detection of class IIa bacteriocinogenic lactic acid bacteria from traditional Chinese fermented food using a YGNGV-motif-based assay. Journal of microbiological methods. 100: 121-127.
- Marie, K. P., François, Z. N., Abbasi, A., Anwar, F., Ali, S. A., Victor, S. D., and Félicité, T. M. (2012). Characterization of a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus plantarum* Lp6SH Isolated from" Sha'a", a Maize-Based Traditionally Fermented Beverage from Cameroon. International Journal of Biology. 4(2): 149.
- Miller, K., Ray, P., Steinmetz, T., Hanekamp, T., and Ray, B. (2005). Gene organization and sequences of pediocin AcH/PA-1 production operons in *Pediococcus* and *Lactobacillus* plasmids. Letters in applied microbiology. 40(1): 56-62.
- Narimani, T., Tarinejad, A., and Hejazi, M. A. (2013). Isolation and identification of lactic acid bacteria from traditional dairy products of Kleibar, Heris and Varzaghan. food hygiene. 3(3): 23-37. [In Persian]
- Pandey, N., Malik, R., Kaushik, J., and Singroha, G. (2013). Gassericin A: a circular bacteriocin produced by Lactic acid bacteria *Lactobacillus gasseri*. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 29(11): 1977-1987.
- Pingitore ,E. V., Salvucci, E., Sesma, F., and Nader-Macias, M. E. (2007). Different strategies for purification of antimicrobial peptides from lactic acid bacteria (LAB). Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology. 1: 557-568.
- Sifour, M., Tayeb, I., Haddar, H. O., Namous, H., and Aissaoui, S. (2012). Production and characterization of bacteriocin of Lactobacillus plantarum F12 with inhibitory activity against Listeria monocytogenes. Online Journal of Science and Technology. 2: 55-61..
- Sip, A., Więckowicz, M., Olejnik-Schmidt, A., and Grajek, W. (2012). Anti–Listeria activity of lactic acid bacteria isolated from golka, a regional cheese produced in Poland. Food Control. 26(1): 117-124.
- Tafreshi, S.-y. H., Mirdamadi, S., Norouzian, D., Khatami, S., and Sardari, S. (2010). Effect of non-nutritional factors on nisin production. African Journal of Biotechnology. 9: 26-34.
- Van Reenen, C., Chikindas, M., Van Zyl, W., and Dicks, L. (2003) .Characterization and heterologous expression of a class IIa bacteriocin, plantaricin 423 from *Lactobacillus plantarum* 423, in Saccharomyces cerevisiae. International journal of food microbiology. 81(1): 29-40.

Repression effect of obtained supernatant from culture of 10 lactic acid strain against index pathogens of food intoxication

Pourabdi Sarabi, P.[1], Tarinejad, A.[2*], Hejazi, M.A.[3]

1. MSc Student, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran
2. Associate Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran
3. Post doctor, Associate Professor, Branch of North-West and West Region of Iran, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Tabriz, Iran

[*]Corresponding Author: atarinejad@yahoo.com
(Received: 2017/1/6 Accepted: 2017/11/11)

Abstract

Identification of lactic acid bacteria, bacteriocin producing has been noticeable by most researchers. The surveys showed that bacteriocins of lactic acid bacteria has antibacterial effect against bacteria of poisoning agent, so these bacteriocins could be used as natural preserving of food materials. In this research, antimicrobial activities of bacterial supernatant from 10 native strain of lactic acid bacteria existing in Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Branch of North-West and West Region of Iran evaluated by disk diffusion assay against seven pathogen including *Listeria innocua*, *Bacillus cereus*, *flexneri Shigella*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia entrocolitica*, *Klebsiella pneumonia*. Each test had three replications and the inhibition zone diameter measured in strains and compared with each other. At next step, peptide identification of antibacterial agent was detected by trypsin enzyme treatment. The results represented that lactic acid strains represented good antimicrobial potential against seven bacteria of poisoning agent. Also 15E strain with 6.03mm and 0.167mm inhibition zone diameter versus *flexneri shigella* and *Yersinia entrocolitica* showed the highest and lowest rate of suppression, respectively. *Escherichia coli* and *Shigella flexneri the sensitive and Bacillus cereus* as resistant strain was detected against bacteriocins of lactic acid bacteria. Also enzyme treatment result confirm peptide identification of antibacterial agent. T2 native strain could consider as strain with high potential versus gram-negative bacteria like *Flexneri shigella, E. coli, Yersinia entrocolitica*, and *Klebsiella pneumonia.*

Conflict of interest: None declared.

Keywords: disk diffusion, inhibition zone, lactic acid bacteria, probiotic