اثر بازدارندگی سویه‌های بومی باکتری‌های اسید لاکتیک علیه باکتری‌های بیماری‌زای غذایی

پریسا پورعبدی سرابی[۱]، علیرضا تاری‌نژاد[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 قابل‌توجهی 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 از باکتری‌های لاکتیکی بومی (که قبلاً از شیر خام و ماست محلی جداسازی شده بود) علیه *لیستریا اینوکوا*، *باسیلوس سرئوس*، *شیگلا فلکسنری*، *اشریشیا کولای*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *یرسینیا انتروکولیتیکا*، *کلبسیلا پنومونیه* مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس ماهیت پروتئینی عامل ضدباکتریایی با استفاده از آنزیم تریپسین بررسی گردید. هر آزمون در سه تکرار انجام و میانگین قطر هاله عدم رشد اندازه‌گیری سویه‌ها با هم مقایسه شدند. طبق نتایج مطالعه، سویه‌های اسید لاکتیک توان ضدباکتریایی خوبی را در مقابل باکتری‌های شاخص 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 انتروکولیتیکا* به‌ترتیب بیش‌ترین و کم‌ترین بازدارندگی را نشان داد. *اشریشیا کولای* و *شیگلا فلکسنری* حساس‌ترین و *باسیلوس سرئوس* مقاوم‌ترین سویه‌های شاخص در برابر باکتری‌های اسید لاکتیک بومی شناخته شدند. هم‌چنین نتایج تیمار آنزیمی ماهیت پروتئینی عوامل آنتاگونیستی تولید شده توسط باکتری‌های لاکتیکی را تأیید کرد. بر اساس یافته‌های مطالعه، سویه بومی T_2 را می‌توان سویه‌ای با پتانسیل بسیار بالا برای مهار رشد باکتری‌های گرم منفی نظیر *شیگلا فلکسنری*، *اشریشیا کولای*، *یرسینیا انتروکولیتیکا* و *کلبسیلا نومونیه* در نظر گرفت.

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

مقدمه

در سال‌های اخیر وقوع تعداد زیادی از بیماری‌های غذایی و افزایش نگرانی در مورد حفظ غذاهای فرآوری شده منجر به آگاهی روزافزونی در زمینه اهمیت ایمنی مواد غذایی شده و این امر موجب توسعه 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 مونوسایتوژنز* (*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 مصرف‌کنندگان 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 acid bacteria) مهم‌ترین گروه باکتریایی شناخته شده در میان میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک هستند که در این میان دو جنس لاکتوباسیلوس و انتروکوکوس جزو 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 روی متابولیت‌های ضدباکتریایی باکتری‌های تخمیرکننده مواد غذایی صورت گرفته است تا بتوان از این مواد طبیعی به‌عنوان جایگزین نگه‌دارنده‌های شیمیایی استفاده کرد. برخی متابولیت‌های تولید شده توسط باکتری‌های اسید لاکتیک شامل اسیدهای آلی (اسید لاکتیک و اسید استیک)، هیدروژن پراکسید و 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 از بین بردن یا مهار تولید می‌شوند (Pandey *et al.*, 2013). باکتریوسین‌های خاص تولید شده توسط باکتری‌های اسید لاکتیک انواع پاتوژن‌های غذایی از جمله *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، به‌منظور غربالگری باکتری‌های اسید لاکتیک تولید کننده باکتریوسین توسعه یافته است که شامل روش نقطه‌گذاری پلیت (spot-on-lawn)، روش انتشار از چاهک (agar well diffusion)، روش انتشار از دیسک (disk diffusion assay) می‌باشد (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* انجام گرفت و مشخص شد که باکتریوسین‌های تولید شده به لیزوزیم و کاتالاز مقاوم بودند، اما با تریپسین و پپسین تجزیه و غیرفعال گردیدند (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 *لیستریا منوسایتوژنز* نشان دادند که *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* یکی از مؤثرترین گونه‌های باکتری‌های اسید لاکتیک است (Sip *et al.*, 2012). با توجه به افزایش تقاضا برای مواد نگه‌دارنده طبیعی و لزوم امنیت غذایی بیشتر، شناسایی سویه‌های تولیدکننده باکتریوسین یک ضرورت محسوب می‌شود. هدف از این پژوهش شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک تولیدکننده باکتریوسین علیه باکتری‌های شاخص غذایی و تعیین ماهیت پروتئینی عامل ضدباکتریایی بود.

مواد و روش‌ها

- سویه‌ها و محیط‌های کشت

در این تحقیق از ۱۰ باکتری اسید لاکتیک و یک سویه استاندارد بومی لاکتوباسیلوس پلانتاروم L_{28} موجود در مجموعه میکروبی پژوهشکده بیوتکنولوژی شمال‌غرب و غرب (تبریز، ایران) استفاده گردید. یک سویه استاندارد *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (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 broth (Sigma-Aldrich) حاوی ۳۰٪ حجمی گلیسرول در فریزر ۸۰- نگه‌داری شده بودند. در این پژوهش هفت سویه شاخص عامل بیماری غذایی 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 انتروکولیتیکا* (*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، به‌منظور دستیابی به کشت تازه و فعال، باکتری‌های اسید لاکتیک فریز شده در دمای آزمایشگاه از انجماد خارج و پس از کشت سطحی آن‌ها بر روی محیط کشت MRS agar (Sigma-Aldrich, Germany)، به‌مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری (Heraeus, Germany) گردید. سپس از کشت‌های ۱۸ ساعته، مقادیر مختلف

به محیط کشت MRS broth منتقل و جذب نوری با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ٦٢٥ نانومتر تعیین گردید، سپس سوسپانسیون باکتری با کدورتی معادل نیم مک‌فارلند تهیه شد. باکتری‌های شاخص بیماری‌زای غذایی نیز پس از کشت سطحی بر روی محیط کشت مولر- هینتون آگار (Merck, Germany)، به‌مدت ١٨ ساعت در دمای ٣٧ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری گردید. سپس از کشت‌های ١٨ 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 مک‌فارلند تهیه شد (Akhondzade *et al*., 2003).

- تولید عامل ضدباکتریایی

برای تولید عامل ضدباکتریایی از کشت‌های فعال شده باکتری‌های اسید لاکتیک به نسبت ١٠٪ حجمی به محیط کشت MRS مایع تلقیح داده شد و در شرایط کم هوازی (در فالکون‌های در بسته) و در دمای ٣٧ درجه سلسیوس به‌مدت ٤٨ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید.

- جداسازی مایع رویی کشت حاوی عامل ضدباکتریایی

به‌منظور جداسازی مایع رویی کشت حاوی عامل ضدباکتریایی و حذف سلول‌های باکتری، محیط کشت ٤٨ ساعته حاوی سلول‌های باکتریایی با دور ٦٠٠٠RPM در دمای ٤ درجه سلسیوس به‌مدت ٢٠ دقیقه سانتریفوژ (Heraeus, Germany) گردید.

- تیمار مایع رویی کشت با سدیم هیدروکسید ٤ مولار

مایع رویی کشت باکتری‌های اسیدلاکتیک با استفاده از سود ٤ نرمال روی ٦ 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 از فیلتر غشایی ٠/٢٢ میکرومتر (Jet-Biofil, Canada) عبور داده شد (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). به‌این ترتیب که ١٠٠ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری شاخص با کدورت معادل نیم مک‌فارلند در پلیت‌های حاوی ٢٠ میلی‌لیتر محیط کشت مولر- هینتون با آگار نرم (حاوی ٠/٨ درصد 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 ٢٠ میکرولیتر از مایع رویی کشت تهیه شده از باکتری‌های اسید لاکتیک بر روی دیسک‌ها قرار داده شد. به‌منظور انتشار باکتریوسین از دیسک بر روی محیط کشت، پلیت‌ها به‌مدت ١ ساعت در دمای ٤ درجه سلسیوس قرار گرفتند و سپس در دمای ٣٧ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند. بعد از ١٢ ساعت فعالیت آنتی‌باکتریایی مایع رویی کشت با اندازه‌گیری قطر هاله مهار رشدی با استفاده از کولیس تعیین شد.

- 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 که pH آن روی ٦ تنظیم شده بود با آنزیم کاتالاز (Sigma-Aldrich, Germany) تیمار گردید. ابتدا مقدار یک میلی‌گرم از آنزیم پودری کاتالاز طبق پروتکل محلول‌سازی سازنده، در یک میلی‌لیتر بافر فسفات‌پتاسیم ٥٠ 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 سلسیوس تیمار گردید و سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰ درجه سلسیوس 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 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 سلسیوس تیمار گردید و سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰ درجه سلسیوس 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 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 درصد انجام گرفت (Alizadeh and Tarinejad, 2010). گراف‌ها با نرم‌افزار Excel 2013 ترسیم شدند.

یافته‌ها

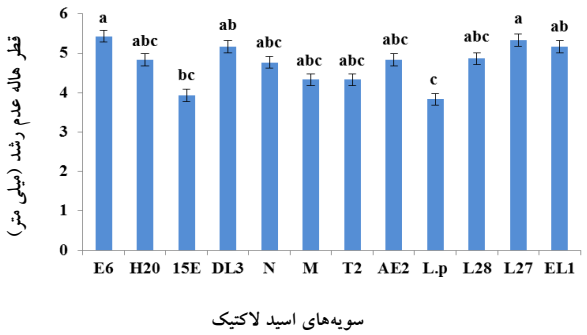
تجزیه واریانس فاکتوریل اثرات سویه‌های مختلف باکتری اسید لاکتیک و پاتوژن نشان داد جدول (۱) بین پاتوژن‌ها، بین سویه‌ها و نیز اثر متقابل پاتوژن × سویه در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار می‌باشد. بنابراین، با توجه به معنی‌دار بودن اثر متقابل، مقایسه میانگین برای هرکدام از پاتوژن‌ها به‌طور جداگانه انجام گرفت (نمودارهای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

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

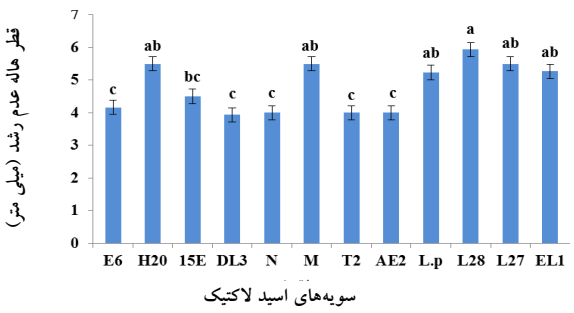
منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	مقادیر آماره F
پاتوژن	٦	۲۷/٥٤	۱۳۳/۲۸**
سویه باکتری اسید لاکتیک	۱۱	٥/۷۹	۲۸/۰۲**
پاتوژن × سویه	٦٦	۳/۲۷	۱٥/۸۲**
خطا	۱٦۸	۰/۲۰۷	

** به مفهوم معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪

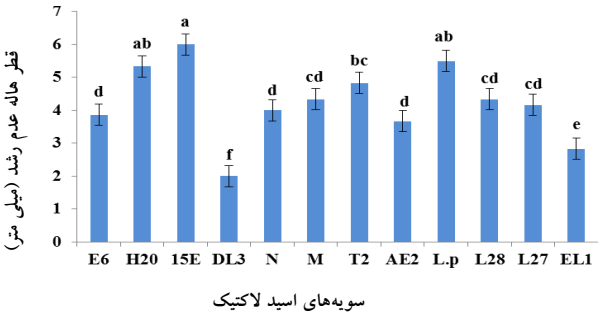
فعالیت ضدباکتریایی مایع رویی حاصل از کشت ۱۰ سویه اسید لاکتیک بومی و دو سویه اسید لاکتیک شاهد با pH خنثی علیه ۷ باکتری شاخص عامل بیماری غذایی مورد ارزیابی قرار گرفت که به‌صورت نمودار مقایسه میانگین نشان داده شده است (نمودارهای ۱ تا ۷). از میان سویه‌های بررسی شده سویه‌های H_{20}، M، L.p، L_{28}، L_{27} و EL_1 بیشترین بازدارندگی را علیه لیستریا *اینوکوا* (نمودار ۱)، سویه‌های DL_3، E_6، L_{27} و EL_1 بیشترین بازدارندگی را علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* (نمودار ۲)، سویه‌های H_{20}، M، L_{27}، E_6، 15E و T_2 بیشترین بازدارندگی را علیه *اشریشیا کولای* (شکل ۳) داشتند. سویه‌های H_{20}، L.p، 15E و T_2 بیش‌ترین بازدارندگی را علیه *کلبسیلا نومونیه* (نمودار ٤)، سویه‌های L_{27}، M و 15E بیش‌ترین بازدارندگی را علیه *باسیلوس سرئوس* نشان دادند (نمودار ٥)، سویه‌های H_{20}، M، T_2، L_{27}، EL_1، L_{28}، AE_2 و L.p بیش‌ترین بازدارندگی را علیه *یرسینیا انتروکولیتیکا* (نمودار ٦) و سویه‌های L_{28}، 15E و EL_1 بیش‌ترین بازدارندگی را علیه *شیگلا فلکسنری* (نمودار ۷) داشتند. نتایج نشان داد که سویه M علیه تمام سویه‌های شاخص و سویه‌های T_2، L_{27} علیه شش باکتری شاخص دارای اثر بازدارندگی بوند. با توجه به نتایج حاصل *لیستریا اینوکوا*، *اشریشیا کولای* و *شیگلا فلکسنری* به‌عنوان حساس‌ترین سویه و باکتری‌های شاخص *یرسینیا انتروکولیتیکا* و *باسیلوس سرئوس* 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 انتروکولیتیکا* به‌ترتیب 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 فعال را نشان می‌دهد (شکل ۹).



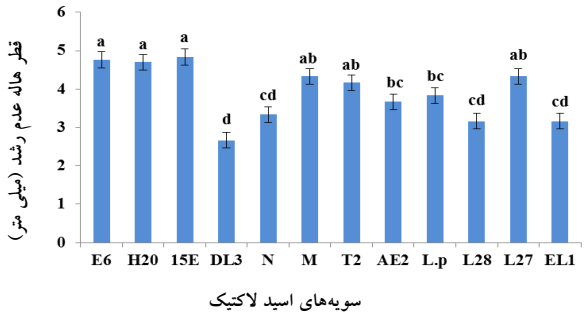
نمودار (۲)- مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۲ سویه اسید لاکتیک در pH خنثی علیه باکتری شاخص *استافیلوکوکوس اورئوس*



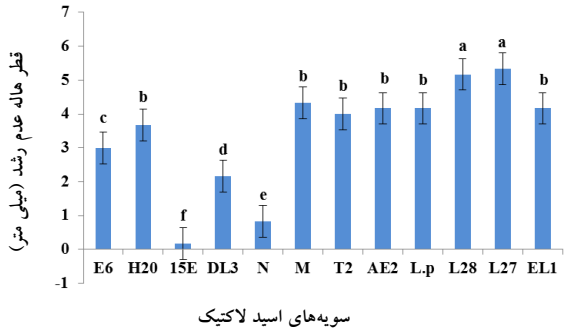
نمودار (۱)- مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۲ سویه اسید لاکتیک در pH خنثی علیه باکتری شاخص *لیستریا اینوکوا*



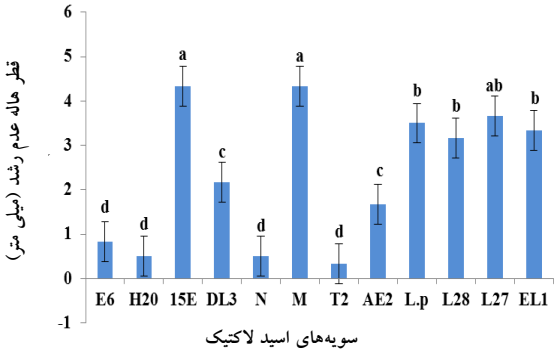
نمودار (٤)- مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۲ سویه اسید لاکتیک در pH خنثی علیه باکتری شاخص *کلبسیلا پنومونیه*



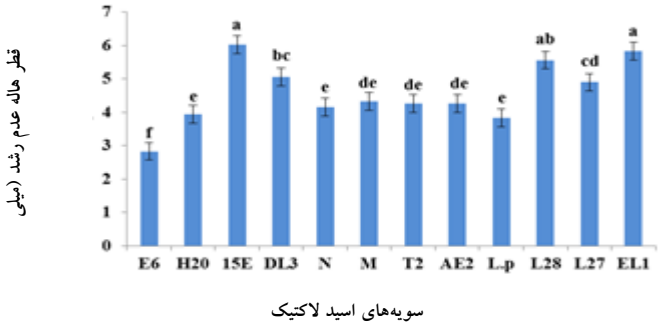
نمودار (۳)- مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۲ سویه اسید لاکتیک در pH خنثی علیه باکتری شاخص *اشرشیا کولای*



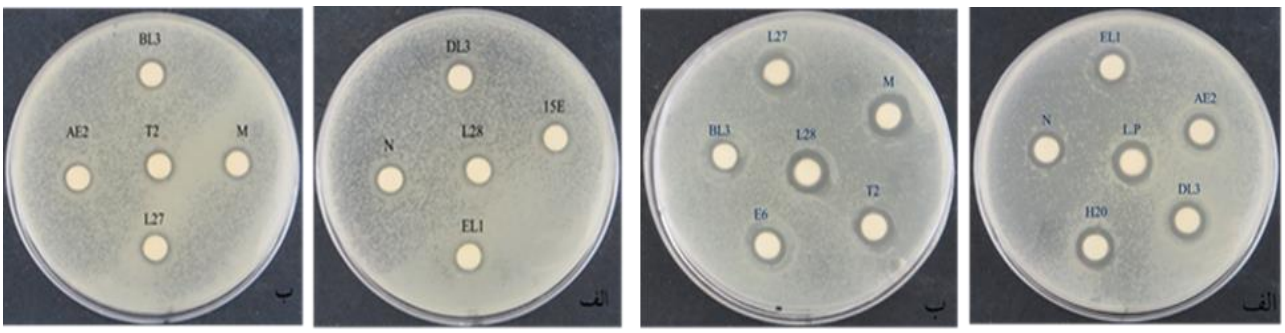
نمودار (٦)- مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۲ سویه اسید لاکتیک در pH خنثی علیه *یرسینیا انتروکولیتیکا*



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



نمودار (۷)- مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۲ سویه اسید لاکتیک 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 لاکتیک گزینش شده علیه *لیستریا اینوکوا* را نشان می‌دهد. دو سویه L_{28} و L.p: شاهد کنترل مثبت.

شکل (۹)- بررسی هاله عدم رشد مایع رویی کشت تیمار شده با آنزیم تریپسین علیه *S. flexneri* سویه L_{28}: شاهد کنترل مثبت.

مقایسه‌های گروهی اثر هر کدام از سویه‌ها به‌تنهایی روی باکتری‌های گرم مثبت و منفی نشان داد که مایع رویی کشت خنثی شده هر کدام از سویه‌ها از نظر تأثیر بر روی قطر هاله عدم رشد در باکتری‌ها گرم مثبت و منفی به استثنای سویه T2 یکسان بوده و نشان‌دهنده این موضوع است که سویه‌ها از نظر قطر عدم هاله رشد روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی یکسان عمل نموده‌اند (جدول ۲). به‌عبارت دیگر توانستند رشد هر دو نوع باکتری را مهار نمایند و این یکی از ویژگی‌های خوب سویه بومی جداسازی شده از محصولات لبنی می‌باشد. سویه بومی T_2 سویه‌ای با پتانسیل بسیار بالا برای مهار رشد باکتری‌های گرم منفی نظیر شیگلا، *ای‌کولای*، 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 +	۳/٤٨±۰,٦٩٢	۳/٦١±۰/٧٩٣	٤/٢٦±۰/١٢٩	۳/٧٨±۰/٤۰۹	۳/۰۹±۰/٦٦٨	۳/۹±۰/٤۳۰
میانگین قطر عدم هاله رشد گرم −	۳/٦٢±۰/٢۳۹	٤/٤١±۰/٢١٥	٤/٢٦±۰/٧٢٨	۲/۹٧±۰/۳٨۰	۳/۰٨±۰/٤١٢	۳/٧١±۰/٢٤٨
آماره t	−۰/١۹ns	−۰/٩٦۹ns	−۰/۰۰٤ns	١/۳٢ns	۰/۰۰٧ns	۰/٤١٢ns
مقایسه گروهی	سویه T2	سویه AE2	سویه L.P	سویه L28	سویه L27	سویه EL1
میانگین قطر عدم هاله رشد گرم +	٢/٨۹±۰/٦٤٥	۳/٥±۰,٥۰٧	٤/١۹±۰/۳۰٤	٤/٦٦±۰/٤٤	٤/٨۳±۰/۳٥۳	٤,٥٨۹±۰/۳٧
میانگین قطر عدم هاله رشد گرم −	٤/۳٢±۰/١٤٦	۳/۹٤±۰/١١٨	٤/۳۳±۰/٢٢٤	٤/٥٦±۰/۳١	٤/٦٨±۰/١٧۰	٤/۰۰±۰/۳٥۹
آماره t	−٢/٤٦٤*	−۰/٨٤٨ns	−۰/۳۹ns	۰/١٨٥ns	۰/٤١٤ns	١/١٢۳ns

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 سویه لاکتوباسیلوس و ۵ سویه انتروکوکوس بومی جداسازی شده از شیر و ماست، سویه استاندارد *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* مولد باکتریوسین گروه IIa (Liu *et al.*, 2014) و هم‌چنین سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* L_{28} که به‌عنوان یکی از سویه‌های بومی تولید کننده باکتریوسین گروه IIb شناسایی شده بود (Gholamzadeh *et al.*, 2017) به‌عنوان باکتری شاهد مثبت مورد استفاده قرار گرفت. 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*، *اشریشیا کولای*، *شیگلا فلکسنری* به‌عنوان حساس‌ترین سویه‌ها و *یرسینیا انتروکولیتیکا* و *باسیلوس سرئوس* 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 به‌دلیل 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 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 انتروکولیتیکا* 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 انتروکولیتیکا*، *کلبسیلا پنومونیه* و *شیگلا فلکسنری*، سویه T_2 بر روی باکتری شاخص گرم منفی *اشریشیا کولای*، *یرسینیا انتروکولیتیکا*، *کلبسیلا پنومونیه*، سویه AE_2، EL_1 بر روی باکتری شاخص گرم منفی *یرسینیا انتروکولیتیکا*، *شیگلا فلکسنری*، مشابه تأثیر مثبت باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* Lp6SH بر روی باکتری‌های شاخص گرم مثبت و گرم منفی بود (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 به‌همراه مواد شلاته‌کننده و متابولیت‌های دیگر در مواد غذایی به‌خوبی 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، *باسیلوس سوبتیلیس*، *اشریشیا کولای*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان دادند که ممکن است به‌دلیل تولید چندین ترکیب ضدباکتریایی مانند اسیدهای آلی، پراکسید هیدروژن و یا باکتریوسین‌ها باشد (Sifour *et al.*, 2012). به‌همین 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 ۳۵ سویه *پلانتاروم* F12، *لاکتوباسیلوس کورواتوس* (*L. curvatus*)، *لاکتوباسیلوس گاسری* (*L. gasseri*)، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس کازئی* (*L. casei*) در شرایط مایع رویی خنثی در برابر سویه‌های شاخص *استافیلوکوکوس اورئوس*، *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 باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سوبتیلیس* و *لیستریا منوسایتوژنز* حفظ کردند. در بررسی حاضر بعد از تیمار محلول رویی با آنزیم تریپسین غیرفعال‌سازی کامل فعالیت آنتی‌باکتریایی مشاهده گردید (شکل ۹) که ماهیت پروتئینی عامل فعال را تأیید می‌کند. در تحقیقی با روش انتشار از چاهک برای به‌دست 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 *لیستریا مونوسایتوجنز*، *ای‌کولای* و

باسیلوس سوبتیلیس 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 *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ST 13BR ثبت شده است. مشاهده کردند که تریپسین، کیموتریپسین و رنین هیچ تأثیری بر باکتریوسین تولید شده توسط باکتری جدا شده از غلات سنتی بلغارستان نظیر *لاکتوباسیلوس لاکتیس* زیرگونه *لاکتیس* 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 نشان‌دهنده 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 فرآورده‌ها و مواد غذایی تخمیری سنتی نقش به‌سزایی 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.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی برای اعلام ندارند.

منابع

- Abo-Amer, A.E. (2007). Characterization of a bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Lactobacillus plantarum* isolated from Egyptian home-made yogurt. Science 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 Publication. 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., *et al*. (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): 149-158.
- 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.

Journal of Food Hygiene, Vol. 8, No. 29, Spring 2018

Antagonistic effect of native lactic acid bacteria against foodborne bacterial pathogens

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

1. M.Sc Student of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran
2. Associate Professor of 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

[*] & R U U H V S R Q G L Q J D X W K R U (atarinejad@yahoo.com) $ Y W K R U L W \ R I P L D O

(Received: 2017/1/6 Accepted: 2017/11/11)

Abstract

Identification of bacteriocin-producing lactic acid bacteria (LAB) has been noticeable by most researchers. Surveys showed that LAB bacteriocins have remarkable antagonistic effects against foodborne pathogens. Consequently, these bacteriocins could be used as natural preserving for foods. In this research, the antimicrobial effect of supernatants derived from 10 standard and native strain of LAB (previously isolated from raw milk and traditional yogurt) were evaluated against *Listeria innocua*, *Bacillus cereus*, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, and *Klebsiella pneumonia*. All treatments were conducted in three replicates and the mean values of the inhibition zone diameters were compared. Moreover, protein nature of the antibacterial agents was identified by trypsin treatment. According to the results, LAB showed a satisfactory antagonistic effect against indicator organisms. Among the LAB, 15E strain demonstrated the highest (6.03 mm) and lowest (0.167 mm) inhibitory impact on *S. flexneri* and *Y. enterocolitica*, respectively. It was revealed that *E. coli* and *S. flexneri* were identified as the most sensitive and *B. cereus* as the most resistant strain against native LAB bacteriocins. Trypsin treatment confirmed the protein nature of the antagonistic agents produced by the LAB. It was concluded that T2 native strain could be considered as the most effective strain versus gram-negative bacteria such as *S. flexneri*, *E. coli*, *Y. enterocolitica*, and *K. pneumonia*.

Conflict of interest: None declared.

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