Archive of SID

Iranian Journal of Medical Microbiology | ISSN:2345-4342

Identification and Evaluation of the Antimicrobial Potential of Strains Derived from Traditional Fermented Dairy Products of Iran as A Biological Preservative Against *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* and *Escherichia coli*

Ahmad Nasrollahzadeh[1], Morteza Khomeiri*[1], Mandana Mahmoudi[1], Alireza Sadeghi[1], Maryam Ebrahimi[1]

Department of Food Microbiology, Faculty of Food Sciences and Industries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

10.30699/ijmm.13.5.391

ABSTRACT

Background: Today, despite improved food safety, nearly a quarter of the population is at risk for foodborne diseases. Therefore, the use of lactic acid bacteria and their metabolites due to their potential health benefits, safety and production of natural antimicrobial compounds is an appropriate solution to reduce microbial spoilage of food.

Materials & Methods: In this research, lactic isolates were identified by PCR method and Micro-dilution method was used to evaluate the antimicrobial activity of the Cell-Free spent Medium (CFSM).

Results: The sequencing of PCR products showed that the species identified were *Lactobacillus* and *Enterococcus* species. Evaluation of the antibacterial properties of the CFSM on the growth of Gram-positive bacteria showed that all isolates were able to prevent the growth of these pathogens, and their inhibitory percentages varied from 86.81 to 38.81 percent. The results of inhibitory effects of lactic isolates on the growth of two gram-negative bacteria of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* also showed that the inhibitory levels of the isolates were varied from 2.43 to 36.43 percent and 14.1 to 31.97 percent, respectively. A comparison of the inhibitory effect of lactic isolates on pathogenic bacteria showed that the inhibitory effect of all lactic isolates on gram-positive bacteria was significantly ($P < 0.05$) more than their effect on gram-negative bacteria.

Conclusion: The results of this study showed that native dairy lactic acid isolates and their metabolites could be used as biological preservatives or in combination with synthetic preservatives in the food and drug industry.

Keywords: Antimicrobial, Lactic acid bacteria, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, Natural preservatives

Received: 2019/08/18; **Accepted**: 2019/11/30; **Published Online:** 2020/01/10

Corresponding Information: **Morteza Khomeiri,** Department of Food Microbiology, Faculty of Food Sciences and Industries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. Email: khomeiri@gau.ac.ir

Copyright © 2019, This is an original open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License, which permits copy and redistribution of the material just in noncommercial usages with proper citation.

Use Mobile to scan and read the article online

Nasrollahzadeh A, Khomeiri M, Mahmoudi M, Sadeghi A, Ebrahimi M. Identification and Evaluation of the Antimicrobial Potential of Strains Derived from Traditional Fermented Dairy Products of Iran as A Biological Preservative Against Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus, Salmonella enterica and Escherichia coli. Iran J Med Microbiol. 2019; 13 (5) :392-405

Download citation: BibTeX | RIS | EndNote | Medlars | ProCite | Reference Manager | RefWorks

Send citation to: Mendeley Zotero RefWorks

Introduction

The term “foodborne diseases” is more commonly referred to as food poisoning, is used to describe the gastrointestinal side effects that occur following the consumption of certain foods or drinks. Foodborne illnesses affect 48 million people in the United States each year **(1-3)**. There are more than 200 identified diseases that can be transmitted through food and by various factors such as bacteria, fungi, viruses, and parasites. According to food safety and health experts, millions of people around the world each year are affected by foodborne pathogens. While food supply and production in the United States is one of the safest in the world, the US Centers for Disease Control and Prevention estimate that foodborne illnesses cause 76 million

www.SID.ir

Archive of SID

illnesses, more than 300,000 per year hospitalization, and 5,000 deaths in the United States (4-6). This figure is also estimated to be 2366,000 in England and Wales, 21138 hospitalizations, 718 deaths (7). On the other hand, with the frequent spread of diseases caused by new pathogens, the use of antibiotics in livestock breeding and resistance gene transfer to human, and current concerns about bovine spongiform encephalitis are just a few examples of these risks (8).

Thus, despite extensive advances in health and food safety food borne pathogens still cause many poisoning and digestive problems for consumers. *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* are food borne pathogens that cause problems for consumers for various reasons such as lack of hygiene before, during or after food production.

Over the past decade, there has been a growing interest in improving the quality and enhancement of food safety by replacing conventional conservation and maintenance systems with natural alternatives. Bio-preservatives are defined as "the use of microorganisms or their metabolites to prevent spoilage, enhance food safety and shelf life" (9,10). Lactic Acid Bacteria (LAB) are bio-preservatives that play a key role in the fermentation process (11). In addition, it has been shown that LAB have antimicrobial activity in fermented foods and therefore can be used as natural preservatives to inhibit the growth of food born pathogenic bacteria and fungi (12,13). Lactic acid bacteria produce a variety of metabolites including organic acids, bacteriocins, hydrogen peroxide and low molecular weight metabolites such as diacetyl and reuterin with inhibitory effects on Gram-negative and Gram-positive producing food spoilage bacteria (such as *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Shewanella*) and as well as food poisoning bacteria (such as *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Clostridium botulinum* type E, *Yersinia enterocolitica*) (14). The mechanism of action of bacteriocins is to destabilize the cells and increase the permeability of the cytoplasmic membrane. Lactic bacteria produce a wide range of bacteriocins (nisin, pediocin, lactacin, divergine, diplocin, elactosterone) that have a different antimicrobial spectrum but are more likely to be effective on Gram-positive pathogenic and food spoilage bacteria (15). In this study, we tried to evaluate the antimicrobial potential of a number of lactic acid bacteria isolated from traditional products against some food-borne pathogens.

Materials and Methods

Bacterial Strains

In this study, bacteria isolated from local yogurt and milk and camel dooq (yogurt drink) of Golestan province with codes M109, M8, Y92, Y91, 8C, Y102, M153, Y73, Y52, Y98, Y89 that were prepared from microbial collection in Department of Food Science and Technology of Gorgan University, were used. To investigate the antimicrobial properties of the pathogenic bacteria, *L. monocytogenes* (ATCC 19115, PTCC 1298), *S. enterica* (ATCC 14028, PTCC 1709), *E. coli* (ATCC 25922, PTCC 1399) and *S. aureus* (ATCC 25923, PTCC 1431) were used. All pathogenic bacteria were purchased from the Persian Type Culture Collection (PTCC), Tehran, Iran.

Activation of Isolates and Phenotypic Identification

For this purpose, the isolates were first cultured in MRS broth under anaerobic conditions at 37°C. Identification of the isolates in early stages was performed using phenotypic criteria such as colony shape and cell morphology, Gram staining and catalase activity. MRS agar and MRS broth and yeast extracts were prepared from Merck, Germany and Muller Hinton Agar (MHA) from Sigma, USA.

Molecular Identification of Isolates

The DNA extraction was carried out using a commercial DNA extraction kit (Takapouzist, South Korea). To identify molecularly LAB by PCR, Universal primers (1492R: 5´-GGTTACCTTGTTACGACTT-3´ and 27F: 5´-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3´) were used to amplify 16S rDNA variable regions. The length of the amplified DNA fragment was 1500 bp.

The PCR was performed in a volume of 30 µL with optimized amounts of 15 µL of Red 2X Master Mix (Macrogen, South Korea), 5.5 µL of each primer, 3 µL of DNA and 11 µL of water in a thermo cycler (Corbett research, CG1-96, Australia).

PCR products were sent to Macrogen Company in South Korea for sequencing. Sequences were compared with available sequences in the world gene bank (NCBI) using the Blast program. Isolates with the highest percentage of similarity of their sequences with the stored sequences in the gene bank were identified as the same species.

Evaluation of Antibacterial Activity of the Isolates

The micro-dilution method was used to evaluate the antimicrobial activity of the Cell Free Spent Medium (CFSM) of 24-hour culture of lactic isolates against pathogenic bacteria including *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. enterica* and *E. coli*. At first, LAB were cultured in MRS broth under anaerobic conditions at 37°C. At the end of the logarithmic phase, CFSMs were centrifuged at 6,000 rpm for 10 min and then filtered with a 0.45 µm syringe filter and were used for antimicrobial testing. To determine the antimicrobial effect, 185 µL of CFSM of each lactic isolate along with 15 µL of pathogenic bacteria (10^5 cfu/mL) were added into each well. After 24 h of incubation under aerobic conditions at 37°C, the samples

www.SID.ir

Archive of SID

absorbance were measured at 600 nm. The inhibitory percentage of lactic isolates was calculated as follows:

1- [the growth in test well/ the growth in positive control well] × 100

Statistical Analysis

The results of this study were analyzed by one-way ANOVA and LSD at the significant level of 0.05 in three replications using SPSS 19 (SPSS In., Chicago, IL., USA) and Microsoft Excel 2007 software was used to draw charts.

Results

Molecular Identification of Activated Isolates

To confirm DNA replication, the PCR products were loaded onto gel electrophoresis (Figure 1).

As shown in Figure 1, the PCR products of each of the 11 extracted DNA samples had a length of 1500 bp. After blasting the PCR product sequences with the data in the NCBI database, it was found that the isolates were *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fermentum*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus rhamnosus* (Table 1). Based on the above results and the obvious differences between molecular and biochemical identification, it can be concluded that molecular identification of microbial strains using the 16S rDNA gene region is the most accurate method.

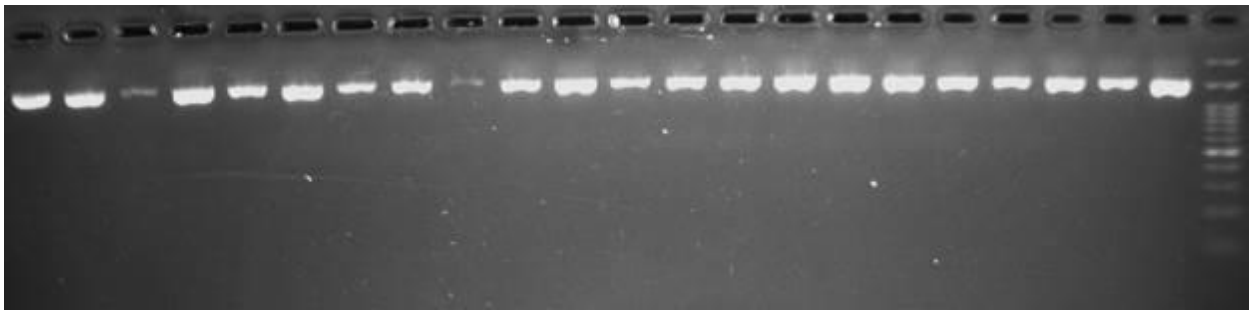


Figure 1. Gel Electrophoresis of PCR products containing specific primer with 500 Bp target sequence on 1.5% gel agarose. 1: Marker, 2: Positive control (*Lactobacillus plantarum*), No. 12 to 22: activated samples from 1 to 11, respectively.

Table 1. Sequencing results of activated isolates and comparison of results obtained from biochemical and molecular identification

No.	Isolate code	source	Molecular identification	Biochemical identification
1	Y92	Local yogurt	*Lactobacillus brevis*	*Lactobacillus* spp.
2	M153	Local milk	*Lactobacillus rhamnosus*	*Lactobacillus* spp.
3	C8	Camel dooq	*Enterococcus faecium*	*Pediococcus pentosaceus*
4	M109	Local milk	*Enterococcus faecium*	*Enterococcus* spp.
5	Y98	Local yogurt	*Lactobacillus acidophilus*	*Lactobacillus* spp.
6	Y52	Local yogurt	*Lactobacillus brevis*	*Lactobacillus* spp.
7	M8	Local milk	*Enterococcus faecium*	*Enterococcus* spp.
8	Y91	Local yogurt	*Lactobacillus reuteri*	*Lactobacillus* spp.
9	Y102	Local yogurt	*Lctobacillus rhamnosus*	*Lactobacillus* spp.
10	Y73	Local yogurt	*Enterococcus faecium*	*Enterococcus hirae*
11	Y89	Local yogurt	*Lactobacillus rhamnosus*	*Lactobacillus* spp.

www.SID.ir

Archive of SID

Antibacterial Activity of the Isolates

Among the identified isolates, 11 isolates of different genera and species were selected and then their antimicrobial activity against pathogenic bacteria was investigated by micro-dilution method (Figures 2 to 5). The results of the evaluation of the inhibitory effects of the CFSM of lactic isolates on the growth of *L. monocytogenes* (Figure 2) showed that the percentage of inhibition of the CFSM of the lactic isolates were varied from 29.96 to 30.99 percent. Among the isolates, *E. faecium* C8 isolated from camel dooq showed the highest inhibitory percentage (P<0.05). Also, no significant difference was observed in the inhibitory percentage among *L. rhamnosus* Y89, *E. faecium* M109 and *L. reuteri* Y91. Also, *L. brevis* Y92 had the lowest inhibitory percentage (P<0.05).

The results of the evaluation of the inhibitory effects of CFSM of lactic isolates on the growth of *S. aureus* are shown in Figure 3. As shown, *L. rhamnosus* Y89 and *E. faecium* M109 had the highest percentage of inhibition against *S. aureus*. Also *E. faecium* Y73 had significantly the least inhibitory effect (P<0.05).

In another part of this study, the inhibitory effects of the CFSM of lactic isolates on the growth of two gram-negative bacteria including *E. coli* (Figure 4) and *S. enterica* were investigated (Figure 5). The results showed that the inhibitory rate of the isolates on the growth of *E. coli* and *S. enterica* varied from 2.42 to 36.93 percent and from 1.14 to 31.97 percent, respectively. Also, the highest inhibitory effect on *E. coli* belonged to *E. faecium* M109 isolated from milk and the lowest inhibitory rate belonged to *L. brevis* Y92 isolated from yogurt (P<0.05).

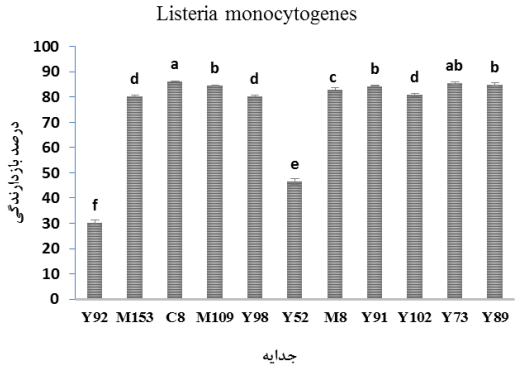


Figure 2. Inhibitory effects of CFSM of lactic isolates on growth of Listeria monocytogenes

* Similar letters in each column indicate no significant difference at 0.05 level.

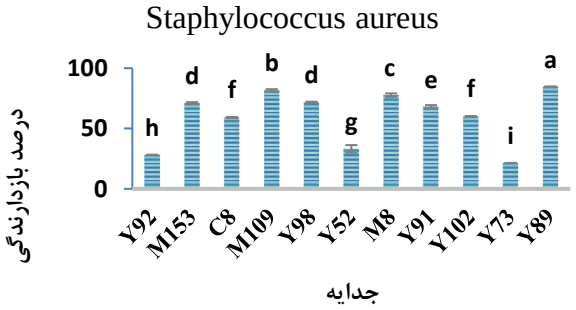


Figure 3. The inhibitory effects of the CFSM of lactic isolates on the growth of *Staphylococcus aureus*

* Similar letters in each column indicate no significant difference at 0.05 level.

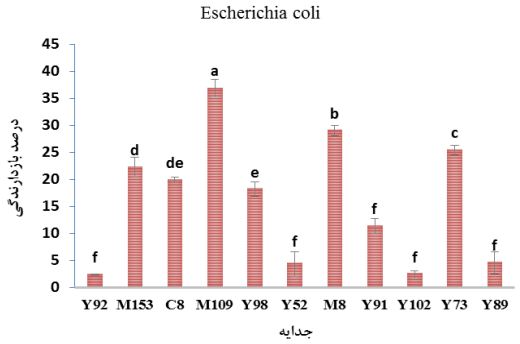


Figure 4. The inhibitory effects of the CFSM of lactic isolates on the growth of *Escherichia coli*

* Similar letters in each column indicate no significant difference at 0.05 level.

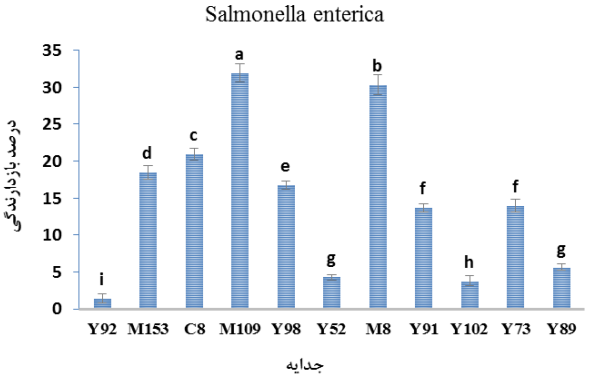


Figure 5. The inhibitory effects of the CFSM of lactic isolates on the growth of *Salmonella enterica*

* Similar letters in each column indicate no significant difference at 0.05 level.

* Y: Local yogurt; M: Local milk; C: Camel dooq

www.SID.ir

Archive of SID

Table 2. Comparison of inhibitory effect of lactic isolates on pathogenic bacteria

No.	Isolate code	Listeria monocytogenes	Staphylococcus aureus	Escherichia coli	Salmonella enterica
1	Y92	0.92 [a]±30.29	0.17 [a]±28.12	0.15[b]±2.44	0.64[b]±1.4
2	M153	0.42 [a]±80.46	0.69 [b]±71.17	1.76[c]±22.29	0.9 [d]±18.46
3	C8	0.085 [a]±86.14	0.43 [b]±59.11	0.53[c] ±19.96	0.74 [c]±20.93
4	M109	0.08 [a]±84.48	1.04 [b]±81.59	1.61[c]±36.93	1.21 [d]±31.97
5	Y98	0.42 [a]±80.46	0.6 [b]±71.71	1.36[c]±18.21	0.55 [c]±16.74
6	Y52	1.25 [a]±46.56	3.12 [b]±33.15	2.29[c]±4.41	0.37 [c]±4.31
7	M8	0.5 [a]±83.06	1.48 [b]±77.67	0.95[c]±29.08	1.32 [c]±30.34
8	Y91	0.17 [a]±84.4	1.3 [b]±68.14	1.4[c]±11.44	0.52 [c]±13.67
9	Y102	0.67 [a]±80.87	0.26 [b]±59.98	0.67[c]±2.5	0.68 [c]±3.78
10	Y73	0.59 [a]±85.49	0.13[c]±21.38	0.88[b]±25.43	0.83 [d]±13.95
11	Y89	0.67 [a]±84.9	0.17 [a]±84.71	2.07 [b]±4.63	0.46[b]±5.65

Similar letters in each row indicate no significant difference at the 0.05 level.

Discussion

According to the results of this study, Lactobacillus and Enterococcus genera were isolated and identified as lactic isolates from traditional fermented dairy products. Other studies have also confirmed the presence of these genera in traditional and native dairy products. In this regard, research by Haghshenas *et al.* (2014) indicated that they were able to identify *Enterococcus mundtii* 50H, *Enterococcus daurans* 39C and *Enterococcus faecalis* 13C in traditional dairy products (18). Tulumoğlu *et al.* (2014) also identified 7 strains of *Lactobacillus fermentum* in a study of more than 100 isolates from Tulum cheese (19). Research by Leite *et al.* (2015) on the study of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains led to the identification of *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus paracasei* isolate and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* **(16)**. Thus, the *Lactobacillus* and *Enterococcus* genera are the most lactic acid bacteria isolated from traditional and native dairy products. The results of evaluation of the inhibitory effect of lactic isolates on *L. monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* showed that all isolates had good antibacterial activity against these two pathogens and the highest inhibition percentage was related to C8 isolate (isolated from camel dough) and Y89 (isolated from local yogurt), respectively. These results are consistent with the findings of Leite *et al.* (2015) who showed that the lactic isolates of *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus paracasei* have inhibitory effect on *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. enterica* and *E. coli* (16). The inhibitory properties of lactic isolates can be attributed to various antimicrobial metabolites such as lactic acid, acetic acid, hydrogen peroxide, carbon dioxide and bacteriocin **(20, 21)**. Casaburi *et al.* (2016) also isolated *Lactobacillus curvatus* 54M16 from Campania's traditional fermented sausage. It produced more than one bacteriocin, including saccharin X, T and P, and showed inhibitory effects on *L. monocytogenes*, *Bacillus cereus*, and *Brochothrix thermosphacta* **(22)**. The results of the inhibitory effects of lactic isolates on the growth of *E. coli* and *S. enterica* also showed that all strains identified from traditional Iranian dairy products except a few strains were able to inhibit the growth of mentioned pathogenic bacteria and the highest inhibition percentage was related to M109 isolate (isolated from local yogurt). In addition, it was found that, among all the isolates, the highest inhibition percentage was related to C8 isolated from camel dough. Also, the cause of less resistance of Gram-positive bacteria than Gram-negative bacteria can be attributed to the impermeable wall and the complex and multilayer structure of these bacteria as well as the presence of an outer membrane. Sabir *et al.* (2010) also isolated *L. acidophilus* strain Z1L from kefir, which was able to significantly inhibit *E. coli* growth **(23)**. Paris Silia *et al.* (2015) also evaluated the antimicrobial effect of different species of *Lactobacillus* genus from traditional Cucido Mexican cheese. Their results showed that the bacteriocin-like compounds produced by these bacteria exhibit significant antimicrobial activity against *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, and *Escherichia coli*. Recently, numerous reports have been published on the antimicrobial activity of lactic acid isolates **(24-26)**. For example, Angmo *et al.* (2016) isolated and identified *Lactobacillus plantarum* KJ722784 from Ladakh and Assohoun *et al.* (2016) isolated and identified *Lactobacillus fermentum* from Doklu that both isolates were able to produce antimicrobial compounds including bacteriocins **(24, 25)**.

Bacteriocins inhibit cell wall synthesis by binding to lipid II, leading to cell death by removing lipid II from the membrane structure and pore formation. They also inhibit DNA replication by blocking the activity of DNA gyrase enzyme, destroying DNA by nuclease

www.SID.ir

Archive of SID

activity, and blocking protein synthesis by disrupting ribosomal activity **(27)**. According to the results of Schillinger *et al.* (2005), *L. acidophilus* had significant accumulation potential against pathogenic bacteria due to its high level of hydrophobicity on the cell surface. There is a direct relationship between the rate of cell wall hydrophobicity and the ability of lactic acid bacteria to accumulate against pathogenic bacteria **(28)**. *L. acidophilus* and *Lactobacillus gasseri* isolated by Fernandez *et al.* (2003) were also able to prevent the growth of Salmonella, Listeria and Campylobacter bacteria without interfering with the microbial flora of the gastrointestinal tract **(29)**. Lactic acid bacteria also have the ability to decrease cholesterol levels, immune system immunization and anti-tumor activity **(30)**.

Due to the importance of specific properties of lactic isolates from traditional and indigenous dairy products, identifying and evaluating the potential properties of these isolates is of great importance.

According to the results of this study, lactic strains isolated from traditional dairy products can be used separately or in combination with other preservatives to reduce the consumption of synthetic preservatives or as starter culture in the food industry.

Conclusion

The sequencing results of PCR products led to the identification of Lactobacillus and Enterococcus genera from traditional fermented dairy products. Also the results of evaluation of the inhibitory effect of Lactic isolates on the growth of *L. monocytogenes* and *S. aureus* showed that all isolates were able to prevent the growth of these two pathogens and their inhibitory percentages varied from 86.14 to 14.14 percent. *L. rhamnosus* Y89 isolated from yogurt and *E. faecium* isolated from camel dough showed the highest inhibition percentage on *L. monocytogenes* and *S. aureus*, respectively.

Comparison of the inhibitory effect of lactic isolates on pathogenic bacteria showed that the inhibitory effect of all tested lactic isolates on Gram-positive bacteria was significantly (P<0.05) more than their effect on Gram negative bacteria. According to the results of this study, all strains isolated and identified from these dairy products are able to prevent the growth of Gram-positive pathogenic *L. monocytogenes* and *S. aureus* and except for some strains, all lactic isolates have the ability to inhibit the growth of Gram-negative bacteria *E. coli* and *S. enterica*. Therefore, it is suggested that the lactic isolates obtained from yogurt, milk and camel dough be used as bio-preservatives in the food and drug industry.

Acknowledgment

……

Conflict of Interest

Authors declared no conflict of interests.

www.SID.ir

Archive of SID

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۳ ـ شماره ۵ ـ آذر و دی ۱۳۹۸

Journal homepage: www.ijmm.ir

شناسایی و بررسی قابلیت ضد میکروبی سویه‌های حاصل از لبنیات تخمیری سنتی ایران به‌عنوان نگهدارندهٔ بیولوژیکی بر باکتری‌های بیماری‌زا *لیستریا مونوسیتوژنز*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سالمونلا انتریکا* و *اشریشیا کلای*

مرتضی خمیری*[۱]، احمد نصرالله‌زاده[۱]، علیرضا صادقی[۱]، ماندانا محمودی[۱]، مریم ابراهیمی[۱]

۱. گروه میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشکده علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچهٔ مقاله

دریافت: ۱۳۹۸/۰۵/۰۷

پذیرش:۱۳۹۸/۰۹/۰۹

انتشار آنلاین: ۱۳۹۸/۱۰/۲۰

موضوع:

میکروبیولوژی مواد غذایی

نویسندهٔ مسئول:

مرتضی خمیری، گروه میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشکده علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران

ایمیل: khomeiri@gau.ac.ir

چکیده

زمینه و اهداف: امروزه علی رغم بهبود ایمنی مواد غذایی، نزدیک به یک چهارم جمعیت در معرض خطر ابتلا به بیماری‌های ناشی از مواد غذایی هستند. بنابراین استفاده از باکتری‌های اسید لاکتیک و متابولیت‌های آنها به دلیل قابلیت‌های بالقوه نظیرخواص سلامت بخشی، ایمن بودن و تولید ترکیبات ضد میکروبی طبیعی یک راه حل مناسب برای کاهش فساد میکروبی مواد غذایی محسوب می‌گردد.

مواد و روش کار: در این پژوهش ابتدا جدایه‌های لاکتیکی که از ماست، شیر محلی و دوغ شتر گلستان جداسازی شده بودند، با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) مورد شناسایی قرار گرفتند و سپس به‌منظور ارزیابی خاصیت ضد میکروبی محیط مایع مصرف‌شده بدون سلول کشت (CFSM) از روش میکرودایلوشن استفاده شد.

یافته‌ها: توالی‌یابی محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز نشان داد که گونه‌های شناسایی شده مربوط به جنس‌های لاکتوباسیلوس و انتروکوکوس بودند. نتایج حاصل از ارزیابی خاصیت ضد باکتریایی محیط مایع مصرف شده بدون سلول کشت بر رشد باکتری‌های بیماری‌زا گرم مثبت نشان داد که همه جدایه‌ها قابلیت جلوگیری از رشد این دو پاتوژن را داشتند و درصد بازدارندگی آنها از ۲۱/۳۸ -۸۶/۱۴ درصد متغیر بود. نتایج اثرات بازدارندگی جدایه‌های لاکتیکی بر رشد دو باکتری گرم منفی *اشریشیا کلای* و *سالمونلا انتریکا* نیز نشان داد که میزان بازدارندگی جدایه‌های مورد بررسی به ترتیب از ۳۶/۹۳-۲/۴۲ درصد و ۱۴/۹۷-۱/۳۱ درصد متغیر بود. مقایسه میزان بازدارندگی جدایه‌های لاکتیکی بر روی باکتری‌های بیماری‌زا نشان داد که میزان بازدارندگی تمام جدایه‌های لاکتیکی مورد بررسی بر روی باکتری‌های گرم مثبت به شکل معنی‌داری ($P<0.05$) بیشتر از تأثیر آن‌ها بر روی باکتری‌های گرم منفی بود.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که جدایه‌های لاکتیکی لبنی بومی مورد آزمون و متابولیت‌های به‌دست آمده از آنها توانایی جلوگیری و مهار رشد باکتری‌های پاتوژن را دارند.

کلید واژه‌ها: ضد میکروبی، باکتری‌های اسید لاکتیک، لیستریا مونوسیتوژنز، استافیلوکوکوس اورئوس، نگهدارنده‌های طبیعی

کپی‌رایت © مجله میکروب شناسی پزشکی ایران: دسترسی آزاد؛ کپی برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیرتجاری با ذکر منبع آزاد است.

مقدمه

اصطلاح بیماری‌های ناشی از غذا (foodborne diseases) که بیشتر تحت عنوان مسمومیت غذایی رایج است، برای مشخص کردن عوارض گوارشی که به دنبال مصرف غذا یا نوشیدنی‌های خاص رخ می‌دهد، استفاده می‌شود. بیماری‌های ناشی از مواد غذایی هر ساله ۴۸ میلیون نفر را در ایالات متحده تحت تاثیر قرار می‌دهند (۳-۱). بیش از ۲۰۰ بیماری شناسایی شده وجود دارد که ممکن است از طریق غذا و بوسیلهٔ عوامل مختلفی نظیر باکتری‌ها، قارچ‌ها، ویروس‌ها و انگل‌ها منتقل شوند. بر اساس نظر کارشناسان بهداشت و ایمنی مواد غذایی، هر ساله میلیون‌ها نفر در سراسر جهان به عوامل پاتوژن ناشی از مواد غذایی مبتلا می‌شوند. در حالی که عرضه و تولید مواد غذایی در ایالات متحده یکی از امن‌ترین نقاط در جهان است، مرکز کنترل و پیشگیری بیماری این کشور تخمین زده است که بیماری‌های ناشی از مواد غذایی هر ساله منجر به ۷۶ میلیون بیماری، بیش از ۳۰۰،۰۰۰ بستری در بیمارستان، و ۵۰۰۰ مرگ در آمریکا می‌شود (۴-۶). همچنین این

www.SID.ir

Archive of SID

میزان در انگلستان و ولز به صورت ۲۳۶۶۰۰۰ بیماری، ۲۱۱۳۸ بستری، ۷۱۸ مرگ و میر تخمین زده شده است (۷). از طرفی با شیوع مکرر بیماری‌های ناشی از پاتوژن‌های جدید، استفاده از آنتی بیوتیک‌ها در پرورش دام و انتقال ژن مقاومت به انسان و نگرانی‌های جاری در مورد آنسفالیت اسفنجی شکل گاوی، تنها چند نمونه از این خطرات است (۸).

بنابراین علی رغم پیشرفت‌های گسترده‌ای که در زمینه بهداشت و ایمنی مواد غذایی صورت گرفته است، هنوز هم پاتوژن‌های شاخص، باعث مشکلات ایجاد مسمومیت و مشکلات گوارشی متعددی برای مصرف کنندگان می‌شوند. *لیستریا مونوسیتوژنز*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سالمونلا انتریکا* و *اشریشیا کلای* از جمله این پاتوژن‌های شاخص هستند که به دلایل مختلفی نظیر عدم رعایت بهداشت قبل، حین و یا بعد از تولید مواد غذایی باعث ایجاد مشکل برای مصرف کنندگان می‌شوند.

در طول دهه گذشته، علاقه زیادی به بهبود کیفیت و افزایش ایمنی مواد غذایی از طریق جایگزینی سیستم‌های حفاظت و نگهداری مرسوم با جایگزین‌های طبیعی نشان داده شده است. نگهدارنده‌های زیستی به صورت "استفاده از میکروارگانیسم‌ها و یا متابولیت‌های آنها برای جلوگیری از فساد، افزایش ایمنی و ماندگاری مواد غذایی" تعریف می‌شود (۹، ۱۰). از جمله این میکروارگانیسم‌ها می‌توان به باکتری‌های اسید لاکتیک (Lactic Acid Bacteria) یا به اختصار LAB که نقش اصلی را در فرآیند تخمیر ایفا می‌کنند، اشاره نمود (۱۱). علاوه بر این نشان داده شده است که LABها می‌توانند در غذاهای تخمیری فعالیت‌های ضد میکروبی از خود نشان دهند و در نتیجه می‌توان از آنها به عنوان نگهدارنده‌های طبیعی، برای جلوگیری و یا مهار رشد باکتری و قارچ‌های بیماری‌زا و عامل فساد مواد غذایی استفاده کرد (۱۲، ۱۳).

باکتری‌های لاکتیک اسید به لحاظ تولید متابولیت‌های مختلف از جمله اسیدهای آلی، باکتریوسین‌ها، پراکسید هیدروژن و متابولیت‌هایی با وزن مولکولی پائین نظیر دی استیل و روترین دارای اثر مهارکنندگی بر انواع باکتری‌های گرم مثبت و منفی عامل فساد مواد غذایی (نظیر *میکروکوکوس‌ها*، *سودوموناس‌ها*، *موراگزلا*، *اسینتوباکترها*، *شوانلا*) و همچنین باکتری‌های مولد مسمویت غذایی (نظیر *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا مونوسیتوژنز*، *کلستریدیوم بوتولینوم تیپ E*، *یرسینیا انتروکولیتیکا* و غیره) است (۱۴). مکانیسم عمل باکتریوسین‌ها، ناپایدار نمودن سلول و افزایش نفوذپذیری غشای سیتوپلاسمی است. باکتری‌های لاکتیکی طیف وسیعی از باکتریوسین‌ها (نایسین، پدیوسین، لاکتاسین، دایورجین، دیپلوسین، الاکتواستریتوسین) را ترشح می‌کنند که دارای طیف ضد میکروبی متفاوتی بوده ولی بیشتر بر روی باکتری‌های گرم مثبت عامل فساد و بیماری موثر هستند. به عنوان مثال نایسین(پلی پپتیدی که توسط سویه‌های خاصی از باکتری لاکتوکوکوس در طول تخمیر ایجاد می‌شود) یکی از این ترکیبات نگهدارنده طبیعی است که مانع رشد بسیاری از باکتری‌های گرم مثبت می‌شود (۱۵). در این پژوهش، با توجه به مطالب ذکرشده، سعی بر آن شد که قابلیت ضد میکروبی تعدادی از باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از محصولات سنتی، در مقابل برخی از پاتوژن‌های شاخص مواد غذایی مورد ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتریایی

در این تحقیق از باکتری‌های جداسازی شده از ماست و شیر محلی استان گلستان و دوغ شتر با کدهای M109، M8، Y92، Y91، C۸، M153،Y102 ، Y73، Y52، Y98، Y89 استفاده شد که همگی از مجموعه میکروبی گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه گرگان تهیه شد. جهت بررسی خواص ضد میکروبی از باکتری‌های بیماری‌زای *لیستریا مونوسیتوژنز*(ATCC 19115)، *سالمونلا انتریکا* (ATCC 14028)، *اشریشیا کلای* (ATCC 25922) و *استافیلوکوکوس اورئوس* که از کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران تهیه گردیده بودند، استفاده شد.

فعال‌سازی جدایه‌ها و بررسی اولیه جهت شناسایی فنوتیپی

برای این هدف، ابتدا احیاسازی جدایه‌ها در محیط کشت MRS مایع تحت شرایط بی‌هوازی در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انجام شد. شناسایی جدایه‌ها در مراحل اولیه به کمک معیارهای فنوتیپی مانند شکل کلنی و مورفولوژی سلولی، رنگ‌آمیزی گرم و فعالیت کاتالازی انجام شد. محیط‌های کشت MRS agar و MRS broth و عصارهٔ مخمر از شرکت مرک آلمان و مولر هینتون آگار (MHA) از شرکت سیگما آمریکا تهیه شدند.

شناسایی جدایه‌ها به روش مولکولی

استخراج DNA توسط کیت تجاری استخراج DNA (تکاپو زیست، کره جنوبی) و بر اساس دستورالعمل کیت مورد استفاده انجام شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

پرایمرهای مورد استفاده: جهت شناسایی مولکولی باکتری‌های لاکتیک اسید به کمک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، از پرایمرهای عمومی رفت‌وبرگشت باکتری‌های لاکتیک اسید، برای تکثیر نواحی متغیر ۱۶S rDNA استفاده شد. توالی پرایمرها عبارت‌اند

www.SID.ir

Archive of SID

از: 27F: 5´- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3´ و 1492R: 5´-GGTTACCTTGTTACGACTT-3´ (۱۶). طول قطعه DNA تکثیر شده ۱۵۰۰bp است.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز: واکنش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در یک حجم ۳۰ میکرولیتر با استفاده از Red 2X Master Mix (پیشگام، کره جنوبی) در دستگاه ترموسایکلر (کاربیت ریسرچ CG1-96، استرالیا) انجام شد. دیگر مواد استفاده شده شامل پروتئیناز K (پیشگام، کره جنوبی)، Ladder (تکاپو زیست، کره جنوبی) و DNA Safe Stain از شرکت پیشگام کره جنوبی تهیه گردید. مقادیر به کار برده شده برای مستر، پرایمر رفت و برگشت، DNA الگو و آب مقطر به ترتیب برابر با۱۵، ۰/۵/۵، ۰/۰، ۳ و ۱۱ میکرولیتر بود.

تعیین توالی و مقایسه توالی‌ها: جهت تعیین توالی، محصولات واکنش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به شرکت ماکروژن در کره جنوبی ارسال شد. از پرایمر رفت نیز جهت تعیین توالی استفاده شد. با کمک برنامه Blast توالی‌های حاصل با توالی‌های موجود در بانک جهانی ژن (NCBI) مقایسه شدند. جدایه‌هایی که توالی آن‌ها با موارد موجود در بانک اطلاعاتی، درصد مشابهت بالاتری را نشان دادند، به‌عنوان همان گونه شناسایی شدند.

بررسی قابلیت ضد باکتریایی جدایه‌ها

به‌منظور ارزیابی خاصیت ضد میکروبی محیط مایع مصرف شده بدون سلول (Cell Free spent Medium) کشت ۲۴ ساعته جدایه‌های لاکتیکی در برابر باکتری‌های بیماری‌زا شامل *لیستریا مونوسیتوژنز*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سالمونلا انتریکا* و *اشریشیا کلای* از روش میکرودایلوشن استفاده شد. بدین صورت که ابتدا باکتری‌های لاکتیک اسید در محیط MRS براث در شرایط بی‌هوازی و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس کشت داده شدند و سپس در انتهای فاز لگاریتمی با سرعت ۶۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و سپس به وسیله فیلتر سرنگی ۰/۴۵ میکرومتر استریل و برای آزمون ضد میکروبی استفاده شدند. در ادامه برای تعیین اثر ضد میکروبی، ۱۸۵ میکرولیتر از محیط مایع مصرف شده بدون سلول کشت هر جدایه لاکتیکی که از سانتریفوژ کشت ۲۴ ساعته در ۴ درجه سلسیوس با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه به دست آمد، به همراه ۱۵ میکرولیتر از باکتری بیماری‌زای مورد نظر (حاوی 10^5 CFU) به هر چاهک اضافه شد. بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری در شرایط هوازی و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، جذب نمونه مذکور در طول‌موج ۶۰۰ نانومتر تعیین گردید (۱۷). درصد بازدارندگی جدایه‌های لاکتیکی به صورت زیر محاسبه گردید:

$$1-\frac{\text{رشد در چاهک آزمایش}}{\text{رشد در چاهک کنترل مثبت}}\times 100$$

تجزیه‌وتحلیل آماری

نتایج حاصل از این پژوهش نیز با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (One way ANOVA) و روش حداقل اختلاف معنی‌داری (LSD) در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ در سه تکرار و به کمک نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ (SPSS Inc., Chicago, Ill., USA) تجزیه و تحلیل شد و برای ترسیم نمودارها از نرم‌افزار میایکروسافت اکسل نسخه ۲۰۰۷ استفاده شد.

نتایج

شناسایی مولکولی سویه‌های فعال‌شده

ارزیابی اولیه تکثیر DNA تک پرگنه‌های حاصل از کشت خطی سوسپانسیون میکروبی جدایه‌های به‌دست‌آمده با ژل الکتروفورز محصولات تولیدی، تائید گردید (شکل ۱).

همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود محصولات PCR مربوط به هر ۱۱ نمونه DNA استخراجی، طولی معادل ۱۵۰۰bp داشتند. توالی قطعات ژن ۱۶S rDNA جدایه‌ها با توالی‌های ذخیره شده در پایگاه اطلاعاتی NCBI، Blast گردید (جدول ۱). نتایج توالی‌یابی محصولات PCR دارای پرایمر اختصاصی از DNA این تک پرگنه‌ها نیز پس از مقایسه توالی‌های مذکور با داده‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI منجر به شناسایی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*، *انتروکوکوس فاسیوم*، *لاکتوباسیلوس برویس* و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* شد. با توجه به نتایج بالا و تفاوت‌های آشکاری که میان شناسایی مولکولی و بیوشیمیایی دیده می‌شود می‌توان به‌دقت و صحت شناسایی مولکولی سویه‌های میکروبی با استفاده از ناحیه ژنی 16S rDNA پی برد.

خاصیت ضد باکتریایی جدایه‌ها

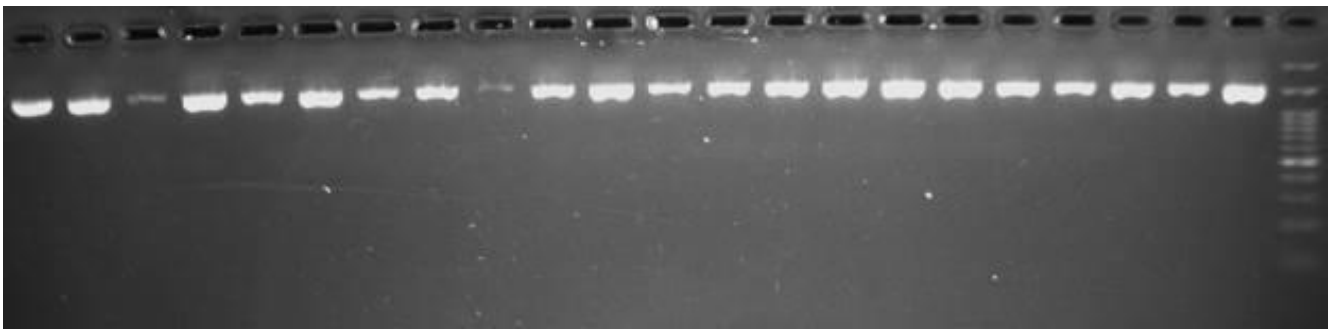
از بین جدایه‌های شناسایی شده، ۱۱ جدایه از جنس و گونه‌های مختلف انتخاب شدند و سپس خاصیت ضد میکروبی آن‌ها در برابر باکتری‌های بیماری‌زا به روش میکرودایلوشن (شکل ۲ تا شکل ۵) بررسی شد. نتایج حاصل از ارزیابی اثرات بازدارندگی محیط مایع مصرف شده بدون سلول کشت جدایه‌های لاکتیکی بر رشد *لیستریا مونوسیتوژنز* (شکل۲) نشان داد که درصد بازدارندگی محیط مایع مصرف شده بدون سلول کشت جدایه‌های لاکتیکی از ۸۶/۱۴-۳۰/۲۹ درصد متغیر بود. در بین جدایه‌ها *انتروکوکوس فاسیوم*C8 جدا شده از دوغ شتر بیشترین درصد بازدارندگی را از خود نشان داد ($P.<0/05$)

www.SID.ir

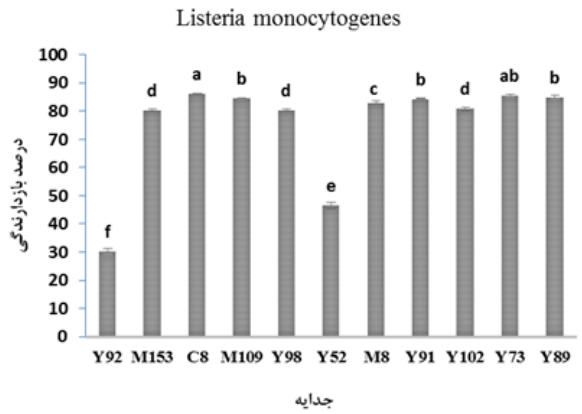
Archive of SID

همچنین بین درصد بازدارندگی *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* Y89، *انتروکوکوس فاسیوم* M109 و *لاکتوباسیلوس روتری* Y91 تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. همچنین *لاکتوباسیلوس برویس* Y92 به شکل معنی‌داری (P <۰/۰۵) کمترین درصد بازدارندگی را به خود اختصاص داد.

در بخش دیگری از این پژوهش، اثرات بازدارندگی محیط مایع مصرف شده بدون سلول کشت جدایه‌های لاکتیکی بر رشد دو باکتری گرم منفی شامل *اشریشیا کلای* (شکل ۴) و *سالمونلا انتریکا* (شکل ۵) بررسی شد. نتایج به دست آمده نشان داد که میزان بازدارندگی جدایه‌های مورد بررسی بر روی *اشریشیا کلای* و *سالمونلا انتریکا* به ترتیب از ۲/۴۲-۳۶/۹۳ درصد و ۱/۱۴-۳۱/۹۷ درصد متغیر بود. همچنین بیشترین مقدار بازدارندگی بر روی رشد *اشریشیا کلای* متعلق به *انتروکوس فاسیوم* M109 جدا شده از شیر و کمترین مقدار بازدارندگی متعلق به *لاکتوباسیلوس برویس* Y92 جدا شده از ماست بود (P <۰/۰۵).

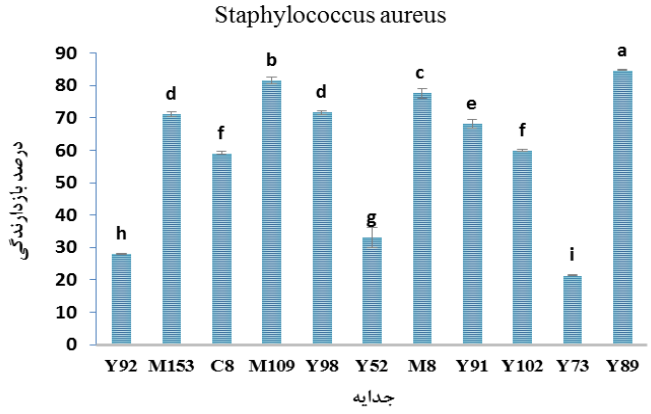


شکل ۱. ژل الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز دارای پرایمر اختصاصی با توالی هدف ۵۰۰ جفت بازی روی ژل آگارز ۱/۵٪، چاهک ۱: مارکر، چاهک ۲ کنترل مثبت (*Lactobacillus plantarum*)، چاهک ۱۲ تا ۲۲ نمونه‌های فعال‌شده به ترتیب از شماره ۱ تا ۱۱



شکل ۲. اثرات بازدارندگی محیط مایع مصرف شده بدون سلول کشت جدایه‌های لاکتیکی بر رشد لیستریا مونوسیتوژنز

* حروف مشابه در هر ستون، نشانگر عدم تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است. * Y: ماست محلی M: شیر محلی C: دوغ شتر

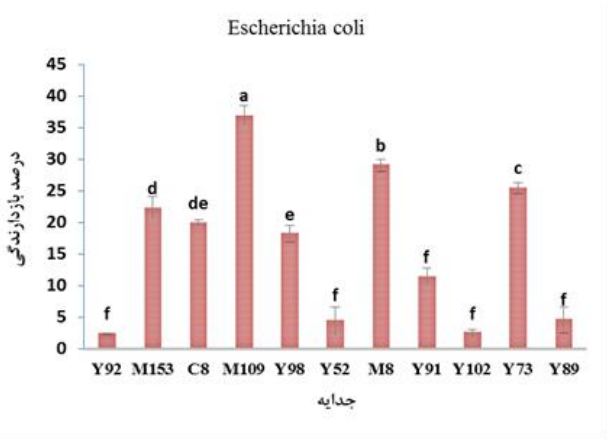


شکل ۳. اثرات بازدارندگی محیط مایع مصرف شده بدون سلول کشت جدایه‌های لاکتیکی بر رشد استافیلوکوس اورئوس

* حروف مشابه در هر ستون، نشانگر عدم تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است. * Y: ماست محلی M: شیر محلی C: دوغ شتر

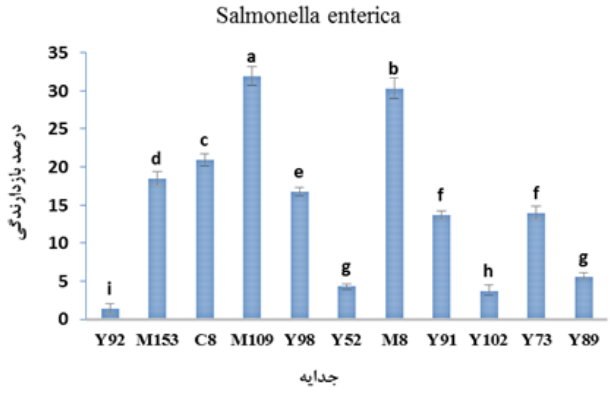
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۴. اثرات بازدارندگی محیط مایع مصرف شده بدون سلول کشت جدایه‌های لاکتیکی بر رشد اشریشیا کلای

* حروف مشابه در هر ستون، نشانگر عدم تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.



شکل ۵. اثرات بازدارندگی محیط مایع مصرف شده بدون سلول کشت جدایه‌های لاکتیکی بر رشد سالمونلا انتریکا

* حروف مشابه در هر ستون، نشانگر عدم تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.

مقایسه میزان بازدارندگی جدایه‌های لاکتیکی بر روی باکتری‌های بیماری‌زا نشان داد که میزان بازدارندگی تمام جدایه‌های لاکتیکی مورد بررسی بر روی باکتری‌های گرم مثبت به شکل معنی‌داری(P <۰/۰۵) بیشتر از تأثیر آن‌ها بر روی باکتری‌های گرم منفی بود. همچنین بین همه جدایه‌ها، بجز جدایه Y92 و Y89 میزان بازدارندگی بر روی *لیستریا مونویتوژنز* با میزان بازدارندگی بر روی *استافیلوکوس اورئوس* تفاوت معنی‌داری بود و بجز دو جدایه مذکور میزان بازدارندگی بر روی *لیستریا مونویتوژنز* در بین همه جدایه‌ها به شکل معنی‌داری بیشتر از میزان بازدارندگی بر روی *استافیلوکوس اورئوس* بود (P <۰/۰۵).

بین درصد بازدارندگی بر روی رشد *اشریشیا کلای* و *سالمونلا انتریکا* در تمام جدایه‌ها به‌جز کدهای M109، M153 و Y73 تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد و در کدهای ذکر شده مقدار بازدارندگی بر روی *اشریشیا کلای* به شکل معنی‌داری بیشتر از بازدارندگی بر روی *سالمونلا انتریکا* بود (جدول ۲).

جدول ۲. مقایسه میزان بازدارندگی جدایه‌های لاکتیکی بر روی باکتری‌های بیماری‌زا

شماره	کد جدایه	*Listeria monocytogenes*	*Staphylococcus aureus*	*Escherichia coli*	*Salmonella enterica*
1	Y92	۳۰/۰±۲۹/۹۲^{a}	۲۸/۰±۱۲/۱۷^{a}	۲/۰±۴۴/۱۵^{b}	۱/۰±۴/۶۴^{b}
2	M153	۸۰/۰±۴۶/۴۲^{a}	۷۱/۰±۱۷/۶۹^{b}	۲۲/۱±۲۹/۷۶^{c}	۱۸/۰±۴۶/۹^{d}
3	C۸	۸۶/۰±۱۴/۰۸۵^{a}	۵۹/۰±۱۱/۴۳^{b}	۱۹/۰±۹۶/۵۳^{c}	۲۰/۰±۹۳/۷۴^{c}
4	M109	۸۴/۰±۴۸/۰۸^{a}	۸۱/۱±۵۹/۰۴^{b}	۳۶/۱±۹۳/۶۱^{c}	۳۱/۱±۹۷/۲۱^{d}
5	Y98	۸۰/۰±۴۶/۴۲^{a}	۷۱/۰±۷۱/۶^{b}	۱۸/۱±۲۱/۳۶^{c}	۱۶/۰±۷۴/۵۵^{c}
6	Y52	۴۶/۱±۵۶/۲۵^{a}	۳۳/۳±۱۵/۱۲^{b}	۴/۲±۴۱/۲۹^{c}	۴/۰±۳۱/۳۷^{c}
7	M8	۸۳/۰±۰۶/۵^{a}	۷۷/۱±۶۷/۴۸^{b}	۲۹/۰±۰۸/۹۵^{c}	۳۰/۱±۳۴/۳۲^{c}
8	Y91	۸۴/۰±۴/۱۷^{a}	۶۸/۱±۱۴/۳^{b}	۱۱/۱±۴۴/۴^{c}	۱۳/۰±۶۷/۵۲^{c}
9	Y102	۸۰/۰±۸۷/۶۷^{a}	۵۹/۰±۹۸/۲۶^{b}	۲/۰±۵/۶۷^{c}	۳/۰±۷۸/۶۸^{c}
10	Y73	۸۵/۰±۴۹/۵۹^{a}	۲۱/۰±۳۸/۱۳^{c}	۲۵/۰±۴۳/۸۸^{b}	۱۳/۰±۹۵/۸۳^{d}
11	Y89	۸۴/۰±۹/۶۷^{a}	۸۴/۰±۷۱/۱۷^{a}	۴/۲±۶۳/۰۷^{b}	۵/۰±۶۵/۴۶^{b}

[1]حروف مشابه در هر ردیف، نشانگر عدم تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

با توجه به نتایج این پژوهش، جنس‌های *لاکتوباسیلوس* و *انتروکوکوس* به عنوان جدایه‌های لاکتیکی از لبنیات تخمیری سنتی جداسازی و شناسایی شدند. در مطالعاتی که با هدف شناسایی جدایه‌های لاکتیکی از لبنیات سنتی و بومی صورت گرفته نیز حضور این جنس‌ها تایید شده است. در این زمینه می‌توان به تحقیقی که Haghshenas و همکاران (۲۰۱۴) برای شناسایی باکتری‌های موجود در لبنیات سنتی استفاده کردند اشاره کرد که منجر به شناسایی *انتروکوکوس موندتی* 50H، *انتروکوکوس دورانس* 39C و *انتروکوکوس فکالیس* 13C شد (۱۸). همچنین Tulumoğlu و همکاران (۲۰۱۴) نیز در بررسی بیش از ۱۰۰ جدایه حاصل از پنیر تولوم به شناسایی ۷ نژاد از *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* دست یافتند (۱۹). تحقیق Leite و همکاران (۲۰۱۵) در بررسی باکتری‌های لاکتیک اسید به دست آمده از دانه‌های کفیر برزیلی منجر به شناسایی *لوکونستوک مزنتروئیدس*، *لاکتوکوس لاکتیس*، جدایه *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* و جدایه *لاکتوکوس لاکتیس* زیرگونه *لاکتیس* گردید (۱۶). بنابر این جنس‌های *لاکتوباسیلوس* و *انتروکوکوس* از عمده‌ترین باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از لبنیات سنتی و بومی هستند.

نتایج حاصل از ارزیابی اثر بازدارندگی جدایه‌های لاکتیکی بر روی *لیستریا مونوسیتوژنز* و *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داد که همه جدایه‌ها قابلیت ضد باکتریایی مناسبی علیه این دو پاتوژن را از خود نشان دادند و بیشترین درصد بازدارندگی مربوط به جدایه C8 (جدا شده از دوغ شتر) و Y89 (جدا شده از ماست محلی) بود. این نتایج با یافته‌های Leite و همکاران (۲۰۱۵) که نشان دادند جدایه‌های لاکتیکی *لاکتوکوس لاکتیس*، *لوکونستوک مزنتروئیدس* و *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* بر روی *لیستریا مونوسیتوژنز*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سالمونلا انتریکا* و *اشریشیا کلای* دارای اثر مهارکنندگی است همخوانی دارد (۱۶). ویژگی بازدارندگی جدایه‌های لاکتیکی را می‌توان به متابولیت‌های ضد میکروبی مختلف مانند لاکتیک اسید، اسید استیک، پراکسید هیدروژن، دی‌اکسید کربن و باکتریوسین‌ها نسبت داد (۲۰، ۲۱). همچنین Casaburi و همکاران (۲۰۱۶)، از سوسیس تخمیری سنّتی کامپانیا *لاکتوباسیلوس کورواتوس* 54M16 را جداسازی کردند. این باکتری بیش از یک باکتریوسین شامل ساکاسین X، T و P را تولید کرده و بر روی *لیستریا مونوسیتوژنز*، *باسیلوس سرئوس* و *بروکوتریکس ترموسفاکتا* اثر بازدارندگی از خود نشان داد (۲۲).

نتایج اثرات بازدارندگی جدایه‌های لاکتیکی بر رشد *اشریشیا کلای* و *سالمونلا انتریکا* نیز نشان داد که همه سویه‌های شناسایی شده از محصولات لبنی سنتی ایران بجز چند سویه، توانایی جلوگیری از رشد *اشریشیا کلای* و *سالمونلا انتریکا* را نیز دارا بودند و بیشترین درصد بازدارندگی مربوط به جدایه M109 (جدا شده از ماست محلی) بود. علاوه بر این مشخص شد که در مجموع و در بین همه جدایه‌ها، بیشترین درصد بازدارندگی مربوط به C8 جدا شده از دوغ شتر است. همچنین علت مقاومت کمتر باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی را می‌توان به دیواره نفوذناپذیر و ساختمان چندلایه و پیچیده این باکتری‌ها و همچنین وجود غشای خارجی نسبت داد. Sabir و همکاران (۲۰۱۰) نیز سویه *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* زیرگونه Z1L را از کفیر جدا نمودند که این سویه به شکل معنی داری قادر به جلوگیری از رشد *اشریشیا کلای* بود (۲۳). پریس سیلیا و همکاران (۲۰۱۵) نیز اثر ضد میکروبی گونه‌های مختلف جنس *لاکتوباسیلوس* را از پنیر سنّتی کوسیدو مکزیکی مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج آنها نشان داد که ترکیبات شبه باکتریوسینی تولید شده از این باکتری‌ها اثر ضد میکروبی قابل توجهی علیه *لیستریا اینوکوا*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سالمونلا تیفی موریوم* و *اشریشیا کلای* از خود نشان می‌دهند. اخیراً نیز گزارش‌های متعددی درباره فعالیت‌های ضد میکروبی جدایه‌های لاکتیکی گزارش شده است (۲۴-۲۶). به عنوان مثال بررسی Angmo و همکاران (۲۰۱۶) منجر به جداسازی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* KJ722784 از لاداخ (Ladakh) و بررسی Assohoun و همکاران (۲۰۱۶) منجر به جداسازی و شناسایی *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* از دوکلو (Doklu) شد که هر دو جدایه قابلیت تولید ترکیبات ضد میکروبی از جمله باکتریوسین‌ها را از خود نشان دادند (۲۴، ۲۵).

باکتریوسین‌ها با اتصال به لیپید II از سنتز دیواره سلولی ممانعت کرده و با خروج لیپید II از ساختار غشاء و تشکیل منافذی در آن منجر به مرگ سلول می‌شوند. این ترکیبات همچنین با توقف فعالیت آنزیم DNA gyrase موجب اختلال در فعالیت همانندسازی DNA، با فعالیت نوکلئازی موجب تخریب DNA و با اختلال در فعالیت ریبوزوم‌ها سبب توقف پروتئین‌سازی می‌شوند (۲۷). براساس نتایج Schillinger و همکاران (۲۰۰۵)، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* از قابلیت تجمعی قابل توجهی علیه باکتری‌های بیماری‌زا برخوردار بود که دلیل آن میزان بالای آب‌گریزی سطح سلولی این باکتری عنوان گردید. بین میزان

www.SID.ir

Archive of SID

آب‌گریزی دیواره سلولی و قابلیت تجمع باکتری‌های اسید لاکتیک بر ضد باکتری‌های بیماری‌زا رابطه مستقیمی گزارش شده است (۲۸). *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *لاکتوباسیلوس گازری* جدا شده توسط Fernandez و همکاران (۲۰۰۳) نیز قادر بودند از رشد باکتری‌های *سالمونلا*، *لیستریا* و *کمپیلو باکتر* بدون ایجاد تداخل در فلور میکروبی دستگاه گوارش جلوگیری کنند (۲۹). همچنین باکتری‌های اسید لاکتیک دارای توانایی کاهش میزان کلسترول، ایمن‌سازی سیستم دفاعی و خاصیت ضد توموری هستند (۳۰). توانایی تولید برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها و ترکیبات زیست فعال خصوصاً باکتریوسین‌ها توسط این باکتری‌ها جهت کنترل و درمان برخی از سرطان‌های دستگاه گوارش به اثبات رسیده است (۳۰).

با توجه به اهمیت خصوصیات ویژه جدایه‌های لاکتیکی از محصولات لبنی سنتی و بومی، شناسایی و ارزیابی خصوصیات بالقوه این جدایه‌ها از اهمیت بالایی برخوردار است. با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق نیز می‌توان از سویه‌های لاکتیکی جدا شده از محصولات لبنی سنتی به‌عنوان نگهدارنده زیستی به‌صورت جداگانه و یا به‌صورت ترکیبی با سایر نگهدارنده‌ها برای کاهش مصرف نگهدارنده‌های سنتزی و یا به‌عنوان کشت آغازگر در صنعت غذا استفاده نمود.

نتیجه‌گیری

نتایج توالی‌یابی محصولات PCR، منجر به شناسایی جنس‌های *لاکتوباسیلوس* و *انتروکوکوس* از لبنیات تخمیری سنتی شد. همچنین نتایج حاصل از ارزیابی اثر بازدارندگی جدایه‌های لاکتیکی بر رشد *لیستریا مونوسیتوژنز* و *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داد که همه جدایه‌ها قابلیت جلوگیری از رشد این دو پاتوژن را داشتند و درصد بازدارندگی آنها از ۲۱/۳۸ -۸۶/۱۴٪ متغیر بود. *لاکتوباسیلوس رامنوس* Y89 جدا شده از ماست و *انتروکوکوس فاسیوم* جدا شده از دوغ شتر به ترتیب بیشترین درصد بازدارندگی را بر *لیستریا مونوسیتوژنز* و *استافیلوکوکوس اورئوس* از خود نشان دادند.

مقایسه میزان بازدارندگی جدایه‌های لاکتیکی بر روی باکتری‌های بیماری‌زا نشان داد که میزان بازدارندگی تمام جدایه‌های لاکتیکی مورد بررسی بر روی باکتری‌های گرم مثبت به شکل معنی‌داری ($P.<۰/۰۵$) بیشتر از تأثیر آنها بر روی باکتری‌های گرم منفی بود. بر اساس نتایج این تحقیق، همه سویه‌های جدا شده و شناسایی‌شده از این محصولات لبنی، قابلیت جلوگیری از رشد باکتری‌های بیماری‌زای گرم مثبت *لیستریا مونوسیتوژنز* و *استافیلوکوکوس اورئوس* و به جز چند سویه، همه جدایه‌های لاکتیکی توانایی جلوگیری از رشد باکتری‌های گرم منفی *اشریشیا کلای* و *سالمونلا انتریکا* را نیز دارند. بنابراین پیشنهاد می‌شود که از جدایه‌های لاکتیکی به‌دست‌آمده از ماست، شیر و دوغ شتر به‌عنوان نگهدارندهٔ زیستی در صنعت غذا و دارو استفاده شود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان این مقاله بر خود لازم می داند که از معاون پژوهشی مرکز تحقیقات کشاورزی خوزستان و نیز مدیریت شرکت پرهام جنوب که در این مطالعه با ما همکاری نمودند کمال تشکر و قدرانی را به عمل آورد.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض منافع گزارش نشده است.

Referance

1. Scallan E, Griffin PM, Angulo FJ, Tauxe RV, Hoekstra RM. Foodborne illness acquired in the United States-unspecified agents. Emerging Infect. Dis. 2011; 17:16. [DOI:10.3201/eid1701.P21101] [PMID] [PMCID]
2. Dewey-Mattia D, Manikonda K, Hall AJ, Wise ME, Crowe SJ. Surveillance for foodborne disease outbreaks-United States, 2009-2015. MMWR Surveillance Summaries. 2018 Jul 27;67(10):1.. [DOI:10.15585/mmwr.ss6710a1] [PMID] [PMCID]
3. Upadhayay UPPDD, Evum PCVVV. Food-home Pathogens of Animal Origin-Diagnosis, Prevention, Control and Their Zoonotic Significance: A Review. Pak J Biol Sci. 2013; 16: 1076-85. [DOI:10.3923/pjbs.2013.1076.1085] [PMID]
4. Control CfD, Prevention. Multistate outbreak of Salmonella serotype typhimurium infections associated with drinking unpasteurized milk--Illinois, Indiana, Ohio, and Tennessee, 2002-2003. MMWR Morbidity and mortality weekly report. 2003; 52: 613.
5. Control CfD, Prevention. Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food--selected sites, United States, 2003. MMWR Morbidity and mortality weekly report. 2004; 53: 338.
6. Oliver SP, Jayarao BM, Almeida RA. Foodborne pathogens, mastitis, milk quality, and dairy food safety. InNMC Annual Meeting Proceedings 2005 (Vol. 1).

www.SID.ir

Archive of SID

7. Rocourt J, Moy G, Vierk K, Schlundt J. The present state of foodborne disease in OECD countries. World Heath Organization: Geneva.

8. Medeiros LC, Hillers VN, Kendall PA, Mason A. Food safety education: what should we be teaching to consumers. J Nutr Educ. 2001; 33: 108-13. https://doi.org/10.1016/S1499-4046(06)60174-7 [DOI:10.1016/S1499-4046(06)60067-5]

9. Cortés-Zavaleta O, López-Malo A, Hernández-Mendoza A, García H. Antifungal activity of lactobacilli and its relationship with 3-phenyllactic acid production. Int J Food Microbiol. 2014; 173: 30-5. [DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.016] [PMID]

10. Muhialdin BJ, Hassan Z. Screening of lactic acid bacteria for antifungal activity against Aspergillus oryzae. Am J Appl Sci. 2011; 8: 447. [DOI:10.3844/ajassp.2011.447.451]

11. Pawlowska AM, Zannini E, Coffey A, Arendt EK. 5" Green Preservatives": Combating Fungi in the Food and Feed Industry by Applying Antifungal Lactic Acid Bacteria. Adv Food Nutr Res. 2012; 66: 217. [DOI:10.1016/B978-0-12-394597-6.00005-7] [PMID]

12. Li H, Zhang S, Lu J, Liu L, Uluko H, Pang X, et al. Antifungal activities and effect of Lactobacillus casei AST18 on the mycelia morphology and ultrastructure of Penicillium chrysogenum. Food Control. 2014; 43: 57-64. [DOI:10.1016/j.foodcont.2014.02.045]

13. Ahmadova A, Todorov SD, Hadji-Sfaxi I, Choiset Y, Rabesona H, Messaoudi S, et al. Antimicrobial and antifungal activities of Lactobacillus curvatus strain isolated from homemade Azerbaijani cheese. Anaerobe. 2013; 20: 42-9. [DOI:10.1016/j.anaerobe.2013.01.003] [PMID]

14. Lauzon, H.L. 2002. Development of biological control for Listeria spp.. in the manufacture of cold -smoked fish. Project Report. Icelandic Fisheries Laboratories.

15. Naidu, S.A. 2000. Natural food antimicrobial system, (1st ed.) CRC press. Washington, USA . [DOI:10.1201/9781420039368] [PMCID]

16. Leite AMO, Miguel MAL, Peixoto RS, Ruas-Madiedo P, Paschoalin VMF, Mayo B, Delgado S. Probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains isolated from Brazilian kefir grains. J Dairy Sci. 2015; 6: 3622-3632. [DOI:10.3168/jds.2014-9265] [PMID]

17. Méndez-Vilas A, editor. Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education. Formatex Research Center; 2013.

18. Haghshenas B, Nami Y, Abdullah N, Radiah D, Rosli R. Yari Khosroushahi A. Anti-proliferative effects of Enterococcus strains isolated from fermented dairy products on different cancer cell lines. J Funct Foods. 2014; 11: 363-374. [DOI:10.1016/j.jff.2014.10.002]

19. Tulumoğlu S, Kaya HI, Simsek o. Probiotic characteristics of Lactobacillus fermentum strains isolated from tulum cheese. Anaerobe. 2014; 30: 120-125. [DOI:10.1016/j.anaerobe.2014.09.015] [PMID]

20. Patil MM, Pal A, Anand T, Ramana K.V .Isolation and characterization of Lactic acid bacteria from curd and cucumber. Indian J Biotechnol. 2010; 9, 166-172.

21. Leroy F, De Vuyst L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. Trends Food Sci Tech. 2004; 15: 67-78. [DOI:10.1016/j.tifs.2003.09.004]

22. Casaburi A, Martino VD, Ferranti P, Picariello L, Villani F. Technological properties and bacteriocins production by Lactobacillus curvatus 54M16 and its use as starter culture for fermented sausage manufacture. Food Control. 2016; 59: 31-45. [DOI:10.1016/j.foodcont.2015.05.016]

23. Sabir F, Beyatli Y, Cumhur C. Assessment of potential probiotic properties of lactobacillus spp.., lactococcus spp.., and pediococcus spp. strains isolated from kefir. J Food Sci. 2010; 759: 568-573. [DOI:10.1111/j.1750-3841.2010.01855.x] [PMID]

24. Angmo K, Kumari A, Savitri A, Bhalla TC. Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of ladakh. Food Sci Tech. 2016; 66: 428-432. [DOI:10.1016/j.lwt.2015.10.057]

25. Assohoun-Djeni, NMC, Djeni NT, Messaoudi S, Lhomme E, Koussemon-Camara M, Ouassa T, et al. Biodiversity, dynamics and antimicrobial activity of lactic acid bacteria involved in the fermentation of maize flour for doklu production in Côte d'Ivoire. Food Control. 2016; 62: 397-404. [DOI:10.1016/j.foodcont.2015.09.037]

26. Caballero B, Finglas P, Toldrá F. Encyclopedia of food and health. Academic Press; 2015 Aug 26.

27. Schaechter M. Encyclopedia of microbiology. 5th ed. Academic Press; 2011 Jan 14; 85-90.

28. Schillinger U, Guigas C, Holzapfel, WH. In vitro adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products. Int Dairy J. 2005; 15: 1289-1297. [DOI:10.1016/j.idairyj.2004.12.008]

29. Fernandez M, Boris S, Barbes C. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. J Appl Microbiol. 2003; 94: 449-455. [DOI:10.1046/j.1365-2672.2003.01850.x] [PMID]

30. Poutanen K, Flander L, Katina K.. Sourdough and cereal fermentation in a nutritional perspective. Food Microbiol. 2009; 26: 693-699. [DOI:10.1016/j.fm.2009.07.011] [PMID]

www.SID.ir