



## بررسی فعالیت ضد میکروبی جسم سلولی و پالیده کشت حاصل از لاکتوباسیلوس هلویتیکوس در شرایط درون تنی و مدل غذایی

سید محمدباقر هاشمی<sup>۱\*</sup>، درنوش جعفرپور<sup>۲</sup>

۱- دانشیار گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فسا، فسا، ایران.

۲- استادیار گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، واحد فسا، دانشگاه آزاد اسلامی، فسا، ایران.

اطلاعات مقاله	چکیده
تاریخ های مقاله :	
تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۲۶	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۱/۲۷	
کلمات کلیدی:	
لاکتوباسیلوس هلویتیکوس، فعالیت ضد میکروبی، پالیده کشت، آب گیلان، باکتری بیماری‌زا.	در این تحقیق، اثر ضد میکروبی جسم سلولی و پالیده کشت حاصل از باکتری لاکتوباسیلوس هلویتیکوس هم در شرایط آزمایشگاهی و هم در ماده غذایی مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور، ابتدا پالیده کشت حاصل از سویه لاکتوباسیلوس مذکور جدا و بخشی از آن تحت تیمار حرارتی (۱۰۰ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه) و بخش دیگر نیز تحت ختنی‌سازی با سود قرار گرفت و با استفاده از روش چاهک و دیسک خاصیت ضد میکروبی آن بر علیه دو باکتری بیماری‌زا شامل <i>سالمونلا اتریکا</i> زیرگونه <i>اتریکا</i> و <i>استافیلوکوکوس اورئوس</i> مورد بررسی قرار گرفت. هم‌چنین فعالیت ضد میکروبی لاکتوباسیلوس هلویتیکوس در آب گیلان در طی ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری ارزیابی شد. نتایج نشان داد که پالیده‌های خام (حرارت ندیده) و حرارت دیده توانستند هر دو باکتری بیماری‌زا را مهار کنند، اما پالیده ختنی شده با سود هیچ گونه اثر مهاری نداشت. تلقیح لاکتوباسیلوس هلویتیکوس به آب گیلان به طور موثری توانست از رشد <i>سالمونلا</i> و <i>استافیلوکوکوس</i> در طی تخمیر جلوگیری کند ( $P < ۰/۰۵$ ). بنابراین بر اساس نتایج بدست آمده می‌توان از باکتری لاکتوباسیلوس هلویتیکوس و پالیده کشت آن به منظور جایگزین نگهدارنده‌های شیمیایی و به عنوان یک منبع ضد میکروبی طبیعی در صنایع غذایی استفاده نمود.
DOI: 10.22034/FSCT.19.125.1	
DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.125.15.4	
* مسئول مکاتبات:	
hashemi@fasau.ac.ir	

## ۱- مقدمه

در حال حاضر تمایل مصرف کنندگان به مصرف غذاهای تازه، بدون مواد نگهدارنده و کمتر فرآوری شده رو به افزایش است. به منظور برآورده ساختن خواسته‌های مصرف کنندگان و در عین حال اطمینان از ایمنی مواد غذایی، تحقیق در مورد استفاده از ترکیبات ضد میکروبی طبیعی به منظور جایگزین مواد نگهدارنده مصنوعی اهمیت پیدا کرده است. از طرفی دیگر، در سال‌های اخیر مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا توجه جامعه علمی را به جستجوی ترکیبات جایگزین با فعالیت ضد میکروبی جلب کرده است [۱]. در این میان، باکتری‌های اسید لاکتیک و متابولیت‌های آن‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. باکتری‌های اسید لاکتیک، باکتری‌های گرم مثبت، کاتالاز و اکسیداز منفی و غیر اسپورزا هستند که قادرند کربوهیدرات‌ها و الکل‌های سنگین مولکول را عمدتاً به اسید لاکتیک تخمیر کنند [۲]. این باکتری‌ها از طریق تولید ترکیبات ضد میکروبی، تحریک سیستم ایمنی، رقابت برای غذا و سایت چسبندگی باعث سرکوب باکتری‌های بیماری‌زا می‌شوند [۳]. باکتری‌های اسید لاکتیک به طور طبیعی در مواد خام مثل شیر، سبزی و حتی در دستگاه گوارش حیوانات و انسان‌ها وجود داشته و می‌توانند به عنوان کشت آغازگر در فرآورده‌های لبنی، گوشت و غلات به کار روند [۴]. باکتری‌های اسید لاکتیک به دلیل تولید ترکیبات مختلف می‌توانند جلوی رشد پاتوژن‌ها را بگیرند. اولین اثر نگهدارندگی این باکتری‌ها مربوط به تولید اسید لاکتیک می‌باشد که باعث کاهش pH شده و از این طریق جلوی رشد بسیاری از میکروارگانیسم‌ها را می‌گیرد. دیگر ترکیبات تولید شده توسط آن‌ها شامل اسید استیک، پراکسید هیدروژن، دی‌استیل، روترین و باکتریوسین‌ها می‌باشند که نقش بسیار مهمی در حفظ و نگهداری مواد غذایی بر عهده دارند [۵]. نکته قابل توجه در مورد باکتری‌های اسید لاکتیک اینست که این دسته از باکتری‌ها به عنوان ارگانیسم‌های ایمن<sup>۱</sup> شناخته می‌شوند و بنابراین می‌توانند در رژیم غذایی انسان‌ها به کار روند [۶]. لاکتوباسیلوس هلوتیکوس یک باکتری تولید کننده اسید لاکتیک است و به‌طور گسترده‌ای به عنوان یک استارتر ترموفیل با تخمیر همگن

(هموفرمنتاتیو) در ساخت پنیرهایی نظیر پنیر سوئیسی و پنیرهای سخت ایتالیایی کاربرد دارد [۷]. مطالعات متعدد نشان داده‌اند که کاربرد مستقیم باکتری‌های اسید لاکتیک یا حتی پالیده کشت آن‌ها، باکتری‌های نامطلوب را در سینه مرغ، گوشت گاو، نان و پنیر مهار می‌کند [۸ و ۹]. Kareem و همکاران (۲۰۱۴)، خواص بازدارندگی پالیده کشت باکتری لاکتوباسیلوس پلاتناروم را در شرایط آزمایشگاهی بر علیه *اشریشیا کلی*، لیستریا مونوسیتوژنز و *سالمونلا انتریکا* بررسی کردند و دریافتند که پالیده کشت این باکتری می‌تواند میکروارگانیسم‌های گرم مثبت و گرم منفی را مهار کند [۱۰]. به علاوه، فعالیت ضد میکروبی باکتری‌های اسید لاکتیک بر علیه طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا مانند *اشریشیا کلی*، *سالمونلا*، *سودوموناس آنروژینوزا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* هم در شرایط درون تنی و هم برون تنی گزارش شده است [۱۱].

گیلاس با نام علمی *Prunus avium L* متعلق به جنس آلوسانان (*Prunus*) و تیره گل‌سرخیان (*Rosaceae*) می‌باشد. این میوه در آب و هوای سرد و معمولاً در کشورهای آمریکا، اروپا و بخشی از آسیا رشد می‌کند. گیلاس سرشار از آنتی‌اکسیدان و ترکیبات ضدالتهاب بوده و در پیشگیری و درمان نقرس مفید است. به علاوه یکی از معدود میوه‌های حاوی ملاتونین است که می‌تواند به درمان بی‌خوابی کمک کند؛ از این رو به عنوان یک منبع دارویی مفید نیز شمرده می‌شود است [۱۲]. از آنجا که باکتری‌های بیماری‌زا باعث به خطر افتادن ایمنی مواد غذایی و سلامت افراد جامعه می‌شوند، به همین علت یافتن راه‌هایی جهت کنترل رشد آن‌ها در نمونه‌های غذایی به ویژه در زمان نگهداری، از اهمیت زیادی برخوردار است. با توجه به فعالیت ضد میکروبی و خواص عملکردی سویه‌های لاکتوباسیلوس در مواد غذایی می‌توانند به عنوان نگهدارنده زیستی به‌طور گسترده‌ای به منظور مهار میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و عامل فساد به کار روند [۱۳]. از این رو، هدف از این تحقیق ارزیابی فعالیت ضد میکروبی پالیده کشت باکتری لاکتوباسیلوس هلوتیکوس بر علیه باکتری‌های *سالمونلا انتریکا* زیرگونه *انتریکا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* بود و در ادامه اثرات ضد میکروبی این باکتری در نمونه غذایی (آب گیلاس) مورد بررسی قرار گرفت.

1. Generally Recognized As Safe (GRAS)

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱- سویه‌های باکتری

در این مطالعه از *Lactobacillus* (PTCC 1332) و *Salmonella helveticus* و باکتری‌های پاتوژن به نام *enterica* subsp. *enteric* (PTCC 1787) و *Staphylococcus aureus* 1431 که از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران خریداری شده بود استفاده گردید. سویه لاکتوباسیلوس در محیط کشت MRS<sup>۱</sup> مایع به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سلسیوس فعال‌سازی گردید. سویه سالمونلا و استافیلوکوکوس<sup>۲</sup> به ترتیب در محیط نوترینت برات<sup>۳</sup> و تریپتیکاز سوی برات<sup>۳</sup> به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس فعال‌سازی شدند.

### ۲-۲- بررسی خاصیت ضد میکروبی در شرایط

#### درون‌تنی

##### ۲-۲-۱- تهیه‌ی پالیده‌ی کشت<sup>۴</sup>

برای تهیه‌ی پالیده‌ی کشت، سویه لاکتوباسیلوس در ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت MRS مایع در دمای ۳۷ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. سپس به منظور جداسازی سلول‌های باکتری از محیط کشت از سانتریفیوژ یخچال‌دار (۴۰۰g، ۲۰ دقیقه و ۴ درجه‌ی سلسیوس) استفاده گردید. مایع رویی جدا و برای اطمینان از عدم وجود سلول باکتری از فیلتر باکتریایی ۰/۲ میکرومتر عبور داده شد [۱۴]. پالیده به دست آمده برای هر باکتری به سه قسمت تقسیم شد، یک قسمت به عنوان شاهد، یک قسمت با کمک سود ۱ نرمال به pH=۶/۵ رسانیده شد و قسمت سوم تحت تیمار حرارتی (۱۰۰ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه) قرار گرفت.

##### ۲-۲-۲- بررسی فعالیت ضد میکروبی به روش انتشار در

#### آگار

به منظور بررسی فعالیت ضد میکروبی به روش انتشار در آگار، باکتری‌های پاتوژن ابتدا در محیط کشت‌های که برای فعال‌سازی آن‌ها استفاده شده بود به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند. سپس ۱ میلی‌لیتر از محیط مایع حاوی باکتری مورد نظر برداشته و در محیط نوترینت آگار کشت گردیدند. سپس، در داخل آن چاهک‌هایی با قطر ۵ میلی‌متر و بافاصله‌ی ۳۰ میلی‌متر از یکدیگر و از بدنه‌ی پلیت ایجاد شد. سپس ۸۰ میکرولیتر از پالیده تیمارهای مختلف به داخل چاهک‌های ایجاد شده در پلیت‌های حاوی باکتری‌های مورد آزمایش ریخته شد. برای جذب محلول به داخل محیط، پلیت‌ها به مدت ۲ ساعت در دمای ۴ درجه‌ی سلسیوس قرار گرفتند. پس از مرحله‌ی جذب، پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۱۸ ساعت نگهداری شدند. پس از اتمام این زمان، اندازه‌ی هاله‌ی بازدارنده تشکیل شده با استفاده از خط کش اندازه‌گیری شد [۱۵].

##### ۲-۲-۳- بررسی فعالیت ضد میکروبی به روش دیسک

در بررسی فعالیت ضد میکروبی به روش دیسک، دیسک‌های کاغذی به قطر ۵ میلی‌متر در پالیده سویه لاکتوباسیلوس به مدت ۵ دقیقه غوطه‌ور و دیسک‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۴ ساعت قرار گرفتند تا کاملاً خشک شوند. دیسک‌ها به بافاصله‌ی ۳۰ میلی‌متر از یکدیگر و بدنه‌ی پلیت قرار داده شدند. سپس پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۱۸ ساعت نگهداری گردیدند. پس از اتمام این زمان، اندازه‌ی هاله‌ی بازدارنده با استفاده از خط کش اندازه‌گیری شد [۱۴].

##### ۲-۳- بررسی خاصیت ضد میکروبی در شرایط

#### برون‌تنی

##### ۲-۳-۱- اندازه‌گیری فعالیت ضد میکروبی در آب

#### گیلاس

آب گیلاس طبیعی بدون هیچ گونه افزودنی از مغازه‌ای در شهر شیراز خریداری گردید و سپس با کمک اتوکلاو به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس استریل گردید. نمونه‌های آب گیلاس با سالمونلا و استافیلوکوکوس در حدود  $\log$  CFU/mL ۶/۲-۶/۱ و سویه‌ی لاکتوباسیلوس در حدود  $\log$

1. de Man, Rogosa and Sharpe (MRS)
2. Nutrient Broth
3. Trypticase Soy Broth
4. Cell Free Culture Supernatant

CFU/mL ۵/۳ تلقیح شدند. گروه‌های شاهد تنها با سویه‌های پاتوژن یا لاکتوباسیلوس تلقیح شدند. پس از آن، انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت انجام شد. برای شمارش سویه‌ی لاکتوباسیلوس، سالمونلا و استافیلوکوکوس به ترتیب از MRS آگار، نوترینت آگار و تریپتیکاز سوی آگار استفاده شد. رقیق سازی نمونه‌ها با استفاده از پپتون واتر قبل از کشت انجام شد [۱۶].

### ۲-۳-۲- اندازه‌گیری pH

pH آب گیلان در نمونه‌های مختلف در حین فرآیند تخمیر توسط pH متر Milwaukee Martini ساخت کشور ایتالیا اندازه‌گیری شد [۱۷].

### ۲-۴- تجزیه و تحلیل آماری

پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی و با ۳ تکرار انجام شد. داده‌های بدست آمده توسط نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۳ (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) ثبت و مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. به منظور بررسی خاصیت ضد میکروبی پالیده حرارت دیده و حرارت ندیده بر علیه پاتوژن‌های مورد مطالعه از رویه تجزیه واریانس (ANOVA) برای آزمون‌های تکرار شونده استفاده شد و با آزمون تی اختلاف بین آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. تغییرات جمعیت باکتریایی در تیمارهای مربوطه در نمونه غذایی با استفاده از رویه تجزیه واریانس یک‌طرفه بررسی شد. در مواردی که اثر معنی‌داری بین تیمارها وجود داشت، میانگین‌ها با آزمون دانکن (Duncan's test) مقایسه شدند [۱۸].

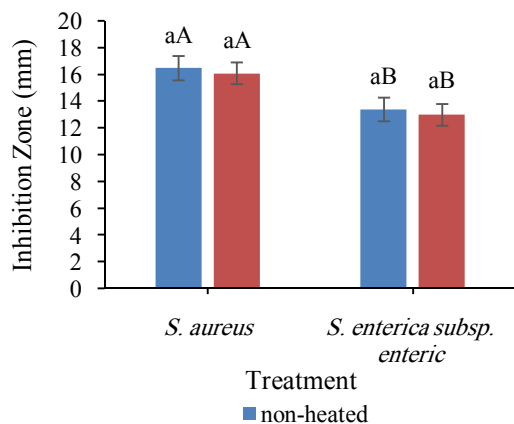
### ۳- نتایج و بحث

#### ۳-۱- فعالیت ضد میکروبی پالیده کشت

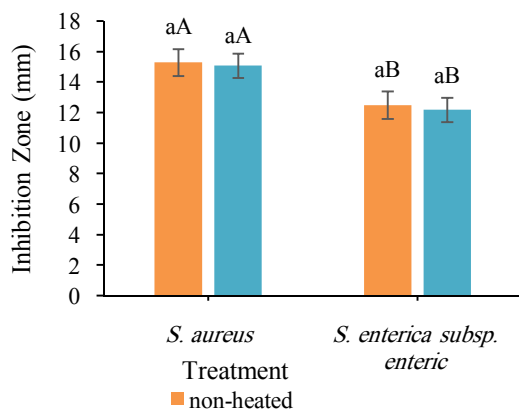
نتایج آزمون ضد میکروبی پالیده کشت باکتری لاکتوباسیلوس هلویتیکوس بر علیه دو باکتری پاتوژن با استفاده از دو روش انتشار در آگار و دیسک در شکل ۱ و ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان دادند که پالیده‌های حرارت دیده و حرارت ندیده توانستند هر دو باکتری بیماری‌زا را مهار کنند، اما پالیده

خنثی شده با سود هیچ گونه اثر مهاری بر باکتری‌های بیماری‌زای مورد مطالعه نداشت. از مقایسه پالیده حرارت دیده و حرارت ندیده چنین استنباط می‌شود که فعالیت ضد میکروبی پالیده حتی بعد از حرارت باقی می‌ماند. با توجه به نتایج چنین می‌توان گفت که ترکیبات تولید شده توسط لاکتوباسیلوس هلویتیکوس مقاوم به حرارت بوده به نحوی که حتی دمای بالا را تحمل کرده و اثر ضد میکروبی آن از بین نرفته است. هم چنین تیمار پالیده با سود و رساندن pH مایع رویی به ۷، نشان داد که اثر بازدارندگی پالیده به طور کامل از بین می‌رود که احتمال می‌رود علت بازدارندگی، وجود اسید در محیط بوده است و با افزودن سود و خنثی سازی اسید خاصیت بازدارندگی از بین رفته است. این نتایج با یافته‌های Mirnejad و همکاران (۲۰۱۳)، که مشاهده کردند فعالیت ضد میکروبی پالیده لاکتوباسیلوس کازئی بر علیه شیگلا فلکسنسری و شیگلا سونئی بعد از تیمار با حرارت باقی مانده اما بعد از خنثی سازی با سود از بین می‌رود، همخوانی دارد [۱۹]. Tharmaraj و Shah (۲۰۰۹)، گزارش کردند که خنثی سازی به وسیله ی سود پالیده کشت اثر بازدارندگی باکتری‌های اسید لاکتیک را از بین می‌برد که می‌توان فعالیت ضد میکروبی پالیده را مربوط به مشتق‌های اسیدی تولید شده و باکتریوسین‌هایی که در pH خنثی فعال نیستند نسبت داد [۲۰]. نتایج مطالعه Tabatabaei Yazdi و همکاران (۲۰۱۵)، بر روی اثر ضد میکروبی متابولیت‌های تولیدی توسط باکتری‌های اسید لاکتیک نشان داد که بیشترین فعالیت ضد میکروبی پالیده‌های حاصل از کشت باکتری‌های اسید لاکتیک در pH اسیدی بوده و هر چه pH پالیده عاری از سلول جدایه لاکتیکی به سمت خنثی و قلیایی سوق داده می‌شود میزان فعالیت ممانعت‌کنندگی آن کاهش می‌یابد [۲۱]. از آنجا که با خنثی سازی پالیده کشت این سویه لاکتوباسیلوس عدم هاله رشد مشاهده شد لذا اثر ضد میکروبی آن را می‌توان به تولید اسید لاکتیک نسبت داد. حضور اسید در محیط منجر به کاهش pH شده و شرایط را برای رشد سایر میکروارگانیسم‌ها نامساعد می‌سازد. مکانیسم اثر ضد میکروبی اسیدهای آلی بدین صورت است که این اسیدها، به شکل تفکیک نشده، از غشای سیتوپلاسمی از طریق لایه لیبیدی عبور کرده و وارد سیتوپلاسم می‌شوند. در آنجا به دلیل pH بالای سیتوپلاسم، اسید تفکیک شده و آنیون‌های اسید و پروتون تولید می‌شوند.

بازدارندگی پالیده‌های کشت ویسلا سیاریا بر روی باسیلوس سوتیلیس و کمترین اثر بازدارندگی آن‌ها نیز بر روی اشیریشیا کلی می‌باشد [۲۵].



**Fig 1** Antimicrobial properties of heat-treated and non-heat treated cell free culture supernatant of *Lactobacillus helveticus* by well method. The same lowercase letters are not significantly different between different treatments for each pathogenic bacteria ( $P > 0.05$ ). Values of the same treatment, followed by the same uppercase letter, are not statistically different ( $P > 0.05$ ).



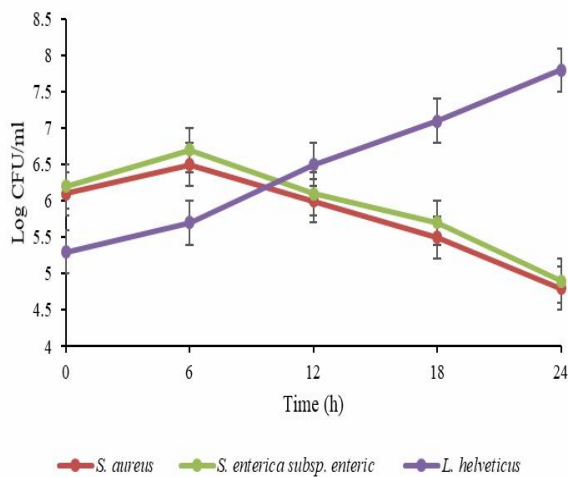
**Fig 2** Antimicrobial properties of heat-treated and non-heat treated cell free culture supernatant of *L. helveticus* by disk method. The same lowercase letters are not significantly different between different treatments for each pathogenic bacteria ( $P > 0.05$ ). Values of the same treatment, followed by the same uppercase letter, are not statistically different ( $P > 0.05$ ).

Arrijoja و همکاران (۲۰۲۰)، نیز در بررسی خود گزارش کردند که باکتری‌های گرم منفی مقاوم‌تر از باکتری‌های گرم مثبت در برابر اثر بازدارندگی پالیده کشت سویه‌های اسید لاکتیک شامل

پروتون‌های تولیدی باعث می‌شوند که pH داخل سلول کاهش یابد و در نتیجه گلیکولیز و انتقال فعال را مهار می‌کند. از طرف دیگر، سلول برای اینکه به حالت قبل خود برگردد، انرژی مصرف کرده و پروتون‌ها را به بیرون می‌ریزد. در اثر این عمل و با تداوم حضور اسیدهای آلی، ATP مصرف شده و انرژی سلول کاهش می‌یابد که در نهایت با اتمام انرژی، مرگ سلول رخ می‌دهد. به علاوه، pH اسیدی درون سلول باعث آسیب به فعالیت‌های آنزیمی، پروتئین‌ها و ساختار DNA می‌شود و در نتیجه به غشای خارج سلول آسیب می‌زند [۲۲ و ۲۳].

در روش چاهک، قطر هاله عدم رشد برای پالیده حرارت ندیده و حرارت دیده بر علیه باکتری *استافیلوکوکوس* به ترتیب ۱۶/۵ و ۱۶/۱ میلی‌متر و بر علیه باکتری *سالمونلا* به ترتیب ۱۳/۴ و ۱۳/۱ میلی‌متر بدست آمد. در روش دیسک نیز قطر هاله عدم رشد برای پالیده حرارت ندیده و حرارت دیده بر علیه باکتری *استافیلوکوکوس* به ترتیب ۱۵/۳ و ۱۵/۱ میلی‌متر و بر علیه باکتری *سالمونلا* به ترتیب ۱۲/۵ و ۱۲/۲ میلی‌متر مشاهده شد. با توجه به نتایج بدست آمده، اثر بازدارندگی پالیده‌های کشت در هر دو روش دیسک و چاهک بر علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* به طور معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) بیشتر از *سالمونلا انتریکا* زیر گونه *انتریکا* بود، هر چند که اختلاف معنی‌داری بین خاصیت ضد میکروبی پالیده حرارت دیده و حرارت ندیده مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ). در مطالعه Savadogo و Cheik (۲۰۰۴)، مشخص شد که قطر هاله عدم رشد برای *اشیریشیا کلی*، *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در نتیجه تاثیر باکتری‌های اسید لاکتیک در حدود ۸ الی ۱۲ میلی‌متر می‌باشد [۲۴]. با توجه به نتایج، باکتری گرم مثبت در مقایسه با باکتری گرم منفی نسبت به پالیده کشت *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس* حساس‌تر بود. احتمالاً تفاوت حساسیت میکروارگانیسم‌های گوناگون به مواد ضد میکروبی به علت ساختار متفاوت میکروارگانیسم‌هاست. باکتری‌های گرم مثبت بر خلاف باکتری‌های گرم منفی، فاقد غشای خارجی در دیواره هستند که این خود می‌تواند سبب شود که ترکیبات فعال در آن نفوذ بهتری داشته باشند. باکتری‌های گرم منفی به علت وجود لایه چربی در لایه بیرونی نفوذناپذیرتر هستند [۱۵]. این نتایج با یافته‌های Khashaie و همکاران (۲۰۱۷)، مطابقت دارد. آن‌ها مشاهده کردند که بیشترین اثر

به  $4/8 \log \text{CFU/mL}$  رسید. این بدان معناست که سویه‌ی لاکتوباسیلوس مورد مطالعه توانسته است به طور موثری از رشد پاتوژن‌های مذکور در طی تخمیر آب گیلاس جلوگیری کند. یافته‌های تحقیق حاضر با گزارش Yang و همکاران (۲۰۰۸) مطابقت داشت، که نشان دادند تلقیح استارترهای باکتری اسید لاکتیک در برنج رشد باسیلوس سرئوس را مهار می‌کند [۲۶]. علاوه بر این، مطالعه دیگری نشان داده است که اسیدهای آلی مهم‌ترین بازدارنده رشد باسیلوس سرئوس بوده و اسید لاکتیک را به عنوان ترکیب اصلی بازدارنده رشد میکروبی معرفی کردند [۲۷]. نتیجه مشابهی توسط Zhang و همکاران (۲۰۱۶)، در طی تخمیر شیر گزارش شده است. آنها نشان دادند که تولید اسید لاکتیک توسط لاکتوباسیلوس پلانتاروم و کاهش pH به طور قابل توجهی از رشد پاتوژن‌ها جلوگیری می‌کند و pH را به عنوان یک عامل بازدارنده اصلی برای تولید ایمن و سالم محصولات تخمیری بیان کردند [۲۸].



**Fig 4** Changes in viable cell counts in fermented cherry juice. Error bars indicate the standard deviation of viable cell counts in cherry juice fermented with *L. helveticus* during 24 h of fermentation.

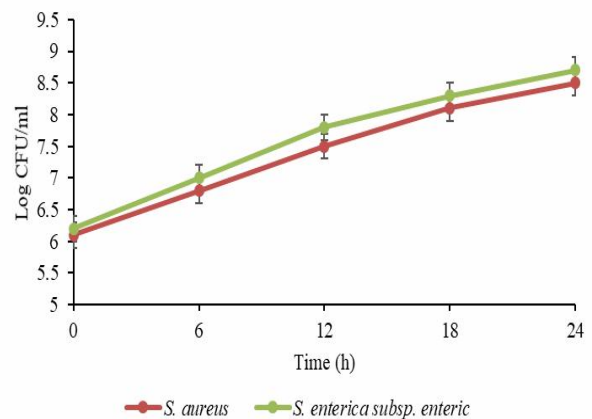
### ۳-۳- اندازه‌گیری pH

نتایج اندازه‌گیری میزان pH آب گیلاس در طول زمان تخمیر در شکل ۵ نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود میزان pH نمونه آب گیلاس به طور قابل توجهی کاهش یافته ( $P < 0/05$ ) و از  $3/9$  به  $3$  در پایان دوره تخمیر رسید. افزایش

لاکتوباسیلوس پلانتاروم<sup>۱</sup>، لاکتوباسیلوس رامنوسوس<sup>۲</sup> و لاکتوباسیلوس ساکی<sup>۳</sup> هستند [۵].

### ۳-۲- فعالیت ضد میکروبی در آب گیلاس

شمارش کلی باکتری‌های سالمونلا و استافیلوکوکوس مورد مطالعه در حضور و عدم حضور لاکتوباسیلوس هلویتیکوس در طی ۲۴ ساعت تخمیر در آب گیلاس مورد بررسی قرار گرفت. در عدم حضور لاکتوباسیلوس هلویتیکوس با گذشت زمان تخمیر تعداد هر دو باکتری به طور معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) افزایش یافت، به طوری که تعداد باکتری سالمونلا از  $6/2$  به  $8/7 \log \text{CFU/mL}$  و تعداد باکتری استافیلوکوکوس از  $6/1$  به  $8/5 \log \text{CFU/mL}$  در انتهای زمان تخمیر رسید (شکل ۳).



**Fig 3** Changes in viable cell counts of pathogenic bacteria in cherry juice. Error bars indicate the standard deviation of viable cell counts in cherry juice without *L. helveticus* during 24 h of incubation.

به منظور بررسی توانایی مهار سویه‌ی لاکتوباسیلوس بر رشد سالمونلا و استافیلوکوکوس در آب گیلاس تخمیر شده، از هر کدام باکتری‌های بیماری‌زای مورد مطالعه به صورت کشت همزمان با لاکتوباسیلوس هلویتیکوس استفاده شد. مطابق شکل ۴، هنگامی که باکتری‌های بیماری‌زا در ترکیب با لاکتوباسیلوس هلویتیکوس استفاده شدند، تعداد باکتری‌های سالمونلا و استافیلوکوکوس به طور معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) کاهش یافت، به نحوی که بعد از ۲۴ ساعت تخمیر، تعداد باکتری سالمونلا از  $6/2$  به  $4/9 \log \text{CFU/mL}$  و تعداد باکتری استافیلوکوکوس از  $6/1$

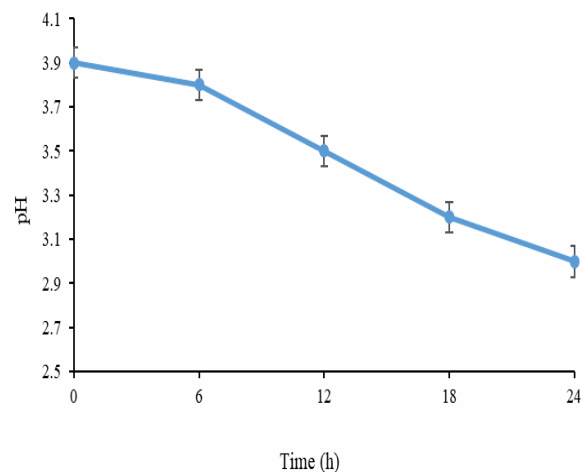
1. *Lactiplantibacillus plantarum*
2. *Lacticaseibacillus rhamnosus*
3. *Latilactobacillus sakei*

رشد سالمونلا انتریکا زیر گونه انتریکا و استافیلوکوکوس اورئوس در طی تخمیر آب گیلان دارد. بنابراین با توجه به نتایج می‌توان گفت که پالیده کشت باکتری لاکتوباسیلوس هلویتیکوس می‌تواند به عنوان یک ترکیب ضد میکروب ارزشمند در جهت مقابله با بیماری‌های عفونی در نظر گرفته شود و از آن جهت جایگزین نگهدارنده‌های شیمیایی به عنوان یک منبع ضد میکروبی طبیعی در محصولات غذایی و صنایع دارویی استفاده کرد.

## ۵- منابع

- [1] Cotter, P.D., Ross, R.P., & Hill, C. (2013). Bacteriocins—a viable alternative to antibiotics? *Nature Reviews Microbiology*, 11, 95–105.
- [2] Danilova, T.A., Adzhieva, A.A., Danilina, G.A., Polyakov, N.B., Soloviev, A.I., & Zhukhovitsky, V.G. (2019). Antimicrobial activity of supernatant of *Lactobacillus plantarum* against pathogenic microorganisms. *Bulletin of experimental biology and medicine*, 167(6), 751-754.
- [3] Jafarpour, D., Shekarforoush, S.S., Ghaisari, H. R., Nazifi, S., Sajedianfard, J., & Eskandari, M.H. (2017). Protective effects of synbiotic diets of *Bacillus coagulans*, *Lactobacillus plantarum* and inulin against acute cadmium toxicity in rats. *BMC Complementary Medicine*, 17, 1–8.
- [4] Jafarpour, D, Shekarforoush, S.S., Ghaisari, H.R., Nazifi, S., & Sajedianfard, J. (2015). Impact of synbiotic diets including inulin, *Bacillus coagulans* and *Lactobacillus plantarum* on intestinal microbiota of rat exposed to cadmium and mercury. *Veterinary Science Development*, 5(2).
- [5] Arrijoja-Bretón, D., Mani-López, E., Palou, E., & López-Malo, A. (2020). Antimicrobial activity and storage stability of cell-free supernatants from lactic acid bacteria and their applications with fresh beef. *Food Control*, 115, 107286.
- [6] Nekouieian, M., & Jafarpour, D. (2021). Feasibility study of production of synbiotic low calorie yogurt by green banana flour and evaluation of physicochemical, textural and

معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) تعداد لاکتوباسیلوس هلویتیکوس در طول دوره تخمیر (شکل ۴) حاکی از رشد این باکتری و تولید اسید لاکتیک است که منجر به کاهش pH شده است. به طور مشابه Bagheri و همکاران (۲۰۲۰)، گزارش کردند که لاکتوباسیلوس هلویتیکوس دارای مسیر تخمیر لاکتیکی همگن و دارای رشد تاخیری بوده و از این رو نیازهای رشد بالا و دارای قابلیت تولید اسید بالایی است [۲۹]. Hashemi و Jafarpour (۲۰۲۰)، گزارش کردند که میکروارگانیسم‌هایی مانند سویه‌های لاکتوباسیلوس از کربوهیدرات‌های ساده به عنوان منابع کربن و انرژی مناسب برای رشد استفاده می‌کنند که افزایش سطح سلول‌های زنده در طی تخمیر، کاهش محتوای گلوکز و فروکتوز و کاهش pH نشان دهنده این روند است [۱۶]. به علاوه، افزایش مقدار اسید لاکتیک، اسید فرمیک و اسید پروپیونیک در نتیجه تخمیر آب انار توسط لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس پلاننتاروم مشاهده شده است [۳۰].



**Fig 5** Changes in pH of cherry juice fermented by *L. helveticus*. Error bars display the standard deviation of pH during 24 h of measurement.

## ۴- نتیجه گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که محصول رویی حاصل از کشت و جسم سلولی باکتری لاکتوباسیلوس هلویتیکوس به عنوان یکی از سویه‌های لاکتوباسیلوس می‌تواند بر علیه باکتری‌های بیماری‌زا استفاده شود و متابولیت‌های حاصل از آن در شرایط سخت دمایی فعال بوده و اثرات ضد باکتریایی‌اش پایدار می‌ماند. به علاوه مشخص شد که سویه‌ی لاکتوباسیلوس مورد مطالعه اثر مهارتی بر

- and their application in cream. Food Science and Technology, 18(115), 339-349. [in Persian]
- [16] Hashemi, S. M. B., & Jafarpour, D. (2020). Fermentation of bergamot juice with *Lactobacillus plantarum* strains in pure and mixed fermentations: Chemical composition, antioxidant activity and sensorial properties. LWT, 131, 109803.
- [17] Jafarpour, D., Amirzadeh, A., Maleki, M., & Mahmoudi, M. R. (2017). Comparison of physicochemical properties and general acceptance of flavored drinking yogurt containing date and fig syrups. Foods and Raw materials, 5(2).
- [18] Jokari, M. M., & Jafarpour, D. (2021). Comparison of the effectiveness of two prebiotics inulin and green banana flour on the survival of *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus coagulans* in low-calorie synbiotic yogurt. Food Science and Technology, 18(117), 49-63. [in Persian]
- [19] Mirnejad, R., Vahdati, A. R., Rashidiani, J., Erfani, M., & Piranfar, V. (2013). The antimicrobial effect of *Lactobacillus casei* culture supernatant against multiple drug resistant clinical isolates of *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri* in vitro. Iranian Red Crescent Medical Journal, 15(2), 122.
- [20] Tharmaraj, N., & Shah, N. P. (2009). Antimicrobial effects of probiotics against selected pathogenic and spoilage bacteria in cheese-based dips. International Food Research Journal, 16(1), 261-276.
- [21] Tabataba i Yazdi, F., Ali Zadeh Behbahani, B., Mortazavi, S. A., & Tabataba i Yazdi, F. (2015). Diversity of Lactic Acid Bacteria communities in "Ash kardeh" with using 16s rRNA gene sequence analysis and antimicrobial activity evaluation of like-bacteriocin compounds. Food Science and Technology, 13(53), 1-14.
- [22] Hashemi, S. M. B., & Jafarpour, D. (2020). Ultrasound and malic acid treatment of sweet lemon juice: Microbial inactivation and quality changes. Journal of Food Processing and Preservation, 44(11), e14866.
- [23] Hashemi, S. M. B., Jafarpour, D., & Gholamhosseinpour, A. Antimicrobial activity of *Carum copticum* and *Satureja khuzestanica* essential oils and acetic acid in vapor phase at sensorial characteristics of it. Food Science and Technology, 18(116), 277-292. [in Persian]
- [7] Griffiths, M.W., & Tellez, A.M. (2013). *Lactobacillus helveticus*: the proteolytic system. Frontiers in Microbiology, 4, 30.
- [8] Cizeikiene, D., Juodeikiene, G., Paskevicius, A., & Bartkiene, E. (2013). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against pathogenic and spoilage microorganism isolated from food and their control in wheat bread. Food Control, 31(2), 539-545.
- [9] da Costa, W.K.A., de Souza, G.T., Brandão, L.R., de Lima, R.C., Garcia, E.F., dos Santos Lima, M., ... & Magnani, M. (2018). Exploiting antagonistic activity of fruit-derived *Lactobacillus* to control pathogenic bacteria in fresh cheese and chicken meat. Food Research International, 108, 172-182.
- [10] Kareem, K.Y., Hooi Ling, F., Teck Chwen, L., May Foong, O., & Anjas Asmara, S. (2014). Inhibitory activity of postbiotic produced by strains of *Lactobacillus plantarum* using reconstituted media supplemented with inulin. Gut pathogens, 6(1), 1-7.
- [11] Karska-Wysocki, B., Bazo, M., & Smoragiewicz, W. (2010). Antibacterial activity of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Microbiological research, 165(8), 674-686.
- [12] Azarfam, M., Hashemiravan, M., & Asadollahi, S. (2021). Production of Probiotic Fermented Beverage Based on Mixture of Sweet Cherry, Red. Food Safety and Processing, 1(1), 1-16.
- [13] Mani-López, E., Palou, E., & López-Malo, A. (2018). Biopreservatives as agents to prevent food spoilage. In Microbial contamination and food degradation (pp. 235-270). Academic Press.
- [14] Hashemi, S.M.B., Shahidi, F., Mortazavi, S.A., et al (2016) Study of antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from traditional Kurdish cheese in comparison to reference strains against some pathogens. Food Science and Technology, 103-113.
- [15] Jafarpour, D., Hashemi, S. M. B., & Ghaedi, A. (2021). Study the antibacterial properties of different parts of saffron extract



- of Food Microbiology, 103(1), 69-77.
- [28] Zhang, Z., Tao, X., Shah, N. P., & Wei, H. (2016). Antagonistics against pathogenic *Bacillus cereus* in milk fermentation by *Lactobacillus plantarum* ZDY2013 and its anti-adhesion effect on Caco-2 cells against pathogens. Journal of dairy science, 99(4), 2666-2674.
- [29] Bagheri, F., Mirdamadi, S., Mirzaei, M., & Safavi, M. (2020). Production of Functional Fermented Milk by Lactobacilli Isolated from Traditional Iranian Dairy Products. Innovative food technologies, 7(2), 243-255.
- [30] Mousavi, Z. E., Mousavi, S. M., Razavi, S. H., Hadinejad, M., Emam-Djomeh, Z., & Mirzapour, M. (2013). Effect of fermentation of pomegranate juice by *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus acidophilus* on the antioxidant activity and metabolism of sugars, organic acids and phenolic compounds. Food Biotechnology, 27(1), 1-13.
- different relative humidities and temperatures in peanuts. Journal of Food Processing and Preservation, e16269.
- [24] Savadogo, A., Ouattara, C. A., Bassole, I. H., & Traore, A. S. (2004). Antimicrobial activities of lactic acid bacteria strains isolated from Burkina Faso fermented milk. Pakistan Journal of nutrition, 3(3), 174-179.
- [25] Khashaie, M., Ebrahimi, M., & Sadeghi, A. (2017). Investigating of the antimicrobial effects of isolated *Weissella cibaria* and its cell free culture filtrate obtained from different growth phases. Iranian Journal of Medical Microbiology, 11(2), 42-52.
- [26] Yang, Y., Tao, W. Y., Liu, Y. J., & Zhu, F. (2008). Inhibition of *Bacillus cereus* by lactic acid bacteria starter cultures in rice fermentation. Food Control, 19(2), 159-161.
- [27] Røssland, E., Langsrud, T., & Sørhaug, T. (2005). Influence of controlled lactic fermentation on growth and sporulation of *Bacillus cereus* in milk. International Journal



## Antimicrobial activity of bacterial cell and cell free culture supernatant of *Lactobacillus helveticus in-vitro* and in a food model

Hashemi, S. M. B.<sup>1\*</sup>, Jafarpour, D.<sup>2</sup>

1. Associate professor of the Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Fasa University, Fasa, Iran.
2. Assistant professor of the Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Fasa Branch, Islamic Azad University, Fasa, Iran.

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p><b>Article History:</b></p> <p>Received 2022/ 01/ 16 Accepted 2022/ 04/ 16</p> <hr/> <p><b>Keywords:</b></p> <p><i>Lactobacillus helveticus</i>, Antimicrobial activity, Cell free culture supernatant, Cherry juice, Pathogen.</p> <hr/> <p><b>DOI:</b> 10.22034/FSCT.19.125.1 <b>DOR:</b> 20.1001.1.20088787.1401.19.125.15.4</p> <hr/> <p>*Corresponding Author E-Mail: hashemi@fasau.ac.ir</p>	<p>In this study, the antimicrobial properties of bacterial cell and cell free culture supernatant of <i>Lactobacillus helveticus</i> was investigated both in vitro and in vivo (food). For this purpose, at first, cell free culture supernatant (CFS) was prepared from the mentioned <i>Lactobacillus</i> strain and then divided into three groups (control, treated by heat (100 °C for 15 min) and neutralized by NaOH). Antimicrobial activity of supernatant treated or no treated was investigated utilizing agar well diffusion and Disk diffusion method against two pathogenic bacteria including <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> and <i>Staphylococcus aureus</i>. Moreover, the antimicrobial activity of <i>L. helveticus</i> in cherry juice was evaluated during 24 h of incubation. The results showed that unheated and heated CFS were able to inhibit both pathogenic bacteria, but neutralized CFS had no antimicrobial activity. Inoculation of <i>L. helveticus</i> in cherry juice effectively (<math>P &lt; 0.05</math>) prevented the growth of <i>Salmonella</i> and <i>Staphylococcus</i> during the fermentation period. Therefore, based on the results, <i>L. helveticus</i> and its CFS can be used as an alternative to chemical preservative and as a natural antimicrobial source in the food industry.</p>