بررسی خاصیت ضدمیکروبی برخی سویه های ذاتی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جدا شده از شیر بز

شیما دالوند[۱]، ناهید مژگانی[۲*]، سولماز صارم نژاد[۳]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی گرایش میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد اسلامی- تهران-ایران.

۲- دانشیار، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، سازمان تحقیقات ،آموزش و ترویج کشاورزی- تهران-ایران.

۳- استادیار، دانشکده علوم و فناوری های نوین، واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد اسلامی- تهران-ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۰/۱۲/ ۹٤ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۳/۱۱)

چکیده

در این مطالعه، فعالیت ضد میکروبی، سویه های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*جدا شده از شیر بز مورد بررسی قرار گرفت. ٦٧ نمونه شیر بز از مناطق تهران و کرج جمع آوری شد و به منظور شناسایی و حضور با کتری های اسید لاکتیک مورد ارزیابی قرار گرفتند. از میان باکتری های اسید لاکتیک جدا شده (LAB)، ۱۸ سویه از طریق الگوی تخمیر قند و تعیین توالی 16S rRNA به عنوان *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* شناسایی شدند. فعالیت ضد میکروبی سویه های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در مقابل تعدادی از عوامل بیماری زا، شامل*استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا منوسیتوژنز، سودوموناس آئروژینوزا، سالمونلا تیفی و اشرشیا کلی* از طریق روش حفره ای آگار مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد، ۱۰ سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، دارای فعالیت ضد میکروبی در مقابل پاتوژن های مورد بررسی بوده، و از میان آنها ٦ سویه طیف گسترده تری از فعالیت ضد میکروبی و مهار رشد در برابر تمامی پاتوژن های گرم مثبت و گرم منفی مورد آزمون را از خود نشان دادند. فعالیت ضد میکروبی سوپرناتانت ٦ سویه،بعد ازتیماربا عوامل فیزیکی و شیمیایی نیز مورد بررسی های بیشتری قرار گرفت. فعالیت ضد میکروبی سوپرناتانت ها پس از خنثی سازیpH،حفظ شد، از میان آنها تنها سوپرناتانت ۲ سویه LP14 وLP4 پس از تیمار با ۱ میلی گرم بر میلی لیتر آنزیم کاتالاز فعالیت ضد میکروبی شان حفظ شد. سوپرناتانت خنثی شده باکتری LP4 نسبت به آنزیم های لیزوزیم مقاوم بوده و آنزیم لیپاز فعالیت آن را کمی کاهش داد از سوی دیگر آنزیم های پروتئولیتیک مانند: پپسین، تریپسین و پروتئیناز k به طور کامل فعالیت ضدمیکروبی را از بین بردند. سویه جدا شدهLp_4 نسبت به خاصیت آنتاگونیستی خود و مهار رشد مقاوم بود. ماده شبه باکتریوسین تولید شده توسط LP_4 به pH و حرارت مقاوم بود زیرا توانست گستره وسیعی از pH از۳ تا ۸ و دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس اتوکلاو را برای ۱۵ دقیقه تحمل کند.این ماده بعد از ٤ هفته نگهداری در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد همچنان فعالیت ضدمیکروبی خود را حفظ کرد و بعد از تیمار با غلظت ۷ درصد NaCl، هنوز دارای فعالیت ضدمیکروبی بود.

کلید واژگان: باکتری های اسید لاکتیک، شیر بز، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*،فعالیت ضد میکروبی، ماده شبه باکتریوسین

* مسئول مکاتبات : dnmoj@yahoo.com

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-07-16]

۱- مقدمه

باکتری های اسیدلاکتیک، گرم مثبت،میله ای یا کوکسی شکل اند و قادر به تخمیر کربوهیدرات ها برای تولید اسیدلاکتیک و انرژی هستند. این میکروارگانیسم ها در شیر، گوشت و محصولات تخمیر شده یافت می شوند [۱]. یکی از گونه های باکتری های اسیدلاکتیک، لاکتوباسیلوس پلانتاروم است. این باکتری در محافظت فرآورده های غذاهای تخمیری مانند سبزیجات، فرآورده های گوشتی، سوسیس تخمیری، خمیر ترش، شیر، پنیر، خیار شور، زیتون، آناناس و... نقش عمده ای دارد. گونه های متعددی از لاکتوباسیلوس پلانتاروم از محیط های مختلف زیستی از جمله گوشت، ماهی، سبزیجات، میوه جات، شیر و محصولات غلات جداسازی شده اند. کاربرد *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به عنوان یک پروبیوتیک در ۲۰ سال گذشته بطور گسترده مطالعه شده است. *لاکتوباسیلوسپلانتاروم* به عنوان یک کشت آغازگر در فرآیندهای تخمیری غذایی استفاده شده است که به خواص ارگانولپتیکی، طعم و بافت کمک میکند.*لاکتوباسیلوسپلانتاروم* به خاطر تولید اسیدلاکتیک و دیگر ترکیبات ضدمیکروبی می تواند به ماندگاری محصولات نهایی کمک نماید و سپس می تواند برای نگهدارنده زیستی غذا استفاده شود [۲]. این باکتری گرم مثبت قادر به هیدرولیز ژلاتین است و در دمای ۱۵ درجه سانتیگراد به خوبی رشد میکند اما در ٤٥ درجه قادر به رشد نیست.تولید مواد ضدمیکروبی توسط *لاکتوباسیلوسپلانتاروم* به زنده ماندن این گونه در دستگاه گوارش کمک می کند. مشخص شده است که این مواد ضدمیکروبی آثار قابل توجهی بر باکتری های گرم مثبت و گرم منفی دارد.این باکتری تاریخچه ای طولانی از مصرف ایمن و طبیعی در انواع محصولات غذایی دارد.به همین علت در حال حاضر فعالیت وسیع ضدمیکروبی *لاکتوباسیلوسپلانتاروم* به عنوان یکی از مهمترین عوامل دارای پتانسیل درمانی برای جلوگیری یا درمان عفونت ها مطرح است[۳].

در سال ۲۰۱٤ در بررسی ای روی باکتری های اسیدلاکتیک جداشده از محصولات غذایی تخمیری، توانایی آن ها برای تولید باکتریوسین و اثر مهاری آن ها روی پاتوژن های *اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس* مطالعه شد. هویت احتمالی آنها: *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس پلانتاروم، ل.فرمنتوم،لویکونستوک مزنتروئیدس، لویکونستوک لاکتیس، پدیوکوکوس پنتاسئوس* بودند. ۸ ایزوله از بین ۲٤ ایزوله گونه های *اشرشیاکلی ATCC117755* و *استافیلوکوکوس اورئوس ATCC12600* را مهار کردند. لاکتوباسیلوس فرمنتوم بیشترین هاله عدم رشد را بر علیه *اشرشیاکلی و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بیشترین هاله را برعلیه *استافیلوکوکوس اورئوس* ایجاد کردند [٤]. Mohankumar و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان دادند که *لاکتوباسیلوس پلانتاروم OL15* جداشده از زیتون های سبز تخمیرشده Algerian، مواد ضدمیکروبی در محیط کشتش تولید می کند. عمل مهار بر علیه دیگر گونه های *لاکتوکوکوس، لاکتوباسیلوس و پروپیونی باکتریوم* مشاهده شد.فعالیت باکتریوسین توسط آنزیم های پروتئولیتیک به طور کامل یا به طور جزئی غیر فعال شد. در رنج pH از ۳ تا ۸ پایدار بود و پایداری حرارتی حتی بعد از ۱۵ دقیقه اتوکلاو در ۱۲۱ درجه سانتیگراد مشاهده شد[٥]. Ryan و همکاران در سال ۱۹۹۸ در مطالعه شان مشاهده کردند که گونه *لاکتوباسیلوسپلانتاروم* تولیدکننده باکتریوسین جداشده از نمونه های شیر گاو رنج وسیعی از فعالیت ضدباکتری علیه پاتوژن های منتقله از غذا را نشان داد [٦]. Lewus و همکاران در سال ۱۹۹۱ گونه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم k11* از بین ٦٨گونه باکتری اسیدلاکتیک جداشده از Dongchimi (نوعی غذای تخمیری کره ای) را انتخاب کردند به علت فعالیتش بر علیه اشریشیاکلی *O157* . بر اساس خصوصیات فیزیکی و شیمیایی اش به عنوان *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* شناسایی شد[۷].

۲-مواد و روش ها

۲-۱- نمونه گیری، جداسازیو شرایط کشت باکتری ها

در این مطالعه، جهت جداسازی باکتری های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* از شیر بز (نژاد های رایینی، مرغوز و نجدی)، مناطق اطراف تهران و کرج در نظر گرفته شدند. نمونه گیری در ظروف کاملاً استریل و در شرایط استریل انجام گرفت. سپس، نمونه ها در مجاورت یخ قرار داده شده و در کمتر از ۱۰ ساعت به آزمایشگاه منتقل شدند. محیط کشت اختصاصی جهت جداسازی باکتری های اسیدلاکتیک، MRS(*deMan, Rogosa andSharpe, HiMedia , India*) است[۸] محیطی اختصاصی که قادر است نیاز های غذایی پیچیده آنان

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-07-16]

را فراهم سازد. این محیط از شرکت Merck آلمان تهیه شد و طبق دستورالعمل این شرکت به صورت جامد و مایع تهیه گردید، سپس میزان ۱۰۰ ماکرولیتر از هر نمونه شیر درون ۵ میلی لیتر از محیط MRSB ریخته شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲٤ ساعت گرمخانه گذاری شدند. بعد از رشد نمونه های شیر در این محیط به میزان ۱ لوپ از هر نمونه بر روی پلیت MRSA به صورت خطی برای بدست آوردن تک کلنی کشت داده شد، و پس از خالص سازی، تمامی کلنی ها از نظر فنوتیپی رنگ امیزی گرم، تست کاتالاز، تست تخمیر قند[۹] مورد بررسی قرار گرفتند.

۲-۲- شناسایی گونه لاکتوباسیلوس پلانتاروم توسط واکنشPCR

برای شناسایی ایزوله ها به روش مولکولی، استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA ساخت شرکت سیناژن انجام شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در تشخیص جنس لاکتوباسیل ها که از 16S rRNA طراحی شدند عبارتند از: 27F5'- AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3' و-'35- CGG TTA CCT TGT TAC GAC TT 1492R دمای دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سلسیوس و مدت زمان ۵ دقیقه بود [۱۰]. سپس سی سیکل شامل ۱ دقیقه و۳۰ ثانیه در دمای ۹٤ درجه سلسیوس، ۱ دقیقه در دمای ۵۵ درجه سلسیوس و ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس انجام شد. پس از این مراحل نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به منظور تکمیل سنتز DNA نگه داشته شد. سپس محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شدند که مشاهده ی باند 1500 bp به معنی تعلق باکتری به جنس *لاکتوباسیلوس* بود. سپس باندهای بدست آمده پس از تخلیص سازی جهت سکانس به شرکت انگلیسی Biosunce فرستاده شدند و تمامی سکانس های بدست آمده با برنامه Blast در حد گونه شناسایی و ثبت گردیدند.

شناسایی در حد گونه با استفاده از پرایمرهای اختصاصی *لاکتوباسیلوسپلانتاروم* نیز انجام شد.توالی پرایمرهای مورد استفادهدر تشخیص گونه پلانتاروم شامل: CCTGAACTGAGAGAATTTGA LP(F)و ATTCATAGTCTAAGTTGGAGGT LP(R) بودند. دمای دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه بود و بعد سی سیکل شامل ۱ دقیقه، دمای ۹٤ درجه سلسیوس، ۱ دقیقه در دمای ۵۳ درجه سلسیوس و ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس انجام شد.پس از آن ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس انجام شدو بقیه مراحل مانند بالا انجام شد[۱۱].

۲-۳- بررسی فعالیت ضدمیکروبی سویه های *لاکتوباسیلوسپلانتاروم* علیه باکتری های بیماری زا

فعالیت ضدمیکروبی ۱۸ ایزوله شناسایی شده به عنوان *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در مرحله ی قبل (تست تخمیر قندها)، علیه باکتری های بیماری زای *استافیلوکوکوس اورئوس* (RTCC124)[1]، *سالمونلا تیفی (بومی)*[2]*،اشرشیاکلی*(RTCC117)[3] و *سودوموناسآئروژینوزا* (RTCC1483)[4]*لیستریا مونوسیتوژنز(بومی)*[5] توسط روش حفره ای [6] انجام شد. برای این منظور باکتری های بیماری زا در محیط BHI(Brain Heart Infusion) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱۸ تا ۲٤ ساعت کشت داده شدند. همچنین کشت تازه ی ۱۸ ایزوله *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در محیط MRS و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲٤ ساعت تهیه شد. 10^8Cfu/ml از باکتری های شاخص در محیط آگار نیمه جامد(۰/۸ درصد آگار) تلقیح و هم زده شدند. سپس روی سطح پلیت های حاوی MRS آگار ریخته شدند. بعد از سرد شدن و بستن محیط، توسط ابزارهای مخصوصی که ابتدا با الکل و سپس با شعله استریل و در مجاورت شعله سرد شده بودند ، حفره هایی به قطر تقریبا ۵ میلی متر در پلیت ها ایجاد شدند. ۸۰ میکرولیتر از کشت باکتری های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* توسط سمپلر در چاهک ها ریخته شد و پلیت ها به مدت ۲ تا ۳ ساعت به منظور جذب بیشتر باکتری ها در یخچال نگهداری شدند. بعد از آن به دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در انکوباتور منتقل شدند و پس از گذشت ۲٤ ساعت نواحی اطراف چاهک ها جهت بررسی هاله بازدارندگی رشدمورد ارزیابی قرار گرفتند [۱۲]. همچنین فعالیت آنتاگونیستی سویه ها علیه همدیگر نیز بررسی شد(طبق روش توضیح داده شده در بالا).

1. Staphylococcus aureus
2. Salmonella tiphy
3. Escherichia coli
4. Psoudomonasaeroginoza
5. Listeria monocytogenes
6. Agar well diffiusion

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-07-16]

۲-٤- جداسازی مایع رویی باکتری های دارای خاصیت ضدمیکروبی

این مرحله به منظور بررسی ماهیت ماده مهارکننده رشد باکتری های با خاصیت آنتاگونیسم بالا، که در مرحله قبل مشخص شدند و اینکه آیا مایع رویی بدون سلول باکتری نیز خاصیت بازدارندگی دارد یا نه، انجام شد. ابتدا کلنی های مربوط به سویه های تولید کننده مواد بازدارنده رشد در محیط MRS مایع به مدت ٢٤ ساعت رشد داده شدند، سپس لوله های حاوی کشت مایع توسط شیکر به هم زده شدند و بعد از آن ١cc از این محیط به ویال های ١/٥cc منتقل و توسط سانتریفیوژ با برنامه ٧٠٠٠ دور بر دقیقه و ٤ درجه سانتیگراد به مدت ١٥ دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع رویی حاصله جهت مطالعات بعدی نگهداری و پلت حاوی سلول های باکتری حذف گردیدند [١٣].

۲-٥- بررسی فعالیت ضد میکروبی مایع رویی خنثی شده

جهت بررسی اینکه فعالیت ضدمیکروبی مشاهده شده توسط مایع رویی، ناشی از تولید اسیدهای آلی توسط باکتری نیست، pH مایع رویی باکتری ها توسط NaOH ٣ مولار خنثی شد و به حدود ٦/٥ رسانده شد. سپس فعالیت ضدمیکروبی آن با روش حفره ای ارزیابی شد. در این مرحله چنانچه عامل بازدارنده، اسید های آلی باشند هاله عدم رشد مشاهده نخواهد شد[١٤].

۲-٦- بررسی اثر آنزیم ها بر فعالیت ضدمیکروبی مایع رویی

تیمار مایع رویی با آنزیم کاتالاز[1] به منظور بررسی اینکه فعالیت ضدمیکروبی مایع رویی ناشی از وجود پراکسید هیدروژن[2] است یا نه، انجام شد. محلول آنزیم کاتالاز در پتاسیم فسفات[3] (با غلظت نهایی ١ میلی گرم در میلی لیتر) تهیه شد و pH آن حدود ٧ تنظیم شد و به مایع رویی اضافه شد، سپس فعالیت ضد میکروبی آن بعد از ٠، ١، ٢ و٤ ساعت انکوباسیون در ٣٧ درجه سانتی گراد، توسط روش حفره ای ارزیابی شد. در صورت مشاهده هاله بازدارنده رشد در مراحل قبل می توان گفت که عامل بازدارنده، باکتریوسین یا ماده شبه باکتریوسین است. به منظور تعیین حضور باکتریوسین از آنزیم های پروتئولیتیک پروتئیناز k[4]، تریپسین[5] و پپسین[6] استفاده شد. محلول آنزیم ها هر کدام در بافر فسفات با غلظت نهایی ١mg/mlتهیه (pH7) و به مایع رویی اضافه شدند. فعالیت ضد میکروبی بعد از ٤،٠،١،٢ ساعت انکوباسیون در دمای ٣٧ درجه با استفاده از روش حفره ای ارزیابی شد. محلول آنزیم های لیپاز و لیزوزیم در بافر فسفات با غلظت نهایی ١mg/ml تهیه شدند و pH آنها حدود ٧ تنظیم شد. سپس مایع رویی با این آنزیم ها بطور جداگانه تیمار شد و بعد از ٤،٢،١،٠ ساعت انکوباسیون در دمای ٣٧ درجه،باقی مانده فعالیت ضدمیکروبی با روش حفره ای آگار ارزیابی شد[١٥].

۲-۷- بررسی اثر pH، دما و NaCl بر فعالیت ضدمیکروبی ماده شبه باکتریوسین

به ترتیب ./.١و ./.٧ و ./.١٠ از محلول Nacl به مایع رویی اضافه شد و باقی مانده فعالیت بعد از ٠، ٤، ٦و٢٤ ساعت انکوباسیون در ٣٧ درجه سانتیگراد با روش حفره ای آگار ارزیابی شد. فعالیت مایع رویی بدون نمک نیز به عنوان کنترل مورد ارزیابی بود[١٦]. محدوده pH مایع رویی توسط NaOH سه مولار و Hcl سه مولار بین ٣ تا ١٠ تنظیم شد و بعد از ٢ساعت انکوباسیون در دمای ٣٧ درجه سانتی گراد، باقی مانده فعالیت ضدمیکروبی مایع رویی با روش کشت حفره ای آگار سنجیده شد. برای ارزیابی تحمل دمایی باکتریوسین، ابتدا مایع رویی بدست آمده از سانتریفوژ کشت باکتری را، جدا کرده و فعالیت ضدمیکروبی آن را در دماهای ٤ و٢٠- درجه سانتی گراد بعد از به ترتیب ٠، ٢٤، ٤٨ و ٧٢ ساعت و پس از آن هر هفته به مدت ٤ هفته با روش کشت حفره ای آگار ارزیابی شد. همچنین جهت سنجش پایداری حرارتی باکتریوسین، فعالیت ضد میکروبی مایع رویی بعد از ٠، ٥، ١٠، ١٥، ٢٠، ٢٥ دقیقه حرارت دهی در دماهای ٤٠، ٦٠، ٨٠، ١٠٠ درجه سانتی گراد و ١٥ دقیقه در ١٢١ درجه سانتی گراد تعیین شد.

*لازم به ذکر است اندیکاتور مورد استفاده از مرحله تیمار با آنزیم های پروتئولیتیک به بعد، باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به میزان 10^8cfu/ml بود.

*تمام تست های ضد میکروبی انجام شده با روش کشت حفره ای آگار، به صورت دوپلیکیت انجام شد.

1. Catalase
2. Peroxide Hydrogen
3. Potasium phosphate
4. Proteinase k
5. Tripsin
6. Pepsin

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-07-16]

۳-نتایج و بحث

۳-۱- جداسازی و شناسایی باکتری های اسیدلاکتیک

اولین نتایج آزمون های میکروبی به جداسازی ۸۲ کلنی از نمونه های شیر بز جمع آوری شده از مناطق اطراف تهران و کرج به طول انجامید. نتایج مراحل بعد نشان داد که تنها ۵۰ کلنی را می توان بطور بالقوه به علت دارا بودن ویژگی هایی فنوتیپی (از جمله مورفولوژی، تست رنگ آمیزی گرم، و تست کاتالاز) که همگی گرم مثبت و کاتالاز منفی بودند، به عنوان باکتری های اسید لاکتیک به حساب آورد.

۳-۲- شناسایی گونه لاکتوباسیلوس پلانتاروم

پس از بررسی نتایج الگوی تخمیر قندها و مقایسه آن با Bergy's manual، ۱۸ نمونه از باکتری های اسید لاکتیک جدا شده به عنوان *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* شناسایی شدند، که به ترتیب از Lp_1تا Lp_{18} کد گذاری شدند.

۳-۳- واکنش PCR

هر ۱۸نمونه انتخاب شده با استفاده از پرایمر عمومی27F/1492R یک باند به اندازه 1500 bp ایجاد کردند، سپس باندهای بدست آمده پس از تخلیص سازی جهت سکانس به شرکت انگلیسی Biosunce فرستاده شدند. تمامی سکانس های بدست آمده با برنامه Blast (blast.ncbi.nim.nih. gov (Nucleotide blast: Basic Local aligment search tool) در حد گونه شناسایی و ثبت گردیدند. طبق نتایج megablast تمامی نمونه ها بین ۹۹-۹۸ ٪ در حدگونه شناسایی شدند. هر ۱۸ نمونه به عنوان لاکتوباسیلوس پلانتاروم تائید شدند. باندهای بدست آمده در شکل۱ مشخص شده اند.

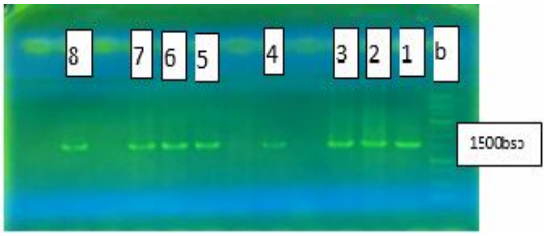

Fig 1 The bonds from general primers of samples. *1. L plantarum (Lp2) 2. L plantarum (Lp14)* 3*L plantarum (Lp4) 4. L plantarum (Lp5) 5. L plantarum (Lp11) 6. L plantarum (Lp7) 7. L plantarum (Lp12) 8. L plantarum (Lp3)* b. Marker

تائید نهایی توسط پرایمر اختصاصی سطح گونه به نام (Reverese), LP(Forward) انجام گردید. محصول بایستی قطعه ای به اندازه 248bp می بود.

از بین ۱۸ ایزوله *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* شناسایی شده، 10 نمونه با ایجاد هاله عدم رشد در اطراف چاهک ها فعالیت ضد میکروبی خوبی را از خود نشان دادند، که باز در میان آنها، ٦ نمونه دارای طیف گسترده تری از فعالیت بازدارندگی رشد علیه هر ۵ باکتری بیماری زای مورد بررسی بودند،که این نشان دهنده طیف فعالیت بازدارندگی آنها هم علیه باکتری های گرم مثبت و هم گرم منفی بوده است.

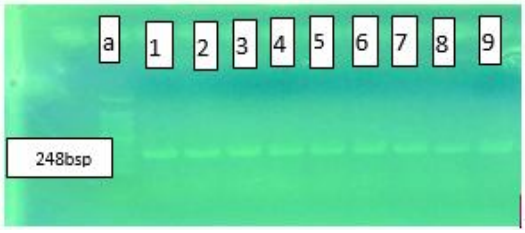

Fig 2 The bonds from specific primers of samples. *1. L plantarum (Lp1) 2. L plantarum (Lp4) 3. L plantarum (Lp3) 4. L plantarum (Lp2) 5. L plantarum (Lp14) 6. L plantarum (Lp5) 7. L plantarum (Lp8) 8. L plantarum (Lp7) 9. L plantarum (Lp12)* a. Marker 1kb

نتایج نشان داد، که نمونه شماره Lp_4 وLp_{14} نسبت به بقیه نمونه ها دارای اثر بازدارندگی قوی تری علیه دو باکتری گرم مثبت *لیستریا منوسیتوژنز و استافیلوکوکوس اورئوس* بوده، که می تواند به علت متابولیتهای ضد میکروبی تولید شده به خصوص باکتریوسین توسط باکتری باشد، زیرا باکتریوسین ها بر علیه باکتری های گرم مثبت موثرتر هستند. ٤Abo-amer گونه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* را از نوعی ماست خانگی مصری جداسازی و شناسایی کرد. هر ٤ گونه هم علیه باکتری های گرم مثبت و هم باکتری های گرم منفی شامل *استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، باسیلوس سرئوس، لیستریا منوسیتوژنز، شیگلا دیسنتری، اشرشیا کلی، سالمونلا تیفی موریوم* فعالیت بازدارندگی از خود نشان دادند، که یکی از گونه های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* اثر قوی تری نسبت به بقیه داشت و باکتری های پاتوژن غذایی گرم مثبت شامل *استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و *باسیلوس سرئوس* و همچنین باکتری های گرم منفی مثل

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-07-16]

سالمونلا پاراتیفی، *سودوموناس آئروژینوزا*، *شیگلا دیسنتری*، *شیگلا سوئنی* و *اشرشیا کلی* را شدیدا مهار کرد، اما اثر ضعیف تری علیه *لیستریا مونوسیتوژنز*، *باسیلوس سوبتیلیس* و *سالمونلا تیفی موریوم* داشت. نتایج تحقیق Abo-amerاز لحاظ طیف فعالیت باکتری های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* علیه هردو باکتری های گرم مثبت و گرم منفی مشابه به نتایج تحقیق ما است[۱۷].گونه های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جداشده از پنیر و خیارشور در مطالعه Askoul دارای فعالیت ضدمیکروبی علیه *کلبسیلا پنومونیه*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیاکلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* بودند [۱۸]. Fazeli و همکاران (۲۰۰۹) در مطالعه خود که بر روی لاکتوباسیلوس پلانتاروم های جداشده از زیتون های تخمیر شده انجام دادند، مشاهده کردند که همه سویه های لاکتوباسیلوس پلانتاروم توانستند رشد سالمونلا تیفی موریوم را مهار کنند[۲۲]. باکتری های اسید لاکتیک فعالیت ضد میکروبی علیه بیشتر پاتوژنها و مواد ترشح شده باکتریایی دارند که در طیف فعالیت شان بسیار متنوع اند.

Table 1 Antimicrobial activity of *Lactobacillus plantarum* isolates

Inhibition zone diameter (mm)					
L.monocytogenes	*Ps.aerouginosa*	*E.coli*	*S.typhi*	*S.aureus*	Sample
12	15	13	11	14	Lp_1
9	11	15	14	12	Lp_2
13	11	11	9	16	Lp_3
17	14	16	18	17	Lp_4
-	7	-	9	-	Lp_5
9	-	5	-	11	Lp_7
13	9	9	-	11	Lp_8
-	-	-	-	9	Lp_{12}
16	12	17	14	15	Lp_{14}
5	-	-	-	7	Lp_{17}

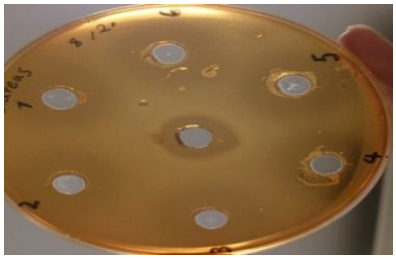

Fig 3 Zone of inhibition for *L.plantarum* samples against *S.aureus*

۳-٤- نتایج فعالیت ضدمیکروبی مایع رویی باکتری ها پس از خنثی سازی pH

پس از خنثی کردن pH مایع رویی باکتری ها، مشاهده شد که ٦ نمونه فعالیت ضدمیکروبی خود را حفظ کردند. همانطور که در جدول۲ مشاهده می شود، فعالیت ضدمیکروبی این ٦ نمونه فقط باکتری های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا منوسیتوژنز* را تحت تاثیر قرار داده است و بر باکتری های گرم منفی اثری نداشته است. مایع رویی خنثی شده توسط NaoH همچنان فعالیت ضد میکروبی خود را حفظ کرده بود، که این نشان دهنده عدم دخالت اسیدهای آلی در ایجاد این فعالیت ضدمیکروبی است.نتایج مشابه توسط Altahi برای مایع رویی لاکتوباسیلوس پلانتاروم UG1گزارش شده است[۱۹]. Seatovic و همکاران(۲۰۱۱) در مطالعه ای که با هدف شناسایی جزئی باکتریوسین G_2 تولید شده توسط لاکتوباسیلوس پلانتاروم جداشده از نمونه بالینی یک شخص سالم انجام دادند، برای آزمایش اثر باکتریوسینی لاکتوباسیلوس پلانتاروم G_2، مشاهده کردند سوپرناتانت خنثی شده کشت این باکتری علیه همه گونه های جنس لاکتوباسیلوس: لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس رامنوسوس، لاکتوباسیلوس لیشمانی، لاکتوباسیلوس پلانتاروم G1، لاکتوباسیلوس کازئی، استافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا آبونی فعال بود [۱۵].

Table2 Antimicrobial activity of supernatant after neutralizing

Listeria monocytogenese	*S.aureus*	Pathogen bacteria / Sample number
+	+	LP1
+	+	LP2
+	+	LP3
+	+	LP4
+	+	LP8
+	+	LP14

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-07-16]

۳-۵- نتایج بررسی فعالیت ضدمیکروبی مایع رویی پس از تیمار با آنزیم ها علیه باکتری های بیماری زا

نتایج فعالیت ضدمیکروبی نمونه ها، پس از تیمار با آنزیم کاتالاز (جدول ۳) نشان داد، که تنها دو نمونهLP_4 و LP_{14} فعالیت ضدمیکروبی مایع رویی شان پس از تیمار با آنزیم کاتالاز به طور کامل حفظ شد، که این نتیجه، دخالت هیدروژن پراکسید را در فعالیت ضد میکروبی مایع رویی نفی می کند (جدول۳). نتایج مشابه برای باکتریوسین *LP08AD* از *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* گزارش شده است مبنی بر اینکه این باکتریوسین تحت تاثیر آنزیم کاتالاز قرار نگرفت [۱٤].

Table 3 Antimicrobial activity of supernatant after treatment with Catalase

Sample no / Pathogen bacteria	LP_1	LP_2	LP_3	LP_4	LP_8	LP_{14}
S.aureus	−	−	−	+	−	+
Listeria monocytogenese	−	−	−	+	−	+

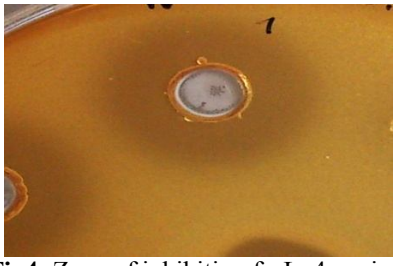

Fig4 Zone of inhibition forLp4 against *L.monocytogenes*

اما با توجه به اندازه گیری قطر هاله عدم رشد، نمونه شماره lp_4دارای فعالیت ضد میکروبی قوی تری نسبت به نمونه دیگر بود و ادامه آزمایشات برای شناسایی باکتریوسین بر روی مایع رویی این نمونه انجام شد.

آنزیم های پروتئولیتیک تریپسین، پپسین و پروتئیناز k باعث غیر فعال شدن کامل فعالیت بازدارندگی مایع رویی شده اند (شکل ۵). این نتیجه، ماهیت پروتئینی ماده بازدارنده را بطور واضح تائید می کند. تیمار با آنزیم لیزوزیم نیز تاثیری بر فعالیت آن نداشت. نتایج مشابه با نتایج بدست آمده در این مطالعه، توسط Francois وهمکاران نشان داده شد.آن ها نشان دادند، که پلانتاریسین 29v بعد از تیمار با آنزیم پروتئیناز k کاملا غیر فعال شد[۱٦]. ماده بازدارنده، فعالیت خود را بعد از تیمار با آنزیم لیپاز حفظ کرده است و فقط کمی کاهش در فعالیت در مقایسه با نمونه کنترل، مشاهده می شود. پس از تیمار با آنزیم لیپاز، فعالیت ضد میکروبی حفظ شد اما همراه با کاهش برخی از باکتریوسین ها از یک بخش پروتئینی و یک بخش یا بخش های شیمیایی دیگر تشکیل شده اند مانند لیپید یا کربوهیدرات بنابراین باکتریوسین ها می توانند بصورت لیپوپروتئین یا گلیکوپروتئین باشند. در نتیجه کاهش در فعالیت ضدمیکروبی ماده باکتریوسین، بعد از تیمار با آنزیم لیپاز، می تواند دلیلی بر ساختمان لیپوپروتئینی این باکتریوسین باشد. نتایج مشابه برای باکتریوسین *LP08AD* از *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* گزارش شده است مبنی بر اینکه این باکتریوسین تحت تاثیر آنزیم کاتالاز و لیپاز قرار نگرفت[۱٤]. Lim و همکارانش(۲۰۰۷) خصوصیات باکتریوسین k11 بدست آمده از لاکتوباسیلوس پلانتاروم k11جداشده از دانگچیمی(نوعی غذای تخمیر شده) را مورد بررسی قرار دادند. فعالیت این باکتریوسین به طور کامل توسط همه آنزیم های پروتئولیتیک از جمله پپسین، پروتئاز، پروتئیناز k، پاپائین، کیموتریپسین و تریپسین از بین رفت اما با آنزیم های کاتالاز، آلفا آمیلاز، لیزوزیم و لیپاز تحت تاثیر قرار نگرفت. و اینطور نتیجه گرفتند که باکتریوسین ماهیت پروتئینی دارد اما برای فعالیتش نیاز به بخش کربوهیدرات یا لیپیدی ندارد [۲۱]. فعالیت باکتریوسین UN01 تولید شده توسط سویه پروبیوتیک لاکتوباسیلوس فرمنتوم به طور کامل با آنزیم پروتئولیتیک پاپائین مهار شد، Udhayashree (۲۰۱۲) نتیجه گرفتند که این نشان دهنده ذات پروتئینی باکتریوسین است[۲۳].

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-07-16]

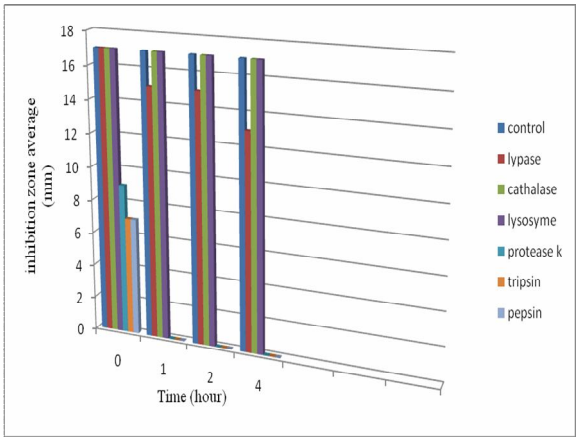

Fig 5 Effect of different enzymes on Lp4 supernatant

۳-٦- نتایج اثر pH، دما و NaCl بر فعالیت ضدمیکروبی ماده شبه باکتریوسین

بررسی نتایج حاصل از اثر تغییرات pH روی فعالیت بازدارندگی مایع رویی (شکل ٦)، نشان داد که فعالیت ماده شبه باکتریوسین در رنج ۸-pH۳ حفظ شد و در pHهای اسیدی (۵-۳) فعالیت بهتری از خود نشان داد. که این فعالیت بهتر می تواند به دلیل اثر همزمان اسید و باکتریوسین باشد. اما در pHهای بالاتر از٦ فعالیتش کم شده و از ۸ pH به بعد فعالیتش بطور کامل از بین رفت. نتایج Lim (۲۰۰۷) نشان داد که فعالیت باکتریوسین k11 علیه E.coli در رنج 3-9pHتحت تاثیر قرار نگرفت[۲۱]. Udhayashree (۲۰۱۲) فعالیت بازدارندگی باکتریوسین UN01 را در pH های (۲و٤و۵و۷و۹) بررسی کردند و بیشترین هاله عدم رشد را در pH 2 مشاهده کردند[۲۳]. بر خلاف نتایج حاضرFrancois نشان داد که باکتریوسین حاصل از لاکتوباسیلوس پلانتاروم 29v نسبت به تغییرات pH حساس نبوده و در رنج ۱۰-pH۲ پایدار و فعال بود. ماده شبه باکتریوسین قادر به تحمل غلظت های ۱و۷ درصد نمک طعام بود و حتی بعد از ٢٤ ساعت فعالیت خود را در این غلظت ها حفظ کرد اما در غلظت ۱۰ درصد در همان ساعت اول کاملا غیر فعال شد. نتایج حاصل از تحمل غلظت نمک نشان دادند که باکتریوسین، غلظت نمک را تا ۷درصد به خوبی تحمل کرد. نتایج در شکل۷ آورده شده است. این نتیجه همسو با نتایج Francoisاست، او در مطالعه اش روی باکتریوسین جداشده از *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* نشان داد که این باکتریوسین در برابر غلظت های مختلف نمک طعام پایداری بالایی داشته است. این ویژگی برای یک باکتریوسین مطلوب است چرا که در صورت کاربرد آن در آینده به عنوان یک نگهدارنده طبیعی غذا، می تواند در غذاهایی با غلظت های ۱-۷درصد نمک طعام فعالیت خود را حفظ کند[١٦]. Mohankumarو همکاران (۲۰۱۱) اثر NaCl را بر روی تولید باکتریوسین توسط سویه تولید کننده بررسی کردند. ۱درصد NaCl، تولید باکتریوسین را تقریبا در همه سویه های مورد مطالعه افزایش داد و دو سویه GALوBFLدر حضور ۳درصد NaClفعالیت بهتری در مقایسه با بقیه سویه ها داشتند اما این فعالیت در حضور ٤درصد نمک از بین رفت. یک سویه نیز در حضور بیش از ۱درصد نمک فعالیتش مهار شد[۵].

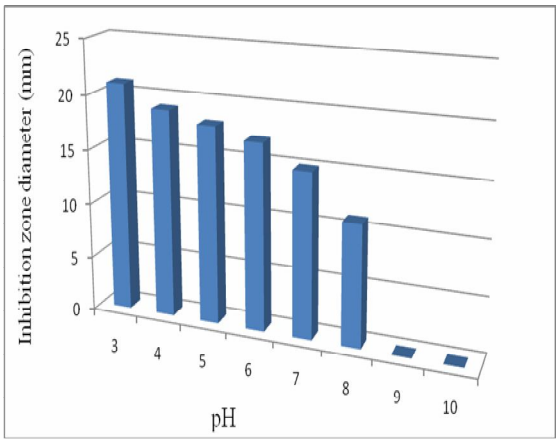

Fig 6 Effect of pH range on antimicrobial activity of supernatant Lp4

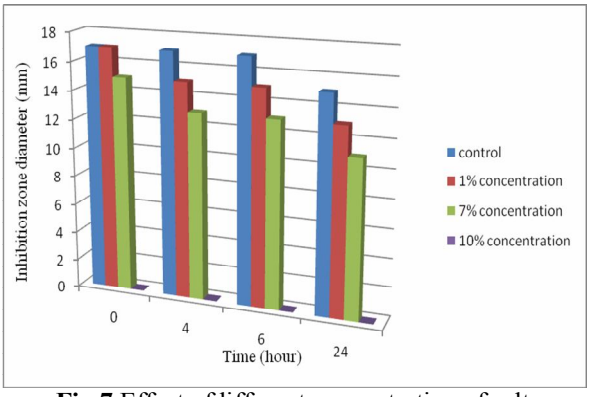

Fig 7 Effect ofdifferent concentration of salt on antimicrobial activity of bacteriocin like substances Lp4

بررسی نتایج مشاهده شده از اثر دماهای نگهداری (٤ و۲۰- درجه سلسیوس) و اثر حرارت (٤۰، ٦۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۱۲۱ درجه سلسیوس) بر باکتریوسین (جداول ٤ و ۵)، نشان دادند که این باکتریوسین دارای پایداری حرارتی تا دمای ۱۰۰ درجه به مدت ۲۵ دقیقه بود و قادر به تحمل دمای ۱۲۱ درجه به مدت ۱۵ دقیقه نیز بود. نتایج در جدول ٤ آمده است. این نتایج نشان دهنده یک باکتریوسین پایدار به حرارت است. این

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-07-16]

نتایج مشابه با نتایج گزارش شده توسط پلانتاریسین *OL15* بود که پایداری حرارتی را تا دمای ۱۰۰ و ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه نشان داد [۲۰]. همچنین نگهداری در دمای ۲۰-درجه به مدت یک ماه، باعث از دست رفتن فعالیت آن نشد اما دمای ٤ درجه را تا دوهفته تحمل کرد و بعد از آن فعالیتش بطور کامل از دست رفت. نتایج در جدول ۵ آمده است. برخلاف نتیجه بدست آمده در این تحقیق، نتایج Lim نشان داد که پلانتاریسین k11 حاصل از *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* k11 دمای ٤ درجه را به مدت سی روز تحمل کرد و مشابه با نتایج ما در دمای ۲۰- درجه نیز به مدت سی روز پایدار بود[۲۱]. فعالیت باکتریوسین UN01 بدست آمده از لاکتوباسیلوس فرمنتوم جداشده از Chickintestine در دماهای مختلف(۳۷و۵۰و۷۵و۹۰و۱۰۰ درجه سانتیگراد) توسط Udhayashree (۲۰۱۲) اندازه گیری شد که بیشترین هاله عدم رشد در ۳۷°C مشاهده شد[۲۳].

Table 4 Antimicrobial activity of bacteriocin in high temperatures

121°C	100°C	80°C	60°C	40°C	Temperature / Time(min)
ND	++++	++++	++++	++++	5
ND	+++	++++	++++	++++	10
++	++	+++	++++	++++	15
ND	++	+++	+++	++++	20
ND	+	++	++	+++	25

Table 5 Antimicrobial activity of bacteriocin in storage temperatures

-20°C	4°C	Temperature / Time
++++	++++	0
+++	+++	24
++	++	48
++	++	72
++	++	1Weeks
++	+	2Weeks
++	_	3Weeks
++	_	4Weeks

+ inhibition zone less than 9 mm
++inhibition zone 9 – 11 mm
+++inhibition zone 12 - 15 mm
++++inhibition zone more than 15 mm

٤- نتیجه گیری

ر این مطالعه، از میان ۱۸ نمونه باکتری های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جداسازی شده از شیر بز، ۱۰سویه دارای خاصیت ضدمیکروبی علیه باکتری های پاتوژن بودند، که ٦ سویه از آنها طیف گسترده تری از فعالیت ضد میکروبی هم علیه باکتری های گرم منفی و هم باکتری های گرم مثبت را از خود نشان دادند. مایع رویی دو سویه LP_4 و LP_{14} بعد از تیمار با آنزیم کاتالاز همچنان فعالیت خود را حفظ کردند. به علت اثر آنتاگونیستی قوی تر مایع رویی سویه LP_4، برای انجام ادامه آزمایشات انتخاب شد. ویژگی های فیزیکوشیمیایی ماده شبه باکتریوسین حاصل از *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* سویه شماره LP_4 عبارت بودند از پایداری حرارتی تا دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه، فعالیت در رنج pH اسیدی و تا حدودی قلیایی، تحمل غلظت نمک طعام تا ۷درصد و ساختمان لیپوپروتئینی. با توجه به نتایج بدست آمده از آزمون های ضدمیکروبی انجام شده بر روی مایع رویی جداشده از محیط کشت این سویه می توان نتیجه گرفت که این فعالیت ضدمیکروبی ناشی از تولید اسیدهای آلی و هیدروژن پراکسید توسط باکتری نبوده و همچنین با توجه به ماهیت پروتئینی این ماده ضدمیکروبی و با درنظر گرفتن این موضوع که سویه های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* غالبا تولیدکننده باکتریوسین هستند، می توان حدس زد که این فعالیت احتمالا مربوط به باکتریوسین تولید شده توسط این سویه باکتریایی است، که با بررسی ها و آزمایشات بیشتر در مطالعات بعدی می توان حضور باکتریوسین در مایع رویی را تائید کرد.

۵- سپاسگزاری

مطالعه حاضر با همکاری و مساعدت موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی انجام گرفته است که بدین وسیله از همکاران محترم این موسسه صمیمانه تشکر و قدر دانی می گردد. همچنینبه طور ویژه از سرکار خانم دکتر ناهید مژگانی و سرکار خانم دکتر سولماز صارم نژاد کمال تشکر و قدر دانی را دارم.

٦- منابع

[1] Tafvizi, F., Tajabadi Ebrahimi, M., Khachareh, L, 1391, Study of phenotype and phylogenetic of Lactobacillus producer bacteriocin isolate from traditional food and dairy product, Journal of medicine sciences university of FASA,(2),p 84.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-07-16]

[2] Nouruzi, J, 1381, Evaluation of possibility creating optimal grow conditions lactobacillus plantarum for more bacteriocin production,Feiz science and research Quarterly,(24).

[3] Driessen, A. J.,Van den hooven,H.W.,Van deK. M., Sahl, H. G., Konings,R., Konings,W.N., 1995, Mechanisticstudies of lantibiotic-induced permeabilization Of phospholipid vesicles Biochemistry, Vol. 34, P. 1606-1614

[4] Niamsup, P.,Chaimanee, V., Sakulsingharoj, C., Deejin, S., Seetakoses, P, 2009, Screening and characterization of bacteriocin-producing bacteria capable of inhibiting the growth of bovine mastitis, Maejo international journal of science and technology,Vol.3,No.1,P. 43-52

[5] Mohankumar, A., 2011, Characterization and antibacterial activity of bacteriocin producing lactobacillus isolated from row cattle milk samples, International journal of biology,Vol.3, No.3, P.128

[6] Ryan, M. P., Mcaney, W.J., Ross, R,1998, Evaluation of lacticin3147 and a tests seal containing this bacteriocin for inhibitory of mastitis pathogens, Applied Environmental microbiology, Vol.64,No.6,P. 2287-2290

[7] Lewus, C. B. Kaiser, A., Montville,T. J, 1991, Inhibition of food born bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat, Applied and Environmental Microbiology, Vol.75,No.6,P. 1683-1688

[8] Deman, J. C., Rogosa, M., Sharp, M. E.,1960, A medium for the cultivation of Lactobacilli, J. APP Bacteriol,Vol. 23, P. 130-135

[9] Kandler, O.,Weiss, N, 1986, Genus lactobacillus beijerinck 1901 in beregys manual of systematic bacteriology,Vol.2, P. 1209-1234

[10] Jiang, H.; Dong, H.; Zhang, G.; Yu, B.; Chapman, L. R.; Fields, M. W. (2006). Microbial Diversity in Water and Sediment of Lake Chaka, an Athalassohaline Lake in Northwestern China. Applied and Environmental Microbiology 72 (6): 3832–3845

[11] Sáenz Y, Rojo-Bezares B, Navarro L, Díez L, Somalo S, Zarazaga M, Ruiz-Larrea F, Torres C. Genetic diversity of the pln locus among oenological Lactobacillus plantarum strains. International Journal of Food Microbiology 134 (2009) 176–183

[12] Ryan, M. P., Mcaney, W.J., Ross, R,1998, Evalution of lacticin3147 and a tests seal containing this bacteriocin for inhibitory of mastaitispathogens, Applied Environmental microbiology ,Vol.64,No.6,P. 2287-2290

[13] Holo, H., Nilssen, Q., Nes, I., 1991, LactococcinA, a new bacteriocin from lactococcus lactis subsp. cremoris:isolation and characterization,Journal of bacteriology,Vol.173,No.12,P. 3879-3887

[14] Toba, T., Samant, S. K., Itoh,T,1991, Assay system for detecting bacteriocin in microdilution wells, Lett App microbiol, Vol.3,P.1209-1234

[15] Seatovic, S.Novakovic, J., Radulovic, Z, Jankulovic, M., Hankove, R, 2011, The partial characterization of the antibacterial peptide bacterioc in G2 produced by the probiotic bacteria lactobacillus plantarum,The Serbian chemical society,Vol.76,No.5,P. 699-707

[16] Francois, Z. M., Marie, K.P., Noelle,T.A. H., Emeric, G.W. R, 2013, Antimicrobial activity of bacteriocin produced lactobacillus plantarum 29v and strain viability in palm kernel oil,International Journal of nutrition and food science,vol.2,No.3,P. 102-108

[17] Amer, A., 2007, Characterization of a bacteriocin-like inhibitory substance produced by lactobacillus plantarum isolated from Egyptian home-made yogurt,science asia,Vol. 33,P 313-319

[18] Askoul, I. Gorrah, S., Al-amir, L., 2014, Isolation and characterization of bacteriocin producing lactic acid bacteria from some Syrian fermented foods, International journal of Chem Tech research,Vol.6,No.4,P .2507-2520

[19] Altahi, A., 2008, Antilisteria activity of plantaricin UG1 during manufacture of zabady and kereesh cheese:tow Arabian dairy products, International journal of medical science,Vol.4,No.4,P 319-322

[20] Mourad, K., Hlima, Z., Eddine, K. N,2005, Detection and activity of plantaricin OL15 a bacteriocin produced by lactobacillus plantarumOL15 isolated from Algerian fermentation olives,GrasasyAceites,Vol.56,P. 192-197

[21] Lim,S.,Im,D.,2007,Bacteriocin effect of lactobacillus plantarum k11 isolated from Dongchimi on Escherichia coli O157,Journal of food hygiene and safety,Vol.22,No.3,P. 151-158

[22] Fazeli, MR., Vaghari,E., Jamalifar, H., Ebrahim, Z., Samadi, N, 2009, Antimicrobial Activity of Lactobacillus Plantarum Strains Isolated From Fermented Olives Origin,Journal of Medicinal Plants, Vol. 8,No31,P.14-18

[23] Udhayashree, N., Senbagan, D., Senthilkumar, B., Nithya, K.,Gurusamy, R, 2012, Production of bacteriocin and their application in food products, Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, P.406-410

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-07-16]

Evaluation of antimicrobial properties of some in digenous *lactobacillus plantarum* strains isolated from goat's milk

Dalvand, Sh.[1], Mojgani, N. [2*], Saremnezhad, S. [3]

1. Graduated of masters food sciences and microbiology orientation, , Faculty of Advanced sciences and Technology, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran-Iran(IAUPS).
2. Associate Professor, Razi vaccine and Serum research Institute, Karaj, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), IR Iran.
3. Assistant Professor, Faculty of Advanced sciences and Technology, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran-Iran(IAUPS).

(Received: 2016/01/02 Accepted:2016/05/31)

In this study the antimicrobial potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from goat's milk was evaluated. Sixty seven goat's milk samples were collected from Tehran and Karaj and screened for the presence of lactic acid bacteria (LAB). Among the isolated LAB, 18 strains were identified as *Lactobacillus plantarum* by their carbohydrate fermentation pattern and 16S rRNA sequencing. Antimicrobial activity of the isolated*Lactobacillus plantarum* strains against a number of pathogens including *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella typhi, Listeria monocytogenes and Escherichia coli* was evaluated by agar spot and well diffusion method. Results indicated 10 of the*Lactobasillusplantarum* strains to possess inhibitory activity towards the tested pathogens, while 6 of these strains were shown to have wide spectrum of inhibitory activity and were able to inhibit the growth of the entire tested gram positive and gram negative pathogens. The antibacterial activity demonstrated by these 6 strains was further analyzed by subjecting their supernatant fluid to various physico-chemical treatments. The supernatant fluid of these strains retained their antagonistic action even after neutralization, while only 2 strains (LP4 and LP14) retained their antimicrobial activity after treatment with 1 mg/ml catalase. The supernatant fluids of the respected isolates LP4 was resistant to enzyme Lysozyme and lipase, while proteolytic enzymes like pepsin, trypsin and proteinase K completely destroyed its antibacterial potential. The isolates were resistant to their own antagonistic action. The bacteriocin like substance produced by LP4 was pH and heat resistant as it resisted wide pH range of 3-8 and autoclave temperatures of 121ºC for 15 min. This substance after 4 weeks storage at -20 0C still retained its antimicrobial activity and after treating by concentration of 7 percent NaCl, it was still active.

Key words: *Lacticacid bacteria, goat's milk, Lactobacillus plantarum, Antimicrobial activity, Bacteriocin like substance*

* Corresponding Author E-Mail Address: dnmoj@yahoo.com

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-07-16]