

بررسی خاصیت ضد میکروبی 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: ۹۴/۱۰/۱۲ 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. ۶۷ نمونه شیر بز از مناطق تهران و کرج جمع آوری شد و به منظور شناسایی و حضور باکتری 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 منوسیژنز، 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 ۶ 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 ۶ سویه، بعد از تیمار با عوامل فیزیکی و شیمیایی نیز مورد بررسی های بیشتری قرار گرفت. فعالیت ضد میکروبی سوپرناتانت ها پس از خنثی سازی pH حفظ شد، از میان آنها تنها سوپرناتانت ۲ سویه LP14 و LP4 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 پروتیناز k به طور کامل فعالیت ضد میکروبی را از بین بردند. سویه جدا شده LP4 نسبت به خاصیت آنتاگونیستی خود و مهار رشد مقاوم بود. ماده شبه باکتریوسین تولید شده توسط LP4 به pH و حرارت مقاوم بود زیرا توانست گستره وسیعی از pH از ۳ تا ۸ و دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس اتوکلاو را برای ۱۵ دقیقه تحمل کند. این ماده بعد از ۴ هفته نگهداری در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد همچنان فعالیت ضد میکروبی خود را حفظ کرد و بعد از تیمار با غلظت ۷ درصد NaCl، هنوز دارای فعالیت ضد میکروبی بود.

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

* مسئول مکاتبات : dnmoj@yahoo.com

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. لاکتوباسیلوس پلانتاروم به عنوان یک کشت آغازگر در فرآیندهای تخمیری غذایی استفاده شده است که به خواص ارگانولپتیکی، طعم و بافت کمک میکند. لاکتوباسیلوس پلانتاروم به خاطر تولید اسیدلاکتیک و دیگر ترکیبات ضد میکروبی 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 ۴۵ درجه قادر به رشد نیست. تولید مواد ضد میکروبی توسط لاکتوباسیلوس پلانتاروم به زنده ماندن این گونه در دستگاه گوارش کمک می کند. مشخص شده است که این مواد ضد میکروبی 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 ضد میکروبی لاکتوباسیلوس پلانتاروم به عنوان یکی از مهمترین عوامل دارای پتانسیل درمانی برای جلوگیری یا درمان عفونت ها مطرح است [۳].

در سال ۲۰۱۴ در بررسی ای روی باکتری های اسیدلاکتیک جداسازی شده 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 پتاسئوس بودند. ۸ ایزوله از بین ۲۴

ایزوله گونه های اشریشیاکلی ATCC11775 و استافیلوکوکوس اورئوس ATCC12600 را مهار کردند. لاکتوباسیلوس فرمنتوم بیشترین هاله عدم رشد را بر علیه اشریشیاکلی و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بیشترین هاله را بر علیه استافیلوکوکوس اورئوس ایجاد کردند [۴]. Mohankumar و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان دادند که لاکتوباسیلوس پلانتاروم OL15 جداسازی شده از زیتون های سبز تخمیر شده Algerian، مواد ضد میکروبی 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 [۵]. Ryan و همکاران در سال ۱۹۹۸ در مطالعه شان مشاهده کردند که گونه لاکتوباسیلوس پلانتاروم تولیدکننده باکتریوسین جداسازی شده از نمونه های شیر گاو رنج وسیعی از فعالیت ضد باکتری علیه پاتوژن های منتقله از غذا را نشان داد [۶]. Lewus و همکاران در سال ۱۹۹۱ گونه لاکتوباسیلوس پلانتاروم kII از بین ۶۸ گونه باکتری اسیدلاکتیک جداسازی شده 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، جداسازی 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 and Sharpe, HiMedia, India) است [۸]. محیطی اختصاصی که قادر است نیاز های غذایی پیچیده آنان

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 شد و بقیه مراحل مانند بالا انجام شد [۱۱].

۲-۳- بررسی فعالیت ضد میکروبی سویه های لاکتوباسیلوس پلانتاروم علیه باکتری های بیماری زا

فعالیت ضد میکروبی ۱۸ ایزوله شناسایی شده به عنوان لاکتوباسیلوس پلانتاروم در مرحله ی قبل (تست تخمیر قندها)، علیه باکتری های بیماری زای *استافیلوکوکوس اورئوس* (RTCC124)^۱، *سالمونلا تیفی* (بومی)، *اشرشیاکلی* (RTCC117)^۲ و *سودوموناس آئروژینوزا* (RTCC1483) لیستریا مونوسیژنوز (بومی)^۵ توسط روش حفره ای^۶ انجام شد. برای این منظور باکتری های بیماری زا در محیط BHI (Brain Heart Infusion) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت کشت داده شدند. همچنین کشت تازه ی ۱۸ ایزوله لاکتوباسیلوس پلانتاروم در محیط MRS و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت تهیه شد. 10^8 Cfu/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 تقریباً 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 ۲۴ ساعت نواحی اطراف چاهک ها جهت بررسی هاله بازدارندگی رشد مورد ارزیابی قرار گرفتند [۱۲]. همچنین فعالیت آنتاگونیستی سویه ها علیه همدیگر نیز بررسی شد (طبق روش توضیح داده شده در بالا).

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 ۲۴ 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 آمیزی گرم، تست کاتالاز، تست تخمیر قند [۹] مورد بررسی قرار گرفتند.

۲-۲- شناسایی گونه لاکتوباسیلوس پلانتاروم توسط واکنش PCR

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-35'- CGG TTA CCT TGT TAC GAC TT- و 1492R دمای دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سلسیوس و مدت زمان ۵ دقیقه بود [۱۰]. سپس سی سیکل شامل ۱ دقیقه ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ 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 لاکتوباسیلوس پلانتاروم نیز انجام شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در تشخیص گونه پلانتاروم شامل:

CCTGAAGTCTAAGTTGGAGGT و LP(F) ATTCATAGTCTAAGTTGGAGGT

LP(R) بودند. دمای دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه بود و بعد سی سیکل شامل ۱ دقیقه، دمای ۹۴

1. *Staphylococcus aureus*
2. *Salmonella typhi*
3. *Escherichia coli*
4. *Pseudomonas aeruginosa*
5. *Listeria monocytogenes*
6. *Agar well diffusion*

۲-۴- جداسازی مایع رویی باکتری های دارای

خاصیت ضد میکروبی

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 ۲۴ ساعت رشد داده شدند، سپس لوله های حاوی کشت مایع توسط شیکر به هم زده شدند و بعد از آن ۱cc از این محیط به ویال های ۱/۵cc منتقل و توسط سانتریفیوژ با برنامه ۷۰۰۰ دور بر دقیقه و ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع رویی حاصله جهت مطالعات بعدی نگهداری و پلت حاوی سلول های باکتری حذف گردیدند [۱۳].

۲-۵- بررسی فعالیت ضد میکروبی مایع رویی

خنثی شده

جهت بررسی اینکه فعالیت ضد میکروبی مشاهده شده توسط مایع رویی، ناشی از تولید اسیدهای آلی توسط باکتری نیست، pH مایع رویی باکتری ها توسط NaOH ۳ مولار خنثی شد و به حدود ۶/۵ رسانده شد. سپس فعالیت ضد میکروبی آن با روش حفره ای ارزیابی شد. در این مرحله چنانچه عامل بازدارنده، اسید های آلی باشند هاله عدم رشد مشاهده نخواهد شد [۱۴].

۲-۶- بررسی اثر آنزیم ها بر فعالیت

ضد میکروبی مایع رویی

تیمار مایع رویی با آنزیم کاتالاز^۱ به منظور بررسی اینکه فعالیت ضد میکروبی مایع رویی ناشی از وجود پراکسید هیدروژن^۲ است یا نه، انجام شد. محلول آنزیم کاتالاز در پتاسیم فسفات^۳ (با غلظت نهایی ۱ میلی گرم در میلی لیتر) تهیه شد و pH آن حدود ۷ تنظیم شد و به مایع رویی اضافه شد، سپس فعالیت ضد میکروبی آن بعد از ۰، ۱، ۲ و ۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ 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 پروتیناز^۴، تریپسین^۵ و پپسین^۶ استفاده شد. محلول آنزیم ها هر کدام در بافر فسفات با غلظت نهایی ۱mg/ml تهیه (pH ۷) و به مایع رویی اضافه شدند. فعالیت ضد میکروبی بعد از ۰، ۱، ۲، ۴ و ۲۱ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه با استفاده از روش حفره ای ارزیابی شد. محلول آنزیم های لپاز و لیپازیم در بافر فسفات با غلظت نهایی ۱mg/ml تهیه شدند و pH آنها حدود ۷ تنظیم شد. سپس مایع رویی با این آنزیم ها بطور جداگانه تیمار شد و بعد از ۰، ۱، ۲، ۴ و ۲۱ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه، باقی مانده فعالیت ضد میکروبی با روش حفره ای آگار ارزیابی شد [۱۵].

۲-۷- بررسی اثر pH، دما و NaCl بر فعالیت

ضد میکروبی ماده شبه باکتریوسین

به ترتیب ۱۰٪، ۷٪ و ۱٪ از محلول NaCl به مایع رویی اضافه شد و باقی مانده فعالیت بعد از ۰، ۴، ۶ و ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتیگراد با روش حفره ای آگار ارزیابی شد. فعالیت مایع رویی بدون نمک نیز به عنوان کنترل مورد ارزیابی بود [۱۶]. محدوده pH مایع رویی توسط NaOH سه مولار و HCl سه مولار بین ۳ تا ۱۰ تنظیم شد و بعد از ۲ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، باقی مانده فعالیت ضد میکروبی مایع رویی با روش کشت حفره ای آگار سنجیده شد. برای ارزیابی تحمل دمایی باکتریوسین، ابتدا مایع رویی بدست آمده از سانتریفیوژ کشت باکتری را، جدا کرده و فعالیت ضد میکروبی آن را در دماهای ۴ و ۲۰- درجه سانتی گراد بعد از به ترتیب ۰، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت و پس از آن هر هفته به مدت ۴ هفته با روش کشت حفره ای آگار ارزیابی شد. همچنین جهت سنجش پایداری حرارتی باکتریوسین، فعالیت ضد میکروبی مایع رویی بعد از ۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ دقیقه حرارت دهی در دماهای ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ درجه سانتی گراد و ۱۵ دقیقه در ۱۲۱ 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 10^8 cfu/ml بود.

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

4. Proteinase k
5. Trypsin
6. Pepsin

1. Catalase
2. Peroxide Hydrogen
3. Potassium phosphate

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 فوتوتیکی (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 Lp₁ تا Lp₁₈ کد گذاری شدند.

۳-۳- واکنش PCR

هر ۱۸ نمونه انتخاب شده با استفاده از پرایمر عمومی 27F/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.nlm.nih.gov) (Nucleotide blast: Basic Local alignment search tool) در حد گونه شناسایی و ثبت گردیدند. طبق نتایج megablast تمامی نمونه ها بین ۹۹-۹۸٪ در حد گونه شناسایی شدند. هر ۱۸ نمونه به عنوان لاکتوباسیلوس پلانتاروم تأیید شدند. باندهای بدست آمده در شکل ۱ مشخص شده اند.

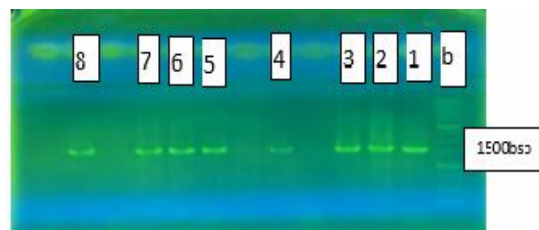


Fig 1 The bonds from general primers of samples.

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

تأیید نهایی توسط پرایمر اختصاصی سطح گونه به نام (Reverse), 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، ۶ 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 Lp₄ و Lp₁₄ نسبت به بقیه نمونه ها دارای اثر بازدارندگی قوی تری علیه دو باکتری گرم مثبت لیستریا منوسیتوزنز و استافیلوکوکوس اورئوس بوده، که می تواند به علت متابولیت های ضد میکروبی تولید شده به خصوص باکتریوسین توسط باکتری باشد، زیرا باکتریوسین ها بر علیه باکتری های گرم مثبت موثرتر هستند. Abo-amer ۴ گونه لاکتوباسیلوس پلانتاروم را از نوعی ماست خانگی مصری جداسازی و شناسایی کرد. هر ۴ گونه هم علیه باکتری های گرم مثبت و هم باکتری های گرم منفی شامل استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا منوسیتوزنز، شینگلا دیستری، 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

سودوموناس آئروژینوزا بودند [۱۸]. Fazeli و همکاران (۲۰۰۹) در مطالعه خود که بر روی لاکتوباسیلوس پلانتاروم های جدا شده از زیتون های تخمیر شده انجام دادند، مشاهده کردند که همه سویه های لاکتوباسیلوس پلانتاروم توانستند رشد سالمونلا تیفی موربوم 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.

سالمونلا پاراتیفی، سودوموناس آئروژینوزا، شیگلا دیسنتری، شیگلا سوننی و اشرشیا کلی را شدیداً مهار کرد، اما اثر ضعیف تری علیه لیستریا مونوسیژنز، باسیلوس سوبتیلیس و سالمونلا تیفی موربوم داشت. نتایج تحقیق Abo-amer از 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 جدا شده از پنیر و خیارشور در مطالعه Askoul دارای فعالیت ضد میکروبی علیه کلبسیلا پنومونیه، استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلی و

Table 1 Antimicrobial activity of *Lactobacillus plantarum* isolates

Inhibition zone diameter (mm)					
<i>L.monocytogenes</i>	<i>Ps.aeruginosa</i>	<i>E.coli</i>	<i>S.typhi</i>	<i>S.aureus</i>	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

لاکتوباسیلوس پلانتاروم UG1 گزارش شده است [۱۹]. Seatovic و همکاران (۲۰۱۱) در مطالعه ای که با هدف شناسایی جزئی باکتریوسین G₂ تولید شده توسط لاکتوباسیلوس پلانتاروم جدا شده از نمونه بالینی یک شخص سالم انجام دادند، برای آزمایش اثر باکتریوسینی لاکتوباسیلوس پلانتاروم G₂، مشاهده کردند سوپرناتانت خنثی شده کشت این باکتری علیه همه گونه های جنس لاکتوباسیلوس: لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس رامنوسوس، لاکتوباسیلوس لیسمانی، لاکتوباسیلوس پلانتاروم G₁، لاکتوباسیلوس کازئی، استافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا آبنوی فعال بود [۱۵].

Table2 Antimicrobial activity of supernatant after neutralizing

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

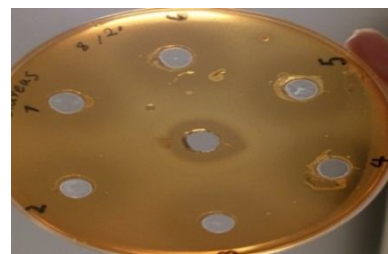


Fig 3 Zone of inhibition for *L.plantarum* samples against *S.aureus*

۳-۴- نتایج فعالیت ضد میکروبی مایع رویی

باکتری ها پس از خنثی سازی pH

پس از خنثی کردن pH مایع رویی باکتری ها، مشاهده شد که ۶ نمونه فعالیت ضد میکروبی خود را حفظ کردند. همانطور که در جدول ۲ مشاهده می شود، فعالیت ضد میکروبی این ۶ نمونه فقط باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا مونوسیژنز 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 ضد میکروبی است. نتایج مشابه توسط Altahi برای مایع رویی

۳-۵- نتایج بررسی فعالیت ضد میکروبی مایع

رویی پس از تیمار با آنزیم ها علیه باکتری

های بیماری زا

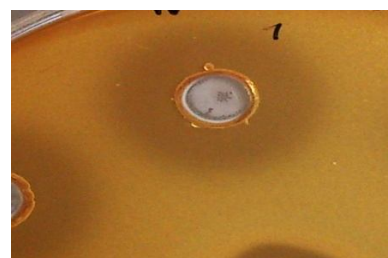
نتایج فعالیت ضد میکروبی نمونه ها، پس از تیمار با آنزیم کاتالاز (جدول ۳) نشان داد، که تنها دو نمونه LP₄ و

LP₁₄ فعالیت ضد میکروبی 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 (جدول ۳). نتایج مشابه برای باکتریوسین LP08AD از لاکتوباسیلوس پلانتاروم گزارش شده است مبنی بر اینکه این باکتریوسین تحت تاثیر آنزیم کاتالاز قرار نگرفت [۱۴].

Table 3 Antimicrobial activity of supernatant after treatment with Catalase

LP ₁₄	LP ₈	LP ₄	LP ₃	LP ₂	LP ₁	Sample no Pathogen bacteria
+	-	+	-	-	-	<i>S. aureus</i>
+	-	+	-	-	-	<i>Listeria monocytogenes</i>

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 ضد میکروبی 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 [۱۴]. Lim و همکارانش (۲۰۰۷) خصوصیات باکتریوسین k11 بدست آمده از لاکتوباسیلوس پلانتاروم k11 جدا شده 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، پروتاز، پروتیناز k، پاپائین، کیموترپسین و ترپسین 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 فرمتوم به طور کامل با آنزیم پروتئولیتیک پاپائین مهار شد، Udhayashree (۲۰۱۲) نتیجه گرفتند که این نشان دهنده ذات پروتئینی باکتریوسین است [۲۳].

Fig4 Zone of inhibition for Lp4 against *L. monocytogenes*

اما با توجه به اندازه گیری قطر هاله عدم رشد، نمونه شماره lp4 دارای 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 ترپسین، پپسین و پروتیناز k باعث غیر فعال شدن کامل فعالیت بازدارندگی مایع رویی شده اند (شکل ۵). این نتیجه، ماهیت پروتئینی ماده بازدارنده را بطور واضح تأیید می کند. تیمار با آنزیم لیزوزیم نیز تاثیری بر فعالیت آن نداشت. نتایج مشابه با نتایج بدست آمده در این مطالعه، توسط Francois و همکاران نشان داده شد. آن ها نشان دادند، که پلانتاریسین 29v بعد از تیمار با آنزیم پروتیناز k کاملاً غیر فعال شد [۱۶]. 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

در صورت کاربرد آن در آینده به عنوان یک نگهدارنده طبیعی غذا، می تواند در غذاهایی با غلظت های ۱-۷ درصد نمک طعام فعالیت خود را حفظ کند [۱۶]. Mohankumar و همکاران (۲۰۱۱) اثر NaCl را بر روی تولید باکتریوسین توسط سویه تولید کننده بررسی کردند. ادرصد NaCl، تولید باکتریوسین را تقریباً در همه سویه های مورد مطالعه افزایش داد و دو سویه GAL و BFL در حضور ۳ درصد NaCl فعالیت بهتری در مقایسه با بقیه سویه ها داشتند اما این فعالیت در حضور ۴ درصد نمک از بین رفت. یک سویه نیز در حضور بیش از ادرصد نمک فعالیتش مهار شد [۵].

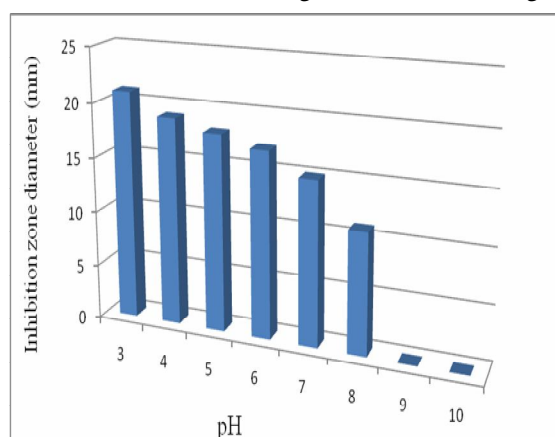


Fig 6 Effect of pH range on antimicrobial activity of supernatant Lp4

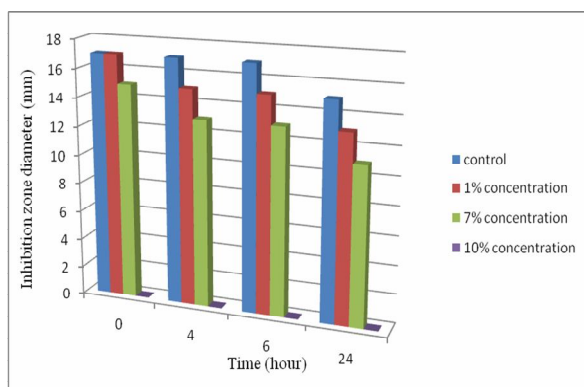


Fig 7 Effect of different concentration of salt on antimicrobial activity of bacteriocin like substances Lp4

بررسی نتایج مشاهده شده از اثر دماهای نگهداری (۴ و ۲۰- درجه سلسیوس) و اثر حرارت (۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۱۲۱ درجه سلسیوس) بر باکتریوسین (جدول ۴ 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 ۴ آمده است. این نتایج نشان دهنده یک باکتریوسین پایدار به حرارت است. این

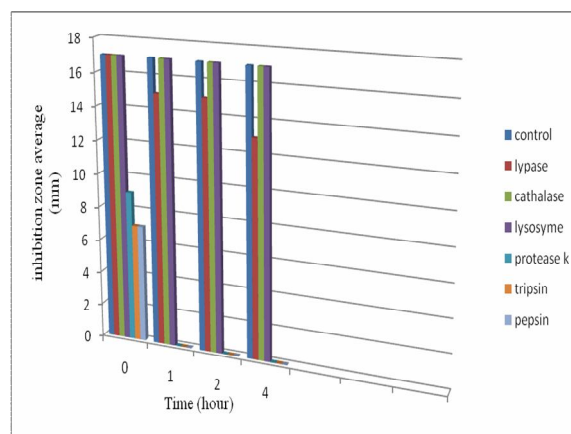


Fig 5 Effect of different enzymes on Lp4 supernatant

۳-۶- 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 ۶)، نشان داد که فعالیت ماده شبه باکتریوسین در رنج ۸-۳ pH حفظ شد و در pH های 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 pH های بالاتر از ۶ 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 ۳-9 pH تحت تاثیر قرار نگرفت [۲۱]. Udhayashree (۲۰۱۲) فعالیت بازدارندگی باکتریوسین UN01 را در pH های (۲ و ۴ و ۵ و ۹) بررسی کردند و بیشترین هاله عدم رشد را در pH ۲ مشاهده کردند [۲۳]. بر خلاف نتایج حاضر Francois نشان داد که باکتریوسین حاصل از لاکتوباسیلوس پلانتروم 29v نسبت به تغییرات pH حساس نبوده و در رنج ۱۰-۲ pH پایدار و فعال بود. ماده شبه باکتریوسین قادر به تحمل غلظت های ۱ و ۷ درصد نمک طعام بود و حتی بعد از ۲۴ ساعت فعالیت خود را در این غلظت ها حفظ کرد اما در غلظت ۱۰ درصد در همان ساعت اول کاملاً غیر فعال شد. نتایج حاصل از تحمل غلظت نمک نشان دادند که باکتریوسین، غلظت نمک را تا ۷ درصد به خوبی تحمل کرد. نتایج در شکل ۷ آورده شده است. این نتیجه همسو با نتایج Francois است، او در مطالعه اش روی باکتریوسین جدا شده از لاکتوباسیلوس پلانتروم 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

۴- نتیجه گیری

ر این مطالعه، از میان ۱۸ نمونه باکتری های لاکتوباسیلوس پلاتناروم جداسازی شده از شیر بز، ۱۰ سویه دارای خاصیت ضد میکروبی علیه باکتری های پاتوژن بودند، که ۶ 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 LP₄ و LP₁₄ بعد از تیمار با آنزیم کاتالاز همچنان فعالیت خود را حفظ کردند. به علت اثر آنتاگونیستی قوی تر مایع رویی سویه LP₄، برای انجام ادامه آزمایشات انتخاب شد. ویژگی های فیزیکی و شیمیایی ماده شبه باکتریوسین حاصل از لاکتوباسیلوس پلاتناروم سویه شماره LP₄ 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 ۷ درصد و ساختمان لیپوپروتئینی. با توجه به نتایج بدست آمده از آزمون های ضد میکروبی انجام شده بر روی مایع رویی جدا شده از محیط کشت این سویه می توان نتیجه گرفت که این فعالیت ضد میکروبی ناشی از تولید اسیدهای آلی و هیدروژن پراکسید توسط باکتری نبوده و همچنین با توجه به ماهیت پروتئینی این ماده ضد میکروبی و با در نظر گرفتن این موضوع که سویه های لاکتوباسیلوس پلاتناروم غالباً تولیدکننده باکتریوسین هستند، می توان حدس زد که این فعالیت احتمالاً 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 تأیید 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. همچنین به ویژه از سرکار خانم دکتر ناهید مژگانی و سرکار خانم دکتر سولماز صارم نژاد کمال تشکر و قدر دانی را دارم.

۶- 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.

نتایج مشابه با نتایج گزارش شده توسط پلاتناریسین *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 ۴ 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 پلاتناریسین *k11* حاصل از لاکتوباسیلوس پلاتناروم *k11* دمای ۴ 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 جدا شده از *Chickintestine* در دماهای مختلف (۳۷ و ۵۰ و ۷۵ و ۹۰ و ۱۰۰ 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

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

Table 5 Antimicrobial activity of bacteriocin in storage temperatures

Temperature	Time	-20°C	4°C
	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

- [13] Holo, H., Nilssen, Q., Nes, I., 1991, LactocococinA, 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 bacteriocin 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 plantarum* OL15 isolated from Algerian fermentation olives, *Grasasy Aceites*, 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, M. R., 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, No.31, 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
- [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, Mechanistic studies 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 *Bergey's 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, 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

Evaluation of antimicrobial properties of some indigenous *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 *Lactobacillus plantarum* 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 121°C for 15 min. This substance after 4 weeks storage at -20 °C still retained its antimicrobial activity and after treating by concentration of 7 percent NaCl, it was still active.

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

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