شناسایی ژنتیکی و بررسی فعالیت ضد باکتریایی جدایه‌های لاکتیکی بدست آمده از کره مسکه بر باکتری‌های بیماریزا *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا انتریکا*

احمد نصرالله‌زاده[۱]، مرتضی خمیری[۲]*، علیرضا صادقی[۲]، ماندانا محمودی[۳]، مریم ابراهیمی[۳]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشکده علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.
۲- گروه میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشکده علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۳- دکتری میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشکده علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.
(تاریخ دریافت: ۹۷/۱۱/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۵/۲۰)

چکیده

کره مسکه یا کره تلمبی حاصل از ماست، کره سنتی مورد استفاده در جنوب خراسان است که دارای طیف گسترده‌ای از باکتری‌های لاکتیکی می‌باشد. این پژوهش با هدف بررسی اثر ضد باکتریایی جدایه‌های لاکتیکی کره مسکه بر رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا انتریکا* انجام گرفت. در این تحقیق، ابتدا با روش PCR، جدایه‌های لاکتیکی مورد شناسایی قرار گرفتند و سپس از روش میکرودایلوشن به‌منظور ارزیابی فعالیت ضد میکروبی جدایه‌ها استفاده گردید. بلاست توالی قطعات ژن ۱۶S rDNA جدایه‌ها با توالی‌های ذخیره شده در پایگاه NCBI، منجر به شناسایی جنس‌های *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس*، *انتروکوکوس فاسیوم*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*، *لاکتوباسیلوس دلبروکی* و *انتروکوکوس هیرا* شد. نتایج ارزیابی فعالیت ضد میکروبی بر باکتری‌های بیماریزای *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا انتریکا* نشان داد که همه جدایه‌ها قابلیت جلوگیری از رشد این دو پاتوژن را داشتند و درصد بازدارندگی آن‌ها بترتیب از ۸۴/۴۹- ۵۵/۴۶ و از ۴۶/۵۶- ۵/۵۵ درصد متغیر بود. همچنین نتایج نشان داد که جنس‌*های لاکتوباسیلوس پلانتاروم* B38، *انتروکوکوس هیرا* B224، *لاکتوباسیلوس دلبروکی* B37 از بالاترین درصد بازدارندگی بر *استافیلوکوکوس اورئوس* برخوردار بودند ($P<0.05$) و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* B38 به طور معنی داری ($P<0.05$) بالاترین درصد بازدارندگی بر *سالمونلا انتریکا* را از خود نشان داد. علاوه بر این نتایج مقایسه بازدارندگی جدایه‌های لاکتیکی نشان داد که میزان بازدارندگی تمامی جدایه‌ها در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* به شکل معنی‌داری از *سالمونلا انتریکا* بیشتر بود ($P<0.05$). بنابراین می‌توان از باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از کره مسکه جهت مهار میکروارگانیسم‌های عامل بیماری و فساد استفاده نمود.

کلید واژگان: مسکه، باکتری‌های لاکتیکی، PCR، ضد باکتریایی، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سالمونلا انتریکا*

*مسئول مکاتبات: khomeiri@gau.ac.ir

۱- مقدمه

کره مسکه، یکی از انواع کره‌های تلمبی است که دارای طیف گسترده‌ای از باکتری‌های لاکتیکی می‌باشد. کره‌ی ماست، نام کلی محصولی برگرفته از چربی ماست است که در داخل تلمب یا چرن سنتی پس از عملیات فیزیکوشیمیایی به توده‌های کره تبدیل می‌شود. این محصول در نقاط مختلف دنیا از جمله آسیای مرکزی، الجزایر، هند، ترکیه و ایران به صورت کاملا محلی و سنتی تولید و با اسامی مختلفی از جمله یاییک، مسکه، اشمن، زابرا، ماخان، داهان و دیگر اسامی شناخته می‌شود [۱و۲]. در بین کره‌های حاصل از ماست، کره‌های تولید شده از ماست گوسفندی به دلیل برخورداری از عطر و طعم فوق العاده از اهمیت ویژه‌ای برخوردار بوده که این نشان دهنده وجود طیف وسیعی از باکتری‌های اسید لاکتیک مولد عطر و آروما است که به همراه تفاوت در ترکیب مواد مغذی شیر، طعم و رایحه‌ی ویژه این محصول را ایجاد می‌نمایند. لذا برای حفظ خواص سنتی و ویژه‌ی کره ماست، سعی شده تا از سویه‌های خاص باکتری‌های اسید لاکتیک ایزوله شده از کره های حاصل از شیر خام برای این منظور استفاده شود [۳]. کره تلمبی حاصل از ماست در ایران، "مسکه" نام دارد. مسکه یکی از متداول ترین کره‌های مورد استفاده در ناحیه جنوب خراسان و فرآورده ای از مشتقات ماست می باشد که طی فرایند خاصی از شیر گاو یا گوسفند قابل استحصال است. تولید این نوع کره، بدون افزودن استارتر تجاری و با تکنیک‌های سنتی صورت می‌گیرد. مسکه یا کره حاصل از ماست دارای شهرت و مصرف فزاینده‌ای در کشور و بخصوص در جنوب خراسان است و دلیل عمده‌ی آن، لذیذ بودن و برخورداری از طعم ومزه مورد پسند مصرف کنندگان در مقایسه با کره پاستوریزه می‌باشد [۳].

در این نوع کره‌ی بدون استارتر حاصل از شیر خام، اعمال بیوشیمیایی از جمله تولید دی استیل، استوئین، سایر مواد مولد عطر و آروما و ترشی اندک کره، وابسته به عمل باکتری‌های اسید لاکتیک بومی شیر یا ماست است. در واقع میکروارگانیسم‌های خاصی مسئول ایجاد آروما، طعم و بافتی منحصر به فرد در این محصول هستند. شناسایی و بررسی انواع این میکروارگانیسم‌ها که باکتری‌های اسید لاکتیک جزو اصلی آنها می‌باشند، در شناخت بهتر این فراورده‌ها و امکان به کارگیری عوامل مفید موجود در آنها برای ارتقای کیفیت این محصول و سایر فراورده‌های لبنی به خصوص جهت تنوع بخشی به محصولات لبنی در سطح صنعتی و نیمه صنعتی، کمک شایانی می‌کند [٤].

به دلیل اهمیت فوق‌العاده این باکتری‌ها (از نظر سلامت بخشی، درمانی و تغذیه‌ای)، جداسازی و شناسایی گونه‌های جدید این باکتری‌ها از منابع مختلف غذایی از اهمیت بالایی برخوردار است. شناسایی خصوصیات پایه‌ای باکتری‌ها بر اساس ویژگی-های مختلف نظیر مورفولوژی سلول، مورفولوژی کلنی، شرایط کشت، حرکت، توانایی تولید اسپور و همچنین الگوی تخمیر کربوهیدرات‌ها انجام می‌شود. اکنون مشخص شده که شناسایی باکتری‌ها صرفاً بر مبنای خصوصیات فنوتیپی و بیوشیمیایی چندان دقیق نبوده به‌گونه‌ای که در بسیاری موارد، دسته‌ای از باکتری‌ها که بر مبنای این خصوصیات در یک گروه قرار می‌گیرند ازنظر خصوصیات ژنوتیپی با یکدیگر تفاوت‌های بسیاری دارند [۵]. امروزه روش‌های مولکولی به ابزار قدرتمندی برای شناسایی مولکولی باکتری‌ها تبدیل شده‌اند که قادر هستند باکتری‌های مختلف را با صحت و دقت بسیار شناسایی و طبقه‌بندی نمایند. به همین دلیل پژوهش‌های گسترده‌ای در زمینه کاربرد این روش-ها برای شناسایی و طبقه‌بندی باکتری‌های جدا شده از منابع گوناگون انجام شده است [۹-٦].

علاوه بر این در حال حاضر اهمیت لاکتیک اسید باکتری‌ها بر علیه ارگانیسم‌های پاتوژن برای بهبود کیفیت غذاهای نگهداری شده برای سلامت انسان به وضوح مشخص است و بی‌خطر بودن بسیاری از آن‌ها از لحاظ دارا بودن شرایط ایمنی برای مصرف انسان مورد تایید قرار گرفته است. از طرفی با توجه به این که استفاده از مواد غذایی با نگهدارنده شیمیایی به علت اثرات منفی بر سلامت انسان و محیط زیست در بین مصرف کنندگان به طور چشمگیری کاهش پیدا کرده است. لذا استفاده از نگهدارنده‌های زیستی نظیر لاکتیک اسید باکتری‌ها که از لحاظ ایمن بودن برای سلامت انسان مورد تایید سازمان‌های مربوطه قرار گرفته‌اند و علاوه بر این خاصیت پروبیوتیکی و سلامت بخشی بسیاری از آن‌ها به اثبات رسیده است، می تواند جایگزین‌های مناسبی برای نگهدارنده‌های شیمیایی باشد.

هدف از این تحقیق شناسایی ژنتیکی جدایه‌های بدست آمده از

کره سنتی مسکه در استان خراسان شمالی و بررسی فعالیت ضد میکروبی جدایه‌ها به‌عنوان یک نگهدارنده زیستی علیه باکتری‌های بیماریزا *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا انتریکا* بوده است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- محیط‌های کشت مصرفی

محیط‌های کشت MRS agar و MRS broth و عصاره مخمر از شرکت مرک آلمان و مولر هینتون آگار (MHA) از شرکت سیگما آمریکا تهیه شدند. محیط‌های کشت در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه استریل گردیدند.

سویه‌های باکتریایی

سویه های باکتری اسید لاکتیک مورد استفاده در این تحقیق شامل جدایه‌های بدست آمده از کره سنتی مسکه در خراسان شمالی با کدهای B38، B37، B120، B224، B66، B251، B23، B260، B39 می‌باشد که از کلکسیون میکروبی گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه گرگان تهیه گردید.

جهت بررسی خواص ضد میکروبی جدایه‌ها از ۲ باکتری بیماریزا *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا انتریکا*استفاده شد که از کلکسیون باکتری‌های صنعتی ایران تهیه گردیدند.

۲-۲- فعال‌سازی جدایه‌ها و بررسی اولیه جهت شناسایی فنوتیپی با استفاده از آزمون بیوشیمیایی

برای این هدف، ابتدا فعال‌سازی جدایه‌ها در محیط کشت MRS مایع تحت شرایط بی‌هوازی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. شناسایی جدایه‌ها در مراحل اولیه به کمک معیارهای فنوتیپی مانند شکل کلنی و مورفولوژی سلولی و رنگ‌آمیزی گرم و فعالیت کاتالازی انجام شد.

۲-۳- شناسایی جدایه‌ها به روش مولکولی

استخراج DNA توسط کیت تجاری استخراج DNA و بر اساس دستورالعمل کیت مورد استفاده انجام شد (شرکت تکاپوزیست).

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

پرایمرهای مورد استفاده: جهت شناسایی مولکولی باکتری‌های لاکتیک اسید به کمک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، از پرایمرهای عمومی رفت و برگشت باکتری‌های لاکتیک اسید، برای تکثیر نواحی متغیر ۱۶S rDNA استفاده شد. توالی پرایمرها عبارت‌اند از: 1492R: 5´-GGTTACCTTGTTACGACTT-3´ و 27F: 5´-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3´ [۱۰]. طول قطعه DNA تکثیر شده ۱۵۰۰bp است.

واکنش PCR: واکنش PCR در یک حجم ۳۰ میکرولیتر با استفاده از Red 2X Master Mix در دستگاه ترموسایکلر انجام شد. واکنش PCR در حجم نهایی ۳۰ میکرولیتر با مقادیر بهینه شده زیر، انجام پذیرفت (جدول ۱).

Table 1 the values of the components used in the PCR reaction

amount (microliters)	materials
15	Master Mix
0.5	Premier F
0.5	Premier R
3	DNA template
11	Distilled water

آنالیز کیفی محصول PCR: جهت مشاهده نتایج واکنش PCR، محصولات تکثیر شده توسط ترموسایکلر، روی ژل آگارز ۰/۵ ٪، بارگذاری شدند.

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

۲-۴- بررسی فعالیت ضد باکتریایی جدایه‌ها با استفاده از روش میکرودایلوشن

به‌منظور ارزیابی خاصیت ضد میکروبی محیط مایع مصرف شده بدون سلول[1] کشت ۲۴ ساعته جدایه‌های لاکتیکی در برابر باکتری‌های بیماری‌زا *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا انتریکا* از روش میکرودایلوشن استفاده گردید. بدین منظور، ۱۸۵ میکرولیتر از محیط مایع مصرف شده بدون سلول کشت هر

1. Cell Free spent Medium (CFSM)

جدایه لاکتیکی که از سانتریفوژ کشت ۲٤ ساعته در ٤ درجه سانتی‌گراد با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه به دست آمد به همراه ۱۵ میکرولیتر از باکتری بیماری‌زای مورد نظر (حاوی 10^5 CFU) به هر چاهک اضافه شد. در ادامه و پس از ۲٤ ساعت گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، جذب نمونه مذکور در طول‌موج ٦۰۰ نانومتر تعیین گردید [۱۱].

۲-۵- تجزیه‌وتحلیل آماری

نتایج حاصل از این پژوهش نیز با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه و روش حداقل اختلاف معنی‌داری (LSD) در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ در سه تکرار و به کمک نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و برای ترسیم نمودارها از نرم‌افزار میایکروسافت اکسل نسخه ۲۰۰۷ استفاده شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- شناسایی مولکولی سویه‌های فعال‌شده

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

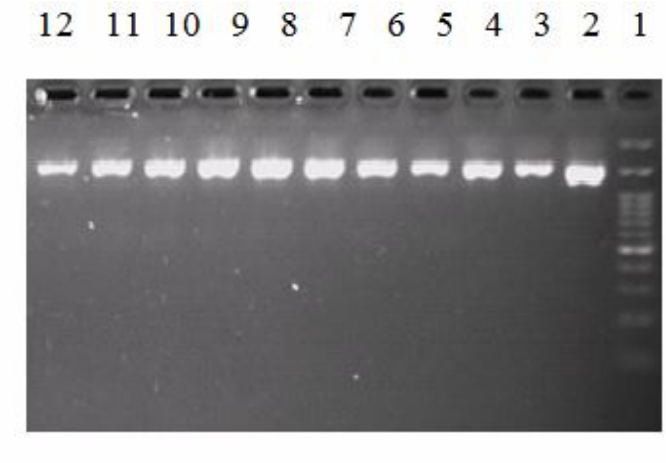

Fig 1 Gel electrophoresis of PCR products

همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود محصولات PCR مربوط به هر ۹ نمونه DNA استخراجی، طولی معادل ۱۵۰۰bp داشتند (ژل الکتروفورز محصولات PCR دارای پرایمر اختصاصی با توالی هدف ۵۰۰ جفت بازی روی ژل آگارز ۱/۵٪، چاهک ۱: مارکر، چاهک ۲ کنترل مثبت (*لاکتوباسیلوس پلانتاروم*)، چاهک ۳ تا ۱۲ نمونه‌های فعال‌شده به ترتیب از شماره ۱ تا ۹). توالی قطعات ژن ۱٦S rDNA جدایه‌ها با توالی‌های ذخیره شده در پایگاه اطلاعاتی NCBI، بلاست گردید (جدول ۲). نتایج توالی‌یابی محصولات PCR دارای پرایمر اختصاصی از DNA این تک پرگنه‌ها نیز پس از مقایسه توالی‌های مذکور با داده‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI منجر به شناسایی *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس*، *انتروکوکوس فاسیوم*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*، *لاکتوباسیلوس دلبروکی* و *انتروکوکوس هیرا* شد. با توجه به نتایج بالا و تفاوت‌های آشکاری که میان شناسایی مولکولی و بیوشیمیایی دیده می‌شود می‌توان به‌دقت و صحت شناسایی مولکولی سویه‌های میکروبی با استفاده از ناحیه ژنی 16S rDNA پی برد.

Table 2 PCR sequencing results of activated isolates from Masske butter and comparison with results from biochemical identification

Biochemical identification	Molecular identification	Isolate code	Number
Streptococcus thermophilus	*Lactobacillus bulgaricus*	B251	1
Lctobacillus spp.	*Lctobacillus plantarum*	B38	2
Lctobacillus plantarum	*Lctobacillus fermentum*	B66	3
Pedicoccus spp.	*Lctobacillus plantarum*	B120	4
Lctobacillus plantarum	*Lactobacillus delbrueckii*	B37	5
Pedicoccus spp.	*Lactobacillus delbrueckii*	B39	6
Lctobacillus spp.	*Enterococcus hirae*	B224	7
Lctobacillus plantarum	*Lctobacillus fermentum*	B23	8
Streptococcus salivarius	*Enterococcus hirae*	B260	9

شناسایی جدایه‌های باکتریایی با استفاده از روش‌های مولکولی در مقایسه با روش‌های بیوشیمیایی و مورفولوژیکی یک روش مطمئن و دقیق محسوب می‌شود و به همین دلیل، تاکنون پژوهش‌های متعددی با استفاده از این روش برای شناسایی دقیق سویه‌های باکتریایی جدا شده از محصولات مختلف لبنی و سایر محصولات انجام گرفته است. به‌عنوان مثال تروپچیوا و همکاران (۲۰۱٤) به شناسایی *لاکتوباسیلوس‌های* جدا شده از محصول لبنی محلی کاتاک با روش‌های اختصاصی در سطح گونه و PCR RAPD و آنالیز توالی 16S rDNA پرداختند. نتایج آن‌ها نشان داد که چهار سویه جدا شده مربوط به گونه *لاکتوباسیلوس برویس* بودند [۹]. اسمیت سینگ و سینگ (۲۰۱٤)، به بررسی *لاکتوباسیلوس‌های* غیر آغازگر جدا شده از پنیر چدار هندی با استفاده از روش PCR مبتنی بر جایگاه 16S rRNA اقدام نمودند که طی آن تمامی سویه‌ها به‌عنوان *لاکتوباسیلوس* شناخته شدند [۸]. همچنین تفویضی و همکاران (۲۰۱۱)، به مطالعه ژنوتیپی و فیلوژنتیکی *لاکتوباسیلوس‌های* تولیدکننده باکتریوسین جدا شده از محصولات لبنی محلی و غذاهای سنتی با استفاده از ناحیه 16S rRNAپرداختند و توانستند گونه‌هایی از *لاکتوباسیلوس* و *انتروکوکوس* را شناسایی کنند[۱۲]. بررسی نریمانی و تاری نژاد (۲۰۱٤)، بر روی جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی باکتری‌های پروبیوتیک شیر و ماست سنتی گاومیش شهرستان خوی، منجر به شناسایی سویه‌های *لاکتوباسیلوس برویس* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* شد[۱۳]. در تحقیقات دیگری که توسط برخی از محققین انجام شده است گونه‌های مختلفی از *لاکتوباسیلوس* جداسازی شده است که از آن‌ها می‌توان به ائوسل (۲۰۰۲) اشاره نمود. این محقق از شوبات که یک محصول تخمیری حاصل از شیر شتر است *لاکتوباسیلوس برویس*، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس کازئی* و گونه‌های *پدیو کوکوس* را جداسازی کرد[۱٤].

۳-۲- خاصیت ضد باکتریایی جدایه‌ها

از بین جدایه‌های شناسایی شده، ۹جدایه از جنس و گونه‌های مختلف انتخاب شدند و سپس خاصیت ضد میکروبی آن‌ها در برابر باکتری‌های بیماری‌زا به روش میکرودایلوشن (شکل ۲ و شکل ۳) بررسی شد. نتایج به دست آمده نشان داد که میزان بازدارندگی جدایه‌های مورد بررسی بر *استافیلوکوکوس اورئوس* از ۸٤/٤۹- ۵۵/٤٦ درصد متغیر بود. نتایج حاصل از ارزیابی اثرات بازدارندگی محیط مایع مصرف شده بدون سلول کشت جدایه‌های لاکتیکی بر رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* در شکل ۲ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*B38، *انتروکوکوس هیرا*B224، *لاکتوباسیلوس دلبروکی* B37 از بالاترین درصد بازدارندگی بر *استافیلوکوکوس اورئوس* برخوردار بودند و تفاوت معنی‌داری بین آن‌ها مشاهده نشد ($P>0.05$). همچنین *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* B23 از کمترین قدرت بازدارندگی برخوردار بود.

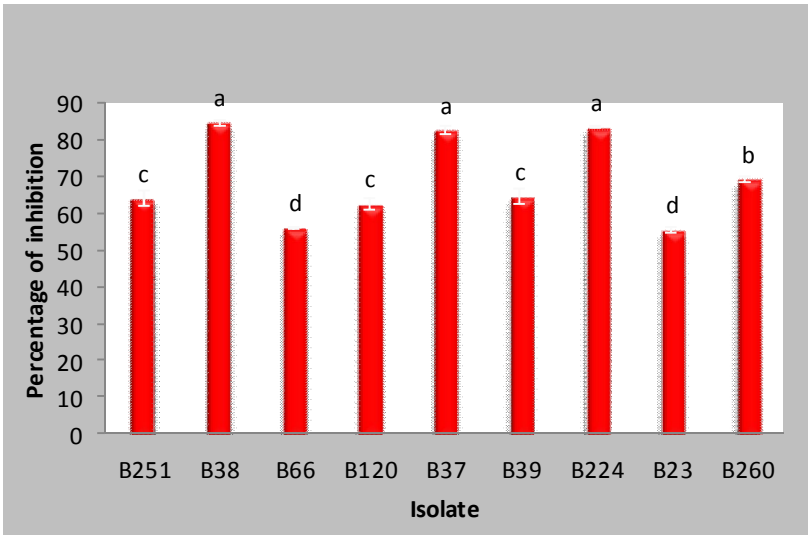

Fig 2 Inhibitory effects of Cell Free Spent Medium (CFSM) used on lactic acid bacteria isolates against of *Staphylococcus aureus*

در بخش دیگری از این پژوهش، اثرات بازدارندگی محیط مایع مصرف شده بدون سلول کشت جدایه‌های لاکتیکی بر رشد باکتری گرم منفی *سالمونلا انتریکا* بررسی شد. نتایج به دست آمده نشان داد که میزان بازدارندگی جدایه‌های مورد بررسی بر *سالمونلا انتریکا* از ۵/۵۵ تا ٤٦/٥٦ درصد متغیر بود. نتایج حاصل از ارزیابی اثرات بازدارندگی محیط مایع مصرف شده بدون سلول کشت جدایه‌های لاکتیکی بر رشد *سالمونلا انتریکا* در شکل ۳ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* B38 به طور معنی داری ($P<0.05$) از بالاترین درصد بازدارندگی بر علیه *سالمونلا انتریکا* برخوردار بود. همچنین *لاکتوباسیلوس دلبروکی* B37 از کمترین قدرت بازدارندگی برخوردار بود.

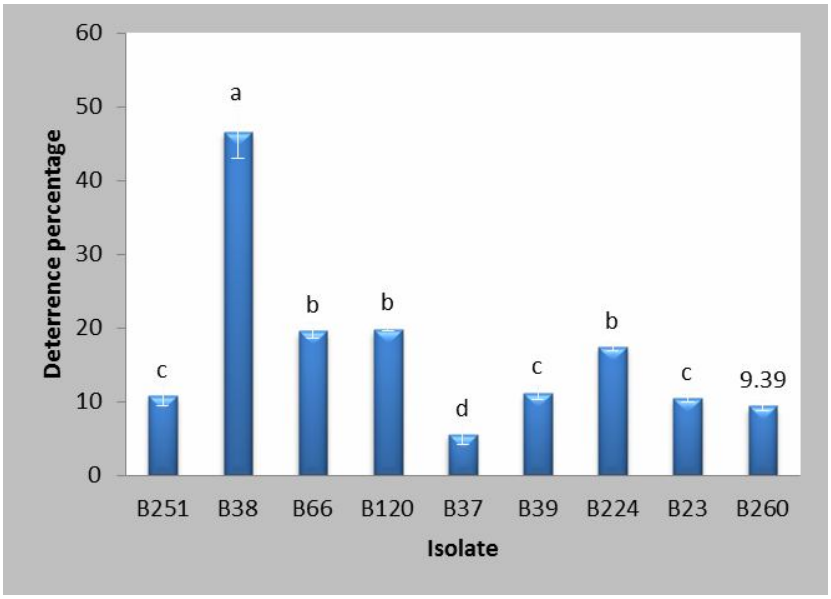

Fig 3 Inhibitory effects of Cell Free Spent Medium (CFSM) used on lactic acid bacteria isolates against of *Salmonella enterica*
*Similar letters in each row indicate no significant difference at the 0.05 level

مقایسه میزان بازدارندگی جدایه‌های لاکتیکی بر روی باکتری‌های بیماری‌زا نشان داد که میزان بازدارندگی تمام جدایه‌های لاکتیکی مورد بررسی بر روی باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* به شکل معنی‌داری ($P<0.05$) بیشتر از تأثیر آن‌ها بر روی باکتری گرم منفی *سالمونلا انتریکا* بود (جدول۳).

Table 3 Comparison of inhibitory effect of lactic isolates on pathogenic bacteria

Salmonella enterica	*Staphylococcus aureus*	Isolate code	Number
^{b*}10/78±1/44	^{a}64/05±2/25	B251	1
^{b}46/56±3/55	^{a}84/49±./78	B38	2
^{b}19/57±1/08	^{a}56/07±./35	B66	3
^{b}19/83±./16	^{a}62/6±1/45	B120	4
^{b}5/55±1/37	^{a}82/46±1/04	B37	5
^{b}11/17±./94	^{a}64/49±2/17	B39	6
^{b}17/4±./45	^{a}83/32±./17	B224	7
^{b}10/45±./45	^{a}55/46±./6	B23	8
^{b}9/39±./72	^{a}69/26±69	B260	9

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

مطالعات سال‌های اخیر و پیشرفت‌های تکنولوژیکی، اهمیت تغذیه‌ای و درمانی محصولات لبنی تخمیری را بخوبی نشان می‌دهد که این خواص به کشت‌های اسید لاکتیک در فرآیند تولید آن‌ها و به متابولیت‌های متعدد و آنزیم‌های تولید شده که دارای برخی مزایای درمانی هستند، نسبت داده می‌شوند. لاکتیک اسید باکتری‌ها به‌طور طبیعی در مواد غذایی مختلف نظیر لبنیات، فراورده‌های گوشتی و سبزیجات تخمیر شده وجود داشته و یا به‌عنوان کشت‌های خالص یا استارتر در تولید محصولات لبنی مانند شیر اسیدوفیلوس، ماست، پنیرهای کاتیج، پنیرهای سخت و نرم بکار برده می‌شوند [۱۵]. با توجه به این‌که لاکتیک اسید باکتری‌ها از لحاظ ایمنی در اروپا مورد تأیید و به‌عنوان مواد ایمن به رسمیت شناخته شده‌اند [۱۷-۱۵]، می‌توان از آن‌ها به‌عنوان ترکیبات طبیعی برای جایگزین کردن با مواد افزودنی شیمیایی و درعین‌حال ارائه محصولات غذایی جدید و جذاب استفاده کرد [۱۸]. گونه‌های لاکتیک اسید باکتری‌ها نمایندگان اصلی پروبیوتیک‌ها در تولید فراورده‌های غذایی و دارویی می‌باشند [۵]. علاوه بر این توانایی تولید برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها و ترکیبات زیست‌فعال خصوصاً باکتریوسین‌ها توسط این باکتری‌ها جهت کنترل و درمان برخی از سرطان‌های دستگاه گوارش به اثبات رسیده است [۱۹]. لاکتیک اسید باکتری‌های زیادی تاکنون شناخته شده‌اند، این باکتری‌ها در محصولات غذایی زیادی به خصوص در محصولات لبنی سنتی مختلف وجود دارند و علاوه بر این بخشی از جمعیت طبیعی دستگاه گوارش را نیز تشکیل می دهند.

در دهه اخیر پژوهش‌های متعددی درباره بررسی اثر ضد میکروبی سویه‌های لاکتیکی جدا شده از محصولات لبنی سنتی و تخمیری انجام گرفته است. بعنوان مثال فرناندز و همکاران (۲۰۰۳) به بررسی فعالیت ضد میکروبی *لاکتوباسیلوس گازری* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بر باکتری‌های *سالمونلا، کمپیلو باکتر و لیستریا* پرداختند. نتایج آن‌ها نشان داد که جدایه‌های لاکتیکی می‌توانند بدون ایجاد تداخل در فلور میکروبی دستگاه گوارش از رشد این پاتوژن‌ها جلوگیری نمایند [۲۰]. در تحقیق دیگری کیائی و همکاران (۲۰۰۶)، اثر آنتاگونیستی باکتری‌های لاکتیکی جدا شده از ماست‌های محلی استان گلستان را علیه باکتری‌های بیماری‌زا مورد ارزیابی قرار دادند که نتایج آن‌ها نشان داد که محلول رویی تهیه‌شده از محیط کشت باکتری‌های *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس لاکتیس*، بیشترین اثر بازدارندگی را بر پاتوژن‌های گوارشی به‌خصوص *سالمونلا تیفی موریوم، اشریشیا*

کلای، *یرسینیا انتروکولیتیکا* و *شیگلا دیسنتری* از خود نشان داد [۲۱]. نتایج حاصل از شناسایی ژنوتیپی و فیلوژنتیکی *لاکتوباسیلوس*های تولیدکننده باکتریوسین جدا شده از محصولات لبنی و غذاهای سنتی محلی توسط تفویضی و همکاران (۲۰۱۱) نشان داد که *لاکتوباسیلوس کازئی* و *انتروکوکوس فاسیوم* در این محصولات تولید باکتریوسین می‌کنند که این متابولیت خاصیت ضد میکروبی دارد [۱۲].

همچنین بررسی فعالیت ضد میکروبی سویه‌های لاکتیکی پدیوکوکوس اسیدی لاکتیکی، پدیوکوکوس پنتوزئوس و *لاکتوباسیلوس ساکی* بر روی میکروارگانیسم‌های پاتوژن و بیماری‌زای جدا شده از مواد غذایی (شامل: سودوموناس، اشریشیا، باسیلوس و لیستریا توسط سیزیکین و همکاران (۲۰۱۳) نشان داد که متابولیت‌های این باکتری‌ها قادر به جلوگیری از رشد پاتوژن‌های مذکور می‌باشند [۲۲]. میرحسینی (۲۰۱۱)، به شناسایی *انتروکوکوس* تولیدکننده باکتریوسین در محصولات لبنی با روش مولکولی پرداخت. نتایج این پژوهش نشان داد که انتروسین A تنها انتروسین غالب در همه نمونه‌ها بود (خاصیت ضد میکروبی *انتروکوکوس*ها به حضور این انتروسین‌ها نسبت داده می‌شود) [۲۳]. علاوه بر این در تحقیق دیگری نشان داه شد که *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* از قابلیت تجمعی قابل توجهی علیه باکتری‌های بیماری‌زا برخوردار بود که دلیل آن میزان بالای آب‌گریزی سطح سلولی این باکتری عنوان گردید [۲٤]. همچنین بین قابلیت تجمع باکتری‌های اسید لاکتیک بر ضد باکتری‌های بیماری‌زا و میزان آب‌گریزی دیواره سلولی رابطه مستقیمی گزارش شده است [۲٤].

بطور کلی و بر اساس تحقیقات مختلفی که تاکنون صورت گرفته است، اسیدهای آلی (مانند اسید لاکتیک، اسید فرمیک، اسید استیک، اسید کاپروئیک، اسید فنیل لاکتیک)، کربن دی‌اکسید، پراکسید هیدروژن، دی استیل، اتانول، اسیدهای چرب هیدروکسیل، دی پپتیدهای حلقوی، ترکیبات پروتئینی، رئوترین و رئوتری‌سیلین، ازجمله مواد ضد میکروبی طبیعی هستند که به‌وسیله باکتری اسید لاکتیک‌ها تولید و باعث افزایش نگهداری و سلامت بخشی مواد غذایی می‌شوند [۲۷-۲۵]

فرآورده‌های لبنی و تخمیری و بخصوص انواع سنتی و بومی مناطق مختلف، از بهترین منابع شناخته شده برای جداسازی، شناسایی و بکارگیری باکتری‌های اسید لاکتیک هستند. کره مسکه یا کره ماست، یکی از انواع کره‌های تلمبی است که دارای طیف گسترده‌ای از باکتری‌های لاکتیکی می‌باشد [۳].

همچنین باکتری‌های اسید لاکتیک از اجزای اصلی ایجاد کننده عطر، آروما، بافت و خصوصیات منحصر بفرد این محصول هستند لذا شناسایی دقیق این باکتری‌ها امکان به کارگیری عوامل مفید موجود در آنها برای ارتقای کیفیت این محصول و سایر فراورده‌های لبنی و به استفاده از آن‌ها به عنوان عوامل ضد میکروبی طبیعی، کمک شایانی می‌کند. در این پژوهش جدایه‌های بدست آمده از کره سنتی مسکه شناسایی و اثر ضد باکتریایی آن-ها بعنوان عوامل ضد میکروبی طبیعی بر باکتری بیمارزای *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا انتریکا* مورد ارزیابی قرار گرفت. در این پژوهش مشخص شد که *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (B38) جدا شده از کره مسکه به شکل معنی‌داری از بالاترین میزان بازدارندگی در برابر باکتری گرم منفی *سالممونلا انتریکا* برخوردار بود. همچنین این جدایه به همراه ۲ جدایه لاکتوباسیلوس دلبروکی B37 و B224 *انتروکوکوس هیرا* (بدون تفاوت معنی‌دار) دارای بیشترین تأثیر بازدارندگی بر رشد استافیلوکوس اورئوس بودند. بنابراین می‌توان از جدایه‌های مذکور بعنوان ترکیبات ضد میکروبی طبیعی بجای ترکیبات سنتزی مورد استفاده در صنعت استفاده نمود.

٤- نتیجه گیری

در قسمت اول این پژوهش به شناسایی مولکولی جدایه‌های حاصل از کره سنتی مسکه پرداخته شد که نتایج توالی‌یابی محصولات PCR دارای پرایمر اختصاصی از DNA این باکتری‌ها منجر به شناسایی جنس‌های *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس*، *انتروکوکوس فاسیوم*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*، *لاکتوباسیلوس دلبروکی* و *انتروکوکوس هیرا* شد.

در قسمت دیگر این تحقیق، فعالیت ضد باکتریایی جدایه‌های شناسایی شده بعنوان نگهدارنده‌های طبیعی بر علیه پاتوژن‌های رایج مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج به دست آمده نشان داد که میزان بازدارندگی محیط مایع

مصرف شده بدون سلول کشت جدایه‌های مورد بررسی بر *استافیلوکوکوس اورئوس* از ۵۵/۴۶ تا ۸۴/۴۹ درصد متغیر بود و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*B38، *انتروکوکوس هیرا*B224، *لاکتوباسیلوس دلبروکی* B37 از بالاترین درصد بازدارندگی بر *استافیلوکوکوس اورئوس* برخوردار بودند و تفاوت معنی‌داری بین آن‌ها مشاهده نشد ($P>0.05$). همچنین *لاکتوباسیلوس* فرمنتوم B23 از کمترین قدرت بازدارندگی برخوردار بود.

نتایج بررسی اثر ضد میکروبی جدایه‌های لاکتیکی بر رشد باکتری گرم منفی *سالمونلا انتریکا* نشان داد که میزان بازدارندگی جدایه‌های مورد بررسی بر *سالمونلا انتریکا* از ۵/۵۵ تا ۴۶/۵۶ درصد متغیر بود. *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* B38 به طور معنی داری ($P<0.05$) از بالاترین درصد بازدارندگی بر علیه *سالمونلا انتریکا* برخوردار بود و *لاکتوباسیلوس دلبروکی* B37 از کمترین قدرت بازدارندگی را از خود نشان داد. علاوه بر این مقایسه میزان بازدارندگی جدایه‌های لاکتیکی بر روی باکتری‌های بیماری‌زا نشان داد که میزان بازدارندگی تمام جدایه‌های لاکتیکی مورد بررسی بر روی باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* به شکل معنی‌داری ($P<0.05$) بیشتر از تأثیر آن‌ها بر روی باکتری گرم منفی *سالمونلا انتریکا* بود.

بنابر این با توجه به افزایش تقاضای مصرف‌کنندگان برای جایگزین‌های طبیعی ضد میکروبی و از طرف دیگر گسترش فزاینده تولید محصولات صنعتی به‌جای محصولات سنّتی و امکان از دست رفتن بسیاری از باکتری‌های اسید لاکتیک خصوصاً جدایه‌های تولیدکننده متابولیت‌های ضد میکروبی طبیعی، می‌توان از جدایه‌های بکر و بومی کره مسکه جهت مهار میکروارگانیسم‌های عامل بیماری و فساد استفاده نمود.

۵- منابع

[1] Kusak, C., and Avsar, Y. K. 2010. Ayran: Microbiology and Technology. In: Development and manufacture of yogurt and other functional dairy products. Yildiz, F. Taylor & Francis Press, New York. Pp123-154.

[2] Idoul, T., and Karam, N. 2008. Lactic acid bacteria from Jijel's traditional butter: Isolation, identification and major technological traits. Grasas Y Aceites, 59 (4): 361-367.

[3] Ghiamati Yazdi, f. 2012 .Diversity of Lactic acid bacteria population in Masske traditional butter of south of Khorasan, Iran. Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources. Master's Thesis.

[4] Sotoudeh, M Momeni, kh. 2006. The Great Islamic Encyclopedia. Tehran, Iran.

[5] Holzapfel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., and Schillinger, U. 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. The American journal of clinical nutrition, 73(2): 365s-373s.

[6] Nanda, D. K., Tomar, S. K., Singh, R., Mal, G., Singh, P., Arora, D. K., ... and Kumar, D. 2011. Phenotypic and genotypic characterisation of Lactobacilli isolated from camel cheese produced in India. International journal of dairy technology, 64(3): 437-443.

[7] Rossetti, L., and Giraffa, G. 2005. Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13-generated, RAPD-PCR fingerprint databases. Journal of microbiological methods, 63(2): 135-144.

[8] Singh, S., and Singh, R. 2014. Phenotypic and genotypic characterization of non-starter Lactobacillus species diversity in Indian Cheddar cheese. LWT-Food Science and Technology, 55(2): 415-420.

[9] Tropcheva, R., Nikolova, D., Evstatieva, Y., and Danova, S. 2014. Antifungal activity and identification of Lactobacilli, isolated from traditional dairy product "katak". Anaerobe, 28: 78-84.

[10] Leite, A. M. O., Miguel, M. A. L., Peixoto, R. S., Ruas-Madiedo, P., Paschoalin, V. M. F., Mayo, B. and Delgado, S. 2015. Probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains isolated from Brazilian kefir grains. Journal of Dairy Science, 6: 3622-3632.

[11] Méndez-Vilas, A. Ed. 2013. Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education. Formatex Research Center. Badajoz, Spain.

[12] Tafvizi, F., Tajabadi Ebrahimi, M., Khojare, L. 2011. Genotypic and phylogenic analysis of lactobacilli producing bacteriocin isolated from traditional dairy products and food. Journal of Fasa University of Medical

Sciences, 2 (2): 90-84. [In persian]
[13] Nariman, T., and Tarinejad, A. 2014. Isolation, biochemical and molecular identification of probiotic bacteria from traditional buffalo milk and yogurt of Khoi city. Journal of Food Industry Researches, 24 (3): 349-335.[In persian].
[14] Aussel, X. 2002. etudes des bacteries lactiques isolées du shubat et du koumis. Memoire de BTSA Industrie agro-alimentaire,CIRAD, Montpellier, France, 51p.
[15] Schnürer, J., and Magnusson, J. 2005. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. Trends in Food Science & Technology, 16: 70-78.
[16] Li, H., Liu, L., Zhang, S., Uluko, H., Cui, W. and Lv, J. 2013. Potential use of *Lactobacillus casei* AST18 as a bioprotective culture in yogurt. Food Control, 34(2): 675-680.
[17] Ljungh, A. and Wadstrom, T. 2006. Lactic acid bacteria as probiotics. Current issues in intestinal microbiology, 7(2): 73-90.
[18] Leroy F, De Vuyst L. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. Trends Food Sci Tech, 15(2): 67–78.
[19] Poutanen, K., Flander, L., Katina, K. 2009. Sourdough and cereal fermentation in a nutritional perspective. Food Microbiol, 26(7): 693–699.
[20] Fernandez M, Boris S, Barbes C. 2003. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. Journal of Applied Microbiology, 94(3): 449-455.
[21] Kiaie, A., Mozaffari, N. A., Sami al-Adab, H., Jandagi, N., and Ghaemi, A. 2006. Antagonistic effect of lactic bacteria isolated from yogurt against pathogenic bacteria.[In persian]
[22] Cizeikiene, D., Juodeikiene, G., Paskevicius, A., and 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.
[23] Mirhosseini, M. 2011. Identification of bacteriocin producing Enterococcus in dairy products by PCR. Iranian Journal of Biology, 25 (3): 357-351. [In persian]
[24] Schillinger, U., Guigas, C., and Holzapfel, W.H. 2005. In vitro adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products. International Dairy Journal, 15: 1289-1297.
[25] Cortés-Zavaleta, O., López-Malo, A., Hernández-Mendoza, A., and García H. 2014. Antifungal activity of lactobacilli and its relationship with 3-phenyllactic acid production. International journal of food microbiology, 173: 5-30.
[26] Gilliland, S.E.1990. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. FEMS Microbiology reviews, 7(1-2): 175-188.
[27] Li, H., Zhang, S., Lu, J., Liu, L., Uluko, H., Pang, X. 2014. Antifungal activities and effect of Lactobacillus casei AST18 on the mycelia morphology and ultrastructure of Penicillium chrysogenum. Food Control, 43: 57-64.

Genetic identification and evaluation of antibacterial activity of lactic isolates derived from Masske butter against pathogenic bacteria *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica*

Nasrollahzadeh, A. [1], Khomeiri, M. [2*], Sadeghi, A. [2], Mahmoudi, M. [4], Ebrahimi, M. [3]

1. MSc, Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
2. Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran.
3. PhD, Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

(Received: 2019/02/06 Accepted:2019/08/11)

Masske is a traditional butter that is derived from yogurt and used in southern Khorasan, Iran. It is a good source of lactic acid bacteria (LAB). The aim of this study was to investigate the antibacterial effect of the LAB isolates against of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica*. In the first step LAB isolates were identified by PCR method, and then microdilution method was used to evaluate the antimicrobial activity of the isolates. BLASTing of sequences of 16S rDNA gene with sequences in the NCBI database identified the species include *Lactobacillus bulgaricus*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus delbrueckii* and *Enterococcus hirae*. The results of antimicrobial activity evaluation against *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* showed that all isolates were able to inhibit the growth of these two pathogens, and their inhibitory percent were 55/46 to 84/49 and 55/46 to 56/55, respectively. Also, the results showed that *Lactobacillus plantarum* B38, *Enterococcus hierae* B224, *Lactobacillus delbrueckii* B37 had the highest inhibitory effect against *Staphylococcus aureus* ($P>0.05$). *Lactobacillus plantarum* B38 had the highest inhibition percentage against *Salmonella enterica* ($P<0.05$). In addition, it was found that the inhibitory effect of all isolates against *Staphylococcus aureus* was significantly higher than *Salmonella enterica* ($P< 0.05$). Therefore, lactic acid bacteria isolated from the Masske butter may be used to control the food borne pathogens and food spoilage microorganisms.

Keywords: Masske butter, Lactic acid bacteria, PCR, Antibacterial, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*

[*] Corresponding Author E-Mail Address: khomeiri@gau.ac.ir