جداسازی و شناسایی مولکولی انتروکوکوس فاسیوم سویه C2 تولیدکننده باکتریوسین با طیف فعالیت ضدباکتریایی وسیع از لبنیات محلی زرند

محمد خدایی [1]، شهلا سلطانی نژاد [2]*

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران.
۲. گروه میکروبیولوژی، واحد جیرفت، دانشگاه آزاد اسلامی، جیرفت، ایران

تاریخ دریافت: ۹۵/۰۴/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۲/۳۰

چکیده

یکی از محدودیت‌های استفاده از باکتریوسین‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک مربوط به طیف ضعیف فعالیت ضدباکتریایی آنهاست. هدف از این پژوهش، جداسازی و شناسایی مولکولی انتروکوکسی‌های تولیدکننده باکتریوسین با طیف وسیع فعالیت ضدباکتریایی می‌باشد. در این پژوهش باکتری‌های تولیدکننده باکتریوسین از لبنیات بومی شهرستان زرند کرمان جداسازی گردیدند. باکتریوسین‌های تولیدی با استفاده از سولفات آمونیوم خالص شدند. اثر باکتریوسین‌های تولیدی بر سویه‌های اندیکاتور گرم منفی و گرم مثبت مختلف بررسی گشت. در ابتدا ۱۵ جدایه تولیدکننده باکتریوسین جداسازی شدند. جدایه‌ای که باکتریوسین آن بیشترین فعالیت ضدباکتریایی را داشت، غربال و از نظر مولکولی شناسایی شد. باکتریوسین *انتروکوکوس فاسیوم* سویه‌ی C2 (جدا شده از پنیر محلی) بیشترین فعالیت ضدباکتریایی را داشت. بیشترین تأثیر ضدباکتریایی علیه *لیستریا مونوسیتوژنز* و *سودوموناس آئروژینوزا* مشاهده شد. باکتریوسین تولیدی رشد این دو سویه را نیز کاهش داد. با توجه به این‌که باکتریوسین تولیدی دارای طیف مهاری وسیع علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی، به‌ویژه باکتری‌های بیماری‌زا بوده، استفاده از آن به‌عنوان جایگزینی برای آنتی‌بیوتیک‌های شیمیایی توصیه می‌شود.

واژه های کلیدی: باکتریوسین، محصولات لبنی، *انتروکوکوس فاسیوم*، فعالیت ضدباکتریایی

*مسوول مکاتبات:: Soltanibiotech@gmail.com

۱- مقدمه

مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها یکی از چالش‌های بزرگی است که سلامت جامعه امروزی را تهدید می‌کند و علت آن استفاده‌ی بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان عفونت‌هاست. باکتریوسین‌ها از جمله ترکیباتی هستند که از گذشته در صنایع غذایی به‌عنوان نگه‌دارنده استفاده می‌شوند و امروزه کاربرد آنها به‌عنوان جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها مطرح است (۵،۸،۹). این مواد دارای ساختار پروتئینی با خاصیت ضدمیکروبی هستند که باعث جلوگیری از رشد سویه‌های حساس می‌شوند. این ترکیبات دوگانه‌دوست با وزن، ساختار مولکولی و مکانیسم عمل متغیر می‌باشند که در برابر تغییرات حرارت مقاوم هستند و در برابر تغییرات pH مقاومت متغیری بسته به نوع باکتریوسین از خود نشان می‌دهند. این مواد ممکن است هم توسط باکتری‌های گرم مثبت و هم گرم منفی تولید شوند. دسته‌ی بزرگی از باکتری‌های تولیدکننده‌ی باکتریوسین، باکتری‌های اسیدلاکتیک می‌باشند که عمدتاً در لبنیات وجود دارند. این باکتری‌ها، به‌دلیل توانایی بالای آنها در تولید باکتریوسین اهمیت زیادی دارند (۷، ۱۰،۱۱، ۱۲، ۱۶،۲۲،۳۲). بیشتر باکتریوسین‌ها فقط علیه باکتری‌های گرم مثبت دارای اثر ضدباکتریایی می‌باشند و این یکی از محدودیت‌های استفاده از آنها در صنایع غذایی به‌عنوان نگه‌دارنده و در صنایع دارویی به‌عنوان جایگزین آنتی‌بیوتیک‌های شیمیایی است. به‌عنوان مثال نایسین که توسط FAO، WHOدر سال ۱۹۶۹ به‌عنوان عامل ضدمیکروبی مجاز در صنایع غذایی شناخته شده است و در بیش از ۵۰ کشور دنیا استفاده می‌شود، فقط علیه طیف وسیعی از باکتری‌های گرم مثبت اثر ضدباکتریایی دارد و به‌تنهایی علیه باکتری‌های گرم منفی بی‌تأثیر است. همچنین پدیوسین PA-1 یکی از باکتریوسین‌های پرکاربرد است که فقط علیه باکتری‌های گرم مثبت دارای اثر ضدباکتریایی است (۱،۲، ۱۳،۲۶، ۲۷). در این پژوهش باکتری‌های تولیدکننده باکتریوسین از فراورده‌های لبنی محلی شهرستان زرند جداسازی و غربال‌گری شدند. سویه‌ای که باکتریوسین خالص شده‌ی آن علیه سویه‌های اندیکاتور دارای طیف فعالیت ضدباکتریایی گسترده ای بود و هم علیه باکتری‌های گرم مثبت و هم گرم منفی اثر ضدباکتریایی داشت، به روش مولکولی شناسایی گردید.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- نمونه‌برداری و جداسازی باکتری‌ها

در این پژوهش جهت نمونه‌برداری، از فراورده‌های لبنی بومی شهرستان زرند واقع در۷۵ کیلومتری شهر کرمان استفاده گردید. نمونه‌های شیر، ماست و پنیر سنتی جمع‌آوری شده و در فالکن‌های استریل و روی یخ به آزمایشگاه منتقل و تا زمان بررسی در یخچال نگه‌داری شدند. جهت جداسازی باکتری‌ها، ۱۰گرم از نمونه‌های پنیر و ماست و ۱۰ میلی‌لیتر از شیر برداشته شده، هر کدام به‌صورت جداگانه به ۹۰ میلی‌لیتر PPS (محلول پپتون فیزیولوژیکی استریل: ۸/۵ گرم بر لیتر کلرید سدیم و ۱ گرم بر لیتر پپتون باکتریولوژیکی) منتقل گردیده و به صورت همگن درآمد. سپس رقت‌های 10^{-1}-10^{-6} از هرکدام فراهم شده، جهت جداسازی باکتری‌های پروبیوتیک بر روی محیط اختصاصی MRS آگار (Biolife، ساخت کشور ایتالیا) کشت داده شد. پس از گرم‌خانه‌گذاری در شرایط کم‌هوازی در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت، از کلونی‌های رشد کرده بر روی محیط کشت، کشت مجدد به‌عمل آمده تا این‌که کشت‌های خالصی بدست آید(۱۷). سویه‌های جداسازی شده بر اساس رنگ‌آمیزی گرم، مورفولوژی سلولی، حرکت، تست‌های کاتالاز، اکسیداز و همولیز انتخاب شدند (۱۹).

۲-۲- جداسازی سوپرناتانت

برای جداسازی سوپرناتانت عاری از سلول[1] (CFS) کشت ۲۴ ساعته‌ی سویه‌های خالص‌سازی شده در محیط

[1] Cell Free Supernatant

MRS broth، فراهم شده و در ۶۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. مایع رویی با فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر فیلتر شد. از این مایع که به صورت شیرابه اسیدی می‌باشد و شامل متابولیت‌های مختلف باکتری از جمله باکتریوسین است، جهت خالص‌سازی باکتریوسین استفاده گشت (۳۰،۲۹،۲۶،۲۵).

۲-۳- خالص‌سازی باکتریوسین

جهت کاهش فعالیت مهاری اسیدهای آلی تولید شده، pH سوپرناتانت به کمک سود ۴N، خنثی و در محدوده ۶ تا ۷ تنظیم گردید. برای خنثی‌شدن اثر آب اکسیژنه از آنزیم کاتالاز به غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استفاده شد. سپس به سوپرناتانت به اندازه‌ای سولفات آمونیوم اضافه گشت که محلول ۶۰ درصد سولفات آمونیوم ایجاد شود. محلول حاصله به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با همزن به‌آرامی تکان داده شد. نمونه به مدت یک ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با دورrpm ۲۰۰۰۰ سانتریفیوژ گردیده، رسوب جمع‌آوری شد. رسوب‌های حاصله در بافر فسفات ۰/۰۶ مولار با pH= ۷ حل گردید. حجم مساوی از محلول کلروفرم و متانول به نسبت۱:۲ به آن اضافه گردید و به مدت یک ساعت در ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. سانتریفیوژ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و دور ۲۰۰۰۰rpm انجام گرفته و رسوب سفید حاصله استخراج گردید و در آب دو بار تقطیر استریل حل شد (۲۸،۳).

۲-۴- بررسی اثر ضدباکتریایی باکتریوسین

به‌منظور بررسی اثر ضدباکتریایی باکتریوسین‌های استخراج شده، از روش انتشار در آگار به کمک دیسک استفاده گردید. باکتری‌های گرم منفی Salmonella enterica PTCC1709، Escherichia coli PTCC 1270، Pseudomonas aeruginosa CZO و گرم مثبت Listeria monocytogenes ATCC 7644، Staphylococcus aureus PTCC 1431 و Bacillus cereus PTCC 1015 به‌عنوان سویه‌های اندیکاتور مورد استفاده قرار گرفتند. به این منظور از سوسپانسیون ۲۴ ساعته سویه‌های اندیکاتور به‌وسیله سواب، کشت چمنی روی محیط مولر هینتون آگار داده، سپس دیسک‌های کاغذی استریل (پادتن طب، ایران) روی سطح محیط‌های کشت با فواصل منظم قرار داده شد. در ادامه دیسک‌ها به حجم‌های ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میکرولیتر از باکتریوسین خالص شده آغشته شده، پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شرایط هوازی قرار گرفت. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، پیدایش یا عدم پیدایش هاله‌های عدم رشد بررسی گردید. این آزمایش سه مرتبه تکرار و میانگین قطر هاله‌های عدم رشد در نظر گرفته شد (۲۲، ۲۳، ۲۶، ۲۷).

۲-۵- سنجش تیتر یا عیار باکتریوسین

سنجش تیتر باکتریوسین تولیدی توسط ایزوله انتخاب شده، با استفاده از روش کریتیکال صورت گرفت .در این روش ۱۲ میکروتیوب استریل از رقت‌های $۱۰^{-۱}$ تا $۱۰^{-۱۲}$ محلول‌های سوپرناتانت خنثی شده، تهیه گردید. در مرحله بعد به‌وسیله‌ی پیپت پاستور استریل در هر پلیت ۴چاهک با فواصل منظم روی محیط کشت مولر هینتون آگار ایجاد شد. سپس با سواپ استریل کشت چمنی از سویه‌های اندیکاتور روی محیط کشت مولر هینتون اگار داده شد. از هر یک از رقت‌ها به‌ترتیب رقت، ۸۰ میکرولیتر از سوپرناتانت‌های جدا شده ریخته شد. پلیت‌ها به مدت ۱۸ ساعت در انکوباتور ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. در ادامه پیدایش و عدم پیدایش هاله رشد بررسی گردید (۲۴). تیتر باکتریوسین به صورت واحدهای فعال در هر میلی‌لیتر بیان می‌گردد و از معادله‌ی شماره (۱) به‌دست می‌آید:

معادله شماره ۱: $AU/ml=2^n (1000/80)$

در این رابطه n شماره آخرین چاهکی است که در آن هاله‌ی عدم رشد تشکیل شده است. به‌عبارتی شماره آخرین چاهکی که سویه‌ی اندیکاتور در آن هیچ رشدی نداشته است (۲۴،۲۸).

۲-۶- تأثیر باکتریوسین بر رشد سویه‌های اندیکاتور

تأثیر سوپرناتانت حاوی باکتریوسین تولید شده توسط سویه‌ی انتخاب شده، علیه دو سویه‌ی اندیکاتور *لیستریا مونوسیتوژنز* و *سودوموناس ائروژینوزا*، بررسی گردید. بدین منظور سوپرناتانت حاوی باکتریوسین از سویه‌ی تولیدکننده باکتریوسین جداسازی گردید. سویه‌های اندیکاتور در ارلن‌های حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط مولر هینتون براث کشت داده شده (هر سویه در دو ارلن) و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردیدند. سه ساعت بعد از کشت به یکی از ارلن‌ها ۱۰ میلی‌لیتر از سوپرناتانت حاوی باکتریوسین اضافه گردید. هر دو ساعت جذب نوری توسط دستگاه اسپکتروفوتومتری در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده شد و با کشت بدون سوپرناتانت مقایسه گردید. در نهایت نمودار رشد، بر حسب زمان (۲۴ ساعت) و OD رسم گردید (۳،۳۰).

۲-۷- شناسایی مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی

برای شناسایی اولیه سویه‌ای که باکتریوسین آن بیشترین فعالیت ضدباکتریایی را دارد، از تست‌های اولیه شامل رنگ‌آمیزی گرم، شکل میکروسکوپی، شکل و رنگ کلونی، حرکت، تست اکسیداز، کاتالاز و همولیز استفاده شد. جهت شناسایی مولکولی، DNA ژنومی به کمک کیت استخراج DNA، Accu Prep (Bioneer، ساخت کشور کره جنوبی، Cat. No: K-3032) استخراج گردید. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل: ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر DNA الگو، ۰/۴ میکرومولار از هر پرایمر، ۰/۲ میکرومولار dNTP، ۲ میکرومولار $MgCl_2$، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR و ۱ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase انجام گردید. در ادامه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (اپندرف، ساخت المان) با شرایط جدول۱ انجام گرفت، محصول PCR به ژل آگارز ۱ درصد واجد اتیدیوم برماید منتقل و به مدت ۱ ساعت در ولتاژ ۸۰ ولت الکتروفورز گردید. جهت تکثیر ژن 16S rRNA از جفت پرایمر ۲۷F -5' (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') و ۱۴۹۲R (5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3') استفاده شد. توالی ژن 16S rRNA توسط شرکت Bioneer کره جنوبی تعیین شد. این توالی توسط نرم‌افزارهای مختلف از جمله BioEdit، Finch TV، Gene Runner مورد بررسی و آنالیز قرار گرفت. نتایج حاصل از BLAST توالی مورد نظر در سایت‌های NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) و EBI (http://www.ebi.ac.uk) بررسی شده و توسط نرم‌افزارهای CLC و MEGA5 آنالیز شد. درخت فیلوژنتیکی به روش Neighbor joining رسم گردید. در نهایت توالی ژن توسط نرم‌افزار Sequin در بانک جهانی ژن ثبت شد.

جدول ۱: برنامهٔ PCR استفاده شده جهت تکثیر ژن 16S rRNA

مرحله	دما (°C)	زمان (ثانیه)	تعداد سیکل
Initial Denaturation	۹۴	۳۰۰	۱
Denaturation	۹۴	۶۰	۳۵
Annealing	۴۵	۳۰	
Extension	۷۲	۹۰	
Final extension	۷۲	۳۰۰	۱
Hold	۴		

۲-۸-آنالیز آماری

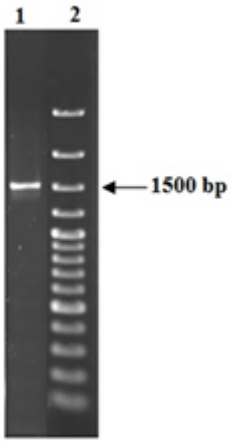
برای محاسبات آماری از نرم‌افزار SPSS و برای مقایسه میانگین نمونه‌ها از آزمون Tukey استفاده گردید. به‌منظور تعیین نمونه‌هایی که دارای اختلاف میانگین معنی‌داری می‌باشند، آنالیز واریانس یک طرفه با تکرار مساوی به‌کار گرفته شد.

۳- نتایج و بحث

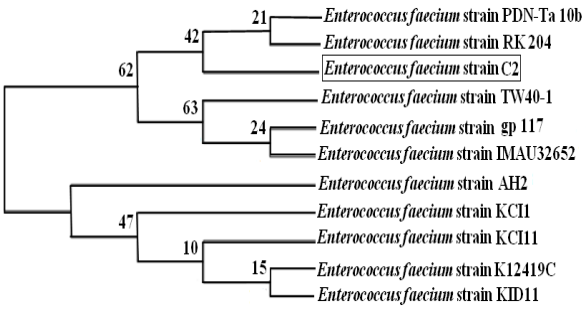
۳-۱- جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی سویه‌ی تولیدکننده باکتریوسین

از ۱۵ نمونه‌ی جمع‌آوری شده از محصولات لبنی بومی زرند، سویه‌های مختلفی جداسازی گردید. باکتریوسین خالص شده سویه‌ای که از پنیر محلی جداسازی شد (C2) علیه همه‌ی سویه‌های اندیکاتور(جدول۱) دارای فعالیت ضدباکتریایی بود. این سویه از طریق آنالیز تشابه توالی ژن ۱۶S rRNA شناسایی شد. جهت تکثیر ژن از جفت پرایمر ذکر شده استفاده گردید. این پرایمرها کل ترادف ژنی ۱۶S rRNA را با 1500 bp تکثیر نمودند (شکل۱). بوسیله‌ی آنالیز توالی ژن ۱۶S rRNA مشخص شد سویه‌ی جدا شده متعلق به *انتروکوکوس فاسیوم* می‌باشد. ارتباط فیلوژنتیکی این سویه با سویه‌های دیگر در شکل۲ نشان داده شده است. سویه‌ی C2، گرم مثبت، رنگ کلونی‌ها سفید، از نظر شکل به‌صورت اجتماعی از کوکسی‌ها، بدون حرکت، کاتالاز و اکسیداز منفی و از نظر همولیز دارای همولیز آلفا می‌باشد. این باکتری‌ها در محیط‌های مختلف دیده می‌شوند، ولی عمدتاً در سیستم گوارش انسان و حیوانات وجود دارند (۱۸). توزیع وسیع انتروکوکسی‌ها در طبیعت در مقایسه با سایر باکتری‌های اسیدلاکتیک به‌علت ماندگاری و مقاوت آنها به فاکتورهای بازدارنده رشد مثل حرارت، خشکی، اسیدیته، نمک و مواد شیمیایی می‌باشد. بعضی از گونه‌های انتروکوکسی‌ها از عوامل بیماری‌زای بیمارستانی محسوب می‌شوند و ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی را نیز دارا می‌باشند (۱۴). اما با این وجود تاکنون گزارشی از خطرناک بودن باکتریوسین‌های تولیدی انتروکوکسی‌ها که در مواد غذایی مختلف مورد استفاده هستند، نشده است و این ترکیبات به‌عنوان ترکیبات بی‌ضرر شناخته می‌شوند (۱۶،۱۸). باکتریوسین‌های تولیدی توسط انتروکوکسی‌ها که به‌طور کلی تحت عنوان انتروسین نامیده می‌شوند، در مطالعات گوناگونی مورد بررسی قرار گرفته و اثر ضدباکتریایی

آنها ثابت شده است. از جمله باکتریوسینی تحت عنوان انتروسین AS-48 که در مواد غذایی مختلف مانند غذاهای کنسروی، آب میوه‌ها، انواع محصولات لبنی و سوسیس‌ها به‌عنوان نگه‌دارنده زیستی استفاده می‌گردد (۴). بیشتر سویه‌های *انتروکوکوس* تولیدکننده باکتریوسین متعلق به گونه‌های *انتروکوکوس فاسیوم و انتروکوکوس فکالیس* می‌باشند (۲۰).



شکل۱: الکتروفورز ژل آگارز محصول PCR ژن 16S rRNA ، ۱- سویه‌ی C2، ۲- مارکر DNA (Gene Ruler 100bp DNA ladder plus, Fermentas)



شکل۲: درخت فیلوژنی رسم شده بر اساس توالی ژن 16S rRNA که وابستگی سویهٔ C2 که از پنیر زرند جدا شده را با سویه‌های دیگر نشان می‌دهد.

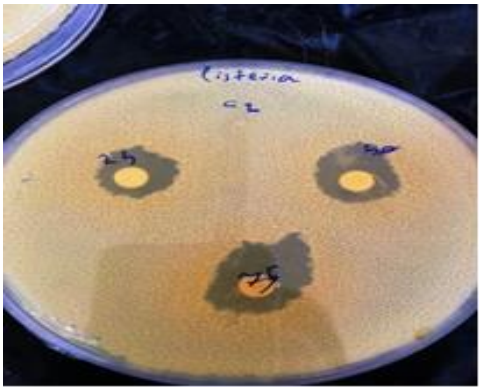
۳-۲- فعالیت ضد باکتریایی باکتریوسین

باکتریوسین خالص شده‌ی سویه‌ی C2 علیه همه‌ی سویه‌های اندیکاتور دارای اثر ضدباکتریایی بود و هاله‌های عدم رشد تشکیل گردید (جدول۲). نتایج نشان می‌دهد که در سطح اطمینان ٪۵، بین اثر ضدمیکروبی باکتریوسین در حجم‌های ۲۵ و ۵۰ میکرولیتر، بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی اختلاف معنی‌دار می‌باشد. در حجم ۷۵ میکرولیتر در سطح اطمینان ٪۵ بین اثر ضدمیکروبی باکتریوسین بر روی *لیستریا منوسیتوژنز* و *باسیلوس سرئوس* اختلاف معنی‌داری وجود ندارد، ولی بین باکتری‌های دیگر اختلاف معنی‌دار می‌باشد. بطور کلی بیشترین فعالیت ضدباکتریایی در بین سویه‌های اندیکاتور گرم مثبت علیه لیستریا مونوسیتوژنز (شکل۳) و در بین سویه‌های اندیکاتور گرم منفی علیه سودوموناس ائروژینوزا مشاهده شد (شکل۴). باکتریوسین‌های تولیدی توسط انتروکوکسی‌ها عمدتاً بر علیه باکتری‌های گرم مثبت که عامل فساد غذایی هستند، مانند لیستریا مونوسیتوژنز، باسیلوس سرئوس و استافیلوکوکوس اورئوس تأثیر ضدباکتریایی دارند (۲۱،۱۶،۹،۶). این باکتریوسین‌ها به‌ندرت بر باکتری‌های گرم منفی تأثیر دارند (۳۱،۱۵،۳)، در حالی‌که سویه‌ی جدا شده در این پژوهش باکتریوسین‌هایی تولید کرد که علاوه بر باکتری‌های گرم مثبت علیه باکتری‌های گرم منفی سودوموناس ائروژینوزا، سالمونلا انتریکا و اشریشیا کولای فعالیت ضدباکتریایی داشت و بیشترین تأثیر بین باکتری‌های گرم منفی علیه سودوموناس ائروژینوزا مشاهده شد.

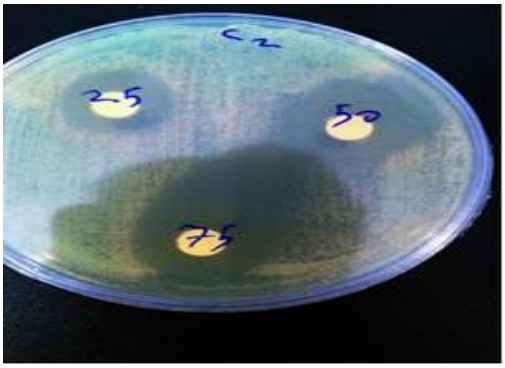
جدول۲: نتایج فعالیت ضدباکتریایی حجم‌های مختلف باکتریوسین سویه‌ی C2 علیه باکتری‌های اندیکاتور (اعداد داخل جدول نشان‌دهندهٔ قطر هاله‌ی عدم رشد بر حسب میلی‌متر می‌باشد)

حجم (µl) / باکتری	۷۵**	۵۰**	۲۵**
لیستریا مونوسیتوژنز	۲۷ ±۰/۲۸۸	۲۱ ±۰/۵۷۷	۱۷ ±۰/۷۶۳
باسیلوس سرئوس	۲۷ ±۰/۵	۲۰ ±۰/۲۸۸	۱۶ ±۰/۵۷۷
استافیلوکوکوس اورئوس	۲۱ ±۰	۱۸ ±۰/۵۷۷	۱۵ ±۰/۷۶۳
سودوموناس ائروژینوزا	۲۹ ±۰/۵۷۷	۲۴ ±۰/۲۸۸	۱۹ ±۰
سالمونلا انتریکا	۱۸ ±۰/۵	۱۴ ±۰/۷۶۳	۱۱ ±۰/۵۷۷
اشریشیا کولای	۱۴ ±۰/۷۶۳	۱۲ ±۰/۵۷۷	۸ ±۰/۷۶۳
t	۹/۳	۹/۹	۸/۶

±: حدود اطمینان میانگین‌ها **: معنی‌دار بودن اختلاف**



شکل۳: اثر ممانعت‌کنندگی حجم‌های مختلف باکتریوسین سویه C2 بر روی لیستریا مونوسیتوژنز



شکل۴: اثر ممانعت‌کنندگی حجم‌های مختلف باکتریوسین سویه‌ی C2 بر روی سودوموناس ائروژینوزا

۳-۳- نتایج تیتر سوپرناتانت

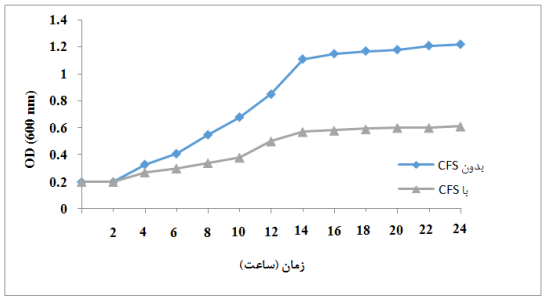
سوپرناتانت حاوی باکتریوسین سویه‌ی C2 علیه همه‌ی سویه‌های اندیکاتور دارای فعالیت ضدباکتریایی بود. بیشترین تیتر علیه لیستریا مونوسیتوژنز و سودوموناس ائروژینوزا و کمترین تیتر نسبت به اشریشیا کولای گزارش گردید (جدول۳). صالحی و حاتمی از انتروکوکوس فاسیوم مسیر گوارشی باکتریوسینی خالص کردند که تیتر آن علیه لیستریا مونوسیتوژنز ۱۰۲۴۰AU/ml و علیه سودوموناس ائروژینوزا ۱۲۸۰AU/ml بود. در حالی‌که باکتریوسین خالص شده علیه اشریشیا کولای و استافیلوکوکوس اورئوس دارای تیتر نبود (۲۴). میزان تیتر باکتریوسین‌های این تحقیق علیه لیستریا مونوسیتوژنز کمتر از تحقیق صالحی و حاتمی می‌باشد، ولی برعلیه طیف گسترده‌تری از سویه‌ها فعال بوده، ضمن این‌که علیه اشریشیا کولای و استافیلوکوکوس اورئوس نیز دارای فعالیت می‌باشد.

جدول۳: نتایج تیتر سوپرناتانت حاوی باکتریوسین سویه‌ی C2 علیه سویه‌های اندیکاتور(AU/ml)

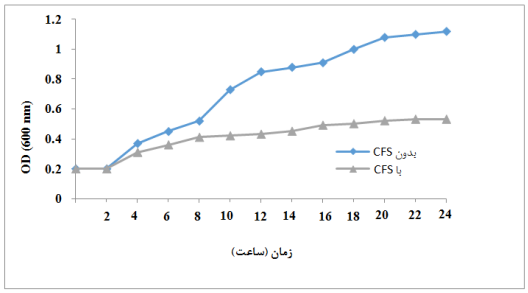
سویه‌های اندیکاتور	تیتر سوپرناتانت C2
لیستریا مونوسیتوژنز	۱۲۸۰
باسیلوس سرئوس	۶۴۰
استافیلوکوکوس اورئوس	۳۲۰
سودوموناس ائروژینوزا	۱۲۸۰
سالمونلا انتریکا	۸۰
اشریشیا کولای	۴۰

۳-۴- تأثیر باکتریوسین بر رشد سویه‌ها

رشد *سودوموناس آئروژینوزا* و *لیستریا مونوسیتوژنز* در ۲۴ ساعت با اضافه کردن سوپرناتانت عاری از سلول(CFS) سویه‌ی C2 نسبت به حالت عدم اضافه کردن CFS به‌طور چشمگیری کاهش یافت (شکل ۵ و۶). اضافه کردن CFS *انتروکوکوس فاسیوم* AQ71 به محیط رشد *لیستریا مونوسیتوژنز* در طول ۲۴ ساعت رشد این باکتری را کاهش داده است (۳).



شکل۵: منحنی رشد *سودوموناس آئروژینوزا* با اضافه کردن CFS سویه‌ی C2 و بدون اضافه کردن CFS



شکل۶: منحنی رشد *لیستریا مونوسیتوژنز* با اضافه کردن CFS سویه‌ی C2 و بدون اضافه کردن CFS

۴- نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد باکتریوسین تولیدی *انتروکوکوس فاسیوم* جدا شده از پنیر محلی زرند علاوه بر باکتری‌های گرم مثبت علیه باکتری‌های گرم منفی نیز دارای فعالیت ضدباکتریایی بوده و رشد سویه‌های پاتوژن را نیز کاهش می‌دهد. بنابراین خالص‌سازی و استفاده از آن به‌عنوان جایگزین آنتی‌بیوتیک‌های شیمیایی در درمان عفونت‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک و همچنین به‌عنوان نگه دارنده زیستی در مهار پاتوژن‌های غذازاد می‌تواند مفید باشد.

۵- تشکر و قدردانی

از گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان بویژه کارشناسان محترم آزمایشگاه‌های میکروبیولوژی تشکر و قدردانی می‌شود.

۶- منابع

1. Abee, T., Krockel, L. and Hill, C. 1995. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. International Journal of Food Microbiology, 28(2):169-85.
2. Acuña, L., Picariello, G., Sesma, F., Morero, R. D. and Bellomio, A. 2012. A new hybrid bacteriocin, Ent35–MccV, displays antimicrobial activity against pathogenic Gram-positive and

3. Gram-negative bacteria. FEBS Open Biology, 2: 12-9.
4. Ahmadova, A., Todorov, S. D., Choiset, Y., Rabesona, H., Zadi, T. M., Kuliyev, A. et al. 2013. Evaluation of antimicrobial activity probiotic properties and safety of wild strain Enterococcus faecium AQ71 isolated from Azerbaijani Motal cheese. Food Control, 30(2):631-641.
5. Aran, H. K., Biscola, V., El-Ghaish, S., Jaffrès, E., Dousset, X., Pillot, G., et al. 2015. Bacteriocin-producing Enterococcus faecalis KT2W2G isolated from mangrove forests in southern Thailand: purification characterization and safety evaluation. Food Control, 54:126-134.
6. Aunpad, R. and Na-Bangchang, K. 2007. Pumilicin: a novel bacteriocin with anti-MRSA and anti-VRE activity produced by newly isolated bacteria Bacillus pumilus strain WAPB4. Current Microbiology, 55(4): 308-313.
7. Barbosa, J., Borges, S. and Teixeira, P. 2014. Selection of potential probiotic Enterococcus faecium isolated from Portuguese fermented food. International Journal of Food Microbiology, 191:144-8.
8. Bowdish, D. M., Davidson, D. J. and Hancock, R. 2005. A re-evaluation of the role of host defence peptides in mammalian immunity. Current Protein and Peptide Science, 6(1): 35-51.
9. Calo-Mata, P., Arlindo, S., Boehme, K., Miguel, T., Pascoal, A. and Barros-Velazquez J. 2008. Current applications and future trends of lactic acid bacteria and their bacteriocins for the biopreservation of aquatic food products. Food Bioprocess Technology, 1(1): 43-63.
10. Chen, Y. S., Yanagida, F. and Srionnual, S. 2007. Characteristics of bacteriocin-like inhibitory substances from dochi-isolated Enterococcus faecium D081821 and D081833. Letters in Applied Microbiology, 44(3):320-325.
11. Cintas, L. M., Casaus, M. P., Herranz, C., Nes, I. F. and Hernández, P. E. 2001. Review: bacteriocins of lactic acid bacteria. Food Science and Technology International, 7(4):281-305.
12. Cotter, P. D., Hill, C. and Ross, R. P. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. Nature Reviews Microbiology, 3(10): 777-788.
13. Daeschel, M. A. 1989. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. Food Technology, 43:164-167.
14. de Arauz, L. J., Jozala, A. F., Mazzola, P. G. and Penna, T. C. 2009. Nisin biotechnological production and application: a review. Trends in Food Science & Technology, 20(3):146-54.
15. Franz, C. M., Huch, M., Abriouel, H., Holzapfel, W. and Gálvez, A. 2011. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. International Journal of Food Microbiology, 151(2):125-40.
16. Hammami, I., Rhouma, A., Jaouadi, B., Rebai, A. and Nesme, X. 2009. Optimization and biochemical characterization of a bacteriocin from a newly isolated Bacillus subtilis strain 14B for biocontrol of Agrobacterium spp. strains. Letters in Applied Microbiology, 48(2):253-60.
17. Javed, A., Masud, T., ul Ain, Q., Imran, M. and Maqsood, S. 2011. Enterocins of Enterococcus faecium, emerging natural food preservatives. Annals of Microbiology, 61(4):699-708.
18. Kasra Kermanshahi, R. and Peymanfar, Sh. 2012. Isolation and identification of Lactobacilli from cheese, yoghurt and silage by 16S rDNA gene and study of bacteriocin and biosurfactant production. Jundishapur Journal of Microbiology, 5(4): 528- 532.
19. Khan, H., Flint, S. and Yu, P. L. 2010. Enterocins in food preservation. International Journal of Food Microbiology, 141(1):1-10.

20. Manero, A. and Blanch, A. R. 1999. Identification of Enterococcus spp. with a biochemical key. Applied and Environmental Microbiology, 65: 4425- 4430.
21. Nascimento, M., Moreno, I. and Kuaye, A. Y. 2010. Antimicrobial activity of Enterococcus faecium FAIR-E 198 against gram-positive pathogens. Brazilian Journal of Microbiology, 41(1): 74-81.
22. Nilsen, T., Nes, I. F. and Holo, H. 2003. Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from Enterococcus faecalis LMG 2333. Applied and Environmental Microbiology, 69(5):2975-2984.
23. Nissen-Meyer, J., Rogne, P., Oppegard, C., Haugen, H. S. and Kristiansen, P. E. 2009. Structure-function relationships of the non-lanthionine-containing peptide (class II) bacteriocins produced by gram-positive bacteria. Current Pharmaceutical Biotechnology, 10(1):19-37.
24. Olasupo, N. A., Schillinger, U., Narbad, A., Dodd, H. and Holzapfel, W. H. 1999. Occurrence of nisin Z production in Lactococcus lactis BFE 1500 isolated from wara, a traditional Nigerian cheese product. International Journal of Food Microbiology, 53(2):141-52.
25. Salehi, M. and Hatami, Z. 2014. Molecular occurrence of enterocin A gene among Enterococcus faecium strains isolated from gastrointestinal tract and antimicrobial effect of this bacteriocin against clinical pathogens. Iranian Journal of Medical Microbiology, 8 (1): 18-26
26. Saranya, S. and Hemashenpagam, N. 2011. Antagonistic activity and antibiotic sensitivity of lactic acid bacteria from fermented dairy products. Advances in Applied Science Research, 2(4): 528-534.
27. Schillinger, U. and Lücke, F. K. 1989. Antibacterial activity of Lactobacillus sake isolated from meat. Applied and Environmental Microbiology, 55(8):1901-1906.
28. Settanni, L. U., Massitti, O., Van Sinderen, D. and Corsetti, A. 2005. In situ activity of a bacteriocin-producing Lactococcus lactis strain. Influence on the interactions between lactic acid bacteria during sourdough fermentation. Journal of Applied Microbiology, 99(3): 670-81.
29. Shokri, D., Zaghian, S., Fazeli, H., Mobasherizadeh, S. and Ataei, B. 2013. Isolation and purification of an ultraviolet-stable bacteriocin produced by Enterococcus faecium strain DSH20 against Listeria monocytogenes. Journal of Isfahan Medical School, 31(236): 649-60.
30. Sonsa-Ard, N., Rodtong, S., Chikindas, M. L. and Yongsawatdigul, J. 2015. Characterization of bacteriocin produced by Enterococcus faecium CN-25 isolated from traditionally thai fermented fish roe. Food Control, 54: 308-16.
31. Todorov, S. D. and Dicks, L. M. 2005. Lactobacillus plantarum isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram-negative bacteria. Enzyme and Microbial Technology, 36(2): 318-26.
32. Todorov, S. D., Wachsman, M., Tomé, E., Dousset, X., Destro, M. T., Dicks, L. M., et al. 2010. Characterisation of an antiviral pediocin-like bacteriocin produced by Enterococcus faecium. Food Microbiology, 27(7): 869-79.
33. Yang, E., Fan, L., Jiang, Y., Doucette, C. and Fillmore, S. 2012. Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts. Applied and Industrial Microbiology Express, 2(1):1-12.