جداسازی و شناسایی گونه‌های پدیوکوکوس از شیر خام شتر تک کوهانه ایرانی و بررسی خواص ضدمیکروبی آن‌ها

نفیسه دعوتی[1]، فریده طباطبائی یزدی[2]*، سعید زیبائی[3]

۱. دانشجوی دکترای میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

۲. گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

۳. موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی واحد شمال شرق، مشهد، ایران.

***نویسنده مسئول**: *tabatabai@um.ac.ir*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۸/۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۰/۲

چکیده

ایران کشوری با بیابان‌های وسیع است و شتر موفقیت زیادی در تطابق با این شرایط دارد. باکتری‌های اسید لاکتیک نظیر پدیوکوکوس نقش مهمی در کیفیت محصولات تخمیری شتر بازی می‌کنند. سه نمونه از شیر خام شتر تک کوهانه ایرانی (Camelus dromedarius) تحت شرایط اسپتیک از استان گلستان جمع آوری شد. در میان باکتری‌های جدا شده تنها ۶ جدایه از نظر فنوتیپی به عنوان گونه پدیوکوکوس شناسایی شدند. ۶ جدایه باکتریایی توسط تکثیر ژن ۱۶S rRNA به وسیله واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) شناسایی شدند و توسط آنالیز محدود DNA ریبوزومی تکثیر شده (ARDRA) گروه بندی شدند. براساس آنالیز محدود ژن ۱۶S rRNA، جدایه‌های جنس پدیوکوکوس درون یک پروفایل باندی گروه بندی شدند که توسط توالی یابی به عنوان پدیوکوکوس پنتوسازئوس شناسایی شدند. فعالیت ضدمیکروبی جدایه‌های پدیوکوکوسی در مقابل سالمونلا تایفی PTCC 1609 و باسیلوس سرئوس ATCC 10876 توسط روش نقطه گذاری بررسی شدند. نتایج نشان داد که فعالیت ضدمیکروبی پدیوکوکوس پنتوسازئوس جدا شده از شیر شتر ایرانی قابل توجه است.

واژگان کلیدی: شتر، شیر خام، پدیوکوکوس، فعالیت ضدمیکروبی.

مقدمه

ایران کشوری با بیابان‌های وسیع است و شتر تطابق زیادی برای زندگی موفقیت آمیز با شرایط بیابانی پیدا کرده است. شیر شتر به عنوان یک ماده غذایی با ارزش به مدت هزاران سال در جوامع مختلف دنیا استفاده شده است. در محصولات تخمیری شیر شتر، باکتری‌های اسید لاکتیک به عنوان آغازگر نقش مهمی در فرایند تخمیر بازی می‌کنند (Ahmed and Kanwal, 2004) و یکی از مهمترین ارگانیسم‌های پروبیوتیک می‌باشند. باکتری‌های پروبیوتیک توازن میکروفلورای روده را تغییر داده، از رشد باکتری‌های بیماری‌زا جلوگیری کرده، هضم غذا را تسریع کرده، باعث تقویت سیستم ایمنی شده، مقاومت به عفونت را افزایش داده، عوامل سرطان‌زا را حذف نموده، سطوح کلسترول را کاهش داده و علائم عدم تحمل لاکتوز را کمتر می‌کنند (Saarela et al., 2000). *پدیوکوکوس پنتوسازئوس*[1]، یک

[1] *Pediococcus pentosaceus*

باکتری گرم مثبت متعلق به گروه باکتری‌های اسید لاکتیک هوموفرمنتاتیو است که به عنوان یکی از مهمترین اعضای شناخته شده باکتری‌های پروبیوتیک محسوب می‌شود و می‌تواند از رشد میکروب‌های بیماری‌زای خطرناک جلوگیری کند (Gibson and Fuller 2000; Rolfe 2000). گونه-های پدیوکوکوس باکتریوسین‌های کوچک، مقاوم به گرما و غیر لانتیونینی حاوی پپتیدهای متعلق به کلاس ۲ تولید می‌کنند که فعالیت ضدمیکروبی در مقابل باکتری‌های بیماری‌زای عفونی غذایی نظیر گونه‌های *لیستریا مونوسیتوژنز، کلستریدیوم پرفرینجنس، باسیلوس سرئوس*[1] و *استافیلوکوکوس اورئوس*[2] نشان داده‌اند (Klaenhammer, 1988; Carminati et al., 1989).

امروزه نسبت میکروب‌های بیماری‌زا مقاوم به آنتی-بیوتیک‌ها به سرعت در حال افزایش است. بطورقابل توجهی، این میکروب‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها به دلیل جهش‌های زیاد مقاوم شده‌اند، که این جهش و تغییرات سریع‌تر از ابداع آنتی بیوتیک جدید جایگزین اتفاق می‌افتد. به‌علاوه، برخی آنتی‌بیوتیک‌های دردسترس اثرات جانبی روی مصرف کنندگان نشان داده‌اند (Martys, 1982). برای مثال، کلرامفنیکل اثراتی روی عملکرد مغز استخوان نشان داده است که منتج به اثرات منفی در تولید سلول‌های قرمز خون می‌شود و ماکرولیدها می‌توانند باعث اسهال و استفراغ شوند. در صنعت غذا، غذای فرموله شده با آنتی‌بیوتیک‌ها جهت افزایش مدت زمان ماندگاری روی سلامت انسان تاثیر منفی می‌گذارد. به‌علاوه، مصرف آنتی بیوتیک‌ها در آبزی پروری به مدت طولانی خطرات متعدد اپیدمی به همراه دارد. بنابراین، استفاده از عوامل ضدمیکروبی طبیعی دیگری غیر از آنتی-بیوتیک‌ها از علایق مهم متخصصین صنعت غذا، علوم بالینی و محیط زیست می‌باشد (Cleveland et al., 2001). به دلایل اشاره شده در بالا، جداسازی و شناسایی گونه‌های پدیوکوکوس از شیر شتر به عنوان یکی از تولیدکنندگان باکتریوسین و بررسی فعالیت ضدمیکروبی آن‌ها هدف این مطالعه می‌باشد. یکی از ابزارهای مناسب برای شناسایی مولکولی باکتری‌های اسید لاکتیک آنالیز محدود DNA ریبوزومی تکثیر شده[3] (ARDRA) می‌باشد که در این مطالعه استفاده شده است (Jensen et al., 1993).

مواد و روش کار

جداسازی و شناسایی فنوتیپی گونه‌های پدیوکوکوس

سه نمونه شیر شتر از استان گلستان تحت شرایط سترون جمع‌آوری شد و تا رقت مناسب رقیق‌سازی شد و بر روی محیط MRS آگار (مرک، آلمان) کشت گردید. پلیت‌ها در ۲۰، ۳۷ و ۴۵ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت تحت شرایط بی‌هوازی به وسیله گازپک نوع A (مرک، آلمان) گرمخانه‌گذاری گردیدند. سپس کلنی‌ها توسط کشت خطی بر روی محیط MRS آگار خالص‌سازی شدند. تست کاتالاز، رنگ‌آمیزی گرم و مشاهدات میکروسکوپی برای غربال‌گری اولیه جدایه‌ها انجام شد. سویه‌های جدا شده با ساختار چهارتایی (تتراد) توسط تولید گاز، تحمل نمک ۶٫۵٪، رشد در ۱۰ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد، pH ۹٫۶ و pH ۴٫۴ در سطح جنس به عنوان گونه‌های پدیوکوکوس شناسایی گردیدند (Salminen et al., 2004). شناسایی فنوتیپی جدایه‌ها در سطح گونه براساس خواص فنوتیپی جدایه‌ها به وسیله رشد در دماهای مختلف (۳۵، ۴۰ و ۴۸ درجه سلسیوس)، در ۹ pH، pH ۷، pH ۴٫۵، بیشترین درصد کلرید سدیم (حجمی/وزنی) مورد تحمل برای رشد علاوه بر قابلیت تخمیر کربوهیدرات‌های مختلف انجام گردید. تخمیر کربوهیدرات‌ها در محیط آبیMRS بدون گلوکز با

[1] *Bacillus cereus, Clostridium perfringens, Listeria species*
[2] *S.aureus*
[3] Amplified ribosomal DNA restriction analysis

بروموکرزول پورپل ۰،۰۴ گرم در لیتر به عنوان شاخص pH، با افزودن کربوهیدرات‌های آرابینوز، گالاکتوز، لاکتوز، مالتوز، ملی‌زیتوز، ریبوز، گزیلوز (سیگما) به میزان ۱٪ (حجمی/وزنی) ارزیابی شدند (Garrity et al., 2004; Samelis et al., 1994).

شناسایی مولکولی جدایه‌ها

استخراج DNA

جهت استخراج DNA، تک پرگنه در ۱۰۰ میکرولیتر آب دیونایز سترون تعلیق‌سازی شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از الکل ایزوآمیل/کلروفرم (۲۴/۱) به سوسپانسیون اضافه گردید. بعد از ورتکس شدن، نمونه در g ۱۶۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه در ۴ درجه سلسیوس سانتریفوژ گردید. سپس ۲ میکرولیتر از محلول فاز آبی به عنوان منبع نمونه DNA برای واکنش PCR استفاده شد (Ruiz-Barba et al., 2005).

انجام عملیات PCR و تکثیر ناحیه ژن ۱۶S rRNA

پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن‌های 16S rDNA شامل: B27F (5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′) و U1492R (5′-ACGTGGTTTGAAGAGATTTTCG-3′) (Bioneer, Korea) بودند. واکنش PCR به وسیله مخلوط کردن µl ۲ از DNA الگو، µl ۱۶ آب دیونیزه سترون فاقد آنزیم DNAse (سیناکلون، ایران)، µl ۱ از هریک از پرایمرهای B27F و U1492R (با غلظت µl/ ۱۰ picomole) با کیت خشک 2X PCR Master (بایورون[1]، آلمان) به وسیله دستگاه ترموسایکلر با پروفایل برنامه دمایی زیر انجام گردید (Bulut, 2003). مرحله فعال سازی[2] در دمای °C ۹۵ به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل مراحل واسرشته‌سازی[3] در °C ۹۴ به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال[4] در °C ۵۰ به مدت ۴۵ ثانیه، توسعه[5] در °C ۷۲ به مدت ۲ دقیقه، ور در نهایت مرحله توسعه نهایی[6] در °C ۷۲ به مدت ۱۰ دقیقه و سرد کردن در °C ۴ به مدت ۵ دقیقه.

آنالیز محدود DNA ریبوزومی تکثیر شده (ARDRA)

جهت هضم آنزیمی به µl ۱۰ محصول PCR ژن 16S rRNA از هریک از جدایه‌ها µl ۱ از آنزیم‌های محدودکننده مورد نظر *Hae* III (RE[7]) (فرمنتاز[8]، کانادا) و *Hha* I (فرمنتاز، کانادا) و µl ۲ بافر آنزیم مربوطه اضافه شد. پس از مخلوط کردن هریک از محلول‌های حاوی آنزیم در حمام بن ماری °C ۳۷ به مدت ۱/۵ ساعت قرار داده شد تا هضم انجام گردد. قطعات DNA به وسیله الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۵٪ و ولتاژ ۷۵ ولت به مدت ۹۰ دقیقه جدا شدند (Bulut, 2003).

بررسی فعالیت ضدباکتریایی جدایه‌ها

روش نقطه گذاری[9]

در این روش از کشت ۲۴ ساعته جدایه‌ها بر روی سطح MRS agarبه مقدار µl ۲/۵ نقطه‌گذاری گردید و در °C ۳۷ به مدت ۴۸ ساعت به طریق غیرهوازی گرمخانه‌گذاری شد. سویه‌های شاخص مورد استفاده شامل *سالمونلا تایفی* PTTC 1609[10] و *باسیلوس سرئوس* ATCC 10876[11] بودند. هر سویه شاخص در محیط مایع نوترینت[12] به مدت ۲۴ ساعت در °C ۳۷ کشت داده شد. کشت ۱۶ ساعته باکتری شاخص مطابق با کدورت معادل ۰،۵ مک فارلند رقیق‌سازی شده و به میزان µl ۱۰ در ۷ میلی‌لیتر

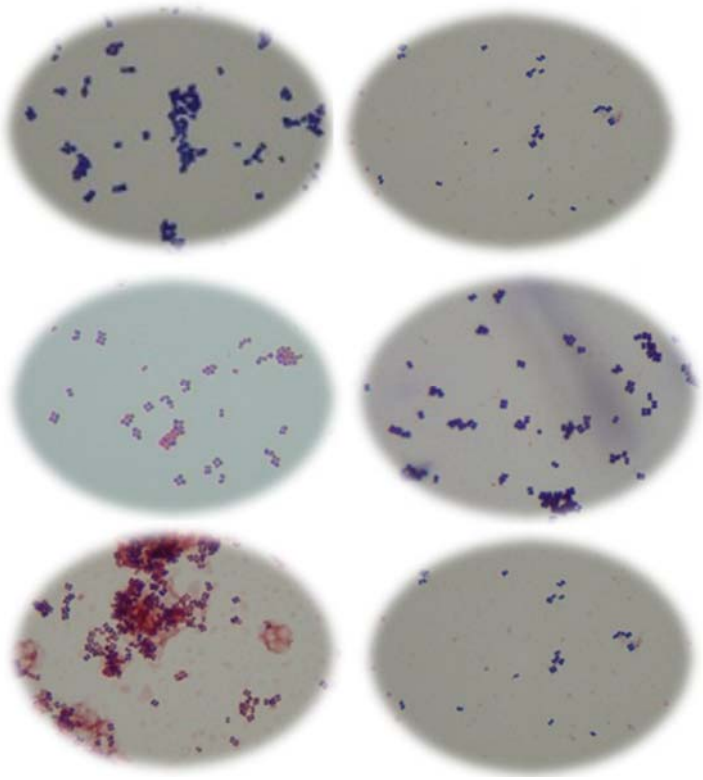
[1] Bioron
[2] Activation
[3] Denaturation
[4] Annealing
[5] Extension
[6] Final extension
[7] Restriction enzyme
[8] Fermentas
[9] Spot-on- Lawn- Method
[10] *Salmonella typhi* PTTC 1609
[11] *Bacillus cereus* ATCC 10876
[12] Nutrient broth

محیط BHI Agar حاوی ۰/۷۵٪ آگار اضافه گردید و این مخلوط به پلیت‌های MRS agar که حاوی کشت نقطه‌ای جدایه‌ها از مرحله قبل بودند منتقل گردید. از MRS broth سترون به عنوان کنترل نقطه‌گذاری استفاده گردید. ایجاد ناحیه ممانعت از رشد میکروب‌های بیماری‌زا در اطراف کلنی جدایه‌ها بعد از ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در ۳۷ $^{\circ}C$ تحت شرایط هوازی بررسی شد (Al-Otaibi, 2012). جدایه‌هایی که دارای نواحی روشن ممانعت‌کنندگی اطراف پرگنه‌های خود با قطر بیش از ۰٫۵ mm یا بیشتر بودند از نظر فعالیت ضدمیکروبی مثبت در نظر گرفته شدند (Djadouni and Kihal, 2012).

نتایج

جداسازی و شناسایی جدایه‌ها

شش جدایه باکتریایی از ۳ نمونه شیر شتر از نظر فنوتیپی به عنوان گونه‌های پدیوکوکوس تشخیص داده شدند. همه این جدایه‌ها گرم مثبت، کاتالاز منفی و ساختار ۴ تایی داشتند (شکل ۱). این سویه‌ها براساس خواص فنوتیپی و بیوشیمیایی به عنوان *پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی*[1] و *پدیوکوکوس پنتوسازئوس* شناسایی شدند. این نتایج در جدول ۱ نشان داده می‌شوند.



[1] *Pediococcus acidilactici*

شکل ۱- مشاهده میکروسکوپی ۶ جدایه با ساختار تتراد از ۳ نمونه شیر شتر

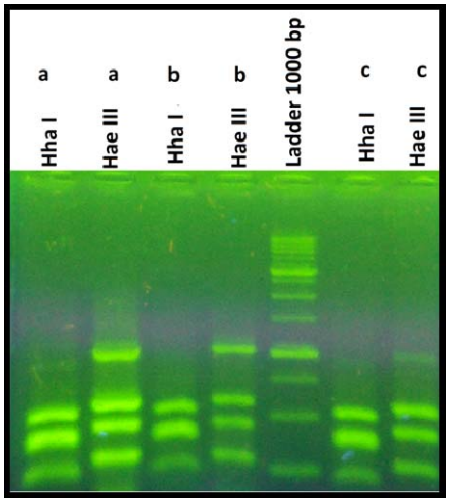
جدول ۱. خصوصیات فنوتیپی متمایز کننده گونه‌های پدیوکوکوس

	P. pentosaceus	*P. acidilactici*
کد جدایه	۲،۴،۵،۶	۱،۳
رشد در:		
pH 4.5	+	+
pH 7.0	+	+
pH 8.0	+	+
pH 9.0	-	-
35°C	+	+
40°C	d	+
45°C	d	+
48°C	-	+
تولید اسید از:		
آرابینوز	+	d
گالاکتوز	+	+
لاکتوز	+	d
مالتوز	+	-
ملیزیتوز	-	-
ریبوز	+	+
گزیلوز	d	+
ماکزیمم غلظت کلرید سدیم مورد تحمل برای رشد:	10	10

راهنما: +، ۹۰٪ سویه‌ها یا بیشتر مثبت هستند; -، ۹۰٪ سویه‌ها یا بیشتر منفی هستند; d، ۱۱-۸۹٪ سویه‌ها مثبت هستند.

براساس هضم محدود آمپلیکون‌های ژن *16S rRNA* توسط آنزیم‌های Hae III و Hha I، شش جدایه با خصوصیات پدیوکوکوسی در سطح جنس از ۳ نمونه شیر شتر در قالب یک پروفایل باندی گروه‌بندی شدند. پروفایل‌های باندی حاصل از ARDRA از سه نمونه شیر در شکل ۲ نشان داده می‌شوند. یک جدایه به عنوان نماینده این گروه پروفایل-

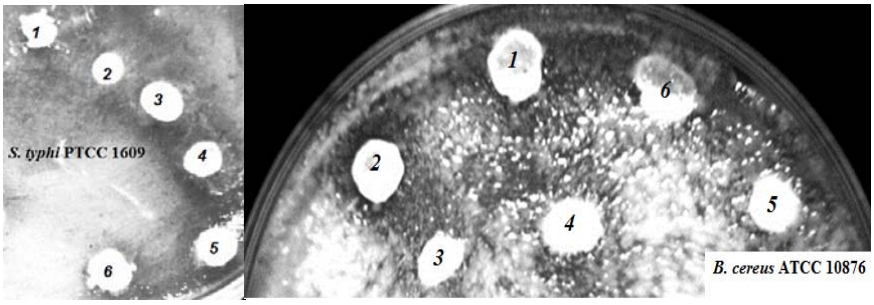
باندی جهت توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کره ارسال گردید و نتایج توالی‌یابی با همولوژی ۹۸-۱۰۰٪ نشان داد که جدایه‌ها متعلق به گونه *پدیوکوکوس پنتوسازئوس* می‌باشند. این نتایج آشکار کرد که جدایه‌های پدیوکوکوس از سه نمونه شیر شتر متعلق به یک سویه می‌باشند.



شکل ۲ - پروفایل‌های هضم محدود آنزیمی ژن تکثیر شده 16S rDNA با HaeIII و HhaI از سه نمونه شیر شتر، M: مارکر ۱۰۰۰ bp، a: *Pediococcus pentosaceus* (نمونه ۱)، b: *Pediococcus pentosaceus* (نمونه ۲)، c: *Pediococcus pentosaceus* (نمونه ۳)

فعالیت ضدمیکروبی باکتری‌های اسید لاکتیک

در شکل ۳ نواحی ممانعت حاصل از گونه‌های پدیوکوکوس برعلیه رشد باکتری‌های بیماری‌زا نشان داده می‌شود. با توجه به اینکه اگر قطر ناحیه ممانعت اطراف کلنی هر جدایه بزرگتر از ۰،۵ میلی‌متر یا بیشتر باشد جدایه از نظر فعالیت ضدمیکروبی مثبت است، بنابراین در این مطالعه گونه‌های پدیوکوکوس جدا شده از شیر شتر فعالیت ممانعتی قابل توجهی از رشد باکتری‌های بیماری‌زا *ی باسیلوس سرئوس* و *سالمونلا تایفی* نشان دادند.



شکل۳- نواحی ممانعت حاصل از ۶ گونه پدیوکوکوس بر علیه *S. typhi* PTCC 1609 و *B. cereus* ATCC 10876 از ۳ نمونه شیر شتر (روش نقطه گذاری) ۱: جدایه نمونه یک. ۲،۳،۴: جدایه‌های نمونه دو. ۵،۶: جدایه‌های نمونه سه.

بحث

این مطالعه نشان داد که در غربال‌گری اولیه جامعه لاکتیکی شیر شتر در سطح جنس، ۶ گونه پدیوکوکوسی شناسایی شد. و مشخص گردید که پرایمرهای انتخاب شده قادر به تکثیر ژن *16S rRNA* هر یک از جدایه می‌باشند. در این مطالعه روش ARDRA، غربال‌گری و شناسایی ۶ جدایه حاصل از شیر شتر را تسهیل کرد. نتایج شناسایی مولکولی جدایه‌های پدیوکوکوسی بر اساس توالی‌یابی ژن *16S rDNA* تنها یک گونه *پدیوکوکوس پنتوسازئوس* و شناسایی فنوتیپی دو گونه *پدیوکوکوس پنتوسازئوس* و *پدیوکوکوس اسیدی لاکتیس* را در شیر شتر نشان داد. که در این دو روش تفاوت کمی وجود داد. البته نتایج شناسایی فنوتیپی به دلایل مختلفی از دقت پایین‌تری نسبت به شناسایی مولکولی برخودار است. مورائس و همکاران (۲۰۱۳) مطالعه‌ای برای مقایسه دقت دو روش فنوتیپی شامل سیستم API50CHL و روش بیولوژی (شامل یک پلیت منحصر به فرد برای گرم مثبت‌ها و گرم منفی‌ها جهت تخمیر ۹۶ کربوهیدرات) با دو روش مولکولی توالی‌یابی *16S rDNA* و واکنش PCR مخصوص گونه[1] برای تعدادی باکتری اسید لاکتیک مشخص انجام دادند. در این مطالعه قابلیت اعتماد به دو روش مولکولی مورد استفاده ۱۰۰٪ بود و تست‌های فنوتیپی قابلیت اعتماد پایین‌تری نشان داده بطوری‌که برای دو روش بیولوژی و روش API50CHL به ترتیب ۹۹/۹ - ۷۴ و ۹۹/۹-۷۸/۲٪ گزارش شد. آن‌ها گزارش کردند برای اکثریت باکتری‌های تست شده هیچ گونه تطابقی بین نتایج فنوتیپی و مولکولی مشاهده نگردید (Moraes et al., 2013). روش‌های فنوتیپی دارای محدودیت‌ها و معایبی در شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک هستند نظیر قدرت پایین تمایز (Mohania et al., 2008)، نیازهای تغذیه‌ای مشابه برای رشد، تکرارپذیری ضعیف، عدم بیان برخی ژن‌ها در برخی باکتری‌ها که مرتبط با شرایط محیطی می‌باشد، تغییرپذیری باکتری‌ها در طی رشد و تغییر شکل از حالت کروی به میله‌ای کوتاه و بالعکس (Moraes et al., 2013). همچنین تخمیر کربوهیدرات‌ها یک واکنش آنزیمی است که تحت تاثیر زمان و دمای گرمخانه‌گذاری قرار می‌گیرد (Ouadghiri et al., 2005). در تحقیقات گذشته که بر روی شیر شتر انجام شده است نیز حضور جنس پدیوکوکوس تایید می‌شود، در این زمینه می‌توان به مطالعه‌ای که فرانسیوسی و همکاران (۲۰۰۹) در زمینه شناسایی پراکنش زیستی و پتانسیل عملکردی باکتری‌های اسید لاکتیک شیر خام شتر برای کاربردهای فراورده‌های شیر انجام دادند اشاره کرد. آن‌ها جنس‌های انتروکوکوس، لاکتوکوکوس، استرپتوکوکوس، لوکونوستوک، لاکتوباسیلوس و پدیوکوکوس را در شیر شتر گزارش کردند (Franciosi et al., 2009). امروزه تقاضای زیادی در به حداقل رساندن فرایندهای حرارتی مواد غذایی با استفاده از روش‌های تشعشع‌دهی، فشار بالا، انبارداری در دمای پایین، نگهدارنده‌های شیمیایی، اتمسفر اصلاح شده، کنترل فعالیت آب و استفاده از ترکیبات ضدمیکروبی وجود دارد. باکتریوسین‌ها، پروتئین‌های ضدباکتریایی تولید شده توسط سویه‌های باکتری بر علیه سایر سویه‌های مشابه یا گونه‌های خویشاوند می‌باشند. اخیرا استفاده از باکتریوسین تولیدی توسط باکتری‌های اسید لاکتیک به عنوان نگهدارنده‌های زیستی در مواد غذایی اهمیت زیادی پیدا کرده است (Djadouni, 2012). در مطالعه ای که انقی و گوین در سال ۲۰۱۴ بر روی فعالیت ضد میکروبی *Pediococcus pentosaceus VTCC-B-601* انجام دادند بیشترین فعالیت ضدمیکروبی در انتهای فاز لگاریتمی ایجاد شد که معادل با اثر ضد میکروبی سفالوسپورین با

[1] Species specific PCR reactions

غلظت (13.3µg/ml) برعلیه *سالمونلا تایفیموریوم*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *میکروکوکوس لوتئوس* بود (Nghe and Nguyen, 2014).

الیزا و آلتایار در بررسی که بر روی فعالیت ضدمیکروبی باکتریوسین‌های حاصل از *لاکتوباسیلوس کورواتوس* و *پدیوکوکوس پنتوسازئوس* جدا شده از گوشت گوساله تخمیر شده و مدفوع نوزاد علیه *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سابتیلیس*، *انتروکوکوس فکالیس*، *اشرشیاکلی*، *کلبسیلا پنومونیه*، *پروتئوس ولگاریکوس* و *سالمونلا تایفی* انجام دادند، مشخص شد که بیشترین فعالیت بازدارندگی این دو باکتریوسین در pH =۵ حاصل می‌گردد. باکتریوسین حاصل از *لاکتوباسیلوس کورواتوس* اثر باکتری‌کشی علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* داشته درحالیکه باکتریوسین حاصل از *پدیوکوکوس پنتوسازئوس* از رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* جلوگیری می‌کند (Elyass et al., 2015).

این مطالعه نیز آشکار کرد که همه جدایه‌های پدیوکوکوسی شیر شتر می‌توانند از رشد *B. Cereus* و *S. typhi* جلوگیری کنند و بر علیه باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت می‌توانند اثر بازدارندگی داشته باشند. بنابراین بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق شیر شتر به عنوان یک منبع بالقوه حاوی باکتری‌های اسید لاکتیک نظیر گونه‌های پدیوکوکوس با خاصیت ضدباکتریایی بر علیه باکتری‌های بیماری‌زا می‌تواند پیشنهاد گردد.

References

1. Ahmed, T., and Kanwal, R. 2004. Biochemical characteristics of lactic acid producing bacteria and preparation of camel milk cheese by using starter culture. Pak Vet J. 24**:** 87-91.
2. Al-Otaibi, M. 2012. Isolation of Lactic Acid Bacteria from Some Traditional Saudi Food. Am J Food Technol. **7**(11): 690-9
3. Bulut, C. 2003. Isolation and molecular characterization of lactic acid bacteria from cheese. MSc Thesis İzmir Institute of Technology.
4. Carminati, D., Giraffa, G., and Bossi, M.G. 1989. Bacteriocin-like inhibitors of Streptococcus lactis against Listeria monocytogenes. J Food Prot. 52**:** 614-7.
5. Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F., and Chikindas, M.L. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. Int J Food Microbiol. 71**:** 1-20.
6. Djadouni, F., and Kihal, M.2012. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria and the spectrum of their biopeptides against spoiling germs in foods. Braz Arch Biol Technol. 55**:** 435-44.
7. Elyass, M. E., Altayar, M.A., Mahdi, A. A., Abdelrawaf, S. S., Shigidi, M. T., and Attitalla, I. H. 2015. Characterization and Evaluation of Antimicrobial Activity of Bacteriocins from *Lactobacillus Curvatus* and *Pediococcus Pentosaceus*. J Microb Pathophysiol Pathogenesis.1: 001.
8. Franciosi E., Settanni L., Cavazza A., and Poznanski E. 2009. Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. Int Dairy J. 19(1): 3-11.

9. Garrity, G.M., Bell, J.A., and Lilburn, T.G. 2004. Taxonomic outline of the prokaryotes. Bergey's manual of systematic bacteriology. 2nd ed. Springer, New York, Berlin, Heidelberg. Vol (3). pp. 484-489, 517, 598-599, 626, 664-671, 673-675, 680-719.

10. Gibson, G.R., and Fuller, R. 2000. Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. J Nutr. 130: 391-5.

11. Jensen, M.A., Webster, J.A., and Straus, N. 1993.Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. Appl Environ Microbiol. 59: 945-52.

12. Klaenhammer, T.R. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. Biochimie. 70: 337-49.

13. Martys, C.R. 1982. Monitoring adverse reactions to antibiotics in general practice. Br J Prev Soc Med. 36: 224-7.

14. Mohania, D., Nagpal R., Kumar M., Bhardwaj A., Yadav M., and Jain S. 2008. Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria. J Dig Dis. 9(4): 190-8.

15. Moraes, P. M., Perin, L. M., Silva Júnior, A., and Nero, L. A. 2013. Comparison of phenotypic and molecular tests to identify lactic acid bacteria. Braz J Microbiol. 44(1): 109-12.

16. Nghe, D., and Nguyen, T. 2014. Characterization of Antimicrobial Activities of Pediococcus pentosaceus. Vtcc-B-601. JAPS.4 (05): 061-064.

17. Ouadghiri, M., Amar, M., Vancanneyt, M., and Swings J. 2005. Biodiversity of lactic acid bacteria in Moroccan soft white cheese (Jben). FEMS Microbiol Lett. 251(2): 267-71.

18. Rolfe, R.D. 2000. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. J Nutr 130: 396S-402S.

19. Ruiz-Barba, J.L., Maldonado, A., and Jimenez-Diaz, R. 2005. Small-scale total DNA extraction from bacteria and yeast for PCR applications. Anal Biochem. 347: 333-5.

20. Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J., and Mattila-Sandholm, T. 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. J Biotechnol. 84(3): 197- 215.

21. Salminen, S., Von Wright, A., and Ouwehand, A. 2004. Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects, CRC Press, Marcel Dekker, New York, pp. 73-103.

22. Samelis, J., Maurogenakis, F., and Metaxopoulos, J. 1994. Characterization of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented Greek dry salami. Int. J Food Microbiol. 23 :179-196.

Isolation and Identification of Pediococcus species from Raw Milk of Iranian One Humped Camel and Evaluation of Their Antibacterial Properties

Davati N [1], Tabatabaee yazdi F [2], Zibaee S[3]

1. PhD student of Food Microbiology, Department of Food Science Industry, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

2. Department of Food Science Industry, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

3. Razi Vaccine & Serum Research Institute, Mashhad, Iran.

***Corresponding author**: *tabatabai@um.ac.ir*

Received: 23 December 2015 Accepted: 30 October 2015

Abstract

Iran is a country with vast arid desert and camels have many adaptations that allow them to live successfully in desert conditions. Lactic Acid Bacteria such as *Pediococcus* play an important role in quality of fermented products of camel milk. A total of three samples of raw milk of Iranian one humped camel (*Camelus dromedarius*) were collected from Golestan province in Iran under aseptic conditions. Among isolated bacteria, only six isolates were phenotypically characterized as pediococcus species. Six bacterial isolates were identified by amplification of the *16S rRNA* gene by Polymerase Chain Reaction (PCR) and were then grouped by the Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA) method. Based on restriction analysis of 16S rRNA gene, the isolates of pediococcus genus were grouped into one ARDRA pattern that were identified by ribosomal DNA sequencing as *Pediococcus pentosaceus.* The antimicrobial activity of Pediococcus isolates against *Salmonella typhi* PTCC 1609 and *Bacillus cereus* ATCC 10876 was examined by the Spot on lawn method. The results showed that antimicrobial activity of P. pentosaceus isolated from raw milk of Iranian camel was remarkable was remarkable.

Keywords: Camel, Raw milk, *Pediococcus*, antibacterial activity.