ارزیابی خواص پروبیوتیکی گونه‌های *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فاسیوم* جداشده از پنیر پوستی استان گیلان در سال ۱۳۹۹

نصراله عالی[۱] و جلیل خندقی[۲*]

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، واحد سراب، دانشگاه آزاد اسلامی ، سراب، ایران.
۲. گروه علوم و صنایع غذایی، واحد سراب، دانشگاه آزاد اسلامی ، سراب، ایران.
***نویسنده مسئول:** *khandaghi@iausa.ac.irm*

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۳/۰۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۱۰

چکیده

پنیر پوستی از محصولات لبنی سنتی مناطق مختلفی از کشورمان است. انتروکوک‌ها ازجمله باکتری‌های غالب پنیرهای تهیه شده از شیر خام مانند پنیر پوستی هستند که حتی به‌عنوان کشت آغازگر و یا پروبیوتیک نیز در پنیرها استفاده می‌شوند. هدف از این مطالعه جداسازی و شناسایی باکتری‌های *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فاسیوم* دارای خواص پروبیوتیکی از پنیرهای پوستی استان گیلان بوده است. برای این منظور پس از جداسازی و تشخیص انتروکوک‌ها به روش فنوتیپیکی و بیوشیمیایی، ویژه‌گی‌های مقاومت در شرایط شبیه سازی شده دستگاه گوارش انسان (اسید، پپسین، صفرا و پانکراتین)، خواص آنتاگونسیتی جدایه‌ها و خواص Auto-aggregation و Co-aggregation با باکتری‌های *اشرشیا کلی* و *سالمونلا انتریکا* مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج وجود انتروکوکسی در ۲۳ نمونه پنیر (۷۶/۶ درصد) را نشان داد که با آزمون‌های تکمیلی و تاییدی بیوشیمیایی ۲۹ جدایه *انتروکوکوس فاسیوم* (۵۰ درصد) و ۲۲ جدایه *انتروکوکوس فکالیس* (۳۷/۹ درصد) تشخیص داده شد. از این بین در مجموع، ۱۴ نمونه (۲۷/۴ درصد) توانایی بقاء در حضور اسید و پپسین را داشتند و برای مراحل بعدی انتخاب شدند. در نهایت ۱۲ جدایه نیز به‌خوبی حضور صفرا و پانکراتین را تحمل و خواص ضدمیکروبی و تجمعی آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. جدایه‌ها اثرات ضد لیستریایی بارزی از خود نشان دادند و همچنین قدرت بالایی در تجمع با خود داشتند (۵۳/۹۵ درصد) و اثر تجمعی آن‌ها با باکتری *سالمونلا انتریکا* بیش‌تر از *اشرشیا کولی* به‌دست آمد. از نتایج حاصله می‌توان به این جمع بندی رسید که برخی جدایه‌های بومی *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فاسیوم* در پنیر پوستی از پتانسیل خوبی برای کاربرد به‌عنوان پروبیوتیک برخوردار هستند.

کلید واژه ها: پنیر پوستی، *انتروکوکوس فکالیس*، *انتروکوکوس فاسیوم*، پروبیوتیک.

مقدمه

لبنیات یکی از گروه‌های اصلی هرم غذایی است و مصرف روزانه دو تا چهار واحد از این گروه برای همه افراد توصیه شده است. پنیر به‌عنوان جزئی از گروه لبنیات، منبع خوبی برای تامین پروتئین، کلسیم و فسفر محسوب می‌شود. آنچه سبب بوجود آمدن انواع پنیرها شده است روش‌های متنوع تولید آن یعنی دلمه کردن، آبگیری و رساندن پنیر می‌باشد (Johnson, 2017). پنیر پوستی یکی از محصولات تخمیری سنتی است که در مناطق مختلفی از کشورمان به‌خصوص در آذربایجان و شمال کشور تولید می‌گردد. این نوع پنیر در برخی کشورهای همسایه ازجمله جمهوری آذربایجان نیز با نام پنیر موتال[۱] تولید می‌شود (Azizi et al., 2017). این پنیر در داخل پوست بز یا گوسفند می‌رسد و دارای یک طعم قوی بوده که احتمالا به خاطر زمان طولانی و سختی فرآوری آن باشد (نجفی و همکاران، ۱۳۹۰). محصولات لبنی تخمیری

[1] Motal cheese

سنتی یکی از منابع مهم برای جداسازی باکتری‌های پروبیوتیک بوده‌اند (Hanchi et al., 2018).

اصطلاح پروبیوتیک که ریشه لاتین دارد، به معنی "برای زندگی" است و سازمان جهانی بهداشت این اصطلاح را به ارگانیسم‌های زنده‌ای اطلاق می‌کند که در صورت مصرف به میزان لازم، اثرات سلامت‌زایی برای میزبان خود دارند. این میکروارگانیسم‌ها عمدتا از گروه باکتری‌های لاکتیک مانند جنس‌های *لاکتوباسیلوس* و برخی گونه‌های *بیفیدوباکتریوم* و *انتروکوکوس* هستند که در چند دهه گذشته در صنایع غذایی روی آن‌ها سرمایه‌گذاری شده است (De Melo Pereira et al., 2018). از خصوصیات مهم پروبیوتیک‌ها می‌توان به تحمل اسید و صفرا، توانایی کاهش کلسترول و ممانعت از رشد باکتری‌های بیماری‌زا اشاره کرد (Ogier and Serror, 2008). باکتری‌های انترکوک کوکسی‌های گرم مثبت، کاتالاز منفی، غیراسپورزا و هموفرمانتاتیو با احتیاجات غذایی پیچیده هستند که پراکندگی گسترده در طبیعت از جمله در مواد غذایی مختلف، آب، خاک دارند. آن‌ها همچنین قسمتی از فلور میکروبی طبیعی روده پستانداران و انسان را تشکیل می‌دهند (García-Solache et al., 2019). *انتروکوکوس*‌ها یکی از بحث‌انگیزترین باکتری‌ها از گروه باکتری‌های لاکتیک بوده و به دلیل بیماری‌زایی در مواد غذایی، تخمیر و هم‌چنین استفاده به عنوان پروبیوتیک از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند (Hanchi et al., 2018). این باکتری‌ها به دلیل داشتن تمام ویژگی‌های پروبیوتیکی یعنی حضور در روده انسان به‌عنوان میکروفلور طبیعی، زنده و فعال بودن به تعداد کافی در روده، مقاوم بودن نسبت به اسید معده و نمک‌های صفراوی در روده کوچک، توانایی اتصال به سلول‌های اپیتلیال روده در رقابت با پاتوژن‌ها و در نهایت توانایی تولید ترکیبات ضدباکتریایی از گروه باکتری‌های پروبیوتیک محسوب می‌شوند (Araújo and Ferreira, 2013; Franz et al., 2011). *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فاسیوم* گونه‌هایی هستند که بیشترین فراوانی را در بین سایر سویه‌ها به خود اختصاص داده و به‌طور فراوان در محصولات لبنی بخصوص انواع پنیر یافت می‌شوند (Morandi et al., 2006).

با توجه به اینکه انتظار می‌رود محصولات لبنی تخمیری محلی شمال کشور بستری مناسب برای بررسی تنوع زیستی میکروبی و به‌ویژه تنوع پروبیوتیکی باشد، در این مطالعه پنیرهای پوستی عرضه شده در استان گیلان در سال ۱۳۹۹ برای جداسازی و شناسائی باکتری‌های *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فاسیوم* که دارای خواص پروبیوتیکی هستند انتخاب و بررسی شده‌اند. طبق بررسی‌های به‌عمل آمده، اکثر مطالعات انجام‌شده در جداسازی انواع بومی باکتری‌های پروبیوتیک از پنیرهای سنتی در کشورمان به لاکتوباسیل‌ها تعلق داشته (Azizi et al., 2017; Hassanzadazar et al., 2017; Nami et al., 2018; تاج آبادی ابراهیمی و همکاران، ۱۳۸۶) و عدم وجود سابقه بررسی باکتری‌های *انتروکوکوس* دارای خاصیت پروبیوتیک در پنیرهای پوستی بر لزوم انجام تحقیق حاضر در این بخش از کشور تاکید دارد.

مواد و روش‌کار

نمونه‌برداری

در این مطالعه تعداد ۳۰ نمونه پنیر پوستی در پائیز و زمستان سال ۱۳۹۹ به‌صورت تصادفی از محل‌های عرضه در شهرهای مختلف استان گیلان برداشت شده و در یخچال به آزمایشگاه منتقل شد.

جداسازی و شناسائی انتروکوک‌ها

برای جداسازی و شناسایی باکتری‌های *انتروکوکوس* از خصوصیات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی سویه‌های مختلف این باکتری استفاده شد. برای این منظور ۵ گرم از هر نمونه پنیر پوستی محلی به داخل ارلن حاوی ۱۰ میلی‌لیتر بافر فسفات سالین اضافه و هم‌زده شد تا به حالت یکنواخت در آید. نمونه‌ها پس از تهیه رقت‌های سریال ده برابر بر روی سطح محیط کشت جامد

کانامایسین آسکولین آزاید آگار[2] (KAA) کشت و در دمای ۳۶ درجه سلسیوس ۲۴ تا ۴۸ ساعت گرم‌خانه گذاری شدند. این میکروارگانیسم‌ها هاله سیاهی را در اطراف کلنی‌ها ایجاد می‌کنند. از بین کلنی‌های تیپیک انتروکوک در پلیت‌هایی که بین ۳۰ تا ۱۵۰ عدد کلنی داشتند، پنج کلنی انتخاب و تست‌های تاییدی بر روی آن‌ها انجام گرفت. این آزمایشات شامل مشاهده کوکسی‌های زنجیره‌ای گرم مثبت، تست کاتالاز، توانایی رشد در دمای ۱۰ و ۴۵ درجه سلسیوس و درحضور ۶/۵ درصد نمک و هم‌چنین توانایی هیدرولیز اسکولین در محیط کشت اسکولین بایل آگار[3] نیز استفاده گردید (Nami et al., 2019). برای شناسایی گونه‌های *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فاسیوم* از واکنش تخمیر قندهای رافینوز، سوربیتول، آرابینوز، لاکتوز، میلیبوز، سوربوز استفاده شد (مهدوی و همکاران، ۱۳۹۵).

بررسی خواص پروبیوتیکی

مقاومت به شرایط معادل با دستگاه گوارش انسان

برای این آزمون بقای ایزوله‌های انتروکوک در حضور اسید و پپسین معادل با شرایط معده انسان و مقاومت ایزوله‌ها به صفرا و پانکراتین مشابه شرایط روده کوچک در انسان مورد بررسی قرار گرفت (Turková et al., 2013). به‌طور خلاصه پس از تهیه کشت تازه ۲۴ ساعته از جدایه‌ها در محیط MRS broth (Merck, Germany) و دو بار سانتریفیوژ کردن (Hettich universal, Germany) آن (پنج دقیقه، چهار درجه سلسیوس با سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه)، مایع رویی جدا و رسوب سلول‌ها در محیط فسفات بافر به طوری‌که کدورت معادل نیم مک‌فارلند داشته باشد حل شد.

برای بررسی مقاومت هم‌زمان به اسید و پپسین، pHسوسپانسیون میکروبی به‌کمک اسید کلریدریک نرمال به سه رسانده شده و مقدار سه میلی‌گرم در میلی‌لیتر به آن پپسین (Sigma-Aldrich, USA) اضافه شد. نمونه‌ها صفر و سه ساعت پس از انکوباسیون در محیط و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، در محیط MRS agar (Merck, Germany) کشت سطحی شده و تعداد باکتری‌های زنده مانده گزارش گردید.

برای ارزیابی مقاومت به صفرا و پانکراتین به سوسپانسیون میکروبی هر جدایه در فسفات بافر، مقدار سه درصد صفرای گاوی و یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر پانکراتین (Sigma-Aldrich, USA) اضافه و pH سوسپانسیون به هشت رسانده شد. تعداد باکتری‌های زنده مانده در ساعت‌های صفر، دو و چهار شمارش گردید. لازم به توضیح است فقط جدایه‌هایی که قدرت بقاء در شرایط معادل معده را داشتند برای این آزمون انتخاب شدند. آزمون‌های فوق در سه تکرار انجام و نتایج بصورت میانگین ± انحراف استاندارد گزارش گردید.

بازدارندگی از رشد پاتوژن‌های بارز

برای مطالعه این ویژگی، جدایه‌هایی که از قدرت بقاء در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش برخوردار بودند انتخاب شدند. این‌آزمون مطابق روش احمدووا و همکاران، ۲۰۱۳ با کمی تغییرات انجام گرفت. بطور خلاصه پس از تهیه عصاره چهار از کشت تازه انتروکوک‌ها، مقدار۵۰ میکرولیتر از آن در چاهک‌های ایجادشده در محیط کشت BHI soft agar که حاوی۲۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی از کشت تازه هرکدام از باکتری‌های پاتوژن اشرشیا کولی (PTCC-1276)، استافیلوکوکوس ارئوس (ATCC-25923)، سالمونلا انتریکا (PTCC-1709) و لیستریا مونوسایتوجنز (PTCC-1163) است، قرار داده و پس از ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در ۳۷ درجه سلسیوس، قطر هاله عدم رشد اندازه گرفته شد ایجاد هاله با قطر حداقل دو میلی‌متر به‌عنوان جواب مثبت تلقی می‌گردد (Ahmadova et al., 2013). عصاره‌های میکروبی قبل از استفاده به pH هفت رسانده شده و به‌منظور جلوگیری از تخریب پروتئولیتیک انتروسین‌ها در آن، مدت ۱۰ دقیقه در بن‌ماری ۸۰ درجه سلسیوس حرارت دیدند.

[2] Kanamycin Aesculin Azide Agar
[3] Bile-esculin agar

خاصیت تجمعی با خود (Auto-aggregation)

این ویژگی به‌روش اسپکتروفوتومتری و مطابق با روش کلادو و همکاران، ۲۰۰۷ مورد بررسی قرار گرفت. به‌طور خلاصه، پس از ۲۴ ساعت گرم‌خانه گذاری ایزوله‌ها در محیط کشت MRS broth و در ۳۷ درجه سلسیوس، حدود هشت واحد لگاریتمی از جدایه‌ها با دو بار سانتریفیوژ کردن (پنج دقیقه، چهار درجه سلسیوس با سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه) جدا و پس از شسته شدن مجددا در همان حجم فسفات بافر وارد شد. سپس مخلوط حاصل ورتکس شده (VELP, Italy) و مدت چهار ساعت و به‌حالت سکون در ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه و جذب نوری با دستگاه اسپکتروفوتومتر (Cecil, England) قرائت گردید. درصد خاصیت تجمعی با استفاده از رابطه زیر بدست آمد (Collado et al., 2007). جذب نوری سوسپانسیون‌های میکروبی در طول موج ۶۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

۱۰۰ × (جذب نوری پس از ۴ ساعت ÷ جذب نوری اولیه)

خاصیت تجمعی مشترک (Co-aggregation)

برای بررسی این خاصیت نیز پس از تهیه سوسپانسیون‌های میکروبی به روش بالا، حجم‌های مساوی از هریک از سوسپانسیون جدایه‌های انتروکوک و هر یک از پاتوژن‌های (اشرشیا کولی، PTCC-1276 و سالمونلا انتریکا، PTCC-1709) مخلوط و پس از ورتکس شدن، چهار ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس به‌حالت سکون انکوبه شد. خاصیت تجمعی مشترک، مطابق رابطه زیر محاسبه شد (Collado et al., 2007).

$$\text{Co-aggregation \%} = [(Ap + Ae) / 2 - (Amix)/(Ap + Ae) / 2] \times 100$$

در رابطه فوق Ap ، Ae و Amix به ترتیب جذب نوری سوسپانسیون میکروب‌های پاتوژن، جدایه‌های انتروکوک و مخلوط آن‌ها می‌باشد که پس از ۴ ساعت انکوباسیون و در طول موج ۶۲۰ نانومتر قرائت شده است.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

در این پژوهش، کلیه آزمون‌ها در سه تکرار انجام گرفت. آمار توصیفی داده‌ها با استفاده از نرم افزار Excel محاسبه شد.

نتایج

جداسازی و شناسائی انتروکوک‌ها

از مجموع ۳۰ نمونه پنیر پوستی، در هفت نمونه (۲۳/۳ درصد) هیچ باکتری انتروکوکی مشاهده نشد و کشت ۲۳ نمونه (۷۶/۶ درصد) در محیط کشت KAA agar حاوی پرگنه‌های تیپیک انتروکوک (پرگنه‌های گرد خاکستری تا سفید با هاله سیاهرنگ در اطراف آن) بود. انتخاب سه پرگنه از پلیت دارای رقت مناسب از هر نمونه و انجام آزمون‌های بیشتر، انتروکوک بودن ۵۸ جدایه از ۶۹ جدایه را تایید کرد. تست تخمیر قندها نشان داد که از مجموع ۵۸ جدایه، ۲۲ جدایه به انتروکوکوس فکالیس (۳۷/۹ درصد) و ۲۹ جدایه (۵۰ درصد) به گونه انتروکوکوس فاسیوم تعلق داشت.

بررسی خواص پروبیوتیکی

مقاومت به شرایط معادل با دستگاه گوارش انسان نتایج نشان داد از مجموع ۵۱ جدایه آزمایش شده تنها ۱۴ نمونه (۲۷/۴ درصد) شامل نه جدایه انتروکوکوس فاسیوم (۱۷/۶ درصد) و پنج جدایه انتروکوکوس فکالیس (۹/۸ درصد) در حضور اسید و پپسین مقاومت بالایی نشان دادند (بقاء بیش از ۶۰ درصد) و برای ادامه کار و سنجش مقاومت به صفرا و پانکراتین انتخاب شدند. جدول۱ بقاء این ۱۸ ایزوله در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش را نشان می‌دهد. چنانچه در جدول ۱ دیده می‌شود درصد بقای ۱۴ ایزوله انتخاب شده در شرایط اسیدی شبیه معده و در حضور پپسین از ۶۶/۵۹ تا ۸۸/۶۵ و درصد بقای همین ایزوله‌ها در محدوده ۴۷/۰۱ تا ۱۰۳/۲۵ متغییر است.

بازدارندگی از رشد پاتوژن‌های بارز

بررسی اثر آنتاگونیستی جدایه‌ها بر روی پاتوژن‌های مورد مطالعه نشان داد که از مجموع ۱۲ جدایه بررسی شده، تنها سه نمونه هیچ اثر ضدلیستریایی نداشته و نه جدایه

(۷۵ درصد) اثر مهاری خوبی بر علیه *لیستریا مونوسایتوجنز* نشان دادند.

جدول۱- بقای *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فاسیوم* جداشده از پنیر پوستی به شرایط معادل با دستگاه گوارش

جدایه	تعداد اولیه (log CFU/mL)	تعداد در حضور پپسین در pH ۳ (log CFU/mL)		درصد بقاء	تعداد در حضور پانکراتین و صفرا در pH ۸ (log CFU/mL)		درصد بقاء
		سه ساعت			دو ساعت	چهار ساعت	
۱	۷/۷۰±۰/۱۹	۵/۷۰±۰/۲۱		۷۴/۰۲	۵/۸۰±۱/۹	۳/۶۲±۰/۱۱	۴۷/۰۱
۲	۸/۸۱±۰/۲۹	۷/۸۱±۱/۹		۸۸/۶۵	۸/۱۱±۰/۴۹	۷/۴۱±۱/۲	۸۴/۱۱
۳	۷/۹۴±۰/۲۱	۵/۳۴±۰/۲۵		۶۷/۲۵	۷/۵۴±۱/۲	۷/۲۴±۰/۴	۹۱/۲۳
۴	۷/۸۴±۰/۳۱	۶/۱۴±۲/۱		۷۸/۳۱	۷/۳۴±۲/۳	۶/۵۴±۱/۴	۸۳/۴۲
۵	۸/۸۰±۰/۱	۵/۸۶±۰/۱۵		۶۶/۵۹	۷/۹۰±۰/۱	۷/۶۰±۰/۹	۸۶/۳۶
۶	۷/۶۹±۰/۱۵	۵/۸۲±۰/۱۴		۷۵/۶۸	۵/۲۴±۰/۷	۳/۳۸±۲/۰۴	۴۳/۹۵
۷	۷/۱۴±۰/۲۴	۵/۷۸±۱/۲		۸۰/۹۵	۷/۷۹±۰/۶	۷/۹۴±۰/۱۹	۱۰۳/۲۵
۸	۸/۰۱±۰/۱۴	۶/۲۱±۰/۵		۷۷/۵۳	۷/۷۱±۰/۱۸	۷/۳۱±۰/۸	۹۱/۲۶
۹	۷/۵۹±۰/۲۱	۵/۸۴±۰/۲۸		۷۶/۹۴	۷/۰۶±۰/۲۲	۷/۸۵±۲/۲	۱۰۳/۴۲
۱۰	۷/۱۴±۰/۲۸	۵/۷۱±۰/۲۳		۷۹/۹۷	۶/۱۳±۲/۰۸	۶/۵۲±۰/۵	۹۱/۳۱
۱۱	۷/۶۹±۰/۱۵	۶/۱۵±۰/۱۳		۷۹/۹۷	۶/۸۹±۲/۱۵	۵/۷۱±۰/۱	۷۴/۲۵
۱۲	۷/۱۱±۰/۲۴	۵/۶۶±۲/۰۴		۷۹/۶	۶/۲۲±۲/۲	۶/۴۱±۱/۲	۹۰/۱۵
۱۳	۷/۸۱±۰/۰۹	۶/۳۱±۰/۹		۸۰/۷۹	۷/۴۱±۰/۳۹	۶/۸۷±۱/۳	۸۷/۹۶
۱۴	۷/۷۰±۰/۱۴	۵/۶۷±۱/۲۸		۷۳/۶۳	۷/۱۰±۰/۴	۶/۷۶±۲/۴	۸۷/۷۹
انتروکوکوس فکالیس PTCC-) 1774)	۷/۴۹±۰/۱۵	۵/۱۵±۰/۱۳		۶۸/۷۶	۶/۹۲±۲/۱۵	۶/۲۱±۰/۱	۸۹/۷۴

جدایه‌های ۱ تا ۹ *انتروکوکوس فاسیوم* و جدایه‌های ۱۰ تا ۱۴ *انتروکوکوس فکالیس* هستند.

نتایج بصورت میانگین ± انحراف استاندارد سه بار تکرار آزمون گزارش شده‌است.

همچنین اثرات ضد میکروبی بر علیه *اشرشیا کولی* در چهار جدایه (۳۳/۳ درصد) مشاهده شد. همانطور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود جدایه‌های انتروکوک هیچ اثر مهاری بر ضد دیگر پاتوژن‌های مورد مطالعه نشان ندادند.

خواص تجمع با خود و تجمعی مشترک

این آزمون‌ها در سه تکرار بصورت مستقل انجام گردید. نتایج این بخش حاکی از اثر تجمعی نسبتا ضعیف‌تر ایزوله‌ها با باکتری *اشرشیا کولی* نسبت به باکتری *سالمونلا انتریکا* می‌باشد. به‌طوریکه خاصیت تجمعی با *اشرشیا کولی* از ۰/۸۸ تا ۲۶/۳۲ و خاصیت تجمعی با *سالمونلا انتریکا* از ۱۲/۷۶ تا ۴۲/۵۴ متغییر بود. طبق نتایج جدول ۳، انتروکوکسی‌های جداشده از توانایی بالای تجمع با خود برخوردار بودند به‌طوری‌که میانگین درصد خاصیت تجمعی با خود ۴۶/۲۴ به‌دست آمد در حالی‌که میانگین درصد خاصیت تجمعی با باکتری *سالمونلا انتریکا* و *اشرشیا کولی* به ترتیب ۲۰/۷۳ و ۹/۱۴ بوده است.

جدول ۲- اثرات ضدمیکروبی عصاره میکروبی انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فاسیوم جداشده از پنیر پوستی برضد پاتوژن‌ها

	اشرشیا کولی (PTCC-1276)	*استافیلوکوکوس ارئوس* (ATCC-25923)	*سالمونلا انتریکا* (PTCC-1709)	*لیستریا مونوسایتوجنز* (PTCC-1163)
۲	–	–	–	+++
۳	–	–	–	–
۴	+++	–	–	++
۵	+	–	–	+++
۷	–	–	–	++
۸	–	–	–	++
۹	++	–	–	+++
۱۰	–	–	–	+++
۱۱	–	–	–	–
۱۲	–	–	–	++
۱۳	++	–	–	+++
۱۴	–	–	–	–
انتروکوکوس فکالیس (PTCC-1774)	–	–	–	+

- : بدون خاصیت آنتاگونیستی یا قطر هاله عدم رشد کمتر از ۲ میلی‌متر، + : قطر هاله بین۲ تا ۴ میلی‌متر، ++ : قطر هاله بین۵ تا ۷ میلی‌متر، +++ : قطر هاله بزرگتر از ۷ میلی‌متر.

جدول ۳- خواص تجمعی انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فاسیوم جداشده از پنیر پوستی

جدایه	درصد خاصیت تجمعی با خود	درصد خاصیت تجمعی با	
		اشرشیا کولی (PTCC-1276)	*سالمونلا انتریکا* (PTCC-1709)
۲	۲۳/۲±۲/۹۸	۹/۲۳±۰/۲۲	۱۸/۶±۰/۴
۳	۴۱/۷۳±۲/۳	۱۱/۰۲±۰/۵	۳۲/۵±۱/۱
۴	۶۴/۳۲±۰/۲۲	۸/۳۴±۲/۱	۱۲/۹±۲/۶۳
۵	۱۲/۷۶±۱/۲	۰/۸۸±۰/۷	۴۲/۵۴±۳/۷۵
۷	۸۷/۴±۰/۵	۱۲/۲۳±۰/۴۹	۲۴/۲۳±۰/۸
۸	۵۱/۵±۱/۷	۲۶/۳۲±۳/۴۵	۳۳/۸۱±۱/۱
۹	۶۳/۳۳±۰/۴	۲۱/۱۱±۲/۳	۲۴/۵±۱/۷۶
۱۰	۷۶/۲۴±۲/۴	۵/۸۴±۱/۴	۱۷/۰۳±۰/۶
۱۱	۴۴/۲±۴/۶۳	۱۳/۵۴±۴/۲۰	۲۴/۲۵±۲/۴
۱۲	۱۱/۵۴±۱/۶	۸/۳۴±۲/۱	۱۲/۹±۲/۶۳
۱۳	۷۶/۹±۰/۱۵	۹/۲۳±۰/۲۲	۳۴/۲۳±۰/۸
۱۴	۹۴/۲۸±۲/۲۲	۱/۸۸±۰/۷	۱۲/۷۶±۱/۲
انتروکوکوس فکالیس (PTCC-1774)	۴۱/۵±۱/۵	۱۶/۳۲±۲/۴۵	۲۳/۸۱±۱/۷

نتایج بصورت میانگین ± انحراف استاندارد سه بار تکرار آزمون گزارش شده است.

بحث

در این تحقیق برای جداسازی انتروکوک‌ها از نمونه‌های پنیر از محیط کشت KAA agar استفاده شد که از مجموع ۶۹ پرگنه مشکوک، وجود انتروکوکسی‌ها در ۵۸ مورد (۸۴ درصد) بکمک آزمون‌های بیوشیمیایی تکمیلی تائید شد و این موضوع نشان از قابلیت و کارایی بالای این محیط کشت در جداسازی انتروکوک‌ها از نمونه‌های مشابه لبنی است. دانشمندان مختلفی KAA agar را بعنوان مناسب‌ترین محیط کشت انتخابی برای انتروکوک‌ها در محصولات لبنی به‌کار برده‌اند (Ingham et al., 2000; Morandi et al., 2006; Yerlikaya and Akbulut, 2020).

اولین شرط هر باکتری برای عملکرد به‌عنوان پروبیوتیک، زنده ماندن و گذر از شرایط اسیدی معده (با pH حدود دو تا سه) است (De Melo Pereira et al., 2018). در این مطالعه بیش از ۷۰ درصد ایزوله‌های *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فاسیوم* نتوانستند در این شرایط مقاومت کنند که این موضوع با یافته‌ی دیگری در مورد *انتروکوکوس فاسیوم* در تناقض است (Strompfová et al., 2004). در مطالعه دیگری نیز که در محصولات لبنی در کشورمان صورت گرفت، همه جدایه‌های انتروکوک مقاومت بالایی نسبت به اسید از خود نشان دادند (پیروزپور و حنیفیان، ۱۳۹۸) گرچه در تحقیق حاضر تحمل همزمان باکتری به اسید و پپسین ارزیابی شده است. از دیگر شرایطی که معمولا برای ارزیابی پتانسیل پروبیوتیکی میکروارگانیسم‌ها به‌کار می‌رود، مقاومت به املاح صفراوی است چرا که روده کوچک به‌عنوان اولین محل جایگزینی باکتری‌های پروبیوتیک، حاوی صفرا است (Klingberg et al., 2005; Mathara et al., 2008).

املاح صفراوی حاوی ترکیبات ضد میکروبی متنوعی می‌باشد (Liong and Shah, 2005). نتایج نشان داد که همه جدایه‌های انتروکوک مقاوم به اسید و پپسین به‌جز دو مورد مقاومت بالایی به حضور صفرا و پانکراتین از خود نشان دادند. مقاومت بالای انتروکوک‌ها به صفرا در این مطالعه با یافته‌های دیگر محققین هم‌خوانی دارد. ازجمله در بررسی خواص پروبیوتیکی جدایه‌های *انتروکوکوس فاسیوم* و *انتروکوکوس دیورانس* در محصولات لبنی و انواع پنیر در کشور ترکیه، تمامی جدایه‌ها نسبت به حضور صفرا در محیط رشدشان مقاومت نشان دادند (Yerlikaya and Akbulut, 2020) و یا در بررسی پتانسیل پروبیوتیکی انتروکوکوس‌های جدا شده از شیر خام و فرآورده‌های لبنی سنتی منطقه تبریز نیز تمامی گونه‌ها مقاوم به صفرا تشخیص داده شدند (پیروزپور و حنیفیان، ۱۳۹۸). برخلاف نتایج تحقیق حاضر فقط حدود ۱۰درصد از باکتری‌های *انتروکوکوس فاسیوم* جدا شده از پنیر سنتی Tafi در کشور آرژانتین مقاوم به صفرا گزارش شدند (Saavedra et al., 2003).

فعالیت ضد میکروبی باکتری‌های پروبیوتیک می‌تواند از رشد و تکثیر انواع پاتوژن‌ها در محصولات تخمیری سنتی در طول دوره رسیدن آن‌ها ممانعت کند (Hossain et al., 1997; Ogier and Serror, 2008). در این تحقیق اثرات آنتاگونیستی ایزوله‌های انتروکوکسی بر ۴ پاتوژن *اشرشیا کولی*، *استافیلوکوکوس ارئوس*، *سالمونلا انتریکا* و *لیستریا مونوسایتوجنز* مطالعه شد که ایزوله‌ها اثرات ضد لیستریایی خوبی نشان دادند (۹ مورد از ۱۲ جدایه). آنها همچنین برضد باکتری *اشرشیا کولی* نسبتا موثر بودند پنج مورد) ولی هیچ اثر آنتاگونیستی بر ضد دیگر پاتوژن‌های مورد مطالعه نشان ندادند. در مطالعات دیگر هم بر اثرات ضدمیکروبی قوی‌تر انتروکوک‌های جداشده از منابع مختلف بر علیه *لیستریا مونوسایتوجنز* و *اشرشیا کولی* اشاره شده‌است (Ahmadova et al., 2013; Hajikhani et al., 2007 ; Yerlikaya and Akbulut, 2020) گرچه در برخی از مطالعات به طیف ضدمیکروبی وسیع‌تر باکتری‌های *انتروکوکوس* نیز اشاره شده است (تفکیکی و حنیفیان، ۱۳۹۸). جدایه‌های انتروکوکوس فاسیوم سویه C در پنیرهای سنتی زرند در استان کرمان بیشترین اثرات ضدمیکروبی علیه *لیستریا*

مونوسایتوجنز و *سودوموناس آیروجینوزا* را داشتند (خدایی و سلطانی نژاد، ۱۳۹۶) و یا انتروکوک‌های جداشده از منطقه مغان و مشگین شهر در کشورمان دارای اثرات ضدمیکروبی برضد *اشرشیا کولی*، *لیستریا اینوکوا* و *یرسینیا انتروکولیتیکا* بودند (جعفری و همکاران، ۱۳۹۱).

میانگین درصد اثرات تجمعی جدایه‌ها در تحقیق حاضر با باکتری *سالمونلا انتریکا* بیشتر از باکتری *اشرشیا کولی* و به‌ترتیب ۲۴/۱۹ و ۱۰/۶۶ به‌دست آمد. همچنین اثرات تجمعی جدایه‌ها با خود بسیار بالاتر و دارای میانگین۵۳/۹۵ بود. اثرات تجمعی با خود به تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌ها مرتبط بوده و خاصیت تجمعی آن‌ها با میکروب‌های مزاحم و پاتوژن نیز به‌عنوان یک سیستم دفاعی در ممانعت از جایگزینی این پاتوژن‌ها در مخاط روده عمل می‌کند (Del Re et al., 2000) لذا این ویژگی‌ها به‌عنوان لازمه پروبیوتیک‌های بکاررفته در غذاهای تخمیری و فراسودمند درنظر گرفته می‌شود (Collado et al., 2008).

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج مطالعه اخیر می‌توان بیان کرد که پنیر سنتی پوستی منبع غنی از گونه‌های *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فاسیوم* می‌باشند و برخی از آن‌ها با توجه به قابلیت بالای زنده‌مانی در حضور اسید و صفرا در دستگاه گوارش و اثرات ضد میکروبی علیه پاتوژن‌ها و همچنین خواص قابل قبول و ایده‌ال Auto-aggregation و Co-aggregation می‌توانند به‌عنوان منبع باکتری‌های پروبیوتیک بومی در محصولات تخمیری مختلف به‌کار گرفته شوند. البته بکارگیری انتروکوک‌ها در غذاها بدلیل شواهد مبتنی بر بیماریزایی و مقاومت‌های آنتی بیوتیکی آن‌ها همیشه مورد بحث و تردید بوده است لذا سنجش جنبه‌های ایمنی جدایه‌های پروبیوتیک انتروکوک‌ها قبل از استفاده از آن‌ها در مواد غذایی امری لازم و ضروری است.

منابع

۱. پیروزپور، نوشین و حنیفیان، شهرام. (۱۳۹۸). پتانسیل پروبیوتیکی انتروکوکوس های جدا شده از شیر خام و فرآورده های لبنی سنتی منطقه تبریز. پژوهش‌های صنایع غذایی (دانش کشاورزی)، دوره۲۹، شماره۳، صفحه ۲۶-۱۳.

۲. تاج آبادی ابراهیمی، مریم.، حجازی، محمدامین و نوری، اشرف السادات. (۱۳۸۶). بررسی خصوصیات پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس های جداسازی شده از محصولات لبنی تخمیری لیقوان. نشریه علوم (دانشگاه خوارزمی)، دوره۷، شماره۳، صفحه ۹۵۲-۹۴۱.

۳. تفکیکی، صبا و حنیفیان، شهرام. (۱۳۹۸). اثر مهاری جدایه های بومی انتروکوک بر برخی از باکتری های بیماری زای غذایی. بهداشت مواد غذایی، دوره۹، شماره۱، صفحه ۴۸-۳۵.

۴. جعفری، بهبود.، منادی، علیرضا.، رضایی، علی.، علی زاده، سیامک.، احمدی زاده، چنگیز.، برزگری، ابوالفضل و همکاران. (۱۳۹۱). ارزیابی پتانسیل پروبیوتیکی انتروکوکسی جداسازی شده از محصولات لبنی سنتی منطقه مغان و مشگین شهر. آسیب شناسی درمانگاهی دامپزشکی (دامپزشکی تبریز)، دوره۶، شماره۱، صفحه ۱۵۱۳-۱۵۰۵.

۵. مهدوی، سامان.، علیلو، سعید و شفیعی، یحیی. (۱۳۹۵). جداسازی و شناسایی گونه های انتروکوکوس از پنیرهای تازه و پنیرهای کوزه‌ای شهرستان خوی. بهداشت مواد غذایی، دوره۶، شماره۳، صفحه ۹۱-۷۷.

۶. نجفی، علی.، ضیابخش دیلمی، مهسا.، کریمیان، حمیده و عابدی نیا، احمدرضا. (۱۳۹۰). بررسی تغییرات میکروبی پنیر پوستی طی دوره رسیدن. علوم غذایی و تغذیه، دوره۸، شماره۲، صفحه ۹۲-۸۵.

۷. خدایی، محمد و سلطانی نژاد، شهلا. (۱۳۹۶). جداسازی و شناسایی مولکولی انتروکوکوس فاسیوم سویه 2C تولید کننده باکتریوسین با طیف فعالیت ضدباکتریایی وسیع از لبنیات محلی زرند. فصلنامه نوآوری در علوم و فناوری غذایی، دوره ۹، شماره۳۴، صفحه ۵۸-۴۹.

8. 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.
9. Araújo T.F, and Ferreira C.L.d.L.F. 2013. The genus Enterococcus as probiotic: safety concerns. Braz. arch. biol. technol. 56(3): 457-466.
10. Azizi F., Najafi M.B.H. and Edalatian Dovom M.R. 2017. The biodiversity of Lactobacillus spp. from Iranian raw milk Motal cheese and antibacterial evaluation based on bacteriocin-encoding genes. AMB Express. 7(1): 1-10.
11. Collado M.C., Meriluoto J, and Salminen S. 2008. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. Eur. Food Res. Technol. 226(5): 1065-1073.
12. Collado M.C., Surono I., Meriluoto J. and Salminen S. 2007. Indigenous dadih lactic acid bacteria: cell-surface properties and interactions with pathogens. J. Food Sci. 72(3): 89-93.
13. Del Re B., Sgorbati B., Miglioli M, and Palenzona D. 2000. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of Bifidobacterium longum. Lett. Appl. Microbiol. 31(6): 438-442.
14. De Melo Pereira G.V., de Oliveira Coelho B., Júnior A.I.M., Thomaz-Soccol V, and Soccol C.R. 2018. How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. Biotechnol. Adv. 36(8): 2060-2076.
15. Franz C.M., Huch M., Abriouel H., Holzapfel W, and Gálvez A. 2011. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. Int. J. Food Microbiol. 151(2): 125-140.
16. García-Solache M. and Rice L.B. 2019. The Enterococcus: a model of adaptability to its environment. Clin. Microbiol. Rev. 32(2): e00058-18.
17. Hajikhani R., Beyatli Y, and Aslim B. 2007. Antimicrobial activity of enterococci strains isolated from white cheese. Int. J. Dairy Technol. 60(2): 105-108.
18. Hanchi H., Mottawea W., Sebei K. and Hammami, R. 2018. The genus Enterococcus: Between probiotic potential and safety concerns—An update. Front. microbiol. 9: 1791.
19. Hassanzadazar H., Mardani K., Yousefi M, and Ehsani A. 2017. Identification and molecular characterisation of lactobacilli isolated from traditional Koopeh cheese. Int. J. Dairy Technol. 70(4): 556-561.
20. Hossain M.I., Sadekuzzaman M, and Ha S.D. 2017. Probiotics as potential alternative biocontrol agents in the agriculture and food industries: A review. Food Res. Int. 100: 63-73.
21. Ingham S.C., Reyes J.C., Schoeller N.P, and Lang M.M. 2000. Potential use of presumptive enterococci and staphylococci as indicators of sanitary condition in plants making hard Italian-type cheese. J. Food Prot. 63(12): 1697-1701.
22. Johnson M. 2017. A 100-Year Review: Cheese production and quality. J. dairy sci. 100(12): 9952-9965.
23. Klingberg T.D., Axelsson L., Naterstad K., Elsser D, and Budde B.B. 2005. Identification of potential probiotic starter cultures for Scandinavian-type fermented sausages. Int. J. Food Microbiol. 105(3): 419-431.
24. Liong M, and Shah N. 2005. Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of lactobacilli strains. J. dairy sci. 88(1): 55-66.
25. Mathara J.M., Schillinger U., Kutima P.M., Mbugua S.K., Guigas C., Franz C. and Holzapfel W.H. 2008. Functional properties of Lactobacillus plantarum strains isolated from Maasai traditional fermented milk products in Kenya. Curr. Microbiol. 56(4): 315-321.
26. Morandi S., Brasca M., Andrighetto C., Lombardi A. and Lodi R. 2006.

Technological and molecular characterisation of enterococci isolated from north–west Italian dairy products. Int. Dairy J. 16(8): 867-875.
27. Nami, Y., Haghshenas B., Bakhshayesh R.V., Jalaly H.M., Lotfi H., Eslami S. and Hejazi M.A. 2018. Novel autochthonous lactobacilli with probiotic aptitudes as a main starter culture for probiotic fermented milk. LWT. 98: 85-93.
28. Nami Y., Vaseghi Bakhshayesh R., Mohammadzadeh Jalaly H., Lotfi, H., Eslami S. and Hejazi M. A. 2019. Probiotic properties of Enterococcus isolated from artisanal dairy products. Front. Microbiol. 10: 300.
29. Ogier J.C. and Serror P. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: the Enterococcus genus. Int. J. Food Microbiol. 126(3): 291-301.
30. Saavedra L., Taranto M.P., Sesma F, and de Valdez G.F. 2003. Homemade traditional cheeses for the isolation of probiotic Enterococcus faecium strains. Int. J. Food Microbiol. 88(2-3): 241-245. Strompfová V., Lauková A. and Ouwehand A.C. 2004. Selection of enterococci for potential canine probiotic additives. Vet. Microbiol. 100(1-2): 107-114.
31. Turková K., Mavrič A., Narat M., Rittich B., Španová A., Rogelj I. and Matijašić, B.B. 2013. Evaluation of Lactobacillus strains for selected probiotic properties. Folia Microbiol. 58(4): 261-267.
32. Yerlikaya O. and Akbulut N. 2020. In vitro characterisation of probiotic properties of Enterococcus faecium and Enterococcus durans strains isolated from raw milk and traditional dairy products. Int. J. Dairy Technol. 73(1): 98-107.

Evaluation of probiotic properties of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* species isolated from Pousti cheese of Gilan province in 2020

Aali N [1] and Khandaghi J[2*]

1. M.Sc. Graduated, Department of Food Science and Technology, Sarab Branch, Islamic Azad University, Sarab, Iran.
2. Department of Food Science and Technology, Sarab Branch, Islamic Azad University, Sarab, Iran.

***Corresponding author:** *khandaghi@iausa.ac.ir*

Received: 27 May 2021 Accepted: 01 September 2021

Abstract

Pousti cheese is a traditional dairy product in different parts of our country. Enterococci are among the predominant bacteria in raw milk cheeses, such as pousti cheeses, which are even used in cheese as a starter or probiotic. The aim of this study was to isolate and identify *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* strains with probiotic potential from Pousti cheeses in Gilan province. For this purpose, after isolation and detection of enterococci by phenotypic and biochemical methods, Survival under in-vitro conditions simulating the human GI tract (acid, pepsin, bile and pancreatin), antagonistic properties of isolates and their Auto-aggregation properties, and Co-aggregation with *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* were evaluated. The results showed the presence of enterococci in 23 cheese samples (76.6%) which were confirmed by conformational and biochemical tests as 29 isolates of *Enterococcus faecium* (50%) and 22 isolates of *Enterococcus faecalis* (37.9%). Totally, 14 samples (27.4%) were able to survive in the presence of acid and pepsin and were selected for the further steps. Finally, 12 isolates well tolerated the presence of bile and pancreatin and their antimicrobial and aggregation properties were evaluated. The isolates showed significant anti-listeria effects and also had a high auto-aggregation power (53.95%) and their co-aggregation effect was higher with *Salmonella enterica* than *Escherichia coli*. From the results it can be concluded that some native isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in Pousti cheese have good potential for use as probiotics.

Keywords: Pousti cheese, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, probiotic.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.
Copyright © 2022 Shahrekord Branch, Islamic Azad University