

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

محمد خدایی^۱، شهلا سلطانی نژاد^{۲*}

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 پذیرش: ۹۶/۰۲/۳۰

تاریخ دریافت: ۹۵/۰۴/۱۸

چکیده

یکی از محدودیت‌های استفاده از باکتریوسین‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک مربوط به طیف ضعیف فعالیت ضدباکتریایی آنهاست. هدف از این پژوهش، جداسازی و شناسایی مولکولی انتروکوکوسی‌های تولیدکننده باکتریوسین با طیف وسیع فعالیت ضدباکتریایی می‌باشد. در این پژوهش باکتری‌های تولیدکننده باکتریوسین از لبنیات بومی شهرستان زرنند 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 سویه C2 (جدا شده از پنیر محلی) بیشترین فعالیت ضدباکتریایی را داشت. بیشترین تأثیر ضدباکتریایی علیه لیستریا مونوسیژنوز و سودوموناس آئروژینوزا مشاهده شد. باکتریوسین تولیدی رشد این دو سویه را نیز کاهش داد. با توجه به این که باکتریوسین تولیدی دارای طیف مهاری وسیع علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی، به ویژه باکتری‌های بیماری‌زا بوده، استفاده از آن به عنوان جایگزینی برای آنتی‌بیوتیک‌های شیمیایی توصیه می‌شود.

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

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 ضد میکروبی 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 تولیدکننده باکتریوسین، باکتری‌های اسیدلاکتیک می‌باشند که عمدتاً در لبنیات وجود دارند. این باکتری‌ها، به‌دلیل توانایی بالای آنها در تولید باکتریوسین اهمیت زیادی دارند (۷، ۱۱، ۱۰، 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 WHO، FAO در سال ۱۹۶۹ به‌عنوان عامل ضد میکروبی 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 زرنند جداسازی و غربال‌گری شدند. سویه‌ای که باکتریوسین خالص شده‌ی آن علیه سویه‌های اندیکاتور دارای طیف فعالیت ضدباکتریایی گسترده‌ای 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 زرنند واقع در ۷۵ 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، ۱۰ گرم 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 هر کدام 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^۱ (CFS) کشت ۲۴ ساعته‌ی سویه‌های خالص‌سازی شده در محیط

^۱ Cell Free Supernatant

سوسپانسیون ۲۴ ساعته سویه‌های اندیکاتور به وسیله سواب، کشت چمنی روی محیط مولر هیتون 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 تیتراژ یا عیار باکتریوسین

سنجش تیتراژ باکتریوسین تولیدی توسط ایزوله انتخاب شده، با استفاده از روش کریتی‌کال صورت گرفت. در این روش ۱۲ میکروتیوب استریل از رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-12} محلول‌های سوپرناتانت خنثی شده، تهیه گردید. در مرحله بعد به وسیله پیت پاستور استریل در هر پلیت ۴ چاهک با فواصل منظم روی محیط کشت مولر هیتون آگار ایجاد شد. سپس با سواب استریل کشت چمنی از سویه‌های اندیکاتور روی محیط کشت مولر هیتون آگار داده شد. از هر یک از رقت‌ها به ترتیب 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). تیتراژ باکتریوسین به صورت واحدهای فعال در هر میلی‌لیتر بیان می‌گردد و از معادله‌ی شماره (۱) به دست می‌آید:

$$AU/ml = 2^n (1000/80) \text{ معادله شماره ۱}$$

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

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 (۲۵، ۲۶، ۲۹، ۳۰).

۲-۳- خالص‌سازی باکتریوسین

جهت کاهش فعالیت مهارت‌های اسیدهای آلی تولید شده، pH سوپرناتانت به کمک سود ۴N، خنثی و در محدوده ۶ تا ۷ تنظیم گردید. برای خنثی شدن اثر آب اکسیژنه از آنزیم کاتالاز به غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استفاده شد. سپس به سوپرناتانت به اندازه‌ی 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 به آرامی تکان داده شد. نمونه به مدت یک ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با دور rpm ۲۰۰۰۰ سانتریفیوژ گردیده، رسوب جمع‌آوری شد. رسوب‌های حاصله در بافر فسفات ۰/۰۶ مولار با pH=۷ حل گردید. حجم مساوی از محلول کلروفوم و متانول به نسبت ۱:۲ به آن اضافه گردید و به مدت یک ساعت در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سانتریفیوژ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و دور rpm ۲۰۰۰۰ انجام گرفته و رسوب سفید حاصله استخراج گردید و در آب دو بار تقطیر استریل حل شد (۳، ۲۸).

۲-۴- بررسی اثر ضدباکتریایی باکتریوسین

به منظور بررسی اثر ضدباکتریایی باکتریوسین‌های استخراج شده، از روش انتشار در آگار به کمک دیسک استفاده گردید. باکتری‌های گرم منفی *Salmonella enterica* PTCC 1709، *Escherichia coli* PTCC 1270، *Pseudomonas aeruginosa* CZO 1270، مثبت *Listeria monocytogenes* ATCC 7644، *Staphylococcus aureus* PTCC 1431 و *Bacillus cereus* PTCC 1015 به عنوان سویه‌های اندیکاتور مورد استفاده قرار گرفتند. به این منظور از

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 نرم افزارهای مختلف از جمله BioEdit، Finch TV، Gene Runner مورد بررسی و آنالیز قرار گرفت. نتایج حاصل از BLAST توالی مورد نظر در سایت های NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) و EBI (<http://www.ebi.ac.uk>) بررسی شده و توسط نرم افزارهای CLC و MEGA5 آنالیز شد. درخت فیلوژنتیکی به روش Neighbor joining رسم گردید. در نهایت توالی ژن توسط نرم افزار Sequin در بانک جهانی ژن ثبت شد.

۲-۶- تأثیر باکتریوسین بر رشد سویه های اندیکاتور
تأثیر سوپرناتانت حاوی باکتریوسین تولید شده توسط سویه ی انتخاب شده، علیه دو سویه ی اندیکاتور لیستریا مونوسییتوزنز و سودوموناس اثرورینوزا، بررسی گردید. بدین منظور سوپرناتانت حاوی باکتریوسین از سویه ی تولیدکننده باکتریوسین جداسازی گردید. سویه های اندیکاتور در ارلن های حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط مولر هیتون براث کشت داده شده (هر سویه در دو ارلن) و در دمای ۳۷ درجه ی سانتی گراد انکوبه گردیدند. سه ساعت بعد از کشت به یکی از ارلن ها ۱۰ میلی لیتر 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 سویه ای که باکتریوسین آن بیشترین فعالیت ضدباکتریایی را دارد، از تست های اولیه شامل رنگ آمیزی 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 زنجیره ای پلی مرز (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 MgCl₂، 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 جدول ۱ انجام گرفت، محصول PCR به ژل آگارز ۱

جدول ۱: برنامه 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 نرم افزار SPSS و برای مقایسه میانگین نمونه‌ها از آزمون Tukey استفاده گردید. به منظور تعیین نمونه‌هایی که دارای اختلاف میانگین معنی داری می‌باشند، آنالیز واریانس یک طرفه با تکرار مساوی به کار گرفته شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- جداسازی، خالص سازی و شناسایی سویه تولیدکننده باکتریوسین

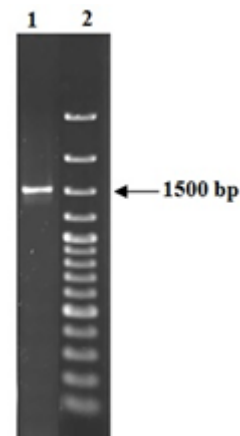
از ۱۵ نمونه‌ی جمع آوری شده از محصولات لبنی بومی زرند، سویه‌های مختلفی جداسازی گردید. باکتریوسین خالص شده سویه‌ای که از پنی‌ر محلی جداسازی شد (C2) علیه همه‌ی سویه‌های اندیکاتور (جدول ۱) دارای فعالیت ضدباکتریایی بود. این سویه از طریق آنالیز تشابه توالی ژن ۱۶S rRNA شناسایی شد. جهت تکثیر ژن از جفت پرایمر ذکر شده استفاده گردید. این پرایمرها کل ترادف ژنی ۱۶S rRNA را با 1500 bp تکثیر نمودند (شکل ۱). بوسیله‌ی آنالیز توالی ژن ۱۶S rRNA مشخص شد سویه‌ی جدا شده متعلق به انتروکوکوس فاسیوم می‌باشد. ارتباط فیلوژنتیکی این سویه با سویه‌های دیگر

در شکل ۲ نشان داده شده است. سویه‌ی C2، گرم مثبت، رنگ کلونی‌ها سفید، از نظر شکل به صورت 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 به علت 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 به عنوان ترکیبات بی‌ضرر شناخته می‌شوند (۱۶، ۱۸). باکتریوسین‌های تولیدی توسط انتروکوکسی‌ها که به طور کلی تحت عنوان انترووسین نامیده می‌شوند، در مطالعات گوناگونی مورد بررسی قرار گرفته و اثر ضدباکتریایی

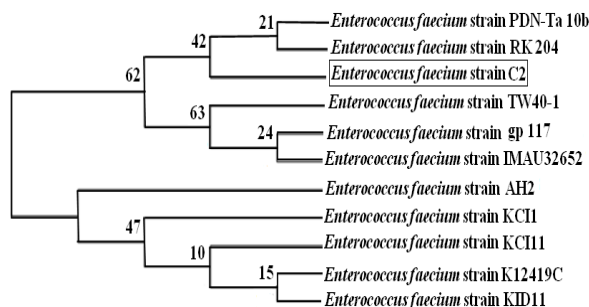
۳-۲- فعالیت ضد باکتریایی باکتریوسین

باکتریوسین خالص شده ی سویه ی C2 علیه همه ی سویه های اندیکاتور دارای اثر ضدباکتریایی بود و هاله های عدم رشد تشکیل گردید (جدول ۲). نتایج نشان می دهد که در سطح اطمینان ۵٪، بین اثر ضد میکروبی باکتریوسین در حجم های ۲۵ و ۵۰ میکرولیتر، بر روی باکتری های گرم مثبت و گرم منفی اختلاف معنی دار می باشد. در حجم ۷۵ میکرولیتر در سطح اطمینان ۵٪ بین اثر ضد میکروبی باکتریوسین بر روی لیستریا مونوسیتوژنز و باسیلوس سرئوس اختلاف معنی داری وجود ندارد، ولی بین باکتری های دیگر اختلاف معنی دار می باشد. بطور کلی بیشترین فعالیت ضدباکتریایی در بین سویه های اندیکاتور گرم مثبت علیه لیستریا مونوسیتوژنز (شکل ۳) و در بین سویه های اندیکاتور گرم منفی علیه سودوموناس اثر وژینوزا مشاهده شد (شکل ۴). باکتریوسین های تولیدی توسط انتروکوکسی ها عمدتاً بر علیه باکتری های گرم مثبت که عامل فساد غذایی هستند، مانند لیستریا مونوسیتوژنز، باسیلوس سرئوس و استفیلوکوکوس اورئوس تأثیر ضدباکتریایی دارند (۶، ۹، ۱۶، ۲۱). این باکتریوسین ها به ندرت بر باکتری های گرم منفی تأثیر دارند (۳، ۱۵، ۳۱)، در حالی که سویه ی جدا شده در این پژوهش باکتریوسین هایی تولید کرد که علاوه بر باکتری های گرم مثبت علیه باکتری های گرم منفی سودوموناس اثر وژینوزا، سالمونلا انتریکا و اشیشیا کولای فعالیت ضدباکتریایی داشت و بیشترین تأثیر بین باکتری های گرم منفی علیه سودوموناس اثر وژینوزا مشاهده شد.

آنها ثابت شده است. از جمله باکتریوسینی تحت عنوان انتروسین AS-48 که در مواد غذایی مختلف مانند غذاهای کنسروی، آب میوه ها، انواع محصولات لبنی و سوسیس ها به عنوان نگه دارنده زیستی استفاده می گردد (۴). بیشتر سویه های انتروکوکوس تولید کننده باکتریوسین متعلق به گونه های انتروکوکوس فاسیوم و انتروکوکوس فکالیس می باشند (۲۰).



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



شکل ۲: درخت فیلوژنی رسم شده بر اساس توالی ژن 16S rRNA که وابستگی سویه C2 که از پنیر زرنند جدا شده را با سویه های دیگر نشان می دهد.

جدول ۲: نتایج فعالیت ضدباکتریایی حجم‌های مختلف باکتریوسین سویه C2 علیه باکتری‌های اندیکاتور (اعداد داخل

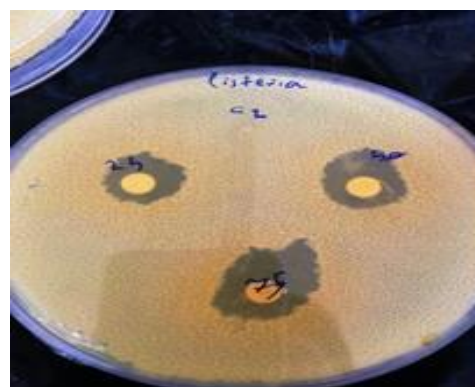
جدول نشان‌دهنده قطر هاله‌ی عدم رشد بر حسب میلی‌متر می‌باشد)

حجم (μl)	**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 اثرورژینوزا	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 ** : معنی دار بودن اختلاف

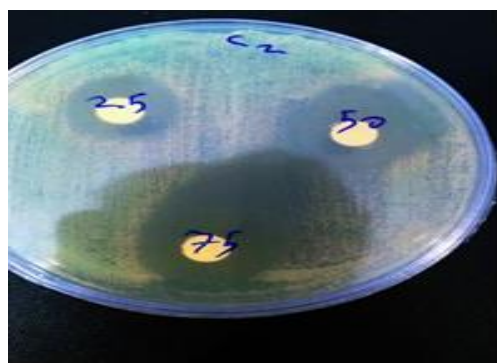
۳-۳- نتایج تیتراژ سوپرناتانت

سوپرناتانت حاوی باکتریوسین سویه C2 علیه همه‌ی سویه‌های اندیکاتور دارای فعالیت ضدباکتریایی بود. بیشترین تیتراژ علیه لیستریا مونوسی‌توژنز و سودوموناس اثرورژینوزا و کمترین تیتراژ نسبت به اشریشیا کولای گزارش گردید (جدول ۳). صالحی و حاتمی از اتروکوکوس فاسیوم مسیر گوارشی باکتریوسینی خالص کردند که تیتراژ آن علیه لیستریا مونوسی‌توژنز ۱۰۲۴۰ AU/ml و علیه سودوموناس اثرورژینوزا ۱۲۸۰ AU/ml بود. در حالی که باکتریوسین خالص شده علیه اشریشیا کولای و استافیلوکوکوس اورئوس دارای تیتراژ نبود (۲۴). میزان تیتراژ باکتریوسین‌های این تحقیق علیه لیستریا مونوسی‌توژنز کمتر از تحقیق صالحی و حاتمی می‌باشد، ولی بر علیه طیف گسترده‌تری از سویه‌ها فعال بوده، ضمن این‌که علیه اشریشیا کولای و استافیلوکوکوس اورئوس نیز دارای فعالیت می‌باشد.



شکل ۳: اثر ممانعت‌کنندگی حجم‌های مختلف باکتریوسین

سویه C2 بر روی لیستریا مونوسی‌توژنز



شکل ۴: اثر ممانعت‌کنندگی حجم‌های مختلف باکتریوسین

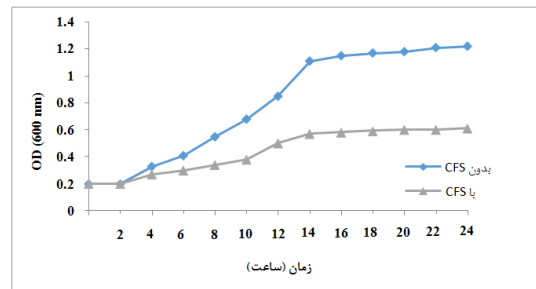
سویه C2 بر روی سودوموناس اثرورژینوزا

جدول ۳: نتایج تیتراژ سوپرناتانت حاوی باکتریوسین سویه ی C2 علیه سویه های اندیکاتور (AU/ml)

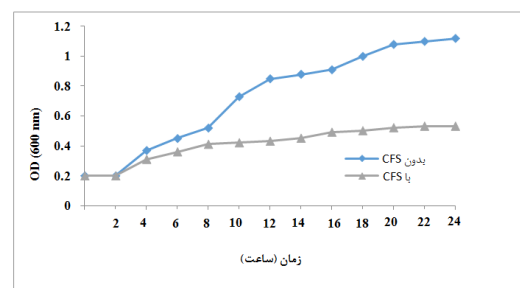
سویه های اندیکاتور	تیتراژ سوپرناتانت C2
لیستریا مونوسیٹوژنز	۱۲۸۰
باسیلوس سرئوس	۶۴۰
استافیلوکوکوس اورئوس	۳۲۰
سودوموناس آئروژینوزا	۱۲۸۰
سالمونلا انتریکا	۸۰
اشریشیا کولای	۴۰

۴-۳- تأثیر باکتریوسین بر رشد سویه ها

رشد سودوموناس آئروژینوزا و لیستریا مونوسیٹوژنز در ۲۴ ساعت با اضافه کردن سوپرناتانت عاری از سلول (CFS) سویه ی C2 نسبت به حالت عدم اضافه کردن CFS به طور چشمگیری کاهش یافت (شکل ۵ و ۶). اضافه کردن CFS/انتروکوکوس فاسیوم AQ71 به محیط رشد لیستریا مونوسیٹوژنز در طول ۲۴ ساعت رشد این باکتری را کاهش داده است (۳).



شکل ۵: منحنی رشد سودوموناس آئروژینوزا با اضافه کردن CFS سویه ی C2 و بدون اضافه کردن CFS



شکل ۶: منحنی رشد لیستریا مونوسیٹوژنز با اضافه کردن CFS سویه ی C2 و بدون اضافه کردن CFS

۴- نتیجه گیری

نتایج این پژوهش نشان داد باکتریوسین تولیدی انتروکوکوس فاسیوم جدا شده از پنیر محلی زرد علاوه بر باکتری های گرم مثبت علیه باکتری های گرم منفی نیز دارای فعالیت ضدباکتریایی بوده و رشد سویه های پاتوژن را نیز کاهش می دهد. بنابراین خالص سازی و استفاده از آن به عنوان جایگزین آنتی بیوتیک های شیمیایی در درمان عفونت های مقاوم به آنتی بیوتیک و همچنین به عنوان نگه دارنده زیستی در مهار پاتوژن های غذازاد می تواند مفید باشد.

۵- تشکر و قدردانی

از گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان بویژه کارشناسان محترم آزمایشگاه های میکروبیولوژی تشکر و قدردانی می شود.

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

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.
3. Gram-negative bacteria. *FEBS Open Biology*, 2: 12-9.
4. Ahmadova, A., Todorov, S. D., Choiset, Y., Rabesona, H., Zadi, T. M., Kuliyevev, 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 Sriannual, S. 2007. Characteristics of bacteriocin-like inhibitory substances from dochi-isolated *Enterococcus faecium* D081821 and D081833. *Letters in Applied Microbiology*, 44(3):320-325.

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., Wachsmann, 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.
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.