جداسازی و غربال‌گری باکتری‌های تولید کننده باکتریوسین از فراورده‌های لبنی بومی کرمان و بررسی فعالیت ضدباکتریایی باکتریوسین تولیدی

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 کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران.

***نویسنده مسئول:** *soltanibiotech@gmail.com*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۲/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۶/۲۶

چکیده

در سال‌های اخیر باکتریوسین‌ها به‌عنوان نگه‌دارنده‌های طبیعی در صنایع غذایی و دارویی و امروزه به‌عنوان جایگزینی برای آنتی‌بیوتیک‌های شیمیایی در درمان عفونت‌ها اهمیت پیدا کرده‌اند. باکتری‌های پروبیوتیک موجود در لبنیات که تحت عنوان باکتری‌های اسید لاکتیک شناخته می‌شوند، گروه مهمی از باکتری‌های تولید کننده باکتریوسین هستند. در این پژوهش ۱۵ جدایه از لبنیات بومی روستای قناتغستان از توابع شهرستان کرمان جداسازی گردید. باکتریوسین‌های تولیدی با استفاده از سولفات آمونیوم خالص گردیدند. اثر باکتریوسین‌های تولیدی بر سویه‌های اندیکاتور گرم منفی و گرم مثبت مختلف بررسی شد. اثر تریپسین، تغییرات pH و حرارت بر باکتریوسین تولیدی مطالعه گردید. جدایه‌ای که باکتریوسین آن بیشترین فعالیت ضدباکتریایی را داشت، به‌عنوان سویه *انتروکوکوس فاسیوم Y1* شناسایی گردید. بیشترین تأثیر ضدباکتریایی علیه *لیستریا مونوسیتوژنز* و *سودوموناس ائروژینوزا* مشاهده شد. باکتریوسین تولیدی در حضور تریپسین فعالیت خود را از دست داده و در برابر تغییرات pH، از ۲ تا ۱۲ و در برابر تغییرات حرارت تا دمای اتوکلاو، فعالیت خود را حفظ نمود. با توجه به اینکه باکتریوسین تولیدی دارای طیف مهاری وسیع علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی، به‌ویژه باکتری‌های بیماری‌زا بوده، همچنین در برابر تغییرات حرارت و pH مقاوم می‌باشد، استفاده از آن به‌عنوان نگه‌دارنده زیستی در صنایع غذایی، دارویی و خوراک دام و همچنین به عنوان جایگزینی برای آنتی‌بیوتیک‌های شیمیایی توصیه می‌شود.

واژگان کلیدی: فراورده‌های لبنی بومی، باکتریوسین، *انتروکوکوس فاسیوم*، فعالیت ضدباکتریایی.

مقدمه

لاکتوباکتریاسه به‌عنوان باکتری‌های بی‌ضرر شناخته می‌شوند و با تخمیر و تولید مواد اسیدی مثل اسید لاکتیک و در نتیجه کاهش pH نقش مهمی به‌عنوان عامل نگه‌دارنده مواد غذایی دارند (Daeschel,1989;Yang et al., 2012). در فرایند تخمیر که در اثر فعالیت بیولوژیک میکروارگانیسم‌هاست، علاوه‌بر رشد میکروارگانیسم‌ها متابولیت‌هایی هم تولید می‌شوند که برخی از آنها ضمن بی‌خطر بودن برای مصارف انسانی، مانع رشد و زندگی میکروارگانیسم‌های ناخواسته مواد غذایی می‌شوند. این مواد نگه‌دارنده را محافظت‌کننده‌های بیولوژیک می‌نامند (Hugas,1998). باکتری‌های اسید لاکتیک شامل گروه بزرگی از باکتری‌های گرم مثبت، کاتالاز و اکسیداز منفی هستند. این باکتری‌ها با تخمیر کربوهیدرات‌ها، اسید لاکتیک تولید می‌کنند. همه آنها بی‌هوازی اجباری یا بی‌هوازی اختیاری هستند و نیازهای غذایی پیچیده‌ای دارند. مهم‌ترین جنس‌های این باکتری‌ها شامل *لاکتوکوکوس*، *استرپتوکوکوس*، *انتروکوکوس*، *لاکتوباسیلوس* و *اسپوروولاکتوباسیلوس* می‌باشند (Rodriguez et al., 2012; Sun et al., 2014). منبع باکتری‌های اسید لاکتیک عمدتاً لبنیات است. این باکتری‌ها مواد ضدمیکروبی شامل پراکسید هیدروژن، دی‌اکسیدکربن، دی‌استیل، استالدئید و پروتئین‌هایی مثل باکتریوسین تولید می‌کنند (Cintas et al., 2001; Bowdish et al., 2005). باکتریوسین‌ها ترکیبات پروتئینی هستند که اثر ضدمیکروبی نسبت به

گونه‌های نزدیک به خود باکتری که باکتریوسین تولید می‌کند یا نسبت به طیف وسیعی از باکتری‌ها دارند (Bowdish et al., 2005; Cotter et al., 2005;Yang et al., 2012). این ترکیبات ممکن است هم توسط باکتری‌های گرم مثبت و هم گرم منفی تولید شوند (Savadogo et al., 2006; Yang et al., 2012). کاربرد باکتریوسین‌ها عمدتاً به‌عنوان نگه‌دارنده مواد غذایی بررسی شده است، ولی باکتریوسین‌ها علاوه بر این به‌عنوان جایگزینی برای آنتی‌بیوتیک‌ها خصوصاً در مورد باکتری‌های پاتوژنی که مقاومت آنتی‌بیوتیکی علیه آن‌ها ایجاد شده است، اهمیت دارند که در این زمینه مطالعات کمتری صورت گرفته است (Calo-Mata, 2008). باکتری‌هایی که به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم شده‌اند، قادرند در حضور آنتی‌بیوتیک رشد کرده و حتی تکثیر نمایند. امروزه بیشتر باکتری‌های بیماری‌زا به برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم شده‌اند (Aunpad and Na-Bangchang, 2007). هدف از این پژوهش جداسازی، غربال‌گری و شناسایی باکتری‌های تولید کننده باکتریوسین از فراورده‌های لبنی بومی روستای قناتغستان کرمان و بررسی فعالیت ضدمیکروبی باکتریوسین تولیدی می‌باشد.

مواد و روش کار

نمونه‌برداری و جداسازی سویه‌های پروبیوتیک

در این پژوهش از فراورده‌های لبنی بومی روستای قناتغستان واقع در ۲۴ کیلومتری شهر کرمان استفاده گردید. نمونه‌های شیر (۳ نمونه)، ماست (۶ نمونه) و پنیر (۳ نمونه) جمع‌آوری شده و در شرایط استریل روی یخ به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان منتقل گردید. در ابتدا ۵ گرم از هر نمونه در ۱۰ ml بافر فسفات نمکی استریل به صورت همگن درآمد. سپس رقت‌های 10^{-6} - 10^{-1} از هر نمونه فراهم شده و جهت جداسازی سویه‌های پروبیوتیک، در محیط کشت MRS agar (Biolife، ساخت کشور ایتالیا) کشت داده شدند. پس از گرم‌خانه‌گذاری در شرایط بی‌هوازی و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت، کلنی‌های رشد کرده بر روی محیط کشت از نظر خواص مورفولوژی و میکروسکوپی بررسی شدند. از کلونی‌های رشد کرده، کشت مجدد به عمل آمده تا این‌که کشت‌های خالصی بدست آید. کشت ۲۴ ساعته‌ی سویه‌های خالص‌سازی شده در محیط broth MRS فراهم شده و در ۶۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژگردید. مایع رویی با فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر فیلتر شد. از این مایع که به صورت شیرابه اسیدی می‌باشد و تحت عنوان سوپرناتانت عاری از سلول نامیده می‌شود، جهت خالص‌سازی باکتریوسین استفاده گشت. (Schillinger and Lücke,1989; Saranya and Hemashenpagam, 2011)

خالص‌سازی باکتریوسین

به منظور کاهش فعالیت مهاری اسیدهای آلی تولید شده، pH سوپرناتانت به کمک سود 4N، خنثی و در محدوده ۶ تا ۷ تنظیم گردید. برای خنثی شدن اثر آب اکسیژنه، به سوپرناتانت آنزیم کاتالاز به غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اضافه شد. سپس به سوپرناتانت به اندازه‌ای سولفات آمونیوم اضافه شد که محلول ۶۰ درصد سولفات آمونیوم ایجاد گردد. 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 و رسوب جمع‌آوری گشت. رسوب‌های حاصله در بافر فسفات ۰/۰۶ مولار با pH= ۷ حل گردید. حجم مساوی از محلول کلروفرم و متانول به نسبت ۱:۲ به آن اضافه شده و به مدت یک ساعت در ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری گشت. سانتریفیوژ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و دور ۲۰۰۰۰rpm انجام شد. رسوب سفید حاصله استخراج گردیده و در آب دو بار تقطیر استریل حل گشت (Shokri et al., 2013).

بررسی فعالیت ضدباکتریایی

جهت بررسی فعالیت ضدباکتریایی باکتریوسین استخراج شده، از روش انتشار در آگار به کمک دیسک استفاده گردید. به این منظور از سوسپانسیون ۲۴ ساعته سویه‌های اندیکاتور گرم مثبت (*لیستریا مونوسایتوژنز* ATCC 7644، *استافیلوکوکوس اورئوس* PTCC 1431 و *باسیلوس سرئوس* PTCC 1015) و گرم منفی (*ایشریشیا کولی* PTCC 1270، *سالمونلا انتریکا* PTCC 1709 و *سودوموناس آئروژینوزا* CZO) بوسیله سواب، کشت چمنی روی محیط مولر هینتون آگار داده شد. دیسک‌های کاغذی استریل (پادتن طب، ساخت ایران) روی سطح محیط‌های کشت با فواصل منظم قرار داده شده، در ادامه دیسک‌ها با مقادیر ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میکرولیتر از باکتریوسین خالص شده، آغشته گردیدند. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده و بعد از ۲۴ ساعت پیدایش یا عدم پیدایش هاله‌های عدم رشد مورد بررسی قرار گرفت. این آزمایش سه مرتبه تکرار شده و میانگین قطر هاله‌های عدم رشد در نظر گرفته شد.

تأثیر حرارت، pH و تریپسین بر عملکرد باکتریوسین

برای تعیین اثر درجه حرارت روی میزان فعالیت باکتریوسین، سوپرناتانت عاری از سلول در چند لوله تقسیم گردیده و در ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه، در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰،۲۰ و ۴۵ دقیقه و در ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه (دمای اتوکلاو) تحت تأثیر حرارت قرار گرفت (Shokri et al., 2013). فعالیت ضدباکتریایی سوپرناتانت‌های حرارت دیده شده، علیه سویه‌های اندیکاتور به روش انتشار در آگار به کمک دیسک بررسی گردید. برای مشخص شدن مقاومت باکتریوسین در برابر تغییرات pH، سوپرناتانت سویه تولید کننده باکتریوسین جداسازی گردید. سوپرناتانت حاصل در چند لوله تقسیم شد و به کمک NaOH و HCl، pHسوپرناتانت هر لوله از ۲ تا ۱۲ تنظیم شد. لوله‌ها به مدت دو ساعت در دمای اتاق قرار گرفتند. پس از این مدت pH روی ۷ تنظیم گردید. فعالیت ضدباکتریایی سوپرناتانت علیه سویه‌های اندیکاتور به روش انتشار در آگار به کمک دیسک بررسی شد. به منظور اثبات پروتئینی بودن عامل ضدباکتریایی موجود در سوپرناتانت، از آنزیم‌های تجزیه کننده پروتئین استفاده می‌گردد. برای این کار آنزیم تریپسین (SIGMA، ساخت کشور امریکا) با غلظت یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و در pH= ۷، تهیه گردید. سپس ۲۰ میکرولیتر از محلول آنزیم به ۲۰۰ میکرولیتر از سوپرناتانت‌های جدا شده اضافه گردید. محلول سوپرناتانت حاوی آنزیم به مدت دو ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری گشت. سپس جهت از بین بردن اثر آنزیم، محلول به مدت ۵ دقیقه در ۸۰ درجه سانتی‌گراد در بن ماری حرارت داده شد. در نهایت اثر سوپرناتانت حاوی آنزیم به روش انتشار در آگار به کمک دیسک علیه سویه‌های اندیکاتور مورد بررسی قرار گرفت و این اثر با اثر سوپرناتانت بدون آنزیم مقایسه گردید.

شناسایی مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی سویه غربال‌گری شده

برای شناسایی اولیه سویه‌ای که باکتریوسین آن بیشترین فعالیت ضدباکتریایی را داشت، از تست‌های اولیه شامل رنگ‌آمیزی گرم، شکل میکروسکوپی، شکل و رنگ کلونی، حرکت، تست اکسیداز، کاتالاز و همولیز استفاده شد. به منظور شناسایی مولکولی سویه مورد نظر، DNA ژنومی به کمک کیت استخراج DNA، Accu Prep (Bioneer، ساخت کشور کره جنوبی، Cat. No: K-3032) استخراج شد. 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 در دستگاه ترموسایکلر (اپندورف، آلمان) انجام گرفت. برنامه حرارتی مورد استفاده شامل ۵ دقیقه واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمرها در دمای ۴۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و طویل‌شدن در دمای ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. جهت تکثیر ژن *16S rRNA* از جفت پرایمر ۲۷F با توالی 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' و ۱۴۹۲R با توالی 5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3' استفاده شد. محصول PCR به ژل آگارز ۱ درصد واجد اتیدیوم برماید منتقل و به مدت ۱ ساعت در ولتاژ ۸۰ ولت الکتروفورز گردید. 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 شدند. درخت فیلوژنتیکی به روش Neighbor joining ترسیم شد. در نهایت ژن توسط نرم افزار Sequin در بانک ژن ثبت گردید.

نتایج

در ابتدا از نمونه‌های جمع‌آوری شده از محصولات لبنی بومی قناتغستان، ۱۵ جدایه‌ی مختلف جداسازی گردید. باکتریوسین جدایه‌ی (Y1) جداسازی شده از ماست محلی، علیه همه سویه‌های اندیکاتور دارای فعالیت ضدباکتریایی بود (جدول۱). بیشترین فعالیت ضدباکتریایی در بین سویه‌های اندیکاتور گرم مثبت علیه *لیستریا مونوسیتوژنز* و در بین سویه‌های اندیکاتور گرم منفی علیه *سودوموناس ائروژینوزا* مشاهده شد.

جدول ۱- نتایج فعالیت ضدباکتریایی مقدارهای مختلف باکتریوسین سویهY1 علیه باکتری‌های اندیکاتور (اعداد داخل جدول نشان‌دهندهٔ قطر هالهٔ عدم رشد بر حسب میلی‌متر می‌باشد)

حجم(µl)	۷۵	۵۰	۲۵
باکتری			
لیستریا مونوسیتوژنز	۲۸ ±۰/۵	۲۳ ±۰/۲۸۸	۱۸ ±۰/۵۷۷
باسیلوس سرئوس	۲۱ ±۰/۵	۱۸±۰/۵۷۷	۱۴ ±۰/۷۶۳
استافیلوکوکوس اورئوس	۲۱ ±۰	۱۸ ±۰/۵۷۷	۱۵ ±۰/۷۶۳
سودوموناس ائروژینوزا	۳۳ ±۰/۲۸۸	۲۷ ±۰/۷۶۳	۲۰ ±۰/۵۷۷
سالمونلا انتریکا	۱۴ ±۰/۷۶۳	۱۲ ±۰/۵۷۷	۱۰ ±۰
اشریشیا کولای	۱۲ ±۰/۵۷۷	۱۰ ±۰/۲۸۸	۶ ±۰/۵

± : حدود اطمینان میانگین‌ها

سوپرناتانت حاوی باکتریوسین سویه Y1 در برابر آنزیم تریپسین فعالیت خود را به‌صورت کامل از دست داد. به عبارتی هیچ‌گونه هاله عدم رشدی نسبت به سویه‌های اندیکاتور مشاهده نشد. در حالی‌که بدون حضور تریپسین هاله عدم رشد تشکیل گردید. در مورد تغییرات درجه حرارت، باکتریوسین سویه Y1 در برابر تغییرات دما بسیار مقاوم بود و هاله‌های عدم رشد با وجود حرارت‌های مختلف علیه سویه‌های اندیکاتور تشکیل گردید. فقط در دمای اتوکلاو کمی از فعالیت باکتریوسین کاسته شد (جدول۲). باکتریوسین سویه Y1 در برابر تغییرات pH مقاوم بود. بیشترین فعالیت باکتریوسین Y1 در برابر تغییرات pH در محدوده ۵ تا ۱۰ می‌باشد که ۱۰۰ درصد گزارش گردید.

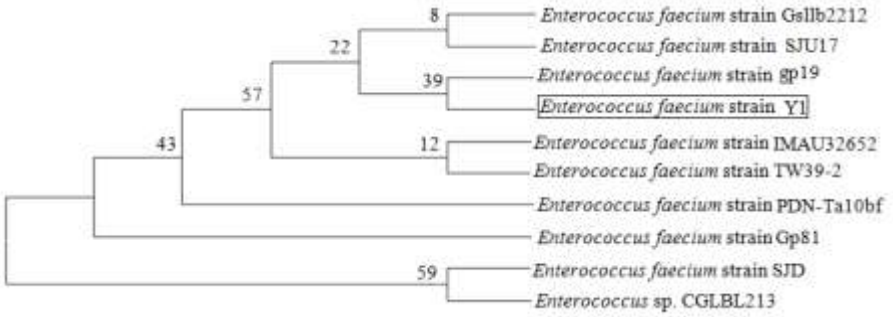
جدول۲- اثر تریپسین و تیمار حرارت بر باکتریوسین سویه Y1 در زمان‌های مختلف

تیمار	فعالیت باکتریوسین Y-1 (درصد)
آنزیم تریپسین	۱۰۰
شاهد	۰
دمای ۶۰°C (۳۰ دقیقه)	۱۰۰
دمای ۱۰۰°C (۱۰ دقیقه)	۱۰۰
دمای ۱۰۰°C (۲۰ دقیقه)	۱۰۰
دمای ۱۰۰°C (۴۵ دقیقه)	۱۰۰
اتوکلاو (۱۵ دقیقه)	۷۵

سویه Y1، گرم مثبت، رنگ کلونی‌ها سفید، به صورت اجتماعی از کوکسی‌ها، بدون حرکت، کاتالاز و اکسیداز منفی، و از نظر همولیز دارای همولیز آلفا می‌باشد. این سویه *که* باکتریوسین آن بیشترین فعالیت ضدباکتریایی را داشت، از طریق آنالیز تشابه توالی ژن *16S rRNA* شناسایی شد. جهت تکثیر ژن از جفت پرایمر ۲۷F و R ۱۴۹۲ استفاده گردید. این پرایمرها کل ترادف ژنی 16S rRNA را با bp ۱۵۰۰ تکثیر نمودند. توالی DNA ژن *16S rRNA* این سویه در (شکل۱) نشان داده شده است. بوسیلهٔ آنالیز توالی ژن 16S rRNA مشخص شد سویه جدا شده متعلق به *انتروکوکوس فاسیوم* می‌باشد. ارتباط فیلوژنتیکی این سویه با باکتری‌های دیگر در شکل(۲) نشان داده شده است.

```
   1 gggtgctata atgcagtcga acgcttcttt ttccaccgga gcttgctcca ccggaaaaag
  61 aggagtggcg aacgggtgag taacacgtgg gtaacctgcc catcagaagg ggataacact
 121 tggaaacagg tgctaatacc gtataacaat caaaaccgca tggttttgat ttgaaaggcg
 181 ctttcgggtg tcgctgatgg atggacccgc ggtgcattag ctagttggtg aggtaacggc
 241 tcaccaaggc cacgatgcat agccgacctg agagggtgat cggccacatt gggactgaga
 301 cacggcccaa actcctacgg gaggcagcag tagggaatct tcggcaatgg acgaaagtct
 361 gaccgagcaa cgccgcgtga gtgaagaagg ttttcggatc gtaaaactct gttgttagag
 421 aagaacaagg atgagagtaa ctgttcatcc cttgacggta tctaaccaga aagccacggc
 481 taactacgtg ccagcagccg cggtaatacg taggtggcaa gcgttgtccg gatttattgg
 541 gcgtaaagcg agcgcaggcg gtttcttaag tctgatgtga aagccccccgg ctcaaccggg
 601 gagggtcatt ggaaactggg agacttgagt gcagaagagg agagtggaat tccatgtgta
 661 gcggtgaaat gcgtagatat atggaggaac accagtggcg a
```

شکل۱- توالی ۷۰۱ جفت بازی ژن *16S rRNA* سویهٔ Y-1 (Accession Number: KU200451)



شکل۲- درخت فیلوژنی رسم شده بر اساس توالی ژن *16S rRNA* که وابستگی سویهٔ Y1 را با سویه‌های دیگر نشان می‌دهد

بحث

در این پژوهش از بین ۱۵جدایه جداسازی شده‌ی اولیه، باکتریوسین سویه‌ی Y1 (جداسازی شده از

ماست محلی قناتغستان) بیشترین تأثیر ضدباکتریایی را علیه سویه‌های اندیکاتور نشان داد. بعد از استخراج DNA، شناسایی و آنالیز فیلوژنتیکی مشخص شد که باکتری جدا شده متعلق به گونه *انتروکوکوس فاسیوم* می‌باشد. باکتریوسین‌های تولیدی توسط انتروکوک‌ها که به‌طور کلی تحت عنوان انتروسین نامیده می‌شوند، در مطالعات گوناگونی مورد بررسی قرار گرفته و اثر ضدباکتریایی آنها ثابت شده است. بیشتر سویه‌های انتروکوکوس تولید کننده باکتریوسین متعلق به گونه‌های *انتروکوکوس فاسیوم* و *انتروکوکوس فکالیس* می‌باشند (Nascimento et al., 2010). سویه *انتروکوکوس فاسیوم* IT62 که سه باکتریوسین ENTL50A، ENTL50B وENTIT را تولید می‌کند، شناسایی شده است (Izquierdo et al., 2008). جدایه‌های تولید کننده باکتریوسین از گونه *انتروکوکوس اویوم* که باکتریوسینی شبیه به پدیوسین به نام اویسین A تولید می‌کنند، شناسایی شده است (Birri et al., 2010). در سایر تحقیقات صورت گرفته، سویه‌های *انتروکوکوس فکالیس LMG2333* (Nilsen et al., 2003) *انتروکوکوس فکالیس KT2W2G* (Aran et al., 2015)، *انتروکوکوس فاسیوم AQ71* (Ahmadova et al., 2013)، *انتروکوکوس فاسیوم CN-25* (Sonsa-Ard et al., 2015) و *انتروکوکوس فاسیوم FAIR-E198* (Nascimento et al.,2010) که توانایی تولید باکتریوسین با خاصیت ضدمیکروبی داشتند، جداسازی و شناسایی گردیده‌اند. باکتریوسین سویه Y1 بیشترین اثر ضدباکتریایی را در بین سویه‌های اندیکاتور گرم مثبت، به ترتیب بر *لیستریا مونوسیتوژنز*، *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داد. مطالعات زیادی تأثیر باکتریوسین انتروکوک‌ها را بر *لیستریا مونوسیتوژنز* ثابت کرده‌اند. فعالیت ضدباکتریایی باکتریوسین سویه *انتروکوکوس فاسیوم* به‌نام *FAIR-E198* بر *لیستریا مونوسیتوژنز* ثابت شده است (Nascimento et al., 2010)، همچنین تأثیر باکتریوسین سویه‌هایی از *انتروکوکوس فاسیوم* بر *باسیلوس سرئوس* نیز مشخص شده است (Chen et al., 2007) که با یافته‌های این پژوهش مطابقت دارد، اما در این مطالعات بر خلاف این تحقیق باکتریوسین سویه‌های *انتروکوکوس فاسیوم* جدا شده بر *استافیلوکوکوس اورئوس* تاثیری ندارد. اکثر باکتریوسین‌ها فعالیت ضدباکتریایی علیه باکتری‌های گرم مثبت دارند و عمدتاً بر باکتری‌های گرم منفی بی‌تأثیرند. یکی از این باکتریوسین‌ها که اکنون در صنعت غذا کاربرد زیادی پیدا کرده است، نایسین است که توسط *لاکتوکوکوس لاکتیس* تولید می‌شود. نایسین بر باکتری‌های گرم مثبت اثر باکتری‌کشی دارد، ولی نسبت به باکتری‌های گرم منفی به‌طور خالص تأثیری ندارد (Dearauz et al., 2009) در حالی‌که باکتری جدا شده در این پژوهش باکتریوسین‌هایی تولید می‌نماید که علاوه بر باکتری‌های گرم مثبت علیه باکتری‌های گرم منفی *سودوموناس ائروژینوزا*، *سالمونلا انتریکا* و *اشریشیا کولای* تأثیر ضدباکتریایی دارند. بیشترین تأثیر بین باکتری‌های گرم منفی علیه *سودوموناس ائروژینوزا* مشاهده شد. حساسیت باکتریوسین تولیدی تحت تأثیر آنزیم تریپسین ارزیابی شد. این آنزیم باعث از بین رفتن فعالیت ضدمیکروبی باکتریوسین گردید. این یافته تأییدی بر پروتئینی بودن ترکیب ضدمیکروبی تولیدی و نشان‌دهنده باکتریوسینی

بودن ماهیت این متابولیت است (Hammami et al., 2009). باکتریوسین تولیدی *انتروکوکوس فاسیوم* AQ71، تحت‌تأثیر آنزیم‌های پروتئولیتیک تریپسین و آلفا کیموتریپسین قرارگرفته که فعالیت ضدمیکروبی باکتریوسین در حضور این آنزیم‌ها از بین رفت (Ahmadova et al., 2013). باکتریوسین *انتروکوکوس فکالیس KT2W2G*، *انتروکوکوس فاسیوم* CN-25 در حضور تریپسین، پپسین، الفا کیموتریپسین و پروتئیناز K غیرفعال گردیدند (Aran et al., 2015; Sonsa-Ard et al., 2015) باکتریوسین تولیدی در این پژوهش به درجه حرارت بالا تا دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد (دمای اتوکلاو) مقاوم می‌باشد. پایداری حرارتی خصوصیت مهمی برای باکتریوسین‌ها محسوب می‌شود، چرا که استفاده از این باکتریوسین‌ها باعث محافظت میکروبی بسیاری از محصولات غذایی و دارویی که در فرایند تولید به حرارت‌های بالا نیاز دارند، می‌گردد. گزارش شده که باکتریوسین JB05-1-1 فعالیت خود را در دمای ۹۰ درجه پس از ۳۰ دقیقه حفظ نموده است (Naghmuchi et al., 2011). همچنین باکتریوسین سویه‌های *انتروکوکوس فکالیس KT2W2G*، و *انتروکوکوس فاسیوم* CN-25 تا دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد دارای فعالیت می‌باشند (Aran et al., 2015; Sonsa-Ard et al., 2015)نتیجه بررسی پایداری باکتریوسین سویه‌های جدا شده نشان دهنده مقاومت بالای آنها به تغییرات pH بود که تغییرات pH ۲ تا ۱۲ را تحمل کردند. باکتریوسین‌های BAC14B و پومیلیسین ۴ فعالیت کمتری نشان دادند و فعالیت خود را بین pH ۲ تا ۹ حفظ نموده‌اند (Hezkisla et al., 2007; Hammami et al., 2009)در حالی‌که باکتریوسین سویه‌های *انتروکوکوس فکالیس KT2W2G*، *انتروکوکوس فاسیوم* AQ71 و *انتروکوکوس فاسیوم* CN-25 در pH ۲ تا ۱۲ دارای فعالیت است(Aran et al., 2015;Sonsa-Ard et al., 2015؛ Ahmadova et al., 2013.)یافته‌های این پژوهش نشان داد، باکتریوسین تولید شده توسط سویه *انتروکوکوس فاسیوم Y1* جدا شده از ماست سنتی قناتغستان، علیه طیف وسیعی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی دارای فعالیت ضدباکتریایی بوده، همچنین در برابر تغییرات pH از ۲ تا ۱۲ فعالیت خود را حفظ نموده و در برابر تغییرات حرارت مقاوم می‌باشد. بنابراین می‌توان از آن به‌عنوان ترکیب ضدباکتریایی جایگزین آنتی‌بیوتیک‌های شیمیایی و همچنین به‌عنوان نگهدارنده در غذاهای تخمیری استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

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

منابع

1. Ahmadova, A. Todorov, S.D. Choiset, Y. Rabesona, H. Zadi, T.M. Kuliyev, A. De Melo Franco, B.D.G. Chobert, J.M. and Haertlé T. 2013. Evaluation of antimicrobial activity probiotic properties and safety of wild strain *Enterococcus faecium* AQ71 isolated from Azerbaijani Motal cheese. Food Control. 30:631-641.

2. Aran, H.K. Biscola, V. El-Ghaish, S. Jaffrès, E. Dousset, X. Pillot, G. Haertlé, T. Chobert, J.M. and Hwanhlem, N. 2015. Bacteriocin-producing *Enterococcus faecalis* KT2W2G isolated from mangrove forests in southern Thailand: purification characterization and safety evaluation. Food Control. 54: 126-134.
3. Aunpad, R. and Na-Bangchang, K. 2007. Pumilicin 4 a novel bacteriocin with anti-MRSA and anti-VRE activity produced by newly isolated bacteria *Bacillus pumilus* strain WAPB4. Current Microbiol. 55: 308-313.
4. Birri, D.J. Brede, D.A. Forberg, T. Holo, H. and Nes I.F. 2010. Molecular and genetic characterization of a novel bacteriocin locus in *Enterococcus avium* isolates from infants. Appl Environ Microbiol. 76: 483-492.
5. Bowdish, D.M. Davidson, D.J. and Hancock, R. 2005. A re-evaluation of the role of host defence peptides in mammalian immunity. Curr Protein Pept Sci. 6(1): 35-51.
6. 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 Tecnol. 1(1): 43-63.
7. Chen YS. Yanagida F, Srionnual S. 2007. Characteristics of bacteriocin-like inhibitory substances from dochi-isolated *Enterococcus faecium* D081821 and D081833. LAM. 44(3):320-325.
8. Cintas, L.M. Casaus, M.P. Herranz, C. Nes, I.F. and Hernández, P.E. 2001. Review: bacteriocins of lactic acid bacteria. Food Sci Technol Int. 7(4):281-305.
9. Cotter, P.D. Hill, C. and Ross, R.P. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. Nat Rev Microbiol. 3(10): 777-788.
10. Daeschel, M.A.1989. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. Food Technol. 43:164-167.
11. Dearauz, L.J. Jozala, A.F. Mazzola, P.G. and Penna, T.C.V. 2009. Nisin biotechnological production and application: a review. Trends Food Sci Technol. 20(3):146-154.
12. Hammami, I. Rhouma, A. Jaouadi, B. Rebai, A. Nesme, X. 2009.Optimization and biochemical characterization of a bacteriocin from a newly isolated *Bacillus subtilis* strain 14B for biocontrol of Agrobacterium spp. strains.LAM. Lett Appl Microbiol. 48(2): 253-260.
13. Hezkisla, D. Zhang, L. Yuan, C. Green-Church, K.B. Yousef, A.E. 2007. Isolation and identification of a *Paenibacillus polymyxa* strain that coproduces a novel lantibiotic and polymyxin. Appl Environ Microbiol. 73(1):168-178.
14. Hugas, M. 1998. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. Meat Sci. 49:139-150.
15. Izquierdo, E. Bednarczyk, A. Schaeffer, C. Cai, Y. Marchioni, E. Van Dorsselaer, A. and Ennahar, S. 2008. Production of enterocins L50A, L50B, and IT, a new enterocin, by *Enterococcus faecium* IT62 a strain isolated from Italian ryegrass in Japan. Antimicrob Agents Chemother. 52(6):1917-1923.
16. Naghmouchi, K. Paterson, L. Forster, B. McAllister, T. Ohene-Adjei, S.and

Drider, D. 2011. *Paenibacillus polymyxa* JB05-01-1 and its perspectives for food conservation and medical applications. Arch Microbiol. 193(3):169-177.

17. Nascimento, M. Moreno, I. Kuaye, A.Y. 2010. Antimicrobial activity of *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 against gram-positive pathogens. Braz J Microbiol. 41(1): 74-81.
18. Nilsen, T. Nes I.F. and Holo, H. 2003. Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. Appl Environ Microbiol. 69(5):2975-2984.
19. Rodríguez, E. Arqués, J.L. Rodríguez, R. Peirotén, Á. Landete, J.M. and Medina, M. 2012. Antimicrobial properties of probiotic strains isolated from breast-fed infants. J Funct Foods. 4(2):542-551.
20. Saranya, S. and Hemashenpagam, N. 2011.Antagonistic activity and antibiotic sensitivity of lactic acid bacteria from fermented dairy products. Adv Appl Sci Res. 2(4):528-534.
21. Savadogo, A. Ouattara, A.C. Bassole, H.I. and Traore, S.A. 2006. Bacteriocins and lactic acid bacteria-a minireview. African J Biotechnol. 5(9):678-683.
22. Schillinger, U. and Lücke, F.K. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. Appl Environ Microbiol. 55(8):1901-1906.
23. Shokri, D. Zaghian, S. Fazeli, H. Mobasherizadeh, S. Ataei, B. 2013. Isolation and Purification of an Ultraviolet-stable Bacteriocin Produced by Enterococcus faecium Strain DSH20 against *Listeria monocytogenes*. J Isfahan Med Sch; 31(236): 649-60.
24. 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. 5: 308-316.
25. Sun, Y. Lou, X. Zhu, X. Jiang, H. Gu, Q.2014. Isolation and characterization of lactic acid bacteria producing bacteriocin from newborn infant's feces. J Bacteriol Mycol. 1(2):1-7.
26. 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. AMB Express. 2(1):1-12.

Isolation and screening of bacteriocin-producing bacteria from native dairy products of Kerman province and study of antibacterial activity of produced bacteriocin

Khodaei M[1], Soltani Nezhad Sh[2*]

1. Graduated of Microbiology, Faculty of sciences, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran.
2. Department of Microbiology, Faculty of sciences, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran.

[*]**Corresponding author:** *Soltanibiotech@gmail.com*

Accepted: 17 September 2017 Received: 30 April 2017

Abstract

In recent years, Bacteriocins have been recognized as natural preservatives in food and drug industries, also, nowadays, they are used as substitutes of chemical antibiotics for treatment of infections. Bacteria in probiotic dairies recognized as "Lactic Acid Bacteria", are significant group of bacteriocin producing bacteria. In this study 15 isolates have been isolated from native dairies of Kerman province. The Bacteriocins were purified by sulfate ammonium method. The effect of produced bacteriocins on different indicator gram negative and positive strains was investigated. The effects of trypsin, pH ranges, and heat on the produced bacteriocin were investigated too. The isolate that produced the most bacteriocin with the most antibacterial activity, identified as *Enterococcus faecium Y1*. The maximum antibacterial effect was observed against *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas aeruginosa*. The produced bacteriocin lost activity in presence of trypsin. It was resistant against pH ranges from 2 to 12 and heat ranges up to autoclave temperature. The produced bacteriocin had a wide antibacterial activity spectrum against the gram positive and negative bacteria, in particular pathogenic bacteria, also was resistant against heat and pH ranges. As a result, use of bacteriocin in food and drug industry, as animal feed, and as a substitute for chemical antibiotics is recommended.

Keywords: native dairy products, Bacteriocin, *Enterococcus faecium*, Antibacterial activity.