(مقاله پژوهشی)

جداسازی و شناسایی باکتری های اسید لاکتیک بومی مولدترکیبات ضدمیکربی از فرآورده های لبنی کرمانشاه، ایران

ساجده شریعتی نیا[۱]، جواد حامدی[۲*]، ستاره حقیقت[۳]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲- بخش زیست فناوری میکروبی، دانشکده زیست شناسی و قطب تبار زایی موجودات زنده، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

۳- گروه آموزشی میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۰۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۱/۲۴

چکیده

پروبیوتیک‌ها فلور طبیعی دهان و دستگاه گوارشی هستند و از طریق تنظیم میکروفلور روده، کاهش کلسترول خون، تحریک سیستم ایمنی، بهبود متابولیسم لاکتور و فعالیت های ضد سرطانی اثرات مفیدی بر سلامت مصرف کننده‌ها دارند. آنها در گوشت، سبزیجات و محصولات لبنی یافت می‌شوند. اکثر باکتری‌های پروبیوتیک متعلق به گروه باکتری‌های اسید لاکتیک هستند. پروبیوتیک‌ها همانند لاکتوباسیلوس‌ها از طریق تولید ترکیبات ضد میکربی ازفعالیت طیف وسیعی از پاتوژن های انسانی و حیوانی ممانعت می نمایند. در این پژوهش ۸۳ سویه باکتری از ۲۰ نمونه ماست محلی که از استان کرمانشاه جمع آوری شده بود، جدا شدند. نمونه ها بر روی محیط MRS آگار کشت و در دمای ۳۰oC در جار بی هوازی گرماگذاری شدند. سویه‌های گرم مثبت و کاتالاز منفی به عنوان باکتری-های اسید لاکتیک در نظر گرفته شد. فعالیت ضدباکتریایی جدایه ها بر علیه Bacillus subtilis، Bacillus cereus و Escherichia coli به عنوان باکتری‌های غذازاد به روش انتشار در آگار بررسی بررسی شد. برای کاهش برهم‌کنش اثر ضد باکتری لاکتیک اسید تولید شده، pH مایع رویی محیط تخمیر آن ها در ۶ تنظیم شد. نتایج نشان داد که بیشترین فعالیت ضد میکربی متعلق به سویه‌های ۴۴، ۶۱ و ۷۲ بود. این سویه‌ها علیه هر سه باکتری گرم مثبت و منفی مورد آزمون اثر ضدمیکربی داشتند. هر سه سویه مطالعه شده فاقد اثر ضد میکربی علیه استارترهای مورد مطالعه شامل Lactobacillus casei و Lactococcus lactis بوده‌اند. نتایج شناسایی مولکولی به روش آنالیز ژن 16S rRNA نشان می‌دهد که هر سه سویه متعلق به جنس Enterococcus هستند. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که باکتری‌های اسیدلاکتیک جداشده از پنیرهای سنتی کردی به علت تولید ترکیبات ضد میکربی قادرند از رشد باکتری های غذازاد عامل فساد و بیماری جلوگیری کنند. متابولیت های بدست آمده از باکتری های پروبیوتیک بومی می توانند به عنوان جایگزینی مناسب برای ترکیبات شیمیایی دارای عوارض جانبی در نظر گرفته شوند.

واژه های کلیدی: فعالیت ضد میکربی، نگهدارنده غذایی، باکتری اسید لاکتیک، پروبیوتیک.

*مسؤول مکاتبات: jhamedi@ut.ac.ir

۱- مقدمه

باکتریهای غذازاد از گروه‌های مختلف گرم منفی و گرم مثبت بوده، و سبب بروز اثرات مضری چون فساد(۱)، بروز مسمومیت (۲) و ایجاد بیماریهای متفاوت(۳) می شوند. برای مقابله با این اثرات مضر از روش های متنوعی چون نگهداری مواد غذایی در شرایط مناسب (۴) و یا افزودن مواد نگهدارنده (۴) استفاده می شود. مواد نگهدارنده متنوعی با منشا زیستی (۵) و شیمیایی(۶) در فراورده های غذایی استفاده می شود. روش دیگر برای حفاظت مواد غذایی، افزودن میکروارگانیسم ها به مواد غذایی است. در این حالت میکروارگانیسم ها با تولید فراورده های مختلف سبب مهار رشد میکروارگانیسم های مضر می شود. در این میان باکتری های اسید لاکتیک علاوه بر تولید اسید لاکتیک و اسید استیک که اثرات بازدارنده رشد بر میکروارگانیسم های دیگر را دارد، مواد ضدمیکربی مختلفی شامل باکتریوسین ها(۷) را تولید می کنند. این باکتری ها همچنین به علت تولید مواد معطره و بهبود دهنده بافت محصولات جایگاه ویژه ای در صنایع غذایی دارند(۸).این باکتری ها، گرم مثبت، معمولا غیر متحرک، فاقد اسپور،کاتالاز منفی، میله ای و کوکسی هستند. آنها فاقدتوانایی سنتز سیتوکروم و پورفیرین(اجزای زنجیره تنفسی) هستند و در نتیجه نمی توانند ازشیب پروتونی برای تولید ATP استفاده کنند. به همین دلیل باکتری های اسید لاکتیک ATP موردنیاز خود را فقط از تخمیر(معمولا قندها)به دست می آورند که نتیجه آن، تولید اسید لاکتیک است. باکتری های اسید لاکتیک به طور کلی در مواد غذایی مختلف از جمله شیر، گوشت و سبزیجات وجود دارند، اما بعضی از آن ها ساکن دهان، روده و واژن پستانداران نیز هستند(۹). از جمله شایع ترین باکتری های فاسد کننده و آلوده کننده مواد غذایی *B. cereus*، *B. subtilis* و *E. coli* هستند. *B.subtilis* همچون *B.cereus* به دلیل اسپورزا بودن، دارای مقاومت نسبی در برابر فرآیندهای محافظتی مواد غذایی است. این باکتری درصورت تکثیر و رشد در ماده غذایی توکسین مقاوم به حرارت تولید می کند که علایمی مشابه *B.cereus* دارد. از جمله علایم مسمومیت با *B.subtilis* می توان به استفراغ، درد های شکمی و تهوع ناگهانی اشاره کرد. بیشترین غذاهایی که می توانند آلوده به گونه های باسیلوس شوند شامل محصولات گیاهی، گوشت، ادویه ها، آرد، غلات، فرآورده های برنجی یا غذاهای نشاسته ای است (۱۰).*E. coli* از طرف دیگر باکتری گرم منفی متعلق به انتروباکتریاسه است و جز شایع ترین عوامل فساد شیر غیر پاستوریزه (۱۱)، آبمیوه ها و فراورده های گوشتی می باشد (۱۲). در این زمینه باکتری های اسید لاکتیک در مبارزه با گونه های متنوعی از باسیلوس ها و اسپورهای آنها موفق عمل می کنند. برای مثال باکتریوسین نیسین تولید شده توسط سویه های مولد *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* موجب مهار رشد باسیلوس ها می شود. این باکتریوسین به عنوان اولین و تنها نگهدارنده با منشا میکروبی از سوی سازمان غذا و داروی آمریکا تایید شده است (۱۳). سایر متابولیت های تولید شده توسط باکتری های اسید لاکتیکمانند پراکسید هیدروژن، اسید ها و الکل ها نیز با تاثیر بر یکپارچگی و نفوذپذیری غشا علیه باکتری های گرم منفی نیز فعالیت های مورد قبولی نشان داده است(۱۴). مطالعات انجام شده تائید کننده نقش مثبت این باکتری ها در مهار عوامل بیماری زا است(۹). نظر به امکان یافتن انواع مفید و جدیدی از انواع باکتری های اسید لاکتیک در فراورده های محلی هر کشور که پتانسیل پروبیوتیکی، تولید مواد ضد میکروبی و امکان استفاده آن ها به عنوان نگهدارنده غذایی داشته باشد، در این پژوهش قابلیت تولید ترکیبات ضد باکتری های شاخص آلودگی و فساد در بین باکتری های اسید لاکتیک موجود در فرآورده های لبنی استان کرمانشاه ارزیابی شده است.

۲-مواد و روش ها

۲-۱-نمونه‌گیری

به منظور جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک، ابتدا نمونه های فرآورده های لبنی محلی(ماست)از شهرستان های کرمانشاه و سنقرو نیزروستاهای قره تپه، مارنگاز وآبباریک تهیه شد. نمونه‌گیری در ظروف کاملاً استریل ودرشرایط اسپتیک، انجام گرفت. سپس نمونه ها در مجاورت یخ قرار داده شدند و به آزمایشگاه منتقل و قبل از ۲۴ ساعت مورد آزمون قرار گرفتند.

۲-۲-جداسازی باکتری های اسید لاکتیک

غنی سازی باکتریهای اسید لاکتیک با استفاده از محیطMRS براث و آگار (شرکت ایبرسکو، ایران) انجام شد. مقدار ۰/۲گرمازهرنمونه در ۲۰ میلی‌لیتر MRS براث ریخته و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس درانکوباتورگرماگذاری شد(۱۵). به منظور جدا سازی باکتری های اسید لاکتیک، پس از ۲۴ ساعت از رقت های $۱۰^{-۶}$-$۱۰^{-۴}$ به میزان ۱۰۰میکرو لیتر در پلیت حاوی MRS آگار تلقیح شده و در جار بی هوازی در انکوباتور به مدت ۷۲-۴۸ساعت و دردمای$۳۷\ ^{\circ}C$ قرار داده شدند. کلنی های بامورفولوژی صاف،گرد، منظم، متراکم و سفید، انتخاب شده و تست کاتالاز و رنگ آمیزی گرم انجام شد. باکتری های گرم مثبت وکاتالازمنفی، جهت خالص سازی درمحیط MRS آگار کشت داده شدند. همچنین این باکتری ها در%20+MRS گلیسرول، درفریزر$-۷۰^{\circ}C$ ودرکلکسیون میکروارگانیسمهای دانشگاه تهران نگهداری شدند.

۲-۳- بررسی اثر ضد میکروبی باکتری های اسیدلاکتیک جدا شده

جدایه های باکتری های اسیدلاکتیک در ۱۰میلی‌لیتر محیط MRS براث تلقیح، و دردمای۳۰ درجه سانتیگراد به مدت۴۸ساعت گرمخانه گذاری شدند. برای جداسازی سلول های باکتری،کشت های انجام گرفته به مدت ۲۰دقیقه با دور ۳۰۰۰سانتریفوژشدند. سپس مایع رویی جداگردید PH محلول به دست آمده باکمک سود، خنثی گردید. در این تحقیق از سویه‌های *Bacillus subtilis* TMC1416 UTMC1983 *Bacillus cereus* و*E.coli* UTMC1407 که از کلکسیون میکروارگانیسم‌های دانشگاه تهران دریافت شده بود برای سنجش اثر ضد میکروبی لاکتوکوکوس ها استفاده گردید. باکتری های فوق ابتدا در محیط کشت نوترینت آگار به مدت ۲۴ساعت دردمای۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شدند و سوسپانسیون نیم مک فارلند تهیه شد. برای بررسی فعالیت ضد باکتریایی باکتری های اسید لاکتیک جدا شده از لبنیات محلی، ازمحیط مولرهینتون آگار استفاده شد. برای این منظور از روش انتشار در چاهک(Well diffusion) برای تعیین مهارکنندگی باکتری های اسیدلاکتیک استفاده شد واثرآنتاگونیستی این باکتری ها بر ۳ سویه معیار بررسی شد. به منظورکاهش خطا هرآزمون سه بارتکرارشد.

۲-٤- بررسی اثر توام باکتری های اسید لاکتیک جدا شده بر روی استارترها

با توجه به این که فعالیت ضد میکربی باکتری های اسید لاکتیک جدا شده می تواند به استارتر های لبنی، آسیب بزند، به منظور بررسی اثر ضد میکربی سویه های برتر برروی استارترهای لبنی، استارترهای *Lactobacillus casei* UTMC108 و*Lactococuslactis* UTMC106 از کلکسیون میکروارگانیسم‌های دانشگاه تهران، انتخاب شد. این جدایه ها روی محیط کشت Trypticase Soy Broth(TSB) کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای $۳۰^{\circ}C$ در جار بی هوازی، گرماگذاری شد. از کشت حاصل سوسپانسیون، غلظت ۱×۱۰^{۷}باکتری تهیه شد. برای بررسی فعالیت ضد باکتریایی باکتریهای لاکتیک اسیدجداشده از محیط TSB آگار و روش انتشار در چاهک استفاده و واثرآنتاگونیستی این باکتریها بر استارترهای موردمطالعه بررسی شد.

۲-۵-شناسایی سویه‌های منتخب

برای شناسایی مولکولی، سویه‌هایمورد نظر و به منظور استخراج DNA ،این سویه ها در فلاسک ۱۰۰ml حاوی ml ۱۰ محیط BHI با pH۰/۲ ± ۵/۷ تلقیح، و دردمای۳۰°C ودور۸۰rpm به مدت ۷۲-۴۸ ساعت گرمخانه گذاری شدند. پساز اطمینان از عدم آلودگی و رشد باکتری، برای تهیه بیومس محتوای ارلن در ویال ۱/۵ میلی لیتری ریخته شد و با استفاده از میکروفیوژ، بادور۱۳۰۰۰rpmبه مدت ده دقیقه سانتریفیوژشد.استخراج DNA با استفاده از کیت (شرکت پویاژن آزما، ایران) طبق دستورالعمل موجود در آن انجام شد. به منظور بررسی موفق بودن عمل استخراج DNA، الکتروفورز با ژل آگارز ۰/۸ ٪به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد. در نهایت در دستگاه ژل داک، باند مشاهده شد.انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) در این پژوهش از دو پرایمر عمومی با نامهای F9 و R1541 برای تکثیر ژن16S rRNA استفاده شد. این پرایمرهای عمومی به منظور تکثیر ژن 16S rRNA با طول ۱۵۰۰ نوکلئوتید مورد استفاده قرار گرفتند.تکثیر ژن 16S rRNA با استفاده از برنامه مشخص برای ۳۰ سیکل در شرایط دمای دناتوراسیون اولیه، ۹۶ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، سپس ۹۶ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال ۵۶درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه و دمای تکثیر ۷۲ درجه به مدت ۸۰ثانیه و با استفاده از آب دو بار تقطیر (۸/۲ میکرولیتر)، پرایمر 9F (یک میکرولیتر)، پرایمر 1541R (یک میکرولیتر)، دی متیل سولفوکساید (۱/۳ میکرولیتر)، مسترمیکس ۵(/۱۲ میکرولیتر) و DNA ژنومی (۱ میکرولیتر) در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش ودمای اتصال مربوط به آن ها به ترتیب زیراست:

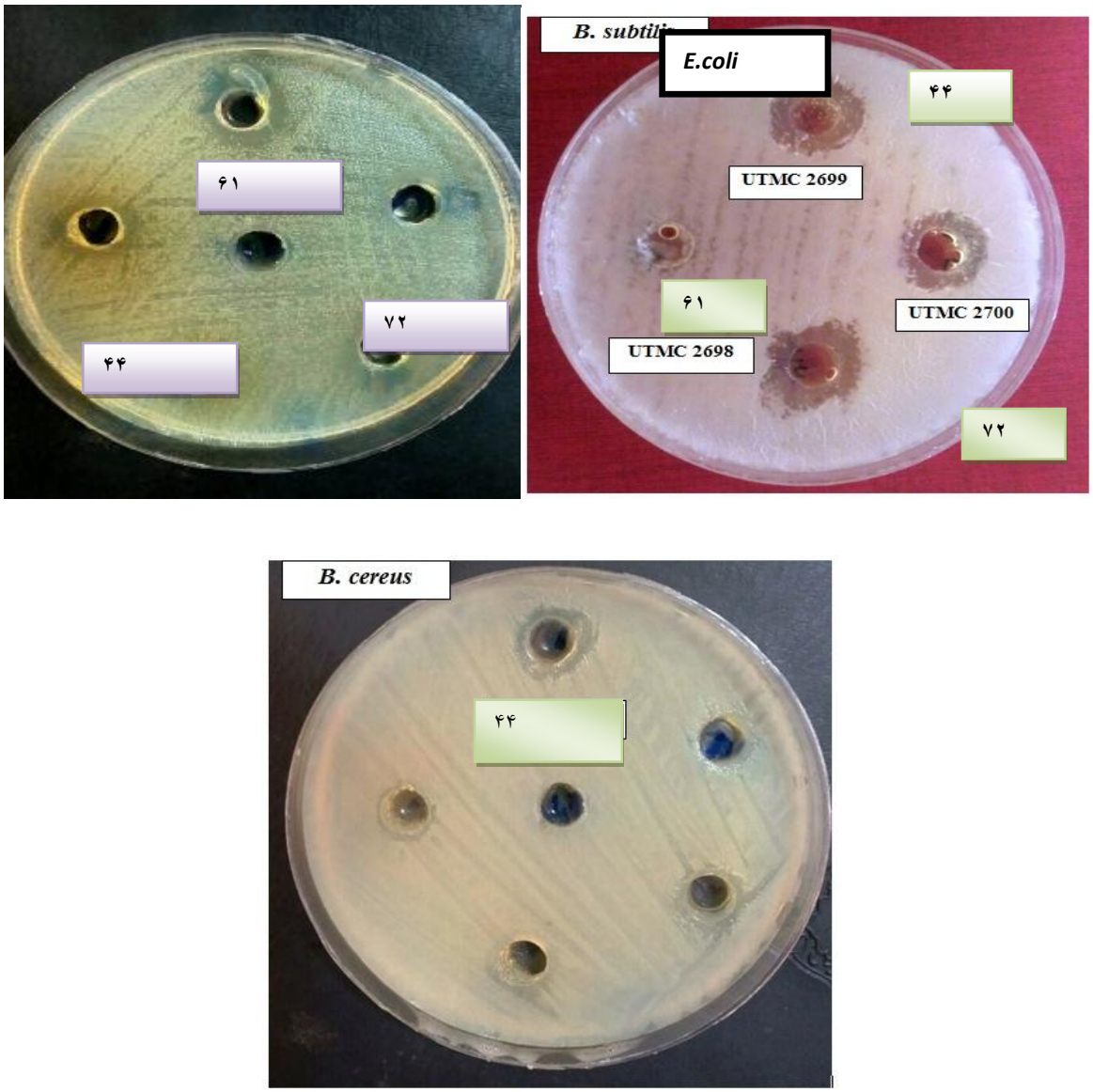
9F: 5'- AAG AGT TTG ATC ATG GCT CAG -3' (Tm:60)

1541R: 5'- AGG AGG TGA TCC ACC CGC A -3' (Tm:60)

بررسی محصول PCR، با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ ٪در بافر TAE (Tris-Acetic acid-EDTA) صورت گرفت. ژن تکثیر شده و مشاهده شده بر روی ژل آگارز برای توالییابی، به شرکت Macrogen کره جنوبی ارسال شدند. شباهت توالی ژن 16S rRNA با استفاده از موارد ثبت شده معتبر در پایگاه داده NCBI و EZ-Taxon با استفاده از الگوریتم BLAST انجام شد.

۳-نتایج و بحث

در این پژوهش، فعالیت ضد باکتریایی باکتری های اسید لاکتیک جدا شده از فرآورده های لبنی استان کرمانشاه به دو صورت ارزیابی مایع تخمیر بدون تنظیم pH و با تنظیم pH (در ۰/۱ ± ۶/۸) بررسی شده است. نتایج به دست آمده از بین ۸۳ نمونه لبنی جدا شده از مناطق مختلف استان کرمانشاه، نشان می دهد که در صورت عدم تنظیم pH، جدایه های بیشتری فعالیت ضد میکربی بر علیه *B. cereus*،*B.subtilis* و*E.coli* داشته اند. ولی در صورت تنظیم pH فراوانی فعالیت ضد میکربی کاهش می یابد. در این حالت، از ۸۳ نمونه جدا شده، سه جدایه فعالیت ضد میکربی بر علیه حداقل یک سویه حساس مورد آزمون نشان داده اند. این نتایج پس از تنظیم pH در حدود ۶ به دست آمده است، که نشانگر فعالیت ضدمیکربی پس از حذف تاثیر لاکتیک اسید تولید شده در محیط است و می تواند نشان دهنده وجود یک ماده ضدمیکربی در محیط باشد. ضمناً درصورت عدم تنظیم pH فعالیت ضدمیکربی در بسیاری از جدایه ها دیده شده است. در این پژوهش در صورت عدم تنظیم pH، ۸۵٪ از سویه ها به دو گونه *Bacillus* مطالعه شده و۶۱٪ از کل سویه ها به باکتری *E.coli* قادر به تولید مواد ضدمیکربی بوده اند.در شکل (۱) نتیجه فعالیت ضد میکربی این جدایه ها نشان داده شده است.



شکل ۱- فعالیت ضدمیکربی جدایه*E.coli*، *B. cereus* و*B. subtilis* بر روی مولرهینتون آگاروهاله عدم رشدآنها.

همچنین مقایسه پژوهش های زیر با پژوهش کنونی، و مقایسه قطر هاله ها نشانگر موفقیت سویه های حاصل از پژوهش های کنونی است (جدول ۲).

جدول ۱- فعالیت ضد میکربی سه جدایه منتخب بر روی باکتری های بیماری زا و عامل فساد شاخص باکتری های گرم+ و گرم-

شماره سویه	کد سویه	منبع سویه	قطر هاله عدم رشد بر روی پاتوژن ها (قبلازتنظیم pH) بر حسب mm			قطر هاله عدم رشد بر روی پاتوژن ها (بعد ازتنظیم pH) برحسب mm		
			E.coli	*B. cereus*	*B. subtilis*	*E.coli*	*B. cereus*	*B. subtilis*
٤٤	UTMC2698	قره تپه	٢١	٢٢	٢٢	٢٠	١٣	٢٠
٦١	UTMC2699	قره تپه	٢٠	٢٥	٢٥	١٦	عدم فعالیت	١٧
٧٢	UTMC2700	سنقر	١٩	٢٠	٢٠	١٦	عدم فعالیت	١٥

جدول۲- پژوهش های انجام شده در رابطه با تاثیرات ضد میکروبی باکتری های اسید لاکتیک و مقایسه با پژوهش کنونی

سویه های اسیدلاکتیک	هاله عدم رشد *E. coli* (mm)	هاله عدم رشد *B. cereus* (mm)	هاله عدم رشد *B. subtilis* (mm)	محدوده pH مطالعه شده	مآخذ
Lactobacillus plantarum	١٢	١٠	١٠	+٢تا٦	(16)
Lactobacillus brevis	٦–٨	٨	٧	+٢تا٨	(16)
Lactobacillus acidophilus	١٢/٦٦	١٢/٣٣	-	بدون توضیح	(17)
Lactobacillus casei	١٠/٣٣	١٢/٣٣	-	بدون توضیح	(17)
Lactobacillus reuteri	٩/٦٦	-	-	بدون توضیح	(18)
UTMC2698	٢٠	١٣	٢٠	خنثیpH	پژوهش کنونی
UTMC2699	١٦	-	١٧	خنثیpH	پژوهش کنونی
UTMC2700	١٦	-	١٥	خنثیpH	پژوهش کنونی

ازسوی دیگر بررسی نتایج آنالیز ژنتیکی 16S rRNA (جدول۳) نشان می دهد که جدایه های منتخب، متعلق به جنس *Enterococcus* می باشند. به طور کلی جنس انتروکوک شامل گونه هایی است که در صنایع غذایی اهمیت زیادی دارند. برای مثال در پنیرهای سنتی این باکتری ها باعث رسیدن پنیر از طریق پروتئولیز، لیپولیز و شکست سیترات می شود (۱۹). علاوه بر پنیرهای سنتی، انتروکوک ها در زیتون و سوسیس ها نیز موجود اند. این باکتری ها مولد باکتریوسین، که در این باکتری ها انتروسین خوانده می شوند، هستند که در این میان انتروسین E1A که توسط *E. faecium* E1 تولید می شود فعالیت ضد لیستریایی بسیار خوبی نشان می دهد(۲۰). ضمنا با دارا بودن توانایی بیوشیمیایی تجزیه سیترات، انتروکوک ها قادر به تولید متابولیت هایی مانند دی استیل، استوئین و یا استالدهید هستند که با تولید عطر

و طعم های متفاوت در محصولات غذایی حائز اهمیت اند. تجزیه سیترات توسط این باکتری ها همچنین منجر به تولید دی اکسید کربن می شود که در به وجود آوردن بافت مطلوب در برخی از غذاهای تخمیری لازم است(۲۱).استفاده مستقیم از این باکتری ها به عنوان پروبیوتیک نیز از دیگر فواید آنهاست. برای مثال محصول پروبیوتیک تجاری Ecoflora حاوی *E. faecium* است که طبق ادعای سازنده باعث درمان اسهال شده و به دلیل تولید متابولیتهای متنوع آثار ضد سرطانی و ضد میکروبی دارد(۲۲).

جدول۳- نتایج آنالیز ژنتیکی 16S rRNA

در صد شباهت	نام سویه	تعداد نوکلئوتید	Lab code	UTMC code
٪۹۹/۴۳	*Enterococcus durans*	۱۰۵۵	٤٤	۲٦۹۸
٪۹۹/۸۱	*Enterococcus faecium*	۱۰٤۲	٦۱	۲٦۹۹
٪۹۹/۱٤	*Enterococcus durans*	۱۰٤٤	۷۲	۲۷۰۰

۳-۱- نتایج تاثیربرهم کنش سویه های مولد ترکیبات ضد میکربی با استارتر های لبنی

نتایج بررسی اثر بر هم کنش سویه های مولد ترکیبات ضد میکربی با استارتر های شایع لبنی شامل *L.casei* و *L.lactis* نشان می دهد که ترکیبات ضد میکربی حاصل از ۳ سویه منتخب، فاقد اثر منفی بر رشد این استارتر ها بوده است.

٤-نتیجه گیری

این پژوهش که با هدف یافتن باکتری های اسید لاکتیک مولد ترکیبات ضد میکربی انجام گرفت، سبب یافتن ۳ جدایه امیدوار کننده از بین ۸۳ جدایه شد.مهم‌ترین نتیجه حاصل از این پژوهش، معرفی سه جدایه انتروکوکی به عنوان استارتر بوده است.این جدایه ها به عنوان سویه های مولد ترکیبات ضد میکربی بر علیه سویه های پاتوژن شاخص g^- و g^+ شامل *B. subtilis* ، *B. cereus* و *E.coli* بوده است. این سویه ها با دو مکانیسم تولید اسید و کاهشpH و نیز تولید ترکیبات ضد میکربی قادر به مقابله با عوامل فساد و بیماری هستند.توانایی تولید ترکیبات ضد میکربی، درpH خنثی، توسط این باکتری ها امکان استفاده از این مواد را به عنوان نگه دارنده های طبیعی و جایگزین فرآورده های شیمیایی بیشتر می کند. این در صورتی است که در اغلب پژوهش های انجام شده تاکنون (جدول ۲)، جدایه های باکتری اسید لاکتیک از این نظر مورد توجه قرار نگرفته اند. با وجود توانایی تولید انتروسین و پتانسیل استفاده از انتروکوک ها به عنوان پروبیوتیک، آنها با تعدادی از عفونت های انسانی مرتبط اند و هم چنین بروز بسیاری از سویه های مقاوم به ونکومایسین در این باکتری ها روز به روز در حال افزایش است(۲۱, ۲۲). لازم به ذکر است که خوشبختانه وجود این دو مورد نامطلوب در انترو کوک ها خاص سویه بوده و می توان با بررسی های جامع امکان استفاده غذایی آن ها را سنجید. به هر حال جامعه علمی به شدت در مورد استفاده ار انتروکوک ها به عنوان افزودنی غذا و یا پروبیوتیک دو قطبی است و بسیاری به دلیل بروز سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک و امکان فعال شدن فاکتورهای ویرولانس این باکتری با استفاده غذایی آن ها مخالف اند. بنابراین با وجود پتاسیل های فراوان اعضای این گروه از باکتری ها در صنایع غذایی از جمله نقش آن ها در بهبود کیفیت انواع پنیر، تولید مواد موثر

ضد میکروبی و توانایی امیدوار کننده برای استفاده به عنوان نگهدارنده طبیعی، همواره نگرانی هایی در استفاده از این باکتری ها وجود دارد که خود تحقیقات بیشتر را در این زمینه می طلبد.

۵-منابع

1. Collins, JE. 1997. Impact of changing consumer lifestyles on the emergence/reemergence of foodborne pathogens. *Emerging infectious diseases*, 3(4):471.

2. Crowley, S., Mahony, J., van Sinderen, D. 2013. Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives. *Trends in food science & technology*, 33(2):93-109.

3. Doyle, MP., Schoeni, JL. 1987. Isolation of Escherichia coli O157: H7 from retail fresh meats and poultry. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(10):2394-4. Helander, IM., Von Wright, A., Mattila-Sandholm, T.1997. Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. *Trends in Food Science & Technology* , 8(5):146-50.

5. Ghariri, T., Frere, J., Berjeaud, J., Manai, M. 2008. Purification and characterisation of bacteriocins produced by Enterococcus faecium from Tunisian rigouta cheese. *Food Control*, 19(2):162-9.

6. Giraffa, G. 2003. Functionality of enterococci in dairy products. *International journal of food microbiology*, 88(2):215-22.

7. Jay, JM., Loessner, MJ., Golden, DA. 2008. Modern food microbiology: Springer Science & Business Media

8. Jones, E., Salin, V., Williams, GW. 2005. Nisin and the market for commercial bacteriocins. Consumer and Product Research CP-01-05, Texas Agribusiness Market Research Center, Texas A&M University, College Station, Tex, USA

9. Kazemi, Reza., Mirsasan Mirpour NG. 2010. Evaluation of antimicrobial activity of lacti acid bacteria isolated from probiotic products. *Islamic Azad university Journal of Microbial Biotechnology*, 2(7):8.

10. Khalid, K. 2011. An overview of lactic acid bacteria. I*nternational journal of Biosciences,* 1(3):1-13.

11. Liu, S-n., Han, Y., Zhou, Z-j. 2011. Lactic acid bacteria in traditional fermented Chinese foods. *Food Research International.* , 44(3):643-51.

12. Moreno, MF., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., De Vuyst, L. 2006. The role and application of enterococci in food and health. *International journal of food microbiology*, 106(1):1-24.

13. Ogunbanwo, S., Sanni, A., Onilude, A. 2003. Characterization of bacteriocin produced by Lactobacillus plantarum F1 and Lactobacillus brevis OG1. *African Journal of Biotechnology*, 2(8):219-27.

14. Oladapo, A., Abiodun, O. 2014. The inhibitory effect of different chemical food preservatives on the growth of selected food borne pathogenic bacteria. *African Journal of Microbiology Research*, 8(14):1510-5.

15. Olsen, SJ., MacKinnon, LC., Goulding, JS., Bean, NH., Slutsker, L. 2000. Surveillance for foodborne-disease outbreaks—United States, 1993–1997. *MMwR CDC Surveill Summ*,49(1):1-62.

16. Perez, RH., Zendo, T., Sonomoto, K, editors. 2014. Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. Microbial cell factories, BioMed Central.

17. Sarantinopoulos, P., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E. 2001. Citrate metabolism by Enterococcus faecalis FAIR-E 229. *Applied and environmental microbiology*, 67(12):5482-7.

18. Scallan, E., Hoekstra, RM., Angulo, FJ., Tauxe, RV., Widdowson, M-A., Roy, SL et al. 2011. Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerging infectious diseases* ,17(1):7.

19. Shirazi, Leila., Soltandalal, Mohammad Mehdi. Evaluation of antimicrobial activity of Lactobacillus reuteri and Lactobacillus acidophilus on several pathogenic Enterobacteriacea bacteria. *Islamic Azad university Journal of Microbial Biotechnology.* 2011;3(9):6

20. Smid, E., Enckevort, F., Wegkamp, A., Boekhorst, J., Molenaar, D., Hugenholtz, J et al. 2005. Metabolic models for rational improvement of lactic acid bacteria as cell factories. *Journal of applied microbiology*, 98(6):1326-31.

21. Spelhaug, SR., Harlander, SK. 1989. Inhibition of foodborne bacterial pathogens by bacteriocins from Lactococcus lactis and Pediococcus pentosaceous. *Journal of Food Protection®*, 52(12):856-62.

22. Upton, P., Coia, J. 1944. Outbreak of Escherichia coli 0157 infection associated with pasteurised milk supply. *The Lancet.* 344(8928):1015.

(Original Research Paper)

Isolation and Identification of Antimicrobial Compounds Producing Lactic Acid Bacteria from Dairy Products of Kermanshah Province, Iran

Sajedeh Shariatinia[1], Javad Hamedi [2*], Setareh Haghighat[3]

1- MSc Graduated of Microbiology, Faculty of Advanced Sciences and Technologies, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2- Department of Microbial Biotechnology, School of Biology and Center of Excellence in Phylogeny of Living Organisms, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran.Iran.
3- Department of microbiology, Faculty of Advanced Sciences and Technologies, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Received:21/01/2018 Accepted: 13/04/2019

Abstract

Probiotics are normal flora of the mouth and digestive tract and have beneficial effects on the health of the consumer by regulating the microflora of the intestine, lowering blood cholesterol, stimulating immune system, improving lactose metabolism and the anti-cancer activities. They are also found in meat, vegetables, and dairy products. Most of probiotic bacteria belong to the Lactic acid bacteria group. Probiotics such as lactobacilli prevent the development of a wide range of human and animal's pathogens through producing antimicrobial compounds.In present study, 83 bacterial strains were isolated from 20 yoghurt samples which were collected from rural area of Kermanshah province, West of Iran. Samples were cultured on MRS agar and incubated at 30^{o}C, in CO_2 atmosphere. Gram-positive and catalase negative strains were considered as LAB. The antibacterial activities of these isolates were evaluated against *Bacillus subtilis, Bacillus cereus* and *Escherichia coli,* as food-born bacterial models using agar diffusion assay. To reduce antibacterial activity of produced lactic acid by the isolates, the supernatants of their fermentation broth were adjusted at pH 6.The results showed that maximum inhibition activity was belonged to strain 44, 61 and 72. These strains have antimicrobial activity against all tested g+ and g- bacteria. These investigated isolates showed no antibacterial activity on tested starter, including *Lactobacillus casei* and *Lactococcuslactis*. 16S rRNA gene analysis of strains 44, 61 and 72 revealed that all three potent LAB are belonged to *Enterococcus* genus. The results of current study showed that isolated LAB from traditional Kurdish cheeses are able to inhibit the growth of food-born spoilage and pathogenic bacteria. Metabolites of native can be considered as suitable alternatives chemicals with side-effects.

Keywords: Antimicrobial activity, Food Preservative, Lactic Acid Bacteria, Probiotic

[*]Corresponding Author: jhamedi@ut.ac.ir