



Synergistic effect of antimicrobial properties of bacteriocin-producing isolates of *Lactobacillus* isolated from traditional dairy products with some common antibiotics

Shima Abdizadeh ¹, Seyed Mohammad Mehdi Mahmoodi ², Farahnaz Javanmardi ³

¹ Master Graduate, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran. ² Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran. ³ Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran.

Abstract

Background and Objectives: Bacteriocins are ribosomal peptides produced by many bacteria and can inhibit the growth of related strains and sometimes other species and genera at low concentrations. The aim of the present study was to produce bacteriocins and investigate their inhibitory effect and possible synergy with some antibiotics on pathogenic bacteria.

Materials and methods: In a cross-sectional study, several *Lactobacillus* species were isolated from traditional dairy products and their antibacterial properties were investigated against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. An isolate with the highest antibacterial activity was used for mass production of bacteriocin. Partial purification of the bacteriocin was performed using ammonium sulfate and dialysis bag, and its protein nature was confirmed by proteinase K. The minimum inhibitory concentration, lethality, and possible synergistic effect with the antibiotics ciprofloxacin and vancomycin were investigated.

Results: The produced bacteriocin had an inhibitory effect on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* at concentrations higher than 30.25 µg/ml and 121 µg/ml, respectively, and a lethal effect on *Staphylococcus aureus* at concentrations higher than 242 µg/ml. The checkerboard combination of different concentrations of bacteriocin with antibiotics showed that the produced bacteriocin had a synergistic effect with vancomycin and an additive effect with ciprofloxacin. Molecular identification showed 97% similarity of the isolate with *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* ATCC 11842.

Conclusion: Strains of *Lactobacillus* are capable of producing bacteriocins with an inhibitory effect on pathogenic bacteria and have the potential to synergize with some common antibiotics.

Key words: Bacteriocin, *Lactobacillus delbrueckii*, dairy products, Synergism.

Received: 30 August 2024

Revised: 6 October 2024

Accepted: 30 November 2024

Correspondence to: seyed mohammad Mehdi mahmoodi

Tel: +98 9177044800

E-mail: smm.mahmoodi@iau.ac.ir

Journal of Microbial World 2024, 17 (3): 182 - 197

DOI: <https://doi.org/10.82363/jmw.2024.1201623>



Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.



تأثیر هم‌افزایی ویژگی‌های ضد میکروبی جدایه‌های لاکتوباسیلوس مولد باکتریوسین جدا شده از لبنیات سنتی با برخی از آنتی‌بیوتیک‌های متداول

شیما عبدی‌زاده^۱، سید محمدمهدی محمودی^{۲*}، فرحناز جوانمردی^۳

^۱ کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران. ^۲ استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران. ^۳ استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: باکتریوسین‌ها پپتیدهای ریبوزومی هستند که توسط بسیاری از باکتری‌ها تولید می‌شوند و می‌توانند در غلظت‌های کم از رشد نژادهای خویشاوند و گاهی دیگر گونه‌ها و جنس‌ها ممانعت کنند. هدف از تحقیق حاضر، تولید باکتریوسین و بررسی اثر مهار و هم‌افزایی احتمالی آن با برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها بر باکتری‌های بیماریزا بود.

مواد و روش‌ها: در یک مطالعه مقطعی، چندین گونه لاکتوباسیلوس از محصولات لبنی سنتی جداسازی شد و خواص ضدباکتریایی آن‌ها بر علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناس آئروجینوزا* مورد بررسی قرار گرفت. یک جدایه با بیشترین اثر ضدباکتریایی، در تولید انبوه باکتریوسین به کار گرفته شد. خالص‌سازی نسبی باکتریوسین، توسط سولفات آمونیوم و کیسه دیالیز انجام و ماهیت پروتئینی آن توسط پروتئیناز K اثبات شد. حداقل غلظت ممانعتی، کشندگی و اثر هم‌افزایی احتمالی آن با آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین و ونکومايسين بررسی شد.

یافته‌ها: باکتریوسین تولیدی، در غلظت‌های بالاتر از $30/25 \mu\text{g/ml}$ و $121 \mu\text{g/ml}$ به ترتیب برای *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناس آئروجینوزا* اثر بازدارندگی و در غلظت‌های بالاتر از $242 \mu\text{g/ml}$ برای *استافیلوکوکوس اورئوس* اثر کشندگی داشت. ترکیب شطرنجی غلظت‌های مختلف باکتریوسین با آنتی‌بیوتیک‌ها نشان داد که باکتریوسین تولیدی، با ونکومايسين اثر هم‌افزایی و با سیپروفلوکساسین اثر جمع‌شوندگی دارد. شناسایی مولکولی، شباهت ۹۷ درصدی جدایه را با لاکتوباسیلوس دلبروکئی زیرگونه بولگاریکوس ATCC 11842 نشان داد.

نتیجه‌گیری: سویه‌هایی از لاکتوباسیلوس قادر به تولید باکتریوسین با اثر مهار بر باکتری‌های بیماریزا بوده و قابلیت هم‌افزایی با برخی از آنتی‌بیوتیک‌های رایج را دارند.

کلمات کلیدی: باکتریوسین، لاکتوباسیلوس دلبروکئی، محصولات لبنی، هم‌افزایی.

پذیرش مقاله: ۱۴۰۳/۹/۱۰

ویرایش مقاله: ۱۴۰۳/۷/۱۵

دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۶/۹

مقدمه

مشکل بزرگ جهانی تبدیل شده است. محققین بسیاری در سراسر جهان به دنبال یافتن و دستیابی به روش‌های جایگزین برای مبارزه با میکروب‌های بیماری‌زا هستند. تاکنون راهکارهای متعددی همچون استفاده از باکتری‌های شکارچی، استفاده از باکتریوفاژها و یا استفاده از باکتری‌های مولد

مقاومت آنتی‌بیوتیکی خصیصه‌ای است که امروزه به‌صورت گسترده‌ای در بین سایر میکروارگانیسم‌ها انتشار یافته و به یک

(*) آدرس برای مکاتبه: گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران.

تلفن: ۰۹۱۷۷۰۴۴۸۰۰

پست الکترونیک: smm.mahmoodi@iaau.ac.ir



کوکوباسیل، فاقد اسپور، فاقد آنزیم کاتالاز و سیتوکروم‌ها هستند. عمدتاً غیر متحرک و بی‌هوازی اختیاری بوده و pH مناسب رشدشان ۵ تا ۶/۵ است. همچنین وجود ۵ درصد دی اکسیدکربن در محیط تأثیر به‌سزایی بر رشد آن‌ها دارد. از نظر تغذیه‌ای سخت رشد بوده و به انواعی از ویتامین‌ها و اسیدهای آمینه نیازمند می‌باشند. از طریق تخمیر قندها تولید انرژی می‌کنند و اسید لاکتیک، بخش عمده‌ای از فرآورده‌های تخمیری آن‌ها را تشکیل می‌دهد. برخی از لاکتوباسیلوس‌ها دارای خاصیت پروبیوتیکی بوده و کاربرد ویژه‌ای در تولید فرآورده‌های لبنی پروبیوتیکی دارند (۱۱ و ۱۲ و ۱۳).

تاکنون تحقیقات متعددی در خصوص اثر هم‌افزایی بین باکتریوسین‌ها با برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها انجام گرفته است. به عنوان نمونه، مونتالبان (Montalban) و همکاران در سال ۲۰۲۰، در بررسی اثر ممانعتی باکتریوسین AS-48 که یک باکتریوسین حلقوی و بسیار پایدار نسبت به شرایط محیطی است، دریافتند که این باکتریوسین دارای اثر بازدارندگی قوی بر گونه‌های مختلف انتروکوک بویژه *انتروکوکوس فیکالیس* (*Enterococcus faecalis*) می‌باشد و همچنین با آنتی‌بیوتیک‌های ونکومايسين، جنتامایسین و کوآموکسی کلاو دارای اثر هم‌افزایی بوده و در غلظت‌های کمتر از ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر می‌تواند عملکرد این آنتی‌بیوتیک‌ها را افزایش داده و حتی بر علیه انتروکوک‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک نیز اثر ممانعتی قابل توجهی از خود نشان دهد (۱۴).

تودورو (Todorov) و همکارانش در سال ۲۰۱۸ در بررسی اثر هم‌افزایی بین باکتریوسین تولید شده توسط لاکتوباسیلوس پلنتاروم (*Lactobacillus plantarum* SH8ST) با ونکومايسين، پروپولیس و EDTA جهت کنترل و مهار تولید بیوفیلم توسط لیستریا مونوسیتوژنز (*Listeria monocytogenes*) دریافتند که ترکیب این باکتریوسین با ونکومايسين، بسیار موثرتر از ترکیب باکتریوسین با پروپولیس و یا باکتریوسین با EDTA می‌تواند تشکیل بیوفیلم توسط این باکتری را مهار نماید (۱۵).

چای (Chi) و همکاران در سال ۲۰۱۸ نشان دادند که garvicin KS که یک باکتریوسین جدید تولید شده توسط لاکتوکوکوس

باکتریوسین، که اساس همگی فرآیندهای طبیعی مبارزه و رقابت میکروارگانیسم‌ها با یکدیگر هستند، پیشنهاد شده و یا مورد آزمایش قرار گرفته است و به نظر می‌رسد که می‌توانند در برخی موارد راهگشا باشند (۱، ۲ و ۳). باکتریوسین‌ها نوعی سموم پروتینی با وزن مولکولی بین ۹۰۰ تا ۵۸۰۰ دالتون هستند که توسط تعداد قابل توجهی از باکتری‌های گرم مثبت و معدودی از باکتری‌های گرم منفی در فاز اولیه رشد باکتری تولید می‌شوند و قادرند با اتصال به نواحی خاصی از دیواره و غشای سلولی دیگر باکتری‌ها و ایجاد اختلال در استحکام و عملکرد غشاء و یا آسیب رساندن به ریبوزوم‌ها موجب مرگ باکتری‌های رقیب شوند. در اغلب موارد برخلاف آنتی‌بیوتیک‌ها که طیف عملکرد گسترده‌تری دارند بیشترین تأثیر باکتریوسین‌ها بر سویه‌های خویشاوند باکتری مولد باکتریوسین می‌باشد (۴ و ۵ و ۶). همین ویژگی عملکرد اختصاصی باکتریوسین موجب شده که امروزه به‌عنوان یک داروی هدفمند مورد توجه قرار گیرد به گونه‌ای که شاید استفاده از آن بتواند بدون آسیب رساندن به فلور میکروبی بدن میزبان، فقط باکتری‌های بیماریزا را تحت تأثیر قرار دهد. البته نتایج برخی از تحقیقات نشان می‌دهد که این ویژگی عملکرد اختصاصی در همه باکتریوسین‌ها وجود نداشته و برخی از آن‌ها طیف عملکرد وسیع‌تری دارند به گونه‌ای که می‌توانند علاوه بر نژادهای خویشاوند، بر دیگر گونه‌ها یا حتی جنس‌های باکتریایی نیز اثر بازدارنده داشته باشند. اغلب باکتریوسین‌ها به راحتی توسط آنزیم‌های پروتئولیتیک به‌ویژه پروتئازهای دستگاه گوارش پستانداران تجزیه شده و این امر باعث شده تا آن‌ها برای مصرف انسانی ایمن باشند درحالی‌که آنتی‌بیوتیک‌ها کاربردشان در مواد غذایی غیر قانونی است و اغلب دارای اثرات جانبی هستند. امروزه نایسین که یک باکتریوسین تولید شده توسط برخی از سویه‌های لاکتوکوکوس لاکتیس (*Lactococcus lactis*) می‌باشد به‌عنوان مهمترین باکتریوسین تایید شده جهت پیشگیری از رشد باکتری‌های بیماریزا در صنایع غذایی کاربرد دارد (۷، ۸، ۹ و ۱۰).

لاکتوباسیلوس‌ها باکتری‌هایی گرم مثبت، میله‌ای و گاهی

میکروسکوپ به صورت باسیل‌های بلند و باریک گرم مثبت و فاقد اسپور نمایان شده و آزمون کاتالاز و اکسیداز منفی داشتند به‌عنوان لاکتوباسیلوس در نظر گرفته شده و از باقی‌مانده کلنی آن‌ها جهت دستیابی به کشت خالص، بر روی پلیت‌های ام آر اس آگار کشت مجدد داده شد (۱۸ و ۱۹).

ب) بررسی توانایی جدایه‌ها در تولید باکتریوسین: از دو باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناس آئروجینوزا* به‌عنوان باکتری‌های هدف استفاده گردید. برای این منظور ابتدا کشت ۱۸ ساعته این باکتری‌ها در محیط نوترینت برات تهیه شد سپس با افزودن تدریجی محیط کشت استریل به لوله‌های کشت باکتری و با استفاده از لوله استاندارد ۰/۵ مک فارلند، غلظت لوله‌های کشت، معادل $10^8 \times 1/5$ باکتری در واحد حجم تنظیم شد. از این باکتری‌ها به میزان ۰/۱ میلی‌لیتر در سطح محیط کشت مولر هیتون آگار کشت داده شد و بعد از گذشت ۳۰ دقیقه، توسط سوزن کشت از کلنی‌های لاکتوباسیلوس نمونه برداری کرده و به صورت نقطه‌ای بر روی سطح پلیت باکتری‌های هدف قرار داده شد، سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند. جدایه‌هایی از لاکتوباسیلوس که توانسته بودند هاله عدم رشد قابل توجهی در اطراف خود ایجاد نمایند جهت تولید باکتریوسین انتخاب شدند (۱۹).

ج) بررسی عملکرد باکتریوسین ناخالص تولیدی با روش انتشار /از دیسک کاغذی: از جدایه‌هایی که در مرحله نخست هاله عدم رشد قابل توجهی داشتند، در لوله‌های حاوی محیط ام آر اس برات کشت داده شد و لوله‌ها به مدت ۴۸ ساعت در محفظه شمعی و در دمای ۳۵ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند. سپس لوله‌ها را با گشتاور ۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ نموده و از مایع رویی آن‌ها جهت آغشته نمودن تعدادی دیسک کاغذی بلانک ۵ میلی‌متری (به میزان ۳۰ میکرولیتر به ازای هر دیسک) استفاده گردید. بعد از خشک شدن، دیسک‌ها را در سطح پلیت‌های حاوی باکتری‌های هدف قرار داده و بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری، هاله عدم رشد ایجاد شده در اطراف دیسک‌ها بررسی شد (۲۰).

گارویه (*Lactococcus garvieae*) می‌باشد، در خصوص باکتری‌های گرم مثبت طیف عملکرد وسیعی داشته و قادر است رشد ۱۹ گونه مختلف از باکتری‌های گرم مثبت مورد مطالعه را مهار نماید، اما در مورد باکتری‌های گرم منفی مورد بررسی در آن تحقیق، تنها بر *اسیتوباکتر (Acinetobacter)* اثر ممانعتی داشت. در آن تحقیق همچنین مشخص گردید که ترکیب این باکتریوسین با پلی میکسین B دارای اثر هم‌افزایی بوده و در این حالت می‌تواند علاوه بر *اسیتوباکتر*، رشد *شریشیا کلی (Escherichia coli)* را نیز به خوبی مهار نماید (۱۶).

در تحقیقی دیگر، بیسواس (Biswas) و همکاران در سال ۲۰۱۷ دریافتند که باکتریوسین‌های استخراج شده از جدایه‌های لاکتوباسیلوس، پدیوکوکوس و انتروکوکوس، در ترکیب با آنتی‌بیوتیک‌های سفوتاکسیم، پلی میکسین B و ایمی‌پنم اثر هم‌افزایی داشته و می‌توانند بسیار موثرتر از آنتی‌بیوتیک تنها، رشد پاتوژن‌های مولد آنزیم‌های بتالاکتاماز را مهار نمایند (۱۷). هدف از تحقیق حاضر، جداسازی و شناسایی مولکولی لاکتوباسیلوس‌های مولد باکتریوسین و بررسی اثر مهارتی یا کشندگی باکتریوسین تولیدی بر برخی از باکتری‌های بیماری‌زا بود. همچنین اثر هم‌افزایی احتمالی بین باکتریوسین تولیدی با آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین و ونکومایسین نیز مورد بررسی قرار گرفت. شناسایی و معرفی چنین سویه‌هایی که بتوانند با تولید باکتریوسین، خواص ضدباکتریایی مطلوبی را از خود نشان دهند و یا بتوانند عملکرد آنتی‌بیوتیک‌های رایج را بهبود بخشند می‌تواند در درمان برخی از عفونت‌ها به‌عنوان داروی مکمل و یا جایگزین کاربرد مناسبی داشته باشد.

مواد و روش‌ها

الف) جداسازی لاکتوباسیلوس: از چندین نمونه محصولات لبنی سنتی شامل ماست، دوغ، کشک و پنیر با روش رقیق سازی متوالی و کشت در محیط ام آر اس آگار (MRS agar) برای جداسازی لاکتوباسیلوس استفاده گردید. پلیت‌های کشت به مدت ۴۸ ساعت در محفظه شمعی و دمای ۳۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. کلنی‌های خاکستری، که در زیر

استفاده شد. برای این منظور ۱ میلی لیتر از باکتریوسین خالص شده با ۱ میلی لیتر محلول پروتئیناز K (با غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر) مخلوط و به مدت ۲ ساعت در گرمخانه ۳۵ درجه قرار داده شد. سپس میزان ۳۰ میکرولیتر از این باکتریوسین تیمار شده را به دیسک کاغذی بلانک افزوده و پس از خشک شدن، بر روی پلیت باکتری‌های هدف قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در ۳۵ درجه سلسیوس، پلیت از نظر تشکیل هاله عدم رشد مورد بررسی قرار گرفت (۱۵، ۲۳ و ۲۴).

و) تعیین حداقل غلظت بازدارنده باکتریوسین و آنتی‌بیوتیک‌ها و بررسی هم‌افزایی احتمالی بین آن‌ها: از دو آنتی‌بیوتیک ونکومايسين و سیپروفلوکساسین استفاده شد و حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و پدیده هم‌افزایی احتمالی آن‌ها با باکتریوسین تولیدی، در میکروپلیت ۹۶ خانه ای مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به استاندارد CLSI، در خصوص آنتی‌بیوتیک‌های ونکومايسين و سیپروفلوکساسین بایستی رقت‌هایی از این آنتی‌بیوتیک‌ها در محدوده ۰/۰۶۲۵ تا ۶۴ میکروگرم در میلی لیتر تهیه می شد. برای این منظور، در مورد هر آنتی بیوتیک ابتدا با حل نمودن ۱۰۰ میلی گرم از پودر آنتی بیوتیک در ۷۸۱/۲۵ میلی لیتر آب مقطر استریل، محلولی با غلظت ۱۲۸ میکروگرم در میلی لیتر تهیه شد سپس با روش رقیق سازی متوالی در ۱۱ لوله (هر کدام حاوی ۲ میلی لیتر آب مقطر استریل) رقت‌های ۶۴، ۳۲، ۱۶، ۸، ۴، ۲، ۱، ۰/۵، ۰/۲۵، ۰/۱۲۵ و ۰/۰۶۲۵ تهیه شدند (۲۴، ۲۵، ۲۶ و ۲۷).

به منظور بررسی حداقل غلظت ممانعت کننده باکتریوسین و آنتی‌بیوتیک‌ها بر باکتری‌های هدف و همچنین بررسی پدیده هم‌افزایی بین آن‌ها، از دو میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای (هر میکروپلیت جهت بررسی یکی از آنتی‌بیوتیک‌ها) با روش ترکیب شطرنجی (checker board) استفاده شد. در این روش، نحوه افزودن باکتریوسین و آنتی‌بیوتیک به خانه‌های میکروپلیت به گونه‌ای بود که در تمام ۱۲ ستون میکروپلیت (از بالا به پایین) غلظت باکتریوسین به یک نسبت کاهش می‌یافت و در تمام ۸ ردیف میکروپلیت نیز (از راست به چپ) غلظت آنتی‌بیوتیک به یک نسبت کاهش می‌یافت. برای رسیدن به این

د) تولید باکتریوسین در حجم زیاد و خالص سازی با سولفات آمونیوم: در این مرحله، یک جدایه لاکتوباسیلوس که از نظر تولید باکتریوسین و ایجاد هاله عدم رشد وضعیت مطلوب تری داشت انتخاب و در یک ارلن حاوی ۵۰۰ میلی لیتر محیط ام آر اس براث کشت داده شد. ارلن به مدت ۴۸ ساعت بر روی شیکر با گشتاور ۱۵۰ دور در دقیقه و در دمای ۳۵ درجه سلسیوس قرار داده شد. سپس محتویات ارلن را در چند لوله سانتریفیوژ ریخته و لوله‌ها با گشتاور ۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع رویی لوله‌ها جمع آوری گردید و به یک ارلن جدید انتقال داده شد. به منظور رسوب دهی و خالص سازی باکتریوسین تولیدی، با افزودن تدریجی ۲۳۶ گرم سولفات آمونیوم تازه ساییده شده به ارلن در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و هم زدن مداوم، غلظت نهایی سولفات آمونیوم به ۷۰ درصد رسانده شد. پس از گذشت ۲ ساعت، محتویات ارلن با گشتاور ۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. رسوب حاصله به دقت جمع آوری و در ۵ میلی لیتر آب مقطر استریل حل شد. برای حذف نمک، محلول باکتریوسین در کیسه دیالیز ۱۰۰۰ دالتونی ریخته شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۴ درجه سلسیوس، در بشر حاوی آب دیونیزه غوطه ور گردید و هر ۶ ساعت آب بشر تعویض گردید. سپس محتویات کیسه دیالیز در یک پلیت که وزن آن به دقت تعیین شده بود ریخته شد و تا خشک شدن کامل رسوب باکتریوسین، در آن ۴۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. برای حذف هرگونه رطوبت احتمالی، پلیت حاوی رسوب باکتریوسین به مدت ۳ ساعت در محفظه دسیکاتور قرار داده شد. سپس با اندازه گیری مجدد وزن پلیت حاوی رسوب، وزن باکتریوسین تولیدی مشخص گردید. در پایان، رسوب باکتریوسین را در ۱۲ میلی لیتر محیط کشت مولر هیتون براث استریل با غلظت مضاعف حل نموده و جهت اطمینان از عدم آلودگی، از فیلتر سرنگی ۰/۲۲ میکرون عبور داده شد (۲۰ و ۲۱ و ۲۲).

ه) اثبات ماهیت پروتینی باکتریوسین تولیدی: به منظور اثبات ماهیت پروتینی باکتریوسین تولیدی، از آنزیم پروتئیناز K

پس از اتمام زمان گرمخانه‌گذاری، با توجه به خانه‌های ستون ۱ میکروپلیت، کمترین غلظتی از باکتریوسین که توانسته بود رشد باکتری هدف را متوقف سازد به عنوان MIC_B در نظر گرفته شد. در ردیف ۸ میکروپلیت نیز، کمترین غلظتی از آنتی‌بیوتیک که رشد باکتری را متوقف ساخته بود به‌عنوان MIC_A در نظر گرفته شد. جهت ارزیابی پدیده هم‌افزایی بین باکتریوسین و آنتی‌بیوتیک، وضعیت رشد یا عدم رشد باکتری هدف در خانه‌هایی که حاوی ترکیبی شطرنجی از باکتریوسین و آنتی‌بیوتیک با تمام حالت‌های ممکن بودند، مورد ارزیابی قرار گرفت. در این خصوص، خانه‌ای که کمترین غلظت باکتریوسین (در ترکیب با آنتی‌بیوتیک) را داشت و توانسته بود بواسطه حضور باکتریوسین، از رشد باکتری هدف جلوگیری نماید به‌عنوان MIC_{B+A} انتخاب شد و خانه‌ای که کمترین غلظت آنتی‌بیوتیک (در ترکیب با باکتریوسین) را داشت و توانسته بود بواسطه حضور آنتی‌بیوتیک، از رشد باکتری هدف جلوگیری نماید به‌عنوان MIC_{A+B} انتخاب شد. طبق تعریف، شاخص نسبی غلظت ممانعت‌کنندگی (fractional inhibitory concentration index)، به‌صورت زیر محاسبه می‌گردد:

$$FIC_{Bacteriocin} = \frac{MIC_{B+A}}{MIC_B}$$

$$FIC_{Antibiotic} = \frac{MIC_{A+B}}{MIC_A}$$

$$FIC \text{ index} = FIC_{Bacteriocin} + FIC_{Antibiotic}$$

اگر $FIC \text{ index} \leq 0.5$ باشد نشانگر پدیده هم‌افزایی بین آنتی‌بیوتیک و باکتریوسین خواهد بود.

اگر $0.5 < FIC \text{ index} \leq 1$ باشد نشانگر مجموع اثر ضدباکتریایی آنتی‌بیوتیک و باکتریوسین خواهد بود.

اگر $FIC \text{ index} \leq 2$ باشد نشانگر عدم وجود رابطه بین آنتی‌بیوتیک و باکتریوسین خواهد بود.

اگر $FIC \text{ index} > 2$ باشد نشانگر پدیده تضاد بین آنتی‌بیوتیک و باکتریوسین خواهد بود (۲۸ و ۳۰).

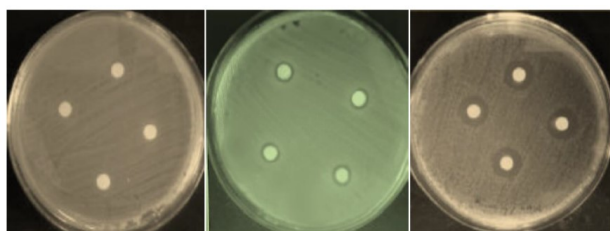
(ز) بررسی حداقل غلظت کشنده (MBC) باکتریوسین و آنتی‌بیوتیک‌ها: برای تعیین MBC باکتریوسین، از خانه‌های فاقد

هدف، در تمام خانه‌های ردیف اول، میزان ۲۰۰ میکرولیتر از محلول غلیظ باکتریوسین ریخته شد. در بقیه خانه‌های میکروپلیت میزان ۱۰۰ میکرولیتر محیط مولر هیتون براث با غلظت مضاعف ریخته شد. سپس عمل رقیق سازی متوالی (از بالا به سمت پایین) در مورد تمام ستون‌های ۱ تا ۱۲ انجام گرفت به این ترتیب که در مورد هر ستون، به کمک سمپلر میزان ۱۰۰ میکرولیتر از خانه بالایی برداشته و به خانه زیرین آن اضافه گردید و این عمل تا ردیف ۷ ادامه یافت و نهایتاً از خانه‌های ردیف ۷ میزان ۱۰۰ میکرولیتر دور ریخته شد. با این روش غلظت باکتریوسین در هر ردیف میکروپلیت نسبت به ردیف بالایی آن نصف شده بود، ضمناً تمام خانه‌های ردیف ۸ فاقد باکتریوسین بودند (۲۳ و ۲۷ و ۲۸).

برای افزودن آنتی‌بیوتیک به خانه‌های میکروپلیت، از لوله آنتی‌بیوتیک با غلظت ۱۲۸ میکروگرم در میلی‌لیتر، به تمام خانه‌های ستون ۱۲ میزان ۱۰۰ میکرولیتر افزوده شد. در نتیجه همزمان غلظت باکتریوسین و آنتی‌بیوتیک موجود در این خانه‌ها نصف شد. سپس از لوله آنتی‌بیوتیک با غلظت ۶۴ میکروگرم در میلی‌لیتر، به تمام خانه‌های ستون ۱۱ میزان ۱۰۰ میکرولیتر افزوده شد. به همین ترتیب، در مورد بقیه ستون‌های میکروپلیت نیز (تا ستون ۲) عمل افزودن دیگر رقت‌های آنتی‌بیوتیک انجام گرفت. به خانه‌های ستون ۱ آنتی‌بیوتیک اضافه نشد (۲۵ و ۲۹).

به این ترتیب، در ستون ۱ میکروپلیت فقط باکتریوسین با غلظت‌های متفاوت وجود داشت و در ردیف ۸ میکروپلیت نیز فقط آنتی‌بیوتیک با غلظت‌های متفاوت وجود داشت. در بقیه خانه‌های پلیت، ترکیبی شطرنجی از تمام غلظت‌های موجود باکتریوسین و آنتی‌بیوتیک وجود داشت. اولین خانه ردیف ۸ به عنوان کنترل مثبت (فاقد باکتریوسین و آنتی‌بیوتیک) فقط حاوی محیط کشت بود. پس از آماده‌سازی میکروپلیت‌ها، میزان ۱۰ میکرولیتر از کشت ۱۸ ساعته باکتری هدف که میزان کدورت آن قبلاً به کمک لوله استاندارد ۰/۵ مک فارلند تنظیم شده بود، به تمام خانه‌های میکروپلیت اضافه گشت و میکروپلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند (۲۵ و ۲۶).

۱۱ میلی‌متر و برای باکتری سودوموناس آئروجینوزا ۷ میلی‌متر بود. همچنین در این تحقیق جهت اثبات ماهیت پروتئینی باکتریوسین تولیدی، از روش تیمار با پروتئیناز K استفاده گردید که عدم تشکیل هاله ممانعتی بیانگر صحت این مطلب بود (شکل ۱).



شکل ۱: بررسی اثر ضدباکتریایی باکتریوسین بر باکتری‌های هدف، راست: استافیلوکوکوس اورئوس؛ وسط: سودوموناس آئروجینوزا؛ چپ: تیمار با پروتئیناز K.

حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی باکتریوسین تولیدی در ستون ۱ میکروپلیت‌ها، و حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی آنتی‌بیوتیک‌ها نیز در ردیف H میکروپلیت‌ها مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ۱). در این جدول، همچنین نتایج حداقل غلظت‌کننده باکتریوسین و آنتی‌بیوتیک‌ها نیز ثبت شده است.

جدول ۱: نتایج MIC و MBC باکتریوسین و آنتی‌بیوتیک‌ها بر باکتری‌های هدف.

باکتری هدف		سیپروفلوکساسین		باکتریوسین		ونکومايسين	
MBC (µg/ml)	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)	MIC (µg/ml)
۳۰/۲۵	۲۴۲	۰/۵	۲	۲	۲	۴	۲
۱۲۱	-	۰/۵	۱	-	-	-	-

استافیلوکوکوس اورئوس

سودوموناس آئروجینوزا

در این تحقیق، برای بررسی وقوع پدیده هم‌افزایی بین باکتریوسین تولیدی با آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی، وضعیت رشد یا عدم رشد باکتری‌های هدف در تمام حالت‌های ممکن ترکیب باکتریوسین با آنتی‌بیوتیک‌ها مورد آزمون قرار گرفت که نتایج آن در جداول ۲ و ۳ و ۴ نشان داده شده است.

رشد ستون ۱ میکروپلیت نمونه برداری شد و بر روی محیط مولر هینتون براث کشت داده شد. در خصوص MBC آنتی‌بیوتیک‌ها نیز از خانه‌های فاقد رشد ردیف ۸ نمونه‌برداری شد و بر روی محیط مولر هینتون براث کشت داده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند. کمترین غلظت باکتریوسین یا آنتی‌بیوتیک که توانسته بود باکتری هدف را از بین ببرد به عنوان MBC باکتریوسین یا آنتی‌بیوتیک در نظر گرفته شد (۱۷).

ح) شناسایی مولکولی لاکتوباسیلوس جداسازی شده: در این تحقیق، با استفاده از کیت استخراج DNA (EX6021، سیناکلون) ژنوم باکتری منتخب جداسازی و خالص‌سازی گردید. سپس از جفت پرایمرهای همگانی که بخشی از ژن 16S rDNA باکتری را شناسایی و مورد تکثیر قرار می‌دادند برای اجرای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز استفاده گردید. توالی نوکلئوتیدی پرایمر رفت مورد استفاده، 5'CCAGCAGCCGCGGTAATAC3' و توالی نوکلئوتیدی پرایمر برگشت مورد استفاده، 5'ATCGGTACCTTGTTACGACTTC3' بود. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر و توسط دستگاه ترموسایکلر (BIO-RAD مدل T100) صورت پذیرفت. در نهایت، تعیین توالی جدایه توسط شرکت سیناکلون انجام شد.

یافته‌ها

در این تحقیق ۱۴ باکتری مختلف از محصولات لبنی جداسازی گردید و سرانجام از بین آن‌ها یک مورد که در خصوص باکتری‌های هدف، بیشترین هاله ممانعتی را ایجاد نموده بود برگزیده شد. برای بررسی اثر ضدباکتریایی باکتریوسین تولیدی بر باکتری‌های هدف، از روش انتشار از دیسک کاغذی استفاده گردید. در این آزمون، برای هر باکتری چندین دیسک کاغذی قرار داده شد و سپس میانگین قطر هاله‌های عدم رشد محاسبه گردید که برای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس

جدول ۲: نتایج رشد یا عدم رشد باکتری / استافیلوکوکوس / اورئوس در مجاورت ترکیب باکتریوسین با آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین. (اعداد با رنگ قرمز، در محاسبات هم‌افزایی به کار رفته‌اند)

شماره ستون‌های میکروپلیت												
	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲
A	۲۴۲	۲۴۲	۲۴۲	۲۴۲	۲۴۲	۲۴۲	۲۴۲	۲۴۲	۲۴۲	۲۴۲	۲۴۲	۲۴۲
	۰	۰/۰۶۲۵	۰/۱۲۵	۰/۲۵	۰/۵	۱	۲	۴	۸	۱۶	۳۲	۶۴
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	۱۲۱	۱۲۱	۱۲۱	۱۲۱	۱۲۱	۱۲۱	۱۲۱	۱۲۱	۱۲۱	۱۲۱	۱۲۱	۱۲۱
	۰	۰/۰۶۲۵	۰/۱۲۵	۰/۲۵	۰/۵	۱	۲	۴	۸	۱۶	۳۲	۶۴
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	۶۰/۵	۶۰/۵	۶۰/۵	۶۰/۵	۶۰/۵	۶۰/۵	۶۰/۵	۶۰/۵	۶۰/۵	۶۰/۵	۶۰/۵	۶۰/۵
	۰	۰/۰۶۲۵	۰/۱۲۵	۰/۲۵	۰/۵	۱	۲	۴	۸	۱۶	۳۲	۶۴
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	۳۰/۲۵	۳۰/۲۵	۳۰/۲۵	۳۰/۲۵	۳۰/۲۵	۳۰/۲۵	۳۰/۲۵	۳۰/۲۵	۳۰/۲۵	۳۰/۲۵	۳۰/۲۵	۳۰/۲۵
	۰	۰/۰۶۲۵	۰/۱۲۵	۰/۲۵	۰/۵	۱	۲	۴	۸	۱۶	۳۲	۶۴
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E	۱۵/۱۲۵	۱۵/۱۲۵	۱۵/۱۲۵	۱۵/۱۲۵	۱۵/۱۲۵	۱۵/۱۲۵	۱۵/۱۲۵	۱۵/۱۲۵	۱۵/۱۲۵	۱۵/۱۲۵	۱۵/۱۲۵	۱۵/۱۲۵
	۰	۰/۰۶۲۵	۰/۱۲۵	۰/۲۵	۰/۵	۱	۲	۴	۸	۱۶	۳۲	۶۴
	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	۷/۵۶	۷/۵۶	۷/۵۶	۷/۵۶	۷/۵۶	۷/۵۶	۷/۵۶	۷/۵۶	۷/۵۶	۷/۵۶	۷/۵۶	۷/۵۶
	۰	۰/۰۶۲۵	۰/۱۲۵	۰/۲۵	۰/۵	۱	۲	۴	۸	۱۶	۳۲	۶۴
	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
G	۳/۷۸	۳/۷۸	۳/۷۸	۳/۷۸	۳/۷۸	۳/۷۸	۳/۷۸	۳/۷۸	۳/۷۸	۳/۷۸	۳/۷۸	۳/۷۸
	۰	۰/۰۶۲۵	۰/۱۲۵	۰/۲۵	۰/۵	۱	۲	۴	۸	۱۶	۳۲	۶۴
	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
H	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	۰	۰/۰۶۲۵	۰/۱۲۵	۰/۲۵	۰/۵	۱	۲	۴	۸	۱۶	۳۲	۶۴
	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

جدول ۳: نتایج رشد یا عدم رشد باکتری / استافیلوکوکوس / اورئوس در مجاورت ترکیب باکتریوسین با آنتی‌بیوتیک ونکومايسين. (اعداد با رنگ قرمز، در محاسبات هم‌افزایی به کار رفته‌اند)

شماره ستون‌های میکروپلیت												
	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲
A	۲۴۲	۲۴۲	۲۴۲	۲۴۲	۲۴۲	۲۴۲	۲۴۲	۲۴۲	۲۴۲	۲۴۲	۲۴۲	۲۴۲
	۰	۰/۰.۶۲۵	۰/۱۲۵	۰/۲۵	۰/۵	۱	۲	۴	۸	۱۶	۳۲	۶۴
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	۱۲۱	۱۲۱	۱۲۱	۱۲۱	۱۲۱	۱۲۱	۱۲۱	۱۲۱	۱۲۱	۱۲۱	۱۲۱	۱۲۱
	۰	۰/۰.۶۲۵	۰/۱۲۵	۰/۲۵	۰/۵	۱	۲	۴	۸	۱۶	۳۲	۶۴
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	۶۰/۵	۶۰/۵	۶۰/۵	۶۰/۵	۶۰/۵	۶۰/۵	۶۰/۵	۶۰/۵	۶۰/۵	۶۰/۵	۶۰/۵	۶۰/۵
	۰	۰/۰.۶۲۵	۰/۱۲۵	۰/۲۵	۰/۵	۱	۲	۴	۸	۱۶	۳۲	۶۴
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	۳۰/۲۵	۳۰/۲۵	۳۰/۲۵	۳۰/۲۵	۳۰/۲۵	۳۰/۲۵	۳۰/۲۵	۳۰/۲۵	۳۰/۲۵	۳۰/۲۵	۳۰/۲۵	۳۰/۲۵
	۰	۰/۰.۶۲۵	۰/۱۲۵	۰/۲۵	۰/۵	۱	۲	۴	۸	۱۶	۳۲	۶۴
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E	۱۵/۱۲۵	۱۵/۱۲۵	۱۵/۱۲۵	۱۵/۱۲۵	۱۵/۱۲۵	۱۵/۱۲۵	۱۵/۱۲۵	۱۵/۱۲۵	۱۵/۱۲۵	۱۵/۱۲۵	۱۵/۱۲۵	۱۵/۱۲۵
	۰	۰/۰.۶۲۵	۰/۱۲۵	۰/۲۵	۰/۵	۱	۲	۴	۸	۱۶	۳۲	۶۴
	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	۷/۵۶	۷/۵۶	۷/۵۶	۷/۵۶	۷/۵۶	۷/۵۶	۷/۵۶	۷/۵۶	۷/۵۶	۷/۵۶	۷/۵۶	۷/۵۶
	۰	۰/۰.۶۲۵	۰/۱۲۵	۰/۲۵	۰/۵	۱	۲	۴	۸	۱۶	۳۲	۶۴
	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
G	۳/۷۸	۳/۷۸	۳/۷۸	۳/۷۸	۳/۷۸	۳/۷۸	۳/۷۸	۳/۷۸	۳/۷۸	۳/۷۸	۳/۷۸	۳/۷۸
	۰	۰/۰.۶۲۵	۰/۱۲۵	۰/۲۵	۰/۵	۱	۲	۴	۸	۱۶	۳۲	۶۴
	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
H	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	۰	۰/۰.۶۲۵	۰/۱۲۵	۰/۲۵	۰/۵	۱	۲	۴	۸	۱۶	۳۲	۶۴
	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

اعداد بالایی در هر خانه، غلظت باکتریوسین (μg/ml)

اعداد پایینی در هر خانه، غلظت سیپروفلوکساسین / ونکومايسين (μg/ml)

+, نشانه رشد باکتری ؛ -, نشانه عدم رشد باکتری

جدول ۴: نتایج رشد یا عدم رشد باکتری سودوموناس آئروجینوزا در مجاورت ترکیب باکتریوسین با آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین. (اعداد با رنگ قرمز، در محاسبات هم‌افزایی به کار رفته‌اند)

شماره ستون‌های میکروپلیت												
	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲
A	۲۴۲ ۰ -	۲۴۲ ۰/۰۶۲۵ -	۲۴۲ ۰/۱۲۵ -	۲۴۲ ۰/۲۵ -	۲۴۲ ۰/۵ -	۲۴۲ ۱ -	۲۴۲ ۲ -	۲۴۲ ۴ -	۲۴۲ ۸ -	۲۴۲ ۱۶ -	۲۴۲ ۳۲ -	۲۴۲ ۶۴ -
B	۱۲۱ ۰ -	۱۲۱ ۰/۰۶۲۵ -	۱۲۱ ۰/۱۲۵ -	۱۲۱ ۰/۲۵ -	۱۲۱ ۰/۵ -	۱۲۱ ۱ -	۱۲۱ ۲ -	۱۲۱ ۴ -	۱۲۱ ۸ -	۱۲۱ ۱۶ -	۱۲۱ ۳۲ -	۱۲۱ ۶۴ -
C	۶۰/۵ ۰ +	۶۰/۵ ۰/۰۶۲۵ +	۶۰/۵ ۰/۱۲۵ +	۶۰/۵ ۰/۲۵ -	۶۰/۵ ۰/۵ -	۶۰/۵ ۱ -	۶۰/۵ ۲ -	۶۰/۵ ۴ -	۶۰/۵ ۸ -	۶۰/۵ ۱۶ -	۶۰/۵ ۳۲ -	۶۰/۵ ۶۴ -
D	۳۰/۲۵ ۰ +	۳۰/۲۵ ۰/۰۶۲۵ +	۳۰/۲۵ ۰/۱۲۵ +	۳۰/۲۵ ۰/۲۵ +	۳۰/۲۵ ۰/۵ +	۳۰/۲۵ ۱ -	۳۰/۲۵ ۲ -	۳۰/۲۵ ۴ -	۳۰/۲۵ ۸ -	۳۰/۲۵ ۱۶ -	۳۰/۲۵ ۳۲ -	۳۰/۲۵ ۶۴ -
E	۱۵/۱۲۵ ۰ +	۱۵/۱۲۵ ۰/۰۶۲۵ +	۱۵/۱۲۵ ۰/۱۲۵ +	۱۵/۱۲۵ ۰/۲۵ +	۱۵/۱۲۵ ۰/۵ +	۱۵/۱۲۵ ۱ -	۱۵/۱۲۵ ۲ -	۱۵/۱۲۵ ۴ -	۱۵/۱۲۵ ۸ -	۱۵/۱۲۵ ۱۶ -	۱۵/۱۲۵ ۳۲ -	۱۵/۱۲۵ ۶۴ -
F	۷/۵۶ ۰ +	۷/۵۶ ۰/۰۶۲۵ +	۷/۵۶ ۰/۱۲۵ +	۷/۵۶ ۰/۲۵ +	۷/۵۶ ۰/۵ +	۷/۵۶ ۱ -	۷/۵۶ ۲ -	۷/۵۶ ۴ -	۷/۵۶ ۸ -	۷/۵۶ ۱۶ -	۷/۵۶ ۳۲ -	۷/۵۶ ۶۴ -
G	۳/۷۸ ۰ +	۳/۷۸ ۰/۰۶۲۵ +	۳/۷۸ ۰/۱۲۵ +	۳/۷۸ ۰/۲۵ +	۳/۷۸ ۰/۵ +	۳/۷۸ ۱ -	۳/۷۸ ۲ -	۳/۷۸ ۴ -	۳/۷۸ ۸ -	۳/۷۸ ۱۶ -	۳/۷۸ ۳۲ -	۳/۷۸ ۶۴ -
H	۰ ۰ +	۰ ۰/۰۶۲۵ +	۰ ۰/۱۲۵ +	۰ ۰/۲۵ +	۰ ۰/۵ +	۰ ۱ -	۰ ۲ -	۰ ۴ -	۰ ۸ -	۰ ۱۶ -	۰ ۳۲ -	۰ ۶۴ -

اعداد بالایی در هر خانه، غلظت باکتریوسین (μg/ml)

اعداد پایینی در هر خانه، غلظت سیپروفلوکساسین (μg/ml)

+, نشانه رشد باکتری؛ -, نشانه عدم رشد باکتری

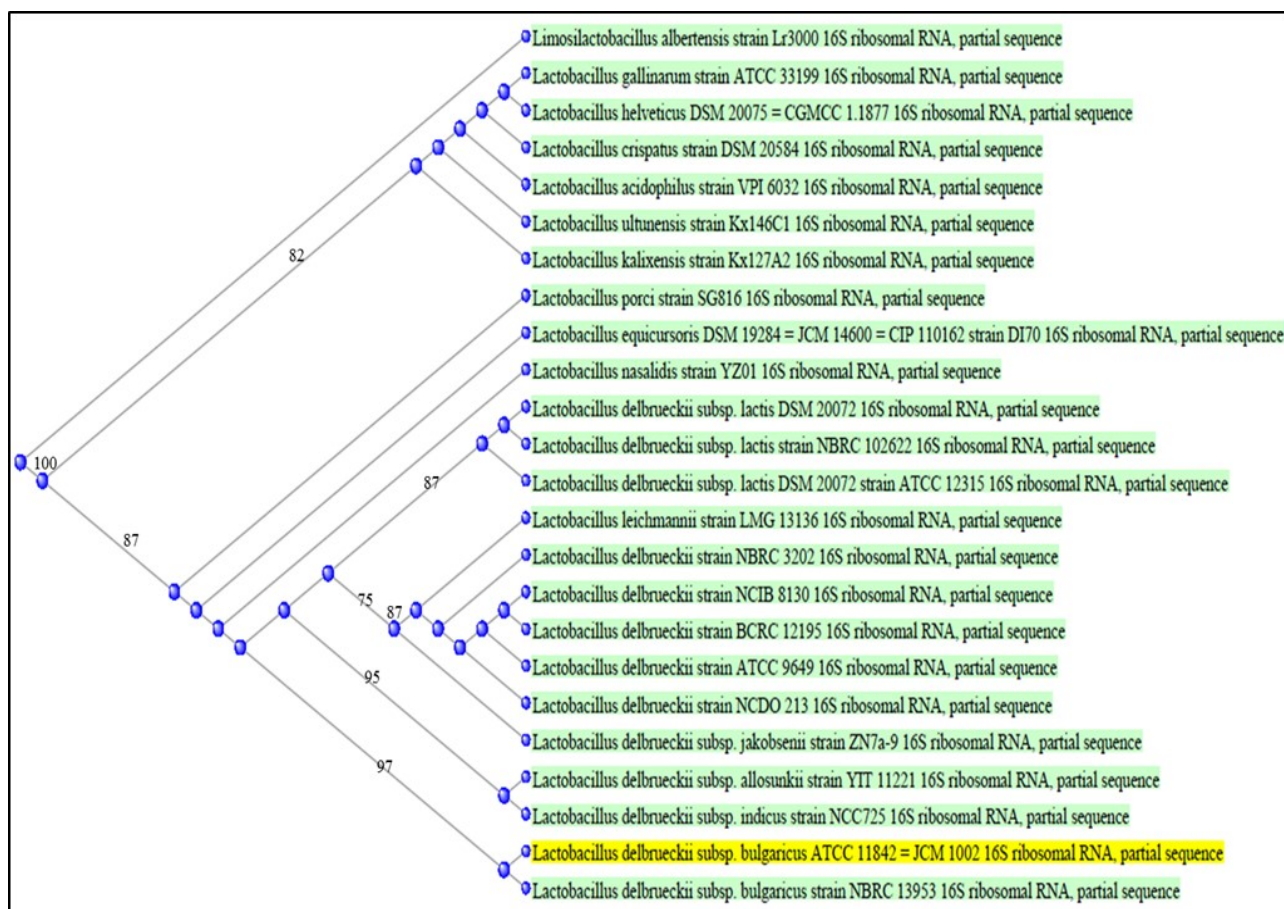
در جداول ۲ و ۳ و ۴ خانه‌هایی با رنگ تیره‌تر ترسیم شده‌اند و در آن خانه‌ها، اعدادی که در محاسبات هم‌افزایی به کار رفته‌اند، با رنگ قرمز مشخص گردیده‌اند. جدول ۵ نتایج این محاسبات

جدول ۵: نتایج محاسبات نوع ارتباط بین باکتریوسین تولیدی با آنتی‌بیوتیک‌ها.

باکتری هدف / ستافیلوکوکوس اورئوس				باکتری هدف / لاکتوباسیلوس			
ترکیب باکتریوسین با	FIC Index	FIC A+B	FIC B+A	ترکیب باکتریوسین با	FIC Index	FIC A+B	FIC B+A
سیپروفلوکساسین	۰/۷۵	۰/۲۵	۰/۵	سیپروفلوکساسین	۰/۷۵	۰/۲۵	۰/۵
ونکومایسین	۰/۳۱۲	۰/۰۶۲۵	۰/۲۵	ونکومایسین	۰/۳۱۲	۰/۰۶۲۵	۰/۲۵

محصولات PCR و مراجعه به بانک ژنی، مشخص گردید که جدایه مورد استفاده در این تحقیق به میزان ۹۷ درصد با باکتری لاکتوباسیلوس دلبروکئی سویه بولگاریکوس (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* ATCC 11842) مطابقت دارد (شکل ۲).

در تحقیق حاضر، برای شناسایی مولکولی جدایه لاکتوباسیلوس مولد باکتریوسین، با به کارگیری جفت پرایمرهای همگانی که بخشی از ژن 16S rDNA باکتری را تکثیر می‌کردند، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز انجام گرفت و محصولات واکنش بر روی ژل الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت. پس از تعیین توالی



شکل ۲: درخت فیلوژنی جدایه لاکتوباسیلوس دلبروکی ترسیم شده با روش Neighbor joining.

بحث

مخاط روده را کاهش داده و همچنین در کاهش میزان بیماری‌های التهابی روده و سندرم روده تحریک پذیر نقش دارند (۳۱ و ۳۲). بسیاری از محققین نقش و اهمیت لاکتوباسیلوس‌ها و باکتریوسین تولیدی توسط این جنس را مورد بررسی قرار داده‌اند. تحقیقات انجام گرفته توسط ساندرز (Sanders) و همکاران در سال ۲۰۱۸، فیجان (Fijan) در سال ۲۰۱۴، جوانشیر (Javanshir) و همکاران در سال ۲۰۲۱، مارکویاک (Markowiak) و همکاران در سال ۲۰۱۷ و پلازا دیاز (Plaza-Diaz) و همکاران در سال ۲۰۱۹ مثال‌هایی از تحقیقات انجام شده بر روی پروبیوتیک‌ها به‌ویژه جنس لاکتوباسیلوس هستند که هر کدام به شکلی اهمیت باکتریوسین تولیدی توسط لاکتوباسیلوس‌ها را برشمرده و کاربردهای مفید آن را ذکر کرده‌اند (۳۱ و ۳۳ و ۳۴ و ۳۵ و ۳۶). در تحقیق حاضر، دو باکتری/استافیلوکوکوس/اورئوس و

در این تحقیق از چندین نمونه لبنیات سنتی در جداسازی لاکتوباسیلوس استفاده گردید. هدف یافتن سویه‌هایی از لاکتوباسیلوس بود که توانایی بالایی برای تولید باکتریوسین داشته و بتوانند رشد برخی از باکتری‌های بیماری‌زا را مهار نمایند. انتخاب جنس لاکتوباسیلوس برای تولید باکتریوسین، براساس غیر بیماری‌زا بودن این جنس و داشتن خواص پروبیوتیکی و درمانی آن صورت گرفت. لاکتوباسیلوس‌ها در شرایط طبیعی عمدتاً از طریق تولید اسید لاکتیک، H_2O_2 ، باکتریوسین و دیگر محصولات تخمیری، موجب کاهش pH روده شده و ضمن ایجاد تعادل در تعداد و تنوع باکتری‌های فلور طبیعی روده می‌توانند از رشد باکتری‌های بیماری‌زا نیز جلوگیری نماید. سویه‌های مختلف لاکتوباسیلوس باعث تقویت سد مخاطی روده شده، میزان جابه جایی باکتری‌ها از طریق

از باکتریوسین‌ها شناسایی شده است، در خصوص مکانیسم اثر آن‌ها در برخی از تحقیقات نیز به اثر ممانعتی باکتریوسین بر دیواره سلولی، ژنوم باکتری و سیستم پروتئین‌سازی باکتری اشاره شده است (۳۶ و ۳۷ و ۳۸). تقریباً همه باکتریوسین‌ها پپتیدهای کوچک کاتیونی با ویژگی آب‌گریز می‌باشند. برخی از باکتریوسین‌ها نیز شناخته شده‌اند که هم دارای بخش‌های آب‌گریز و هم بخش‌های آب‌دوست هستند. هم باکتری‌های گرم مثبت و هم باکتری‌های گرم منفی می‌توانند باکتریوسین تولید نمایند. معمولاً دیده شده که باکتریوسین تولید شده توسط باکتری‌های گرم مثبت طیف عملکرد محدودتری داشته و اثر بازدارندگی آن عمدتاً به دیگر باکتری‌های گرم مثبت محدود می‌شود. البته این مسئله عمومیت نداشته و موارد استثنا هم وجود دارد. دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت از ۶۰ تا ۹۰ درصد پپتیدوگلیکان تشکیل شده است. وجود چنین لایه ضخیمی موجب می‌گردد که باکتری‌های گرم مثبت بتوانند فشارهای مکانیکی و اسمزی زیادی را تحمل نمایند اما وجود این لایه‌ها نمی‌تواند باکتری را در برابر مواد شیمیایی، داروها و مواد کوچک مولکول محافظت نماید. در باکتری‌های گرم منفی اگرچه لایه پپتیدوگلیکان نازک بوده و تنها ۱۰ درصد دیواره باکتری را تشکیل می‌دهد اما وجود غشای خارجی که از جنس چربی است می‌تواند به نحو بسیار موثری باکتری را در برابر مولکول‌های شیمیایی و داروها و مواد کوچک مولکول محافظت نماید. در این تحقیق نیز علت مقاومت بیشتر سودوموناس آئروجینوزا نسبت به اثر ممانعتی باکتریوسین تولیدی را می‌توان همین مسئله در نظر گرفت، ضمن اینکه این باکتری به دلیل تعداد اندک کانال‌های پورین در غشای خارجی خود، نسبت به نفوذ خیلی از ترکیبات سمی و داروها مقاوم می‌باشد (۳۹ و ۴۰).

از ویژگی‌های باکتریوسین‌های تولید شده توسط لاکتوباسیلوس‌های پروبیوتیک می‌توان به مقاومت حرارتی باکتریوسین، حساسیت به آنزیم‌های پروتئاز و غیر سمی بودن برای انسان و حیوانات اشاره کرد (۴۱ و ۴۲ و ۴۳ و ۴۴). در این تحقیق برای اثبات ماهیت پروتئینی باکتریوسین تولیدی، از آنزیم

سودوموناس آئروجینوزا به عنوان باکتری‌های هدف از نظر اثر ضد باکتریایی باکتریوسین تولیدی بررسی شدند. انتخاب این دو باکتری، براساس شیوع فراوان آن‌ها در جامعه، توانایی عفونت زایی بسیار بالای آن‌ها و همچنین مقاومت آنتی‌بیوتیکی گسترده‌ای که در سویه‌های مختلف آن‌ها دیده می‌شود بود. امروزه مسئله مقاومت آنتی‌بیوتیکی و انتشار ژن‌های عامل مقاومت به صورت بسیار گسترده در بین باکتری‌های بیماریزا، یکی از مهمترین چالش‌های پزشکی و باکتری شناسی است. محققین بسیاری در تلاش هستند تا آنتی‌بیوتیک‌های جدید و یا روش‌های درمانی جدید که بتوانند جایگزین روش‌های درمانی فعلی شده و یا در کنار این روش‌ها به عنوان درمان مکمل به کار گرفته شوند را کشف نمایند (۳۹).

فعالیت ضد باکتریایی باکتریوسین تولیدی توسط جدایه لاکتوباسیلوس، بر علیه دو باکتری هدف مطالعه شد، ضمن آنکه ترکیب باکتریوسین تولیدی با دو آنتی‌بیوتیک رایج سیپروفلوکساسین و ونکومایسن که امروزه بر علیه این باکتری‌های هدف به کار می‌روند نیز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این بررسی نشان داد که باکتریوسین تولید شده توسط جدایه لاکتوباسیلوس، در غلظت ۳۰/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر استافیلوکوکوس اورئوس و در غلظت ۱۲۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر سودوموناس آئروجینوزا اثر مهارکنندگی داشت. اثر کشندگی باکتریوسین تولیدی نیز در غلظت ۲۴۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌تواند استافیلوکوکوس اورئوس را از بین ببرد اما در هیچ کدام از غلظت‌های استفاده شده، اثر کشندگی بر سودوموناس آئروجینوزا نداشت. با توجه به این نتایج مشخص شد که سودوموناس آئروجینوزا که یک باکتری گرم منفی است (در مقایسه با باکتری استافیلوکوکوس اورئوس که گرم مثبت می‌باشد) از مقاومت بیشتری در برابر اثر مهاری و کشندگی باکتریوسین تولیدی برخوردار است. به طور کلی باکتریوسین‌ها، پپتیدهای ریبوزومی ساخته شده توسط بسیاری از باکتری‌ها می‌باشند که می‌توانند با ایجاد منفذ در غشای سلولی باکتری‌های رقیب و بر هم زدن تعادل یون‌های پروتون، موجب مرگ باکتری رقیب شوند. با توجه به اینکه کلاس‌های مختلفی

کشندگی روی باکتری‌های بیماریزا می‌تواند با برخی از آنتی‌بیوتیک‌های رایج نیز اثر هم‌افزایی داشته باشد. با توجه به اینکه در این تحقیق از باکتری لاکتوباسیلوس پروبیوتیک جداسازی شده از ماست سنتی استفاده شده بود، می‌توان نتیجه گرفت که باکتریوسین تولیدی توسط این سویه نیز سمیت نداشته و می‌تواند در موارد انسانی یا حیوانی به‌عنوان یک عامل بازدارنده رشد باکتری‌های بیماریزا به کار گرفته شود. همچنین با توجه به اینکه ترکیب این باکتریوسین با آنتی‌بیوتیک ونکومایسین بر علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس خاصیت هم‌افزایی داشت می‌توان با انجام تحقیقات بیشتر، در خصوص به کارگیری این باکتریوسین به‌عنوان یک عامل تقویت‌کننده و مکمل برای آنتی‌بیوتیک ونکومایسین اطلاعات جامع‌تری کسب نمود.

تشکر و قدردانی

از مدیریت محترم پژوهشی که امکان استفاده از امکانات آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون را فراهم کردند، صمیمانه سپاسگزاریم.

ملاحظات اخلاقی

نکات اخلاقی شامل سرقت ادبی، داده‌سازی، تحریف داده‌ها و انتشار دوگانه توسط نویسندگان رعایت شده است.

تعارض منافع

وجود ندارد.

پروتئیناز K استفاده شد. نتایج این بررسی نشان داد که باکتریوسین تولیدی پس از تیمار ۲ ساعته توسط این آنزیم، خواص ضد باکتریایی خود را کاملاً از دست داده و هیچ اثر ممانعتی بر باکتری‌های هدف نداشت. اثر ضد باکتریایی باکتریوسین تولیدی در ترکیب با آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین، بر علیه دو باکتری هدف استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروجنوزا مورد بررسی قرار گرفت و در هر دو مورد میزان FIC Index برابر ۰/۷۵ به دست آمد. چون عدد به دست آمده از ۰/۵ بیشتر بود طبق تعریف، نتیجه ترکیب باکتریوسین با آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین به صورت جمع اثر بوده است و پدیده هم‌افزایی صورت نگرفته است. در خصوص ترکیب باکتریوسین با آنتی‌بیوتیک ونکومایسین و بررسی عملکرد این ترکیب بر علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، میزان FIC Index برابر از ۰/۳۱۲ به دست آمد که چون از ۰/۵ کمتر شده است طبق تعریف، نتیجه ترکیب باکتریوسین با آنتی‌بیوتیک ونکومایسین به صورت هم‌افزایی بوده است. بعد از شناسایی مولکولی جدایه مورد بررسی، مشخص گردید که باکتری مورد استفاده در این تحقیق به میزان ۹۷ درصد با سویه *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC ۱۱۸۴۲ خویشاوندی دارد. این باکتری یکی از گونه‌های اصلی در تولید ماست و محصولات پروبیوتیک می‌باشد و همچنین در رسیده شدن بعضی از انواع پنیرها نیز نقش اساسی دارد. این گونه، یک لاکتوباسیلوس هومو فرمنتاتیو بوده و تنها محصول نهایی تخمیر قندها توسط این گونه، اسید لاکتیک است. گرم مثبت، فاقد حرکت و فاقد اسپور بوده و در شرایط اسیدی با pH بین ۴/۶ تا ۵/۴ بهترین رشد را دارد. بی‌هوازی است اما می‌تواند شرایط هوازی را تحمل نماید. برخی از نژادهای این باکتری قادر به تولید باکتریوسین هستند (۴۵ و ۱۲).

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق، می‌توان به اهمیت سویه‌هایی از لاکتوباسیلوس که قادر به تولید باکتریوسین هستند تاکید نمود. زیرا باکتریوسین آن‌ها علاوه بر داشتن اثر مهارتی یا

References

1. Cotter PD, Ross RP, Hill C. Bacteriocins—a viable alternative to antibiotics? *Nat Rev Microbiol.* 2013; 11(2):95–105.
2. Nishie M, Nagao JL, Sonomoto K. Antibacterial peptides “bacteriocins”: an overview of their diverse characteristics and applications. *Biocontrol Sci.* 2012; 1-16.
3. Romero-Calle D, Guimaraes Benevides R, Goes-Neto A, Billington C. Bacteriophages as alternatives to antibiotics in clinical care. *Antibiotics.* 2019; 138- 141.
4. Plaza-Diaz J, Ruiz-Ojeda FJ, Gil-Campos M, Gil A. Mechanisms of action of probiotics. *Adv Nutr.* 2019; S49-S66.
5. Muñoz M, Jaramillo D, del Pilar Melendez A, J Almeciga-Diaz C, F Sanchez O. Native and heterologous production of bacteriocins from gram-positive microorganisms. *Recent Pat Biotechnol.* 2011; 199-211.
6. Sun Z, Wang X, Zhang X, Wu H, Zou Y, Li P, Sun C, Xu W, Liu F, Wang D. Class III bacteriocin Helveticin-M causes sublethal damage on target cells through impairment of cell wall and membrane. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2018; 213-227.
7. Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int J Food Microbiol.* 2001; 71(1):1–20.
8. Markowiak P, Śliżewska K. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients.* 2017; 1021.
9. Wang G, Li X, Wang Z. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Res.* 2016; D1087-D1093.
10. Ołdak A, Zielińska D. Bacteriocins from lactic acid bacteria as an alternative to antibiotics. *Postepy higieny i medycyny doswiadczonej (Online).* 2017; 328-338.
11. Ali AA. Beneficial role of lactic acid bacteria in food preservation and human health: a review. *Res J Microbiol.* 2010; 5(12):1213–1221.
12. Axelsson L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. *Food Sci Technol-New York-Marcel Dekker.* 2004; 1-66.
13. Zheng J, Wittouck S, Salvetti E, Franz CM, Harris HM, Mattarelli P, O’toole PW, Pot B, Vandamme P, Walter J, Watanabe K. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus Beijerinck* 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. *Int J Syst.* 2020; 2782-2858.
14. Montalbán-López M, Cebrián R, Galera R, Mingorance L, Martín-Platero AM, Valdivia E, et al. Synergy of the Bacteriocin AS-48 and Antibiotics against Uropathogenic *Enterococci*. *Antibiotics (Basel)* 2020; 9(9):567-572.

15. Todorov SD, de Paula OAL, Camargo AC, Lopes DA, Nero LA. Combined effect of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ST8SH and vancomycin, propolis or EDTA for controlling biofilm development by *Listeria monocytogenes*. Rev Argent Microbiol. 2018; 50(1):48-55.
16. Chi H, Holo H. Synergistic antimicrobial activity between the broad spectrum bacteriocin Garvicin KS and Nisin, Farnesol and polymyxin B against gram-positive and gram-negative bacteria. Curr Microbiol. 2018; 75(3):272–277.
17. Biswas K, Upadhayay S, Rapsang GF, Joshi SR. Antibacterial and Synergistic Activity Against β -Lactamase-Producing Nosocomial Bacteria by Bacteriocin of LAB Isolated From Lesser Known Traditionally Fermented Products of India. HAYATI J Biosci. 2017; 24(2): 87-95.
18. Baron EJ, Finegold SM. Diagnostic microbiology. 8th edition. C.V.Mosby Company. 1990; 363-380.
19. Adedire OM, Odeniyi OA. Antimicrobial activities of bacteriocin-like extracellular metabolites produced by soil bacteria. Pharm Biosci J. 2017; 47-54.
20. Bungenstock L, Abdulmawjood A, Reich F. Evaluation of antibacterial properties of lactic acid bacteria from traditionally and industrially produced fermented sausages from Germany. PLoS One. 2020; e0230345.
21. Zou J, Jiang H, Cheng H, Fang J, Huang G. Strategies for screening, purification and characterization of bacteriocins. Int J Biol Macromo. 2018; 781-789.
22. Jiang H, Li P, Gu Q. Heterologous expression and purification of plantaricin NC8, a two-peptide bacteriocin against *Salmonella* spp. from *Lactobacillus plantarum* ZJ316. Protein Expression Purif. 2016; 28-34.
23. Hanchi H, Hammami R, Gingras H, Kourda R, Bergeron MG, Ben Hamida J, Ouellette M, Fliss I. Inhibition of MRSA and of *Clostridium difficile* by durancin 61A: synergy with bacteriocins and antibiotics. Future Microbiol. 2017; 205-212
24. Naghmouchi K, Baah J, Hober D, Jouy E, Rubrecht C, Sané F, Drider D. Synergistic effect between colistin and bacteriocins in controlling Gram-negative pathogens and their potential to reduce antibiotic toxicity in mammalian epithelial cells. Antimicrob Agents Chemother. 2013; 2719-2725.
25. Abdulhussein M, Jabr HS, Al-Maenei MKA, Alfarras AF, Hussain AHA, Hassan SA, Fenjan MN. Enhancement of Ciprofloxacin Activity against Uropathogenic Bacteria by Synergistic Effect of Purified Bacteriocin from *Staphylococcus epidermidis*. Int J Pharm Qual Assur. 2022; 174-177.
26. Draper LA, Cotter PD, Hill C, Ross RP. The two peptide lantibiotic lactacin 3147 acts synergistically with polymyxin to inhibit Gram negative bacteria. BMC microbiology. 2013; 1-8.

27. Bucheli JE, Fugaban JI, Holzapfel WH, Todorov SD. Combined Action of Antibiotics and Bacteriocins against Vancomycin-Resistant Enterococci. *Microorganisms*. 2022; 1423.
28. Gani O, Aisen B, Yasemin Z, Iclal B. Synergy tests by E-Test and checkerboard methods of antimicrobial combinations against *Brucella melitensis*. *J Clin Microbiol*. 2005; 43(1): 140-143.
29. Weinstein MP, Patel JB, Campeau Sh, et al. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI. M100, 28th ed. 2018; 38(3)
30. Costa A.R, Daniel B. Ortega, Débora L.A. Fulgêncio, Flávio S. Costa, Thiago F. Araújo, Cristine C. Barreto, Checkerboard testing method indicates synergic effect of pelgipeptins against multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae*, *Biotechnol Res Innovation*. 2019; 3(1): 187-191,
31. Fijan S. Microorganisms with claimed probiotic properties: an overview of recent literature. *Int J Environ Res Public Health*. 2014; 4745-4767.
32. Markowiak P, Śliżewska K. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients*. 2017; 1021.
33. Sanders M, Merenstein D, Merrifield C, Hutkins R. Probiotics for human use. *Nutr Bull*. 2018; 212-225.
34. Javanshir N, Hosseini GNG, Sadeghi M, Esmaeili R, Satarikia F, Ahmadian G, Allahyari N. Evaluation of the Function of Probiotics, Emphasizing the Role of their Binding to the Intestinal Epithelium in the Stability and their Effects on the Immune System. *Biol Proced Online*. 2021; 1-17.
35. Markowiak P, Śliżewska K. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients*. 2017; 1021.
36. Plaza-Diaz J, Ruiz-Ojeda FJ, Gil-Campos M, Gil A. Mechanisms of action of probiotics. *Adv Nutr*. 2019; S49-S66.
37. Mokoena M.P. Lactic acid bacteria and their bacteriocins: classification, biosynthesis and applications against uropathogens: a mini-review. *Molecules*. 2017; 1255.
38. Meade E, Slattery MA, Garvey M. Bacteriocins, potent antimicrobial peptides and the fight against multi drug resistant species: resistance is futile?. *Antibiotics*. 2020; 32.
39. Wilson S.G.S. Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections (10th ed.) Wiley, USA. 2010; 864 - 865.
40. Firouzi Dalvand L, Hosseini F, Moradi Dehaghi Sh, Siasi Torbati E. Antibacterial and antibiofilm activity of bismuth oxide nanoparticles produced by *Bacillus subtilis* against clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolated from wound infections. *Journal of Microbial World*. 2019; 12(2): 172-185.

41. Hernández-González JC, Martínez-Tapia A, Lazcano-Hernández G, García-Pérez BE, Castrejón-Jiménez NS. Bacteriocins from lactic acid bacteria. A powerful alternative as antimicrobials, probiotics, and immunomodulators in veterinary medicine. *Animals*. 2021; 979.
42. Bungenstock L, Abdulmawjood A, Reich F. Evaluation of antibacterial properties of lactic acid bacteria from traditionally and industrially produced fermented sausages from Germany. *PLoS One*. 2020; e0230345.
43. Armand M, Faezi Ghasemi M, Fazeli M, Mirpour M. Optimization of biomass production by probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnonsus* at pilot-plant scale. *Journal of Microbial World*. 2020; 13 (3): 202-214.
44. Shayesteh F, Usup G. Mechanism of action of an antifungal bacteriocin produced by a marine *Bacillus* sp. Sh.10. *Journal of Microbial World*. 2022; 15(1): 56-67.
45. Fujisawa T, Benno Y, Yaeshima T, Mitsuoka T. Taxonomic study of the *Lactobacillus acidophilus* group, with recognition of *Lactobacillus gallinarum* sp. nov. and *Lactobacillus johnsonii* sp. nov. and synonymy of *Lactobacillus acidophilus* group A3 (Johnson et al. 1980) with the type strain of *Lactobacillus amylovorus* (Nakamura 1981). *Int J Syst Evol Microbiol*. 1992; 487-491.