ارزیابی قدرت آنتی‌باکتریال پست‌بیوتیک باکتری‌های جنس لاکتوباسیلوس علیه *لیستریا منوسیتوژنز*

المیرا تیزجنگ[۱]، حدیث متشفی[۲]، **ابراهیم باباپور**[۳]*

[۱]کارشناسی ارشد میکروبیولوژی- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران

[۲]استادیار بخش فرآوری محصولات، موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی کرج، ایران

[۳]استادیار گروه میکروبیولوژی- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۸/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۲/۳۱

چکیده

نظر به تقاضای فزاینده‌ی جامعه مبنی بر استفاده از پروتکل‌های غذایی ایمن و توجه به‌سلامت سبد غذایی، اهمیت استفاده از نگه‌دارنده‌های طبیعی بیشتر شده است. *لیستریا منوسیتوژنز* یکی از مهم‌ترین پاتوژن‌های غذایی است. ازاین‌روی پژوهش حاضر باهدف ارزیابی قدرت آنتی‌باکتریال پست بیوتیک باکتری‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بر روی این پاتوژن انجام گردید. پست‌بیوتیک‌ها در زمان‌های تخمیر ۲۴ و ۴۸ ساعت تولید شدند و قدرت آنتی‌باکتریالی آن‌ها در pH اسیدی و خنثی از روش‌های چاهک گذاری در آگار، تعیین حداقل غلظت بازدارنده، تعیین حداقل غلظت باکتری‌کشی و تأثیر مهاری در ایجاد بیوفیلم *لیستریا منوسیتوژنز* بررسی شدند. نتایج نشان داد که پست‌بیوتیک ۴۸ ساعته *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* با pH اسیدی نسبت به سایر پست‌بیوتیک‌ها، قدرت آنتی‌باکتریالی بیشتر و توانایی در مهار تشکیل بیوفیلم را نیز دارد. یافته‌های کلی نشان دادند که اولاً، خواص ضدمیکروبی پست‌بیوتیک‌ها متاثر از نوع سویه و خاصیت اسیدی و مدت زمان کشت است. ثانیا"، رقیق‌سازی پست‌بیوتیک‌ها به‌طور مؤثری سبب کاهش خواص آنتی‌باکتریالی می‌گردد. با توجه به خاصیت آنتی‌باکتریالی پست‌بیوتیک‌ها، پایداری خواص در طول ذخیره‌سازی سرد، ماهیت غیرسمی و تأثیر در کاهش پاسخ‌های التهابی می‌توان از آن‌ها به‌عنوان کاندید مناسب جهت جایگزینی نگهدارنده‌های شیمیایی استفاده کرد.

کلمات کلیدی: لاکتوباسیلوس، پست بیوتیک، آنتی باکتریال، *لیستریا منوسیتوژنز*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*

* e.babapour@kiau.ac.ir

[Downloaded from amfi.ir on 2024-05-26]

مقدمه

امروزه انواع مختلفی از محصولات غذایی تخمیر شده در سراسر جهان وجود دارد که بسته به نوع مواد خام و افزودنی-های مورداستفاده و همچنین زمان و شرایط تخمیر دارای فلور میکروبی متفاوتی می‌باشند (۱). دستگاه گوارش از مهم‌ترین ارگان‌های دخیل در سیستم ایمنی بدن بوده و حدود ۷۰ درصد عملکرد سیستم ایمنی میزبان را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۲). باکتری‌های تولیدکننده اسیدلاکتیک به‌عنوان باکتری‌های همزیست در روده انسان و حیوانات وجود دارند. این باکتری‌ها با خاصیت پروبیوتیک با سکونت در روده و ایجاد تعادل در فلور میکروبی آن باعث اثرات سلامت بخش برای میزبان می‌شوند. ارتباط مستقیم بین حضور میکروبیوتای مفید، توسعه عملکرد سیستم ایمنی و حفظ هومئوستازیس وجود دارد. اثرات سلامت بخش میکروبیوم روده می‌تواند از دو طریق تامین شوند؛ مسیر اول، وابسته به فرم زنده میکروبیوم و فعالیت متابولیکی آن بوده و مسیر دیگر وابسته به ترکیبات غیرزنده و زیستی مشتق شده از میکروبیوم (پست‌بیوتیک‌ها)است. ازاین‌رو مصرف غذاها یا مکمل‌های حاوی ترکیبات پست‌بیوتیک، از مهم-ترین راهبردها برای تعدیل توازن میکروبیوتا و بهبود وضعیت سلامت میزبان محسوب می‌شود (۳). محدودیت های عملکردی فنی در پروبیوتیک‌ها مانند کنترل زنده‌مانی، کاربرد بالقوه آن‌ها را در بخش‌های غذایی و دارویی با مشکل روبرو کرده است؛ بنابراین، تمرکز به‌تدریج از باکتری‌های پروبیوتیک زنده به سمت پاراپروبیوتیک‌های غیرزنده و یا مولکول‌های زیستی مشتق شده از پروبیوتیک‌ها تغییر می‌یابد که اصطلاحاً به آن‌ها پست‌بیوتیک گفته می‌شود که مخلوط پیچیده‌ای از محصولات متابولیکی است (۴). پست‌بیوتیک‌ها در مقایسه با سلول‌های پروبیوتیک والد خود نیازی به زنده‌مانی نداشته و می‌توانند اثرات سلامت بخش مشابه پروبیوتیک‌ها را ایجاد کنند (۳). پست‌بیوتیک‌ها اولاً با توجه به ویژگی‌های منحصربه‌فرد خود ازجمله پایداری، ایمن و غیرسمی‌بودن و ثانیاً به دلیل دارا بودن فعالیت‌های زیستی و ایجاد اثرات سلامت بخش مشابه سلول‌های پروبیوتیک والد خود، می‌توانند به عنوان جایگزین ایمن پروبیوتیک‌ها معرفی شوند (۶ و ۵). درنتیجه باوجود اثربخش بودن پروبیوتیک‌ها، پست‌بیوتیک‌های حاصل از آن‌ها با کاهش خطر ابتلا به باکتریمی، ایجاد عفونت و یا افزایش پاسخ التهابی که برای برخی از مصرف‌کنندگان با سیستم ایمنی نامتعادل یا ضعیف نشان داده‌شده (۷)، دارای مزایای ایمنی بر پروبیوتیک‌ها بوده و به‌عنوان نسل جدید پروبیوتیک‌ها و جایگزین ایمن برای آن‌ها شناخته می‌شوند و می‌توانند در قالب سیستم دارویی یا غذاهای فراسودمند برای اهداف پیشگیری و درمانی مورداستفاده قرار بگیرند (۸). بیماری‌های ناشی از مسمومیت و آلودگی مواد غذایی باعث به وجود آمدن نگرانی در مقیاس جهانی برای مصرف‌کنندگان می‌باشند. *لیستریا منوسیتوژنز* به‌عنوان یک عامل بیماری‌زای قابل‌انتقال از طریق مواد غذایی سبب ایجاد بیماری در انسان است. به علت بروز مقاومت‌های دارویی و تشکیل بیوفیلم قوی در محیط، نیاز به استفاده از روش‌های جدید مانند پروبیوتیک‌ها برای مقابله با این باکتری احساس می‌شود (۹).

لیستریا به‌وفور در محیط اطراف شامل خاک، آب، سبزیجات در حال فساد و غذاها به‌خصوص غذاهای آماده مصرف یافت می‌شود و همین امر کنترل آن را در صنعت غذا دشوار کرده است. پتانسیل بالای خطر آلودگی محصولات گوشتی و شیر خام و پاستوریزه و فرآورده‌های شیر با باکتری *لیستریا منوسیتوژنز* در مطالعات بسیاری از کشورهای مختلف نشان داده‌شده است (۱۰). فلذا این مطالعه باهدف ارزیابی قدرت آنتی‌باکتریال پست بیوتیک باکتری‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بر روی *لیستریا مونوسیتوژنز* انجام گردید.

[Downloaded from amfi.ir on 2024-05-26]

مواد و روش‌ها

میکروارگانیسم‌های استاندارد استفاده شده در این پژوهش *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (PTCC 1745)، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* (PTCC 1637)، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (PTCC 1643) و *لیستریا مونوسیتوژنز* (PTCC 1298) از کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شدند. در گام اول اقدام به فعال-سازی باکتری‌های لاکتوباسیلوس در محیط MRS آگار[2] (شرکت Merck آلمان) و پاتوژن روی محیط TSA[3] (شرکت Merck آلمان) و برای مراحل بعدی پژوهش استفاده شد.

تولید پست‌بیوتیک از کشت پروبیوتیک

پست‌بیوتیک‌های حاصل از کشت پروبیوتیک‌های ذکر شده، در دو فرم CFS[4] و NCFS[5] به ترتیب سوپرناتانت بدون سلول و سوپرناتانت بدون سلول با pH خنثی در این پژوهش استفاده شدند. به این صورت‌که از باکتری‌های پروبیوتیک فعال‌شده مایه تلقیح تهیه و از آن به ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت MRS مایع افزوده شد. جهت بررسی اثر زمان بر قدرت آنتی باکتریال پس از گذشت ۲۴و ۴۸ ساعت از انکوباسیون نمونه ها، توده زیستی پروبیوتیک‌ها با دور ۸۰۰۰ xg به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ و مایع روماند (CFS) جدا شد. هر نمونه به دو قسمت تقسیم و یک قسمت توسط سدیم هیدروکسید به pH حدوداً ۶/۵ تنظیم که با عنوان NCFS نام‌گذاری شدند. پس‌ازآن با فیلتر سرنگی ۰/۲ µm استریل و جهت انجام آزمایشات بعدی در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند (۱۳-۱۱).

ارزیابی فعالیت آنتی باکتریالی به روش پور پلیت

از کشت تازه‌ی باکتری مرجع *لیستریا منوسیتوژنز* به محیط کشت TSA تلقیح (استاندارد نیم مک‌فارلند) و بعد از اختلاط در پلیت های ۸ سانتی متری توزیع شد. چاهک‌هایی روی محیط کشت TSA ایجاد و ۱۰۰ µL از پست‌بیوتیک-ها (CFS و NCFS) بارگذاری شد. قطر هاله‌ی عدم رشد ایجاد شده پس از ۲۴ ساعت گرم‌خانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، طبق شکل شماره یک بررسی و اندازه‌گیری شد. آزمایش فوق در سه تکرار برای نمونه‌ها انجام شد. بر-اساس استاندارد ملی ایران به شماره ۱۹۴۵۹ وجود هاله عدم رشد با قطر بیش از ۲ میلی‌متر، به عنوان اثرآنتی‌باکتریال مثبت علیه *لیستریا منوسیتوژنز* گزارش شد.

تعیین حداقل غلظت بازدارنده (MICs[6]) به روش پورپلیت

این آزمایش به‌منظور بررسی حداقل غلظت بازدارنده پست‌بیوتیک‌های تولیدشده (CFS و NCFS) بر مهار رشد باکتری مرجع *لیستریا منوسیتوژنز* انجام شد. باکتری پاتوژن در محیط TSA به روش پور پلیت کشت داده شد. چاهک-هایی روی محیط کشت ایجاد و ۱۰۰ µL از پست‌بیوتیک‌ها (CFS و NCFS) (در غلظت‌های ۱۰۰تا ۲۵درصد) بارگذاری شد. آزمایش فوق نیز در سه تکرار و بر اساس اندازه‌گیری هاله‌ی شفاف عدم رشد انجام گردید (۱۱). آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، تتراسایکلین و کانامایسین در یک سری رقت (۱.۲۸-۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) تهیه و به‌عنوان کنترل مثبت و محیط کشت MRS به‌عنوان کنترل منفی استفاده گردید (۱۲).

تعیین حداقل غلظت بازدارنده پست‌بیوتیک‌ها به روش Broth Microdilution Assays

در این روش در چاهک‌های میکروپلیت ۱۰۰µL میکرولیتر اپاتوژن *لیستریا مونوسیتوژنز* (استاندارد نیم مک‌فارلند) بارگذاری شدند. ۱۰۰µL از CFS و NCFSها (در غلظت های ۱۰۰تا ۲۵درصد) با سه تکرار درون هر چاهک ریخته وبه مدت ۴۸ ساعت درون انکوباتور شیکر دار ۳۷ درجه سلسیوس گرم‌خانه گذاری شدند. اندازه‌گیری جذب نوری در طول موج ۶۰۰ nm انجام شد. نمونه‌ی کنترل مثبت فاقد

[2] de man, rogosa and sharpe (MRS) agar
[3] Tryptic Soy Agar
[4] Cell-Free Supernatant
[5] Neutral-pH Cell-Free Supernatant
[6] Minimum inhibitory concentration

[Downloaded from amfi.ir on 2024-05-26]

پست‌بیوتیک و نمونه کنترل منفی فقط محیط کشت TSB (شرکت Merck آلمان) بوده است (۱۴ و ۱۲).

تعیین حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC[7]) پست‌بیوتیک‌ها

این آزمون با کشت باکتری پاتوژن در چاهک و بازده منفی رشد آن پس از انکوباسیون، جهت تعیین تعداد سلول‌های باقی‌مانده بر اساس میزان رشد کلنی و یا عدم رشد انجام شد. به این منظور ۱۰۰ µL از CFS وNCFSها به‌صورت خالص (رقیق نشده) و با غلظت ۵۰٪، با ۱۰۰ µL پاتوژن *لیستریا مونوسیتوژنز* (استاندارد نیم مک‌فارلند) در سه تکرار درون هر چاهک میکروتیتر پلیت بارگذاری و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس گرم‌خانه گذاری شدند. سپس ۱۰۰ µL از هر چاهک روی محیط TSA کشت خطی انجام شد. تعداد کلنی‌های حاصل بعد از انکوباسیون تأثیر کشندگی پست‌بیوتیک را نشان داد (۱۵، ۱۴ ، ۱۲).

بررسی اثر مهاری پست‌بیوتیک در تشکیل بیوفیلم توسط پاتوژن *لیستریا مونوسیتوژنز* (Crystal Violet assay)

در هر چاهک میکروتیتر پلیت، ۱۰۰ میکرولیتر محیط TSB و ۱۰۰µL از CFS وNCFSها (خالص (رقیق نشده) و غلظت۵۰٪) بارگذاری شد. ۵۰µL از پاتوژن *لیستریا مونوسیتوژنز* با کدورتی معادل ۱×۱۰^{-۶} (معادل نیم مک‌فارلند) درون چاهک‌ها ریخته و ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شد. نمونه کنترل مثبت فاقد پست‌بیوتیک و کنترل منفی عاری از باکتری پاتوژن بود. پس از گرمخانه گذاری چاهک‌ها به‌آرامی تخلیه و با DDW (آب مقطر آمپولی) شسته شدند. سپس با ۲۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۰/۵٪ رنگ‌آمیزی و ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم‌خانه گذاری شد. مایع رویی به‌آرامی تخلیه و با محلول اتانول و استن (نسبت ۸۰به ۲۰ درصد) شسته شد. درآخر چاهک‌ها دو بار با محلول PBS شسته و با دستگاه الایزا ریدر در طول‌موج ۴۹۲ نانومتر جذب نوری (OD) قرائت گردید (۱۷ و ۱۶). درصد مهار تشکیل بیوفیلم از رابطه‌ی زیر محاسبه شد.

$$\text{درصد مهار تشکیل بیوفیلم} = \frac{\text{(میزان جذب نمونه − میزان جذب کنترل مثبت}}{\text{میزان جذب کنترل مثبت}} \times ۱۰۰$$

آنالیز آماری و تجزیه و تحلیل نتایج

آزمون‌ها در این پژوهش در سه تکرار انجام‌شده و اختلاف بین میانگین‌ها با استفاده از آزمون تحلیل واریانس در نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ مقایسه و مقادیر با $p<0.05$ معنی‌دار فرض شدند. اختلاف معنادار بین گروه‌ها نیز با استفاده از آزمون دانکن (نتایج ارزیابی فعالیت آنتی باکتریالی) و حداقل تفاوت معنی دار (اثر مهاری پست‌بیوتیک در تشکیل بیوفیلم) بررسی شدند.

نتایج تغییر pH پس از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت از گرمخانه‌گذاری

pH محیط حاوی *لاکتوباسیلوس پلانتارم* پس از ۲۴ ساعت ۳/۶۶ و بعد از ۴۸ ساعت به ۳/۴۵ کاهش یافت که نسبت به سایر باکتری‌ها اسیدی‌تر بود. رشد *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* با کاهش pH از ۳/۷۸ به ۳/۶۸ و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس از* ۴/۳۱ به ۳/۹۵ در محیط کشت MRS مایع همراه بود.

نتایج ارزیابی فعالیت آنتی باکتریالی به روش پور پلیت

نتایج نشان داد که فقط نمونه‌های CFS قادر به مهار رشد پاتوژن بودند. در ارتباط با فاکتور زمان، نمونه‌های تخمیری ۴۸ ساعته فعالیت آنتی باکتریال بهتری نسبت به تخمیر ۲۴ ساعته داشتند. آنالیز آماری نشان داد که هر سه نمونه، قادر به مهار پاتوژن هستند و اختلاف معناداری بین عملکرد سه سویه وجود دارد.($p<0.05$) به ترتیب *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* با قطر ۱۶/۷ میلی‌متر، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* ۱۴/۷ میلی‌متر و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* ۱۲/۷ میلی‌متر هاله‌ی عدم رشد

[7] Minimum bactericidal concentration

[Downloaded from amfi.ir on 2024-05-26]

ایجاد کردند که دلالت بر قدرت آنتی‌باکتریالی پست-بیوتیک‌ها دارد.

(ج) (ب) (الف)

شکل شماره ۱-نمونه ای از فعالیت آنتی باکتریالی پست بیوتیک ها

الف: هاله پست بیوتیک *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (CFS 48, 24h)، ب: هاله پست بیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (CFS 48, 24h)، ج:عدم وجود هاله در پست بیوتک های نرمال شده *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (NCFS 48,24h)

جدول شماره۱- نتایج اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد پور پلیت.

حروف غیر مشابه نشان دهنده وجود تفاوت آماری بین میانگین های قطر هاله عدم رشد نمونه های پست بیوتیک ۴۸ ساعته می‌باشد.

ردیف	نمونه‌ی پست بیوتیک	قطر هاله (mm)
۱	*Lactobacillus plantarum*(CFS) 24 h	7/14±0.18
۲	*Lactobacillus plantarum*(CFS) 48 h	16/7±0.75[a]
۳	*Lactobacillus rhamnosus* (CFS) 24 h	11/7±0.41
۴	*Lactobacillus rhamnosus* (CFS) 48 h	14/7±0.37[b]
۵	*Lactobacillus acidophilus*(CFS) 24 h	11±0.61
۶	*Lactobacillus acidophilus*(CFS) 48 h	12/7±0.44[c]

نتایج حداقل غلظت بازدارنده پست‌بیوتیک‌ها به روش پورپلیت

با توجه به جدول شماره دو CFS *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* با غلظت ۵۰ درصد توانایی مهار رشد *لیستریا مونوسیتوژنز* را دارد و قطر هاله‌ی عدم رشد در آن نسبت به سایر پست-بیوتیک‌ها بیشتر است. پست‌بیوتیک‌های دیگر در غلظت‌های بالاتر قادر به مهار رشد پاتوژن هستند. *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در غلظت ۵۰درصد قطر ۹/۳ میلی‌متر، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* در غلظت ۵۰ درصد ۸/۳ میلی‌متر و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در غلظت ۶۰ درصد قطر ۶/۳ میلی‌متر، هاله‌ی عدم رشد ایجاد کردند. ضمناً هیچ‌کدام از NCFSها اثر مهاری از خود نشان ندادند. در حالیکه قطر هاله عدم رشد باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* در حضورآنتی-بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، تتراسایکلین و کانامایسین در غلظت ۰.۰۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به ترتیب ۱۴، ۱۰.۳ و ۹.۷ میلی-متر و در غلظت ۱.۲۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به ترتیب ۴۳، ۳۸.۷ و ۳۴.۳ میلی‌متر اندازه‌گیری شد.

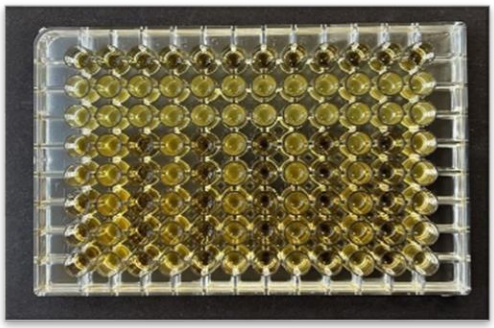
[Downloaded from amfi.ir on 2024-05-26]

جدول شماره ۲ - نتایج اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد *لیستریا مونوسیتوژنز* در آزمون حداقل غلظت بازدارنده پست بیوتیک

غلظت پست بیوتیک‌ها (برحسب درصد)	۱۰۰	۹۰	۸۰	۷۰	۶۰	۵۰	۲۵
Lactobacillus plantarum (CFS -24 h)	۱۳/۷	۱۱/۷	۱۰/۳	۱۰	۸/۳	۷	۰
Lactobacillus plantarum (CFS -48 h)	۱۵/۷	۱۳/۷	۱۱/۷	۱۱/۳	۱۰/۳	*۹/۳	۰
Lactobacillus rhamnosus (CFS -24 h)	۱۱/۷	۱۰/۷	۱۰	۸/۷	۸	۶/۷	۰
Lactobacillus rhamnosus (CFS -48 h)	۱۳/۳	۱۲	۱۱/۳	۱۰/۳	۸/۳	7*	۰
Lactobacillus acidophilus (CFS -24 h)	۱۲/۳	۱۰/۷	۸/۷	۷/۳	۵/۷	۰	۰
Lactobacillus acidophilus (CFS -48 h)	۱۳	۱۱/۷	۱۰/۳	۷/۷	*۶/۳	۰	۰

نتایج آزمون حداقل غلظت بازدارنده پست-بیوتیک‌ها به روش Broth Microdilution Assays

مقایسه خوانش کدورت در ۶۰۰ نانومتر این آزمون نیز به‌درستی تائید کرد که رشد پاتوژن در حضور تیمارهای پست‌بیوتیک ۴۸ ساعته، کمتر از تیمارهای پست بیوتیک ۲۴ ساعته از یک گونه است. از طرفی CFS *پلانتاروم* در مقایسه با سایر گونه‌ها مؤثرتر بوده است. همچنین حداقل غلظت بازدارندگی رشد پاتوژن در غلظت ۵۰ درصد پست‌بیوتیک *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *رامنوسوس* و در غلظت ۶۰درصد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* مشاهده شد(شکل ۲).



شکل شماره۲- میکرو پلیت آزمون MIC پست‌بیوتیک‌ها

نتایج حاصل از آزمون حداقل غلظت باکتری‌کشی پست‌بیوتیک‌ها

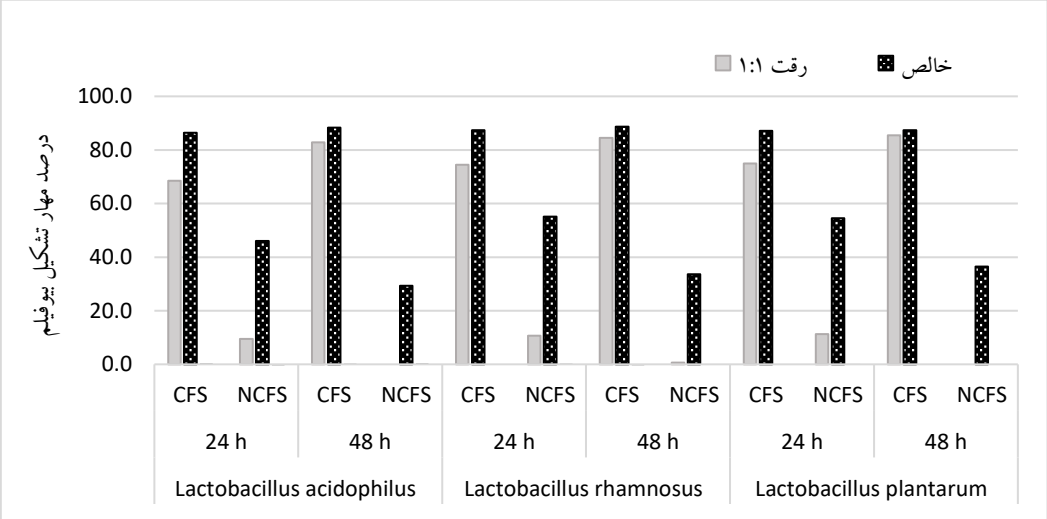
هدف از این آزمون، بررسی خاصیت باکتری‌کشی پست‌بیوتیک‌ها در کنار خواص آنتی‌باکتریال آن‌ها بود. نتایج حاکی از آن است توانایی کاهش جمعیت میکروبی بیشتری در تیمارهای ۴۸ ساعت و خالص (رقیق نشده) پست‌بیوتیک هر سه سویه مشاهده گردید. به‌طوریکه نتیجه‌ی شمارش تعداد پرگنه‌های *لیستریا مونوسیتوژنز* به روی محیط TSA در بین CFS سویه‌ها با تیمار ۴۸ ساعته و رقیق نشده بر حسب(CFU/mL) برای *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ۵ ، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* ۹ و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* ۲۳ بود. درحالیکه در تیمارهای ۲۴ ساعته و با غلظت ۵۰ درصد تعداد پرگنه‌های باکتری پاتوژن بر حسب(CFU/mL) برای *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ۱۷ ، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* ۲۱ و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* ۴۳ شمارش شد. آنالیز آماری در هر سه نمونه پست‌بیوتیکی، تفاوت معناداری ازنظر قدرت باکتری‌کشی را تائید کرد ($p<0.05$). بنابراین در ارتباط با خاصیت باکتری‌کشی نوع پروبیوتیک به کار گرفته‌شده در تهیه‌ی ماده‌ی پست‌بیوتیک حائز اهمیت است و باکتری پلانتاروم بهترین عملکرد را علیه *لیستریا مونوسیتوژنز* نشان داد. آزمون‌های حداقل غلظت بازدارنده MIC و MBC نتایج مکملی را نشان دادند که

[Downloaded from amfi.ir on 2024-05-26]

اثبات کرد پست‌بیوتیک‌های تولیدشده توانایی مهار رشد پاتوژن *لیستریا منوسیتوژنز* را دارند. طبق نتایج NCFS در هیچ‌کدام از سویه‌ها، قادر به ایجاد اثرات آنتی باکتریال نبودند.

نتایج اثر مهاری پست‌بیوتیک در تشکیل بیوفیلم پاتوژن *لیستریا منوسیتوژنز* (Crystal Violet assay)

با توجه به شکل شماره ۳، آنالیز آماری نشان داد، پست‌بیوتیک‌های تولیدشده توانایی پیشگیری از تشکیل بیوفیلم باکتریایی را نسبت به نمونه کنترل مثبت دارند. زمان برداشت پست‌بیوتیک، pH پست‌بیوتیک و غلظت، بر درصد مهار بیوفیلم باکتری پاتوژن توسط هر سویه تأثیرگذار هستند($p<0.05$). دو سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* ازنظر آماری عملکردی مشابه یکدیگر نشان دادند($p>0.05$). نتایج نشان داد، بیشترین درصد مهار تشکیل بیوفیلم (۸۸.۷٪) متعلق به CFS (۴۸ ساعته) رقیق نشده در گونه‌ی *رامنوسوس* بود.



شکل شماره ۳- نمودار نتایج درصد مهار تشکیل بیوفیلم توسط پست بیوتیک ها

بحث و نتیجه‌گیری

در دهه گذشته شناسایی و استفاده از گونه‌های غیربیماری‌زای باکتری‌ها و متابولیت‌های آن‌ها که بتوانند به سبب خاصیت آنتاگونیستی که دارند، رشد باکتری‌های بیماری‌زا را متوقف کنند، موردتوجه قرارگرفته است. در میان نگهدارنده‌های زیستی بیشترین توجه به لاکتیک اسید باکتری‌ها بوده است که به‌طور طبیعی در انواع مختلفی از غذاها ازجمله لبنیات، گوشت‌ها و سبزیجات یافت می‌شوند. این باکتری‌ها تولیدکننده چندین نوع ترکیب ضدمیکروبی می‌باشد (۱۸).

یکی از عوامل اصلی مرگ و میر در جهان مربوط به بیماری‌های عفونی بوده، از سوی دیگر گسترش سویه‌های بیماری‌زای مقاوم در برابر داروها، افزایش رادیکال‌های آزاد در منابع غذایی و عوارض جانبی داروهای شیمیایی محققین را به سمت استفاده از ترکیبات طبیعی سوق داده است که پست‌بیوتیک‌ها یکی از سودمندترین، جدیدترین و ایمن‌ترین ترکیبات طبیعی قابل استفاده در جهت کنترل عوامل میکروبی می‌باشند. پست‌بیوتیک‌ها ترکیبات زیست فعالی هستند که توسط باکتری‌های زنده حین رشد در محیط کشت و داخل ماده غذایی ترشح می‌شوند که بر اساس نوع و ترکیب شیمیایی به انواع لیپیدی، پروتئینی، کربوهیدراتی و

[Downloaded from amfi.ir on 2024-05-26]

ویتـامینی طبقه بندی می‌شوند. به همین روی، در این مطالعه به بررسی اثرات آنتی‌باکتریال پست‌بیوتیک‌ها پرداخته شد. با توجه به مطالعات پیشین و نتایج حاصل از این مطالعه می‌توان به این موضوع پی برد که افزایش غلظت پست بیوتیک‌ها به طور موثری سبب افزایش خواص آنتی‌باکتریالی آن‌ها می‌گردد که این امر با توجه به ماهیت ماده‌ی پست بیوتیک و حفظ خواص آن در طول ذخیره سازی سرد و اثر مهاری آن بر رشد میکروبی، این ماده را به عنوان کاندید بسیار مناسبی جهت جایگزین شدن با نگهدارنده های شیمیایی کرده است. همچنین یافته ها نشان داد که بین قدرت آنتی‌باکتریالی با زمان تخمیر، اسیدیته‌ی پست بیوتیک و غلظت آن رابطه‌ی مستقیمی وجود دارد. همچنین خاصیت آنتی‌باکتریالی یک پدیده‌ی وابسته به سویه است. در سال ۲۰۱۶ Mitjans و همکاران به بررسی اثر لاکتیک اسید باکتری‌ها بر ممانعت رشد میکروارگانیسم‌های عامل فساد پرداختند. در این مطالعه گونه‌های مولد باکتریوسین از شیر بز جداسازی شدند و قادر به ممانعت رشد *لیستریا منوسیتوژنز* (ATCC74902) بودند، قطر هاله‌های عدم رشد بین ۸ تا ۱۲ میلی‌متر بود(۱۹). شباهت مطالعه‌ی حاضر در اثر بازدارندگی پست‌بیوتیک‌های حاصل از باکتری‌های لاکتوباسیلوس بر روی *لیستریا منوسیتوژنز* و قطر هاله عدم رشد که ۱۶/۷ میلی‌متر بود، می‌باشد. با توجه به عدم حضور سلول زنده در پست‌بیوتیک‌ها و میزان اثربخشی آن در مقایسه با استفاده از سویه‌های پروبیوتیک زنده که گاهی برخی افراد جامعه به علت نقص سیستم ایمنی امکان استفاده از آن را ندارند بسیار کارآمد و ایمن‌تر است.

Amiri و همکاران نیـز فعالیـت ضـد میکروبـی *لاکتوباسـیلوس بولگـاریکوس* و *اسـترپتوکوکوس ترموفیلـوس* جـدا شـده از ماست‌های گلپایگان را بـا دو روش دیسـک و چاهـک علیه *اشریشیاکلی* (۹ میلی‌متر) ، *استافیلوکوکوس اورئـوس* (۱۱ /۳ میلی‌متر) و *لیستریا منوسیتوژنز* (۹/۴ میلی متر) نشان دادند (۲۰). در پژوهش حاضر نیز قطر هاله‌های *لاکتوباسیلوس پلانتارم* (۱۷ میلی‌متر)، رامنوسوس (۱۴ میلی‌متر) و در آخر اسیدوفیلوس (۱۲ میلی‌متر) بود. نتایج نشان داد که رابطه‌ی مستقیم بین افزایش اسیدیته و قدرت آنتی‌باکتریال پست‌بیوتیک‌ها وجود دارد. همچنین با افزاش زمان تخمیر، اسیدیته افزایش یافته و علت اثربخشی بهتر تیمار ۴۸ ساعته نسبت به ۲۴ ساعته همین امر بوده است.

در سال ۲۰۱۴، Slozilova توانایی ۸ باکتری لاکتیک اسید را برای مهار رشد *لیستریا منوسیتوژنز* که از منابع مختلف جداسازی شده بود، به روش چاهک گذاری مورد ارزیابی قرارداد(۲۱). میانگین قطر هاله عدم رشد حدود ۱۶ میلی‌متر به دست آمد. در یافته‌ی پژوهش حاضر تأثیر CFS پلانتاروم با تیمار زمانی ۴۸ ساعته اثربخشی بهتری از خود نشان داد.

Mahdavi و همکاران، اثر *لاکتوکوکوس لاکتیس* را علیه *لیستریا منوسیتوژنز* و *باسیلوس سرئوس* بررسی کرد. نتایج این مطالعه نشان داد که نایسین فعالیت ضدمیکروبی بالایی دارد(۲۲). در تحقیق حاضر نتایج حاصل از آزمون MIC به روش میکروتیتراسیون، اثر آنتی‌باکتریال CFSها بر فاز رشد *لیستریا منوسیتوژنز* نشان داد که بیشترین فعالیت آنتی‌باکتریالی، در ساعات اولیه فاز سکون (۱۴ ساعت بعد از شروع تلقیح) است که به علت وجود اسید تیکوئیک در محصولات ثانویه باکتری (همان CFS) است و با ایجاد استرس اکسیداتیو و اثر منفی بر دیواره‌ی سلولی پاتوژن سبب مهارپاتوژن می‌شود.

ارتباط بین منشاء جداسازی سویه‌های میکروبی با شدت فعالیت ضدمیکروبی توسط Tremonte و همکاران (۲۰۱۷) گزارش‌شده است (۲۳). بر اساس نتایج پژوهش مذکور شرایط استرس‌زای محیطی در محیط تولید، قابلیت تولید ترکیبات ضدمیکروبی توسط سویه‌های لاکتوباسیلوس را بیشتر می‌کند. مهم‌ترین مکانیسم‌های مهاری در فعالیت آنتی‌باکتریال پست‌بیوتیک‌ها ناشی از تاثیر بر لایه‌ی فسفولیپیدی غشا باکتریایی است که با از بین بردن غشای سلولی، سبب ایجاد استرس اکسیداتیو در پاتوژن و اختلال در چرخه‌ی متابولیسمی و تقسیم سلولی می‌شود. در این پژوهش قدرت آنتی‌باکتریال مناسبی توسط پست‌بیوتیک‌های تولید

[Downloaded from amfi.ir on 2024-05-26]

شده به ویژه پست‌بیوتیک *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (PTCC 1745) اثبات شد. به‌نظر می‌رسد انجام پژوهش‌های بیشتر در زمینه شناسایی ترکیبات، روش‌های تغلیظ و خشک‌کردن مناسب پست‌بیوتیک‌ها و فرمولاسیون آن‌ها امکان استفاده از این مواد آنتی‌باکتریال زیستی را در صنایع غذائی و دامپزشکی در آینده فراهم کند.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر از پایان‌نامه دانشجویی در مقطع کارشناسی ارشد گروه علوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج است.

تعارض منافع

طبق اظهار نویسندگان تعارض در منافع وجود ندارد.

[Downloaded from amfi.ir on 2024-05-26]

منابع

1. Rhee SJ, Lee JE, Lee CH. Importance of lactic acid bacteria in Asian fermented foods. InMicrobial Cell Factories. 2011; 10(1): 1-13.

2. Moludi J, Alizadeh M, Yagin NL, Pasdar Y, Nachvak SM, Abdollahzad H, et al. New insights on atherosclerosis: A cross-talk between endocannabinoid systems with gut microbiota. J Cardiovasc Thorac Res. 2018 Sep;10(3):129.

3. Homayouni A, Azizi A, Ehsani M, Yarmand M, Razavi S. Effect of microencapsulation andresistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. Food Chem. 2008 Nov;111(1):50-5.

4. Koohsari H, Rashti Z, Arab S. The Isolation of lactic acid bacteria from local dairy products of Gorgan township with the ability to inhibit the growth of some gastrointestinal pathogens. Journal of Food Microbiology. 2019 Sep 23;6(3):22-36.

5. Wegh CA, Geerlings SY, Knol J, Roeselers G, Belzer C. Postbiotics and their potential applications in early life nutrition and beyond. Int J Mol Sci. 2019 Sep;20(19):4673.

6. Sharma A, Das P, Buschmann M, Gilbert JA. The future of microbiome-based therapeutics in clinical applications. Clin Pharmacol Ther. 2020 Oct;107(1):123-8.

7. Sanders ME, Akkermans LM, Haller D, Hammerman C, Heimbach JT, Hörmannsperger G, et al. Safety assessment of probiotics for human use. Gut microbes. 2010 May;1(3):164-85.

8. Shigwedha N. Probiotical cell fragments (PCFs) as “novel nutraceutical ingredients”. J Biosci Med. 2014 Dec;2(03):43.

9. Rajabi S, Darban D, Rafie Tabatabaei R, Hosseini F. Investigation the Effect of Spore-Forming Probiotics on the Expression of Virulence genes hly, plc, inlA of L. Monocytogenes. JABS 2020; 10 (4) :2916-2925

10. Dalzini E, Bernini V, Bertasi B, Daminelli P, Losio MN, Varisco G. Survey of prevalence and seasonal variability of Listeria monocytogenes in raw cow milk from Northern Italy. Food Control. 2016 Feb 1;60:466-70.

11. Arena MP, Silvain A, Normanno G, Grieco F, Drider D, Spano G, Fiocco D. Use of Lactobacillus plantarum strains as a bio-control strategy against food-borne pathogenic microorganisms. Frontiers in microbiology. 2016 Apr 13;7:464

12. Hamad GM, Abdelmotilib NM, Darwish AM, Zeitoun AM. Commercial probiotic cell-free supernatants for inhibition of Clostridium perfringens poultry meat infection in Egypt. Anaerobe. 2020 Apr 1;62:102181.

13. Shahrampour D, Khomeiri M, Razavi MA, Kashiri M. Evaluating the Effect of Diversity of Lactobacillus plantarum Strains Isolated from Different on Their Antagonistic, Antioxidant and Aggregation Activities. Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology. 2019 May 10;14(2):39-53.

14. Chapman CM, Gibson GR, Rowland I. Effects of single-and multi-strain probiotics on biofilm formation and in vitro adhesion to bladder cells by urinary tract pathogens. Anaerobe. 2014 Jun 1;27:71-6.

15. Chapman CM, Gibson GR, Rowland I. Health benefits of probiotics: are mixtures more effective than single strains?. European journal of nutrition. 2011 Feb;50(1):1-7

16. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset CL. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT-Food science and Technology. 1995 Jan 1;28(1):25-30

17. Deegan C, Unerman J. Financial Accounting Theory. london. UK: McGrawYHill. 2006.

18. Kumari A, Angmo K, Monika S, Bhalla TC. Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and partial purification of its bacteriocin. CIBTech J. Biotechnol. 2016;5:8-16.

19. Amiri S, Kazemi S. Concept and potential applications of postbiotics in the food industry. FSCT 2022;19(126) :87-101

20. Složilová I, Purkrtova S, Kosova M, MIhULOVÁ M, Šviráková E, Demnerová K. Antilisterial activity of lactic acid bacteria against Listeria monocytogenes strains originating from different sources. Czech Journal of Food Sciences. 2014 Apr 22; 32 (2):145-51.

[Downloaded from amfi.ir on 2024-05-26]

Drory N, Boquien M, Thomas D. SDSS IV MaNGA–metallicity and nitrogen abundance gradients in local galaxies. Monthly Notices of the Royal Astronomical Society. 2017 Jul; 469(1):151-70.

21. Sanaei M, Yazdi M H, Mahdavi M. Postbiotics; Next-generation Probiotics. aumj 022; 11 (4) :513-523

22. Belfiore F, Maiolino R, Tremonti C, Sánchez SF, Bundy K, Bershady M, Westfall K, Lin L,

[Downloaded from amfi.ir on 2024-05-26]

Evaluation of postbiotic antibacterial power of Lactobacillus bacteria against *Listeria monocytogenes*

Elmira Tizjang[1], Hadis Moteshafi [2], **Ebrahim Babapour**[3*]

[1]Master of Science (M.Sc.) Microbiology, Biotechnology Research Center, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran

[2]Assistant Professor of Products processing Department, Animal Science Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO)Karaj, Iran

[3]Assistant Professor of Microbiology, Biotechnology Research Center, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran

Abstract:

Due to the growing demand of society to use safe food protocols and pay attention to the health of the food basket, the importance of using natural preservatives has increased. *Listeria monocytogenes* is one of the most important food pathogens. Therefore, the present study was conducted to evaluate the postbiotic antibacterial power of *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, and *Lactobacillus acidophilus* bacteria on this pathogen. The postbiotics were produced in 24 and 48 hours of fermentation and their antibacterial power was determined at acidic and neutral pH by welling methods in agar, determining the minimum inhibitory concentration, determining the minimum bactericidal concentration, as well as the inhibitory effect on the creation of biofilm by *Listeria monocytogenes* was investigated. The results showed that plantarum species postbiotics at acidic pH and 48 hours' time treatment are more effective in inhibiting biofilm formation and antibacterial power than other postbiotics. The general findings showed that, firstly, the antimicrobial properties of postbiotics are related to the strain and acidic properties. Secondly, dilution of postbiotics effectively reduces antibacterial properties. Considering the antibacterial properties of postbiotics, stability of properties during cold storage, non-toxic nature, and effect in reducing inflammatory responses, they can be considered suitable candidates to replace chemical preservatives.

Keywords: Lactobacillus, postbiotic, *Listeria monocytogenes*, antibacterial, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*

* e.babapour@kiau.ac.ir

[Downloaded from amfi.ir on 2024-05-26]