



ارزیابی قدرت آنتی‌باکتریال پست‌بیوتیک باکتری‌های جنس لاکتوباسیلوس علیه لیستریا منوسیتوژنز

المیرا تیزجنگ^۱، حدیث مثنقی^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 به سلامت سبب غذایی، اهمیت استفاده از نگه‌دارنده‌های طبیعی بیشتر شده است. لیستریا منوسیتوژنز یکی از مهم‌ترین پاتوژن‌های غذایی است. از این روی پژوهش حاضر باهدف ارزیابی قدرت آنتی‌باکتریال پست‌بیوتیک باکتری‌های لاکتوباسیلوس پلانٹاروم، 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 چاهک‌گذاری 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 پلانٹاروم 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 ضد میکروبی پست‌بیوتیک‌ها متأثر از نوع سویه و خاصیت اسیدی و مدت زمان کشت است. ثانیاً، 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، پست‌بیوتیک، آنتی‌باکتریال، لیستریا منوسیتوژنز، لاکتوباسیلوس پلانٹاروم، لاکتوباسیلوس رامنوسوس، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس

* e.babapour@kiaou.ac.ir

مقدمه

پروبیوتیک‌ها را ایجاد کنند (۳). پست‌بیوتیک‌ها اولاً با توجه به ویژگی‌های منحصر به فرد خود از جمله پایداری، ایمن و غیرسمی بودن 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). در نتیجه با وجود 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 داده شده (۷)، دارای مزایای ایمنی بر پروبیوتیک‌ها بوده و به عنوان نسل جدید پروبیوتیک‌ها و جایگزین ایمن برای آن‌ها شناخته می‌شوند و می‌توانند در قالب سیستم دارویی یا غذاهای فراسودمند برای اهداف پیشگیری و درمانی مورد استفاده قرار بگیرند (۸). بیماری‌های ناشی از مسمومیت و آلودگی مواد غذایی باعث به وجود آمدن نگرانی در مقیاس جهانی برای مصرف‌کنندگان می‌باشند. لیستریا منوسیترنر به عنوان یک عامل بیماری‌زای قابل انتقال 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 منوسیترنر در مطالعات بسیاری از کشورهای مختلف نشان داده شده است (۱۰). فلذا این مطالعه باهدف ارزیابی قدرت آنتی‌باکتریال پست بیوتیک باکتری‌های لاکتوباسیلوس پلاتناروم، لاکتوباسیلوس رامنوسوس و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بر روی لیستریا منوسیترنر انجام گردید.

امروزه انواع مختلفی از محصولات غذایی تخمیر شده در سراسر جهان وجود دارد که بسته به نوع مواد خام و افزودنی‌های مورد استفاده 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 هموستازیس 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. از این رو مصرف غذاها یا مکمل‌های حاوی ترکیبات پست‌بیوتیک، از مهم‌ترین راهبردها برای تعدیل توازن میکروبیوتا و بهبود وضعیت سلامت میزبان محسوب می‌شود (۳). محدودیت‌های عملکردی فنی در پروبیوتیک‌ها مانند کنترل زنده‌مانی، کاربرد بالقوه آن‌ها را در بخش‌های غذایی و دارویی با مشکل روبرو کرده است؛ بنابراین، تمرکز به تدریج 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

مواد و روش ها

میکروارگانسیم های استاندارد استفاده شده در این پژوهش لاکتوباسیلوس پلانشاروم (PTCC 1745)، لاکتوباسیلوس رامنوسوس (PTCC 1637)، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (PTCC 1643) و لیستریا منوسیترنوز (PTCC 1298) از کلکسیون میکروارگانسیم های صنعتی سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران تهیه شدند. در گام اول اقدام به فعال سازی باکتری های لاکتوباسیلوس در محیط MRS آگار^۲ (شرکت Merck آلمان) و پاتوژن روی محیط TSA^۳ (شرکت Merck آلمان) و برای مراحل بعدی پژوهش استفاده شد.

تولید پست بیوتیک از کشت پروبیوتیک

پست بیوتیک های حاصل از کشت پروبیوتیک های ذکر شده، در دو فرم CFS^۴ و NCFS^۵ به ترتیب سوپرناتانت بدون سلول و سوپرناتانت بدون سلول با pH خنثی در این پژوهش استفاده شدند. به این صورت که از باکتری های پروبیوتیک فعال شده مایه تلقیح تهیه و از آن به ۲۰ میلی لیتر محیط کشت MRS مایع افزوده شد. جهت بررسی اثر زمان بر قدرت آنتی باکتریال پس از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت از انکوباسیون نمونه ها، توده زیستی پروبیوتیک ها با دور ۸۰۰۰ xg به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ و مایع رومانند (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 نام گذاری شدند. پس از آن با فیلتر سرنگی ۰/۲ μm استریل و جهت انجام آزمایشات بعدی در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند (۱۱-۱۳).

ارزیابی فعالیت آنتی باکتریالی به روش پور پلیت

از کشت تازه ی باکتری مرجع لیستریا منوسیترنوز به محیط کشت TSA تلقیح (استاندارد نیم مک فارلند) و بعد از اختلاط در پلیت های ۸ سانتی متری توزیع شد. چاهک هایی

روی محیط کشت TSA ایجاد و ۱۰۰ μL از پست بیوتیک-ها (CFS و NCFS) بار گذاری شد. قطر هاله ی عدم رشد ایجاد شده پس از ۲۴ ساعت گرم خانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، طبق شکل شماره یک بررسی و اندازه گیری شد. آزمایش فوق در سه تکرار برای نمونه ها انجام شد. بر اساس استاندارد ملی ایران به شماره ۱۹۴۵۹ وجود هاله عدم رشد با قطر بیش از ۲ میلی متر، به عنوان اثر آنتی باکتریال مثبت علیه لیستریا منوسیترنوز گزارش شد.

تعیین حداقل غلظت بازدارنده (MICs) به روش پور پلیت

این آزمایش به منظور بررسی حداقل غلظت بازدارنده پست بیوتیک های تولید شده (CFS و NCFS) بر مهار رشد باکتری مرجع لیستریا منوسیترنوز انجام شد. باکتری پاتوژن در محیط TSA به روش پور پلیت کشت داده شد. چاهک های روی محیط کشت ایجاد و ۱۰۰ μL از پست بیوتیک ها (CFS و NCFS) (در غلظت های ۱۰۰ تا ۲۵ درصد) بار گذاری شد. آزمایش فوق نیز در سه تکرار و بر اساس اندازه گیری هاله ی شفاف عدم رشد انجام گردید (۱۱). آنتی بیوتیک های آمپی سیلین، تتراسایکلین و کاناماسین در یک سری رقت (۱-۲۸-۰ میلی گرم بر میلی لیتر) تهیه و به عنوان کنترل مثبت و محیط کشت MRS به عنوان کنترل منفی استفاده گردید (۱۲).

تعیین حداقل غلظت بازدارنده پست بیوتیک ها به روش Broth Microdilution Assays

در این روش در چاهک های میکرو پلیت ۱۰۰ μL میکرو لیتر پاتوژن لیستریا منوسیترنوز (استاندارد نیم مک فارلند) بار گذاری شدند. ۱۰۰ μL از CFS و NCFS ها (در غلظت های ۱۰۰ تا ۲۵ درصد) با سه تکرار درون هر چاهک ریخته و به مدت ۴۸ ساعت درون انکوباتور شیکر دار ۳۷ درجه سلسیوس گرم خانه گذاری شدند. اندازه گیری جذب نوری در طول موج ۶۰۰ nm انجام شد. نمونه ی کنترل مثبت فاقد

^۴ Cell-Free Supernatant

^۵ Neutral-pH Cell-Free Supernatant

^۶ Minimum inhibitory concentration

^۲ de man, rogosa and sharpe (MRS) agar

^۳ Tryptic Soy Agar

(OD) قرائت گردید (۱۷ و ۱۶). درصد مهار تشکیل بیوفیلم از رابطه‌ی زیر محاسبه شد.

$$100 \times \frac{\text{میزان جذب نمونه} - \text{میزان جذب کنترل مثبت}}{\text{میزان جذب کنترل مثبت}} = \text{درصد مهار تشکیل بیوفیلم}$$

آنالیز آماری و تجزیه و تحلیل نتایج

آزمون‌ها در این پژوهش در سه تکرار انجام شده 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 معنی‌دار (اثر مهارت پست‌بیوتیک در تشکیل بیوفیلم) بررسی شدند.

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

pH محیط حاوی لاکتوباسیلوس پلاتنارم 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 پلاتناروم با قطر ۱۶/۷ میلی‌متر، لاکتوباسیلوس رامنوسوس ۱۴/۷ میلی‌متر و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ۱۲/۷ میلی‌متر هاله‌ی عدم رشد

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

تعیین حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC)^۷ پست-بیوتیک‌ها

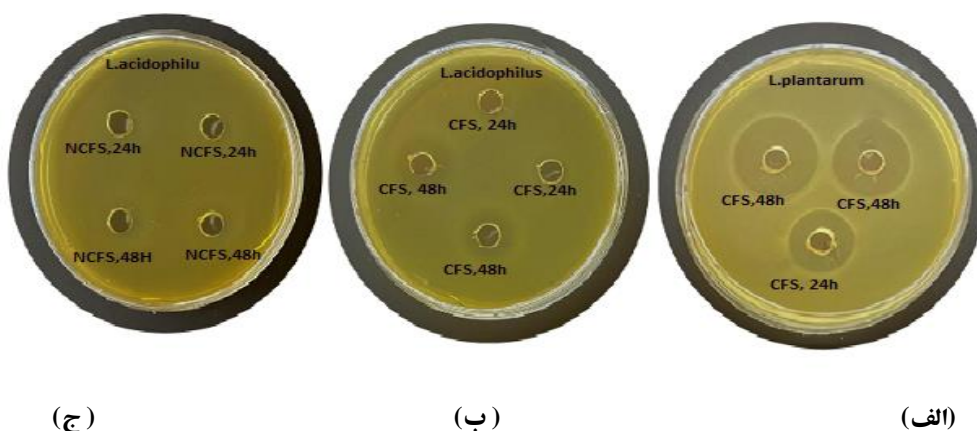
این آزمون با کشت باکتری پاتوژن در چاهک و بازده منفی رشد آن پس از انکوباسیون، جهت تعیین تعداد سلول‌های باقی‌مانده بر اساس میزان رشد کلنی و یا عدم رشد انجام شد. به این منظور ۱۰۰ μL از CFS و NCFS‌ها به صورت خالص (رقیق نشده) و با غلظت ۵۰٪، با ۱۰۰ μL پاتوژن لیستریا مونوسیترنر (استاندارد نیم مک‌فارلند) در سه تکرار درون هر چاهک میکرویتیر پلیت بارگذاری و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری 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 (۱۲، ۱۴، ۱۵).

بررسی اثر مهارت پست‌بیوتیک در تشکیل بیوفیلم توسط پاتوژن لیستریا مونوسیترنر (Crystal Violet assay)

در هر چاهک میکرویتیر پلیت، ۱۰۰ میکرولیتر محیط TSB و ۱۰۰ μL از CFS و NCFS‌ها (خالص (رقیق نشده) و غلظت ۵۰٪) بارگذاری شد. ۵۰ μL از پاتوژن لیستریا مونوسیترنر با کدورتی معادل $10^{-6} \times 10^6$ (معادل نیم مک-فارلند) درون چاهک‌ها ریخته و ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شد. نمونه کنترل مثبت فاقد پست‌بیوتیک و کنترل منفی عاری از باکتری پاتوژن بود. پس از گرمخانه‌گذاری چاهک‌ها به آرامی 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 گرم‌خانه‌گذاری شد. مایع رویی به آرامی تخلیه و با محلول اتانول و استن (نسبت ۸۰ به ۲۰ درصد) شسته شد. در آخر چاهک‌ها دو بار با محلول PBS شسته و با دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۴۹۲ نانومتر جذب نوری

⁷ Minimum bactericidal concentration

ایجاد کردند که دلالت بر قدرت آنتی باکتریالی پست-بیوتیک ها دارد.



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 بیوتیک های نرمال شده لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (NCFS 48, 24h)

جدول شماره ۱- نتایج اندازه گیری 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 می باشد.

ردیف	نمونه ی پست بیوتیک	قطر هاله (mm)
۱	<i>Lactobacillus plantarum</i> (CFS) 24 h	7/14±0.18
۲	<i>Lactobacillus plantarum</i> (CFS) 48 h	16/7±0.75 ^a
۳	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> (CFS) 24 h	11/7±0.41
۴	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> (CFS) 48 h	14/7±0.37 ^b
۵	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (CFS) 24 h	11±0.61
۶	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (CFS) 48 h	12/7±0.44 ^c

و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در غلظت ۶۰ درصد قطر ۶/۳ میلی متر، هاله ی عدم رشد ایجاد کردند. ضمناً هیچ کدام از NCFS ها اثر مهاری از خود نشان ندادند. در حالیکه قطر هاله عدم رشد باکتری لیستریا مونوسیژنوز در حضور آنتی-بیوتیک های آمپی سیلین، تتراسایکلین و کانامایسین در غلظت ۰.۰۱ میلی گرم در میلی لیتر به ترتیب ۱۴، ۱۰.۳ و ۹.۷ میلی-متر و در غلظت ۱.۲۸ میلی گرم در میلی لیتر به ترتیب ۴۳، ۳۸.۷ و ۳۴.۳ میلی متر اندازه گیری شد.

نتایج حداقل غلظت بازدارنده پست بیوتیک ها به روش پور پلیت

با توجه به جدول شماره دو CFS لاکتوباسیلوس پلانتاروم با غلظت ۵۰ درصد توانایی مهار رشد لیستریا مونوسیژنوز را دارد و قطر هاله ی عدم رشد در آن نسبت به سایر پست-بیوتیک ها بیشتر است. پست بیوتیک های دیگر در غلظت های بالاتر قادر به مهار رشد پاتوژن هستند. لاکتوباسیلوس پلانتاروم در غلظت ۵۰ درصد قطر ۹/۳ میلی متر، لاکتوباسیلوس رامنوسوس در غلظت ۵۰ درصد ۸/۳ میلی متر

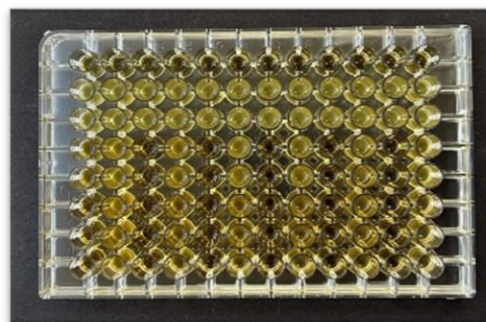
جدول شماره ۲ - نتایج اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد لیستریا منوسیتوژنز در آزمون حداقل غلظت بازدارنده پست بیوتیک

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

ساعته از یک گونه است. از طرفی CFS پلاتاروم در مقایسه با سایر گونه‌ها مؤثرتر بوده است. همچنین حداقل غلظت بازدارندگی رشد پاتوژن در غلظت ۵۰ درصد پست بیوتیک لاکتوباسیلوس پلاتاروم و رامنوسوس و در غلظت ۶۰ درصد لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس مشاهده شد (شکل ۲).

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

مقایسه خوانش کدورت در ۶۰۰ نانومتر این آزمون نیز به‌درستی تأیید کرد که رشد پاتوژن در حضور تیمارهای پست بیوتیک ۴۸ ساعته، کمتر از تیمارهای پست بیوتیک ۲۴



شکل شماره ۲- میکرو پلیت آزمون MIC پست بیوتیک‌ها

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 پلاتاروم ۱۷ ، لاکتوباسیلوس رامنوسوس ۲۱ و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ۴۳ شمارش شد. آنالیز آماری در هر سه نمونه پست بیوتیکی، تفاوت معناداری از نظر قدرت باکتری کشی را تأیید کرد ($p < 0.05$). بنابراین در ارتباط با خاصیت باکتری کشی نوع پروبیوتیک به کار گرفته‌شده در تهیه ماده‌ی پست بیوتیک حائز اهمیت است و باکتری پلاتاروم بهترین عملکرد را علیه لیستریا منوسیتوژنز نشان داد. آزمون‌های حداقل غلظت بازدارنده MIC و MBC نتایج مکملی را نشان دادند که

نتایج حاصل از آزمون حداقل غلظت باکتری کشی پست بیوتیک‌ها

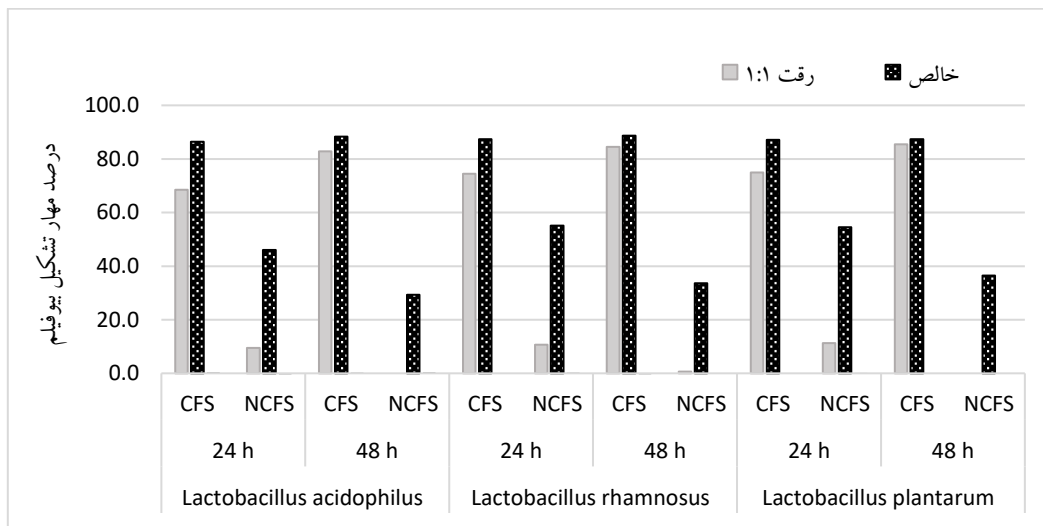
هدف از این آزمون، بررسی خاصیت باکتری کشی پست بیوتیک‌ها در کنار خواص آنتی باکتریال آن‌ها بود. نتایج حاکی از آن است توانایی کاهش جمعیت میکروبی بیشتری در تیمارهای ۴۸ ساعت و خالص (رقیق نشده) پست بیوتیک هر سه سویه مشاهده گردید. به‌طوریکه نتیجه‌ی شمارش تعداد پرگنه‌های لیستریا منوسیتوژنز به روی محیط TSA در بین CFS سویه‌ها با تیمار ۴۸ ساعته و رقیق نشده بر حسب (CFU/mL) برای لاکتوباسیلوس پلاتاروم ۵ ،

بیوفیلم باکتریایی را نسبت به نمونه کنترل مثبت دارند. زمان برداشت پست بیوتیک، pH پست بیوتیک و غلظت، بر درصد مهار بیوفیلم باکتری پاتوژن توسط هر سویه تأثیرگذار هستند ($p < 0.05$). دو سویه لاکتوباسیلوس پلانٹاروم و لاکتوباسیلوس رامنوسوس از نظر 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 بوده.

اثبات کرد پست بیوتیک‌های تولیدشده توانایی مهار رشد پاتوژن لیستریا منوسیوتوزنر را دارند. طبق نتایج NCFS در هیچ کدام از سویه‌ها، قادر به ایجاد اثرات آنتی باکتریال نبودند.

نتایج اثر مهاری پست بیوتیک در تشکیل بیوفیلم پاتوژن لیستریا منوسیوتوزنر (Crystal Violet assay)

با توجه به شکل شماره ۳، آنالیز آماری نشان داد، پست بیوتیک‌های تولیدشده توانایی پیشگیری از تشکیل



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

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 پست بیوتیک‌ها یکی از سودمندترین، جدیدترین و ایمن‌ترین ترکیبات طبیعی قابل استفاده در جهت کنترل عوامل میکروبی می‌باشند. پست بیوتیک‌ها 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

بحث و نتیجه گیری

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، مورد توجه قرار گرفته است. در میان نگهدارنده‌های زیستی بیشترین توجه به لاکتیک اسید باکتری‌ها بوده است که به‌طور طبیعی در انواع مختلفی از غذاها از جمله لبنیات، گوشت‌ها و سبزیجات یافت می‌شوند. این باکتری‌ها تولیدکننده چندین نوع ترکیب ضد میکروبی می‌باشد (۱۸).

میلی متر) بود. نتایج نشان داد که رابطه‌ی مستقیم بین افزایش اسیدیته و قدرت آنتی‌باکتریال پست‌بیوتیک‌ها وجود دارد. همچنین با افزایش 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 منوسیژنر 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 پلانترام با تیمار زمانی ۴۸ ساعته اثربخشی بهتری از خود نشان داد.

Mahdavi و همکاران، اثر لاکتوکوکوس لاکتیس را علیه لیستریا منوسیژنر و باسیلوس سرئوس بررسی کرد. نتایج این مطالعه نشان داد که نایسین فعالیت ضد میکروبی بالایی دارد (۲۲). در تحقیق حاضر نتایج حاصل از آزمون MIC به روش میکروتیتراسیون، اثر آنتی‌باکتریال CFSها بر فاز رشد لیستریا منوسیژنر 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 مهار پاتوژن می‌شود.

ارتباط بین منشاء جداسازی سویه‌های میکروبی با شدت فعالیت ضد میکروبی توسط Tremonte و همکاران (۲۰۱۷) گزارش شده است (۲۳). بر اساس نتایج پژوهش مذکور شرایط استرس‌زای محیطی در محیط تولید، قابلیت تولید ترکیبات ضد میکروبی توسط سویه‌های لاکتوباسیلوس را بیشتر می‌کند. مهم‌ترین مکانیسم‌های مهارتی در فعالیت آنتی‌باکتریال پست‌بیوتیک‌ها ناشی از تأثیر 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

ویتامینی 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 پست‌بیوتیک‌ها به طور موثری سبب افزایش خواص آنتی‌باکتریالی آن‌ها می‌گردد که این امر با توجه به ماهیت ماده‌ی پست‌بیوتیک و حفظ خواص آن در طول ذخیره سازی سرد و اثر مهارتی آن بر رشد میکروبی، این ماده را به عنوان کاندید بسیار مناسبی جهت جایگزین شدن با نگهدارنده‌های شیمیایی کرده است. همچنین یافته‌ها نشان داد که بین قدرت آنتی‌باکتریالی با زمان تخمیر، اسیدیته‌ی پست‌بیوتیک 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 میکروارگانیزم‌های عامل فساد پرداختند. در این مطالعه گونه‌های مولد باکتریوسین از شیر بز جداسازی شدند و قادر به ممانعت رشد لیستریا منوسیژنر (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 منوسیژنر 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 ایمن تر است.

Amiri و همکاران نیز فعالیت ضد میکروبی لاکتوباسیلوس بولگاریکوس و استرپتوکوکوس ترموفیلوس جدا شده از ماست‌های گلپایگان را با دو روش دیسک و چاهک علیه اشریشیاکلی (۹ میلی‌متر)، استفیلوکوکوس اورئوس (۱۱/۳ میلی‌متر) و لیستریا منوسیژنر (۹/۴ میلی‌متر) نشان دادند (۲۰). در پژوهش حاضر نیز قطر هاله‌های لاکتوباسیلوس پلانترام (۱۷ میلی‌متر)، رامنوسوس (۱۴ میلی‌متر) و در آخر اسیدوفیلوس (۱۲

تعارض منافع

طبق اظهار نویسندگان تعارض در منافع وجود ندارد.

شده به ویژه پست‌بیوتیک لاکتوباسیلوس پلاتاروم (PTCC 1745) اثبات شد. به نظر می‌رسد انجام پژوهش‌های بیشتر در زمینه شناسایی ترکیبات، روش‌های تغلیظ و خشک کردن مناسب پست‌بیوتیک‌ها و فرمولاسیون آن‌ها امکان استفاده از این مواد آنتی‌باکتریال زیستی را در صنایع غذایی 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.

منابع

- Rhee SJ, Lee JE, Lee CH. Importance of lactic acid bacteria in Asian fermented foods. *In* *Microbial Cell Factories*. 2011; 10(1): 1-13.
- 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.
- Homayouni A, Azizi A, Ehsani M, Yarmand M, Razavi S. Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. *Food Chem*. 2008 Nov;111(1):50-5.
- 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.
- 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.
- 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.
- Sanders ME, Akkermans LM, Haller D, Hammerman C, Heimbach JT, Hörmannspurger G, et al. Safety assessment of probiotics for human use. *Gut microbes*. 2010 May;1(3):164-85.
- Shigwedha N. Probiotic cell fragments (PCFs) as "novel nutraceutical ingredients". *J Biosci Med*. 2014 Dec;2(03):43.
- 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
- 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.
- 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
- 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.
- 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.
- 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.
- 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
- 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
- Deegan C, Unerman J. *Financial Accounting Theory*. London. UK: McGraw-Hill. 2006.
- 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.
- Amiri S, Kazemi S. Concept and potential applications of postbiotics in the food industry. *FSCT* 2022;19(126) :87-101
- Složilová I, Purkrátová 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.

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, Bershadly M, Westfall K, Lin L, 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.

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

Elmira Tizjang¹, Hadis Moteshafi², **Ebrahim Babapour**^{3*}

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

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

³Assistant 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@kiaau.ac.ir