



ارزیابی قدرت آنتی باکتریال پست بیوتیک باکتری‌های جنس لاکتوباسیلوس علیه لیستریا منوسیتوژنز

المیرا تیزجنگ^۱، حدیث مشفی^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 سبد 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 آنتی باکتریال پست بیوتیک باکتری‌های لاکتوباسیلوس پلانتاروم، لاکتوباسیلوس رامنوسوس و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بر روی این پاتوژن انجام گردید. پست بیوتیک‌ها در زمان‌های تخمیر ۲۴ و ۴۸ ساعت تولید شدند و قدرت آنتی باکتریالی آن‌ها در pH اسیدی و خنثی از روش‌های چاهک گذاری در آگار، تعیین حداقل غلظت بازدارنده، تعیین حداقل غلظت باکتری کشی و تأثیر مهارتی در ایجاد بیوفیلم لیستریا منوسیتوژنز بررسی شدند. نتایج نشان داد که پست بیوتیک ۴۸ ساعته لاکتوباسیلوس پلانتاروم با pH اسیدی نسبت به سایر پست بیوتیک‌ها، قدرت آنتی باکتریالی بیشتر و توانایی در مهار تشکیل بیوفیلم را نیز دارد. یافته‌های کلی نشان دادند که اولاً، خواص ضد میکروبی پست بیوتیک‌ها متأثر از نوع سویه و خاصیت اسیدی و مدت زمان کشت است. ثانیاً، رقیق‌سازی پست بیوتیک‌ها به‌طور مؤثری سبب کاهش خواص آنتی باکتریالی می‌گردد. با توجه به خاصیت آنتی باکتریالی پست بیوتیک‌ها، 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@kiauo.ac.ir

مقدمه

امروزه انواع مختلفی از محصولات غذایی تخمیر شده در سراسر جهان وجود دارد که بسته به نوع مواد خام و افزودنی-های 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 تأمین 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 پارا پروبیوتیک‌های 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 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 باکتری، 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 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 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 منوسیتوژنز به‌عنوان یک عامل بیماری‌زای قابل انتقال از طریق مواد غذایی سبب ایجاد بیماری در انسان است. به علت بروز مقاومت‌های دارویی و تشکیل بیوفلم 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 داده شده است (۱۰). فلذا این مطالعه باهدف ارزیابی قدرت آنتی‌باکتریال پست بیوتیک باکتری‌های لاکتوباسیلوس پلاتناروم، لاکتوباسیلوس رامنوسوس و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بر روی لیستریا منوسیتوژنز انجام گردید.

مواد و روش‌ها

میکروارگانسیم‌های استاندارد استفاده شده در این پژوهش لاکتوباسیلوس پلانتروم (PTCC 1745)، لاکتوباسیلوس رامنوسوس (PTCC 1637)، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (PTCC 1643) و لیستریا منوسیتوژنز (PTCC 1298) از کلکسیون میکروارگانسیم‌های صنعتی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شدند. در گام اول اقدام به فعال-سازی باکتری‌های 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 پست‌بیوتیک از کشت پروبیوتیک

پست‌بیوتیک‌های حاصل از کشت پروبیوتیک‌های 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 باکتری‌های پروبیوتیک فعال شده 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 ۲۴ و ۴۸ ساعت از انکوباسیون نمونه‌ها، توده زیستی پروبیوتیک‌ها 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 نام‌گذاری شدند. پس از آن با فیلتر سرنگی ۰/۲۲ 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 تازه‌ی باکتری مرجع لیستریا منوسیتوژنز به محیط کشت TSA تلقیح (استاندارد نیم مک‌فارلند) و بعد از اختلاط در پلیت‌های 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 گرم‌خانه‌گذاری 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 اثر آنتی باکتریال مثبت علیه لیستریا منوسیتوژنز گزارش شد.

تعیین حداقل غلظت بازدارنده (MICs)^۶ به روش پور پلیت

این آزمایش به منظور 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. چاهک‌هایی روی محیط کشت ایجاد و ۱۰۰ μL از پست‌بیوتیک‌ها (CFS و NCFS) (در غلظت‌های ۱۰۰ تا ۲۵ درصد) 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 (۱-۰/۲۸ میلی گرم بر میلی‌لیتر) تهیه و به عنوان کنترل مثبت و محیط کشت MRS به عنوان کنترل منفی استفاده گردید (۱۲).

تعیین حداقل غلظت بازدارنده پست‌بیوتیک‌ها به روش Broth Microdilution Assays

در این روش در چاهک‌های میکروپلیت ۱۰۰ μL میکرولیتر پاتوژن لیستریا منوسیتوژنز (استاندارد نیم مک‌فارلند) بارگذاری شدند. ۱۰۰ μL از CFS و NCFS‌ها (در غلظت‌های ۱۰۰ تا ۲۵ درصد) با سه تکرار درون هر چاهک ریخته و به مدت ۴۸ ساعت درون انکوباتور شیکر دار ۳۷ درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری شدند. اندازه‌گیری جذب نوری در طول موج ۶۰۰ nm انجام شد. نمونه‌ی 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 مهار پیوسته بیوتیک 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

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

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

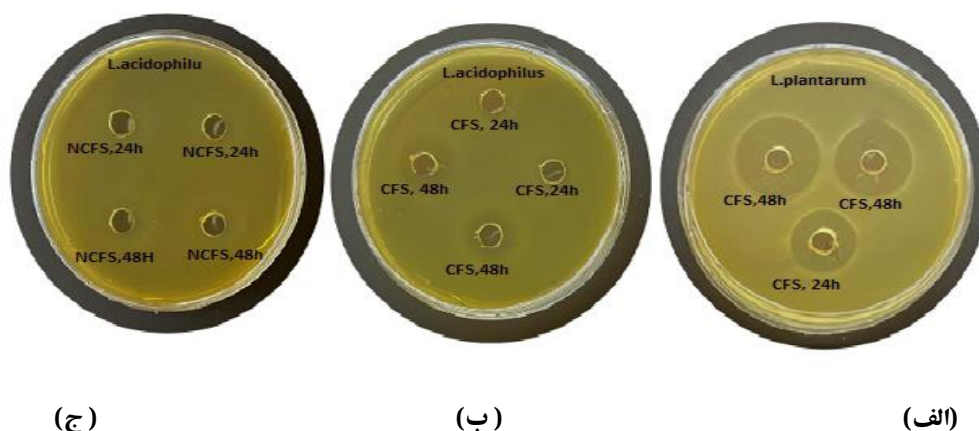
این آزمون با کشت باکتری پاتوژن در چاهک و بازده منفی رشد آن پس از انکوباسیون، جهت تعیین تعداد سلول‌های باقی‌مانده بر اساس میزان رشد کلنی و یا عدم رشد انجام شد. به این منظور ۱۰۰ μL از CFS و NCFS‌ها به صورت خالص (رقیق نشده) و با غلظت ۵۰٪، با ۱۰۰ μL پاتوژن لیستریا مونوسیژنر (استاندارد نیم مک‌فارلند) در سه تکرار درون هر چاهک میکرویتیر 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 پیست بیوتیک را نشان داد (۱۵، ۱۴، ۱۲).

بررسی اثر مهار پیست بیوتیک در تشکیل بیوفیلم توسط پاتوژن لیستریا مونوسیژنر (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 مونوسیژنر با کدورتی معادل $10^{-6} \times 1$ (معادل نیم مک-فارلند) درون چاهک‌ها ریخته و ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شد. نمونه کنترل مثبت فاقد پیست بیوتیک و کنترل منفی عاری از باکتری پاتوژن بود. پس از گرمخانه گذاری چاهک‌ها به آرامی تخلیه و با DDW (آب مقطر آمپولی) شسته شدند. سپس با ۲۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۰/۵٪ رنگ آمیزی و ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم‌خانه گذاری 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

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 مونوسیژنر 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

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 مونوسیژنر 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.

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

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

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



شکل شماره ۲- میکرو پلیت آزمون MIC پست بیوتیک‌ها

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 پلاتناروم ۵ ،

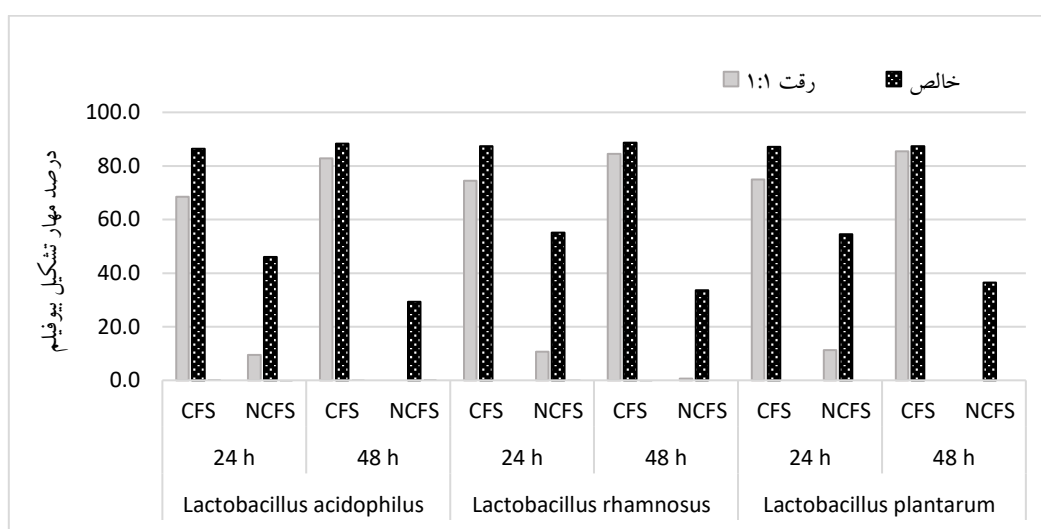
لاکتوباسیلوس رامنوسوس ۹ و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ۲۳ بود. درحالی‌که در تیمارهای ۲۴ ساعته و با غلظت ۵۰ درصد تعداد پرگنه‌های باکتری پاتوژن بر حسب (CFU/mL) برای لاکتوباسیلوس پلاتناروم ۱۷ ، لاکتوباسیلوس رامنوسوس ۲۱ و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ۴۳ شمارش شد. آنالیز آماری در هر سه نمونه پست بیوتیکی، تفاوت معناداری از نظر قدرت باکتری کشی را تأیید کرد ($p < 0.05$). بنابراین در ارتباط با خاصیت باکتری کشی نوع پروبیوتیک به کار گرفته‌شده در تهیه‌ی ماده‌ی پست بیوتیک حائز اهمیت است و باکتری پلاتناروم بهترین عملکرد را علیه لیستریا منوسیتوژنز نشان داد. آزمون‌های حداقل غلظت بازدارنده MIC و MBC نتایج مکملی را نشان دادند که

بیوفیلم باکتریایی را نسبت به نمونه کنترل مثبت دارند. زمان برداشت پستیوتیک، pH پستیوتیک 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 بود.

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

نتایج اثر مهاری پستیوتیک در تشکیل بیوفیلم پاتوژن لیستریا منوسیتوزنر (Crystal Violet assay)

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



شکل شماره ۳- نمودار نتایج درصد مهار تشکیل بیوفیلم توسط پستیوتیک 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 پستیوتیک‌ها یکی از سودمندترین، جدیدترین و ایمن‌ترین ترکیبات طبیعی قابل استفاده در جهت کنترل عوامل میکروبی می‌باشند. پستیوتیک‌ها 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 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، 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 منوسیتوژنز که از منابع مختلف جداسازی شده بود، به روش چاهک گذاری مورد ارزیابی قرارداد (۲۱). میانگین قطر هاله عدم رشد حدود ۱۶ میلی متر به دست آمد. در یافته‌ی پژوهش حاضر تأثیر CFS پلاتناروم 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 ضد میکروبی 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 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 مهار 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 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 مهاري 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 میلی متر 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 میلی متر 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 /شریشیاکلی (۹ میلی متر)، /استافیلوکوکوس اورئوس (۱۱ /۳ میلی متر) و لیستریا منوسیتوژنز (۹/۴ میلی متر) نشان دادند (۲۰). در پژوهش حاضر نیز قطر هاله‌های لاکتوباسیلوس پلاتنارم (۱۷ میلی متر)، رامنوسوس (۱۴ میلی متر) و در آخر اسیدوفیلوس (۱۲

تعارض منافع

طبق اظهار نویسندگان تعارض در منافع وجود ندارد.

شده به ویژه پست بیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم (PTCC 1745) اثبات شد. به نظر می رسد انجام پژوهش های بیشتر در زمینه شناسایی ترکیبات، روش های تغلیظ و خشک کردن مناسب پست بیوتیک ها و فرمولاسیون آن ها امکان استفاده از این مواد آنتی باکتریال زیستی را در صنایع غذایی و دامپزشکی در آینده فراهم کند.

تشکر و قدردانی

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

منابع

1. Rhee SJ, Lee JE, Lee CH. Importance of lactic acid bacteria in Asian fermented foods. *In* Microbial 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 and resistant 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, Hörmannspurger G, et al. Safety assessment of probiotics for human use. *Gut microbes*. 2010 May;1(3):164-85.
8. Shigwedha N. Probiotic 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. Shahrapour 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: McGraw-Hill. 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, 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, Bershady 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 Motesafi², **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