شماره: .....

تاریخ: / /

بیست و یکمین کنگره ملی علوم و صنایع غذایی ایران

۷ تا ۹ آبان ۱۳۹۲

21st National Congress of Food Science and Technology

29 - 31 Oct 2013

بسمه تعالی

پژوهشگران محترم «محمدرضا صداقتیان دوم، فریبا قیامتی یزدی، مسعود یاورمنش، مرتضی خمیری»

به پاس ارائه سخنرانی تحت عنوان «بررسی اثر باکتریوسین های تولیدی باکتری های اسید لاکتیک ایزوله شده از کره محلی مسک بر روی میکروارگانیسم های بیماریزا»

در بیست و یکمین کنگره ملی علوم و صنایع غذایی ایران که در تاریخ ۹-۷ آبان ماه ۱۳۹۲ در دانشگاه شیراز برگزار گردید، از شما تشکر و قدردانی نموده و امید است حضور شما گام بلندی در عرصه های نوآوری، شکوفایی و پیشرفت کشور عزیزمان ایران اسلامی باشد.

دبیر علمی

دکتر عسگر فرحناکی

دبیران اجرایی

دکتر محمد هادی اسکندری

دکتر مهرداد نیاکوثری

بررسی اثر باکتریوسین‌های تولیدی باکتری‌های اسیدلاکتیک ایزوله شده از کره محلی مسکه، بر روی میکروارگانیسم‌های بیماریزا

محمد رضا عدالتیان دوم[1*]، فریبا قیامتی یزدی[2]، مسعود یاورمنش[1]،مرتضی خمیری[3]
۱- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی ، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۳- دانشیار دانشکده صنایع غذایی ، دانشگاه علوم کشا ورزی و منابع طبیعی گرگان
edalatian@um.ac.ir

چکیده: هدف از این پژوهش، بررسی خواص ضد میکروبی باکتری‌های اسیدلاکتیک از کره محلی مسکه، در برابر باکتری‌های بیماریزا می‌باشد. بدین منظور، سه نمونه شیر، ماست و مسکه جمع‌آوری شده و با استفاده از روش‌های مبتنی بر کشت و مولکولی (توالی‌یابی ناحیه ژن 16S rRNA) نسبت به شناسایی باکتری‌های اسیدلاکتیک، اقدام شد. فعالیت ضد پاتوژنیک جدایه‌های فوق در برابر شاخص‌های *E.coli*، *L.innocoa* و *S.aureus* با استفاده از دو تکنیک Agar Spot وWell diffusion assay مورد سنجش قرار گرفت. نتایج حاصل از تعیین توالی، عبارت بودند از: *لاکتوباسیلوس دلبروکی*، *انتروکوکوس(فاسیوم، دورانس، هیرایی)*، *ائروکوکوس(ویریدنس و یورینه‌ایکو)*، *استرپتوکوکوس ترموفیلوس*، *لاکتوکوکوس لاکتیس* و *لئوکونستوک* مزنتروئیدز. از میان ۵۱ جدایه‌ی مورد آزمون، در تکنیک Agar Spot، ۲۳ جدایه و در Well diffusion assay، ۲۰ جدایه در برابر حداقل یک باکتری بیماریزا، فعالیت بازدارندگی نشان دادند که از این میان اکثر ایزوله‌ها بر روی *E.coli* اثر بازدارندگی داشته بعلاوه دو ایزوله متعلق به *انتروکوکوس* و *استرپتوکوکوس* که در تکنیک Agar spot نیز بر روی لیستریا هاله شفاف با قطر قابل توجه ایجاد کرده بودند.

واژه های کلیدی: *باکتری‌های اسید لاکتیک، خواص بازدارندگی، باکتریوسین، Agar Spot، Well diffusion assay*

مقدمه

نخستین کره‌های تولید شده، از شیر گوسفند و بز بودند. فرآورده‌های حاصل از شیر بز و گوسفند، دارای طعم و مزه خاصی است که با فرآورده-های حاصل از شیر خام گاو کاملا متفاوت است. کره‌ی تلمبی حاصل از ماست در ایران، مسکه[1] نام دارد. مسکه یکی از متداول‌ترین کره‌های مورد استفاده در ناحیه جنوب خراسان و فرآورده‌ای از مشتقات ماست می‌باشد که طی فرایند خاصی از شیر گاو یا گوسفند قابل استحصال است. این محصول از طعم و آرومای خوب و قابلیت هضم بالایی برخوردار است. همچنین لازم به ذکر است، در تولید سنتی این محصول، یا از فرایند حرارتی استفاده نمی-شود یا اعمال آن بسیار اندک می‌باشد. بنابر خصوصیات ذکر شده، این محصول می‌تواند به صورت بالقوه، حاوی باکتری‌های اسید لاکتیک متنوع با خصوصیات ایجاد عطر وآرومای فراوان باشد (قیامتی یزدی، ۱۳۹۱).

باکتری‌های اسید لاکتیک، گروهی از باکتری‌های گرم مثبت هستند که ویژگی‌های مورفولوژیکی، متابولیکی و فیزیولوژیکی خاص خود را دارند (ساویجوکی و همکاران، ۲۰۰۶). علاوه بر آن، باکتری‌های اسید لاکتیک، یک منبع با ارزش از عوامل ضد میکروبی، یعنی باکتریوسین‌ها به شمار می‌آیند (کوتر و همکاران، ۲۰۰۵). باکتریوسین ها، پپتید های سنتز شده ریبوزومی هستند که دارای فعالیت ضد میکروبی بوده و پتانسیل به کارگیری در کنترل پاتوژن های غذا زاد و میکروارگانیسم های مولد فساد را دارا می باشند. در غذاهای لبنی محلی مانند پنیر و کره‌ی محلی، که فلور میکروبی آن به طور طبیعی ایجاد می‌شود، باکتری‌های ایزوله شده، عموما متعلق به جنس‌های *لاکتوباسیلوس*، *لاکتوکوکوس*، *پدیوکوکوس*، *استرپتوکوکوس* و *انتروکوکوس* می‌باشند. باکتری‌های اسید لاکتیک در بین فلور میکروبی کره بسیار حائز اهمیت بوده و در واقع میکروارگانسیم‌های ذاتی و طبیعی کره-های محلی بوده‌اند. هر یک از جنس‌های این خانواده می‌توانند تاثیر خاصی بر روی ویژگی‌های کره داشته باشند(آیدو و کرم، ۲۰۰۸). تحقیقات زیادی بر روی محصولات محلی انجام پذیرفته و باکتری‌های اسید لاکتیک با استفاده از روش‌های مبتنی بر کشت سنتی و مدرن (مولکولی) مورد بررسی و شناسایی قرار گرفته اند. عدالتیان و همکاران (۲۰۱۱)، با استفاده از نتایج حاصل از توالی‌یابی ژن ۱۶S ریبوزومی به بررسی و شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک موجود در پنیر لیقوان پرداختند. آن‌ها، توانستند گونه‌های *انتروکوکوس*، *لاکتوکوکوس* و *لاکتوباسیلوس* را در پنیر لیقوان (از مرحله شیر تا تولید پنیر رسیده) شناسایی کنند. رودریگز و گونزالس (۲۰۰۶)، بر روی تنوع باکتریوسین‌های تولید شده توسط باکتری‌های لاکتیک اسید ایزوله شده از شیر خام، تحقیق نمودند. باکتری‌های اسید لاکتیک تولید کننده باکتریوسین، از ۲۸۹ نمونه شیر گوسفند، گاو و بز، ایزوله شدند. ۸۲ باکتری تولید کننده باکتریوسین، از لحاظ فنوتیپی و ژنوتیپی، شناسایی شدند.

عدالتیان و همکاران (۲۰۱۲)، مطالعه ای بر روی خواص ضدمیکروبی باکتری های انتروکوکوس (انتروسین) ایزوله شده از پنیر های سنتی ایرانی (لیقوان و کوزه) انجام دادند. در این بررسی مشخص شد از تعداد ۹۶ ایزوله انتروکوکوس، تعداد ۴۸ ایزوله ، اثر بازدارندگی را بر روی حداقل یک باکتری شاخص در روش Agar spot نشان دادند. که از این تعداد، ۲۰ ایزوله مطابق با ۱۵ سویه مختلف ، در محیط کشت مایع در روش Well Diffusion Assay ، مشخص شد که ترکیبات شبه باکتریوسینی تولید می کنند.

هدف اصلی از انجام این تحقیق، پس از جداسازی و شناسایی باکتری های اسید لاکتیک از محصول سنتی کره مسکه، بررسی و امکان تولید ترکیبات ضد میکروبی شبه باکتریوسینی توسط فلور لاکتیکی توسط روشهای مبتنی بر کشت (Agar Spot و Agar well Diffusion Assay) بوده است.

مواد و روش ها

سویه ها، محیط کشت ها و شرایط کشت

تعداد ۵۱ ایزوله باکتری اسید لاکتیک ، پس از جداسازی از نمونه های کره مسکه (جمع آوری شده از سه منطقه متفاوت در استان خراسان رضوی) و شناسایی با روشهای مبتنی بر کشت تا مرحله جنس، سپس با استفاده از روشهای مولکولی شامل استخراج DNA ، انجام PCR با پرایمرهای یونیورسال از ناحیه 16S rRNA و توالی یابی محصولات حاصل از تکثیر ، ایزوله ها تا مرحله گونه و زیرگونه شناسایی شدند. باکتری های شاخص به کار رفته برای تعیین خواص ضد میکروبی باکتری های اسید لاکتیک ایزوله شده عبارت بودند از: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) ، *Listeria innocoa* (ATCC33090)، *E.coli* (ATCC 25922)، *Lactobacillus sake* (ATCC15521)، *Lactobacillus plantarum* (ATCC8014)، *Lactococcus lactis ssp. Lactis* (ATCC 11454) و *Lactococcus lactis ssp. cremoris* (ATCC 19275).

برای فعال سازی اسید لاکتیک باکتری های ایزوله شده از محیط کشت BHI-agar و برای باکتری های شاخص از BHI agar یا TSA (Tryptone Soy agar) برای *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیا کلی* و *لیستریا اینوکووا*، از MRS agar برای *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس ساکی* و از M17 agar برای *لاکتوکوکوس لاکتیس زیرگونه لاکتیس* و *لاکتوکوکوس لاکتیس زیرگونه کرموریس* ، استفاده گردید(عدالتیان و همکاران، ۲۰۱۲). عمل فعال سازی مجدد و بازیابی ایزوله ها از میکروتیوب های ذخیره شده در دمای ۸۰ – درجه سانتیگراد ، بوسیله گرمخانه گذاری تحت شرایط هوازی و در دمای بهینه رشد مربوطه به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت صورت گرفت.

[1] Masske

شناسایی و کشف فعالیت ضد میکروبی

فعالیت بازدارندگی ایزوله ها به صورت متناوب در محیط کشت های جامد و مایع به ترتیب با استفاده از آزمون های Agar Spot و Well-diffusion Assay بررسی گردید(عدالتیان و همکاران، ۲۰۱۲؛ آلقریا و همکاران، ۲۰۰۹).

تکنیک Agar spot

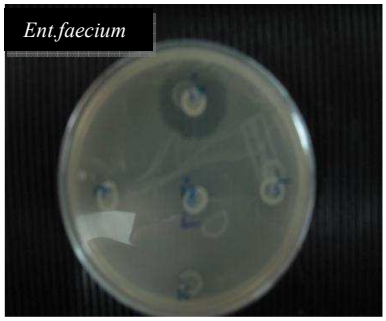
فعالیت آنتاگونیستی تمامی ایزوله ها در محیط کشت جامد با توجه به روش اصلاح شده فلمینگ و همکاران (۱۹۸۵) صورت پذیرفت. به طور خلاصه، میزان ۵ میکرولیتر از کشت یک شبه ایزوله ها بر روی سطح پلیت های حاوی BHI agar اصلاح شده (BHI به همراه ۰/۲ ٪ گلوکز) نقطه گذاری گردید و سپس در دمای ۳۲ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت ، جهت رشد و توسعه نقطه ها ، گرمخانه گذاری شد. سپس، نقاط مزبور با ۱۰ میلی لیتر از محیط کشت آگار نرم (۰/۷۵٪) مطابق با هر باکتری شاخص و تلقیح شده به میزان ۰/۲۵٪ با باکتری شاخص ، پوشیده شدند.پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت تحت شرایط دمایی مورد نیاز هر باکتری شاخص گرمخانه گذاری شدند. در نهایت، پلیت ها جهت هاله شفاف حاصل از بازدارندگی در اطراف نقاط بررسی و کنترل گردیدند.

تکنیک Well- diffusion Assay

سویه های مثبت ، در آزمون Agar spot ، جهت فعالیت ضد میکروبی در یک آزمون Well-diffusion Assay مورد بررسی قرار گرفتند. به طور خلاصه ، کشت های یک شبه از باکتری های شاخص جهت تلقیح (به میزان ۱٪) به ۲۰ میلی لیتر از محیط کشت آگار مربوطه در دمای ۴۵ درجه سانتیگراد استفاده شدند. سپس ، محیط کشت های تلقیح شده داخل پلیت ها ریخته شد و بعد از جامد شدن، تعداد ۶ تا ۷ چاهک در هر پلیت ایجاد گردید. بعد از آن، ۵۰ میکرولیتر از سوپرناتانت خنثی شده (pH 6.5-7) و استریل شده با فیلتر غشایی (0.2 µm pore membrane; Millipore, Bedford, MA, USA) حاصل از سویه های مولد ترکیبات ضد میکروبی رشد کرده در BHI در داخل این چاهک ها ریخته شد. تمامی پلیت ها در شرایط دمایی مناسب گرمخانه گذاری شدندو بعد از آن ایجاد هاله حاصل از ممانعت در اطراف چاهک ها بررسی گردید.(عدالتیان و همکاران، ۲۰۱۲).

نتایج و بحث

نتایج حاصل شناسایی مولکولی و تعیین توالی، عبارت بودند از: *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونه‌ی *لاکتیس*(۷)، *انتروکوکوس(فاسیوم، دورانس، هیرایی، لاکتیس*)(۱۶)، *ائروکوکوس(ویریدنس و یورینه ایکو)*(۱۳)، *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* (۱۱)، *لاکتوکوکوس لاکتیس*(۱)، *لئوکونستوک* مزنتروئیدز زیرگونه‌ی *مزنتروئیدز*(۳). در تکنیک Agar Spot ، از میان ۵۱ ایزوله باکتری اسید لاکتیک ، ۳۱ ایزوله در برابر حداقل یکی از باکتری های شاخص ، خاصیت بازدارندگی از خود نشان دادند. باکتری *E. coli* بوسیله ۲۶ ایزوله، باکتری *Staphylococcus aureus* بوسیله ۷ ایزوله و باکتری *Listeria innocoa* توسط ۹ ایزوله ممانعت شدند. البته تفاوت هایی در اندازه یا قطر هاله شفاف (Clear zone) برخی از ایزوله ها مشاهده شد. بیشترین قطر هاله بازدارندگی بر روی باکتری شاخص لیستریا مشاهده شد که مربوط به یک سویه از *انتروکوکوس فاسیوم* و یک سویه *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* بود (شکل ۱) که جالب است هر دو سویه مورد نظر از کره مسکه ، ایزوله شده بودند، که نشان دهنده این حقیقت است که منشاء اولیه هر دو سویه یکی بوده است. سپس، قابلیت ۵۱ ایزوله ، برای تولید ترکیبات ضد میکروبی در محیط کشت مایع در برابر تمام باکتری های شاخص بیماری زا در یک آزمون Well- diffusion Assay ، سنجیده شد. تحت این شرایط ، فقط ۲۰ ایزوله ، فعالیت ممانعت کنندگی را در برابر یک یا تعداد بیشتری باکتری شاخص ، از خود نشان دادند.



شکل۱- هاله شفاف حاصل از بازدارندگی سویه *انتروکوکوس فاسیوم* برروی باکتری شاخص *لیستریا اینوکووا*.

در روش Well diffusion Assay ، اشرشیا کلی توسط ۱۱ ایزوله، استافیلوکوکوس اورئوس توسط ۲ ایزوله و لیستریا اینوکووا توسط ۷ ایزوله ممانعت شدند. همانطور که ملاحظه می شود ، دامنه ممانعت کنندگی در روش محیط کشت مایع با آنچه در روش محیط جامد مشاهده گردید،

متفاوت است که این موضوع با گزارشات بسیاری از محققین توافق دارد که نشان دادند فعالیت های ممانعت کنندگی در محیط کشت جامد آگار ، همواره با آنچه در سوپرناتانت های خنثی شده و فیلتر شده مشاهده می شود ، یکی نمی باشد(هرناندز و همکاران، ۲۰۰۵؛ لارسن و همکاران، ۱۹۹۳). این پدیده به این علت می‌تواند باشد که ترکیبات متابولیکی وابسته به کلونی با خاصیت ضد میکروبی، از جمله اسید های آلی، پراکسید هیدروژن و اسید های چرب در واقع مسئول اثرات ضد میکروبی مشاهده شده در روش Agar Spot هستند(دی ویست و لوری ، ۲۰۰۷).

نتیجه گیری کلی

مشخص شده است که بسیاری از باکتریوسین ها بویژه باکتریوسین های تولید شده توسط انتروکوکوس ها (انتروسین ها)، در برابر طیف وسیعی از باکتری پاتوژن لیستریا اثر بازدارندگی دارند. اگر چه یک همبستگی مثبت میان ممانعت لیستریا اینوکووا و لیستریا منوسیتوژنز، همواره گزارش شده است ، اما باید فعالیت ممانعت کنندگی در برابر پاتوژن واقعی لزوماً ، مورد تایید قرار گیرد.ممانعت گونه های لیستریا و سایر پاتوژن هایی مانند استافیلوکوکوس اورئوس بوسیله باکتری های اسید لاکتیک مولد باکتریوسین ، استفاده و کاربرد آنها را در تامین ایمنی سیستم های غذایی ، تقویت می نماید. البته لازم است برای اظهار نظر دقیق تر در این خصوص کارهای مولکولی و اثبات حضور ژن های مولد باکتریوسین، به کمک تکنیک های مولکولی نیز صورت گیرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله ، بدین وسیله ، مرتب تشکر و قدردانی خود را از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد ، که حمایت مالی و تامین اعتبار مالی این تحقیق را به عهده داشته اند، ابراز می دارد. همچنین از زحمات کارشناس محترم آزمایشگاه فناوری های نوین گروه علوم و صنایع غذایی ، جناب آقای مهندس قزوینی و نیز از همکاری سر کار خانم مهندس نیری، در انجام بخشی از آزمایشات ، سپاسگزاری می گردد.

منابع:

۱- عدالتیان، م.ر. ۱۳۹۰. شناسایی و تعیین هویت فلور لاکتیکی پنیرهای حاصل از شیر خام با استفاده از روش‌های مبتنی بر محیط کشت و روش‌های مولکولی. رساله‌ی دکتری، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.

۲- قیامتی یزدی، ف.۱۳۹۱. تنوع جمعیتی باکتری های اسید لاکتیک در کره محلی مسکه جنوب خراسان، ایران. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

3.Alegría, A., Alvarez-Martín, P., Sacristán, N., Fernández, E., Delgado, S., Mayo, B. 2009. Diversity and evolution of the microbial populations during manufacture and ripening of Casín, a traditional Spanish, starter-free cheese made from cow's milk. International Journal of Food Microbiology, 136: 44-51.

4.Cotter, P. D., Hill, C., and Ross, R. P. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. Nature Reviews Microbiology, 3: 777-788.

5.De Vuyst L, Leroy F (2007) Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. J Mol Microbiol Biotechnol 13:194–199.

6.Edalatian MR, Habibi Najafi MB, Mortazavi SA, Alegría A, Nassiri MR, Bassami MR, Mayo B (2011) Microbial diversity of the traditional Iranian cheeses Lighvan and Koozeh, as revealed by polyphasic culturing and culture-independent approaches. Dairy Sci Technol. doi:10.1007/s13594-011-0045-2.

7.Edalatian MR, Habibi Najafi MB, Mortazavi SA, Alegría A, Delgado S, Bassami MR, Mayo B (2012). Production of bacteriocins by *Enterococcus* spp. isolated from traditional, Iranian, raw milk cheeses, and detection of their encoding genes. Eur Food Res Technol , 234:789–796.

8.Fleming HP, Etchells JL, Costilow RL (1985) Microbial inhibition by an isolate of *Pediococcus* from cucumber brines. Appl Microbiol 30:1040–1042.

9.Hernández D, Cardell E, Zárate V (2005) Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711. J Appl Microbiol 99:77–84.

10.Idoul, T., and Karam, N. 2008. Lactic acid bacteria from Jijel's traditional butter: Isolation, identification and major technological traits. Grasas Y Aceites, 59 (4): 361-367.

11.Larsen AG, Vogensenm FK, Josephsen J (1993) Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from sour doughs: purification and characterization of bavaricin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* MI401. J Appl Bacteriol 75:113–122.

12.Rodriguez, E., Gonzalez, B. 2006. Diversity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw milk. International Dairy Journal,10: 7-15.

13.Savijoki, K., Ingmer, H., and Varmanen, P. 2006. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. Applied Microbiology and Biotechnology, 71: 394-406.