مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال هفتم، شماره ۵، ویژه‌نامه زمستان ۱۳۹۱، صفحات ۵۰۳-۴۹۵

بررسی نقش باکتری انتروکوک فکالیس در مهار رشد باکتری استافیلوکوک ارئوس از طریق تولید یک ترکیب ضد میکروبی

مهسا یگانه[۱]، آنیتا خنافری [۲]، محمدرضا فلاحیان [۳]، انوشه شریفان [۴]

۱- نویسنده مسئول: کمیته تحقیقات دانشجویان، انستیتو تحقیقات تغذیه و صنایع غذایی، دانشکده تغذیه و علوم صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران، پست الکترونیکی: mahsayeganeh19@yahoo.com

۲ - دانشیار گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

۳- مربی گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

۴- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران

چکیده

سابقه و هدف: هدف از انجام این تحقیق، بررسی نقش باکتری انتروکوک فکالیس در مهار رشد باکتری استافیلوکوک ارئوس از طریق تولید یک ترکیب ضد میکروبی می‌باشد.

مواد و روش ها: پس از کشت *انتروکک فکالیس* با مشخصه PTCC1394و ATCC9854در محیط کشت BHI agar ، سانتریفوژ و جداسازی توده میکروبی، ماده ضدمیکروبی آن توسط روش دیالیز خالص سازی شد.اثر ضدمیکروبی ترکیب حاصل بر باکتری‌های شاخص گرم مثبت و گرم منفی به روش چاهک مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: واحد فعالیت، فعالیت اختصاصی و ضریب تخلیص این ترکیب پس از دیالیز، افزایش یافت و غلظت، فعالیت کل، و میزان پروتئین کل، پس از دیالیز، کاهش یافت. قطر هاله عدم رشد و کمترین غلظت باکتریواستاتیکی ایجاد شده، توسط ترکیب ضد میکروبی ، پس از دیالیز، بر روی باکتری *استافیلوکوکوس ارئوس* بود.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به دست آمده از ترکیب ضد میکروبی، *انتروکوکوس فکالیس* با مشخصه PTCC1394 ، می‌تواند از طریق تولید یک ترکیب ضد میکروبی، نقش گسترده ای به عنوان پروبیوتیک در صنعت غذا ایفا نماید.

واژگان کلیدی: اثر ضدمیکروبی، انتروکوک *فکالیس*، پروبیوتیک

مقدمه

باکتری انتروکوک که یکی از بحث برانگیزترین باکتری ها از گروه باکتری‌های اسیدلاکتیک است، نقش بسزایی در سلامتی انسان ایفا می‌نماید (۱). پروبیوتیک ها فرآورده هایی از سلول های میکروبی هستند که اثر مفید روی سلامت و آسایش انسان دارند. بر اساس مطالعات متعدد، خواص بسیار با ارزشی از جمله اثرات ضد جهش زایی و ضد سرطان زایی و تقویت ایمنی بدن و مقاومت در مقابل پاتوژن های روده ای و ... را به پروبیوتیک ها نسبت داده اند.پروبیوتیک‌ها ممکن است با اتصال به ترکیبات سرطان‌زا و یا ممانعت از رشد باکتریای که ترکیبات پیش سرطان‌زا را به ترکیبات سرطان‌زا تبدیل می‌کند، سبب کاهش میزان ترکیبات سرطان‌زا در روده شوند و یا با کاهش آنزیم‌های بتا- گلوکرونیداز و بتا گلوسیداز و دکانژوگه نمودن اسیدهای صفراوی و بهبود سیستم ایمنی میزبان، اثر محافظتی خود را در مقابل سرطان ایفا نمایند. تحقیقات نشان می‌دهد که تجویز LAB سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیداتیو و یا تعدیل استرس اکسیداتیو می‌شود که بدین طریق از سلول‌ها در مقابل صدمات ناشی از ترکیبات سرطان زا، محافظت می‌کند. میکرو ارگانیسم های(باکتری ومخمر)زنده و فعالی که با استقراردر بخش های مختلف بدن(اساساروده)به تعداد مناسب با فعالیت زیستی خود عمدتا از طریق حفظ وبهبود توازن فلور میکروبی روده میان میکروارگانیسم های سودمند و زیان بخش ، دربردارنده خواص سلامت بخش برای میزبان هستند.واژه پروبیوتیک در زبان لاتین به معنای حیات بخش

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-07-21]

است و از نظرمفهوم در مقابل واژه آنتی بیوتیک به معنای ضد حیات قرار دارد.

با توجه به تعداد رو به افزایش سوش‌های *استافیلوکوک ارئوس* مقاوم به متی سیلین، هدف از انجام تحقیق حاضر، بررسی توان تولید ترکیب ضد میکروبی توسط سوش *انتروکوکوس فکالیس* و بررسی تاثیر ضد میکروبی این ترکیب بر ضد باکتری های بیماریزا بود (۳، ۲) .

مواد و روش ها

کلیه مواد به کار رفته در این تحقیق، از شرکت MERCKتهیه گردیدند.

محیط‌های کشت میکروبی : BHI agar & BHI broth، Streptococcus -KF ، Enterococci broth ، Blood agar agarو Skim milk broth ساخت شرکت Merck بودند.

مواد شیمیایی: اتانل، گلیسرول، سوکسینات آمونیوم، سولفات آمونیوم، پراکسید هیدروژن، پودر تترامتیل پارافنیل دی آمین دی هیدروکلراید، فنل رد، گلوکز، گالاکتوز، مانیتول، لاکتوزف رافینوز، آرژنین، دی پتاسیم هیدروژن فسفات، سدیم دی هیدروژن فسفات،معرف نسلر، سولفات مس، سدیم پتاسیم تارتارات، معرف ciocalto-Folin، کربنات سدیم، سرم آلبومین گاوی، ژل آکریلامید 5.18٪. کلیه مواد شیمیایی مورد استفاده در این تحقیق، ساخت شرکت Merck بودند..

سویه‌های میکروبی:باکتری *انتروکوکوس فکالیس* با مشخصه PTCC1394 و ۱۳ سویه تست استرین شامل ۶ باکتری گرم مثبت (استافیلوکوکوس ارئوس وکورینه باکتریوم دیفتریه و باسیلوس سرئوس و یاسیلوس سوبتیلیس و لیستریا مونوسیتوژنز) و ۷ باکتری گرم منفی *(کلبسیلا پنومونیه* و *پروتئوس میرابیلیس* و *سالمونلا پاراتیفی* و *شیگلا فلکسنری* و *سودوموناس آئروژینوزاو اشرشیاکلی* و *اشرشیاکلی* با PTCC۱۳۳۰) تهیه شدند. انتخاب این سویه‌های تست استرین بر اساس طیف گرم مثبت و گرم منفی بودن باکتری ها و کوکسی و باسیل بودن آن ها صورت گرفت.

تهیه کشت آغازگر: پس از کشت این باکتری ها در پلیت‌های حاوی محیط کشت BHI agar، مشخصات ماکروسکوپیکلنی‌های انتروکوکوس، از قبیل شکل، قوام، رنگ و اندازه، در عمق محیط کشت و مشخصات میکروسکوپی توسط رنگ آمیزی گرم مورد بررسی قرار گرفتند (۴) .

شناسایی ماکروسکوپی و میکروسکوپی سوش انتروکوکوس: مشخصات ماکروسکوپی کلنی‌های انتروکوکوس، در عمق محیط کشت، از قبیل شکل، قوام، رنگ و اندازه و مشخصات میکروسکوپی توسط رنگ آمیزی گرم مورد بررسی قرار گرفتند (۵) .

انجام آزمون‌های بیوشیمیایی جهت تایید سوش انتروکوک: برای این منظور از آزمون‌های بیوشیمیایی، نظیر آزمون کاتالاز، اکسیداز، تجزیه ارژنین و توانایی استفاده از قندهای گلوگز، گالاکتوز، مانیتول، رافینوز ولاکتوز استفاده شد. پس از تلقیح سویه میکروبی به محیط کشت، سوش مورد نظر در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدو سپس مورد آزمون‌های بیوشیمیایی قرار گرفت (۶ ، ۴) .

ارزیابی منحنی رشد باکتری بر اساس میزان جذب نور (OD): در ابتدا، چند کلنی از سوش ، توسط لوپ به لوله آزمایش حاوی محیط کشت BHI broth افزوده شد (تهیه کشت تلقیح) و میزان جذب نور (OD) نمونه توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. پس از رسیدن میزان OD نمونه به ۱، ۵٪ از کشت تلقیح به ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط BHI brothحاوی سوکسینات آمونیوم افزوده شد. سپس، ارلن به انکوباتور با میزان دی اکسید کربن ۵٪ و دمای ۳۷ درجه سانتی گرادمنتقل شد. در زمان‌های ۰،۲،۴، ۶،۸، ۱۲، ۱۶،۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶، ۱۲۰ ساعت،از محیط حاوی باکتری نمونه برداری کرده و میزان OD خوانده و یادداشت گردید و منحنی رشد باکتری بر حسب OD رسم شد (۵).

آماده سازی نمونه‌های حاوی آنتی‌بیوتیک برای سانتریفیوژ: جهت آماده سازی نمونه ها ، از سوش ۲۴ ساعته انتروکوک، سوسپانسیونی با (OD=1) تهیه گردید. سپس، توسط یک سر سمپلر استریل، به میزان ۵ ٪ یا ۱۰ میلی‌لیتر از این سوسپانسیون، به ارلن‌های حاوی محیط کشت BHI broth استریل که حاوی ۱ ٪ (۲ گرم) از پودر سوکسینات آمونیوم بودند ، تلقیح شد. ارلن‌های تلقیح شده، به خوبی به هم زده شده تا سوسپانسیون یکنواختی حاصل گردد. ارلن ها در انکوباتور حاوی ۵٪ دی اکسید کربن و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت۸ ، ۱۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت گرماگذاری شدند (۷) .

سانتریفوژ نمونه ها: نمونه ها ی موجود در انکوباتور، در زمان‌های متفاوت از انکوباتور خارج شدند و در دستگاه سانتریفوژ یخچال دار با دور rpm ۱۶۰۰۰ و زمان ۵۰ دقیقه

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-07-21]

و دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شدند. پس از سانتریفوژ، جرم سلولی باکتری رسوب کرد و محلول رویی (Supernatant) در ارلن‌های استریل مجزا نگهداری شد(۷).

خنثی سازی: pH محلول‌های رویی پایین تر از ۷ ، توسط افزوده شدن ۱ تا ۲ قطره از NaoH ۱ مولار به7.7 8-رسانده شد. زیرا تولید اسید لاکتیک توسط میکروارگانیسم مورد نظر و در نتیجه ایجاد شرایط اسیدی و کاهشpH ، به دلیل دارا بودن اثر ضد میکروبی بر روی باکتری ها در اندازه گیری قطر هاله عدم رشد ایجاد شده توسط ماده ضد میکروبی ایجاد خطا می‌کند (۷) .

بررسی فعالیت ضد میکروبی محلول رویی نمونه ها به روش تهیه چاهک (Well Diffusion Agar): از پیپت پاستورهای استریل جهت ایجاد چاهک در BHI agar استفاده شد. پیپت پاستورها پس از استریل شدن در اتوکلاو، در الکل ۷۰٪ نگهداری شدند و سپس بر روی شعله سوزانده شدند و به آن ها اجازه داده شد که در کنار شعله به آرامی خنک شوند. سپس، چاهک هایی به فاصله معین از یکدیگر به قطر ۷ میلی متر ایجاد گردید. توسط سمپلر و سر سمپلر استریل، ۵۰ میکرولیتر از محلول‌های رویی مورد بررسی را در این چاهک ها ریخته و به منظور نفوذ بهتر عصاره تخمیری (محلول رویی حاصل از سانتریفوژ)، پلیت ها در حدود یک ساعت، در یخچال ۴ درجه سانتی گراد، سرماگذاری شدند.در این زمان انتشار مایع تخمیری در آگار صورت می‌گیرد، اما رشد باکتریایی متوقف می‌ماند. سپس، پلیت ها به آرامی به انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد انتقال داده شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت، قطر هاله‌های عدم رشد مربوط به هریک از عصاره‌های تخمیری ۸، ۱۶، ۲۴ و ۴۸ ساعته توسط کولیس دورنیه اندازه گیری و در جداول مربوطه ثبت گردید. تعداد حفره ها یا چاهک‌های ایجاد شده بیش از ۴ عدد نبودند، زیرا در اثر تداخل هاله‌های عدم رشد، امکان اندازه گیری قطر هاله ها وجود نداشت (۱۰-۸) .

رسوب پروتئین ها توسط سولفات آمونیوم: چند میلی‌لیتر از محلول رویی، پس از سانتریفوژ از توده سلولی جدا گردید و در ارلن استریل ریخته شد. ارلن روی همزن مغناطیسی قرار داده شد. مقدار ی از سولفات آمونیوم ، تا حد اشباع شدن، وزن گردید و به آرامی، در حالیکه ارلن در ظرف محتوی یخ قرار گرفته بود، به آن اضافه گردید. نمونه‌ها به مدت یک شب (over night)، در یخچال ۴ درجه سانتی گراد قرار داده شدند تا انحلال سولفات آمونیوم به خوبی صورت گیرد. محتویات ارلن شامل رسوبات حاصله و محلول حاوی رسوب به ویال‌های اپندرف ۱.۵ میلی‌لیتر استریل منتقل شدند و در ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵۰ دقیقه و در ۱۶۰۰۰rpm، توسط میکروسانتریفوژ یخچال دار، سانتریفوژ گردیدند. مایع رویی دور ریخته شد و رسوب حاصله در یک میلی‌لیتر بافر پتاسیم فسفات 0. 05 مولار و دارای pH=7 حل گردید. بخشی از فراکسیون‌های حاصله برای سنجش فعالیت ضد میکروبی و بخشی دیگر، به منظور انجام عمل دیالیز کنار گذاشته شدند (۱۱، ۷) .

ارزیابی میزان پروتئین محلول توسط تست لوری (**Lowry Protein Assay**): منحنی استاندارد برای غلظت‌های ۰، ۰.۵، ۱، ۱.۵، ۲، ۲.۵، ۳، ۳.۵، ۴ میلی گرم در میلی‌لیتر از پروتئین سرم آلبومین گاوی، درآب مقطر ترسیم گشت. منحنی استاندارد رسم شده بر اساس غلظت پروتئین برOD به دست آمده در آزمایشات لوری می‌باشد .پس از رسم منحنی استاندارد، OD نمونه رسوب پروتئینی را توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده و با رسم خط عمود بر منحنی استاندارد از آن OD، غلظت پروتئین محاسبه شد (۱۳، ۱۲) .

خالص سازی رسوبات پروتئینی با استفاده از دیالیز: از کیسه دیالیز، با مشخصات THOMAS Co.ARTHOR H. , 1×1-3787.Cat, inch.D 8 با منافذ دارای cut offهای 12000KDa استفاده گردید. کیسه دیالیز، به اندازه تقریبی ۸ سانتی‌متر برای هر یک از نمونه‌ها، بدون قطعه قطعه کردن کیسه بریده شد. کیسه دیالیز درون یک بشر یک لیتری حاوی آب قرار داده شد و به منظور آماده سازی آن برای استفاده و زدودن مواد محافظت پوشاننده از روی کیسه، بشر به مدت ۴ ساعت بر روی جریان شیر آب قرار گرفت. سپس، کیسه دیالیز توسط قیچی به قطعات ۸ سانتی‌متری بریده شد و یک سمت آن توسط خود کیسه گره زده شد. رسوبات پروتئینی رسوب داده شده با سولفات آمونیوم، در ۱ میلی‌لیتر از بافر پتاسیم فسفات 0. 05 مولار حل گردیدند. محتوبات فوق به درون کیسه دیالیز ریخته شد و درب آن توسط چسب مسدود گردید. کیسه ها نامگذاری شدند. سپس در یک ارلن ۱ لیتری، به میزان ۸۰۰ میلی‌لیتر از بافر پتاسیم فسفات 0. 05 مولار ریخته و ارلن مذکور در یخچال ۴ درجه سانتی گراد قرار گرفت. نمونه‌های درون کیسه ها، در این بافر قرار داده شدند و به مدت ۴۸ ساعت در آن

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-07-21]

شناور گردیدند. پس از ۲۴ ساعت، بافر تعویض و مجدداً کیسه ها در بافر تازه، غوطه ور شدند. پس از سه بار تعویض بافر و استفاده از معرف نسلر به منظور خروج سولفات آمونیوم، محتویات کیسه ها، به لوله‌های استریل منتقل گردیدند و جهت بررسی ویژگی‌های باکتریوسینی و آنتی بیوتیکی، مورد سنجش قرار گرفتند. حجم نمونه ها قبل و بعد از دیالیز به دقت اندازه‌گیری و یادداشت گردیدندو از همه نمونه ها مقادیر یکسانی برای انجام تست لوری و اندازه گیری میزان پروتئین کنار گذاشته شد (۱۱، ۷) .

بررسی فعالیت ضد میکروبی ترکیب ضد میکروبی در قبل و پس از دیالیز: با استفاده از ایجاد چاهک هایی به قطر ۷ میلی متر، اثر ضد میکروبی ترکیب ضد میکروبی بر روی سه سوش پاتوژن کشت داده شده به صورت متراکم، ارزیابی شد و سرانجام، قطر هاله‌های عدم رشد با کولیس اندازه گیری شدند و بر حسب میلی متر گزارش گردیدند (۱۰) .

ساخت رقت‌های مختلف رسوب پروتئین: برای تعیین MIC (Minimum Inhibitory Concentration) از روش رقیق‌سازی در محیط مایع استفاده می‌شود. برای این منظور،رقت‌های ۰.۰۱، ۰.۰۵، .۰.۰۶، ۰.۱، ۰.۲، ۰.۵، ۰.۷، ۱، ۱.۱، ۱.۲، ۱.۵، ۱.۷، ۲، ۲.۱ ، ۲.۷ گرم بر لیتر ازعصاره‌های تخمیری با غلظت مشخص تهیه شدند.سپس،با استفاده از روش انتشار در آگار، مقدار MIC، به عنوان حداقل غلظتی از رسوبات پروتئینی که مانع از رشد می‌شود (یعنی هیچ کدورتی در لوله مذبور دیده نشود)، تعریف و بیان شد (۶).

اندازه‌گیری فعالیت و سایر فاکتورهای ترکیب ضدمیکروبی: در هر مرحله، برای هر فراکسیون، مقادیر حجم نهایی، غلظت پروتئین، واحد فعالیت، فعالیت کل، راندمان، ضریب تلخیص، در صد بازیافت، فعالیت اختصاصی، مبزان پروتئین کل محاسبه و ثبت گردید. رقت‌های ۱/۵۰، ۱/۱۰۰ ، ۱/۱۵۰، ۱/۲۰۰ ، ۱/۲۵۰ ، ۱/۳۰۰، ۱/۳۵۰، ۱/۴۰۰، از ترکیب ضد میکروبی تهیه شدند. تیتر فراکسیون‌های فوق، به عنوان معکوس بیشترین رقتی که قادر به مهار قطعی سویه اندیکاتور بود، به صورت واحد فعالیت بیان گردید (۷).

محاسبات بر اساس فرمول‌های زیر بودند:

درصد بازیافت: میزان پروتئینی فراکسیون÷ میزان پروتئین کل عصاره خام × **۱۰۰**

پروتئین کل: غلظت پروتئین فراکسیون÷ حجم نهایی

واحدکل: فعالیت کل: حجم نهایی × واحد فعالیت

فعالیت اختصاصی: واحد فعالیت ÷ غلظت پروتئین

ضریب تخلیص: فعالیت اختصاصی فراکسیون خالص شده ÷ فعالیت اختصاصی عصاره خام

راندمان: فعالیت کل فراکسیون خالص شده ÷ فعالیت کل عصاره خام × ۱۰۰

رسم منحنی میزان تولید ترکیب ضد میکروبی بر حسب U/mL : برای رسم منحنی میزان تولید ترکیب ضد میکروبی بر حسب U/mL ، واحد فعالیت این ترکیب(U/mL) در زمان‌های متفاوت، محاسبه شد و منحنی میزان تولید، با قرار دادن واحد فعالیت در زمان‌های متفاوت، رسم گشت.

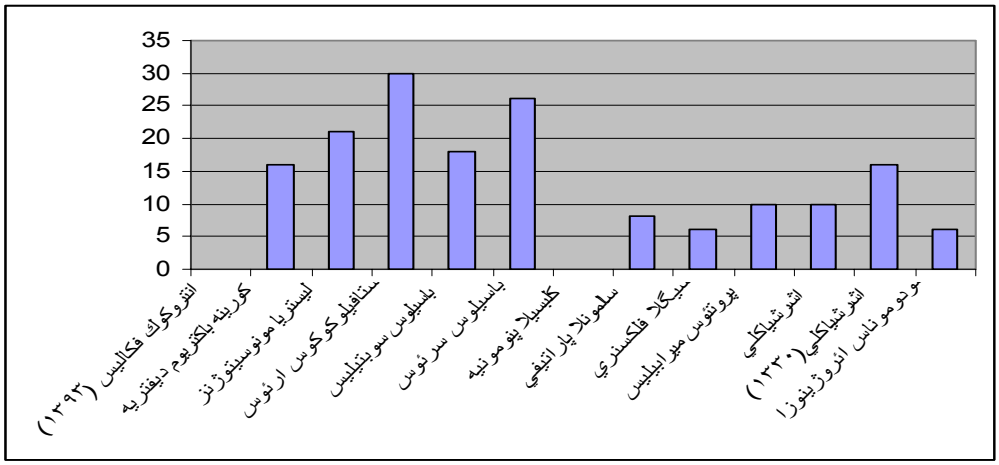
یافته‌ها

به منظور تایید باکتری *انتروکوک فکالیس*، آزمون‌های بیوشیمیایی بر روی سوش مولد ترکیب ضد میکروبی انجام شد ند . با توجه به نتایج به دست آمده ، باکتری انتروکوک فکالیس، قادر به مصرف قندهای مانیتول و سوربیتول و لاکتوز می‌باشد و دارای آنزیم تجزیه کننده آرژنین است و بدین ترتیب، می‌تواند از این اسید آمینه به عنوان منبع ازت استفاده نماید.این باکتری، قادر به مصرف دو قند سوربوز و آرابینوز نیست.

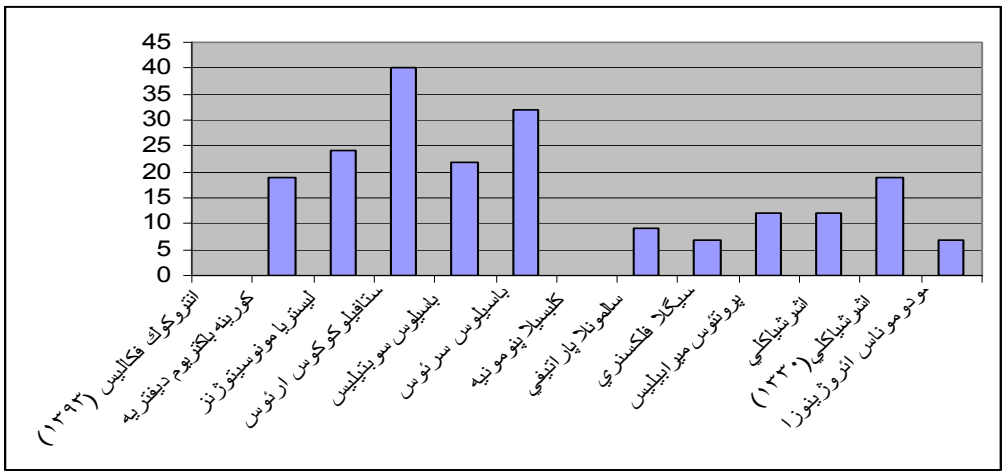
نتایج حاصل از منحنی رشد باکتری، نشان داد که باکتری تحت شرایط کار در این پژوهش (۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت، گرما گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و دور ۱۵۰rpm)، در حدود ساعت ۱۶ به حداکثر میزان رشد خود (فاز لگاریتمی رشد) می‌رسد. همان‌طوری که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود، میزان کدورت پس از یک تاخیر کوتاه (Lag phase) در حدود چهار ساعت پس از تلقیح اولیه به تدریج افزایش یافته و مقارن با آن، pH نیز با همان میزان تاخیر، شروع به کاهش می‌کند.

نتایج قطر هاله عدم رشد حاصل از اثر ضد میکروبی عصاره تخمیری سوش مولد ماده ضد میکروبی، پس از ۱۶، ۲۴ و ۴۸ساعت گرماگذاری بر روی ۱۳ باکتری شاخص گرم مثبت و گرم منفی استاندارد، مشاهده شد. تاثیر ضد میکروبی از ساعت ۱۶ تا ۲۴ (در طول فاز لگاریتمی و در ابتدای فاز سکون) افزایش نشان داد. در ساعت ۴۸، به دلیل وجود باکتری در اواسط فاز سکون، کاهش جزئی در تاثیر ضد میکروبی مشاهده شد (نمودارهای ۳، ۲، ۱) .

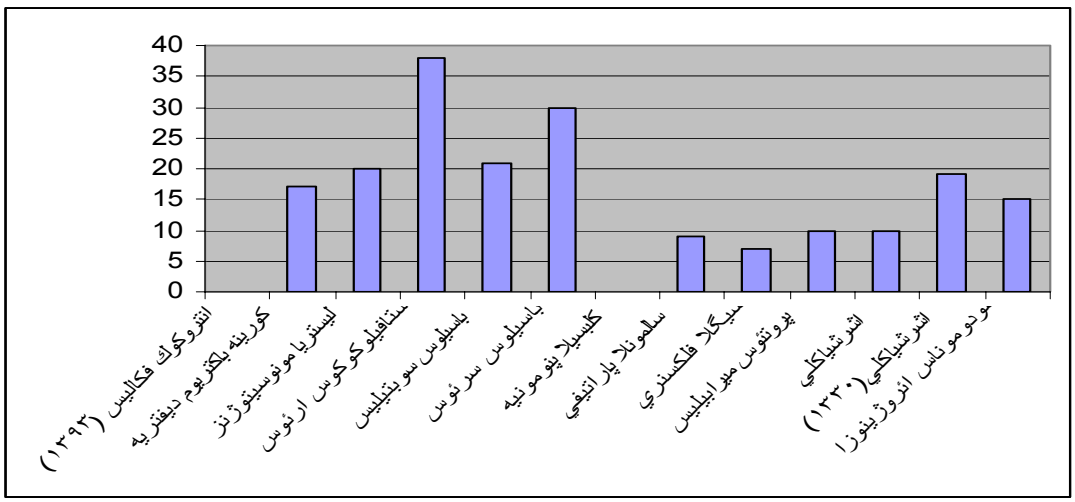
[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-07-21]



نمودار ۱. نتایج قطر هاله عدم رشد حاصل از تاثیر عصاره تخمیری محیط کشت باکتری مولد ترکیب ضد میکروبی ، پس از ۱۶ساعت گرماگذاری بر روی ۱۳ باکتری شاخص گرم مثبت و گرم منفی استاندارد



نمودار۲. نتایج قطر هاله عدم رشد حاصل از تاثیر عصاره تخمیری محیط کشت باکتری مولد ترکیب ضد میکروبی ، پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری بر روی ۱۳ باکتری شاخص گرم مثبت و گرم منفی استاندارد



نمودار ۳. نتایج قطر هاله عدم رشد حاصل از تاثیر عصاره تخمیری محیط کشت باکتری مولد ترکیب ضد میکروبی، پس از ۴۸ ساعت گرماگذاری روی ۱۳ باکتری شاخص گرم مثبت و گرم منفی استاندارد

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-07-21]

نتایج حاصل از رسوب پروتئین ها توسط سولفات آمونیوم و بررسی اثر ضد میکروبی پروتئین‌های رسوب یافته در قبل و بعد از دیالیز در جدول ۱ نشان داده شده است (جدول ۱) .

از طریق تعیین واحد فعالیت *انتروکوک فکالیس* بر حسب (U/mL) در زمان‌های متفاوت، میزان تولید ترکیب ضد میکروبی بر حسب (U/mL) به دست آمد و میزان تولید در ساعت‌های ۱۶ تا ۲۴ (در طول فاز لگاریتمی و در ابتدای فاز سکون) افزایش یافت و در ساعت ۴۸ (در اواسط فاز سکون) کاهش یافت.

حجم نمونه (mL)، واحد فعالیت (U/mL)، فعالیت کل (Unit)، غلظت پروتئین(mg/mL)، میزان پروتئین کل (mg)، فعالیت اختصاصی (U/ mg)، راندمان (٪)،درصد بازیافت (٪)و ضزیب تخلیص ترکیب ضد میکروبی، در قبل و بعد از دیالیز در جدول ۲ آورده شده است (جدول۲).

حداقل غلظت باکتریواستاتیکی ترکیب ضد میکروبی برای باکتری‌های گرم مثبت کمتر از گرم منفی بود (جدول ۳) .

جدول ۱. نتایج رسوب پروتئین ها در زمان ۲۴ ساعت در قبل و بعد از دیالیز

قطر هاله عدم رشد (mm)	*استافیلوکوکوس ارئوس*		*لیستریا مونوسیتوژنز*		*باسیلوس سرئوس*		*کلبسیلا پنومونیه*	
انتروکوک								
نمونه های قبل و پس از دیالیز	۱	۲	۱	۲	۱	۲	۱	۲
انتروکوک فکالیس	۱۹	۱۹	۱۰	۸	۱۶	-	-	-

۱- رسوب پروتئین ها پیش از دیالیز

۲- رسوب پروتئین ها پس از دیالیز

جدول ۲. میزان پروتئین و فعالیت و سایر فاکتور های ترکیب ضد میکروبی، در قبل و بعد از دیالیز:

سویه ها	*انتروکوک فکالیس*		
فاکتورها	مایع تخمیر	قبل از دیالیز	پس از دیالیز
حجم نمونه(**mL**)	۱۰۰	۳۵	۲۵
واحدفعالیت (**Unit/mL**)	۱۰۰	۱۵۰	۲۰۰
فعالیت کل (**Unit**)	۱۰۰۰۰	۵۲۵۰	۵۰۰۰
غلظت پروتئین(**mg/mL**)	۲/۶	۱/۹	۰/۸
پروتئین کل (**mg**)	۲۶۰	۶۶/۵	۲۰
فعالیت اختصاصی(**U/mg**)	۳۸/۴۶	۷۸/۹۵	۲۵۰
راندمان (٪)	-	۵۲/۵	۵۰
درصد بازیافت(٪)	-	۲۵/۵۸	۷/۶۹
ضریب تخلیص	-	۲/۰۵	۶/۵۰

جدول ۳. حداقل غلظت باکتریواستاتیکی

حداقل غلظت باکتریواستاتیکی (**g/L**)	*استافیلوکوکوس ارئوس*	*لیستریامونوسیتوژنز*	*باسیلوس سرئوس*	*کلبسیلا پنومونیه*
انتروکوک				
انتروکوک فکالیس	۰/۰۵	۰/۴	-	-

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-07-21]

بحث

به دلیل گرم مثبت بودن باکتری انتروکک و تاثیرماده ضد میکروبی بر روی سویه‌های منسوب به سویه تولید کننده، تاثیر ضد میکروبی انتروکوک بر باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از گرم منفی بود (۱۶) . بیشترین اثر ضد میکروبی این ترکیب، در زمان ۲۴ ساعت و مربوط به باکتری استافیلوکوکوس ارئوس بود.

مقاوم ترین باکتری به این ترکیب ضد میکروبی، باکتری *کلبسیلا پنومونیه* بود. سولفات آمونیوم یک روش شناخته شده برای رسوب دهی و بازیابی پروتئین ها است و به طور گسترده برای بازیافت پروتئین ها استفاده می‌شود. در این روش، حلالیت پروتئین ها با افزودن نمک ها، حلال‌های آلی و سایر ترکیباتی که حلالیت زیادی دارند، کاهش داده می‌شود. رسوب دهی را برای تفکیک پروتئین ها از یکدیگر یا به عنوان روش کاهش دهنده حجم، به منظور تغلیظ محصول به کار می‌برند. هم چنین می‌توان، پیش از مراحل تخلیص نهایی ، از آن به عنوان یک مرحله برای جداسازی محصولات جانبی نامطلوب مانند اسیدهای نوکلئیک، رنگدانه ها و دیگر اجزای باقی مانده از محصول حاصل از تخمیر استفاده نمود (۱۵) . رسوبات پروتئین حاصله پس از حل شدن در بافر پتاسیم فسفات، به منظور خالص سازی، مورد فرایند دیالیز قرار گرفتند. آزمایشات اولترافیلتراسیون نشان داده است که آنتی بیوتیک ها قادر به عبور از غشاء هایی با cut-ofF های ۱۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ کیلودالتون نیستند (۱۴) . در این تحقیق، به منظور خلوص بیشتر مایع پروتئینی، یک مرحله دیالیز در حضور بافر پتاسیم فسفاتpH=0, 7. 05M انجام گرفت. در زمان دیالیز، تعویض بافر باید تا زمانی ادامه یابد که اطمینان حاصل شود که تمام یون‌های آمونیوم از مایع پروتئینی درون کیسه خارج گردیده اند و فقط پروتئین ها باقی مانده اند. برای تایید این موضوع از معرف نسلر استفاده گردید. ایجاد رنگ قرمز آجری در اثر افزودن معرف نسلر به محلول مورد نظر نشان دهنده وجود یون‌های آمونیوم در محلول فوق می‌باشد، که ناشی از ایجاد ترکیب زیر می‌باشد:

$$NH_4^+ + 2[HgI_4]^{2-} + 4OH^- \longrightarrow HgO.Hg(NH_2)I + 7I^- + 3H_2O$$

حساسیت تست نسلر تا 0 NH_3. 3µg در 2µl نمونه می‌باشد(۱۷، ۱۶) . چنانچه نتایج نشان داد، پس از دیالیز، به دلیل حذف سولفات آمونیوم و برخی از ناخالصی‌های موجود در محیط، تاثیر ضد میکروبی، تقریباً ثابت و در برخی از نمونه ها به طور جزئی کاهش یافت. میزان تولید ترکیب ضد میکروبی بر اساس U/ mL، در ۴ ساعت اولیه رشد ، تقریباً صفر است، یعنی از آن جایی که رشدی صورت نگرفته، در نتیجه، ماده ضد میکروبی هم تولید نشده است. اما به تدریج، شروع به افزایش می‌کند و در ساعت ۱۶، پس از تلقیح اولیه، یک افزایش شدید در میزان تولید روی می‌دهد این زمان، دقیقاً مقارن با افزایش تعداد باکتری و به عبارتی، همزمان با فاز لگاریتمی رشد است. این، نشان دهنده تولید این ترکیب در فاز لگاریتمی رشد است. بنابراین، می‌توان گفت که تولید ترکیب ضد میکروبی از شمای تولید یک متابولیت اولیه پیروی می‌کند (۱۸) . با ورود باکتری به فاز سکون(رکود)، میزان ترکیب ضد میکروبی تولید شده، تقریباً ثابت است و سپس، به تدریج کاهش می‌یابد (۱۹). همانطوری که در جدول ۵ مشاهده شد، فرایند دیالیز از طریق خالص نمودن ترکیب ضد میکروبی و حذف سایر ترکیبات ضد میکروبی موجب افزایش واحد فعالیت، فعالیت اختصاصی ترکیب ضد میکروبی شد. بدلیل حذف ترکیبات پروتئینی موجود در محیط کشت، موجب کاهش غلظت پروتئین و میزان پروتئین کل نیز شد. دلیل کم شدن راندمان و درصد بازیافت ترکیب ضد میکروبی، پس از دیالیز، از دست رفتن تیروتریسین طی فرایند خالص سازی(دیالیز) می‌باشد. به علت خالص شدن ترکیب ضد میکروبی در طی فرایند دیالیز، ضریب تخلیص این ماده پس از دیالیز بیشتر شد. به علت کاهش حجم نمونه پس از دیالیز نیز میزان فعالیت کل این ترکیب، کاهش یافت.

با بررسی حداقل غلظت باکتریواستاتیکی ترکیب ضد میکروبی برای باکتری *استافیلوکوکوس ارئوس* مشاهده شد که بدلیل حساس بودن این باکتری نسبت به این ترکیب ، حداقل غلظت مورد نیاز برای جلوگیری از رشد این باکتری کمتر از باکتری مقاوم (*کلبسیلا پنومونیه*) بوده است. با مقایسه نتایج به دست آمده با نتایج حاصل از بررسی حداقل غلظت باکتریواستاتیکی آنتی بیوتیک فنی توئین بر روی باکتری ها توسط دکتر متواضع در سال ۱۳۷۹، مشاهده شد که حداقل غلظت باکتریواستاتیکی آنتی بیوتیک فنی توئین بر روی *استافیلوکوکوس ارئوس* و *کلبسیلا پنومونیه* ۰/۰۲۵ است. دلیل کمتر بودن قابل ملاحظه حداقل غلظت باکتریواستاتیکی آنتی بیوتیک فنی توئین نسبت به ترکیب

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-07-21]

ضد میکروبی انتروکوک، قوی تر بودن این آنتی بیوتیک برای مهار باکتری‌های فوق می‌باشد (۲۰) .

نتیجه‌گیری

انتروکوکوس *فکالیس* با مشخصه PTCC1394 ، می‌تواند از طریق تولید یک ترکیب ضد میکروبی، اثر مفیدی بر روی ماندگاری محصول غذایی و سلامتی مصرف کننده داشته باشد.

References

1. Foulquié Moreno MR, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, Vuyst LD. The role and application of *enterococci* in food and health .International journal of Food microbiol. 2006; 106:1-24
2. Kretschmar M, Witte W, Hof H. Bactericidal activity of tyrothricin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to mupirocin.European journal of Clinical microbiol and Infectious disease.1996;15:261-263
3. Stokes JL, Woodward CR. Formation of Tyrothricin in Submerged Cultures of *Bacillus Brevis* .journal ofBacteriol. 1943; 46(1): 83–88
4. Kandler O, Nobert W, editors .Bergeys mannual of systematic,2nd ed . New York: Springer; 1989
5. Baron Ellen Jo, Finegold Sydney M, editors.Diagnostic microbiology, 8th ed.USA: Bailey & Scott; 1990
6. Khanafari A, Hosseini F. practical Microbiology and biochemical principles of reactions 2007 [in persian].
7. Dobus R.j, Hotchkiss R.D, Isolation of tyrothricin from *bacillusbrevis* cultures .Journal of Exp.Med 1941: pp 629
8. admanabha Reddy V, Christopher MD, Sankara Reddy I . Antimicrobial activity of *Lactobacillus acidophillus*.Taminadu. Journal of Vet Animal Sci. 2006; 4:142-149
9. Yamazaki S, Kamimuura H, Momose H .Protective effect of *bifidobacterium* monoassociation against lethal activity of *E.coli* .Journal of *Bifidobacterium* Microflora.1982;1:55-60
10. Khanafari A. Evaluation of antimicrobial effect of extract and pigment of three plants on aerobic bacteria(dissertation). Tehran: Islamic Azad U niversity of North Branch of Tehran,Faculty of basic of sciences; 2001 [in persian].
11. Klaenhammer TR .Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria .Journal of FEMS Microbiol Review .1993;12:39-86
12. Aroutcheva Alla A, Simoes Jose A .Sebastian Faro Antimicrobial protein produced by vaginal *Lactobacillus acidophilus* that inhibits *Gardnerellavaginalis*. Infect Dis Obstet Gynecol. Journal of Microbiol. 2001; 9 :33–39
15 -Bruno MEC , Momntville TJ .13. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria.Journal of Appl .Environ .Microbiol. 1993; 59:3003-3010
14. Lue De Vuyst .Functionality of novel starter cultures in traditional fermentation process .Journal of Microbiol. 1995;41 :1-7
15. Krijsman J,editor. Product recovery in bioprocess technology .Oxford :Butterworth heinemann;1992
16. Ougshi S, Yoshioto T .Purification and comparison of two types of beta-galactosidase from *Asdpergillus oryza* .Journal of Ferment .Technol. 1980; 58:115-212
17. Brummer W, Gunzer G .Laboratory techniques of enzyme recovery .Journal ofBiotechnol.1987; 7a:213-279
18. Charlotta E .Inhibition of *Enterobacteria* and *Listeria* growth by Latic acid and formic acid . Journal of Appl.Bacterial. 1993; 75:18-24
19. Sahl HG, Bradis H .Efflux of low Mr substances from the cytoplasm of sensitive cells caused by the staphylococcin like agent Pep5 .Journal of FEMS Microbiol Lett. 1983;16:75-79
20. Motavaze K. Evaluation of minimum inhibitory concentration of fenny toin(dissertation). Tehran: Islamic Azad U niversity of North Branch of Tehran,Faculty of basic of sciences; 2001 [in Persian].

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-07-21]

Evaluation of the *Enterococcus faecalis* role on inhibitory growth of *staphylococcus aureus* by production of a antimicrobial compound

*Yeganeh M[*1], Khanafari A[2] , Fallahian MR[3], Sharifan A[4]*

*1- *Corresponding author: Students` Research Committee, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. Email:mahsayeganeh19@yahoo.com*

2-Associated Prof. Dept. of Microbiology, Faculty of Basic of Sciences Islamic AzadUniversity, North branch of Tehran, Tehran, Iran

3-Instructor of microbiology Prof. Dept. of Microbiology, Faculty of Basic of Sciences Islamic AzadUniversity, North branch of Tehran, Tehran, Iran

4- Assistant Prof. Faculty of agriculture and natural resources, Islamic Azad University, Sciences and Researches branch of Tehran, Tehran, Iran

Abstract

Background and objective: The object of this research performance was Evaluation of the *Enterococcus faecalis* role on inhibitory growth of *staphylococcus aureus* by production of a antimicrobial compound.

Material and Methods: After the culture of *Enterococcus faecalis* with property of PTCC 1394 and ATCC 9854 in the BHI agar, centrifuging and isolation of microbial mass, that antimicrobial compound was purified by dialyze .Antimicrobial effect of present compound was evaluated on gram positive and gram negative indicator bacteries by well diffusion method. Inhibitory Concentration is determined by dilution method.

Results:The results of this research proved that Activity Unit, Specific activity, purification factor increased after dyalisis . Total protein, Concentration, Total activity, amount of total protein decreased after dyalisis. Produced the lowest inhibitory concentration by antimicrobial compound was on *Staphylococcus aureus* .

Conclusion: In attention to achieved results of this antimicrobial compound , *Enterococcus faecalis* with property of PTCC1394 can play a important role as a probiotic in food industry by producing of a anitimicrobial compound .

Keywords: Antimicrobial affect, *Enterococcu faecalis*, Probiotic

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-07-21]