مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال شانزدهم، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۰، صفحات ۱۲۰-۱۱۱

ارزیابی فعالیت و بررسی ویژگی‌های باکتریوسین تولید شده توسط باکتری‌های *لاکتوباسیل* جدا شده از ماست محلی شهرستان بهبهان

بهروز علیزاده بهبهانی[۱]، محمد نوشاد[۲]، حسین جوینده[۳]

۱- نویسنده مسئول: استادیار گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران
پست الکترونیکی: B.alizadeh@asnrukh.ac.ir
۲- استادیار گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران
۳- دانشیار گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

تاریخ دریافت: ۹۹/۱۰/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱/۳۰

چکیده

سابقه و هدف: باکتری‌های جنس *لاکتوباسیلوس* به‌طور گسترده‌ای در طبیعت و به‌خصوص فراورده‌های لبنی وجود دارند. این میکروارگانیسم‌ها در طول فرایند تخمیر، ترکیباتی مختلفی مانند اسیدهای آلی و باکتریوسین تولید می‌کنند که دارای فعالیت ضدمیکروبی می‌باشند. هدف از این پژوهش جداسازی، شناسایی و تعیین فعالیت ضدمیکروبی باکتریوسین تولیدی توسط سویه‌های ایزوله شده *لاکتوباسیلوس* از ماست محلی شهرستان بهبهان بود.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش جدایه‌های *لاکتوباسیل* ماست محلی شهرستان بهبهان توسط روش آنالیز ژن 16S rRNA شناسایی و سپس اثر ضدمیکروبی باکتریوسین تولیدی علیه ۵ سویه باکتری شاخص غذازاد به روش‌های انتشار در آگار به کمک چاهک و دیسک مورد بررسی قرار گرفت. اثر آنزیم‌های پروتئولیتیک، حرارت و pH بر فعالیت و پایداری باکتریوسین سویه‌های *لاکتوباسیوس* نیز بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل از روش چاهک و دیسک نشان داد که بیشترین اثر مهارکنندگی روی باکتری‌های *شیگلا دیسانتری*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس آئروژینوزا* ، *میکروکوکوس لوتئوس* و *لیستریا مونوسیتوژنز* به‌ترتیب مربوط به جدایه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس بوشنری* بود. جدایه *میکروکوس لوتئوس* حساس‌ترین و *سودوموناس آئروژینوزا* مقاوم‌ترین باکتری بیماری‌زا در برابر اثر ترکیبات باکتریوسینی بودند. ترکیبات ضدمیکروبی تولید شده توسط آنزیم‌های پروتئولیتیک غیر فعال شدند اگر چه در برابر حرات و pH پایداری خود را حفظ کردند.

نتیجه گیری: باکتریوسین تولید شده توسط *لاکتوباسیل*‌های بومی، قادر به مهار طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌های شاخص غذازاد موجود در مواد غذایی می‌باشند و می‌توانند به عنوان نگهدارنده‌های زیستی سالم و بی‌خطر استفاده شود.

واژگان کلیدی: *لاکتوباسیلوس*، محصولات لبنی سنتی، باکتریوسین، فعالیت ضدمیکروبی

• مقدمه

باکتری‌های اسید لاکتیک باکتری‌هایی هستند گرم مثبت، بدون اسپور، کاتالاز منفی، احیای نیترات منفی و سیتوکروم اکسیداز منفی که فاقد توانایی ذوب ژلاتین و تولید اندول هستند. باکتری‌های اسید لاکتیک متابولیسمی تخمیری داشته، ساکارولیتیک هستند و اسید لاکتیک محصول نهایی حاصل از تخمیر کربوهیدرات است. خانواده باکتری‌های اسید لاکتیک شامل جنس و گونه‌های متعددی می‌باشد که به صورت مشخص برای صنعت غذا مفید هستند. به صورت تاریخی، این باکتری‌ها به عنوان افزودنی زیستی جهت کاهش آلودگی باکتریایی و فساد غذایی و افزایش زمان ماندگاری محصولات به غذا اضافه می‌شدند. برخی گونه‌های مشخص از این خانواده، استفاده‌های صنعتی خاص دارند. به طور مثال به‌عنوان آغازگر برای تخمیرهای صنعتی از جمله در فراورده‌های لبنی، گوشتی، غلات و سبزی‌ها استفاده می‌شوند (۱). *لاکتوباسیلوس*‌ها یکی از باکتری‌های مهم خانواده اسید لاکتیک بوده که به شکل‌های متنوع باسیل‌های باریک و بلند تا کوکوباسیل کوتاه وجود دارند و دارای بیش از ۱۰۰ گونه و زیرگونه هستند. این باکتری‌ها به صورت طبیعی در دهان،

روده، شیر و فراورده های آن، سبزی‌ها، گوشت و همچنین فراورده‌های تخمیری یافت می‌شود. باکتری‌های *لاکتوباسیلوس* بی‌هوازی اختیاری یا میکروآئروفیل بوده و ۵ درصد دی‌اکسیدکربن در محیط باعث تحریک رشد آن‌ها می‌شود. دمای بهینه فعالیت آن‌ها بین ۳۰ تا ۴۰ درجه سانتی‌گراد است و pH بهینه برای رشد آن‌ها در حدود ۵/۵ تا ۵/۸ است اما در pH کمتر از ۵ نیز قادر به رشد هستند. این باکتری‌ها در محصولات و فرآورده‌های غذایی مختلف دارای نقش‌های متفاوتی است. به طور مثال به علت تولید اسید لاکتیک می‌تواند نقش نگهدارنده داشته باشد یا به‌علت تولید متابولیت‌های مفید و پتانسیل تنظیم و تقویت سیستم ایمنی، به‌عنوان سویه مکمل در محصولات استفاده شود. همچنین، به علت ایجاد طعم‌های مختلف، بافت مناسب و ترکیبات مغذی به عنوان استارتر برای انواع مختلفی از محصولات لبنی، تخمیر غذاهای گیاهی، تخمیر گوشت و نان نقش دارند (۳، ۲). باکتری‌های *لاکتوباسیلوس* دارای طیف وسیعی از فعالیت ضدمیکروبی هستند که دارای دلایل مختلفی می‌باشد. از جمله تولید ترکیباتی مانند اسیدهای آلی از قبیل اسید استیک، اسید لاکتیک و اسید فرمیک، پراکسید هیدروژن، باکتریوسین‌ها، پپتیدهایی با وزن مولکولی کم و پروتئین‌های ضدقارچی، متابولیت‌های چربی، اسیدهای آمینه و اسیدهای چرب، فنیل لاکتیک اسید و هیدروکسی فنیل لاکتیک اسید و ترکیبات دیگر مانند دی استیل، آمونیاک، اتانل، دی آمیناستوئین، استالدئید، بنزوات (۵، ۴). اثر آنتاگونیستی باکتری *لاکتوباسیلوس* علیه بسیاری از باکتری‌های بیماری‌زای مهم انسانی و غذایی از قبیل *لیستریا مونوسایتوژنز*، *اشرشیا کلی*، *سالمونلا انتریکا* و *شیگلا فلکسنری*، *کلستریدیوم بوتولونیوم* و *استافیلوکوکوس اورئوس* به اثبات رسیده است (۹-۶). واژه باکتریوسین شامل گروه بزرگ و وسیعی از پروتئین‌ها یا پپتیدهای ضدمیکروبی ریبوزومی خارج سلولی می‌باشد که اثر باکتری‌کشی و یا باکتریواستاتیکی دارند و معمولا علیه باکتری‌هایی که از نظر ژنتیکی قرابت بیشتری با خود دارند، عمل می‌کنند. از میان باکتریوسین‌هایی که توسط ارگانیسم‌های گرم مثبت تولید می‌شوند، باکتریوسین تولیدی توسط *لاکتوباسیلوس*ها ارزش تجاری بالایی دارند (۱۰). تاکنون انواع مختلفی از باکتریوسین‌ها مانند نایسین (Nisin)، دیپلوکوکسین (Diplococcin)، بولگاریکان (Bulgarican)، هلوتیسین (Helviticin)، لاکتاسین (Lactacin) و انواع مختلف پلانتاراسین‌ها شناسایی و تعیین خصوصیت شده‌اند. باکتریوسین‌ها معمولا بر غشا سیتوپلاسمیک تاثیر می‌گذارد و با ایجاد نیروی حرکتی پروتون باعث تشکیل حفره در غشا شده و مرگ سلول را باعث می‌شود (۱۱). Wang و همکاران (۲۰۱۸)، باکتریوسین LPL-1 را از باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* LPL-1 جداسازی نموده و بیان داشتند این باکتریوسین دارای ویژگی‌های مطلوبی جهت استفاده به عنوان نگهدارنده غذایی می‌باشد (۱۲). Bromberg و همکاران (۲۰۰۴)، باکتری‌های اسید لاکتیک تولید کننده باکتریوسین را از گوشت و محصولات گوشتی جداسازی نموده و گزارش کردند این باکتری‌ها به واسطه تولید ترکیبات باکتریوسینی می‌توانند از رشد و فعالیت باکتری‌های عامل فساد و بیماری‌زا جلوگیری کنند (۱۳). Jawan و همکاران (۲۰۱۹)، از باکتری پدیوکوکوس *اسیدی لاکتیسی* و *لاکتوباسیلوس فارسیمینیس*، ترکیبات باکتریوسینی را جدا نموده و ویژگی‌های آن‌ها را مورد بررسی قرار دادند (۱۴). Pei و همکاران (۲۰۲۰)، باکتریوسین جدیدی را از باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جداسازی و تخلیص نمودند و گزارش کردند این باکتریوسین علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی فعالیت ضد میکروبی دارد و می‌تواند از تشکیل بیوفیلم توسط باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* جلوگیری کند (۱۵). با توجه به اهمیت جدایه‌های بومی پروبیوتیکی و استفاده از آن‌ها در فراورده‌های مختلف غذایی، هدف از انجام این پژوهش، جداسازی و شناسایی جدایه‌های *لاکتوباسیلوس* از ماست‌های محلی شهرستان بهبهان بود. همچنین پتانسیل آن‌ها در تولید باکتریوسین و ارزیابی ویژگی‌های آن به منظور نوع عملکرد ضدمیکروبی آن‌ها، مورد بررسی قرار گرفت.

• مواد و روش‌ها

جداسازی و شناسایی *لاکتوباسیلوس*ها با روش تکثیر ژن 16S Rrna: به منظور جداسازی جدایه‌های *لاکتوباسیل* بومی، ۷ نمونه ماست محلی از مناطق مختلف شهرستان بهبهان تهیه شد. ۱۰ میلی‌لیتر از هر نمونه ماست با ۹۰ mL از سیترات سدیم مخلوط و بعد از همگن شدن توسط استومیکر (اینترساینس، فرانسه)، روی محیط اختصاصی MRS آگار (مرک، آلمان) کشت داده شد و سپس گرمخانه‌گذاری به مدت ۳۶ h در دمای ۳۷ °C انجام پذیرفت. کلنی‌های که از نظر رنگ، اندازه و حاشیه با هم تفاوت داشتند از محیط کشت جدا و رنگ‌آمیزی گرم و تست کاتالاز روی آن‌ها صورت پذیرفت و زیر میکروسکوپ از نظر ریخت‌شناسی مشاهده شدند. جدایه‌های میله‌ای شکل که گرم مثبت و کاتالاز منفی بودند، با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی و تخمیر کربوهدرات گروه‌بندی شدند. برای شناسایی مولکولی از هر گروه یک سویه

انتخاب و ادامه آزمایش‌ها بر آن‌ها انجام پذیرفت. ابتدا DNA ژنومی توسط کیت استخراج DNA برای باکتری‌های گرم مثبت (بایونیر، کره جنوبی) استخراج و واکنش زنجیره‌ای PCR با پرایمرهای 5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3' و 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'، با شرایط زیر انجام گرفت: دناتوراسیون اولیه در ۹۵ °C، ۵ min؛ ۳۰ سیکل شامل ۹۴ °C، ۳۰ s (دناتوراسیون)، ۵۵/۵ °C، ۳۰ s (اتصال پرایمر)، ۷۲ °C، ۳۰ s (گسترش) و گسترش نهایی در دمای ۷۲ °C. سپس جدایه‌هایی که بعد از انجام PCR باندی حدود ۱۵۰۰ جفت باز داشتند برای توالی‌یابی به شرکت ماکروژن ارسال شدند (۱۶).

جداسازی باکتریوسین: جهت بررسی تولید باکتریوسین توسط جدایه‌های انتخابی، ابتدا در محیط MRS براث در دمای ۳۷ °C به مدت ۴۸ h کشت داده شد. سپس جهت جداسازی سوپرناتانت و باکتری‌ها، محیط کشت به مدت ۱۵ min در ۲۰۰۰g سانتریفیوژ شده و محلول رویی جدا شد. برای خنثی کردن اثر اسیدهای آلی، از سود ۴ N استفاده شد و pH سوپرناتانت روی ۶/۵ تنظیم شد. درمرحله بعد سوپرناتانت سلولی به ارلن‌های استریل منتقل و سپس به ظروف حاوی یخ روی همزن‌های مغناطیسی انتقال داده شد. ۵۰ درصد از حجم موجود در هر ارلن، سولفات آمونیوم اضافه شد. به منظور حل شدن بهتر سولفات آمونیوم، نمونه‌ها به مدت ۱۸ h ساعت در دمای ۴ °C قرار گرفتند. محتویات ارلن‌ها به لوله‌های استریل جدید منتقل شده و در ۲۵۰۰g به مدت ۴۰ min سانتریفیوژ شدند. مایع رویی دورریخته شده و رسوب حاصله در ۱ mL بافر فسفات پتاسیم ۰/۰۵ M و pH برابر ۷ حل شد. برای خنثی کردن اثر پراکسید به آن آنزیم کاتالاز با غلظت ۲mg/mL اضافه شد. محلول حاصل شده به عنوان باکتریوسین نیمه خالص مورد بررسی قرار گرفت (۱۷).

تعیین فعالیت باکتریوسینی: در این پژوهش از باکتری‌های *شیگلا دیسانتری* PTCC ۱۱۸۸ ، *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC ۲۵۹۲۳ ، *سودوموناس آئروژینوزا* PTCC ۱۷۰۷، *میکروکوکوس لوتئوس* PTCC ۱۱۱۰ و *لیستریا اینوکوا* ATCC ۳۳۰۹۰ استفاده شد. فعالیت ضدمیکروبی باکتریوسین‌های جدا شده با روش انتشار در آگار به کمک چاهک و دیسک بررسی گردید. نفوذ ماده ضدمیکروبی از طریق حفره ایجاد شده در آگار به اطراف اساس کار در روش چاهک می‌باشد. از سویه‌های بیماری‌زا که غلظت آن‌ها روی نیم مک‌فارلند تنظیم شده بود، به میزان ۱۰ µl روی محیط کشت به کمک میله ال شکل به خوبی پخش گردید. در پلیت‌ها چاهک‌هایی با قطر ۶/۸ mm به وسیله انتهای پیپت استریل ایجاد شد و ۱۱۰ µl از سوپرناتانت هر جدایه به چاهک‌ها اضافه شد. بعد از گرمخانه‌گذاری به مدت ۲۴ h در دمای ۳۷ °C ، قطر هاله عدم رشد در اطراف هر چاهک اندازه گیری شد. در روش انتشار در آگار به کمک دیسک، دیسک‌های کاغذی با قطر ۶/۸ mm را به مدت ۱۵ min در سوپرناتانت غوطه‌ور کرده و روی محیط مولر هینتون اگار کشت داده شده با باکتری‌های بیماری‌زای غذازاد قرار داده شد و بعد از گرمخانه‌گذاری هاله عدم رشد اندازه گیری شده و بر حسب میلی‌متر گزارش شد. در هر دو روش از پلیت‌های MRS آگار برای رشد سویه لیوفیلیزه شده به عنوان کنترل مثبت استفاده شد (۱۹، ۱۸).

بررسی اثر آنزیم‌ها، حرارت و pH بر فعالیت باکتریوسین: جهت بررسی مقاومت باکتریوسین تولید شده از آنزیم‌های پپسین (pH=۳)، پروتئیناز K و تریپسین (pH=۷) با غلظت نهایی ۱ mg/mL استفاده شد. در این روش به طور خلاصه، به ۲۰۰ µl از سوپرناتانت حاوی باکتریوسین متعلق به هر جدایه، ۲۰ µl از آنزیم اضافه و سپس به مدت ۲ h در دمای ۳۷ °C گرمخانه‌گذاری شد. جهت غیرفعال کردن آنزیم‌ها، محلول حاصل به مدت ۳ min در معرض دمای ۱۰۰ °C قرار گرفت. میزان فعالیت ضدمیکروبی هر محلول به صورت جداگانه مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی اثر دما بر فعالیت باکتریوسین‌ها، سوپرناتانت خنثی شده در معرض دماهای ۶۰ درجه سانتی‌گراد (به مدت ۲۰ min، ۳۰ و ۴۵)، ۱۰۰ °C (۱۰ min) و در نهایت از دمای ۱۲۱ °C (به مدت ۱۵ min) قرار گرفت (۲۰). برای بررسی اثر pH، ابتدا pH سوپرناتانت محیط کشت با استفاده از سود ۴ M و هیدروکلریک اسید ۵ M بین ۹-۲ تنظیم شد. نمونه‌ها ۲ h ساعت در دمای اتاق قرار داده شدند و سپس فعالیت آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت (۲۱). سوپرناتانت جدایه‌ها که تحت هیچ تیمار آنزیمی، اسیدی و دمایی قرار نگرفتند به عنوان شاهد با فعالیت ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شده و نتایج در مقایسه با آن‌ها بیان گردید.

تجزیه و تحلیل آماری: در پژوهش حاضر نمونه برداری با استفاده از طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA) در سطح احتمال ۵ درصد و آزمون دانکن برای تأیید وجود اختلاف بین میانگین‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۱۸ انجام گرفت.

• یافته‌ها

شناسایی *لاکتوباسیلوس*ها با روش تکثیر ژن 16S rRNA: شناسایی باکتری‌ها یکی از مهم ترین کاربردهای روش آنالیز ژن 16S rRNA هست. پس از تکثیر ژن 16S rRNA با استفاده از واکنش PCR، نتایج بر روی ژل مشاهده شده و پس از تخلیص آمپلیکون‌ها با کیت استخراج از ژل شرکت بایونیر جهت خوانش توالی به شرکت ماکروژن ارسال گردید. مقایسه توالی‌های به دست آمده از جدایه‌ها با توالی جدایه‌های موجود در مرکز ملی اطلاعات زیست فناوری (NCBI) نشان داد توالی‌های انتخاب شده متعلق به ۴ باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی*، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس بوشنری* است.

ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی جدایه‌های *لاکتوباسیلوس*: فعالیت ضد میکروبی جدایه‌های *لاکتوباسیلوس* علیه باکتری‌های بیماری‌زا به روش‌های انتشار در آگار به کمک چاهک و دیسک مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد هاله بازدارندگی ایجاد شده توسط باکتریوسین تولید شده جدایه‌های *لاکتوباسیلوس* در روش چاهک بین ۰ mm تا ۲۲/۶۰ متفاوت است. بیشترین میزان مهار کنندگی مربوط به جدایه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و سپس *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بود. حساس‌ترین سویه بیماری‌زا نسبت به اثر باکتریوسین جدایه‌ها، *میکروکوکوس لوتئوس* بود به‌طوری که *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* هاله‌ای به قطر ۲۲/۶۰ mm و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* هاله‌ای به قطر ۱۹ mm در سطح محیط رشد این باکتری ایجاد نمودند (جدول ۱). مقاوم‌ترین جدایه در برابر فعالیت ضدمیکروبی باکتریوسینی، مربوط به باکتری گرم منفی *سودوموناس آئروژینوزا* بود؛ به‌طوری *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس بوشنری* هیچ اثر مهار کنندگی روی آن نداشتند. بیشترین اثر ضدمیکروبی بر جدایه *شیگلا دیسانتری* مربوط به *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* با هاله‌ای به قطر ۱۴/۶۰ mm میلی‌متر و کمترین فعالیت مربوط به جدایه *لاکتوباسیلوس بوشنری* با ۸/۲ mm قطر هاله بود. در مورد جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس*، بیشترین فعالیت ضدمیکروبی مربوط به *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (۱۷/۸۰ mm) و کمترین اثر ضدمیکروبی متعلق به لاکتوباسیلوس بوشنری (۱۱/۲۰ mm) بود. همچنین *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بیشترین هاله ممانعت از رشد را روی *سودوموناس آئروژینوزا* (۱۱/۵۰ mm) و *لیستریا اینوکوا* (۱۵/۳۰ mm) ایجاد نمود. در بررسی فعالیت ضدمیکروبی به روش انتشار در آگار به کمک دیسک (دیسک دیفیوژن)، قطر هاله‌های ایجاد شده بین mm ۰ – ۱۸/۵ بود. به‌طوری که *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* دارای بیشترین فعالیت ضدمیکروبی بودند (جدول ۲). بیشترین اثر ضدمیکروبی بر جدایه *شیگلا دیسانتری* متعلق به *لاکتوکوکوس کازئی* با هاله‌های به قطر ۱۲/۶ mm بود و کمترین اثر ضدمیکروبی باکتریوسینی به *لاکتوباسیلوس بوشنری* تعلق داشت. در مورد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشترین و کمتری فعالیت ضد-میکروبی به *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (۱۵ mm) و *لاکتوباسیلوس بوشنری* (۱۱/۲۰ mm) متعلق بود. *لاکتوباسلوس اسیدوفیلوس* بیشترین خاصیت مهارکنندگی را روی *سودوموناس آئروژینوزا* (۱۱ mm) داشت در حالی که باکتریوسین متعلق به جدایه‌های *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس بوشنری* هیچ فعالیت ضدمیکروبی علیه این پاتوژن نداشت. حساس‌ترین باکتری بیماری‌زا در برابر فعالیت ضدمیکروبی باکتریوسینی جدایه‌های *لاکتوباسیلوس*، *میکروکوکوس لوتئوس* بود به گونه‌ای که *لاکتوباسلوس پلانتاروم* با ۱۸/۵ هاله شفاف و *لاکتوباسیلوس بوشنری* با هاله‌ای به قطر ۱۰/۲ mm بیشترین و کمترین فعالیت ضد-میکروبی را علیه *میکروکوکوس لوتئوس* از خود نشان دادند. در مورد باکتری *لیستریا اینوکوا* نیز *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس کازئی* بیشترین (۱۵ mm) و کمترین (۱۲ mm) فعالیت ضدمیکروبی داشتند. نتایج آزمون چاهک آگار و روش دیسک دیفیوژن نشان داد بهترین تأثیر ضدمیکروبی مربوط به باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بود.

جدول ۱. ناحیه بازداری (mm) جدایه‌های *لاکتوباسیلوس* در مهار باکتری‌های بیماری‌زای شاخص غذازاد به روش چاهک آگار

سویه‌های *لاکتوباسیل*	باکتری‌های بیماری‌زا				
	شیگلا دیسانتری	*استافیلوکوکوس اورئوس*	*سودوموناس آئروژینوزا*	*میکروکوکوس لوتئوس*	*لیستریا اینوکوا*
لاکتوباسیلوس کازئی	۱۲/۰±۶۰/۳۲^{c}	۱۳/۰±۵۰/۱۰^{b}	–	۱۵/۰±۱۰/۱۵^{a}	۱۲/۰±۰۰/۳۷^{c}
لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس	۱۱/۰±۰۰/۳۲^{d}	۱۵/۰±۰۰/۲۵^{b}	۱۱/۰±۰۰/۲۵^{d}	۱۷/۰±۴۰/۲۳^{a}	۱۳/۰±۷۰/۲۵^{c}
لاکتوباسیلوس پلانتاروم	۱۰/۰±۵۰/۲۰^{c}	۱۴/۰±۰۰/۵۴^{b}	۱۰/۰±۵۰/۱۸^{c}	۱۸/۰±۵۰/۲۶^{a}	۱۵/۰±۰۰/۴۸^{b}
لاکتوباسیلوس بوشنری	–	۱۱/۰±۲۰/۱۴^{b}	–	۱۰/۰±۲۰/۱۱^{c}	۱۲/۰±۲۰/۱۶^{a}

- حروف غیر مشابه در یک سطر نشان‌دهنده تفاوت در سطح معنی‌داری ۵ درصد (آنالیز واریانس یک‌طرفه، آزمون دانکن) است.
- (-) هاله عدم رشد مشاهده نشد.

جدول ۲. ناحیه بازداری (mm) جدایه‌های *لاکتوباسیلوس* در مهار باکتری‌های بیماری‌زای شاخص غذازاد به روش دیسک دیفیوژن

سویه‌های *لاکتوباسیل*	باکتری‌های بیماری‌زا				
	شیگلا دیسانتری	*استافیلوکوکوس اورئوس*	*سودوموناس آئروژینوزا*	*میکروکوکوس لوتئوس*	*لیستریا اینوکوا*
لاکتوباسیلوس کازئی	۱۰/۰±۵۰/۳۲^{d}	۱۵/۰±۵۰/۳۰^{b}	–	۱۶/۰±۵۰/۱۸^{a}	۱۱/۰±۸۰/۱۹^{c}
لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس	۱۲/۰±۵۰/۲۵^{d}	۱۷/۰±۸۰/۲۷^{b}	۸/۰±۵۰/۱۸^{e}	۱۹/۰±۰۰/۲۸^{a}	۱۴/۰±۴۰/۳۲^{c}
لاکتوباسیلوس پلانتاروم	۱۴/۰±۶۰/۰۵^{d}	۱۷/۰±۰۰/۱۹^{b}	۱۱/۰±۵۰/۲۳^{e}	۲۲/۰±۶۰/۱۹^{a}	۱۵/۰±۳۰/۰۸^{c}
لاکتوباسیلوس بوشنری	۸/۰±۲۰/۱۰^{d}	۱۱/۰±۲۰/۱۵^{b}	–	۱۴/۰±۲۰/۳۴^{a}	۹/۰±۲۰/۰۷^{c}

- حروف غیر مشابه در یک سطر نشان‌دهنده تفاوت در سطح معنی‌داری ۵ درصد (آنالیز واریانس یک‌طرفه، آزمون دانکن) است.
- (-) هاله عدم رشد مشاهده نشد.

بررسی اثر آنزیم‌ها (پپسین، تریپسین و پروتئیناز K)، حرارت و pH بر فعالیت باکتریوسین: به‌منظور بررسی ماهیت و مقاومت عامل ضدمیکروبی استخراج شده در شرایط مختلف، از سوپرناتانت جدایه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* که نتایج بهتری نسبت به باقی جدایه‌ها داشت، استفاده شد. نتیجه آزمون تاثیر آنزیم‌های پپسین، تریپسین و پروتئیناز K نشان داد بعد از تیمار کردن سوپرناتانت خنثی شده با آنزیم‌های پروتئازی، هیچ‌گونه فعالیت ضدمیکروبی مشاهده نشد که ماهیت پروتئینی این ترکیبات را اثبات می‌کند (جدول ۳). این ترکیبات ضدمیکروبی دارای مقاومت بالایی نسبت به دماهای بالا بودند به‌طوری که شرایط اتوکلاو را با کاهش ۷ درصدی در میزان فعالیت خود، به خوبی تحمل کردند (جدول ۳). همچنین نسبت به شرایط اسیدی و بازی نیز مقاومت بالایی داشتند.

• بحث

در این پژوهش، ابتدا ۷ نمونه از ماست محلی شهرستان بهبهان جمع آوری گردید، سپس با استفاده از روش‌های مبتنی بر کشت سویه‌های میکروبی جداسازی شدند و در نهایت با تکنیک مولکولی ۴ سویه *لاکتوباسیلوس* مشخص گردید. ۴ باکتری شناسایی شده شامل *لاکتوباسیلوس کازئی*، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس بوشنری* بود. Wang و همکاران (۲۰۱۶)، فلور لاکتیکی محصولات تخمیری لبنی سنتی میانه غربی مغولستان را مورد بررسی و شناسایی قرار دادند. نتایج حاصل از شناسایی مولکولی نشان داد *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* غالب‌ترین گونه لاکتوباسیل در این محصولات بود (۲۲).

جدول ۳. بررسی اثر آنزیم‌های پروتئازی، حرارت و pH بر فعالیت باکتریوسین تولیدی توسط *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* علیه *استافیلوکوکوس اورئوس*

تیمار	نوع تیمار	فعالیت (درصد)
	شاهد	۱۰۰
اثر آنزیم‌های پروتئولیتیک	پپسین	۰
	تریپسین	۰
	پروتئیناز K	۰
اثر حرارت	۶۰ °C، ۲۰ min	۹۶
	۶۰ °C، ۳۰ min	۹۲
	۶۰ °C، ۴۵ min	۸۸
	۱۰۰ °C، ۱۰ min	۹۵
	۱۲۱ °C، ۱۵ min	۹۳
اثر pH	۲	۱۰۰
	۵	۱۰۰
	۷	۹۴
	۹	۹۴

Amirbozorgi و همکاران (۲۰۱۶)، فلور لاکتیکی محصولات لبنی سنتی ایران را از نظر وجود جدایه‌های اسید لاکتیک مورد مطالعه قرار دادند. نتایج به دست آمده نشان داد باکتری‌ها متعلق به دو زیرگروه جنس *لاکتوباسیلوس* (*لاکتوباسیلوس هلویتیکوس* و *لاکتوباسیلوس برویس*) هستند و *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس* با ۷۶/۷۹ درصد جمعیت، غالب‌ترین گونه در این محصولات در نظر گرفته شد (۲۳). قبل از گسترش تکنیک‌های مولکولی برای بررسی فلور و ترکیب باکتریایی یک نمونه غذایی، روش‌های مبتنی بر کشت بیشترین استفاده را جهت شناسایی باکتریایی داشتند که به خصوصیات فیزیولوژیکی و یا فنوتیپی این ارگانیسم‌ها مربوط می‌شد. پاسخ‌های فنوتیپی می‌تواند تحت تاثیر شرایط محیطی قرار گیرد. جهت طراحی روش‌های شناسایی پایدار و قابل اعتماد، باید آزمون‌های مبتنی بر ژنوم به کار رود (۲۴). طباطبایی و همکاران (۱۳۹۰)، بیان داشتند شناسایی باکتری‌ها در حد گونه بر اساس ویژگی‌های فنوتیپی به علت تغییرات زیاد خصوصیات بیوشیمیایی (الگوی تخمیر) دشوار است، لذا مقایسه توالی‌های ژن rDNA روش مناسبی جهت مقایسه فیلوژنیکی و شناسایی باکتری‌ها محسوب می‌شود (۲۵). به کارگیری روش‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی بسیار وقت‌گیر و ابهام آمیز است. برای مثال *لاکتوباسیلوس گاسری* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* هر دو دارای زیستگاه یکسان و مشابهی هستند و از نظر خصوصیات فنوتیپی از یکدیگر قابل تشخیص نیستند (۲۶). PCR در اصل تقویت آنزیمی یک بخش از DNA است که توسط دو آغازگر یعنی الیگونوکلئوتیدهای کوتاهی که رشته‌های مخالف یک توالی هدف را هیبرید کرده، احاطه شده و سپس سنتز اولیه توالی DNA مکمل را با DNA پلیمراز انجام می‌دهند. در این شرایط می‌تواند مقادیر بسیار پایین DNA جدایه هدف را، در حد نانوگرم، تکثیر کند و فرایند شناسایی را با دقت انجام دهد. Faghfoori و همکاران (۲۰۱۷) پراکندگی جنس *لاکتوباسیلوس* را در محصولات سنتی لبنی آذربایجان شرقی مورد مطالعه قرار دادند. نتایج به دست آمده نشان داد جدایه‌های *لاکتوباسیل* در این محصولات متعلق به *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس کازئی*، *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* و *لاکتوباسیلوس رامنسوس* بود (۲۷).

باکتری‌های اسید لاکتیک که به طور معمول در مواد غذایی تخمیری بر پایه لبنیات یافت می‌شوند و کاربرد گسترده‌ای در ایجاد تعادل میکروبی و افزایش میکروب‌های مفید با خاصیت درمانی دارند. این باکتری‌ها می‌توانند شرایط سخت دستگاه گوارش مانند اسیدیته بالا، نمک‌صفراوی، آنزیم‌های موجود در شیره معده و روده مانند پپسین و تریپسین را تحمل کنند و به نقاط هدف در بدن رسیده و تاثیرات مثبت خود را ایفا کنند (۲۸). همچنین این باکتری‌ها می‌توانند نسبت به شرایط سخت مثل نمک، کمبود اکسیژن، اسیدیته و ... مقاوم باشند که این موضوع قابلیت بالایی در استفاده‌های غذایی برای باکتری‌های اسید لاکتیک ایجاد می‌نماید. باکتری‌های اسید لاکتیک با تولید ترکیبات ضدمیکروبی از قبیل اسیدهای ارگانیک و همین طور باکتریوسین‌ها توانایی مقابله با پاتوژن‌های غذایی و انسانی را دارا هستند. امروزه با توجه به استفاده بی‌رویه از ترکیبات شیمیایی برای افزایش ماندگاری محصولات غذایی و همچنین مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی که با مقادیر بالا تجویز می‌شوند، توجه به باکتری‌های مفید که بتوانند با تولید ترکیبات ضدمیکروبی زمان ماندگاری محصولات غذایی را به صورت طبیعی بهبود دهند، رو به افزایش است (۲۹). امروزه نایسین به‌عنوان اولین ترکیب ضدمیکروبی که دارای مجوزهای لازم است در بیش از ۵۰ کشور جهان با نام تجاری Nisaplin به‌عنوان افزودنی غذایی استفاده می‌شود (۳۰).

در پژوهش حاضر، اثر ۴ جدایه *لاکتوباسیل* بر ۵ باکتری بیماری‌زا شاخص غذازاد و بیماری‌زای انسانی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان دادند بیشترین اثر ضدمیکروبی مربوط به سوپرناتانت خنثی شده (غیرفعال کردن اثر ضدمیکروبی اسیدهای آلی تولید شده) جدایه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بود که بیشترین اثرات ضدمیکروبی خود را در فاز ابتدایی لگاریتمی از خود نشان داد. همچنین *میکروکوکوس لوتئوس* حساس‌ترین باکتری پاتوژن بوده و بیشترین قطر هاله عدم رشد در تیمارهای مختلف مربوط به این جدایه بود. تحقیقات بسیاری اثر ضدمیکروبی جدایه‌های *لاکتوباسیل* را بر میکروارگانیسم‌های پاتوژن در طی سالیان طولانی مورد بررسی قرار داده‌اند. نتایج این مطالعات نشان داده است که نمونه های *لاکتوباسیل* زمانیکه در محیط‌های کشت انتخابی یا اختصاصی کشت داده شوند، قادر به تولید ترکیبات ضدمیکروبی با قابلیت باکتری‌کشی یا باکتریواستاتیکی هستند (۳۴-۳۱). خنافخری و همکاران (۱۳۸۸) توان تولید لاکتوسین‌ها توسط جدایه‌های پروبیوتیکی در نمونه ماست‌های محلی اراک، سرعین، شاهاندشت و دماوند را مورد بررسی قرار دادند. محققین ۲۱ جدایه اسید لاکتیک از محصولات فوق جداسازی نموده و بیان نمودند اثر ضدمیکروبی دو جدایه *لاکتوباسیل* بر باکتری‌های پاتوژن محسوس‌تر است که بعد از آنالیز این ترکیبات

پروتئینی با SDS-PAGE وزن مولکولی آن‌ها ۴۸ تا ۵۷ کیلودالتون تخمین زده شد (۳۵).

باکتریوسین‌ها در فرم خام، ترکیباتی غیر قابل دیالیز، مقاوم به pH و حرارت، حساس به آنزیم های پروتئولیتیک و غیر حساس نسبت به کاتالاز هستند. این ترکیبات و همچنین مولکول های شبیه باکتریوسین، مستقیماً به صورت پلی پپتید یا پیش پلی پپتید ساخته شده و اثر ضدمیکروبی آن‌ها به شرایط محیطی بستگی دارد. باکتریوسین‌ها جزء متابولیت‌های اولیه طبقه‌بندی شده و حداکثر تولید آن‌ها در فاز لگاریتمی رشد مشاهده می‌شود؛ اگر چه برخی از تحقیقات نشان داده که در اوایل فاز رکود نیز امکان تولید آن‌ها وجود دارد. به عنوان مثال، تولید باکتریوسین توسط *کلستریدیوم پرفرنژنس* ۱۱۰۵ فقط در فاز رکود انجام می‌گیرد (۳۶). خالدزاده و همکاران (۱۳۹۷) خصوصیات باکتر یوسین‌های تو لید شده توسط دو سو یه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بومی آذربایجان شرقی را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد باکتریوسین تولید شده توسط هر دو جدایه نسبت به تمامی پاتوژن‌های مورد مطالعه فعال بوده و طیف مهاری وسیعی داشتند. همچنین بعد از اعمال تیمارهای دمایی باکتریوسین‌ها همچنان فعال بودن خود را حفظ کردند اگرچه مشاهده شد که باکتریوسین‌های تولیدی نسبت به آنزیم پروتئیناز K حساس هستند. مهار و جلوگیری از رشد باکتری‌های گرم منفی توسط باکتریوسین باکتری‌های *لاکتوباسیلوس* یک ویژگی منحصر به فرد می‌باشد که منجر به گسترش کاربردهای دارویی این ترکیبات نیز می‌شود (۳۷). میردامادی و تنگستانی (۱۳۹۰) جدایه‌های *لاکتوباسیل* تخلیص شده از فرآورده‌های شیری سنتی ایرانی را از نظر تولید باکتریوسین علیه جدایه‌های استاندارد پاتوژن گرم مثبت، گرم منفی و مخمر مورد آزمون قرار دادند. نتایج نشان داد جدایه‌های لاکتوباسیل بومی قادر به تولید ترکیبات باکتریوسینی بوده و بیشترین اثر آن‌ها بر *میکروکوکوس لوتئوس*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، *باسیلوس سرئوس* و به میزان کمتری *لیستریا مونوسیتوژنز* بود. همچنین *کاندیدا آلبیکنس* مقاوم‌ترین جدایه در برابر اثرات ضدمیکروبی باکتریوسینی در نظر گرفته شد (۳۸). Abanoz و Kunduhoglu (۲۰۱۸) باکتریوسین تولیدی توسط *انترکوکوس فکالیس* را علیه پاتوژن‌های مهم و همینطور برخی از باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک مورد ارزیابی قرار داد. نتایج نشان داد که باکتریوسین KT11 در مقابل انواع باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی، از جمله باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک ونکومایسین و متیسیلین مؤثر است. همچنین فعالیت باکتریوسین KT11 پس از تیمار با آنزیم‌های پروتئولیتیک (پروتئیناز K، α- کیموتریپسین ، پروتئیناز و تریپسین) به طور کامل از بین رفت که نشان دهنده ماهیت پروتئینی این باکتریوسین است. علاوه بر این ، باکتریوسین KT11 در مقادیر pH ۲ تا ۱۱ و بعد از اتوکلاو در ۱۲۱ سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه پایدار باقی ماند (۳۹).

در مطالعه حاضر، جدایه‌های *لاکتوباسیل* موجود در فلور لاکتیکی ماست محلی بهبهان با روش آنالیز ژن 16S rRNA شناسایی و سپس پتانسیل ضدمیکروبی ترکیبات باکتریوسینی تولیدی توسط آن‌ها بر روی ۵ باکتری شاخص غذازاد مورد ارزیابی قرار گرفت. با توجه به نتایج به دست آمده مبنی بر فعالیت ضدمیکروبی این ترکیبات، پایداری حرارتی، اسیدی و بازی و حساسیت به آنزیم‌های پروتئازی توسط باکتریوسین-های تولید شده در این پژوهش، می‌توان نتیجه گرفت با توجه به‌عوارض ناشی از مصرف ترکیبات ضدمیکروبی مصنوعی و شیمیایی، این ترکیبات ضدمیکروبی می‌توانند به عنوان متابولیت‌های ضدمیکروبی طبیعی کاربرد غذایی و دارویی وسیعی داشته باشند.

سپاسگزاری: مقاله حاضر مستخرج از طرح پژوهشی با کد ۹۹۱/۱۶ می‌باشد، لذا نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان به دلیل حمایت‌های مادی و معنوی صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

• References

1. Siddhi BN, WayanSuardana I, Antara NS. Studies on Lactic Acid Bacteria Isolate Sr 13 From Bali Cattle Gastric. Journal of Veterinary and Animal Sciences. 2019; 2(1):31-8.
2. Barrons R, Tassone D. Use of *Lactobacillus* probiotics for bacterial genitourinary infections in women: a review. Clinical Therapeutics 2008; 30(3):453-68.
3. Seddik HA, Bendali F, Gancel F, Fliss I, Spano G, Drider D. *Lactobacillus plantarum* and its probiotic and food potentialities. Probiotics and Antimicrobial Proteins. 2017; 9(2):111-22.
4. Servin AL. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. FEMS Microbiology Reviews. 2004; 28(4):405-40.

5. Bischoff KM, Skinner-Nemec KA, Leathers TD. Antimicrobial susceptibility of Lactobacillus species isolated from commercial ethanol plants. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. 2007; 34(11):739-44.

6. Aguilar C, Vanegas C, Klotz B. Antagonistic effect of Lactobacillus strains against *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* in milk. Journal of Dairy Research. 2011; 78(2):136-43.

7. Mahdi L, Alkareem SA, Musafer H. Immunomodulatory and antagonistic effect of *Lactobacillus reuteri* and its purified characterized bacteriocin against *Salmonella enterica* and *Shigella flexneri.* Advances in Natural and Applied Sciences. 2016; 10(17):155-68.

8. Rodgers S, Peiris P, Casadei G. Inhibition of nonproteolytic *Clostridium botulinum* with lactic acid bacteria and their bacteriocins at refrigeration temperatures. Journal of Food Protection. 2003; 66(4):674-8.

9. Lazarenko L, Babenko L, Sichel LS, Pidgorskyi V, Mokrozub V, Voronkova O, Spivak M. Antagonistic action of *lactobacilli* and *bifidobacteria* in relation to *Staphylococcus aureus* and their influence on the immune response in cases of intravaginal staphylococcosis in mice. Probiotics and Antimicrobial Proteins. 2012; 4(2):78-89.

10. Garneau S, Martin NI, Vederas JC. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. Biochimie. 2002; 84(5-6):577-92.

11. Vesković-Moračanin SM, Đukić DA, Memiši NR. Bacteriocins produced by lactic acid bacteria: A review. Acta Periodica Technologica. 2014; 45:271-83.

12. Wang Y, Qin Y, Xie Q, Zhang Y, Hu J and Li P. Purification and characterization of plantaricin LPL-1, a novel class IIa bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPL-1 isolated from fermented fish. Frontiers in Microbiology. 2018; 9: 2276.

13. Bromberg R, Moreno I, Zaganini CL, Delboni RR and Oliveira JD. Isolation of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from meat and meat products and its spectrum of inhibitory activity. Brazilian Journal of Microbiology. 2004; 35(1-2):137-44.

14. Jawan R, Kasimin ME, Jalal SN, Faik AM, Abbasiliasi S and Ariff A. Isolation, characterisation and in vitro evaluation of bacteriocins-producing lactic acid bacteria from fermented products of Northern Borneo for their beneficial roles in food industry. In Journal of Physics: Conference Series. IOP Publishing. 2019; 1358(1): 012020.

15. Pei J, Jin W, Abd El-Aty AM, Baranenko DA, Gou X, Zhang H, Geng J, Jiang L, Chen D and Yue T. Isolation, purification, and structural identification of a new bacteriocin made by Lactobacillus plantarum found in conventional kombucha. Food Control. 2020; 110: 106923.

16. Farimani RH, Najafi MB, Bazzaz BS, Edalatian MR, Bahrami AR, Flórez AB, Mayo B. Identification, typing and functional characterization of dominant lactic acid bacteria strains from Iranian traditional yoghurt. European Food Research and Technology. 2016; 242(4):517-26.

17. Ogunbanwo ST, Sanni AI, Onilude AA. Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. African Journal of Biotechnology. 2003; 2(8):219-27.

18. Ghanbari M, Jami M, Kneifel W, Domig KJ. Antimicrobial activity and partial characterization of bacteriocins produced by lactobacilli isolated from Sturgeon fish. Food Control. 2013; 32(2):379-85.

19. Garcia-Gutierrez E, O'Connor PM, Colquhoun IJ, Vior NM, Rodríguez JM, Mayer MJ, Cotter PD, Narbad A. Production of multiple bacteriocins, including the novel bacteriocin gassericin M, by *Lactobacillus gasseri* LM19, a strain isolated from human milk. Applied Microbiology and Biotechnology. 2020; 13:1-6.

20. Zhao R, Lu Y, Ran J, Li G, Lei S, Zhu Y & Xu B. Purification and characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus rhamnosus* zrx01. Food Bioscience. 2020: 38: 100754.

21. Khalil R, Elbahloul Y, Djadouni F, Omar S. Isolation and Partial Characterization of a Bacteriocin Produced by a Newly Isolated *Bacillus megaterium* 19 Strain. Pakistan Journal of Nutrition. 2009; 8(3): 242-50.

22. Wang D, Liu W, Ren Y, De L, Zhang D, Yang Y, Bao Q, Zhang H, Menghe B. Isolation and identification of lactic acid bacteria from traditional dairy products in Baotou and Bayannur of Midwestern Inner Mongolia and q-PCR analysis of predominant species. Korean Journal for Food Science of Animal Resources. 2016; 36(4):499-507.

23. Amirbozorgi G, Samadlouie H, Shahidi A. Identification and Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from Iranian Traditional Dairy Products. International Biological and Biomedical Journal. 2016; 2(1):47-52.

24. Nacef M, Chevalier M, Chollet S, Drider D, Flahaut C. MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of lactic acid bacteria isolated from a French cheese: The Maroilles. International Journal of Food Microbiology. 2017; 17: 2-8.

25. Tabatabaie F and Roozbeh Nasiraii L. Isolation and identification of lactic acid bacteria in mother,s breast milk using 16S ribosomal DNA sequencing method. Journal of Food Research. 2011; 21(2): 167-78 [in Persian].

26. Du Plessis EM, Dicks LM. Evaluation of random amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR as a method to differentiate *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus gallinarum*, *Lactobacillus gasseri*, and *Lactobacillus johnsonii*. Current Microbiology. 1995; 31(2):114-8.

27. Faghfoori Z, Gargari BP, Saber A, Seyyedi M, Khosroushahi AY. The investigation of the diversity of *lactobacilli* spp. and assessment their some probiotic properties in traditional dairy products in East Azerbaijan province in Iran. Iranian Journal of Pharmaceutical Research. 2017; 6(4):1538-45.

28. Vasiee A, Mortazavi SA, Sankian M, Yazdi FT, Mahmoudi M, Shahidi F. Antagonistic activity of recombinant *Lactococcus lactis* NZ1330 on the adhesion properties of Escherichia coli causing urinary tract infection. Microbial Pathogenesis. 2019; 133:103547.

29. Vieco-Saiz N, Belguesmia Y, Raspoet R, Auclair E, Gancel F, Kempf I, Drider D. Benefits and inputs from lactic acid bacteria and their bacteriocins as alternatives to antibiotic growth promoters during food-animal production. Frontiers in Microbiology. 2019; 10:57.

30. Ruiz Martinez RC, Alvarenga VO, Thomazini M, Favaro-Trindade CS, Sant'Ana AD. Assessment of the inhibitory effect of free and encapsulated commercial nisin (Nisaplin (R)), tested alone and in combination, on Listeria monocytogenes and Bacillus cereus in refrigerated milk. LWT-Food Science and Technology. 2016; 68:67-75.

31. Chen CY, Chen SW, Wang HT. Effect of supplementation of yeast with bacteriocin and Lactobacillus culture on growth performance, cecal fermentation, microbiota composition, and blood characteristics in broiler chickens. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences. 2017; 30(2):211-20.

32. Todorov SD, de Paula OA, Camargo AC, Lopes DA, Nero LA. Combined effect of bacteriocin produced by Lactobacillus plantarum ST8SH and vancomycin, propolis or EDTA for controlling biofilm development by Listeria monocytogenes. Revista Argentina de Microbiologia. 2018: 50(1):48-55.

33. SiRui S, Feng W, PengHao Z, YuJia H, XiaoPiao F, Yu L, XiangChen M. Effect of luxS gene on growth and bacteriocin synthesis of Lactobacillus plantarum under NaCl stress. Shipin Kexue/Food Science. 2019; 40(14):69-76.

34. Wang G, Yu Y, Garcia-Gutierrez E, Jin X, He Y, Wang L, Tian P, Liu Z, Zhao J, Zhang H, Chen W. *Lactobacillus acidophilus* JCM 1132 strain and its mutant with different bacteriocin-producing behaviour have various in situ effects on the gut microbiota of healthy mice. Microorganisms. 2020; 8(1):49.

35. Khanafari A, Esmaeilzadeh M, Akhavan Sepahi A. Potential ability of probiotics isolated from Iranian local yogurts to produce lactacins. Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology. 2009; 4(1):67-78 [in Persian].

36. Lajis AF. Biomanufacturing process for the production of bacteriocins from Bacillaceae family. Bioresources and Bioprocessing. 2020; 7(1):1-26.

37. Khaledzade S, Hejazi MA. Partial purification and characterization of produced bacteriocins by two East-Azarbayjan native isolates of Lactobacillus plantarum. Food Science and Technology.2018; 15(83):399-407 [in Persian].

38. Mirdamadi, S., Tangestani, M. Screening and characterization of bacteriocins produced by some Strains of Lactobacillus spp isolated from Iranian Dairy products. Food Hygiene, 2011; 1(3): 55-69 [in Persian].

39. Abanoz HS, Kunduhoglu B. Antimicrobial Activity of a Bacteriocin Produced by Enterococcus faecalis KT11 against Some Pathogens and Antibiotic-Resistant Bacteria. Korean Journal for Food Science of Animal Resources. 2018; 38(5):1064.

Assessing Activity and Characteristics of the Bacteriocins Produced by *Lactobacilli* from Local Yogurts of Behbahan City

Alizadeh Behbahani B[1], Noshad M[2], Jooyandeh H[3]*

*1- *Corresponding author: Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.*

Email: B.alizadeh@asnrukh.ac.ir

2- Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran

3- Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran

Received 16 Jan, 2021 **Accepted 19 Apr, 2021**

Background and Objectives: *Lactobacillus* spp. are widely distributed in environment as well as dairy products. During the fermentation process, these microorganisms produce various compounds such as organic acids and bacteriocins with antimicrobial activities. The aims of this study were to isolate and identify lactobacilli from local yogurts of Behbahan, Iran, and assessment of antimicrobial activity of the bacteriocins produced by these lactobacilli.

Materials & Methods: In this study, the lactobacilli isolates were identified using 16S rRNA gene analysis. Antimicrobial effects of the bacteriocins were studied against five pathogenic bacteria using well diffusion and disk diffusion methods. Effects of proteolytic enzymes, heat and pH on these compounds were investigated as well.

Results: Results of the well diffusion and disk diffusion methods showed that the most inhibitory effects on *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus luteus* and *Listeria innocua* belonged to *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus buchneri* respectively. *Micrococcus luteus* was the most susceptible and *Pseudomonas aeruginosa* was the most resistant pathogens to effects of the bactericidal compounds. Antimicrobial compounds were inactivated by the proteolytic enzymes; however, the compounds preserved their resistance to heat and pH.

Conclusion: Bacteriocins produced by native lactobacilli are able to inhibit activity of various pathogenic microorganisms in foods and can be used as safe, harmless biological preservatives.

Keywords: *Lactobacillus*, Traditional dairy products, Bacteriocin, Antimicrobial activity