مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال بیستم، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۴، صفحات ۱۰۷-۹۵

ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی و ضدبیوفیلم پست‌بیوتیک *Lactiplantibacillus plantarum* SPS1 بر *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 و اثر آن بر سلول‌های سرطانی HT-29 و HeLa

بهروز علیزاده بهبهانی[۱]، محمد حجتی[۲]، بهاره گودرزی شمس آبادی[۳]

۱- نویسنده مسئول: دانشیار، 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- استاد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

۳- دانشجوی دکتری، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۰/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۲/۵

چکیده

سابقه و هدف: *Listeria monocytogenes* باکتری گرم مثبت با توانایی تولید بیوفیلم و عامل لیستریوز، با نرخ مرگ و میر بالا در میان عوامل بیماری‌زای غذایی است. هدف از این مطالعه ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی و ضدبیوفیلم سوپرناتانت بدون سلول (CFS)، *Lactiplantibacillus plantarum* SPS1 بر *L. monocytogenes* ATCC 19115 و اثر آن بر سلول‌های سرطانی HT-29 و HeLa بود.

مواد و روش‌ها: فعالیت ضدمیکروبی سویه با استفاده از روش حداقل غلظت بازدارنده رشد، چاهک آگار و دیسک دیفیوژن آگار در مقابل ۶ باکتری بیماری‌زای غذازاد (*Bacillus cereus*، *Escherichia coli*، *Staphylococcus aureus*، *L. monocytogenes*، *Salmonella enterica serovar Typhimurium* و *Shigella dysenteriae*) بررسی شد. ارزیابی سمیت سلولی با آزمون MTT و ارزیابی توانایی ضد بیوفیلم با آزمون کریستال ویولت، میکروسکوپ الکترونی روبشی و میکروسکوپ کونفوکال انجام شد.

یافته‌ها: حداقل غلظت بازدارندگی رشد، ۶۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در برابر *L. monocytogenes* و سمیت سلولی متابولیت‌های ترشح شده توسط سویه بر سلولی سرطانی HT-29 و HeLa به ترتیب ۴۷/۶۱ و ۴۰/۴۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. بیشترین قطر هاله عدم رشد CFS سویه در روش چاهک آگار و دیسک دیفیوژن آگار روی *L. monocytogenes* مشاهده شد. CFS حاصل از سویه، تشکیل بیوفیلم‌ها را (۴MIC تا ۱/۴ MIC با سطوح ۱۸/۷۰٪ تا ۷۲/۴۸٪) مهار کرده و تیمار با CFS منجر به از بین رفتن بیوفیلم‌های بالغ *L. monocytogenes* شد. نتایج حاصل از میکروسکوپ الکترونی روبشی و میکروسکوپ کونفوکال اثرات ضد میکروبی سویه را تأیید کرد.

نتیجه‌گیری: پست‌بیوتیک *Lpb. plantarum* SPS1 می‌تواند به‌عنوان عامل ضدمیکروبی و مهارکننده‌ی بیوفیلم *L. monocytogenes* جهت کاهش خطرات آلودگی غذایی در زنجیره غذایی مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: *Listeria monocytogenes*، پست‌بیوتیک، ضدمیکروبی، بیوفیلم

پیام‌های اصلی

- فعالیت ضدباکتری و ضد بیوفیلم پست‌بیوتیک *Lactiplantibacillus plantarum* SPS1 در برابر *Listeria monocytogenes* تعیین گردید.
- سوپرناتانت بدون سلول سویه، اثر مهاری بر تشکیل بیوفیلم و تجزیه بیوفیلم‌های بالغ داشت.
- خواص ضدمیکروبی سویه توسط میکروسکوپ الکترونی و میکروسکوپ کونفوکال تایید گردید.
- پست‌بیوتیک *Lpb. plantarum* SPS1 پتانسیل قابل‌توجهی به‌عنوان مهارکننده‌ی بیوفیلم *L. monocytogenes* برای کاهش خطرات آلودگی غذایی در زنجیره غذایی دارد.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-01-29]

[DOI: 10.61882/nsft.20.3.95]

• مقدمه

مهار رشد میکروب‌های بیماری‌زا رویکرد اصلی برای حفظ ایمنی مواد غذایی و کنترل چنین بیماری‌هایی از طریق غذا است. در دهه‌های اخیر، روش‌های مختلفی هم‌چون استفاده از عوامل فعال زیستی مشتق شده از پروبیوتیک‌ها برای جلوگیری از رشد میکروب‌های بیماری‌زا و متعاقبا افزایش ماندگاری موادغذایی به‌ویژه در کشورهای در حال توسعه به عنوان استراتژی‌های جدید در نظر گرفته می‌شوند (۱). از جمله عوامل فعال زیستی با منبع میکروبی می‌توان به ترکیب‌های پست‌بیوتیک اشاره نمود. پست‌بیوتیک‌ها محصول‌های جانبی میکروارگانیسم‌های مفید هستند که اغلب توسط باکتری‌های لاکتیک اسید تولید می‌شوند و شامل ترکیب‌های مختلف درون‌سلولی و برون‌سلولی از جمله ویتامین‌ها، پروتئین‌های ضدمیکروبی، پپتیدهای بیواکتیو و بیوسرفکتانت‌های باکتریایی هستند (۲). برخلاف پروبیوتیک‌ها که در آن زنده‌مانی عامل مهمی در ایجاد مزایای بهداشتی است، پست‌بیوتیک‌های غیر زنده می‌توانند به دلیل حضور اجزای سلولی و متابولیت‌های مهم همچنان تأثیر مثبتی بر سلامت داشته باشند (۳). در مقایسه با سلول‌های باکتریایی زنده، پست‌بیوتیک‌ها مزایای ارزشمندی از جمله طول عمر بیشتر، ایمنی ساختاری، عدم انتقال مقاومت آنتی‌بیوتیکی، عدم تولید آمین بیوژنیک (BA) و فعالیت ضدمیکروبی گسترده علیه باکتری‌ها و قارچ‌ها دارند. یکی دیگر از ویژگی‌های قابل توجه پست‌بیوتیک‌ها، خواص ضدبیوفیلم آن‌ها علیه باکتری‌های بیماری‌زا است که می‌تواند تأثیرهای مهمی برای صنعت غذا داشته باشد (۴). بیوفیلم‌ها معمولاً از گروه‌های پیچیده‌ای از میکروارگانیسم‌های زنده تشکیل شده‌اند که به یک لایه متصل شده و توسط ماتریکس خارج سلولی خودتولید که شامل پلی‌ساکاریدها، DNA خارج سلولی و پروتئین‌ها است، احاطه شده‌اند. بنابراین، مشکل بیوفیلم‌ها وضعیت مقاومت عوامل ضد میکروبی را پیچیده‌تر می‌کند. به خوبی اثبات شده است که درصد زیادی از عفونت‌های انسانی شامل بیوفیلم‌ها می‌باشند. باکتری‌هایی که بیوفیلم تشکیل می‌دهند نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها بسیار مقاوم‌تر هستند. پاتوژن‌های شناخته‌شده شامل پروتوزوا، باکتری‌ها، ویروس‌ها، قارچ‌ها و سیانوباکتری‌های بیماری‌زا در تشکیل بیوفیلم‌ها نقش مهمی دارند. بیوفیلم‌ها توانایی به دام انداختن ذره‌های مختلف، شامل مواد معدنی متنوع و اجزای سیستم میزبان مانند پلاکت‌ها، فیبرین و گلبول‌های قرمز را نشان داده‌اند. بیوفیلم‌ها از سلول‌های بسیاری از میکروب‌ها تشکیل شده و به سطوحی مانند تجهیزات پزشکی، سیستم‌های لوله‌کشی آب و بافت‌های بیولوژیکی متصل می‌شوند (۵). مطالعه‌های متعدد به طور مداوم تأثیرهای ضدمیکروبی پست‌بیوتیک‌های مختلف علیه پاتوژن‌های غذایی مانند *Listeria monocytogenes* و *Escherichia coli* را نشان داده‌اند (۴).

L. monocytogenes باکتری گرم مثبت با توانایی تولید بیوفیلم و عامل لیستریوز، با نرخ مرگ و میر بالا در افراد آسیب‌پذیر بوده که بالاترین نرخ مشاهده شده در میان عوامل بیماری‌زای غذایی را دارد. این باکتری توانایی بقا در شرایط محیطی سخت، از جمله دماهای بالا (۱-۴۵ درجه سانتی‌گراد) و گستره وسیعی از pH (۴/۳ -۹/۸) را با تشکیل بیوفیلم دارد و چالشی بزرگ برای صنعت غذا محسوب می‌شود (۶). برای از بین بردن بیوفیلم‌های تشکیل شده توسط *L. monocytogenes* به طور موثر، می‌توان از استراتژی‌ها و مداخلات مختلفی مانند استفاده از مواد ضدعفونی‌کننده شیمیایی، حذف مکانیکی، عوامل مختل‌کننده بیوفیلم، درمان با حرارت استفاده کرد. با این حال، استفاده از روش‌های ایمن، مانند ترکیب‌های ضدمیکروبی طبیعی تولید شده توسط باکتری‌های اسید لاکتیک (LAB)، یک روش جذاب است که توجه محققان و مصرف‌کنندگان را به خود جلب کرده است (۷). *Lactiplantibacillus plantarum* به عنوان یک گونه برجسته و بسیار متنوع در جنس لاکتوباسیلوس شناخته شده است که دارای بزرگترین ژنوم در میان همتایان خود است و به دلیل خواص پروبیوتیکی خود، مانند اثرهای ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی و همچنین توانایی مقاومت در شرایط سخت و چسبیدن به دستگاه گوارش، به‌طور گسترده‌ای به عنوان پروبیوتیک استفاده می‌شود. علاوه بر این، به عنوان یک راه حل مؤثر برای مقابله با عوامل بیماری‌زا، آمین‌های بیوژنیک، سموم قارچی و بیوفیلم‌ها محسوب می‌شود (۸). در مطالعه‌های مختلف تولید متابولیت‌های پست‌بیوتیک مانند اسید لاکتیک، اسید استیک و باکتریوسین توسط سویه‌های مختلف *Lpb. plantarum* تایید شده است (۱۰، ۹). علاوه بر این پژوهشگران گزارش داده‌اند که *Lpb. plantarum* I-UL4 دارای ترکیب جدیدی از دو ژن باکتریوسین، یعنی پلانتاریسین W و پلانتاریسین EF است که فعالیت مهار گسترده‌ای در برابر باکتری‌های بیماری‌زای گرم مثبت و گرم منفی دارد (۱۲، ۱۱). هدف از این مطالعه بررسی فعالیت ضدمیکروبی سوپرناتانت

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-01-29]
[DOI: 10.61882/nsft.20.3.95]

بدون سلول (cell-free supernatant: CFS)، *Lpb. plantarum* SPS1 در مقابل ۶ باکتری بیماری‌زای غذازاد (*Bacillus cereus*، *Escherichia coli*، *Staphylococcus aureus*، *Listeria monocytogenes*، *Salmonella enterica serovar Typhimurium* و *Shigella dysenteriae*) و فعالیت ضدبیوفیلم پست‌بیوتیک *Lpb. plantarum* SPS1 علیه *L. monocytogenes* ATCC 19115 بود. علاوه بر این، اثر آن بر سلول‌های سرطانی HT-29 و HeLa مورد بررسی قرار گرفت.

• مواد و روش‌ها

مواد و سویه‌های میکروبی

مطالعه حاضر در سال ۱۴۰۲، در آزمایشگاه میکروبیولوژی مواد غذایی، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان انجام شد. محیط کشت‌های De Man-Rogosa-Sharpe (MRS) broth، Soy Broth Tryptic، Mueller Hinton agar از شرکت مرک تهیه شد. سویه پاتوژن *L. monocytogenes* ATCC 19115 و سویه پروبیوتیک *Lpb. plantarum* SPS1 از مرکز جمع‌آوری کلکسیون میکروبی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان تهیه گردید.

تهیه پست‌بیوتیک و خشک‌کردن انجمادی

به منظور تهیه پودر پست‌بیوتیک از سویه *Lpb.plantarum* SPS1، سویه در محیط کشت مایع MRS رشد داده شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار گرفت. سپس سوسپانسیون‌های باکتریایی به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت g× ۴۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. سوپرناتانت به دست آمده جمع‌آوری شده و توسط خشک کن انجمادی (دمای انجماد: ۴۰- درجه سانتی‌گراد، فشار پمپ: ۱۰۰میلی‌تور و دمای سینی: ۶۰- درجه سانتی‌گراد) خشک شد و به عنوان CFS (ماده حاوی پست‌بیوتیک)، در آزمایش‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفت. سویه پاتوژن نیز در محیط کشت تریپتیک سوی براث (TSB) به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد (۶).

تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد (Minimum inhibitory concentration (MIC))

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی رشد، مطابق با مطالعه روحی و همکاران (۲۰۲۴)، انجام شد. به این منظور محلولی حاوی پست‌بیوتیک باکتری اسید لاکتیک به صورت لیوفیلیزه شده در آب دیونیزه استریل با غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر (w/v) تهیه شد. سپس، از روش استاندارد رقیق‌سازی میکرو برای تعیین MIC از سوپرناتانت فاقد سلول باکتریایی *Lpb. plantarum* SPS1 در برابر *L. monocytogenes* استفاده گردید. کشت شبانه پاتوژن در TSB رقیق شد تا به غلظت 10^6 colony forming unit (CFU)/mL برسد. در یک پلیت میکروتیتر ۹۶ خانه‌ای از جنس پلی‌استایرن، هر چاهک با ۱۰۰ میکرولیتر از کشت رقیق‌شده پاتوژن و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول‌های رقیق‌شده پست‌بیوتیک درمحیط کشت TSB پر شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار گرفتند. پس از این مدت، حدود ۳ میکرولیتر از محلول تترازولیوم (۰/۵٪) به هر چاهک اضافه شده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. MIC، به عنوان کمترین غلظت پست‌بیوتیک که به طور مؤثر رشد قابل مشاهده میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا را مهار می‌کند، شناسایی شد. تمامی آزمون‌ها این مطالعه با سه بار تکرار انجام شد. محیط کشت TSB استریل به عنوان کنترل منفی و محیط TSBکشت حاوی *L. monocytogenes* (بدون پست‌بیوتیک)، به عنوان کنترل مثبت برای ارزیابی رشد استفاده شد. تمام کنترل‌ها تحت شرایط انکوباسیون مشابه نمونه‌ها قرار گرفتند (۶).

تعیین سمیت سلولی بالقوه ترکیبات پست‌بیوتیک

به منظور بررسی اثر سایتوتوکسیک پست بیوتیک *Lpb. plantarum* SPS1 بر رده های سلول های سرطانی کلون روده HT-29 و HeLa از آزمونMTT مطابق با مطالعه روحی و همکاران (۲۰۲۴)، استفاده شد. ابتدا سلول‌های سرطانی در پلیت‌های ۹۶-خانه‌ای با تراکم 10^3× ۳ سلول در هر خانه کشت داده شدند. پلیت‌ها حاوی محیط کشت Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS) و ۰/۱٪ آنتی‌بیوتیک (پنی‌سیلین و استرپتومایسین)، بودند. پس از ۴۸ ساعت، سلول‌ها با غلظت‌های مختلف CFS (۰-۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، به چاهک‌ها اضافه شدند. پس از طی مدت زمان ۲۴ ساعت، ۱۰۰ میکرولیتر محلول MTT (۴و۵ دی متیل تیازول ۲ وای ال ۲و۵ دی فنیل تترا زولیوم بروماید)، به هر خانه اضافه شد و به مدت ۴ ساعت انکوبه شد. سپس سوپرناتانت حذف شد و DMSO (دی متیل سولفوکساید)، اضافه گردید. جذب نوری در ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل به صورت درصد زیستایی و IC_{50} گزارش شدند. آزمایش‌ها با سه بار تکرار انجام شد (۶).

ارزیابی فعالیت ضدباکتری سویه *Lpb. plantarum* SPS1

جهت بررسی فعالیت ضدمیکروبی از دو روش نفوذ در چاهک و دیسک دیفیوژن آگار استفاده شد. در این مطالعه ظرفیت ضدباکتری سویه در مقابل ۶ باکتری بیماری‌زای غذازاد (*B. cereus*، *E. coli*، *S. aureus*، *L. monocytogenes*، *S.*

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-01-29]

[DOI: 10.61882/nsft.20.3.95]

Typhimurium و *S. dysenteriae*) بررسی شد. در ارزیابی پتانسیل ضدمیکروبی سویه *Lpb. plantarum* SPS1 از روش ذکر شده در مطالعه علیزاده بهبهانی و همکاران (۲۰۲۳)، استفاده شد. سویه با استفاده از محیط کشت MRS مایع (۲۸ ساعت، ۳۷ درجه سانتی‌گراد) کشت داده شد، سپس با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. برای خنثی‌سازی تاثیر اسیدی اسیدهای آلی، pH نیمی از سوپرناتانت بدون سلول (CFS) به حال خود باقی ماند، در حالی که pH نیمه دیگر به ۵/۵ تغییر یافت. روماند حاصل برای اطمینان از حذف کامل سلول‌های باکتریایی از فیلتر سرنگی با قطر ۰/۲۲ میکرومتر عبور داده شد. پس از ایجاد چاهک‌هایی با قطر ۶ میلی‌متر در سطح پلیت‌های ۸ سانتی‌متری حاوی ۲۰ میلی‌لیتر از محیط کشت MHA، میزان ۱۰۰ میکرولیتر از سویه میکروبی استاندارد به وسیله میله‌ی ال شکل به طور کامل و دقیق پخش گردید و میزان ۲۰ میکرولیتر روماند سویه به چاهک‌ها تزریق گردید. یک عدد چاهک در وسط پلیت فاقد روماند سویه نیز به عنوان کنترل در نظر گرفته شد.

جهت ارزیابی خواص ضدمیکروبی سویه در برابر باکتری‌های بیماری‌زای ذکر شده به روش دیسک دیفیوژن آگار، جمعیت شاخص‌های باکتریایی با روش جذب‌خوانی به معادل استاندارد نیم مک فارلند تنظیم گردید. از سوسپانسیون میکروبی هر سویه بیماری‌زای استاندارد به میزان ۱۰۰ میکرولیتر بر سطح محیط کشت MHA توسط سمپلر ریخته و با میله‌ی ال شکل استریل به طور کامل پخش گردید. ۲۰ میکرولیتر از روماند حاصل از سویه به دیسک‌های کاغذی استریل با قطر ۶ میلی‌متر به آرامی اضافه شد. دیسک‌های کاغذی در پلیت‌های ۸ سانتی‌متری در ۴ طرف به فواصل منظم و دقیق قرار گرفته شده به نحوی که از لبه‌ها و از یکدیگر دارای فاصله مناسب جهت جلوگیری از تداخل هاله ضدمیکروبی بود. یک دیسک کاغذی بلانک فاقد روماند سویه نیز به عنوان نمونه کنترل در مرکز پلیت قرار گرفته شد. نهایتاً پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. نواحی بازدارنده در اطراف دیسک‌ها و چاهک‌ها پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری و گزارش شد (۱۳).

ارزیابی فعالیت ضدبیوفیلم پست‌بیوتیک *Lpb. plantarum* SPS1

ارزیابی توانایی سویه در مهار و تخریب بیوفیلم *L. monocytogene*، با استفاده از آزمون کریستال ویولت انجام شد. جهت بررسی اثر مهاری سوپرناتانت بدون سلول(CFS)، بر مراحل اولیه تشکیل بیوفیلم *L. monocytogenes*، CFS به صورت متوالی و دو برابر رقیق شده تا غلظت‌های۱۰۰٪ تا ۰/۷۸٪ به دست‌آید. کشت‌های باکتری نیز تا غلظت 10^6 CFU/mL رقیق شدند. ۵۰ میکرولیتر از CFS رقیق‌شده و حجم مساوی از کشت باکتری به هر چاهک از یک صفحه ۹۶ چاهکی اضافه و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. برای هر سویه، گروه کنترل با استفاده از محیط کشت TSBبه جای CFS بارگذاری شد. پس از انکوباسیون، سوسپانسیون سلولی حذف و هر چاهک دو بار با ۱۵۰ میکرولیتر آب مقطر شسته شد. صفحه‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کاملاً خشک شدند، سپس ۱۰۰ میکرولیتر محلول کریستال ویولت ۱٪ (در ۳۰٪ متانول (v/v) و ۱۰٪ اسید استیک (v/v)، به هر چاهک اضافه شد و سلول‌های بیوفیلم متصل به مدت ۳۰ دقیقه با تکان دادن به صورت ملایم رنگ‌آمیزی شدند. پس از ۳۰ دقیقه، محلول رنگ‌آمیزی با استفاده از میکروپیپت حذف و چاهک‌ها به آرامی با آب سرد و سپس با آب مقطر شسته شدند. در نهایت، ۱۰۰ میکرولیتر محلول کریستال ویولت به هر چاهک اضافه شد و جذب نوری در ۵۷۰ نانومتر با استفاده از میکروپلیت‌ریدر (Molecular Devices, San Jose, CA, USA)، اندازه‌گیری شد. برای تعیین تأثیر تخریبی CFS بر بیوفیلم‌های بالغ، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری 10^6CFU/mL به یک صفحه میکروتیتر پلی‌استایرن ۹۶ خانه‌ای اضافه شد. پس از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، سوسپانسیون سلولی حذف و ۱۰۰ میکرولیتر از CFS که به صورت متوالی و دوبرابر رقیق شده بودند (از ۱۰۰٪ تا ۰/۷۸٪)، به هر خانه اضافه شد. برای هر سویه، گروه کنترل با محیط کشت TSB به جای CFS بارگذاری شد. صفحه‌ها به مدت ۲۴ ساعت دیگر در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس صفحه‌ها دو بار شسته شدند و بیوفیلم‌های باقی‌مانده با روش‌های قبلی اندازه‌گیری شدند. در نهایت نرخ تشکیل بیوفیلم با استفاده از معادله زیر محاسبه شد (۱۴).

نرخ تشکیل بیوفیلم= (جذب نوری کنترل/ جذب نوری نمونه)×۱۰۰

میکروسکوپ الکترونی روبشی (Scanning electron microscope (SEM))

بررسی تاثیر مورفولوژیکی CFS بر دیواره سلولی *L. monocytogenes* با استفاده از SEM انجام شد. به این منظور ۳ میلی‌لیتر از سلول‌های *L. monocytogenes* در فاز رشد لگاریتمی (10^6 CFU/ml) به حجم مساوی از CFS با غلظت ۲MIC در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-01-29]

[DOI: 10.61882/nsft.20.3.95]

گرفتند. سلول‌های تیمار نشده به عنوان کنترل در نظر گرفته شدند. سپس سوسپانسیون باکتریایی سانتریفیوژ شده تا باکتری‌های رسوب کرده جمع‌آوری شوند. سلول‌های جمع‌آوری شده *L. monocytogenes* دو بار با محلول بافر فسفات pH ۴/۷، شستشو داده شدند و سپس در ۴ میلی‌لیتر بافر گلوتارآلدئید ۲/۵٪ به مدت یک شب تثبیت شدند. در مرحله بعد، هر کدام از سلول‌ها به ترتیب با استفاده از محلول‌های اتانول (۲۰٪، ۵۰٪، ۸۰٪ و ۱۰۰٪)، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، دهیدراته شده و قبل از بررسی با میکروسکوپ الکترونی روبشی (مدل Zeiss (LEO) 1450 VP ، آلمان)، با طلا پوشش داده شدند (۶).

میکروسکوپ کونفوکال (Confocal laser scanning microscopy (CLSM))

در این مطالعه از روش جلیل سرقلعه و همکاران (۲۰۲۳)، برای ارزیابی تأثیر CFS بر ایجاد بیوفیلم *L. monocytogenes* استفاده شد. برای این آزمون، بیوفیلم با استفاده از پلیت‌های شش‌خانه‌ای کف‌صاف پیش‌استریل (Iwaki) و پوشش‌های پلاستیکی پیش‌استریل (Thermanox plastic coverslips; Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA) آماده شد. سوسپانسیون *L. monocytogenes* به اولین پلیت اضافه شد.کوپن‌های (coupons)، پیش‌استریل شده (استیل ضد زنگ، قطر ۱۲,۷ میلی‌متر)، در چاهک‌های سه پلیت شش‌خانه‌ای مختلف قرار داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در یک شیکر اوربیتالی (۷۵ دور در دقیقه)، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. کوپن‌های پیش‌شسته با لکه‌های زنده و مرده رنگ‌آمیزی و بررسی شدند (۱۵).

• یافته‌ها

تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد (Minimum inhibitory concentration (MIC))

مقدار حداقل غلظت مهارکنندگی پست‌بیوتیک *Lpb. plantarum* SPS1 برابر *L. monocytogenes*، ۶۲/۵ گرم بر میلی‌لیتر بود.

تعیین سمیت سلولی بالقوه ترکیبات پست‌بیوتیک

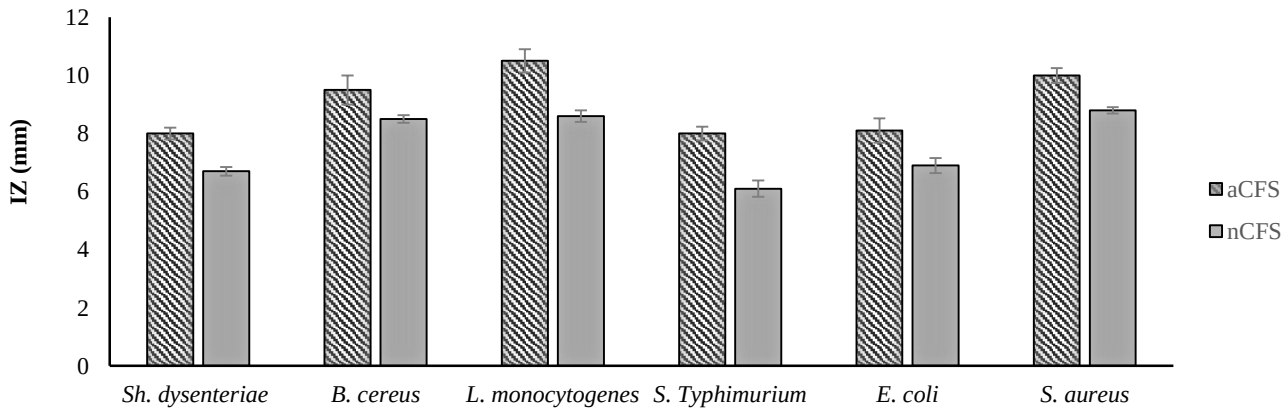
این مطالعه با بررسی متابولیت‌های ترشح شده توسط *Lpb. plantarum* SPS1 بر روی خطوط سلولی سرطانیHT-29 و HeLa به منظور تعیین توانایی آنها در مهار رشد با استفاده از آزمون MTT انجام شد (جدول ۱).

ارزیابی فعالیت ضدباکتری سویه *Lpb. plantarum* SPS1

اثر ضدمیکروبی *Lpb. plantarum* SPS1 اسیدی و غیراسیدی بر سویه‌های پاتوژن به روش انتشار در آگار به کمک دیسک و چاهک در شکل‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است. در هر دو روش بیشترین اثر بازدارندگی روی *L. monocytogenes* بود. کمترین میزان بازدارندگی در روش دیسک دیفیوژن آگار بر پاتوژن‌های *S. Typhimurium* و *S. dysenteriae* و در روش چاهک آگار بر*S. Typhimurium* و *E. coli* تعیین گردید.

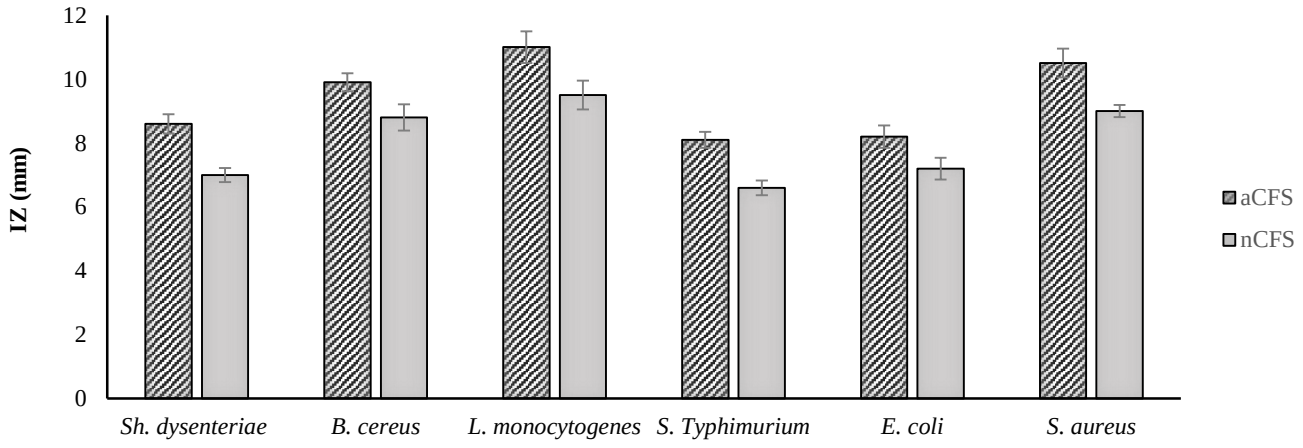
جدول ۱. آزمون سمیت سلولی سوپرناتانت بدون سلول *Lactiplantibacillus plantarum* SPS1 بر اساس آزمون رنگ‌سنجی MTT

	HT-29	HeLa
IC_{50}	47.61 ± 1.27 (mg/mL)	40.48 ± 1.23 (mg/mL)



شکل ۱. پتانسیل ضد میکروبی *Lactiplantibacillus plantarum* SPS1 با استفاده از روش دیسک دیفیوژن آگار.
aCFS و nCFS به ترتیب به معنی سوپرناتانت‌های بدون سلول اسیدی و سوپرناتانت‌های بدون سلول خنثی‌شده هستند.

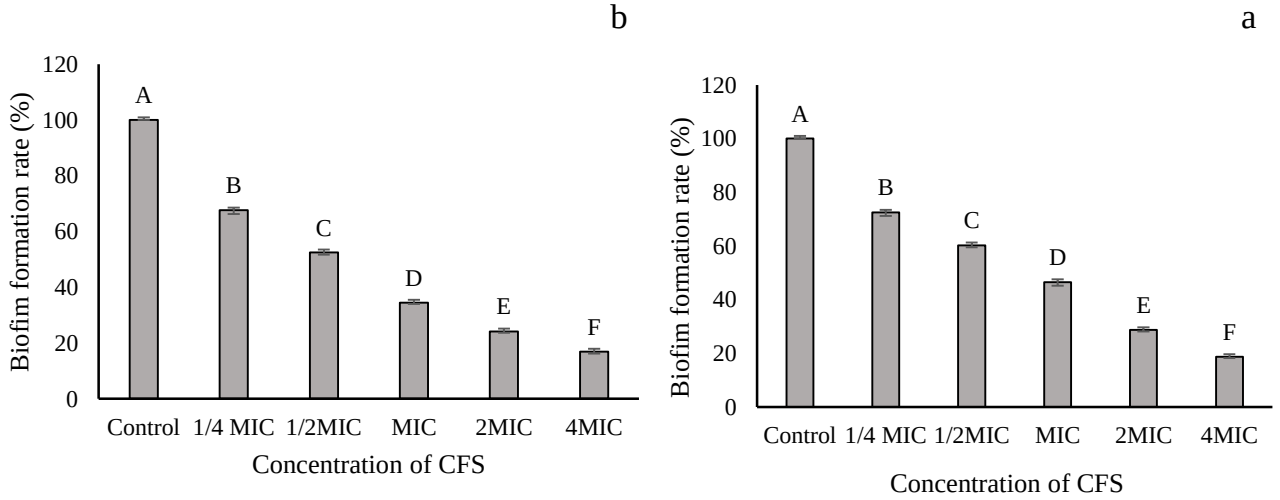
[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-01-29]
[DOI: 10.61882/nsft.20.3.95]



شکل ۲. پتانسیل ضدمیکروبی *Lactiplantibacillus plantarum* SPS1 با استفاده از روش چاهک آگار.
aCFS و nCFS به ترتیب به معنی سوپرناتانت‌های بدون سلول اسیدی و سوپرناتانت‌های بدون سلول خنثی‌شده هستند.

ارزیابی فعالیت ضدبیوفیلم پست‌بیوتیک *Lpb. plantarum SPS1*

توانایی مهار تشکیل بیوفیلم‌های *L.monocytogenes* توسط CFS، *Lpb.plantarum* SPS1 در شکل (A)۳ نشان داده شده است که حاکی از تأثیر مهارکنندگی بالقوه سویه، طی مرحله اولیه توسعه بیوفیلم پاتوژن است. CFS حاصل از سویه، به طور قابل توجهی تشکیل بیوفیلم‌ها را توسط *L. monocytogenes* در غلظت‌های ۴MIC تا ۱/۴ MIC با سطح مهار از ۱۸/۷۰٪ تا ۷۲/۴۸٪ مهار می‌کند. بنابراین، CFS مشتق شده از *Lpb. plantarum* SPS1، توانایی جلوگیری از تشکیل بیوفیلم‌ها را در تمام زیر غلظت‌ها نشان می‌دهد. فعالیت تجزیه بیوفیلم سوپرناتانت بدون سلول *Lpb. plantarum* SPS1 بر بیوفیلم‌های بالغ *L. monocytogenes*، در شکل (B)۳ نشان داده شده است. تیمار با CFS منجر به از بین رفتن قابل توجه بیوفیلم‌های بالغ *L. monocytogenes* شد. شکل (B)۳، به وضوح نشان می‌دهد که با کاهش غلظت عامل ضدمیکروبی، میزان مهار و تخریب بیوفیلم نیز کاهش می‌یابد.



شکل ۳. نرخ تشکیل بیوفیلم (**a**) و فعالیت تجزیه بیوفیلم (**b**) *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 تیمارشده با سوپرناتانت بدون سلول *Lactiplantibacillus plantarum* SPS1 (CFS).
حروف مختلف نشان‌دهنده تفاوت‌های معنادار بین نمونه‌ها است.

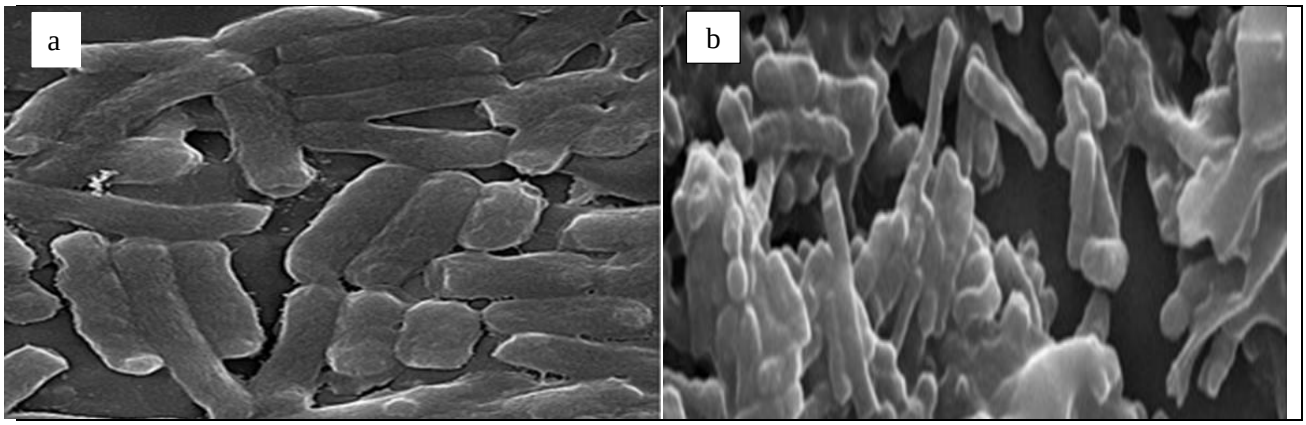
[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-01-29]
[DOI: 10.61882/nsft.20.3.95]

میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

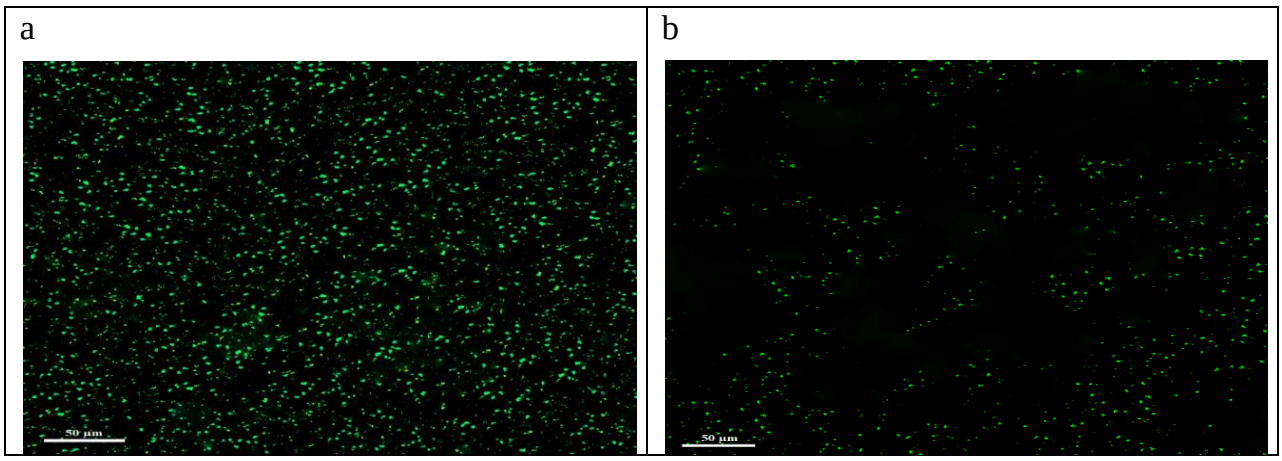
یافته‌های میکروسکوپی الکترونی، تغییرات قابل‌توجهی در ساختار سلولی *L. monocytogenes* پس ازتیمار با CFS، نسبت به سلول‌های بدون تیمار نشان داد. تحلیل‌ها نشان داد که سلول‌های بدون تیمار ساختار طبیعی و سالمی با سطح صاف و خطوط اصلی مشخص داشتند (شکل ۴a). در مقایسه با گروه کنترل، سلول‌های *L. monocytogenes* که تحت تیمار با CFS قرار گرفته بودند، تغییرات قابل‌توجهی مانند چین‌خوردگی‌ها و ظهور چندین شکاف در ساختار سلولی خود را نشان دادند (شکل ۴b). به‌دنبال این تغییرات، مواد درون‌سلولی باکتری از سلول‌های آسیب‌دیده نشت کرده و در نهایت منجر به مرگ سلول‌ها شد. بنابراین، CFS به‌طور مؤثرپتانسیل ایجاد آسیب در ساختار سلول‌های *L. monocytogenes* داشته است و به نظر می‌رسد دیواره سلولی و غشای باکتری‌های پاتوژن را هدف قرار می‌دهد.

میکروسکوپ کونفوکال (CLSM)

تصاویر میکروسکوپ کانفوکال (CLSM)، در شکل ۵، نمایش داده شده‌اند. در تهیه این تصاویر از رنگ سبز برای رنگ‌آمیزی سلول‌های زنده استفاده می‌شود. در نمونه کنترل که تحت تیمار با سوپرناتانت بدون سلول *Lpb. plantarum* SPS1 قرار نگرفته است (شکل ۵a)، سلول‌های زنده متراکم و به‌هم پیوسته (به رنگ سبز) مشاهده شد. در مقابل در نمونه تیمارشده، تعداد نقاط سبز کاهش یافته است (شکل ۵b). این تصاویر کاهش چشمگیر زنده‌مانی سلول‌های زنده و اثر ضدمیکروبی سویه را نشان می‌دهند. عوامل مختلفی مانند سروتیپ سویه، شرایط انکوباسیون و ترکیب محیط بر تشکیل بیوفیلم *L. monocytogenes* تأثیر می‌گذارند.



شکل ۴. تصاویر میکروسکوپ الکترونی(SEM) از سلول‌های *Listeria. monocytogenes* ATCC 19115 بدون تیمار(a)؛ تیمارشده با غلظت ۲MIC با سوپرناتانت بدون سلول *Lactiplantibacillus plantarum* SPS1 (b).



شکل ۵. تصاویر میکروسکوپ لیزر کنفوکال (CLSM)، *Listeria. monocytogenes* در وضعیت کنترل (a) و *Listeria. monocytogenes* تیمار شده با سوپرناتانت بدون سلول *Lactiplantibacillus plantarum* SPS1 (b).

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-01-29]

[DOI: 10.61882/nsft.20.3.95]

• بحث

L. monocytogenes می‌تواند با غلبه بر شرایط نامناسب محیط از جمله اسیدیته، اکسیژن کم و اثر ضدمیکروبی نمک‌ها و پپتیدهای صفراوی، خود را با شرایط دستگاه گوارش سازگار کند. بررسی‌ها نشان داده است که *L. monocytogenes* می‌تواند باعث عفونت مزمن شود و توانایی منحصر به فردی برای زنده ماندن در دستگاه گوارش دارد (۱۶). لاکتوباسیل‌ها می‌توانند طیفی از ترکیبات مهار کننده رشد (باکتریوسین‌ها، اسیدهای آلی، H_2O_2)، را که عمدتاً علیه پاتوژن‌های گرم مثبت فعال هستند تولید کنند. تخمیر متابولیک کربوهیدرات‌ها توسط پروبیوتیک‌ها به آن‌ها این امکان را می‌دهد که اسیدهای آلی، از جمله اسید پروپیونیک و اسید استیک، تولید کنند. حضور این اسیدهای آلی منجر به تشکیل یک محیط اسیدی می‌شود که سرعت رشد *L. monocytogenes* را کاهش می‌دهد (۱۷). اسیدهای آلی با کاهش مقدار pH ، که به طور منفی بر رشد و بقای باکتری‌ها، قارچ‌ها و مخمرها تأثیر می‌گذارد، در کنترل میکروارگانیسم‌ها نقش مهمی ایفا می‌کند (۱۸). روحی و همکاران (۲۰۲۴)، میزان حداقل غلظت مهار کنندگی را در برابر *L. monocytogenes* برای *Lpb. plantarum* TW57-4، ۳۱/۲۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، بیان کردند (۶). حسین و همکاران (۲۰۲۱)، گزارش دادند که *Lpb. plantarum* M.2 توانایی تولید ترکیبات مختلفی مانند باکتریوسین‌ها، اسیدهای آلی و هیدروژن پراکسید را دارد که اثرات مهاری مشخصی علیه *L. monocytogenes* نشان داده‌اند (۱۹). در مطالعه میرنژاد و همکاران (۲۰۱۳)، در میان CFS های مختلف مورد بررسی، *Lactobacillus. casei* 431 کمترین فعالیت ضد لیستریایی را نشان داد که نشان دهنده فعالیت ضعیف ضد باکتریایی است که به حضور اسیدهای آلی در CFS مربوط می‌شود و باکتریوسین‌ها در آن دخالت نداشتند (۲۰).

مطالعه‌ها نشان داده است که پروبیوتیک‌ها با تأثیر بر آنزیم‌های گوارشی حیوان‌ها و انسان‌ها، مهار عوامل سرطان‌زا در داخل بدن و شرایط آزمایشگاهی، سرکوب موتاسیون‌ها، ترکیب‌های القاکننده سرطان و تومورها در حیوان‌های آزمایشگاهی نقش مؤثری در جهت مقابله با سرطان ایفا می‌کنند (۲۱). اثر ضدسرطانی پروبیوتیک‌ها از طریق جلوگیری از تبدیل پروکارسینوژن به کارسینوژن، اتصال و غیرفعال کردن ترکیب‌های میتوژنی، کاهش رشد باکتری‌های پروکارسینوژنز، کاهش جذب میتوژن‌ها و افزایش عملکرد سیستم ایمنی می‌باشد (۲۲). همچنین یکی از مکانیسم‌های عملکردی پروبیوتیک‌ها از جمله لاکتوباسیلوس‌ها خاصیت ضدتکثیری سلول‌های سرطانی از جمله سرطان کولون با القای آپوپتوز است (۲۳). روش MTT به طور معمول برای بررسی سمیت سلولی و قابلیت زیستی سلول‌های زنده استفاده می‌شود.

در مطالعه روحی و همکاران (۲۰۲۴)، مقدار IC_{50} برای CFSهای *Lpb. plantarum* TW57-4 در مقابل سلول‌های سرطانی Caco-2 برابر با ۴۴/۶۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ارزیابی گردید (۶). متابولیت‌های پست‌بیوتیک تولید شده توسط *Lpb. plantarum* I-UL4، به طور ویژه‌ای باعث القای آپوپتوز شد، که منجر به تجزیه سلول‌های آپوپتوتیک به اجسام آپوپتوتیک کوچکتر می‌شود. گزارش شده است که این اجسام آپوپتوتیک توسط سلول‌های فاگوسیت‌کننده بدون اینکه واکنش التهابی در بدن ایجاد کنند، پاکسازی می‌شوند که این نوع مرگ سلولی در مقایسه با نکروز برای درمان سرطان‌ها ترجیح داده می‌شود (۲۴). *Lpb. plantarum* 17C نیز اثر سیتوتوکسیک بر روی خط سلولی HT-29 نشان داد (۲۵). بلوبری‌های تخمیر شده با *Lpb. plantarum* فعالیت‌های ضداکسیدانی و ضدتکثیری بیشتری در مقابل سلول‌های HeLa نسبت به بلوبری‌های خام نشان دادند. تخمیر بلوبری با *Lpb. plantarum*، پلی‌فنول‌های بلوبری را به متابولیت‌های فعال فنول تبدیل کرد که دارای فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و ضدتکثیری قوی بودند (۲۶). نتایج مطالعه دیگری نشان داد که *Lpb. plantarum* IIA-1A5 با مقادیر IC_{50} برابر با ۶/۸۳ و ۱۲/۳۵ میکروگرم در میلی‌لیتر به ترتیب برای استخراج‌های داخل‌سلولی و خارج‌سلولی اثر مهاری وابسته به غلظت بر سلول‌های سرطان پستان MCF-7 داشت (۲۷).

مواد شیمیایی ضدمیکروبی اصلی تولید شده توسط لاکتوباسیل‌ها شامل پپتیدهای سنتز شده ریبوزومی، یعنی باکتریوسین‌ها و فرآورده‌های متابولیک مانند پراکسید هیدروژن، اسیدلاکتیک و سایر اسیدهای آلی، ترکیبات فنولی و غیره می‌باشد. در حالی که باکتریوسین‌ها به طور معمول فعالیت مختص و هدفمند دارند، گروه دوم شامل مولکول‌هایی است که به طور کلی به صورت غیرتخصصی در مهار رشد گونه‌های رقیب عمل می‌کنند. با توجه به بحران بهداشت جهانی مقاومت (چند دارویی) در مقابل عوامل عفونی، ضدمیکروبی‌های تولید شده توسط لاکتوباسیل‌های پروبیوتیک، به ویژه باکتریوسین‌ها، ممکن است به عنوان جایگزین مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌های معمولی مورد استفاده قرار گیرند (۲۸). فعالیت ضدمیکروبی *Lpb. plantarum* بیشتراز همه به تولید و انتشار انواع مختلف اسیدهای آلی (به ویژه اسید لاکتیک و اسید استیک، و همچنین اسیدهای تارتاریک، سیتریک، مالیک،

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-01-29]
[DOI: 10.61882/nsft.20.3.95]

اوکسالیک و سوکسینیک) و کاهش pH محیط اطراف بستگی دارد.

این دو عامل با هم، به مهار رشد میکروارگانیسم‌های حساس به اسید کمک می‌کنند. حتی اسیدهای چندکربنی کوتاه زنجیر مانند اسید بوتیریک، پروپیونیک و والریک و ترکیبات تغییریافته آن‌ها نیز فعالیت ضدباکتریایی دارند (۲۹). با توجه به اینکه رشد میکروارگانیسم‌های مهم تخریب‌کننده و مسمومیت‌زای غذایی در pH پایین (<۴) مهار می‌شود، *Lpb. plantarum* که یکی از لاکتوباسیل‌های با بیشترین نرخ تولید اسید لاکتیک است، می‌تواند به عنوان یک محافظ طبیعی به انواع غذاهای تخمیری اضافه شود. باکتری‌های اسیدلاکتیک، از جمله *Lpb. plantarum*، ممکن است هوموفرمنتاتیو یا هتروفرمنتاتیو باشند. باکتری‌های هوموفرمنتاتیو، اکثرا اسیدلاکتیک را از طریق گلیکولیز تولید می‌کنند در مقابل باکتری‌های هتروفرمنتاتیو گلوکز را از طریق مسیر ۶-فسفوگلوکونات/فسفوکتولاز تخمیر می‌کنند (۳۰). با توجه به اینکه سویه‌های مختلف اسیدهای آلی انواع، مقادیر و ترکیبات متفاوتی را تولید می‌کنند، اقدامات مهاری مختلفی در این زمینه وجود دارد. این نکات نشان می‌دهند که مکانیسم ضدمیکروبی ناشی از اسیدی شدن pH بستگی به گونه و نوع سویه دارد (۳۱).

در مطالعه‌ای *Lpb. plantarum* AF1 و *Lpb. plantarum* NO1دارای ویژگی‌های ضد باکتریایی برجسته‌ای علیه *S. aureus*، *E.coli*، *L. monocytogenes* و *S. Typhimurium* هستند که عمدتاً به دلیل تشکیل ترکیبات مهاری مانند باکتریوسین‌ها، CO_2، H_2O_2، اسیدهای آلی و δ-دودکالاکتون است (۳۲)، این نتایج همسو با مطالعه حاضر است.

بیوفیلم‌ها از رشد غیرمتحرک میکروب‌ها که در ماتریکس خارج سلولی یافت می‌شوند و به صورت تجمعی به یک سطح متصل می‌شوند، تشکیل شده‌اند. تشکیل بیوفیلم‌ها از پاتوژن‌ها در برابر شرایط سخت، درمان‌های ضد میکروبی و همچنین پاسخ‌های ایمنی میزبان محافظت می‌کند. علاوه بر این، عامل اصلی ایجاد بیماری‌های مزمن مختلف، بیوفیلم‌های پاتوژن‌ها هستند که با کاهش اثربخشی آنتی‌بیوتیک‌های موجود و افزایش حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) بالاتر، باعث بروز مشکلات می‌شوند (۳۳). پروبیوتیک‌ها به عنوان بهترین استراتژی جایگزین برای کاهش و از بین بردن بیوفیلم‌هایی که باعث عفونت‌های جدی می‌شوند، مطرح هستند. پروبیوتیک‌ها اثرات مفید خود را علیه میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا از طریق مکانیزم‌های مختلفی مانند رقابت، حذف و جابجایی اعمال می‌کنند. رقابت شامل هر دو کشت هم‌زمان پروبیوتیک‌ها یا ترکیبات ضدمیکروبی ترشح‌شده با پاتوژن‌ها است و حذف شامل پیش‌پوشش دادن با پروبیوتیک‌ها یا ترکیبات ضدمیکروبی ترشح‌شده برای جلوگیری از تشکیل بیوفیلم‌های پاتوژن‌ها می‌باشد. در همین حال، جابجایی شامل تجزیه بیوفیلم‌های از پیش تشکیل‌شده میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا توسط پروبیوتیک‌ها است (۳۴).

اثر ضدبیوفیلم پس‌بیوتیک‌ها بسته به سویه و منبع لاکتوباسیلوس، غلظت و مدت زمان درمان و پاتوژن خاص مورد هدف متفاوت است (۶ و ۳۵). مطالعه‌های پیشین به بررسی اثربخشی CFS لاکتوباسیلوس در مبارزه با بیوفیلم‌های تولید شده توسط سویه‌های *L. monocytogenes* پرداخته‌اند. تیمار با سوپرناتانت بدون سلول *Lpb. plantarum* TW57-4 به طور مؤثر تشکیل بیوفیلم را در غلظت‌های ۱/۱۶MIC (۹/۶۷٪) تا MIC(۸۰٪)، مهار کرد (۶). رضایی و همکاران (۲۰۲۱)، تشکیل بیوفیلم و خواص ضدباکتریایی لاکتوباسیلوس‌های جدا شده از محصولات لبنی بومی را مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه از میان چهارده سویه جداسازی شده، سویه‌هایی *L. delbrueckii subsp lactis*، *Lpb.plantarum*، *L. delbrueckii*، *Lactobacillus brevis*، *Lactobacillus lactis subsp. lactis* دارای اثر قویتری بودند. نتایج این مطالعه نشان داد که اکثر سویه‌ها قادر به تشکیل بیوفیلم بودند، اما تراکم و ضخامت بیوفیلم تشکیل شده می‌تواند بسته به گونه‌ها کمی متفاوت باشد (۳۶). بوجناکوا و کمت (۲۰۱۲)، نیز به نتایج مشابهی دست یافتند (۳۷).

باکتری‌های اسیدلاکتیک، توانایی ایجاد اثرات باکتریواستاتیک و باکتریوسیدال را از طریق اختلال در عملکرد غشای سلول‌های پاتوژنیک دارا هستند. این اختلال منجر به افزایش نفوذپذیری غشاء، لیز سلولی، آزاد شدن محتویات سلولی و در نهایت مرگ پاتوژن شده و تحت تأثیر نوع و غلظت عامل ضدمیکروبی استفاده شده و همچنین چگالی سلول‌های پاتوژنیک قرار دارد (۳۸).

در پژوهش علیزاده بهبهانی و همکاران (۲۰۲۴)، سلول‌های *L. monocytogenes* ATCC 19115 پس از تیمار با سوپرناتانت بدون سلول *Bacillus subtilis* GS3، دستخوش تغییراتی از جمله چروکیدگی دیواره سلولی، فرورفتگی و پارگی و همچنین تا خوردن سلول شدند. این پژوهشگران گزارش کردند سوپرناتانت بدون سلول سویه، باعث نشت مواد داخل سلولی به خارج از سلول شد که در نهایت منجر به لیز شدن سلول گردید (۳۹). در مطالعه دیگر محققان تاثیر عصاره جاشیر(*Prangos ferulacea*)، را بر ویژگی‌های ساختاری *L. monocytogenes* را با استفاده از میکروسکوپ الکترونی بررسی کردند. نتایج نشان

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-01-29]
[DOI: 10.61882/nsft.20.3.95]

داد پس از تیمار با عصاره، تغییرات ساختاری قابل توجهی در ساختار این کوکوباسیل دوگانه مشاهده شد که با نتایج حاصل از این مطالعه همسو است (۱۵). آنتی‌بیوتیک حاصل از سویه پروبیوتیک *Lpb. plantarum* KJB23 نیز اثر ضدباکتریایی خود علیه *L. monocytogenes* را از طریق تشکیل حفره بر روی غشای سلولی این پاتوژن غذازاد ایجاد کرد (۴۰).

در ارزیابی سویه *Lpb. plantarum* sps1، جداسازی‌شده از ماست محلی توسط علیزاده بهبهانی و همکاران (۲۰۲۵)، نتایج نشان داد این سویه مقاومت مناسبی در برابر شرایط اسیدی و نمک‌های صفراوی داشته و فاقد فعالیت همولیتیک، DNase و تولید آمین بیوژنیک است. میزان جذب کلسترول (۴۲/۳۰درصد) و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (۴۰/۵۰ درصد برای DPPH و ۴۶/۳۰ درصد برایABTS) قابل توجه بود. همچنین، سویه توانایی مطلوبی در تجمیع خودکار(۳۸/۶۰ درصد)، انباشتگی (۲۲/۴۰درصد)، چسبندگی به سلول Caco-2 (۱۱درصد) و خاصیت ضدچسبندگی در برابر *S. Typhimurium* از خود نشان داد (۴۱). تیمار با سوپرناتانت بدون سلول *Lpb. plantarum* TW57-4 تغییرات قابل توجهی در ساختار *L. monocytogene* به وجود آورد که این تغییر در نهایت منجر به مرگ سلول شد (۶). تصاویر حاصل از میکروسکوپ کونفوکال در مطالعه جلیل سرقلعه و همکاران (۲۰۲۳)، نیز کاهش سلول‌های زنده *L. monocytogenes* و اثر ضدمیکروبی عصاره مورد بررسی را نشان داد (۱۵).

نتیجه‌گیری

امروزه استفاده از روش‌های ایمن، مانند استفاده از ترکیب‌های ضدمیکروبی طبیعی تولید شده توسط باکتری‌های اسیدلاکتیک برای از بین بردن بیوفیلم‌های تشکیل شده توسط *L. monocytogenes* توجه محققان را به خود جلب کرده است. بر اساس یافته‌های ما، پست‌بیوتیک *Lpb. plantarum* SPS1 می‌تواند به‌طور قابل‌توجهی به‌عنوان مهارکننده‌ی بیوفیلم *L. monocytogenes* برای کاهش خطرات آلودگی غذایی در زنجیره غذایی مورد استفاده قرار گیرد.

بررسی اثر ضدمیکروبی سویه بر سویه‌های پاتوژن مورد بررسی در این مطالعه نشان‌دهنده ویژگی‌های ضدباکتریایی برجسته *Lpb. plantarum* SPS1 بود. اثر ضدمیکروبی CFS در برابر *L. monocytogenes* از طریق تحلیل مورفولوژیکی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی و میکروسکوپ کونفوکال نیز تأیید شد. بررسی متابولیت‌های ترشح شده توسط *Lpb. plantarum* SPS1روی سلول های سرطانی HT-29 و HeLa نیز اثر سیتوتوکسیک بر این سلول‌ها را تایید کرد. چنین یافته‌هایی، کاربرد امیدبخش پست‌بیوتیک‌ها به‌عنوان زیست‌نگهدارنده‌ها برای کنترل تشکیل بیوفیلم *L. monocytogenes* و سایر باکتری‌های منتقل شونده از طریق غذا در صنعت غذایی را بدون خطر برای مصرف‌کنندگان تقویت می‌کند.

تقدیر و تشکر

نویسندگان از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان جهت حمایت مالی طرح پژوهشی به‌شماره ۱۴۰۲/۴۴ که این مقاله مستخرج از آن می‌باشد، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References

1. Sepordeh S, Jafari AM, Bazzaz S, Abbasi A, Aslani R, Houshmandi S, Rad AH. Postbiotic as Novel Alternative Agent or Adjuvant for the Common Antibiotic Utilized in the Food Industry. Current Pharmaceutical Biotechnology. 2024;25(10):1245-1263.

2. Rezaei Z, Nickfar F, Salari A, Yousefi M, Khodaparast MHH, Shamloo E. Feasibility of biofilm production capacity by Levilactobacillus brevis isolated from motal cheese and evaluation of biofilm resistance produced in vitro and in yogurt. Arab J Chem. 2023;16(5):104702.

3. Rezaei Z, Khanzadi S, Salari A. Biofilm formation and antagonistic activity of Lacticaseibacillus rhamnosus (PTCC1712) and Lactiplantibacillus plantarum (PTCC1745). AMB Express. 2021;11(1):1-7.

4. Moradi M, Kousheh SA, Almasi H, Alizadeh A, Guimarães JT, Yılmaz N, Lotfi A. Postbiotics produced by lactic acid bacteria: the next frontier in food safety. Compr Rev Food Sci Food Saf. 2020;19(6):3390-3415.

5. Costerton JW. Introduction to biofilm. Int J Antimicrob Agents. 1999;11:217-221.

6. Rouhi A, Falah F, Azghandi M, Behbahani BA, Mortazavi SA, Tabatabaei-Yazdi F, Vasiee A. Investigating the effect of Lactiplantibacillus plantarum TW57-4 in preventing biofilm formation and expression of virulence genes in Listeria monocytogenes ATCC 19115. LWT. 2024;191:115669.

7. Falah F, Vasiee A, Tabatabaei-Yazdi F, Moradi S, Sabahi S. Optimization of γ-aminobutyric acid (GABA) production by Lactobacillus spp. from agro-food waste. Biomass Conversion and Biorefinery. 2022.

8. Falah F, Zareie Z, Vasiee A, Tabatabaee Yazdi F, Mortazavi SA, Alizadeh Behbahani B. Production of synbiotic ice-creams with Lactobacillus brevis PML1 and inulin: Functional characteristics, probiotic viability, and sensory properties. Journal of Food Measurement and Characterization. 2021;15(6):5537-5546.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-01-29]

[DOI: 10.61882/nsft.20.3.95]

9. Van TT, Foo HL, Loh TC, Bejo MH. Inhibitory activity and organic acid concentrations of metabolite combinations produced by various strains of Lactobacillus plantarum. African J Biotechnol. 2011;10:1359-1363.

10. Choe DW, Foo HL, Loh TC, Hair-Bejo M, Awis QS. Inhibitory property of metabolite combinations produced from Lactobacillus plantarum strains. Pertanika J Trop Agric Sci. 2013;36:79-88.

11. Moghadam MS, Foo HL, Leow TC, Rahim RA, Loh TC. Novel bacteriocinogenic Lactobacillus plantarum strains and their differentiation by sequence analysis of 16S rDNA, 16S-23S and 23S-5S intergenic spacer regions and randomly amplified polymorphic DNA analysis. Food Technol Biotechnol. 2010;48:476-483.

12. Tai HF, Foo HL, Abdul Rahim R, Loh TC, Abdullah MP, Yoshinobu K. Molecular characterisation of new organisation of plnEF and plw loci of bacteriocin genes harbour concomitantly in Lactobacillus plantarum I-UL4. Microb Cell Fact BioMed Central. 2015;14:89.

13. Alizadeh Behbahani B, Barzegar H, Mehrnia MA, Ghodsi M. Probiotic Characterization of Limosilactobacillus fermentum Isolated from Local Yogurt: Interaction with Pathogenic Bacteria and Caco-2 Enteric Cell Line. Nutrition and Food Sciences Research. 2023;10(1):37-45. http://nfsr.sbmu.ac.ir/article-1-593-fa.html.

14. Park YJ, Kim YJ, Yu HH, Lee NK, Paik HD. Cell-free supernatants of Bacillus subtilis and Bacillus polyfermenticus inhibit Listeria monocytogenes biofilm formation. Food Control. 2023;144:109387. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109387.

15. Jalil Sarghaleh S, Alizadeh Behbahani B, Hojjati M, Vasiee A, Noshad M. Evaluation of the constituent compounds, antioxidant, anticancer, and antimicrobial potential of Prangos ferulacea plant extract and its effect on Listeria monocytogenes virulence gene expression. Front Microbiol. 2023;14:1202228. doi: 10.3389/fmicb.2023.1202228. PMID: 37492261; PMCID: PMC10364450.

16. Abdi Moghaddam Z, Jamal A, Rezaei Z, Mohtashami M, Shamloo E, Hajigolam Sarizdi M. Prevalence of Listeria monocytogenes in Iranian food products. School of Medical Sciences, Nishapur. 2022;10(1):1-24.[In Pershia].

17. Diop M, Alvarez V, Guiro A, Thonart P. Efficiency of neutralized antibacterial culture supernatant from bacteriocinogenic lactic acid bacteria supplemented with salt in control of microorganisms present in senegalese artisanally handled fish by immersion preservative technology during gueldj seafood processing at 10°C and 30°C. International Journal of Food Microbiology. 2016;1(1).

18. Wu M, Dong Q, Ma Y, Yang S, Aslam MZ, Liu Y, Li Z. Potential antimicrobial activities of probiotics and their derivatives against Listeria monocytogenes in food field: A review. Food Research International. 2022;160:111733.

19. Hossain MI, Mizan MFR, Roy PK, Nahar S, Toushik SH, Ashrafudoulla M, Ha SD. Listeria monocytogenes biofilm inhibition on food contact surfaces by application of postbiotics from Lactobacillus curvatus B.67 and Lactobacillus plantarum M.2. Food Research International. 2021;148:110595.

20. Mirnejad R, Vahdati AR, Rashidiani J, Erfani M, Piranfar V. The antimicrobial effect of Lactobacillus casei culture supernatant against multiple drug resistant clinical isolates of Shigella sonnei and Shigella flexneri in vitro. Iranian Red Crescent Medical Journal. 2013;15(2):122-126.

21. Guandalini S, Cernat E, Moscoso D. Prebiotics and probiotics in irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease in children. Benef Microbes. 2015;6(2):209-217.

22. Bernstein CN. Antibiotics, probiotics and prebiotics in IBD. Nestle Nutr Inst Workshop Ser. 2014;79:83-100.

23. DE Vrese M, Marteau PR. Probiotics and prebiotics: effects on diarrhea. J Nut. 2007;137(3):803S-811S.

24. Konishi H, Fujiya M, Tanaka H, Ueno N, Moriichi K, Sasajima J, Ikuta K, Akutsu H, Tanabe H, Kohgo Y. Probiotic-derived ferrichrome inhibits colon cancer progression via JNK-mediated apoptosis. Nat Commun. 2016;7:12365.

25. Chuah LO, Foo HL, Loh TC, Mohammed Alitheen NB, Yeap SK, Abdul Mutalib NE, Yusoff K. Postbiotic metabolites produced by Lactobacillus plantarum strains exert selective cytotoxicity effects on cancer cells. BMC Complementary and Alternative Medicine. 2019;19:1-12.

26. Haghshenas B, Nami Y, Haghshenas M, Abdullah N, Rosli R, Radiah D, Yari Khosroushahi A. Bioactivity characterization of Lactobacillus strains isolated from dairy products. Microbiologyopen. 2015;4(5):803-813.

27. Ryu JY, Kang HR, Cho SK. Changes over the fermentation period in phenolic compounds and antioxidant and anticancer activities of blueberries fermented by Lactobacillus plantarum. J Food Sci. 2019;84(8):2347-2356.

28. Adiyoga R, Budiman C, Abidin Z, Fujiyama K, Arief II. Evaluating the cytotoxic activity of Lactobacillus plantarum IIA-1A5 against MCF-7 human breast cancer cells and identifying its surface layer protein gene. Sains Malaysiana. 2024;53(4):881-892. https://doi.org/10.17576/jsm-2024-5304-12.

29. Zhou Q, Gu R, Li P, Lu Y, Chen L, Gu Q. Anti-Salmonella mode of action of natural L-phenyl lactic acid purified from Lactobacillus plantarum ZJ316. Applied Microbiology and Biotechnology. 2020;104:5283-5292. https://doi.org/10.1007/s00253-020-10503-4.

30. Ołdak A, Zielińska D, Rzepkowska A, Kołożyn-Krajewska D. Comparison of antibacterial activity of Lactobacillus plantarum strains isolated from two different kinds of regional cheeses from Poland: Oscypek and Korycinski cheese. BioMed Research International. 2017;2017:6820369. https://doi.org/10.1155/2017/6820369.

31. Van Thu T, Foo HL, Loh TC, Bejo MH. Inhibitory activity and organic acid concentrations of metabolite combinations produced by various strains of Lactobacillus plantarum. African Journal of Biotechnology. 2011;10(8):1359-1363. DOI: 10.5897/AJB10.1610.

32. Li X, Xu W, Yang J, Zhao H, Pan C, Ding X, Zhang Y. Effects of applying lactic acid bacteria to the fermentation on a mixture of corn steep liquor and air-dried rice straw. Animal Nutrition. 2016;2(3):229-233. https://doi.org/10.1016/j.aninu.2016.04.003.

33. Ryu EH, Chang HC. In vitro study of potentially probiotic lactic acid bacteria strains isolated from kimchi. Annals

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-01-29]

[DOI: 10.61882/nsft.20.3.95]

of Microbiology. 2013;63:1387-1395. https://doi.org/10.1007/s13213-013-0599-8.

34. Roy R, Tiwari M, Donelli G, Tiwari V. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. Virulence. 2018;9(1):522-554.

35. Prabhurajeshwar C, Chandrakanth RK. Probiotic potential of Lactobacilli with antagonistic activity against pathogenic strains: An in vitro validation for the production of inhibitory substances. Biomed J. 2017;40(5):270-283.

36. Vasiee A, Falah F, Mortazavi SA. Evaluation of probiotic potential of autochthonous lactobacilli strains isolated from Zabuli yellow kashk, an Iranian dairy product. Journal of Applied Microbiology. 2022;133(5):3201-3214.

37. Rezaei Z, Salari A, Khanzadi S. Biofilm formation and antibacterial properties of Lactobacillus isolated from indigenous dairy products. Journal of Food Quality and Hazards Control. 2021;8:162-168.

38. Bujňáková D, Kmeť V. Functional properties of Lactobacillus strains isolated from dairy products. Folia Microbiologica. 2012;57:263-267. [DOI: 10.1007/s12223-012-0121-x].

39. Mgomi FC, Yang YR, Cheng G, Yang ZQ. Lactic acid bacteria biofilms and their antimicrobial potential against pathogenic microorganisms. Biofilm. 2023;100118.

40. Behbahani BA, Noshad M, Vasiee A, Brück WM. Probiotic Bacillus strains inhibit growth, biofilm formation, and virulence gene expression of Listeria monocytogenes. LWT. 2024;191:115596.

41. Alizadeh Behbahani B, Hojjati M, Goodarzi Shamsabadi B. Investigation of probiotic, antioxidant, and immune properties of Lactiplantibacillus plantarum sps1 strain. Food Research Journal. 2025;35(2),1-22.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-01-29]

[DOI: 10.61882/nsft.20.3.95]

Evaluation of Antimicrobial and Antibiofilm Activities of the Postbiotic of *Lactiplantibacillus plantarum* SPS1 on *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 and Its Effect on HT-29 and HeLa Cancer Cells

Alizadeh Behbahani B[*1], *Hojjati M*[2], *Goodarzi Shamsabadi B*[3]

*1- *Corresponding Author: 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.*
Email: B.alizadeh@asnrukh.ac.ir

2- 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- PhD. student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural, Iran

Received 31 Dec, 2024 **Accepted 23 Feb, 2025**

Background and Objective: *Listeria monocytogenes*, a Gram-positive bacterium capable of biofilm formation and causing listeriosis, has a high mortality rate among foodborne pathogens. This study aimed to evaluate the antimicrobial and antibiofilm activities of the cell-free supernatant (CFS) of *Lactiplantibacillus plantarum* SPS1 on *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 and its effect on HT-29 and HeLa cancer cells.

Materials and Methods: The antimicrobial activity of the strain was assessed using the minimum inhibitory concentration (MIC) method and by evaluating the antibacterial activity (well diffusion and disk diffusion agar) against six foodborne pathogenic bacteria (*Bacillus cereus, Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, Salmonella enterica serovar Typhimurium, and Shigella dysenteriae*). Cytotoxicity was evaluated using the MTT assay, and antibiofilm capability was assessed using the crystal violet assay, scanning electron microscopy (SEM), and confocal microscopy.

Results: The MIC was found to be 62.5 mg/mL against *L. monocytogenes*, and the cytotoxicity of the strain's secreted metabolites on HT-29 and HeLa cancer cell lines was 47.61 mg/mL and 40.48 mg/mL, respectively. The strain showed the highest inhibitory effect on *L. monocytogenes*. CFS obtained from the strain inhibited the formation of biofilms (4MIC to 1/4MIC with a level of 18.70% to 72.48%) and treatment with CFS led to the eradication of mature biofilms of *L. monocytogenes*. SEM and confocal microscopy results confirmed the antibiofilm effects of the strain.

Conclusion: The postbiotic *Lpb. plantarum* SPS1 can be used as an antimicrobial and biofilm inhibitor agent against *L. monocytogenes* to reduce the risks of food contamination in the food chain.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, Postbiotic, Antimicrobial, Biofilm

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-01-29]

[DOI: 10.61882/nsft.20.3.95]