

بررسی اثر مهارى پروبیوتیک های منتخب بر رشد پاتوژن های باکتریایی دریایی در محیط آزمایشگاهی

مریم نصری^۱، سید مهدی اجاقی^{۲*}، امین غلامحسینی^۳، مریم منتصری^۴، معظمه کردجری^۵ و علیرضا عالیشاهی^۶

- ۱- گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
- ۲- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
- ۳- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
- ۴- گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
- ۵- گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
- ۶- گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

چکیده

پروبیوتیک‌ها به عنوان میکروارگانیسم‌های زنده، نقش مهمی در ایجاد تعادل میکروبی و کاهش رشد باکتری‌های فساد مواد غذایی دارند. سوپرناتانت حاصل از رشد پروبیوتیک‌ها حاوی ترکیبات زیست فعال نظیر اسیدهای آلی، پراکسید هیدروژن و باکتریوسین‌ها است که می‌تواند به عنوان جایگزینی طبیعی برای مواد نگهدارنده شیمیایی مورد استفاده قرار گیرد. هدف این پژوهش بررسی اثر مهارى سوپرناتانت سویه‌های پروبیوتیک شامل *Pediococcus acidilactici*، *Lactobacillus acidophilus*، *Enterococcus faecium*، *Bacillus licheniformis*، *Lactobacillus rhamnosus*، *Bacillus subtilis*، *Lactobacillus buchneri*، *Bacillus plantarum*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Bacillus cereus*، *coagulans* بر رشد باکتری‌های پاتوژن شامل *Salmonella*، *Listeria monocytogenes*، *Staphylococcus aureus*، *Escherichia coli*، *typhimurium* و *Proteus mirabilis* در شرایط آزمایشگاهی بود. برای ارزیابی فعالیت ضد میکروبی، سوپرناتانت سویه‌های پروبیوتیک استخراج و به روش میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای علیه پاتوژن‌ها آزمون شد. میزان رشد باکتری‌ها بر اساس جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر سنجش و درصد مهار رشد محاسبه گردید. یافته‌ها نشان داد سوپرناتانت‌های حاصل از *Pediococcus acidilactici*، *Lactobacillus acidophilus* و *Lactobacillus rhamnosus* بیشترین درصد مهار رشد را در مقایسه با سایر سویه‌ها نشان دادند. این نتایج بیانگر توانایی ترکیبات ترشحی پروبیوتیک‌ها در مهار رشد پاتوژن‌های عامل فساد و بهبود ماندگاری مواد غذایی است. نتایج این پژوهش حاکی از پتانسیل بالای برخی پروبیوتیک‌ها در تولید ترکیبات زیست فعال با خاصیت ضد میکروبی و کاربرد آن‌ها به عنوان جایگزینی طبیعی برای نگهدارنده‌های شیمیایی در صنایع غذایی است. پیشنهاد می‌شود در پژوهش‌های آینده پایداری سوپرناتانت‌ها در شرایط فرآوری و نگهداری مواد غذایی، مکانیسم دقیق ترکیبات ضد میکروبی و همچنین امکان استفاده در مقیاس صنعتی و بسته‌بندی فعال بررسی گردد.

کلید واژه‌ها: پروبیوتیک، سوپرناتانت، پاتوژن، درصد مهار رشد

نوع مقاله

مقاله پژوهشی اصیل

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۱/۱۵

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۲/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۶/۱۵

تاریخ چاپ الکترونیک:

۱۴۰۴/۰۶/۱۶

*نویسنده مسئول: سید مهدی اجاقی
ojagh@ut.ac.ir

پروبیوتیک ها میکروارگانیسم های زنده ای هستند که در صورت مصرف مناسب برای سلامتی مفید می باشند. اگرچه اغلب مردم فکر می کنند باکتری ها و سایر میکروارگانیسم ها مضر هستند، در واقع بسیاری از آن ها مفید بوده و برخی از آن ها به هضم غذا کمک می کنند، سلول های بیماری را از بین می برند یا ویتامین تولید می کنند. بسیاری از میکروارگانیسم های موجود در محصولات پروبیوتیک، مشابه میکروارگانیسم هایی هستند که به طور طبیعی در بدن ما زندگی می کنند. پروبیوتیک ها ممکن است حاوی انواع مختلفی از میکروارگانیسم ها باشند. شایع ترین باکتری ها به گروه هایی به نام لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم تعلق دارند.

فساد مواد غذایی ناشی از رشد میکروارگانیسم های ناخواسته از جمله باکتری های پاتوژن و ساپروفیت، یکی از مهم ترین چالش های صنایع غذایی در حفظ کیفیت و سلامت محصولات است. پاتوژن هایی نظیر *Staphylococcus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* و *Bacillus cereus*, *aureus* گونه سامونلا، نقش مهمی در فساد غذا، کاهش عمر ماندگاری محصولات و ایجاد خطرات بالقوه برای مصرف کننده دارند [1]. همچنین باکتری های *Salmonella typhimurium* پروتئوس و سودوموناس ها [2] می توانند در شرایط یخچالی، بسته بندی ناقص یا طیف وسیعی از محصولات غذایی رشد کرده و ترکیبات مضر، توکسین یا آنزیم های تخریبی تولید کنند که کیفیت حسی، ارزش تغذیه ای و ایمنی غذا را به شدت کاهش می دهد [3].

یکی از راهکارهای نوین برای مقابله با فساد میکروبی، استفاده از نگهدارنده های طبیعی است. در واقع نگهدارنده ها به منظور جلوگیری و به تاخیر انداختن فساد میکروبی و شیمیایی در مواد غذایی مورد استفاده قرار می گیرند. از جمله نگهدارنده هایی که به منظور مانع از فساد شیمیایی و میکروبی استفاده می شود [4] ترکیبات طبیعی ضد میکروبی مشتق از پروبیوتیک ها است. پروبیوتیک ها میکروارگانیسم های زنده ای هستند که در صورت مصرف یا کاربرد مناسب می توانند اثرات مثبتی بر سلامت میزبان یا محصول غذایی داشته باشند [5] [6]. این باکتری ها عمدتاً از جنس لاکتوباسیلوس، بیفیدوباکتریوم، انتروکوکوس، پدیوکوکوس و باسیلوس هستند که قادرند از طریق تولید ترکیبات ضدباکتری شامل اسیدهای آلی، پراکسید هیدروژن، دیاستازها و باکتریوسین ها از رشد پاتوژن های غذایی جلوگیری کنند [7]. سوپرناتانت کشت پروبیوتیک ها، بخشی از محیط کشت صاف شده و بدون سلول است که حاوی متابولیت های ضد میکروبی ترشح شده در طی رشد پروبیوتیک ها می باشد. این سوپرناتانت ها، بدون تغییر خصوصیات حسی غذا، توانایی مهار رشد باکتری های مسبب فساد و افزایش ماندگاری غذا را دارا هستند [8].

مطالعات متعددی نشان داده اند که سوپرناتانت های تولید شده توسط گونه های لاکتوباسیل و پدیوکوکوس می توانند فعالیت ضد میکروبی علیه پاتوژن های مواد غذایی داشته باشند [9] [10]. کاربرد این سوپرناتانت ها به عنوان مواد نگهدارنده طبیعی در صنایع لبنی، گوشتی، سبزیجات فرآوری شده و فرآورده های پخته شده، در سال های اخیر مورد توجه زیادی قرار گرفته است. ویژگی مهم این ترکیبات، حفظ ایمنی غذا بدون نیاز به نگهدارنده های شیمیایی و کاهش مصرف مواد افزودنی صنعتی است [11]. لذا پژوهش حاضر با هدف بررسی توانایی سوپرناتانت چند سویه پروبیوتیک منتخب در مهار رشد پاتوژن های مؤثر در فساد غذایی طراحی شده است تا از امکان استفاده این ترکیبات به عنوان عوامل نگهدارنده طبیعی و افزایش دهنده ماندگاری غذا اطمینان حاصل شود.

مواد و روش ها

منطقه نمونه برداری

در این پژوهش، برای نمونه برداری از باکتری های کد بندی شده بخش بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز و شرکت فرآورده های زیستی پردیس رشد مهرگان-پارسی لاکت، انتخاب شده است.

۱- آماده سازی کشت های باکتریایی

در این مطالعه، ابتدا گونه های منتخب پروبیوتیکی شامل باکتری های *Pediococcus acidilactici*، *Lactobacillus acidophilus*، *Bacillus coagulans*، *Bacillus licheniformis*، *Bacillus subtilis*، *Lactobacillus rhamnosus*، *Entrococcus faecium*، *Bacillus cereus*، *Salmonella*، *Listeria monocytogenes*، *Staphylococcus aureus*، *Escherichia coli*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Proteus mirabilis* و *typhimurium* در محیط (TSB^۲) کشت داده شدند و مشابه باکترهای پروبیوتیک ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در شرایط هوازی انکوبه و باکتری ها overnight شدند. برای اطمینان از رشد یکنواخت، تلقیح اولیه از کلنی های خالص تازه انجام شد. همچنین، باکتری های پاتوژن مورد مطالعه شامل *Bacillus cereus*، *Salmonella*، *Listeria monocytogenes*، *Staphylococcus aureus*، *Escherichia coli*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Proteus mirabilis* و *typhimurium* در محیط (TSB^۲) کشت داده شدند و مشابه باکترهای پروبیوتیک ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردیدند. استفاده از MRS Broth برای رشد گونه های لاکتوباسیل و سایر باکتری های اسید لاکتیک^۳ به دلیل غنی بودن این محیط از منابع کربن، نیترژن و نمک های معدنی ضروری است، در حالی که محیط TSB محیط کشت عمومی برای رشد اکثر باکتری های پاتوژن محسوب می شود [12] [13].

۲- تهیه مایع رویی بدون سلول (CFS^۴) از باکتری های پروبیوتیک

پس از طی دوره انکوباسیون، محیط کشت حاوی گونه های پروبیوتیکی به منظور جداسازی، سوپرناتانت سانتریفیوژ شد. برای این منظور، کشت های مایع در لوله های استریل به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شدند. سپس فاز مایع رویی (سوپرناتانت) با دقت جمع آوری شده و از فیلتر سرسرنگی با منفذ ۰/۲۲ میکرومتر عبور داده شد تا تمام سلول های باکتریایی زنده حذف شوند و تنها ترکیبات تر شحی باقی بمانند. سوپرناتانت های فیلتر شده در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند تا در آزمون های ضد میکروبی مورد استفاده قرار گیرند. به منظور استاندارد سازی شرایط، pH تمام سوپرناتانت ها قبل از استفاده اندازه گیری شد. در برخی مطالعات جهت تمایز بین اثر اسیدی و سایر ترکیبات ضد میکروبی مانند باکتریوسین ها، pH سوپرناتانت ها به خنثی (حدود ۶/۵) تنظیم می شود [14]. لازم به ذکر است در برخی مقالات برای از بین بردن سلول های باکتریایی زنده احتمالی از کلروفرم استفاده می شود که به لحاظ سلامتی بسیار خطرناک است اما در این پژوهش جهت فیلتراسیون از فیلترهای سرسرنگی با منافذ بسیار کوچک و استاندارد استفاده شد.

۳- آزمون فعالیت ضد میکروبی به روش میکروپلیت

به منظور ارزیابی اثر مهاري سوپرناتانت های (CFS) حاصل از گونه های پروبیوتیکی بر رشد باکتری های پاتوژن، از روش میکروپلیت ۹۶ خانه ای استفاده شد. برای این منظور، ابتدا سوپرناتانت های فیلتر شده در سری های رقیق شده (۱:۱، ۱:۲، ۱:۴ و ۱:۸) تهیه گردیدند. سوسپانسیون باکتری های پاتوژن با تراکم معادل ۰/۵ مک فارلند (حدود $10^8 \times 1.5$ CFU/mL) آماده شد و به محیط کشت TSB اضافه گردید. در هر خانه از پلیت، ۱۰۰ میکرولیتر از CFS و ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت حاوی پاتوژن افزوده شد، به طوری که حجم نهایی هر چاهک به ۲۰۰ میکرولیتر رسید. پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در شرایط ایستا انکوبه شدند. البته قبل از انکوبه شدن و بعد از پایان میکروپلیت گذاری یکبار توسط دستگاه ریدر الایزا خوانده شد. پس از پایان انکوباسیون، میزان رشد باکتری ها با استفاده از ریدر الایزا در طول موج ۶۰۰ نانومتر (OD600^۵) اندازه گیری شد. میزان کاهش جذب نوری در مقایسه با کنترل مثبت (فاقد سوپرناتانت) به عنوان شاخص مهار رشد باکتریایی در نظر گرفته شد.

¹ De Man, Rogosa, and Sharpe

² Tryptic Soy Broth

³ Lactic Acid Bacteria

⁴ Cell-Free Supernatant

⁵ Optical Density

فرمول درصد مهار رشد (%):

(۱)

$$[\frac{\text{درصد مهار نمونه تیمار شده} - \text{درصد مهار نمونه کنترل}}{\text{درصد مهار نمونه کنترل}}] \times 100 = (\%) \text{ درصد مهار رشد}$$

OD treatment: محیط کشت + باکتری پاتوژن + CFS

OD control: محیط کشت حاوی باکتری پاتوژن بدون CFS

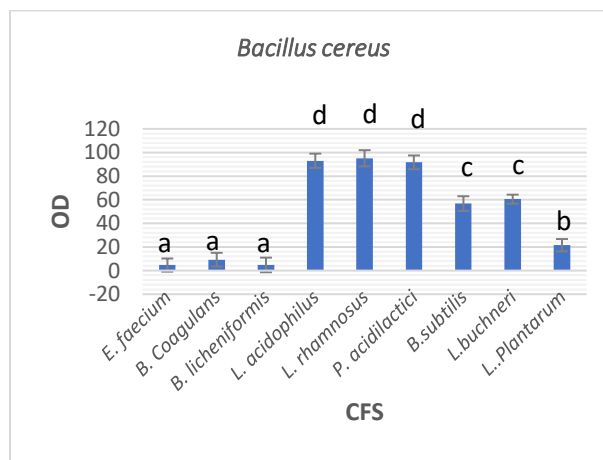
کنترل پایه: محیط TSB به تنهایی جهت کالیبراسیون دستگاه

برای جلوگیری از تبخیر، چاهک های ردیف و ستون اول توسط نرمال سالین پر شد و پلیت ها با پوشش چسب دار مخصوص میکروپلیت پوشانده شدند [15].

نتایج

در نمودار ۱ درصد مهار بدست آمده از آزمون MIC^۶ (حداقل غلظت مهارکننده گی) به منظور تاثیر سوپرناتانت گونه های مختلف باکتری های پروبیوتیک بر باکتری پاتوژن *Bacillus cereus* نشان داده شده است. نتایج نشان می دهد سه گونه باکتری *Lactobacillus acidophilus*، *Pediococcus acidolactici* و *Lactobacillus rhamnosus* اثر ضد میکروبی قوی تری نسبت به گونه های: *Bacillus licheniformis*، *Entrococcus faecium*، *Lactobacillus buchneri*، *Bacillus subtilis*، *Lactobacillus plantarum* و *Bacillus coagulans* از خود نشان داده اند. درصد مهار این سه گونه به ترتیب برای باکتری *Bacillus cereus* ۹۳٪، ۹۱/۶۷٪ و ۹۵/۱۱٪ محاسبه شد. اثر ضد میکروبی این سه گونه اختلاف معنی داری با شش گونه دیگر دارد.

۱- مقایسه اثر ضد میکروبی پروبیوتیک ها بر روی باکتری پاتوژن *Bacillus cereus*



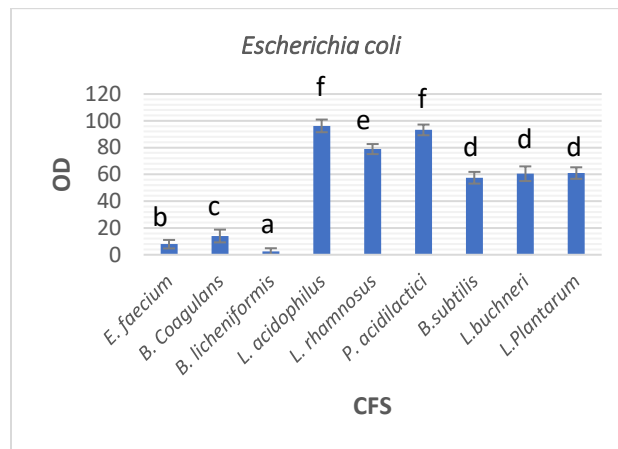
نمودار ۱: درصد مهار سوپرناتانت باکتری های پروبیوتیک بر روی باکتری پاتوژن *Bacillus cereus*. عدم وجود حروف مشترک بیانگر اختلاف معنی دار بین گروه ها.

در نمودار ۲ درصد مهار بدست آمده از آزمون MIC به منظور تاثیر سوپرناتانت گونه های مختلف باکتری های پروبیوتیک بر باکتری پاتوژن *Escherichia coli* نشان داده شده است. نتایج نشان می دهد سه گونه باکتری *Pediococcus*، *Lactobacillus plantarum* و *Lactobacillus*

^۶ Minimum Inhibitory Concentration

Bacillus licheniformis و *Lactobacillus rhamnosus* اثر ضد میکروبی قوی تری نسبت به گونه های: *Bacillus coagulans*، *Bacillus subtilis*، *Lactobacillus plantarum*، *Entrococcus faecium*، *Lactobacillus buchneri*، *Escherichia coli* ۹۶/۲۲٪، ۹۳/۲۲٪ و ۷۸/۸۹٪ محاسبه شد. اگرچه درصد مهار *Lactobacillus rhamnosus* از گونه های *Pediococcus acidolactici* و *acidophilus* کمتر است اما باز هم اختلاف معنی داری با ۶ گونه دیگر دارد.

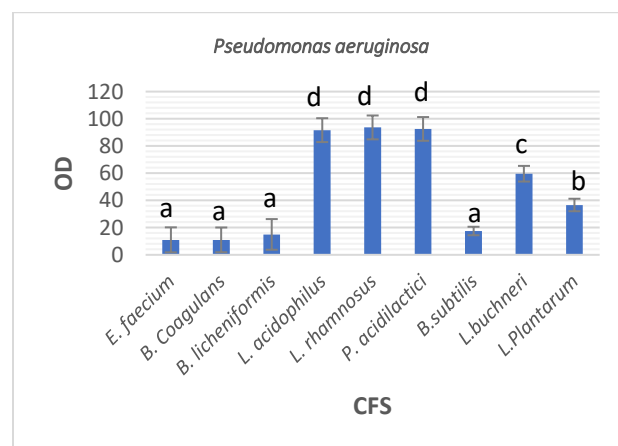
۲- مقایسه اثر ضد میکروبی پروبیوتیک ها بر روی باکتری پاتوژن *Escherichia coli*



نمودار ۲: در صد مهار سوپرناتانت باکتری های پروبیوتیک بر روی باکتری پاتوژن *Escherichia coli*. عدم وجود حروف مشترک بیانگر اختلاف معنی دار بین گروه ها.

در نمودار ۳ درصد مهار بدست آمده از آزمون MIC به منظور تاثیر سوپرناتانت گونه های مختلف باکتری های پروبیوتیک بر باکتری پاتوژن *Pseudomonas aeruginosa* نشان داده شده است. نتایج نشان می دهد سه گونه باکتری *Lactobacillus acidophilus*، *Bacillus coagulans* از خود نشان داده اند. درصد مهار این سه گونه به ترتیب برای باکتری *Pseudomonas aeruginosa* ۹۱٪/۵۶، ۹۳٪/۶۷ و ۹۳٪/۶۷ محاسبه شد. اثر ضد میکروبی این سه گونه اختلاف معنی داری با شش گونه دیگر دارد.

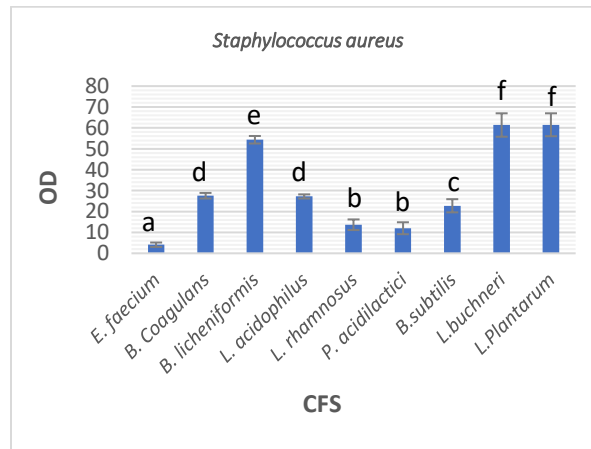
۳- مقایسه اثر ضد میکروبی پروبیوتیک ها بر روی باکتری پاتوژن *Pseudomonas aeruginosa*



نمودار ۳: درصد مهار سوپرناتانت باکتری های پروبیوتیک بر روی باکتری پاتوژن *Pseudomonas aeruginosa*. عدم وجود حروف مشترک بیانگر اختلاف معنی دار بین گروه ها.

در نمودار ۴ درصد مهار بدست آمده از آزمون MIC به منظور تاثیر سوپرناتانت گونه های مختلف باکتری های پروبیوتیک بر باکتری پاتوژن *Staphylococcus aureus* نشان داده شده است. نتایج نشان می دهد دو گونه باکتری *Lactobacillus* و *Lactobacillus buchneri* اثر ضد میکروبی قوی تری نسبت به گونه های: *Bacillus licheniformis*، *Entrococcus faecium*، *Bacillus subtilis*، *Pediococcus acidolactici* و *Bacillus coagulans* از خود نشان داده اند. درصد مهار این دو گونه به ترتیب برای باکتری *Staphylococcus aureus* ۶۸/۳۸٪ و ۶۱/۵۰٪ محاسبه شد. اثر ضد میکروبی این دو گونه اختلاف معناداری با هفت گونه دیگر دارد.

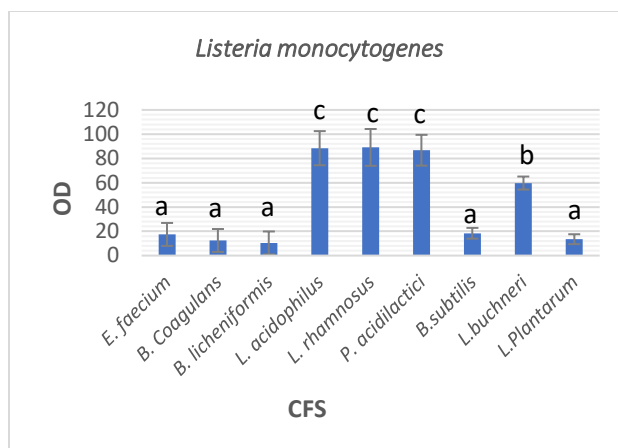
۴- مقایسه اثر ضد میکروبی پروبیوتیک ها بر روی باکتری پاتوژن *Staphylococcus aureus*



نمودار ۴: درصد مهار سوپرناتانت باکتری های پروبیوتیک بر روی باکتری پاتوژن *Staphylococcus aureus*. عدم وجود حروف مشترک بیانگر اختلاف معنی دار بین گروه ها.

در نمودار ۵ درصد مهار بدست آمده از آزمون MIC به منظور تاثیر سوپرناتانت گونه های مختلف باکتری های پروبیوتیک بر باکتری پاتوژن *Listeria monocytogenes* نشان داده شده است. نتایج نشان می دهد سه گونه باکتری *lactobacillus* و *Pediococcus acidolactici*، *acidophilus* اثر ضد میکروبی قوی تری نسبت به گونه های: *Bacillus licheniformis*، *Entrococcus faecium*، *Bacillus subtilis*، *Lactobacillus Buchneri*، *Lactobacillus* و *plantarum* از خود نشان داده اند. درصد مهار این سه گونه به ترتیب برای باکتری *Listeria monocytogenes* ۸۸٪/۴۴، ۸۶٪/۷۸ و ۸۹٪/۱۱ محاسبه شد اثر ضد میکروبی این سه گونه اختلاف معناداری با شش گونه دیگر دارد.

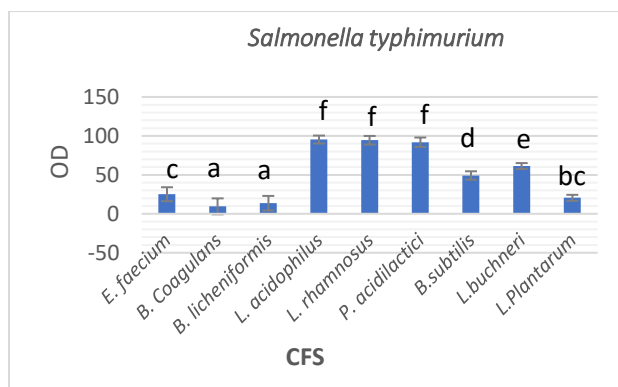
۵- مقایسه اثر ضد میکروبی پروبیوتیک ها بر روی باکتری پاتوژن *Listeria monocytogenes*



نمودار ۵: درصد مهار سوپرناتانت باکتری های پروبیوتیک بر روی باکتری پاتوژن *Listeria monocytogenes*. عدم وجود حروف مشترک بیانگر اختلاف معنی دار بین گروه ها.

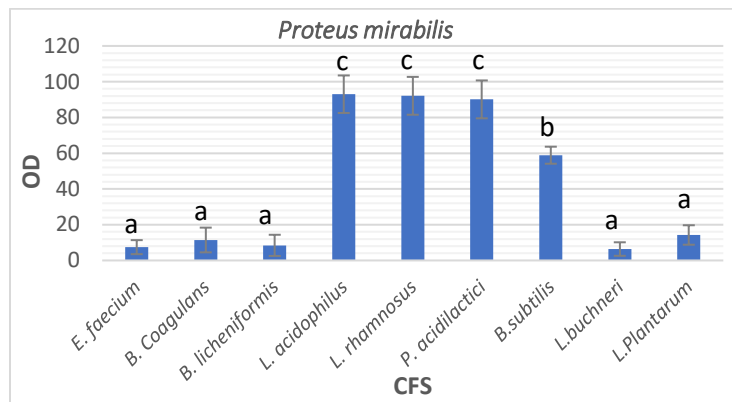
در نمودار ۶ درصد مهار بدست آمده از آزمون MIC به منظور تاثیر سوپرناتانت گونه های مختلف باکتری های پروبیوتیک بر باکتری پاتوژن *Salmonella typhimurium* نشان داده شده است. نتایج نشان می دهد سه گونه باکتری *Lactobacillus acidophilus*، *Pediococcus acidilactici* و *Lactobacillus rhamnosus* اثر ضد میکروبی قوی تری نسبت به گونه های: *Bacillus licheniformis*، *Entrococcus faecium*، *Bacillus subtilis*، *Lactobacillus Buchneri* و *plantarum* از خود نشان داده اند. درصد مهار این سه گونه به ترتیب برای باکتری *Salmonella typhimurium* ۹۱/۸۹٪ و ۹۴/۴۴٪ محاسبه شد. اثر ضد میکروبی این سه گونه اختلاف معناداری با شش گونه دیگر دارد.

۶- مقایسه اثر ضد میکروبی پروبیوتیک ها بر روی باکتری پاتوژن *Salmonella typhimurium*



نمودار ۶: درصد مهار سوپرناتانت باکتری های پروبیوتیک بر روی باکتری پاتوژن *Salmonella typhimurium*. عدم وجود حروف مشترک بیانگر اختلاف معنی دار بین گروه ها.

در نمودار ۷ درصد مهار بدست آمده از آزمون MIC به منظور تاثیر سوپرناتانت گونه های مختلف باکتری های پروبیوتیک بر باکتری پاتوژن *Proteus mirabilis* نشان داده شده است. نتایج نشان می دهد سه گونه باکتری *acidophilus*، *Lactobacillus* و *Pediococcus acidilactici* اثر ضد میکروبی قوی تری نسبت به گونه های: *Bacillus licheniformis*، *Entrococcus faecium*، *Lactobacillus Buchneri*، *Bacillus subtilis* و *Lactobacillus plantarum* از خود نشان داده اند. درصد مهار این سه گونه به ترتیب برای باکتری *Proteus mirabilis* ۹۳٪، ۱۱٪/۹۰ و ۱۱٪/۹۲ محاسبه شد. اثر ضد میکروبی این سه گونه اختلاف معناداری با شش گونه دیگر دارد.

۷- مقایسه اثر ضد میکروبی پروبیوتیک ها بر روی باکتری پاتوژن *Proteus mirabilis*

نمودار ۷: درصد مهار سوپرناتانت باکتری های پروبیوتیک بر روی باکتری پاتوژن *Proteus mirabilis*. عدم وجود حروف مشترک بیانگر اختلاف معنی دار بین گروه ها.

بحث و نتیجه گیری

یافته های این مطالعه نشان داد که تمام سوپرناتانت های تولید شده از باکتری های پروبیوتیک دارای توانایی مهار رشد پاتوژن های مورد بررسی دارند. در آزمون MIC به روش پلیت ۹۶ خانه ای، تفاوت های معنی داری بین فعالیت ضد میکروبی گونه های مختلف مشاهده شد. در میان سوپرناتانت های استخراج شده، پروبیوتیک های *Lactobacillus acidophilus*، *Pediococcus acidolactici* و *Lactobacillus rhamnosus* بیشترین قدرت بازدارندگی در برابر پاتوژن های گرم منفی روده ای *Escherichia coli*، *Listeria monocytogenes*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Proteus mirabilis*، *Bacillus cereus* و *Salmonella typhimurium* از خود نشان دادند. به ویژه سوپرناتانت های این سه باکتری توانستند در غلظت های پایین (۲۵٪ تا ۵۰٪) رشد این پاتوژن ها را به طور کامل متوقف کنند. این عملکرد ممکن است به تولید اسید های آلی، باکتریوسین ها و کاهش pH محیط مربوط باشد. از سوی دیگر، در برابر باکتری گرم مثبت *Staphylococcus aureus*، پروبیوتیک های *Lactobacillus plantarum* و *Lactobacillus buchneri* موثرتر عمل کردند که می تواند ناشی از تفاوت در حساسیت دیواره سلولی باکتری های گرم مثبت به ترکیبات ضد میکروبی تولید شده توسط این گونه ها باشد. در اینجا سوال پیش می آید که چرا همه ی پروبیوتیک ها به یک اندازه بر مهار رشد پاتوژن ها اثر گذار نیستند و فعالیت های متفاوتی از خود نشان می دهند. که در ادامه به برخی از دلایل علمی عنوان شده در مطالعات پیشین اشاره می کنیم:

۱- *Lactobacillus plantarum* و باکتریوسین های ویژه علیه گرم مثبت ها

گونه هایی مثل *Lactobacillus plantarum*، ماده های آنتی میکروبی مستقیم (باکتریوسین ها) تولید می کنند که اثری قوی بر باکتری های گرم مثبت مانند *Staphylococcus aureus* دارند. در مطالعات پیشین [16]، مشخص شد که *Lactobacillus ATCC 14917* با استفاده از سلول های زنده، سوپرناتانت های بدون سلول به خوبی پاتوژن *Staphylococcus aureus* را مهار کرده است. افزون بر این، برخی سویه های *Lactobacillus plantarum* دارای سیستم های مشابه quorum sensing هستند (مانند lamBDCA)، که می توانند سیگنال های ارتباط جمعی پاتوژن های مثل *Staphylococcus aureus* (که آن هم از agr استفاده می کند) را مختل کنند، و در نتیجه بیان ژن های ویرو لانسسی و تولید سم را کاهش دهند. همچنین، این گونه ها می توانند تولید H_2O_2 کنند که برای باکتری های گرم مثبت سمی است چرا که پراکسید هیدرون برای غشای حساس باکتری بسیار کشنده است [17].

۲. *Lactobacillus buchneri* و مهار *Staphylococcus aureus*

در رابطه با *Lactobacillus buchneri* اگرچه تحقیق اختصاصی مشابه *Lactobacillus plantarum* کمتر وجود دارد، اما این گونه نیز تولید اسید لاکتیک و ترکیبات آنتی میکروبی دارد که pH محیط را کاهش داده و رشد *Staphylococcus aureus* را محدود می کند.

اسیدهای عالی و نمک آن‌ها در ممانعت از رشد میکروبی بسیار موثرند. این مولکول‌ها ر شد سلول‌های باکتریایی و قارچی را متوقف می‌کنند. اسیدهای آلی مانند بنزوئیک اسید، پارابن‌ها، سوربیک اسید، پروپیونیک اسید، استیک اسید، لاکتیک اسید، اسیدهای چرب متوسط، نمک‌ها (سوربات‌ها، بنزوات، پروپیونات) و ترکیب آن‌ها دارای فعالیت ضد میکروبی قوی هستند. حتی بسیاری از اسیدهای ضعیف، در حالت تفکیک نشده می‌توانند از غشاء سلولی عبور کنند و در سیتوپلاسم تجمع یابند و آن را اسیدی کنند^[18]. به طور کلی می‌توان گفت، این برتری و قدرت مهار در برابر *Staphylococcus aureus* به خاطر تولید باکتریوسین اختصاصی مانند Plantaricin است که با سوراخ کردن غشای سلول باعث نشت محتویات سلول می‌شود و در نهایت منجر به مرگ باکتری می‌گردد. علاوه بر این باکتریوسین‌ها با اختلال در سیستم quorum sensing از تشکیل بیوفیلم‌های مقاوم جلوگیری می‌کنند^[19].

۳. عملکرد بهتر پروبیوتیک های *Lactobacillus acidophilus* و *Pediococcus acidolactici* و *Lactobacillus rhamnosus*

می‌توان این چنین توجیه کرد که به طور مثال در گونه *Pediococcus acidolactici* ناشی از تولید پدیوسین و تمایل به محیط اسیدی باشد که پاتوژن‌هایی با ساختار متفاوت را هدف قرار می‌دهد، یا *Lactobacillus acidophilus* و *Lactobacillus rhamnosus* از طریق تولید لاکتیک اسید و تنظیم شدید pH به ویژه در محیط‌های مرطوب ر شد باکتری‌های گرم منفی را مهار می‌کنند^[20]. در واقع یافته‌ها نشان داد اثربخشی پروبیوتیک‌ها در مهار رشد پاتوژن‌ها به گونه‌ی باکتری پاتوژن بستگی دارد، و انتخاب پروبیوتیک موثر باید بر اساس نوع پاتوژن هدف انجام شود و استفاده ترکیبی از چند پروبیوتیک می‌تواند رویکرد موثرتری برای کنترل طیف وسیعی از پاتوژن‌های غذایی و انسانی باشد. در این بررسی کنترل مثبت (پاتوژن بدون سوپرناتانت) ر شد کامل نشان داد و کنترل منفی (فقط محیط کشت) هیچ ر شدی ندا شت. همچنین سوپرناتانت‌ها به تنهایی (بدون پاتوژن) نیز شفاف باقی ماندند که نشان‌دهنده عدم آلودگی یا رشد میکروبی مزاحم بود. نتایج حاصل از این پژوهش با مطالعات پیشین در زمینه تأثیر ضدباکتریایی ترکیبات تولیدی توسط پروبیوتیک‌ها هم‌راستا بود. حضور ترکیباتی مانند باکتریوسین‌ها، اسیدهای آلی، دی‌اکسیدکربن و پراکسید هیدروژن در سوپرناتانت‌ها می‌تواند علت اصلی فعالیت ضد میکروبی آن‌ها باشد^{[21][22]}. این نتایج نشان می‌دهند که استفاده هدفمند از سوپرناتانت‌های خاص، به‌ویژه در فرمولاسیون‌های غذایی، می‌تواند در کاهش فساد میکروبی و افزایش ایمنی غذایی مؤثر باشد. این روش همچنین از نظر اقتصادی و زیست‌محیطی جایگزین مناسبی برای نگهدارنده‌های شیمیایی رایج به‌شمار می‌آید.

نتیجه گیری نهایی

نتایج این پژوهش نشان داد، سوپرناتانت‌های بدون سلول حاصل از گونه‌های منتخب پروبیوتیکی می‌توانند به‌عنوان عوامل ضد میکروبی مؤثر برای مهار رشد برخی از باکتری‌های عامل فساد مواد غذایی مورد استفاده قرار گیرند. گونه‌هایی مانند *Lactobacillus rhamnosus*، *Pediococcus acidolactici* و *Lactobacillus acidophilus* پتانسیل بالایی در کاهش رشد پاتوژن‌ها از خود نشان دادند که این امر می‌تواند به کاهش وابستگی به نگهدارنده‌های شیمیایی و بهبود ایمنی مواد غذایی کمک کند. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، پیشنهاد می‌شود از این سوپرناتانت‌ها در توسعه ترکیبات طبیعی نگهدارنده مواد غذایی، پوشش‌های ضدباکتری، یا فرمولاسیون‌های پیشرفته در صنایع غذایی استفاده شود. همچنین بررسی‌های تکمیلی در مورد ترکیبات مؤثر موجود در سوپرناتانت‌ها و مکانیزم‌های دقیق اثر آن‌ها، گامی ضروری در مسیر کاربرد تجاری این راهکار زیستی خواهد بود.

تشکر و قدردانی

از تمامی کسانی که در این تحقیق با اینجانب همکاری نمودند، به ویژه جناب آقای دکتر شکر فروش و سرکار خانم دکتر بصیری اساتید محترم بخش بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز نهایت سپاس و قدردانی را دارم.

تأییدیه اخلاقی: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان گزارش نشده است.

سهم نویسندگان: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

منابع

- [1] Gram, L., et al, Food spoilage–interactions between food spoilage bacteria. International Journal of Food Microbiology. (2002) 78(1-2), 79–97.
- [2] Jay, J.M, Modern Food Microbiology. 6th Edition, Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg. (2000) 635 p. <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4615-4427-2>.
- [3] Lorenzo, J. M., et al, Natural compounds for extending the shelf-life of fresh and processed meat products. Meat Science. (2018) 145, 115–120.
- [4] Faraji, S., Kafshgari, M., Akbarian, J & Habibi Najafi, M, Investigating Types of Antimicrobial Packaging Systems. Food Science and Industry Malayer Raisin and Grape Research Institute, Malayer, Iran (Scientific Journal of Packaging Science and Art. (2024) Vol. 14, No. 4, Serial No. 56.
- [5] FAO/WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. (2002).
- [6] Hill, C., et al, The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. (2014) 11(8), 506–514.
- [7] De Vuyst, L., & Leroy, F, Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology. (2007) 13(4), 194–199.
- [8] Langa, S., et al, Antimicrobial activity of supernatants produced by lactic acid bacteria isolated from traditional dairy products. International Journal of Food Microbiology. (2019) 295, 1–10.
- [9] Teixeira, J. S., et al, Lactic acid bacteria as a natural alternative to synthetic preservatives in food systems. Food Bioscience. (2021) 41, 100986.
- [10] Rehaïem, A., et al, Antimicrobial activity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Tunisian traditional fermented foods. African Journal of Microbiology Research. (2014) 8(18), 1935–1943.
- [11] Campana, R., van Hemert, S., & Baffone, W, Strain-specific probiotic properties of lactic acid bacteria and their interference with human intestinal pathogens invasion. Gut Pathogens. (2017) 9(1), 1–12.
- [12] Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L., & Collins, J. K, Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. Journal of Applied Microbiology. (1998) 84(5), 759–768.
- [13] Schillinger, U., and Lücke, F. K, Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. Applied and Environmental Microbiology. (1989) 55(8), 1901–1906.
- [14] Ye, Z., Shentu, H. & Zhou, Q, A novel bacteriocin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, purified from *Lactiplantibacillus plantarum* ZFM9. Food Chemistry. (2024). Volume 451 (Issue 12), Article 139344. DOI: 10.1016/j.foodchem.2024.139344

- [15] Sahoo, T., Jena, P. K., Nagar, N., & Patel, A. K, "Screening of antimicrobial activity of probiotic isolates by microtiter plate-based turbidimetric assay." *Biotechnology Reports*. (2021) 29, e00594. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00594>.
- [16] Li, Z., et al, Purification and antimicrobial mechanism of a novel bacteriocin produced by *Lactiplantibacillus plantarum* FB-2. *Journal of Food Composition and Analysis*, Elsevier. (2023).
- [17] Haghshenas, B., Nami, Y., Yari Khosroushahi, A., & Yari, M. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from traditional dairy products. *Iranian Journal of Microbiology*. (2017) 9(5), 319–327.
- [18] P. M. Davidson and S. Zivanovic, "The use of natural antimicrobials". In: P. Zeuthen, L. Bøgh-Sørensen, editors, *Food preservation technologies*, Woodhead Publishing Limited and CRC Press, (2003).
- [19] Pei, Z., et al, Plantaricin YKX inhibits quorum sensing and biofilm formation in *S. aureus*. *Molecules*, MDPI. (2022) 27(13), 4280; <https://doi.org/10.3390/molecules27134280>.
- [20] Kumar, A., et al, Probiotic potential of *Lactobacillus* strains against Gram-negative pathogens in foods. *Frontiers in Microbiology*. (2021) Volume. 12-2021. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.774903>.
- [21] Yang, Q., et al, Antimicrobial effects of probiotic cell-free supernatants on foodborne pathogens. *Food Control*. (2023) Volume 145, March 2023, 109512. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109512>.
- [22] Fijan, S, Microorganisms with claimed probiotic properties: an overview of recent literature. *Int J Environ Res Public Health*. *Food Control*. (2016) Volume 145, March 2023, 109512.

Investigation of the Inhibitory Effects of Selected Probiotics on the Growth of Marine Bacterial Pathogens in Vitro

Maryam Nasri¹, Seyed Mahdi Ojagh^{*2}, Amin Gholamhosseini³, Maryam Montaseri⁴, Moazameh Kordjazi⁵, Alireza Alishahi⁶

1- Ph.D. Student of Sea Food Processing, Faculty of Fisheries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

2- Associate Prof., Dept of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

3- Department of Clinical Sciences, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran

4- Department of Food Hygiene and Public Health, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran

5- Associate Prof., Dept. of Sea Food Processing, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

6- Associate Prof., Dept. of Sea Food Processing, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

ABSTRACT

Probiotics, as live microorganisms, play a crucial role in maintaining microbial balance and reducing the growth of spoilage bacteria in food products. The supernatants obtained from probiotic cultures contain bioactive compounds such as organic acids, hydrogen peroxide, and bacteriocins, which can serve as natural alternatives to chemical preservatives in the food industry. The aim of this study was to evaluate the inhibitory effect of the supernatants derived from *Lactobacillus acidophilus*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus buchneri*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans*, *Enterococcus faecium*, and *Bacillus licheniformis* against foodborne spoilage and pathogenic bacteria, including *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus cereus*. To assess antimicrobial activity, probiotic supernatants were extracted and tested against target pathogens using a 96-well microplate assay. Bacterial growth was determined by optical density measurement at 600 nm, and the percentage of growth inhibition was calculated accordingly. The findings indicated that the supernatants of *Lactobacillus acidophilus*, *Pediococcus acidilactici* and *Lactobacillus rhamnosus* exhibited the highest inhibitory effects compared to other strains. These results highlight the potential of probiotic-derived metabolites in controlling spoilage microorganisms and enhancing food shelf life. In conclusion, this study demonstrates the high potential of certain probiotic strains in producing bioactive compounds with antimicrobial properties, suggesting their application as natural alternatives to chemical preservatives in the food industry. Future research is recommended to investigate the stability of probiotic supernatants under different food processing and storage conditions, to elucidate the exact antimicrobial mechanisms of the secreted compounds, and to explore their feasibility for industrial-scale applications and active packaging systems

KEYWORDS: Probiotic, Supernatant, Pathogens, Growth Inhibition Percentage

ARTICLE TYPE

Original Research

ARTICLE HISTORY

Received:

2025/04/04

Revised: 10 May 2025

Accepted:

2025/06/05

ePublished:

2025/06/06

* Corresponding Author: Seyed Mahdi Ojagh

Email address: ojagh@ut.ac.ir

Tel:

© Published by Tarbiat Modares University

ISSN: 2322-5513