مجله بوم شناسی آبزیان

Journal homepage: http://jae.hormozgan.ac.ir

جداسازی، شناسایی و ارزیابی فعالیت باکتریوسینی باکتری های اسید لاکتیک از فلور باکتریایی روده ماهی گاریز (*Planiliza klunzingeri*(Day, 1888

فاطمه شایسته

گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

نوع مقاله
پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۲/۱۶
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۳/۱۴
تاریخ چاپ الکترونیک: ۱۴۰۲/۰۹/۳۱

***نویسنده مسئول:**

Shayesteh_fatemeh@yahoo.com

چکیده

باکتریوسین ها پپتید های ضد باکتریایی می باشند که توسط برخی از گونه های باکتری های اسید لاکتیک تولید می شوند. در پژوهش حاضر ۱۸ باکتری اسید لاکتیک از روده ماهی گاریز (*Planiliza klunzingeri*) جداسازی شدند و از نظر تولید باکتریوسین با قابلیت مهار کنندگی پاتوژن های شاخص مواد غذایی مورد ارزیابی قرار گرفتند. باکتریوسین خام حاصل از ۷ جدایه اسید لاکتیک با استفاده از روش لکه گذاری آگار، قادر به مهار پاتوژن های شاخص مواد غذایی بودند که در این میان باکتریوسین حاصل از دو جدایه LK5 و LK12 دارای طیف مهاری وسیع تری در برابر پاتوژن های مورد مطالعه بودند. همچنین باکتریوسین های مورد مطالعه در مقابل آنزیم های پروتئولیتیک حساس بوده و کاملا تخریب شدند در صورتی که در زمان مواجهه با طیف وسیعی از دترجنت ها، تغییرات pH و حرارت، فعالیت ضد باکتریایی خود را حفظ کردند. با تجزیه و تحلیل توالی ژن 16S rRNA ، جدایه های LK5 و LK12 با میزان تشابه به ترتیب ۹۸/۵۵ و ۹۹/۴۶ درصد، به عنوان *Lactobacillus plantarum* شناسایی شدند. با توجه به اطلاعات به دست آمده از مطالعه حاضر، می توان بیان نمود که فلور باکتریایی روده ماهی گاریز مخزن زیستی مناسبی برای جداسازی باکتری های تولید کننده باکتریوسین بوده و همچنین باکتریوسین های تولید شده توسط باکتری های *L. Plantarum LK5* و *L. Plantarum LK12* قابلیت مطالعه به عنوان نگهدارنده های زیستی در صنایع غذایی را دارند.

کلید واژه‌ها: باکتری های اسید لاکتیک، باکتریوسین، خلیج فارس، *Lactobacillus plantarum*

مقدمه

یکی از مشکلات بهداشت عمومی جهان، بیماری های قابل انتقال از غذا به انسان می باشد که تاثیر چشمگیری بر اقتصاد و سلامت کشورهای در حال توسعه دارد (Heredia and Garcia, 2018) بنابراین عدم رعایت اصول و موازین بهداشتی در مراحل مختلف تولید، نگهداری، توزیع و مصرف مواد غذایی سبب بروز بیماری و یا مسمومیت های مختلف غذایی در سطح جامعه می گردد. در این میان باکتری ها به عنوان مهمترین عامل فساد مواد غذایی، باعث ایجاد بیماری های دستگاه گوارش در مصرف کنندگان می شوند. بنابراین به منظور افزایش ایمنی مواد غذایی نیاز به ارائه راهکاری مناسب می باشد (Zunabovic *et al.*,2011) درحال حاضر طیف وسیعی از مواد نگهدارنده شیمیایی جهت پیشگیری از مسمومیت و عفونت غذایی توسط باکتری ها، در صنایع غذایی در حال استفاده می باشد اما به دلیل اثرات مضر این گونه مواد شیمیایی صنعتی در مصرف کنندگان مانند سمیت و سرطان زا بودن آنها، باعث ایجاد نگرانی های زیادی شده است. بنابراین به منظور مهار رشد باکتری های بیماری زا و افزایش طول عمر مواد غذایی در جهت ارتقا کیفیت فراورده های غذایی، استراتژی استفاده از نگهدارنده های

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-05-19]

زیستی مورد توجه قرار گرفته است (Mirdamadi and Agha Ghazvini, 2015). در این راستا پژوهش‌های زیادی به منظور شناسایی و تولید ترکیبات ضد میکروبی جدید به عنوان نگهدارنده های زیستی جهت استفاده در صنایع غذایی صورت گرفته است (Lahiri *et al.*, 2022). از میان نگهدارنده های زیستی که بسیار مورد توجه واقع شده است، گروهی از پپتیدهای ضد میکروبی به عنوان باکتریوسین ها می باشند. باکتریوسین ها پپتیدهای زیست فعال سنتز شده ریبوزومی هستند که توسط باکتری ها تولید شده و دارای خاصیت ضد میکروبی می‌باشند. این ترکیبات با افزایش نفوذ پذیری غشای سیتوپلاسمی سلول های هدف باعث انتشار ذرات کوچک سیتوپلاسمی، دپلاریزه شدن پتانسیل غشای سلولی و در نهایت مرگ سلول های باکتری می شود (Lahiri *et al.*, 2022). طیف وسیعی از باکتری ها قابلیت تولید باکتریوسین را دارند (Sobrino-Lopze and Martin-Belloso, 2008) اما در میان باکتریوسین های شناسایی شده از باکتری های متفاوت، باکتریوسین های تولید شده توسط باکتری های اسید لاکتیک، توجه ویژه ای را در صنایع غذایی به عنوان نگهدارنده های زیستی به خود جلب کرده است (Cotter *et al.*, 2005). خانواده باکتری های اسید لاکتیک دارای بیش از ۶۰ جنس می باشند که با توجه به ویژگی ایمنی زیستی و قابلیت مصرف آنها به وسیله انسان، توجه زیادی را به خود جلب کرده است (Balciunas *et al.*, 2013; Mokoena, 2017). پژوهش های متعددی در ارتباط با استفاده از باکتریوسین هایی نظیر نایسین، ساکسین K، لاکتیسین ۳۱۴۷، پدیوسین PA-1 و انتروسین A و B در محصولات مختلف غذایی از جمله محصولات لبنی، گوشتی، دریایی، سبزی ها و آب میوه ها به تنهایی و یا به همراه فرایندهای صنعتی از جمله میدان های الکتریکی پالسی، فشار هیدروستاتیک بالا، بسته بندی فعال و تیمارهای حرارتی به منظور از بین بردن پاتوژن های شاخص مواد غذایی صورت پذیرفته که منجر به مهار پاتوژن های مورد نظر گشته است (Galvez *et al.*, 2008).

تنوع فیلوژنتیکی در دریاها به دلیل شرایط فیزیکوشیمیایی موجود در آنها به صورت قابل توجهی بیشتر از خشکی می باشد. میکروارگانیسم های دریایی به دلیل خصوصیات منحصر به فرد مانند سازگاری با نوسانات فیزیکی و شیمیایی محیط زیست خود، متابولیت های زیست فعال متنوع تری را نسبت به همتایان خود در محیط خشکی تولید می کنند (Boeuf *et al.*, 2019). روده دارای وظایف متعددی از جمله جذب مواد غذایی و تنظیم میکروفلور روده ای می باشد (Rajan and Deivasigamani, 2018). از طرفی دستگاه گوارش مهره داران به دلیل لایه سلولی اپیتلیال، مهمترین سد در برابر محیط خارجی را تشکیل می دهد. ماهیان به دلیل اینکه در مقایسه با مهره داران موجود در خشکی، در معرض میکروارگانیسم های بیشتری هستند (Martin *et al.*, 2016)، فلور میکروبی روده آنها بسیار متنوع بوده و تحت تاثیر عوامل متعددی از جمله شرایط محیط زیست و نوسانات فیزیکوشیمیایی آب می باشد(Sahu *et al.*, 2007; Migaw *et al.*, 2014) . با توجه به اهمیت مطالب ذکر شده، مطالعه حاضر با هدف جداسازی باکتری های اسید لاکتیک تولید کننده باکتریوسین از دستگاه گوارش ماهیان گاریز (*Planiliza klunzingeri* Day, 1888) انجام شد. قابلیت مهار کنندگی پاتوژن های شاخص مواد غذایی توسط باکتریوسین ها و همچنین پایداری باکتریوسین ها در برابر تیمارهای مختلف نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. در نهایت باکتری های منتخب به روش تکثیر ژن 16SrRNA شناسایی شدند.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری و جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک

ماهیان مورد استفاده در این تحقیق (۲۰ عدد ماهی*P. Klunzingeri* با وزن تقریبی ۳۰۰ گرم) در شهریور ۱۴۰۰ از سواحل شمالی خلیج فارس در بندرعباس صید شدند. بلافاصله پس از صید، ماهیان با آب دریای استریل شستشو شده و در کیسه های پلاستیکی استریل قرار داده شدند و با استفاده از فلاسک یخ به آزمایشگاه واقع در دانشکده علوم و فنون دریایی دانشگاه هرمزگان منتقل گردیدند. به منظور جداسازی باکتری های اسید لاکتیک از روده ماهیان جمع آوری شده، ابتدا سطح شکمی

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-05-19]

ماهیان با الکل ۷۰ درصد ضدعفونی شده و در شرایط استریل اقدام به باز کردن شکم ماهیان شد و روده آنها خارج گردید. سپس روده ها با استفاده از بافر فسفات خنثی و استریل (pH=7.5, PBS) سه بار شستشو شد و پس از هموژن کردن بافت های روده، میزان ۱ گرم از آن توزین گردید و با استفاده از لوله های حاوی PBS استریل به صورت متوالی از بافت هموژنیزه شده رقت متوالی تهیه گردید. سپس میزان ۰/۱ میلی لیتر از رقت های 10^{-1}تا 10^{-8} بر روی محیط کشت MRS agar (مرک، آلمان) حاوی ۱/۵ درصد کلرید سدیم، به صورت سه تکرار از هر رقت و به روش پور پلیت کشت داده شد. تمام پلیت ها به مدت یک هفته در جار بی هوازی و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس گرم خانه گذاری شد. پس از طی کردن زمان گرم خانه گذاری، کلنی های با مرفولوژی متفاوت انتخاب شده و در محیط کشت MRS agar حاوی ۱/۵ درصد کلرید سدیم به صورت خطی کشت داده شد و در صورت مشاهده کلنی هایی با مرفولوژی یکسان پس از رشد، به عنوان جدایه خالص در نظر گرفته شد. در نهایت کشت های خالص در محیط کشت MRS broth حاوی ۵۰ درصد گلیسرول در دمای ۲۰- درجه سلسیوس جهت انجام مراحل بعدی پژوهش نگهداری شدند (Sahu *et al.*, 2007; Migaw *et al.*, 2014).

بررسی برخی از خصوصیات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی باکتری های اسید لاکتیک جداسازی شده

باکتری های اسید لاکتیک جداسازی شده از روده ماهی گاریز از نظر برخی از خصوصیات مرفولوژیکی و بیوشیمیایی شامل شکل کلنی و سلول باکتری، رنگ آمیزی گرم و تولید اسپور مورد بررسی قرار گرفت (Sneath *et al.*, 1986).

پاتون‌های مورد مطالعه

در این پژوهش پاتوژن‌های شاخص مواد غذایی شامل باکتری های گرم مثبت *Listeria innocoa* ATCC 33090، *Staphylococcus aures* PTCC 1431، *Bacillus cereus* PTCC 1247، *Streptococcus pyogenes* PTCC 1522 و باکتری های گرم منفی *Salmonella typhi* PTCC 1609، *Shigella flexner* PTCC 1865، *Pseudomonas aeruginosa* PTCC 1707 و *Escherichia coli* PTCC 1399 به منظور بررسی فعالیت ضد باکتریایی باکتریوسین های تولید شده توسط باکتری های جداسازی شده از روده ماهی گاریز، از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم های صنعتی تهیه شدند. هر پاتوژن در محیط کشت تریپتون سوی براث تا رسیدن مرحله لگاریتمی کشت داده شد و سپس با غلظتی معادل نیم مک فارلند (10^8 CFU/ml × ۱/۵) مورد استفاده قرار گرفتند (Seuk-Hyun and Cheol, 2000).

بررسی فعالیت باکتریوسینی باکتری های اسید لاکتیک

باکتری های اسید لاکتیک جداسازی شده به دو روش کشت متقاطع خطی و لکه گذاری آگار جهت تولید باکتریوسین مورد ارزیابی قرار گرفتند.

روش کشت متقاطع خطی

ابتدا باکتری های اسید لاکتیک جدا سازی شده به مدت ۲۴ ساعت در شرایط بی هوازی در محیط کشت MRS broth حاوی ۲٪ کلرید سدیم کشت داده شدند سپس هر کدام از آنها به صورت جداگانه در مرکز پلیت حاوی محیط کشت MRS agar و ۲ درصد کلرید سدیم به صورت یک خط مستقیم کشت داده شدند. پلیت های کشت داده شده به مدت ۴۸ ساعت در شرایط بی

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-05-19]

هوازی و دمای ۳۰ درجه سلسیوس گرماگذاری شدند سپس پاتوژن های شاخص مواد غذایی به صورت یک خط عمود بر خط اصلی کشت باکتری های اسید لاکتیک و با فاصله ۱ سانتی متر کشت داده شدند. همچنین فاصله کشت های خطی پاتوژن ها از هم ۱ سانتی متر در نظر گرفته شد. در ادامه پلیت ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری گردیدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت، وجود یا عدم وجود هاله عدم رشد پاتوژن ها ثبت گردید (Valli *et al.*, 2012).

روش لکه گذاری آگار

در این مرحله باکتریوسین تولید شده توسط جدایه هایی که در روش کشت متقاطع خطی دارای فعالیت ضد میکروبی در مقابل پاتوژن های شاخص مواد غذایی بودند، جداسازی گردید و با استفاده از روش لکه گذاری آگار طیف فعالیت باکتریوسینی آنها مطابق با روش Todorov (2008) بر علیه باکتری‌های بیماری‌زا مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور باکتری های منتخب در محیط کشت MRS broth و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس گرماگذاری شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت، کشت ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰ rpm و دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شده و محلول رویی آنها جدا گردید. به منظور خنثی کردن اثر اسیدهای آلی، pH مایع رویی با هیدروکسید سدیم ۱ مولار استریل روی ۶ تنظیم گردید. همچنین جهت غیر فعال سازی پر اکسید هیدروژن، مایع رویی به دست آمده از هر باکتری به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری ۸۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. سپس سوپرناتانت هر باکتری به صورت جداگانه از فیلتر غشایی (0.2 µm pore membrane, Millipore, bed ford, USA) عبور داده شد و به عنوان باکتریوسین خام مورد استفاده قرار گرفت. میکروارگانیسم های بیماریزا در غلظت نهاییCFU/ml ۱۰^{۸} × ۱/۵ به صورت چمنی در محیط کشت تریپتون سوی آگار کشت داده شد و میزان ۱۰ میکرولیتر از باکتریوسین خام در سطح پلیت ها قرار داده شد. پس از طی کردن دوره گرمخانه گذاری در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت، هاله عدم رشد بزرگتر از ۵ میلی متر به عنوان فعالیت باکتریوسین در نظر گرفته شد.

بررسی تاثیر آنزیم، pH، دما و دترجنت ها بر فعالیت باکتریوسین

به منظور مطالعه اثر تیمارهای متفاوت بر فعالیت باکتریوسینی، باکتریوسین خام استخراج شده از جدایه های اسید لاکتیک به روش لکه گذاری مورد سنجش قرار گرفت (Todorov, 2008). حساسیت باکتریوسین تولید شده به آنزیم های تریپسین، پروتئیناز K، لیزوزیم، لیپاز و آلفا آمیلاز با غلظت نهایی۱ میلی گرم در میلی لیتر هر کدام از آنزیم ها مورد بررسی قرار گرفت و در دمای اتاق گرمخانه گذاری شد. پس از گذشت ۲ ساعت فعالیت باکتریوسینی آنها سنجیده شد. به منظور بررسی پایداری حرارتی، باکتریوسین های خام در معرض درجه حرارت های مختلف شامل ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ درجه سلسیوس (به مدت ۳۰ دقیقه)، ۱۲۱ درجه سلسیوس (به مدت ۲۰ دقیقه) و در نهایت ۴ درجه سلسیوس (به مدت ۳ ماه) قرار گرفته و در نهایت فعالیت باکتریوسینی آنها ارزیابی گردید. همچنین به منظور بررسی اثر شرایط اسیدی و بازی بر فعالیت باکتریوسین، pH باکتریوسین خام به وسیله هیدروکسید سدیم و اسید کلریدریک ۵ مولار بین ۲-۹ تنظیم شد و پس از نگهداری در دمای اتاق به مدت ۲ ساعت، فعالیت باکتریوسین مورد سنجش قرار گرفت. اثر انواع دترجنت ها مانند SDS، Tween 20، Tween 80 (غلظت ۱ درصد) و EDTA در غلظت های ۰/۱ ، ۲ و ۵ میلی مولار، بر روی فعالیت باکتریوسین خام سنجیده شد. بدین منظور انواع دترجنت ها با غلظت های ذکر شده به باکتریوسین خام حاصل از باکتری های مختلف به صورت جداگانه افزوده شد و پس از گذشت ۵ ساعت در دمای اتاق، فعالیت باکتریوسین مجدد سنجیده شد. باکتریوسین های خام جدایه های انتخاب شده که هیچ تیماری روی آن صورت نگرفته بود، به عنوان شاهد در نظر گرفته شد و درصد فعالیت باقی مانده باکتریوسین نسبت به شاهد محاسبه گردید. تمام مراحل آزمایش با سه بار تکرار و به صورت مستقل از هم انجام شد (Todorov *et al.*, 2008).

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-05-19]

شناسایی باکتری های اسید لاکتیک به روش تکثیر ژن 16S rRNA

به منظور شناسایی مولکولی جدایه های منتخب، DNA باکتری ها به روش جوشاندن استخراج گردید (Chen *et al.*, 2009). بدین منظور کشت تازه باکتری ها به میکروتیوپ حاوی ۱ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه استریل منتقل شد و سپس میکروتیوپ ها در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. پس از گذشت ۱۵ دقیقه، نمونه ها بلافاصله درون ظرف یخ به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شدند و در نهایت به مدت ۵ دقیقه درrpm ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ گردیدند و مایع رویی حاوی DNA به میکروتیوپ های استریل جدید منتقل شدند. جهت اطمینان از استخراج DNA، DNA استخراج شده با روش الکتروفوزز و با استفاده از ژل آگارز ۱٪ مورد بررسی قرار گرفت. واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) جهت تکثیر ژن 16S rRNA، با استفاده از پرایمرهای ('5-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 9F و ('5-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') 1541 R انجام گردید(Boulares *et al.*, 2013) . PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱ میکرولیتر DNA باکتری‌های مورد مطالعه، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر، ۱۲/۵ میکرولیتر مستر میکس و ۱۰/۵ میکرولیتر آب دیونیزه استریل انجام شد. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (مدل $BIORADT100^{TM}$) با شرایط ۱ دقیقه واسرشته شدن اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس و در ادامه ۳۰ سیکل شامل واسرشته شدن در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه انجام شد. پس از بررسی کیفیت و کمیت محصول PCR با استفاده از دستگاه الکتروفورز و اسپکتروفوتومتر، نمونه جهت تعیین توالی به روش سنگر به شرکت ژن فناوران ارسال گردید. توالی های تعیین شده با استفاده از نرم افزار Chromas بازنگری شد و سپس در پایگاه اطلاعاتی NCBI، هم ردیف سازی گردید و درصد همسانی آنها مورد بررسی قرار گرفت (Dastgeib *et al.*, 2012). در انتها با استفاده از نرم افزار MEGA X، توالی ها هم ردیف شده و درخت فیلوژنی باکتری ها با روش Neighbor-Joining و Bootstrap برابر ۱۰۰۰ تکرار، ترسیم شد (Kimura 1980; Kumar *et al.*, 2018)

نتایج

در این مطالعه ۱۸ باکتری اسید لاکتیک با استفاده از محیط کشت MRS Agar از روده ماهیان گاریز جد اسازی و خالص سازی شده و از نظر تولید باکتریوسین مورد بررسی قرار گرفتند. خصوصیات مرفولوژیکی و بیوشیمیایی جدایه ها در جدول ۱ ارائه شده است. ابتدا فعالیت ضد میکروبی جدایه ها با استفاده از روش کشت خطی متقاطع بر علیه باکتری های بیماریزای شاخص مواد غذایی، مورد ارزیابی قرار گرفت که از میان آنها، ۱۶ جدایه دارای فعالیت ضد میکروبی بر علیه حداقل یک پاتوژن از ۸ پاتوژن مورد مطالعه بودند و ۲ جدایه (LK6, LK10) هیچ گونه فعالیت مهاری را بر علیه هیچ کدام از پاتوژن ها نشان ندادند (جدول ۱). پس از تنظیم pH مایع رویی این جدایه ها بر روی ۶/۵، فعالیت ضد باکتریایی ۱۳ جدایه به روش لکه گذاری آگار حفظ گردید. در مرحله بعد، ۵ جدایه از میان ۱۳ جدایه پس از غیر فعال کردن پر اکسید هیدروژن (قرار دادن سوپرناتانت باکتری ها در ۸۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه)، فعالیت ضد میکروبی خود را از دست دادند که این نتایج نشان می دهد مهار پاتوژن ها توسط این جدایه ها به دلیل تولید پر اکسید هیدروژن بوده و فقط ۷ جدایه شامل LK2، LK5، LK8، LK11، LK12، LK14 و LK15 فعالیت مهاری خود را حفظ کردند (جدول۲).

همان گونه که در جدول ۲ ملاحظه می گردد، بیشترین دامنه فعالیت مهار کنندگی باکتریوسین خام در جدایه های LK5 و LK12 مشاهده گردید به طوری که این جدایه ها قادر به مهار رشد ۷ پاتوژن از ۸ پاتوژن مورد بررسی بودند. حساس ترین پاتوژن نسبت به باکتریوسین تولید شده توسط این جدایه ها، *S. thypi* PTCC 1609 بود به طوری که جدایه LK5 هاله ای به

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-05-19]

قطر ۰/۴ ± ۱۵/۰ میلی متر و جدایه LK12 هاله‌ای به قطر ۰/۶ ± ۱۴/۰ میلی متر در محیط کشت این پاتوژن به وجود آوردند (جدول ۲). از طرفی باکتریوسین تولید شده توسط جدایه هایLK11، LK14 و LK15 فعالیت مهاری بر علیه پاتوژن های گرم منفی (*S. thyphi, E. coli, Sh. flexneri* and *P. aeruginosa*) نداشتند و تنها قادر به مهار پاتوژن های گرم مثبت (*L. Innocoa, S. aureus, B. subtilis* and *S. pyogenes)* بودند به طوری که باکتریوسین تولید شده توسط جدایه LK11، بیشترین فعالیت مهاری را در برابر *S. aures* (۰/۷ ± ۱۱/۸ میلی متر) نشان داد. همچنین *S. pyogenes* بیشترین حساسیت را نسبت به باکتریوسین های جداسازی شده از جدایه های LK14 (۰/۸ ± ۸۴/ ۱۳) و LK15 (۰/۸ ± ۱۳/۷۸) نشان داد. بیشترین فعالیت بازدارندگی باکتریوسین جدایه های LK2 و LK8 ، بر علیه پاتوژن *S. pyogenes* با تشکیل قطر هاله عدم رشد به ترتیب ۰/۸ ± ۱۲/۰ و ۰/۳ ± ۱۲/۲۳ ثبت گردید.

به منظور بررسی ماهیت ترکیب مهار کننده رشد پاتوژن ها و همچنین بررسی مقاومت آن در شرایط متفاوت، از باکتریوسین خام تولید شده توسط جدایه های LK5 و LK12 که دارای بیشترین دامنه مهار کنندگی در برابر پاتوژن ها بودند، استفاده شد و پاتوژن *S. typhi* به عنوان اندیکاتور مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۲). پس از مواجهه باکتریوسین ها با آنزیم های تریپسین و پروتئیناز K اثر مهار کنندگی باکتریوسین حاصل از هر دو جدایه کاملا از بین رفت که این موضوع ماهیت پروتئینی بودن عامل مهاری را تایید می کند در صورتی که آنزیم های آلفا آمیلاز، لیزوزیم و لیپاز هیچ تاثیری بر فعالیت ضد میکروبی این ترکیبات نداشت. باکتریوسین حاصل از دو جدایه ذکر شده دارای مقاومت بالایی نسبت به دما بودند به طوری که باکتریوسین حاصل از جدایه LK5 در تمام شرایط دمایی مورد ارزیابی، فعالیت خود را به طور کامل حفظ کرد و باکتریوسین خام جدایه LK12 دردماهای ۱۰۰ و ۱۲۱ درجه سلسیوس به ترتیب ۴ و ۲۰ درصد از فعالیت خود را از دست داد. همچنین اثر ضد میکروبی باکتریوسین خام جدایه های مورد بررسی در شرایط اسیدی کاملا پایدار بودند و تنها در pHهای ۸ و ۱۰ فعالیت مهاری آنها به میزان کمی کاهش پیدا کرد. از طرفی باکتریوسین تولید شده توسط جدایهLK5 پس از در معرض قرار گرفتن با ۱ درصد از دترجنت های SDS، Tween20، Tween20 و ۰/۱ مولار EDTA فعالیت مهاری خود را حفظ کرده ولی در زمان مواجهه با غلظت های ۲ و ۵ میلی مولار EDTA فعالیت آن کاهش پیدا کرد. در صورتی که فعالیت باکتریوسین حاصل از جدایهLK12 پس از مواجهه با تمام دترجنت های مورد استفاده کاهش یافت (جدول ۲).

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-05-19]

جدول ۱. خصوصیات مرفولوژیکی و بیوشیمیایی و دامنه بازدارندگی جدایه ها در مهار پاتوژن به روش کشت متقاطع خطی

کد جدایه	خصوصیات مرفولوژیکی و بیوشیمیایی	دامنه بازدارندگی پاتوژن ها
LK1	باسیل گرم مثبت دارای کلنی های بزرگ، گرد و کرم رنگ. فاقد اسپور	*S. typhi, E. coli*
LK2	کوکو باسیل گرم مثبت دارای کلنی های کوچک، گرد و کرم رنگ. فاقد اسپور	*L. innocoa, S. aureus, fh. Flexneri, S. pyogenes*
LK3	باسیل گرم مثبت دارای کلنی های کوچک، گرد و سفید رنگ. فاقد اسپور	*S. aureus, B. cereus*
LK4	کوکو باسیل گرم مثبت دارای کلنی های متوسط، گرد و کرم رنگ. فاقد اسپور	*L. innocoa, S. aureus, fh. Flexneri, E. coli*
LK5	باسیل گرم مثبت دارای کلنی های کوچک، گرد و سفید رنگ. فاقد اسپور	*L. innocoa, S. aureus, S. thyphi, fh. Flexneri, B. cereus, P. aeruginosa, S. pyogenes*
LK6	کوکسی گرم مثبت دارای کلنی های کوچک، گرد و سفید رنگ. فاقد اسپور	فاقد فعالیت بازدارندگی
LK7	کوکو باسیل گرم مثبت دارای کلنی های کوچک، گرد و سفید رنگ. فاقد اسپور	*S. thyphi*
LK8	باسیل گرم مثبت دارای کلنی های متوسط، گرد و کرم رنگ. فاقد اسپور	*S. aureus, S. thyphi, B. cereus, S. pyogenes*
LK9	کوکسی گرم مثبت دارای کلنی های بزرگ، گرد و زرد رنگ. فاقد اسپور	*S. aureus, B. cereus, S.pyogenes, E. coli*
LK10	باسیل گرم مثبت دارای کلنی های کوچک، گرد و سفید رنگ. فاقد اسپور	فاقد فعالیت بازدارندگی
LK11	کوکسی گرم مثبت دارای کلنی های بزرگ، گرد و زرد رنگ. فاقد اسپور	*S. aureus, S. thyphi, B. cereus, S.pyogenes*
LK12	باسیل گرم مثبت دارای کلنی های کوچک، گرد و کرم رنگ. فاقد اسپور	*L. innocoa, S. thyphi, fh. Flexneri, B. cereus, P. aeruginosa, S. pyogenes, E. coli*
LK13	کوکو باسیل گرم مثبت دارای کلنی های متوسط، گرد و زرد رنگ. فاقد اسپور	*B. cereus, P. aeruginosa, E. coli*
LK14	باسیل گرم مثبت دارای کلنی های کوچک، گرد و سفید رنگ. فاقد اسپور	*S. aureus, B. cereus, S.pyogenes*
LK15	باسیل گرم مثبت دارای کلنی های کوچک، گرد و سفید رنگ. فاقد اسپور	*S. aureus, B. cereus, S.pyogenes*
LK16	کوکو باسیل گرم مثبت دارای کلنی های بزرگ، گرد و کرم رنگ. فاقد اسپور	*S. thyphi, fh. Flexneri, B. cereus, S. pyogenes, E. coli*
LK17	کوکسی گرم مثبت دارای کلنی های کوچک، گرد و زرد رنگ. فاقد اسپور	*P. aeruginosa, E. coli*
LK18	کوکسی گرم مثبت دارای کلنی های بزرگ، گرد و سفید رنگ. فاقد اسپور	*L. innocoa*

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-05-19]

جدول ۲. دامنه فعالیت ضد باکتریایی باکتریوسین خام تولید شده توسط باکتری های اسید لاکتیک به روش لکه گذاری روی آگار (هاله عدم رشد بر حسب میلی متر)

کد جدایه‌ها	پاتوژن‌ها							
	L. innocoa	*S. aureus*	*S. thyphi*	*Sh. flexneri*	*B. cereus*	*P. aeroginosa*	*S. pyogenes*	*E. coli*
Lk2	۶/۲۵ ± ۰/۳	۹/۲ ±۰/۳	–	۷/۳۱ ±۰/۵	–	–	۱۲/۰ ± ۰/۸	–
LK5	۱۱/۴۳ ±۰/۷	۱۰/۴۳ ± ۰/۹	۱۵/۰ ± ۰/۴	۸/۸۳ ±۰/۹	۱۱/۹۲ ±۰/۵	۱۲/۲۶ ± ۰/۴	۱۱/۲۷ ± ۰/۴۷	–
LK8	–	۱۱/۹۲ ± ۰/۵	۱۰/۷۷ ±۰/۶	–	۹/۱۶ ±۰/۹	–	۱۲/۲۳ ± ۰/۳	–
LK11	–	۱۱/۸ ±۰/۷	–	–	۱۰/۸۳ ± ۰/۸	–	۱۰/۲۷ ± ۰/۶	–
LK12	۱۱/۲۶ ± ۰/۳	–	۱۴/۰ ±۰/۶	۱۲/۴۵ ± ۰/۶	۷/۸۶ ± ۰/۳	۱۰/۴۴ ± ۰/۵	۱۱/۵۵ ±۰/۵	۹/۸۵ ± ۰/۵
LK14	–	۸/۵۳ ±۰/۶	–	–	۸/۱۴ ± ۰/۳	–	۱۳/۸۴ ± ۰/۸	–
LK15	–	۱۱/۳۶ ± ۰/۸	–	–	۶/۳۶ ±۰/۴	–	۱۳/۷۸ ± ۰/۸	–

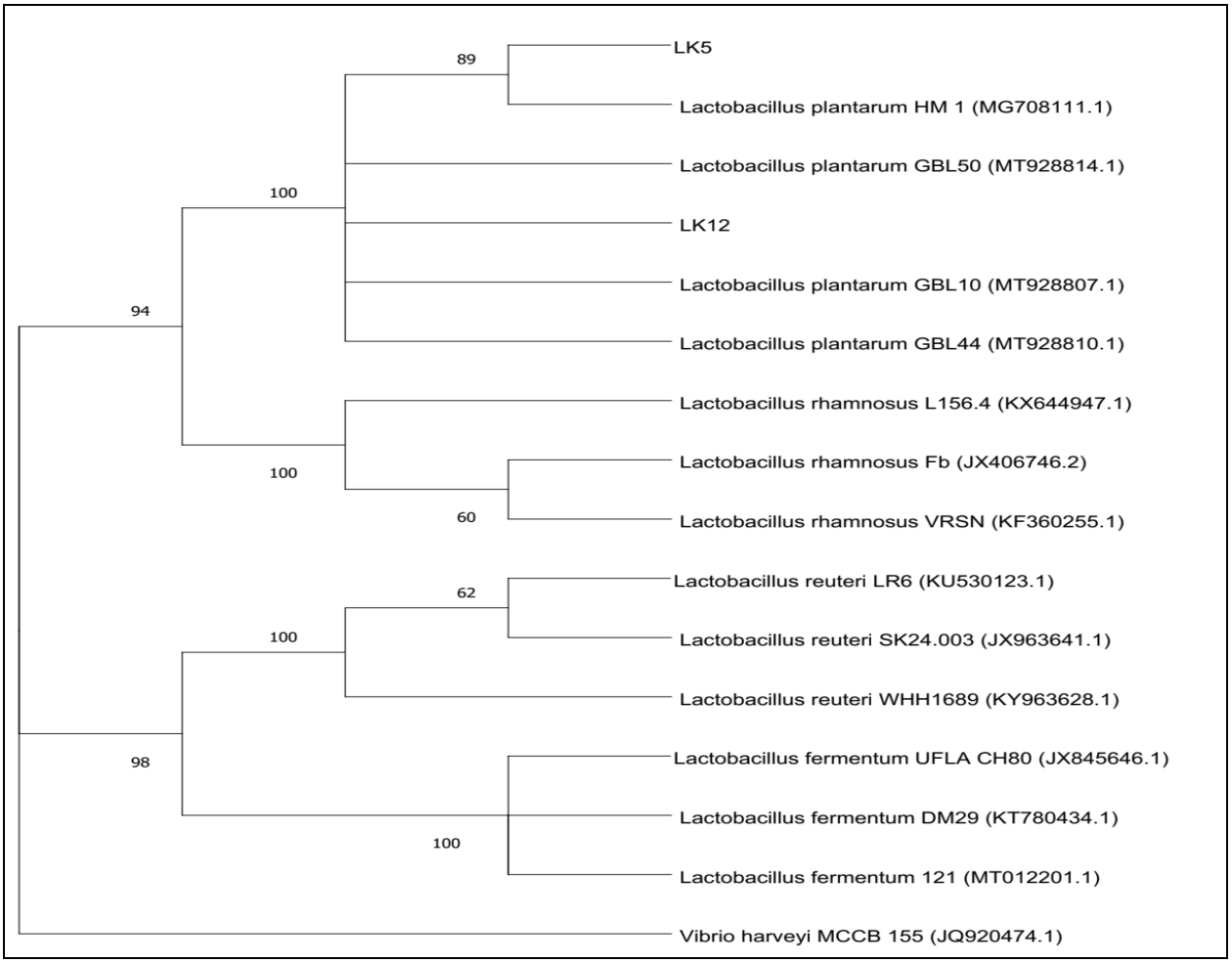
دو جدایه LK5 و LK12 که دارای وسیع ترین طیف مهاری پاتوژن ها بودند، توسط توالی یابی ژن 16S rRNA با توالی ۱۵۰۰ جفت باز شناسایی شدند. بررسی ژن 16S rRNA نشان داد که هردو جدایه بیشترین تشابه را به گونه *L. plantarum* دارند. جدایه LK5 بیشترین تشابه (۹۸/۵۵ درصد) را به L. plantarum HM1 (MG708111.1) و جدایه LK12 بیشترین تشابه (۹۹/۴۶ درصد) را به *L. plantarum* GBL 10 (MT928807.1) نشان داد. توالی های ژن 16S rRNA جدایه های LK5 و LK12 در NCBI به ترتیب با شماره های دسترسی OQ824956 و OQ824957 ثبت گردید. درخت فیلوژنیک روابط تکاملی توالی نوکلئوتیدی ژن 16S rRNA دو جدایه LK5 و LK12 در شکل ۱ ارائه شده است.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-05-19]

جدول ۳. بررسی اثر آنزیم، حرارت، pH و دترجنت ها بر فعالیت باکتریوسین تولید شده توسط جدایه های LK5 و LK12 در مقابل سویه اندیکاتور *S. thyphi* به روش لکه گذاری آگار

ویژگی تیمار	درصد فعالیت باقی مانده باکتریوسین حاصل از جدایه ها	
	LK5	LK12
شاهد	۱۰۰	۱۰۰
آنزیم (۲ساعت در دمای اتاق)		
تریپسین	صفر	صفر
پروتئیناز k	صفر	صفر
لیزوزیم	۱۰۰	۱۰۰
لیپاز	۱۰۰	۱۰۰
آلفا آمیلاز	۱۰۰	۱۰۰
دما (درجه سلسیوس)		
۴۰ (۳۰ دقیقه)	۱۰۰	۱۰۰
۶۰ (۳۰ دقیقه)	۱۰۰	۱۰۰
۸۰ (۳۰ دقیقه)	۱۰۰	۱۰۰
۱۰۰ (۳۰ دقیقه)	۱۰۰	۹۶
۱۲۱ (۲۰ دقیقه)	۱۰۰	۸۰
۴ (۳ ماه)	۱۰۰	۱۰۰
pH (۲ ساعت در دمای اتاق)		
۲	۱۰۰	۱۰۰
۴	۱۰۰	۱۰۰
۶	۱۰۰	۱۰۰
۸	۹۶	۹۰
۱۰	۸۰	۸۰
دترجنت ها		
SDS (۱ درصد، ۵ساعت در دمای اتاق)	۱۰۰	۹۰
Tween 20 (۱ درصد، ۵ ساعت در دمای اتاق)	۱۰۰	۹۵
Tween 80 (۱ درصد، ۵ ساعت در دمای اتاق)	۱۰۰	۹۵
EDTA (۰/۱میلی مولار، ۵ ساعت در دمای اتاق)	۱۰۰	۸۰
EDTA (۲ میلی مولار، ۵ ساعت در دمای اتاق)	۸۰	۷۰
EDTA (۵ میلی مولار، ۵ ساعت در دمای اتاق)	۶۵	۵۵

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-05-19]



شکل ۱. درخت فیلوژنتیک توالی های نوکلئوتیدی ژن 16S rRNA در جدایه های LK5 و LK12

بحث

دستگاه گوارش ماهیان اولین جایگاه مناسب جهت تجمع و کلونیزه شدن باکتری های مفید می باشد (Zhou *et al.*, 2022) که در این میان، باکتری های اسید لاکتیک بزرگترین اجتماعات باکتریایی را به خود اختصاص می دهند (Alonso *et al.*, 2019; Patel et al., 2020). عوامل متفاوتی اعم از فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب، تغییر فصول، تفاوت فیزیولوژیکی و رفتار تغذیه آبزیان بر نوع گونه های باکتریایی موجود در دستگاه گوارش آنها تاثیر می گذارد (Romero *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2019). در پژوهش حاضر ۱۸ باکتری اسید لاکتیک از روده ماهیان گاریز جداسازی گردید و دو باکتری LK5 و LK12 به دلیل طیف مهاری وسیع باکتریوسین تولید شده توسط آنها در مقابل انواع پاتوژن ها، با استفاده از روش مولکولی مورد شناسایی قرار گرفتند که هر دو باکتری متعلق به گونه *L. plantarum* بودند. باکتری *L. plantarum* یکی از مهمترین و متنوع ترین گونه از خانواده باکتری های اسید لاکتیک می باشد که به دلیل قابلیت تخمیر انواع مختلف کربوهیدرات ها و دارا بودن ژنوم بزرگ و آنزیم های متفاوت، گسترده ترین دامنه زیستگاهی را در میان گونه های دیگر باکتری های اسید لاکتیک دارند (De Varis et al., 2006). در مطالعات پیشین نیز جداسازی باکتری *L. Plantarum* از دستگاه گوارش آبزیان گزارش گردیده است. Song و همکاران (۲۰۲۰) سویه *L. Plantarum 12* را از دستگاه گوارش ماهی توربوت (*Scophthalums maximus*) جداسازی کردند. همچنین Zaghloul و همکاران (۲۰۲۲) موفق به جداسازی باکتری *L. Plantarum* E16 از روده میگوهای آب شور شدند. Canak و همکاران (۲۰۱۸) نیز سویه *L. plantarum* O1 را از دستگاه گوارش ماهی سیبریم جداسازی کردند.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-05-19]

نتایج حاصل از طیف مهاری باکتریوسین های حاصل از جدایه های مورد مطالعه نشان داد که جدایه های LK 11، LK 14 و LK15 تنها قادر به مهار رشد پاتوژن های گرم مثبت بودند در صورتی که باکتریوسین حاصل از جدایه های LK 2، LK5، LK8 و LK 12 بر علیه پاتوژن های گرم مثبت و گرم منفی فعال بودند، این در حالی است که باکتریوسین های تولید شده توسط باکتری های اسید لاکتیک از جمله *L. plantarum* معمولاً قادر به مهار باکتری های گرم منفی نبوده و تنها گزارش های محدودی از مهار باکتری های گرم منفی توسط باکتریوسین جداسازی شده توسط آنها ارائه گردیده است (Sakr et al., 2021; Das Neves *et al.*, 2021; Kim *et al.*, 2020). فعالیت ضد میکروبی باکتریوسین های تولید شده توسط باکتری های اسید لاکتیک بر علیه پاتوژن های گرم منفی یک ویژگی منحصر به فرد می باشد و می تواند در صنایع دارویی و مقابله با پاتوژن های بیماری زا در انسان مورد استفاده قرار گیرد.

فعالیت ضد میکروبی باکتریوسین های استخراج شده از جدایه های LK5 و LK12 پس از تیمار با آنزیم های پروتئولیتیک (تریپسین و پروتئیناز K) به طور کامل از بین رفته که این موضوع تاییدی بر ماهیت پروتئینی ترکیب مهار کننده می باشد. از سوی دیگر آنزیم های لیپاز، آلفا آمیلاز و لیزوزیم هیچ تاثیری در فعالیت مهاری باکتریوسین های حاصل نداشته که این موضوع نشان دهنده عدم وجود به ترتیب ترکیبات لیپیدی، پلی ساکاریدی یا گلیکوزیدی در باکتریوسین های مورد نظر می باشد. حساس بودن باکتریوسین های تولید شده توسط *L. plantarum* C19 به آنزیم های پروتئولیتیک توسط Atrih و همکاران (۱۹۹۳) نیز گزارش شده است. علاوه بر این باکتریوسین های تولید شده توسط جدایه های LK5 و LK12 بعد از عملیات حراتی پایدار بوده و پس از اتوکلاو به مدت ۲۰ دقیقه نیز فعالیت مهاری آنها حفظ گردید. همچنین فعالیت باکتریوسین های مورد مطالعه پس از نگهداری در ۴ درجه سلیسیوس به مدت ۳ ماه بدون تغییر باقی ماند. مطالعات دیگری نیز پایداری حرارتی باکتریوسین ها حاصل از *L. plantarum* TF711 (Hernandez *et al.*, 2005) و *L. plantarum* LP31 (Muller *et al.*, 2009) را گزارش کرده اند. ویژگی قابل توجه باکتریوسین های مورد مطالعه به دلیل مقاومت در برابر حرارت های بالا و نگهداری طولانی مدت در دماهای پایین، استفاده بالقوه آنها را به عنوان نگهدارنده مواد غذایی در فرایندهای متفاوت مانند پاستوریزه کردن، خشک کردن، نگهداری در یخچال بدون از بین رفتن فعالیت ضد میکروبی آن، تایید می کند.

باکتریوسین های مورد مطالعه در pH های ۲ تا ۶ پایدار بوده اما در زمان تنظیم pH معادل ۸، فعالیت جدایه های LK5 و LK12 به ترتیب ۴ و ۱۰ درصد کاهش یافت و در pH قلیایی ۱۰، فعالیت هر دو جدایه ۲۰ درصد کاهش یافت. پایداری فعالیت ضد میکروبی باکتریوسین ها در شرایط قلیایی، دارای اهمیت بسزایی در صنایع غذایی می باشد. همچنین گزارش شده است نایسین که به عنوان تنها باکتریوسین تجاری به صورت گسترده به عنوان نگهدارنده زیستی در صنایع غذایی استفاده می شود، در pH قلیایی ناپایدار است (Liu and Hansen, 1990).

دترجنت های آنیونی به دلیل باز کردن چین های موجود در ساختمان پروتئین ها و در نتیجه ظاهر شدن هسته هیدروفوب آنها قادر به تغییر ساختار سه بعدی و فعالیت پروتئین ها می باشند. همان گونه که در جدول ۳ مشاهده می گردد، همه دترجنت های مورد استفاده فعالیت ضد میکروبی باکتریوسین های حاصل از جدایه LK12 را کاهش داده اند اما پایداری فعالیت باکتریوسین تولید شده توسط جدایه LK5 تنها در حضور ۲ و ۵ میلی مولار EDTA کاهش یافت و تغییری در فعالیت باکتریوسین ذکر شده پس از مواجهه با SDS، Tween 20 و Tween 80 مشاهده نگردید. پایداری ترکیب ضد باکتریایی جدایه LK5 نسبت به دترجنت های مورد مطالعه، نشان می دهد که ماهیت آنها مشابه باکتریوسین های تولید شده توسط دیگر باکتری های اسید لاکتیک می باشد. در راستای نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر، دو باکتریوسین پلانتاریسین C19 (Atrih *et al.*, 1993) و پلانتاریسین ST31 (Todorov *et al.*, 1999) که به ترتیب توسط باکتری های *L. plantarum* C19 و *L. plantarum* TS31 تولید شده بودند، نیز پس از مواجهه با انواع دترجنت ها، فعالیت مهاری خود را حفظ کردند.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-05-19]

نتیجه گیری

باکتریوسین های تولید شده توسط جدایه های *L. plantarum* LK5 و *L. plantarum* LK12 ، به دلیل مهار رشد طیف وسیعی از پاتون های شاخص مواد غذایی و همچنین با توجه به حساسیت به آنزیم های پروتئازی، پایداری حرارتی و ماندگاری در شرایط اسیدی و بازی می توانند به عنوان نگهدارنده های زیستی در مواد غذایی تهیه شده در فرایندهای حرارتی بالا و همچنین مواد غذایی با pH های اسیدی و قلیایی در آزمون های تکمیلی مورد مطالعه قرار گیرند.

منابع

Alonso, S., Castrol, M.C., Berdascol, M., de la Banda, I.G., Moreno-Ventas, X., de Rojas, A. H. 2019. Isolation and partial characterization of lactic acid bacteria from the gut microbiota of marine fishes for potential application as probiotics in aquaculture. Probiotics and Antimicrobial Proteins. 11(2): 569-579.

Asfie, M., Yoshijima, T., Sugita, H. 2003. Characterization of the goldfish fecal microflora by the fluorescent in situ hybridization method. Fisheries Science. 69: 21-26.

Atrih, A., Rekhif, N., Milliere, J.B., Lefebvre, G. 1993. Detection and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* C19. Canadian Journal of Microbiology. 39: 1173-1179.

Balcázar, J.L., Vendrell, D., De Blas, I., RuizZarzuela, I., Gironés, O., Múzquiz, J.L. 2007. In vitro competitive adhesion and production of antagonistic compounds by lactic acid bacteria against fish pathogens. Veterinary Microbiology. 122(3-4): 373-380.

Balciunas, E.M., Martinez, F.A.C., Todorov, S.D., de Melo Franco, B.D.G., Converti, A., de Souza Oliveira, R.P. 2013. Novel biotechnological applications of bacteriocins:A review. Journal of Food Control. 32:134-142.

Boeuf, D., Edwards, B.R., Eppley, J.M., Hu, S.K., Poff, K.E., Romano, A.E., Caron, D.A., Karl, D.M., DeLong, E.F. 2019. Biological composition and microbial dynamics of sinking particulate organic matter at abyssal depths in the oligotrophic open ocean. PNAS. 116:11824-11832.

Boulares, M., Mankai, M., Aouadhi, C., Hassouna, M. 2013. Characterisation and identification of spoilage psychotrophic Gramnegative bacteria originating from Tunisian fresh fish. Annals of Microbiology. 63(2): 733-744.

Canak, I., Markov, K., Melvan., E., Starčević, A., M, Živković., Zadravec, M., Pleadin, J., Jakopović, Z., Kostelac, D., Frece, J. 2018. *L. plantarum* O1 as Potential Starter Culture for Biopreservation of Aquaculture Products. Food technology and Biotechnology. 56 (4): 581-589.

Chen, J., Su, Z., Liu, Y., Wang, S., Dai, X., Li, Y., Peng, S., Shao, Q., Zhang, H., Wen, P., Yu, J. 2009. Identification and characterization of class 1 integrons among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients in Zhenjiang, China. International Journal of Infectious Diseases. 13(6): 717-721.

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

das Neves Selis, N., de Oliveira, H.B.M., Le*ão*, H.F., Dos Anjos, Y.B., Sampaio, B.A., Correia, T.M.L., Almeida, C.F., Pena, L.S.C., Reis, M.M., Brito, T.L.S., et al. 2021. *Lactiplantibacillus plantarum* strains isolated from spontaneously fermented cocoa exhibit potential probiotic properties against *Gardnerella vaginalis* and *Neisseria gonorrhoeae*. BMC Microbiology. 21: 198.

Dastgheib, S.M.M., Amoozegar, M.A., Khajeh, K., Shavandi, M. Shavandi, Ventosa, A. 2012. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a halophilic microbial consortium. Applied Microbiology and Biotechnology. 95: 789-798.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-05-19]

De Vries, M.C., Vaughan, E.E., Kleerebezema, M. de Vosa, W.M. 2006. *Lactobacillus plantarum* survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. International Dairy Journal. 16(9):1018-1028.

Galvez, A., Lopez, R., Abriouel, H., Valdivia, E., Omar, N. 2008. Application of Bacteriocins in the Control of Food borne Pathogenic and Spoilage Bacteria. Critical Reviews in Biotechnology. 28: 125-152.

Heredia, N., Garcia, S. 2018. Animals as sources of food-borne pathogens: a review. Animal Nutrition, 4 (3): 250-255.

Hernandez, D., Cardell, E., Zárate, V. 2005. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711. Journal of Applied Microbiology. 99: 77-84.

Kim, S.W., Kang, S.I., Shin, D.H., Oh, S.Y., Lee, C.W., Yang, Y., Son, Y.K., Yang, H.S., Lee, B.H., An, H.J., et al. 2020. Potential of cell-free supernatant from *lactobacillus plantarum* NIBR97, including novel bacteriocins, as a natural alternative to chemical disinfectants. Pharmaceuticals, 13, 266.

Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of molecular evolution. 16(2): 111-120.

Kumar, S., Stecher, G., Li, M. Knyaz, C., Tamura, K. 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Molecular biology and evolution, 35(6): 1547.

Lahiri, D., Nag, M., Dutta, B., Sarkar, T., Pati, S., Basu, D., Abdul Kari, Z., Wei, L.S., Smaoui, S., Wen Goh, K., Ray, R.R. 2022. Bacteriocin: A natural approach for food safety and food security. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. 10:1005918.

Liu, W., Hansen, J. N. 1990. Some chemical and physical properties of nisin, a small protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. Applied Environmental Microbiology. 56: 2551-2558.

Martin, S., Dehler, C., Krol, E. 2016. Transcriptomic responses in the fish intestine. Developmental and Comparative Immunology. 64: 103-117.

Migaw, S., Ghrairi, T., Belguesmia, Y., Choiset, Y., Berjeaud, J., Chobert, J., Hani, K., Haertle, T. 2014. Diversity of bacteriocinogenic lactic acid bacteria isolated from Mediterranean fish viscera. World Journal Microbiology Biotechnology. 30(4): 1207-1217.

Mirdamadi, S., Agha Ghazvini, S. A. 2015. Comparative study between inhibitory effect of *L. lactis* and nisin on important pathogenic bacteria in Iranian UF Feta cheese. Biological Journal of Microorganism. 3(12): 79- 92.

Mokoena, M. 2017. Lactic acid bacteria and their bacteriocins: classification, biosynthesis and applications against uropathogens: a mini-review. Molecules. 22:1255.

Muller, D.M., Carrasco, M.S., Tonarelli, G.G., Simonetta, A.C. 2009. Characterization and purification of a new bacteriocin with a broad inhibitory spectrum produced by *Lactobacillus plantarum* lp 31 strain isolated from dry-fermented sausage. Journal of Applied Microbiology. 106 (6): 2031-40.

Patel, P., Patel, B., Amaresan, N., Joshi, B., Shah, R., Krishnamurthy, R. 2020. Isolation and characterization of *Lactococcus garvieae* from the fish gut for in vitro fermentation with carbohydrates from agro-industrial waste. Biotechnology Reports. 28:e00555.

Rajan, S., Deivasigamani, B. 2018. Screening, production and characterization of extracellular glutaminase free L-asparaginase producing endo-symbiontic bacteria from the gut of *Mugil cephalus* (mullet fish). Asian Journal of Pharmacy and Pharmacology. 4(3): 288–292.

Romero, J., Ringø, E., Merrifield, D.L. 2014. The gut microbiota of fish. In: D.L. Merrifield, E. Ringø (Eds.). Aquaculture Nutrition: Gut husbandry. In: C. Lückstädt (Ed.). Acidifiers in Animal Nutrition-A Guide for Feed Preservation and Acidification to Promote Animal Performance, Nottingham University Press, Nottingham, England. pp: 1-11.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-05-19]

Sahu, M.K., Sivakumar, K., Poorani, E., Thangaradjou, T., Kannan, L. 2007. Studies on Lasparaginase enzyme of actinomycetes isolated from estuarine fishes. Journal of Environmental Biology. 28(2): 465–474 .

Sakr, E.A.E., Ahmed, H.A.E., Abo Saif, F.A.A. 2021. Characterization of low-cost glycolipoprotein biosurfactant produced by *Lactobacillus plantarum* 60 FHE isolated from cheese samples using food wastes through response surface methodology and its potential as antimicrobial, antiviral, and anticancer activity. International Journal of Biological Macromolecules. 170: 94-106.

Seuk-Hyun, K., Cheol, A. 2000. Bacteriocin production by *Lactococcus lactis* KCA 2386 isolated from white kimchi. Food Science and Biotechnology. 9, 263-269.

Sneath, P., Mair, J. 1986. Bergys manual of systematic bacteriology vol 2 Williama & Wilkins, Baltimore.

Sobrino-López, A., Martín-Belloso, O. 2008. Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products. International Dairy Journal. 18(4): 329-43.

Song, Y.,Sun, M., Feng, L., Liang, X., Song, X., Mu, G., Tuo, Y., Jiang, S., Qian, F. 2020. Antibiofilm Activity of *Lactobacillus plantarum* 12 Exopolysaccharides against *Shigella flexneri*. Applied Environmental Microbiology. *86*, e00694-20.

Sun, F., Wang, Y., Wang, C., Zhang, L., Zheng, Z. 2019. Insights into the intestinal microbiota of several aquatic organisms and association with the surrounding environment. Aquaculture. 507, 196-202.

Todorov, S.D. 2008. Bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* AMA-K isolated from Amasi, a Zimbabwean fermented milk product and study of the adsorption of bacteriocin AMA-K to *Listeria* sp. Brazilian Journal of Microbiology. 39(1): 178-187.

Todorov, S., Onno, B., Sorokine, O., Chobert, J.M., Ivanova, I., Dousset, X. 1999. Detection and characterization of a novel antibacterial substance produced by *Lactobacillus plantarum* ST 31 isolated from sourdough. International Journal of Food Microbiology. 48(3): 167–177.

Valli, S., Suvathi, S.S., Aysha, O.S., Nirmala, P., Vinoth, K.P., Reena, A. 2012. Antimicrobial potential of actinomycetes species isolated from marine environment. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 2(6): 469 -473.

Zaghloul, E.H, Ibrahim, M.I.A. 2022. Production and Characterization of Exopolysaccharide From Newly Isolated Marine Probiotic *Lactiplantibacillus plantarum* EI6 With in vitro Wound Healing Activity. Frontiers in Microbiology. 13:903363.

Zhou, D., Zhang, T., Ren, L., Fang, D.A., Xu, D.P. 2022. Differential Study of Microbiota in the Gill and Intestine of Silver Carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) from the Algae-Dominated and HydrophyteDominated Areas of Taihu Lake, China. Fishes. 7, 304.

Zunabovic, M., Domig, K.J., Kneifel, W. 2011. Practical relevance of methodologies for detecting and tracing of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and manufacture environments-A review. LWT Food Science and Technology. 44, 351-362.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-05-19]

Journal of Aquatic Ecology
Volume14, Issue 2, Autumn 2023
Pages:38-52

Journal of Aquatic Ecology

Journal homepage: http://jae.hormozgan.ac.ir

University Of Hormozgan

Isolation, identification and evaluation of bacteriocin activity of lactic acid bacteria from intestinal bacterial flora of *Planiliza klunzingeri* (Day, 1888)

Fatemeh Shayesteh

Department of Fisheries, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran

Abstract

The study delved into bacteriocins, peptides with antibacterial properties, originating from select lactic acid bacteria. Isolating 18 such bacteria from *Liza klunzingeri's* intestine, their potential in bacteriocin production against food pathogens was assessed. Crude bacteriocins from 7 isolates exhibited the ability to inhibit food pathogens via an agar spot test. Notably, bacteriocins derived from LK5 and LK12 isolates displayed a broader inhibitory spectrum against the pathogens under study. Further analysis revealed that the studied bacteriocins were susceptible to proteolytic enzymes, leading to complete degradation. However, these bacteriocins retained their antibacterial potency when subjected to diverse detergents, pH variations, and temperature fluctuations. Genetic analysis via the 16S rRNA gene identified LK5 and LK12 as strains of Lactobacillus plantarum, with similarity percentages of 98.55% and 99.46%, respectively. The findings highlight L. Klunzingeri's intestinal bacterial flora as a promising source for isolating bacteriocin-producing bacteria. Specifically, bacteriocins derived from *L. Plantarum* LK5 and *L. Plantarum* LK12 showcase potential as biological preservatives within the food industry, warranting further exploration.

ARTICLE TYPE
Research

Received: 6 May 2023
Accepted: 4 June 2023
ePublished: 17 December 2023

* Corresponding Author:
Shayesteh_fatemeh@yahoo.com

Keywords: Bacteriocin, Lactic acid bacteria, *Lactobacillus plantarum*, Persian Gulf

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-05-19]