

جداسازی و شناسایی گونه‌های پدیوکوکوس از شیر خام شتر تک کوهانه ایرانی و بررسی خواص

ضدمیکروبی آن‌ها

نفیسسه دعوتی^۱، فریده طباطبائی یزدی^{۲*}، سعید زیبائی^۳

۱. دانشجوی دکترای میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

۲. گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

۳. موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی واحد شمال شرق، مشهد، ایران.

*نویسنده مسئول: tabatabai@um.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۸/۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۰/۲

چکیده

ایران کشوری با بیابان‌های وسیع است و شتر موفقیت زیادی در تطابق با این شرایط دارد. باکتری‌های اسید لاکتیک نظیر پدیوکوکوس نقش مهمی در کیفیت محصولات تخمیری شتر بازی می‌کنند. سه نمونه از شیر خام شتر تک کوهانه ایرانی (*Camelus dromedarius*) تحت شرایط اسپتیک از استان گلستان جمع آوری شد. در میان باکتری‌های جدا شده تنها ۶ جدایه از نظر فنوتیپی به عنوان گونه پدیوکوکوس شناسایی شدند. ۶ جدایه باکتریایی توسط تکثیر ژن ۱۶S rRNA به وسیله واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) شناسایی شدند و توسط آنالیز محدود DNA ریبوزومی تکثیر شده (ARDRA) گروه بندی شدند. براساس آنالیز محدود ژن ۱۶S rRNA، جدایه‌های جنس پدیوکوکوس درون یک پروفایل بانندی گروه بندی شدند که توسط توالی یابی به عنوان پدیوکوکوس پنتوسازئوس شناسایی شدند. فعالیت ضدمیکروبی جدایه‌های پدیوکوکوسی در مقابل سالمونلا تایفی PTCC 1609 و باسیلوس سرئوس ATCC 10876 توسط روش نقطه گذاری بررسی شدند. نتایج نشان داد که فعالیت ضدمیکروبی پدیوکوکوس پنتوسازئوس جدا شده از شیر شتر ایرانی قابل توجه است.

واژگان کلیدی: شتر، شیر خام، پدیوکوکوس، فعالیت ضدمیکروبی.

مقدمه

ارگانسیم‌های پروبیوتیک می‌باشند. باکتری‌های پروبیوتیک توازن میکروفلورای روده را تغییر داده، از رشد باکتری‌های بیماری‌زا جلوگیری کرده، هضم غذا را تسریع کرده، باعث تقویت سیستم ایمنی شده، مقاومت به عفونت را افزایش داده، عوامل سرطان‌زا را حذف نموده، سطوح کلسترول را کاهش داده و علائم عدم تحمل لاکتوز را کمتر می‌کنند (Saarela et al., 2000). پدیوکوکوس پنتوسازئوس^۱، یک

ایران کشوری با بیابان‌های وسیع است و شتر تطابق زیادی برای زندگی موفقیت آمیز با شرایط بیابانی پیدا کرده است. شیر شتر به عنوان یک ماده غذایی با ارزش به مدت هزاران سال در جوامع مختلف دنیا استفاده شده است. در محصولات تخمیری شیر شتر، باکتری‌های اسید لاکتیک به عنوان آغازگر نقش مهمی در فرایند تخمیر بازی می‌کنند (Ahmed and Kanwal, 2004) و یکی از مهمترین

¹ *Pediococcus pentosaceus*

و محیط زیست می‌باشد (Cleveland et al., 2001). به دلایل اشاره شده در بالا، جداسازی و شناسایی گونه‌های پدیوکوکوس از شیر شتر به عنوان یکی از تولیدکنندگان باکتریوسین و بررسی فعالیت ضد میکروبی آن‌ها هدف این مطالعه می‌باشد. یکی از ابزارهای مناسب برای شناسایی مولکولی باکتری‌های اسید لاکتیک آنالیز محدود DNA ریبوزومی تکثیر شده^۳ (ARDRA) می‌باشد که در این مطالعه استفاده شده است (Jensen et al., 1993).

مواد و روش کار

جداسازی و شناسایی فنوتیپی گونه‌های پدیوکوکوس سه نمونه شیر شتر از استان گلستان تحت شرایط سترون جمع‌آوری شد و تا رقت مناسب رقیق‌سازی شد و بر روی محیط MRS آگار (مرک، آلمان) کشت گردید. پلیت‌ها در ۲۰، ۳۷ و ۴۵ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت تحت شرایط بی‌هوازی به وسیله گازپک نوع A (مرک، آلمان) گرمخانه‌گذاری گردیدند. سپس کلنی‌ها توسط کشت خطی بر روی محیط MRS آگار خالص‌سازی شدند. تست کاتالاز، رنگ‌آمیزی گرم و مشاهدات میکروسکوپی برای غربال‌گری اولیه جدایه‌ها انجام شد. سویه‌های جدا شده با ساختار چهارتایی (تتراد) توسط تولید گاز، تحمل نمک ۶٫۵٪، رشد در ۱۰ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد، pH ۹٫۶ و pH ۴٫۴ در سطح جنس به عنوان گونه‌های پدیوکوکوس شناسایی گردیدند (Salminen et al., 2004). شناسایی فنوتیپی جدایه‌ها در سطح گونه براساس خواص فنوتیپی جدایه‌ها به وسیله رشد در دماهای مختلف (۳۵، ۴۰ و ۴۸ درجه سلسیوس)، در pH ۷، pH ۴٫۵ و pH ۴٫۵، بیشترین درصد کلرید سدیم (حجمی/وزنی) مورد تحمل برای رشد علاوه بر قابلیت تخمیر کربوهیدرات‌های مختلف انجام گردید. تخمیر کربوهیدرات‌ها در محیط آبی MRS بدون گلوکز با

باکتری گرم مثبت متعلق به گروه باکتری‌های اسید لاکتیک هوموفرمنتاتیو است که به عنوان یکی از مهمترین اعضای شناخته شده باکتری‌های پروبیوتیک محسوب می‌شود و می‌تواند از رشد میکروب‌های بیماری‌زای خطرناک جلوگیری کند (Gibson and Fuller 2000; Rolfe 2000). گونه‌های پدیوکوکوس باکتریوسین‌های کوچک، مقاوم به گرما و غیر لانتیونینی حاوی پپتیدهای متعلق به کلاس ۲ تولید می‌کنند که فعالیت ضد میکروبی در مقابل باکتری‌های بیماری‌زای عفونی غذایی نظیر گونه‌های لیستریا مونوسیژنز، کلستریدیوم پرفرینجنس، باسیلوس سرئوس^۱ و استافیلوکوکوس/اورئوس^۲ نشان داده‌اند

(Klaenhammer, 1988; Carminati et al., 1989). امروزه نسبت میکروب‌های بیماری‌زا مقاوم به آنتی-بیوتیک‌ها به سرعت در حال افزایش است. بطور قابل توجهی، این میکروب‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها به دلیل جهش‌های زیاد مقاوم شده‌اند، که این جهش و تغییرات سریع‌تر از ابداع آنتی‌بیوتیک جدید جایگزین اتفاق می‌افتد. به‌علاوه، برخی آنتی‌بیوتیک‌های دردسترس اثرات جانبی روی مصرف‌کنندگان نشان داده‌اند (Martys, 1982). برای مثال، کلرامفنیکل اثراتی روی عملکرد مغز استخوان نشان داده است که منتج به اثرات منفی در تولید سلول‌های قرمز خون می‌شود و ماکرولیدها می‌توانند باعث اسهال و استفراغ شوند. در صنعت غذا، غذای فرموله شده با آنتی‌بیوتیک‌ها جهت افزایش مدت زمان ماندگاری روی سلامت انسان تاثیر منفی می‌گذارد. به‌علاوه، مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها در آبی پروری به مدت طولانی خطرات متعدد اپیدمی به همراه دارد. بنابراین، استفاده از عوامل ضد میکروبی طبیعی دیگری غیر از آنتی-بیوتیک‌ها از علایق مهم متخصصین صنعت غذا، علوم بالینی

¹ *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Listeria species*

² *S.aureus*

³ Amplified ribosomal DNA restriction analysis

اتصال^۴ در 50°C به مدت ۴۵ ثانیه، توسعه^۵ در 72°C به مدت ۲ دقیقه، و در نهایت مرحله توسعه نهایی^۶ در 72°C به مدت ۱۰ دقیقه و سرد کردن در 4°C به مدت ۵ دقیقه.

آنالیز محدود DNA ریبوزومی تکثیر شده (ARDRA) جهت هضم آنزیمی به $10\ \mu\text{l}$ محصول PCR ژن 16S rRNA از هر یک از جدایه‌ها $1\ \mu\text{l}$ از آنزیم‌های محدودکننده مورد نظر *Hae* III (RE^۷) (فرمنتاز^۸، کانادا) و *Hha* I (فرمنتاز، کانادا) و $2\ \mu\text{l}$ بافر آنزیم مربوطه اضافه شد. پس از مخلوط کردن هر یک از محلول‌های حاوی آنزیم در حمام بن ماری 37°C به مدت $1/5$ ساعت قرار داده شد تا هضم انجام گردد. قطعات DNA به وسیله الکتروفورز در ژل آگارز $1/5\%$ و ولتاژ ۷۵ ولت به مدت ۹۰ دقیقه جدا شدند (Bulut, 2003).

بررسی فعالیت ضدباکتریایی جدایه‌ها

روش نقطه گذاری^۹

در این روش از کشت ۲۴ ساعته جدایه‌ها بر روی سطح MRS agar به مقدار $2/5\ \mu\text{l}$ نقطه‌گذاری گردید و در 37°C به مدت ۴۸ ساعت به طریق غیرهوازی گرمخانه‌گذاری شد. سویه‌های شاخص مورد استفاده شامل *سالمونلا تایفی* PTTC 1609^{۱۰} و *باسیلوس سرئوس* ATCC^{۱۱} 10876 بودند. هر سویه شاخص در محیط مایع نوترینت^{۱۲} به مدت ۲۴ ساعت در 37°C کشت داده شد. کشت ۱۶ ساعته باکتری شاخص مطابق با کدورت معادل ۰.۵ مک فارلند رقیق‌سازی شده و به میزان $10\ \mu\text{l}$ در ۷ میلی‌لیتر

بروموکرزول پوریل 0.04 گرم در لیتر به عنوان شاخص pH، با افزودن کربوهیدرات‌های آرابینوز، گالاکتوز، لاکتوز، مالتوز، ملی‌زیتوز، ریبوز، گزیلوز (سیگما) به میزان $1/1$ (حجمی/وزنی) ارزیابی شدند (Garrity et al., 2004; Samelis et al., 1994).

شناسایی مولکولی جدایه‌ها

استخراج DNA

جهت استخراج DNA، تک پرگنه در 100 میکرولیتر آب دیونایز سترون تعلیق‌سازی شد. سپس 100 میکرولیتر از الکل ایزوآمیل‌کلروفرم (۲۴/۱) به سوسپانسیون اضافه گردید. بعد از ورتکس شدن، نمونه در $16000\ \text{g}$ به مدت ۵ دقیقه در 4°C درجه سلسیوس سانتریفوژ گردید. سپس 2 میکرولیتر از محلول فاز آبی به عنوان منبع نمونه DNA برای واکنش PCR استفاده شد (Ruiz-Barba et al., 2005).

انجام عملیات PCR و تکثیر ناحیه ژن rRNA ۱۶S

پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن‌های 16S rDNA شامل: (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') B27F و (5'-ACGTGGTTTGAAGAGATTTTCG-3') U1492R (Bioneer, Korea) بودند. واکنش PCR به وسیله مخلوط کردن $2\ \mu\text{l}$ از DNA الگو، $16\ \mu\text{l}$ آب دیونیزه سترون فاقد آنزیم DNase (سیناکلون، ایران)، $1\ \mu\text{l}$ از هر یک از پرایمرهای B27F و U1492R (با غلظت $10\ \mu\text{l}/\mu\text{mole}$) با کیت خشک 2X PCR Master (بایورون^۱، آلمان) به وسیله دستگاه ترموسایکلر با پروفایل برنامه دمایی زیر انجام گردید (Bulut, 2003).

مرحله فعال سازی^۲ در دمای 95°C به مدت ۵ دقیقه، 35 سیکل مراحل واسرشته‌سازی^۳ در 94°C به مدت ۳۰ ثانیه،

⁴ Annealing

⁵ Extension

⁶ Final extension

⁷ Restriction enzyme

⁸ Fermentas

⁹ Spot-on- Lawn- Method

¹⁰ *Salmonella typhi* PTTC 1609

¹¹ *Bacillus cereus* ATCC 10876

¹² Nutrient broth

¹ Bioron

² Activation

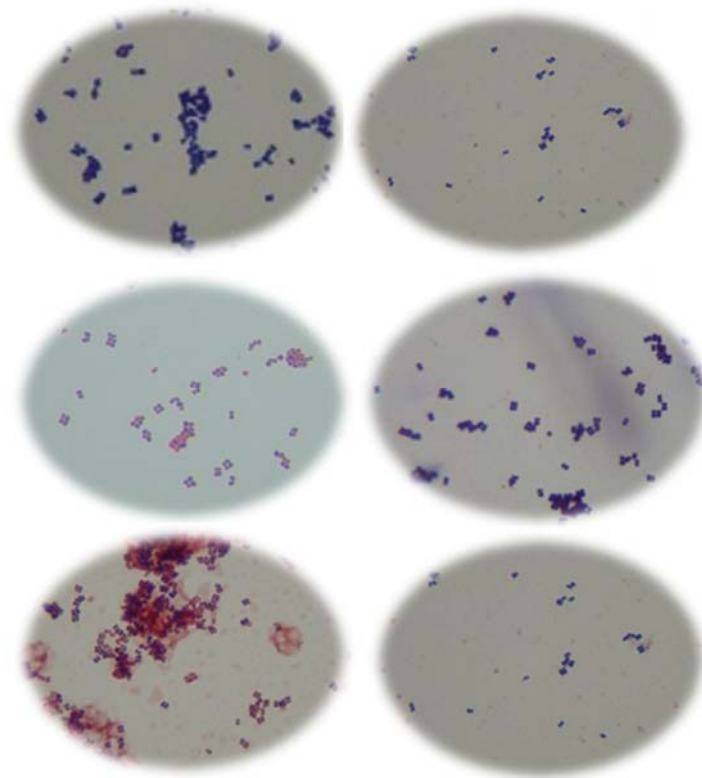
³ Denaturation

نتایج

جداسازی و شناسایی جدایه‌ها

شش جدایه باکتریایی از ۳ نمونه شیر شتر از نظر فنوتیپی به عنوان گونه‌های پدیوکوکوس تشخیص داده شدند. همه این جدایه‌ها گرم مثبت، کاتالاز منفی و ساختار ۴ تایی داشتند (شکل ۱). این سویه‌ها براساس خواص فنوتیپی و بیوشیمیایی به عنوان پدیوکوکوس / اسیدی لاکتیسی^۱ و پدیوکوکوس پنتوسازئوس شناسایی شدند. این نتایج در جدول ۱ نشان داده می‌شوند.

محیط BHI Agar حاوی ۰/۷۵٪ آگار اضافه گردید و این مخلوط به پلیتهای MRS agar که حاوی کشت نقطه‌ای جدایه‌ها از مرحله قبل بودند منتقل گردید. از MRS broth سترون به عنوان کنترل نقطه‌گذاری استفاده گردید. ایجاد ناحیه ممانعت از رشد میکروب‌های بیماری‌زا در اطراف کلنی جدایه‌ها بعد از ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در ۳۷ °C تحت شرایط هوازی بررسی شد (Al-Otaibi, 2012). جدایه‌هایی که دارای نواحی روشن ممانعت‌کنندگی اطراف پرگنه‌های خود با قطر بیش از ۰,۵ mm یا بیشتر بودند از نظر فعالیت ضد میکروبی مثبت در نظر گرفته شدند (Djadouni and Kihal, 2012).



¹ *Pediococcus acidilactici*

شکل ۱- مشاهده میکروسکوپی ۶ جدایه با ساختار تتراد از ۳ نمونه شیر شتر

جدول ۱. خصوصیات فنوتیپی متمایز کننده گونه‌های پدیوکوکوس

<i>P. acidilactici</i>	<i>P. pentosaceus</i>	کد جدایه
۱،۳	۲،۴،۵،۶	رشد در:
+	+	pH 4.5
+	+	pH 7.0
+	+	pH 8.0
-	-	pH 9.0
+	+	35°C
+	d	40°C
+	d	45°C
+	-	48°C
		تولید اسید از:
d	+	آرابینوز
+	+	گالاکتوز
d	+	لاکتوز
-	+	مالتوز
-	-	ملیزیتوز
+	+	ریبوز
+	d	گزیلوز
10	10	ماکزیمم غلظت کلرید سدیم مورد تحمل برای رشد:

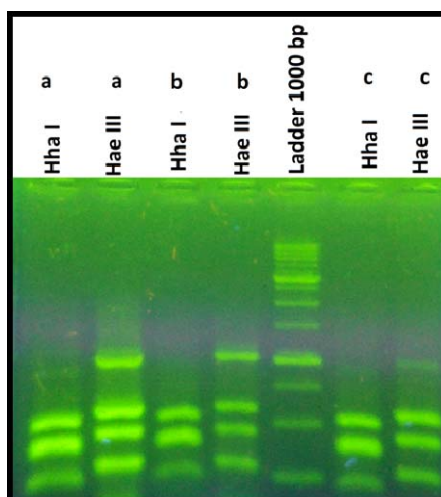
راهنما: +، ۹۰٪ سویه‌ها یا بیشتر مثبت هستند؛ -، ۹۰٪ سویه‌ها یا بیشتر منفی هستند؛ d، ۱۱-۸۹٪ سویه‌ها مثبت هستند.

یک پروفایل بانندی گروه‌بندی شدند. پروفایل‌های بانندی حاصل از ARDRA از سه نمونه شیر در شکل ۲ نشان داده می‌شوند. یک جدایه به عنوان نماینده این گروه پروفایل-

براساس هضم محدود آمپلیکون‌های ژن *16S rRNA* توسط آنزیم‌های Hha I و Hae III، شش جدایه با خصوصیات پدیوکوکوسی در سطح جنس از ۳ نمونه شیر شتر در قالب

این نتایج آشکار کرد که جدایه‌های پدیوکوکوس از سه نمونه شیر شتر متعلق به یک سویه می‌باشند.

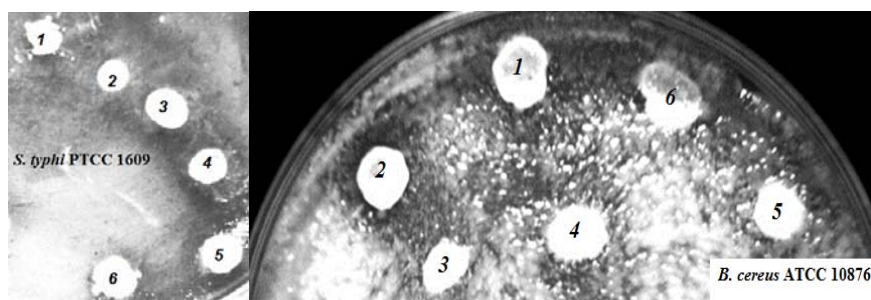
باندی جهت توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کره ارسال گردید و نتایج توالی‌یابی با همولوژی ۹۸-۱۰۰٪ نشان داد که جدایه‌ها متعلق به گونه پدیوکوکوس پنتوسازئوس می‌باشند.



شکل ۲ - پروفایل‌های هضم محدود آنزیمی ژن تکثیر شده 16S rDNA با HhaI و HaeIII از سه نمونه شیر شتر، M: مارکر ۱۰۰۰ bp، a: *Pedicoccus pentosaceus* (نمونه ۱)، b: *Pedicoccus pentosaceus* (نمونه ۲)، c: *Pedicoccus pentosaceus* (نمونه ۳)

ضدمیکروبی مثبت است، بنابراین در این مطالعه گونه‌های پدیوکوکوس جدا شده از شیر شتر فعالیت ممانعتی قابل توجهی از رشد باکتری‌های بیماری‌زای باسیلوس سرئوس و سالمونلا تایفی نشان دادند.

فعالیت ضدمیکروبی باکتری‌های اسید لاکتیک در شکل ۳ نواحی ممانعت حاصل از گونه‌های پدیوکوکوس بر علیه رشد باکتری‌های بیماری‌زا نشان داده می‌شود. با توجه به اینکه اگر قطر ناحیه ممانعت اطراف کلنی هر جدایه بزرگتر از ۰٫۵ میلی‌متر یا بیشتر باشد جدایه از نظر فعالیت



شکل ۳- نواحی ممانعت حاصل از ۶ گونه پدیوکوکوس بر علیه *S. typhi* PTCC 1609 و *B. cereus* ATCC 10876 از ۳ نمونه شیر شتر (روش نقطه گذاری): ۱: جدایه نمونه یک، ۲، ۳، ۴: جدایه‌های نمونه دو، ۵، ۶: جدایه‌های نمونه سه.

بحث

(2008)، نیازهای تغذیه‌ای مشابه برای رشد، تکرارپذیری ضعیف، عدم بیان برخی ژن‌ها در برخی باکتری‌ها که مرتبط با شرایط محیطی می‌باشد، تغییرپذیری باکتری‌ها در طی رشد و تغییر شکل از حالت کروی به میله‌ای کوتاه و بالعکس (Morales et al., 2013). همچنین تخمیر کربوهیدرات‌ها یک واکنش آنزیمی است که تحت تاثیر زمان و دمای گرمخانه‌گذاری قرار می‌گیرد (Ouahghiri et al., 2005). در تحقیقات گذشته که بر روی شیر شتر انجام شده است نیز حضور جنس پدیوکوکوس تایید می‌شود، در این زمینه می‌توان به مطالعه‌ای که فرانسیوسی و همکاران (۲۰۰۹) در زمینه شناسایی پراکنش زیستی و پتانسیل عملکردی باکتری‌های اسید لاکتیک شیر خام شتر برای کاربردهای فرآورده‌های شیر انجام دادند اشاره کرد. آن‌ها جنس‌های انتروکوکوس، لاکتوکوکوس، استرپتوکوکوس، لاکونوستوک، لاکتوباسیلوس و پدیوکوکوس را در شیر شتر گزارش کردند (Franciosi et al., 2009). امروزه تقاضای زیادی در به حداقل رساندن فرایندهای حرارتی مواد غذایی با استفاده از روش‌های تشعشع‌دهی، فشار بالا، انبارداری در دمای پایین، نگهدارنده‌های شیمیایی، اتمسفر اصلاح شده، کنترل فعالیت آب و استفاده از ترکیبات ضد میکروبی وجود دارد. باکتریوسین‌ها، پروتئین‌های ضدباکتریایی تولید شده توسط سویه‌های باکتری بر علیه سایر سویه‌های مشابه یا گونه‌های خویشاوند می‌باشند. اخیراً استفاده از باکتریوسین تولیدی توسط باکتری‌های اسید لاکتیک به عنوان نگهدارنده‌های زیستی در مواد غذایی اهمیت زیادی پیدا کرده است (Djadouni, 2012). در مطالعه ای که انقی و گوین در سال ۲۰۱۴ بر روی فعالیت ضد میکروبی *Pediococcus pentosaceus* VTCC-B-601 انجام دادند بیشترین فعالیت ضد میکروبی در انتهای فاز لگاریتمی ایجاد شد که معادل با اثر ضد میکروبی سفالوسپورین با

این مطالعه نشان داد که در غربال‌گری اولیه جامعه لاکتیکی شیر شتر در سطح جنس، ۶ گونه پدیوکوکوسی شناسایی شد. و مشخص گردید که پرایمرهای انتخاب شده قادر به تکثیر ژن *16S rRNA* هر یک از جدایه می‌باشند. در این مطالعه روش ARDRA، غربال‌گری و شناسایی ۶ جدایه حاصل از شیر شتر را تسهیل کرد. نتایج شناسایی مولکولی جدایه‌های پدیوکوکوسی بر اساس توالی‌یابی ژن *16S rDNA* تنها یک گونه پدیوکوکوس پنتوسازئوس و شناسایی فنوتیپی دو گونه پدیوکوکوس پنتوسازئوس و پدیوکوکوس/اسیدی لاکتیس را در شیر شتر نشان داد. که در این دو روش تفاوت کمی وجود داد. البته نتایج شناسایی فنوتیپی به دلایل مختلفی از دقت پایین‌تری نسبت به شناسایی مولکولی برخوردار است. مورائس و همکاران (۲۰۱۳) مطالعه‌ای برای مقایسه دقت دو روش فنوتیپی شامل سیستم API50CHL و روش بیولوژی (شامل یک پلیت منحصر به فرد برای گرم مثبت‌ها و گرم منفی‌ها جهت تخمیر ۹۶ کربوهیدرات) با دو روش مولکولی توالی‌یابی *16S rDNA* و واکنش PCR مخصوص گونه^۱ برای تعدادی باکتری اسید لاکتیک مشخص انجام دادند. در این مطالعه قابلیت اعتماد به دو روش مولکولی مورد استفاده ۱۰۰٪ بود و تست‌های فنوتیپی قابلیت اعتماد پایین‌تری نشان داده بطوری که برای دو روش بیولوژی و روش API50CHL به ترتیب ۹۹/۹ - ۷۴ و ۹۹/۹ - ۷۸/۲٪ گزارش شد. آن‌ها گزارش کردند برای اکثریت باکتری‌های تست شده هیچ گونه تطابقی بین نتایج فنوتیپی و مولکولی مشاهده نگردید (Morales et al., 2013). روش‌های فنوتیپی دارای محدودیت‌ها و معایبی در شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک هستند نظیر قدرت پایین تمایز (Mohania et al.,

¹ Species specific PCR reactions

استافیلوکوکوس اورئوس داشته درحالیکه باکتریوسین حاصل از پدیوکوکوس پنتوسازئوس از رشد استافیلوکوکوس اورئوس جلوگیری می‌کند (Elyass et al., 2015).

این مطالعه نیز آشکار کرد که همه جدایه‌های پدیوکوکوسی شیر شتر می‌توانند از رشد *B. Cereus* و *S. typhi* جلوگیری کنند و بر علیه باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت می‌توانند اثر بازدارندگی داشته باشند. بنابراین بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق شیر شتر به عنوان یک منبع بالقوه حاوی باکتری‌های اسید لاکتیک نظیر گونه‌های پدیوکوکوس با خاصیت ضدباکتریایی بر علیه باکتری‌های بیماری‌زا می‌تواند پیشنهاد گردد.

غلظت (13.3µg/ml) بر علیه سالمونلا تایفیموریوم، استافیلوکوکوس اورئوس و میکروکوکوس لوتئوس بود (Nghe and Nguyen, 2014).

الیزا و آلتایار در بررسی که بر روی فعالیت ضد میکروبی باکتریوسین‌های حاصل از لاکتوباسیلوس کورواتوس و پدیوکوکوس پنتوسازئوس جدا شده از گوشت گوساله تخمیر شده و مدفوع نوزاد علیه استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سابتیلیس، انتروکوکوس فکالیس، اشرشیاکلی، کلبسیلا پنومونیه، پروتئوس ولگاریکوس و سالمونلا تایفی انجام دادند، مشخص شد که بیشترین فعالیت بازدارندگی این دو باکتریوسین در pH = 5 حاصل می‌گردد. باکتریوسین حاصل از لاکتوباسیلوس کورواتوس اثر باکتری‌کشی علیه

References

1. Ahmed, T., and Kanwal, R. 2004. Biochemical characteristics of lactic acid producing bacteria and preparation of camel milk cheese by using starter culture. Pak Vet J. 24: 87-91.
2. Al-Otaibi, M. 2012. Isolation of Lactic Acid Bacteria from Some Traditional Saudi Food. Am J Food Technol. 7(11): 690-9
3. Bulut, C. 2003. Isolation and molecular characterization of lactic acid bacteria from cheese. MSc Thesis İzmir Institute of Technology.
4. Carminati, D., Giraffa, G., and Bossi, M.G. 1989. Bacteriocin-like inhibitors of Streptococcus lactis against Listeria monocytogenes. J Food Prot. 52: 614-7.
5. Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F., and Chikindas, M.L. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. Int J Food Microbiol. 71: 1-20.
6. Djadouni, F., and Kihal, M. 2012. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria and the spectrum of their biopeptides against spoiling germs in foods. Braz Arch Biol Technol. 55: 435-44.
7. Elyass, M. E., Altayar, M.A., Mahdi, A. A., Abdelrawaf, S. S., Shigidi, M. T., and Attitalla, I. H. 2015. Characterization and Evaluation of Antimicrobial Activity of Bacteriocins from *Lactobacillus Curvatus* and *Pediococcus Pentosaceus*. J Microb Pathophysiol Pathogenesis. 1: 001.
8. Franciosi E., Settanni L., Cavazza A., and Poznanski E. 2009. Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. Int Dairy J. 19(1): 3-11.

9. Garrity, G.M., Bell, J.A., and Lilburn, T.G. 2004. Taxonomic outline of the prokaryotes. Bergey's manual of systematic bacteriology. 2nd ed. Springer, New York, Berlin, Heidelberg. Vol (3). pp. 484-489, 517, 598-599, 626, 664-671, 673-675, 680-719.
10. Gibson, G.R., and Fuller, R. 2000. Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. *J Nutr.* 130: 391-5.
11. Jensen, M.A., Webster, J.A., and Straus, N. 1993. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Appl Environ Microbiol.* 59: 945-52.
12. Klaenhammer, T.R. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie.* 70: 337-49.
13. Martys, C.R. 1982. Monitoring adverse reactions to antibiotics in general practice. *Br J Prev Soc Med.* 36: 224-7.
14. Mohania, D., Nagpal R., Kumar M., Bhardwaj A., Yadav M., and Jain S. 2008. Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria. *J Dig Dis.* 9(4): 190-8.
15. Moraes, P. M., Perin, L. M., Silva Júnior, A., and Nero, L. A. 2013. Comparison of phenotypic and molecular tests to identify lactic acid bacteria. *Braz J Microbiol.* 44(1): 109-12.
16. Nghe, D., and Nguyen, T. 2014. Characterization of Antimicrobial Activities of *Pediococcus pentosaceus*. Vtcc-B-601. *JAPS.* 4 (05): 061-064.
17. Ouadghiri, M., Amar, M., Vancanneyt, M., and Swings J. 2005. Biodiversity of lactic acid bacteria in Moroccan soft white cheese (Jben). *FEMS Microbiol Lett.* 251(2): 267-71.
18. Rolfe, R.D. 2000. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *J Nutr* 130: 396S-402S.
19. Ruiz-Barba, J.L., Maldonado, A., and Jimenez-Diaz, R. 2005. Small-scale total DNA extraction from bacteria and yeast for PCR applications. *Anal Biochem.* 347: 333-5.
20. Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J., and Mattila-Sandholm, T. 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J Biotechnol.* 84(3): 197- 215.
21. Salminen, S., Von Wright, A., and Ouwehand, A. 2004. Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects, CRC Press, Marcel Dekker, New York, pp. 73-103.
22. Samelis, J., Maurogenakis, F., and Metaxopoulos, J. 1994. Characterization of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented Greek dry salami. *Int. J Food Microbiol.* 23 :179-196.

Isolation and Identification of *Pediococcus* species from Raw Milk of Iranian One Humped Camel and Evaluation of Their Antibacterial Properties

Davati N¹, Tabatabaee yazdi F², Zibae S³

1. PhD student of Food Microbiology, Department of Food Science Industry, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

2. Department of Food Science Industry, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

3. Razi Vaccine & Serum Research Institute, Mashhad, Iran.

*Corresponding author: tabatabai@um.ac.ir

Received: 23 December 2015

Accepted: 30 October 2015

Abstract

Iran is a country with vast arid desert and camels have many adaptations that allow them to live successfully in desert conditions. Lactic Acid Bacteria such as *Pediococcus* play an important role in quality of fermented products of camel milk. A total of three samples of raw milk of Iranian one humped camel (*Camelus dromedarius*) were collected from Golestan province in Iran under aseptic conditions. Among isolated bacteria, only six isolates were phenotypically characterized as pediococcus species. Six bacterial isolates were identified by amplification of the 16S rRNA gene by Polymerase Chain Reaction (PCR) and were then grouped by the Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA) method. Based on restriction analysis of 16S rRNA gene, the isolates of pediococcus genus were grouped into one ARDRA pattern that were identified by ribosomal DNA sequencing as *Pediococcus pentosaceus*. The antimicrobial activity of *Pediococcus* isolates against *Salmonella typhi* PTCC 1609 and *Bacillus cereus* ATCC 10876 was examined by the Spot on lawn method. The results showed that antimicrobial activity of *P. pentosaceus* isolated from raw milk of Iranian camel was remarkable was remarkable.

Keywords: Camel, Raw milk, *Pediococcus*, antibacterial activity.