مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره ۲۱، بهمن ۱۴۰۱، ۱۱۵۲-۱۱۳۳

جداسازی، شناسایی و بررسی خواص بیولوژیکی پروبیوتیک‌های مولد بیوسورفکتانت و نانوذرات اکسید منیزیم از نمونه‌های لبنی محلی: یک مطالعه آزمایشگاهی

عذری حسینی‌نوه[۱]، اشرف کریمی نیک[۲]، شهلا سلطانی‌نژاد [۳]، مهدی رنجبر[۴]، عنایت‌اله شیخ‌حسینی[۵]

دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۰۷/۲۵ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۱۴۰۱/۰۸/۲۸ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۱۴۰۱/۱۱/۰۵ پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۱۱/۰۹

چکیده

زمینه و هدف: پروبیوتیک‌ها، میکروارگانیسم‌های شناخته شده‌ای در میکرو فلور انسان و حیوان هستند و به‌طور گسترده جهت مصارف پزشکی و غذایی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. تحقیق حاضر با هدف جداسازی و شناسایی باکتری‌های پروبیوتیکی و توانایی تولید بیوسورفکتانت و نانوذرات اکسید منیزیم از لبنیات محلی شهر رفسنجان انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه آزمایشگاهی، نمونه‌های لبنی تحت شرایط استریل با رعایت زنجیره سرد، به آزمایشگاه منتقل گردید و در محیط کشت MRS (de Man Rogosa Sharpe) آگار کشت داده شد. جهت جداسازی جدایه‌های مولد بیوسورفکتانت، آزمون‌های گسترش نفت خام و امولسیفیه‌کنندگی انجام گرفت. جدایه‌ها از نظر تولید نانو ذرات اکسید منیزیم مورد مطالعه فراتر قرار گرفتند. اندازه و شکل نانوذرات، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، طیف سنجی در محدوده مادون قرمز و اثرات ضد باکتریایی آن‌ها تعیین گردید. جهت تعیین هویت سویه برتر، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، توالی‌یابی و ترسیم درخت فیلوژنی انجام شد.

یافته‌ها: تعداد ۹ جدایه پروبیوتیک، توانایی تولید بیوسوفکتانت داشته که همگی فعالیت امولسیفیه‌کنندگی قابل توجهی نشان دادند. بیوسورفکتانت‌های تولیدی دارای خاصیت ضد باکتریایی بودند. یکی از جدایه‌های مولد بیوسورفکتانت قادر به تولید نانوذرات اکسید منیزیم بود که بر اساس تعیین هویت مولکولی، به‌نام *انتروکوکوس فاسیوم* سویه L۸ نام گرفت. ۹۰ درصد نانوذرات دارای سایز ۱۰۷ نانو متر بوده و اثرات ضد باکتریایی و آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی نشان دادند.

نتیجه‌گیری: سویه *انتروکوکوس فاسیوم* سویه L۸، قابلیت پروبیوتیکی مطلوبی داشته و با انجام آزمون‌های بیشتر می‌توان از این سویه بومی جهت استفاده در فرمولاسیون مواد غذایی فراسودمند استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: لبنیات محلی، پروبیوتیک، بیوسورفکتانت، نانوذرات اکسید منیزیم

۱- دانشجوی دکترا میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران
۲- (نویسنده مسئول)، استادیار گروه میکروبیولوژی، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران
تلفن: ۰۳۴-۳۱۳۲۳۲۱۳۷۶، دورنگار: ۰۳۴-۳۱۳۲۳۲۱۳۷۶، پست الکترونیکی: a.kariminik@Iauk.ac.ir
۳- استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد جیرفت، دانشگاه آزاد اسلامی، جیرفت، ایران
۴- دانشیار، مرکز تحقیقات فرماسیوتیکس، انستیتو نوروفارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان ، ایران
۵- دانشیار، گروه شیمی، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-06-10]

[DOI: 10.52547/jrums.21.11.1133]

مقدمه

پروبیوتیک‌ها ارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که با تعدیل فلورمیکروبی روده اثرات مفیدی را بر روی سلامت میزبان اعمال می‌کنند. آن‌ها عموماً از منابع انسانی بوده و غیربیماری‌زا محسوب می‌شوند. با توجه به گسترش فزآینده محصولات لبنی صنعتی به جای محصولات سنتی امکان از دست دادن بسیاری از باکتری‌های پروبیوتیک وجود دارد. بنابراین، جداسازی و شناسایی این باکتری‌ها از منابع سنتی و لبنی ضرورت دارد [۱].

یک سویه پروبیوتیک مطلوب دارای قابلیت‌هایی نظیر تحمل اسید و صفرا که جهت استفاده پروبیوتیک‌ها برای تجویز خوراکی بسیار مهم است، چسبندگی به سطوح مخاطی و اپیتلیال که یک ویژگی مهم برای مدولاسیون موفقیت آمیز ایمنی، حذف رقابتی پاتوژن‌ها و هم‌چنین جلوگیری از چسبندگی و کلونیزاسیون پاتوژن، فعالیت ضد میکروبی در برابر باکتری‌های بیماری‌زا می‌باشد [۲].

بیوسورفکتانت‌ها گروه متنوعی از ترکیبات فعال سطحی (خارج سلولی یا متصل به غشاء سلولی) بوده که توسط برخی از باکتری‌ها، مخمرها و قارچ‌ها تولید می‌شوند و به دلیل برخورداری از ویژگی‌هایی نظیر کاهش کشش سطحی و بین سطحی یا قدرت امولسیون‌کنندگی در صنایع مختلفی از جمله صنعت نفت، پتروشیمی، شوینده‌ها و پاک‌کننده‌ها، داروسازی، آرایشی، پزشکی، کشاورزی، نساجی و صنایع غذایی کاربرد دارند. اهمیت این ترکیبات در مقایسه با سورفکتانت‌های شیمیایی و غیر زیستی را می‌توان در سمیت کم، تجزیه زیستی، سازگاری با محیط زیست و فعالیت در دما، pH و شوری بالا و قدرت تولید کف فراوان برشمرد [۴-۳]. در مقابل، استفاده بیش از حد از آنتی‌بیوتیک‌ها و خوددرمانی با آنتی‌بیوتیک‌ها در بسیاری از مناطق متداول و بالاتر از حد استاندارد است که منجر به پیدایش مقاومت در بین باکتری‌ها شده است. بنابراین، راه‌کارهای جدید نظیر استفاده از نانو مواد که به سرعت در سال‌های مختلف گسترش یافته است، پیشنهاد شده است [۳].

فن‌آوری نانو به کاهش مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها کمک می‌کند. هم‌چنین، به‌رغم رشد فزآینده صنعت غذا و رعایت اصول بهداشتی در تولید و فرآوری مواد غذایی، آلودگی میکروبی به‌عنوان منبع اصلی شیوع مکرر بیماری‌های ناشی از مواد غذایی شناخته می‌شود. از این‌رو یافتن ترکیبات ضد باکتریایی جدید برای اطمینان از سلامت مواد غذایی و افزایش ماندگاری آن‌ها کاملاً ضروری به‌نظر می‌رسد. اکسید منیزیم به دلیل خواص گسترده آن از نقطه نظر تغذیه‌ای و سلامتی مورد توجه قرار گرفته است. منیزیم جزء مواد معدنی ضروری برای سلامت انسان می‌باشد. اکسید منیزیم یکی از ترکیبات شش‌گانه منیزیم می‌باشد که در موارد بیولوژیکی مانند تسکین سوزش سر دل و بازسازی استخوان مصرف می‌شود [۳]. نانوذرات اکسید منیزیم، اکسیدهای فلزی غیر آلی دارای خواص ضد باکتریایی بوده و از مزایای مهم آن‌ها می‌توان به غیرسمی بودن، قابلیت سنتز سریع، آسان و کم هزینه اشاره کرد. این نانوذره توسط سازمان غذا و داروی ایالات متحده (21CFR184.1431) به عنوان یک ماده ایمن شناسایی شده است [۵، ۳]. فعالیت ضد باکتریایی این نانوذرات را به قلیایی بودن، تولید گونه‌های فعال اکسیژن

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-06-10]

[DOI: 10.52547/jrums.21.11.1133]

مانند یون سوپر اکسید و جذب الکترواستاتیک نانوذرات به دیواره سلول باکتری نسبت داده‌اند [۶].

بر طبق جستجوهای انجام شده، تاکنون پژوهشی در زمینه بیوسنتز نانوذرات اکسید منیزیم توسط باکتری‌های پروبیوتیک انجام نشده است، لذا این تحقیق با هدف جداسازی باکتری‌های پروبیوتیک، تعیین خصوصیات پروبیوتیکی، اثرات ضد باکتریایی بیوسورفکتانت و نانوذرات اکسید منیزیم از لبنیات محلی شهر رفسنجان انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

این تحقیق آزمایشگاهی با اخذ کد کمیته اخلاق در زیست پزشکی به شماره IR.IAU.KERMAN.REC.1400.001، از مهر تا دی ماه ۱۴۰۰ در دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهید سلیمانی (کرمان) انجام گرفت. از تعداد ۱۵ نمونه ماست سنتی شهرستان رفسنجان جهت جداسازی سویه‌های مورد نظر به‌صورت تصادفی، تحت شرایط استریل نمونه‌برداری شد و نمونه‌ها با رعایت زنجیره سرد به آزمایشگاه منتقل شدند. ابتدا ۱۰ گرم از هر نمونه با ۹۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل مخلوط شد. رقت‌های مختلف تا 10^{-5} تهیه و بر روی محیط کشت MRS (de Man Rogosa Sharpe agar) آگار (مرک آلمان) در شرایط بی‌هوازی و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت قرار داده شد. کلنی‌های رشد یافته با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم و آزمایش کاتالاز جهت تشخیص مورد بررسی قرار گرفتند. جهت جداسازی باکتری‌های مولد بیوسورفکتاتت، آزمون‌های گسترش یا پراکندگی نفت خام و فعالیت امولسیونه‌کنندگی انجام شد [۷].

کلنی‌های به دست آمده در محیط کشت MRS براث کشت داده شد و تحت شرایط بی‌هوازی و دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۷ روز قرار داده شدند. ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی حاصله با ۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل و ۱۰۰ میکرولیتر نفت خام به پتری‌دیش استریل متنقل گردید. کنار رفتن لایه نفتی و مشاهده ناحیه شفاف در سطح آب مؤید حضور بیوسورفکتانت بود. قطر منطقه شفاف اندازه‌گیری و با کنترل منفی (آب مقطر) مورد مقایسه قرار گرفت [۱].

توانایی امولسیون سازی جدایه‌ها با شاخص امولسیون سازی (Emulsification index; E_{24}) ارزیابی شد. ۴ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری به ۶ میلی‌لیتر نفت سفید، توسط ورتکس (IKA، آلمان) با سرعت بالا به‌مدت دو دقیقه مخلوط گردید و سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط قرار داده شد. شاخص E_{24} به عنوان نسبت ارتفاع لایه امولسیون شده (سانتی‌متر) به ارتفاع کل ستون مایع (سانتی‌متر) محاسبه شد. نتایج با آب مقطر به عنوان شاهد منفی مقایسه شد [۱].

کلنی خالص از جدایه‌های انتخابی باکتریایی، در ارلن محتوی ۵۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت تلقیح گردید و در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۷ روز در در انکوباتور شیکردار (LABNET-311DS، آمریکا) با ۱۵۰ دور در دقیقه قرار داده شد. بعد از کسب کدورت لازم، سوسپانسیون‌های باکتریایی به‌وسیله دستگاه سانتریفیوژ (شیمی فن، ایران) با ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. مایع روماند جمع‌آوری شد. PH نهایی مایع با اضافه کردن

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-06-10]

[DOI: 10.52547/jrums.21.11.1133]

محلول اسید کلریدریک ۶ مولار، معادل ۲ تنظیم گردید. محلول به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. سپس محلول کلروفرم - متانول (۱:۲ v/v) اضافه شد. فاز آلی را جدا نموده و حلال در دستگاه فور (شیمی فن، ایران) با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد تبخیر گردید. وزن خشک بیوسورفکتانت‌های جمع‌آوری شده تعیین گردید [۱].

جهت بررسی فعالیت ضد باکتریایی بیوسورفکتانت‌های استخراج شده از روش انتشار چاهک استفاده شد. ابتدا کشت تازه ۲۴ ساعته از سوش‌های باکتریایی گرم مثبت و گرم منفی شامل *استافیلوکوکوس‌اورئوس* (PTCC 1431)، *سالمونلا انتریتیدیس* (PTCC 1709)، *باسیلوس سرئوس* (PTCC 1015)، *اشریشیا کلی* (PTCC 1270) و *سودوموناس آئروژینوزا* (YX 441328) در محیط کشت تریپتی کاز سوی آگار (مرک، آلمان) تهیه شد. از کشت‌های حاصله به لوله حاوی محیط کشت مایع مولر هینتون براث اضافه شد و با محلول استاندارد ۰/۵ مک فارلند مقایسه گردید تا کدورت معادل $1/5 \times 10^8$ CFU/ml حاصل شود [۸]. از سوسپانسیون حاصله، در سطح محیط کشت مولر هینتون آگار به روش یکنواخت کشت داده شد و چاهک‌هایی به قطر ۶ میلی‌متر به فاصله ۱۵ میلی‌متر از لبه پلیت و ۲۰ میلی‌متر از هم ایجاد گردید. غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از بیوسورفکتانت تولید شده، در حلال دی متیل سولفوکسید و متانول با حجم برابر تهیه گردید. سپس از این غلظت به روش دو برابر کردن رقت در هر مرحله، در حلال مذکور، غلظت‌های بعدی شامل ۵۰، ۲۵ و ۱۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تهیه شد و از هر غلظت میزان ۲۰ میکرولیتر به هر حفره انتقال داده شد [۸].

پلیت‌ها در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت زمان ۲۴ ساعت قرار داده شدند. به‌عنوان کنترل مثبت، از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی شامل تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، آمیکاسین (۱۰ میکروگرم)، سفتریاکسون (۳۰ میکروگرم) و سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم) (پادتن طب، تهران، ایران) با روش انتشار در دیسک، آنتی بیوگرام انجام شد. پس از پایان دوره انکوباسیون قطر هاله عدم رشد اطراف چاهک‌ها و دیسک‌ها برحسب میلی‌متر با خط‌کش اندازه‌گیری گردید. نتایج حاصل از آنتی بیوتیک‌ها با جداول مؤسسه استاندارد بالینی و آزمایشگاهی (CLSI 2020) (Clinical and Laboratory Standards Institute) مقایسه شد [۹].

پروبیوتیک‌های مولد بیوسورفکتانت به ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت MRS براث اضافه شد. در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۸-۲۴ ساعت قرار داده شد. ۵۰ میلی‌لیتر نیترات منیزیم ۰/۱ نرمال و NaOH ۰/۲ مولار به کشت باکتری اضافه و در بن‌ماری ۴۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰-۱۵ دقیقه قرار داده و به مدت ۱۰ ساعت در دمای اتاق نگه‌داری شد. سپس با دور ۵۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. مایع رویی تخلیه و رسوب توسط آب دو بار تقطیر دو مرتبه شستشو داده شده و در آون ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸ ساعت خشک گردید. رسوب به‌دست آمده فرم هیدروکسید نانو می‌باشد که ۴ ساعت در

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-06-10]

[DOI: 10.52547/jrums.21.11.1133]

۳۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و به فرم اکسید تبدیل شد [۱۰].

جهت آزمون طیف سنجی در محدوده مادون قرمز، نانوذرات اکسید منیزیم سنتز شده را با برمید پتاسیم مخلوط کرده و تحت فشار زیاد به‌صورت یک قرص نازک و شفاف تبدیل و سپس در دستگاه FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscope) قرار داده شد [۱۱]. آنالیز توزیع اندازه ذره‌ای نانوذرات، یکی از روش‌های مناسب برای تعیین توزیع ابعاد ذرات است. در این روش، از روی حرکت براونی ذرات در سوسپانسیون کلوئیدی می‌توان توزیع ابعاد ذرات در یک محلول را مشخص نمود. در این آنالیز، میزان ۱ میلی‌گرم از نمونه مورد بررسی قرار گرفت [۱۰].

فعالیت آنتی‌اکسیدانی نانوذرات با ارزیابی توانایی نانوذرات اکسید منیزیم برای خنثی کردن رادیکال DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) تعیین گردید که با کاهش جذب محلول متانول DPPH در طول واکنش مشخص شد. یک میلی‌لیتر از محلول نانوذرات منیزیم و منیزیم استات در محدوده غلظتی معین (۰-۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به ۲ میلی‌لیتر محلول تازه تهیه شده DPPH ۱۰۰ میکرو مولار در متانول اضافه شده و مخلوط حاصل پس از افزودن ۳ میلی‌لیتر متانول، به مدت یک ساعت در تاریکی قرار داده شد. سپس جذب محلول در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد. هم‌زمان با نمونه، یک لوله شاهد (بدون محلول نانوذره) نیز در نظر گرفته می‌شود. از ترکیب بوتیل هیدروکسی تولوئن به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی از فرمول زیر محاسبه گردید:

DPPH radical scavenging ability (%) = [1- (Aa-Ab)/Ac] × 100

که در این فرمول، Aa میزان جذب نمونه حاوی منیریم، Ab میزان جذب شاهد و Ac میزان جذب نمونه کنترل می‌باشد [۱۲].

اثرات ضد باکتریایی نانوذرات اکسید منیزیم بر علیه ۵ باکتری گرم مثبت و گرم منفی شامل: *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سالمونلا انتریتیدیس*، *باسیلوس سرئوس*، *اشریشیا کلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* به روش انتشار چاهک انجام شد. غلظت متفاوت ۳۰، ۱۵، ۷/۵، ۳/۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از نانوذرات اکسید منیزیم در حلال دی متیل سولفوکسید و متانول با حجم برابر (v/v ۱:۱) به روش دو برابر کردن رقت در هر مرحله تهیه شد. از کشت باکتری در محیط مایع معادل کدورت نیم مک فارلند بر روی محیط کشت مولرهینتون آگار (مرک، آلمان) به روش یکنواخت تلقیح گردید و سپس چاهک‌هایی به قطر ۶ میلی‌متر به فاصله ۱۵ میلی‌متر از لبه پلیت و ۲۰ میلی‌متر از همدیگر ایجاد گردید. از غلظت‌های تهیه شده از نانوذرات اکسید منیزیم مقدار ۰/۲ میلی‌لیتر در هر چاهک ریخته شد. سپس پلیت‌ها در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و مدت زمان ۲۴ ساعت قرار داده شدند [۱۲].

برای شناسایی مولکولی از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Polymerase chain reaction; PCR) استفاده شد. استخراج DNA توسط کیت استخراج شرکت سیناژن طبق دستورالعمل انجام شد. ژن ۱۶ S rRNA با استفاده ازپرایمرهای اولیگونوکلئوتیدی 5′AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3′ (8F) و

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-06-10]

[DOI: 10.52547/jrums.21.11.1133]

5´AAGGAGGTGATCCAGCCGCA 3´ (1541R) تکثیر شد. واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل: ۱۰ نانوگرم بر میکرولیتر DNA الگو، ۰/۴ میکرومولار از هر پرایمر، ۰/۲ میکرومولار dNTP، ۲ میکرو مولار MgCl2، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR و ۱ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase انجام گردید. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Bio-Rad، آمریکا) با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. در نهایت، محصول PCR به ژل آگارز ۱ درصد واجد اتیدیوم برماید منتقل و به مدت ۱ ساعت با ولتاژ ۸۰ ولت الکتروفورز گردید [۱]. ۲۰۰ میکرولیتر از محصول PCR به شرکت تکاپوزیست، تهران ارسال گردید. سپس توالی‌های ارسال شده با نرم‌افزارهای Bio edit و Gene runner و مگا ورژن ۷ بررسی گردید. پس از بلاست کردن در سایت NCBI (National Center for Biotechnology Information) و انجام بلاست سویه مورد نظر شناسایی گردید [۱۳].

اطلاعات جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. متغیرهای کمی به صورت انحراف معیار ± میانگین و متغیرهای کیفی به صورت تعداد و درصد گزارش شدند. بررسی خواص ضدباکتریایی در سه تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. فرض نرمال بودن توزیع متغیرهای کمی با استفاده از آزمون ناپارامتریک Kolmogorov-Smirnov مورد بررسی قرار گرفت و با توجه به برخورداری متغیرهای کمی از توزیع نرمال (P>۰/۰۵)، جهت مقایسه میانگین این متغیرها در گروه‌های مختلف مورد بررسی (غلظت‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها) از آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی Tukey استفاده شد. سطح معنی‌داری در آزمون‌ها ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

در مجموع ۴۰ باکتری پروبیوتیک از نمونه‌های ماست سنتی شهر رفسنجان جداسازی و شناسایی شد. تعداد ۹ جدایه از مجموع کلنی بررسی شده باکتری‌هایی به اشکال کوکسی و باسیل گرم مثبت و کاتالاز منفی بودند که قابلیت تولید بیوسورفکتانت داشتند. بررسی نتایج گسترش نفت خام بر روی آن‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است که همگی قادر به کاهش کشش سطحی بوده و هاله شفاف تشکیل دادند. جدایه L۸ بیشترین هاله را تشکیل داد و در بررسی گسترش نفت خام با آب مقطر هیچ‌گونه تغییری در سطح لکه نفتی ایجاد نشد.

در بررسی فعالیت امولسیون کنندگی طبق جدول ۱، مشخص گردید که جدایه L۸ فعالیت امولسیون کنندگی قابل توجهی داشته و به عنوان جدایه برتر جهت تولید بیوسورفکتانت و نانوذرات اکسید منیزیم انتخاب گردید.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-06-10]

[DOI: 10.52547/jrums.21.11.1133]

جدول ۱- نتایج آزمون گسترش نفت خام و فعالیت امولسیونه کنندگی ۹ باکتری پروبیوتیک جدا شده از ۱۵ نمونه ماست محلی رفسنجان در سال ۱۴۰۰

جدایه پروبیوتیکی	گسترش نفت خام قطر هاله (میلی‌متر)	فعالیت امولسیونه کنندگی (E_{24}٪)
L۳	۴۹	۶۱
L۴	۳۰	۵۲
L۵	۳۰	۲۲/۵
L۷	۲۸	۵۶
L۸	۵۹	۵۷
L۹	۲۹	۰
L۱۰	۳۴	۳۵
L۱۱	۵۵	۵۲
L۱۲	۵۸	۳۳

بیوسورفکتانت استخراج شده از جدایه L۸، فعالیت ضد باکتریایی قابل توجهی در برابر سویه‌های باکتریایی مورد استفاده نشان داد. بیوسورفکتانت استخراج شده به رنگ قهوه‌ای کاملاً تیره، با قوام عسل مانند و حالت کش‌دار و وزن آن ۱/۳۸ گرم بود. اثرات ضد باکتریایی بیوسورفکتانت در غلظت‌های ۱۰۰، ۵۰، ۲۵ و ۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر علیه ۵ سویه باکتری *اشریشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *سالمونلا انتریتیدیس* و *باسیلوس سرئوس* در ۳ تکرار مورد بررسی قرار گرفت. میانگین و انحراف معیار میزان فعالیت ضد باکتریایی غلظت‌های مختلف بیوسورفکتانت در جدول ۲ گزارش شده است. با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه، فعالیت بر علیه هر باکتری در غلظت‌های مختلف بیوسورفکتانت مورد مقایسه قرار گرفت و با توجه به معنی‌دار بودن این آزمون در تمام باکتری‌ها، جهت مقایسه دو به دوی غلظت‌ها با هم، از آزمون تعقیبی Tukey استفاده شد. در جدول ۲، مقایسات به صورت سطری انجام شده (مقایسه غلظت‌های مختلف بیوسورفکتانت بر علیه هر باکتری) و حروف انگلیسی متفاوت، نشان دهنده تفاوت معنی‌داری بین غلظت‌ها می‌باشد ($P<۰/۰۵$). به عنوان مثال، میزان فعالیت علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در دو غلظت ۱۲/۵ و ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، از لحاظ آماری مشابه بوده ($P>۰/۰۵$) ولی میزان فعالیت در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌طور معنی‌داری بیشتر از دو غلظت ۱۲/۵ و ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ($P<۰/۰۵$) و میزان فعالیت در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نیز به‌طور معنی‌داری بیشتر از سه غلظت دیگر بوده است ($P<۰/۰۵$).

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-06-10]

[DOI: 10.52547/jrums.21.11.1133]

جدول ۲- فعالیت ضد باکتریایی غلظت‌های مختلف بیوسورفکتانت (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) حاصل از سویه پروبیوتیکی L8 جدا شده از ۱۵ نمونه ماست محلی بر علیه ۵ سویه باکتری پاتوژن (n=۶۰)

غلظت بیوسورفکتانت / سویه باکتری	۱۰۰ انحراف معیار ± میانگین	۵۰ انحراف معیار±میانگین	۲۵ انحراف معیار±میانگین	۱۲/۵ انحراف معیار±میانگین	مقدار P
اشریشیا کلی	۱۷/۰۰ ± ۰/۸۹ ^{c}	۷/۰۰ ± ۰/۴۳ ^{b}	۰ ^{a}	۰ ^{a}	۰/۰۱۴
استافیلوکوکوس‌اورئوس	۳۲/۰۰ ± ۰/۴۳ ^{c}	۲۲/۰۰ ± ۰/۸۸ ^{b}	۱۱/۰۰ ± ۰/۷۸ ^{a}	۱۰/۰۰ ± ۰/۵۲ ^{a}	۰/۰۲۱
سودوموناس آئروژینوزا	۲۵/۰۰ ± ۰/۳۶ ^{d}	۲۲/۰۰ ± ۰/۷۰ ^{c}	۱۲/۰۰ ± ۰/۳۶ ^{b}	۰ ^{a}	۰/۰۱۵
سالمونلا انتریتیدیس	۱۶/۰۰ ± ۰/۸۷ ^{c}	۱۳/۰۰ ± ۰/۲۶ ^{b}	۰ ^{a}	۰ ^{a}	۰/۰۱۴
باسیلوس سرئوس	۲۰/۰۰ ± ۰/۶۵ ^{c}	۱۹/۰۰ ± ۰/۷۸ ^{c}	۱۰/۰۰ ± ۰/۲۰ ^{b}	۷/۰۰ ± ۰/۵۳ ^{a}	۰/۰۲۲

اعداد جدول میانگین و انحراف معیار قطر هاله عدم رشد برحسب میلی‌متر می‌باشد.

آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی Tukey، حروف انگلیسی متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در میزان فعالیت علیه باکتری برحسب غلظت‌های مختلف (P<۰/۰۵).

در جدول ۳، الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های باکتریایی بر علیه ۵ آنتی بیوتیک مختلف تعیین شده است. برای هر مورد، ۳ نمونه (تکرار) مورد بررسی قرار گرفته است. مقایسه اثرات ضد باکتریایی غلظت‌های مختلف بیوسورفکتانت استخراج شده و آنتی‌بیوتیک‌های مختلف بر روی ۵ سویه باکتری بیماری‌زا نشان داد که بیوسورفکتانت استخراج شده جدایه منتخب این پژوهش، از اثرات ضد باکتریایی مطلوبی در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های مذکور علیه سویه‌های بیماری‌زای منتخب برخوردار بودند. با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه، میزان حساسیت هر سویه باکتری بر علیه ۵ آنتی‌بیوتیک مختلف مورد مقایسه قرار گرفت. با توجه به معنی‌دار بودن این آزمون در تمام باکتری‌ها، جهت مقایسه دو به دوی غلظت‌ها با هم، از آزمون تعقیبی Tukey استفاده شد. در این جدول نیز مقایسه‌ها به صورت سطری انجام شده (مقایسه میزان حساسیت هر سویه باکتری بر علیه ۵ آنتی‌بیوتیک مختلف) و حروف انگلیسی متفاوت، نشان دهنده تفاوت معنی‌داری بین آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد (P<۰/۰۵). برای نمونه، باکتری *اشریشیا کلی* نسبت به آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین مقاوم و میزان حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک سفتریاکسون به طور معنی‌داری بیشتر از تتراسایکلین، میزان حساسیت نسبت به آمیکاسین به طور معنی‌داری بیشتر از سفتریاکسون، میزان حساسیت نسبت به جنتامایسین به طور معنی‌داری بیشتر از آمیکاسین و میزان حساسیت نسبت به سیپروفلوکساسین به طور معنی‌داری بیشتر از جنتامایسین بوده است (P<۰/۰۵). در واقع حساسیت‌های *اشریشیا کلی* نسبت به آنتی بیوتیک‌های آمیکاسین و سفتریاکسون در محدوده نیمه‌حساس، و نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین و جنتامایسین در محدوده حساس قرار گرفته است (جدول ۳).

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-06-10]

[DOI: 10.52547/jrums.21.11.1133]

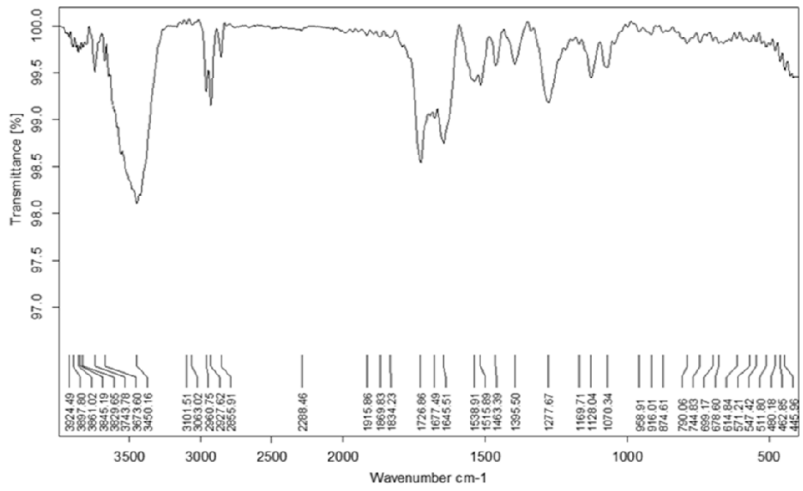
جدول ۳- الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی ۵ سویه باکتریایی نسبت به ۵ آنتی بیوتیک (n=۷۵)

آنتی‌بیوتیک / سویه باکتری	جنتامایسین انحراف معیار ± میانگین	سیپروفلوکساسین انحراف معیار ± میانگین	سفتریاکسون انحراف معیار ± میانگین	تتراسایکلین انحراف معیار ± میانگین	آمیکاسین انحراف معیار ± میانگین	مقدار P
اشریشیا کلی	۲۰/۰۰±۰/۲۶^{d} حساس	۲۷/۰۰±۰/۴۶^{e} حساس	۱۳/۰۰±۰/۶۲^{b} نیمه‌حساس	۰^{a} مقاوم	۱۵/۰۰±۰/ ۸۹^{c} نیمه‌حساس	۰/۰۰۹
استافیلوکوکوس اورئوس -	۲۸/۰۰±۰/۳۰^{d} حساس	۲۵/۰۰±۰/۲۷^{c} حساس	۰^{a} مقاوم	۰^{a} مقاوم	۱۹/۰۰±۰/۸۹^{b} حساس	۰/۰۰۸
سودوموناس آئروژینوزا	۰^{a} مقاوم	۶/۰۰±۰/۷۰^{b} مقاوم	۰^{a} مقاوم	۰^{a} مقاوم	۰^{a} مقاوم	۰/۰۰۸
سالمونلا انتریتیدیس	۲۰/۰۰±۰/۴۳^{d} حساس	۱۱/۰۰±۰/۲۷^{b} مقاوم	۰^{a} مقاوم	۰^{a} مقاوم	۱۴/۰۰±۰/۸۹^{c} مقاوم	۰/۰۰۸
باسیلوس سرئوس	۲۸/۰۰±۰/۴۰^{e} حساس	۲۶/۰۰±۰/۸۰^{d} حساس	۰^{a} مقاوم	۱۵/۰۰±۰/۲۰^{b} حساس	۲۱/۰۰±۰/۴۳^{c} حساس	۰/۰۰۹

اعداد جدول میانگین و انحراف معیار قطر هاله عدم رشد برحسب میلی‌متر می‌باشد.

آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی Tukey، حروف انگلیسی متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در میزان حساسیت باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف (P<۰/۰۵).

طیف سنجی مادون قرمز بر اساس جذب تابش و بررسی جهت‌های ارتعاشی مولکول‌ها و یون‌های چند اتمی صورت می‌گیرد. نتایج طیف‌سنجی اسپکتروسکوپی مادون قرمز FTIR نشان داد که طول موج‌های ظاهر شده در ناحیه $3444\ cm^{-1}$ مربوط به پیوندهای هیدروکسیدی گروه O-H در ساختار نانوذرات اکسید منیزیم می‌باشد. پیوندهای C-H ارتعاشی موجود در ساختار نانوذرات در طول موج حدود $2288cm^{-1}$ و $1644\ cm^{-1}$ ظاهر می‌شوند. پیوندهای C-H-C موجود در ساختار نانوذرات در ناحیه $1234\ cm^{-1}$ و $1129\ cm^{-1}$ در طیف اسپکتروسکوپی مادون قرمز FTIR نمایش داده شده‌اند. وجود پیوندهای فلزی در ناحیه زیر $1000\ cm^{-1}$ به صورت پیک‌های ضعیفی نمایان شد. اسپکتروسکوپی مادون قرمز وجود نانوذرات اکسید منیزیم را تأیید نمود (نمودار ۱).

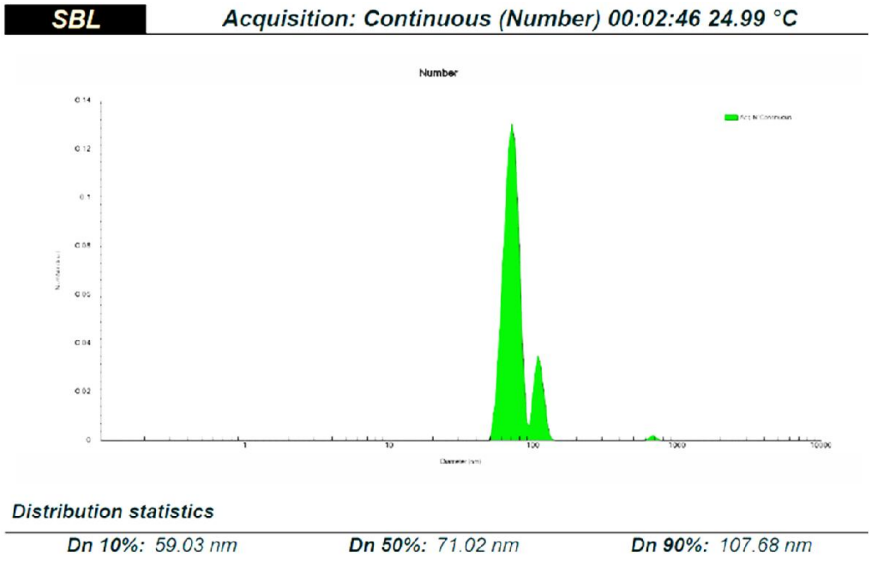


نمودار ۱- طیف FTIR نانوذرات اکسید منیزیم سنتز شده توسط سویه پروبیوتیک L8

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-06-10]

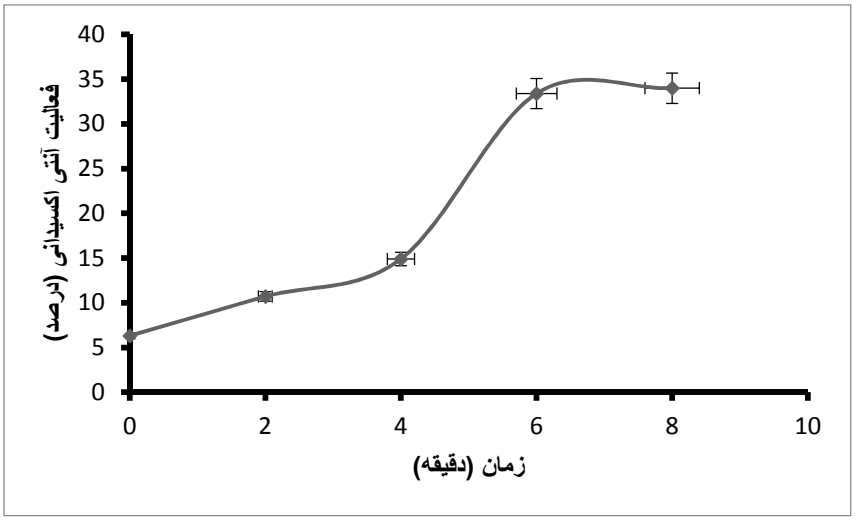
[DOI: 10.52547/jrums.21.11.1133]

توزیع اندازه ذره‌ای یا تفرق نور پویا یکی از روش‌های مناسب برای تعیین توزیع ابعاد ذرات است. این آنالیز نشان داد اندازه ۹۰ درصد نانوذرات تشکیل شده توسط سویه پروبیوتیکی L8، برابر ۱۰۷ نانو متر می‌باشد (نمودار ۲).



نمودار ۲- نتایج توزیع اندازه ذره‌ای نانوذرات اکسید منیزیم سنتز شده توسط سویه پروبیوتیک L8

نتایج فعالیت آنتی‌اکسیدانی نانوذرات اکسید منیزیم نشان داد که نانوذره ساخته شده توسط سویه پروبیوتیک L8، دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجه و وابسته به زمان می باشد به طوری که در فاصله زمانی ۱۰ دقیقه با شیب ملایم، میزان مهار رادیکال‌های آزاد به افزایش حدود ۳۵ تا ۴۰ درصد را نشان داد (نمودار ۳).



نمودار ۳- فعالیت آنتی اکسیدانی نانوذرات اکسید منیزیم سنتز شده توسط سویه پروبیوتیک L8

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-06-10]

[DOI: 10.52547/jrums.21.11.1133]

نتایج مربوط به فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات اکسید منیزیم در جدول ۴ گزارش شده است. برای هر باکتری، نانوذره اکسید منیزیم با غلظت‌های مختلف ۳۰، ۱۵، ۷/۵ و ۳/۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (هر مورد در ۳ بار تکرار) مورد بررسی قرار گرفته است. نانوذرات اکسید منیزیم فعالیت خوبی در برابر باکتری‌های گرم مثبت نشان دادند. *باسیلوس سرئوس* حساس‌ترین جدایه بود. نتایج این پژوهش نشان داد که نانوذرات اکسید منیزیم بر باکتری‌های *اشریشیا کلی* و *سالمونلا انتریتیدیس* فعالیت ضد باکتریایی نداشت. با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه، فعالیت ضدباکتریایی بر علیه هر باکتری در غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید منیزیم مورد مقایسه قرار گرفت. با توجه به معنی‌دار بودن این آزمون در تمام باکتری‌ها، جهت مقایسه دو به دوی غلظت‌ها با هم، از آزمون تعقیبی Tukey استفاده شد. در این جدول، مقایسه‌ها به صورت سطری انجام شده (مقایسه میزان فعالیت ضد باکتریایی غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید منیزیم بر علیه هر باکتری) و حروف انگلیسی متفاوت، نشان دهنده تفاوت معنی‌داری بین غلظت‌ها می‌باشد (P<۰/۰۵). همان‌گونه که در جدول ۴ مشاهده می‌شود، میزان فعالیت علیه هر سه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *باسیلوس سرئوس* در غلظت ۷/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌طور معنی‌داری بیشتر از غلظت ۳/۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده و میزان فعالیت در غلظت ۱۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌طور معنی‌داری بیشتر از غلظت ۷/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و میزان فعالیت در غلظت ۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌طور معنی‌داری بیشتر از غلظت ۱۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است (P<۰/۰۵).

جدول ٤- بررسی اثرات ضد باکتریایی نانوذره اکسید منیزیم (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بر علیه ٥ سویه باکتریایی پاتوژن در ٤ غلظت مورد بررسی (n=٦٠)

غلظت نانوذره / سویه باکتری	۳۰ انحراف معیار ± میانگین	۱۵ انحراف معیار ± میانگین	۷/۵ انحراف معیار ± میانگین	۳/۷۵ انحراف معیار ± میانگین	مقدار P
اشریشیا کلی	۰[a]	۰[a]	۰[a]	۰[a]	-
استافیلوکوکوس‌اورئوس	۲۵/۰۰ ± ۰/۲۷[d]	۲۰/۰۰ ± ۰/۲۷[c]	۱۸/۰۰ ± ۰/۲۰[b]	۱۵/۰۰ ± ۰/۳۰[a]	۰/۰۱۶
سودوموناس آئروژینوزا	۲۲/۰۰ ± ۰/۲۷[d]	۱۲/۰۰ ± ۰/۵۰[c]	۱۰/۰۰ ± ۰/۳۰[b]	۹/۰۰ ± ۰/۷۰[a]	۰/۰۱۶
سالمونلا انتریتیدیس	۰[a]	۰[a]	۰[a]	۰[a]	-
باسیلوس سرئوس	۳۰/۰۰ ± ۰/۱۰[d]	۲۵/۰۰ ± ۰/۲۰[c]	۲۴/۰۰ ± ۰/۲۷[b]	۲۳/۳۳ ± ۰/۴۵[a]	۰/۰۱۹

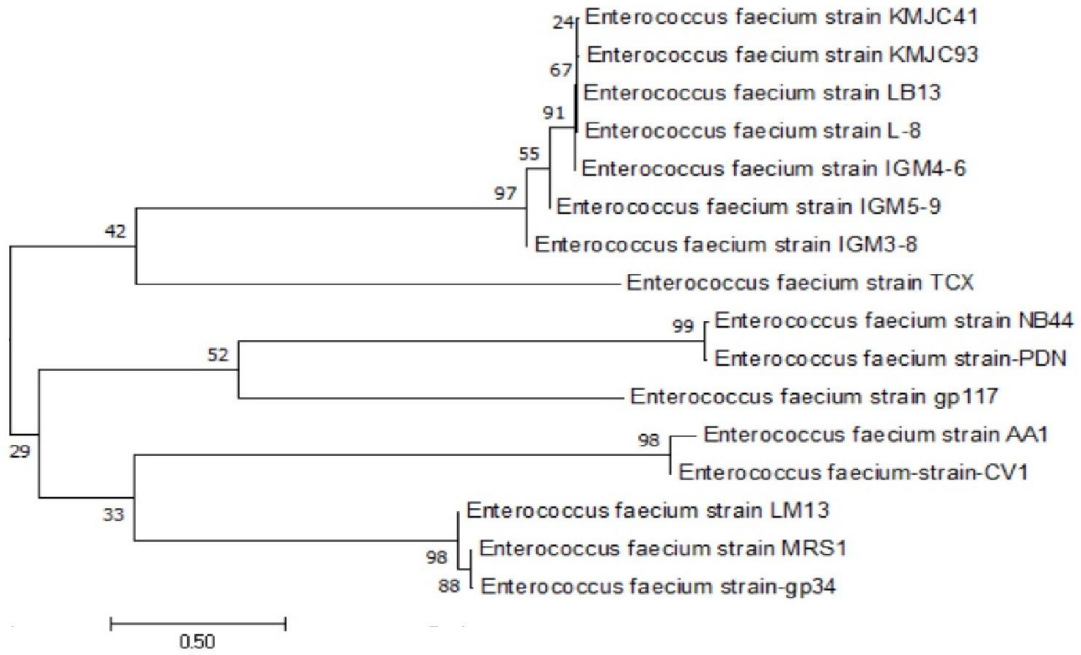
اعداد جدول میانگین و انحراف معیار قطر هاله عدم رشد برحسب میلی‌متر می‌باشد.

آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی Tukey، حروف انگلیسی متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در میزان فعالیت ضد باکتریایی غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید منیزیم (P<۰/۰۵).

ضمن آنالیز تشابه توالی ژن ۱۶ S rRNA، سویه *انتروکوکوس فاسیوم* L8 با قابلیت های تولید بیوسورفکتانت، اثر ضد باکتریایی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و تولید کننده نانوذره اکسید منیزیم شناسایی شد. شکل ۱، نشان دهنده ارتباط فیلوژنی سویه *انتروکوکوس فاسیوم* L8 و باکتری‌های مرجع موجود در GenBank می‌باشد.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-06-10]

[DOI: 10.52547/jrums.21.11.1133]



شکل ۱- درخت فیلوژنتیکی نشان دهنده ارتباط بین توالی‌های 16srRNA سویه انتروکوکوس فاسیوم L8 و توالی‌های مرجع در GenBank. اعداد واقع در شاخه‌ها نمایش‌گر ارزش Bootstrapping برحسب درصد می‌باشند.

بحث

باکتری‌های پروبیوتیک مکمل‌های غذایی میکروبی هستند که از طریق حفظ تعادل میکروبی روده تأثیرات سودمندی بر سلامت انسان‌ها دارند. تحقیقات انجام شده نشان داده است که استفاده از محصولات پروبیوتیک می‌تواند در از بین بردن میکروب‌های بیماری‌زا مؤثر باشد. لذا پروبیوتیک‌ها می‌توانند به عنوان درمان کمکی در کنار داروها یا حتی درمان اصلی به کار گرفته شوند [۱۴]. این باکتری‌ها گرم مثبت، میله‌ای شکل، بدون اسپور و کاتالاز منفی هستند که قادرند در شرایط اسیدی پایین رشد نمایند و با تولید اسیدهای آلی و ترشح مواد آنتی باکتریال همچون باکتریوسین‌ها محیط را برای رشد دیگر میکروارگانیسم‌ها نامناسب نمایند. در مطالعه حاضر، پروبیوتیک‌های تولید کننده بیوسورفکتانت از نمونه ماست سنتی شهرستان رفسنجان جداسازی شد. جدایه‌ها از نظر مورفولوژی ظاهری، واکنش گرم و آزمون کاتالاز مورد بررسی قرار گرفتند. جدایه‌های تولید کننده بیوسورفکتانت با آزمایش‌های تکنیک گسترش نفت خام و فعالیت امولسیون کنندگی شناسایی شدند [۱۵].

بیوسورفکتانت‌ها باعث کاهش کشش سطحی و مهار اتصال پاتوژن‌ها می‌شوند [۱۶]. بیوسورفکتانت‌ها در صنایع غذایی به عنوان امولسیفایر جهت فرآیند مواد خام جهت ایجاد سازگاری و قوام مطلوب در غذا مورد استفاده قرار می‌گیرند. از کاربردهای بیوسورفکتانت‌ها در صنایع غذایی می‌توان به تهیه انواع سس‌ها و فرآورده‌های لبنی مانند پنیر اشاره کرد. از جمله مزایای این ترکیبات سمیت پایین،

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-06-10]

[DOI: 10.52547/jrums.21.11.1133]

قابلیت تجزیه‌پذیری زیستی، قدرت تولید کف فراوان، سازگاری بهتر با شرایط متغیر محیط، قابلیت دسترسی آسان به دلیل تنوع ساختاری و توانایی بیوسنتز آن‌ها از گروه‌های مختلف میکروبی می‌باشد [۱۷]. هم‌چنین، برخی از پروبیوتیک‌ها قابلیت سنتز نانوذره دارند. در این مطالعه شناسایی پروبیوتیک‌هایی با دو ویژگی تولید بیوسورفکتانت و سنتز نانوذره اکسید منیزم مدنظر قرار گرفت.

نانوذرات منیزیم به دلیل زیست سازگاری، زیست تخریب‌پذیری و هزینه نسبتاً پایین در صنایع مختلف استفاده می‌شود. این نانوذرات را می‌توان به عنوان ضد باکتریایی به تنهایی یا در ترکیب با سایر عوامل ضد باکتریایی استفاده کرد. سنتز بیولوژیکی نانوذرات یک روش مقرون به صرفه و کم هزینه، سازگار با محیط زیست و به عنوان یک ماده ایمن برای سلامت انسان که به راحتی در دسترس می‌باشد [۱۰]. تحقیقات متعددی در خصوص میکروارگانیسم های تولیدکننده بیوسورفکتانت در آب، خاک و مناطق آلوده به هیدروکربن‌ها صورت گرفته است، اما تحقیق حاضر و تحقیقات مشابه تولید این ترکیبات را در لبنیات و مواد غذایی مورد توجه قرار داده است. به عنوان مثال از باکتری *باسیلوس سوبتیلیس*، نوعی بیوسورفکتانت جدا شده است که به عنوان امولسیفایر در صنایع غذایی نقش نگه دارنده را دارد [۱۸] و نیز مشابه تحقیق حاضر، در پژوهش دیگری از محصولات لبنی لاکتوباسیلوس‌های با قابلیت تولید بیوسورفکتانت جدا گردیده است [۲۰-۱۹]. بر اساس نتایج تحقیق حاضر، با توجه به آزمون گسترش نفت خام و فعالیت امولسیون کنندگی جدایه L۸، با توانایی تولید بیوسورفکتانت مطلوب شناسایی شد. بیوسورفکتانت حاصل از این جدایه فعالیت ضد باکتریایی در برابر باکتری‌های بیماری‌زای مورد استفاده نشان داد.

نتایج $E_{۲۴}$ به‌دست آمده برای جدایه‌های غربال شده از این پژوهش نشان داد ۶ جدایه پروبیوتیکی، فعالیت امولسیون کنندگی نسبتاً خوبی نشان دادند و ۳ جدایه هم دارای فعالیت آمیزندگی نسبی بودند. در پژوهشی دیگری، بیوسورفکتانت حاصل از *لاکتوباسیلوس کازئی* جدا شده از شیرخام در مزارع هارینا در هند، فعالیت امولسیون را ۵۸ درصد برآورد کردند که با نتایج به دست آمده در این پژوهش همخوانی دارد [۱۶].

محققین دیگری، خواص بیوسورفکتانت تولید شده در لاکتوباسیلوس‌ها را بررسی کردند. بیوسورفکتانت‌های تولید شده توسط *لاکتوباسیلوس جانسونی* P6A و *لاکتوباسیلوس گسری* P65 به ترتیب ۶۲ و ۷۷ درصد گزارش شد و نتایج حاصل از بررسی فعالیت امولسیون کنندگی با استفاده از نفت سفید با یافته‌های تحقیق حاضر هم‌راستا می‌باشد [۲۱].

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که فعالیت ضد باکتریایی گسترده‌تر بیوسورفکتانت‌های به دست آمده از سویه *انتروکوکوس فاسیوم* L8، در مقایسه با ۵ آنتی‌بیوتیک می‌باشد. فعالیت ضد باکتریایی بیوسورفکتانت به ساختار بیوسورفکتانت تولید شده، غلظت استفاده شده و نوع باکتری‌های مورد مطالعه بستگی دارد. لذا در بررسی مطالعات مشابه، وجود برخی تفاوت‌ها در میزان اثرات ضد باکتریایی مشاهده شده در مطالعه حاضر و پژوهش‌های سایر محققین می‌تواند به دلیل تفاوت سوبستراهای مختلف برای

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-06-10]

[DOI: 10.52547/jrums.21.11.1133]

رشد باکتری تولید کننده بیوسورفکتانت و استفاده از روش-های مختلف برای استخراج و تفاوت موجود در ترکیبات متشکله بیوسورفکتانت‌ها باشد.

در راستای تحقیق حاضر، پژوهش دیگری نشان داد که بیوسورفکتانت تولید شده از *لاکتوباسیلوس جانسونی* و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* فعالیت ضد باکتریایی برعلیه *اسینتوباکتر بومانی*، *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* با غلظت ۵۰-۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دارد. هم‌چنین، بیوسورفکتانت باعث آسیب غشاء *اسینتوباکتر بومانی* و آسیب دیواره سلولی در *استافیلوکوکوس اورئوس* گردید که با نتایج فعالیت ضد باکتریایی پژوهش حاضر، مشابه می‌باشد [۲۲]. Rayeni و همکاران، خصوصیات بیوسورفکتانت تولید شده توسط باکتری‌های پروبیوتیک را بررسی کردند و نشان دادند که بیوسورفکتانت‌های تولید شده توسط سویه‌های غربال شده در مقایسه با آنتی بیوتیک‌های رایج، از فعالیت ضد باکتریایی مطلوبی برخودار هستند و برخی از جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها مؤثرتر عمل کردند که با نتایج مطالعه حاضر همخوان است [۱].

به طور معمول، از روش‌های فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی می‌توان برای سنتز نانوذرات اکسید منیزیم استفاده کرد [۲۳]. از عصاره‌های گیاهی، قارچ‌ها و باکتری‌ها برای سنتز نانوذرات اکسیدهای فلزی به روش سبز استفاده می‌گردد [۲۴]، که در پژوهش حاضر، سنتز نانوذرات اکسید منیزیوم توسط باکتری پروبیوتیک با قابلیت تولید بیوسورفکتانت انجام شد. سایز و پراکندگی مناسب نانوذرات تولیدی منجر به بروز خواص ضد باکتریایی و آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی گردید. تولید نانوذرات اکسید منیزیم توسط *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس اسپوروژنز*، در مطالعه مشابهی گزارش شد. آنالیز توزیع اندازه ذره‌ای نانوذرات نشان دهنده تعیین توزیع ابعاد ذرات بود که در تحقیق حاضر و تحقیقات مشابه نیز از این آزمون استفاده شده است [۱۰]. سنتز نانوذرات اکسید منیزیم توسط *آسپرژیلوس توربنجنسیس* با اندازه ۲/۸ نانومتر و شکل کروی، نمونه دیگری از روش سبز سنتز نانوذرات می‌باشد [۲۵].

تولید فاکتورهای استرس اکسیداتیو یکی از علل بروز بسیاری از بیماری‌های ناشی از اختلالات متابولیک می‌باشد. رادیکال‌های آزاد موجب انجام زنجیره‌ای از واکنش‌ها می‌شوند که در نهایت به سلول‌های ارگانیسم‌های مختلف آسیب می‌رسانند. از این رو کاهش تولید یا حذف این عوامل می‌تواند در جلوگیری یا بهبود بیماری‌های مربوطه مؤثر باشد. آنتی‌اکسیدان‌ها با خنثی سازی رادیکال‌های آزاد از یک طرف باعث کاهش خطر ابتلاء به بیماری‌های قلبی عروقی و سکته می‌شوند و از طرف دیگر از پیشرفت سرطان‌ها جلوگیری می‌کنند [۲۶].

در تحقیق حاضر، خواص آنتی‌اکسیدانی نانوذره اکسید منیزیم تولید شده توسط سویه *انتروکوکوس فاسیوم* L8 بررسی شد که میزان مهار رادیکال‌های آزاد را در محدوده ۳۵ تا ۴۰ درصد افزایش، نشان داد. فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات اکسید منیزیم نیز در برابر برخی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مورد ارزیابی قرار گرفت. بررسی آماری نتایج نشان داد که نانوذرات اکسید منیزیم اثر ضد باکتریایی

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-06-10]

[DOI: 10.52547/jrums.21.11.1133]

مناسبی بر باکتری‌های گرم مثبت دارد و بر علیه باکتری‌های گرم منفی *اشریشیا کلی* و *سالمونلا انتریتیدیس* مؤثر واقع نشدند که احتمالاً دلیل آن پوشش سلولی باکتری‌های گرم منفی و وجود غشاء خارجی و پروتئین‌های پورین موجود در غشاء خارجی می‌باشد که دارای ویژگی نفوذپذیری انتخابی می‌باشند. در پژوهشی اثرات ضد باکتری نانوذرات اکسید منیزیم ساخته شده به روش شیمیایی بر علیه سه باکتری *استافیلوکوکوس‌اورئوس*، *سالمونلا انتریتیدیس* و *باسیلوس سرئوس* عامل مسمومیت غذایی بررسی کردند و هر سه باکتری علی‌رغم این که به برخی از آنتی بیوتیک‌ها مقاومت نشان دادند، اما نسبت به نانوذرات اکسید منیزیم حساس بودند [۲۷].

در پژوهش دیگری، اثر ضد باکتریایی ۹ گونه *انتروکوکوس* جدا شده از فرآورده‌های سنتی منطقه تبریز بر روی ۹ باکتری گرم مثبت و گرم منفی بررسی شد. بیشترین اثر ضد باکتریایی مربوط به گونه‌های *انتروکوکوس فکالیس* و *فاسیوم* نسبت به باکتری‌های گرم منفی بود که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی نداشت. در مطالعه حاضر، انتروکوکوس‌ها بر روی باکتری‌های گرم مثبت اثر داشتند و اثری بر روی باکتری‌های گرم منفی نداشتند. این وضعیت می‌تواند در نتیجه تفاوت سویه‌های جداسازی شده از مناطق مختلف جغرافیایی باشد. هم‌چنین، روش و تکنیک اثرات ضد باکتریایی می‌تواند از عوامل مهم و مؤثر در کسب نتایج متفاوت در این قبیل آزمون‌ها باشد [۲۵].

جهت شناسایی دقیق جدایه‌های تولید کننده بیوسورفکتانت از روش قدرت‌مند و دقیق توالی‌یابی ژن S ۱۶rRNA، استفاده شد. سویه L۸ غربال‌گری شده، تحت عنوان *انتروکوکوس فاسیوم* شناسایی گردید. در پژوهش مشابهی، ۲۶ جدایه پروبیوتیکی از نمونه‌های شیر، ماست و پنیر بومی جداسازی گردید که تنها دو جدایه بیشترین تحمل را در شرایط اسیدی و غلظت بالای نمک‌های صفراوی از خود نشان دادند و هم‌چنین اثر ضد باکتریایی مطلوبی داشتند که این دو سویه مربوط به گونه *لاکتوباسیلوس کازئی* بود [۲۶].

به دلیل کم بودن تنوع نمونه‌های لبنی مورد استفاده در تحقیق حاضر و استفاده از سویه‌های بیماری‌زای محدود جهت بررسی فعالیت ضد میکروبی بیوسورفکتانت و نانوذره اکسید منیزیم، اظهار نظر قطعی در مورد نتایج این مطالعه مشکل است و پیشنهاد می‌شود در پژوهش‌های بعدی از نمونه‌های مختلف لبنی و انتخاب طیف گسترده‌تر باکتری-های بیماری‌زا استفاده شود.

نتیجه‌گیری

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که باکتری‌های جدا شده از فرآورده‌های لبنی شهر رفسنجان دارای خاصیت پروبیوتیکی بوده و برخی از سویه‌ها قادر به تولید بیوسورفکتانت و سنتز نانوذرات اکسید منیزیم می‌باشند که هر دو متابولیت تولید شده دارای خاصیت ضد باکتریایی بوده و می‌توانند در مطالعات بعدی سویه برتر به عنوان عوامل ضد باکتریایی فعال و کاندیدای مناسب برای کنترل آلودگی‌های میکروبی غذایی و بخش‌های صنعتی در نظر گرفته شود.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-06-10]

[DOI: 10.52547/jrums.21.11.1133]

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان نامه دوره دکتری میکروبیولوژی می‌باشد. نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از همکاری صمیمانه حوزه پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهید سلیمانی به جهت تأمین بخشی از هزینه‌های تحقیق و تجهیزات آزمایشگاهی تشکر و قدردانی نمایند.

References

[1] Rayeni LT, Nezhad SS. Characterization of biosurfactant produced by probiotic bacteria isolated from human breast milk. *Int basic appl med Sci* 2018; 3(1): 18-24.

[2] La Fata G, Weber P, Mohajeri MH. Probiotics and the Gut Immune System: Indirect Regulation. *Probiotics Antimicrob Proteins* 2018; 10(1): 11-21.

[3] Imani MM, Safaei M. Optimized Synthesis of Magnesium Oxide Nanoparticles as Bactericidal Agents. *J Nanotechnol* 2019; 2019.

[4] Mozaffari HR, Sharifi R, Sadeghi M. Interleukin-6 levels in the serum and saliva of patients with oral lichen planus compared with healthy controls: a meta-analysis study. *Cent Eur J Immuno* 2018; 43(1): 103.

[5] Joob B, Wiwanitkit V. Nanotechnology for health: A new useful technology in medicine. *Med J DY Patil Univ* 2017; 10(5): 401.

[6] Samadi M, Shekarforoush SS, Ghaisari HR. Antimicrobial effects of magnesium oxide nanoparticles and ε-poly-L-lysine against Escherichia coli O157: H7 and Listeria monocytogenes. *IJMM* 2016; 10(2): 33-41. [Farsi]

[7] Jafari B, Rezaie A, Alizadeh S. Isolation and identification of potentially probiotic bacteria from traditional dairy products of Ardabil region in Iran. *Ann Biol Res* 2011; 2: 311-7.

[8] Anandaraj B, Thivakaran P. Isolation and production of biosurfactant producing organism from oil spilled soil. *J Biosci Tech* 2010; 1(3): 120-6.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-06-10]

[DOI: 10.52547/jrums.21.11.1133]

[9] Benkova M, Soukup O, Marek J. Antimicrobial susceptibility testing: currently used methods and devices and the near future in clinical practice. *J Applied Microbiol* 2020; 129(4): 806-22.

[10] Mohanasrinivasan V, Devi CS, Mehra A, Prakash S, Agarwal A, Selvarajan E, et al. Biosynthesis of MgO Nanoparticles Using Lactobacillus Sp. and its Activity Against Human Leukemia Cell Lines HL-60. *BioNanoScience* 2018; 8(1): 249-53.

[11] Mohamed MA, Jaafar J, Ismail A, Othman M, Rahman M. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *Membrane Characterization* Elsevier 2017. p. 3-29.

[12] Chen Z, Bertin R, Froldi G. EC50 estimation of antioxidant activity in DPPH assay using several statistical programs. *Food Chem* 2013; 138(1): 414-20.

[13] Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 2011; 28(10): 2731-9.

[14] Jomehzadeh N, Javaherizadeh H, Amin M, Saki M, Al-Ouqaili MT, Hamidi H, et al. Isolation and identification of potential probiotic Lactobacillus species from feces of infants in southwest Iran. *Int J Infect Dis* 2020; 96: 524-30.

[15] Kachrimanidou V, Papadaki A, Lappa I, Papastergiou S, Kleisiari D, Kopsahelis N. Biosurfactant production from lactobacilli: an insight on the interpretation of prevailing assessment methods. *Appl Biochem Biotechnol* 2022; 194(2): 882-900.

[16] Sharma D, Singh Saharan B. Simultaneous production of biosurfactants and bacteriocins by probiotic Lactobacillus casei MRTL3. *Int J Microbiol Res* 2014; 2014.

[17] Nitschke M, Silva SS. Recent food applications of microbial surfactants. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2018; 58(4): 631-8.

[18] Chander CS, Lohitnath T, Kumar DM, Kalaichelvan PT. Production and

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-06-10]

[DOI: 10.52547/jrums.21.11.1133]

characterization of biosurfactant from Bacillus subtilis MTCC441 and its evaluation to use as bioemulsifier for food bio-preservative. *Adv Appl Sci Res* 2012; 3(3): 1827-31.

[19] KasraKermanshahi R, Peymanfar SH. Isolation and Identification of Lactobacilli from Cheese. Yoghurt and Silage by 16SrRNA Gene and study of bacteriocin and biosurfactant production, *Jundishapur J Microbiol* 2012; 5(4): 528-32.

[20] Satria AH. Isolation and characterization of biosurfactant-producing lactic acid bacteria from sauerkraut. *EKST* 2022; 29(2): 60-9.

[21] Morais I, Cordeiro A, Teixeira G, Domingues V, Nardi R, Monteiro A, et al. Biological and physicochemical properties of biosurfactants produced by Lactobacillus jensenii P 6A and Lactobacillus gasseri P 65. *Microb Cell Fact* 2017; 16(1): 155.

[22] Sambanthamoorthy K, Feng X, Patel R, Patel S, Paranavitana C. Antimicrobial and antibiofilm potential of biosurfactants isolated from lactobacilli against multi-drug-resistant pathogens. *BMC Microbiol* 2014; 14(1): 197.

[23] Majeed S, Danish M, Muhadi NFBB. Genotoxicity and apoptotic activity of biologically synthesized magnesium oxide nanoparticles against human lung cancer A-549 cell line. *Adv Nat Sci: Nanosci Nanotechno* 2018; 9(2): 025011.

[24] Bandeira M, Giovanela M, Roesch-Ely M, Devine DM, da Silva Crespo J. Green synthesis of zinc oxide nanoparticles: A review of the synthesis methodology and mechanism of formation. *Sustain Chem Pharm* 2020; 15: 100223.

[25] Raliya R, Tarafdar J, Choudhary K, Mal P, Raturi A, Gautam R, et al. Synthesis of MgO nanoparticles using *Aspergillus tubingensis* TFR-3. *J Bionano Science* 2014; 8(1): 34-8.

[26] Luan X, Feng M, Sun J. Effect of *Lactobacillus plantarum* on antioxidant activity in fermented sausage. *Food Res Int* 2021; 144: 110351.

[27] Baniasadi N, Kariminik A, Khoshroo SMR. Synthesis of MgO nanoparticles and their

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-06-10]

[DOI: 10.52547/jrums.21.11.1133]

bacterial pathogens. *Food Hyg* 2019; 9(33): 35-48. [Farsi]

[29] Rokhtabnak N, Khaleghi M, Sasan HA. Isolation and identification of Lactobacillus bacteria with probiotic potential from traditional dairy in Kerman. *IJMM* 2016; 10(1): 24-34. [Farsi]

antibacterial properties on three food poisoning causing bacteria. *IJMM* 2019; 13(5): 380-91. [Farsi]

[28] Tafkiki S, Hanifian S. Inhibitory effect of native enterococci isolates on some of the foodborne

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-06-10]

[DOI: 10.52547/jrums.21.11.1133]

Isolation, Identification, and Investigation of Biological Properties of Biosurfactant-Producing Probiotics and Magnesium Nanoparticles from Local Dairy Samples: A Laboratory Study

Ozra Hosseini-Naveh[1], Ashraf Kariminik[2], Shahla Soltani-Nezhad[3], Mehdi Ranjbar[4], Enayatollah Sheikhhosseini[5]

Received: 17/10/22 Sent for Revision: 19/11/22 Received Revised Manuscript: 25/01/23 Accepted: 29/01/23

Background and Objectives: Probiotics are common and well-known microorganisms in human and animal microflora and have been widely studied for medical and food productions. The present research was conducted with the aim of isolating and identifying probiotic bacteria and the ability to produce biosurfactant and magnesium oxide nanoparticles from local dairy products in Rafsanjan, Iran.

Materials and Methods: In this laboratory study, the local dairy samples were transported to the laboratory under sterile conditions, observing the cold chain, and cultured in MRS (de Man Rogosa Sharpe) agar medium. In order to isolate biosurfactant-producing isolates, oil spreading and emulsification tests were performed, then the isolates were further studied in terms of the production of magnesium oxide nanoparticles. The size and morphology of nanoparticles, antioxidant activity, FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscope), and their antibacterial effects were determined. Then polymerase chain reaction, sequencing, and phylogeny tree drawing were performed for the identification of superior strain.

Results: Nine probiotic isolates had the ability to produce biosurfactants, all of which had a significant emulsifying activity. The produced biosurfactants had antibacterial properties. One of the biosurfactant-producing isolates was able to produce magnesium oxide nanoparticles, which was named *Enterococcus faecium* L8 based on the molecular identity. The size of 90% of nanoparticles was 107 nm, which showed significant antibacterial and antioxidant effects.

Conclusion: *Enterococcus faecium* L8 has a favorable probiotic ability, and this native strain can be used in the formulation of multipurpose foods by conducting more tests.

Key words: Traditional dairy products, Probiotics, Biosurfactant, Magnesium oxide nanoparticles

Funding: This study did not have any funds.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Ethics Committee of Islamic Azad University of Kerman approved the study (IR.IAU.Kerman.REC.1400.001).

How to cite this article: Hosseini-Naveh Ozra, Kariminik Ashraf, Soltani-Nezhad Shahla, Ranjbar Mehdi, Sheikhhosseini Enayatollah. Isolation, Identification, and Investigation of Biological Properties of Biosurfactant-Producing Probiotics and Magnesium Nanoparticles from Local Dairy Samples: A Laboratory Study. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2023; 21 (11): 1133-52. [Farsi]

1- PhD Student, Dept. of Microbiology, Islamic Azad University, Kerman Branch, Kerman, Iran
2- Assistant Prof., Dept. of Microbiology, Islamic Azad University, Kerman Branch, Kerman, Iran, ORCID: 0000-0001-6489-9500
(Corresponding Author) Tel: (034) 31321376, Fax: (034) 31321376, E-mail: a.kariminik@Iauk.ac.ir
3- Assistant Prof., Dept. of Microbiology, Islamic Azad University, Jiroft Branch, Jiroft, Iran
4- Associate Prof., Pharmaceutics Research Center, Institute of Neuropharmacology, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
5- Associate Prof., Dept. of Chemistry, Islamic Azad University, Kerman Branch, Kerman, Iran

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-06-10]

[DOI: 10.52547/jrums.21.11.1133]