تأثیر محلول روئی عاری از سلول *Lactobacillus reuteri* بر میزان رشد گونه توکسین‌زای قارچ *Fusarium oxysporum* در آزمایشگاه

مریم رحیمی کاکلکی[۱]، آرش امیدی[۲*]

۱- دانشجوی دکتری بهداشت خوراک دام، گروه مدیریت بهداشت دام، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.
۲- استاد گروه مدیریت بهداشت دام، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.

دریافت مقاله: ۰۵ تیر ۱۳۹۹، بازنگری: ۱۸ تیر ۱۳۹۹، پذیرش نهایی: ۲۵ شهریور ۱۳۹۹

چکیده

لاکتوباسیلوس روتری یک پروبیوتیک است که در حضور گلیسرول، روترین را که یک ماده ضد میکروب با طیف گسترده است تولید می‌کند. مطالعه حاضر با هدف ارزیابی اثربخشی محلول روئی عاری از سلول *لاکتوباسیلوس روتری* بر رشد قارچ *فوزاریوم اوکسیسپوروم* انجام گرفت. بدین منظور، محلول روئی عاری از سلول باکتری، از سانتریفیوژ (۸۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه) کشت اورنایت باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* در محیط با و بدون گلیسرول، تهیه شد. اثر مهاری آن با استفاده از دو روش: میکروتیترپلیت (مقادیر سریالی از ۱۰۰ تا ۶/۲۵ میکرولیتر از دو نوع محلول روئی عاری از سلول؛ ۱۰ میکرولیتر اسپور قارچ (۲×۱۰^{۶} spores/ml)؛ محیط PDB) و روش کشت در لوله (مقادیر ۶۰ و ۸۰ مایکرولیتر از دو نوع محلول روئی عاری از سلول؛۱۰ میکرولیتر اسپور قارچ (۲×۱۰^{۶} spores/ml)؛ محیط SDB) بررسی شد. حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشنده محلول روئی عاری از سلول حاصل از محیط کشت حاوی دو درصد گلیسرول، ۶۰ میکرولیتر تعیین گردید. محلول روئی عاری از سلول حاصل از محیط کشت فاقد گلیسرول، اثر مهاری بر رشد قارچ *فوزاریوم اکسیسپوروم* نشان نداد. با توجه به نتایج مطالعه حاضر محلول رویی عاری از سلول به‌دست آمده از محیط کشت *لاکتوباسیلوس روتری* حاوی دو درصدگلیسرول احتمالاً به دلیل حضور روترین، قادر به مهار رشد گونه توکسین‌زای *فوزاریوم اکسیسپوروم* بوده و می‌تواند به‌عنوان یک عامل کنترل‌کننده زیستی بالقوه علیه گونه‌های توکسین‌زای *فوزاریوم*، در صنایع خوراک دام و مواد غذایی، مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: *باکتری اسید لاکتیک، روترین، فوزاریوم، گلیسرول، مایکوتوکسین*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: aomidi@shirazu.ac.ir

مقدمه

فوزاریوم‌ها از جمله مهم‌ترین قارچ‌های مولد مایکوتوکسین هستند که به‌طور گسترده در سراسر جهان، غلات و خوراک حیوانات را آلوده می‌کنند و طیف گسترده‌ای از اثرات سمی را به صورت حاد و مزمن در حیوانات مزرعه و انسان ایجاد می‌کنند و می‌توانند منجر به مرگ انسان یا حیوانات شوند (۱، ۲). با توجه به مقاوم بودن این سموم به دما و فشار بالا و همچنین زیان‌های اقتصادی ناشی از آنها (۳) و نیز به دلیل محدودیت‌های استراتژی‌های متعدد فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی که به منظور سم‌زدایی مواد غذایی و خوراک‌های آلوده دامی به کار گرفته شده است (۴)، توجه پژوهشگران به استفاده از میکرو ارگانیسم‌های ایمن* به منظور کاهش اثرات مایکوتوکسین‌ها معطوف شد.

به‌دنبال مطالعات صورت گرفته، قابلیت مهار رشد و تولید مایکوتوکسین در برخی از باکتری‌های اسید لاکتیک به اثبات رسید (۵) و تعدادی از آنها یا متابولیت‌های ضد قارچ آنها به عنوان نگهدارنده طبیعی جهت جلوگیری از رشد قارچ‌های توکسین‌زا و مهار تولید مایکوتوکسین مورد استفاده قرار گرفتند (۶) قابلیت مهارکنندگی این باکتری‌ها عمدتاً به تولید ترکیبات ضد میکروبی نظیر اسیدهای آلی، اسیدهای چرب، پراکسید هیدروژن، فنیل‌لاکتیک اسید، دی‌پپتیدهای حلقوی، ترکیبات پروتئینی، دی‌استیل، باکتریوسین‌ها و روترین مربوط می‌باشد (۷). در این میان *لاکتوباسیلوس روتری* از جمله باکتری‌های اسید لاکتیک است که در دستگاه گوارش انسان، حیوانات و در غذاهای تخمیر شده یافت می‌شود و به عنوان پروبیوتیک در تغذیه انسان و دام استفاده می‌گردد (۸). این باکتری در محیط‌های با اکسیژن محدود رشد می‌کند و به دامنه وسیعی از pHهای محیط مقاوم بوده (۹) و به کمک مکانیسم‌های متعددی از طریق ترشح واسطه‌های ضد میکروبی مانند اسیدهای ارگانیک، اتانول و روترین (۱۰)، قادر به مهار میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا است (۱۰، ۱۱). *لاکتوباسیلوس روتری* گلیسرول را به یک مهارکننده رشد قوی به نام روترین تبدیل می‌کند؛ این متابولیت جالب توجه قادر به مهار طیف گسترده‌ای از میکروارگانیسم‌ها از جمله پروتوزوآها، باکتری‌های گرم‌مثبت و گرم‌منفی است (۱۲). از این رو به نظر می‌رسد این باکتری بتواند بر مهار رشد قارچ‌های *فوزاریوم* نیز مؤثر باشد. لذا هدف از مطالعه حاضر بررسی تأثیر محلول روئی عاری از سلول▯ (CFCS) *لاکتوباسیلوس روتری* حاصل از محیط کشت با و بدون گلیسرول بر میزان رشد گونه توکسین‌زای قارچ *فوزاریوم اکسیسپوروم* بوده است.

مواد و روش‌ها

قارچ *Fusarium oxysporum* (PTCC-۵۱۱۵) و باکتری *Lactobacillus reuteri* (PTCC-۱۶۵۵) از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران، تهیه و فعال‌سازی طبق دستورالعمل ارائه شده انجام گرفت. در این مطالعه از محیط‌های کشت PDA‡، PDB§، MRS Agar** و MRS Broth محصول شرکت ایرانی "تعاونی کاردان آزما" با نام تجاری MIRMEDIA و محیط SDB†† محصول شرکت آلمانی Merck استفاده شد. به منظور جلوگیری از آلودگی‌های احتمالی تمام آزمایشات زیر هود میکروبی انجام گرفت.

تهیه سوسپانسیون اسپور قارچ: سوسپانسیون اسپور قارچ *F. oxysporum* با استفاده از کشت ده روزه در محیط PDA در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد تهیه شد. بدین منظور میسلیوم‌های رشد یافته بر روی محیط PDA از طریق افزودن آب مقطر استریل به روش پیپتینگ ملایم شستشو داده شد و مایع حاصل از شستشو که حاوی

* Generally Regarded As Safe (GRAS)

▯ Cell Free Culture Supernatant (CFCS)

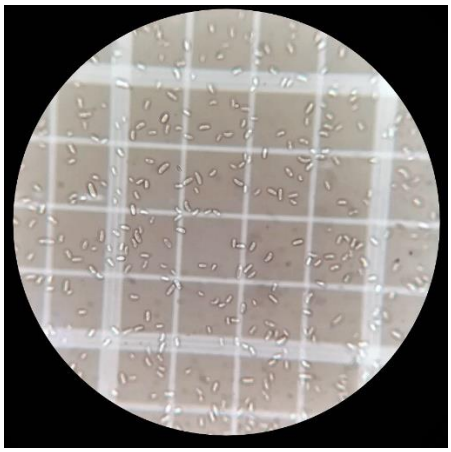
▯ Potato Dextrose Agar

▯ Potato Dextrose Broth

** DeMan-Rogosa-Sharpe (MRS)

▯▯ Sabroud Dextrose Broth

اسپورهای قارچ بود جمع‌آوری شد. تعداد اسپورها توسط لام نئوبار شمارش و غلظت نهایی اسپور روی spores/ml ۲×۱۰^{۶} تنظیم شد (شکل ۱).



شکل ۱- اسپورهای قارچ *Fusarium oxysporum* جمع آوری شده ازکشت ده روزه در محیط PDA (بزرگنمایی 40×)

کشت و آماده سازی باکتری: مقدار یک میلی‌لیتر از محتویات فعال شده باکتری ***L. reuteri*** به محیط کشت MRS Agar انتقال و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در شرایط با اکسیژن محدود گرمخانه‌گذاری و از این کشت در مطالعه استفاده گردید. به منظور محدود کردن اکسیژن مقدار محیط آگار بیشتری (۲۵ میلی‌لیتر) نسبت به مقدار متداول (۱۵-۲۰ میلی‌لیتر در پلیت شیشه‌ای به قطر شش سانتی‌متر) به منظور کم کردن فاصله سطح کشت و درب پلیت و به حداقل رساندن هوای موجود (و نه حذف کامل هوا) به هر کدام از پلیت‌ها اضافه شد. از باکتری کشت شده به منظور بررسی خلوص و عدم آلودگی، اسمیر تهیه شد. تصویر مشاهده شده در زیر میکروسکوپ حاکی از خلوص و عدم آلودگی باکتری کشت شده بود (شکل ۲).

شکل- ۲- اسمیر تهیه شده از کشت ۴۸ ساعته باکتری *Lactobacillus reuteri*

تهیه محلول روئی عاری از سلول: مقدار ده میلی‌لیتر محیط MRS Broth با و بدون دو درصد گلیسرول با ۱۰۰ میکرولیتر کشت اورنایت باکتری *L. reuteri* (۱×۱۰^{۸} CFU/ml) تلقیح شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در شرایط با اکسیژن محدود گرمخانه‌گذاری شد. به منظور محدود کردن اکسیژن از لوله درب‌دار با حجم ۱۰ میلی لیتر استفاده شد (کاهش حجم هوای موجود روی محیط مایع و نه حذف کامل آن). بعد از گذشت ۲۴ ساعت،

محیط کشت حاصل سانتریفیوژ شد (۸۰۰۰rpm به مدت ۱۵ دقیقه) و مایع فوقانی جمع‌آوری و به منظور حذف باکتری‌های موجود احتمالی از فیلتر ۰،۲۲ میکرون عبور داده شد. محلول روئی عاری از سلول استریل به‌دست آمده تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شد.

بررسی فعالیت ضد قارچی محلول روئی عاری از سلول: بررسی فعالیت ضد قارچی محلول CFCS باکتری *L.reuteri* به دو روش ۱- میکروتیتر پلیت* و ۲- کشت در لوله[] انجام شد:

۱- به منظور بررسی فعالیت ضد قارچی محلول CFCS باکتری *L.reuteri* به روش میکروتیتر پلیت از میکروپلیت ۹۶ خانه استفاده شد. مایع CFCS حاصل از کشت باکتری در محیط مخلوط با و بدون دو درصد گلیسرول و محلول CFCS حاصل از کشت باکتری در محیط فاقد گلیسرول به صورت غلظت‌های سریالی از ۱۰۰ الی ۶/۲۵ میکرولیتر به یک میلی‌لیتر محیط PDB اضافه و با مقدار ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون اسپور قارچ (۲×۱۰۶ spores/ml) تلقیح شد. سه چاهک به عنوان کنترل مثبت و سه چاهک به عنوان کنترل محیط (منفی) در نظر گرفته شد، به این ترتیب که در چاهک‌های کنترل مثبت ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون اسپور قارچ به محیط استریل اضافه و در چاهک‌های کنترل محیط ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت PDB افزوده شد. میکروپلیت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. آزمون فوق دو بار و با سه تکرار برای هر تیمار انجام گرفت. کمترین غلظت محلول CFCS که منجر به مهار کامل رشد قارچ شود به عنوان حداقل غلظت بازدارنده (MIC)[] محلول در نظر گرفته شد. خوانش میکروپلیت‌ها به صورت چشمی (ماکروسکوپی) و با مشاهده میسلیوم‌ها انجام گرفت (۵، ۱۳).

۲- در آزمونی جداگانه به منظور بررسی اثر بازدارندگی مایع رویی فاقد سلول باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* بر رشد قارچ *فوزاریوم اکسیسپوروم* در فاصله مقادیر بین ۵۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر، مقادیر ۶۰ و ۸۰ میکرولیتر از محلول CFCS با و بدون گلیسرول به روش کشت در لوله بررسی شد. مقادیر ۶۰۰ و ۸۰۰ میکرولیتر از هر دو نوع CFCS به همراه ۱۰۰ میکرولیتر اسپور قارچ (۲×۱۰۶ spores/ml) در لوله اضافه شد و حجم با محیط SDB به دو میلی‌لیتر رسانده شد و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت هفت روز نگهداری شد.

تفکیک اثر قارچ کشی از اثر قارچ ایستایی: به‌منظور تعیین کمترین غلظت کشنده قارچ (MFC)[] و تفکیک اثر قارچ ایستایی محلول CFCS از اثر قارچ‌کشی، پس از اتمام انکوباسیون ۷۲ ساعته میکروپلیت مرحله MIC، مقدار ۲۰ میکرولیتر از چاهک‌های فاقد رشد قارچ و ۲۰ میکرولیتر از چاهک کنترل مثبت، روی پلیت‌های حاوی محیط PDA کشت داده شد. کمترین غلظت از محلول CFCS که پس از هفت روز رشد قارچ در آن مشاهده نشود به عنوان MFC محلول CFCS مربوطه در نظر گرفته شد. آزمون فوق دو بار و با سه تکرار برای هر تیمار انجام شد.

نتایج

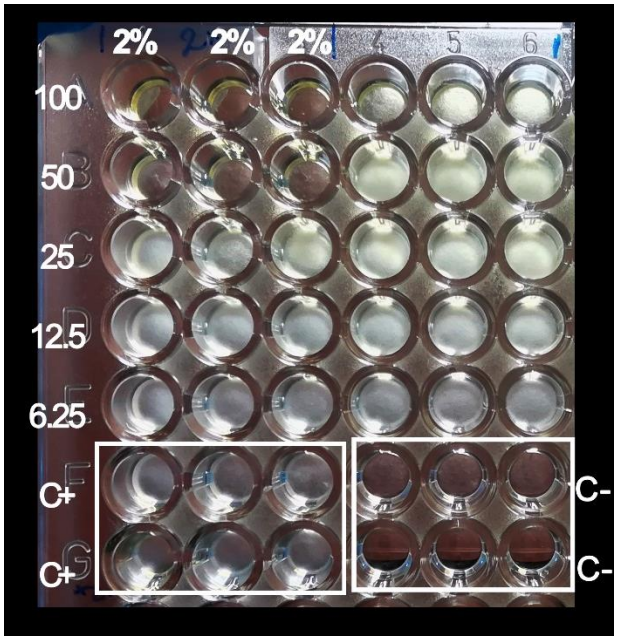
اثر بازدارندگی مایع رویی باکتری: حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) مایع رویی فاقد سلول باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* با و بدون افزودن دو درصد گلیسرول به روش میکروتیتر پلیت بررسی شد. نتیجه اثردهی غلظت‌های سریالی ۱۰۰ الی ۶/۲۵ میکرولیتر تلقیح شده با مقدار ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون اسپور قارچ (spores/ml ۲×۱۰۶) در جلوگیری از رشد قارچ *فوزاریوم اکسیسپوروم* پس از نگهداری در دمای ۲۵درجه سانتیگراد به مدت ۷۲ ساعت در تصویر ۳ قابل مشاهده است.

* Microdilution method

[] Tube culture method

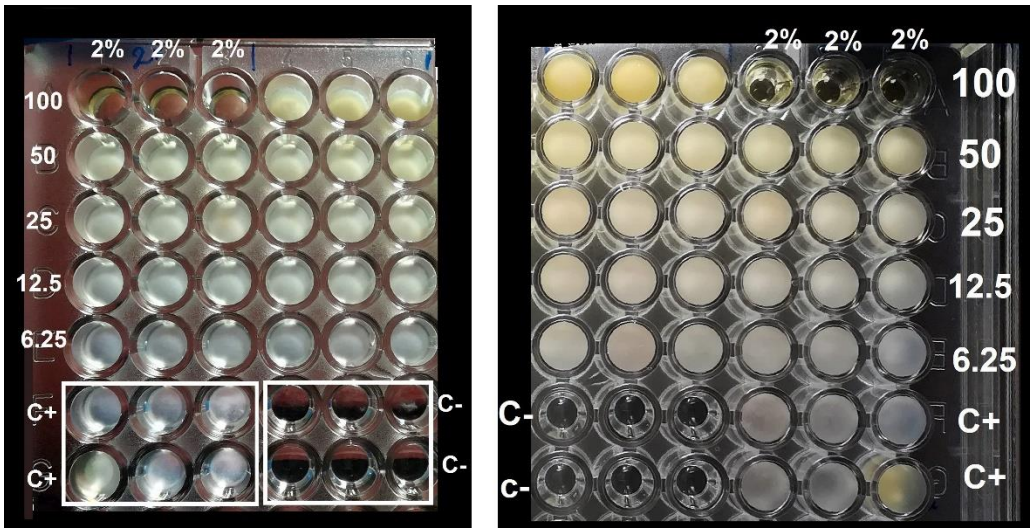
[] Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

[] Minimum Fungicidal Concentration (MFC)



شکل ۳- کشت سه روزه اسپورقارچ *فوزاریوم اکسیسپوروم* spores/ml ۲×۱۰^۶ در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در محیط PDB در حضور غلظت‌های سریالی از ۱۰۰ الی ۶/۲۵ میکرولیتر دو نوع مایع CFCS لاکتوباسیلوس روتری. ستون‌های ۱، ۲ و ۳ مشخص شده با ۲ درصد، حاوی مایع CFCS حاصل از کشت باکتری در محیط مخلوط با دو درصد گلیسرول، ستون‌های ۴، ۵ و ۶ حاوی مایع CFCS حاصل از کشت باکتری در محیط فاقد گلیسرول. ردیف F و G چاهک‌های مشخص شده با +C، کنترل مثبت و چاهک مشخص شده با -C کنترل منفی.

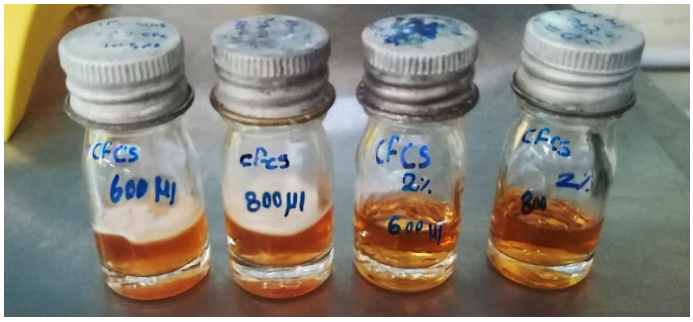
در چاهک کنترل مثبت قارچ تمام سطح چاهک را پوشانده بود. مایع CFCS حاوی دو درصد گلیسرول، در مقدار ۱۰۰ مایکرولیتر توانسته بود رشد قارچ *F. oxysprom* را مهار کند. مایع CFCS حاصل از محیط کشت فاقد گلیسرول در هیچ کدام از غلظت‌ها اثر مهارکنندگی نشان نداد. میکروپلیت فوق پس از ۲۱ روز در شکل ۴ آورده شده است.



شکل ۴- کشت ۲۱ روزه اسپورقارچ فوزاریوم اکسیسپوروم spores/ml ۲×۱۰^۶ در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در محیط PDB در حضور غلظت‌های سریالی از ۱۰۰ الی ۶/۲۵ میکرولیتر دو نوع مایع CFCS لاکتوباسیلوس روتری. تصویر سمت راست، نمای زیر میکروپلیت و تصویر سمت چپ نمای سطح فوقانی میکروپلیت؛ ستون‌های ۱، ۲ و ۳ مشخص شده با ۲ درصد، حاوی مایع CFCS حاصل از کشت باکتری در محیط مخلوط با دو درصد گلیسرول؛ ستون‌های ۴، ۵ و ۶ حاوی مایع CFCS حاصل از کشت باکتری در محیط فاقد گلیسرول. سه چاهک اول ردیف‌های F و G کنترل مثبت و سه چاهک دوم این ردیف‌ها کنترل منفی.

در روش کشت در لوله مشاهده شد محلول CFCS حاصل از کشت باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* در محیط مخلوط با دو درصد گلیسرول، در مقدار ۶۰ میکرولیتر قادر به مهار رشد قارچ *F. oxysprom* است (شکل ۵).

تفکیک اثر قارچ کشی از اثر قارچ ایستایی: بعد از گذشت مدت زمان گرمخانه‌گذاری، پلیت‌ها از نظر رشد کلونی قارچ بررسی شدند؛ به جز پلیت کنترل مثبت در هیچ یک از پلیت‌ها رشد میسلیوم قارچ مشاهده نشد. در نهایت میزان MFC برای مایع رویی *لاکتوباسیلوس روتری* حاصل از کشت در محیط واجد گلیسرول مقدار ۶۰ مایکرولیتر تعیین شد.



شکل۵- کشت هفت روزه اسپور قارچ *فوزاریوم اکسیسپورم* (2×10^6 spores/ml) در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در حضور غلظت‌های ۶۰۰ و ۸۰۰ میکرولیتر دو نوع CFCS *لاکتوباسیلوس روتری* در محیط SDB. دو لوله سمت چپ حاوی مایع CFCS حاصل از کشت باکتری در محیط فاقد گلیسرول و دو لوله یونیورسال سمت راست حاوی CFCS حاصل از کشت باکتری در محیط مخلوط با دو درصد گلیسرول.

بحث و نتیجه‌گیری

مایکوتوکسین‌های حاصل از قارچ‌های فوزاریوم از جمله مهم‌ترین آلاینده‌های غلات و خوراک حیوانات هستند که طیف گسترده‌ای از اثرات سمی در انسان و حیوانات مزرعه ایجاد می‌کنند (۲). *لاکتوباسیلوس روتری* از طریق تولید واسطه‌های ضد میکروبی متعدد قادر به مهار طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا از جمله قارچ‌ها است. لذا هدف از مطالعه حاضر بررسی اثربخشی محلول روئی عاری از سلول *L. reuteri* بر رشد گونه توکسین‌زای قارچ *F. oxysporum* بود. نتایج مطالعه حاضر نشان داد محلول CFCS به‌دست آمده از محیط کشت باکتری حاوی دو درصد گلیسرول، در مقدار ۶۰ میکرولیتر مانع رشد قارچ *F. oxysprom* شد. محلول CFCS حاصل از محیط کشت فاقد گلیسرول در هیچ کدام از مقادیر استفاده شده، اثر مهاری بر رشد قارچ *F. oxysprom* نشان نداد.

لاکتوباسیلوس روتری گلیسرول را به یک مهار کننده رشد قوی به نام روترین تبدیل می‌کند، این متابولیت جالب توجه قادر به مهار طیف گسترده‌ای از میکروارگانیسم‌ها از جمله پروتوزوآها، باکتری‌های گرم‌مثبت و گرم‌منفی است (۱۲) این ترکیب غیر پپتیدی، محلول در آب، مقاوم به حرارت و آنزیم‌های پروتئولیتیک و لیپولیتیک بوده (۱۴) و فعالیت ضد میکروبی آن در pH های پایین و غلظت‌های بالای NaCl حفظ می‌شود (۱۵) لذا به عنوان یک افزودنی کاندید، برای جلوگیری از فساد مواد غذایی و رشد پاتوژن در مواد غذایی مورد مطالعه قرار گرفته است (۱۶).

ترکیبات دیگری نیز در مهار میکرواورگانیسم‌ها توسط *لاکتوباسیلوس روتری* تولید می‌شوند که فعالیت ضد قارچی و ضد میکروبی آنها به اثبات رسیده است، از جمله اسیدهای‌آلی (اسیداستیک و اسید لاکتیک)، پراکسید

هیدروژن، ترکیبات پروتئینی، اسیدهای چرب هیدروکسیل و ترکیبات فنلی (۱۰). Heller و همکاران (۲۰۰۱) پیشنهاد کردند اثر ضد میکروبی محلول CFCS حاصل از باکتری‌های پروبیوتیک را می‌توان به تولید اسیدلاکتیک نسبت داد زیرا در طی رشد باکتری‌های پروبیوتیک، اسیدیته محیط افزایش یافته و باکتری‌های بیماریزا که به طور طبیعی به شرایط اسیدی حساس هستند از بین می‌روند (۱۷). با این حال، مقایسه اثر محلول CFCS سویه‌های لاکتوباسیلوس و محیط‌های MRS اسیدی شده با اسید لاکتیک و اسید معدنی HCL نشان داد که محلول CFCS نسبت به محیط‌های اسیدی شده به طور مؤثرتری رشد قارچ *Penicillium nordicum* (BFE 487) را مهار کرد که این نشان‌دهنده آن است که علاوه بر اسید لاکتیک و اسید استیک، متابولیت‌های دیگری نیز توسط لاکتوباسیلوس‌ها تولید می‌شوند که در فعالیت مهاری آنها نقش دارند (۱۸). Lavermicocca و همکاران (۲۰۰۰) نیز پتانسیل مهار *Lactobacillus plantarum* سویه 21B جدا شده از خمیر ترش را بر سویه‌هایی از قارچ‌های *Penicillium*، *Aspergillus* و *Fusarium* مربوط به اسیدهای ارگانیک و متابولیت‌های با جرم مولکولی کم و یا دی‌پپتیدهای حلقوی مربوط دانستند (۱۹). توانایی تولید H_2O_2 توسط *لاکتوباسیل روتری* و اثر مهاری آن بر شش گونه قارچ کاندیدای دهانی نیز تأیید شد (۲۰).

از آنجا که در مطالعه حاضر محلول CFCS به‌دست آمده از محیط کشت باکتری فاقد گلیسرول، در هیچ کدام از غلظت‌های استفاده شده نتوانست مانع رشد قارچ *F. oxysporum* شود، لذا می‌توان نتیجه گرفت که مهار رشد قارچ *فوزاریوم* توسط محلول CFCS حاوی گلیسرول به ترکیب یا ترکیباتی غیر از موارد بررسی شده در مطالعات فوق مربوط خواهد بود. با توجه به این که تفاوت دو محلول CFCS مورد آزمایش در مطالعه حاضر، گلیسرول بوده است و ترکیب شناخته شده‌ای که در اثر تخمیر گلیسرول در باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* ایجاد می‌شود، روترین گزارش شده است (۱۰، ۱۵، ۲۱) لذا می‌توان این طور نتیجه گرفت که عامل مؤثر مهارکننده موجود در محلول CFCS حاوی دو درصد گلیسرول، در این مطالعه، احتمالاً متابولیت روترین بوده که در اثر تخمیر گلیسرول تولید شده است.

تولید ترکیب ضد میکروبی ۳-هیدروکسی پروپیونالدئید* مشهور به روترین که به‌عنوان یک مرحله واسطه در تبدیل گلیسرول به ۱،۳-پروپانیدیول[▯] تولید می‌شود، مسیری است که برای احیا NAD^+ از NADH و بهبود عملکرد رشد پیشنهاد می‌شود (۱۶). گفتنی است ۱،۳-پروپانیدیول، محصول رایج از تخمیر گلیسرول است که در تبدیل بی‌هوازی سایر سوبستراهای آلی یافت نمی‌شود و تنها از گلیسرول از طریق مسیر متابولیزه روترین تولید می‌شود (۱۰).

از آنجا که روترین می‌تواند به ترکیبات مختلف تبدیل شود، تعیین مکانیسمی که توسط آن اثر ضد میکروبی اعمال می‌کند، دشوار است. در این خصوص دو فرضیه اصلی ارائه شده است: اول اینکه پیشنهاد شده، گروه آلدئیدی روترین با گروه‌های تیول و آمین‌های اولیه بسیار واکنش پذیر بوده، بنابراین می‌تواند از طریق تغییر گروه‌های تیول، پروتئین‌ها و مولکول‌های کوچک حاوی این گروه‌ها را غیرفعال کند، این امر می‌تواند اثرگذاری روترین بر طیف گسترده‌ای از باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌ها را توضیح دهد (۲۲). از طرف دیگر، شکل دایمری روترین (دایمر HPA) از لحاظ ساختاری به قند ریبوز شباهت دارد، لذا می‌تواند به‌طور اختصاصی با عمل به‌عنوان یک مهارکننده رقابتی، آنزیم ریبونوکلئوتید ردوکتاز را مسدود کند. این آنزیم برای تولید دی‌اکسی‌نوکلئوتیدها، که برای سنتز DNA لازم هستند، ضروری است (۱۶). Perczak و همکاران (۲۰۱۸) نیز بیان کردند روترین فعالیت ریبونوکلئاز -آنزیمی که در بیوسنتز DNA دخیل است را سرکوب می‌کند. این عمل رشد *فوزاریوم* و *آسپرژیلوس* را مهار می‌کند (۲۲). یک

* 3-hydroxypropionaldehyde (3-HPA)

▯ 1,3-propanediol

گزارش قدیمی‌تر نیز بیان کرد که روترین از طریق مهار ریبونوکلئوتید ردوکتاز، احتمالاً قادر است طیف گسترده‌ای از اثرات مهاری را اعمال کند (۱۱). از آنجا که جایگاه فعال این آنزیم حاوی یک گروه تیول است، نمی‌توان تعیین کرد که کدام یک از فرضیات پیشنهادی از آزمایش‌های قبلی درست‌تر است (۱۶). مطالعات اخیر خواص ضد قارچی *L. reuteri* را به ترکیب ضد میکروبی ۳- فنیل لاکتیک‌اسید که از کاتابولیسم فنیل‌آلانین ایجاد می‌شود نیز مربوط می‌دانند (۲۳). فعالیت ضد قارچی فنیل‌لاکتیک اسید وابسته به مکانیسم سینرژیک با سایر متابولیت‌های باکتریایی است. با این وجود اگر مسیر متابولیک فنیل‌لاکتیک اسید تحریک شود، فعالیت ضد قارچی احتمالاً افزایش می‌یابد (۲۳، ۲۴).

با توجه به مطالعات صورت گرفته و نتایج مطالعه حاضر محلول رویی عاری از سلول به‌دست آمده از محیط کشت *لاکتوباسیلوس روتری* حاوی دو درصدگلیسرول احتمالاً به دلیل حضور روترین قادر به مهار رشد گونه توکسین‌زای *فوزاریوم اکسیسپوروم* است. لذا این محلول قابلیت این را خواهد داشت که به‌عنوان یک عامل کنترل‌کننده زیستی علیه گونه *فوزاریوم* در صنایع خوراک دام و مواد غذایی مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

از حمایت های مالی حوزه پژوهشی دانشگاه شیراز قدردانی می‌گردد.

References

1- Bertero A, Moretti A, Spicer LJ, Caloni F. Fusarium molds and mycotoxins: Potential species-specific effects. Toxins. 2018; 10(6): 244.

2- Cortinovis C, Pizzo F, Spicer LJ, Caloni F. Fusarium mycotoxins: Effects on reproductive function in domestic animals—A review. Theriogenology. 2013; 80(6): 557-64.

3- Cserháti M, Kriszt B, Krifaton C, Szoboszlay S, Háhn J, Tóth S, *et al.* Mycotoxin-degradation profile of Rhodococcus strains. International journal of food microbiology. 2013; 166(1): 176-85.

4- Ji C, Fan Y ,Zhao L. Review on biological degradation of mycotoxins. Animal Nutrition. 2016; 2(3): 127-33.

5- Taheur FB, Mansour C, Kouidhi B, Chaieb K. Use of lactic acid bacteria for the inhibition of Aspergillus flavus and Aspergillus carbonarius growth and mycotoxin production. Toxicon. 2019; 166: 15-23.

6- Kabak B, Dobson AD, Var Il. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. Critical reviews in food science and nutrition. 2006; 46(8): 593-619.

7- Nasrollahzadeh A, Khomeiri M. Application of lactic lacid bacteria to biological control of fungal spoilage in food; metabolites, mechanisms and health effects. Food Science and Technology. 2019; 16(92): 113-27.

8- Britton R. Lactobacillus reuteri. The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology: Elsevier; 2017. p. 89-97.

9- Mu Q, Tavella V, Luo XMJFim. Role of Lactobacillus reuteri in Human Health and Diseases. 2018; 9: 757.

10- Cleusix V, Lacroix C, Vollenweider S, Le Blay G. Glycerol induces reuterin production and decreases Escherichia coli population in an in vitro model of colonic fermentation with immobilized human feces. FEMS microbiology ecology. 2008; 63(1): 56-64.

11- Talarico TL, Dobrogosz WJ. Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by Lactobacillus reuteri. Antimicrobial agents and chemotherapy. 1989; 33(5): 674-9.

12- Jones SE, Versalovic JJBm. Probiotic Lactobacillus reuteri biofilms produce antimicrobial and anti-inflammatory factors. 2009; 9(1): 35.

13- Ganjali HR, abkhoo j, Dahmardeh E. Effect of extracts of Glycyrrhiza glabra, Cinnamomum zeylanicum and Ocimum basilicum on Fusarium graminearum control and expression of essential genes in zearalenone biosynthetic pathway. Biological Control of Pests and Plant Diseases. 2018; 7(1): 58-64.

14- Arqués JL, Fernández J, Gaya P, Nuñez M, Rodríguez E, Medina M. Antimicrobial activity of reuterin in combination with nisin against food-borne pathogens. International Journal of Food Microbiology. 2004; 95(2): 225-9.

15- Langa S, Martín-Cabrejas I, Montiel R, Landete J, Medina M, Arqués J. Combined antimicrobial activity of reuterin and diacetyl against foodborne pathogens. Journal of dairy science. 2014; 97(10): 6116-21.

16- Schaefer L, Auchtung TA, Hermans KE, Whitehead D, Borhan B, Britton RAJM. The antimicrobial compound reuterin (3-hydroxypropionaldehyde) induces oxidative stress via interaction with thiol groups. 2010; 156(6):

1589-99.

17- Heller KJ. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. The American journal of clinical nutrition. 2001; 73(2): 374s-9s.

18- Schillinger U, Villarreal JV. Inhibition of Penicillium nordicum in MRS medium by lactic acid bacteria isolated from foods. Food control. 2010; 21(2): 107-11.

19- Lavermicocca P, Valerio F, Evidente A, Lazzaroni S, Corsetti A, Gobbetti M. Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough Lactobacillus plantarum strain 21B. Appl Environ Microbiol. 2000; 66(9): 4084-90.

20- Jørgensen MR, Kragelund C, Jensen PØ, Keller MK, Twetman S. Probiotic Lactobacillus reuteri has antifungal effects on oral Candida species in vitro. Journal of oral microbiology. 2017; 9(1): 1274582.

21- Spinler JK, Taweechotipatr M, Rognerud CL, Ou CN, Tumwasorn S, Versalovic JJA. Human-derived probiotic Lactobacillus reuteri demonstrate antimicrobial activities targeting diverse enteric bacterial pathogens. 2008; 14(3): 166-71.

22- Perczak A, Goliński P, Bryła M, Waśkiewicz A. The efficiency of lactic acid bacteria against pathogenic fungi and mycotoxins. Archives of Industrial Hygiene and Toxicology. 2018; 69(1): 32-45.

23- Schmidt M, Lynch KM, Zannini E, Arendt EK. Fundamental study on the improvement of the antifungal activity of Lactobacillus reuteri R29 through increased production of phenyllactic acid and reuterin. Food Control. 2018; 88: 139-48.

24- Cortés-Zavaleta O, López-Malo A, Hernández-Mendoza A, García H. Antifungal activity of lactobacilli and its relationship with 3-phenyllactic acid production. International journal of food microbiology. 2014; 173: 30-5.

Effect of cell-free supernatant of *Lactobacillus reuteri* on the growth rate of toxigenic *Fusarium oxysporum in vitro*

Maryam Rahimi Kakolaki [1], Arash Omidi [2]*

1- PhD candidate of feed hygiene, Department of Animal Health Management, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran.
2- Professor, Department of Animal Health Management, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran.

Receive: June 25, 2020; Revise: July 8, 2020; Accept: September 15, 2020

Summary

Lactobacillus reuteri is a probiotic bacterium that produces a wide-range of antimicrobial substance, "reuterin", in the presence of glycerol. The present study was aimed to evaluate the efficacy of *Lactobacillus reuteri* against the growth of *Fusarium oxysporum*. So, the cell-free culture supernatant (CFCS) of *Lactobacillus reuteri* was prepared by centrifugation (8000 rpm for 15 min) of bacterial overnight *culture,* with and without 2% glycerol medium. Inhibition effects were evaluated by two methods: micro-well dilution (both of CFCSs: two-fold dilution series (100, … 6.25 µl); 10 µl fungal spore suspension (2×10^6 spores/ml); PDB medium) and Tube culture (both of CFCSs: (80, 60 µl); 10 µl fungal spore suspension (2×10^6 spores/ml); SDB medium). The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) of CFCS obtained from glycerol-medium was determined as 60µl. The CFCS obtained from glycerol-free medium had no inhibitory effect on *F.oxysprom* growth. The results of the present study revealed that the CFCS of *Lactobacillus reuteri* obtained from medium with 2% glycerol, probably due to the presence of reuterin, is able to inhibit the growth of toxigenic *Fusarium oxysporum* and can be used in the feed and food industry as a potential bio-controller against toxigenic *Fusarium* species.

Key words: *Fusarium, glycerol, lactic acid bacteria, mycotoxin, reuterin*