Original Article

Investigation of the bactriocin effect of lactic acid probiotic bacteria isolated from dairy products of Nadushan region, Yazd

Porshaker M, Hesampour A*

Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, I. R. Iran

Received: 2018/07/17 | Accepted: 2018/12/26

Abstract:

Background: Among probiotics, *lactobacillus* species with bacteriocin activities have been used in microbial biotechnology as safe biological preservatives. So, this study aimed to determine antimicrobial activity of bacteriocins of *lactobacillus* species isolated from lactic acid bacteria in traditional dairy products.

Materials and Methods: In this experimental study, isolated lactic acid bacteria from local yoghurt of Nadushan region were used as probiotics with a bacteriocin production potential. The bacteriocin effect of isolated lactic acid bacteria was investigated against seven pathogenic bacteria using well diffusion and disk methods.

Results: The results of well diffusion analysis showed that the most growth inhibitory effect against *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis and Candida albicans* pathogen bacteria was caused by isolated lactic acid bacteria including *Lactobacillus delbrucki*, *Lactobacillus caesium* and *Lactobacillus plantarum*, respectively. Also, the results of disc method showed that the highest inhibitory effect against the bacterial pathogens was caused by *Lactobacillus delbrucki*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus caesium*, respectively. Although antimicrobial compounds were inactivated by proteolytic enzymes, they showed stability against variant pH and temperature treatments.

Conclusion: It seems that bacteriocin of the probiotics isolated from dairy products of this region can be used as a safe and healthy biological preservative in food industry.

Keywords: *Lactobacillus*, Bacteriocin, Pathogenic, Antimicrobial

*** Corresponding Author.**
Email: a.hesampour@gmail.com
Tel: 0098 912 301 7118
Fax: 0098 214 460 0182

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, April, 2019; Vol. 23, No 1, Pages 36-44

Please cite this article as: Porshaker M, Hesampour A. Investigation of the bactriocin effect of lactic acid probiotic bacteria isolated from dairy products of Nadushan region, Yazd. ***Feyz*** 2019; 23(1): 36-44.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-03]

بررسی اثر باکتریوسینی باکتری‌های اسید لاکتیک با خاصیت پروبیوتیک جدا شده از محصولات لبنی محلی منطقه ندوشن یزد

مهدی پورشاکر [۱]، اردشیر حسام‌پور [۲*]

خلاصه:

سابقه و هدف: در میان پروبیوتیک‌ها، لاکتوباسیل‌ها با فعالیت باکتریوسینی به‌عنوان نگهدارنده زیستی سالم و بی‌خطر کاربری متعددی در زیست‌فن‌آوری میکروبی دارند. لذا، بررسی و تعیین فعالیت ضد میکروبی باکتریوسین لاکتوباسیل‌های بومی موجود در محصولات لبنی سنتی با قابلیت طیف وسیع درمانی حائز اهمیت می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این پژوهشی تجربی پس از نمونه‌گیری و جداسازی لاکتوباسیل‌های بومی از ماست محلی منطقه ندوشن، از آنها به‌عنوان پروبیوتیک و تولید کننده باکتریوسین استفاده شد. اثر باکتریوسین تولیدی بر علیه ۷ سویه باکتریایی بیماری‌زا به‌روش‌های چاهک و دیسک بررسی شد.

نتایج: نتایج حاصل از روش چاهک نشان داد که بیشترین اثر مهارکنندگی روی باکتری‌های پاتوژن *استافیلوکوکوس اپیدرمیس*، *اشریشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *انتروکوکوس فکالیس* و *کاندیدا* آلبیکانز به‌ترتیب مربوط به سویه‌های اسید لاکتیک بومی جداسازی شده شامل *لاکتوباسیلوس دلبروکی*، *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* است. بر پایه روش دیسک، بیشترین میزان مهارکنندگی علیه باکتری‌های بیماری‌زا به‌ترتیب مربوط به *لاکتوباسیلوس دلبروکی*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس کازئی* بود. اگرچه ترکیبات ضد میکروبی تولید شده، توسط آنزیم‌های پروتئولیتیک غیرفعال شدند، ولی در برابر طیف وسیعی از تغییرات pH و حرارت فعالیت خود را حفظ کردند.

نتیجه‌گیری: می‌توان از باکتریوسین پروبیوتیک‌های جداسازی شده از محصولات لبنی محلی منطقه ندوشن یزد به‌عنوان نگهدارنده زیستی سالم و بی‌خطر استفاده نمود.

واژگان کلیدی: لاکتوباسیل، باکتریوسین، پاتوژن، ضدمیکروبی

دو ماه‌نامه علمی- پژوهشی فیض، دوره بیست و سوم، شماره ۱، فروردین- اردیبهشت ۹۸، صفحات ۴۴-۳۷

مقدمه

در سال‌های اخیر با مشخص شدن مضرات برخی از نگهدارنده‌های شیمیایی، محققین توجه خود را به ترکیبات نگهدارنده طبیعی معطوف کرده‌اند؛ زیرا نگهداری مواد غذایی و کنترل کیفیت آن از نظر میکروبی یکی از مشکلات و چالش‌های تولیدکنندگان مواد غذایی است [۱]. در این راستا، باکتری‌های اسید لاکتیک (LAB) و متابولیت‌های آنها در جهت بهبودی ایمنی میکروبی و افزایش ماندگاری مواد غذایی تحت عنوان نگهدارنده‌های زیستی معرفی شده‌اند.

باکتری‌های اسید لاکتیک معمولا به‌عنوان ارگانیسم‌های محافظ غذایی درنظر گرفته می‌شوند که با دارا بودن ویژگی‌های اختصاصی به‌عنوان کشت‌های محافظ کارایی دارند. بعضی از باکتری‌های اسیدلاکتیک دارای عملکردهای ضد میکروبی هستند که ناشی از فعالیت پپتیدهای کوچک و مقاوم به حرارت به نام باکتریوسین می‌باشند [۲]. علی‌رغم آنکه باکتریوسین‌ها توسط بسیاری از باکتری‌های گرم مثبت و منفی تولید می‌شوند، اما ازآنجایی‌که باکتری‌های اسید لاکتیک بی‌ضرر می‌باشند، به‌طور کلی تمایل بیشتری برای استفاده از باکتریوسین‌های آنها وجود دارد. باکتری‌های لاکتیک شامل لاکتوکوکوس و لاکتوباسیلوس هستند که به‌علت توانایی گسترده آنها در تولید باکتریوسین‌ها و نقش نگهدارنده‌ای که دارند، امروزه مورد توجه خاص پژوهشگران قرار گرفته‌اند [۳]. باکتریوسین‌ها، ماکرومولکول‌های خارج سلولی هستند که به‌صورت آنتی‌بیوتیک‌های پروتئینی یا پپتیدی توسط گونه‌های مختلف باکتری تولید می‌شوند و تاثیرات کشندگی روی باکتری‌های مشابه یا نزدیک دارند [۴]. باکتریوسین‌ها خاصیت ضد میکروبی طبیعی علیه میکروب‌های گرم مثبت و منفی دارند و خود باکتری مولد باکتریوسین معمولا توسط یک پروتئین ایمن‌ساز که برای هر باکتریوسین اختصاصی است، از اثر

[۱] دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[۲] استادیار، گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

* **نشانی نویسنده مسئول:**
گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد تهران مرکزی دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تلفن: ۰۹۱۲۳۰۱۷۱۱۸ **دورنویس:** ۳-۴۴۶۰۰۱۸۲-۰۲۱

پست الکترونیک: a.hesampour@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۴/۲۶ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۱۳۹۷/۱۰/۵

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-03]

باکتریوسین تولیدی محافظت می‌شود [۵]. اکثر باکتریوسین‌ها با خاصیت آب‌دوستی یا آب‌گریزی غشای سلولی را هدف می‌گیرند، درحالی‌که برخی از آن‌ها بیوسنتز پلیمرهای زیستی و یا فعالیت آنزیم‌ها را نیز مهار می‌کنند و تاثیرات مهاری خود را اعمال می‌نمایند [۶]. باکتریوسین‌ها در مقابل حرارت، pH پایین، حلال‌های آلی ضعیف، سرما، نمک‌ها و آنزیم‌ها مقاوم بوده و درنتیجه قابلیت کاربرد در سیستم‌های حفاظت از غذا را دارند [۷]. پروتئین‌هایی که در انتقال باکتریوسین از عرض غشاء دخالت دارند، پروتئین‌های تنظیمی هستند که موجب ایمنی می‌شوند [۸]. تاکنون باکتریوسین‌های زیادی شناسایی و دسته‌بندی شده‌اند که مهم‌ترین آنها نایسین، اسیدوفیلین، بولگاریسین، هلوتیسین، لاکتاسین، لاکتولین و پلانتراسین هستند [۹]. باکتریوسین‌های تولید شده توسط باکتری‌های اسیدلاکتیک به ۴ کلاس تقسیم می‌شوند که شامل لانتی‌بیوتیک‌ها، غیر لانتی‌بیوتیک‌ها، باکتریوسین‌های کلاس III و IV می‌باشد [۱۱،۱۰]. مکانیسم‌های اثر متفاوت و متعددی برای باکتریوسین‌ها گزارش شده است که از آن جمله می‌توان به ایجاد تغییر در فعالیت آنزیمی، مهار جوانه زنی اسپور و غیرفعال کردن حامل‌های آنیونی از طریق ایجاد منافذ اختصاصی و غیر اختصاصی در غشا اشاره نمود [۱۳،۱۲]. در مورد اثر درمانی محصولات لبنی سنتی مطالعات متعددی در ایران انجام شده که منجر به دست‌یابی به نتایج علمی و تائید اثربخش بودن محصولات لبنی سنتی شده است، به‌طوری‌که سویه‌های میکروبی پروبیوتیکی *لاکتوباسیل*، *بیفیدیوباکتریوم* و *اشریشیا کلی* از منابع طبیعی متعدد جداسازی شده و اثرات ضد میکروبی باکتریوسین آنها بررسی شده است [۱۵،۱۴]. هدف پژوهش حاضر بررسی اثر ضد باکتریایی باکتریوسین‌های سویه‌های جداسازی شده بومی لاکتوباسیل با خاصیت پروبیوتیک از محصولات لبنی منطقه ندوشن استان یزد است تا بتوان به‌عنوان نگهدارنده زیستی سالم و بی‌خطر از آنها استفاده نمود.

مواد و روش‌ها

تهیه لاکتوباسیل‌های بومی

نمونه‌های ماست سنتی محلی تهیه شده و پس از کشت در محیط اختصاصی MRS (De Man, Rogosa and Sharpe) Broth (Merck)، در دمای ۳۷ °C به‌مدت ۱۸ ساعت، جداسازی لاکتوباسیل‌ها انجام شد. سپس، DNA ژنومی توسط کیت اختصاصی (Takara)، استخراج شده و با استفاده از روش‌های مولکولی، تعیین توالی ژن srDNA ۱۶ توسط کمپانی AG A/S Copenhagen (Denmark) انجام شد. درنهایت شناسایی مولکولی در سطح جنس و گونه انجام شد و نمونه‌های جداسازی شده در فریزر ۸۰- °C نگهداری شدند. برای بررسی تولید باکتریوسین توسط لاکتوباسیل‌های جداسازی شده، نمونه‌ها در محیط MRS broth کشت داده شدند. برای این منظور، در شرایط بی‌هوازی و در دمای ۳۷ °C انکوبه شدند تا کدورتی معادل ۰/۵ مک‌فارلند ($1/5\times10^8$ cfu/ml) تهیه شود. برای تهیه سوپرناتانت، کشت باکتری‌ها به‌مدت ۲۵ دقیقه در دمای ۴ °C و ۳۵۰۰ g سانتریفیوژ شده و محلول رویی جداسازی شد.

جداسازی باکتریوسین

سویه‌های تولیدکننده باکتریوسین در محیط MRS broth به‌مدت ۴۹ ساعت انکوبه شده و سپس کشت‌ها در دمای ۱۲°C با ۲۵۲۰۰ g سانتریفیوژ شد. به‌منظور کاهش فعالیت مهارکنندگی اسیدهای آلی تولید شده، pH محیط تخمیری توسط سود ۴ نرمال خنثی شد. هم‌چنین، برای حذف سلول‌های باکتریایی، سوسپانسیون در ۲۸۰۰ g به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و سوپرناتانت جدا گردید. سوپرناتانت حاصله به آرامی در مجاورت یخ با ایزوپروپانول سرد با نسبت ۱۰ درصد حجمی مخلوط شد. سپس، نمونه‌ها به‌مدت ۴۰ دقیقه با ۲۵۲۰۰ g در دمای ۴ °C سانتریفیوژ شده و رسوب حاصله در بافر سیترات ۰/۱ مولار و pH برابر ۴/۵ حل شده و از نظر فعالیت باکتریوسینی مورد بررسی قرار گرفت. از محیط کشت MRS broth استریل به‌تنهایی پس از تیمارهای موازی به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد. نمونه حاصله به‌مدت ۴۸ ساعت با بافر فسفات (۰/۰۶ مولار و pH برابر ۷) در ۴ °C تحت دیالیز قرار گرفت و سپس با استفاده از معرف نسلر حذف یون‌های آمونیوم از محلول اثبات گردید [۱۵].

باکتری‌های پاتوژن

هفت سویه باکتریایی بیماری‌زا شامل *میکروکوکوس لوتئوس* (PTCC1169)، *باسیلوس سرئوس* (PTCC1247)، *استافیلوکوکوس اپیدرمیس* (PTCC1435)، *اشریشیا کلی* (PTCC1399)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC1431)، *انتروکوکوس فکالیس* (PTCC1393) و *کاندیدا آلبیکنز* (PTCC5027) به‌صورت لیوفلیزه از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های ایران (سازمان پژوهش‌های صنعتی ایران) تهیه گردیده و پس از تهیه و کشت در محیط نوترینت براث با کدورت ۰/۵ مک‌فارلند مورد استفاده قرار گرفتند.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-03]

تعیین فعالیت باکتریوسینی

روش چاهک

طی این روش از سوسپانسیون باکتری‌های بیماری‌زای کشت داده شده در محیط نوترینت براث با سوآپ استریل روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد. سپس، به‌کمک پیپت پاستور استریل چاهک‌هایی روی محیط ایجاد شده و از سوپرناتانت لاکتوباسیل‌های بومی جدا شده از ماست به‌میزان ۰/۱ میلی‌لیتر در چاهک‌ها ریخته شد. بعد از خشک شدن محیط، پلیت‌ها در انکوباتور ۳۷ °C به‌مدت ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شدند. سپس، قطر هاله عدم رشد ایجاد شده توسط باکتری‌های اسید لاکتیکی بومی علیه هریک از باکتری‌های بیماری‌زا توسط خط‌کش بر حسب واحد میلی‌متر اندازه‌گیری شد [۱۶].

روش دیسک دیفیوژن آگار

در این روش دیسک‌های کاغذی استریل با قطر ۶ میلی‌متر به سوپرناتانت باکتری‌های اسید لاکتیکی به‌مدت ۵ دقیقه آغشته شده و دیسک‌ها در دمای ۳۷ °C به‌مدت ۴ ساعت قرار داده شدند تا به‌طور کامل خشک شوند. سپس، از سوسپانسیون باکتری‌های بیماری‌زای کشت داده شده در محیط نوترینت براث با سوآپ استریل روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شده و دیسک‌های آغشته به محلول رویی باکتری‌های اسید لاکتیک با فاصله معین از یکدیگر و از لبه پلیت روی سطح محیط مولر هینتون آگار قرار داده شدند. سپس، پلیت‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C انکوبه شدند. جهت تعیین اثر ضد میکروبی هرکدام از سویه‌های لاکتوباسیل جداسازی شده، یک نمونه شاهد (کشت هر-کدام از باکتری‌های پاتوژن به تفکیک بدون افزودن لاکتوباسیل) درنظر گرفته شد و مقایسه اثر ضد میکروبی هر لاکتوباسیل جدا-شده با گروه شاهد نظیر خود انجام شد و قطر هاله عدم رشد توسط خط‌کش میلی‌متری اندازه‌گیری شد.

بررسی اثر آنزیم‌ها، حرارت و pH بر فعالیت باکتریوسین

جهت مطالعه اثر آنزیم‌های مورد نظر بر فعالیت باکتریو-سین، آنزیم‌های پپسین (pH: ۳)، پروتیناز K و تریپسین (pH: ۷) (Sigma)، در غلظت نهایی یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر استفاده گردید. به ۲۰۰ میکرولیتر از مایع رویی خنثی شده از باکتری‌های تولید کننده باکتریوسین به‌طور جداگانه ۲۰ میکرولیتر از محلول آنزیم‌ها اضافه شد. سپس، این محلول‌ها به‌مدت ۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ °C قرار گرفتند. پس از آن با حرارت دادن محلول‌ها در ۱۰۰ °C به‌مدت ۲۵ دقیقه آنزیم‌ها غیر فعال گردیدند. در این مرحله میزان فعالیت ضد میکروبی این محلول‌ها به روش رقت سازی در چهار تکرار مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت باکتریوسین که به‌صورت واحدهای فعال در هر میلی‌لیتر بیان می‌گردد، از فرمول $AU/ml = 2^n \times (1000/100)$ به‌دست آمد. در این فرمول n شماره آخرین چاهکی است که سویه معرف در آن هیچ رشدی نداشته و کدورتی مشاهده نشده است [۱۷]. به‌منظور تعیین اثر دما بر میزان فعالیت باکتریوسین، مایع رویی خنثی شده در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰، ۳۰ و ۴۵ دقیقه و هم‌چنین در دمای ۱۰۰°C به‌مدت۱۰ دقیقه و در نهایت در دمای ۱۲۱ °C به‌مدت ۱۵ دقیقه (حرارت اتوکلاو) حرارت داده شد و میزان اثر مهاری آن بررسی گردید [۱۸]. برای بررسی اثر pH روی فعالیت باکتریوسین، pH مایع رویی محیط کشت با استفاده از NaOH ۵ مولار و HCl ۵ مولار استریل بین ۱۰-۲ تنظیم شد و نمونه‌ها به‌مدت ۲ ساعت در دمای اتاق قرار داده شدند. پس از این مدت، pH نمونه‌ها روی ۷ تنظیم شد و میزان فعالیت ضد میکروبی آنها بررسی گردید [۱۸]. سوپرناتانت سویه‌های بومی لاکتوباسیل که تحت هیچ تیمار پروتئازی، دما و تغییرات pH قرار نگرفته بودند، به‌عنوان شاهد با ۱۰۰ درصد فعالیت درنظر گرفته شدند و درصد فعالیت باکتریو-سینی سوپرناتانت‌های نمونه‌های تیمار شده نسبت به شاهد تعیین شد.

تجزیه و تحلیل آماری

به‌منظور کاهش خطا هر آزمون چهار بار تکرار شد. تجزیه‌وتحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS انجام شده و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون تحلیل واریانس دوسویه (Two-Way ANOVA) استفاده شد. حدود اطمینان در تمامی آزمایشات ۹۵ درصد درنظر گرفته شد و $P<0/05$ معنی‌دار محسوب گردید [۱۶-۱۴].

نتایج

نمونه‌های باکتریایی جداسازی شده در این آزمون سویه-های باکتریایی *لاکتوباسیلوس دلبروکی*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* و *لاکتوباسیلوس کازئی* بودند که از نمونه‌های ماست محلی منطقه ندوشن تهیه شده و فعالیت ضد میکروبی آنها علیه هفت سویه بیماری‌زا به روش‌های چاهک و دیسک مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بررسی‌های ضد میکروبی نشان داد که سویه‌های جداسازی شده از طریق باکتریوسین خود اثر مطلوبی بر باکتری‌های پاتوژن داشته و توانستند باکتری‌های پاتوژن را سرکوب نمایند. نتایج بررسی به روش چاهک حاکی از

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-03]

توانایی اثر مهارکنندگی لاکتوباسیل‌ها بود؛ به‌طوری‌که هاله عدم رشد از ۵ تا ۱۴ میلی‌متر متفاوت بود. بیشترین میزان مهار کنندگی مربوط به سویه‌های *لاکتوباسیلوس دلبروکی* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بود (جدول شماره ۱). از بین باکتری‌های اسید لاکتیکی و در ارتباط با اثر مهارکنندگی بر *میکروکوکوس لوتئوس*، سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بیشترین میزان مهارکنندگی را نشان داد (۱۳/۲۱±۰/۳۱ میلی‌متر) و به‌دنبال آن سویه *لاکتوباسیلوس دلبروکی* با میزان مهارکنندگی ۱۲/۴۰±۰/۴ میلی‌متر قرار داشت. *لاکتوباسیلوس دلبروکی* بیشترین اثر مهارکنندگی بر *باسیلوس سرئوس* داشت که قطر آ« ۱۳/۷۸±۰/۸ میلی‌متر بود. هم‌چنین، برای این باکتری پاتوژن سویه *لاکتوباسیلوس کازئی* با اثر مهارکنندگی با قطر هاله ۷/۷۶±۰/۳ میلی‌متر کمترین اثر را داشت. بیشترین اثر مهارکنندگی برای باکتری‌های پاتوژنی *استافیلوکوکوس اپیدرمیس*، *اشریشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *انتروکوکوس فکالیس* و *کاندیدا آلبیکانز* به‌ترتیب مربوط به باکتری‌های اسید لاکتیک *لاکتوباسیلوس دلبروکی* (۱۴±۰/۶ میلی‌متر)، *لاکتوباسیلوس کازئی* (۱۲/۲۰±۰/۶ میلی‌متر)، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (۱۳/۸۴±۰/۸) و *لاکتوباسیلوس کازئی* (۵/۱۲±۰/۳) بودند. در ادامه میزان مهار-کنندگی فعالیت باکتریوسینی سویه‌های بومی جداسازی شده در مهار باکتری‌های بیماری‌زا برحسب روش دیسک بر علیه تمام سویه‌های پاتوژن به روش دیسک تعیین شد (جدول شماره ۲). بررسی نتایج بررسی به روش دیسک نشان داد که بیشترین میزان مهار کنندگی مجدد مربوط به سویه‌های *لاکتوباسیلوس دلبروکی* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* است. میزان مهارکنندگی برای همه سویه-های بررسی شده پس از اندازه‌گیری هاله عدم رشد بین ۶ تا ۱۴ میلی‌متر تعیین شد. بیشترین میزان مهارکنندگی علیه باکتری‌های بیماری‌زای *میکروکوکوس لوتئوس*، *باسیلوس سرئوس*، *استافیلو-کوکوس اپیدرمیس*، *اشریشیاکلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *انترو-کوکوس فکالیس* و *کاندیدا آلبیکانز* به‌ترتیب شامل *لاکتوباسیلوس دلبروکی*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس کازئی* بود. به-منظور بررسی ماهیت عامل ضد میکروبی استخراج شده، از اثر آنزیم‌های پروتئازی پپسین، پروتیئناز K و تریپسین روی میزان فعالیت باکتریوسین با روش رقت‌سازی در برابر نمونه کنترل که تیماری روی آن انجام نگرفته بود، استفاده شد. نتایج نشان داد اثر ضد میکروبی و مهاری سویه‌های جداسازی شده به‌وسیله پروتئازها به‌طور قابل توجهی از بین می‌رود. لذا، این نتایج احتمالا تأییدی بر پروتئینی بودن عامل مهاری تولید شده در این سویه‌ها است. جهت تعیین میزان پایداری خاصیت مهاری باکتریوسین‌ها، حرارت بالا و pH های مختلف روی فعالیت ضد میکروبی استفاده شد و میزان فعالیت باکتریوسین تیمار شده به روش رقت سازی در مقایسه با نمونه شاهد بدون تیمار مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که سویه‌های جداسازی شده ازنظر مقاومت دمایی به‌طور کامل در برابر حرارت پایدار هستند و این درحالی‌است که بعد از ۱۵ دقیقه حرارت دیدن در اتوکلاو فعالیت خود را حفظ کردند. هم‌چنین، نتایج نشان داد که اثر ضد میکروبی مشاهده شده در شرایط اسیدی و قلیایی به نسبت پایدار است (جدول شماره ۳).

جدول شماره ۱- میزان مهار کنندگی (میلی‌متر) سویه‌های جداسازی شده از ماست بومی در مهار باکتری‌های بیماری‌زا بر حسب روش چاهک

	میکروکوکوس لوتئوس	*باسیلوس سرئوس*	*استافیلوکوکوس اپیدرمیس*	*اشریشیا کلی*	*استافیلوکوکوس اورئوس*	*انتروکوکوس فکالیس*	*کاندیدا آلبیکانز*
لاکتوباسیلوس دلبروکی	۱۲/۴۰±۰/۴	۱۳/۷۸±۰/۸	۱۴±۰/۶	۱۱/۸۳±۰/۷	۱۲/۲۶±۰/۴	۹/۱۲±۰/۳	۱۳/۲۲±۰/۴
لاکتوباسیلوس پلانتاروم	۱۳/۲۱±۰/۳۱	۱۳/۲۴±۰/۲	۱۲/۲۳±۰/۳	۱۲±۰/۸	۱۳/۵۴±۰/۶	۱۳/۸۴±۰/۸	۱۲/۱۴±۰/۸
استرپتوکوکوس ترموفیلوس	۱۱/۴۳±۰/۷	۱۲/۳۵±۰/۴	۱۳/۶۵±۰/۶	۸/۱۴±۰/۳	۶/۲۵±۰/۳	۸/۵۳±۰/۶	۹/۴۵±۰/۴
لاکتوباسیلوس کازئی	۱۱/۲۷±۰/۴۷	۷/۸۶±۰/۲	۱۳/۱۰±۰/۵	۱۲/۲۰±۰/۶	۱۰/۴۴±۰/۵	۱۱/۳۶±۰/۸	۵/۱۲±۰/۳

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-03]

جدول شماره ۲- میزان مهار کنندگی (میلی‌متر) سویه‌های جداسازی شده از ماست بومی در مهار باکتری‌های بیماری‌زا بر حسب روش دیسک دیفیوژن

	میکروکوکوس لوتئوس	*باسیلوس سرئوس*	*استافیلوکوکوس اپیدرمیس*	*اشرشیاکلی*	*استافیلوکوکوس اورئوس*	*انتروکوکوس فکالیس*	*کاندیدا آلبیکانز*
لاکتوباسیلوس دلبروکی	۱۳/۳۲±۰/۴	۱۱/۷۸±۰/۸	۱۳/۱۴±۰/۶	۹/۸۵±۰/۵	۱۱/۳۲±۰/۸	۸/۱۴±۰/۵	۱۳/۵۵±۰/۷
لاکتوباسیلوس پلانتاروم	۱۰/۸۳±۰/۸	۱۲/۲۶±۰/۶	۷/۳۱±۰/۵	۱۲±۰/۲	۱۲/۷۳±۰/۹	۱۲/۴۳±۰/۷	۱۰/۷۷±۰/۶
استرپتوکوکوس ترموفیلوس	۱۱/۲۶±۰/۳	۱۰/۴۳±۰/۹	۱۲/۴۵±۰/۶	۷/۲۲±۲۲	۸/۸۳±۰/۹	۷/۸۶±۰/۳	۱۲/۳۴±۰/۹
لاکتوباسیلوس کازئی	۹/۱۶±۰/۹	۷/۷۶±۰/۳	۱۱/۹۲±۰/۵	۱۰/۲۷±۰/۶	۱۱/۵۵±۰/۵	۱۲/۴۹±۰/۶	۶/۳۶±۰/۴

جدول شماره ۳- بررسی اثر آنزیم‌های پروتئازی، pH و دما بر فعالیت باکتریوسین در مقابل سویه *استافیلوکوکوس اورئوس*

تیمار	ویژگی تیمار	درصد فعالیت
	شاهد	۱۰۰
آنزیم‌های پروتئولیتیک	پپسین	صفر
	تریپسین	صفر
	پروتئیناز K	صفر
دما	۶۰ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ دقیقه	۹۰
	۱۰۰ درجه سانتی‌گراد، ۱۰ دقیقه	۱۰۰
	۱۰۰ درجه سانتی‌گراد، ۴۵ دقیقه	۱۰۰
	۱۲۱ درجه سانتی‌گراد، ۱۵ دقیقه	۱۰۰
pH	۲	۶۵
	۵	۸۵
	۷	۱۰۰
	۹	۱۰۰

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که متابولیت‌های باکتری‌های اسید لاکتیک جداسازی شده از ماست محلی منطقه ندوشن می‌توانند از رشد باکتری‌های پاتوژن جلوگیری نمایند. این مسئله از این نظر حایز اهمیت است که امروزه به‌علت عوارض ناشی از مواد ضد میکروبی شیمیایی و نیز مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم که به‌میزان زیادی تجویز می‌شوند، توجه به سمت مواد ضد میکروب زیستی با کاربری در صنایع دارویی، غذایی و فرمولاسیون درمانی متمرکز شده است. متابولیت‌های باکتری‌های اسید لاکتیک می‌توانند به‌عنوان ترکیبات ضد میکروبی طبیعی کاربرد غذایی و دارویی داشته باشند. یکی دیگر از مکانیسم‌های باکتری‌های اسید لاکتیک تولید اسید لاکتیک و اسیدهای آلی است که سبب کاهش pH محیط می‌شوند و از رشد بسیاری از باکتری‌ها ممانعت می‌کنند [۱۹]. مژگانی و همکارانش موفق به جداسازی فلورهای اسید لاکتیک از شیر منطقه آذربایجان شرقی شدند که قابلیت ضد میکروبی علیه سویه‌های پاتوژن *لیستریا مونوسایتوژنز*، *شیگلا*، *سالمونلا*، *استافیلوکوک اورئوس* و *استافیلوکوک پنمونی* داشتند [۱۹،۱۶]. نتایج پژوهش حاضر نیز حضور لاکتوباسیل‌های پروبیوتیک در محصولات لبنی ایران را نشان داد. در ارتباط با ارزیابی فعالیت باکتریوسین تولید شده توسط باکتری‌های مولد اسید لاکتیک مطالعات زیادی انجام شده و در همه آنها خاصیت ضد میکروبی این سویه‌ها تایید شده است [۲۱،۲۰]. Chris Henning و همکاران بیان کرده‌اند حدود ۷۷ نوع باکتریوسین توسط گونه‌های انتروکوکوس تولید می‌شود که از رشد *لیستریا مونوسایتوژنز* جلوگیری می‌کنند و می‌توان آن‌ها را از منابع غذایی حیوانی جداسازی کرد. استفاده از ترکیبی از باکتریوسین‌ها در مواد غذایی مخصوصا باکتریوسین‌ها با دامنه‌های عملکردی متفاوت می‌توانند عملکرد بسیار خوبی علیه پاتوژن‌های غذایی مانند *لیستریا مونوسایتوژنز* داشته باشند و مواد غذایی مورد مصرف ما را ایمن‌تر کنند [۲۱]. *انتروکوکوس‌ها* بزرگ‌ترین گروه باکتری‌های اسید لاکتیک هستند و فعالیت باکتریوسین دارند. باکتری *E. faecium* M3K31 به‌عنوان بزرگترین تولید کننده انتروسین HF است که

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-03]

می‌توان آن را با توجه به ایمن بودن به‌عنوان یک مکمل غذایی برای حیوانات استفاده کرد. Bendali و همکاران بیان کرده‌اند که تولید نایسین تحت تاثیر عوامل متعددی مثل سوش تولید کننده و ترکیبات مواد غذایی است، اما حلالیت، پایداری و فعالیت بیولوژیکی نایسین وابسته به pH محلول است. زیرا نایسین تقریبا در شرایط خنثی و قلیایی نامحلول است و مهم‌ترین مشکل تولید نایسین ممانعت از رشد ناشی از افزایش غلظت لاکتات در نتیجه کاهش pH است [۲۷]. Hirano و همکاران نیز بیان نموده‌اند که لاکتوباسیلوس‌های *پلانتاروم و کوروواتوس* بر طیف وسیعی از باکتری‌های پاتوژن نظیر *لیستریا مونوسیتوژنز*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *یرسینیا انتروکولیتیکا* اثر مهارکنندگی دارند [۲۲]. نتایج مطالعه‌ای که توسط Ralitsa و همکاران روی ۳۲ سویه لاکتوباسیلوس جداسازی شده از نیچ‌های اکولوژی متعدد انجام شد، اثر ضد میکروبی آنها روی سویه‌های پاتوژن متعدد را نشان داد [۱۶] که با نتایج حاصله از پژوهش حاضر مطابقت دارد. اغلب باکتریوسین‌ها فعالیت ضد باکتریایی دارند و این امر به‌وسیله تحریک نفوذ غشا که منجر به تراوش مولکول‌های موجود در سیتوپلاسم و مرگ سلول هدف می‌شود، انجام می‌گردد [۲۳]. برخی از باکتریوسین‌ها به‌دلیل فعالیت باکتری‌کشی به پروتئین‌های سیستم مانوز فسفو ترانسفراز (Man-PTS) اتصال می‌یابند. توالی آمینو اسیدی حفاظت شده YGNGV در ناحیه انتهای N باکتریوسین‌ها کلاس II نقش مهمی برای فعالیت ضد *لیستریایی* دارد، درحالی‌که دومین انتهای C برای فعالیت ضد میکروبی بر علیه دیگر سویه‌های هدف عمل می‌کند [۲۵،۲۴]. مکانیسم کشندگی باکتریوسین‌های کلاس IIb شامل ایجاد منفذ در غشای سلول‌های هدف است که منجر به تراوش مولکول‌های سیتو-پلاسمی از قبیل کاتیون‌های یک ظرفیتی مانند Na^+، K^+، Li^+، Cs^+ و Rb^+ می‌شود، اما تاثیری بر کاتیون‌های دو ظرفیتی از قبیل Mg^{2+} یا فسفات ندارد [۲۶]. Garsa و همکاران اثر آنتاگونیستی باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از ماست بر علیه باکتری‌های بیماری‌زا را مطالعه نمودند. نتایج ایشان نشان داد که بیشترین اثر بازدارندگی مربوط به گونه‌های *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوکوکوس لاکتیس* در روش چاهک بوده و حداکثر میانگین قطر هاله عدم رشد آنها ۱۸ میلی‌متر ارزیابی شده است. بیشترین و کمترین اثر مهاری بر علیه باکتری‌های پاتوژن به‌ترتیب روی *یرسینیا انترو-کولیتیکا* و *باسیلوس سرئوس* مشاهده شد. گونه‌های هر دو جنس *لاکتوباسیلوس* و *لاکتوکوکوس* اثر مهاری مناسبی روی باکتری-های بیماری‌زای روده نشان دادند، ولی در مطالعه‌ای که توسط Bendali و همکاران انجام شد نتایج نشان داد که لاکتوباسیل-های موجود در ماست‌های محلی استان گلستان نسبت به لاکتوکوک‌ها توانایی بیشتری در مقابله با پاتوژن‌ها از خود نشان دادند و این اثر مهاری روی *یرسینیا انتروکولتیکا* مشهودتر بود [۲۸،۲۷]. سویه‌های بررسی شده در این تحقیق روی باکتری‌های گرم منفی مانند *اشریشیا کلی* اثر مهاری کمتری از خود نشان دادند. اکثر پژوهشگران عدم فعالیت ضد میکروبی باکتریوسین‌ها را در برابر باکتری‌های گرم منفی گزارش کرده‌اند [۲۹]. به‌دلیل وجود دیواره خارجی در باکتری‌های گرم منفی که مانعی برای رسیدن باکتریوسین به جایگاه فعال خود و اعمال اثر مهاری بر باکتری‌های گرم منفی می‌باشد، باکتریوسین‌ها در مقابل این گروه از باکتری‌ها غیر فعال بوده و یا فعالیت کمتری از خود نشان می-دهند. گزارش‌های معدودی در رابطه با اثر مهاری برخی باکتریوسین‌ها بر باکتری‌های گرم منفی وجود دارد: ازجمله گزارش شده است که باکتریوسین تولید شده توسط *پانی باسیلوس پلی میکسا* رشد *کمپیلوباکتر ژژونی* را مهار می‌کند و باکتریوسین تولیدی توسط *پانی باسیلوس پلی میکسا* JB05-1-1 رشد *اشریشیا کلی* RR1 و *پسودوموناس فلورسنس* R73 را نیز مهار می‌کند و می‌تواند به‌عنوان نگهدارنده در مواد غذایی استفاده شود [۳۰]. نتایج نشان داد که آنزیم پروتئاز باعث از بین رفتن فعالیت ضد میکروبی باکتریوسین‌ها می‌گردد که تأییدی بر پروتئینی بودن ترکیب ضد میکروبی تولید شده می‌باشد. فعالیت پومیلی‌سین و توچیسین که به‌ترتیب توسط *باسیلوس پومیلوس*، *باسیلوس سابتیلیس* و *باسیلوس تورنجنسیس* تولید می‌شوند نیز به‌وسیله آنزیم‌های پروتئولیتیک به‌طور کامل ازدست می‌رود، اما ایزوله‌ها به اثر درجه حرارت بالا مقاوم می‌باشند [۳۲،۳۱]. پایداری حرارتی خصوصیت مهمی برای این باکتریوسین‌ها است؛ چرا که استفاده از این باکتریوسین‌ها را در محافظت طیف وسیعی از داروها که نیازمند حرارت بالا در طی فرایند آماده سازی می-باشند، ممکن می‌سازد. باکتریوسین تولید شده در pH های مختلف قادر به حفظ فعالیت ضد میکروبی خود می‌باشد که درصورت مصرف گوارشی در pH اسیدی معده غیر فعال نمی-شود.

نتیجه گیری

داده‌های پژوهش حاضر نشان داد، می‌توان از سویه‌های بومی جداسازی شده از محصولات لبنی سنتی با قابلیت تولید باکتریوسین به عنوان پروبیوتیک‌های نگهدارنده زیستی سالم و بی‌خطر در صنایع دارویی، غذایی و درمانی استفاده نمود.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-03]

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از کلیه عزیزانی که در انجام این تحقیق همکاری نمودند و نیز از دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی نهایت تشکر و قدردانی به‌عمل می‌آید.

References:

[1] Boziaris IS, Nychas GJ. Effect of nisin on growth boundaries of *Listeria monocytogenes* at various temperatures, pH, and water activities. ***Food Microbiol*** 2006; 23(8): 779-84.

[2] Sharma V, Harjai K, Shukla G. Effect of bacteriocin and exopolysaccharides isolated from probiotic on P. aeruginosa PAO1 biofilm. ***Folia Microbiol (Praha)*** 2018; 63(2): 181-90.

[3] Todorov SD, Holzapfel W, Nero LA. In Vitro Evaluation of Beneficial Properties of Bacteriocinogenic Lactobacillus plantarum ST8Sh. ***Probiotics Antimicrob Proteins*** 2017; 9(2): 194-203.

[4] Das D, Goyal A. Characterization of a noncytotoxic bacteriocin from probiotic Lactobacillus plantarum DM5 with potential as a food preservative. ***Food Funct*** 2014; 5(10): 2453-62.

[5] Basanta A, Herranz C, Gutiérrez J, Criado R, Hernández PE, Cintas LM. Development of bacteriocinogenic strains of Saccharomyces cerevisiae heterologously expressing and secreting the leaderless enterocin L50 peptides L50A and L50B from Enterococcus faecium L50. ***Appl Environ Microbiol*** 2009; 75(8): 2382–92.

[6] Shetty K, Paliyath G, Pometto A, Levin RE. Food Biotechnology. 2nd ed. New York: CRC Press; 2005.

[7] Cheikhyoussef A, Pogori N, Chen W, Zhang H. Antimicrobial proteinaceous compounds obtained from bifidobacteria: From production to their application. ***Int J Food Microbiol*** 2008; 125(3): 215-22.

[8] Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. ***Int J Food Microbiol*** 2001; 71(1): 1-20.

[9] M Sh, Rajok R, Hayat HF, Sarwar H, Mehwish M, Ahmad F, et al. Isolation and evaluation of probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from poultry intestine. ***Microbiology*** 2018; 87, 1, 116-26.

[10] O'Sullivan L, Ross RP, Hill C. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. ***Biochimie*** 2002; 84(5-6): 593-604.

[11] Klaenhammer TR. Probiotic bacteria: today and tomorrow. ***J Nutrition*** 2000; 130(2): 415S-6S.

[12] Martín M, Gutiérrez J, Criado R, Herranz C, Cintas LM, Hernández PE. Cloning, production and expression of the bacteriocin enterocin A produced by Enterococcus faecium PLBC21 in Lactococcus lactis. ***Appl Microbiol Biotechnol*** 2007; 76(3): 667-75.

[13] Urazova M, Moldagulova A, Anuarbekova S, Tuyakova A, Abitaeva G, Nagyzbekkyzy E, et al. Examination of Lactic Acid Bacteria to Secretion of Bacteriocins. ***Cent Asian J Glob Health*** 2014; 24; 2(Suppl): 106.

[14] Karimi S, Azizi F, Nayeb-Aghaee M, Leila Mahmoodnia. The antimicrobial activity of probiotic bacteria *Escherichia coli* isolated from different natural sources against hemorrhagic *E. coli* O157: H7. ***Electron Phys*** 2018; 10(3): 6548–53.

[15] Mojgani N, Hussaini F, Vaseji N. Characterization of indigenous Lactobacillus strains for probiotic properties. ***Jundishapur J Microbiol*** 2015; 8(2): e17523.

[16] Ralitsa G, Lyubomira Y, Lilia T, Galina Z, Nina S, Akseniya A, et al. Antimicrobial activity and antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* spp. intended for use as starter and probiotic cultures. ***Biotechnol Equip*** 2015; 29(1): 84–91.

[17] Pasteris SE, Vera Pingitore E, Ale CE, Nader-Macías ME. Characterization of a bacteriocin produced by Lactococcus lactis subsp. lactis CRL 1584 isolatedfrom a Lithobates catesbeianus hatchery. ***World J Microbiol Biotechnol*** 2014; 30(3): 1053-62.

[18] Khalil R, Elbahloul Y, Djadouni F, Omar S. Isolation and partial characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus megaterium* 19 strains. ***Pakistan J Nutrition*** 2009; 8(3): 242-50.

[19] Aroutcheva AA, Simoes JA, Faro S. Antimicrobial protein produced by vaginal *lactobacillus acidophilus* that inhibits *Gardnerlla vaginalis*. ***Infect Dis obstet Gynecol*** 2001; 9(1): 33-8.

[20] Fraga Cotelo M, Perelmuter Schein K, Giacaman Salvo SS, Abirad Z, Miguel P, Carro Techera SB. Antimicrobial properties of lactic acid bacteria isolated from Uruguayan artisan cheese. ***Food Sci*** 2013; 33(4): 801-4.

[21] Henning C, Vijayakumar P, Adhikari R, Jagannathan B, Gautam D, Muriana P. Isolation and Taxonomic Identity of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria from Retail Foods and Animal Sources. ***Microorganisms*** 2015; 3(1): 80-93.

[22] Hirano J, Yoshida T, Sugiyama T, Koide N, Mori I, Yokochi T. The effect of Lactobacillus rhamnosus on enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection of human intestinal cells in vitro. ***Microbiol Immunol*** 2003; 47(6): 405-9.

[23] Perez RH, Zendo T, Sonomoto K. Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. ***Microbial Cell Factories*** 2014; 13(1): 89-93.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-03]

[24] Johnsen L, Fimland G, Nissen-Meyer J. The C-terminal domain of pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) is involved in specific recognition of the C-terminal part of cognate immunity proteins and in determining the antimicrobial spectrum. ***J Biol Chem*** 2005; 280 (10): 9243-50.
[25] Fimland G, Johnsen L, Dalhus B, Nissen-Meyer J. Pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) and their immunity proteins: biosynthesis, structure, and mode of action. ***J Peptide Sci*** 2005; 11(11): 688-96.
[26] Oppegard C, Rogne P, Emanuelsen L, Kristiansen PE, Fimland G, Nissen- Meyer J. The two-peptide class II bacteriocins: structure, production, and mode of action. ***J Mol Microbiol Biotechnol*** 2007; 13(4): 210-9.
[27] Bendali F, Madi N, Sadoun D. Beneficial effects of a strain of Lactobacillus paracasei subsp. paracasei in Staphylococcus aureus-induced intestinal and colonic injury. ***Int J Infect Dis*** 2011; 15(11): 787-94.
[28] Garsa AK, Kumariya R, Sood SK, Kumar A, Kapila S. Bacteriocin production and different strategies for their recovery and purification. ***Probiotics Antimicrob Proteins*** 2014; 6(1): 47-58.
[29] Hammami I, Rhouma A, Jaouadi B, Rebai A, Nesme X. Optimization and biochemical characterization of a bacteriocin from a newly isolated *Bacillus subtilis* strain 14B for biocontrol of Agrobacterium spp. strains. ***Lett Appl Microbiol*** 2009; 48(2): 253-60.
[30] Stern NJ, Svetoch EA, Eruslanov BV, Kovalev YN, Volodina LI, Perelygin VV, et al. *Paenibacillus polymyxa* purified bacteriocin to control *Campylobacter jejuni* in chickens. ***J Food Prot*** 2005; 68(7): 1450-3.
[31] Naghmouchi K, Paterson L, Forster B, McAllister T, Ohene-Adjei S, Drider D, et al. *Paenibacillus polymyxa* JB05-01-1 and its perspectives for food conservation and medical applications. ***Arch Microbiol*** 2011; 193(3): 169-77.
[32] Zaghian S, Shokri D, Emtiazi G. Co-production of a UV-stable bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS) and indole-3-acetic acid hormone (IAA) and their optimization by Taguchi design in *Bacillus pumilus*. ***Ann Microbiol*** 2012; 62(3): 1189-97.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-03]