INHIBITION ACTIVITY OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM FERMENTED FOODS AGAINST VEGETATIVE CELLS AND SPORE GERMINATION OF *BACILLUS* SPP.

WASIM S. M. QADI

(Matric NO. 3150007)

Thesis submitted fulfillment for the degree of Master of Science

(FOOD BIOTECHNOLOGY)

Faculty of Science and Technology

UNIVERSITI SAIN ISLAM MALAYSIA

NILAI

July 2017

DEDICATION

TO

My dead father and My mother

Suhail mohmed qadi

And

Fathia mohmed hoor

My brother and sister for the inspiration:

Baseem, Mohmed, Odai, Qosai, jamela, Braa

all my uncle and my friend

Ayman hoor

Dr. Ahmed B. Abed

The martyrs of Palestine especially sourif martyrs

Mahmmod Gnemate

The prisoners of Palestine especially Prisoners Sourif

Jamal abed El ftah hoor

Ahmed abu fara

BIODATA OF THE AUTHOR

The author was born in Hebron City on 24th May 1984. He received the bachelor degree of food processing from alquds university in Palestine 2007/2008. The author is doing his master program in Food Biotechnology , Universiti Sains Islam Malaysia(USIM). His research interest in the area of antimicrobial activity from natural resource.

APPROVAL SHEETS

This thesis **"Inhibition activity of lactic acid bacteria isolated from fermented foods against vegetative cells and spore germination of *Bacillus* spp."** submitted to the Faculty of Science and Technology (FST), Universiti Sains Islam Malaysia(USIM) and was accepted as fulfillment of the requirement for the degree of master of science.

ZAITON HASSAN, PHD.D,

Associate professor

Faculty of science and technology (FST)

Universiti Sains Islam Malaysia(USIM)

Date:

ACKNOWLEDGEMMENTS

In the name of Allah, The most Graceful, The most merciful.

All praise is to Allah, lord of the universe, for giving me the strength in the journey to complete this thesis.

First and foremost, I would to express my deepest gratitude and appreciation to my supervisor, Associate professor Dr. Zaiton Hassan for her attention, kidness, patience and most of all, for her faith towards me, also for her professional guidance, helpful comments and generous advices throughout preparing this project and thesis, I consider myself very lucky to be given this honor to work with her.

I want to thank the University of Universiti Sains Islam Malaysia represented Prof. Dr. Musa Ahmed And faculty members In the College of Science.

Next, I would like to thank my family especially my mother fathia, my brother Baseem, Mohmed, Odai, Qosai and my sister Jamela, Braa and all my uncle. And I would like to thank my friend Dr. Ahmed B. Abed for A lot of advice and assistance during my studies, and so much thank for my friend Dr. Samer Samara my old brother in foreign land.

Finally , Send thanks to the unknown soldiers who are a big reason to end my studies

ABSTRAK

Aktiviti Perencatan Bakteria Asid Laktik Diasingkan Daripada Makanan Diperam Terhadap Sel-sel Vegetatif dan Percambahan Spora Bacillus spp.

Bacillus spp. menghasilkan spora dan juga sejenis bakteria gram positif yang boleh menyebabkan kerosakan makanan dan penyakit bawaan makanan. Bakteria asid laktik (LAB) terkenal dengan keupayaan mereka untuk mensintesis kompaun yang boleh menghalang pertumbuhan sel-sel vegetatif dan percambahan spora *Bacillus* spp. Tujuan kajian ini adalah untuk menyaring LAB daripada yogurt, pes udang yang telah ditapai ataupun dikenali sebagai "belacan" dan durian yang telah ditapai yang dikenali sebagai "tempoyak" dengan bertujuan untuk melihat aktiviti antimikrob terhadap pertumbuhan sel vegetatif dan percambahan spora oleh *Bacillus cereus, B. subtilis* dan *B. spizizenii*. Keputusan spot assay agar menunjukkan bahawa daripada 45 sel LAB yang telah disaring, 98% daripadanya dapat menghalang dengan kuat pertumbuhan *B. cereus* ,78% dapat menghalang *B. spizizenii* dan 51% dapat menghalang *B. subtilis*. Supernatan LAB menunjukkan aktiviti perencatan yang kuat terhadap *B. cereus* iaitu sebanyak 58%, diikuti oleh *B. spizizenii* sebanyak 44.5% dan B. subtilis sebanyak 31%. Pelbagai aktiviti perencatan terhadap sel-sel dan pencambahan spora diperhatikan apabila pH supernatan telah diselaraskan kepada pH 4, 5 dan 6. Supernatan daripada kesemua LAB yang telah disaring menunjukkan aktiviti perencatan yang bagus terhadap sel-sel vegetatif iaitu sebanyak 46.5% terhadap *B. cereus*, 31% terhadap *B . subtilis* dan 37.8% terhadap *B. spizizenii* pada pH 4. LAB yang diasingkan daripada belacan dan tempoyak menunjukkan aktiviti pada pH 5 dan 6 di mana 15.5% terhadap *B. subtilis*, 20% terhadap *B. cereus* dan 2% terhadap *B. spizizenii* . Supernatan daripada LAB yang diasingkan daripada yogurt kehilangan aktiviti perencatan pada pH 5 dan 6. Percambahan spora *Bacillus* spp terjejas disebabkan oleh sel-sel LAB dan supernatant Seperti yang telah dinilai daripada keputusan assay spot , sel LAB yang telah diasingkan daripada yogurt, belacan dan tempoyak merencat dengan kuat percambahan spora oleh *B. subtilis* (89%), *B. cereus (75.5%)* dan *B. spizizenii* (73.3%). Sebaliknya, supernatan menunjukkan aktiviti perencatan yang berbagai terhadap percambahan spora di mana 24.4% terhadap *B. subtilis*, 29% terhadap *B. cereus* dan 15.5% terhadap *B. spizizenii*. Percambahan spora telah kuat direncatkan oleh pH supernatan di mana perencatan yang lebih besar berlaku pada pH 4 berbanding pH 5 dan 6. Supernatan daripada LAB yang telah diasingkan daripada belacan dan durian dapat merencatkan percambahan spora pada pH 5 dan 6. Sementara itu, supernatan daripada LAB yang diasingkan daripada yogurt kehilangan aktiviti perencatan terhadap percambahan spora pada pH 5 dan 6. Aktiviti antimickrob oleh supernatan LAB (BP2, BK4, BT1, D2) telah berkurangan apabila diuji dengan proteinase k dan RNaseI. LAB yang diasingkan daripada belacan dan tempoyak adalah mudah terkesan kepada Penicillin G (PI), gentamicin (CN), Chloramphenicol (C), Tetracycline (TE), tetapi resisten kepada vancomycin dan Streptomycin (S). Kajian ini menunjukkan kehadiran kompaun di dalam supernatants LAB yang mempunyai aktiviti perencatan terhadap sel-sel vegetatif dan

percambahan spora pada pH 5 dan 6. Kompaun ini mungkin mempunyai potensi untuk penggunaan biopreservatif terhadap kerosakan makanan dan penyakit bawaan makanan disebabkan oleh *Bacillus* spp.

Kata kunci :*Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *B. spizizenii*, bakteria asid laktik, percambahan spora, aktiviti antimikrobial.

ABSTRACT

Inhibition Activity of Lactic Acid Bacteria Isolated From Fermented Foods Against Vegetative Cells And Spore Germination of *Bacillus* spp.

Bacillus spp. are endospore-forming, Gram-positive bacteria able to cause food spoilage and foodborne diseases. Lactic acid bacteria (LAB) are known for their ability to synthesize compounds that can inhibit growth of vegetative cells and spore germination of *Bacillus* spp. The aim of this study was to screen LAB isolated from yogurt, fermented shrimp paste "belacan" and fermented durian "tempoyak" for antimicrobial activity on vegetative cell growth and spore germination of *Bacillus cereus, B. subtilis* and *B. spizizenii*. Results of agar spot assay showed that from the 45 LAB cells 98% inhibited strongly growth of *B. cereus* compared to 78% against *B. spizizenii* and 51% against *B. subtilis*. The LAB supernatant showed strong inhibitory activity against *B. cereus* 58%, followed by *B. spizizenii* 44.5% and *B. subtilis* 31%. Variable inhibitory activity against vegetative cells and spore germination was observed when the pH of supernatants was adjusted to pH 4, 5 and 6. The supernatants of all LAB isolates showed good inhibitory activity against vegetative cells 46.5 % against *B. cereus*, 31% against *B. subtilis* and 37.8 % against *B. spizizenii* at pH 4. LAB isolated from belacan and fermented durian showed activity at pH 5 and 6: 15,5% against *B. subtilis*, 20% against *B. cereus* and 2% against *B. spizizenii*. Supernatant of LAB from yogurt lost its inhibitory activity at pH 5 and 6. Spore germination of the *Bacillus* spp. was affected by LAB cells and supernatants. LAB cells isolated from yogurt, belacan and fermented durian inhibited strongly spore germination of *B. subtilis* (89%) than *B. cereus* (75.5%) and *B. spizizenii* (73.3%) as evaluated by spot assay. In contrast, the supernatant demonstrated variable inhibitory activity against spore germination as indicated by 24.4% for *B. subtilis*, 29% for *B. cereus* and 15.5% against *B. spizizenii* as evaluated by well method. Spore germination was strongly inhibited by pH of supernatant, greater inhibition at pH 4 compared to pH 5 and 6. The supernatant of LAB isolates from belacan and durian inhibited spore germination at pH 5 and 6. While Supernatant of LAB from yogurt lost its inhibitory activity against spore germination at pH 5 and 6. Antimicrobial activity of supernatant LAB (BP2, BK4, BT1, D2) were diminished when treated with proteinase k, RNase I. LAB isolates from "belacan" and fermented durian were susceptible to Penicillin G (PI), Gentamicin(CN),

Chloramphenicol(C), Tetracycline(TE) but resistant to vancomycin and Streptomycin (S). This study indicated that the presence of compounds in LAB supernatants that have inhibitory activity against vegetative cells and spore germination at pH 5 and 6. Such compounds may have potential use for food biopresevation against food spoilage and foodborne disease caused by *Bacillus* spp.

Keywords: *Bacillus cereus, B. subtilis, B. spizizenii*, lactic acid bacteria, spore germination, antimicrobial activity.

ملخص البحث

نشاط بكتيريا حمض الاكتيك المعزوله من الطعام ضد نمو خلايا وابواغ البكتيريا العصيه

البكتيريا العصيه هي بكتيريا قادره على تشكيل الابواغ القادره على التسبب في فساد الطعام والتسبب في الامراض للانسان, بكتيريا حمض الاكتيتك قادره على انتاج بعض المركبات لها القدره على تثبيط نمو الخلايا والابواغ البكتيريا العصويه, وكان الهدف من هذه الدراسه عزل بكتيريا حمض الاكتيك من بعض المواد الغذائيه كالدوريان واللبن والبليكان والتاكد من فعاليه هذه البكيتريا ضد انواع مختلفه من البكتيريا العصويه وهي الباسيلوس سيروس, الباسيلوس سبتلوس والباسلوس سبايزيني باستخدام طريقة السبوت والويل . اظهرت النتائج عن طرييقة السبوت ان 45 من عزلة البكتيريا اظهرت نشاطا ضد نو خلايا البكتريا العصويه حيث ان 98% من البكتريا الاكتيك اظهرت نشاط قوي ضد بكتيريا الباسيلوس سيروس و 78% ضد بكتيريا الباسيلوس سباينيزي و51 % ضد بكتيريا الباسيلوس السبتلوس , كما ان الراشح البكتيري اظهر نشاط ضد نمو خلايا البكتيريا العصيه عن طريق طريقة الويل حيث اظهرت النتائج أن 58% من البكتيريا لها نشاط قوي ضد بكتيريا الباسيلوس سيروس و 44% ضد الباسيلوس سبايزيني مقارنة ب 31 % ضد الباسيلوس سبتلوس , نشاطات مختلفه اظهرتها البكتيريا ضد نمو خلايا وابواغ بكتيريا الباسيلوس عند تغير درجة الحموضه ل 4,5,6.5 حيث لوحظ أن الراشح البكتيري له تاثير على نشاط ونمو خلايا الباسيلوس 46.5% ضد الباسيلوس سيروس و 31% ضد الباسيلوس سبتلوس و 37.8% ضد الباسلوس سبايزيني عند ضبط درجة الحموضه على 4 . عزلات البكيتريا من الدوريان والبليكان اظهرت نشاطاً قويا ضد بكتيريا الباسيلوس عند درجة حموضه 5,6.5 : 15.5% ضد الباسيلوس سبتلوس و 20% ضد الباسلوس سيروس و2% ضد الباسيلوس سبايزيني في حين أن الراشح البكتيري من عزلات البكتيريا التي مصدرها اللبن تفقد قدرتها على النشاط عند ضبط درجة الحموضه عند 5,6.5 .ابواغ بكتيريا الباسيلوس تأثرت بواسطة خلايا والراشح الكتيري لبكتيريا حمض الاكتيك , عزلات بكتيريا حمض الاكتيك المعزولة من اللبن والدوريان والبليكان اظهرت نشاطا قويا ضد ابواغ بكتيريا الباسيلوس حيث أن 89% ضد الباسيلوس سبتلوس و75.5% ضد الباسيلوس سيروس و 73.3% ضد الباسيلوس سبايزيني عن طريق طريقة السبوت . على العكس من ذلك أظهر الراشح البكتيري نشاطات مختلفه ضد ابواغ بكتيريا الباسيلوس حيث أن النتائج كانت كالأتي أن 24% ضد الباسيلوس سبتلوس و 29% ضد الباسيلوس سيروس و 15.5% ضد الباسيلوس سبايزيني . أظهر الراشح البكتيري نشاطا قويا ضد ابواغ الباسيلوس عند ضبط درجة الحموضه عند 4 مقارنة بدرجة الحموضه عند 5 و 6.5. حيث أن العزلات المعزولة من الدوريان والبليكان اظهرت نشاطا ضد ابواغ الباسيلوس عند ضبط درجة الحموضه على 5 و 6.5 في حين أن العزلات المعزلة من اللبن لم تظهر أي نشاط ضد أبواغ الباسيلوس عند ضبط درجة الحموضه عند 5 و 6.5.نشاط العزلات أنخفض عندما أختبرت بواسطة أنزيم بروتينيز ك و أرانيز 1. عزلات بكتيريا حمض الاكتيك المعزوله من الدوريان والبليكان كانت عرضه وتتاثر لبعض المضادات الحيوي للالبنسلين,جيتامايسين, الكلورامفينيكول, التتراسيكلين في حين أظهرت مقاومة لفانكومايسين و ستربتومايسين . اشارة هذ الدراسه الى وجود بعض المركبات في الراشح البكتيري لديها القدره على ثنتبيط نمو خلايا وأبواغ الباسيلوس ويمكن أستخدمها في الصناعات الغذائيه كمضافات طبيعيه.

CONTENT PAGE

TABLE OF CONTENT

LIST OF TABLES

LIST OF FIGURES

LIST OF ABBREVIATIONS

BHI	brain heart infusion Broth
BLIS	Bactriocin-like inhibitory substance
$CaCO_3$	Calcium carbonate
CFS	Cell free supernatant
°C	Celsius
CFU	Colony Forming Unit
CO_2	Carbon dioxid
G	Gram
h	Hour
HCL	Hydrochloric acid
H_2O_2	Hydrogen peroxide
LAB	Lactic acid bacteria
µg	Microgram
Mg	Milligram
Ml	milliliter
µl	Microliter
Mm	Millimeter
µm	Micrometer
MRS	de Man Rogosa Sharpe
NaCl	Sodium chloride
NAOH	Sodium Hydroxide
Nm	Nanometer
OD	Optical density
O_2 -	Superoxide
OH-	Hydroxyl
PLA	phenyllactic acid
rpm	Revolution per minute
S.D	standard deviation
Spp.	Species
TGE	Tryptone Glucose Extract broth
U	Unite
UHP	Ultra high Pressure
UTI	Urinary tract infection