فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال دوم، شماره ۵، بهار ۱۳۹۲، صفحه ۱۱- ۲۰
تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۰/۲۵ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۴/۱۵

اثر متابولیت‌های لاکتوباسیل‌های جدا شده از ماست‌های بومی استان چهارمحال و بختیاری علیه باکتری‌های بیماری‌زا

سمیرا ابراهیمی علویجه: کارشناس ارشد باکتری شناسی، دانشگاه شهرکرد، ایران، samira.ebrahimi99@yahoo.com
محمد رضا محزونیه: دانشیار میکروبیولوژی، پژوهشکده بیماری های مشترک انسان و دام، دانشگاه شهرکرد، ایران، mahzounieh@vet.sku.ac.ir *
محسن مبینی دهکردی: استادیار میکروبیولوژی، دانشگاه شهرکرد، ایران، mmobinid@gmail.com

چکیده

مقدمه: به علت اثرات مفید پروبیوتیک‌ها بر سلامت، این باکتری‌ها به شکل روز افزون به مواد لبنی و سایر مواد غذایی افزوده می‌شوند. لاکتوباسیل‌ها[1] از پرکاربردترین باکتری‌ها برای این منظور، هستند. هدف این مطالعه، جداسازی لاکتوباسیل‌های بومی با توانایی پروبیوتیک است.

مواد و روش‌ها: به کمک واکنش گرم و آزمایش کاتالاز، لاکتوباسیل‌ها از میان باکتری‌های جدا شده از ۴۰ نمونه ماست بومی، تفکیک شدند. جدایه‌ها در اسیدیته ۲/۵ به مدت ۲ ساعت قرار گرفتند و با کشت نمونه‌ها و شمارش تعداد کلونی‌ها، توانایی مقاومت به اسید جدایه‌ها ارزیابی شد. سپس، از بین ۱۸ باکتری مقاوم به اسید از طریق روش انتشار در ژل[2] اثر ممانعتی جدایه‌ها روی بیماری‌زاهایی نظیر *اشریشیا کلی*[3] و عامل عفونت‌های سوختگی *پسودوموناس آئروژینوزا*[4] بررسی و نتایج با نتایج سویه‌های تجاری مقایسه شد.

نتایج: نتایج نشان داد بیش‌ترین اثر مهاری علیه عوامل بیماری‌زا به جدایه‌ی S_4 مربوط است که حدود ۸۰ درصد بازدارنده خوب و ۲۰ درصد بازدارنده قوی بودند. نتایج حاصل از این جدایه با نتایج به دست آمده در مورد سویه تجاری *لاکتوباسیلوس گاسری*[5] به‌طور کامل منطبق بود. همچنین کم‌ترین اثر ممانعتی علیه بیماری‌زاها به جدایه‌های (Y_4-Y_5-Y_{11}-Y_{14}-Y_{15}) مربوط بود که همه (۱۰۰ درصد) بازدارنده ضعیف بودند و سایر جدایه‌ها در دسته‌ی بازدارنده خوب قرار گرفتند.

بحث و نتیجه‌گیری: با توجه به افزایش روز افزون مقاومت دارویی بیماری‌زاها، امروزه استفاده از پروبیوتیک‌ها به‌ویژه لاکتوباسیل‌ها به عنوان جایگزین مناسب آنتی‌بوتیک‌ها حائز اهمیت است. باکتری‌های مورد بررسی در این مطالعه، تا حدودی قادر به جلوگیری از رشد بیماری‌زاها بودند اما به منظور بررسی دقیق‌تر بهتر است از روش‌هایی با حساسیت بیشتر نظیر روش دو لایه و MIC[6] نیز استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: پروبیوتیک، باکتری‌های لاکتیک اسید، لاکتوباسیل، فعالیت ضد میکروبی، روش چاهک

---

* نویسنده مسؤول مکاتبات

مقدمه

به‌طور کلی پروبیوتیک[۷] به‌یک اثر طبیعی اشاره دارد. این اصطلاح زمانی به کار می‌رود که دو ارگانیسم با یکدیگر کشت داده شده باشند. در این حالت مواد تولیدی توسط یک ارگانیسم، رشد ارگانیسم دیگر را تحریک یا مهار می‌کند که این مواد را در اصطلاح پروبیوتیک می‌نامند (۱).

پروبیوتیک واژه‌ای یونانی به معنای «برای حیات» است. نخستین بار این علم توسط مچینکوف[۸] در سال ۱۹۰۷ پایه گذاری شد. پس از آن فولر[۹] در سال ۱۹۸۹ پروبیوتیک‌ها را تحت عنوان «مکمل‌های غذایی حاوی میکروب‌های زنده که از طریق تعادل میکروفلور روده‌ای اثرات مفیدی بر سلامت دارند» تعریف کرد (۳).

سالمینن[۱۰] و همکاران در سال ۱۹۹۹ پروبیوتیک‌ها را این گونه تعریف کردند: «فرآورده‌ها یا اجزائی از سلول‌های میکروبی که آثار مفیدی بر سلامت دارند» (۲ و ۳).

متخصصین سازمان کشاورزی و غذای ملل متحد و سازمان بهداشت جهانی[۱۱] در سال ۲۰۰۱، پروبیوتیک‌ها را تحت عنوان «میکروارگانیسم‌های زنده که استفاده کافی از آن‌ها اثرات مفیدی بر سلامت میزبان دارد» تعریف کردند (۴).

امروزه تولید محصولات پروبیوتیک در سطح جهان گسترش یافته است زیرا بیشتر مصرف کنندگان مواد غذایی به افزایش سطح سلامت خود با مصرف این محصولات توجه خاصی دارند. از مهم‌ترین این محصولات، شیر و فرآورده‌های لبنی پروبیوتیکی است. امروزه متخصصین صنایع غذایی و مراکز تحقیقاتی مرتبط، علاقه‌ی زیادی به شناسایی باکتری‌های پروبیوتیک جدید با خواص عملکردی بهتر و مناسب‌تر دارند (۵). از ویژگی‌های عملکردی پروبیوتیک‌ها می‌توان به تعدیل سیستم ایمنی، کاهش کلسترول سرمی، کاهش عفونت‌های گوارشی، کاهش میزان اسهال‌های مزمن مسافرتی و همچنین کاهش میزان سرطان اشاره نمود (۵).

باکتری‌های لاکتیک اسید از مدت‌های طولانی به خاطر نقش در تولید غذاهای تخمیری شناخته شده‌اند. امروزه این محصولات بخشی از رژیم غذایی انسان‌ها را تشکیل می‌دهند. این دسته از مواد غذایی در مقایسه با سایرین دارای مزایایی هستند که از این مزایا می‌توان به تأثیر مفید بر سلامت بشر و همچنین افزایش دوره نگهداری مواد غذایی اشاره نمود (۶).

باکتری‌های لاکتیک اسید[۱۲] و بیفیدوباکتریوم‌ها[۱۳] به‌طور گسترده به عنوان عوامل پروبیوتیک مصرف می‌شوند و علت آن شناخته شدن این باکتری‌ها به عنوان فلور طبیعی در انسان و حیوان است. سابقه دیرین استفاده از این باکتری‌ها و همچنین استفاده عمومی از آن‌ها بیانگر نقش مؤثر این باکتری‌هاست (۷).

گونه‌های متفاوتی از باکتری‌های لاکتیک اسید به عنوان پروبیوتیک معرفی شده اند اما بیش‌ترین گونه‌های معرفی شده به لاکتوباسیل‌ها[۱۴] مربوط می‌باشند.

لاکتوباسیل‌ها، باکتری‌هایی میله ای شکل، گرم مثبت، میکروآئروفیل، فاقد حرکت و اسپور و با واکنش کاتالاز منفی هستند که ترکیب درصد گوانین سیتوزین (C+G) در DNA آن‌ها کمتر از ۵۰ درصد است. این باکتری‌ها به ۴ گروه کلی زیر دسته بندی شده اند:

۱. هومو فرمانتاتیو اجباری[۱۵]
۲. هترو فرمانتاتیو اختیاری[۱۶]
۳. هترو فرمانتاتیو اجباری[۱۷] که گاز تولید می‌کنند
۴. سایر لاکتوباسیل‌ها (۸)

برای آن که یک باکتری به عنوان پروبیوتیک معرفی شود، باید چندین عامل متفاوت ارزیابی شوند که

بررسی میزان بقای باکتری در سیستم گوارش یکی از مهم‌ترین این عوامل است. باکتری پروبیوتیک برای دست‌یابی و تثبیت در روده به عبور از محیط‌های حاوی اسیدیته پایین در معده و املاح صفراوی در روده ملزم هستند. از این رو یکی از نخستین مراحل در انتخاب باکتری پروبیوتیک ارزیابی مقاومت باکتری نسبت به اسید و صفراست (۹). همچنین، توانایی سویه‌ها در مهار رشد باکتری‌های بیماری‌زا نیز می‌تواند عامل دیگری برای انتخاب آن سویه به عنوان پروبیوتیک باشد (۵).

توانایی باکتری‌های لاکتیک اسید در جلوگیری از رشد میکروب‌های ناخواسته ممکن است ناشی از عوامل متعددی مانند تولید اسیدهای آلی مانند استیک اسید، پروپیونیک اسید و فرمیک اسید یا اسیدهای چرب آزاد، آمونیاک، پراکسید هیدروژن، کاهش پتانسیل احیا به ویژه سنتز آنتی‌بیوتیک‌ها و باکتریوسین‌ها باشد که همگی تحت عنوان آنتی‌بیوز[۱۸] تعریف شده اند (۱۰).

با توجه به روش عمل آوری محصولات لبنی در ایران، این انتظار وجود دارد که باکتری‌های پروبیوتیک در این مواد وجود داشته باشند و از آن جایی که این باکتری‌ها از مواد لبنی جدا شده اند، به کارگیری آن‌ها در محصولات لبنی صنعتی با مشکلات کمتری مواجه است. از این رو جداسازی، شناسایی و کاربرد باکتری‌های پروبیوتیک از محصولات لبنی سنتی می‌تواند راهکار مناسبی برای ارائه محصولات پروبیوتیک سنتی ایران و سویه‌های پروبیوتیک بومی با ویژگی‌های عملکردی خاص باشد (۵).

لاکتوباسیل‌ها جزو میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک هستند و با تولید ترکیبات آلی نظیر لاکتیک اسید، هیدروژن پراکسید و استیک اسید و افزایش اسیدیته روده از استقرار بسیاری از باکتری‌های مضر جلوگیری می‌کنند. پروبیوتیک‌ها با کمک به عملکرد سیستم ایمنی بدن باعث افزایش مقاومت در برابر عفونت می‌شوند (۱۰).

باکتری‌های گرم منفی روده ای به ویژه سالمونلا، شیگلا و *اشریشیا کلی* از مهم‌ترین عوامل ایجاد کننده بیماری‌های ناشی از غذا و اسهال در کشورهای در حال توسعه می‌باشند. از طرفی چون مقاومت دارویی در این باکتری‌ها روز به روز در حال افزایش است، امروزه از مهار رقابتی باکتری‌های بیماری‌زا و پروبیوتیک‌ها از جمله باکتری‌های لاکتیک اسید، به ویژه لاکتوباسیل‌ها برای جلوگیری از رشد بیماری‌زاها استفاده می‌شود (۵).

با توجه به اهمیت موضوع، هدف این مطالعه، بررسی توانایی ضد میکروبی لاکتوباسیل‌های مقاوم به اسید وصفرا جدا شده از ماست بومی روستاهای اطراف شهرکرد، در برابر سویه‌های بیماری‌زا روده‌ای شامل: *سالمونلا تایفی موریوم*[۱۹] (PTCC 1709) ، *اشریشیا کلی* (PTCC 1399)، *کلبسیلا پنومونیه*[۲۰] (PTCC 1290) و *پروتئوس ولگاریس*[۲۱] (PTCC 1079)و همچنین عامل اصلی عفونت‌های سوختگی، *پسودوموناس آئروژینوزا* (PTCC 1707) است.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه‌ها

برای این منظور ۴۰ نمونه ماست محلی (تهیه شده به روش غیر صنعتی) در ظرف‌های درب دار استریل جمع‌آوری و طی ۲۴ ساعت در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل شدند.

غنی سازی نمونه‌ها

در این مرحله مقدار یک میلی‌لیتر از نمونه‌های ماست به ۱۰ میلی‌لیتر محیط مغذی و مناسب رشد لاکتوباسیل‌ها یعنی MRS منتقل شد. سپس این محیط‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور حاوی کربن دی اکسید (۱۰ درصد) و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفتند (۸).

غربال انتخابی سویه‌های لاکتوباسیل متحمل اسید

فرآورده‌های لبنی دارای تنوع میکروبی بسیار غنی هستند و جداسازی تک تک باکتری‌ها از این محصولات بسیار وقت گیر است. از این رو با اسیدی کردن محیط می‌توان تا حدود زیادی سویه‌های غیر مقاوم را حذف نمود. به همین منظور، در این مرحله ۵ میلی لیتر از محیط MRS مایع تهیه شده در مرحله غنی‌سازی که حاوی هر یک از جدایه‌ها بود به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. سپس، رسوب حاصل از سانتریفوژ در ۲۰ میلی لیتر محلول بافر نمک فسفات اسیدی (PBS) با اسیدیته ۲/۵ حل شد.

برای تهیه PBS مقادیر ۹ گرم در لیتر NaCl، ۹ گرم در لیتر Na_2HPO_4-$2H_2O$ و ۱/۵ گرم در لیتر KH_2PO_4 در آب مقطر حل و اسیدیته آن توسط کلریدریک اسید یک مولار به کمک دستگاه اسیدیته سنج روی اسیدیته ۲/۵ تنظیم شد (۸ و ۹).

سپس نمونه‌های حل شده در PBS اسیدی، به مدت ۲ ساعت در گرمخانه حاوی کربن دی اکسید (۱۰ درصد) و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

پس از گذشت این مدت دوباره نمونه‌ها در rpm ۴۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ شد. سانتریفوژ نمونه‌ها پس از مرحله‌ی غنی‌سازی و تیمار اسیدی موجب می‌شود که باکتری‌ها حتی با تعداد کم در لایه‌ی پایینی رسوب کرده و همراه مایع رویی از دست نروند.

در پایان، محلول رویی را دور ریخته، رسوب حاصل دو مرتبه با محلول PBS خنثی شستشو داده و سانتریفوژ شد. محلول رویی را دور ریخته، از رسوب زیرین که حاوی باکتری‌های مورد نظر است روی محیط MRS جامد کشت خطی داده شد و در شرایط قبل به مدت ۷۲ ساعت در گرمخانه قرار گرفت. برای اطمینان از خلوص کشت‌های حاصل از کلونی‌های ایجاد شده ۳ تا ۵ بار کشت خطی تهیه شد. نمونه‌های خالص شده از نظر ریخت‌شناسی پس از رنگ آمیزی با روش گرم و آزمون کاتالاز بررسی شدند. در طی مراحل خالص‌سازی به منظور جلوگیری از رشد مخمرها، ۵۰ میکروگرم نیستاتین به محیط MRS افزوده شد. نیستاتین با مهار رشد مخمرها و جلوگیری از تشکیل کلونی‌های پهن آن‌ها روی کلونی‌های ریز باکتری امکان جداسازی بهتر لاکتوباسیل‌ها را فراهم می‌آورد (۹).

در نهایت از بین ۴۰ نمونه ماست، ۵۳ باکتری لاکتیک اسید جداسازی شد که ۳۲ مورد از آن‌ها باسیل‌های گرم مثبت، کاتالاز منفی بوده که به عنوان جنس لاکتوباسیل جداسازی شدند.

پس از غربال‌گری لاکتوباسیل‌های جداسازی شده از نظر مقاومت به اسیدیته معادل ۲/۵ و حضور ۳ درصد املاح صفراوی، ۱۸ جدایه لاکتوباسیل مقاوم به این شرایط شناسایی شد. در انتها خواص ضد میکروبی این جدایه‌ها بررسی شد.

برای کنترل و مقایسه اثر، از سه سویه استاندارد *لاکتوباسیل گاسری* (*ATCC 33323*)، *لاکتوباسیل اسیدوفیلوس* (*PTCC 1643*) و *لاکتوباسیل کازئی* (*PTCC 1608*) نیز در کنار موارد بالا آزمایش شد.

بررسی اثر ضد میکروبی

برای این منظور از روش انتشار در ژل استفاده شد. ابتدا باکتری‌های بیماری‌زای مورد نظر محیط نوترینت مایع کشت داده شدند و تا رسیدن به کدورت لوله شماره ۱ (۰/۵ مک فارلند) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس سویه‌های بیماری‌زا به کمک سوآپ استریل به پلیت‌های حاوی محیط مولر هینتون آگار[۲۲] (MHA) شرکت مرک به‌طور یکنواخت تلقیح شدند. با استفاده از پیپت پاستور بر روی سطح محیط کشت چاهک‌هایی با فواصل و قطر یکسان ایجاد شدند.

لاکتوباسیل‌های مورد بررسی، جدا شده از مواد لبنی بومی که دارای مقاومت نسبت به اسیدیته پایین بودند قبل از افزودن به چاهک‌ها در محیط MRS[۲۳] مایع شرکت مرک به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و حضور ۱۰ درصد کربن دی اکسید کشت داده شدند. هنگامی که کدورت محیط به اندازه کدورت لوله شماره ۱ (۰/۵ مک فارلند) رسید، روی نمونه پارافین ریخته شد و محیط‌ها برای ۴ روز در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند (این زمان، زمان مناسب برای ایجاد مواد ضد میکروبی است). سپس پارافین را خارج کرده و محیط‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. رسوب را دور ریخته و محلول رویی را که حاوی مواد ضد میکروبی است، به میزان ۱۰۰ میکرولیتر در شرایط استریل به چاهک‌ها انتقال داده و برای اطمینان از جذب آن‌ها در آگار محیط، پلیت‌ها به مدت ۲ ساعت در یخچال نگهداری و سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. در نهایت، قطرهاله‌ی عدم رشد بر حسب میلی‌متر اندازه گیری شد و بر اساس اندازه قطرهاله‌ها فعالیت ضد میکروبی سویه‌های لاکتوباسیل تعیین شد. به منظور افزایش دقت، هر آزمون با ۳ بار تکرار انجام و میانگین قطر هاله‌ها ثبت شد. بر این اساس جدایه‌های لاکتوباسیل به سه دسته تقسیم شدند: (۱۱)

الف- قطرهاله بیش از ۱۶ میلی‌متر: بازدارنده قوی (strong +++).

ب- قطرهاله‌ی ۱۱ تا ۱۵ میلی‌متر: بازدارنده خوب (good ++)

ج- قطرهاله‌ی ۵ تا ۱۰ میلی‌متر: بازدارنده ضعیف (weak +).

مواردی که هاله ی عدم رشد نشان ندادند به عنوان منفی (- negative) در نظر گرفته شدند.

نتایج حاصل به کمک آزمون t مستقل و آزمون Kolmogrov-Smirnov در سطح اطمینان ۹۵ درصد با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۵ تجزیه و تحلیل شدند (۵ و ۱۱).

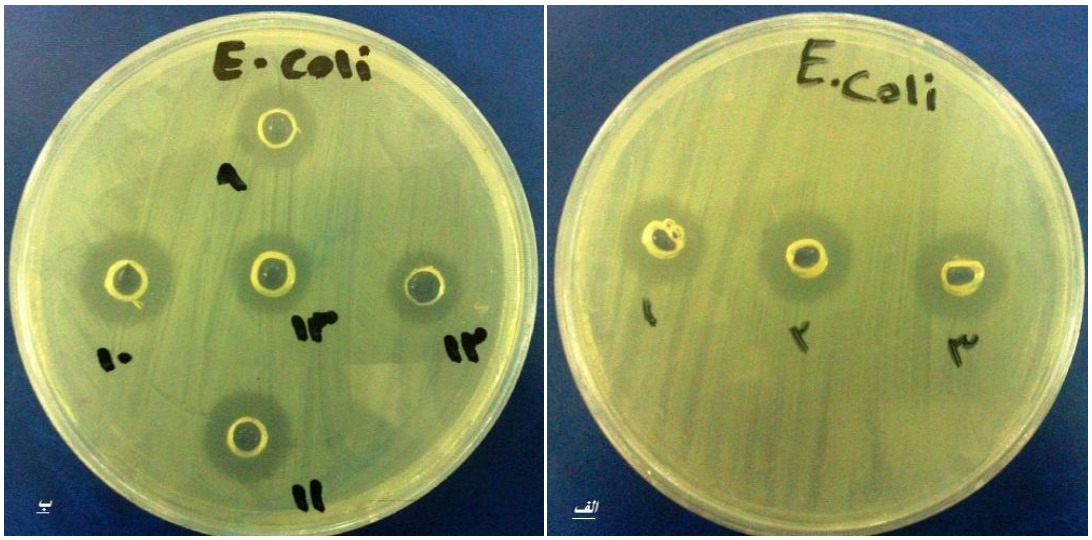
نتایج

در این مطالعه، اثر مهاری ۱۸ جدایه‌ی مقاوم به اسید نسبت به ۵ سویه باکتری بیماری‌زا با نتایج حاصل از سویه‌های تجاری مقایسه شد.

بر اساس قطرهاله‌ی عدم رشد، جدایه‌های لاکتوباسیل به سه دسته بازدارنده‌ی ضعیف، خوب و قوی تقسیم شدند. نتایج نشان داد که بیش‌ترین اثر مهاری علیه عوامل بیماری زا به جدایه‌ی (S_4) مربوط است که برای تمام سویه‌های بیماری‌زا به شکل (۸۰ درصد) بازدارنده قوی و (۲۰ درصد) بازدارنده‌ی خوب بود. نتایج حاصل از این جدایه با نتایج به دست آمده در مورد سویه تجاری *لاکتوباسیلوس گاسری* به‌طور کامل منطبق بود. همچنین کم‌ترین اثر ممانعتی علیه باکتری‌های بیماری‌زا به جدایه‌های (Y_4-Y_5-Y_{11}-Y_{14}-Y_{15}) مربوط بود که همه (۱۰۰ درصد) بازدارنده ضعیف بودند. سایر جدایه‌ها بیشتر در دسته‌ی بازدارنده خوب قرار گرفتند.

از بین سویه‌های بیماری‌زا، حساس‌ترین باکتری نسبت به جدایه‌ها، باکتری *پسودوموناس آئروژینوزا* و مقاوم ترین آن‌ها باکتری‌های *کلبسیلا پنومونیه* و *سالمونلا تایفی‌موریوم بودند.*

نتایج حاصل از این بررسی در جدول ۱ آمده است.



شکل ۱- (الف) تصویرهاله‌های عدم رشد در سویه‌های استاندارد۱: *L.casei* ۲:*L.gasseri* ۳-:*L.acidophilus*

(ب) جدایه‌های لاکتوباسیل ۹: جدایه Y_3، ۱۰: جدایه Y_4، ۱۱: جدایه Y_5، ۱۲: جدایه Y_{10}، ۱۳: جدایه Y_{11}

جدول ۱- میانگین قطرهاله‌های عدم رشد (میلی‌متر) اطراف چاهک‌های حاوی عصاره‌ی لاکتوباسیل‌ها و درصد بازدارندگی آن‌ها

نام و کد جدایه لاکتوباسیل	گونه باکتری بیماری‌زا					درصد بازدارندگی		
	اشریشیا کلی	*سالمونلا تایفی موریوم*	*کلبسیلا پنومونیه*	*پسودوموناس آئروژینوزا*	*پروتئوس ولگاریس*	بازدارنده ضعیف $X \leq ۱۰$	بازدارنده خوب $۱۱ \leq X \leq ۱۵$	بازدارنده قوی $X \geq ۱۶$
L.gasseri	۱۴	۱۶	۱۳	۱۳	۱۴	–	۸۰	۲۰
L.casei	۱۳	۱۲	۱۰	۱۰	۱۱	۴۰	۶۰	–
L.acidophilus	۱۴	۱۳	۱۳	۱۲	۱۳	–	۱۰۰	–
S_3	۱۲	۱۴	۱۰	۱۴	۱۵	۲۰	۸۰	–
S_4	۱۴	۱۵	۱۲	۱۷	۱۱	–	۸۰	۲۰
S_5	۱۴	۱۲	۱۳	۱۳	۱۴	–	۱۰۰	–
S_6	۱۲	۱۰	۱۰	۱۲	۱۲	۴۰	۶۰	–
S_7	۱۰	۸	۷	۱۱	۹	۸۰	۲۰	–
S_8	۱۲	۱۱	۱۱	۱۳	۱۱	–	۱۰۰	–
S_9	۱۴	۱۴	۱۲	۱۱	۱۵	–	۱۰۰	–
S_{10}	۱۳	۱۰	۱۳	۱۳	۱۴	۲۰	۸۰	–
S_{11}	۱۱	۱۳	۱۱	۱۳	۱۲	–	۱۰۰	–
S_{12}	۱۳	۱۱	۱۱	۱۲	۱۴	–	۱۰۰	–
Y_3	–	–	–	۱۰	۱۱	۸۰	۲۰	–
Y_4	۱۰	۱۰	–	۹	–	۱۰۰	–	–
Y_5	۹	۹	–	۸	–	۱۰۰	–	–
Y_{10}	۱۱	۱۰	۷	۱۰	–	۸۰	۲۰	–
Y_{11}	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	–	۱۰۰	–	–
Y_{14}	۹	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰۰	–	–
Y_{15}	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰۰	–	–
Y_{21}	۹	۸	–	۱۱	۱۰	۸۰	۲۰	–

بحث و نتیجه گیری

باکتری‌های گرم منفی روده‌ای به ویژه سالمونلا، شیگلا و *اشریشیا کلی* از مهم‌ترین عوامل ایجاد کننده بیماری‌های ناشی از غذا و اسهال در کشورهای در حال توسعه می‌باشند. از طرفی چون مقاومت دارویی در این باکتری‌ها روز به روز در حال افزایش است، امروزه از مهار رقابتی باکتری‌های بیماری‌زا و پروبیوتیک‌ها از جمله باکتری‌های لاکتیک اسید به‌ویژه لاکتوباسیل‌ها برای جلوگیری از رشد باکتری‌های بیماری‌زا استفاده می‌شود (۵).

به همین منظور در این پژوهش به بررسی فعالیت ضد میکروبی لاکتوباسیل‌های جدا شده علیه ۴ عامل بیماری‌زای روده‌ای و یک عامل شایع عفونت‌های سوختگی، *پسودوموناس آئروژینوزا*، پرداخته شد. نتایج حاصل نشان داد اکثر جدایه‌ها به خوبی توانایی مهار رشد سویه‌های بیماری‌زا را داشته اند. نتایج حاصل از این بررسی تشابه نزدیکی با نتایج حاصل از فعالیت سایر محققین داشت. برای مثال مطالعات تاج آبادی و همکاران در سال ۱۳۸۷ نشان داد که ۶ سویه از ۲۲ سویه مورد بررسی در روش چاهک، قادرند مانع از رشد عوامل بیماری‌زا شده وهاله‌ی عدم رشد ایجاد نمایند ولی اکثر سویه‌ها در روش دو لایه قادر به مهار سویه‌های بیماری‌زا بودند و درصد بازدارندگی آن‌ها بین ۲۰ تا ۸۰ درصد متغییر بود که با نتایج بدست آمده از این پژوهش مشابهت دارند (۸).

در مطالعه نوروزی و همکاران در سال ۲۰۰۰ نشان داده شد که لاکتوباسیل‌های جدا شده از حفره دهانی دارای اثر بازدارندگی بر روی *اشریشیا کلی* بوده ولی روی سالمونلا و شیگلا دارای اثر مهاری ضعیف و یا فاقد اثر مهاری بودند. در صورتی که اکثر جدایه‌های مورد آزمایش در این مطالعه به جز جدایه‌ی Y_3 از رشد سالمونلا جلوگیری کردند (۱۰).

در بررسی‌های کیائی و همکاران در سال ۱۳۸۵ مشخص شد ۵۹/۳ درصد لاکتوباسیل‌ها و ۵۲ درصد لاکتوکوک‌ها قادرند از رشد باکتری‌های بیماری‌زا جلوگیری کنند (۱۲).

ریپامونتی[۲۴] و همکاران در سال ۲۰۱۱ توانایی ضد میکروبی ۳ سویه جدا شده از مدفوع گاو را علیه عوامل بیماری‌زا شامل: *اشریشیا کلی* ATCC 25922 و *سالمونلا تایفی موریوم* ATCC 14028 و *لیستریا مونوسایتوژنز*[۲۵] ATCC7644 بررسی کردند. آن‌ها دریافتند دو باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* زیر گونه‌ی *پاراکازئی*[۲۶] و *لاکتوباسیلوس انیمالیس*[۲۷] اثر مهاری مشخصی روی این عوامل بیماری‌زا دارند و حساس‌ترین سویه بیماری‌زا در مقابل این باکتری‌ها *لیستریا مونوسایتوژنز* است. لاکتوباسیل‌های جدا شده در این مطالعه نیز دارای اثر مهاری خوبی روی سویه‌های بیماری‌زا *اشریشیا کلی* و *سالمونلا تایفی موریوم بودند* (۱۳).

تاج آبادی و همکاران در سال ۱۳۸۸ به بررسی ویژگی‌های آنتاگونیسمی لاکتوباسیل‌های جدا شده از مواد لبنی بومی روی عوامل بیماری‌زای روده‌ای نظیر *اشریشیا کلی*، *لیستریا اینوکوا*[۲۸]، *یرسینیا اینتروکولیتیکا*[۲۹]، *لیستریا مونوسایتوژنز* و *استافیلوکوکوس اورئوس*[۳۰] با دو روش دو لایه و ایجاد چاهک پرداختند و اعلام داشتند که در روش دو لایه تمامی‌سویه‌ها تا حدودی توانایی مهار رشد باکتری‌های بیماری‌زا را دارند و در صد بازدارندگی آن‌ها بین ۲۰ تا ۱۰۰ درصد متغییر است. اما در روش چاهک عصاره تعداد محدودی از باکتری‌ها این توانایی را داشته و تنها یک سویه قادر به مهار رشد

لیستریا مونوسایتوژنز بوده است در حالی که در مطالعه حاضر بیشتر جدایه‌های لاکتوباسیل با روش چاهک ایجاد هاله‌ی عدم رشد نموده و مانع از رشد سویه‌های بیماری‌زا شدند (۵).

اشلینگر و لوک[۳۱] سویه‌های مختلف *لاکتوباسیل ساکی*[۳۲] *را* از نظر توانایی مهار رشد باکتری‌ها بیماری‌زا بررسی کردند. نتایج نشان داد باکتری‌هایی که در روش دو لایه دارای اثر مهاری بودند هیچکدام در روش چاهک فعالیت مهاری از خود نشان ندادند. با وجود این پس از افزایش غلظت مایع رویی، ۶ سویه از ۱۹ سویه روی محیط آگار هاله عدم رشد ایجاد نمودند (۱۴).

در بررسی برومبرگ[۳۳] و همکاران در سال ۲۰۰۴، ۶۱ درصد از باکتری‌های لاکتیک اسید جدا شده از فرآورده‌های تخمیری گوشتی، فعالیت ضد میکروبی در روش ساندویچی (روشی شبیه روش دو لایه) داشتند. از این تعداد تنها ۳۱ در صد قادر به مهار رشد باکتری‌های بیماری‌زا روی محیط بودند (۱۵).

با توجه به گسترش مصرف انواع افزودنی‌ها در مواد غذایی و افزایش چشمگیر تولیدات جهانی این فرآورده‌ها، به راحتی می‌توان حجم و میزان دارو و مواد شیمیایی که از این طریق به عنوان یک آلاینده، محیط زیست را تهدید می‌کند و سلامت مصرف کنندگان این قبیل محصولات را به مخاطره می‌اندازد، برآورد نمود.

بر اساس گزارشات موجود افزایش روز افزون ناهنجاری‌های مادرزادی، بیماری‌های مزمن، عدم اثر بخشی آنتی‌بیوتیک‌ها، افزایش پدیده‌ی مقاومت میکروبی و دیگر عارضه‌ها که به عنوان معضلات بهداشتی کنونی در جوامع بشری یاد می‌شود، به مصرف همین مواد نسبت داده شده است. بنابراین، داشتن انواعی از افزودنی‌ها که ضمن حفظ ویژگی‌های مطلوب، فاقد تبعات زیان بار بهداشتی و زیست محیطی باشند مورد توجه پژوهشگران سرتاسر جهان قرار دارد.

بنابراین، در این مطالعه و سایر مطالعات انجام شده در این زمینه به ارزیابی توانایی باکتری‌های مولد لاکتیک اسید به ویژه لاکتوباسیل‌ها به عنوان افزودنی‌های پروبیوتیکی در صنایع غذایی پرداخته شده است و نتایج حاصل بیانگر این حقیقت است که بسیاری از این باکتری‌ها علاوه بر بی‌ضرر بودن برای مصرف کننده دارای اثرات مفید بر سلامتی آن‌ها نیز می‌باشند. امید است با تکمیل بیشتر این مطالعه و مطالعات مشابه بتوان برخی از سویه‌های جدا شده از مواد لبنی سنتی ایران را به عنوان سویه‌های بومی با توانایی پروبیوتیکی معرفی کرده و در صنعت مواد غذایی و همچنین فرآورده‌های دامی استفاده تجاری کرد.

References

(1) Tannock GW. Probiotic properties of lactic-acid bacteria: plenty of scope for fundamental R & D. *Trends Biotechnol*, 1997; 15 (7) :270-4.

(2) Kaur IP, Chopra K, Saini A. Probiotics: potential pharmaceutical applications. *Eur J Pharm Sci*, 2002; 15 (1) :1-9.

(3) Mirzaei H. An introduction to probiotics and application of probiotics in human health. *J Tabriz Azad Univer*, 2004; 1:2-1.

(4) Gaggia F, Di Gioia D, Baffoni L, Biavati B. The role of protective and probiotic cultures in food and feed and their impact in food safety. *Trends Food Sci Tech*, 2011; 22: 58-66.

(5) Tajabadi M, Ebrahimi M, Hejazi A, Ghaffari R. The ability of acid and bile resistant Lactobacillus antagonism isolated from dairy products. *J Med Sci Univer Arak*, 2009; 47: 27-17.

(6) Hammes WP, Tichaczek PS. The potential of lactic acid bacteria for the production of safe and wholesome food. *Z Lebensm UntersF A*, 1994; 198 (3) : 193-201.

(7) Tsai CC, Liang HW, Yu B, Hsieh CC, Hwang CF, Chen MH, et al. The relative efficacy of different strain combinations of lactic acid bacteria in the reduction of populations of Salmonella enterica Typhimurium in the livers and spleens of mice. *FEMS Immunol Med Mic*, 2011;63 (1) :44-53.

(8) Tajabadi M, Ebrahimi M, Hejazi A, Nouri A. Characterization of probiotic lactobacilli isolated from fermented dairy products Lighvan. *Sci J Teach Training Univer*, 2007; 4: 941-52.

(9) Tajabadi M, Ebrahimi M, Hejazi A, Jaffari P. Selective screening of potential probiotic lactobacilli from fermented dairy products locally. *Life Sci J IAU Zanjan*, 2009; 2: 47-51.

(10) Norouzi J, Khanafari A, Biglari N. Isolation and identification of lactic acid bacteria in their mouths and inhibitory effects on some pathogenic intestinal bacteria. *Microb World J*, 2008; 1: 29-38.

(11) Pan X, Chen F, Wu T, Tang H, Zhao Z. The acid, bile tolerance and antimicrobial property of *Lactobacillus acidophilus*. *Food Control*, 2009; 20 (6) : 598-602.

(12) Kiai A, A. MN, Samie Adab H. Antagonistic effect of lactic acid bacteria isolated from us against pathogenic bacteria. *J Med Sci Univer Gorgan*, 2006; 8: 28-33.

(13) Ripamonti B, Agazzi A, Bersani C, De Dea P, Pecorini C, Pirani S, et al. Screening of species-specific lactic acid bacteria for veal calves multi-strain probiotic adjuncts. *Anaerobe*, 2011; 17 (3) : 97-105.

(14) Schillinger U, Lücke FK. Antibacterial activity of Lactobacillus sake isolated from meat. *Appl Environ Microbiol*. 1989; 55 (8) : 1901-6.

(15) Bromberg R, Moreno I, Zaganini CL, Delboni RR, Oliveira J. Isolation of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from meat and meat products and its spectrum of inhibitory activity. *Braz J Microbiol.*, 2004; 35 (1-2) : 137-44

---

[1]. Lactobacillus
[2]. Well-Diffiusion
[3]. *E.coli*
[4]. *Pseudomonas aeruginosa*
[5]. *Lactobacillus gasseri*
[6]. Minimal inhibition concentration
[7]. Probiotic
[8]. Metchinikoff
[9]. Fuller
[10]. Salminen
[11]. Food and Agricalture Organization of United Nation / World Health Organization (FAO/WHO)
[12]. Lactic Acid Bacteria (LAB)
[13]. Bifidobacterium
[14]. Lactobacillus
[15]. Obligately homofermentative lactic acid bacteria
[16]. Facultatively heterofermentative lactic acid bacteria
[17]. Obligately heterofermentative lactic acid bacteria
[18]. Antibios
[19]. *Salmonella typhimurium*
[20]. *Klebsiella pneumoniae*
[21]. *Proteus vulgaris*
[22]. Mueller Hinton Agar
[23]. Man Rogosa and Sharpe
[24]. Ripamonti
[25]. *L.monocytogenes*
[26]. *L.casei subsp. paracasei*
[27]. *L.animalis*
[28]. *Listeria innocua*
[29]. *Yersinia introlitic*
[30]. *Staphylococcus aureus*
[31]. Schillinger & Lucke
[32]. *L.sake*
[33]. Bromberg

Effects of metabolites of Lactobacilli isolated from local yoghurts in Chahrmahal va Bakhtiary on pathogenic bacteria

Samira Ebrahimi Alavijeh
M.Sc of Bacteriology, Shahrekord University, Iran, samira.ebrahimi99@yahoo.com
Mohammadreza Mahzounieh *
Associate Professor of Microbiology, Research Institute of Zoonotic Diseases, Shahrekord University, Iran, mahzounieh@vet.sku.ac.ir †
Mohsen Mobini Dehkordi
Assistant Professor of Microbiology, Shahrekord University, Iran, mmobinid@gmail.com

Abstract

Introduction: Probiotics have some beneficial effects on health so these microorganisms are added to dairy products and other foods as well. Lactobacillus bacteria are the most commonly used for this purpose. The aim of this study was to find native Lactobacillus bacteria which has the potentiality for using as probiotic.

Materials and methods: For isolating lactobacilli, gram strain reaction and catalase test were performed on separated bacteria from 40 local yoghurt samples: after isolating, the acid resistance ability of isolates were evaluated by placing isolates in pH=2.5 for 2 hours and culturing samples on medium and colony counts. Then, among 18 acid resistant bacteria, by gel diffusion method the inhibitory effect of isolates on pathogens bacteria such as *E.coli* and *Pseudomonas aeruginosa* were investigated. The results were compared to the results of investigated commercial strains.

Results: The results revealed that S_4 isolate had the most inhibitory effect, it showed %80 good-inhibitory and %20 strong-inhibitory effect on pathogenic bacteria, which were completely consistent with results for commercial *Lactobacillus gasseri* strain. Also, the lowest inhibitory effect against pathogens was related to (Y_4-Y_5-Y_{11}-Y_{14}-Y_{15}) isolates that all of them had weak-inhibitory effect on pathogens. Other strains were classified in good-inhibitor group.

Discussion and conclusion: Considering daily increasing of drug resistance relating to pathogenic bacteria, today, the use of probiotics, especially lactobacilli as an appropriate alternative of antibiotics is important. The investigated bacteria in this study were able to inhibit pathogens's growth to some extent, but for investigating the results more accurately, some methods with more sensitivity, for instance, two layers method and MIC method can be used as well.

Key words: Probiotics, lactic acid bacteria, lactobacilli, Antimicrobial activity, Gel diffusion method

* Corresponding Author
Received: January 14, 2013 / **Accepted:** July 6, 2013