مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۷ – شماره ۳ – پاییز ۱۳۹۲

Journal homepage: www.ijmm.ir

ارزیابی فعالیت ضد باکتری باکتری‌های اسیدلاکتیک جداشده از پنیر سنّتی کردی در مقایسه با سویه‌های تجاری

فرشته تفنگ سازان[۱]، فخری شهیدی[۱]، سید علی مرتضوی[۱]، الناز میلانی[۲]، زرین اسحاقی[۲]

۱. گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۲. جهاد دانشگاهی واحد مشهد، مشهد، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت:۱۳۹۲/۰۴/۱۰

پذیرش:۱۳۹۲/۰۷/۱۰

انتشار آنلاین:۱۳۹۳/۰۲/۱۵

موضوع:

باکتری شناسی پزشکی

IJMM 1392; 7(3): P 34-41

نویسنده مسئول:

فرشته تفنگ‌سازان

گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

تلفن: ۰۲۱۲۲۸۹۱۸۹۰

پست الکترونیک:

f.tofangsazan@gmail.com

چکیده

زمینه و اهداف: اهمیت تأثیرات سودمند سلامتی باکتری های لاکتیکی بومی در انسان، به ویژه اثر ممانعت کنندگی از رشد میکروارگانیسم های بیماری زا، همواره از دیرباز مطرح بوده است. هدف از این بررسی، ارزیابی توانایی ضد باکتری باکتری های اسیدلاکتیک جداسازی شده از فراورده پنیر سنّتی کردی بر عوامل باکتریایی بیماری زا است.

مواد و روش کار: در این مطالعه، ابتدا بخشی از پالیده کشت باکتری های اسیدلاکتیک جداسازی شده از نمونه پنیر سنّتی کردی تحت تیمار حرارتی و خنثی‌سازی با سود قرار گرفت و سپس خاصیت ضد باکتری آن‌ها با استفاده از روش چاهک (*Well Diffusion Agar*) و دیسک (*Disk Diffusion Agar*) بررسی شد. به علاوه، کمترین غلظت بازدارندگی (*MIC*) پالیده و خاصیت تجمعی (*Coaggregation*) باکتری های اسیدلاکتیک بر ضد باکتری های پاتوژن تعیین شد. به منظور کاهش خطا هر آزمایش سه بار تکرار گردید.

یافته‌ها: مطابق با نتایج، باکتری‌های اسیدلاکتیک جداشده از پنیر کردی در مقایسه با سویه‌های تجاری توان ضد باکتری خوبی را در مقابل باکتری‌های بیماری‌زا نشان دادند. طی این مطالعه، حرارت دادن پالیده تأثیری در کاهش و یا افزایش خاصیت ضد باکتری نداشت اما تیمار با سود خاصیت ضد میکروبی را به صفر رساند. همچنین، نتایج حاصل از کمترین غلظت بازدارندگی، تفاوت معنی‌داری را بین سویه‌های بومی و سویه های تجاری نشان نداد و باکتری‌های اسیدلاکتیک بومی خاصیت تجمعی قابل قبولی را در مقابل باکتری‌های بیماری‌زا نشان دادند.

نتیجه‌گیری: با توجه به اینکه باکتری‌های اسیدلاکتیک بومی و متابولیت های تولیدی آن‌ها در این پژوهش توانستند از رشد باکتری‌های بیماری‌زا جلوگیری کنند، این امر نقش مثبت این دسته از باکتری ها در سلامت انسان را به‌خوبی نشان داده و درنتیجه استفاده بیشتر از آن‌ها به‌عنوان عوامل ضد میکروبی طبیعی توصیه می‌شود.

کلمات کلیدی: *باکتری‌های اسیدلاکتیک، پنیر سنتی کردی، فعالیت ضد باکتری، پالیده کشت، باکتری‌های بیماری‌زا.*

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

پروبیوتیک ها مکمل‌های غذایی میکروبی زنده می‌باشند که از طریق بهبود توازن میکروب‌های روده‌ای دارای اثر مفید برای مصرف‌کننده هستند (۱). این گروه از باکتری‌ها در قسمت‌های مختلف بدن به‌ویژه دهان، دستگاه گوارش و دستگاه ادراری-تناسلی نقش مهمی در بازدارندگی عفونت دارند (۲). از میان میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک، باکتری‌های اسیدلاکتیک به‌عنوان مهم‌ترین گروه شناخته‌شده‌اند. باکتری‌های اسیدلاکتیک مکمل-های غذایی هستند که روی میزبان تأثیرات سودمندی داشته و به تعادل فلور میکروبی روده کمک می‌کنند. باکتری های اسیدلاکتیک گرم مثبت، فاقد اسپور، کاتالاز منفی و محصول

نهایی از تخمیر قند توسط آن‌ها اسیدلاکتیک می‌باشد. این باکتری‌ها اولین بار از شیر جداسازی شدند و به صورت گسترده به عنوان کشت آغاز گر در صنایع لبنی، گوشت، سبزی‌ها و غلات به کار می‌روند (۲، ۳). امروزه استفاده از باکتری‌های اسیدلاکتیک و متابولیت‌های ضد میکروبی آن‌ها در پیشگیری از فساد فراورده‌های غذایی و افزایش زمان ماندگاری به ویژه در فراورده‌هایی که غنی از مواد مغذی و ویتامین هستند بسیار رایج شده است. همچنین، با افزایش مقاومت پادزیستی و عوارض‌های ناشی از مصرف داروهای شیمیایی استفاده از درمان‌های طبیعی جایگزین ضروری به نظر می‌رسد (۴). باکتری‌های اسیدلاکتیک علاوه بر اینکه قادر به کاهش میکروارگانیسم‌های بیماری زا و عامل فساد هستند، می‌توانند متابولیت‌های تولیدی و توکسین های احتمالی تولیدشده توسط آن‌ها را نیز بی‌اثر کنند. فعالیت ضد میکروبی این باکتری‌ها ناشی از عوامل گوناگون از جمله تولید اسیدهای آلی (اساساً اسیدهای لاکتیک و استیک)، باکتریوسین، پراکسید هیدروژن، دی استیل، استالدئید و آمونیاک می‌باشد (۵).

مطالعات انجام‌شده بیشماری تأییدکننده نقش مثبت پروبیوتیکی از جمله فعالیت ضد میکروبی باکتری‌های اسیدلاکتیک در مهار عوامل بیماری زا است. در این تحقیق باکتری‌های مورد بررسی، باکتری‌های اسیدلاکتیک و متعلق به جنس لاکتوباسیلوس می‌باشند. لاکتوباسیلوس‌ها، جزء فلور طبیعی دستگاه گوارش و مواد غذایی تخمیر شده هستند و کاندیداهای خوبی برای پروبیوتیک بودن محسوب می‌شوند (۶، ۷)؛ بنابراین، هدف از این مطالعه بررسی توانایی ضد میکروبی دو سویه‌ی *Lactobacillus casei* (059, 032)، یک سویه‌ی RMS3-1 *Lactobacillus paracasei* و یک نژاد از WCFS1 *Lactobacillus plantarum* جداسازی شده از پنیر سنّتی کردی بر ضد باکتری‌های بیماری‌زا در مقایسه با سویه‌های تجاری هست.

مواد و روش‌ها:

این پژوهش در زمستان سال ۱۳۹۱ در دانشکده کشاورزی گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد. طی این بررسی، فعالیت ضد باکتری دو سویه‌ی *Lactobacillus casei* (059, 032)، یک سویه‌ی *Lactobacillus paracasei* RMS3-1 و یک نژاد از *Lactobacillus plantarum* WCFS1 جداسازی شده از پنیر سنّتی کردی مقایسه گردید. این سویه‌ها جهت فعال‌سازی، در محیط کشت MRS مایع به مدت ۲۴ ساعت کشت شدند و سپس در دمای ۳۷ درجه‌ی سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند. باکتری‌های بیماری‌زای مورد نظر شامل *Escherichia coli* O157 H7، *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853، *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 و *Bacillus cereus* ATCC 10876 در محیط کشت مولر هینتون مایع در دمای ۳۷ درجه ی سلسیوس به مدت ۱۸ ساعت فعال‌سازی شده اند.

تهیه‌ی پالیده (Cell Free Culture Supernatant) کشت باکتری‌های اسیدلاکتیکی

سویه‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک در ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت MRS مایع کشت و در دمای ۳۷ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. برای جداسازی سلول‌های باکتری، کشت‌های انجام‌گرفته به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سلسیوس با دور ۴۰۰۰ سانتریفوژ شدند. سپس مایع رویی جدا گردید و از فیلتر باکتریایی ۰/۲ میکرومتر جهت اطمینان از عدم وجود سلول عبور داده شد (۸). پالیده به دست آمده برای هر باکتری به سه قسمت تقسیم شد: یک قسمت به عنوان کنترل استفاده شد، pH یک قسمت با کمک سود ۱ نرمال به ۷ رسانیده شد و یک قسمت هم تحت حرارت ۱۰۰ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفت.

بررسی فعالیت ضد میکروبی به روش انتشار در آگار

باکتری‌های پاتوژن ابتدا در محیط کشت مولر هینتون مایع به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سلسیوس گرمخانه-گذاری شدند. سپس ۱ میلی‌لیتر از محیط مایع حالت Cfu/ml ۳×۱۰^{۸} از باکتری مورد نظر برداشته و با استفاده از روش" pour plate" به پلیت حاوی نوترینت آگار با دمای ۴۵ درجه‌ی سلسیوس اضافه گردید. پس از سرد شدن محیط با کمک پیپت پاستور سترون روی محیط چاهک‌هایی با قطر ۵ میلی‌متر بافاصله‌ی ۳۰ میلی‌متر از یکدیگر و از بدنه‌ی پلیت ایجاد کرده و ۸۰ میکرولیتر از پالیده تیمارهای مختلف در پلیت‌های حاوی باکتری‌های مورد آزمایش به داخل چاهک‌های ایجادشده ریخته

شد. برای جذب محلول به داخل محیط، پلیت‌ها به مدت ۲ ساعت در دمای ۴ درجه‌ی سلسیوس قرار گرفتند و متعاقباً پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۱۸ ساعت نگهداری شدند. سپس قطر هاله‌ی بازدارنده رشد ایجادشده توسط باکتری‌های اسیدلاکتیکی علیه هر یک از باکتری‌های بیماری‌زا با استفاده از خط کش میلی‌متری، اندازه‌گیری شد (**۸، ۹**).

بررسی فعالیت ضد میکروبی به روش دیسک

ابتدا دیسک‌های کاغذی به قطر ۵ میلی‌متر در پالیده باکتری‌های اسیدلاکتیک به مدت ۵ دقیقه غوطه‌ور شد. در مرحله بعد، دیسک‌ها در دمای ۳۷ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۴ ساعت قرار داده شدند تا کاملاً خشک شوند. دیسک‌های حاوی پالیده در فواصل معین ۳۰ میلی‌متر از یکدیگر روی سطح پلیت حاوی کشت باکتری شاخص قرار گرفتند. سپس پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۱۸ ساعت نگهداری شدند. پس از اتمام این زمان، قطر هاله‌ی بازدارنده تشکیل‌شده با استفاده از خط کش میلی‌متری اندازه‌گیری شد (**۸، ۹**).

تعیین کمترین غلظت بازدارندگی(MIC)

پالیده باکتری‌های اسیدلاکتیک تهیه‌شده توسط بافر فسفات به رقت‌های مختلف رسانیده شد. سپس،۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت به درون چاهک‌های ایجادشده در سطح پلیت‌های حاوی میکروب‌های بیماری‌زا تزریق گردید. پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۱۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. پس از اتمام ۱۸ ساعت، رقتی که حداقل هاله‌ای به قطر ۲ میلی‌متر ایجاد کرده بود، به عنوان کمترین غلظت در نظر گرفته شد و با استفاده از روش تودورو و دیکس (۲۰۰۵)، به صورت AU/ml گزارش شد. لازم به ذکر است که هر واحد AU معکوس بیش‌ترین غلظتی می‌باشد که اثر بازدارندگی دارد (**۹**).

بررسی خاصیت تجمعی (Coaggregation)

سلول‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک و بیماری زا پس از کشت ۲۴ ساعته به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سلسیوس با دور ۴۰۰۰ سانتریفوژ و جداسازی شده و دو بار توسط بافر فسفات شستشو داده شدند و سپس در همین بافر قرار گرفتند. مخلوطی از حجم‌های مساوی از سوسپانسیون هر کدام از باکتری‌های اسیدلاکتیک و سوسپانسیون باکتری بیماری‌زای مورد نظر تهیه و در دمای ۳۷ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۴ ساعت نگهداری شد. متعاقباً، جذب سوسپانسیون‌ها در ۶۰۰ نانومتر خوانده شد و سپس مطابق رابطه‌ی زیر میزان خاصیت تجمعی محاسبه گردید.

$$[(AP + Alac)/2 – (Amix)/(AP+ Alac)/2] *100$$

بطوریکه AP برابر با جذب سوسپانسیون باکتری بیماری‌زا، Alac جذب سوسپانسیون باکتری اسیدلاکتیک و Amix جذب مخلوط سوسپانسیون باکتری اسیدلاکتیک و بیماری‌زا پس از ۴ ساعت می‌باشد (**۱۰**).

آنالیز آماری

به منظور کاهش خطا، هر آزمایش سه بار تکرار شد. مقایسه‌ی میانگین‌ها توسط آزمون‌های Anova و دانکن با استفاده از نرم‌افزار SPSS 20 انجام شد.

یافته‌ها

طی این تحقیق، فعالیت ضد باکتریایی پالیده کشت باکتری‌های اسیدلاکتیک جداشده از فراورده بومی پنیر کردی بر علیه سویه‌های بیماری‌زا به روش دیسک و چاهک مورد بررسی قرار گرفت که در پی آن اثرات مثبتی مشاهده شد. تمام سویه‌های مورد نظر در محدوده متغیر ۱۲ تا ۱۹ میلی‌متر، قادر به مهار باکتری‌های بیماری‌زا بودند. با توجه به حدود اطمینان و سطح معنی‌داری در ارتباط با فعالیت ضد میکروبی سویه‌های جداسازی شده مورد بررسی با $p\leq ۰/۰۵$ می‌توان از درستی آزمون، اطمینان حاصل کرد. بعلاوه، در این بررسی پالیده کشت باکتریایی تحت تیمار حرارتی و خنثی سازی توسط سود قرار گرفت.

نتایج به دست آمده در روش چاهک برای پالیده بدون تیمار، جدول شماره ۱، نشان دهنده‌ی اثر مهار کننده مناسب این دسته از باکتری‌ها است. سویه‌های *L.casei* (059, 032) بیش‌ترین اثر بازدارندگی را نسبت به *B. cereus* ATCC 10876 و *S. aureus* ATCC 25923 نشان دادند که بیش‌ترین اثر بازدارندگی برای *B.cereus* ATCC 10876 مربوط به سویه‌ی *L.casei* 059 و برای *S. aureus* ATCC 25923 مربوط به سویه‌ی *L casei* 032 بود. *L. paracasei* RMS3-1 نیز اثر ضد میکروبی مناسبی را نسبت به سویه های *L.casei* (059, 032) نشان داد، هرچند که این اثر در ارتباط با سویه *P.aeruginosa* ATCC 27853، نسبت به سایر سویه‌های بیماریزای مورد بررسی در این

تحقیق، کمتر بود. همچنین با بررسی سویه‌ی *L. plantarum* WCFS1 بیش‌ترین اثر ضد میکروبی بر علیه *S. aureus* ATCC 25923 مشاهده گردید. مقایسه‌ی نتایج به دست آمده برای سویه‌های جداسازی شده در مقایسه با سویه‌های تجاری نیز نشان داد که سویه‌های بومی فعالیت ضد میکروبی مناسب‌تری دارند.

جدول1 : خاصیت ضد میکروبی پالیده کشت باکتری های اسیدلاکتیک بومی و تجاری به روش چاهک

Lactic acid bacteria	*E. coli* O157 H7	*S .aureus subsp. Aureus* ATCC 25923	*B. cereus* ATCC 10876	*Ps.asaeruginosa* ATCC 27853
L. casei 059	۱۷±۱/۷۳^{d}	۱۶/۷±۰/۵۷^{abcd}	۱۸/۷±۱/۱۵^{e}	۱۵/۳±۱/۱۵^{b}
L.casei 032	۱۷/۷±۱/۵۲^{d}	۱۸/۳±۱/۵^{de}	۱۴/۷±۱/۵۲^{ab}	۱۳/۷±۱/۱۵^{ab}
L. paracasei RMS3-1	۱۵/۷±۱/۱۵^{bcd}	۱۵±۱^{a}	۱۵/۳±۱/۵۲^{abc}	۱۴/۳±۰/۵۷^{ab}
L. plantarum WCFS1	۱۳±۱^{a}	۱۷±۱^{bcd}	۱۴/۷±۱/۵۲^{ab}	۱۵/۷±۱/۱۵^{b}
L.casei DSM 20011	۱۴±۱^{ab}	۱۶/۳±۱/۵^{abc}	۱۶/۷±۰/۵۷^{bcde}	۱۵/۳±۱/۵۲^{b}
L.parcasei DSM 5622	۱۲/۵۸±۰/۹۷^{ab}	۱۴/۸±۱/۴۵^{abc}	۱۴/۱±۰/۵۵^{bcde}	۱۳/۸±۱/۴۱^{b}
L.plantarum ATCC 14917	۱۲/۶±۱/۱۵^{abc}	۱۴/۶±۱/۱۵^{abcd}	۱۴±۱^{abc}	۱۲/۷±۰/۵۷^{a}

*حروف مشابه در گروه‌بندی آماری نمایانگر عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح ۵٪ بین آنهاست.

نتایج به دست آمده حاصل از روش دیسک در جدول شماره ۲، نشان دهنده اثر بازدارندگی باکتری‌های بومی و تجاری می-باشد. برای *S.aureus* ATCC 25923 و*E.coli* O157 H7 به ترتیب با مهار ۱۷/۰۱ و ۱۶/۴ میلی‌متر *L.casei* 032 بیشترین اثر بازدارندگی را نسبت به دیگر سویه‌های بومی و تجاری نشان داد. اثر بازدارندگی *L.plantarum* WCFS1 در مقابل *B.cereus* ATCC 10876 بامهار ۱۶/۶ میلی‌متر، نسبت به سایر سویه‌های مورد بررسی بیشتر بود. در مورد اثر ضد باکتریایی برای *P.aeruginosa* ATCC 27853 بین سویه‌های بومی و تجاری تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. همچنین اثر بازدارندگی سویه بومی*L.paracasei* RMS3-1 برای*E.coli* O157 H تفاوت معنی-داری را با سایر سویه‌های بیماری‌زا نشان داد.

تیمار حرارتی پالیده کشت باکتریایی، جدول شماره ۳، در روش چاهک تأثیری در افزایش و یا کاهش فعالیت ضد میکروبی نداشت. هر چند که تیمار کردن با سود و با رساندن pH مایع رویی به ۷ اثر بازدارندگی برای تمام سویه‌های بومی و تجاری به طور کامل از بین رفته و مایع رویی با pH= ۷ اثر بازدارندگی بر هیچکدام از باکتری‌های بیماری‌زا نداشت. تیمار حرارتی در روش دیسک نیز مانند روش انتشار تفاوتی را در اثر بازدارندگی پالیده کشت باکتریایی نشان نداد. همچنین مطابق جدول شماره ۴، تیمار با سود همانند روش انتشار فعالیت ضد میکروبی را به صفر رسانید.

نتایج حاصل از کمترین غلظت بازدارندگی (جدول شماره ۵) پالیده کشت باکتری های اسیدلاکتیک بر ضد باکتری‌های بیماری‌زا در مقایسه با سویه‌های تجاری را نشان داد، بطوریکه سویه‌های بومی توانایی بازدارندگی بسیار خوبی در مقایسه با سویه‌های تجاری دارند و می‌توانند به عنوان ترکیب‌های ضد میکروبی طبیعی کاربرد داشته باشند.

در جدول شماره‌ی ۶، همه‌ی سویه‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک در مقایسه با سویه‌های تجاری خاصیت تجمعی خوبی نشان دادند که برای سویه‌های (059, 032) *L. casei* و *L. paracasei* RMS3-1 این میزان بیشتر از سویه‌های تجاری بود.

جدول2 : خاصیت ضد میکروبی پالیده کشت باکتری های اسیدلاکتیک بومی و تجاری به روش دیسک

Lactic acid bacteria	*E. coli* O157 H7	*S .aureus subsp. Aureus* ATCC 25923	*B. cereus* ATCC 10876	*Ps.asaeruginosa* ATCC 27853
L. casei 059	۱۵ /۸۱±۱/۶^{d}	۱۵/۵۳±۰/۵۳^{abcd}	۱۷/۳۹±۱/۰۶^{e}	۱۴/۲±۱/۰۶^{b}
L.casei 032	۱۶/۴±۱/۴۱^{d}	۱۷/۰۱±۱/۳۹^{de}	۱۳/۷±۱/۴۱^{ab}	۱۲/۷±۱/۰۶^{ab}
L. paracasei RMS3-1	۱۴/۶±۱/۰۶^{bcd}	۱۳/۹۵±۰/۹۳^{a}	۱۴/۲±۱/۴۱^{abc}	۱۳/۲±۰/۵۳^{ab}
L. plantarum WCFS1	۱۲/۰۹±۰/۹۳^{a}	۱۵/۸۱±۰/۹۳^{bcd}	۱۶/۶±۱/۴۱^{ab}	۱۴/۶±۱/۰۶^{b}
L.casei DSM 20011	۱۳/۰۲±۰/۹۳^{ab}	۱۵/۱±۱/۳^{abc}	۱۵/۵±۰/۵۳^{bcde}	۱۴/۲±۱/۴۱^{b}
L.parcasei DSM 5622	۱۲/۶۲±۰/۹^{ab}	۱۴/۶±۱/۳۴^{abc}	۱۴/۹±۰/۵۱^{bcde}	۱۳/۷±۱/۳۱^{b}
L.plantarum ATCC 14917	۱۳/۵۷±۱/۰۶^{abc}	۱۵/۴±۱/۰۶^{abcd}	۱۳/۹±۰/۹۳^{abc}	۱۱/۸±۰/۵۳^{ab}

*حروف مشابه در گروه‌بندی آماری نمایانگر عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح ۵٪ بین آنهاست

جدول3 : خاصیت ضد میکروبی پالیده کشت باکتری های اسیدلاکتیک بومی و تجاری تیمار شده با حرارت به روش چاهک

Lactic acid bacteria	*E. coli* O157 H7	*S .aureus subsp. Aureus* ATCC 25923	*B. cereus* ATCC 10876	*Ps.asaeruginosa* ATCC 27853
L. casei 059	۱۶/۶±۱/۵۲^{cd}	۱۶/۳±۰/۵۷^{ab}	۱۹±۱^{d}	۱۵±۲/۶۴^{b}
L.casei 032	۱۷/۶±۱/۵۲^{abc}	۱۸/۳±۱/۱۵^{ab}	۱۴/۶±۰/۵۷^{c}	۱۳±۱/۷۳^{ab}
L. paracasei RMS3-1	۱۵/۳±۱/۵۲^{bc}	۱۵/۷±۰/۵۷^{d}	۱۵/۳±۰/۵۷^{bc}	۱۳/۷±۰/۵۷^{ab}
L. plantarum WCFS1	۱۳/۶±۰/۵۷^{ab}	۱۶/۷±۰/۵۷^{ab}	۱۵±۱^{ab}	۱۵±۱^{b}
L.casei DSM 20011	۱۳/۳±۱/۵۲^{a}	۱۶/۷±۱/۵۲^{ab}	۱۶/۳±۰/۵۷^{bc}	۱۵/۳±۰/۵۷^{b}
L.parcasei DSM 5622	۱۲/۹±۱/۴۷^{a}	۱۶/۱±۱/۴۷^{ab}	۱۵/۸±۰/۵۵^{bc}	۱۴/۸±۰/۵۵^{b}
L.plantarum ATCC 14917	۱۵±۱^{abc}	۱۷±۱^{abc}	۱۴/۶±۱/۵۲^{ab}	۱۳/۳±۰/۵۷^{a}

*حروف مشابه در گروه‌بندی آماری نمایانگر عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح ۵٪ بین آنهاست

جدول4 : خاصیت ضد میکروبی پالیده کشت باکتری های اسیدلاکتیک بومی و تجاری تیمار شده با حرارت به روش دیسک

Lactic acid bacteria	*E. coli* O157 H7	*S .aureus subsp. Aureus* ATCC 25923	*B. cereus* ATCC 10876	*Ps.asaeruginosa* ATCC 27853
L. casei 059	۱۵/۴±۱/۴۱^{cd}	۱۷±۱/۰۶^{ab}	۱۷/۶±۰/۹۳^{d}	۱۳/۹±۲/۴۵^{b}
L.casei 032	۱۶/۳±۱/۴۱^{abc}	۱۷/۰۱±۱/۰۶^{ab}	۱۳/۵±۰/۵۳^{c}	۱۲/۰۹±۱/۶^{ab}
L. paracasei RMS3-1	۱۴/۲±۱/۴۱^{bc}	۱۴/۶±۰/۵۳^{d}	۱۴/۲±۰/۵۳^{bc}	۱۲/۷±۰/۵۳^{ab}
L. plantarum WCFS1	۱۲/۶±۰/۵۳^{ab}	۱۵/۵±۰/۵۳^{ab}	۱۳/۹±۰/۹۳^{ab}	۱۳/۹±۰/۹۳^{b}
L.casei DSM 20011	۱۲/۳±۱/۴۱^{a}	۱۵/۵±۱/۴۱^{ab}	۱۵/۱±۰/۵۳^{bc}	۱۴/۲±۰/۵۳^{b}
L.parcasei DSM 5622	۱۱/۹±۱/۳۶^{a}	۱۴/۹±۱/۳۶^{ab}	۱۴/۶±۰/۵۱^{bc}	۱۳/۷±۰/۵۱^{b}
L.plantarum ATCC 14917	۱۳/۹±۰/۹۳^{abc}	۱۵/۸±۰/۹۳^{abc}	۱۳/۵±۱/۴۱^{ab}	۱۲/۳±۰/۵۳^{a}

*حروف مشابه در گروه‌بندی آماری نمایانگر عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح ۵٪ بین آنهاست

جدول5 : کمترین غلظت بازدارندگی (MIC) پالیده کشت باکتری های اسیدلاکتیک بومی و تجاری بر حسب AU/ml

	E. coli O157 H7	*S .aureus subsp. Aureus* ATCC 25923	*B. cereus* ATCC 10876	*Ps.asaeruginosa* ATCC 27853
***L. casei* 059**	۸۶۳/۳±۴۰/۴^{abc}	۸۸۶/۷±۴۰/۴^{abc}	۸۶۳/۳±۴۰/۴^{ab}	۷۹۶/۷±۷۵^{a}
***L.casei* 032**	^{a}۷۹۶/۷±۷۵	۸۴۰^{a}	۸۴۰^{a}	۸۴۰^{a}
***L. paracasei* RMS3-1**	۸۴۰^{ab}	۸۶۳/۳±۴۰/۴^{ab}	۸۶۳/۳±۴۰/۴^{ab}	۸۶۳/۳±۴۰/۴^{a}
***L. plantarum* WCFS1**	^{a}۷۹۶/۷±۷۵	۸۶۳/۳±۴۰/۴^{ab}	۸۶۳/۳±۴۰/۴^{ab}	۷۵۳/۳±۷۵^{a}
***L.casei* DSM 20011**	۸۶۳/۳±۴۰/۴^{abc}	۸۶۳/۳±۴۰/۴^{ab}	۸۸۶/۷±۴۰/۴^{ab}	۷۵۳/۳±۷۵^{a}
***L.parcasei* DSM 5622**	۸۳۷/۴±۳۹/۱^{abc}	۸۳۷/۴±۳۹/۱$^{a b}$	۸۶۰±۳۹/۱^{ab}	۷۳۰/۷±۷۲/۷^{a}
***L.plantarum* ATCC 14917**	۸۸۶/۷±۴۰/۴^{bc}	۸۶۳/۳±۴۰/۴^{ab}	۹۰۳/۳±۶۰/۲^{ab}	۷۹۶/۷±۷۵^{a}

*حروف مشابه در گروه‌بندی آماری نمایانگر عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح ۵٪ بین آنهاست

جدول6 : میزان خاصیت تجمعی باکتری های اسیدلاکتیک بومی و تجاری

	E. coli O157 H7	*S .aureus subsp. Aureus* ATCC 25923	*B. cereus* ATCC 10876	*Ps.asaeruginosa* ATCC 27853
***L.casei* 059**	۲۸/۳±/۸۳^{abc}	۳۳/۱±۲/۰۲^{bc}	۳۴/۲±۱/۷^{cd}	۲۳/۶±۱/۵۶^{ab}
***L. casei* 032**	۳۷±۱/۳۵^{e}	۳۶/۱±۰/۹۵^{d}	۲۹/۸±۲/۲۱^{ab}	۲۴/۷±۰/۹۵^{abc}
***L. paracasei* RMS3-1**	۳۶/۱±۰/۹^{e}	۳۳/۷±۱/۶۱^{bc}	۲۹/۱±۱/۷۶^{a}	۲۳/۹±۱/۷۲^{abc}
***L. plantarum* WCFS1**	۲۵/۹±۱/۸^{ab}	۲۸/۴±۰/۶۶^{a}	۳۴/۸±۱/۷۲^{d}	۲۲/۸±۱/۹^{a}
***L. casei* DSM 20011**	۳۱/۴±۱/۴۲^{d}	۳۱/۷±۱/۴۷^{b}	۳۱±۲/۲۸^{abc}	۲۶/۸±۱/۱۶^{c}
***L. parcasei* DSM 5622**	۳۰/۴±۱/۳۷^{d}	۳۰/۷±۱/۴۲^{b}	۳۰/۰۷±۲/۲۱^{abc}	۲۵/۹±۱/۱۲^{c}
***L. plantarum* ATCC 14917**	۲۸/۹±۱/۵^{bcd}	۳۱/۴±۰/۹۲^{b}	۳۱±۱/۲۴^{abc}	۲۳/۲±۰/۷۵^{a}

*حروف مشابه در گروه‌بندی آماری نمایانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ بین آنهاست.

بحث

یافته‌های به دست آمده در این تحقیق نشان داد که باکتری-های اسیدلاکتیک جداشده از پنیر سنتی کردی قادر هستند از رشد باکتری‌های بیماری زا جلوگیری کنند. با توجه به عوارض ناشی از مصرف ترکیب‌های ضد میکروبی شیمیایی و مصنوعی، این متابولیت‌ها می‌توانند به عنوان ترکیب‌های ضد میکروبی طبیعی کاربرد غذایی و دارویی داشته باشند.

در مطالعات مختلف "*in vivo*" و "*in vitro*"، فعالیت ضد میکروبی تعداد زیادی از میکروارگانیسم‌های پاتوژن شامل *P. aeruginosa*، *E.coli*، *S.aureus*، *B.cereus* به وسیله لاکتوباسیلوس ها نشان داده شده است (**۸ و ۱۱-۱۳**).

Dorsanki و همکاران، به کمک روش دیسک و چاهک نشان دادند که شش گونه باکتری اسیدلاکتیک شناسایی شده شامل *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس بولگاریکوس، لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس کازئی* از ماست و *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* از قرص پروبایوتیکی دارای اثر ممانعت کنندگی بر علیه باکتری‌های بیماری‌زای *استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، سودوموناس آئروژینوزا، کلبسیلا پونومونیه، سالمونلا تیفی موریوم، شیگلا دیسانتری و اشریشیا کلی* دارند (**۱۴**).

Savadoga و همکاران، نشان دادند که باکتری‌های اسیدلاکتیک دارای فعالیت ضد میکروبی بر علیه سویه‌های استاندارد *باسیلوس سرئوس، انتروکوکوس فکالیس، اشریشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس* هستند (**۱۵**).

Boris و همکاران، نشان دادند که لاکتوباسیلوس‌های جداشده از لبنیات اثر مهار کنندگی بر *سودوموناس آئروژینوزا*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلی* و *سالمونلا تیفی موریوم* دارند (۱۶).

Coconeer و همکاران، گزارش کردند که مایع رویی کشت باکتری‌های *لاکتوباسیلوس فرمانتوم*، *لاکتوباسیلوس کازئی*، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *لاکتوکوکوس لاکتیس* بر طیف وسیعی از باکتری‌های بیماری‌زا اثر ممانعت کنندگی دارد (۱۷).

Tamaraj، بیان کردند که خنثی سازی به وسیله‌ی سود پالیده کشت میکروبی اثر بازدارندگی باکتری های اسیدلاکتیک را از بین می‌برد که می‌توان فعالیت ضد میکروبی پالیده کشت باکتری‌ها را به مشتق های اسیدی تولید شده و باکتریوسین‌هایی که در pH خنثی فعال نیستند، نسبت داد (۱۸).

در این مطالعه نیز باکتری‌های جداشده از پنیر سنّتی کردی توانستند در مقابل همه سویه‌های بیماری‌زا مورد بررسی اثر ممانعت کنندگی نشان دهند.

در بررسی های مختلف گزارش شده است که توانایی خاصیت تجمعی سویه‌های لاکتوباسیلوس آن‌ها را قادر به تولید یک سد در برابر باکتری‌های پاتوژن می‌کند (۱۹). همچنین عواملی مانند سویه‌ی باکتری اسیدلاکتیک، باکتری بیماری‌زا و زمان گرمخانه گذاری، بر میزان خاصیت تجمعی تأثیر گذار هستند (۱۰). باکتری های اسیدلاکتیک بومی مورد مطالعه در این پژوهش، خاصیت تجمعی مناسبی را نشان دادند که این خاصیت، نشان دهنده خاصیت مفید بودن سویه‌های بومی است بدین معنا که آن‌ها می‌توانند از ساکن شدن باکتری‌های بیماری زا در روده ممانعت کنند.

بطور کلی، می‌توان بیان نمود که باکتری‌های اسیدلاکتیک می‌توانند به سلامت انسان کمک شایانی کنند و با تغییر فلور روده سبب نابودی باکتری‌های مضر در بدن شوند. همچنین، با توجه به افزایش تقاضای مصرف‌کنندگان به بهبود سلامت عمومی و کاهش خطر ابتلا به بیماری‌ها و ضرورت استفاده از باکتری‌های پروبیوتیک از منابع سنّتی به علت گسترش فزاینده محصولات صنعتی به جای محصولات سنّتی و امکان از دست دادن بسیاری از باکتری‌های پروبیوتیک، تحقیقات بیشتر بر روی جداسازی و شناسایی این باکتری‌ها از منابع سنّتی و استفاده از آن‌ها جهت تولید فراورده‌های غذایی جدید نیاز می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل از پایان نامه دانشجویی دکتری دانشکده کشاورزی گروه میکروبیولوژی علوم و صنایع غذایی دانشگاه فردوسی مشهد می‌باشد. از اساتید محترم راهنما و مشاور که من را در انجام این امر یاری کردند، کمال تشکر را دارم.

References

1. Tannock GW, Munro K, Harmsen HJ, Welling GW, Smart J, Gopal PK. Analysis of the fecal microflira of human subjects consuming a probiotic product containing Lactobacillus rhamnosus DR20. Applied and Environmental Microbiology 2000; 66: 2578-2588.
2. Picard C, Floramonti J, Francois A, Robinson T, Neat F, Matuchansky C. Review article: Bifidobacteria as agents-physiological effect and clinical benefits. Animal pharmacolther 2005; 22: 495-512.
3. Axelsson LT. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: Salminen et al. (Ed.), Lactic Acid Bacteria. Marcel Deker, USA, 1993; 1-64.
4. De Rose N, M Katan M. Effects of probiotic bacteria on human. Journal Clinical Nutrition 2000; 171: 405-409.
5. Vanderbergh PA. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. FEMS Microbiology Review 1993; 12: 221–238.
6. Topisirovic LJ, Kojic M, Fira D, Golic N, Strahinic I, Lozo J. Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. International Journal of Food Microbiology 2006; 112: 230–235.
7. Kovi J, Kos B, Beganovi J, Pavunc AL, Habjani K, Mato S. Antimicrobial Activity – The Most Important Property of Probiotic and Starter Lactic Acid Bacteria. Food Technology and Biotechnology 2010; 48: 296–307.

8. Makras L, Triantafyllou V, Fayol-Messaoudi D, Zoumpopoulou TAG, Tsakalidou E, Servin A. Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli toward Salmonella enterica serovar Typhimurium reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds. Research in Microbiology 2006; 157: 241–247.
9. Todorov SD, Dicks LMT. Lactobacillus plantarum isolated from molasses produces bacteriocin active against gram negative bacteria. Enzyme and Microbial Technology 2005; 36: 318-326.
10. Zhanga Y, Zhanga L, Dua M, Yi H, Guoa C, Tuob Y. Antimicrobial activity against Shigella sonnei and probiotic properties of wild lactobacilli from fermented food. Microbiological Research 2011; 167: 27– 31.
11. Gopal PK, Prasad J, Smart J, Gill HS. IN vitro adherence properties of lactobacillus rhamnosus DR20 and Bifidobacterium lactis DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic Escherichia coli. Int J Food Microbiol 2001; 67: 674- 686.
12. Tsai CC, Hsih HY, Chiu HH, Lai YY, Liu JH, Yu B, et al. Antagonistic activity against Salmonella infection in vitro and in vivo for two Lactobacillus strains from swine and poultry. Int J Food Microbiol 2005; 102: 185-194.
13. Karska-Wysockib B, Bazoa M, Smoragiewicza W. Antibacterial activity of Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus casei against methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). Microbiol Res 2010; 165: 674-686.
14. Kazemi Dorosnaki R, Ghaemi N, Mirpor M S. Study of antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from probiotic products. Journal of Microbial Biotechnology of Azad university 2011; 7: 26-29.
15. Savadogo A, Cheik A. Antimicrobial activities of lactic acid bacteria strains isolated from Burkina faso fermented milk. Pakistan Journal of nutrition 2004; 3(3): 174-179.
16. Boris S, Jimenez-Diaz R, Caso JL, Barbes C. Partial characterization of a bacteriocin produced by Lactobacillus delberueki sunsp. Lactis U0004. An intestinal isolate with probiotic potential. J Appl Microbiol. 2001; 91(2): 32-33.
17. Coconnier MH, Lievin V, Hemery E, Servin AL. Antagonistic activity against Helicobacter infection in vitro by the human Lactobacillus acidophilus strain LB. Appl Environ Microbiol 1998; 64: 4573-4580.
18. Tharmaraj N, Shah NP. Antimicrobial effects of probiotics against selected pathogenic and spoilage bacteria in cheese-based dips. International Food Research Journal 2009; 16: 261-276.
19. Pelletier C, Bouley C, Cayuela C, Bouttier S, Bourlioux P, Bellon-Fontaine MN. Cell surface characteristics of Lactobacillus casei subsp. Casei, Lactobacillus paracasei subsp. paracasei and Lactobacillus rhamnosus strains. Appl Environ Microbiol 1997; 63: 1725-1731.