جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

ارزیابی توان ضدمیکروبی باکتری های اسید لاکتیک جدا شده از دستگاه گوارش مرغ

مهندس محمد امیر کریمی ترشیزی[۱] دکتر شعبان رحیمی[۲*] دکتر ناهید مژگانی[۳] دکتر سعید اسماعیل خانیان[۴]

دریافت مقاله: ۱۴ اردیبهشت ماه ۱۳۸۲
پذیرش نهایی: ۴ آبان ماه ۱۳۸۲

هدف: بررسی توان باکتری های اسید لاکتیک جدا شده از مرغ در مهار رشد باکتری های پاتوژن *اشریشیا کلی* و *سالمونلا*.

روش: در این پژوهش از قسمتهای مختلف دستگاه گوارش مرغهای سالم به وسیله لوپ استریل نمونه برداری صورت گرفت و به محیط کشت MRS broth منتقل شد. پس از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد بر روی محیط های Rogosa agar و MRS agar کشت خطی انجام شد و به صورت بیهوازی و هوازی به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شدند. پرگنه های ظاهر شده از نظر شکل، رنگ و اندازه بررسی گردید. باکتری های گرم مثبت، کاتالاز منفی و بدون اسپور کروی و میله ای که فاقد قدرت ایجاد همولیز بتا بودند، انتخاب و توان آنها در مهار رشد باکتری های اشریشیاکلی (*E. coli* 078:K80, *E. coli* 01:K2, *E. coli* 02:K1) و سالمونلا (*Salmonella pullorum, S. enteritidis, S. typhimurium*) با استفاده از روش کشت نقطه ای بر روی آگار بررسی شد.

نتایج: از مجموع ۶۵۹ باکتری جدا شده ۱۳۹ ایزوله دارای توان مهار رشد پاتوژن و تعداد ۵۲۰ ایزوله فاقد توانایی مهار رشد پاتوژن های مورد بررسی بودند. باکتری های اسید لاکتیک جدا شده در این پژوهش در مهار رشد سروتیپ های سالمونلا نسبت به سروتیپ های اشریشیا کلی توان بیشتری داشتند.

نتیجه گیری: با توجه به منشا جداسازی باکتری های اسید لاکتیک در این پژوهش و توان بالقوه مهار رشد پاتوژن های مورد بررسی، با در نظر گرفتن سایر معیارهای ضروری می توان از این ایزوله ها به عنوان افزودنی خوراکی با هدف کاهش آلودگی به پاتوژن ها در پرورش طیور سود جست. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، (۱۳۸۳)، دوره ۵۹، شماره ۱، ۸۲-۷۹.

واژه های کلیدی: باکتری های اسید لاکتیک، مهار رشد پاتوژن، *سالمونلا*، *اشریشیاکلی*، مرغ.

باکتری های اسید لاکتیک عبارت اند از: باکتری های کروی، بیضوی یا میله ای گرم مثبت و فاقد توانایی ایجاد اسپور که عموماً کاتالاز منفی می باشند (۱۲). باکتری های اسیدلاکتیک از اعضای مهم فلور همزیست در مجاری گوارشی و تناسلی انسان و حیوانات می باشند. اعتقاد بر این است که برخی از باکتری های اسید لاکتیک به عنوان پروبیوتیک عمل می نمایند. پروبیوتیک عبارت است از مکمل میکروبی خوراکی که اثرات سودمندی را در اثر بهبود تعادل میکروبی بر میزبان اعمال می نماید (۵). هنگامی که یک پروبیوتیک با هدف کاهش میکروارگانیسمهای بالقوه پاتوژن و غیرمفید به کار می رود، داشتن ویژگیهای آنتاگونیستی از اهمیت خاصی برخوردار است (۶،۷).

اثر حفاظتی باکتری های اسید لاکتیک عمدتاً به علت تخمیر کربوهیدرات ها

۱) دانش آموخته دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس تهران، تهران - ایران.
۲) گروه آموزشی پرورش و مدیریت تولید طیور دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس تهران، تهران - ایران.
۳) بخش بیوتکنولوژی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی حصارک کرج، کرج - ایران.
۴) بخش بیوتکنولوژی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور کرج، کرج - ایران.
*) نویسنده مسئول rahimi_s80@yahoo.com

Evaluation of antimicrobial potential of lactic acid bacteria isolated from chicken gastrointestinal tract

Karimi Torshizi, M.A.,[1] Rahimi,Sh.,[2] Mojgani, N.,[3] Esmaeilkhanian, S.[4]

[1]*Graduated from Faculty of Agriculture, University of Tarbiat Modarres, Tehran-Iran.* [2]*Department of Poultry Science, Faculty of Agriculture, University of Tarbiat Modarres University, Tehran-Iran.* [3]*Department of Biotechnology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Hesarak Karaj, Karaj - Iran.* [4]*Department of Biotechnology, Animal Science Research Institute of Iran, Karaj-Iran.*

Objective: Isolation of lactic acid bacteria with the potential to inhibit the growth of pathogenic *E. coli* and *Salmonella*.

Procedures: Samples from different parts of digestive tract of healthy chickens were cultured in MRS broth and incubated at 37°C for 24-48 hours in anaerobic and aerobic conditions. Then, plates containing MRS agar and Rogosa agar were inoculated with cells grown in MRS broth previously. Plates were incubated at 37°C for 24-48 hours. Different colonies on MRS agar plates were studied for cultural and morphological characters. The gram positive, catalase negative, non-spore forming cocci and bacilli which were unable to produce haemolysis were selected for inhibition assay against *E. coli* serotypes (O78:K80, O2:K1, O1:K1) and *Salmonella* serotypes (*pullorum*, *enteritidis*, *typhimurium*). The antagonistic properties of isolated lactic acid bacteria were studied by using agar spot test.

Results: Out of 659 isolated lactic acid bacteria, 139 isolates (21.09%) were able to inhibit growth of indicator strains used in this study. From 139 isolated lactic acid bacteria, of those which demonstrated antagonistic activity against the pathogens, 31 isolates were identified as *Lactobacillus spp.*, and the 108 reminder isolates were *Enterococcous spp*. The isolated lactic acid bacteria were more efficient in inhibition of *Salmonella* than *E. coli*. The antagonistic activity observed in this experiment can be attributed to organic acids and bacteriocin production by lactic acid bacteria.

Clinical implications: As the source of isolation of lactic acid bacteria in this study was poultry, and their potential inhibitory effects against mentioned pathogens and considerto other essential criteria, it is foreseen that it would be possible to use these isolates as a feed additive in poultry production in order to reduce the risk of infection. ***J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran. 59, 1: 79-82, 2004.***

Key words: Lactic acid bacteria, Pathogen inhibition, *Salmonella*, *E. coli*, Chicken.

Corresponding author email:rahimi_s80@yahoo.com

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

به اسیدهای آلی (اسیدلاکتیک و اسید استیک) که توام با کاهش pH در محیط است، می باشد. علاوه بر این سیستمهای آنتاگونیستی پیچیده تری نیز می توانند در ایفای نقش مهارکنندگی این باکتری ها مشارکت داشته باشند. برخی باکتری های اسید لاکتیک قادر به تولید و ترشح مواد مهارکننده ای غیر از اسیدهای لاکتیک و استیک می باشند. این مواد بر طیف وسیعی از میکروارگانیسم ها اثر آنتاگونیستی دارند و به مقادیر بسیار کمتر از اسیدهای یاد شده تولید می شوند و عبارت اند از: اسید فورمیک، اسیدهای چرب آزاد، آمونیاک، اتانول، پراکسید هیدروژن، دی- استیل استون ۲و۳- بوتان دیول، استالدئید، بنزوات، آنزیم های پروتئولیتیک، باکتریوسین ها و آنتی بیوتیک ها، همچنین چندین ماده مهار کننده رشد که کمتر شناخته شده اند یا به کلی ناشناخته می باشند (۶،۱۲).

شهیدی و همکاران در سال ۱۳۷۴، از ۷۰ باکتری اسید لاکتیک جدا شده از گوشت مشاهده نمودند که ۱۲ جنس و گونه دارای خاصیت آنتاگونیستی علیه باکتری های پاتوژن و فاسد کننده بودند (۱). وند یوسفی و همکاران در سال ۱۳۷۸ اثر ضد میکروبی ۸ باکتری اسید لاکتیک علیه *Listeria monocytogenes*، به روشهای مختلف بررسی کرده و گزارش نمودند که همه این باکتری ها قادر به مهار رشد سویه پاتوژن بودند (۳).

Jin و همکاران در سال ۱۹۹۶، ۱۲ ایزوله لاکتوباسیل جدا شده از روده مرغ را که دارای توان اتصال به سلولهای اپی تلیال ایلئوم بودند را علیه سه سروتیپ *اشریشیا کلی* و پنج سروتیپ *سالمونلا* آزمایش نمودند و دریافتند که کلیه این ایزوله ها قادر به مهار رشد سویه های مورد بررسی می باشند (۸). Juven و همکاران در سال ۱۹۹۲ تولید ترکیبات آنتاگونیستی سویه های *Lactobacillus acidophilus* جدا شده از روده مرغ را مطالعه نمودند و عوامل مهار کننده رشد در بررسی آنها اسیدهای آلی، پراکسید هیدروژن و باکتریوسین تعیین شدند (۹). Miyamoto و همکاران در سال ۲۰۰۰ اقدام به جداسازی باکتری های لاکتوباسیل از کلوآک و ابتدای مجرای تناسلی مرغهای تخمگذار نمودند و سویه های جدا شده را علیه باکتری *S. enteritidis* مورد آزمایش قرار دادند و مشاهده نمودند که کلیه سویه های لاکتوباسیل جدا شده توانستند رشد این باکتری را مهار نمایند. این محققان برای این باکتری ها نقش ممانعت کننده ای را در تشکیل کلنی *S. enteritidis* در کلوآک و ابتدای مجرای تناسلی مرغهای تخمگذار پیشنهاد نمودند (۱۰).

باتوجه به اهمیت اقتصادی و بهداشتی بیماریهای سالمونلوز و کلی باسیلوز در گله های طیور و نیز اهمیت آنها در بهداشت جامعه انسانی و نیز استفاده بی رویه از آنتی بیوتیک ها برای کنترل و پیشگیری عفونتهای حاصل از این پاتوژنها که از طرفی منجر به بروز سویه های مقاوم و از دیگر سو مسأله باقیمانده های دارویی را سبب شده است، در این تحقیق اثرات آنتاگونیستی باکتری های اسید لاکتیک جدا شده از دستگاه گوارش مرغ بر سه سروتیپ *اشریشیا کلی* (*E. coli* O78:K80 ،O1:K1, O2:K1) و سه گونه *سالمونلا* (*Salmonella pullorum, S. enteritidis, S. typhimurium*) مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار

۱- جداسازی باکتری های اسید لاکتیک: در طی چندین مرحله از قسمتهای مختلف دستگاه گوارش جوجه های گوشتی مرغ بومی و مرغ تخمگذار موجود در مزارع مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور، به وسیله سواب و لوپ استریل نمونه برداری انجام شد. نمونه ها پس از ثبت مشخصات به لوله های آزمایش حاوی محیط MRS broth(Quelab) منتقل و به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به صورت بیهوازی گرمخانه گذاری شدند. پس از رشد، از محیط مذکور بر روی پلیت های حاوی محیط Rogosa agar (Merck) و MRS agar (Quelab) کشت خطی انجام شد و پلیت ها به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در شرایط بیهوازی و هوازی در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری گردیدند. پرگنه های ظاهر شده از نظر خصوصیات رشد و مرفولوژی و همچنین خلوص مورد بررسی قرار گرفتند. باکتری های گرم مثبت فاقد اسپور و کاتالاز منفی کروی و میله ای که همولیز بتا ایجاد نمی کردند، برای انجام آزمایشهای ارزیابی توان مهار رشد به لوله های حاوی محیط MRS agar نیمه جامد (۰/۷ درصد آگار) منتقل و در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. این کشت ها به طور ماهانه تجدید می شدند. برای کلیه ایزوله ها به طور مقدماتی آزمون کشت نقطه ای بر روی آگار و انتشار در آگار به منظور بررسی اولیه توان مهار رشد انجام گرفت و باکتری هایی که براساس آزمون کشت نقطه ای بر روی آگار دارای خصوصیت مهار رشد بودند، انتخاب و در محیط MRS broth حاوی ۲۰ درصد گلیسرول و محیط Skim milk (Biomark) معلق کرده و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

۲- باکتری های پاتوژن: بر اساس مطالعه انجام شده سروتیپ های O78:K80 و O2:K1 *اشریشیا کلی* از سروتیپ های غالب در مرغداریهای اطراف تهران بودند که از طیور بیمار جدا شده اند (زهرایی صالحی، ۱۳۸۰) و به همراه سروتیپ *S. Typhimurium* از گروه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه شدند (۲). باکتری اشریشیا کلی سروتیپ O1:K1 و باکتری های *S. pullorum* RITCC 1818 و *S. enteritidis* RITCC1695 از گنجینه میکروبی بخش شناسی مؤسسه تحقیقات سرم و واکسن سازی رازی تهیه گردیدند. تکثیر و نگهداری باکتری های *اشریشیا کلی* و *سالمونلا* انجام شد (۸،۹،۱۱).

۳-ارزیابی توان ضد میکروبی باکتری های اسید لاکتیک: برای تعیین فعالیت آنتاگونیستی باکتری های اسید لاکتیک علیه سویه های پاتوژن از روش کشت نقطه ای بر روی آگار مطابق شرح Schillinger و Lucke در سال ۱۹۸۹ و Jin و همکاران در سال ۱۹۹۶ استفاده گردید (۹،۱۱). بدین ترتیب که کشت های ۲۴ ساعته باکتری های اسیدلاکتیک در محیط MRS broth تهیه و با استفاده از آنس بر روی پلیت های حاوی محیط MRS agar به صورت نقطه ای کشت شدند و پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شدند. سپس حدود ۵×۱۰^{۷} سلول *سالمونلا* یا *اشریشیا کلی* به ۱۵ میلی لیتر محیط آگار مغذی نیمه جامد (۰/۷ درصد

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

جدول ۱- فراوانی باکتری های اسید لاکتیک مهار کننده رشد باکتری های پاتوژن در آزمون Agar spot test.

	فراوانی (درصد فراوانی) ایزوله های مهارکننده رشد باکتری های پاتوژن*					
سویه های پاتوژن	*Escheriachia coli*			*Salmonella*		
شعاع هاله عدم رشد (میلیمتر)	01	02:K1	078:K80	*typhimurium*	*pullorum*	*enteritidis*
>۱۰	۱۳ (۹/۳۵)	۴ (۲/۸۷)	۱۱ (۷/۹۱)	۱۴ (۱۰/۰۷)	۵۱ (۳۶/۶۹)	۱۷ (۱۲/۲۳)
۵-۱۰	۸۴ (۶۰/۴۳)	۹۳ (۶۶/۹۰)	۹۰ (۶۴/۷۵)	۹۳ (۶۶/۹۰)	۶۸ (۴۸/۹۲)	۹۶ (۶۹/۰۶)
۱-۵	۴۲ (۳۰/۲۱)	۴۲ (۳۰/۲۱)	۳۸ (۲۷/۳۳)	۳۲ (۲۳/۰۲)	۲۰ (۱۴/۳۸)	۲۶ (۱۸/۷۰)

*) اعداد حاصل میانگین سه تکرار آزمایش می باشند.

آگار) افزوده شد و بر روی سطح پلیت هایی که در آنها باکتری های اسید لاکتیک به صورت نقطه ای رشد یافته بودند پخش گردید. پس از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، قطر ناحیهٔ عدم رشد مربوط به هر ایزوله اسیدلاکتیک اندازه گیری و ثبت گردید (۴). این مراحل برای هر یک از ایزوله ها سه بار تکرار شد و میانگین مقدار به دست آمده برای مقایسه توان ایزوله ها به کار رفت.

نتایج

از مجموع ۶۵۹ باکتری اسید لاکتیک جدا شده در این پژوهش ۱۳۹ ایزوله قادر به ایجاد منطقه عدم رشد قابل اندازه گیری بودند. براساس ویژگیهای مرفولوژیکی، رنگ آمیزی گرم، آزمون کاتالاز، رنگ آمیزی اسپور و عدم ایجاد همولیز بتا، ۳۱ ایزوله (۲۲/۳۰ درصد) به عنوان *Lactobacillus spp.* و ۱۰۸ ایزوله (۷۷/۷۰ درصد) به عنوان *Enterococcus spp.* تعیین جنس گردیدند. در جدول۱ نتایج فراوانی ایزوله های قادر به مهار رشد باکتری های پاتوژن (نشانگر)، حاصل از آزمون کشت نقطه ای بر روی آگار مشاهده می شود. باکتری های اسید لاکتیک جدا شده در این تحقیق قادر بودند pH محیط کشت MRS broth را از ۶/۵۰ به ۵/۷۰-۳/۶۰ کاهش دهند.

بحث

تعدادی از باکتری های اسید لاکتیک جدا شده در این تحقیق قادر به مهار رشد باکتری های پاتوژن (*سالمونلا* و *اشریشیا کلی*) بودند (جدول ۱). در پژوهش حاضر، باکتری های اسید لاکتیک جدا شده در مهار رشد باکتری های *سالمونلا* قدرت بیشتری داشتند تا مهار رشد باکتری های *E. coli*، در میان سروتیپ های سالمونلای مورد بررسی نیز مشاهده می شود که *S.pullorum* دارای بیشترین حساسیت می باشد. در آزمایش Jin و همکاران در سال ۱۹۹۶ نیز حساسیت سویه های *سالمونلا* بیش از *اشریشیا کلی* بود (۸). با توجه به عدم اختصاصی بودن مهار رشد نسبت به سویه های پاتوژن احتمالاً عامل مؤثر در مهار رشد سویه های نشانگر به کار رفته در این آزمایش تولید اسیدهای آلی و کاهش pH می باشد. Jin و همکاران در سال ۱۹۹۶ نیز اثر ممانعت کنندگی مشاهده شده را ناشی از تولید پراکسید هیدروژن یا باکتریوسین ندانسته بلکه آن را با تولید اسیدهای آلی مرتبط دانسته اند(۸). Miyamoto و همکاران در سال ۲۰۰۰ مکانیسم مهار رشد باکتری *سالمونلا* را توسط *لاکتوباسیل های* جدا شده از کلوآک و ابتدای مجرای تناسلی مرغهای تخمگذار را، تولید پراکسید هیدروژن یا کاهش pH ندانسته، بلکه تولید باکتریوسین ها را به عنوان عامل احتمالی ذکر نموده اند (۱۰). بدین ترتیب به منظور تعیین دقیق مکانیسم مهار رشد مشاهده شده در این پژوهش، تحقیقات بیشتری لازم می باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از آقای دکتر لطف الهیان مسؤول محترم بخش طیور مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور به جهت مساعدت در امر نمونه برداری از طیور و آقای مهندس کاظمی کارشناس محترم آزمایشگاه گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس سپاسگزاری می گردد. نویسندگان همچنین از مسؤولین محترم بخش میکروب شناسی مؤسسه تحقیقات سرم و واکسن سازی رازی و آقای دکتر زهرایی مدیر محترم گروه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران به لحاظ در اختیار گذاشتن سوش های باکتریایی تشکر می نمایند.

References

۱. شهیدی، ف.، یوسفی، ج.، محمدی، ع.ا. و مرتضوی، ع. (۱۳۷۴): بررسی خصوصیات ضدمیکروبی باکتری های اسید لاکتیک جدا شده از گوشت، مجله علوم و صنایع کشاورزی، ۹ (۱)،صفحه: ۷۸-۵۶.

۲. زهرایی صالحی، ت. و یحیی رعیت، ز. (۱۳۸۰): سروتایپینگ کلی باسیل های جدا شده از مرغداریهای اطراف تهران مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران ۵۶ (۴)، صفحه: ۲۰-۱۷.

۳. وند یوسفی، ج.، اهورائی، آ. و مهرابیان، ص. (۱۳۷۸): اثر ضد لیستریائی تعدادی از باکتری های لاکتیک. پژوهش و سازندگی. شماره۴۰، ۴۱، ۴۲، صفحه: ۱۳۷-۱۳۴.

4. Catherine, B.L., Kaiser, A. and Montville, T.j. (1991): Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. Appl. Environ. Microbiol. 57: 1683-3688.
5. Fuller, R. (1989): A review: Probiotics in man and animals.J. Appl. Bacteriol. 66:365-378.
6. Havenaar, R., Ten Brink, B. and Huis In't Veld, J.H.J. (1992): Selection of strains for probiotic use. In: Probiotics: the Scientific Basis. Edited by R. Fuller. Chapman & Hall, London, UK. PP: 209-224.

7. Huis In't Veld, J.H.J. and Shortt, C. (1996): Selection criteria for probiotic micro-organisms. In: Gut Flora and Health- Past, Present and Future. Edited by A. R. Leeds and I. R. Rowland. International congress and symposium series No. 219, Royal Society of Medicine Press Limited. PP: 27-36.
8. Jin, T.Z., Ho, Y.W., Abdullah, N., Ali, M.A. and Jalaludin, S. (1996): Antagonistic effects of intestinal *Lactobacillus* isolates on pathogens of chicken. Letters in Appl. Microbiol. 23: 67-71.
9. Juven, B.J., Schved, F. and Linder, P. (1992): Antagonistic compounds produced by a chicken intestinal strain of *Lactobacillus acidophilus*. J. Food. Protect. 55: 157-161.
10. Miyamoto, T., Horie,T., Fujiwara, T., Fukata, T., Sasai, K. and Baba, E. (2000): *Lactobacillus* flora in the cloaca and vagina of hens and its inhibitory activity against *Salmonella enteritidis* in vitro. Poultry. Sci. 79:7-11.
11. Schillinger, U. and Lücke, F.K. (1989): Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. Appl. Environ. Microbiol. 55:1901-1906.
12. Vuyst, D.L. and Vandamme, E.J. (1994): Antimicrobial potential of lactic acid bacteria . In: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and Applications. Edited by D.L. Vuyst and E.J. Vandamme. Blackie Academic & Professional. Glasgow, UK. PP: 91-142.