

ارزیابی فعالیت باکتریوسین تولید شده توسط باکتریهای اسیدلاکتیک جداسازی شده از فرآورده های لبنی در محیط *in situ*

زهرا حیدری^۱، ناصر قائمی^۲، محمد فائزی قاسمی^۳

۳. دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، دانشکده علوم، گروه میکروبیولوژی، لاهیجان، ایران، صندوق پستی: ۱۶۱۶

۲. دانشگاه تهران، پردیس علوم، ایران، گروه بیوتکنولوژی، تهران، ایران، صندوق پستی: ۶۴۵۵ - ۱۴۱۵۵

faezi_m@yahoo.com

چکیده

باکتریهای اسیدلاکتیک بطور وسیعی در طبیعت پراکنده هستند. این ارگانیسرها در طول تخمیر لاکتیک، موادی مانند اسیدهای آلی، دی استیل، پراکسید هیدروژن و باکتریوسین تولید می نمایند. باکتریوسینها مواد ضد میکروبی با ماهیت پروتئینی هستند که از رشد سویه های حساس جلوگیری می کنند. در این تحقیق، ۲۸ سویه باکتری اسید لاکتیک از فرآورده های لبنی برای آزمایش فعالیت ضد میکروبی، جداسازی شدند. فعالیت آنتاگونیسمی بوسیله آزمایش Agar Spot Test بررسی شد. فقط ۱۷ سویه از لاکتوباسیلها تولید مواد شبه باکتریوسین نمودند. برای استخراج باکتریوسین محلول رویی بوسیله سانتریفوژ محیط کشت مایع بدست آمد. هاله عدم رشد باکتریهای شناساگر که شامل ۱۰ سویه پاتوژن میکروبی در برابر محلول رویی لاکتوباسیلهای جداکننده بوسیله آزمایش Well Diffusion Assay بررسی شد. همچنین تأثیر باکتریهای اسید لاکتیک تولید کننده باکتریوسین بر سایر باکتریهای اسید لاکتیک نیز بررسی شد. بزرگترین قطر هاله عدم رشد بوسیله عصاره سویه ch5 با استافیلوکوکوس اورئوس به اندازه ۲۰ میلی متر و کمترین هاله عدم رشد بوسیله سویه d9 با انتروباکتر ائروژنز به اندازه ۱ میلی متر بدست آمد. بیشترین فعالیت در pH برابر با ۶/۵ - ۵/۵ و دوره انکوباسیون ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ - ۲۵ درجه سلسیوس، بدست آمد. فعالیت ضد میکروبی محلول رویی خالص شده با آنزیم کاتالاز ثابت، ولی بوسیله تیمار با آنزیم های پروتئاز مانند پپسین، این فعالیت ضد میکروبی از بین رفت.

کلمات کلیدی: اسیدلاکتیک، باکتریوسین، فعالیت ضد میکروبی.

مقدمه

باکتریهای اسید لاکتیک به طور طبیعی در مواد خام مثل شیر، گوشت و حتی در دستگاه گوارش حیوانات و انسانها نیز وجود دارد (۸ و ۱۲). تخمیر اسید لاکتیک که توسط این باکتریها انجام می شود، نقش مهمی در تولید فرآورده های لبنی، نوشیدنی ها، سوسیس، ترشی ها و شوری ها دارد (۱۲). گزارشات متعدد نشان می دهد که اغلب باکتریهای اسید لاکتیک، تولید موادی می نمایند که از رشد میکرو ارگانیزم های بیماریزا جلوگیری می نماید (۱۳). باکتریهای اسید لاکتیک (Lactic Acid Bacteria) تولید اسیدهای آلی، پراکسید هیدروژن، دی استیل، ترکیبات ضد قارچی مثل اسیدهای چرب و موادی به نام باکتریوسین می نمایند (۸). باکتریوسین ها توسط باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی تولید می شوند (۷). باکتریوسین ها ترکیبات پروتئینی با خاصیت ضد میکروبی هستند که باعث جلوگیری از رشد سویه های حساس می شوند (۹) و در این زمینه لاکتوباسیلوس ها از اهمیت ویژه ای برخوردار هستند. لاکتوباسیلوسها جزء فلور نرمال روده، دستگاه تناسلی زنان، دهان و... بوده و تولید باکتریوسین می نمایند. این باکتریها نقش مهمی در کنترل میکرو فلورای ناخواسته و نامطلوب در روده داشته و قادر به جلوگیری از افزایش باکتریهای بیماریزا بوسیله تولید متابولیت های ضد میکروبی می باشند. آنها می توانند به عنوان مواد نگهدارنده زیستی و طبیعی مطرح باشند (۶ و ۷) آزمایشات متعدد نشان داده است که سویه های لاکتوباسیلوس از رشد سویه های بیماریزا موجود در دستگاه گوارش جلوگیری می نماید.

در تحقیق انجام شده توسط Savadogo & Cheik (2004) فعالیت ضد میکروبی باکتریهای

اسید لاکتیک بر علیه نژادهای استاندارد *Bacillus cereus*، *Enterococcus fecalis*، *E. coli*، *Staphylococcus aureus* بررسی کردند و هاله عدم رشد ایجاد شده از ۸ تا ۱۲ میلی متر بود (۹). بعلاوه لاکتوباسیلوسها با توجه به تولید باکتریوسینها دارای خواصی مانند فعالیت ضد کلسترول، ضد تومور، جذب ویتامینهای گروه B و افزایش پاسخ ایمنی می باشند (۵). لاکتوباسیلوسها جزء پروبیوتیک ها می باشند. پروبیوتیک یک مکمل غذایی میکروبی زنده است که در اصلاح تعادل میکروبی روده مؤثر می باشد (۷). میکروارگانیسم های مورد استفاده بعنوان پروبیوتیک شامل انواع لاکتوباسیلوسها، بیفید و باکتریوم ها، استرپتوکوکوس سالیواریوس زیر گونه ترموفیلوس، انتروکوکوس فکالیس و فاسیوم و ... می باشند (۷). استفاده از پروبیوتیک های باکتریهای اسید لاکتیک LAB بهترین انتخاب، نه فقط برای بالا بردن تعداد میکروبیهای مفید در فرآورده های غذایی، بلکه بعنوان میکروبیهای سازگار طبیعی با محیط روده می باشند (۷). ترکیبات ضد میکروبی تولید شده توسط LAB، آنها را آماده رقابت با سایر میکروارگانیزم ها می نماید. این باکتریها مقاوم به اسید، لیزوزیم بزاق، آنزیم های موجود در شیره معده یا روده و نمک صفاوی می باشند. پروبیوتیک ها بوسیله رقابت در غذا و سایت چسبندگی، تولید مواد ضد میکروبی و تحریک سیستم ایمنی باعث سرکوب باکتریهای بیماریزا می شوند. سویه های LAB موجود در فرآورده های لبنی، دارای استفاده با سابقه تاریخی طولانی مدت هستند (۷). هدف از این تحقیق ارزیابی فعالیت ضد میکروبی باکتریهای اسید لاکتیک از فرآورده های لبنی تولید شده صنعتی یا

و غیر بیماریزا بود که این کار با روش Agar spot test انجام گرفت. در این روش، کشت های ۲۴ ساعته سویه هایی که باید برای تولید ترکیبات ضد میکروبی تست شوند، در مرکز پلیت حاوی محیط کشت MRS، کشت داده شد و سپس ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس انکوبه گردیدند. سپس به اندازه ۵۰۰ میکرولیتر از محیط کشت مایع سویه های شناساگر که باید برای حساسیت تست شوند، (به اندازه $1/5 \times 10^8$ سلول یعنی کدورت ۰/۵ مک فارلند) به ۷ میلی لیتر از محیط کشت آگاردار مناسب مانند BHI یا Muller Hinton agar اضافه شد و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، هاله عدم رشد اطراف کلنی لاکتوباسیلوسها بررسی گردید (۱۰).

سویه های استاندارد جهت انجام فعالیت آنتاگونیستیک از مرکز کلکسیون قارچ ها و باکتریهای صنعتی عفونی واقع در سازمان پژوهشهای علمی - صنعتی ایران تهیه شدند که عبارتند از:

- 1- *E.coli* PTCC 1399
- 2- *Pseudomonas aerogenosa* PTCC 27853
- 3- *Staphylococcus aureus* PTCC 1431
- 4- *Enterobacter aerogenese* PTCC 1221
- 5- *Klebsiella pneumoniae* PTCC 1053
- 6- *Serratia marcescens* PTCC 1111
- 7- *Bacillus cereus* PTCC 1247
- 8- *Bacillus subtilis* PTCC 1023
- 9- *Proteus vulgaris* PTCC 1079
- 10- *Salmonella typhi* PTCC 1639

محلی علیه سویه های مختلف بیماریزا که اطلاعات کمی در این زمینه در ایران موجود می باشد.

مواد و روشها

جداسازی لاکتوباسیلوس ها

برای جداسازی باکتریهای اسیدلاکتیک از مواد لبنی، این مواد بصورت تصادفی از فروشگاههای مختلف تهیه شدند. فرآورده های لبنی بصورت صنعتی یا محلی (خانگی) بودند. در حدود ۱۰۰ نمونه مواد لبنی که ۵۰ درصد آن صنعتی و ۵۰ درصد آن محلی بودند، بررسی شدند. فرآورده ها شامل ماست، پنیر، دوغ معمولی، دوغ گازدار بودند. برای جداسازی لاکتوباسیلوس ها کشت فرآورده های لبنی روی محیط کشت اختصاصی MRS Agar (De Man, Rogosa & Sharpe) کشت انجام شد. کشت نمونه ها با انتقال مستقیم نمونه ها توسط فیلدو پلاتین بر روی محیط کشت آگاردار با تکنیک (Quadrant streak) انجام شد. بعد از کشت، انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت در شرایط ناچیز اکسیژن (Microaerophile) انجام شد. برای جلوگیری از رشد مخمر به محیط کشت بعد از اتوکلاو، آنتی بیوتیک نیستاتین اضافه شد. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون از نمونه ها لام تهیه شد و رنگ آمیزی گرم انجام گرفت. تست حرکت و تست کاتالاز نیز برای اثبات وجود لاکتوباسیلوس روی نمونه ها انجام گرفت.

بررسی خاصیت آنتاگونیسم لاکتوباسیلوس ها

مرحله دوم کار بررسی وجود آنتاگونیسم بین لاکتوباسیلوسهای جدا شده و میکروارگانیزم های بیماریزا

بررسی تولید باکتریوسین

سویه های تولیدکننده باکتریوسین در محیط کشت مایع MRS به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس کشت داده شد و سپس محلول رویی بوسیله سانتریفوژ محیط کشت بدست آمد (۱۵ دقیقه، ۸۰۰۰ rpm) و سپس به این محلول سولفات آمونیوم ($\frac{W}{V} \%$ ۴۰) اضافه شد و پس از هم زدن به مدت یک ساعت در دمای ۴ درجه سلسیوس، دوباره این محلول سانتریفوژ شد (مدت ۳۰ دقیقه، ۱۰۰۰۰ rpm). به رسوب حاصله با فرسفات ۵٪ مولار با pH ۸/۶ به اندازه ۵۰۰ میکرولیتر اضافه گردید. این pH عصاره را به ۶/۵-۷ رسانده و برای خنثی کردن اثر پراکسید به آن آنزیم کاتالاز ($\frac{mg}{ml}$ ۲) اضافه گردید. این ماده به عنوان باکتریوسین نیمه خالص شده برای آزمایشات بعدی مورد استفاده واقع شد.

برای بررسی فعالیت باکتریوسین از روش Well Agar Diffusion استفاده گردید (۱۰). در این روش ۷ میلی لیتر از آگار ذوب شده نرم با ۰/۳-۰/۵ میلی لیتر از کشت یک روزه سویه های شناساگر مخلوط شد و سپس در پلیت ریخته شد. پس از سرد و منجمد شدن، چاهک هایی به قطر ۳-۵ میلی متر به فواصل در پلیتها حفر گردید. برای جلوگیری از پخش شدن مواد در زیر پلیت، ته هر کدام از چاهک ها با یک قطره آگار مسدود گردید. سپس محلول رویی خالص شده بدست آمده را به اندازه ۵۰ میکرولیتر در داخل چاهک ها ریخته و ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس انکوبه و سپس هاله عدم رشد بررسی گردید (۱۰).

بررسی حساسیت باکتریوسین به NaCl، گرما

و pH

در این مرحله تولید باکتریوسین در غلظت های مختلف NaCl و یا در pH های مختلف و یا مقاومت باکتریوسین نسبت به دمای مختلف بررسی شد. درصد نمک NaCl در محیط کشت تغییر داده شد و سپس هاله عدم رشد بررسی گردید. pH محیط کشت مایع لاکتوباسیلوسها تغییر داده شد و در آزمایش دیگر محلول رویی محیط کشت در دمای مختلف قرار گرفت و سپس میزان هاله عدم رشد بررسی گردید.

بررسی اثر منابع کربن و نیتروژن در تولید

باکتریوسین

منابع کربن و نیتروژن در محیط کشت تغییر داده شد و تولید باکتریوسین با تغییر میزان هاله عدم رشد بررسی گردید. یعنی از روش تغییر یک عامل در یک زمان استفاده شد. منابع نیتروژن شامل عصاره گوشت، عصاره مخمر، پپتون سویا، پپتون گوشت و منابع کربن شامل گلوکز، گزیلوز، گالاکتوز، فروکتوز، سوکرز و ... بودند.

بررسی حساسیت به کاتالاز و پروتاز

برای این منظور به میزان $2 \frac{mg}{ml}$ آنزیم های مورد نظر به محیط کشت مایع لاکتوباسیلوسها اضافه گردید و سپس یک ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد و بعد هاله عدم رشد بررسی گردید. برای بررسی اثر آنزیم پروتاز، از آنزیم پپسین استفاده شد.

نتایج

از ۱۰۰ نمونه مواد لبنی، ۲۸ سویه لاکتوباسیلوس جداسازی گردید که ۱۱ سویه مربوط به نمونه های محلی و ۱۷ سویه مربوط به نمونه های صنعتی بودند. در حدود ۵۴ درصد سویه ها از پنیر، ۲۵ درصد از دوغ گازدار، ۱۴ درصد از ماست و ۷ درصد از دوغ معمولی جداسازی گردیدند.

بعد از کشت در محیط MRS، انکوباسیون در دمای ۳۷-۳۵ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت، کلنی های سفید تا قهوه ای روشن لاکتوباسیلوس ها به اندازه ۱/۵-۱ میلی متر مشاهده شد. برای اثبات وجود لاکتوباسیلوس ها، رنگ آمیزی گرم، تست کاتالاز و حرکت انجام گرفت و باسیلهای گرم مثبت، بدون اسپور، حرکت منفی و کاتالاز منفی جداسازی گردیدند (جدول ۱). پس از جداسازی، فعالیت ضد میکروبی سویه های جدا شده بر علیه ۱۰ سویه پاتوژن مورد بررسی قرار گرفت. فقط ۱۷ سویه از لاکتوباسیلهای جداسازی شده فعالیت آنتاگونیسم بر علیه سویه های شناساگر استاندارد نشان دادند. شکل ۱ هاله عدم رشد ایجاد شده توسط لاکتوباسیلوسها را روی سویه های استاندارد نشان می دهد و شکل ۲ هاله عدم رشد سویه ch5 را روی سرایشیا مارسسنس نشان می دهد. در مرحله بعد با استفاده از Well Diffusion Assay میزان هاله عدم رشد سویه های لاکتوباسیل بر علیه سویه های بیماریزا و همچنین سایر سویه های اسیدلاکتیک (غیر تولیدکننده باکتریوسین) بررسی گردید (جدول ۲ و ۳).

بیشترین هاله عدم رشد توسط سویه Ch5 برای استافیلوکوکوس اورئوس به اندازه ۲ سانتی متر و

کمترین هاله عدم رشد توسط سویه d9 برای انتروباکتر ائروژنز به اندازه ۱ میلی متر بود.

بررسی منابع کربنی مشخص کرد که بعد از گلوکز، هاله عدم رشد یا ریبوز و گزیلوز بهتر از سایر منابع بود.

بعد از بررسی منابع مختلف نیتروژن، مشخص شد که تولید باکتریوسین با Soy bean peptone بهتر از سایر منابع بود. در بررسیهای انجام یافته مشخص شد که لاکتوباسیلوسهای جدا شده از لبنیات قادر به رشد و تولید باکتریوسین در ۶ درصد نمک NaCl بودند. همچنین در محدوده pH بین ۲ تا ۱۰، لاکتولاسیلوسها قادر به رشد و تولید باکتریوسین بودند. ماده ضد میکروبی تولید شده تا دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه دارای فعالیت بود. بیشترین فعالیت در دمای ۳۰-۲۵ درجه سلسیوس، مدت انکوباسیون ۴۸ ساعت و محدوده pH بین ۶/۵-۵/۵ بدست آمد. در بررسی اثر آنزیمها بر روی ماده ضد میکروبی موجود در ماده رویی بدست آمده، مشخص شد که آنزیم کاتالاز هیچ تأثیری در هاله عدم رشد ایجاد نکرد ولی با اثر دادن آنزیم پپسین بر عصاره بدست آمده، هاله عدم رشد، کاملاً از بین رفت و این موضوع نشاندهنده ماهیت پروتئینی ماده ضد میکروبی تولید شده توسط لاکتوباسیلهای جداسازی شده از لبنیات است.



شکل ۱: هاله عدم رشد ایجاد شده توسط لاکتوباسیلوسهای جداسازی شده بر علیه سویه های استاندارد



شکل ۲: هاله عدم رشد ایجاد شده توسط سویه ch5 (شماره ۱) بر علیه سرایشا مارسسنس به روش Agar Well Diffusion

جدول ۱: لاکتوباسیلوسهای جداسازی شده از مواد لبنی و مشخصات هر یک از آنها

| رشد در ۴۵ °C | رشد در ۱۵ °C | رشد در ۶/۵ درصد NaCl | حرکت | کاتالاز | واکنش گرم | اندازه کلنی | رنگ کلنی | منبع | مشخصه سویه |
|--------------|--------------|----------------------|------|---------|-----------|-------------|--------------|-----------------------|------------------|
| + | + | + | - | - | + | ۱ mm | سفید | پنیر پاستوریزه ليقوان | Ch ₁ |
| + | + | + | - | - | + | ۱ mm | قهوه ای روشن | آب پنیر محلی | Ch ₂ |
| + | + | + | - | - | + | ۱ mm | سفید | آب پنیر محلی | Ch ₅ |
| + | + | + | - | - | + | ۱ mm | سفید | پنیر پاستوریزه | Ch ₆ |
| + | + | + | - | - | + | ۱ mm | سفید | آب پنیر پاستوریزه | Ch ₉ |
| + | + | + | - | - | + | ۱ mm | سفید | پنیر ليقوان | Ch ₁₀ |
| + | + | + | - | - | + | ۱ mm | قهوه ای روشن | پنیر ليقوان | Ch ₁₁ |
| + | + | + | - | - | + | ۱ mm | سفید | پنیر پاستوریزه | Ch ₁₂ |
| + | - | + | - | - | + | ۱ mm | سفید | دوغ گاز دار پاستوریزه | d ₁ |
| + | - | + | - | - | + | ۱/۵mm | سفید | دوغ گاز دار پاستوریزه | d ₇ |
| + | + | + | - | - | + | ۱ mm | سفید | دوغ معمولی پاستوریزه | d ₈ |
| + | + | + | - | - | + | ۱ mm | سفید | دوغ معمولی پاستوریزه | d ₉ |
| + | - | + | - | - | + | ۱/۵mm | سفید | ماست محلی | y ₃ |
| + | + | + | - | - | + | ۱/۵mm | سفید | ماست محلی | y ₄ |

جدول ۲: نتایج حاصل از بررسی اثر باکتریوسین تولید شده توسط لاکتوباسیل‌های جداسازی شده بر علیه ۱۰ سویه پاتوژن استاندارد (اعداد داخل پرانتز هاله عدم رشد بر حسب میلی متر)

| <i>S.typhi</i> | <i>P.vulgaris</i> | <i>B.subtilis</i> | <i>B.cereus</i> | <i>S.marcescens</i> | <i>K.pneumoniae</i> | <i>E.aerogenes</i> | <i>S.aureus</i> | <i>P.aerogenosa</i> | <i>E.Coli</i> | سویه استاندارد سویه جدا شده |
|----------------|-------------------|-------------------|-----------------|---------------------|---------------------|--------------------|-----------------|---------------------|---------------|--------------------------------|
| - | - | - | ۴-۵ | ۵-۶ | - | - | - | ۵-۶ | - | Ch ₁ |
| - | - | - | ۲-۳ | ۵-۶ | - | ۴-۵ | ۲-۳ | ۲-۳ | ۶-۷ | Ch ₂ |
| ۳-۴ | ۲-۳ | ۲-۳ | - | ۴-۵ | ۲-۳ | ۲-۳ | ۲-۳ | ۲-۳ | ۴-۵ | Ch ₄ |
| ۶-۷ | ۴-۵ | ۷-۸ | ۴-۵ | ۱۰ | ۸-۹ | - | ۲۰ | ۳-۴ | ۴-۵ | Ch ₅ |
| ۲-۳ | - | - | ۶-۷ | - | - | - | ۴-۵ | - | - | Ch ₁₀ |
| ۲-۳ | - | - | ۴-۵ | - | - | - | ۲-۳ | - | - | Ch ₁₄ |
| ۲-۳ | - | - | - | - | - | ۶-۷ | - | ۳-۴ | ۴-۵ | Ch ₁₅ |
| ۴-۵ | ۲-۳ | ۳-۴ | ۲-۳ | ۶-۷ | ۴-۵ | - | ۷-۸ | ۴-۵ | ۶-۷ | d ₁ |
| ۷-۸ | ۶-۷ | ۵-۶ | ۵-۶ | ۷-۸ | ۶-۷ | - | ۲-۳ | ۵-۶ | ۷-۸ | d ₂ |
| ۲-۳ | ۴-۵ | ۶-۷ | ۷-۸ | ۶-۷ | ۴-۵ | - | ۴-۵ | ۵-۶ | ۷-۸ | d ₃ |
| ۴-۵ | ۶-۷ | ۶-۷ | ۱۰ | ۶-۷ | ۲-۳ | - | ۶-۷ | ۳-۴ | ۷-۸ | d ₄ |
| ۷-۸ | ۷-۸ | ۴-۵ | ۹-۱۰ | ۷-۸ | ۴-۵ | - | ۷-۸ | ۲-۳ | ۶-۷ | d ₅ |
| ۲-۳ | ۷-۸ | ۴-۵ | ۷-۸ | ۴-۵ | ۲-۳ | - | ۷-۸ | ۳-۴ | ۶-۷ | d ₆ |
| - | - | ۴-۵ | ۱-۲ | ۶-۷ | ۴-۵ | ۱-۱/۵ | ۴-۵ | ۴-۵ | - | d ₉ |
| - | - | - | - | ۲-۳ | - | ۴-۵ | ۶-۷ | ۴-۵ | ۲-۳ | y ₃ |
| - | - | - | - | ۴-۵ | - | ۲-۳ | ۱-۲ | ۱-۲ | ۲-۳ | y ₄ |

جدول ۳: نتایج حاصل از بررسی فعالیت ضد میکروبی برخی از لاکتوباسیل‌های تولید کننده باکتریوسین بر علیه سویه های غیر تولید کننده باکتریوسین

| y2 | y1 | d8 | Ch13 | Ch12 | Ch11 | Ch9 | Ch8 | Ch7 | Ch6 | Ch3 | غیر تولید کننده باکتریوسین تولید کننده باکتریوسین |
|----|----|----|------|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | Ch ₁ |
| - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | Ch ₅ |
| - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | Ch ₁₀ |
| - | - | - | + | - | + | - | - | - | + | + | Ch ₁₄ |
| - | + | + | + | + | + | - | - | - | - | + | Ch ₁₅ |
| + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | d ₁ |
| + | - | + | + | - | + | + | + | + | - | - | d ₅ |
| - | - | + | - | + | - | - | + | + | + | + | d ₆ |
| + | - | + | + | - | + | - | - | - | + | + | d ₇ |
| + | + | + | + | - | - | - | + | + | + | + | d ₉ |
| + | + | - | - | - | + | - | + | + | + | + | y ₃ |
| + | + | + | - | + | + | - | - | - | + | - | y ₄ |

بحث

باکتریهای اسید لاکتیک که به طور معمول از مواد لبنی جدا می شوند، کاربرد فراوانی در ایجاد تعادل میکروبی و افزایش میکروبهای مفید در غذاها دارند. این باکتریها قادر به تحمل شرایط سخت مثل نمک، کمبود اکسیژن، اسیدیته و ... می باشند. همچنین آنها با تولید مواد ضد میکروبی توانایی مقابله با پاتوژنهای حساس را دارا می باشند. باکتریوسین تولید شده توسط این باکتریها می تواند جایگزین مناسبی برای نگهدارنده های شیمیایی در غذاهای آماده باشد. Nisin اولین باکتریوسینی است که بصورت تجاری مورد استفاده قرار گرفت. این ماده با نام تجاری Nisaplin در بیش از ۵۰ کشور دارای مجوز بعنوان افزودنی غذایی می باشد (۱۵,۹). در این مطالعه مشخص شد که متابولیت های خارج سلولی باکتریهای اسید لاکتیک (LAB) که یکی از آنها باکتریوسین می باشد، قادر به جلوگیری از رشد باکتریهای بیماریزا بودند. مشابه این یافته ها توسط Kivance (1990) بر روی باکتریهای اسید لاکتیک انجام شد و نتیجه آن بود که این باکتریها از رشد برخی از باکتریهای بیماریزا جلوگیری می کنند (۳). در این مطالعه، باکتریهای اسید لاکتیک در محدوده pH بین ۲ تا ۱۰ قادر به رشد و فعالیت بودند، یعنی در شرایط اسیدی در دستگاه گوارش قادر به فعالیت هستند. مشابه این یافته توسط Hood & Zottola (1998) انجام یافته است (۲). طبق نتایج بدست آمده در این تحقیق، میزان هاله عدم رشد ایجاد شده توسط مواد باکتریوسینی حاصل از لاکتوباسیلوس ها روی سویه های بیماریزای استاندارد بطور متوسط بصورت زیر است:

انتروباکتر آئروجنزین ۷-۱ میلیمتر، کلبسیلا پنومونیه بین ۹-۲ میلیمتر، سراسیا مارسنس بین ۱۰-۲ میلیمتر، باسیلوس سرئوس بین ۱۰-۲ میلیمتر، باسیلوس سوبتیلیس بین ۸-۲ میلیمتر، پروتئوس ولگاریس بین ۸-۲ میلیمتر و سالمونلا تیفی بین ۸-۲ میلیمتر.

در تحقیق مشابه که بوسيله Savadogo & Cheik (2004) انجام شد، میزان هاله عدم رشد بدست آمده بوسيله سويه های بیماریزا با سويه های لاکتوباسیلوس جدا شده از لبنیات بدین صورت بود: ایکولای ۹ میلیمتر، باسیلوس سرئوس ۱۰ میلیمتر و استافیلوکوکوس اورئوس ۹ میلیمتر (۵).

در تحقیق مشابه دیگر توسط Kumsung et al در کشور تایلند انجام شد، اثر ممانعت کنندگی باکتریهای اسید لاکتیک جدا شده از غذاهای تخمیری بر روی بعضی باکتریهای بیماریزا بررسی شد. هاله ممانعت از رشد برای باسیلوس سرئوس ۲۰-۱۷، برای باسیلوس سوبتیلیس ۱۷-۱۴، ایکولای ۱۸/۵-۱۷، سودوموناس آئروجنوزا ۱۴-۱۲، استافیلوکوکوس اورئوس ۱۹-۱۵ و برای سالمونلا تیفی ۱۵/۵-۱۳/۵ میلیمتر بوده است (۴).

اخیراً نیز مطالعات فراوانی در مورد سودمندی باکتریوسین LAB در کنترل باکتریهای بیماریزا صورت گرفته است. در مطالعه ای که توسط Castellano & Holzapfel (2004) انجام شده، باکتریهای اسید لاکتیک تولید کننده باکتریوسین، می توانند بعنوان نگهدارنده گوشت مورد استفاده قرار گیرند (۱). مطالعه دیگری نیز اخیراً توسط Tereza & Lima در سال 2005 با عنوان باکتریوسین ها، شناسایی، مکانیسم عملکرد و پتانسیل استفاده آنها در فرآورده های غذایی صورت گرفته است (۱۴). در

3. Kivance, M., 1990. Antagonistic action of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 34: 273-277.
4. Kumsung, Y., Sookkhee, S., Preuksakorn, S., 2007. In vitro antimicrobial activities the symbiotic cultures. *Proceedings of the 7th Grad-research conference*. Surat. Thani, Thailand.
5. Nowroozi, J., Noruzi, Mirzaii, M., 2004. Study of lactobacillus as probiotic bacteria. *Iranian J Publ Health*. 33: 1-7.
6. Oyetayo, V.O. 2004. Phenotypic characterization and assessment of the inhibitory potential of lactobacillus isolates from different sources. *African Journal of Biotechnology*. 3(7): 355 – 357.
7. Somro, A. 2002. Role of lactic acid bacteria in food preservation and Human Health-A Review. *Pakistan Journal of Nutrition*. (1): 20-24.
8. Savadogo, A., 2006. Bacteriocins and Lactic acid bacteria – a minireview. *African Journal of Biotechnology*. 5(9): 678-683.
9. Savadogo, A., Cheik, A., 2004. Antimicrobial activities of lactic acid bacteria strains isolated from Burkina faso fermented milk. *Pakistan Journal of Nutrition*. 3(3): 174-179.
10. Schillinger, U., 1989. Antibacterial activity of lactobacillus sake isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*. 23: 1901-1906.
11. Settanni, L., Massitti, O., 2005. In situ activity of bacteriocin – producing lactococcus lactis strain. *Journal of Applied Microbiology*. 99: 670.
12. Tserovska, L., Stefanova, S., Yordanova, T., 2002. Identification of lactic acid bacteria isolated from kатыk, goat's milk and cheese. *Journal of Culture Collections*. 3: 48-52.

کشور ما نیز مطالعاتی در این زمینه صورت گرفته است که یکی از آنها مطالعه لاکتوباسیل ها بعنوان پروبیوتیک بوده است. در این مطالعه نیز اثر باکتریوسین باکتریهای جداسازی شده از سوسیس بر روی باکتری استافیلو کوکوس اورئوس بررسی شده است، که در آن از ۲۸ سویه لاکتوباسیل جدا شده، ۴ سویه قادر به مهار رشد استافیلوکوک بودند (۵). در این تحقیق، اثرات باکتریوسین باکتریهای جداسازی شده از لبنیات بر باکتریهای بیماریزای حساس بررسی شد، لذا از این قابلیت باکتریهای اسید لاکتیک می توان بعنوان نگهدارنده طبیعی بهره برد. بنابراین پیشنهاد می شود که مطالعات بعدی باید بیشتر بر پایه نحوه بکارگیری این باکتریها و باکتریوسین تولید شده توسط آنها در فرآورده های غذایی صورت گیرد و همچنین گونه های لاکتوباسیل های بدست آمده از فرآورده های لبنی بوسیله روشهای نوین تشخیصی مورد شناسایی قرار گیرد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از کارشناس محترم آزمایشگاه میکروبیولوژی سرکار خانم مهندس داستان، که در انجام این تحقیق ما را یاری و راهنمایی نمودند، بسیار سپاسگزاریم.

منابع

1. Castellano, P.H., Holzappel, W.H. 2004. The control of *Listeria innocua* and *Lactobacillus sakei* in broth and meat. *Food Microbiol*. 21: 291-298.
2. Hood, S., Zottola, M., 1998. Effect of low pH on the ability of *Lactobacillus acidophilus* to survive and adhere to human intestinal cell. *J. Food Sci*. 53: 1514-1516.

13. Tadesse, G., Ephraim, E., 2000. Assessment of the antimicrobial activity of lactic acid bacteria. *Internet Journal of Food safety*. (5): 13-20.
14. Tereza, E., Lima, D., 2005. Bacteriocins, nomenclature, detection, mechanism of action and potential use in poultry production. *Journal of food Agriculture and Environment*. 3(2):62-66.
15. Vanderberg, P.A., 1993. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiol Reviews*. 12:221-238.