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

جداسازی و غربالگری باکتری‌های اسید لاکتیک از ماست گاومیش و بررسی فعالیت پروبیوتیکی آن

فاطمه مصدق*[1]، زهیر حشمتی پور[2]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی، میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی

۲- استادیار میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی

چکیده

باکتری‌های پروبیوتیک اثرات مفیدی بر سلامت انسان دارند، استفاده از فرآورده‌های لبنی صنعتی نسبت به سنتی منجر به افزایش احتمال حذف باکتری‌های پروبیوتیک می‌شود. هدف از این مطالعه، جداسازی لاکتوباسیل ها و بررسی پروبیوتیکی آن می‌باشد در این مطالعه که در سال ۱۳۹۴ انجام شده است، نمونه ماست گاومیش تهیه و با استفاده از محیط کشت اختصاصی MRS agar و MRS broth، لاکتوباسیل را در شرایط بیهوازی جدا کرده و با روش‌های غربالگری انتخابی، تست کاتالاز، تست گرم و حرکت، لاکتوباسیل انتخاب و توسط 16s rRNA تأیید گردید. پس از جداسازی، تست آنتی بیوتیکی، pH و نمک صفراوی برای مشخص شدن پتانسیل پروبیوتیکی آن بر روی آن انجام گردید. لاکتوباسیل جدا شده به آنتی بیوتیک ها اعم از نیتروفورانتوتین، کلرامنفیکل، کلیندامایسین، پنی سیلین، تتراسایکلین، سیپروفلوکساسین، پیپراسیلین، سفپیم، کوتریماکسازول، جنتاماسین، لووفلوکساسین، آزترونام حساس بوده ولی نسبت به آنتی تیک‌هایی مانند توبراماسیین، باسی تراسین، ونکوماسیین، کاناماسین، نالیدیکسیک اسید واکنشی نشان نداده ونتایج بررسی رشد در pH های مختلف ۴ و ۵ و ۶ و ۷ نشان داد که در pH ۴ رشد نکرده ولی در ۵ و ۶ و ۷ رشد داشته یعنی در pH اسیدی قادر به رشد نبوده وتحمل اسیدی این سویه به شرایط معده ای بسیار پایین می‌باشد و در نهایت با افزودن ۰/۳ گرم نمک صفراوی به محیط کشت اختصاصی و رشد در ساعت‌های مختلف در زمان‌های ۴۵ دقیقه،۲،۴، ۶،۸ و ۲۴ ساعت با توجه به جذب نوری تا زمان ۴ ساعت رشد داشته ولی از ۴ ساعت به بعد از میزان جذب کاسته شده که نشان دهنده پایداری این سویه طی این زمان در داخل بدن می‌باشد.

کلمات کلیدی: لاکتو باسیل، ماست، باکتری پروبیوتیک، گاومیش

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

مقدمه

باکتری‌های اسیدلاکتیک به عنوان بزرگ‌ترین گروه تشکیل دهنده پروبیوتیک‌ها بوده و این باکتری‌های پروبیوتیک میکروارگانیسم‌های غیر بیماریزا و مستعدی می‌باشند که در صورت فراهم شدن آن‌ها به میزان کافی اثرات مفیدی روی میزبان می-شوند (۱ن). این باکتری‌های گرم مثبت، فاقد اسپور و میکروآیروفیلیک کروی یا میله‌ای می‌باشند که از تخمیر کربوهیدرات‌ها در این باکتری‌ها اسیدلاکتیک به عنوان یک محصول نهایی تولید می‌شود. یکی از مهم‌ترین کاربردهای باکتری‌های اسید لاکتیک تولید فرآورده‌های پروبیوتیک می‌باشد که بزرگ‌ترین گروه باکتری موجود در این محصولات را تشکیل می‌دهد (۳ ف). تولید پلی‌لاکتیک‌اسید (*Poly lactic acid*)، غذاهای تخمیری، نوشیدنی‌های تخمیری، افزودنی‌ها، اگزوپلی‌ساکارید، باکتریوسین، اسید-لاکتیک میکروبی و افزایش کیفیت و ماندگاری محصولات غذایی بخشی از کاربردهای مهم باکتری‌های اسیدلاکتیک است که همه این باکتری‌ها را به عنوان گروه بسیار مهم در میکروبیولوژی صنعتی و پزشکی مطرح می‌کنند (۴۸ ف). این میکروارگانیسم‌ها روی سلامت انسان و جانوران تأثیر بسیار خوبی داشته از جمله لاکتوباسیل و بیفیدوباکترها پروبیوتیک‌هایی هستند که توانایی زیادی در جلوگیری از بروز سرطان روده دارند. از خواص بیولوژیک این باکتری‌ها می‌توان به فعالیت ضدمیکروبی، ضدقارچی، ضدویروسی، و ویژگی‌های ضد سرطانی، ضد تجمع پلاکت و ویژگی آنتی‌اکسیدانی می‌توان اشاره کرد (مقاله مهناز کاظمی پور ۲۰۱۲). باکتری‌های اسیدلاکتیک و فرآورده‌های آن‌ها کاربردهای بسیاری در صنایع مختلف از جمله صنایع گوشتی، کشاورزی، نوشیدنی‌ولبنی به عنوان استارترفرآورده‌های لبنی صنعتی داشته واین گروه از پروبیوتیک‌ها به عنوان یک مانع خوب و مؤثر بر علیه عفونت‌های میکروبی و تأثیر درمان زیستی با توجه به داشتن چندین فاکتور مهم به شمار می‌آیند. اثر نگهدارندگی باکتری‌های اسیدلاکتیک بدلیل تولید اسیدهای آلی مثل اسید لاکتیک، اسید استیک و تولید مواد ضد میکروبی، فنیل لاکتیک (*Phenyllactic*)، P-OH اسیدهای فنیل لاکتیک (*P-OHPhenyllactic* acid)، کاپروئیک اسید (*Capoic* acid) یا رئوترین (*Reuterin*) می‌باشد. بنابراین این باکتری‌ها و فرآورده‌های آن‌ها را می‌توان به عنوان نگهدارنده‌های زیستی به کار گرفت.

مواد وروش

ابتدا نمونه ماست تهیه شده از شیر گاو میش را درمحیط اختصاصی MRS براث در شرایط کاملاً بیهوازی بمدت ۴۸ ساعت در جار بیهوازی در دمای ۳۷ درجه انکوباسیون می‌کنیم سپس از این محیط وارد محیط اختصاصی MRS آگار کرده ودوباره در شرایط بیهوازی انکوبه می‌کنیم اینکار را ادامه داده تا لاکتو باسیل مورد نظر را جدا سازی کنیم باکتری حاصله را رنگ آمیزی گرم می‌کنیم تا باسیل گرم منفی در زیر میکروسکوپ دیده شود سپس تست حرکت توسط محیط کشت SIM انجام داده که بیحرکت می‌باشد ونیز تست کاتالاز که آن هم کاتالاز منفی است بر روی این لاکتو باسیل انجام می‌دهیم.

تست آنتی بیوگرام

در مرحله بعدی تست آنتی بیوگرام در محیط اختصاصی MRS آگار انجام می‌دهیم به اینصورت که ابتدا کشت سفره ای از لاکتو باسیلی که در محیط غنی شده رشد کرده ومعادل نیم مک فارلند رسیده را بر روی محیط کشت MRS آگار انجام داده و دیسک‌های آنتی بیوتیک را در نقاط مشخص برروی پلیت حاوی محیط کشت قرار می‌دهیم که این آنتی بیوتیکها اعم از نیتروفورانتوین ۲۰ میلی متر هاله داده و کلرامفنیکل ۲۰ میلی متر، پنی سیلین ۱۰ میلی متر، کلیندامایسین ۲۵ میلی متر، تتراسایکلین ۲۰ میلیمتر، سیپرو فلوکساسین ۱۸ میلی متر، پیپراسیلین ۳۷ میلیمتر، Tigecyciline ۲۷ میلی متر، سفپیم ۲۷ میلی متر،

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

کوتریماکسازول ۱۵ میلی متر، جنتامایسین ۱۹ میلی متر، لووفلو کساسین ۱۷ میلی متر، آزترونام ۱۸ میلیمترهاله عدم رشد نشان داده ولی توبرامایسین وباسیتراسین، ونکومایسین، نالیدیکسیک اسید و کانامایسین هاله ای ندادند.

بررسی تأثیر نمک صفراوی بر رشد لاکتوباسیل

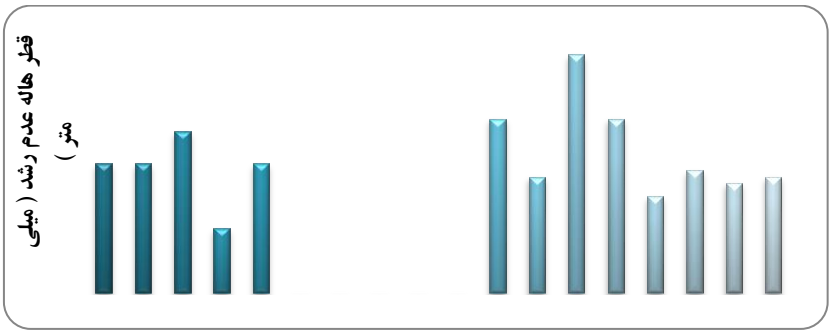
در ابتدا ۱۰۰ سی سی از محیط کشت MRS براث که حاوی ۰/۳ گرم نمک صفراوی می‌باشد را در ۱۰ لوله تقسیم و اتوکلاو می‌کنیم ودر ۵ لوله یک لوپ از لاکتو باسیل و ۵ لوله به عنوان شاهد در جار بیهوازی گذاشته ودر زمانهای ۴۵ دقیقه و ۲ ساعت و ۴ و ۶ و ۸ ونیز ۲۴ ساعت توسط دستگاه اسپکتوفتومتر با طول موج ۶۰۰ نانومتر جذبش را می‌خوانیم.

تنظیم pH

ابتدا در ۴ ارلن ودر هر کدام ۵۰ سی سی از محیط کشت اختصاصی MRS براث ریخته وبا HCL پی اچ آنرا در ۴ و ۵ و ۶ و ۷ تنظیم کرده واتوکلاو می‌کنیم سپس در هر کدام ازین ارلن ها ۱ سی سی از لاکتو باسیل رشد داده شده را به به این محیط تلقیح ودر شرایط بیهوازی به مدت ۴۸ ساعت انکوبه می‌کنیم که نهایتاً در ارلن با PH=4 کدورتی مشاهده نشده وبه ترتیب در PH ۵ و ۶ و ۷ کدورت افزایش پیدا کردند.

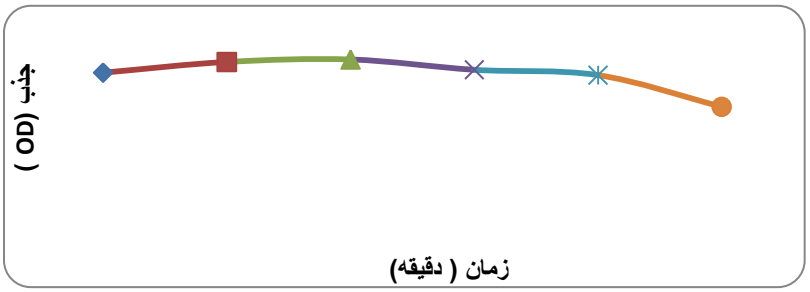
بحث و نتیجه گیری:

نتایج مقایسه هاله عدم رشد (میلی متر) آنتی بیوتیک های مورد مطالعه بر رشد لاکتوباسیل جدا شده از ماست گاومیش در نمودار زیر نشان می‌دهد که آنتی بیوتیک پیپراسیلین با قطر هاله عدم رشد ۳۷ میلی متر دارای بیشترین اثر ضد میکروبی بوده است در حالیکه آنتی بیوتیک های توپرامایسین، باسیتراسین، ونکومایسین، نالیدیکسیک اسید و کانامایسین فاقد اثر آنتی باکتریال بوده‌اند.



نمودار ۱- مقایسه هاله عدم رشد (میلی متر) آنتی بیوتیک های مورد مطالعه بر رشد لاکتوباسیل جدا شده از ماست گاومیش

نتایج تحقیقات حاصل از تأثیر تیمار نمک صفراوی بر روند رشد لاکتوباسیل در زمانهای مختلف در نمودار زیر نشان می‌دهد که رشد لاکتوباسیل تا زمان ۲۴۰ دقیقه از روند افزایشی برخوردار بوده است سپس با گذشت زمان تأثیر از آهنگ کاهشی برخوردار بوده است بطوریکه در زمان ۱۴۴۰ دقیقه به کمترین میزان رسیده است.



نمودار ۲- روند رشد لاکتوباسیل در زمانهای مختلف تأثیر تیمار نمک صفراوی.

در این تحقیق سعی شده از بروزترین روش‌ها برای جداسازی شناسایی و بیوشیمیایی و مولکولی لاکتوباسیلها استفاده شود. در منابع مختلف برای جداسازی باکتری‌ها از محیط کشت MRS اگار استفاده شده وگرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت انجام شده است.

در سال ۲۰۰۷ Ingo و همکاران در آمریکا فعالیت آنتی میکروبیال لاکتوباسیلوس را از پروبیوتیکهای طبیعی بررسی کردند. Grajek و همکاران درسال ۲۰۰۵ درباره اثرات ساختاری پروبیوتیک و پریبیوتیک و آنتی اکسیدان ه ادرغذاها به بررسی پرداختند. Shea Beasly در سال ۲۰۰۴ درباره جداسازی وشناسایی باکتری‌های اسیدلاکتیک از میکروفلورهای انسانی وحیوانی تحقیقاتی را انجام داده است. Sihummel و همکاران در سال ۲۰۰۷ به بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی استارتر و گونه‌های باکتریایی اسیدلاکتیک در چند فراورده لبنی پرداختند. که نتایج تحقیقات آن‌ها در تائید این پژوهش می‌باشد

در این تحقیق با استفاده از محیط کشت مذکور کلنی تیپیک و خالص لاکتوباسیل از ماست گاومیش بدست آ مد وتحمل شرایط اسیدی و مقاومت در برابر نمک‌های صفراوی مورد بررسی قرار گرفت وهمچنین، در بقاء باکتری‌های اسید لاکتیک اهمیتpH محدوده فراوانی دارد که لاکتو باسیل ایزوله شده مذکور در pH اسیدی قادر به رشد نبوده ,از روش‌های متعددی می‌توان باکتری‌های مقاوم به اسید را جداسازی نمود که از دو آزمایش (مقاومت اسیدی بالا و مقاومت به نمک‌های صفراوی) جهت تشخیص پتانسیل پروبیوتیکی سویه ایزوله شده، استفاده شد .زیرا این دو ویژگی جزو مهم‌ترین خصوصیات باکتری‌های پروبیوتیک محسوب می‌شود که مطابق با تحقیقات Dunne و همکاران در سال ۲۰۰۱ بوده است. و نهایتاً اینکه تست آنتی بیو گرام لاکتو باسیل ایزوله شده با ایجاد هاله عدم رشد مناسبی نسبت به برخی از آنتی بیوتیکها همراه بوده است.

منابع

1-WALKER W.A., Bacterial colonization, Probiotics and the development of intesti al nhost defense Functional Food Reviews, 1:13–19 (2009).

2-SANDERS M.E., How do we know when something called “probiotic” is really a probiotic? A Guideline for Consumers and Health Care Professionals, Functional Food Reviews, 1:3–12 (2009).

3-I. GOKTEPE V., JUNEJA K., AHMEDNA M., Probiotics in food safety and human health, Taylor and Francis Group LLC., CRC Press Inc., Boca Raton, FL., (2006).

4-ALANDER M., SATOKARI R., KORPELA R., SAXELIN M., T. VILOPPONEN-SALMELA, T.MATTILA-SANDHOLM, A. VON WRIGHT, Persistence of colonization of human colonic mucosa, Appl Environ Microbiol., 65:351-354 (1999).

5-V. LAZAR, M.C. BALOTESCU, T. VASSU, I. STOICA, D. SMARANDACHE, V. BARBU, E. SASARMAN, A. ISRAIL, D. BULAI, I. ALEXANDRU AND R. CERNAT, Experimental studies on rats of the probiotic effect of some lactic acid bacteria previously selected for their in vitro capacity to interfere with Salmonella enteritidis infection, Romanian Biotechnological Letters 10:2123-2133 (2005).
6-V.I. DEDLOVSKYA, Investigation of pH of contents of the gastro-intestinal tract by radiotelemetric method, Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 55:1292-1294, (1968).
7-H. HOVE, H. NÙRGAARD, P. BRÙBECH MORTENSEN, Lactic acid bacteria and the human gastrointestinal tract. European Journal of Clinical Nutrition 53:339-350 (1999).
8-J. SINGH, A. RIVENSON, M. TOMITA, S. SHIMAMURA, N. ISHIBASHI, S.R. BANDARU,Bifidobacterium longum, a lactic acid-producing intestinal bacterium inhibits colon cancer and modulates the intermediate biomarkers of colon carcinogenesis, Carcinogenesis, 18: 833–841 (1997).