ارزیابی پتانسیل پروبیوتیکی انتروکوکسی جداسازی شده از محصولات لبنی سنتی منطقه مغان و مشگین شهر

بهبود جعفری[1*]، علیرضا منادی[2]، علی رضایی[3]، سیامک علیزاده[4]، چنگیز احمدیزاده[1]، ابوالفضل برزگری[5]، مهرداد پاشازاده[1]، حامد جعفرزاده[6]

١. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اهر، گروه میکروبیولوژی، اهر، ایران
٢. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز، گروه میکروبیولوژی، تبریز ،ایران
٣. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز، گروه علوم بالینی، تبریز، ایران
٤. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اهر، باشگاه پژوهشگران جوان، اهر، ایران
٥. دانشگاه علوم پزشکی تبریز، گروه بیوتکنولوژی، تبریز، ایران
٦. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز، دانشکده دامپزشکی، تبریز، ایران
** نویسنده مسئول مکاتبات: b-jafari@iau-ahar.ac.ir*

(دریافت مقاله: ٩١/٤/٢٧، پذیرش نهایی: ٩١/٦/١٥)

چکیده

انتروکوکسی نقش مهمی در صنعت لبنیات دارد. همچنین بعضی از انتروکوکسی‌ها با منشاء لبنیات به عنوان پروبیوتیک گزارش شده‌اند. هدف از این تحقیق، جداسازی و شناسایی انتروکوکسی‌ها از محصولات لبنی سنتی مناطق مشکین شهر و مغان (اردبیل) و بررسی پتانسیل پروبیوتیکی آنها می‌باشد. در حضور بافر فسفات سالین (pH برابر ٢/٥) ٢٦ ایزوله مقاوم به اسید و در حضور نمک‌های صفراوی، ١٠ ایزوله مقاوم، ٧ ایزوله با تحمل بالا، ٦ ایزوله با تحمل ضعیف و ٣ ایزوله حساس شناسایی شد. شناسایی بیوشیمیایی تعلق ایزوله‌ها به گونه‌های انتروکوکس آویوم (*E. avium*)، انتروکوکس فاسیوم (*E. faecium*)، انتروکوکس دورانس (*E. durans*) و انتروکوکس فکالیس (*E. faecalis*) را نشان داد. همچنین فعالیت آنتاگونیستی بررسی شده با روش چاهک‌گذاری نشان داد که ایزوله‌ها دارای قدرت مهارکنندگی علیه اشریشیا کولی، *پرسینیا انتروکولیتیکا* و *لیستریا اینوکوا* هستند. بررسی حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف نشان داد که تمامی سویه‌ها به ونکومایسین و کلرامفنیکل حساس بودند. همچنین همه آنها به سولفامتوکسازول مقاوم بودند. نتایج بیان می‌کند که محصولات لبنی سنتی منبع مهمی برای ارگانیسم‌هایی با خاصیت پروبیوتیکی می‌باشند.

مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، ١٣٩١، دوره ٦، شماره ١، پیاپی ٢١، صفحات: ١٥١٣-١٥٠٥.
کلید واژه‌ها: پروبیوتیک، انتروکوکسی، محصولات لبنی

مقدمه

مصرف محصولات غذایی تخمیری از سال ١٩٧٠ به طور عمده‌ای افزایش یافته است. این محصولات غذایی شامل ماست، پنیر، شیر بطری و همچنین محصولات غذایی تخمیری از قبیل کفیر، کومیس، توگا و غیره می‌باشند. تخمیر توسط لاکتیک اسید باکتری‌ها، قادر به کاهش pH به کمتر از ٤ در محصولات غذایی است. این باکتری‌ها به دلیل تاثیر در طعم، بو و تعویق فساد ماده

غذایی، به طور سنتی در تخمیر غذاها استفاده می‌شود. اثر حفاظتی باکتری‌های اسید لاکتیک طی فرایند تولید و نگهداری بعدی غذاهای تخمیری عمدتاً به خاطر شرایط اسیدی است که این باکتری‌ها از طریق تبدیل کربوهیدرات‌ها به اسیدهای آلی (اسید لاکتیک و اسید استیک) در طول رشدشان در مواد غذایی ایجاد می‌کنند (۲). باکتری‌های پروبیوتیک به عنوان مکمل‌های غذایی زنده میکروبی تعریف می‌شوند که به طور مفید با اصلاح تعادل میکروبی روده، میزبان را تحت تاثیر قرار می‌دهند (۹). پروبیوتیک‌ها به عنوان مکمل‌های رژیمی به صورت قرص، کپسول، خمیر و تیمارهای منجمد خشک شده به بازار عرضه می‌شوند. جنس‌های عمده اسید لاکتیک باکتری‌ها که به عنوان پروبیوتیک مطرح هستند عبارتند از لاکتوکوکوس، انتروکوکوس، لوکونوستوک، پدیوکوکوس، لاکتوباسیلوس و استرپتوکوکوس (۱ و ۱۱). اخیراً مطالعات بالینی اثرات مفید پروبیوتیک‌ها را از قبیل تحریک سیستم ایمنی، خاصیت ضد سرطانی، اصلاح عدم تحمل لاکتوز، پیشگیری از اسهال را بر روی انسان و حیوان نشان داده است. هم‌چنین باکتری‌های پروبیوتیک، با تولید باکتریوسین و اسیدهای آلی، رشد پاتوژن‌ها را مهار می‌کنند. فاکتورهای عمده‌ای در خاصیت بازدارندگی لاکتیک اسید باکتری‌ها نقش دارند. مهمترین این فاکتورها تولید اسید لاکتیک و اسیداستیک و به دنبال آن کاهش pH و همچنین تولید باکتریوسین‌ها می‌باشد. اسیدیته یا قلیائیت یک محیط تاثیر زیادی بر ثبات و فعالیت مولکول‌های بزرگی نظیر آنزیم‌ها دارد، از این رو جای تعجب نیست که رشد و متابولیسم میکروارگانیسم‌ها به وسیله pH تحت تاثیر قرار گیرد (۱ و ۱۱).

یکی از منابع مهم برای جداسازی باکتری‌های پروبیوتیک محصولات لبنی تخمیری سنتی است. محصولات لبنی سنتی استان اردبیل سال‌هاست که در بین افراد بومی منطقه مصرف می‌شود و تاکنون گزارشی از اثرات زیانبار این محصولات بر سلامتی افراد ارائه نشده است. یکی از مهمترین فلور میکروبی این محصولات انتروکوکسی هست. همچنین برخی از سویه‌های انتروکوکسی جداسازی شده از محصولات لبنی به عنوان پروبیوتیک مطرح شده است از طرفی دیگر بعضی از سویه‌های انتروکوکسی با بیماری‌های انسانی مرتبط بوده و به عنوان پاتوژن مطرح هست. در این تحقیق به بررسی پتانسیل پروبیوتیکی و شناسایی ایزوله‌های جداسازی شده از نمونه‌های لبنی سنتی (ماست، پنیر و کشک) تهیه شده به روش‌های خانگی (محلی) پرداخته شده است. تحمل اسیدیته بالا و مقاومت به نمک‌های صفراوی، از جمله خصوصیات اولیه و ضروری است که در این تحقیق برای غربالگری سویه‌های با پتانسیل پروبیوتیکی در نظر گرفته شد. شناسائی سویه‌های غربال شده، با استفاده از تست‌های بیوشیمیائی و مورفولوژیکی گرفت. در پایان فعالیت ضد میکروبی ایزوله‌های متفاوت از نظر بیوشیمیایی، بر روی ۳ باکتری پاتوژن اشریشیاکولی (PTCC 1399)، *یرسینیا انتروکولیتیکا* (ATCC 1159) و *لیستریا اینوکوا* (DSMZ20649) و همچنین حساسیت ایزوله ها به آنتی‌بیوتیک‌های مهم بالینی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

۱- **جمع آوری نمونه:** نمونه‌های مختلف محصولات لبنی از نقاط مختلف شهرستانهای مشکین شهر و مغان جمع آوری و در فالکون‌های استریل و درون بسته‌های یخی به آزمایشگاه منتقل گردید و در یخچال نگه‌داری شدند.

۲- **جداسازی و غربال اولیه باکتری‌ها:** برای تهیه سوسپانسیون باکتریایی، از متد Callichia و همکارانش استفاده شد. از محیط کشت MRS مایع به منظور غنی‌سازی و افزایش جمعیت باکتریایی اولیه، در شرایط کم هوازی و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد استفاده شد (۸). به منظور جداسازی ایزوله‌های مقاوم به اسید از محیط معدنی (PBS) Phosphate-Buffered Saline با pH برابر ۳ استفاده شد. این محیط معدنی براساس روش Erkkila و Petaja تهیه شد (۸). باکتری‌های زنده مانده (مقاوم به اسید) در شرایط اسیدی تا ده برابر رقیق شدند و به صورت سطحی در محیط کشت MRS آگار کشت داده

شدند. پلیت‌ها بـه مـدت ٤٨ تـا٧٢ سـاعت در دمـای ٣٧ درجـه سـانتی‌گـراد و شـرایط کـم هـوازی گرمخانـه‌گـذاری شـدند. از پلیـت‌هـای دارای کلـونی‌هـای قابـل شـمارش، کلـونی‌هـای بـا مورفولوژی متفاوت جداسـازی و بـا اسـتفاده از میکروسـکوپ، رنگ‌آمیزی گرم و واکنش کاتالاز آنها بررسـی شـد. ایزولـه‌هـای باکتریایی میله‌ای شکل، گرم مثبت، کاتالاز منفی و مقاوم به اسید جداسازی و در گلیسرول نگـه‌داری شـدند. ضـمناً بـاکتری‌هـای حساس به اسید از بین رفتند و از آزمایشات بعدی حذف شدند.

٣- تعیین درصد بقاء ایزوله‌های جداسـازی شـده در شـرایط اسیدی معادل با شرایط اسیدی معده

برای تعیین درصد بقاء ایزوله‌هـا، CFU (Colony forming unit) برای هر ایزوله به صورت جداگانه تعیـین گردیـد. بـرای تعیین CFU به ازای هر میلی‌لیتر در زمان صفر (لحظه تلقـیح) و در انتهای ساعت ٣، از کشت‌های باکتریایی اولیـه و تلقـیح شـده در محیط PBS به صورت سریالی تـا ١٠ برابـر رقـت‌سـازی و برای هر رقت ٢ کشت به صورت سـطحی انجـام گردیـده و بـه صورت کم‌هوازی و در دمای ٣٧ درجه سانتی‌گراد به مدت ٧٢- ٤٨ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. پلیت‌هـای حـاوی کلنـی‌هـای قابل شمارش و به طور معمـول پلیـت‌هـای دارای ٢٠ الـی ٢٠٠ کلنی، برای شمارش انتخاب شدند.

تعداد باکتری به‌ازای هر میلی‌لیتر:

$$COUNT/ML = \frac{C}{V \times \left(N1 + (0.1 \times N2) \times D\right)}$$

C = تعداد کل کلنی‌های شمارش شده روی همه پلیت‌ها

V= حجم تلقیحی به کار برده شده برای همه پلیت‌ها

N1 = تعداد پلیت‌های شمارش شده از پائین‌ترین رقت

N2 = تعداد پلیت‌های شمارش شده از بالاترین رقت

D = پائین‌ترین رقتی که شمارش کلنی انجام گرفته است.

بدین ترتیب CFU برای همه ایزوله‌های باکتریایی در زمان صفر (لحظـه تلقـیح)، انتقـال بـه محـیط معـدنی PBS و در پایـان انکوباسیون ٣ سـاعته تعیـین، در محـیط MRS آگـار محاسـبه و مقایسه گردید (٣).

٤- تعیین مقاومت به نمک‌های صـفراوی بـرای ایزولـه‌هـای مقاوم بـه اسـید: اجـرای ایـن مرحلـه بـا روش Gilliland و همکارانش انجام شد. محیط کشت MRS مایع به عنوان کنتـرل و MRS مـایع دارای ٠/٣ درصـد بایـل (Oxgall) بـه عنـوان کشت مورد آزمایش (تیمار) استفاده شد. رشـد هـر نـیم سـاعت یک بار با اندازه‌گیری جذب نوری در طول موج ٦٠٠ نانومتر بـا استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری و منحنـی جـذب براسـاس زمان انکوباسیون رسم شد و اختلاف رشـدی بـر حـسب دقیقـه بیان و به عنوان تاخیر در رشـد در نتیجـه اثـر بازدارنـدگی بایـل (نمک های صفراوی) در نظر گرفته شد (٣).

٥- شناسایی فنوتیپی ایزوله های دارای پتانسیل پروبیـوتیکی: شناسایی ایزوله‌های جداسـازی شـده در سـطح گونـه براسـاس مشخصات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی توصیه شده توسط برگی، اسنس و همکاران در سال ١٩٨٦ و وود و هولزاپفل و همکـاران در سال ١٩٩٥ انجام گردید (١٢). دمای رشد، تحمل به نمـک و pH و الگوی تخمیر کربوهیدرات‌ها (شـامل ١٧قنـد) در محـیط کشت MRS مایع، براساس روش‌های توصیف شده بـه وسـیله Harrigan و McCance درسال ١٩٧٦ تعیـین شـد. رشـد در دمای ١٥ و ٤٥ درجه سانتی‌گراد برای ایزوله‌های کوکسی شـکل به صورت مشاهده‌ای بعد از انکوباسـیون بـه مـدت ٢٤ الـی ٤٨ ساعت ارزیابی شد. تحمل نمـک (٦/٥ درصـد حجمـی- وزنـی کلریدسدیم درمحیط کشت MRS مایع) با انکوباسیون در دمای ایزولاسیون (٣٧ درجه سانتی‌گراد) بـه مـدت ٧٢ سـاعت، بـرای همه ایزوله‌ها تعیین گردید. الگوی تخمیر کربوهیدرات‌هـا بـرای همه ایزوله‌ها در محیط کـشت MRS مـایع دارای معـرف فنـل قرمز (٠/٠٥ گرم بر لیتر) تعیین گردید (٤).

٦- ارزیابی فعالیت آنتاگونیستی ایزوله‌ها: بررسی خـصوصیات آنتاگونیستی سویه‌های ایزوله شده در شرایط آزمایشگاهی علیـه سـه بـاکتری پـاتوژن اشریـشیاکولی (PTCC 1399)، *یرسـینیا*

انتروکولیتیکا (ATCC 1159) و *لیستریا اینوکوا* (DSMZ20649) به عنوان اندیکاتور با روش چاهک‌گذاری صورت گرفت. در ابتدا عصاره انتروکوسی‌ها تهیه گردید و سپس pH مایع رویی با NaOH ٤ مولار در حد ٧ تنظیم گردید (٦). باکتری‌های پاتوژن به محیط کشت Soft BHIagar (٧٪ آگار) تلقیح و سریعاً در پلیت‌ها پخش شدند. سپس روی محیط چاهک‌هایی به قطر ٥ میلی‌متر ایجاد گردید. داخل هر چاهک ١٠٠ میکرولیتر از عصاره لاکتوباسیل‌های مورد بررسی ریخته شد و قطر هاله شفاف اطراف چاهک‌ها براساس میلی‌متر اندازه‌گیری شد (٦).

٧- بررسی حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف

مقاومت سویه‌ها به‌وسیله روش انتشار دیسک به آنتی‌بیوتیک‌های مهم بالینی از قبیل: کلرامفنیکل، آمپی‌سیلین، سیپروفلوکساسین، تری‌متوپریم، تتراسایکلین، اریترومایسین و ونکومایسین بررسی شد. بر اساس اندازه هاله بازدارندگی باکتری‌های مورد مطالعه به گروه‌های مقاوم، متوسط و حساس طبقه‌بندی شدند.

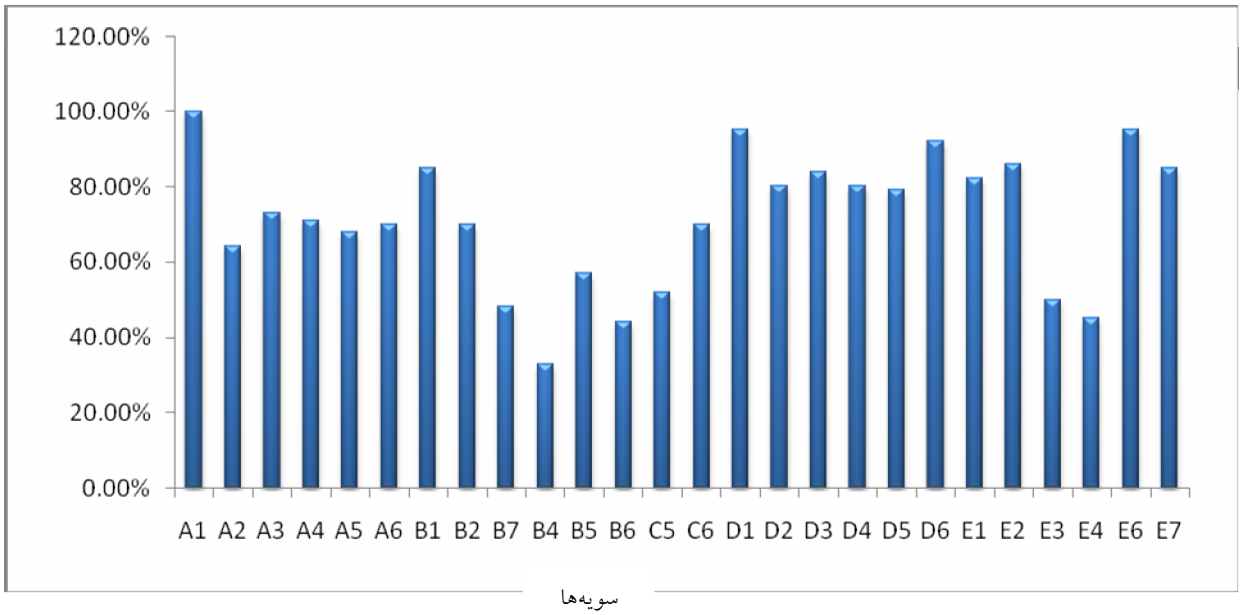
یافته‌ها

١- جداسازی ایزوله‌های مقاوم به اسید: یکی از مهم‌ترین مشخصه باکتری‌های پروبیوتیکی تحمل اسیدیته معده و قابلیت عبور از معده می‌باشد. غربالگری در محیط معدنی PBS با pH برابر ٣ به مدت ٢/٥ ساعت منجر به جداسازی ٢٦ ایزوله کوکسی شکل مقاوم به اسید به عنوان باکتری‌های اسید لاکتیکی از ٥ نمونه لبنی پنیر، ماست و کشک گردید.

جدول ١- منشا و تعداد ایزوله‌های کوکسی شکل جداسازی شده

نوع محصول لبنی	تعداد ایزوله‌های کوکسی شکل
A (کشک مغان)	٦
B (کشک مشکین)	٦
C (پنیرسنتی مشکین)	٢
D (پنیر سنتی مغان)	٦
E (ماست مغان)	٦

٢- بررسی مقاومت ایزوله ها به اسید: ایزوله‌های جداسازی شده در مرحله غربال‌سازی، به منظور تعیین درصد بقاء در محیط اسیدی به طور جداگانه در محیط معدنی PBS با pH برابر ٢/٥ به مدت ٣ ساعت انکوبه گردیدند که درصد بقاء ایزوله‌ها در نمودار شماره ١ آورده شده است. بر اساس درصد بقاء، ایزوله‌ها به سه گروه تقسیم بندی شدند. ٥ ایزوله کوکسی شکل با درصد بقاء بین ٣٠ تا ٥٠ درصد و ١٢ ایزوله در صد بقاء بین ٥٠ تا ٧٥ درصد و ٩ ایزوله در صد بقاء بین ٧٥ تا١٠٠درصد را نشان دادند. همچنین همه ایزوله‌ها درصد بقاء بالای ٣٠ درصد را نشان دادند. ایزوله‌های جداسازی شده از نمونه کشک مغان همگی درصد بقاء خوبی (بالای ٥٠ درصد) را نشان دادند. ایزوله‌های جداسازی شده از پنیر سنتی مغان همگی درصد بقاء بسیار خوبی (بالای ٧٥ درصد) را نشان دادند. در نمودار شماره ١ اختلاف درصد بقاء ٢٦ ایزوله جداسازی شده در محیط معدنی PBS با pH برابر ٢/٥ به مدت ٣ ساعت نشان داد شده است.



نمودار ١ – درصد بقاء ایزوله‌ها در محیط اسیدی PBS با pH برابر ٢/٥

٣- **تعیین تحمل به نمک‌های صفراوی:** ایزوله‌هایی که درصد بقاء بهتری را در محیط اسیدی نشان دادند میزان تحمل‌شان به نمک‌های صفراوی بررسی شد. به غیر از ایزوله A6-E1-D6 که یک تاخیر رشد یک ساعته را نشان داد. بقیه ایزوله‌ها همگی تاخیر رشد کمتر از یک ساعت را نشان دادند. نتایج بدست آمده بر اساس پیشنهاد ارائه شده توسط چاتئو و همکارانش در سال ١٩٩٤، که چهار گروه متمایز را براساس تاخیر رشد ایجاد شده به وسیله نمک‌های صفراوی تشخیص داده بودند، تحلیل شد. این چهار گروه عبارتند از: (جدول ٢)

A: شامل ایزوله‌های مقاوم ($d \leq 15\,\text{min}$)

B: شامل ایزوله‌هایی با تحمل بالا ($40 \leq d \leq 15\,\text{min}$)

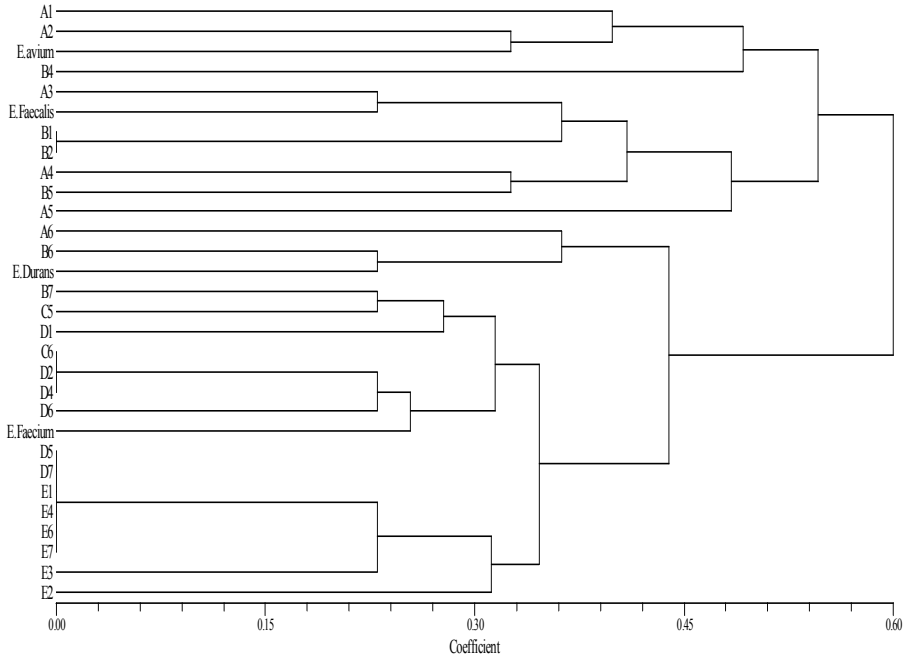
C: شامل ایزوله‌های با تحمل ضعیف ($60 \leq d \leq 40\,\text{min}$)

D: شامل ایزوله‌های حساس ($d \geq 60\,\text{min}$)

جدول ٢– دسته‌بندی باکتری‌های ایزوله شده بر اساس مقاومت به نمک‌های صفراوی (Bile oxgall)

تأخیر رشد بر حسب دقیقه	١ d <15	٢ 40<d <15	٣ 60<d< 40	٤ d <60
A5-B6-C5-D1-D2-D4-D5-E7-A1-B7	+			
B1-B2-B4-B5-C6-D3-E3		+		
A2-A3-A4-E2-E4-E6			+	
A6-D6-E1				+

٤- شناسایی فتوتیپی باکتری‌های انتخاب شده: شناسایی مقدماتی ایزوله‌ها در سطح گونه براساس الگوی تخمیر کربوهیدرات‌ها و رشد در دماهای ١٥ و ٤٥ درجه سانتی‌گراد در محیط کشت MRS مایع، رشد در غلظت بالای نمک (٦/٥ درصد) و تولید گاز از تخمیر قند گلوکز تعیین شد. قندهای مورد استفاده در این تحقیق شامل: سوکروز، سوربیتول، لاکتوز، گالاکتوز، ترهالوز، فروکتوز، آرابینوز، رامنوز، سالیسین، گلوکز، اینوزیتول، مالتوز، مانوز، مانیتول، گزیلوز، رافینوز و سلوبیوز بودند. با تحلیل این نتایج، ٢٦ ایزوله انتروکوکسی در ٤ گروه مختلف شامل ایزوله‌های (A3, B1, B2, A4, A5, B5) در درون گونه *انتروکوکوس فکالیس* (*E. faecalis*) ایزوله‌های (A1, A2, B4) در گونه *انتروکوکوس آویوم* (*E.avium*) ایزوله‌های (E2, E3,B7, E4, E6, E7 , C5, D1, D6, C6, D2, D4,D5, D7, E1,) در گونه *انتروکوکوس فاسیوم* (*E.faecium*) ایزوله‌های (A6, B6) در گونه *انتروکوکوس دورانس* (*E. durans*) قرار گرفتند. بعد از شناسایی مقدماتی، نتایج با استفاده از نرم افزار آماری NTsyspc و روش Jacard تحلیل شد که در نمودار ٢ آورده شده است.



نمودار ٢- دندوگرام مربوط به تحلیل آماری، (بااستفاده ازنرم افزارآماری NTsys pc و روش Jacard) نتایج حاصل از تست‌های بیوشیمیایی انجام شده برای ٢٦ ایزوله انتروکوکسی جداسازی شده در مطالعه

٥- ارزیابی فعالیت آنتاگونیستی انتروکوکسی‌های ایزوله شده متفاوت از نظر بیوشیمیایی

ایزوله‌های متفاوت از نظر بیوشیمیایی، برای بررسی فعالیت ضد میکروبی مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج مربوط به اثر بازدارندگی ایزوله‌های مختلف انتروکوکسی با اندازه‌گیری قطر هاله‌های عدم رشد در جدول ٣ آورده شده است. تقریباً همه ایزوله‌ها در حالت طبیعی (مایع رویی خنثی نشده) یک اثر بازدارندگی روی همه پاتوژن‌ها داشتند که احتمالاً این اثر مربوط به تولید اسید لاکتیک و یا به دلیل وجود پراکسید هیدروژن می‌باشد. ولی در حالتی که pH مایع رویی ایزوله‌های متفاوت در حد خنثی تنظیم گردید این اثر بازدارندگی محدود شد. از بین ایزوله‌ها، ایزوله A1 و ایزوله B6 که بر اساس تست‌های

بیوشیمیایی به عنوان *انتروکوکوس آویوم* و *انتروکوکوس دورانس* شناخته شده بودند، تقریباً هم در حالت خنثی شده و هم در حالت خنثی نشده اثر بازدارندگی یکسانی بر روی پاتوژن‌های مختلف نشان دادند. بنابراین به نظر می‌رسد که این اثر مربوط به تولید مواد ضد میکروبی در این باکتری‌ها باشد.

جدول ٣- اندازه قطر هاله‌های عدم رشد (برحسب میلی‌متر) مربوط به فعالیت آنتاگونیستی برخی از ایزوله‌ها

	مایع رویی با pH طبیعی (pH=4)			مایع رویی با pH خنثی شده (pH=6.5)		
	Listeria Innocua DSMZ 20649	*Yersinia Entercolitica* ATCC 1159	*E.coli* PTCC 1399	*Listeria innocua* DSMZ20649	*Yersinia Entercoliticaa* ATCC 1159	*E.coli* PTCC 1399
***E. faecium* (E6)**	+	+	+	+	_	_
***E. avium* (A1)**	+	+	+	+	_	+
***E. faecalis* (A3)**	+	+	+	_	_	_
E. durans (B6)	+	+	+	_	+	+
E. faecium (E1)	+	+	+	+	_	_

٦- بررسی حساسیت به آنتی بیوتیک‌های مختلف

نتایج نشان دادند که تمامی سویه‌ها به ونکومایسین و کلرامفنیکل حساس بودند. همچنین همه آنها به سولفامتوکسازول مقاوم بودند. ٤ سویه (E1, E6, A2, A5) به تتراسایکلین حساس و یک سویه متعلق به *انتروکوکسی فاشیوم* (B7) و یک سویه متعلق به *انتروکوکسی فکالیس* (A5) به تتراسایکلین مقاوم بود. همچنین تمامی سویه‌ها به آنتی بیوتیک‌های اریترومایسین و آمپی‌سیلین مقاومت (متوسط) نسبی نشان دادند.

بحث و نتیجه‌گیری

رفتارهای فیزیولوژیکی برای حفظ بقاء باکتری‌های موجود در دستگاه گوارش، شامل مقاومت به شرایط اسیدی معده و نمک‌های صفراوی می‌باشد. در مورد شرایط فیزیولوژیکی باکتری‌های پروبیوتیک در حین عبور از شرایط اسیدی معده مثل فعالیت متابولیکی و تولید ATP دانسته‌های کمی وجود دارد، اما چیزی که به وضوح ثابت شده، این است که مقاومت به شرایط اسیدی معده در بین سویه‌های مختلف یک گونه متفاوت است (٥). روش غربالگری استفاده شده در این تحقیق به ما اجازه داد که ٢٦ سویه مقاوم به اسید به طور مستقیم از ٥ نمونه محصول لبنی سنتی، بدون جداسازی مقدماتی و وقت‌گیر همه باکتری‌های فلور پر جمعیت آنها، جداسازی کنیم. در این مطالعه برای جداسازی باکتری‌های مقاوم به اسید، از محیط معدنی PBS با pH برابر با ٣ به مدت ٢/٥ ساعت استفاده شد که بسیاری از باکتری‌های حساس به اسید از بین رفتند. کانوی، گورپاچ و گولدین در سال ١٩٨٧ و پارک و همکارانش در سال ٢٠٠٢ از محیط PBS با pH تغییر یافته برای این منظور استفاده کردند (٧). در سال ١٩٨٧ کانوی و همکارانش نشان دادند که بقاء لاکتوباسیلی در محیط PBS نسبت به محتوی معدی، به خاطر اثر حفاظتی ترکیبات موجود در محتوی معدی بر روی سلول‌های باکتریایی، اندکی پائین‌تر است. در مطالعه‌ای که پناچیا

و همکارانش در سال ۲۰۰٤ بر روی لاکتوباسیل‌های سوسیس انجام دادند، سویه‌هایی که بالاتر از ۸۰ درصد بقاء را در PBS با pH برابر ۲/۵ به مدت ۳ ساعت نشان داد، برای مطالعات بیشتر و بررسی خصوصیات پروبیوتیکی انتخاب کرد (۸). با در نظر گرفتن همه موارد گفته شده، باید اشاره کرد که از بین سویه‌های انتخاب شده در این تحقیق، ۲۲ سویه درصد بقاء بالاتر از ۵۰ درصد را نشان دادند و انتخاب این سویه‌ها برای مطالعات بیشتر با مطالعات قبلی مطابقت داشت.

کیسه صفرا یک نقش اساسی در مکانیسم دفاعی اختصاصی و غیر اختصاصی روده بازی می‌کند و بزرگی اثر بازدارندگی آن به وسیله غلظت نمک‌های صفراوی تعیین می‌شود (۱۰). باور بر این است که در دستگاه گوارشی انسان میانگین غلظت نمک‌های صفراوی ۰/۳ درصد وزنی/ حجمی است و برای غربال سویه-های مقاوم به صفرا، بحرانی و کافی تلقی می‌شود (۱۰). این غلظت در این مطالعه برای ارزیابی قابلیت رشد ۲٦ سویه انتخاب شده در حضور نمک‌های صفراوی انتخاب گردید. به غیر از ایزوله A6-E1-D6 که تاخیر رشدی یک ساعته داشت، بقیه سویه ها با سطوح مختلفی از مقاومت قادر به رشد در محیط کشت دارای ۰/۳ درصد نمک‌های صفراوی بودند. در مطالعه‌ای که در سال ۱۹۹٤ توسط چاتئو، دسچامس، و هادج ساسسی انجام شد، تاثیر نمک‌های صفراوی بر روی رشد ۳۸ سویه لاکتیک اسید باکتری استفاده شده به عنوان پروبیوتیک مورد آزمایش قرار گرفت. نیمی از سویه‌های مورد آزمایش به آرامی تحت تاثیر نمک‌های صفراوی ۰/۳ درصد قرار گرفتند و تاخیر رشد زیر یک ساعت را تا رسیدن به یک جذب نوری ۰/۳ در طول موج ٦۰۰ نانومتر در محیط کشت MRS مایع در مقایسه با کشت کنترل بدون نمک های صفراوی به نمایش گذاشتند (۳). شناسایی ایزوله‌های مذکور براساس روش فنوتیپی انجام گردید و در بعضی موارد الگوی بیوشیمیایی و فیزیولوژی مبهمی برای بعضی ایزوله ها حاصل شد که نیاز به شناسایی مولکولی را نشان می‌دهد. همه ایزوله‌ها از ۵ نوع محصول لبنی متفاوت شامل پنیرسنتی، ماست و کشک شهرستان های مشگین شهر و مغان (اردبیل) جداسازی گردید. علی‌رغم وجود نمونه‌های لبنی متفاوت، در برخی موارد همگی ایزوله‌ها الگوی بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی یکسانی را نشان دادند. بیشترین فعالیت بازدارندگی زمانی مشاهده شد که pH مایع‌های روئی طبیعی بودند، اما در بعضی موارد مایع‌های روئی با pH خنثی فعالیت بازدارندگی بیشتری نشان دادند. *لیستریا اینوکوا* حساس‌ترین باکتری مورد آزمایش بود. نتایج نشان داد که علاوه بر اسیدهای آلی مواد ضد میکروبی دیگری بر علیه باکتری‌های شناساگر مورد آزمایش در این مطالعه وجود دارند. همچنین، از آنجائی که سویه‌های یک گونه طیف بازدارندگی متفاوتی نشان دادند، طیف ضد میکروبی وابسته به سویه بود. میزان مقاومت به اسید و صفرا، همچنین خاصیت ضد میکروبی و حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در بین ایزوله‌های جداسازی شده در این تحقیق از تفاوت و تنوع بالایی برخوردار بود.

بر اساس یافته‌های این بررسی نتیجه‌گیری می‌شود که محصولات لبنی مختلف مناطق مذکور، منابع با ارزشی جهت جداسازی باکتری‌های پروبیوتیک هستند. ایزوله‌های جداسازی شده از نمونه‌ی پنیر سنتی و کشک مقاومت بهتری نسبت به شرایط اسیدی و نمک صفراوی نشان دادند و اثر آنتاگونیستی خیلی خوبی بر روی باکتری‌های پاتوژن تست شده داشتند که احتمالاً مربوط به تولید باکتریوسین می‌باشد ولی بررسی‌های بیشتر در این زمینه مورد نیاز است. روش استفاده شده در این تحقیق، به منظور جداسازی باکتری‌های مقاوم به اسید (استفاده از محیط معدنی PBS با pH برابر ۳) با توجه به بار میکروبی بالا در محصولات لبنی سنتی، می‌تواند روش مناسبی برای جداسازی و شناسایی باکتری‌های با پتانسیل پروبیوتیکی باشد و نیاز برای جداسازی مقدماتی و زمان بر جمعیت باکتریایی اولیه را برطرف می‌سازد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه براساس طرح پژوهشی تاییـد شـده توسـط معاونـت پژوهش و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر صورت گرفته است. بدین وسیله از این معاونت قدردانی می‌شود.

منابع

١. مرتضوی، س.ع. و صادقی ماهونک، ع.ر.١٣٨٢. میکروبیولوژی غذایی. (ترجمه)، تالیف: ادمز،ام.ار. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، صفحات: ٣٢٦-٣٢٥.

2. Acharya, M.R.and Shah, R.K. 2002. Selection of human isolates of Bifidobacteria for their use as probiotics, Jour. App Biochern. Biotechnol. 102-103:81-98.
3. Chateau, N., Deschamps, A. M.andHadjSassi, A.1994.Heterogeneityof bile salts resistance in the Lactobacillus isolates of aprobiotic consortium, Jour. Letters in Applied Microbiology. 18: 42–44.
4. Harrigan, W.F.andMcCance M.E.1966.Laboratory Methods in Microbiology, (Fourth Edition), Pub.Academic Press. New York.
5. Ipak, G., Vijay, K.andJuneja, M. A.2006.Probiotics in Food Safety and Human Health, Jour. CRC Press, Taylor & Francis Group.
6. Lalitha, M.K.2007.Manual on Antimicrobial Susceptibility Testing,Pub.Retrived January 3.
7. Park, Y.S., Lee, J.Y., Kim, Y.S.and Shin, D.H. 2002. Isolation andcharacterization of lactic acid bacteria from feces of newborn baby and from dongchimi, Jour.Agricultural andFood Chemistry. 50: 2531–2536.
8. Pennacchia, C., Ercoloni,D., Blaiotta, G., Pepe, O., Mauriello,G,.and Villani F.2004.Selection of Lactobacillus strains fromfermented sausages for their potential use as probiotics. MeatScience, Barking. 67:309-317.
9. Salminen, S.1996.Uniqueness of probiotic strains, Jour. IDF Nutr News Lett. 5: 16–8.
10. Sperti, G. S.1971.Probiotics, Pub. West Point, CT: Avi Co. 69: 105-107.
11. Tamime, A.Y. 2002, Fermentedmilks:a historical food with modern applications-areview, Jour. European Clinical Nutrition, 56(Supplement 4), S2-S15.
12. Wood, B. J. B.andHolzapfel, W. H.1995. The genera of lactic acid bacteria, 1st ed. Blackie Academic and Professional, Jour. Glasgow, United Kingdom.

Vet. J. of Islamic Azad Uni. Tabriz Branch. 6, 1:1505-1513, 2012

Evalution of probiotic potential of enterococci isolated from traditionadairy product

Jafari, B.[1*], Monadi, A.R.[2], Rezaei, A.[3], Alizadeh, S.[4], Ahmadizadeh, Ch.[1], Barzegari, A.[5], Pashazadeh, M.[1], Jafarzadeh, H.[6]

1-Department of Microbiology, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran
2-Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
3-Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
4-Young Research Club, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran
5-Faculty of Biotechnology, Faculty of Medicin Sciences, Tabriz University, Tabriz, Iran
6-Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran

[*]***Corresponding author's email:*** *b-jafari@iau-ahar.ac.ir*

(Received: 2012/7/17, Accepted: 2012/9/6)

Abstract

Enterococci have important role in the dairy industry. Also some of enterococcies with dairy origin have been reported as probiotics. The aim of this study is isolate and identify enterococcies from traditional dairy products of Meshkinshahr and Moghan(Ardabil) regions and evaluate the potential probiotic of them. In the presence of phosphate saline buffer (PH equal to 5/2) 26 acid resistant isolates and in the presence of bile salts, 10 resistant isolates, 7 isolates with high tolerance, 6 isolates with poor tolerance and 3 susceptible isolates were identified. Biochemical identification showed isolates belonging to species of *E.avium, E.faecium, E.durans* and *E.faecalis*. Also antagonistic activity was investigated with well diffusion method showed that isolates with inhibitory ability against *Escherichia coli* are *Yersinia enterocolitica* and *Listeria innocua*. Susceptibility study to various antibiotics showed that all strains were susceptible to vancomycin and chloramphenicol. Also all of them were resistant to solfamethacsazol. The results indicate that traditional dairy products of these regions are important source for organisms with probiotic properties.

Keywords: Probiotics, Enterococci, Traditional dairy products