مجله علمی- پژوهشی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی
زمستان 1390، دوره سوم، شماره یازدهم، صفحه 14-7

جداسازی و تعیین خصوصیات پروبیوتیکی باسیلوس‌های جدا شده از مرغ‌داری‌های شهرستان اراک

مسعود کرمی[1]، پروانه جعفری[2]، نور امیرمظفری[3]، عادل حمیدی[1]، یاسرعبدالوند[4]، فرزاد طهماسبی[5]

1. مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی شعبه اراک
2. گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک
3. گروه میکروب‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی تهران
4. گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان
5. گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم

نویسنده مسؤول: عادل حمیدی. مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی شعبه اراک .a.ha201291@yahoo.com

دریافت: 90/10/3 پذیرش: 90/12/16

چکیده

زمینه و هدف: باکتری‌های پروبیوتیک خوراکی با توانایی تغییر فلور میکروبی روده نقش مهمی در سلامت بدن بازی می‌کنند. پس از مصرف در روده ساکن شده و اثرات مفید خود را اعمال می‌نمایند. همچنین پروبیوتیک‌ها جایگزین مناسبی برای آنتی‌بیوتیک‌ها هستند. هدف این تحقیق به دست آوردن باسیلوس‌های بومی شهرستان اراک جداشده از مرغ‌داری‌ها و ارزیابی خصوصیات پروبیوتیک آن‌ها می‌باشد.

روش بررسی: در این تحقیق 41 نمونه از فضولات تازه از 8 مرغ‌داری شهرستان اراک جمع‌آوری شد. پس از غنی‌سازی و توسط تیمار حرارتی باکتری‌های اسپوردار غربال شدند. سپس خصوصیات پروبیوتیکی سویه‌ها (مقاومت به اسید، صفرا، پپسین، عصاره سنگدان و تولید ترکیبات ضدمیکروبی) تعیین شد.

یافته ها: در این تحقیق 140 ایزوله باسیلوسی غربال و 14 ایزوله به واسطه عدم ایجاد همولیز در مطالعات بعدی استفاده شد. بررسی خصوصیات پروبیوتیکی نشان داد که نیمی از ایزوله ها توانایی رشد در10% نمک را داشته و سویه شماره 8، 100% به اسید کلریدریک مقاوم بوده و سویه شماره 5 نیز 100% به نمک‌های صفراوی (کولات و داکسی‌کولات‌سدیم) مقاوم بودند. سویه‌های انتخابی به عصاره سنگدان و پپسین مقاوم بوده (بیش از 80%) و توانایی اتصال آن‌ها به سلول‌های روده مورد بررسی قرار گرفت. تمامی سویه‌ها دارای فعالیت ضدمیکروبی علیه پاتوژن‌های معمول مرغ‌داری‌ها همانند ***Salmonella*** و ***E.coli*** بودند.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که ایزوله‌های باسیلوسی انتخاب شده خاصیت پروبیوتیکی داشته و پس از تست‌های تکمیلی و آزمایشهای میدانی می‌توانند به عنوان پروبیوتیک طیور استفاده شوند در حالی که توانایی ممانعت از بیماری‌های متداول طیور را دارا می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: پروبیوتیک، غربال‌سازی، باسیلوس، فعالیت ضدمیکروبی.

www.SID.ir

مقدمه

امروزه یکی از مشکلات صنعت پرورش طیور استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها به منظور محرک رشد و پیشگیری و درمان بیماریهای عفونی می‌باشد. منظور از محرک رشد دوزهای پایینی از آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد که باعث سرکوب میکروفلور طبیعی ولی مضر دستگاه گوارش شده و باعث جذب بیشتر غذا و رشد بیشتر حیوان می‌شوند. به عنوان مثال باکتری *انتروکوکوس هیرا* جزء میکروفلور طبیعی روده طیور است و غیر بیماریزا می‌باشد ولی این باکتری با فعالیت خود باعث ضخیم شدن جداره روده حیوان و در نتیجه جذب کمتر مواد غذایی و رشد کمتر پرنده می‌شود که آنتی‌بیوتیک‌های محرک رشد این باکتری را مهار می‌کنند. به منظور پیشگیری از بیماریهای عفونی نیز اکثر پرورش دهندگان طیور از همان روزهای آغازین به دنیا آمدن جوجه‌ها دوزهایی از آنتی‌بیوتیک‌های مختلف را در جیره غذایی آنها وارد می‌کنند تا احتمال ابتلا به بیماریهای باکتریایی را کاهش دهند. این مصرف بی‌رویه آنتی‌بوتیک‌ها مشکلات عدیده‌ای را به وجود آورده است که مهمترین آنها عبارتند از: مقاوم شدن سویه‌های باکتریایی بیماریزای طیور به دلیل تماس مداوم و طولانی مدت با آنتی‌بوتیک‌ها و در نتیجه تلفات بالای آنها، انتقال مقاومت دارویی به باکتریهای بیماریزای انسان و سایر حیوانات از طریق تبادلات ژنتیکی، وجود مقادیر بالایی آنتی‌بیوتیک در گوشت و تخم مرغ تولید شده(1و2).

برای رفع این مشکلات و کاهش مصرف آنتی‌بوتیک‌ها در صنعت پرورش طیور امروزه در اکثر مناطق دنیا و به خصوص کشورهای پیشرفته از محصولات پروبیوتیکی استفاده می‌شود و در ایران نیز مصرف این محصولات که تماما وارداتی هستند در حال افزایش می‌باشد.

اصطلاح پروبیوتیک که ریشه لاتین دارد به معنی «برای زندگی» است و اولین بار توسط مچنیکوف دانشمند میکروب‌شناس در حدود 100 سال پیش مورد استفاده قرار گرفت، امروزه اصطلاح پروبیوتیک به میکروارگانیزم‌های زنده‌ای گفته می‌شود که از طریق دستگاه گوارش وارد بدن موجود زنده (انسان، دام، طیور و آبزیان) شده و بتوانند در آنجا زنده مانده و تکثیر کنند و اثرات مفیدی روی سلامت و بقای میزبان داشته باشند. میکروارگانیزم‌های پروبیوتیک به سه گروه باکتری، مخمر و کپک تقسیم می‌شوند که مثالهایی از هر گروه عبارتند از: *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* برای باکتریها، *ساکارومیسس بولاردی* برای مخمرها و *آسپرژیلوس اوریزهآ* برای کپکها. هر گونه حیوانی پروبیوتیکهای مخصوص به خود را دارد که از میکروفلور غالب دستگاه گوارش حیوان منشاء می‌گیرند و با شرایط فیزیکی و شیمیایی بدن حیوان سازگاری کامل دارند و کاملا غیر بیماریزا می‌باشند.

به طور کلی می‌توان اثرات پروبیوتیک‌ها را به صورت زیر جمع‌بندی نمود: حفظ جمعیت میکروبی مفید در دستگاه گوارش، افزایش میزان دریافت غذا و بهبود هضم آن و در نتیجه افزایش رشد، تغییر در متابولیسم باکتریایی دستگاه گوارش، جلوگیری از ساکن شدن میکروبهای بیماریزا و مضر در دستگاه گوارش، تحریک سیستم ایمنی، خنثی کردن سموم روده‌ای(3و4). در میان انواع مختلف باکتریهای پروبیوتیک مورد استفاده برای طیور باکتریهای جنس *Bacillus* به دلیل تولید اسپور می‌توانند شرایط نامناسب محیطی را تحمل کرده و تا مدتها زنده بمانند. آزمایشها نشان داده است که گونه‌های جنس *Bacillus* به میزان زیاد در فضولات طیور طبیعی وجود دارند این باکتریها به فراوانی در غذای طیور یافت می‌شوند و می‌توانند در دستگاه گوارش حیوان به شکل پایدار باقی بمانند و اثرات مفید پروبیوتیکی خود را اعمال کنند. بعضی از باسیلوسها توانایی تولید بیوفیلم دارند و تشکیل بیوفیلم در روده حیوان باعث مقاومت این باکتریها در مقابل تغییرات و استرسهای شدید فیزیکی و شیمیایی می‌شود همچنین وجود این بیوفیلم‌ها در روده حیوان آنرا در برابر اتصال عوامل بیماریزای روده‌ای محافظت می‌کند. به عنوان مثال سلولهای *B.subtilis* می‌توانند بیوفیلم پیچیده‌ای تولید کنند و در این حالت اسپورزایی انجام دهند. از اسپور باکتریهای جنس باسیلوس نیز می‌توان برای تهیه محصولات پروبیوتیکی استفاده کرد که از مزایای آنها نسبت به سلولهای رویشی می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: قیمت کم تولید، سهولت تولید، مقاومت به فرایندهای تولیدی و عمر قفسه‌ای طولانی در دامنه دمایی گسترده به دلیل تولید اسپور(5-6).

هدف از این مطالعه جداسازی سویه‌های باسیلوسی بومی دارای خاصیت پروبیوتیکی بالا از مرغداریهای شهرستان اراک می‌باشد تا با استفاده از آنها بتوان محصولات پروبیوتیکی بومی مناسب برای استفاده در طیور به منظور کاهش مصرف آنتی‌بیوتیکها و همچنین کاهش بروز بیماریهای مختلف را تولید نمود.

www.SID.ir
Archive of SID

روش بررسی

نمونه برداری: برای این منظور پس از انتخاب 8 مرغداری (تعداد مرغداری‌های گوشتی شهرستان اراک 72 مزرعه می‌باشد که به صورت تصادفی از بین آنها 8 مرغداری انتخاب شدند) تعداد 41 نمونه از فضولات تازه مرغ از این مرغداریها به وسیله سواپ استریل به داخل لوله‌های حاوی آب پپتونه منتقل شدند و سپس نمونه‌ها در اسرع وقت به آزمایشگاه منتقل شدند.

غنی سازی نمونه‌ها: برای حذف باکتری‌های رویشی و فعال‌سازی اسپورها غنی‌سازی نمونه‌ها در آزمایشگاه صورت گرفت. بدین منظور از تیمار حرارتی استفاده شد. بدین صورت که لوله‌های آزمایش حاوی نمونه‌های فضولات به مدت 15 دقیقه در دمای 80 درجه سانتی‌گراد در بن ماری قرار داده شدند(7).

جداسازی و شناسایی باکتری‌ها: ابتدا محیط‌کشت نوترینت آگار (مرک ساخت آلمان (ord no. 1.05450.0500) ساخته شد و سپس از نمونه‌های تیمار شده فضولات، بر روی پلیت‌های حاوی محیط‌کشت نوترینت آگار به صورت چهارجهتی جهت خالص‌سازی ایزوله‌های باسیلوسی کشت داده شدند و پس از رشد باکتریها با استفاده از تست‌های زیر ایزوله‌های باسیلوسی جداسازی شدند. رنگ‌آمیزی گرم، رنگ‌آمیزی اسپور، تست کاتالاز، تست همولیز، بلادآگار، تست حرکت، پتاس 3% و رشد در نمک 10% . که با توجه به تست‌های ذکر شده ما به دنبال جداسازی باسیلهای گرم مثبت، اسپورزا، کاتالاز مثبت و همولیز منفی بودیم(7).

نگهداری باکتری‌ها: برای این منظور از غلظت‌های مختلف گلیسرول(50% و40%) در محیط‌کشت Brain Heart) Infusion) BHI براث و نگهداری در دمای 20- درجه سانتی گراد استفاده شد. همچنین برای جلوگیری از آلودگی کشت‌ها و فعال نگه داشتن باکتری‌ها از محیط‌کشتهای اسلنت و پاساژ مکرر(هر دو هفته یک‌بار) در محیط‌کشت نوترینت آگار استفاده شد و باکتریها در دمای یخچال نگه‌داری شدند.

تعیین خصوصیات پروبیوتیکی ایزوله‌های باسیلوسی بصورت ذیل انجام شد.

بررسی مقاومت به نمک: به محیط کشت نوترینت آگار 10 % نمک کلرید سدیم اضافه (100g/Lit) و سپس ایزوله‌های باسیلوسی جدا شده روی پلیت‌های حاوی نمک کشت داده شدند و به مدت 48 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند(8).

بررسی مقاومت به اسید: برای انجام این تست محیط‌کشت BHI براث ساخته شده و بعد هریک از ایزوله‌های باسیلوس‌های پروبیوتیک در آن‌ها تلقیح و به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد بر روی شیکر گرماگذاری شدند(پیش کشت). در مرحله بعد به ازای هر ایزوله 2 ارلن انتخاب کرده در هر کدام از آن‌ها 45 میلی‌لیتر محیط‌کشت BHI براث ریخته و بعد یکی از ارلن‌ها را با اضافه کردن اسید کلریدریک اسیدی کرده pH آن را به 2 رسانده، در مرحله بعد از پیش کشت 5 میلی‌لیتر از ایزوله باسیلوس‌های مورد نظر درون هریک از دو ارلن تلقیح شد. سپس در زمان‌های 0، 2، 4، 6 و 24 ساعت OD هر دو ارلن به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج 600nm اندازه گیری و ثبت شد(اساس کار کدورت‌سنجی می‌باشد)(9).

بررسی مقاومت به نمک‌های صفراوی: این تست مشابه تست قبلی می‌باشد با این تفاوت که به جای اسید کلریدریک، نمک‌های صفراوی(سدیم کولات و سدیم دزوکسی‌کولات) به مقدار 2g/Lit به نسبت 1:1 استفاده شدند.

بررسی مقاومت به پپسین: این تست مشابه تست بررسی مقاومت نسبت به اسید بوده و به ارلنی که به وسیله اسید کلریدریک اسیدی کرده و pH آن را به 2 رسانده بودیم مقدار 1mg/ml پپسین (آنزیم پروتئولیتیک موجود در معده مرغ) اضافه شد. از پیش کشتی که قبلا آماده شده بود 1 میلی‌لیتر به هر دو ارلن اضافه شده و به مدت 2 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند، سپس تعداد باکتری‌ها با استفاده از روش پورپلیت شمارش شد(تا رقت 10^{-10})(10).

بررسی مقاومت به عصاره سنگدان: محتویات 5 عدد سنگدان مرغ جمع‌آوری و توزین شده و 2 برابر وزنش به آن آب‌مقطر اضافه و مخلوط شد. مخلوط حاصل در 1000 rpm به‌مدت 30 دقیقه سانتریفیوژ شد سپس مایع‌رویی(سوپرناتانت) جدا و pH آن اندازه‌گیری شد در مرحله بعد مایع‌رویی با استفاده از فیلتر 0/2 میکرون استریل شده و عصاره سنگدان تا زمان استفاده در دمای 18- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس از کشت یک‌شبه باسیلوس‌ها مقدار 5 میلی‌لیتر درون 2 لوله استریل ریخته و در 7000 rpm به مدت 10 دقیقه

Archive of SID
www.SID.ir

سانتریفیوژ شدند و مایع‌رویی دور ریخته شد و رسوب (باسیلوس‌ها) ته یکی از لوله‌ها با 1 میلی‌لیتر از عصاره‌سنگدان که از قبل آماده شده بود مخلوط شد و لوله دیگر با 1 میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی مخلوط و هر 2 لوله به‌مدت 3 ساعت در دمای37 درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند و بعد از گرماگذاری باکتریها به روش پورپلیت شمارش شدند(تا رقت 10^{-10})(11).

بررسی تولید ترکیبات ضدمیکروبی به روش Top agar: از ایزوله‌های باسیلوس‌های پروبیوتیک به وسیله ته لوپ داخل پلیت نوترینت آگار لکه گذاری کرده بعد ازگذشت 24 ساعت که باسیلوس‌ها رشد کردند زیر هود درب پلیت‌ها را باز کرده و داخل درب هر کدام یک قطره فرمالین جهت کشته شدن باکتری‌ها و آزاد شدن ترکیبات ضدمیکروبی آنها ریخته شد و به مدت 15 دقیقه به همان حالت نگه داشته شده و سپس از باکتریهای پاتوژن (*سالمونلا* و *اشریشیاکلی*) سوسپانسیون 1% (در نوترینت آگار مذاب) تهیه کرده و به صورت یک لایه (با حجم مشخص) روی پلیت‌های لکه گذاری شده اضافه شده و در37 درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند تا اثر ضد میکروبی عصاره‌های باسیلوسی روی آنها مشخص شود(12-13).

یافته‌ها

نمونه برداری و خالص‌سازی: جمعا 41 نمونه از فضولات تازه مرغ به آزمایشگاه منتقل و پس از خالص‌سازی 140 پلیت خالص از ایزوله‌های باسیلوسی به دست آمد.

شناسایی ایزوله‌ها: برای شناسایی باکتری‌ها از تست‌های رنگ‌آمیزی‌گرم، رنگ‌آمیزی اسپور، کاتالاز و حساسیت به آنتی‌بیوتیک ونکومایسین استفاده شد. همه ایزوله‌ها گرم‌مثبت، اسپوردار و کاتالاز مثبت بودند. جهت غربال‌گری ایزوله‌های بیماری‌زا تست همولیز بر روی محیط‌کشت بلادآگار انجام شد که بعد از 24 ساعت نیمی از ایزوله‌ها همولیزشان مثبت شد و برخی ایزوله‌ها که همولیز ضعیفی داشتند بعد از 48 ساعت همولیزشان کامل شد. همه ایزوله‌های همولیز مثبت کنار گذاشته شدند و در نهایت 14 ایزوله خالص همولیز منفی باقی ماند که مطالعات بعدی روی آنها صورت گرفت.

بررسی خصوصیات پروبیوتیکی ایزوله‌ها: ایزوله‌های باسیلوسی جدا شده از1 تا 14 (به صورت قراردادی) کدگذاری شدند و بدین ترتیب ما خصوصیات پروبیوتیکی که در ذیل آورده شده است را بررسی کردیم:

بررسی مقاومت ایزوله‌های جدا شده نسبت به نمک: ایزوله‌ها در محیط‌کشت BHI براث حاوی نمک کلریدسدیم 10% کشت داده شده و گرماگذاری شدند و بعد از 48 ساعت نتایج آنها به قرار زیر بود (جدول 1).

جدول 1، بررسی مقاومت ایزوله‌های جدا شده نسبت به نمک

ایزوله‌های باسیلوسی	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
مقاومت به نمک	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+

بررسی توانایی تولید ترکیبات ضد میکروبی بر علیه باکتری‌های پاتوژن مرغ *سالمونلا* و *اشریشیاکلی* به روش Top agar: همه ایزوله‌ها فعالیت ضدمیکروبی بر علیه *E.coli* و *Salmonella*(سویه‌های *اشریشیاکلی* پاتوژن و *سالمونلا گالیناروم* (عامل حصبه طیور) و *سالمونلا پولوروم* (عامل اسهال باسیلاری سفید طیور) جدا شده از لاشه تلفات مرغداری‌ها) داشتند. این فعالیت به صورت هاله عدم رشد پاتوژن‌ها (رقت استفاده از پاتوژن‌ها 0/5 مک‌فارلند بود) توسط ایزوله‌های باسیلوسی پروبیوتیک در پلیت‌ها مشاهده شد. قطر هاله‌های ایجاد شده توسط ایزوله‌ها اندازه‌گیری و در جدول 2 آورده شده است.

جدول 2، مقایسه هاله عدم رشد E.coli و Salmonella ایجاد شده توسط ایزوله‌های باسیلوسی پروبیوتیک (14 ایزوله آورده شده در این جدول همگی مربوط به همین تحقیق هستند)

Archive of SID

www.SID.ir

ایزوله‌های باسیلوسی	قطر هاله عدم رشد 1 *E.coli* (cm)	قطر هاله عدم رشد 2 *E.coli* (cm)	قطر هاله عدم رشد 1 *Salmonella* (cm)	قطر هاله عدم رشد 2 *Salmonella* (cm)	میانگین هاله عدم رشد 1 و 2 *E.coli* (cm)	میانگین هاله عدم رشد 1 و 2 *Salmonella* (cm)
1	5/1	5	4/8	4/6	5/05	4/7
2	4/6	5	4/9	4/6	4/8	4/75
3	4/9	4/7	4/6	4/8	4/8	4/7
4	4/8	4/6	4/2	4/4	4/7	4/3
5	4/7	4/5	4/4	4/4	4/6	4/4
6	4/7	4/8	5	4/9	4/75	4/95
7	3/5	4/7	4/7	4/5	4/1	4/6
8	4/3	4/9	4/5	4/3	4/6	4/4
9	4/3	4/5	4/9	4/8	4/4	4/85
10	4/7	4/8	4/5	4/7	4/75	4/6
11	4/6	4/7	3/9	4/1	4/65	4
12	3/7	4/1	4/8	4/4	3/9	4/6
13	4/1	5/1	4/3	4/7	4/6	4/5
14	4	4/1	4	4/1	4/05	4/05

بررسی مقاومت ایزوله‌های جدا شده نسبت به اسید کلریدریک و صفرا: ایزوله‌های شماره 5 و 8 به ترتیب بیشترین مقاومت را به اسید و صفرا داشتند و ایزوله‌های شماره 4 و 13 به ترتیب کمترین مقاومت به اسید و صفرا دارند.نتایج آزمایشات در جدول 3 آورده شده است.

جدول 3. مقاومت ایزوله‌های باسیلوسی جدا شده نسبت به اسید کلریدریک و نمک‌های صفراوی (مقاومت سویه‌ها به صورت درصد روی قید شده است)

ایزوله‌های باسیلوسی	تیمار با اسید	تیمار با صفرا	ایزوله‌های باسیلوسی	تیمار با اسید	تیمار با صفرا
1	%41/6	%27	9	28/42 %	%67
2	%72/2	%70	10	%33/3	%60
3	%28	%50	11	%45/6	%12/8
4	%21/2	%69	12	%81	%35/2
5	%66/6	%100	13	%72	0
6	%32/2	%20/6	14	%27	%43
7	%91/7	%74/5	*B.subtilis* (شاهد)	%73	%69
8	%100	%70	*B.licheniformis* (شاهد)	%76	%73

نتایج مربوط به مقاومت به پپسین: 4 ایزوله 7، 8، 10 و 12 بهترین نتایج را در آزمایشات تولید ترکیبات ضد میکروبی و مقاومت نسبت به اسید و صفرا داشتند و بنابراین تنها از این 4 ایزوله در این آزمایش استفاده شد. ایزوله شماره 10 کم‌ترین مقاومت را از خود نشان داده و رشدش در حضور پپسین محدود شده است ولی ایزوله‌های شماره 7، 8 و 12 در حضور پپسین از خود مقاومت نشان دادند و رشدشان محدود نشده است. نتایج حاصل از بررسی مقاومت ایزوله‌ها در مقابل پپسین در جدول 4 آورده شده است که در آن درصد مقاومت ایزوله‌ها به پپسین از تقسیم تعداد کلونی‌های رشد کرده در محیط‌کشت معمولی به تعداد کلونی‌های رشد کرده در محیط‌کشت حاوی پپسین به دست آمده است و از باکتری *B.licheniformis* نیز به عنوان سویه شاهد در این آزمایش استفاده شده است.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول 4، بررسی مقاومت ایزوله‌ها نسبت به پپسین

ایزوله‌های باسیلوسی	تعداد کلنی در محیط‌کشت حاوی پپسین	تعداد کلنی در محیط‌کشت معمولی	درصد مقاومت به پپسین
7	$44/25 \times 10^6$	65×10^6	% 68/07
8	70×10^5	105×10^5	% 66/6
10	32×10^4	$32/6 \times 10^6$	%0/98
12	56×10^6	85×10^6	% 65/08
B.licheniformis (شاهد)	66×10^6	87×10^6	% 75/88

جدول 5، بررسی مقاومت ایزوله‌ها نسبت به عصاره‌سنگدان

ایزوله‌های باسیلوسی	تعداد کلنی در محیط‌کشت حاوی عصاره‌سنگدان	تعداد کلنی در محیط‌کشت معمولی	درصد مقاومت به عصاره سنگدان
7	$116/6 \times 10^{10}$	$139/7 \times 10^{10}$	% 79/8
8	$70/5 \times 10^{10}$	$85/7 \times 10^{10}$	% 82/2
10	$0/57 \times 10^8$	$28/5 \times 10^8$	% 0/2
12	$133/1 \times 10^{10}$	170×10^{10}	% 78/3
B.licheniformis (شاهد)	70×10^{10}	88×10^{10}	% 80

بحث

نتایج مربوط به مقاومت به عصاره‌سنگدان: 4 ایزوله 7، 8، 10 و 12 بهترین نتایج را در آزمایشات تولید ترکیبات ضد میکروبی و مقاومت نسبت به اسید و صفرا داشتند و بنابراین تنها از این 4 ایزوله در این آزمایش استفاده شد. ایزوله شماره 10 با 0/2% کمترین مقاومت را در مقابل عصاره‌سنگدان از خود نشان داد و ایزوله‌های شماره 7، 8 و12 در حضور عصاره‌سنگدان مقاومت بالایی از خود در مقایسه با باکتری شاهد نشان دادند. این مقاومت خوب یک خصوصیت مناسب برای یک باکتری است تا بتوان از آن به عنوان پروبیوتیک استفاده کرد. نتایج حاصل از بررسی مقاومت ایزوله‌ها در مقابل عصاره سنگدان در جدول 5 آورده شده است که در آن درصد مقاومت ایزوله‌ها به عصاره‌سنگدان از تقسیم تعداد کلونی‌های رشد کرده در محیط‌کشت معمولی به تعداد کلونی‌های رشد کرده در محیط‌کشت حاوی عصاره‌سنگدان به دست آمده است و از باکتری *B.licheniformis* نیز به عنوان سویه شاهد در این آزمایش استفاده شده است.

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیزم‌های زنده همانند باکتری، مخمر و کپک می‌باشند که می‌توانند کیفیت حیات میزبان را بهبود بخشند. این میکروارگانیزم‌ها می‌توانند از سدهای دفاعی بدن همانند معده و روده عبور کرده و سپس در روده کوچک و حتی سطح بدن موجود زنده جایگزین شده و زنده بمانند. با استفاده از این محصولات سیستم ایمنی میزبان تقویت شده و مقاومت آن در برابر بسیاری از بیماری‌ها افزایش می‌یابد. امروزه صنعت پروبیوتیک در دنیا با سرعت بالا رو به گسترش می‌باشد و محصولات تجاری مختلف با استفاده از میکروارگانیزم‌های گوناگون تولید و به بازار عرضه می‌شود. در ایران نیز به تازگی استفاده از پروبیوتیک‌ها مورد توجه قرار گرفته و محصولات تجاری از این دست به فروش می‌رسند. استفاده از این محصولات می‌تواند در بهبود ضریب تبدیل جیره غذایی به گوشت موثر باشد. باید توجه داشت که تولید محصولات پروبیوتیک در داخل کشور علاوه بر ممانعت از خروج ارز می‌تواند به لحاظ علمی نیز بسیار مورد توجه باشد و از سوی دیگر باکتری‌های بومی ایران در طول زمان با سیستم گوارش حیوانات بومی سازش یافته‌اند و مسلما می‌توانند اثرات بهتری را در بهبود کیفیت حیات آنها نشان دهند(14-16).

Archive of SID

www.SID.ir

در این تحقیق 140 سویه باسیلوس بومی از مرغداری‌های شهرستان اراک جداسازی شده و خصوصیات رشدی و پروبیوتیکی آن‌ها با سویه‌های جدا شده از محصولات تجاری مقایسه شد. در این بخش نتایج بسیار جالب توجهی حاصل شد به گونه‌ای که در پایان این آزمایش ها 3 سویه باسیلوسی مشخص گردید که خصوصیات پروبیوتیکی آن‌ها بسیار بهتر از سویه‌های محصولات تجاری بوده و از سوی دیگر رشد بالایی نیز داشتند.

یک سویه مناسب پروبیوتیک باید بتواند شرایط بدن حیوان میزبان را تحمل کرده و زنده به محل هدف برسد. آزمایش‌های صورت گرفته نشان داد که سویه‌های 7، 8 و 12 به ترتیب دارای مقاومتی بالغ بر 74/5% ،70% و35/2% به صفرای مرغ بوده و این رقم برای دو سویه بیوشم (به ترتیب *B.subtlis* و *B.licheniformis*) برابر با 69/30% و73/26% بود. این امر نشان می‌دهد که سویه‌های بومی دارای مقاومت مناسبی به صفرا بوده و می‌توانند پس از عبور از صفرا به تعداد مناسب به روده حیوان برسند.

Nisbet و Silvia و همکارانشان در دو تحقیق جداگانه نشان دادند که اسپور برخی از ایزوله‌های باسیلوس‌های پروبیوتیکی نسبت به شرایطی شبیه دستگاه گوارش و نمک‌های صفراوی مقاوم هستند(8-17). از مهم‌ترین مشخصه بعضی از ایزوله‌های باسیلوسی بومی توانایی مقابله آن‌ها با باکتری‌های بیماری‌زا بود. محصولات تجاری مورد بررسی قرار گرفته به هیچ‌وجه توانایی ممانعت از رشد باکتری‌های بیماری‌زای متداول طیور را نداشتند در حالی که باکتری‌های بومی جدا شده به راحتی با تولید ترکیبات ضدمیکروبی از رشد آن‌ها ممانعت می‌کردند.

از دیگر شرایطی که یک باکتری پروبیوتیک طیور باید به آن مقاوم باشد شرایط اسیدی به همراه پپسین موجود در معده مرغ می‌باشد. آزمایشات نشان داد که سویه 7 در حدود 68/07% و سویه 8 در حدود 66/6% و سویه 12 نیز در حدود 65/08% به اسید و پپسین مقاوم بود در حالی که این مقدار برای سویه‌های بیوشم (نمونه‌هایی که به عنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفته بودند) به ترتیب *B.subtlis* و *B.licheniformis* برابر با 72/96% و75/88% بود. کاملا مشخص است که سویه‌های بومی دارای درصد مقاومت مناسبی نسبت به شرایط معده هستند. در آزمایشی دیگر مشخص شد که هر 5 سویه توانایی رشد در pH معادل 1 (HCl) را داشتند. یکی از مهم‌ترین خصوصیات سویه‌های مذکور توانایی آن‌ها در ممانعت از رشد باکتری‌های بیماری‌زای طیور می‌باشد. آزمایش‌های صورت گرفته به صورت in-vitro نشان داد که این سویه‌ها می‌توانند از رشد *اشریشیاکلی* و *سالمونلاها* ممانعت به عمل آورند که این فعالیت به نظر می‌رسد با تولید باکتریوسین صورت می‌گیرد. دو سویه بیوشم تحت این شرایط فعالیت ضد میکروبی علیه سویه‌های محک به کار گرفته شده نشان ندادند.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق و خصوصیات پروبیوتیکی لازمه یک باکتری که بتواند به عنوان یک باکتری پروبیوتیکی استفاده شود و در مقایسه با مطالعات مشابه که دیگران انجام داده‌اند می‌توان ایزوله‌های شماره 7، 8 و 12 را به عنوان سویه‌های باکتریایی مناسب جهت کاربرد پروبیوتیک طیور پیشنهاد کرد تا در آینده با انجام آزمایش‌های تکمیلی از جمله آزمایش‌های in-vivo، سنجش ایمنی و غیره بتوان از آنها به عنوان یک محصول پروبیوتیک بومی بهره برد.

تشکر و قدردانی

در پایان از جناب آقای دکتر سید داوود حسینی ریاست محترم مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی شعبه اراک و تمام عزیزانی که در انجام این تحقیق یاری نموده‌اند کمال تشکر و قدردانی را دارم.

References

1- Fuller R. *Probiotics in man and animals.* The Journal of applied bacteriology. 1989; 66(5):365-78.
2- Salminen S, Ouwehand A, Benno Y, Le YK. *Probiotics: how should they be defined?* Trends in food science & technology. 1999; 10(3):107-110.
3- Shortt C. *The probiotic century: historical and current perspectives.* Trends in Food Science and Technology. 1999; 10(12):411-417.
4- Jernigan MA, Miles RD, Arafa AS. *Probiotics in poultry nutrition - a review.* World's Poultry Science Journal. 1985; 41(2):99-107.
5- Tagg JT, Dajani AS, Wannamaker LW. *Bacteriocins of gram positive bacteria.* Bacteriol Rev. 1976; 40:722–56.
6- Tomasik PJ, Tomasik P. *Probiotics and prebiotics.* Cereal Chemistry. 2003; 80(2):113-117.
7- Barbosa TM. *Screening for Bacillus isolates in the broiler gastrointestinal tract.* Applied and Environmental Microbiology. 2005; 71(2):968.
8- Nisbet T, Cook AM, Gilbert RJ. *The effect of sodium chloride on heat resistance and recovery of heated spores of Bacillus stearothermophilus.*

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of applied microbiology. 2008;32(1):96-102.

9- Guo X, Li D, Lu W, Piao X, Chen ***X***. *Screening of Bacillus strains as potential probiotics and subsequent confirmation of the in vivo effectiveness of Bacillus subtilis MA139 in pigs.* Antonie Van Leeuwenhoek. 2006;90(2):139-146.

10- Vanderpool C, Yan F, Polk DB. *Mechanisms of probiotic action: Implications for therapeutic applications in inflammatory bowel diseases.* Inflam Bowel Dis. 2008; 14(11):1585-96.

11- Lin WH, Sheng-Hon J, Hau-Yang T. *Different probiotic properties for Lactobacillus fermentum strains isolated from swine and poultry.* Applied and Environmental Microbiology. 2007 ;(13):107–113.

12- Klaenhammer TR, O'Flaherty S, Goh YJ. *Probiotics and prebiotics.* World's Poultry Science Journal. 2000; 53(4):351-368.

13- Lorca GL, Wadstrom T, Valdez GF, Ljungh A. *Lactobacillus acidophilus autolysins inhibit Helicobacter pylori in vitro.* Curr Microbiol. 2001; 42:39–44.

14- Spanggaard B. The *probiotic potential against vibriosis of the indigenous microflora of rainbow trout.* Environmental Microbiology. 2002; 3(12):755-765.

15- Temmerman R. *Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products.* International Journal of Food Microbiology. 2003; 81(1):1-10.

16- Urdaci MC, Bressollier P, Pinchuk I. *Bacillus clausii probiotic strains: antimicrobial and immunomodulatory activities.* Journal of clinical gastroenterology. 2004; 38-86.

17- Silvia A, Nakaia JKS. *Validation of bacterial growth inhibition models based on molecular properties of organic acids.* Int J Food Microbiol. 2003; 86:249–55.

Archive of SID

www.SID.ir