Archive of SID

جداسازی باکتری‌های اسیدلاکتیک از محصولات لبنی محلی شهرستان گرگان با توان مهار رشد برخی از بیماریزاهای گوارشی

هادی کوهساری[1*]، زینب رشتی[2]، شهره عرب[2]

۱. گروه میکروبیولوژی، واحد آزادشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آزادشهر، ایران.

۲. دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم وصنایع غذایی، واحد آزادشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آزادشهر، ایران.

***نویسنده مسئول:** *hadikoohsari@yahoo.com*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۲/۰۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۵/۰۱

چکیده

جداسازی و شناسایی باکتری‌های اسیدلاکتیک از محصولات محلی می‌تواند در معرفی انواعی منحصر به‌فرد از پروبیوتیک‌ها نقش بسزایی داشته باشد. این مطالعه با هدف جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک از محصولات لبنی محلی شهرستان گرگان با توان مهار رشد برخی از پاتوژن‌های گوارشی انجام شد. به‌منظور جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک، کشت نمونه‌ها بر روی محیط‌های کشت اختصاصی MRSآگار، M17 آگار، KAA و MRS+Vancomycin انجام شد. سپس بر اساس ویژگی‌های مورفولوژی معمول و تست‌های بیوشیمیایی و تخمیر قندی ایزوله‌ها تعیین هویت شدند. ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی محلول رویی کشت ایزوله‌ها علیه چهار باکتری بیماری‌زای گوارشی با روش چاهک صورت پذیرفت. از ۲۴ نمونه دوغ و پنیر محلی و ۴ نمونه صنعتی در مجموع ۷۳ ایزوله شناسایی شدند که در این بین *لاکتوباسیلوس کازئی* با ۳۴/۲۴ درصد بیشترین فراوانی را داشت. *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* جدا شده از دوغ و پنیر گوسفندی و *لاکتوباسیلوس دلبروکئی* و *لاکتوباسیلوس رامنوزوس* جدا شده از دوغ گوسفندی علیه تمامی باکتری‌های پاتوژن مورد مطالعه یعنی *اشریشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس* و *سیتروباکتر فروندی* فعالیت ضدباکتریایی قابل توجهی نشان دادند. همچنین باکتری‌های اسیدلاکتیک جدا شده از نمونههای صنعتی فعالیت ضدباکتریایی کمتری در مقایسه با ایزوله‌های نمونه‌های محلی نشان دادند. در مجموع با توجه به فعالیت آنتاگونیستی باکتری‌های اسیدلاکتیک جدا شده از محصولات لبنی محلی شهرستان گرگان، ارزیابی استفاده از آن‌ها به عنوان باکتری‌های با توان پروبیوتیکی توصیه می‌شود.

کلید واژه ها: باکتری‌های اسید لاکتیک، محصولات لبنی محلی، شهرستان گرگان، فعالیت ضدباکتریایی، بیماریزای گوارشی.

مقدمه

امروزه در بسیاری از جوامع، نقش غذا در سلامت و تغذیه‌ی انسان از اهمیت بسیاری برخوردار است. به‌طوری‌که نقش اولیه‌ی غذا به‌عنوان منبع انرژی و رشد به نقش بیولوژیکی اجزای آن روی سلامتی انسان تغییر یافته و بازار تولید و مصرف مواد غذایی به سوی "غذاهای فراسودمند "رهنمون شده است.

غذاهای فراسودمند به فرآورده‌هایی گفته می‌شود که علاوه بر فراهم کردن تغذیه پایه موجب ارتقای سطح سلامت می شوند. در بین غذاهای فراسودمند، غذاهای حاوی ریز زنده‌های پروبیوتیک اهمیت ویژه‌ای یافته‌اند. از آن‌جا که پروبیوتیک ها روی تعادل میکروبی روده و سلامتی کلی بدن اثر مثبت دارند بازار تولید و مصرف این دسته از غذاها در حال توسعه است و بررسی‌های زیادی جهت افزودن باکتری‌های پروبیوتیک به محصولات لبنی و غیر لبنی و تاثیر این باکتری‌ها بر سلامت مصرف کننده صورت گرفته است.

پروبیوتیک‌ها، ارگانیسم‌های زندهای هستندکه با تعدیل فلور میکروبی روده اثرات مفیدی را بر سلامت میزبان اعمال می‌کنند. این میکروارگانیسم‌های زنده تاثیرات مفیدی مانند بهبود سیستم ایمنی، جلوگیری از استقرار و رشد باکتری‌های بیماری‌زا، کاهش جذب کلسترول و کاهش احتمال ابتلا به سرطان کولون را دارند. از هزاران سال قبل مصرف پروبیوتیک‌ها به صورت سنتی درکشورهای مختلف جهان رایج بوده است. به طوریکه

www.SID.ir

استفاده از میکروارگانیسم‌های زنده در غذا به ویژه باکتری‌های تولیدکننده اسیدلاکتیک به‌منظور حفظ سلامت انسان بسیار طولانی است (Wadher et al., 2010).

از میان میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک، باکتری‌های اسید لاکتیک به‌عنوان مهم‌ترین گروه شناخته شده‌اند. باکتری‌های اسیدلاکتیک گروهی از باکتری‌های گرم مثبت، غیر اسپورزا، بی‌حرکت و کاتالاز منفی را تشکیل می‌دهند که میله‌ای یا کروی بوده و محصول اصلی آنها، حاصل از تخمیر کربوهیدرات‌ها اسیدلاکتیک می‌باشد. باکتری‌های اسیدلاکتیک مهم در صنایع لبنیات متعلق به جنس‌های *لاکتوباسیلوس*، *استرپتوکوکوس*، *لاکتوکوکوس*، *لوکونوستوک*، *پدیوکوکوس* و *انتروکوکوس* هستند (Arques et al., 2015; Rattanchikunopon and Phuinkhachorn, 2010).

فعالیت ضدباکتریایی علیه باکتری‌های عامل بیماری‌های گوارشی، قدرت تحمل شرایط اسیدی و تحمل املاح صفراوی از ویژگی‌های باکتری‌های پروبیوتیک می‌باشد. بسیاری از باکتری‌های اسیدلاکتیک در طی فرایندهای متابولیسمی ترکیباتی ایجاد می‌کنند همچون، اسیدهای آلی، ترکیبات با وزن مولکولی پایین مانند پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، دی اکسید کربن (CO_2)، دی استیل، ترکیبات با وزن مولکولی بالا مثل باکتریوسین‌ها، اسیدهای چرب و... که می توانند بر علیه دیگر میکروارگانیسم‌ها اثرات ضدمیکروبی داشته باشد. به‌همین دلیل این باکتری‌ها از دیدگاه تکنولوژیکی، حائز اهمیت هستند (Somoro et al., 2002; Mattila Sandholm et al., 2002).

از نظر صنعتی، کاربرد کشت‌های آغازگر ویژه باعث ایجاد کیفیت ثابت در محصول می‌گردد ولی منجر به تولید محصولی با محدودیت طعم می‌شود. از سوی دیگر، مصرف‌کنندگان، فرآورده های لبنی با طعم طبیعی و اصلی را ترجیح می‌دهند. به همین دلیل، جستجو و کاوش سویه‌های وحشی موجود در محصولات تخمیری سنتی، جهت تولید فرآورده‌های لبنی جدید با طعم اصیل و طبیعی مورد توجه بسیار می‌باشد که پتانسیل جداسازی نژادهای جدید جهت بهره‌برداری در صنعت لبنیات را دارا می‌باشند که آنها را به‌عنوان نگهدارنده‌های زیستی و طبیعی مطرح می‌کند (Navidghasemizad et al., 2009).

از طرفی میکروفلور محصولات لبنی در مناطق مختلف با توجه به شرایط تغذیه‌ای، فصلی و دیگر عوامل محیطی می تواند دستخوش تغییرات زیادی شود. این موضوع تلاش در خصوص جستجو و یافتن ایزوله‌های بومی و وحشی با توان پروبیوتیک در محصولات لبنی سنتی هر منطقه جغرافیایی را توجیه می کند تا مسیر یافتن نژادهای جدید جهت بهره‌برداری در صنعت لبنیات را هموار سازد.

این مطالعه با هدف جداسازی و شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک از محصولات لبنی محلی مناطق روستایی شهرستان گرگان واقع در شمال ایران و ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی و اثر آنتاگونیستی آنها علیه چهار باکتری بیماری‌زای گوارشی شامل *اشریشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس* و *سیترو باکتر فروندی* انجام شد.

روش کار

نمونه‌برداری

این مطالعه از نوع توصیفی مقطعی و در سال ۱۳۹۳ انجام گرفت و در مجموع ۲۸ نمونه محصول لبنی مورد آزمون قرار گرفتند که نوع و تعداد آنها در جدول ۱ آمده است. از این تعداد ۱۳ نمونه دوغ‌های محلی با منشاء دامی مختلف (گاو، گاومیش، گوسفند، بز و شتر)، ۱۱ نمونه پنیرهای محلی با منشاء دامی مختلف (گاو، گاومیش، گوسفند، بز) از تولید کنندگان محصولات لبنی سنتی مناطق روستایی شهرستان گرگان واقع در شمال ایران (با تاکید مبنی بر عدم استفاده از سویه های تجاری جهت کشت مایه یا

www.SID.ir

Archive of SID

استارتر) در کنار ۴ نمونه از محصولات صنعتی تولیدی کارخانجات لبنی استان تهیه شد. برای نمونه‌های دوغ مقدار ۵۰ میلی‌لیتر و برای نمونه‌های پنیر ۵۰ گرم در ظروف در پیچ‌دار در شرایط سرما (در فلاکس‌های یخ) به آزمایشگاه منتقل گردید و تا زمان انجام آزمایشات در یخچال نگهداری شد.

جدول۱- نوع و تعداد محصولات لبنی

ردیف	نوع محصول (منشاء دامی)	تعداد نمونه
۱	دوغ گاو	۳
۲	دوغ گوسفند	۳
۳	دوغ گاومیش	۲
۴	دوغ شتر	۴
۵	دوغ بز	۱
۶	پنیرگاو	۳
۷	پنیر گوسفند	۳
۸	پنیر گاومیش	۲
۹	پنیر بز	۱
۱۰	پنیر صنعتی	۲
۱۱	دوغ صنعتی	۲

جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک

یک میلی‌لیتر از نمونه‌های دوغ و یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون یکنواخت (رقت ۰/۱) پنیر در سیترات سدیم جهت غنی‌سازی به محیط‌های کشت MRS براث و M17 براث (مرک، آلمان) انتقال داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در جار بی‌هوازی در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شد. پس از این مدت کشت بر روی محیط‌های کشت اختصاصی شامل MRS آگار، M17 آگار، KAA[1] آگار و MRS آگار حاوی آنتی بیوتیک وانکومایسین(۲۰mg/ml) (مرک، آلمان) به ترتیب جهت جداسازی *لاکتوباسیل‌ها*، *استرپتوکوکوس‌ها*، *انتروکوکوس‌ها* و *لوکونوستوک‌ها* کشت خطی انجام شد. پلیت‌های کشت داده شده به مدت ۷۲-۴۸ ساعت در جار بی‌هوازی در ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند. پس از این مدت با توجه به مورفولوژی از کلنی‌های مشکوک رنگ‌آمیزی گرم و آزمون کاتالاز انجام شد و باکتری‌های میله‌ای و کروی گرم مثبت و کاتالاز منفی خالص‌سازی شدند و مراحل تعیین هویت بر روی آن‌ها انجام شد. جهت نگهداری جدایه‌ها جدا شده از محیط کشت MRSبراث حاوی ۱۰ درصد گلیسرول در فریزر ۷۰- درجه سلسیوس استفاده شد (Lacerda et al., 2005; Torres Lianez et al., 2006).

تعیین هویت باکتری‌های اسیدلاکتیک

به منظور تعیین هویت جدایه‌ها از آزمون‌های بیوشیمیایی شامل، تخمیر قندهای آرابینوز، گزیلوز، گالاکتوز، سوربیتول، فروکتوز، مانیتول، مانوز، رامنوز، رافینوز، مالتوز، لاکتوز، سوکروز در کنار آزمون رشد در ۱۰ و ۴۵ درجه سلسیوس و توانایی رشد در غلظت ۶/۵ درصد نمک‌طعام استفاده شد و باکتری‌های موجود تا سطح گونه طبق آخرین چاپ کتاب برجی (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology) مورد تایید قرار گرفتند (Edalatian et al., 2010; Finegold et al., 2009).

به منظور بررسی تخمیر قندهای مختلف، هر یک از جدایه‌ها در محیط کشت فنل رد براث پایه حاوی ۲ درصد از هر یک از قندهای مورد بررسی تلقیح شدند و برای ایجاد شرایط بی‌هوازی روی محیط با پارافین مایع استریل پوشانده شد و پس از ۴ روز گرمخانه‌گذاری در ۳۷ درجه سلسیوس، با بررسی تغییر رنگ محیط از قرمز به زرد تخمیر قند مورد نظر تایید گردید. به منظور بررسی رشد هر یک از جدایه‌ها در دمای۱۰ و ۴۵ درجه سلسیوس، از هر جدایه در دو لوله حاوی محیط کشت MRS مایع تلقیح گردید و با ایجاد شرایط بی‌هوازی (افزودن پارافین مایع استریل بر روی محیط)، یکی از لوله‌ها در ۱۰ درجه سلسیوس به مدت ۷ روز و دیگری در ۴۵ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری شد و پس از این مدت با بررسی

[1] Kanamycin Aesculin Azid

www.SID.ir

ایجاد کدورت (در مقایسه با لوله شاهد منفی) رشد جدایه مورد تایید قرار گرفت.

به منظور بررسی رشد در غلظت ۶/۵ درصد نمک هر یک از جدایه‌ها در محیط کشتMRS مایع حاوی ۶/۵ گرم کلرید سدیم تلقیح شدند و در کنار لوله شاهد منفی و با ایجاد شرایط بی‌هوازی در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شد و پس از این مدت با بررسی ایجاد کدورت (در مقایسه با لوله شاهد منفی) رشد جدایه مورد تایید قرار گرفت (Torres Lianez et al., Lacerda et al., 2005; 2006; Bhardwaj et al., 2012).

تهیه محلول رویی کشت باکتری‌های اسیدلاکتیک جدا شده

۳ تا ۴ پرگنه یکدست از کشت ۲۴ ساعته هر کدام از جدایه‌ها در محیط کشت اختصاصی MRSمایع تلقیح و سپس روی آن با پارافین مایع استریل پوشانده شد و به مدت ۴ روز در دمای۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری گردید. در این مدت باکتری‌های اسیدلاکتیک رشد کرده و ترکیبات ضدمیکروبی تولید می‌شود. آنگاه پارافین خارج شده و لوله‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۴۰۰۰ سانتریفوژ گردیده و مایع رویی جهت اطمینان از عدم وجود باکتری‌ها با استفاده از فیلتر سرنگی با قطر ۰/۲ میکرومتر فیلتر گردید و تا زمان انجام آزمون ضدباکتریایی علیه باکتری‌های بیماریزا در داخل لوله ای استریل در یخچال نگهداری شد (Aslam and Qazi, 2010; Pundir et al., 2013).

آماده سازی باکتری‌های بیماری‌زا

۴ سویه استاندارد باکتری‌های بیماری‌زای گوارشی شامل *اشرشیاکلی* (PTCC 1338)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC 1112)، *باسیلوس سرئوس* (PTCC 1154) و *سیتروباکتر فروندی* (PTCC 1600) از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شدند و پس از احیاء در محیط BHI (عصاره قلب و مغز)، (مرک، آلمان) در محیط کشت نوترینت آگار (مرک، آلمان) کشت داده شد تا کلنی‌های خالص حاصل شود. آنگاه چند پرگنه یکدست از کشت ۲۴ ساعته هر باکتری به ۳ میلی‌لیتر محیط آبگوشت نوترینت (مرک، آلمان) تلقیح شد و به مدت چند ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شد تا به کدورتی معادل ۰/۵ مک‌فارلند $1/5\times10^8$ CFU/ml رسید.

بررسی اثر ضدمیکروبی به روش چاهک

اثر ضدمیکروبی بر اساس انتشار در آگار و با روش چاهک مورد ارزیابی قرار گرفت. از سوسپانسیون معادل ۰/۵ مک‌فارلند ($1/5\times10^8$ CFU/ml) باکتری‌های بیماریزا با سواپ استریل در سطح محیط کشت مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) به طور یکنواخت کشت داده شد. سپس با کمک پیپت پاستور استریل چاهک هایی به قطر ۶ میلی متر در محیط حفر شد و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رویی باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده در داخل چاهک‌ها ریخته و به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شد. بعد از این مدت قطر هاله عدم رشد اندازه‌گیری و ثبت شد (Aslam and Qazi, 2010; Pundir et al., 2013).

آنالیز آماری

به منظور افزایش دقت هر آزمون حداقل سه بار تکرار و میانگین قطر هاله عدم رشد بعد از سه بار ثبت گردید. جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون‌های ANOVA و دانکن و از نرم افزار SPSS استفاده گردید.

نتایج

نتایج جداسازی و شناسایی باکتری‌های اسیدلاکتیک

از مجموع ۲۴ نمونه محصولات لبنی محلی شامل ۱۳ نمونه دوغ و ۱۱ نمونه پنیر در کنار ۴ نمونه دوغ و پنیر صنعتی در مجموع ۷۳ جدایه باکتری‌های اسید لاکتیک شناسایی شدند. تمامی این جدایه‌ها باکتری‌های میله‌ای و کروی گرم مثبت و کاتالاز منفی بودند. در کنار رنگ‌آمیزی گرم و آزمون کاتالاز، آزمون‌های بیوشیمیایی شامل تخمیر ۱۲ قند، رشد در ۱۰ و ۴۵

www.SID.ir

Archive of SID

درجه سلسیوس و رشد در حضور ۶/۵ درصد نمک طعام به تعیین هویت جدایه‌ها کمک کرد که نتایج آن به همراه انواع و تعداد باکتری‌های جدا شده در جدول ۲ آمده است.

جدول۲- جدول تشخیصی گونه های باکتری‌های اسید لاکتیک بر اساس آزمون‌های بیوشیمیایی

آزمون‌ها / نام باکتری	رشد در ۴۵ درجه سلسیوس	رشد در ۱۰ درجه سلسیوس	رشد در حضور ۶/۵ درصد نمک	قدرت تخمیر قندها: سوکروز	لاکتوز	مالتوز	رافینوز	رامنوز	مانوز	مانیتول	فروکتوز	سوربیتول	گالاکتوز	گریلوز	آرابینوز	تعداد (درصد)
لاکتوباسیلوس کازئی	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	(۳۴/۲۴) ۲۵
لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	(۱۵/۰۶) ۱۱
لاکتوباسیلوس دلبروکئی	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	(۱۰/۹۵) ۸
لاکتوباسیلوس رامنوزوس	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	۳ (۴/۱)
لاکتوباسیلوس هلوتیکوس	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	_	_	+	۲ (۲/۷۳)
لاکتوباسیلوس ویریدسنس	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	۱ (۱/۳۶)
لاکتوباسیلوس فرمنتوم	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	_	۱ (۱/۳۶)
استرپتوکوکوس لاکتیس	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	۷ (۹/۵۸)
استرپتوکوکوس ترموفیلوس	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	۴ (۵/۴۷)
انتروکوکوس فاسیوم	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	۶ (۸/۲۱)
انتروکوکوس فکالیس	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	۳ (۴/۱)
لوکونوستوک مزنتروئیدس	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	۲ (۲/۷۳)
مجموع																۷۳ (۱۰۰)

از مجموع ۷۳ جدایه شناسایی شده، ۳۶ جدایه از پنیرهای محلی، ۳۲ جدایه از دوغ‌های محلی، ۳ جدایه از دوغ‌های صنعتی و ۲ جدایه از پنیرهای صنعتی شناسایی شدند. تعداد جدایه‌های شناسایی شده در نمونه‌های پنیر به ترتیب ۱۳، ۱۲، ۷، ۴ و ۲ جدایه از نمونه‌های پنیر گوسفندی، گاوی، گاومیش بز و صنعتی بود. همچنین تعداد جدایه‌های شناسایی شده در نمونه‌های دوغ به ترتیب ۱۲، ۱۱، ۸، ۳، ۱و ۰ جدایه از نمونه‌های دوغ گوسفندی، گاومیش، گاو، صنعتی، بز و شتر می‌باشد (جداول ۳ و ۴).

جنس *لاکتوباسیلوس* با ۶۹/۸۶ درصد بیشترین فراوانی باکتری‌های اسیدلاکتیک جدا شده از محصولات لبنی مورد مطالعه را به خود اختصاص داد و *استرپتوکوکوس* با ۱۵/۰۶ درصد، *انتروکوکوس* با ۱۲/۳۳ درصد و *لوکونوستوک* با ۲/۷۳ درصد در جایگاه‌های بعدی قرار داشتند.

www.SID.ir

همانطور که در جداول ۳ و ۴ مشاهده می‌شود تنوع و تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک در نمونه‌های گوسفندی بیش از سایر نمونه‌ها می‌باشد و نمونه‌های صنعتی این تنوع و تعدد را نشان نمی‌دهند.

در پنیر گوسفندی بیشترین باکتری اسیدلاکتیک جدا شده متعلق به *استرپتوکوکوس لاکتیس* می‌باشد و *لاکتوباسیلوس کازئی* در پنیرهای گاوی و گاومیش بیشترین میزان را به خود اختصاص داده است. غالب بودن *انتروکوکوس فاسیوم* در پنیر بز جالب توجه می‌باشد و با توجه به مدفوعی بودن این باکتری قابل تامل می‌باشد.

در نمونه‌های دوغ، *لاکتوباسیلوس کازئی* بیشترین فراوانی را به خود اختصاص داد. غالب بودن *لاکتوباسیلوس کازئی* در نمونه‌های دوغ گاومیش و گاو و غالب بودن *لاکتوباسیلوس دلبروکئی* در نمونه‌های دوغ گوسفندی مشاهده شد. جداسازی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در تمام نمونه‌های دوغ قابل انتظار بود.

جدول۳- انواع و تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک جدا شده از نمونه‌های پنیر بر اساس نوع دام

ردیف	نوع دام	تعداد نمونه	باکتری‌های اسید لاکتیک	
			تعداد	نوع
۱	گاو	۳	۳	*لاکتوباسیلوس کازئی*
			۲	*لاکتوباسیلوس دلبروکئی*
			۲	*انتروکوکوس فاسیوم*
			۲	*لاکتوباسیلوس رامنوزوس*
			۲	*استرپتوکوکوس لاکتیس*
			۱	*انتروکوکوس فکالیس*
۲	گوسفند	۳	۲	*لاکتوباسیلوس کازئی*
			۲	*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*
			۱	*لاکتوباسیلوس دلبروکئی*
			۵	*استرپتوکوکوس لاکتیس*
			۲	*استرپتوکوکوس ترموفیلوس*
			۱	*انتروکوکوس فکالیس*
۳	گاومیش	۲	۶	*لاکتوباسیلوس کازئی*
			۱	*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*
۴	بز	۱	۴	*انتروکوکوس فاسیوم*
۵	صنعتی	۲	۱	*لاکتوباسیلوس کازئی*
			۱	*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*

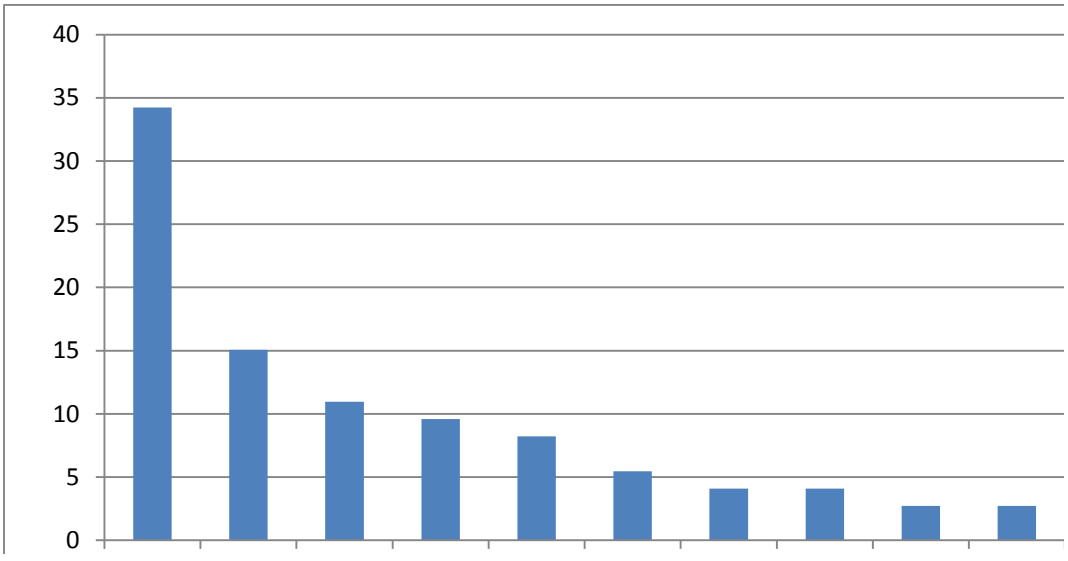
www.SID.ir

Archive of SID

جدول۴- انواع و تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک جدا شده از نمونه‌های دوغ بر اساس نوع دام

ردیف	نوع دام	تعداد نمونه	باکتری اسید لاکتیک	
			تعداد	نوع
۱	گاو	۳	۴	*لاکتوباسیلوس کازئی*
			۳	*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*
			۱	*لاکتوباسیلوس فرمنتوم*
			۴	*لاکتوباسیلوس دلبروکئی*
			۲	*استرپتوکوکوس ترموفیلوس*
			۱	*لوکونوستوک مزنتروئیدس*
			۱	*انتروکوکوس فکالیس*
۲	گوسفند	۳	۱	*لاکتوباسیلوس کازئی*
			۱	*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*
			۱	*لاکتوباسیلوس رامنوزوس*
			۱	*لاکتوباسیلوس هلوتیکوس*
۳	گاومیش	۲	۸	*لاکتوباسیلوس کازئی*
			۱	*لاکتوباسیلوس دلبروکئی*
			۱	*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*
			۱	*لاکتوباسیلوس هلوتیکوس*
۴	شتر	۴	۰	-
۵	بز	۱	۱	*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*
			۱	*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*
۶	صنعتی	۲	۱	*لاکتوباسیلوس ویریدنس*
			۱	*لوکونوستوک مزنتروئیدس*

در شکل ۱ درصد فراوانی گونه‌های مختلف باکتری‌های اسیدلاکتیک جدا شده در همه نمونه‌ها نشان داده شده است. که در این بین *لاکتوباسیلوس کازئی* با ۳۴/۲۴ درصد بیشترین فراوانی را به خود اختصاص داد. *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (۱۵/۰۶ درصد)، *لاکتوباسیلوس دلبروکئی* (۱۰/۹۵ درصد) و *استرپتوکوکوس لاکتیس* (۹/۵۸ درصد) از نظر فراوانی در جایگاه‌های بعدی قرار گرفتند.



شکل۱- درصد فراوانی باکتری‌های اسیدلاکتیک جدا شده

www.SID.ir

نتایج ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده علیه باکتری‌های بیماریزای گوارشی

میانگین نتایج قطر هاله عدم رشد حاصل از بررسی فعالیت ضدباکتریایی محلول رویی کشت باکتری‌های اسیدلاکتیک علیه چهار باکتری بیماریزای گوارشی با کمک روش چاهک در جدول ۵ نشان داده شده است. لازم به ذکر است که در این جدول نتایج جدایه‌هایی که اثر ضدباکتریایی نداشته‌اند نمایش داده نشده است. همانطور که مشاهده می‌شود *لاکتوباسیل‌ها* در مقایسه با دیگر جنس‌های باکتری‌های جدا شده فعالیت ضدباکتریایی بیشتری را نشان داده‌اند. در این بین *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* جدا شده از نمونه‌های دوغ و پنیرگوسفندی بیش از بقیه گونه‌ها باعث مهار رشد باکتری‌های بیماریزا گردیدند. بطوریکه *لاکتوباسیلوس کازئی* جدا شده از نمونه دوغ گوسفندی با میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۸/۳۳، ۱۶۶/۳۳، ۱۶/۳۳ و ۱۳ میلی‌متر به ترتیب علیه باکتری‌های *سیتروباکتر فروندی*، *باسیلوس سرئوس*، *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* فعالیت ضدباکتریایی قابل توجهی را نشان داد و اثرات آنتاگونیستی این باکتری علیه باکتری‌های بیماریزای گوارشی در سطح ۰/۰۵ با دیگر جدایه‌ها اختلاف معناداری دارد ($P < ۰/05$).

نکته قابل توجه در نتایج فعالیت ضدباکتریایی باکتری‌های اسید لاکتیک، فعالیت کمتر باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از نمونه‌های صنعتی در مقایسه با نمونه‌های محلی می باشد. در این بین تنها *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* جدا شده از دوغ صنعتی با میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۲، ۱۱، ۹/۶۶ و ۹ میلی‌متر به ترتیب علیه باکتری‌های *باسیلوس سرئوس*، *سیتروباکتر فروندی*، *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* فعالیت ضدباکتریایی نشان داد که در مقایسه با جدایه‌های جدا شده از نمونه‌های محلی فعالیت کمتری می باشد (جدول ۵).

از دیگر نتایج این مطالعه که در جدول ۵ کاملا مشهود است، فعالیت ضدباکتریایی قابل توجه باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از نمونه‌های محصولات لبنی گوسفندی در مقایسه با دیگر محصولات لبنی می‌باشد. بطوریکه *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* جدا شده از دوغ و پنیر گوسفندی به‌همراه *لاکتوباسیلوس دلبروکئی* و *لاکتوباسیلوس رامنوزوس* جدا شده از دوغ گوسفندی علیه تمامی باکتری‌های پاتوژن مورد مطالعه فعالیت ضدباکتریایی قابل توجهی نشان دادند. *لاکتوباسیلوس دلبروکئی* جدا شده از پنیر گوسفندی نیز به استثناء *استافیلوکوکوس اورئوس* باعث مهار رشد دیگر باکتری‌های پاتوژن گردید. در این بین *لوکونوستوک مزانتروئیدس* جدا شده از دوغ گوسفندی به ترتیب با میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۱ و ۹ میلی متر فعالیت ضدباکتریایی علیه باکتری‌های گرم مثبت مورد آزمون یعنی *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داد و *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده از پنیر گوسفندی نیز با میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۲/۳۳ میلی متر فقط علیه *باسیلوس سرئوس* موثر بود (جدول ۵).

نتایج این تحقیق نشان داد که *سیترو باکتر فروندی* بیشترین حساسیت را نسبت به محلول رویی کشت باکتری‌های اسیدلاکتیک جدا شده از نمونه‌های محصولات لبنی محلی شهرستان گرگان دارد ($P<0.05$) و اختلاف معنی‌دار بر اساس داده‌های خروجی از SPSS بین *سیتروباکتر فروندی* با *استافیلوکوکوس اورئوس* ، *اشرشیا کولی* و *باسیلوس سرئوس* مشاهده شد.

Archive of SID

جدول۵- قطر هاله عدم رشد باکتری‌های بیماریزای روده‌ای تحت تاثیر محلول رویی کشت باکتری‌های اسیدلاکتیک ایزوله شده بر حسب میلی‌متر (نتایج جدایه‌هایی که اثرضدباکتریایی نداشته اند نمایش داده نشده است)

باکتری بیماریزا باکتری اسیدلاکتیک جدا شده (منشاء ایزوله)	*اشریشیاکلی*	*باسیلوس سرئوس*	*سیتروباکتر فروندی*	*استافیلوکوکوس اورئوس*
لاکتوباسیلوس کازئی (دوغ گوسفندی)	۱۶/۳۳±۰/۵۷^{ab}	۱۶/۳۳±۰/۵۷^{ab}	۱۸/۳۳±۱/۵۲^{a}	۱۳±۳/۶^{b}
لاکتوباسیلوس کازئی (پنیر گوسفندی)	۱۵±۳/۴۶^{ab}	۱۳/۶۶±۰/۵۷^{b}	۱۸±۱/۷۳^{a}	۱۶±۰^{ab}
لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (پنیر گوسفندی)	۱۶±۰^{a}	۱۵±۰^{a}	۱۸±۲/۸۲^{a}	۱۵/۳۳±۱/۱۵^{a}
لاکتوباسیلوس رامنوزوس (دوغ گوسفندی)	۱۶±۰^{a}	۱۳/۶۶±۳/۰۵^{a}	۱۵/۶۶±۴/۰۴^{a}	۱۴/۳۳±۱/۱۵^{a}
لاکتوباسیلوس دلبروکئی (پنیر گاومیش)	۱۲/۵±۴/۹۴^{a}	۱۴±۵/۱۹^{ab}	۱۷±۰^{a}	۱۲±۰^{ab}
لاکتوباسیلوس فرمنتوم (دوغ گاوی)	۱۵±۰^{b}	۱۶±۰^{a}	۹/۶۶±۰/۵۷^{c}	۹±۰^{c}
لاکتوباسیلوس کازئی (دوغ گاو میش)	۱۳±۰^{a}	۱۲/۶۶±۰/۵۷^{a}	۹/۳۳±۰/۵۷^{b}	۱۳±۰^{a}
لاکتوباسیلوس دلبروکئی (پنیر گوسفندی)	۱۲/۵±۴/۹۴^{a}	۱۲±۱/۷۳^{a}	۱۴±۳/۴۶^{a}	-
لاکتوباسیلوس دلبروکئی (دوغ گوسفندی)	۱۱±۰^{a}	۱۳±۰^{a}	۱۲/۶۶±۳/۵۱^{a}	۱۱±۲^{a}
لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (دوغ گوسفندی)	۱۰/۳۳±۳/۲۱^{a}	۱۲±۰^{a}	۱۳±۰^{a}	۹±۰^{a}
لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (دوغ صنعتی)	۹/۶۶±۱/۱۵^{a}	۱۲±۲^{a}	۱۱±۰^{a}	۹±۰^{a}
لاکتوباسیلوس کازئی (پنیر گاوی)	۱۲±۰^{a}	۱۲±۰^{a}	۱۱±۰^{b}	-
لاکتوباسیلوس رامنوزوس (پنیر گاوی)	۹/۳۳±۰/۵۷^{b}	-	۱۱±۰^{a}	-
لاکتوباسیلوس هلوتیکوس (دوغ گاومیش)	-	۱۵±۰^{a}	-	۱۰±۰^{b}
انتروکوکوس فکالیس (پنیر گوسفندی)	-	۱۲/۳۳±۰/۵۷^{a}	-	-
لوکونوستوک مزونتروئیدس (دوغ گوسفندی)	-	۱۱±۰^{a}	-	۹±۰^{a}

حروف کوچک متفاوت در ستون‌ها (a,b,...) وجود اختلاف معنی دار بین تیمارهای مختلف را نشان می‌دهد.

بحث

جستجوی باکتری‌های با توان پروبیوتیک در محصولات سنتی، پتانسیل معرفی نژادهای جدید جهت بهره برداری در صنعت لبنیات را فراهم می‌کند. فعالیت ضدباکتریایی علیه باکتری‌های عامل بیماری‌های گوارشی، قدرت تحمل شرایط اسیدی و تحمل املاح صفراوی از شاخص‌های پروبیوتیک‌ها می‌باشد. در مطالعه حاضر باکتری‌های اسیدلاکتیک جدا شده از نظر مهار رشد چهار باکتری بیماریزای گوارشی شامل *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلی*، *باسیلوس سرئوس* و *سیتروباکتر فروندی* با هدف معرفی سویه‌های پروبیوتیک از محصولات لبنی محلی شهرستان گرگان مورد ارزیابی قرار گرفتند. در این خصوص مطالعات متعددی در نقاط مختلف دنیا صورت پذیرفته است و منجر به شناسایی و معرفی سویه‌های بومی باکتری‌های اسیدلاکتیک با توان پروبیوتیک شده است (توکلی و همکاران، ۱۳۹۵؛ نریمانی و همکاران، ۱۳۹۲ ;Aslim et al., 2005; Kiai et al., 2006; Aslam and Qazi, 2010; Tajabadi Ebrahimi et al., 2011; Iranmanesh et al., 2012; Pundir et al., 2013;

www.SID.ir

Dorri et al., 2013; Salehi, 2013; Haghshenas et al., 2015;).

همانطور که در بخش نتایج آمد جنس *لاکتوباسیلوس* با ۶۹/۸۶ درصد بیش ترین فراوانی باکتری‌های اسیدلاکتیک جدا شده از محصولات لبنی مورد مطالعه را به خود اختصاص داد. مطالعات متعددی جنس *لاکتوباسیلوس* را به عنوان شایع‌ترین جنس باکتری‌های اسید لاکتیک از محصولات لبنی محلی معرفی کرده اند (Badis et al., 2004; Greco et al., 2005; Torres Lianez et al., 2006; Ahmadi et al., 2010;).

لاکتوباسیل‌ها به‌عنوان گونه‌های غالب در پنیرهای تهیه با شیرخام گزارش شده اند، زیرا این ارگانیسم‌ها قادرند که تحت شرایط انتخابی شدید نیز به رشد ادامه دهند و به دلیل ویژگی‌های پروتئولیتیک نقش اساسی در ایجاد خصوصیات حسی محصول از خود نشان دهند (Torres Lianez et al., 2006).

وجود *انتروکوکوس‌ها* با فراوانی ۱۲/۳۳ درصد در نمونه های محصولات لبنی و به خصوص پنیرهای محلی از دیگر نتایج این تحقیق بود. گونه‌های *فکالیس* و *فاسیوم* گونه‌های جدا شده بودند. در مطالعه احمدی و همکاران (۲۰۱۰) انتروکوکوس‌ها بعد از *لاکتوباسیل‌ها* شایع‌ترین باکتری‌های اسید لاکتیک در نمونه‌های پنیر لیقوان گزارش شدند (Ahmadi et al., 2010).

دعوتی (۱۳۹۷) در پژوهشی *انتروکوکوس فاسیوم، انتروکوکوس دورانس، پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی، لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم، لاکتوباسیلوس فرینتوشنسیز، لاکتوباسیلوس جانسونی و لاکتوباسیلوس دلبروکی* را از ماست گوسفندی عشایر الوند جداسازی کرد (دعوتی، ۱۳۹۷).

حضور *انتروکوکوس فاسیوم، انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس دورانس* در شیر خام و پنیر تهیه شده از شیر خام معمول است. *انتروکوکوس فاسیوم* و *انتروکوکوس دورانس* از پنیر فرسکوی مکزیکی و پنیر مصری و پنیر لیقوان شناسایی شده‌اند که *انتروکوکوس فاسیوم* گونه غالب در میان جدایه‌های *انتروکوکوس* در پنیرهای یاد شده گزارش شده است (Ayad et al., 2004; Torres Lianez et al., 2006).

حتی از تعدادی از نژادهای *انتروکوکوس* به عنوان استارتر به صورت تجاری استفاده می‌شوند. برای مثال استفاده از *انتروکوکوس فاسیوم* (K77D) به عنوان یک استارتر در دانمارک مورد تأیید قرار گرفته است (Torres Lianez et al., 2006).

همانطور که گفته شد *لاکتوباسیلوس کازئی* بیش ترین فراوانی را در محصولات لبنی محلی شهرستان گرگان در مطالعه حاضر نشان داد و به دنبال آن *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *لاکتوباسیلوس دلبروکئی* و *استرپتوکوکوس لاکتیس* قرار داشتند. در مطالعه‌ای مشابه، فراوان‌ترین *لاکتوباسیل‌های* موجود در محصولات لبنی شهرستان جهرم، *لاکتوباسیلوس کازئی* ، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس پلانتاروم* معرفی شدند (Dorri et al., 2013).

بردواج و همکاران (۲۰۱۲) نیز *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازئی* به ترتیب با ۳۷/۱۷ و ۲۴/۳۵ درصد به‌عنوان فراوان‌ترین جدایه‌های نوعی محصول لبنی سنتی در هندوستان معروف به Dahi گزارش کردند (Bhardwaj et al., 2012).

فرح بخش و همکاران (۱۳۹۲) با هدف جداسازی و شناسایی لاکتوباسیل های با توان پروبیوتیک و دارای فعالیت ضدمیکروبی از ماست‌های سنتی شهرستان رفسنجان، *لاکتوباسیلوس کازئی*، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *لاکتوباسیلوس دلبروکئی*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس رامنوزوس*، *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس*، *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* و *لاکتوباسیلوس برویس* جداسازی نمودند که در این بین بیشترین اثر ضد باکتریایی از *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* مشاهده شد (فرح بخش و همکاران، ۱۳۹۲).

www.SID.ir

Archive of SID

فراوانی *لاکتوباسیلوس کازئی* در محصولات لبنی سنتی در مطالعه ظفرمختاریان و همکاران (۱۳۹۷) با هدف جداسازی اگزوپلی ساکارید از باکتری‌های اسید لاکتیک گزارش شده است. این محققین حضور *لاکتوباسیلوس کازئی، لاکتوباسیلوس پلانتاروم، لاکتوباسیلوس رامنوزوس* و *لاکتوباسیلوس بوچنری* را در نمونه‌های شیر و ماست گوسفندی روستاهای شهرستان ارومیه را با تکثیر ژن 16s rRNA با استفاده از PCR تایید نمودند (ظفرمختاریان و همکاران، ۱۳۹۷).

در مطالعه حاضر فعالیت ضدباکتریایی محلول رویی حاصل از کشت باکتری‌های اسیدلاکتیک جدا شده از محصولات لبنی محلی شهرستان گرگان به اثبات رسید. مطالعات متعدد دیگر نیز به نقش باکتری‌های اسیدلاکتیک جدا شده از محصولات لبنی علیه باکتری‌های بیماریزا اشاره داشته‌اند.

نتایج بررسی فعالیت آنتاگونیستی باکتری‌های اسیدلاکتیک جدا شده، فعالیت ضدباکتریایی قابل توجه *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* را نشان داد. این فعالیت ضدباکتریایی در مطالعات دیگر نیز گزارش شده است.

صالحی (۲۰۱۳) در مطالعه‌ای به ارزیابی اثر آنتاگونیستی لاکتوباسیل‌های جدا شده از مواد غذایی بومی ایران در استان‌های غربی و شرقی پرداخت. در این تحقیق ۷۰ درصد جدایه‌ها قادر به مهار رشد دو باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیاکلی* بودند. *لاکتوباسیلوس کازه ای* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* از جمله این لاکتوباسیلوس‌ها بودند (Salehi, 2013).

در مطالعه کاظمی درسنکی و همکاران (۲۰۱۱)، باکتری‌های اسید لاکتیک، توان ضد میکروبی خوبی در مقابل هفت باکتری بیماری‌زا از خود نشان دادند و بیشترین اثر مهار کنندگی را *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بر علیه *باسیلوس سرئوس* طی روش چاهک با میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۴ میلی‌متر از خود نشان داد (Kazemi Dorosnaki et al., 2011).

اسلم و قاضی (۲۰۱۰) چهار باکتری *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس، لاکتوباسیلوس کازئی، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس سالیواریوس* از یک نمونه ماست محلی را جداسازی نمودند و فعالیت ضدباکتریایی محلول رویی کشت این باکتری ها را علیه *استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشا کلی، سالمونلا* و مخمرها اثبات کردند. در مطالعه آنان *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بیشترین اثر آنتاگونیستی را علیه *اشریشیا کلی* داشت (Aslam and Qazi, 2010).

کیایی و همکاران (۱۳۸۵) نیز به مطالعه اثر آنتاگونیستی باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از ماست‌های محلی استان گلستان پرداختند نتایج آنها نشان داد که بیشترین اثر بازدارندگی مربوط به گونه‌های *لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوکوکوس لاکتیس* در روش چاهک بود و حداکثر میانگین قطر هاله عدم رشد آنها ۱۸ میلی‌متر ارزیابی شد، بیشترین و کمترین اثر مهاری برعلیه باکتری‌های بیماریزا به ترتیب علیه *یرسینیا انتروکولیتیکا و باسیلوس سرئوس* مشاهده شد (کیایی و همکاران، ۱۳۸۵).

فعالیت ضدمیکروبی باکتری‌های اسیدلاکتیک ناشی از عوامل گوناگون از جمله اسیدهای آلی، پراکسید هیدروژن، دی اکسید کربن و باکتریوسین‌ها می‌باشد. میزان و نوع عوامل ضدمیکروبی باکتری‌های اسیدلاکتیک به گونه و مواد تشکیل دهنده محیط کشت بستگی دارد (Arques et al., 2015). اسیدهایی همچون اسید لاکتیک و اسید استیک از جمله ترکیباتی هستند که می‌توانند بر طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها اثر بازدارندگی داشته باشند. حضور اسید می‌تواند سبب کاهش pH محیط شود و شرایط رشد را برای دیگر میکروارگانیسم‌ها غیرفعال کند. همچنین فرم غیریونیزه این اسیدهای آلی می‌تواند از غشای سلول باکتری‌های بیماری‌زا عبور نماید و با توجه

www.SID.ir

به pH داخل سلول به فرم یونیزه تبدیل شود و یون‌های هیدروژن تولید سبب اسیدی شدن سیتوپلاسم و اختلال در خاصیت الکتروشیمیایی سلول شوند (Collado et al., 2007).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این تحقیق نشان داد که متابولیت‌های تولید شده توسط باکتری‌های اسیدلاکتیک محصولات لبنی محلی شهرستان گرگان قادرند از رشد باکتری‌های بیماری‌زا جلوگیری کنند. می‌توان امیدوار بود از ایزوله هایی همچون *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* که فعالیت ضدباکتریایی قابل توجهی علیه باکتری‌های بیماریزا گوارشی مورد آزمون نشان دادند، به‌عنوان پروبیوتیک‌های بومی در محصولات لبنی استفاده شود. پیشنهاد می‌شود جهت معرفی این ایزوله‌ها به‌عنوان پروبیوتیک‌های بومی، دیگر شاخص‌های میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک از جمله میزان بقاء و تحمل شرایط اسیدی معده و املاح صفراوی روده، کاهش میزان کلسترول و تری‌گلیسرید، توانایی کلونیزاسیون به سلول‌های اپی‌تلیال روده‌ای، همچنین مطالعه اثر سینرژیسمی باکتری‌های اسید لاکتیک فوق در مهار رشد پاتوژن‌های روده‌ای در کنار انجام این آزمون‌ها در شرایط *In vivo* در حیوانات آزمایشگاهی مورد آزمون و تایید قرار بگیرد.

منابع

۱. توکلی، محمود.، حمیدی اصفهانی، زهره.، حجازی، محمد امین.، عزیزی، محمد حسین و عباسی، سلیمان. (۱۳۹۵). توانایی پروبیوتیکی سویه های *لاکتوباسیلوس* جدا شده از پنیر محلی مازندران. مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران، سال یازدهم، شماره ۴، صفحه ۹۸-۸۹.

۲. دعوتی، نفیسه. (۱۳۹۷). جداسازی و شناسایی فنوتیپی باکتری های اسید لاکتیک ذاتی ماست تولید شده از شیر گوسفند عشایر منطقهالوند و ارزیابی پتانسیل تولید اسید آنها. مجله علوم و صنایع غذایی ایران، سال پانزدهم، شماره ۱، صفحه ۲۲۲-۲۱۳.

۳. ظفرمختاریان، الهام.، رضازاد باری، محمود و امیری، صابر. (۱۳۹۷). جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری‌های اسید لاکتیک تولید کننده اگزوپلی ساکارید از شیر و ماست گوسفندی. مجله علوم وصنایع غذایی، دوره ۱۵، شماره ۷۹، صفحه ۲۵۲-۲۴۳.

۴. فرح بخش، محمد.، حکیمی، حمید.، بهرام آبادی، رضا.، ذوالفقاری، محمدرضا و درکی، نادر. (۱۳۹۲). جداسازی لاکتوباسیلهای پروبیوتیک از ماست‌های سنتی مناطق روستایی رفسنجان و بررسی اثرات ضد میکروبی آنها. مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، دوره دوازدهم، شماره ۹، صفحه ۷۴۶-۷۳۳.

۵. کیایی، الهه.، امیرمظفری، نور.، جندقی، نادر و قائمی، عزت اله. (۱۳۸۵). اثر آنتاگونیستی باکتری‌های لاکتیک جدا شده از ماست برعلیه باکتری‌های بیماری زا. مجله مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی گرگان، دوره هشتم، شماره ۱، صفحه ۳۳-۲۸.

۶. نریمانی، طاهره.، تاری نژاد، علیرضا و حجازی، محمد امین. (۱۳۹۲). جداسازی و شناسایی باکتری‌های لاکتیکی از محصولات لبنی سنتی کلیبر، هریس و ورزقان. مجله بهداشت مواد غذایی، دوره سوم، شماره ۳، صفحه ۳۷-۲۳.

7. Ahmadi, S.M., Khomeiri, M., Khosroshahi, A. and Kashani Nejad, M. 2010. Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria (LAB) from Iranian Traditional Lighvan Cheese. J Agri Sci Nat Resourc. 16: 136-146.

8. Arqués, J.L., Rodríguez, E., Langa, S., María Landete, J. and Medina M. 2015. Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria in Dairy Products and Gut: Effect on Pathogens. Biomed Res. Int. 2015: 1-9.

9. Aslam, S. and Qazi, J.I. 2010. Isolation of Acidophilic Lactic Acid Bacteria Antagonistic to Microbial Contaminants. Pakistsn j. zool. 42: 567-573.

www.SID.ir

Archive of SID

10. Aslim, B., Yukesekdag, Z.N., Sarikaya, E. and Beyatli, Y. 2005. Determination of the bacteriocin-like substances produced by some lactic acid bacteria isolated from Turkish dairy products. LWT-Food Sci Technol. 38: 691-694.
11. Ayad, E.H.E., Nashat, S., El-Sadek, N., Metwaly, H. and El-Soda. M. 2004. Selection of wild lactic acid bacteria isolated from tradional Egyption dairy products according to production and technological criteria. J Food Microbiol. 21: 715-725.
12. Badis, A., Guetarni, D., Mussa Boudjema, B., Henni, D.E. and Kihal, M. 2004. Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. J Food Microbiol. 21: 579-588.
13. Bhardwaj, A., Puniya, M., Sangu, K.P.S., Kumar, S. and Dhewa, T. 2012. Isolation and Biochemical Characterization of *Lactobacillus* Species Isolated from Dahi. Research & Reviews. J Dairy Sci Technol, 1: 18-31.
14. Collado, C., Surono, I., Meriluoto, J. and Salminen, S. 2007. Indigenous dadih lactic acid bacteria: cell-surface properties and interactions with pathogens. J Food Sci, 72: 89–93.
15. Dorri, K., Namdar, N. and Hemayatkhah Jahromi, V. 2013. Isolation of *Lactobacilli* from Dairy Products and Their Effects on the Main Pathogenic Bacteria in Stomach and Intestine. Med. Lab. J. 7: 21-29.
16. Edalatian, M.R., Habibi, M.B., Mortazavi, S.A., Nasiri, M.R., Basami, M.R. and Hashemi, M. 2010. Isolation and Identification the Indigenous Lactic Flora from *Lighvan*, as an Iranian Raw Milk Cheese from Milk to Ripened cheese. World Acad Sci Eng Technol. 68: 1346-1351.
17. Finegold, S.M. and Baron, E.J. 2009. Diagnostic Microbiology, 8th ed. Bailey & Scott s. Mosby Company. Baltimore. Philadelphia. Part II, IV, 171-476.
18. Haghshenas, B., Nami, Y., Haghshenas, M., Abdullah, N., Rosli, R., Radiah, D. and Yari Khosroushahi, A. 2015. Bioactivity Characterization of *Lactobacillus* Strain isolated Frome dairy producets. Micribiol Open. 4: 803-813.
19. Iranmanesh, M., Ezzatpanah, H., Mojgani, N., Karimi Torshizi, M.A., Aminafshar, M. and Maohamadi, M. 2012. Isolation of Lactic Acid Bacteria from Ewe Milk, Traditional Yoghurt and Sour Buttermilk in Iran. European J Food Res Rev. 2: 79-92.
20. Kazemi Dorosnaki, R., Ghaemi, N. and Mirpor, M.S. 2011. Study of antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from probiotic products. J Microbial Biotechn. 2: 26-29.
21. Lacerda, I.C.A., Miranda, R.L., Borelli, B.M., Nunnes, A.C., Nardi, R.M.D., Lachance, M., Rosa, C.A. 2005. Lactic acid bacteria and yeasts associated with spontaneous fermentations during the production of sour cassava starch in Brazil. Int J Food Microbiol. 105: 213-219.
22. Mattila-Sandholm, T., Myllarinen, P., Crittenden, R., Fonden, R. and Saarela, M. 2002. Technological Challenges for future Probiotic foods. Int Dairy J. 12: 173-182.
23. Navidghasemizad, S., Hesari, J., Saris, P. and Nahaei, M.R. 2009. Isolation of lactic acid bacteria from *Lighvan* cheese, a semi hard cheese made from raw sheep milk in hard cheese made from raw sheep milk in Iran. Int J Dairy Technol. 62: 260-264.
24. Pundir, R.K., Neha Kashyap, S.R. and Kaur, A. 2013. Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from food samples:an in vitro study. J Appl Pharm Sci. 3: 085-093.
25. Rattanchikunopon, P. and Phuinkhachorn, P. 2010. Lactic acid bacteria:their antimicrobial compounds and their uses in food production. Ann. Biol. Res. 1: 218-228.
26. Salehi, M. 2013. Evaluating the antagonistic activities of *lactobacillus* isolated from foods native to Iran. Innov Food Sci Technol. 1: 79-84.
27. Somoro, A., Masud, T. and Anwaa, K. 2002. Role of lactic acid bacteria in food

www.SID.ir

M.A. and Gonzalez-Cordova, A.F. 2006. Characterization of the natural microflora of artisanal Mexican Fresco cheese. J Food Cont. 17: 683-690.
30. Wadher, K.J., Mahore, J.G. and Umekar, M.J. 2010. Probiotics: living medicines in health maintenance and disease prevention. Int J Pharma and Bio Sci. 1: 1-9.
preservation and Human Health-A Review. Pak J Nutr, 1: 20-24.
28. Tajabadi Ebrahimi, M.C., Ouwehand, A.A., Hejazi, M. and Jafari, P. 2011. Traditional Iranian dairy products: A source of potential probiotic *Lactobacilli*. Afr. J. Microbiol. Res. 5: 20–27.
29. Torres-Llanez, M.J., Vallejo-Cordoba, B., Diaz-cinco, M.E., Mazorra-Manzano,

www.SID.ir

Archive of SID

The Isolation of lactic acid bacteria from local dairy products of Gorgan township with the ability to inhibit the growth of some gastrointestinal pathogens

Koohsari H[1*], Rashti Z[2], Arab S[2]

[1]Department of Microbiology, Azadshahr branch, Islamic Azad University, Azadshahr, Iran.

[2]Graduated student, Department of Food Science and technology, Azadshahr branch, Islamic Azad University, Azadshahr, Iran.

***Corresponding author:** *hadikoohsari@yahoo.com*

Received: 21 April 2018 Accepted: 23 July 2018

Abstract

Isolation and identification of lactic acid bacteria from local products can play an important role in the introduction of unique types of probiotics. The present study was conducted in an attempt to isolate lactic acid bacteria from local dairy produced in the township of Gorgan which had the ability to inhibit the growth of some gastrointestinal pathogens. In order to isolate lactic acid bacteria, cheeses samples were sub-cultured on media cultures of MRS agar, M17 Agar , KAA and MRS+Vancomycin. Then, isolates were identified based on general morphological characteristics, biochemical and sugar fermentation tests. Using agar well diffusion, the antibacterial activity of culture supernatant of lactic acid bacteria was tested against four pathogenic bacteria. Among 24 samples of local cheeses and dooghs and 4 industrial samples, a total of 73 isolates were identified in which *Lactobacillus casei* was the most frequent isolate with with 34.24%. *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus* isolated from sheep's dough and sheep's cheese and *Lactobacillus delbrucki* and *Lactobacillus ramenosus* isolated from sheep's dough showed significant antibacterial activity against all pathogenic bacteria studied, namely, *E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus* and *C. freundii*. Moreover, lactic acid bacteria isolated from industrial samples showed less antibacterial activity compared to isolates of local samples. Overall according to antagonistic effects of lactic acid bacteria isolated from of *Gorgan's* local dairy products, it is recommended to evaluate their use as probiotic bacteria.

Keywords: Lactic acid bacteria, Local dairy products, Gorgan township, Antibacterial activity, gastrointestinal pathogen.

www.SID.ir