# جداسازی، شناسایی و مشاهده فعالیت ضدمیکروبی لاکتوباسیلهای بدست آمده از لبنیات در تهران – سال ۱۳۸۰

دکتر جمیله نوروزی[۱]، دکتر رحیم سوادکوهی[۲]، دکتر عباس جعفری‌نژاد[۳]، فاطمه نوربخش[۴]

## چکیده

**سابقه و هدف:** : باکتریهای اسیدلاکتیک که به عنوان آغازگر برای تولید فرآورده‌های لبنیاتی مورد استفاده قرار می‌گیرند، عوامل اصلی تخمیر و محافظت کننده غذا بوده و همچنین در ایجاد طعم، بو و بافت فرآورده‌های غذایی نقش بسزایی دارند. هدف از این بررسی، جداسازی، شناسایی و مشاهده فعالیت ضدمیکروبی لاکتوباسیلهای بدست آمده از لبنیات بوده است.

**مواد و روش ها:** در این مطالعه توصیفی نمونه‌های مختلفی از شیر و فرآورده‌های لبنیاتی به روش پورپلیت در محیط MRS در شرایط بیهوازی در $37^0C$ کشت داده شد. بعد از پیدایش کلنی‌ها و رنگ‌آمیزی به روش گرام و انجام تست کاتالاز و اکسیداز، از تستهای بیوشیمیایی برای شناسایی آنها استفاده گردید. خاصیت ضدمیکروبی آنها با استفاده از دیسک بلانک و نقطه‌گذاری در برابر برخی از باکتریهای پاتوژن مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته ها:** از ۵۰ نمونه مورد بررسی، ۱۶ لاکتوباسیل مختلف شامل لاکتوباسیل فرمنتوم ( ۳۲٪ ) , پلانتاروم (۲۵٪)، کازه‌ای (۲۵٪)، دلبروکی , کورواتوس، هلوتیکوس ( هر کدام ۶٪ ) بدست آمد. این باکتریها دارای خاصیت ضدمیکروبی در برابر سودوموناس آئروژینوزا، استافیلوکوک اورئوس، اشریشیاکلی، سالمونلاتایفی موریوم، باسیلوس سوبتیلیس و باسیلوس سرنوس بودند. این باکتریها در ۷-۵ ph در حرارت $24^0C$، مواد ضدمیکروبی بیشتری تولید کردند. خاصیت ضدمیکروبی این مواد در حرارت $100^0C$ به مدت ۱۰ دقیقه پایدار بوده، در مدت ۲۰ دقیقه کاهش زیادی یافت و پس از ۳۰ دقیقه جوشاندن و همچنین در حرارت اتوکلاو به مدت ۱۵ دقیقه غیرفعال شد.

**نتیجه گیری و پیشنهادات:** به علت اثر مهارکنندگی، از لاکتوباسیلهای پروبیوتیک یا باکتریوسین خالص شده آن می‌توان به عنوان نگهدارنده بیولوژیکی در تولید فرآورده‌های لبنیاتی استفاده نمود. بنابراین، توصیه می‌شود که لاکتوباسیل کازه‌ای و لاکتوباسیل اسیدوفیلوس به عنوان آغازگر در این فرآورده‌ها به کار رود.

**واژه‌های کلیدی:** لاکتوباسیلها، اسیدلاکتیک، فرآورده‌های لبنیاتی، فعالیت ضدمیکروبی.

## مقدمه:

لاکتوباسیلها، باکتریهای گرم مثبت، بدون اسپور، بلند، کوتاه، کشیده یا خمیده هستند. سلولها اغلب آرایش زنجیره‌ای داشته و بندرت متحرک می‌باشند. این باکتریها به مقدار فراوان در شیر، فرآورده‌های لبنی، گوشت، سبزیجات وغیره وجود دارند.اثر حفاظتی لاکتوباسیلها در نگهداری غذاهای تخمیری به طور عمده به دلیل شرایط اسیدی است که در زمان رشد باکتریها در غذا بوجود می‌آید. تبدیل کربوهیدراتها به اسیدهای آلی (اسید استیک و اسید لاکتیک) به همراه کاهش pH، باعث افزایش نیمه عمر وکیفیت خوب فرآورده‌های غذاهای تخمیری می‌شود. این باکتریها قادر به تولید مواد دیگری مانند باکتریوسین، پراکسیدهیدروژن، دی‌استیل، استالدئید، آمونیاک، اسیدهای چرب آزاد
و غیره هستند که اکثر اثر بازدارندگی بر روی رشد بسیاری از میکروارگانیزمها دارند (۱). برخی از این مواد در برابر برخی از میکروارگانیزمهای پاتوژن غذایی و میکروارگانیزمهای فاسد کننده غذا
مانند لیستریا (۲)، کلوستریدیوم، لیستریاو انتروکوک (۳)، برخی از باسیلوسها، استافیلوکوک و لیستریا (۴) و غیره، اثر بازدارندگی رشد دارند.
لاکتوباسیلها در صنعت برای اصلاح بو، طعم و بافت محصولات تخمیری به کار می‌روند و با توجه به اثر ممانعت از رشدی که بر روی باکتریهای مختلف دارند. سعی بر آن است تا از این باکتریها با باکتریوسین‌های خالص شده آنها به عنوان نگهدارنده بیولوژیکی در غذا استفاده شود (۵).
حضور لاکتوباسیلها برای بقا اکوسیستم میکروبی روده مهم است، زیرا، علاوه بر بقا و تشکیل کلنی در معده و روده، این باکتریها به اسید و صفرا بردبارند و دارای توانایی اتصال به سطح روده می‌باشند (۶).
برخی از این باکتریها دارای خاصیت پروبیوتیک هستند، یعنی میکروارگانیزمهایی بوده که مصرف آنها موجب حفظ سلامتی انسان می‌شود (۷). از اثرات مفید این باکتریها، پیشگیری و درمان اختلالات روده‌ای در انسان می‌باشد و در افرادی که مبتلا به نقص (کمبود)لاکتاز هستند، هضم لاکتوز را بهبود می‌بخشند. به علاوه در حیوانات، گزارشهایی از اثرات مفید این باکتریها در پائین آوردن کلسترول، تحریک سیستم ایمنی و توسعه فعالیتهای ضدسرطان گزارش شده است (۸). بنابراین، علاوه بر مغذی بودن و لذیذ بودن، فرآورده‌های لبنیاتی با جلوگیری از رشد پاتوژنها، در سلامت انسان کمک می‌کنند (۵).
هدف از این بررسی، جداسازی، شناسایی و مشاهده فعالیت ضدمیکروبی لاکتوباسیلهای موجود در شیر و فرآورده‌های لبنیاتی (پنیر، ماست، خامه، کره و کشک) بوده است.

---

[1]- ph.D میکروبیولوژی و دانشیار دانشگاه علوم پزشکی ایران
[2]- فوق تخصص بیماریهای عفونی و استادیار دانشگاه علوم پزشکی بابل
[3]- ph.D میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی
[4]- کارشناس ارشد دانشگاه آزاد اسلامی

Archive of SID
www.SID.ir

**مواد و روش ها**

نمونه‌های مختلفی از شیر و فرآورده‌های لبنیاتی (ماست، پنیر، خامه، کره و کشک) از کارخانه‌های مختلف خریداری شد و پس از تهیه رقت، به روش پورپلیت در محیط MRS جامد کشت داده شد و در شرایط بیهوازی در $37^0C$ نگهداری گردید. بعد از پیدایش کلنی‌ها و رنگ‌آمیزی به روش گرام و انجام تست کاتالاز و اکسیداز، از تستهای بیوشیمیایی (تخمیر قندها، آزمایش حرکت، رشد در pHهای مختلف و دماهای مختلف) جهت شناسایی بیشتر لاکتوباسیل‌ها تا سطح گونه مورد استفاده قرار گرفت. قندهای مورد آزمایش شامل گلوکز، آرابینوز، رافینوز، رامنوز، گزیلوز، تری‌هالوز، ساکاروز، لاکتوز، مالتوز، گالاکتوز و مانیتول بود. برای انجام آزمایش قندها، مقدار ۱٪ از قند موردنظر به محیط کشت MRS بدون گلوکز و عصاره گوشت اضافه گردید.

بعد از اطمینان لاکتوباسیل بودن آنها، خاصیت ضدمیکروبی آنها با استفاده از روش دیسک بلانک و نقطه‌گذاری در برابر پاتوژنهای استافیلوکوک اورئوس، سالمونلاتیفی موریوم، اشریشیاکلی، سودوموناس آئروژینوزا، باسیلوس سوبتیلیس و باسیلوس سرئوس مورد بررسی قرار گرفت. سپس، هاله عدم رشد آنها در pHهای مختلف (۲تا۱۲) و حرارتهای ۲۰ تا $40^0C$ هم به روش پلیت و هم با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۶۰نانومتر با هم مقایسه گردید. خاصیت ضدمیکروبی این لاکتوباسیلها نیز با افزودن مایع سطحی آنها که فاقد باکتری بود، بدون حرارت و پس از حرارت $100^0C$ به مدت ۱۰،۲۰،۳۰ دقیقه و حرارت اتوکلاو به مدت ۱۵ دقیقه، به پاتوژنهای فوق مورد بررسی قرار گرفت. در این حالت، هم از روش پلیت و هم از اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۵۰ نانومتر استفاده شد و هر یک ساعت یکبار تا ۲۴ ساعت اندازه گرفته شد.

**یافته ها**

در این بررسی که در تابستان و پائیز ۱۳۸۰ در آزمایشگاه محمودیه دانشگاه آزاد اسلامی انجام گرفت، از ۵۰ نمونه مورد بررسی، ۱۶ لاکتوباسیل بدست آمد. این لاکتوباسیلها بر اساس شکل ظاهری کلنی، شکل میکروسکوپی، رشد در حرارتهای مختلف , تخمیر قندها و وجود حرکت به عنوان لاکتوباسیل های فرمنتوم ( ۳۲٪ ) , کازه ای ( ۲۵٪ ) , پلانتاروم ( ۲۵٪ ) , هلوتیکوس (۶٪)، دلبروکی (۶٪) و کورواتوس (۶٪) شناسایی شدند.

کلنی این باکتریها در $37^0C$ در شرایط بیهوازی پس از ۴۸ ساعت به قطر ۲ تا ۵ میلیمتر به رنگ سفید تا کرم در محیط MRS مشاهده شد. این باسیلها، گرم مثبت، بدون اسپور، بلند. برخی کوتاه بوده و تعدادی هم حالت خمیده داشتند. تمام باکتریهای جدا شده در این بررسی، در حرارت ۲۴ تا $37^0C$ رشد خوبی داشتند اما بهترین رشد در حرار $30^0C$ مشاهده گردید. مناسب‌ترین pH برای رشد این لاکتوباسیلها در محیط MRSحدود ۶/۶-۵/۵ بود. اگرچه این باکتریها در pH قلیایی تا ۱۰ رشد کردند اما با کاهش و افزایش pH، رشد آنها نیز بتدریج کاهش یافت، به طوری که در PH برابر ۱۲، رشدی مشاهده نگردید.

این باکتریها در $37^0C$ پس از ۷، ۲۴، ۷۲ ساعت، هیچگونه فعالیت ضدمیکروبی بر روی باکتریهای مورد بررسی نداشتند و در اطراف دیسک بلانک، هاله عدم رشد مشاهده نگردید. در $30^0C$، هاله، عدم رشد، باریک بوده اما در $24^0C$، هاله بازدارنده رشد به مقدار ماکزیمم رسید و بیشترین هاله عدم رشد توسط لاکتوباسیل کازه‌ای بر روی استافیلوکوک اورئوس حدود ۱۷ میلیمتر بود

هاله عدم رشد مایع سطحی لاکتوباسیل پلانتاروم بر روی استافیلوکوک حدود ۸ ساعت بعد از کشت ظاهر گردید و پس از ۱۲ ساعت به میزان حداکثر ۱۵ میلیمتر رسید و تا ۴۸ ساعت ثابت باقی ماند.

هنگامی که مایع سطحی لاکتوباسیل به محیط کشت باکتریهای مورد بررسی اضافه گردید، نتایج نشان داد که حدود ۳-۱ ساعت از رشد باکتریهای جلوگیری شد و سپس، رشد مجدد آنها ادامه یافت. به طور کلی، نتایج نشان داد که اثر مهارکنندگی رشد لاکتوبایل کازه‌ای بر روی باکتریهای مورد بررسی بسیار قویتر از سایر باکتریها بوده است. علاوه بر آن، در بررسیهای هاله عدم رشد، اثر ضدمیکروبی عصاره کشت لاکتوباسیل کازه‌ای که به مدت ۲ هفته در حرارت اتاق، یخچال و فریزر یخچال آزمایشگاه نگهداری شده بود، قویتر از سایر لاکتوباسیلها بود.

خاصیت ضدمیکروبی ماده تولید شده توسط باکتریهای فوق، در حرارت $100^0C$ به مدت ۱۰ دقیقه پایدار بوده، در مدت ۲۰ دقیقه، کاهش زیادی یافت و پس از ۳۰ دقیقه جوشاندن و همچنین در حرارت اتوکلاو به مدت ۱۵ دقیقه غیرفعال شد.

**بحث و نتیجه‌گیری**

باکتریهای اسیدلاکتیک که به عنوان آغازگر برای تولید فرآورده‌های لبنیاتی مورد استفاده قرار می‌گیرند، عامل اصلی تخمیر و محافظت کننده غذا نیز هستند (۹). این باکتریها همچنین در ایجاد طعم، بو و بافت فرآورده‌های غذایی نقش بسزایی دارند (۱۰). در این بررسی، برای جداسازی اولیه لاکتوباسیلها از نمونه‌ها، رقت تهیه شد و به روش پورپلیت در شرایط بیهوازی کشت داده شد. در جداسازی اولیه، اگر شرایط هوازی بود. این باکتریها رشد نمی‌کردند اما در کشتهای بعدی، در شرایط هوازی معمولی رشد می‌کردند. این نتایج مشابه با نتایج Coventry و همکارانش بود (۱۱).

Michael و همکارانش (۱۲) برای جداسازی لاکتوباسیلها، ابتدا مواد غذایی را در محیط MRS مایع وارد نموده و پس از چند ساعت در محیط جامد MRS کشت دادند. این روش غنی‌سازی معمولاً برای بدست آوردن لاکتوباسیلها از سبزیجات و غذاهای دریایی مفید می‌باشد اما در بررسی حاضر، بدون استفاده از روش غنی سازی لاکتوباسیلها در محیط MRS رشد کردند. علت آن احتمالاً تعداد فراوان این باکتریها به عنوان آغازگر در فرآورده‌های لبنیاتی بوده است.

در این بررسی، لاکتوباسیلها در $4^0C$ رشد نکردند و درجه حرارت مناسب رشد آنها $30^0C$ بود و در دمای ۱۵ و $45^0C$، رشد بسیار ضعیفی داشتند. بنابراین، این باکتریها در گروه مزوفیل قرار دارند. نتایج مشابهی با آن توسط پژوهشگران دیگر گزارش شده است (۱۳).

در این مطالعه، لاکتوباسیلهای جدا شده از لبنیات، مانع رشد سودوموناس آئروژینوزا، استافیلوکوک اورئوس، اشریشیاکلی، سالمونلاتایفی موریوم، باسیلوس سوبتیلیس شدند و این امر بر روی رشد استافیلوکوک قویتر از سایر باکتریهای مورد آزمایش بود. در ضمن، خاصیت ضدمیکروبی لاکتوباسیلها پس از جوشاندن به مدت

Archive of SID

www.SID.ir

۱۰ دقیقه پایدار بود که با نتایج سایر پژوهشگران (۹) مطابقت دارد. مقاومت در برابر حرارت، یکی از نکات مفید می‌باشد، زیرا در بسیاری از مراحل تهیه غذا به حرارت نیاز می‌باشد. نکته دیگر، آن است که کشتهای آغازگر مناسب معمولاً لاکتوباسیل بولگاریکوس و استرپتوکوک ترموفیلوس هستند (۱۴و۱۵)، اما در این مطالعه، لاکتوباسیل بولگاریکوس از ماست جدا نشد و لاکتوباسیلهای جدا شده بیشتر از نوع لاکتوباسیل لاکتیس و لاکتوباسیل فرمنتوم بودند. طعم و مزه ماست کشور ما (ایران) با ماست کشورهای دیگر متفاوت است، پس احتمالاً نوع لاکتوباسیلهای آن نیز با هم تفاوت دارد. احتمال دیگر اینکه، لاکتوباسیلهای دیگر موجود در ماست، ماده ضد میکروبی تولید کرده و باعث از بین رفتن لاکتوباسیل بولگاریکوس شده است.

کشتهای آغازگر ماست معمولاً لاکتوباسیل دلبروکی زیر گونه بولگاریکوس و استرپتوکوک ترموفیلوس می‌باشند (۱۴و۱۵) که با همکاری هم، شیر را به ماست تبدیل می‌کنند. لاکتوباسیل دلبروکی زیر گونه بولگاریکوس، میکروفلور طبیعی انسان نبوده و نمی‌تواند در روده تشکیل کلنی دهد، در صورتی که، لاکتوباسیل اسیدوفیلوس به راحتی در روده تشکیل کلنی داده و باعث توقف رشد اشریشیاکلی و سایر کلی فرمها می‌گردد و قادر است اختلالات بوجود آمده توسط کلی فرمها را کنترل کند.

اشریشیاکلی، باکتروئیدوس و باکتریهای بیهوازی اجباری قادر به تولید بتاگلوکورونیداز هستند که احتمال می‌رود این آنزیم در ایجاد سرطان روده بزرگ دخالت داشته باشد. پس وجود لاکتوباسیل اسیدوفیلوس با کاهش تعداد کلی فرمها و بیهوازیها موجب کاهش فعالیت بتاگلوکورونیداز می‌شود (۱۶). لاکتوباسیل کازه‌ای نژاد GC نیز فعالیت آنزیم بتاگلوکورونیداز و گلیکولیک هسیدهیدرولاز را کاهش می‌دهد (۱۱). گزارشهای مختلفی مبنی بر نقش باکتریهای اسیدلاکتیک پروبیوتیک در پیشگیری از سرطان وجود دارد (۱۷) و همچنین به علت وجود ویتامین A و E در فرآورده‌های لبنیاتی توصیه شده است که فرآورده‌های لبنباتی به غذای سالمندان اضافه گردد (۱۸). با توجه به مطالب فوق، موارد زیر پیشنهاد می‌شود:

- در صورتی که از لاکتوباسیل اسیدوفیلوس و لاکتوباسیل کازه‌ای نژاد GC به عنوان آغازگر کشت در لبنیات استفاده شود از بروز بسیاری از بیماریهای عفونی روده، معده، اختلالات مجرای گوارشی بدون استفاده از دارو و با مصرف مواد طبیعی خوراکی، جلوگیری شده و احتمال دارد که موارد سرطان روده و معده کاهش یابد.
- مؤثرترین و پایدارترین ماده ضدمیکروبی از لاکتوباسیلها جدا شود و به عنوان نگهدارنده بیولوژیکی در غذا مورد استفاده قرار گیرد تا احتمال فساد مواد غذایی و هم امکان ابتلا به مسمومیتهای غذایی و بیماریهایی که از طریق غذا منتقل می‌شوند نیز کاهش یابد.
- از لاکتوباسیل‌های تولید کننده مواد بازدارنده قوی که فعالیت آن در اثر حرارت از بین نمی‌رود، در تهیه فرآورده‌های لبنیاتی استفاده شود.
- با افزودن لاکتوباسیلهای خاص می‌توان طعم و مزه غذا را مطابق ذائقه افراد تهیه نمود.
- با استفاده از روشهای بیوتکنولوژی، لاکتوباسیلهایی را بدست آورد که باکتریوسین قوی در برابر میکروارگانیزمها تولید می‌کنند و به عنوان آغازگر در فرآورده‌های لبنیاتی مورد استفاده قرار داد.

**REFERENCES**:


1- Kandler 0.; Nobert Weiss: Bergey's Manual of systematic Bacteriology. 1989. Vol.2: sec.14. :1208-1234

2- Ennahar S.: Deschamps N.: Anri-l.isteria effect of enterocin A. produced by cheese- isolated Enterol:occuS faecium EFMO I. Relative to other bacteriocins from lactic acid bacteia. J. Appl. Microbiol. *2000* Mar; 88(3): 449-57

3- Zhu W.M.; Liu W.: Wu D. Q.: Isolation and characterization ofa new bacteriocin from Lactobacillus gasseri KT7..I. Appl. Microbiol. *2000* May: 88(5): 877-86

4- Messenes W.: De - Vuyst L.: Inhibitory substances produced by Lactobacilli isolated from sourdoughs--a review. Int. .J. Food. Microbiol. *2002* jan 30: 72 (1-2): 31-43

5- Sreekumar O.; Mosono A.: lmmediated effect of lactobacillus on the intestinal flora and fecal enzyme of rats and in vitro inhibition of E.coli in coculture. 2000. J. Dairy. Sci. 93: 931-939

6- Jacobsen C. N.; Rosenfeldt N. V.; Hayfored A. E.; Michaelsen K. F.; Paerregaard A.; Sandstrom B.: Tvede M.: Jakobsen M.: Screening of probiotic activities of forty seven strains of Lactobacillus sr. by in vitro techniques and evaluation of colonization ability on five selected strains in human. Appl. Environ. Microbiol. 1999: 65( 11 ). 4949-4956.

7- Gorbach S.L.: Probiotics and gastrointestinal health. Am. J. Gastroenterol, 2000jan; 95(1 suppl): S2-4

8- Thoreux K.; Balas P.; Bouley C.; Senegas F.: Diet supplemented with yoghurt or milk fennented by Lactobacillus casei DN-114001 stimulates growth and brush-border enzyme activities in mouse small intestine. Digestion. 1998.59: 349-359

9- Boris S.; Jimenez-Diaz R.; Caso J.L.; Barbes C.: Partial characterization of a bacteriocin produced by Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis U0004. an intestinal isolate with probiotic potential. J. Appl. Microbiol. 2001 Aug: 91(2): 32R-33

10- Izco-J. M.; Tormo M.; Jimenez J. R.: Development of a CE method to analysis organic acids in dairy products: application to study the metabolism of heat-shocked spores. J. Agric. Food. Chem. 2002 mar 27: 50(7): 1765-73.

11- Casla D: Requena T: Gomez R: Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from goats milk and artisanal cheese: Characteristies of bacteriocin produced by Lactobacillus curvatus IFPL 105. J. Appl. Bacteriol. 1996; 81: 35-41


Archive of SID

www.SID.ir

12- Ganzel M. G.; Weber S.: Hammes W.P.: Efftect of ecological factor on the inhibitory spectrum and activity of bacteriocins, Int..J. Food Microbiol. 1999.207-217
13- Schillinger U.: Bacteriocin of lactic acid bacteria. In biotechnologyand food safety. Ed. D.D. Bills and S.D. Kung. butter Worth-Heinemann. 1990 Boston. Pp:55- 74
14- Yap P. S. Gilliand S.E.: Comparison of newly isolated of Lactobacillus delbrueckii subsp. Lactis for hydrogen peroxide
production at 5°C. J. Dairy Sci.2000; 83: 628-632
15- Mortiagh A. M.; Johson M. C.; Ray B.: Viability loss of food - borne pathogens by starter culture metabolites. J. Food Protect. 1993.54.873-874.884
16- Smiety M.B.: Fryder V,: plasmids, lactic' acid production and N-acetyl- D glucosamine fermentation in Lactobacillus helveticus subsp. jugarti. Appl. Environ. Microbiol. 1978; 35:777-781
17- Hirayama K.; Rafter J.: The role of probiotic bacteria in cancer prevention. Microbes Infect. 2000 May; 2(6): 681-6
18- Herrero C.: Granado F.; Blanco I.: Olmedilla B.: Vitamin A and E content in dairy products: their contribution to the recom mended dietary allowances (RDA) for elderly people.J. Nutr. Health Aging. 2002; 6(1): 57-9.

Archive of SID

www.SID.ir