اثرات آنتی باکتریال سویه های مختلف لاکتوباسیلوس بر روی باکتری پاتوژن سالمونلا انتریکا

مریم طاهانژاد*[۱]، شهرام نقی زاده رییسی [۲]، حامی کابوسی [۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی

۲- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد آیت اله آملی

۳- استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد آیت اله آملی

چکیده

در این تحقیق اثرات آنتی باکتریال سویه های مختلف لاکتوباسیلوس بر روی باکتری پاتوژن سالمونلا انتریکا با استفاده از تست well diffusion مورد بررسی قرارگرفت. سویه های مختلف لاکتوباسیلوس پلانتاروم در محیط کشت MRS براث کشت و تکثیر شدند و با کشت در محیط MRS آگار کلنی خالص بدست آمد. سوپرناتانت خام سویه ها با استفاده از انکوباتور شیکر در محیط کشت MRS براث تهیه گردید و با سانتریفوژ جداسازی شد. سپس خاصیت ضد باکتریایی سوپرناتانت سویه ها با استفاده از تست well diffusion، در pH طبیعی و pH خنثی بررسی گردید. براساس نتایج بدست آمده، سوپرناتانت سویه ها در هر دو شرایط pH قادر به مهار پاتوژن بودند و هاله عدم رشد تشکیل دادند. همچنین با تغلیظ سوپرناتانت بوسیله روتاری اواپراتور برخی از سویه ها اثر مهاری بیشتری نشان دادند. بیشترین اثر مهارکنندگی ترکیبات بر روی رشد باکتری سالمونلا انتریکا در شرایط خنثی مربوط به تیمار خنثی تغلیظ شده بود که در این شرایط سویه ATCC۱۴۹۱۷ اثر معناداری نسبت به سایر سویه ها نشان داد($P<۰/۰۵$). به منظور کاهش خطا هر آزمون سه بار تکرار شد و قطر هاله عدم رشد اندازه گیری و توانایی ضد باکتریایی آنها با هم مقایسه شد. لذا این نتایج نشان دهنده تولید ترکیبات ضد باکتریایی فعال توسط سویه های مورد بررسی می باشد.

کلمات کلیدی: فعالیت ضد باکتریایی، سوپرناتانت، لاکتوباسیلوس پلانتاروم، سالمونلا انتریکا

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

امروزه عفونت های ناشی از مواد غذایی، یکی از مهم ترین چالش ها برای سلامت عمومی، ایجاد بیماری، گاهی منجر به مرگ و همچنین موجب از دست دادن سرمایه اقتصادی می باشند[2]. بیماری های منتقله از غذا شامل سندرم حاد و مزمن از شدت و بقای متفاوت چند میکروارگانیسم پاتوژن سبب می شود. نسبت بیماری ناشی از غذا، بواسطه هر دو عامل بیماریزا (گونه / سویه، تلقیح و غیره) و میزبان (سن، جنس، ایمنی و غیره) متفاوت است [8]. به طور خاص، بقا میکروارگانیسم ها در مواد غذایی می تواند منجر به فساد و خراب شدن کیفیت محصولات مواد غذایی و یا باعث عفونت و بیماری شود. در میان پاتوژن های باکتریایی ناشی ازغذا، سالمونلا انتریکا عمده ترین عامل بیماریزایی از لحاظ میزان مرگ و میر سالانه می باشد[5,10] که افزایش بیماری سالمونلوسیس در طی دهه ۱۹۸۰ به وضوح در کشورهای توسعه یافته مشاهده شده است[7]. فعالیت آنتاگونیستی باکتری های اسید لاکتیک در برابر پاتوژن های میکروبی در بین فاکتورهای دیگر ممکن است به مهار آنها کمک کند، که در واقع یک روش مهم برای گسترش طیف وسیعی از غذاهای سالم می باشد[2]. بنابراین منابع جایگزین ایمن، ترکیبات ضد میکروبی موثر و احتمالا طبیعی یک موضوع استراتژیک تحقیقاتی، درهر دو زمینه پزشکی و صنایع غذایی هستند[5]. هدف از این تحقیق بررسی اثرات آنتی باکتریال سویه های مختلف لاکتوباسیلوس بر روی باکتری پاتوژن سالمونلا انتریکا می باشد.

مواد و روش ها

۱سویه های باکتری و محیط رشد

سویه های میکروبی استاندارد لاکتوباسیلوس پلانتاروم(ATCC:۸۰۱۴)، لاکتوباسیلوس پلانتاروم (ATCC:۱۴۹۱۷) و سالمونلا انتریکا (ATCC:۱۶۳۹) بصورت لیوفیلیزه از مرکز کلکسیون قار چها و باکتری های سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران و سویه لاکتوباسیلوس پلانتاروم (ATCC :۱۳۶۴۳) از آزمایشگاه مرکزی انستیتو پاستور ایران خریداری شدند، محیط کشت های MRS براث (مرک آلمان)، MRS آگار(Himedia هند)، Brain Heart Infushion براث (Biolife ایتالیا) ، نوترینت آگار (مرک آلمان) و آگار آگار(مرک آلمان) استفاده شدند.

تولید سوپرناتانت

برای تولید سوپرناتانت، طبق روش از کشت یک شبه سویه ل. پلانتاروم بوسیله لوپ استریل در سرم فیزیولوژی رقیق گردید و برروی همزن قرارگرفت تا کدورت سوسپانسیون معادل نیم مک فارلند $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ CFU/ml بدست آید سپس از سوسپانسیون بدست آمده در محیط کشت MRS براث کشت داده شد و در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در شرایط بی هوازی انکوبه شد. به منظور جداسازی سوپرناتانت از جسم سلول باکتری ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد با دور g×۴۰۰۰ سانتریفوژ شدند. pH سوپرناتانت بدست آمده در محدوده ۶/۵ تا ۷ با NaOH ۱مولار تنظیم شد. سپس سوپرناتانت از فیلتر استریل ۰/۲ میکرومتر عبور داده شد و توسط روتاری اواپراتور تغلیظ شد[9].

Archive of SID
www.SID.ir

تعیین فعالیت ضد میکروبی

فعالیت ضدمیکروبی سوپرناتانت جدا شده از سویه ها با روش well diffusion انجام شد. طبق روش از کشت یک شبه سویه شاخص سوسپانسیونی معادل نیم مک فارلند $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ CFU/ml بدست آمد. برای این آزمون از محیط کشت BHI آگار نرم (حاوی ۰/۷ درصد آگار) استفاده گردید. بعد از رسیدن دمای محیط کشت مذکور حدود ۴۰درجه سانتیگراد از سوسپانسیون بدست آمده سویه شاخص (در غلظت نهایی $۱۰^{۷}$cfu/ml) به محیط کشت BHI آگار نرم (حاوی ۰/۷ درصدآگار) اضافه شد. سپس پلیت ها به مدت یک ساعت در دمای یخچال قرار داده شدند تا محیط کاملا جامد گردد. بعد بوسیله پی پت پاستور چاهک هایی با قطر ۶ میلی متر ایجاد گردید. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوپرناتانت در هر چاهک تلقیح شد. این پلیت ها به مدت ۴ ساعت در دمای یخچال قرارداده شدند تا کاملا سوپرناتانت جذب محیط کشت شود. سپس پلیت ها به مدت ۴۸- ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. بعد از گذشت زمان مورد نظر، قطر هاله رشد یا عدم رشد مربوط به سویه های شاخص اندازه گیری شد [1].

تجزیه و تحلیل آماری

در این تحقیق نتایج بدست آمده توسط نرم افزار Spss آنالیز و میانگین ها در سطح احتمال (P<۰/۰۵) مقایسه و در نهایت نمودارها با نرم افزار Excel رسم گردید.

نتایج

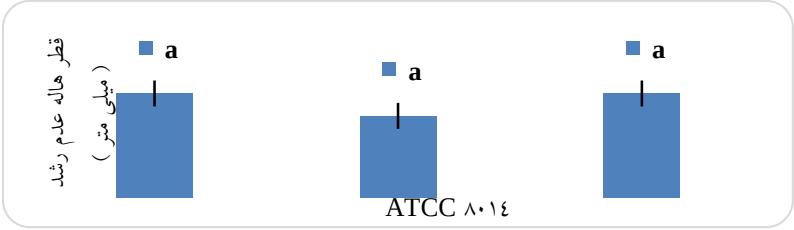
نتایج فعالیت ضدمیکروبی سوپرناتانت سویه های ل. پلانتاروم بر باکتری سالمونلا انتریکا درجدول۱ آمده است.

جدول ۱. میزان فعالیت ضدمیکروبی سوپرناتانت سویه های ل. پلانتاروم بر باکتری سالمونلا انتریکا (قطرهاله رشد یا عدم رشد برحسب میلیمتر)

ل. پلانتاروم / آزمون Well diffusion	۸۰۱۴ATCC	۱۴۹۱۷ATCC	۱۳۶۴۳ATCC
سوپرناتانت تغلیظ شده	۹/۳۳±۱/۱۵[a]	۹/۳۳±۲/۳۰[a]	۸/۶۷±۱/۱۵[b]
سوپرناتانت خنثی	۷/۳۳ ±۱/۱۵[a]	۶/۰۰±۰/۰۰[b]	۷/۳۳±۱/۱۵[b]
سوپرناتانت غیر خنثی	۹/۳۳±۱/۱۵[a]	۹/۳۳±۱/۱۵[a]	۱۱/۳۳±۱/۱۵[a]

*اعداد (انحراف معیار ± میانگین) دارای حروف مشترک در هر ستون از لحاظ آماری تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارند(P ۰/۰۵ >).

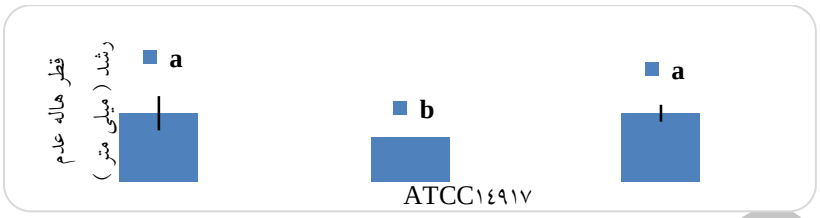
قطرهاله رشد یا عدم رشد با احتساب قطرچاهک (۶میلیمتر) درنظرگرفته شد.



شکل ۱. اثرفعالیت ضدمیکروبی سوپرناتانت سویه ل. پلانتاروم ATCC۸۰۱۴ بر باکتری سالمونلا انتریکا

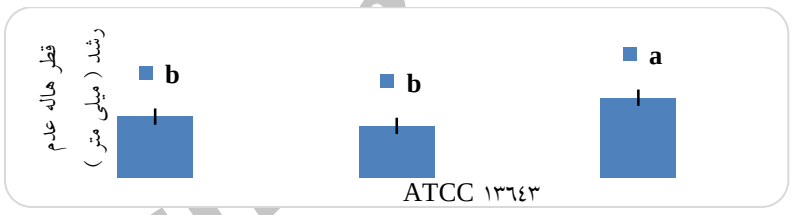
Archive of SID
www.SID.ir

شکل ۱ نشان می دهد که اثرفعالیت ضدمیکروبی سوپرناتانت سویه ل. پلانتاروم ۸۰۱۴ ATCC مربوط به سوپرناتانت تغلیظ شده، غیر خنثی و سوپرناتانت خنثی فاقد تفاوت معنی دار با یکدیگر هستند (P>۰/۰۵).



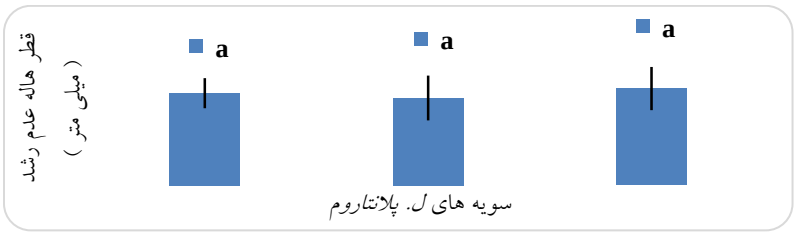
شکل۲. اثرفعالیت ضدمیکروبی سوپرناتانت سویه ل. پلانتاروم ۱۴۹۱۷ ATCC بر باکتری سالمونلا انتریکا

نتایج شکل۲ نشان می دهد که بیشترین اثرفعالیت ضدمیکروبی سوپرناتانت سویه ل. پلانتاروم ۱۴۹۱۷ ATCC مربوط سوپرناتانت تغلیظ شده و غیر خنثی بوده و کمترین اثرفعالیت ضدمیکروبی مربوط به سوپرناتانت خنثی بوده است. سوپرناتانت خنثی دارای تفاوت معنی داری با سایرتیمارها بوده (P<۰/۰۵)، اما سوپرناتانت تغلیظ شده و غیر خنثی دارای تفاوت غیرمعنی داری با یکدیگر می باشند (P>۰/۰۵).



شکل ۳. اثرفعالیت ضدمیکروبی سوپرناتانت سویه ل. پلانتاروم ATCC۱۳۶۴۳ بر باکتری سالمونلا انتریکا

نتایج بدست آمده در شکل ۳ نشان داد که بیشترین اثرفعالیت ضدمیکروبی سوپرناتانت سویه ل. پلانتاروم ۱۳۶۴۳ ATCC مربوط به سوپرناتانت غیرخنثی و کمترین اثر مربوط به سوپرناتانت خنثی بوده است. سوپرناتانت تغلیظ شده دارای اثرحدواسط بوده است. سوپرناتانت خنثی دارای تفاوت معنی داری با غیرخنثی بوده (P<۰/۰۵)، اما با سوپرناتانت تغلیظ شده دارای تفاوت غیرمعنی دار می باشد (P>۰/۰۵). سوپرناتانت تغلیظ شده نیز دارای تفاوت معنی داری با غیرخنثی بوده است (P<۰/۰۵).



www.SID.ir

شکل۴. اثرفعالیت ضدمیکروبی سویه های مختلف ل. پلانتاروم بر باکتری سالمونلا انتریکا درآزمونWell diffusion

نتایج کلی بدست آمده در شکل۴ نشان می دهد که اثر فعالیت ضد میکروبی سوپرناتانت همه سویه ها بر باکتری سالمونلا انتریکا دارای تفاوت غیرمعنی دار با یکدیگر می باشند(P>۰/۰۵).

بحث و نتیجه‌گیری

در آزمون Well diffusion سوپرناتانت های خنثی و تغلیظ شده همه سویه ها فعالیت مطلوبی برروی باکتری بیماریزا نشان ندادند. هاله های ایجاد شده بیشتر مربوط به سوپرناتانت های غیرخنثی (تولید اسید) و تا حدودی مربوط به سوپرناتانت های تغلیظ شده بود. از بین سویه ها، ل. پلانتاروم ATCC۱۳۶۴۳ و ATCC ۱۴۹۱۷ در بین تیمارهای مورد بررسی تفاوت معنی داری ایجاد کردند. اما در مقایسه کلی سویه های تست شده بر سالمونلا انتریکا اثر معناداری نداشتند. مطالعات مختلف نشان داد که دیواره سلولی باکتریهای گرم منفی در مقابل بسیاری از آنتی بیوتیک ها و ترکیبات شیمیایی ضد میکروبی مقاوم هستند. وجود لایه لیپوپلی ساکاریدی دیواره و ترکیب کاتیونی غشا خارجی از دلائل مهم این مقاومت نسبی گرم منفی ها می باشد[5,6] براساس نتایج بدست آمده، ترکیبات ضدمیکروبی سویه های مورد بررسی بیشتر از نوع اسیدهای آلی مانندااسید لاکتیک و نیز نوعی از پپتیدها هستند. بسیاری از ترکیبات ضد میکروبی مانند اسیدهای آلی، پراکسید هیدروژن، دی استیل، بتا هیدروکسیل پروپیونالدهید و یا باکتریوسین(ضدباکتری یا پپتیدهای باکتریوستاتیک و پروتئین) می توان توسط باکتری های مختلف اسید لاکتیک در طول انکوباسیون تشکیل شوند. اسیدهای آلی (اسید لاکتیک و استیک) محصولات اصلی متابولیسم کربوهیدرات هستند و طیف وسیعی از فعالیت های بازدارنده در مقابل باکتری ها، مخمرها و کپک ها دارند[4]. درمطالعه حاضر با تغلیظ سوپرناتانت سویه های ل.پلانتاروم در شرایط pH خنثی تا حجم یکدهم اولیه از جمله سویه ATCC۱۴۹۱۷ تا حد۲-۱ میلی متر هاله عدم رشد نشان داد که یافته های تحقیق حاضر موافق با تحقیقات Toure و همکاران در سال ۲۰۰۳ بود. آنها با بررسی بر روی سوپرناتانت تولید شده از ۶ جدایه بیفیدوباکتریایی نوزادان دریافتند در شرایط pH خنثی سوپرناتانت جدایه ها اثر مهاری بر روی لیستریا منوسیتوژنز نداشتند. اما با تغلیظ کردن سوپرناتانت تا حجم یکدهم ۳ سویه اثر مهاری نشان دادند Wang و همکاران در سال ۲۰۱۰ در روشی مشابه بیان کردند که سوپرناتانت خنثی سویه ل. پلانتاروم جدا شده از مدفوع نوزادان شیرخوار و کلم ترشی تایوانی، فعالیت ضد میکروبی با هاله عدم رشد حدود ۶ میلیمتر برروی سالمونلا انتریکا داشتند. با بررسی پروتئین میکروبی جدا شده از سوپرناتانت سویه ل.پلانتاروم۸۰۱۴ATCC توسط Ismail و همکاران در روشی مشابه دریافتند که این ماده دارای فعالیت ضد میکروبی برعلیه برخی باکتری های گرم منفی بود. در نهایت بررسی اثر مهارکنندگی سوپرناتانت تولید شده در آزمون Well ddiffusion در دو شرایط pH طبیعی و pH خنثی نشان داد که تمامی سویه ها در شرایط طبیعی اثر ضد میکروبی داشته و بیشترین میانگین قطر هاله عدم رشد بر سالمونلا انتریکا در این شرایط مربوط به سویه ل. پلانتاروم ۱۳۶۴۳ ATCC می باشد. بیشترین اثر مهارکنندگی ترکیبات تولید شده در شرایط خنثی مربوط به تیمارخنثی تغلیظ شده بوده است که در این شرایط سویه ل. پلانتاروم ATCC۱۴۹۱۷ بر سالمونلا انتریکا اثر معناداری نسبت به سایر سویه ها نشان داد. اما در مقایسه کلی فعالیت ضد میکروبی سویه های مختلف ل. پلانتاروم بر سالمونلا انتریکا اثر معناداری نداشتند (P>۰/۰۵).

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

1.Cosentino, S., Fadda, M.E., Deplano, M., Melis, R., Pomata, R., Pisano, M.B., Antilisterial activity of nisin- like bacteriocin producing Lactococcus lactis subsp. lactis isolated from traditional sardinian dairy products, Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2012, pp.1-8.

2.Geria M, Dambrosio A, Normanno G, Lorusso V, Caridi A., Antagonistic activity of dairy lactobacilli against gram-foodborne pathogens, ActaScientiarum Technology, Vol.36, 2014, pp. 1- 6.

3.Ismail, I.N.A., Noor, H.M., Muhamad, H.S., Radzi, S.M., Kader, A.J.A., Rehan, M.M., Mohamad, R., Protein produced by Lactobacillus plantarum ATCC 8014 during Stress, World Journal of Science and Technology Research, Vol.1, 2013, pp. 174–181.

4.Lim, S.M., Im, D.S. , Inhibitory effects of antagonistic compounds produced from Lactobacillus brevis MLK27 on adhesion of Listeria monocytogenes KCTC3569 to HT-29 Cells, Food Science Biotechnol, Vol.21, 2012, pp.775-784.

5.Mazzarrino, G., Paparella, A., Lopez, C.C., Faberi, A., Sergi, M., Sigismondi, C., Compagnone, D., Serio, A., Salmonella enterica and Listeria monocytogenes inactivation dynamics after treatment with selected essential oils, Food Control, Vol. 50, 2015, pp. 794-803.

6.MCdonnell, G., Russell, A.D., Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance, Clinical Microbiology Reviews, Vol. 12, 1999, pp. 147–179.

7.Newell DG, Koopmans M,Verhoef L,Duizer E, Aidara-Kane A, Sprong H, Opsteegh M, Langelaar M ,Threfall J, Scheutz F, Giessen Jvd, Kruse H., Food-borne diseases — The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue toemerge, International Journal of Food Microbiology ,Vol.139, 2010, pp. 3–15.

8.Pannella, G., Interaction between lactobacillus plantarum and food related microorganisms by proteomics and bioinformatics, Ph.D. Thesis, University of Italy, Molise, 2013, pp.1-164.

9.Seatovic, S., Novakovic, J.S. J., Zavisic, G.N., Radulovic, Z.C., Jankulovic, M.D. G., Jankov, R.M., The partial characterization of the antibacterial peptide bacteriocin G2 produced by the probiotic bacteria Lactobacillus plantarum G2, Journal of the Serbian Chemical Society, Vol.76, 2011, pp. 699–707.

10.Toure, R., Kheadr, E., Lacroix, C., Moroni, O., Fliss, I., Production of antibacterial substances by bifidobacterial isolates from infant stool active against Listeria monocytogenes, Journal of Applied Microbiology, Vol.95, 2003,pp. 1058–1069.

11.Wang, C.Y., Lin, P.R., Ng, C.C., Shyu, Y.T., Probiotic properties of Lactobacillus strains isolated from the feces of breast-fed infants and Taiwanese pickled cabbage, Anaerobe, Vol.16, 2010, pp.578-585.

Archive of SID

www.SID.ir