بررسی فعالیت ضد میکروبی باکتری های اسید لاکتیک جدا شده از پنیر سنتی کردی در مقایسه با سویه های تجاری

سید محمد باقر هاشمی[۱]، فخری شهیدی[۲]، سید علی مرتضوی[۲]، الناز میلانی[۳*]، زرین اسحاقی[۴]

۱-دانشجوی دکتری گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه فردوسی مشهد
۲- استاد گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه فردوسی مشهد
۳- استادیار پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی جهاد دانشگاهی مشهد
٤- دانشیار گروه شیمی دانشگاه پیام نور مشهد
(تاریخ دریافت: ۹۲/۳/۱۳ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۱/۲۳)

چکیده

در این مطالعه، فعالیت ضد میکروبی باکتری های اسید لاکتیک جداسازی شده از پنیر سنتی کردی مورد ارزیابی قرار گرفت. ابتدا پالیده کشت باکتری های اسید لاکتیک جدا و بخشی از آن تحت تیمار حرارتی و خنثی سازی با سود قرار گرفت و با استفاده از روش چاهک، دیسک و کمترین غلظت بازدارندگی، خاصیت ضد میکروبی آن ها بر ضد باکتری های بیماری زا بررسی شد. نتایج نشان داد باکتری های اسید لاکتیک جدا شده از پنیر کردی در مقایسه با سویه های تجاری خاصیت ضد میکروبی مناسبی داشتند و حرارت دادن پالیده ی کشت آن ها تاثیری در کاهش و یا افزایش خاصیت ضد میکروبی نشان نداد اما تیمار با سود خاصیت ضد میکروبی را به صفر رساند. کمترین غلظت بازدارندگی سویه های بومی با سویه های تجاری نیز تفاوت معنا داری را نشان نداد. همچنین با بررسی خاصیت تجمعی ، باکتری های اسید لاکتیک بومی خاصیت تجمعی قابل قبولی را با باکتری های بیماری زا نشان دادند که ازدیگر عوامل ضد میکروبی آن ها می باشد. نتایج این پژوهش نشان داد که باکتری های اسید لاکتیک بومی و متابولیت های تولیدی آن ها می توانند به عنوان ترکیب های ضد میکروبی طبیعی کاربرد داشته باشند.

کلید واژه گان: باکتری های اسید لاکتیک، باکتری های بیماری زا ،پنیر سنتی کردی، خاصیت ضد میکروبی

* مسئول مکاتبات: e_milani81@yahoo.com

۱- مقدمه

امروزه مصرف کنندگان نسبت به گذشته به ایمنی و سلامت غذا اهمیت بیشتری می دهند. امروزه علی رغم بهبود ایمنی مواد غذایی، هنوز تعداد مسمومیت های ناشی از مصرف غذا های آلوده در خور توجه می باشد. اطمینان از ایمنی فراورده های غذایی به کاهش تعداد میکروب های اولیه و جلوگیری از رشد آن ها در حین فرایند، توزیع و انبارداری بستگی دارد. یکی از روش های مهم برای رسیدن به این هدف، استفاده از ترکیب های ضد میکروبی و نگهدارنده های شیمیایی می باشد. هر چند که استفاده از این ترکیب ها به دلیل تاثیر نامطلوب ثانویه ای که دارند بهتر است که با نگهدارنده ها و ترکیب های ضد میکروبی طبیعی جایگزین شوند [۱].

باکتری های اسید لاکتیک، گرم مثبت، غیر اسپور زا، کاتالاز منفی و محصول نهایی از تخمیر قند توسط آن ها اسید لاکتیک می باشد. این باکتری ها به صورت گسترده به عنوان کشت آغاز گر در صنایع لبنی،گوشت، سبزی ها و غلات به کار می روند. کاهش pH و تبدیل قند ها به اسید های آلی نخستین فعالیت این میکروارگانیسم ها در افزایش زمان ماندگاری فراورده های تخمیری می باشد [۲].

فعالیت ضد میکروبی این میکروارگانیسم ها ناشی از عوامل گوناگون از جمله اسید های آلی (اسید لاکتیک و اسید استیک)، پراکسید هیدروژن، دی اکسید کربن و باکتریوسین ها می باشد. میزان و نوع عوامل ضد میکروبی باکتری های اسید لاکتیک به گونه و مواد تشکیل دهنده ی محیط کشت بستگی دارد. به عنوان مثال تخمیر هگزوز ها توسط باکتری های اسید لاکتیک هوموفرمنتاتیو منجر به تولید لاکتات و توسط هتروفرمنتاتیو ها منجر به تولید لاکتات، استات و دی اکسید کربن می شود. بیشتر گونه های هتروفرمنتاتیو به دلیل داشتن فلاوپروتئین اکسیداز که سبب کاتالیز و احیای اکسیژن می شود پراکسید هیدروژن تولید می کنند. این باکتری ها نه تنها سبب کاهش میکروارگانیسم های بیماری زا و عامل فساد می شوند بلکه می توانند متابولیت های تولیدی و توکسین های احتمالی تولید شده توسط آن ها را نیز بی اثر کنند [۳].

امروزه استفاده از باکتری های اسید لاکتیک و متابولیت های ضد میکروبی آن ها در پیشگیری از فساد فراورده های غذایی و افزایش زمان ماندگاری به ویژه در فراورده هایی که غنی از مواد مغذی و ویتامین هستند و فرایند کمی روی آن ها انجام می شود، بسیار رایج شده است. همچنین با افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی و عوارض ناشی از مصرف دارو های شیمیایی این دسته از باکتری ها می توانند نقش درمانی داشته باشند. پژوهش های انجام شده تایید کننده ی نقش مثبت این باکتری ها در مهار عوامل بیماری زا هستند [۵ - ٤].

هدف از این تحقیق بررسی فعالیت ضد میکروبی چهار سویه *Lactobacillus plantarum* و یک سویه *Lactobacillus paraplantarum* جدا شده از پنیر سنتی کردی بر ضد باکتری های بیماری زا در مقایسه با سویه های تجاری می باشد.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- سویه های باکتری

در این مطالعه فعالیت ضد باکتریایی چهار سویه *Lactobacillus plantarum* (LS5,LU5,AF1,LP3) و یک سویه *Lactobacillus paraplantarum* جدا شده از پنیر سنتی کردی با سویه های تجاری از ATCC 14917 *Lactobacillus plantarum* و *Lactobacillus paraplantarum* DSM 14485 مقایسه گردید. این سویه ها در محیط کشت MRS مایع به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه ی سانتی گراد فعال سازی شدند. باکتری های بیماری زا مورد نظر شامل *Escherichia coli* O157 H7 ، *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853، *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 و *Bacillus cereus* ATCC 10876 در محیط کشت مولر هینتون[1] مایع در دمای ۳۷ درجه ی سانتی گراد به مدت ۱۸ ساعت فعال سازی شدند.

1. Mueller Hinton

۲-۲- تهیه ی پالیده ی کشت[2]

برای تهیه ی پالیده ی کشت ، سویه های باکتری های اسید لاکتیک در ۳۰ میلی لیتر محیط کشت MRS مایع در دمای ۳۷ درجه ی سانتی گراد به مدت ۲٤ ساعت گرمخانه گذاری گردیدند. سپس به منظور جداسازی سلول های باکتری از محیط کشت از سانتریفیوژ یخچال دار (Sigma 1-16K ، آلمان)(٤۰۰۰g ، ۲۰ دقیقه و ٤ درجه ی سانتی گراد) استفاده گردید. مایع رویی جدا و برای اطمینان از عدم وجود سلول از فیلتر باکتریایی۰/۲ میکرومتر عبور داده شد [٦]. پالیده به دست آمده برای هر باکتری به سه قسمت تقسیم شد. یک قسمت به عنوان کنترل، یک قسمت با کمک سود ۱ نرمال به pH=۷ رسانیده شد و قسمت سوم تحت تیمار حرارتی(۱۰۰ درجه ی سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه) قرار گرفت.

۲-۳- بررسی فعالیت ضد میکروبی به روش انتشار در آگار[3]

به منظوربررسی فعالیت ضد میکروبی به روش انتشار در آگار، باکتری های بیماری زا ابتدا در محیط کشت مولر هینتون مایع به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه ی سانتی گراد گرمخانه گذاری شدند. سپس ۱ میلی لیتر از محیط مایع حاوی باکتری مورد نظر برداشت و با استفاده از روش "Pour Plate" به پلیت حاوی نوترینت آگار[4] با دمای ٤۵ درجه سانتی گراد اضافه گردید. پس از سرد شدن محیط تحت شرایط استریل، در داخل آن چاهک هایی با قطر ۵ میلی متر و با فاصله ۳۰ میلی متر از یکدیگر و از بدنه پلیت ایجاد شد. سپس ۸۰ میکرولیتر از پالیده تیمار های مختلف به داخل چاهک های ایجاد شده در پلیت های حاوی باکتری های مورد آزمایش ریخته شد. برای جذب محلول به داخل محیط، پلیت ها به مدت ۲ ساعت در دمای ٤ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. پس از مرحله ی جذب، پلیت ها در دمای ۳۷ درجه ی سانتی گراد به مدت ۱۸ ساعت نگهداری شدند. پس از اتمام این زمان، اندازه ی هاله بازدارنده تشکیل شده با استفاده از خط کش اندازه گیری شد [۷ -٦].

۲-٤- بررسی فعالیت ضد میکروبی به روش دیسک[5]

در بررسی فعالیت ضد میکروبی به روش دیسک، دیسک های کاغذی به قطر ۵ میلی متر در پالیده باکتری های اسید لاکتیک به مدت ۵ دقیقه غوطه ور شد و دیسک ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ٤ ساعت قرار داده شدند تا کاملا خشک شوند. دیسک ها به با فاصله ی ۳۰ میلی متر از یکدیگر و بدنه ی پلیت قرار داده شدند. سپس پلیت ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۸ ساعت نگهداری گردیدند. پس از اتمام این زمان، اندازه ی هاله ی بازدارنده با استفاده از خط کش اندازه گیری شد [۷ -٦].

۲-۵- تعیین کمترین غلظت بازدارندگی[6]

درتعیین کمترین غلظت بازدارندگی پس از به دست آوردن پالیده ی کشت باکتری های اسید لاکتیک بر اساس روش مذکور، با کمک بافر فسفات رقت های مختلف تهیه و میزان ۱۰۰ میکرولیتر از هر کدام به درون چاهک های ایجاد شده در سطح پلیت های حاوی کشت میکروب های بیماری زا تزریق گردید. پس از گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه ی سانتی گراد به مدت ۱۸ ساعت، رقتی که حداقل هاله ای به قطر ۲ میلی متر ایجاد کرده بود به عنوان کمترین غلظت در نظر گرفته شد و با استفاده از روش تودورو و دیکس [۷] به صورت AU/mlگزارش گردید. هر واحد AU معکوس بیشترین غلظتی می باشد که اثر بازدارندگی دارد.

۲-٦- بررسی خاصیت تجمعی[7]

به منظور بررسی خاصیت سلول های باکتری های اسید لاکتیک و بیماری زا پس از کشت ۲٤ ساعته با استفاده از سانتریفیوژ(٤۰۰۰g ، ۲۰ دقیقه و ٤ درجه ی سانتی گراد) جداسازی و دوبار با کمک بافر فسفات شستشو داده شدند و سپس در همین بافر قرار گرفتند. حجم های مساوی از سوسپانسیون هر کدام از باکتری های اسید لاکتیک و

2. Cell Free Culture Supernatant
3. Agar diffusion
4. Nutrient agar
5. Disk
6. Minimum Inhibition Concentration
7. Coaggregation

سوسپانسیون باکتری بیماری زای مورد نظر با هم مخلوط و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ٤ ساعت نگهداری شدند و سپس جذب سوسپانسیون ها در ٦۰۰ نانومتر خوانده شد و از رابطه ی زیر میزان خاصیت تجمعی محاسبه گردید.

$[(A_P + A_{lac})/2 - (A_{mix})/(A_P + A_{lac})/2] *100$

در این رابطه A_P جذب سوسپانسیون باکتری بیماری زا، A_{lac} جذب سوسپانسیون باکتری اسید لاکتیک و A_{mix} جذب مخلوط سوسپانسیون باکتری اسید لاکتیک و بیماری زا پس از ٤ ساعت می باشد [۸].

۲-۷-آنالیز آماری

به منظورآنالیز آماری هر آزمایش سه بار تکرار شد. برای مقایسه ی میانگین ها از آزمون های ANOVA و دانکن و از نرم افزار SPSS 20 استفاده گردید.

جدول ۱ خاصیت ضد میکروبی پالیده کشت باکتری های اسید لاکتیک بومی و تجاری به روش چاهک

باکتری های اسید لاکتیک	باکتری های بیماری زا			
	Escherichia coli O157 H7	*Staphylococcus aureus* ATCC 25923	*Bacillus cereus* ATCC 10876	*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
*Lactobacillus plantarum*LP3	۱٤/۷±۰/۵۸^{abc}	۱۸±۱^{cde}	۱۸/۳±۱/۱۵^{de}	۱٤/٦±۱/۱۵^{ab}
Lactobacillus plantarum AF1	۱٤/۷±۱/۱۵^{abc}	۱٦/٦±۰/۵۸^{abcd}	۱۷/۳±۰/۵۷^{cde}	۱٤/٦±۱/۱۵^{ab}
*Lactobacillus plantarum*LU5	۱٦±۱^{bcd}	۱۹±۱^{e}	۱۵/٦±۱/۵۲^{abc}	۱٤/٦±۱/۵۲^{ab}
*Lactobacillus plantarum*LS5	۱۳±۱^{a}	۱٦±۱^{ab}	۱٦±۱^{abcd}	۱۳±۱^{a}
Lactobacillus paraplantarum	۱٦/٦±۰/۵۸^{cd}	۱٦^{ab}	۱٤±۲^{a}	۱٤/٦±۱/۵۲^{ab}
Lactobacillus paraplantarum DSM 14485	۱٤/٦±۱/۱۵^{abc}	۱٦/٦±۱/۱۵^{abcd}	۱۵±۱^{abc}	۱۲/٦±۰/۵۷^{a}
Lactobacillus plantarum ATCC 14917	۱٤±۱^{ab}	۱٦/۳±۱/۱۵^{abcd}	۱٦/٦±۰/۵۷^{bcde}	۱۵/۳۳±۱/۵۳^{b}

اعداد با حروف مشابه در هر ستون تفاوت معنا داری ندارند (p<۰/۰۵).

۳-نتایج

فعالیت ضد میکروبی پالیده کشت باکتری های اسید لاکتیک جدا شده از پنیر کردی بر ضد چهار سویه بیماری زا به روش دیسک و چاهک مورد بررسی قرار گرفت که اثر مثبتی مشاهده شد و تمام سویه ها توانستند باکتری های بیماری زا را مهار کنند. توانایی مهار کنندگی آن ها از ۱۱ تا ۱۹ میلی متر متغیر بود و با توجه به حدود اطمینان و سطح معنی داری در ارتباط با فعالیت ضد میکروبی سویه های جداسازی شده مورد بررسی(p<۰/۰۵) می توان از درستی آزمون، اطمینان حاصل کرد. پالیده ی کشت باکتریایی همچنین تحت تیمارهای حرارت و خنثی سازی به روش سود قرار گرفت.

نتایج به دست آمده از روش چاهک برای پالیده بدون تیمار در جدول شماره ۱ نشان دهنده ی اثر مهارکننده مناسب این دسته از باکتری هاست. سویه های *Lactobacillus plantarum* و

Lactobacillus paraplantarum بیشترین اثر بازدارنـدگی را نـسبت بـه *Bacillus cereus* و *Staphylococcus aureus* نشان دادند که بیشترین اثر بازدارندگی برای *Bacillus cereus* مربوط بـه سـویه LU5 و بـرای *Staphylococcus aureus* مربـوط بـه سـویه LP3 و AF1 بـود. *Lactobacillus paraplantarum* نیـز اثـر ضـد میکروبـی مناسبی را نسبت به سویه هـای *Lactobacillus plantarum* نشان داد هرچند که نسبت به برخی سویه ها کمتر بود. مقایسه ی نتایج به دست آمده برای سویه های جدا شده از پنیر کردی در مقایسه با سویه های تجاری نیز نشان داد که سویه های بـومی فعالیت ضد میکروبی مناسبی دارند و برای بعضی از سویه ها این اثر بازدارندگی نسبت به سویه های تجاری بیشتر می باشد.

جدول ۲ خاصیت ضد میکروبی پالیده کشت باکتری های اسید لاکتیک بومی و تجاری به روش دیسک

باکتری های اسید لاکتیک	باکتری های بیماری زا			
	Escherichia coli O157 H7	*Staphylococcus aureus* ATCC 25923	*Bacillus cereus* ATCC 10876	*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
*Lactobacillus plantarum*LP3	۱۳/۵±۰/۵۳ ^{abc}	۱۶/۵±۰/۹۲^{cde}	۱۶/۸±۰/۷۱^{de}	۱۳/۵±۰/۷۱^{ab}
*Lactobacillus plantarum*AF1	۱۳/۵±۰/۷۱^{abc}	۱۴±۰/۵۳^{abcd}	۱۵/۹±۰/۵۳^{cde}	۱۳/۵±۰/۷۱^{ab}
*Lactobacillus plantarum*LU5	۱۴/۷±۰/۹۲^{bcd}	۱۷/۵±۰/۹۲^{e}	۱۴/۳±۱/۴^{abc}	۱۳/۵±۰/۷۱^{ab}
*Lactobacillus plantarum*LS5	۱۲±۰/۹۲^{a}	۱۴/۷±۰/۹۲^{ab}	۱۴/۷±۰/۹۲^{abcd}	۱۲±۰/۹۲^{a}
Lactobacillus paraplantarum	۱۵/۳±۰/۵۳^{cd}	۱۴/۷^{ab}	۱۲/۸±۱/۸۴^{a}	۱۳/۵±۰/۷۱^{ab}
Lactobacillus paraplantarum DSM 14485	۱۳/۵±۰/۷۱^{abc}	۱۵/۳±۰/۷۱^{abcd}	۱۳/۸±۰/۹۲^{abc}	۱۱/۶±۰/۵۳^{a}
Lactobacillus plantarum ATCC 14917	۱۲/۸±۰/۹۲^{ab}	۱۴/۹±۰/۷۱^{abcd}	۱۴±۰/۵۳^{bcde}	۱۴±۰/۷۱^{b}

اعداد با حروف مشابه در هر ستون تفاوت معنا داری ندارند (p<۰/۰۵).

نتایج به دست آمده برای روش دیسک (جدول شـماره ۲) نـشان دهنده ی اثر بازدارندگی باکتری های بومی و تجاری مـی باشـد. برای *Staphylococcus aureus* سویه ی LU5 بیشترین اثـر بازدارندگی را نسبت به دیگر سویه ها نشان داد. اثـر بازدارنـدگی *Lactobacillus paraplantarum* در مقابـل *Bacillus cereus* نسبت بـه بعـضی از سـویه هـای *Lactobacillus plantarum* کمتـر بـود امـا در مقابـل *Pseudomonas aeruginosa* تفاوت معنا داری با سویه های *Lactobacillus plantarum* و سویه ی تجاری نداشت. همچنین اثر بازدارندگی سویه های بومی برای *Escherichia coli* تفاوت معنا داری را با سویه های تجاری نشان نداد.

تیمار پالیده کشت باکتریایی با حرارت (جدول شماره ۳) در روش چاهک تاثیری در افزایش و یا کاهش فعالیت ضد میکروبی نداشت. هر چند که تیمار کردن با سود و رساندن pH مایع رویی به ۷ اثر بازدارندگی تمام سویه های بومی و تجاری به طور کامل از بین رفت و پالیده کشت با pH= ۷ اثر مهاری بر هیچکدام از باکتری های بیماری زا نداشت.

جدول ۳ خاصیت ضد میکروبی پالیده کشت باکتری های اسید لاکتیک بومی و تجاری تیمار شده با حرارت به روش چاهک

باکتری های اسید لاکتیک	باکتری های بیماری زا			
	Escherichia coli O157 H7	*Staphylococcus aureus* ATCC 25923	*Bacillus cereus* ATCC 10876	*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
*Lactobacillus plantarum*LP3	۱٤/۳±۰/۵۸ ^{ab}	۱۷/۳±۰/۵۸^{bcd}	۱۸/٦±۰/۵۷^{d}	۱٤/۳±۱/۵۲^{ab}
Lactobacillus plantarum AF1	۱۵±۱^{abc}	۱٦/۳±۰/۵۸^{ab}	۱۷±۱^{c}	۱۵±۱^{ab}
*Lactobacillus plantarum*LU5	۱۵/۷±۰/۵۸^{bc}	۱۸/۳±۰/۵۸^{d}	۱۵/٦±۰/۵۷^{bc}	۱۵±۱^{ab}
*Lactobacillus plantarum*LS5	۱۳/۳±۰/۵۸^{a}	۱٦±۱^{ab}	۱٦/۳±۰/۵۷^{bc}	۱٤±۱^{ab}
Lactobacillus paraplantarum	۱٦/۷±۰/۵۸^{cd}	۱۵/۷^{a}	۱٤±۱^{a}	۱٦/۳±۱/۱۵^{b}
Lactobacillus paraplantarum DSM 14485	۱۵±۱^{abc}	۱۷±۱^{abc}	۱٤/٦±۱/۵۲^{ab}	۱۳/۳±۰/۵۷^{a}
Lactobacillus plantarum ATCC 14917	۱۳/۳±۱/۵۲^{a}	۱٦/٦±۱/۵۲^{ab}	۱٦/۳±۰/۵۷^{bc}	۱۵/۳±۰/۵۷^{ab}

اعداد با حروف مشابه در هر ستون تفاوت معنا داری ندارند (p<۰/۰۵).

جدول ٤ خاصیت ضد میکروبی پالیده کشت باکتری های اسید لاکتیک بومی و تجاری تیمار شده با حرارت به روش دیسک

باکتری های اسید لاکتیک	باکتری های بیماری زا			
	Escherichia coli O157 H7	*Staphylococcus aureus* ATCC 25923	*Bacillus cereus* ATCC 10876	*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
*Lactobacillus plantarum*LP3	۱۳/۱±۰/۵۳ ^{ab}	۱۵/۹±۰/۵۳^{bcd}	۱۷/۱±۰/۵۳^{d}	۱۳/۲±۰/۷۱^{ab}
*Lactobacillus plantarum*AF1	۱۳/۸±۰/۹۲^{abc}	۱۵±۰/۵۳^{ab}	۱۵/٦±۰/۹۲^{c}	۱۳/۸±۰/۹۲^{ab}
*Lactobacillus plantarum*LU5	۱٤/٤±۰/۵۳^{bc}	۱٦/۸±۰/۵۳^{d}	۱٤/٤±۰/۵۳^{bc}	۱۳/۸±۰/۹۲^{ab}
*Lactobacillus plantarum*LS5	۱۲/۲±۰/۵۳^{a}	۱٤/۷±۰/۹۲^{ab}	۱۵±۰/۵۳^{bc}	۱۲/۸±۰/۹۲^{ab}
Lactobacillus paraplantarum	۱٦/۷±۰/۵۸^{cd}	۱٤/٤^{a}	۱۲/۸±۰/۹۲^{a}	۱۵±۰/۷۱^{b}
Lactobacillus paraplantarum DSM 14485	۱۳/۸±۰/۹۲^{abc}	۱۵/٦±۰/۹۲^{abc}	۱۳/٤±۰/۷۱^{ab}	۱۲/۲±۰/۵۳^{a}
Lactobacillus plantarum ATCC 14917	۱۲/۲±۰/۷۱^{a}	۱۵/۳±۰/۷۱^{ab}	۱۵±۰/۵۳^{bc}	۱٤/٤±۰/۵۳^{ab}

اعداد با حروف مشابه در هر ستون تفاوت معنا داری ندارند (p<۰/۰۵).

تیمار با حرارت در روش دیسک نیز مانند روش انتشار تفاوتی را در اثر بازدارندگی پالیده کشت باکتریایی نشان نداد (جدول شماره ٤). هر چند که تیمار با سود همانند روش انتشار فعالیت ضد میکروبی را به صفر رسانید.

جدول ۵ کمترین غلظت بازدارندگی پالیده کشت باکتری های اسید لاکتیک بومی و تجاری بر حسب AU/ml

باکتری های اسید لاکتیک	باکتری های بیماری زا			
	Escherichia coli O157 H7	*Staphylococcus aureus* ATCC 25923	*Bacillus cereus* ATCC 10876	*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
*Lactobacillus plantarum*LP3	۸۶۳/۳±۴۰/۴ abc	۹۲۶/۷±۲۸/۷ bc	۹۲۶/۷±۲۸/۹ b	۸۴۰ a
*Lactobacillus plantarum*AF1	۸۴۰ ab	۹۴۳/۳±۲۸/۹ c	۸۸۶/۷±۴۰/۴ ab	۸۶۳/۳±۴۰/۴ a
*Lactobacillus plantarum*LU5	۹۴۳/۳±۲۸/۹ c	۸۶۳/۳±۴۰/۴ ab	۸۸۰±۶۹/۳ ab	۸۴۰ a
*Lactobacillus plantarum*LS5	۸۸۶/۷±۴۰/۴ bc	۸۸۶/۷±۴۰/۴ abc	۹۰۳/۳±۶۰/۳ ab	۷۹۶/۷±۷۵ a
Lactobacillus paraplantarum	۹۴۳/۳±۲۸/۹ c	۸۶۳/۳±۴۰/۴ ab	۸۴۰ a	۸۲۰±۱۰۱ a
Lactobacillus paraplantarum DSM 14485	۸۸۶/۷±۴۰/۴ bc	۸۶۳/۳±۴۰/۴ a b	۹۰۳/۳±۶۰/۳ ab	۷۹۶/۷±۷۵ a
Lactobacillus plantarum ATCC 14917	۸۶۳/۳±۴۰/۴ abc	۸۶۳/۳±۴۰/۴ ab	۸۸۶/۷±۴۰/۴ ab	۷۵۳/۳±۷۵ a

اعداد با حروف مشابه در هر ستون تفاوت معنا داری ندارند (p<۰/۰۵).

کمترین غلظت بازدارندگی (جدول شماره ۵) پالیده کشت باکتری های اسید لاکتیک بر ضد باکتری های بیماری زا در مقایسه با سویه های تجاری نشان داد که سویه های بومی توانایی بازدارندگی بسیار خوبی در مقایسه با سویه های تجاری دارند و می توانند به عنوان ترکیب های ضد میکروبی طبیعی کاربرد داشته باشند. برای *Escherichia coli* سویه های بومی تفاوت معنا داری را با سویه های تجاری نشان نداد هر چند که برای *Staphylococcus aureus* سویه ی AF1 فعالیت ضد میکروبی بیشتری را نسبت به سویه های تجاری نشان داد. همچنین نتایج کمترین غلظت بازدارندگی نشان داد که سویه های بومی و تجاری تفاوت معنا داری را بر ضد باکتری های *Bacillus cereus* و *Pseudomonas aeruginosa* ندارند. در جدول شماره ی ٦، نتایج خاصیت تجمعی مشاهده می شود. همه ی سویه های باکتری های اسید لاکتیک در مقایسه با سویه های تجاری خاصیت خاصیت تجمعی خوبی نشان دادند که برای بعضی از سویه ها (سویه LP3) این میزان بیشتر از سویه های تجاری بود. سویه های LP3 و LU5 بیشترین خاصیت تجمعی را با *Escherichia coli* نسبت به دیگر سویه ها نشان دادند و برای *Staphylococcus aureus* و *Bacillus cereus* سویه ی LP3 فعالیت بیشتری را نسبت سویه های تجاری و دیگر سویه های بومی نشان داد. سویه های بومی و تجاری تفاوت معناداری را در خاصیت تجمعی برای *Pseudomonas aeruginosa* نداشتند. این خاصیت موید مفید بودن سویه های باکتری های اسید لاکتیک بومی می باشد یعنی این سویه ها می توانند از ساکن شدن باکتری های بیماری زا در روده جلوگیری کنند. میزان خاصیت تجمعی می تواند تحت تاثیر عوامل مختلف از جمله سویه ی باکتری اسید لاکتیک و بیماری زا و زمان گرمخانه گذاری قرار گیرد [۸].

جدول ٦ میزان خاصیت تجمعی باکتری های اسید لاکتیک بومی و تجاری

باکتری های اسید لاکتیک	باکتری های بیماری زا			
	Escherichia coli O157 H7	*Staphylococcus aureus* ATCC 25923	*Bacillus cereus* ATCC 10876	*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
*Lactobacillus plantarum*LP3	۳۵/۳±۱/۹٤^{e}	۳۸/۸±۱/۱۵^{e}	۳۹/۵±۱/۳^{e}	۲۵/۱±۱/۸۵^{abc}
*Lactobacillus plantarum*AF1	۳۰/۹±۰/٤^{cd}	۳۵/۲±۱/۱۵^{cd}	۳۲/۱±۱^{abcd}	۲٦/٦±۱/۳^{bc}
*Lactobacillus plantarum*LU5	۳۵/۵±۲/۷^{e}	۳۲/۳±۱/۲^{b}	۳۲/۵±۲/٤۵^{abcd}	۲۳/۷±۱/۸^{ab}
*Lactobacillus plantarum*LS5	۲۵/۹±۱/۸^{a}	۲۸/٦±۰/۹^{a}	۳٤/۱±۱/۹^{cd}	۲۵/۱±۱/۷^{abc}
Lactobacillus paraplantarum	۲۹/٦±۱/۸^{bcd}	۳۲/۹±۰/۹^{bc}	۳۲/۸±۲/۵^{bcd}	۲۳/۳±۱/۹^{a}
Lactobacillus paraplantarum DSM 14485	۲۸/۹±۱/۵^{bcd}	۳۱/٤±۰/۹^{b}	۳۱±۱/۲^{abc}	۲۳/۲±۰/۷۵^{a}
Lactobacillus plantarum ATCC 14917	۳۱/٤±۱/٤^{d}	۳۱/۷±۱/۵^{b}	۳۱±۲/۳^{abc}	۲٦/۸±۱/۲^{c}

اعداد با حروف مشابه در هر ستون تفاوت معنا داری ندارند (p<۰/۰۵).

٤-بحث و نتیجه گیری

بر اساس بررسی بوریس و همکاران [۹]*لاکتوباسیلوس* های جدا شده از فراورده های لبنی از رشد *Pseudomonas aeruginosa*، *Staphylococcus aureus*، *Escherichia coli* و *Salmonella typhimurium* جلوگیری کردند که بیشترین اثر ممانعت کنندگی در مقابل *Staphylococcus aureus* مشاهده شد. در پژوهش انجام شده توسط سوادگو و چیک [۱۰] فعالیت ضد میکروبی باکتری های اسید لاکتیک بر علیه سویه های استاندارد *Bacillus cereus*، *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus* هاله های عدم رشد از ۸ تا ۱۲ میلی متر به وجود آورد.

شاه و همکاران [۱۱] نیز گزارش دادند که خنثی سازی به وسیله ی سود پالیده کشت اثر بازدارندگی باکتری های اسید لاکتیک را از بین می برد که می توان فعالیت ضد میکروبی پالیده کشت را مربوط به مشتق های اسیدی تولید شده و باکتریوسین هایی که در pH خنثی فعال نیستند نسبت داد. طاهری و همکاران [۱۲] نیز گزارش دادند که باکتری های اسید لاکتیک جدا سازی شده از شیر، فعالیت ضد میکروبی مناسبی بر ضد باکتری های گرم مثبت و گرم منفی دارند و حداقل غلظت بازدارندگی برای *Lactococcus lactis* به میزان ۳۲۰AU/ml می باشد.

احتمالا تولید اسید لاکتیک و اسید استیک اولین عامل ضد میکروبی باکتری های اسید لاکتیک هتروفرمنتاتیو می باشد و با توجه به هتروفرمنتاتیو بودن *Lactobacillus plantarum* و *Lactobacillus paraplantarum* و نتایج به دست آمده از خنثی سازی به وسیله ی سود اثر ضد میکروبی سویه های مورد بررسی در این پژوهش را می توان مربوط به اسید لاکتیک و اسید استیک نسبت داد. هر چند که این فعالیت ضد میکروبی می تواند تحت تاثیر جمعیت باکتری های اسید لاکتیک، شرایط رشد و میزان مقاومت باکتری های بیماری زا قرار بگیرد. حضور اسید می تواند سبب کاهش pH محیط شود و شرایط رشد را برای دیگر میکروارگانیسم ها غیر فعال کند. همچنین فرم غیر یونیزه این اسید های آلی می تواند از غشای سلولی باکتری های بیماری زا عبور نماید و با توجه به pH داخل سلولی به فرم یونیزه تبدیل و

یون های هیدروژن تولیدی سبب اسیدی شدن سیتوپلاسم و اختلال در خاصیت الکتروشیمیایی سلول گردند که در نتیجه آن سلول غیرفعال شده و یا از بین می رود. اسید های ضعیف مانند اسید لاکتیک و اسید استیک از جمله ی این ترکیب ها می باشند که بر طیف وسیعی از میکروارگانیسم ها اثر بازدارندگی دارند. میزان بازدارندگی شکل غیر یونیزه ی این اسید ها ۱۰ تا ۶۰۰ برابر شکل یونیزه ی آن ها می باشد که میزان یونیزه شدن اسید های ضعیف با اندازه گیری pH امکان پذیر است. فرم غیر یونیزه ی اسید سیتریک، اسید استیک و اسید لاکتیک قدرت ضد میکروبی بسیار خوبی دارند که به دلیل انحلال و نفوذ بیشتر این شکل از اسید ها در لایه های لیپیدی غشای سیتوپلاسمی میکروارگانیسم ها می باشد. [۱۷-۱۳].

پژوهش های صورت گرفته در مورد فعالیت ضد میکروبی سویه های *لاکتوباسیلوس* به خوبی نشان می دهد که تولید ترکیب های ضد میکروبی از جمله اسید های آلی به نوع سویه بستگی دارد و هر سویه ی پروبیوتیک ممکن است بر سویه ی خاصی از میکروارگانیسم های بیماری زا تاثیر گذار باشد که به حساسیت میکروارگانیسم های بیماری زا به ترکیب های تولیدی توسط سویه ی پروبیوتیک بستگی دارد. فعالیت ضد میکروبی سویه های *لاکتوباسیلوس* به فاکتور های زیادی بستگی دارد; فعالیت متابولیکی آن ها در تخمیر قند ها (هموفرمنتیتو و یا هتروفرمنتیتو بودن) و شرایط رشد به ویژه حضور اکسیژن در محیط از جمله ی این فاکتور ها می باشد. در همه ی این تحقیق ها باکتری های اسید لاکتیک ابتدا در محیط MRS کشت داده شدند و سپس فعالیت ضد میکروبی آن ها بر روی میکروارگانیسم های بیماری زا بررسی گردیده است. در پژوهشی که توسط ماریانلی و همکاران[۱۸] صورت گرفت مدلی ارائه شد که در آن ارزیابی فعالیت ضد میکروبی باکتری های اسید لاکتیک دقیق تر بررسی گردید. در این مدل با تغییر در محیط کشت و شرایط رشد باکتری های اسید لاکتیک سعی گردید تا رفتار این میکروارگانیسم ها به رفتار آن ها در روده ی کوچک هر چه بیشتر نزدیک شود. در ابتدا محیط کشتی که هم باکتری های اسید لاکتیک و هم باکتری بیماری زا در آن به طور مطلوبی قادر به رشد باشند مورد بررسی قرار گرفت که محیط کشت BHI انتخاب گردید. سپس فعالیت ضد میکروبی *L. rhamnosus* و *L. reuteri* بر ضد سویه ی *سالمونلا* در میزان اکسیژن و pH مشابه روده ی کوچک ارزیابی شد. *L. rhamnosus* فعالیت ضد میکروبی بسیار خوبی را به ویژه در شرایط غیر هوازی و pH پایین نشان داد که در نتیجه ی تولید اسید لاکتیک و دیگر ترکیب های غیر لاکتیکی بود. این پژوهشگران همچنین پیشنهاد دادند که باکتری های اسید لاکتیک برای تولید ترکیب های ضد میکروبی به شرایط مطلوبی نیازمند می باشند.

نتایج این پژوهش نشان داد که متابولیت های باکتری های اسید لاکتیک جدا شده از پنیر سنتی کردی می توانند از رشد باکتری های بیماری زا جلوگیری کنند و با توجه به عوارض ناشی از مصرف ترکیب های ضد میکروبی شیمیایی ومصنوعی، این متابولیت ها می توانند به عنوان ترکیب های ضد میکروبی طبیعی کاربرد غذایی و دارویی داشته باشند. همچنین باکتری های اسید لاکتیک بومی خاصیت تجمعی مناسبی را نشان دادند که می توانند از ساکن شدن باکتری های بیماری زا در روده جلوگیری نمایند.

۵- منابع

[1] Havelaar, A.H, Brul, S., Jong, A.D., Jonge, R.D., Zwietering, M.H., Kuile, B.H. 2009.Future challenges to microbial food safety. International Journal of Food Microbiology, vol. 129: 79–94.

[2] Axelsson, L.T. 1993. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: Salminen et al. (Ed.), Lactic Acid Bacteria. Marcel Deker, USA, pp. 1-64.

[3] Vanderbergh, P.A. 1993. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. FEMS Microbiology Review, vol. 12: 221–238

[4] Kovi, J., Kos, B., Beganovi, J., Pavunc, A.L., Habjani, K., Mato, S. 2010. Antimicrobial Activity – The Most Important Property of Probiotic and Starter Lactic Acid Bacteria. Food Technology and Biotechnology, vol. 48: 296–307.

[5] Topisirovic, L.J, Kojic, M., Fira, D., Golic, N., Strahinic, I., Lozo, J. 2006. Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation.

International Journal of Food Microbiology, vol. 112: 230–235.

[6] Makras, L., Triantafyllou, V., Fayol-Messaoudi, D., Zoumpopoulou, T.A.G., Tsakalidou, E., Servin, A. 2006. Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli toward *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds. Research in Microbiology, vol. 157: 241–247.

[7] Todorov, S.D., Dicks, L.M.T. 2005. *Lactobacillus plantarum* isolated from molasses produces bacteriocin active against gram negative bacteria. Enzyme and Microbial Technology, vol. 36: 318-326.

[8] Zhanga, Y., Zhanga, L., Dua, M., Yi, H., Guoa, C., Tuob, Y. 2011. Antimicrobial activity against *Shigella sonnei* and probiotic properties of wild lactobacilli from fermented food. Microbiological Research, vol. 167: 27–31.

[9] Boris, S., Jimnez-Diaz, R., Caso, J.L., Barbes, C. 2001. Partial characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus delbruecki* subsp.*lactis* U0004. An intestinal isolate with probiotic potential. Journal of Applied Microbiology, vol. 91(2): 32-33.

[10] Savadogo, A., Cheik, A. 2004. Antimicrobial activities of lactic acid bacteria strains isolated from Burkina faso fermented milk. Pakistan Journal of Nutrition, vol. 3: 174-179.

[11] Tharmaraj N, Shah N P. 2009. Antimicrobial effects of probiotics against selected pathogenic and spoilage bacteria in cheese-based dips. International Food Research Journal, vol. 16: 261-276.

[12] Taheri, P., Samadi, N., Khoshayand, M.R., Fazeli, M.R., Jamalifar, H., Ehsani, M.R. 2011. A Study on the Antibacterial Activity of Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Iranian Milk Samples. International Journal of Agricultural Science and Research, vol. 2: 27-34.

[13] Collado, C., Surono, I., Meriluoto, J., Salminen, S. 2007. Indigenous dadih lactic acid bacteria: cell-surface properties and interactions with pathogens. Journal of Food Science, vol. 72: 89–93.

[14] Lyon, W.J., Glatz, B.A. 1993. Isolation and purification of propionicin PLG-1, a bacteriocin produced by a strain *Propionibacterium theoni*. Applied and Environmental Microbiology, vol. 59: 83-88.

[15] Nowroozi, J., Mirzaii, M., Norouzi, M. 2004. Study of *Lactobacillus* as Probiotic Bacteria. Iranian Journal of Public Health, vol. 33: 1-7.

[16] Nikolova, D., Petrova, M., Evstatieva, Y., Danova, S., Atev, A. 2009. Antimicrobial activity of *lactobacillus helveticus* strain 50p1. Trakia Journal of Sciences, vol. 7: 40-44.

[17] Lyon, W.J., and Glatz, B.A. 1993. Isolation and purification of propionicin PLG-1, a bacteriocin produced by a strain *Propionibacterium theoni*. Applied and Environmental Microbiology, vol. 59: 83-88.

[18] Marianelli, C., Cifani, N., and Pasquali, P. 2010. Evaluation of antimicrobial activity of probiotic bacteria against *Salmonella enterica* subsp. *enterica serovar typhimurium* 1344 in a common medium under different environmental conditions. Research in Microbiology, vol. 161: 673-680.

Study of antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from traditional Kurdish cheese in comparison to reference strains against some pathogens

Hashemi, S. M. B. [1], Shahidi, F. [2], Mortazavi, S. A. [2], Milani, E. [3*], Eshaghi, Z. [4]

1. Ph.D, Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
2. Prof, Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
3. Assistant Prof, Food Science and Technology Research Institute, Iranian Academic Center for Education Culture and Research (ACECR), Mashhad, Iran.
4. Associate Prof, Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Payame Noor University, Mashhad, Iran

(Received: 92/3/13 Accepted: 92/11/23)

In this study, antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from traditional Kurdish cheese was evaluated. At first, cell free culture supernatant was prepared, and then divided into three groups (control, treated by heat and treated by NaOH). Antimicrobial activity of supernatant treated or no treated was investigated utilizing Agar diffusion, Disk diffusion and Minimum Inhibition Concentration. In addition, coaggregation of lactic acid bacteria against pathogens was determined. Results showed native lactic acid bacteria were suitable antimicrobial activity in comparison to commercial lactic acid bacteria. Heating of supernatant hadn't effect on antimicrobial activity, while treating by NaOH didn't show antimicrobial activity. In addition, native lactic acid bacteria didn't show significant difference in minimum inhibition concentration with commercial lactic acid bacteria. Native lactic acid bacteria also have a suitable coaggregation with pathogens. Results of this study showed native lactic acid bacteria isolated from traditional Kurdish cheese can be used as natural antimicrobial agents.

Keywords: Lactic acid bacteria, Traditional Kurdish cheese, Antimicrobial activity, Pathogen

* Corresponding Author E-Mail Address: e_milani81@yahoo.com