مجلـه دانشگـاه علـوم پـــزشکـی اردبیـل

دوره یازدهم، شماره سوم، پاییز ۱۳۹۰، صفحات ۲۰۸ الی ۲۱۷

اثرات ضد میکروبی جسم سلولی و مایع رویی لاکتوباسیلوس کازه‌ای جدا شده از ماست بر ضد اشریشیاکلی O157:H7

مریم چاووشی فروشانی[۱]، دکتر عباسعلی ایمانی فولادی[۲]، دکتر سارا سعادتمند[۳]

[۱] کارشناس ارشد گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[۲] نویسنده مسئول: استادیار مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

Email: Imanifouladi.a@gmail.com

[۳] استادیار گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

زمینه و هدف: باکتری اشریشیاکلی O157:H7 در کشورهای در حال توسعه، یکی از عوامل مهم اسهال می‌باشد، لذا توجه به درمان آن ضروری است. به علت بروز مقاومت‌های دارویی، از بین رفتن فلور طبیعی روده و القا تولید وروتوکسین توسط این باکتری در اثر مصرف برخی از آنتی بیوتیک‌ها، نیاز به روش‌های نوین درمانی است. در این تحقیق لاکتوباسیلوس کازه‌ای از ماست جداسازی شد و اثر جسم سلولی و مایع رویی حاصل از کشت آن بر روی باکتری پاتوژن فوق بررسی شد.

روش کار: نمونه‌های مختلفی از ماست در محیط MRS در شرایط بی‌هوازی در ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. لاکتوباسیلوس کازه‌ای به روش میکروبیولوژیک و مولکولی شناسایی شد. اثرات ضد میکروبی جسم سلولی و مایع رویی حاصل از کشت این لاکتوباسیلوس با استفاده از روش انتشار از چاهک و حداقل غلظت بازدارندگی (MIC; Minimum Inhibitory Concentration) برضد اشریشیاکلیO157:H7 تعیین گردید. منحنی‌های رشد استاندارد برای باکتری پاتوژن و لاکتوباسیلوس کازه‌ای به دو روش کدورت سنجی و شمارش کلنی رسم شد، حداقل غلظت کشنده (MBC; Minimum Bactericidal Concentration) و مهارکننده رشد مایع رویی حاصل از کشت لاکتوباسیلوس کازه‌ای نیز تعیین گردید و پایداری مایع رویی حاصل از کشت در مقابل حرارت و pH بررسی شد.

یافته‌ها: در بین ماست‌های مورد مطالعه از ۲ نمونه ماست لاکتوباسیلوس کازه‌ای جداسازی و با روش‌های فنوتیپی و ژنوتیپی تایید گردید. اثر ضد میکروبی این سویه‌ها بر علیه اشریشیاکلیO157:H7 اثبات گردید. مایع رویی حاصل از کشت سویه‌های مورد مطالعه، در حرارت‌های ۵۶، ۷۰ و ۸۰ و ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۳۰ و ۶۰ دقیقه پایدارند، و نیز در مقابل pH های ۳ ، ۷ و ۱۰ پایدار بودند. حداقل غلظت کشنده و مهار کننده رشد مایع رویی لاکتوباسیلوس‌ها با استفاده از روش رقت در لوله به ترتیب رقت ۱/۱۶ و ۱/۸ بود.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج بدست آمده، می‌توان از مایع رویی به عنوان نگهدارنده بیولوژیکی در صنایع غذایی استفاده کرد. همچنین به علت اثر ضد باکتریایی لاکتوباسیلوس کازه‌ای، می‌تواند در درمان بیماری‌های ناشی از اشریشیاکلیO157:H7 مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: لاکتوباسیلوس کازه‌ای؛ ماست؛ فعالیت ضد میکروبی؛ اشریشیاکلیO157:H7

دریافت: ۸۹/۱۱/۲۵ **پذیرش:** ۹۰/٤/۱۸

مقدمه

لاکتوباسیلوس‌ها باکتری‌های گرم مثبت، بدون اسپور، بلند، کوتاه، کشیده و یا خمیده هستند. سلول‌ها اغلب آرایش زنجیره‌ای داشته و به ندرت متحرک می‌باشند. این باکتری‌ها به فراوانی در شیر، فرآورده‌های لبنی، گوشت، سبزیجات وجود دارند.

لطفا به این مقاله به شکل زیر ارجاع دهید:

Chavoshi Frooshani M, Imani Fooladi AA, Saadatmand S. Antimicrobial effects of bacterial cell debris and supernatant of *Lactobacillus casei* isolated from yoghurt against Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. J Ardabil Univ Med Sci. 2011; 11(3): 208-217. (Full text in persain)

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-12-26]

اثر حفاظتی لاکتوباسیلوس‌ها 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 و کیفیت خوب فرآورده‌های غذایی تخمیری می‌شود. این باکتری‌ها قادر به تولید مواد دیگری مانند باکتریوسین، پراکسید هیدروژن، دی استیل، استالدهید، آمونیاک، اسیدهای چرب آزاد هستند که بر روی رشد بسیاری از میکروارگانیسم‌ها اثر بازدارندگی دارند [۱].

برخی از این مواد موجب بازدارندگی رشد برخی از میکروارگانیسم‌های پاتوژن منتقله از غذا و میکروارگانیسم‌های فاسد کننده‌ی غذا مانند لیستریا [۲]، کلستریدیوم و انتروکوک [۳]، برخی از باسیلوس‌ها و استافیلوکوک‌ها [٤] می‌شوند. لاکتوباسیلوس‌ها 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 یا باکتروسین‌های خالص شده آنها به عنوان نگهدارنده بیولوژیک در غذا استفاده شود [۵].

حضور لاکتوباسیلوس‌ها برای بقا اکوسیستم میکروبی روده مهم است زیرا علاوه بر بقا و تشکیل کلنی در معده و روده، این باکتری‌ها به اسید و صفرا مقاومند و دارای توانایی اتصال به سطح روده می‌باشند [۶].

برخی از این باکتری‌ها دارای خاصیت پروبیوتیک هستند یعنی میکروارگانیسم‌هایی‌اند که مصرف آنها موجب حفظ سلامت انسان می‌شود [۷].

از اثرات مفید این باکتری‌ها پیشگیری و درمان اختلالات روده‌ای در انسان است. در افرادی که مبتلا به نقص (کمبود) لاکتاز هستند، هضم لاکتوز را بهبود می‌بخشند. همچنین در حیوانات، گزارش‌هایی از اثرات مفید این باکتری‌ها در پایین آوردن کلسترول، تحریک سیستم ایمنی و توسعه فعالیت‌های ضد سرطان گزارش شده است [۸].

بنابراین علاوه بر مغذی بودن و لذیذ بودن، فرآورده‌های لبنی با جلوگیری از رشد پاتوژن‌ها، به سلامت انسان کمک می‌کنند [۵].

در این تحقیق لاکتوباسیلوس کازه‌ای از ماست جداسازی و بروش فنوتیپی و ژنوتیپی شناسایی گردید و اثرات ضدمیکروبی جسم سلولی و مایع رویی حاصل از آن بروی اشریشیاکلی O157:H7 بررسی شد.

روش کار

جداسازی و شناسایی فنوتیپی لاکتوباسیلوس کازه‌ای از ماست

هفت نمونه ماست مربوط به شرکت‌های مختلف خریداری شد و پس از تهیه رقت، در محیط MRS جامد کشت داده شد و در شرایط بی‌هوازی جار و گاز پک در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه‌گذاری شد. بعد از پیدایش کلنی‌ها، رنگ‌آمیزی به روش گرم و انجام تست‌های بیوشیمیایی و تست‌های تخمیری قند جهت شناسایی بیشتر لاکتوباسیلوس‌ها تا سطح گونه استفاده شد. قندهای مورد آزمایش شامل مانیتول، سلوبیوز، مالتوز، مله زیتوز، سوربیتول، سالیسین و اسکولین بود. برای انجام آزمایش قندها، مقدار ۱٪ از قند مورد نظر به محیط تخمیر قندی تهیه شده، اضافه گردید [۹].

شناسایی مولکولی لاکتوباسیلوس کازه‌ای به روش PCR

استخراج DNA

سویه مورد نظر ابتدا در ۲ سی‌سی محیط لوریا براث کشت داده شدند و پس از یک شب انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ و از رسوب حاصل استخراج DNA صورت گرفت. استخراج DNA ژنومی بر اساس دستورالعمل کیت استخراج DNA (Metabion, Germany) انجام شد. از محصولات

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-12-26]

استخراج، ۵ µL بر روی ژل آگارز (سیگما) ۰/۸٪ الکتروفورز شد و در کنار مارکر ۱۰۰ bp با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد و باند DNA مشاهده گردید. غلظت DNA با دستگاه اسپکتروفتومتری نانودراپ (TERMO , Nanodrap, 1000, USA SCIENTIFIC) اندازه‌گیری شد.

آزمایش PCR و بهینه سازی مراحل آن

برای شناسایی سویه لاکتوباسیلوس کازه‌ای از پرایمرهای ژن 16s – 23s spacer (پرایمر L Casei-F، ۵´CAGACTGAAAGTCTGACGG۳´ و پرایمر L Casei-R، GCGATGCGAATTTCT۳´ ۵´TTTTC) استفاده شد [۱۰]، این پرایمرها توسط شرکت سیناژن ساخته شد (جدول ۱).

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی ۲ میکرولیتر بافر PCR-10X، ۲ میکرولیتر MgCl2 (۲/۵ mM)، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (۱۰ pmol)، ۲ میکرولیتر dNTPs (۲/۵ mM)، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم Taq پلیمراز (۵U) و ۲ میکرولیتر DNA الگو در دستگاه ترموسایکلر در ۳۵ سیکل با شرایط دمای دناتوراسیون اولیه ۹۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه و واسرشت شدن ۹۵ درجه سانتی گراد بمدت ۳۰ ثانیه، اتصال ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، طویل شدن ۷۲ درجه سانتی گراد ۳۰ ثانیه، طویل شدن نهایی ۷۲ درجه سانتیگراد ۱ دقیقه صورت گرفت.

از لاکتوباسیلوس کازه‌ای استاندارد ATCC4684 (تهیه شده از بانک میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران) به عنوان سویه کنترل مثبت استفاده گردید. سپس نمونه‌ها در کنار مارکر bp ۱۰۰ بر روی ژل ۱/۵٪ آگاروز الکتروفورز شده و باندهای مربوطه بعد از رنگ آمیزی ژل با استفاده از اتیدیوم بروماید زیر نور ماورای بنفش مشاهده شد (شکل۱) [۱۰].

رسم منحنی استاندارد رشد لاکتوباسیلوس و باکتری اشریشیاکلی O157:H7 در مدت ۲٤ ساعت به منظور مقایسه رشد باکتری پاتوژن در مجاورت با لاکتوباسیلوس کازه‌ای در ابتدا ضروری است که منحنی رشد این باکتری‌ها در شرایط استاندارد بدست آید، که در این مطالعه از دو روش کدورت‌سنجی در طول موج ۶۵۰ نانومتر و شمارش کلنی استفاده گردید [۱۱،۹].

کدورت سنجی

برای لاکتوباسیلوس و باکتری اشریشیاکلیO157:H7 دو لوله انتخاب و در هر لوله ۵ سی سی محیط TSB[1] ریخته شد. سپس از محیط کشت حاوی لاکتوباسیلوس کازه‌ای و باکتری اشریشیاکلیO157:H7 با غلظت $۱۰^{۸}$ ۳ باکتری (یک مک فارلند)، یک لوپ کامل به هر لوله تلقیح کرده و کدورت بوجود آمده در ساعت‌های صفر، ٤ ، ۱۲ و ۲٤ قرائت گردید [۱۱،۹].

شمارش کلنی

برای باکتری لاکتوباسیلوس‌های کازه‌ای واشریشیاکلی O157:H7 ٤ لوله برای ٤ زمان مختلف (۰ ، ٤ ، ۱۲ و ۲٤ ساعت) انتخاب و در هر لوله، ۵ سی سی محیط TSB و یک لوپ کامل از محیط کشت لاکتوباسیلوس‌ها و اشریشیاکلیO157:H7 با غلظت $۱۰^{۸}$ ۳ باکتری در هر میلی‌لیتر تلقیح شد. سپس بر روی هر لوله، ساعت معینی پس از تلقیح (۰ ، ٤ ، ۱۲ و ۲٤ ساعت) را یادداشت کرده و در آن ساعت از محتویات آن لوله رقت‌های متوالی $۱۰^{-۱}$ تا $۱۰^{-۶}$ تهیه گردید. سپس از هر کدام از این رقت‌ها یک میلی‌لیتر به پلیت استریل حاوی محیط مولر هینتون آگار ذوب شده با دمای ٤۰ تا ٤۵ درجه سانتی‌گراد اضافه شد. بعد از سفت شدن محیط کشت، پلیت‌ها به مدت ۲٤ ساعت در شرایط بی هوازی در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پلیت‌های حاوی ۱۰ تا ۳۰۰ کلنی انتخاب کرده و شمارش کلنی شد (نتایج حاصل از ۳ بار تکرار آزمایش آنالیزشد).

تهیه مایع رویی حاصل از کشت لاکتوباسیلوس‌ها

[1] Tripticase Soy Broth

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-12-26]

لاکتوباسیلوس‌های رشد یافته در محیط کشت مایع MRS را با سرعت ۵۰۰۰ rpm به مدت۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و سپس مایع رویی جدا شد.

بررسی اثر مهارکنندگی مایع رویی حاصل از کشت لاکتوباسیل کازه‌ای بر روی رشد اشریشیاکلی O157:H7 پس از شناسایی ژنوتیپی و فنوتیپی لاکتوباسیلوس کازه‌ای، اثر ضد میکروبی مایع رویی حاصل از کشت این لاکتوباسیل‌ها، با استفاده از روش-های روش انتشار از چاهک (WDA)[1] و کدورت سنجی (در طول موج ۶۵۰ نانومتر) در برابر اشریشیاکلیO157:H7 مورد بررسی قرار گرفت و MIC و MBC آن تعیین گردید .

کدورت سنجی

یک میلی لیتر از مایع رویی حاصل از کشت هر یک از لاکتوباسیلوس‌ها به طور جداگانه در داخل لوله با ۰/۵ سی‌سی مایع تلقیح معادل استاندارد ۱ مک فارلند سویه ی پاتوژن مجاور شد و در طول موج ۶۵۰ نانومتر در فواصل زمانی ۰، ٤، ۱۲ و ۲٤ ساعت پس از مجاورت، کدورت‌ها قرائت و نتایج آن به صورت نمودار ارائه شد (نتایج میانگینی از سه بار تکرار آزمایش می‌باشد) [۱۱].

روش انتشار از چاهک WDA

در پلیت حاوی محیط کشت چاهک ایجاد شد و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از مایع رویی هر یک از لاکتوباسیلوس‌ها در داخل چاهک ریخته و ٤۰ میکرولیتر سوسپانسیون یک مک فارلنداشریشیاکلی O157:H7 روی پلیت پخش، سپس پلیت در ۳۷ درجه بمدت ۲٤ ساعت انکوبه شد و در نهایت قطر هاله عدم رشد در اطراف هر چاهک بر حسب میلیمتر اندازه‌گیری شد (نتایج میانگینی از سه بار تکرار آزمایش می‌باشد) [۱۳،۱۲].

تعیین MIC و MBC مایع رویی حاصل از کشت لاکتوباسیلوس کازه ای

رقت‌های نزولی ۱/۲ تا ۱/٦٤ از مایع رویی در محیط مولر هینتون براث تهیه شد سپس یک میلی‌لیتر سوسپانسیون یک مک فارلند اشریشیاکلیO157:H7 به هر لوله اضافه و لوله‌ها در ۳۷ درجه بمدت ۲٤ ساعت انکوبه شد و میزان MIC تعیین گردید. ۱۰۰ میکرولیتر از چند لوله بدون کدورت قبل از MIC روی محیط مولر هینتون آگار کشت و پلیت ها انکوبه شد. سپس کلنی‌ها شمارش و از نظر MBC بررسی شد [۱٤].

اثر ضد میکروبی جسم سلولی لاکتوباسیلوس کازه‌ای

یک لوپ کامل از غلظت ۳×۱۰^{۸} از باکتری لاکتوباسیلوس کازه‌ای و اشریشیاکلیO157:H7 را در ٤ لوله محیط TSB به طور مجزا و همزمان در داخل لوله مجاورت داده شدند. سپس بر روی هر لوله، ساعت معینی پس از تلقیح (۰ ، ٤ ، ۱۲ و ۲٤ ساعت) یادداشت و در آن زمان از محتویات لوله‌ها بر روی محیط جامد، کشت داده شد و پس از ۲٤ ساعت انکوبه‌گذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، کلنی‌های رشد یافته لاکتوباسیلوس‌ها و اشریشیاکلی O157:H7 به طور جداگانه شمارش شد و نتایج حاصله با منحنی‌های رشد آنها مقایسه شد [۱۵].

بررسی خواص فیزیکوشیمیایی مایع رویی حاصل از کشت لاکتوباسیلوس کازه ای

الف) حرارت: مایع رویی حاصل از کشت لاکتوباسیلوس کازه‌ای بمدت ۱۰ دقیقه در دماهای ۵۶، ۷۰ و ۸۰ و همچنین ۱۰، ۳۰ و ۶۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و در نهایت فعالیت ضد میکروبی آن به روش WDA بررسی شد.

ب) pH: اسیدیته مایع رویی حاصل از کشت لاکتوباسیلوس کازه‌ای با اسید کلریدریک و سود یک نرمال به ۳، ۷ و ۱۰ رسانده شد و فعالیت ضد میکروبی آن به روش WDA بررسی شد.

[1] Well Diffusion Agar

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-12-26]

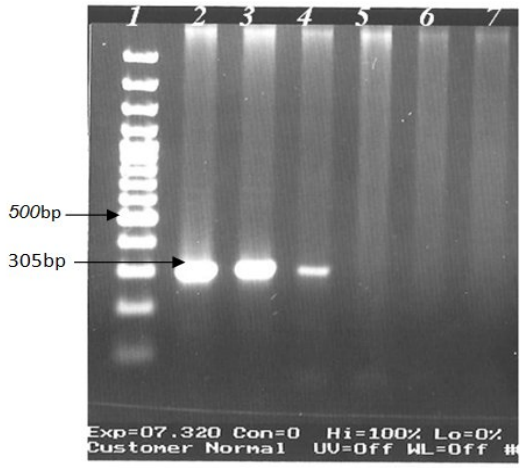
تمامی این اطلاعات توسط نرم افزار آماری SPSS نسخه ۱۷ و آزمون‌های کای دو، فیشر آنالیز شد.

یافته ها

جدا سازی و شناسایی فنوتیپی و ژنوتیپی لاکتوباسیلوس کازه ای از ماست

در این مطالعه از ۷ نمونه ماست مورد بررسی، ۲ نمونه لاکتوباسیلوس کازه‌ای بدست آمد. جنس و گونه این باکتری بر اساس شکل ظاهری کلنی، شکل میکروسکوپی، تست‌های بیوشیمیایی، تخمیر قندها و روش مولکولی PCR تایید شد (شکل ۱).

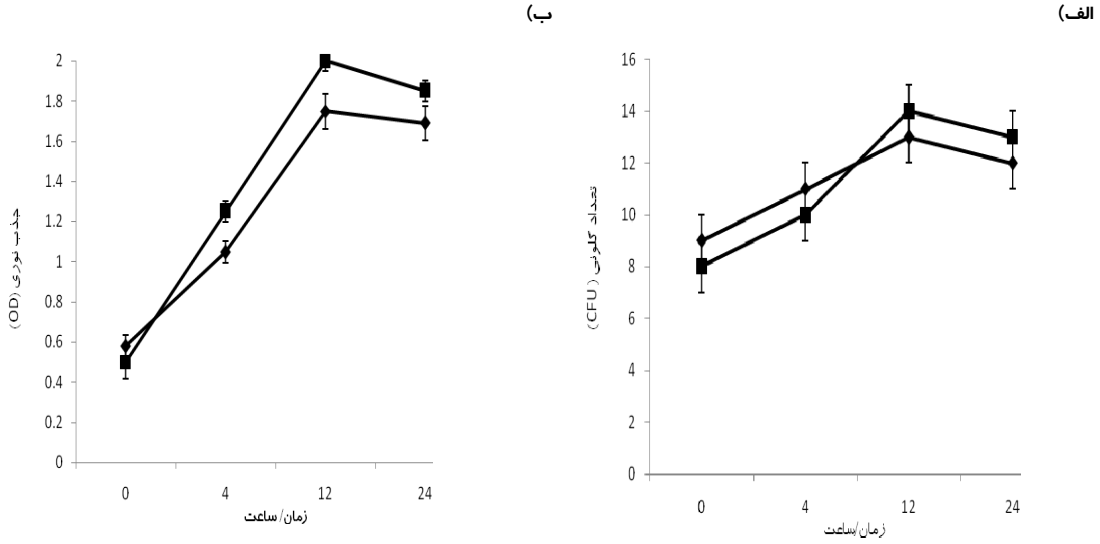
کلنی این باکتری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، در شرایط بی‌هوازی و پس از ۷- ۳ روز، به قطر ۲- ۱ میلیمتر به رنگ سفید تا کرم در محیط MRS مشاهده شد. این باکتری، باسیل گرم مثبت، بدون اسپور، بلند، برخی کوتاه بوده و تعدادی هم حالت خمیده داشتند. رسم منحنی استاندارد رشد لاکتوباسیلوس و باکتری اشریشیاکلیO157:H7 در مدت ۲٤ ساعت در شرایط استاندارد منحنی رشد هر دو باکتری بدو روش بیانگر رشد مناسب آنهاست (نمودار ۱).



شکل ۱. ستون ۱- مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA، ستون ۲ لاکتوباسیلوس کازه‌ای استاندارد ATCC4684 شاهد مثبت، ستون ۳-٤ نمونه لاکتوباسیل کازه‌ای جدا شده از ماست (۳۰۵ bp)، ستون ۵ نمونه باکتری اشریشیاکلیO157:H7 کنترل منفی ستون ۶-۷ شاهد منفی

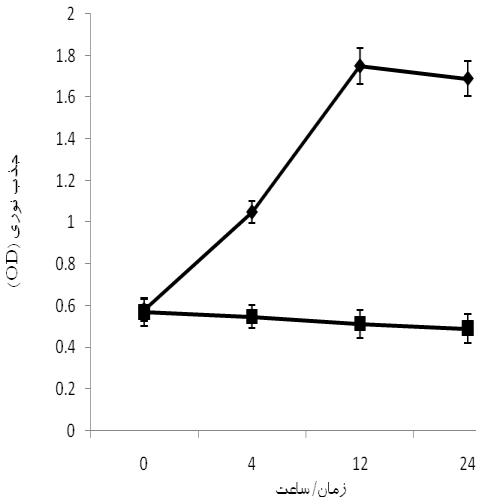
اثر ضد میکروبی مایع رویی لاکتوباسیلوس کازه‌ای:

الف) کدورت سنجی: مجاورت مایع رویی حاصل از کشت لاکتوباسیلوس کازه‌ای با اشریشیاکلی O157:H7 منجر به کاهش رشد معنی‌دار ($p<0.05$) باکتری پاتوژن شد (نمودار۲).



نمودار ۱. منحنی رشد E.coli O157:H7 (■) و لاکتوباسیلوس کاز ه ای (◆) به روش (الف) شمارش کلنی و (ب) کدورت سنجی

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-12-26]



نمودار ۲. منحنی رشد E.coli O157:H7 (◆) (منحنی شاهد) و در مجاور با مایع رویی کشت لاکتوباسیلوس کازه ای (■) بروش جذب نوری (Optical Density)(طول موج ۶۵۰ نانومتر)

روش انتشار از چاهک (WDA)

مایع رویی کشت لاکتوباسیلوس کازه‌ای بر علیه اشریشیاکلیO157:H7، فعالیت ضد میکروبی نشان داد و هاله عدم رشد مربوط به آن ۱۷ میلی‌متر بود.

تعیین MIC و MBC مایع رویی حاصل از کشت لاکتوباسیل کازه ای

نتایج MIC و MBC مایع رویی حاصل از کشت لاکتوباسیل کازه‌ای بر ضد اشریشیاکلی O157:H7 نشان داد که میزان MIC و MBC مایع رویی به ترتیب رقت ۱/۱۶ و ۱/۸ می‌باشد.

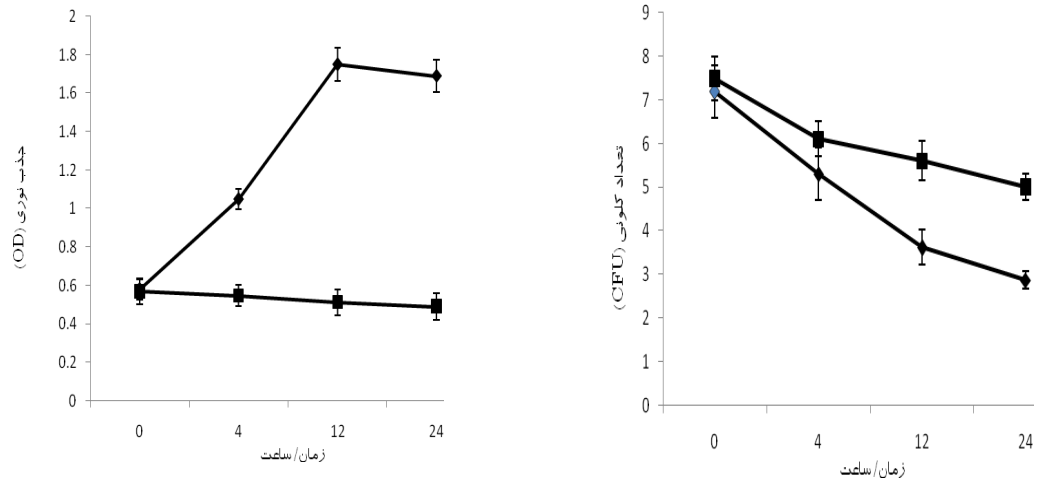
اثر ضد میکروبی جسم سلولی لاکتوباسیلوس کازه‌ای

کشت همزمان باکتری پاتوژن اشریشیاکلی O157:H7 در مجاورت لاکتوباسیلوس کازه‌ای در مقایسه با نمودار کنترل مثبت (منحنی های رشد لاکتوباسیلوس و باکتری اشریشیاکلی O157:H7) نشان می‌دهد که رشد باکتری پاتوژن اشریشیاکلی O157:H7در مجاورت با لاکتوباسیلوس کازه‌ای از کاهش معنی‌داری برخوردار است ($p<۰/۰۵$). از طرف دیگر، تعداد لاکتوباسیلوس‌ها در این مدت، ثابت و یا کاهش نامحسوسی داشت (نمودار۳).

نتایج حاصل از بررسی خواص فیزیکوشیمیایی مایع رویی حاصل از کشت لاکتوباسیلوس کازه ای

مایع رویی حاصل از کشت لاکتوباسیلوس کازه‌ای، در حرارت‌های ۵۶، ۷۰ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد و دمای جوش، به مدت ۱۰ دقیقه پایدار بود. از طرفی در مقابل pH های ۳ ، ۷ و ۱۰ نیز اثر ضد باکتریایی خود را حفظ کرد (لازم به ذکر است که در حالت طبیعی مایع رویی حاصل از کشت لاکتوباسیلوس کازه‌ای دارای pH اسیدی برابر ۵/۵ بوده است).

الف ب



نمودار ۳. الف) اثر مهار کنندگی رشد لاکتوباسیلوس کازه ای بر روی E.coli O157:H7 (◆) ب) منحنی رشد لاکتوباسیلوس کازه ای وO157:H7 E Coli هر کدام به تنهایی (■)

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-12-26]

بحث

باکتری‌های اسید لاکتیک که به عنوان استارتر برای تولید فرآورده‌های لبنیاتی استفاده می‌شوند، عامل اصلی تخمیر و محافظت کننده غذا نیز هستند. این باکتری‌ها همچنین در ایجاد بو، طعم و بافت فراورده های تخمیری نقش بسزایی دارند [۱۶].

کسلا[1] و همکارانش [۱۷] برای جداسازی لاکتوباسیلوس‌ها ابتدا مواد غذایی را در محیط MRS مایع وارد نموده و پس از چند ساعت در محیط MRS جامد کشت دادند. این روش غنی‌سازی معمولا برای بدست آوردن لاکتوباسیلوس‌ها از سبزیجات و غذاهای دریایی مفید است. اما در بررسی حاضر، بدون استفاده از روش غنی‌سازی، لاکتوباسیلوس‌ها در محیط MRS رشد کردند. علت آن احتمالا تعداد فراوان این باکتری‌ها به عنوان آغازگر در فرآورده‌های لبنیاتی بوده است.

اوتا[2] و همکارانش در سال ۱۹۹۹ گزارش کردند مصرف ماست باعث می‌شود تا لاکتوباسیلوس بیشتری در روده کلنیزه شده و شرایطی مهیا شود که از کلنیزاسیون انتروهموراژیک اشریشیاکلی جلوگیری شود [۱۸]. توبا[3] و همکاران، مایع رویی کشت لاکتوباسیلوس‌های مختلفی را با باکتری‌های پاتوژن از جمله لیستریا مونوسیتوژنز، سالمونلا، شیگلا و استافیلوکوکوس اورئوس مجاور کرده و کدورت‌های حاصل را در فواصل زمانی مختلف بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که میزان کدورت‌های قرائت شده از ۵۶۶ به ٤۰۷ کاهش می‌یابد [۲۱-۱۹].

در تحقیق حاضر مایع رویی کشت لاکتوباسیلوس کازه‌ای با سویه پاتوژن اشریشیاکلی‌انتروهموراژیک مجاورت داده شد که سیر نزولی کدورت‌های قرائت شده، بیانگر این نکته است که مایع رویی، از رشد باکتری پاتوژن جلوگیری کرده است. ضمن اینکه علاوه بر روش کدورت‌سنجی، اثر جسم سلولی لاکتو باسیلوس بر باکتری پاتوژن نیز مورد بررسی قرار گرفت که نتایج مشابهی را نشان داد.

هیرانو[4] و همکارانش بر روی اثر ضد میکروبی مایع رویی کشت لاکتوباسیلوس های سیک، پلانتاروم و کورواتوس در پلیت به روش ایجاد حفره مطالعه کرده و متوجه شدند که این مواد با ایجاد هاله عدم رشد، بر طیف وسیعی از باکتری‌های پاتوژن نظیر لیستریا مونوسیتوژنز، استافیلوکوکوس اورئوس و یرسینیا انتروکولیتیکا اثر مهارکنندگی دارند [۲۲].

در تحقیق حاضر، لاکتوباسیل‌ها، به روش WDA، بر علیه اشریشیاکلی‌انتروهموراژیک، فعالیت ضد میکروبی نشان دادند که هاله عدم رشد مربوط به مایع رویی لاکتوباسیلوس کازه‌ای بر ضد باکتری اشریشیاکلی O157:H7 قابل توجه بود.

روش دیگری از طرف ماتسوساکی[5] و همکارانش برای بررسی اثر بازدارندگی رشد لاکتوباسیلوس‌ها بر روی باکتری‌های بیماریزا به کار رفت و آن شمارش کلنی باکتری‌ها در فواصل زمانی مختلف پس از مجاورت با یکدیگر بود [۱۱].

در تحقیق حاضر، باکتری پاتوژن در مجاورت لاکتوباسیلوس‌ها، به طور همزمان کشت داده شد و مشخص شد که رشد باکتری پاتوژن در مجاورت لاکتوباسیلوس‌ها، از کاهش محسوسی برخوردار است.

آلپای[6] و همکارانش دریافتند که فعالیت ضد میکروبی مایع رویی کشت لاکتوباسیلوس‌های واژن، در اسیدیته بین ۷-٤/۵ پایدار می‌باشد، اما در اسیدیته ۹ فعالیت ضدمیکروبی آنها از بین می‌رود [۱۲]. در حالیکه در مطالعه ما تا در اسیدیته ۱۰ نیز اثرات ضد میکروبی کاملا مشهود بود.

[1] Casla
[2] Ota
[3] Toba
[4] Hirano
[5] Matsusaki
[6] Alphy

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-12-26]

اگانبانو و همکارانش گزارش کردند که مایع رویی کشت لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس برویس بعد از نگهداری در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ روز، فعالیت خود را کاملا حفظ می‌کنند اما در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲۰ روز، پایداری نسبی دارند. این در حالی است که این مایع پس از نگهداری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ تا ۸۰ روز هیچ فعالیتی از خود نشان نمی‌دهند [۲۳].

در تحقیق حاضر پایداری اثر ضد میکروبی مایع رویی حاصل از کشت لاکتوباسیلوس کازه‌ای، در برابر حرارت‌های مختلف مورد مطالعه قرار گرفت و مشخص شد که در برابر حرارت‌های ۵۶ ، ۷۰ ، ۸۰ درجه سانتی‌گراد و دمای جوش به مدت ۱۰ دقیقه پایدار بود. تفاوت مطالعه حاضر با تحقیق فوق در دو نکته می‌باشد، اولا در مطالعه ما از لاکتوباسیلوس کازه‌ای استفاده شد و ثانیا دما بالای ۳۷ درجه تا دمای جوش بررسی شد که در مطالعه اگانبانو و همکاران بررسی نگردید. همچنین در این تحقیق مایع رویی کشت این لاکتوباسیلوس‌ها، به pHهای ۳ ، ۷ و ۱۰ مقاوم بود، که در مطالعه سایرین مشاهده نشده است.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج بدست آمده از تحقیق حاضر می‌توان نتیجه گرفت که لاکتو باسیلوس کازه ای یکی از باکتری‌هایی است که محصول رویی حاصل از کشت و جسم سلولی آن می‌تواند بر علیه باکتری‌های پاتوژن از جمله پاتوژن‌های روده‌ای استفاده شود و محصولات آن درشرایط سخت دمایی و اسیدیته فعال بوده و اثرات ضد باکتریایی اش پایدار می‌ماند.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از زنده یاد استاد محترم دکتر مرتضی ستاری بدلیل همکاری‌های بی‌دریغشان تشکر می‌نماییم.

References

1- Kandler O, Nobert Weiss: Bergey's Manual of systematic Bacteriology. 1989; 14(2): 1208-1234.

2- Ennahar S, Deschamps N. Anti-Listeria effect of enterocin A, produced by cheese-isolated Enterococcus faecium EFM01, relative to other bacteriocins from lactic acid bacteria. J Appl Microbiol. 2000 Mar; 88(3):449-57.

3- Zhu WM, Liu W, Wu DQ. Isolation and characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus gasseri KT7*. J 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; 72 (1-2): 31-43.

5- Sreekumar O, Hosono A. Immediate effect of *Lactobacillus acidophilus* on the intestinal flora and fecal enzymes of rats and the in vitro inhibition of E coli in coculture. J Dairy Sci. 2000 May; 83(5):931-9.

6- Jacobsen CN, Rosenfeldt Nielsen V, Hayford AE, Møller PL, Michaelsen KF, Paerregaard A, et al. Screening of probiotic activities of forty-seven strains of Lactobacillus spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. Appl Environ Microbiol. 1999 Nov; 65(11):4949-56.

7- Gorbach SL, Probiotics and gastrointestinal health. Am J Gastroenterol. 2000 Jan; 95(1 Suppl): S2-4.

8- Thoreux K, Balas D, Bouley C, Senegas-Balas F, Balas P. Diet supplemented with yoghurt or milk fermented by Lactobacillus casei DN-114 001 stimulates growth and brush-border enzyme activities in mouse small intestine. Digestion. 1998 Jul-Aug; 59(4):349-59.

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-12-26]

9- Finegold SM, Baron EJ. Diagnostic Microbiology, 8th ed. Bailey & Scott s. Mosby Company. Baltimore. Philadelphia . 2009; Part II, IV, 171-476.
10- Walter J, Tannock GWA, Sala-Timisjarvi IL, Rodtong SLoach DM , Munro K, Alatossava T. Detection and Identification of Gastrointestinal Lactobacillus Species by Using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Species-Specific PCR Primers. Appl Environ Microbiol. 2000 Jan; 66(1): 297–303.
11- Matsusaki H, Endo N, Sonomoto K, Ishizaki A, Matsusaki H. Lantibiotic nisin Z fermentative production by Lactococcus lactis IO-1: relationship between production of the lantibiotic and lactate and cell growth. Appl Microbiol Biotechnol. 1996 Mar; 45(1-2):36-40.
12- Alphy karaoglu S, Aydin F, Kilic AO. Antimicribial activity and characterization of bacteriocins produced by vaginal Lactobacilli. Turk J Med Sci 2003; 33: 7-13.
13- Aslim B, Yukesekdag ZN, Sarikaya E, Beyatli Y. Determination of the bacteriocin-like substances produced by some lactic acid bacteria isolated from Turkish dairy products. LWT, 2005 Sep; 38: 691-694.
14- Wikler MA, Cockeril FR, Craig WA, Dudley MN ,Hecht DW. Method for Dilution Antimicrobial Test for Bacteria that Grow aerobically; Approved Standard. 7th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute. ISBN, 2006; 1: 56238-587-9.
15- Boris S, Jiménez-Díaz R, Caso JL, Barbés C. Partial characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus delbrueckii subsp*. lactis UO004, an intestinal isolate with probiotic potential. J Appl Microbiol. 2001 Aug; 91(2):328-33.
16- Izco JM, Tormo M, Jiménez-Flores R. Development of a CE method to analyze 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.
17- Casla D, Requena T, Gómez R. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from goat's milk and artisanal cheeses: characteristics of a bacteriocin produced by Lactobacillus curvatus IFPL 105. J Appl Bacteriol. 1996 Jul; 81(1):35-41.
18- Ota A. Protection against an infectious disease by Enterohemorrhagic *Escherchia coli*. Med Hypotheses. 1999 Jul; 53(1):87-8.
19- Toba T, Yoshioka E, Itoh T. Acidophilucin A, a new heat labile bacteriocin produced by Lactobacillus acidophilus LAPT 1060 , Lett Appl Microbiol, 1991 Apr; 13 , 106-108.
20- Itoh T, Fujimoto Y, Kawai Y, Toba T, Saito T. Inhibition of food-borne pathogenic bacteria by bacteriocins from *Lactobacillus gasseri*. Lett Appl Microbiol. 1995 Sep; 21(3):137-41.
21- Schillinger U. Bacteriocin of lactic acid bacteria. In biotechnology and food safety. Ed. D.D. Bills and S.D. Kung. Butter Worth-Heinemann. 1990 Boston. 55-74.
22- Hirano J, Yoshida T, Sugiyama T, Koide N, Mori I, Yokochi T. The effect of Lactobacillus rhamnosus on enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection of human intestinal cells in vitro. Microbiol Immunol. 2003; 47(6):405-9.
23- Ogunbanwo ST, Sanni AL and Onilude A. Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and Lactobacillus brevis OG1. African J of Biotechnol , 2003 Agu; 2(8): 219-227.

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-12-26]

Antimicrobial Effects of Bacterial Cell Debris and Supernatant of *Lactobacillus casei* Isolated from Yoghurt Against Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7

Chavoshi Frooshani M, MSc[1]; Imani Fooladi AA, PhD[2]; Saadatmand S, PhD[3]

[1] MSc of Biology Dept, Sciences and Research Branch Islamic Azad University, Tehran, Iran.
[2] Corresponding author: Assistant Prof. of Applied Microbiology Research Center, Baqiyatallah University Medical of Sciences, Teharn, Iran. E-mail: Imanifouladi.a@gmail.com
[3] Assistant Prof. of Biology Dept, Sciences and Research Branch Islamic Azad University, Tehran, Iran.

ABSTRACT

Background & Objectives: *Escherishia coli* O157:H7 is one of the most important diarrhea causing agents in developing countries. Using antibiotics cause adverse effects as promoting emergence of antibiotic resistance, fading the microflora of intestine and enhancement of verotoxin (VTEC) production by this bacterium. So, a modern treatment protocol is needed for treatment of infections caused by this bacterium. In this study, *Lactobacillus casei* (*L. casei*) was isolated from yogurt and antibacterial effects of bacterial cell debris and its culture supernatant were tested against *E.coli* O157:H7.

Methods: Several different samples of yoghurt were cultured in MRS agar in anaerobic conditions at 37 ºC. *L. casei* was identified by common microbiological and molecular methods. Antimicrobial effects of bacterial cell debris and its culture supernatant were tested against *E. coli* O157:H7 by using Agar Well Diffusion (AWD) and Broth macrodilution methods. In addition, standard growth curves of pathogenic bacterium and *L. casei* were obtained by turbidometery and colony count procedures. The MIC (Minimum Inhibitory Concentration) and MBC (Minimum Bactericidal Concentration) of supernatant originated from culture of *L. casei* were determinded. The stability of antimicrobial effects of the supernatant in different conditions of pH and temperature were studied.

Results: *Lactobacillus casei* was isolated from two different samples of yoghurts, and confirmed by phenotypic and genotypic methods. The results showed that antimicrobial effects of culture supernatant were stable at 56, 70, 80 and 100 ºC for 30 and 60 minutes. Furthermore, they were stable in pH of 3, 7 and 10. The MIC and MBC of supernatants were 1:16 and 1:8 respectively.

Conclusion: According to the results of this study, culture supernatant of *L. casei* can be used as a biological preservative in food industries. Also due to antimicrobial effect of L. casei, it can be used in treatment of diseases associated with *E. coli* O157:H7.

Key words: *Lactobacillus casei*; *Escherishia coli* O157:H7; Yoghurt; Antimicrobial effect

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-12-26]