مقاله پژوهشی
(Original Article)

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره پنجم ـ شماره چهارم ـ زمستان ۹۰
صفحات ۱۵ الی ۲۰

اثر محیط کشت بر فعالیت‌های متابولیکی و ضد باکتریایی پروبیوتیک‌ها

فاطمه میرداودی[۱]، ناصر قائمی[۲]، میرساسان میرپور[۳]، رضا کاظمی درسنکی[۴]

[۱]کارشناس ارشد میکروب‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، لاهیجان، ایران.
[۲]استادیار بیوتکنولوژی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
[۳]مربی میکروب‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، لاهیجان، ایران.
[۴]کارشناس ارشد میکروب‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، لاهیجان، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: پروبیوتیک‌ها ترکیبات میکروبی زنده‌ای هستند که مستقیماً به مواد غذایی اضافه شده و تأثیر مطلوبی بر عملکرد و سلامت موجودات زنده می‌گذارند. فاکتورهای بیفیدوژنیک با ورود به روده بزرگ، به افزایش جمعیت باکتری‌های اسید لاکتیک از جمله *لاکتوباسیل‌ها* و *بیفیدوباکتریوم‌ها* کمک کرده و مانع رشد پاتوژن‌های روده‌ای می‌شوند. این مطالعه با هدف بررسی اثر محیط کشت بر فعالیت‌های متابولیکی و ضد باکتریایی پروبیوتیک‌ها صورت گرفت.

روش بررسی: در این مطالعه، از باکتری‌های پروبیوتیک و باکتری‌های پاتوژن روده‌ای استفاده شد. *لاکتوباسیل‌ها* و *بیفیدوباکتریوم‌ها* با کشت در محیط MRS، رنگ‌آمیزی گرم و روش‌های استاندارد بیوشیمیایی شناسایی شدند. اثر آنتاگونیستی پروبیوتیک‌ها در حضور فاکتورهای رشد به روش انتشار در آگار، بر روی *شیگلا فلکسنری*، *اشرشیا کلی* و *سالمونلا تیفی موریوم* بررسی گردید و pH محیط کشت اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: باکتری‌های پروبیوتیک رشد کرده در محیط کشت MRS حاوی ۱٪ لاکتوز به اضافه سوربتیول، رافینوز و ریبوفلاوین، خاصیت ضد باکتریایی از خود نشان دادند. بیشترین فعالیت آنتاگونیستی مربوط به *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* سویه صنعتی بر روی *شیگلا فلکسنری* و کمترین فعالیت ضد باکتریایی مربوط به *لاکتوباسیلوس کازئی* (PTCC 1608) بر روی *سالمونلا تیفی موریوم* بود. همچنین *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* سویه صنعتی، بیشترین تأثیر را در کاهش pH محیط کشت در اثر مصرف ترکیبات فوق داشت.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد با افزودن فاکتورهای رشد به محیط پایه MRS حاوی ۱٪ لاکتوز، رشد پروبیوتیک‌ها افزایش یافته و فعالیت ضد باکتریایی آنها نیز بیشتر می‌شود.

کلید واژه‌ها: *لاکتوباسیل‌ها*؛ *بیفیدوباکتریوم*؛ آنتاگونیست‌ها و مهارکننده‌ها؛ پروبیوتیک‌ها.

نویسنده مسئول مکاتبات: دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، لاهیجان، ایران؛
آدرس پست الکترونیکی: fatememirdavoudi@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۸۹/۴/۱۶ تاریخ پذیرش: ۸۹/۶/۱۸

مقدمه

پروبیوتیک‌ها به‌عنوان میکروارگانیسم‌های زنده و غیربیماری‌زا، وقتی در مواد غذایی به مقادیر کافی وارد بدن شوند؛ تأثیر مثبتی بر سلامت میزبان می‌گذارند (۱). Minora Shirota، پزشک ژاپنی این تئوری را مطرح نمود که بالانس میکروبی مناسب در روده می‌تواند از ابتلا به بیماری جلوگیری کند، و عدم تعادل فلور میکروبی روده نیز عامل ایجاد بیماری‌های مختلفی از جمله اسهال (به دلیل مصرف آنتی‌بیوتیک، مسافرت، عفونت روده و رادیوتراپی)، التهاب روده و معده، یبوست، سندرم روده تحریک‌پذیر، بیماری کرون، التهاب کولون، آلرژی ناشی از غذا

و بعضی از سرطان‌ها می‌باشد. برعکس فلور متعادل روده از طریق رقابت، باکتری‌های بیماری‌زا را از روده خارج و با تحریک سیستم ایمنی، مواد مغذی و حیاتی مانند اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه، ویتامین‌ها، اسیدهای آمینه آرژنین، سیستین، گلوتامین و پلی‌آمین‌ها، فاکتورهای رشد و آنتی‌اکسیدان‌های مختلف را تولید می‌کند (۲). *لاکتوباسیلوس‌ها* و *بیفیدوباکتریوم‌ها* دو جنس از پرکاربردترین پروبیوتیک‌ها برای انسان هستند که به گروه باکتری‌های لاکتیک اسید (LAB) تعلق دارند (۳). باید به این نکته توجه نمود که تمامی باکتری‌های اسیدلاکتیک لزوماً پروبیوتیک نمی‌باشند. ارگانیزم‌هایی که به‌عنوان پروبیوتیک استفاده می‌شوند به مواد غذایی اضافه شده و از این طریق با ورود به روده، عملکرد خود را انجام می‌دهند. روند مصرف غذاهای پروبیوتیک در اروپا، آسیا و شمال آمریکا به‌تدریج در حال افزایش است، و امروزه در بیشتر سوپرمارکت‌های سراسر دنیا این مواد غذایی عرضه می‌شود (۴). این مطالعه با هدف تعیین اثر محیط کشت بر فعالیت‌های متابولیکی و ضد باکتریایی پروبیوتیک‌ها انجام شد.

روش بررسی

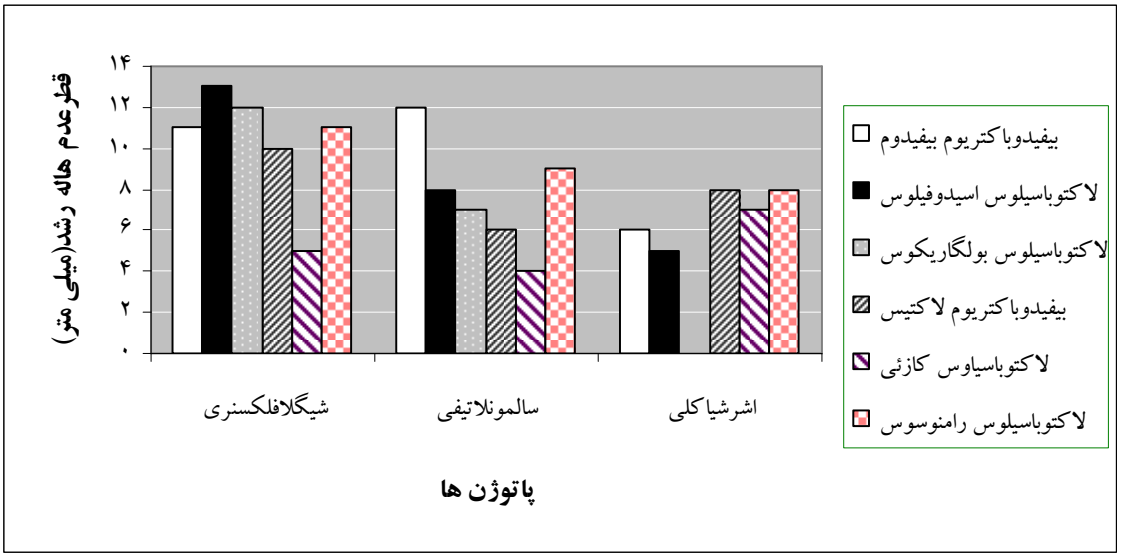
در این تحقیق *از لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* جداشده از یک کپسول تجاری پروبیوتیک ساخت شرکت نچرال فاکتورز کانادا، *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس* و *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* جداشده از ماست پروبیوتیکی و سویه‌های استاندارد *لاکتوباسیل کازئی* (PTCC 1608)، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* (PTCC 1637)، *اشرشیا کلی* (PTCC 1552)، *سالمونلا تیفی موریوم* (PTCC 1609) و *شیگلا فلکسنری* (PTCC 1234) تهیه‌شده از مرکز کلکسیون باکتری‌ها و قارچ‌های سازمان پژوهش علمی و صنعتی ایران، استفاده شد.

باکتری‌های موجود در کپسول و ماست پروبیوتیکی پس از انتقال به محیط مایع MRS، به مدت ۴۸ ساعت در جار بی‌هوازی ۳۸°c انکوبه شدند. سپس به محیط MRS جامد منتقل و در جار بی‌هوازی با دمای ۳۸°c قرار داده شدند. در ادامه، با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی شامل: رنگ‌آمیزی گرم، قابلیت رشد در دماهای ۱۵°c و ۴۵°c، تولید گاز گلوکز، گلوکونات، گالاکتوز و مالتوز، مانیتول، ریبوز، سوکروز، آرابینوز، لاکتوز، مانوز، رافینوز، رامنوز، گزیلوز، سوربتیول و سالیسین و تست کاتالاز، اکسیداز، تولید اندول و سولفید هیدروژن در محیط SIM بررسی و نتایج به دست آمد، با اطلاعات مندرج در کتاب برجی، جنس و گونه باکتری مورد نظر تأیید گردید (۵). برای بررسی فعالیت آنتاگونیستی LAB، به محیط کشت پایه MRS بعد از اتوکلاو در ۱۲۱°c به مدت ۲۰ دقیقه، فاکتورهای رشد شامل: ۲٪ سوربتیول، ۲٪ رافینوز و ۱۰۰mg/l ریبوفلاوین بعد از فیلتراسیون اضافه شد. سوسپانسیونی از باکتری‌های پروبیوتیک به کدورت ۰/۵ مک‌فارلند ($۱/۵\times۱۰^{۸}$cfu/ml) تهیه و به میزان ۰/۱ml به محیط کشت حاوی فاکتورهای رشد تلقیح شد، سپس به مدت ۲۴ ساعت در جار بی‌هوازی ۳۸°c انکوبه گردید. جهت بررسی فعالیت ضد باکتریایی، از محیط مولر هینتون آگار استفاده شد. برای این منظور با استفاده از آزمون انتشار در آگار توسط چاهک (Well Diffusion Agar)، اثر آنتاگونیستی باکتری‌های پروبیوتیک بر ۳ سویه استاندارد *اشرشیا کلی* (PTCC 1552)، *سالمونلا تیفی* (PTCC 1609) و *شیگلا فلکسنری* (PTCC 1234) بررسی شد. از نمونه‌های باکتری‌های پاتوژن، کشت تلقیح ۲۴ ساعته تهیه و کدورت آن با شاهد ۰/۵ مک‌فارلند مقایسه گردید. میزان ۰/۱ml از کشت تلقیح فوق به محیط کشت مولر هنیتول آگار منتقل و با سواپ استریل کشت یکنواخت و متراکم تهیه شد. بعد از ایجاد چاهک، ۵۰ml از محیط کشت MRS مایع حاوی فاکتورهای رشد و بدون فاکتورهای رشد (به‌عنوان شاهد) و محیط MRS حاوی ۱٪ لاکتوز به جای گلوکز به اضافه فاکتورهای رشد و بدون فاکتورهای رشد (به‌عنوان شاهد) که باکتری‌های پروبیوتیک در آن رشد کرده بودند به هر چاهک افزوده شد. به‌منظور انتشار بهتر بخش‌های فوق در محیط کشت، پلیت‌ها به مدت یک ساعت در یخچال ۴°c سرماگذاری شده، و به انکوباتور ۳۷°c منتقل شدند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، قطر هاله عدم رشد مربوط به هریک از بخش‌ها توسط خط‌کش میلی‌متری اندازه‌گیری و در جداول مربوطه ثبت گردید.

یافته‌ها

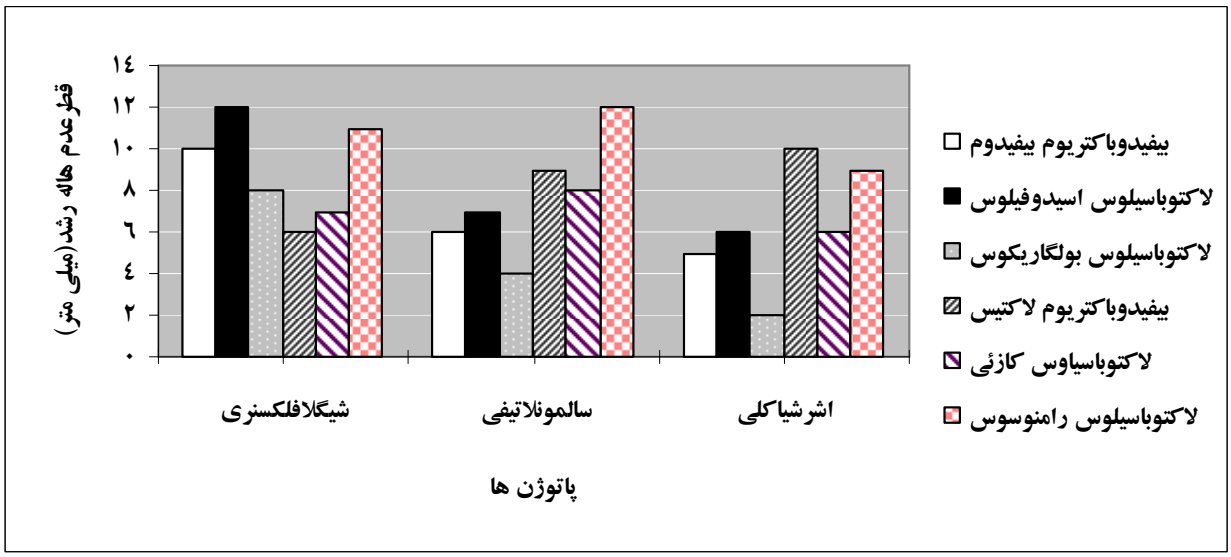
در این بررسی، فعالیت آنتاگونیستی *لاکتوباسیل‌ها* و *بیفیدوباکتریوم‌ها* در حضور سوربتیول، رافینوز و ریبوفلاوین به‌عنوان فاکتور رشد بیشتر از زمانی بود که محیط کشت پایه به تنهایی مورد استفاده قرار می‌گرفت، و در حضور این ترکیبات رشد این باکتری‌ها نیز افزایش یافت.

بیشترین فعالیت آنتاگونیستی مربوط به *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بر روی *شیگلا فلکسنری* و کمترین فعالیت ضد باکتریایی مربوط به *لاکتوباسیلوس کازئی* بر روی *سالمونلا تیفی موریوم* در حضور سوربیتول، رافینوز و ریبوفلاوین بود (نمودار شماره ۱ و ۲). محیط کشت در حضور این ترکیبات، پایین‌تر از حالت محیط کشت پایه به تنهایی بود. همچنین *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* بیشترین تأثیر را در کاهش pH محیط در اثر مصرف ترکیبات فوق و ۱٪ لاکتوز داشت (برابر ۵/۱۲، نسبت به کنترل ۶/۵۴) و کمترین تأثیر در کاهش pH مربوط به *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* (برابر ۶/۵۵، نسبت به کنترل ۶/۶۲) گزارش شد (نمودار شماره ۳ و ۴، جدول).

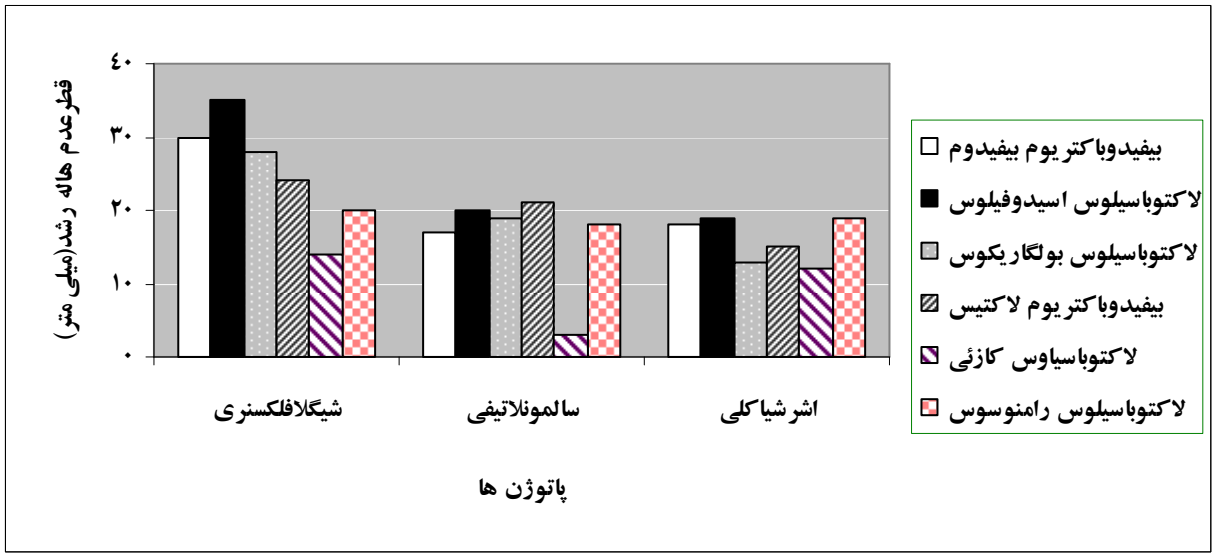


نمودار شماره ۱: مقایسه تأثیر آنتاگونیستی پروبیوتیک‌ها بر پاتوژن‌های روده‌ای در اثر رشد در محیط پایه

نمودار شماره ۲: مقایسه تأثیر آنتاگونیستی پروبیوتیک‌های مختلف بر پاتوژن‌های روده‌ای بر اثر رشد در محیط پایه بهینه‌شده



نمودار شماره ۳: مقایسه تأثیر آنتاگونیستی پروبیوتیک‌ها برپاتوژن‌های روده‌ای در اثر رشد در محیط پایه حاوی ۱٪ لاکتوز



نمودار شماره ٤: مقایسه تأثیر آنتاگونیستی پروبیوتیک‌های مختلف بر پاتوژن‌های روده‌ای بر اثر رشد در محیط بهینه‌شده حاوی ۱٪ لاکتوز

جدول: مقدار pH در محیط MRS پایه و محیط MRS همراه با فاکتورهای رشد

باکتری‌های پروبیوتیک	MRS حاوی ۱٪ لاکتوز	MRS بهینه حاوی ۱٪ لاکتوز	MRS پایه	MRS پایه بهینه‌شده
لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس	۶/۳۸	۵/۶۳	۶/۴۲	۵/۹۳
بیفیدوباکتریوم بیفیدوم	۶/۵۴	۵/۲۱	۶/۸۲	۵/۵۱
لاکتوباسیلوس بولگاریکوس	۶/۵۹	۵/۷۸	۶/۶۳	۵/۸۸
بیفیدوباکتریوم لاکتیس	۶/۶۳	۶/۰۱	۶/۷۱	۶/۱۰
لاکتوباسیلوس رامنوسوس (PTCC 1634)	۶/۶۲	۶/۵۵	۶/۸۳	۶/۷۲
لاکتوباسیلوس کازئی (PTCC 1608)	۶/۸۳	۶/۳۸	۶/۹۱	۶/۵۹

بحث

در این تحقیق اثر فاکتورهای رشد (فاکتورهای بیفیدوژنیک) بر روی فعالیت‌های ضد باکتریایی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیر گونه *بولگاریکوس*، *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* و *باکتریوم لاکتیس* و دوسویه استاندارد *لاکتوباسیلوس کازئی* (PTCC 1608)، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* (PTCC 1634) علیه پاتوژن‌های روده‌ای از جمله *اشرشیا کلی* (PTCC 1552)، *سالمونلا تیفی موریوم* (PTCC 1609) و *شیگلا فلکسنری* (PTCC 1234) بررسی شد. بسیاری از محققان اثر ضد میکروبی *لاکتوباسیل‌ها* را بر سایر میکروارگانیسم‌ها در طی سالیان طولانی بررسی کرده‌اند، تحقیقات آنها نشان داده است هنگامی که نمونه‌های *لاکتوباسیل* بر روی محیط کشت انتخابی یا اختصاصی کشت داده شود؛ قادر به تولید ترکیبات ضد میکروبی خواهد بود (۷،۶). ترکیبات تولیدشده با جرم مولکولی کم‌نظیر اسیدلاکتیک، رشد پاتوژن‌های گرم منفی را مهار می‌کند (۸). فعالیت آنتاگونیستی لاکتیک اسید باکتری‌ها از توانایی شکل اسیدی این میکروارگانیسم‌ها به‌وجود می‌آید. به‌وجود آمدن لاکتیک اسید و استیک اسید از کربوهیدرات‌ها منجر به کاهش pH شده که مانع از رشد بسیاری از پاتوژن‌ها و میکروارگانیسم‌های موجود در غذاهای آلوده می‌شود (۹). یک تحقیق دیگر با بررسی تأثیر لاکتولوز و لاکتیتول (از مشتقات لاکتوز) بر روی فعالیت ضد باکتریایی پروبیوتیک‌ها، حضور پروبیوتیک‌ها علیه رشد پاتوژن روده را نشان داد این یافته با نتایج مطالعه حاضر که در حضور ۱٪ لاکتوز و فاکتورهای رشد، اثر ضد باکتریایی بیشتر بود، مطابقت داشت (۱۰). مطالعه‌ای که توسط Klewicki و همکارانش در سال ۲۰۰۴ بر روی فعالیت ضدباکتریایی لاکتیک اسید باکتری به‌عنوان پروبیوتیک علیه پاتوژن‌های روده‌ای خانواده انتروباکتریاسه در حضور پلی‌ال‌ها و مشتقات گالاکتوزیلی آنها انجام شد، نشان داد فعالیت آنتاگونیستی در حضور کربوهیدرات‌ها از جمله Galaxylitol بیشتر شده و pH محیط کشت کاهش می‌یابد که این یافته با مطالعه حاضر همخوانی داشت. فعالیت ضد میکروبی اکثر لاکتوباسیل‌ها به‌علت تولید اسید لاکتیک است، اما مواد ضد میکروبی دیگر نظیر ترکیبات آروماتیک و مولکول‌های هتروسیلیک نیز به‌وسیله *لاکتوباسیل‌ها* تولید می‌شوند که در pH اسیدی و در حضور اسید لاکتیک بر باکتری‌های گرم منفی تأثیر می‌گذارند (۱۱). اثر بازدارندگی رشد توسط برخی از این مواد بر پاتوژن‌های مواد غذایی، میکروارگانیسم‌های فاسدکننده نظیر *لیستریاها*، *کلستریدیوم‌ها* و *انتروکوکوس‌ها*، و برخی از *باسیلوس‌ها* و *استافیلوکوکوس‌ها*، باکتریوسین‌های تولیدشده توسط *لاکتوباسیل‌ها*، پپتون‌ها یا پروتئین‌های ضد میکروبی می‌باشد که معمولاً از رشد باکتری‌های گرم مثبت جلوگیری می‌کنند (۱۳،۱۲). *لاکتوباسیل‌ها* با منشأ انسانی، اثر آنتاگونیستی بر پاتوژن‌های گوارشی روده‌ای مختلف نظیر *هلیکوباکترپیلوری*، *کلستریدیوم دیفسیل*، *کمپیلو باکترژوژنی* و *اشرشیا کلی* دارند (۱۴). تحقیقی که توسط اخوان و همکارانش در سال ۱۳۸۴ در ایران صورت گرفت، نشان داد دو پری بیوتیک رافتیلوز و رافتیلین باعث افزایش رشد *بیفیدوباکتری‌ها* و *لاکتوباسیل‌ها* شده، و فعالیت آنتاگونیستی آنها را نیز علیه پاتوژن‌های روده‌ای از جمله *شیگلا فلکسنری* و *اشرشیا کلی* و *سالمونلا تیفی موریم* افزایش می‌دهد. همچنین در این مطالعه، بیشترین اثر ضد باکتریایی بر روی *شیگلا* گزارش شد که با تحقیق حاضر مطابقت داشت. در ضمن، در این مطالعه شاهدی در نظر گرفته نشده بود، ولی در پژوهش حاضر از محیط فاقد فاکتورهای رشد به‌عنوان شاهد استفاده گردید، که فعالیت ضد باکتریایی کمتری نسبت به باکتری‌های رشد کرده در محیط بهینه‌شده با فاکتورهای رشد داشت.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد بیشترین فعالیت ضد باکتریایی مربوط به لاکتوباسیلوس *اسیدوفیلوس* بر روی *شیگلا فلکسنری* و کمترین فعالیت ضد باکتریایی مربوط به *لاکتوباسیلوس کازئی* بر روی *سالمونلا تیفی موریوم* در حضور سوربتیول، رافینوز و ریبوفلاوین به‌عنوان فاکتورهای رشد می‌باشد. تمامی باکتری‌های پروبیوتیک مورد بررسی در این مطالعه در محیط MRS پایه به اضافه فاکتورهای رشد، فعالیت ضد باکتریایی بیشتری از خود نشان دادند که نشان‌دهنده رشد بهتر در این محیط و تولید متابولیت‌های ضدمیکروبی و باکتریوسین‌ها می‌باشد. همچنین در این محیط، pH محیط کشت نسبت به محیط پایه کاهش یافت که

نشان‌دهنده تولید اسید می‌باشد. براساس این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت فاکتورهای بیفیدوژنیک و پری‌بیوتیک‌ها در کنار باکتری‌های پروبیوتیک باعث افزایش خصوصیات پروبیوتیکی می‌شود و در آینده می‌توان از این مواد در کپسوله کردن پروبیوتیک‌ها استفاده نمود.

References:

1. Ito M, Deguchi Y, Miyamaouri A, Matsumoto K, Kikuchi H, Matsumoto K. Wheat Bran Affects the Site of Fermentation of Resistant Starch and Luminal Indxnes Related to Colon Cancer Risk. J Nutr 1999;45:840-7.

2. Bouhnik Y, Flourie B, Pochart P, Gramet G, Agay-Abensour L, et al. Administration of Transgalacto-Oligosaccharides Increases Fecal Bifidobacteria and Modifies Colonic Fermentation Metabolism in Healthy Humans. J Nutr 1997;127(3):444-8.

3. Rufter J. Lactic Acid Bacteria and Cancer: Mechanistic Perspective. J Nutrition 2002;88(Suppl 1):589-594.

4. Luo J, Rizkalla SW, Alamowitch C, Boussairi A, Blayo A, et al. Chronic Consumption of Short Chain Fracto-Oligosaccharides By Healthy Subjects Decreased Basal Hepatic Glucose Production But Had no Effect on Insulin-Stimulated Glucose Metabolism. Am J Clin Nutr 1999;63(6):939-45.

5. Kandler O. Carbohydrate Metabolism in Lactic Acid Bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek 1983;49(3):209-224.

6. Hamdan IY, Mikolajecik EM. Acidolin: An Antibiotic Produced by Lactobacillus Acidophilus. J Antibiot 1974;27(8):631-636.

7. Shahani JR, Kilara A. Natural Activity of Lactobacillus Acidophilus and L. Bulgaricus Π Isolation of Acidophilin from L. Acidophilus. Cultured Dairy Product J 1977;2:8-11.

8. Aroutcheva AA, Simoes JA, Sebastian F. Antimicrobial Protein Produced by Vaginal Lactobacillus Acidophilus that Inhibits Gardnerlla Vaginalis. Infect Dis Obstet Gynecol 2001;9(1):33-39.

9. Reddy BS, Rivenson A. Inhibitory Effect of Bifidobacterium Longum on Colon, Mammary, and Liver Carciuogenesis Induced by 2-amino-3-Methylimidazo [4,5-f] Quinoline, a Food Mutagen. Cancer Res 1993;53(17):3914-3918.

10. Kontula P, Suihko ML, Von Wringht A, et al. The Effect of Lactose Derivatives on Intestinal Lactic Acid Bacteria. J Dairy Sci 1999;82(2):249-256.

11. Klewicki R, Klewicka E. Antagonistic Activity of Lactic Acid Bacteria as Probiotics Against Selected Bacteria of the Enterobacteriacae Family in the Presence Polyols and Their Galactosyl Derivertives. Biotechnology Letters 2004;26(4):317-320.

12. Ennahar S, Deachamrs N. Anti-Listeria Effect of Enterocin: A Produced by Cheese-Isolated Enterococcus Faecium Relative to Other Bacteriocins Form Lactic acid Bacteria. J Appl Microbiol 2008;88(3):449-457.

13. Lue De Vuyst. Functionality of Novel Starter Cultures in Traditional Fermentation Process. Microbial 1995;47:1-7.

14. Strus M. A New Method for Testing Antagonistic Activity of Lactic Acid Bacteria (LAB) on Selected Phathogenic Indicator Bacteria. Med Dosw Microbiol 1998;50:123-130.