DOI: 10.22092/VJ.2020.351419.1751
شماره ۱۳۳ زمستان ۱۴۰۰
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

بررسی فعالیت آنتاگونیستی لاکتوباسیل های جدا شده از شیر و ماست گاومیش علیه بعضی از پاتوژن های غذایی در استان گلستان

• **روژین احمدی لیوانی**
گروه میکروبیولوژي، دانشکدهٔ علوم زیستی، واحد گرگان، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان، ایران
• **آنیا آهنی آذری (نویسنده مسئول)**
گروه میکروبیولوژي، دانشکدهٔ علوم زیستی، واحد گرگان، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان، ایران
• **هادی کوهساری**
گروه میکروبیولوژی، واحد آزادشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آزادشهر، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹-۰۵-۱۷ تاریخ پذیرش:۱۳۹۹-۰۷-۰۵
Email: ania_783@yahoo.com

چکیده

لاکتیک اسید باکتری‌ها که به مقدار زیاد در فرآورده‌های لبنی یافت می‌شوند، علیه بسیاری از میکروارگانیسم‌های پاتوژن فعالیت آنتاگونیستی دارند. در این مطالعه اثر مهاری سویه های لاکتوباسیلوس جدا شده از شیر و ماست گاومیش در شهرستان بندرگز واقع در استان گلستان بررسی شد. نمونه‌های شیر خام و ماست پس از کشت در محیط MRS تحت شرایط بی‌هوازی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. کلنی‌های مشکوک بر اساس رنگ‌آمیزی گرم و آزمایش‌های بیوشیمیایی افتراقی شناسایی شدند. سپس فعالیت ضدباکتریایی محلول رویی استخراج شده از سویه‌های لاکتوباسیلوس با استفاده از روش انتشار در آگار علیه ۵ سویه استاندارد شامل *Vibrio* ATCC 17802، *Salmonella typhimurium* ATCC 14028، *Shigella flexneri* ATCC 12022، *Escherichia coli* ATCC 11303 *paraheamolyticus* و *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 بررسی شد. در مجموع ۱۰ سویه لاکتوباسیلوس شامل سویه‌های *Lactobacillus casei*، *Lactobacillus plantarum* و *Lactobacillus acidophilus* جدا شدند. در بین جدایه‌ها *L. plantarum* A1 اثر مهاری خوبی در برابر *E. coli* ، *S.aureus* و *S.flexneri* از خود نشان داد اما در برابر *V. paraheamolyticus* و *S. typhimurium* اثر مهارکنندگی نداشت. تنها جدایه‌ای که اثر مهاری روی *V. paraheamolyticus* داشت، جدایه *L. acidophilus R1* بود. نتایج این مطالعه نشان داد که لاکتوباسیل‌های جدا شده از شیر و ماست گاومیش علیه بعضی از پاتوژن‌های غذایی اثر مهاری دارند و می‌توانند از گزینه‌های مطرح برای کنترل این عوامل در محصولات غذایی باشند.

کلمات کلیدی: پاتوژن‌ها، گاومیش، لاکتوباسیل، مهارکنندگی

Veterinary Researches & Biological Products No 133 pp: 121-127

Antagonistic Activity of *Lactobacilli* Isolated from Buffalo Milk and Yogurt against Some Food Pathogens in Golestan province

By: Ahmadi Liwani, R., Department of Microbiology, Gorgan Branch, Islamic Azad University, Gorgan, Iran. Ahani Azari, A., (Corresponding Author) Department of Microbiology, Gorgan Branch, Islamic Azad University, Gorgan, Iran. and Koohsari, H., Department of Microbiology, Azadshahr branch, Islamic Azad University, Azadshahr, Iran.

Received:2020-08-07 Accepted: 2020-09-26

Email: ania_783@yahoo.com

Lactic acid bacteria which are found in large amounts in dairy products, have antagonistic activity against many pathogenic microorganisms. In this study, the inhibitory effect of *Lactobacillus* strains isolated from buffalo milk and yogurt in Bandar Gaz city was investigated. Raw milk and yogurt samples were cultivated on MRS medium, incubating anaerobically at 37°C for 48 h. The suspected colonies were identified on the basis of Gram's staining and biochemical tests. The antibacterial activity of the cell-free supernatant extracted from *Lactobacillus* strains was determined using the agar well diffusion method against standard strains including *Shigella flexneri* ATCC 12022 ، *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 ، *Vibrio paraheamolyticus* ATCC 17802 ، *Escherichia coli* ATCC 11303 and *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. A total 10 *Lactobacillus* strains were identified as *L. plantarum*, *L. casei*, *L. acidophilus*. The cell-free supernatant of *L. plantarum A1* had a relatively strong inhibitory effect against *S. aureus* and a moderate inhibitory effect against *E. coli* and *S. flexneri*, while no inhibitory effect on *V. paraheamolyticus* and *S. typhimurium* growth. L. *casei B1* showed a moderate inhibitory effect against *S. flexneri* and *S. aureus*. The supernatant of *L. acidophilus R1* vs. *S. aureus* showed a moderate inhibitory effect and had an inhibitory effect on *V. paraheamolyticus*. The results of this study showed that *Lactobacilli* isolates had good inhibitory activity against some food pathogens, therefore further studies on their use as biopreservatives to prevent the survival and proliferation of microorganisms in food products are recommended.

Key words: *Pathogens, Buffalo, Lactobacilli, Inhibitory*

مقدمه

در سال‌های اخیر، با افزایش شیوع بیماری‌های ناشی از مواد غذایی نگرانی‌هایی در زمینه سلامت و بهداشت مواد غذایی به وجود آمده است. از طرفی استفاده بیش از حد و نادرست از آنتی‌بیوتیک ها منجر به پیدایش و افزایش باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک شده است. بنابراین، یافتن مواد ضدباکتری جدید و بی‌خطر به عنوان جایگزینی برای آنتی‌بیوتیک‌ها ضروری به نظر می‌رسد. علاوه بر این، تقاضای مصرف‌کنندگان برای استفاده از مواد نگهدارنده طبیعی به جای مواد نگهدارنده شیمیایی برای داشتن محصولات غذایی سالم روز به روز در حال افزایش است (۲۷، ۱۵).

امروزه تمایل به استفاده از مواد نگهدارنده طبیعی در مواد غذایی سبب شده است که باکتری‌های اسید لاکتیک (LAB) به دلیل تولید متابولیت‌های دارای فعالیت ضدمیکروبی مورد توجه بسیاری از محققان قرار بگیرند (۴). مطالعات انجام شده در این خصوص تائیدکننده نقش مثبت این باکتری‌ها در مهار عوامل بیماری‌زاست (۱۶). این باکتری‌ها کوکسی‌ها یا باسیل‌های گرم مثبت بدون اسپور و کاتالاز منفی هستند که از تخمیر کربوهیدرات‌ها اسید لاکتیک تولید کرده و pH را کاهش می‌دهند (۴). لاکتوباسیلوس یکی از مهم‌ترین جنس‌های LAB است. اولین بار لاکتوباسیلوس‌ها از شیر جداسازي شدند. امروزه حضور آن‌ها در غذاهاي تخميري مختلف، گوشت، سبزیجات، انواع نوشیدنی‌ها و شیرینی جات نیز اثبات شده است. از LAB به عنوان استارتر در تخمیر به خصوص برای فرآورده‌های لبنی استفاده می‌شود که علاوه بر تولید اسید لاکتیک، در تشکیل بافت، طعم و بوی مطبوع نیز اثرات مطلوبی دارند (۶). همچنین ترکیبات مختلفی مانند دی استیل، هیدروژن پراکسید، استالدئید، اسیدهای آلی، باکتریوسین و مواد شبه باکتریوسین نیز تولید می‌کنند. البته اثرات ضدباکتریایی آن‌ها به کاهش pH و رقابت در منابع مغذی نیز نسبت داده شده است (۲۸). بنابراین، مطالعات مربوط به خاصیت ضدباکتریایی این ارگانیسم‌ها برای پیشگیری، کنترل و درمان بیماری‌ها و حفظ سلامتی بسیار مورد توجه قرار گرفته است (۱). در ۲۰ سال گذشته، اثر آنتاگونیستی LAB در برابر بسیاری از میکروارگانیسم‌ها از جمله پاتوژن‌های غذایی و میکروارگانیسم‌های مولد فساد گزارش شده است (۲۷، ۱۵).

LAB در شیر و فرآورده‌های لبنی فراوان هستند و به عنوان یک منبع مهم پروتئینی توسط بسیاری از مردم مصرف می‌شوند (۶). در بین آن‌ها مصرف شیر گاو، گوسفند و بز در ایران رایج‌تر است. مصرف شیر گاومیش و ماست سنتی تهیه شده از آن بیشتر در مناطق روستایی کشور رواج دارد (۱۰). در مقایسه با شیرهای گاو، گوسفند یا بز، شیر گاومیش از کلسترول کمتر و کلسیم بیشتری برخوردار است. علاوه بر محتوای مغذی آن، منبع متابولیت ضدمیکروبی مانند اسید لاکتیک و باکتریوسین نیز هست (۶) اما در کشور ما اکثر پروژه‌های تحقیقاتی بر روی شناسایی LAB در محصولات لبنی گاو و فعالیت‌های ضدباکتریایی آن‌ها متمرکز شده است و محصولات لبنی گاومیش کمتر مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. از طرفی مشخص شده است که میکروفلور محصولات لبنی در مناطق مختلف با توجه به شرایط تغذیه‌ای، فصلی و سایر عوامل محیطی متفاوت هستند (۲۰)، در نتیجه شناسایی LAB در شیر و محصولات لبنی سنتی در هر منطقه جغرافیایی منطقی به نظر می‌رسد. لذا هدف از این مطالعه جداسازی و شناسایی گونه‌های مختلف لاکتوباسیلوس از شیر و ماست گاومیش جمع‌آوری شده از مناطق روستایی شهرستان بندرگز، استان گلستان، و تعیین فعالیت ضدباکتریایی محلول رویی آن‌ها در برابر برخی از پاتوژن‌های غذایی در شرایط آزمایشگاهی بود.

مواد و روش‌ها

جداسازی و شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک

این مطالعه به صورت توصیفی- مقطعی از اردیبهشت تا خرداد سال ۱۳۹۶ به منظور بررسی اثر مهاری محلول رویی سویه‌های لاکتوباسیلوس جدا شده از شیر و ماست گاومیش در مناطق روستایی بندر گز واقع در استان گلستان انجام شد. نمونه‌های شیر خام و ماست در لوله‌های سرپیچ‌دار استریل جمع‌آوری و در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل شدند. ۱۰ گرم نمونه ماست و ۱۰ میلی‌لیتر نمونه شیر به ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول پپتون فیزیولوژیکی (PPS) انتقال داده شد. پس از تکان دادن به مدت حدود نیم ساعت ، ۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون آماده شده به ۲۰۰ میلی‌لیتر MRS براث (کاندا پرونادیسا، اسپانیا) منتقل شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. سپس ۱۰ میلی‌لیتر از MRS براث در بافر PBS (بافر نمکی فسفات با pH= ۳) تلقیح شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت و نیم گرماگذاری شد. سپس سلول‌ها با سانتریفوژ با دور g ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه رسوب داده شده و پس از انتقال به MRS براث برای غنی‌سازی به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت سلول‌ها تا ده برابر با سرم فیزیولوژی استریل رقیق شده و ۱ میلی‌لیتر از هر رقت در MRS آگار (کاندا پرونادیسا، اسپانیا) به صورت آمیخته کشت داده شد، پلیت‌ها به روش بی‌هوازی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت گرماگذاری شدند. کلنی‌هایی که از نظر مورفولوژیکی ظاهری متفاوت داشتند جدا شده و در محیط MRS آگار جدا و خالص‌سازی شدند. سپس کلنی‌ها بر اساس رنگ‌آمیزی گرم، تست‌های بیوشیمیایی، تخمیر قندها، توانایی رشد در دماهای ۱۰ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد و در حضور ۶/۵ درصد NaCl شناسایی شدند (۲۱، ۶).

جدول ۱- شناسایی لاکتوباسیل ها بر اساس تخمیر قند و شرایط رشدی مختلف.

جدایه ها	مانیتول	رامنوز	سوربیتول	سوکروز	مالتوز	لاکتوز	رافینوز	فروکتوز	گالاکتوز	رشد در ۶/۵ درصد نمک	رشد در ۴۵ درجه	رشد در ۱۰ درجه
L. acidophilus	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+
L. casei	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
L. plantarum	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

سنجش فعالیت ضدباکتریایی به روش چاهک

فعالیت ضدباکتریایی مایع‌رویی هر یک از جدایه‌های لاکتوباسیلوس در برابر سویه‌های استاندارد با استفاده از روش انتشار چاهک مورد بررسی قرار گرفت (۱۲). در این روش کلنی‌های جدایه‌ها در MRS براث تلقیح شده و به مدت ۴۸ ساعت در ۱۵۰ دور در دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. پس از گرماگذاری، محیط براث به مدت ۱۵ دقیقه با دور g ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ شد و مایع‌رویی با عبور از فیلترهای میلی‌پور ۰/۴۵ میکرون استریل شد. سویه‌های استاندارد مورد استفاده در این مطالعه شامل *Salmonella* ATCC 14028، *Shigella flexneri* ATCC 12022، *Vibrio paraheamolyticus* ATCC 17802، typhimurium ، *Escherichia* coli ATCC 11303 و *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (تهیه شده توسط دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران) بودند. ۵۰ میکرولیتر از مایع‌رویی عاری از سلول در چاهک‌های با قطر ۵ میلی‌متر در نوترینت آگار کشت داده شده با سویه‌های مورد آزمایش ریخته شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. بر اساس قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر) که در اطراف چاهک‌ها ایجاد شد، فعالیت ضد باکتریایی تخمین زده شد (۴، ۶). هاله عدم رشد <۱۵ میلی‌متر و ≤ ۱۵ میلی‌متر به ترتیب فعالیت متوسط و نسبتاً قوی در نظر گرفته شد (۱۴). این آزمایش سه بار تکرار انجام شد و میانگین قطر هاله‌ها ثبت شد.

تعیین مکانیسم مهارکنندگی

برای مشخص نمودن مکانیسم فعالیت مهارکنندگی جدایه‌ها، pH مایع رویی عاری از سلول اندازه‌گیری شد و با استفاده از NaOH (مرک ، آلمان، ۲/۵ مولار) روی ۶/۵ تنظیم شد. سپس کاتالاز (۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، سیگما-آلدریش، آلمان) اضافه گردید و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت گرماگذاری شد. فعالیت ضدمیکروبی مایع‌رویی با استفاده از روش انتشار چاهک مورد بررسی قرار گرفت (۲).

نتایج

در مجموع ۱۰ سویه لاکتوباسیلوس از ۱۰ نمونه شیر و ماست (شامل ۶ نمونه شیر و ۴ نمونه ماست) با کلنی‌های سفید و خامه‌ای شکل روی MRS آگار جدا شدند. برای شناسایی جدایه‌ها از خصوصیات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی استفاده شد (جدول ۱). همه جدایه‌ها گرم مثبت و میله‌ای شکل بودند. براساس نتایج حاصل از تخمیر قندها و شرایط رشدی مختلف، همان طور که در جدول ۲ نشان داده شده است ، در این مطالعه جدایه‌های *L. plantarum* از نمونه‌های شیر گاومیش، جدایه‌های *L. casei* از نمونه‌های ماست گاومیش و جدایه‌های *L. acidophilus* از هر دو نمونه جدا شدند.

با توجه به نتایج آزمون فعالیت ضدباکتریایی، محلول رویی *L. plantarum* A1 اثر مهاری نسبتاً قوی در برابر *S. aureus* و اثر مهاری متوسط در برابر *E. coli* و *flexneri.S* داشت در حالی که هیچ گونه اثر مهاری بر رشد *V. paraheamolyticus* و *S. typhimurium* از خود نشان نداد. *L. casei* B1 اثر مهاری متوسطی در برابر *S.flexneri* و *S. aureus* از خود نشان داد و در اطراف *V. paraheamolyticus* هاله عدم رشدی ایجاد نکرد. محلول رویی *L. acidophilus* R1 در برابر *S. aureus* اثر مهاری متوسطی از خود نشان داد در حالی که روی سایر ارگانیسم‌های مورد آزمایش تاثیر کمتر اما یکسانی داشت. در بین جدایه‌ها فقط این جدایه روی *V. paraheamolyticus* اثر مهارکنندگی داشت.

به طورکلی، این جدایه‌ها بیشترین و کمترین فعالیت مهارکنندگی را به ترتیب نسبت به سویه‌های *S.aureus* و*V. paraheamolyticus* از خود نشان دادند. میانگین قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر) در جدول ۳ آورده شده است. پس از تنظیم pH مایع رویی روی ۶/۵ و افزودن کاتالاز اثر مهاری جدایه‌ها از بین رفت که نشان‌دهنده این است که اثر مهاری تحت تاثیر تولید اسیدهای آلی (کاهش pH) یا پراکسید ئیدروژن بوده است.

بحث

میکروفلور محصولات لبنی در مناطق مختلف با توجه به شرایط تغذیه‌ای، فصلی و سایر عوامل محیطی متفاوت هستند (۱۸)، در نتیجه شناسایی LAB در شیر و محصولات لبنی سنتی در هر منطقه جغرافیایی منطقی به نظر می‌رسد. لذا هدف از این مطالعه جداسازی و شناسایی گونه‌های مختلف لاکتوباسیلوس از شیر و ماست گاومیش جمع‌آوری شده از مناطق روستایی شهرستان بندرگز، استان گلستان، و تعیین فعالیت ضد باکتریایی محلول رویی آن‌ها در برابر برخی از پاتوژن‌های غذایی در شرایط آزمایشگاهی بود. مطالعات مشابه این تحقیق در داخل و خارج کشور انجام شده است اما تعداد کمی از آن‌ها به شناسایی LAB در

جدول ۲-لاکتوباسیل های مختلف جدا شده از نمونه های شیر و ماست.

جدایه ها	ماست	شیر
L. plantarum	-	۴
L. casei	۲	-
L. acidophilus	۲	۲
مجموع	۴	۶

محصولات لبنی گاومیش و فعالیت‌های ضدباکتریایی آن‌ها پرداخته‌اند.
در یک مطالعه در بنگلادش، Forhad و همکاران (۶) چهار جدایه از جمله *L. acidophilus*، *L. casei*، *L. fermentum* و *Bifidobacterium longum* از شیر گاومیش جدا کردند. Eid و همکاران (۴) نیز *L. fermentum*، *L. acidophilus* و *L. pentosus* را از شیر گاومیش جدا کردند که در بین آن‌ها L. pentosus بیشترین فعالیت ضدباکتریایی را در برابر ارگانیسم‌های مورد آزمایش نشان داد. در یک تحقیق دیگر، Chowdhury و همکاران (۱) چهار سویه از *L. plantarum* جدا کردند که رشد پاتوژن‌های مورد مطالعه را تا حدی مهار می‌کردند اما بیشترین و کمترین منطقهٔ مهار به ترتیب در مقابل باسیلوس سرئوس و استافیلوکوکوس اورئوس مشاهده شد. در مطالعه Naeemi و همکاران (۲۲) *L. plantarum* فراوان‌ترین باکتری اسید لاکتیک جدا شده از آغوز گاو بود که بیشترین فعالیت ضدباکتریایی را در برابر ارگانیسم‌های آزمایش نشان داد. در مطالعه کوهساری و همکاران (۱۸) *L. casei* و به دنبال آن *L. acidophilus* بیشترین فراوانی را در محصولات لبنی سنتی در گرگان داشتند. در یک مطالعه مشابه در جهرم، *L. acidophilus*، *L. casei* و *L. plantarum* شایع‌ترین لاکتوباسیل‌ها بودند (۳).
فرح بخش و همکاران (۵) فعالیت ضدباکتریایی لاکتوباسیل‌های جدا شده از ماست سنتی را در رفسنجان بررسی کردند. در بین جدایه‌ها، بیشترین فعالیت ضدباکتریایی مربوط به *L. plantarum* بود. در یک مطالعه انجام شده توسط حسین علیپور و همکاران (۱۰) *L. salivarius* جدا شده از شیر گاومیش به ترتیب بیشترین و کمترین اثر مهاری را روی *S. aureus* و *S. typhimurium* داشت. Rahimpour Hesari و همکاران (۲۲) فعالیت آنتاگونیستی LAB جدا شده از محصولات لبنی سنتی را علیه *E. coli* O157: H7 بررسی کردند. این جدایه‌ها شامل *L. plantarum* و *L. fermentum* بودند و *L. plantarum* فعالیت آنتاگونیستی بیشتری نسبت به *L. fermentum* داشت. یک مطالعه در نپال اثر ضدباکتریایی لاکتوباسیل‌های جدا شده از لبنیات را علیه *Salmonella*، *E. coli*، *S. aureus*، *Pseudomonas spp.*، *Salmonella typhi paratyphi* و *Acinetobacter* و *Proteus. spp* نشان داد در حالی که این جدایه‌ها روی *Klebsiella pneumoniae* و *Shigella spp* هیچ اثر مهاری نداشتند (۲۳).
در مطالعه‌ای در اهواز، لاکتوباسیل‌های جدا شده از نمونه‌های لبنی سنتی شامل *L. sake*، L. *alimentarius* و *L. collinoides* اثر مهارکنندگی در برابر *Bacillus subtilis* ATCC 12711، *S. aureus* ATCC 6538 و *P. aeruginosa* ATCC 27853 از خود نشان دادند. دو جدایه *L. collinoides* و *L. alimentarius* فعالیت مهاری نسبتاً قوی (منطقه مهار≤۱۵) به ترتیب در مقابل *P. aeruginosa* و *B. subtilis* داشتند(۱۲).
Iranmanesh و همکاران (۱۱) LAB را از شیر گوسفند، ماست سنتی و کره ترش جدا کردند. در میان جدایه‌ها، *Pediococcus acidilactici* فعالیت ضدباکتریایی خوبی در برابر *S. aureus*، *L. monocytogenes* و *Salmonella enteritidis* داشت.
در یک مطالعه توسط Slozilova و همکاران (۲۶) فعالیت ضدلیستریایی شش سویه از LAB (Lactococcus lactis subsp. lactis CCDM 416 و *L. plantarum* HV 11، NIZO R5 و DC 1246، P. acidilactici HV 12 و (Enterococcus mundtii CCM 1282 و یک استارتر (DELVO-ADD 100-X DSF) مورد بررسی قرار گرفت. این سویه‌ها حداقل در مهار یکی از سویه‌های مورد مطالعه *L. monocytogenes* مؤثر بودند. در مطالعه دیگری، *L. plantarum* و *Lactococcus piscium* شایع‌ترین ایزوله‌های پروبیوتیکی جدا شده از شیر

جدول ۳ - میانگین قطر هاله عدم رشد (میلی متر) ناشی از محلول رویی بدون سلول جدایه های لاکتوباسیلوس.

جدایه ها	*S. typhimurium*	*S.flexneri*	*V. paraheamolyticus*	*S. aureus*	*E. coli*
L. plantarum A1	-	۱۲	-	۱۶/۲	۱۲/۳
L. plantarum A2	-	۱۱/۲	-	۱۱	-
L. plantarum A3	۹/۲	۹/۸	-	۱۲/۳	۱۰/۵
L. plantarum A4	۸/۲	-	-	۱۰/۳	۱۱/۲
L. casei B1	۹	۱۱	-	۱۱	۹
L. casei B2	۷/۸	۱۰	-	۱۱	۹/۸
L. acidophilus R1	۱۰	۱۰	۱۰	۱۱/۵	۱۰/۳
L. acidophilus R2	-	۱۰/۴	-	۱۰/۳	-
L. acidophilus R3	۶/۸	-	-	۱۱/۲	۹/۲
L. acidophilus R4	-	۱۰/۳	-	۱۱/۳	-

بز بودند اما *L. lactis* بیشترین اثرات مهاری را علیه اسینتوباکتر بومنی مقاوم به دارو از خود نشان داد (۷). Sikarchi و همکاران (۲۴) اثر مهاری باکتری‌های پروبیوتیکی جدا شده از شیر شتر را بر روی جدایه های بالینی *Helicobacter pylori* مقاوم به دارو بررسی کردند. در بین جدایه‌ها، *L. plantarum* بیشترین فراوانی را داشت و *L. fermentum*، *L. plantarum* و *L. casei* اثر مهاری خوبی در برابر جدایه‌های *H. pylori* از خود نشان دادند، اما *L. plantarum* بیشترین اثر مهاری را داشت.

تحقیقی در پاکستان در مورد اثر ضدباکتریایی LAB در برابر پاتوژن‌های ادراری مقاوم به چند دارو *P. aeruginosa*، *Candida albicans*، *Enterococcus fecalis*، *K.pneumoniae* و *E. coli* انجام شد. قطر هاله عدم رشد در اطراف همه یوروپاتوژن‌های مورد آزمایش بیش از ۱۰ میلی‌متر بود، در حالی که *L. fermentum* و *L. plantarum* فعالیت مهاری قابل توجهی در برابر *E. coli* و *E. faecalis* از خود نشان دادند (۲۰). در یک مطالعه، در بین جدایه‌های LAB از ماست *L. casei* و *L. lactis* اثر مهاری بهتری علیه باکتری‌های بیماری‌زا داشتند. این جدایه‌ها بیشترین و کمترین اثر مهاری را علیه *Yersinia enterocolitica* و *B. cereus* از خود نشان دادند (۱۷). کاظمی درسنکی و همکاران (۱۶) شش LAB را از ماست و قرص‌های پروبیوتیکی جدا کردند. بیشترین فعالیت ضدباکتریایی در برابر *B. cereus* توسط *L. acidophilus* مشاهده شد. در تحقیقی در مصر، *Lactobacills paracasei* و *L. helveticus* و به دنبال آن *L. fermentum* بیشترین فعالیت آنتاگونیستی را در برابر پاتوژن‌های مورد آزمایش از خود نشان دادند، در حالی که *Bifidobacterium longum* و *L lactis subsp lactis* نسبت به سویه‌هاي مورد آزمایش فعالیت ضعیف و یا هیچگونه فعالیتي نشان ندادند (۸).

در مطالعه حاضر، وقتی pH مایع رویی لاکتوباسیل‌ها روی ۶/۵ تنظیم شد و تحت تاثیر کاتالاز قرار گرفت اثر مهاری از بین رفت. این نتایج حاکی از آن است تولید ترکیبات شبه باکتریوسینی در فعالیت ضدمیکروبی آن‌ها نقشی نداشته‌اند. مطالعات گذشته نیز نقش مکانیسم‌های وابسته به pH را در فعالیت ضدمیکروبی سویه‌های لاکتوباسیلوس نشان داده‌اند (۱۳، ۲۵، ۲۹).

با توجه به نتایج کلیه مطالعات انجام شده و مطالعه حاضر، LAB جدا شده از محصولات لبنی دارای فعالیت مهاری علیه پاتوژن‌های گرم مثبت و گرم منفی هستند و در بین آن‌ها لاکتوباسیل‌ها فعالیت آنتاگونیستی خوبی در برابر مهم‌ترین عوامل بیماری‌زا از خود نشان داده‌اند. از این رو، این باکتری‌ها از پتانسیل بالایی برای استفاده در صنایع غذایی برای جلوگیری از رشد پاتوژن‌ها در محصولات غذایی و کنترل بیماری‌ها برخوردار هستند.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که لاکتوباسیل‌های جدا شده از شیر و ماست گاومیش فعالیت مهاری خوبی علیه بعضی از پاتوژن‌های غذایی دارند و می‌توانند از گزینه‌های مطرح برای کنترل این عوامل در محصولات غذایی باشند. لذا انجام مطالعات بیشتر در خصوص استفاده از آن‌ها به عنوان نگهدارنده‌های طبیعی به منظور افزایش ماندگاری مواد غذایی توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر مستخرج از پایان‌نامه سرکارخانم روژین احمدی‌لیوانی براي دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشتهٔ میکروبیولوژي از دانشگاه آزاد اسلامی گرگان می‌باشد. محققین این مطالعه برخود لازم می‌دانند از مسئولین آزمایشگاه که نهایت همکاري را با ما داشته‌اند صمیمانه تشکر به عمل آورند.

منابع مورد استفاده

1-Chowdhury, A., Md.N. Hossain, NJ. Mostazir, Md. Fakruddin, M. Billah, et al.2012. Screening of *Lactobacillus* spp. from Buffalo Yoghurt for Probiotic and Antibacterial Activity. *Journal of Bacteriology and Parasitology* 3: 3-8.

2-Davoodabadi, A., MM. Soltan Dallal, E. Lashani, M. Tajabadi Ebrahimi. 2015. Antimicrobial Activity of *Lactobacillus* spp. Isolated From Fecal Flora of Healthy Breast-Fed Infants against Diarrheagenic Escherichia coli. *Jundishapur Journal of Microbiology* 8(12):1-6.

3-Dorri, K., N. Namdar, V. Hemayatkhah Jahromi. 2013. Isolation of *Lactobacilli* from Dairy Products and Their Effects on the Main Pathogenic Bacteria in Stomach and Intestine. *Medical Laboratory Journal* 7: 21-29.

4-Eid, R., J. El Jakee, A. Rashidy, H. Asfour, S. Omara, MM. Kandil, Z. Mahmood, J. Hahne, AA. Seida. 2016. Potential Antimicrobial Activities of Probiotic Lactobacillus Strains Isolated from Raw Milk. *Journal of Probiotics & Health* 4: 1-8.

5-Farahbakhsh, M., H. Hakimi, R. Bahram Abadi. 2013. Survey on Isolation of Probiotic Lactobacilli from Traditional Yogurts Produced in Rural Areas of Rafsanjan and their Antimicrobial Effects. *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences* 12: 733-46.

6-Forhad, M. H., S.M. Khaledur Rahman, Md. Shahedur Rahman, F. Karim Saikot, K. Chandra Biswas. 2015. Probiotic Properties Analysis of Isolated Lactic Acid Bacteria from Buffalo Milk. *Archives of Clinical Microbiology* 7: 1-6.

7-Fozouni, L., M. Yaghoobpour, A. Ahani Azari. 2019. Probiotics in Goat Milk: A Promising Solution for Management of Drug-Resistant Acinetobacter baumannii. *Jorjani Biomedicine Journal* 7: 31-38.

8-Gad, S.A., R.M.A. El-Baky, A.B. F. Ahmed, G.F.M. 2016. Gad. In vitro evaluation of probiotic potential of five lactic acid bacteria and their antimicrobial activity against some enteric and food-borne pathogens. *African Journal of Microbiology Research* 10: 400-409.

9-González, L., H. Sandoval, N. Sacristán, JM. Castro, JM. Fresno, ME. Tornadijo. 2007. Identification of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese throughout ripening and study of their anti-

microbial activity. *Food Control* 18(6):716-22.

10-Hossein Alipour, E., K. Mardani, M. Moradi. 2018. Isolation and Identification of *Lactobacillus* salivarius from Buffalo Milk and Evaluation of Its Antimicrobial Activity. Iran. *Iranian Journal of Medical Microbiology* 12: 96-106.

11-Iranmanesh, M., H. Ezzatpanah, N. Mojgani, MA. Karimi Torshizi, M. Aminafshar, M. Maohamadi. 2012. Isolation of Lactic Acid Bacteria from Ewe Milk, Traditional Yoghurt and Sour Buttermilk in Iran. *European Journal of Food Research & Review* 2: 79-92.

12-Ivanova, I., P. Kabadjova, A. Pantev, S. Danova, X. Dousset. 2000. Detection, purification and partial characterization of a novel bacteriocin substance produced by Lactococcus lactis subsp. lactis b14 isolated from Boza- Bulgarian traditional cereal beverage. *Biocatalysis* 41: 47-53.

13-Juárez Tomás, MS., CI. Saralegui Duhart, PR. De Gregorio, E. Vera Pingitore, ME. Nader-Macías. 2011. Urogenital pathogen inhibition and compatibility between vaginal *Lactobacillus* strains to be considered as probiotic candidates. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 159(2):399-406.

14-Karami, S., M. Roayaei, H. Hamzavi, M. Bahmani, H. Hassanzad-Azar, L. Mahmoodnia, M. Rafieian-Kopaei. 2017. Isolation and identification of probiotic *Lactobacillus* from local dairy and evaluating their antagonistic effect on pathogens. *International Journal of Pharmaceutical Investigation* 7: 137–141.

15-Kasra-Kermanshahi, R. and Mobarak-Qamsari, E. 2015. Inhibition Effect of Lactic Acid Bacteria against Food Born Pathogen, Listeria monocytogenes. Applied Food Biotechnology 2: 11-19.

16-Kazemi Darsnaki, R., N. Ghaemi, M. Mirpour. 2010. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from probiotic products (*Lactobacillus* and *Bifidobacterium*). *Journal of Microbial Biotechnology Islamic Azad University* 2: 29-36.

17-Kiai, A., N. Amir Mozaffari, H. Sami Al-Adab, N. Jandaghi, A. Ghaemi. 2006. Antagonistic effect of lactic acid bacteria isolated from yogurt against pathogenic bacteria. *Journal of Gorgan University of Medical Sciences* 8(1): 33 - 28.

18-Koohsari, H., Z. Rashti, S. Arab. 2019. The Isolation of lactic acid bacteria from local dairy products of Gorgan town with the ability to inhibit the growth of some gastrointestinal pathogens. *Journal of Food Microbiology* 6: 22 – 36.

19-Manzoor, A., I. Ul-Haq, SH. Baig, J. Iqbal Qazi, S. Seratlic. 2016. Efficacy of Locally Isolated Lactic Acid Bacteria against Antibiotic-Resistant Uropathogens. Jundishapur *Journal of Microbiology* 9: 1-11.

20-Naeemi, Z., H. Koohsari, H.R. Pordeli. 2019. Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potential from bovine colostrum in livestock farms of Ramian Township in located in the north of Iran. *International Journal of Molecular and Clinical Microbiology* 9: 1097-1107.

21-Narimani, T., A. Tari Nejad. 2014. Isolation and biochemical and molecular identification of probiotic bacteria from traditional buffalo milk and yogurt of Khoy city. *Journal of Food Research* 42 (3): 349-335.

22-Rahimpour Hesari, M., R. Kazemi Darsanaki, A. Salehzadeh. 2017. Antagonistic Activity of Probiotic Bacteria Isolated from Traditional Dairy Products against *E. coli* O157:H7. *Journal of Medical Bacteriology* 6: 23-30.

23-Saud, B., P. Pandey, G. Paudel, G. Dhungana G, V. Shrestha. 2020. In-vitro Antibacterial Activity of Probiotic against Human Multidrug Resistant Pathogens. *Archives of Veterinary Science and Medicine* 3: 31-39.

24-Sikarchi, A., L. Fozouni. 2018. Inhibitory Effect of Probiotic Bacteria Isolated from Camel Milk on Clinical Strains of Drug-Resistant Helicobacter pylori. Medical Laboratory Journal 12: 20-26.

25-Servin, AL. 2004. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews* 28(4):405-40.

26-Slozilova, I., S. Purkrtova, M. Kosova, M. Mihulova, E. Svirakova, K. Demnerova. 2014. Antilisterialactivity of lactic acid bacteria against Listeria monocytogenes strains originating from different sources. *Czech Journal of Food Sciences* 32: 145-151.

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

28-Tesfaye, A. 2014. Antagonism and primary in vitro probiotic evaluation of lactic acid bacteria recovered from Ergo. *Journal of Agricultural and Biological Science* 7: 240-245.

29-Zare Mirzaei E, E. Lashani, A. Davoodabadi. 2018. Antimicrobial properties of lactic acid bacteria isolated from traditional yogurt and milk against Shigella strains. *GMS Hygiene and Infection Control* 13: 1-5.