مجله دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران (پیاورد سلامت) دوره ۸ شماره ۳ مرداد و شهریور۱۳۹۳، ۱۹۷-۱۸۸

مطالعه‌ی تاثیر جدایه ماستی لاکتوباسیلوس پاراکازئی بر رشد و تولید انتروتوکسین استافیلوکوکوس اورئوس

دکتر مهنوش پارسایی مهر[۱]، دکتر علی میثاقی[۲]، دکتر افشین آخوندزاده[۳]
دکتر اشکان جبلی جوان[۱]، دکتر مهدی طاهری[۴]، دکتر نبی شریعتی فر[۵]

چکیده

زمینه و هدف: اثرات سودمند پروبیوتیک‌ها بر بدن، امروزه یکی از مباحث مهم دنیای علم تلقی می‌شود، لذا این مطالعه به منظور بررسی اثر ضد میکروبی سویه پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پاراکازئی جدا شده از ماست بر روی باکتری بیماری زای غذایی به نام استافیلوکوکوس اورئوس انجام گردید.

روش بررسی: در این تحقیق اثر سویه پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پاراکازئی جدا شده از ماست(1×10^{8} cfu/ml) بر رشد و تولید انتروتوکسین‌های باکتری استافیلوکوکوس اورئوس(1×10^{5} cfu/ml) مورد بررسی قرار گرفت که پس از تلقیح در محیط TSB و گرم خانه گذاری در دو دمای ۲۵ و ۳۵ درجه سانتی گراد، در زمان‌های صفر، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، از کشت مخلوط و کنترل در محیط‌های اختصاصی BP و MRS کشت داده شد و سپس با استفاده از کیت الیزای ریدا اسکرین تولید انتروتوکسین بررسی گردید. یافته‌های این تحقیق با استفاده از آنالیز واریانس و آزمون مربع کای، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

یافته‌ها: پروبیوتیک‌ها در این مطالعه، رشد استافیلوکوکوس اورئوس را نسبت به نمونه‌ی کنترل ۳ لوگ در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و ۲ لوگ در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد کاهش داد. سویه پروبیوتیکی تولید انتروتوکسین‌های A، C و E را در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و انتروتوکسین‌های نوع E و A را در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد مهار کرد.

نتیجه‌گیری: استفاده از پروبیوتیک‌ها می‌تواند راهکار جدیدی برای کنترل زیستی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بدون استفاده از آنتی بیوتیک‌ها محسوب گردد.

واژه‌های کلیدی: لاکتوباسیلوس پاراکازئی، استافیلوکوکوس اورئوس، انتروتوکسین

* نویسنده مسئول :
دکتر علی میثاقی ؛
دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران
Email : Misaghia@vetmed.ut.ac.ir

- دریافت مقاله : فروردین ۱۳۹۳ - پذیرش مقاله : تیر ۱۳۹۳

مقدمه

به کارگیری پروبیوتیکها در پیشگیری از بیماریها و بهبود وضعیت سلامتی انسان و دام پیشینه‌ای چندین ساله دارد. امروزه پروبیوتیک‌ها نه تنها به عنوان محرک رشد، بلکه برای تحریک دستگاه ایمنی و پیشگیری از ابتلا به بسیاری از بیماریها به کار گرفته می‌شوند. این مواد، میکرو ارگانیسمهای زنده‌ای هستند که به منظور جایگزینی و یا تقویت میکروارگانیسمهای مفید موجود در دستگاه گوارش

[۱] استادیار گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران
[۲] دانشیار گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
[۳] استاد گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
[۴] استادیار گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
[۵] استادیار گروه بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

موجب حفظ سلامتی یا افزایش میزان رشد دام و انسان می‌شوند(۳-۱).

بازدارنده‌های پروتئینی پروبیوتیک‌ها تحت عنوان باکتریوسین‌ها متابولیت‌های میکروبی شناخته شده‌ای هستند که به منظور حفاظت زیستی در محدوده‌ی وسیعی از محصولات لبنی و غیر لبنی در سرتاسر دنیا کاربرد یافته‌اند و نقش آنها در جلوگیری از رشد باکتری‌های مولد فساد و مسمومیت غذایی بسیار قابل توجه است که توجه خاصی را در سال‌های اخیر به خاطر کاربرد بالقوه شان در صنعت غذایی، به عنوان نگه دارنده‌های طبیعی به خود معطوف داشته‌اند. پروبیوتیک‌ها تاثیر ضد میکروبی بسیار زیادی در مقابل باکتری‌های گرم مثبت، نظیر استافیلوکوکوس اورئوس که یک باکتری بیماری زای مهم انسانی و حیوانی است و مسمومیت‌های غذایی ناشی از تولید توکسین را هم شامل می‌شود، از خود نشان می‌دهند(۶-۴).

امروزه بیش از ۱۵ انتروتوکسین استافیلوکوکی شناخته شده است که در این میان، انتروتوکسین‌های کلاسیک A،B،C،D،E نقش بیشتری در مسمومیت‌های غذایی دارند. این انتروتوکسین‌ها، اگزوپروتئین‌های مقاوم به حرارت هستند که سندرم گاستروانتریت در انسان ایجاد می‌کنند. بیشترین توکسین درگیر در مسمومیت‌های غذایی استافیلوکوکی، انتروتوکسین A است. فقدان معیارهای مناسب بهداشتی درطی آماده سازی غذا، خطر بزرگی جهت آلودگی است و مسمومیت غذایی استافیلوکوکی که اغلب مرتبط با فراورده‌های غذایی که به طور مستقیم توسط انسان دستکاری می‌شوند هستند، هنوز علت مهمی از مسمومیت‌های غذایی در سرتاسر جهان محسوب می‌شود(۹-۷).

این مطالعه، به تعیین تاثیر باکتریوستاتیکی سویه پروبیوتیکی جدا شده از ماست(لاکتوباسیلوس پاراکازئی) بر روی رشد و تولید انتروتوکسین باکتری بیماری زای غذایی مهم یعنی استافیلوکوکوس اورئوس و شناسایی هرچه بیشتر ایزوله‌های پروبیوتیکی از فراورده‌های تخمیری بومی مناطق مختلف کشور و خواص رئولوژی و تکنولوژی و استفاده از آنها به طور صنعتی جهت تولید فراورده‌های تخمیری پرداخته است.

روش بررسی

در این مطالعه اثر ایزوله‌ی باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پاراکازئی که از ماست محلی جدا شد بر روی رشد و تولید انتروتوکسین باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 29213 در محیط آبگوشت تریپتیکاز(TSB) به مدت ۳ روز در زمان‌های صفر، ۸، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، پس از کشت مورد ارزیابی قرار گرفت.

آماده سازی دز تلقیح باکتریایی

باکتری استافیلوکوکوس اورئوس از گروه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه گردید و جهت تهیه دز تلقیح به محیط آبگوشت TSB منتقل شد و به مدت ۱۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد، گرمخانه گذاری صورت گرفت. مجدداً کشت دومی از این کشت ۱۸ ساعته اول در محیط آبگوشت TSB دیگری تهیه شد و به مدت ۱۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری گردید. سپس مقادیر مختلفی از ۱۸ ساعته دوم کشت آبگوشت TSB درون لوله‌های کووت اضافه گردیده و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Milton Roy Company, USA) با طول موج ۶۰۰ نانومتر، جذب نوری لوله‌های مذکور خوانده شد. ضمناً محتویات این لوله‌ها تحت شمارش باکتریایی به روش کشت پورپلیت قرار گرفت.

جداسازی و شناسایی باکتری لاکتوباسیلوس پاراکازئی، سویه پروبیوتیکی، از ماست محلی بدین صورت انجام گرفت که بعد از کشت نمونه(ماست) در محیط mMRS و جدا کردن کلونی تک، آزمایش‌های بیوشیمیایی اختصاصی لاکتوباسیل‌ها از جمله تست کاتالاز و قندها و تحمل به اسید و صفرا انجام شد و سپس به بررسی ژنتیکی ایزوله جدا شده به روش Multiplex PCR و تعیین توالی (sequencing) ژنوم ۱۶ srRNA ایزوله مورد نظر پرداخته شد. هم چنین، دز تلقیح باکتری لاکتوباسیلوس پاراکازئی مشابه با استافیلوکوکوس اورئوس نیز تهیه گردید.

تهیه و گرمخانه گذاری کشت همزمان(مخلوط)

ابتدا در محیط آبگوشت TSB، کشت مخلوطی به طور همزمان از استافیلوکوکوس اورئوس و لاکتوباسیلوس پاراکازئی با دزهای تلقیح $۱×۱۰^{۵}$ cfu/ml و $۱×۱۰^{۸}$ cfu/ml به ترتیب تهیه گردید و سپس کشت فوق الذکر در دماهای ۲۵ و ۳۵ درجه سانتی گراد به مدت ۷۲ ساعت گرم خانه گذاری شد و در ساعت‌های صفر، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ پس از تهیه‌ی رقت و با استفاده از محیط‌های اختصاصی برد پارکرآگار BPA(برای استافیلوکوکوس اورئوس) و مان روگزا شارپ آگار MRSA(برای لاکتوباسیلوس پاراکازئی)، تعداد استافیلوکوکوس اورئوس و لاکتوباسیلوس پاراکازئی شمارش شد. سویه استافیلوکوک اورئوس بدون باکتری پروبیوتیک نیز به عنوان یک کنترل گرمخانه گذاری گردیده، هر گروه آزمایش با سه بار تکرار انجام شد.

تهیه نمونه جهت سنجش انتروتوکسین استافیلوکوکوس اورئوس:

برای بررسی توانایی انتروتوکسین زایی استافیلوکوکوس اورئوس در محیط کشت مخلوط با پروبیوتیک و کنترل از کیت الیزای ریدا اسکرین که یک آزمون الایزای ساندویچی(شرکت بیوفارم) برای تشخیص انتروتوکسین‌های A تا E در غذاهای مایع و جامد و همچنین عصاره‌ی محیط‌های کشت است، استفاده گردید.

با استفاده از فیلتر استریل یکبار مصرف، عصاره‌ی محیط مخلوط حاوی استافیلوکوکوس اورئوس و پروبیوتیک و کنترل، پس از ۷۲ ساعت به عنوان نمونه، برای بررسی حضور انتروتوکسین با استفاده از کیت تهیه شد. بدین صورت که اساس واکنش آنتی ژن – آنتی بادی، چاهک‌های H و A-E در نوارهای میکروتیتر با آنتی بادی‌های خاصی علیه انتروتوکسین‌های A، B، C، D و E استافیلوکوکوس اورئوس پوشانده شدند و چاهک‌های F و G به عنوان کنترل منفی، با آنتی بادی‌هایی که از حیوانات غیر ایمن گرفته شده بودند، پوشانده شدند. با افزودن عصاره‌ی تهیه شده از نمونه‌ها به چاهک‌های A تا G و کنترل مثبت به چاهک H، توکسین‌های موجود به آنتی بادی‌های مربوط به خود باند شدند و اجزای باقیمانده‌ی نمونه که در واکنش شرکت نکردند در مرحله شستشو حذف شدند. توکسین‌های باند شده توسط مخلوطی از آنتی بادی‌های کنژوگه شده با پراکسید تشخیص داده شدند. بخش غیر کنژوگه آنزیمی در مرحله شستشو از واکنش خارج گردید و سپس سوبسترای آنزیم(پراکسید اوره) و کروموژن (تترامتیل بنزیدین) به چاهک‌ها افزوده شده و در دمای اتاق و دور از نور نگهداری شدند. آنزیم‌های باند شده کنژوگه باعث تغییر رنگ کروموژن بی رنگ به آبی شده و سرانجام با افزودن محلول متوقف کننده آزمایش که شامل اسید سولفوریک نرمال بود واکنش پایان پذیرفت. اندازه گیری میزان جذب نور که بستگی به غلظت‌های ایجاد شده در نمونه داشت به

کمک اسکپتروفتومتر در طول موج ۴۵۰ نانومتر انجام گرفت.

شناسایی مولکولی ایزوله پروبیوتیک:

برای شناسایی ایزوله بپروبیوتیکی به روش مولکولی، استخراج DNA به روش استاندارد با به کارگیری لیزوزیم انجام شد(۱۰). استفاده از پرایمر طراحی شده از ژن *16srDNA* برای انجام واکنش PCR برای تشخیص جنس لاکتوباسیلوس مورد تایید قرار گرفت(۱۱). پرایمرهای اختصاصی جنس و 16srDNA مطابق با منابع موجود طراحی شد(۱۲). توالی پرایمرهای مورد استفاده در تشخیص جنس لاکتوباسیل‌ها که از 16srDNA طراحی شدند، عبارت بودند از

R16-1:5´-CTTGTACACACCGCCCGTCA-3´
و AGTTTC-3´ bLMA1-rev:5´-CTCAAAACTAAACAA

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با شرایط زیر انجام گرفت: دمای دناتوره شدن اولیه ۹۵ درجه سلسیوس و مدت زمان آن ۵ دقیقه بود. سپس سی سیکل، شامل ۴۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس، ۴۰ ثانیه در دمای ۵۳درجه سلسیوس، و ۴۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس انجام شد. پس از این مراحل، نمونه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به منظور تکمیل سنتز DNA نهایی نگه داشته شد. سپس جهت بدست آوردن ردیف کامل نوکلئوتیدی 16srDNA که برای رده بندی فیلوژنی باکترها به آن نیاز است، از جفت پرایمر زیر

27-F (5´-AGAGTTTGATCA/CTGGCTCAG-3´)
و(5´-AAGGAGGTGA/TTCCAA/GCC-3´) 1525-R

با شرایط تکثیر ذکر شده استفاده شد. شرایط تکثیر شامل دمای دناتوره شدن اولیه ۹۴ درجه سلسیوس و مدت زمان ۵ دقیقه و در ادامه سی و پنج چرخه شامل ۴۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس ۹۰ ثانیه در ۶۲ درجه سلسیوس و ۲ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس انجام و سپس ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به منظور تکمیل سنتز DNA اعمال شد.

با استفاده از نرم افزار SPSS ورژن ۱۵، اطلاعات حاصل از پاسخ رشد باکتریها به کمک آزمون آنالیز واریانس ANOVA و آنالیز رگرسیون و یافته‌های مربوط به سنجش انتروتوکسین باکتری مورد مطالعه با استفاده از آزمون مربع کای، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها

در این بررسی، تاثیر جدایه ماستی لاکتوباسیلوس پاراکازئی با دز تلقیح 1×10^{8} بر روی رشد و تولید انتروتوکسین باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 29213، با دز تلقیح 1×10^{5} به صورت کشت همزمان و در محیط آبگوشت TSB در زمان‌های صفر، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت و پس از کشت در دو دمای ۲۵ و ۳۵ درجه سانتی گراد انجام شد. نتایج پس از شمارش باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در محیط B.P و لاکتوباسیلوس پاراکازئی در محیط MRS در جدول ۱ و۲ ارائه شده است.

جدول۱: نتایج شمارش استافیلوکوکوس اورئوس با لاکتوباسیلوس پاراکازئی (log(cfu/ml در کشت‌های مخلوط و کنترل در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد

نوع کشت	تعداد باکتری بر حسب (log(cfu/ml			
	ساعت صفر	ساعت۲۴	ساعت ۴۸	ساعت ۷۲
استافیلوکوکوس اورئوس در کشت کنترل	۵/۳	۹/۴	۹/۵	۹/۴

استافیلوکوکوس اورئوس در کشت مخلوط با لاکتوباسیلوس پاراکازئی	۵/۰۴	۶/۲	۶/۱۸	۶/۳
لاکتوباسیلوس پاراکازئی در کشت مخلوط	۸/۲	۸/۷	۸/۸	۸/۴
لاکتوباسیلوس پاراکازئی در کشت کنترل	۸/۳	۹/۱	۹/۴	۹/۴

بر طبق نتایج جدول ۱ لاکتوباسیلوس پاراکازئی در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد در ساعت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از کشت به ترتیب ۳ لوگ و ۲ لوگ رشد استافیلوکوکوس اورئوس را نسبت به گروه کنترل کاهش داده است که این مقدار از نظر آماری معنی دار است(P<۰/۰۵).

جدول۲: نتایج شمارش استافیلوکوکوس اورئوس با لاکتوباسیلوس پاراکازئی (log(cfu/ml در کشت‌های مخلوط و کنترل در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد

نوع کشت	تعداد باکتری بر حسب (log(cfu/ml			
	ساعت صفر	ساعت۲۴	ساعت ۴۸	ساعت ۷۲
استافیلوکوکوس اورئوس در کشت کنترل	۵/۱	۸/۵	۹/۴	۹/۵
استافیلوکوکوس اورئوس در کشت مخلوط با لاکتوباسیلوس پاراکازئی	۵/۲۳	۶/۸	۷.۱	۶/۹۱
لاکتوباسیلوس پاراکازئی در کشت مخلوط	۸/۸	۸/۶	۸/۲	۸/۳
لاکتوباسیلوس پاراکازئی در کشت کنترل	۸/۸	۸/۴	۸/۳	۸/۳

بر طبق نتایج جدول ۲ لاکتوباسیلوس پاراکازئی در دمای ۲۵ و۳۵ درجه سانتی گراد در ساعت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از کشت به ترتیب ۳ لوگ و ۲ لوگ رشد استافیلوکوکوس اورئوس را نسبت به گروه کنترل کاهش داده است که این مقدار از نظر آماری معنی دار است(P<۰/۰۵). مقایسه‌ی اثر لاکتوباسیلوس پاراکازئی بر رشد استافیلوکوکوس اورئوس در دو دمای ۲۵ و ۳۵ درجه سانتی گراد نشان می‌دهد که لاکتوباسیل مورد استفاده در این مطالعه، در دمای ۲۵ درجه نسبت به دمای ۳۵ درجه دارای اثر ممانعت کنندگی برجسته‌تری بر رشد استافیلوکوکوس اورئوس داشته است.

بررسی اثر ممانعت کنندگی لاکتوباسیلوس پاراکازئی بر روی تولید انواع انتروتوکسین استافیلوکوکوس اورئوس پس از ۷۲ ساعت در دو دمای ۲۵ و ۳۵ درجه سانتی گراد نشان داد که نمونه‌ی مربوط به کنترل استافیلوکوکوس اورئوس که در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد پس از ۷۲ ساعت از نظر حضور انتروتوکسین‌های A، C و E مثبت بوده و پروبیوتیک مورد مطالعه می‌تواند در این دما، در محیط کشت مخلوط، تولید این انتروتوکسین‌ها را مهار کند. همینطور با بررسی نمونه‌ی مربوط به کنترل استافیلوکوکوس اورئوس در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد مشاهده شد که این نمونه از نظر حضور انتروتوکسین‌های A و E مثبت بود. اما در این دما لاکتوباسیلوس پاراکازئی به خوبی توانست تولید انتروتوکسین نوع E و A را مهار کند. بنابراین، بر اساس نتایج بدست آمده در این مطالعه، لاکتوباسیلوس پاراکازئی تاثیر معنی داری را در ممانعت از رشد استافیلوکوکوس اورئوس که یکی از

مهم ترین عوامل مسمومیت غذایی است، نشان داد و علاوه بر این توانست تولید انتروتوکسین‌های C، A و E را در ۳۵ درجه سانتیگراد و A و E را در ۲۵ درجه سانتیگراد مهار کند.

بحث

افزایش بیماری‌های منتقل شده از غذا همراه با مشکلات اجتماعی و اقتصادی حاصل به معنای آن است که باید کوششی مداوم برای تولید غذای سالم‌تر و توسعه‌ی عوامل ضدمیکروبی جدید به کار برد. عوارض منفی استفاده از برخی نگهدارنده‌های شیمیایی و نگرانی مصرف کننده‌ها درباره‌ی این نگهدارنده‌ها، باعث افزایش تمایلات به سمت نگه دارنده‌های طبیعی تر گردیده است. بنابراین، امروزه توجه بسیاری به سمت استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی از جمله پروبیوتیک‌ها(باکتریهای مولد اسید لاکتیک) معطوف گردیده است(۱۴و۱۳).

در این میان پروبیوتیک‌ها و باکتریوسین‌های تولیدی آن‌ها از جایگاه بخصوصی در میان دانشمندان و تولید کنندگان مواد غذایی برخوردارند. پروبیوتیک‌ها قادرند با روش‌های مختلفی از رشد و توکسین زایی پاتوژن‌های مختلف جلوگیری کنند. در مطالعات گوناگون تاثیر پروبیوتیک‌ها بخصوص لاکتوباسیل‌ها روی پاتوژن‌های مختلف بررسی شده است(۱۴). در ضمن، گزارش‌های زیادی نیز بر نقش این باکتری‌ها در پیشگیری از سرطان وجود دارد. یزدی و همکاران در مطالعه خود تاثیر ضد سرطانی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس را بر سرطان پستان نشان دادند(۱۵). بررسی‌های مختلفی در مورد اثر پروبیوتیک‌های متفاوت بر روی باکتری‌های بیماری زای مهم غذایی در محیط کشت و غذا انجام گرفته است. در پژوهش انجام شده توسط Millet و همکاران در سال ۲۰۰۷ آثار ضد میکروبی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بر لیستریا منوسیتوژن مشخص گردید(۱۶). در گزارش دیگر، Metaxopoulos و همکاران دزهای تلقیح متفاوت از استافیلوکوکوس اورئوس و لاکتوباسیل‌ها را در گوشت آزمایش کردند و به این نتیجه رسیدند که نسبت لاکتوباسیل‌ها و استافیلوکوکوس اورئوس با اثر ممانعت کنندگی لاکتوباسیل‌ها ارتباط دارد. افزون بر این، درجه حرارت هم عامل موثر در میزان اثرگذاری بیان شد(۱۷). در مطالعه حاضر هم لاکتوباسیلوس پاراکازئی در دمای ۲۵ درجه اثر ممانعت کنندگی بهتری در مقایسه با دمای ۳۷ درجه از خود نشان داد. این نتایج با مطالعه پیشین و هم چنین با نتایج پژوهش Sameshima و همکاران در سال ۱۹۹۷ مطابقت دارد. آنها تاثیر سویه‌های لاکتوباسیل جدا شده از روده(لاکتوباسیلوس رامنوسوس و اسیدوفیلوس) را در دماهای ۲۰ و ۳۵ در مقابل استافیلوکوکوس اورئوس بررسی کردند و گزارش نمودند اثر ممانعت کنندگی در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد بیشتر از ۳۵ درجه سانتیگراد است(۲۰-۱۸). علاوه بر این Salvatierra و همکاران در سال ۲۰۰۴ به بررسی اثر لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در ماست در ۲ غلظت ۱×۱۰^{۹} و ۱×۱۰^{۷} cfu/g، روی رشد استافیلوکوکوس اورئوس پرداختند و مشاهده کردند که pH و جمعیت باکتری‌های اسید لاکتیک در طول آزمایش ثابت بوده و جمعیت استافیلوکوکوس اورئوس در ماست حاوی این پروبیوتیک‌ها در هر دو غلظت طی مدت ۸ روز به سطحی غیر قابل تشخیص کاهش پیدا کرده است، اما در ماست بدون پروبیوتیک حتی پس از ۲۴ روز، باز هم استافیلوکوکوس اورئوس قابل تشخیص بود(۲۱).

Alomar و همکاران نیز تاثیر ۴ سویه لاکتوباسیلوس گاروئی، ۳ سویه لاکتوباسیلوس لاکتیس و ۱ سویه انتروکوکوس فکالیس را بر رشد استافیلوکوکس اورئوس SA15 در شیر میکروفیلتر شده بررسی و گزارش کردند تمام سویه‌های ذکر شده‌ی رشد استافیلوکوک را پس از ۶ ساعت مهار نمودند و لاکتوباسیلوس گارویه موثر ترین سویه در مهار استافیلوکوکوس اورئوس بود(۲۲).

Fandos-Gomza`lez و همکاران طی آزمایشی تاثیر سه سویه استارتر تجاری را بر رشد و تولید انتروتوکسین‌های D، C، B، A استافیلوکوکوس اورئوس بررسی کردند. رشد ۴ سویه استافیلوکوکوس اورئوس که تولید کننده ۳ نوع انتروتوکسین بودند، توسط ۳ نوع استارتر تجاری که در صنعت گوشت به کار می رفت، در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد در شرایط رشد آبگوشت، به طور نسبی مهار شد(۵).

Niskanen و Nurmi گزارش دادند که استفاده از مخلوط استارتر کشت لاکتوباسیل و میکروکوکسی، تولید انتروتوکسین A را مهار کرده ولی مانع تولید انتروتوکسین C نمی‌شود(۲۳).

در این تحقیق انتروتوکسین زایی استافیلوکوکوس اورئوس نیز تحت تاثیر قرار گرفت و میزان تولید انتروتوکسین‌های A و C و E در ۲۵ درجه و انتروتوکسین‌های A و E در ۳۵ درجه در محیط کشت همزمان استافیلوکوکوس اورئوس و سویه پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس پاراکازئی مهار گردید.

نتیجه گیری

افزایش دانسته‌ها در مورد مکانیسم‌های درگیر در برهم کنش میان اسید لاکتیک باکتری‌ها و باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، راهکار جدیدی برای کنترل زیستی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بدون استفاده از آنتی بیوتیک‌ها می‌باشد. این امر، علاوه براینکه حفظ توازن اکوسیستم‌های باکتریایی را سبب می‌شود، می‌تواند به طور قابل توجهی برای ارتقای روش‌های مواجهه جدید کنترل گسترش سویه‌های مقاوم به آنتی بیوتیک استافیلوکوکوس اورئوس را فراهم کند. با توجه به تاثیر گذاری مثبت جدایه ماستی لاکتوباسیلوس پاراکازئی بر رشد و توکسین زایی استافیلوکوکوس اورئوس و تمایل جامعه به جایگزینی نگهدارنده‌های طبیعی به جای نگهدارنده‌های شیمیایی و سنتتیک، مطالعه در زمینه‌ی استفاده‌ی ترکیبی از چندین سویه پروبیوتیک بومی جهت یافتن بهترین ترکیب پروبیوتیکی و اثر سینرژیستی آنها در مهار پاتوژن‌ها در مدلهای غذایی به خصوص در فراورده‌های تخمیری جهت کاربرد صنعتی توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

این پژوهش در دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران انجام شده است و بدین وسیله از تمام کسانی که در اجرای این تحقیق ما را یاری فرمودند سپاسگزاری می‌شود.

منابع

1. Valeur N, Engel P, Carbajal N, Connolly E & Ladefoged K. Colonization and immunomodulation by Lactobacillus reuteri ATCC 55730 in the human gastrointestinal tract. Applied Environmental Microbiology 2004; 70(2): 1176-81.

2. Alander M, Satokar R, Korpela R, Saxelin M, Vilpponen-Salmela T, Mattila-Sandholm T, et al. Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, Lactobacillus, rhamnosus GG, after oral consumption. Applied Environmental Microbiology 1999; 65(1): 351-4.

3. Del Piano M, Ballare M, Anderloni A, Carmagnola S, Montino F, Garello E, et al. In vitro sensitivity of probiotics of human gastric juice. Availiable at: http://journals.lww.com/jcge/Abstract/2008/09002/. 2006.

4. Korshunov VM, Potashnik LV, Efimov BA, Korshunova OV, Sameianov W, Gyr K, et al. Intestinal microecology of the adult population of Mongolia, Switzerland, and Russia. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol 2001; 1(1): 71-3.

5. Gomza`lez Fandos E, Otero A, Sierra M, Garci`a-Lo`pez M & Prieto M. Effect of three commercial starters on growth of Staphylococcus aureus and enterotoxins (A–D) and thermonuclease production in broth. International Journal of Food Microbiology 1994; 24(1-2): 321-7.

6. Soltan Dallal MM, Salehipour Z, Eshraghi S, Fallah Mehrabadi J & Bakhtiari R. Occurrence and molecular characterization of Staphylococcus aureus strains isolated from meat and dairy products by PCR-RFLP. Annals of Microbiology 2010; 60(2): 189-96.

7. Tatini SR, Jezeski JJ, Olson Jr JC & Casman EP. Factors influencing the production of staphylococcal enterotoxin A in milk. Journal of Dairy Science 1971; 54(3): 312-20.

8. Dinges MM, Orwin PM & Schlievert PM. Exotoxins of Staphylococcus aureus. Clinical Microbiology Review 2000; 13(1): 16-34.

9. Soltan Dallal MM, Salehipour Z & Mehrabadi JF. Molecular epidemiology of Staphylococcus aureus in food samples based on the protein A gene polymorphic region DNA sequence. Can J Microbiol 2010 Jan; 56(1): 18-21.

10. ISO. Foodstuffs-- Methods of analysis for the detection of genenetically modified organisms and derived product-nucleic acid extraction. Availiable at: http://www.iso.org/iso/catalogue _detail.htm?csnumber=34614. 2005.

11. Nour M. 16S-23S and 23S-5S intergenic spacer regions of lactobacilli: Nucleotide sequence, secondary structure and comparative analysis. Research in Microbiology 1998; 149(6): 433-48.

12. Kwon HS, Yang EH, Yeon SW, Kang BH & Kim TY. Rapid identification of probiotic Lactobacillus species by multiplex PCR using species-specific primers based on the region extending from 16S rRNA through 23S rRNA. FEMS Microbiology Letters 2004; 239(2): 267-75.

13. Smith Palmer A, Steward J & Fyfe L. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. Food Microbiology 2001; 18(4): 463-70.

14. Charlier C, Cretenet M, Even S & Le Loir Y. Interactions between Staphylococcus aureus and lactic acid bacteria: An old story with new perspectives. Int J Food Microbiol 2009; 131(1): 30-9.

15. Yazdi MH, Soltan Dallal MM, Hassan ZM, Holakuyee M, Agha Amiri S, Abolhassani M, et al. Oral administration of Lactobacillus acidophilus induces IL-12 production in spleen cell culture of BALB/c mice bearing transplanted breast tumour. British Journal of Nutrition 2010; 104(2): 227-32.

16. Millet L, Saubusse M, Didienne R, Tessier L & Montel MC. Control of Listeria monocytogenes in raw-milk cheeses. International Journal Food Microbiology 2006; 108(1): 105-14.

17. Metaxopoulos J, Genigeorgis C, Fanelli MJ, Franti C & Cosma E. Production of Italian dry salami: Effect of starter culture and chemical acidulation on staphylococcal growth in salami under commercial manufacturing conditions. Appl Environm Microbiol 1981; 42(5): 863-71.

18. Sameshima T, Magome C, Takeshita K, Arihara K, Itoh M & Kondo Y. Effect of intestinal Lactobacillus starter cultures on the behavior of Staphylococcus aureus in fermented sausage. Int J Food Microbiol 1998; 41(1): 1-7.

19. Thomas LV, Wimpenny JW & Davis JG. Effect of three preservatives on the growth of Bacillus cereus, Vero cytotoxigenic Escherichia coli and Staphylococcus aureus, on plates with gradients of pH and sodium chloride concentration. International Journal Food Microbiology 1993; 17(4): 289-301.

20. Pauli A. Antimicrobial properties of essential oil constituents. International Journal Aromatherapy 2001; 11(3): 126-33.

21. Salvatierra M, Molina A, Gamboa Mdel M & Arias ML. Evaluation of the effect of probiotic cultures on two different yogurt brands over a known population of Staphylococcus aureus and the production of thermonuclease. Arch Lationam Nutr 2004; 54(3): 298-302.

22. Alomar J, Loubiere P, Delbes C, Nouaille S & Montel MC. Effect of Lactococcus garvieae, Lactococcus lactis and Enterococcus faecalis on the behavior of Staphylococcus aureus in microfiltered milk. Food Microbiology 2008; 25(3): 502-8.

23. Niskanen A & Nurmi E. Effect of starter culture on staphylococcal enterotoxin and thermonuclease production in dry sausage. Appl Environ Microbiol 1976; 31(1): 11-20.

The Effect Of Lactobacillus Paracasei Isolated From Yoghurt On The Growth And Production Of Staphylococcus Aureus Enterotoxin

Parsaeimehr Mahnoosh[1](Ph.D) - Misaghi Ali[2](Ph.D) - Akhondzade Afshin[3](Ph.D)
Jebelli Javan Ashkan[1](Ph.D) - Taheri Mehdi[4](Ph.D) - Shariatifar Nabi[5](Ph.D)

1 Assistant Professor, Food Hygiene Department, School of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran
2 Associate Professor, Food Hygiene Department, School of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
3 Professor, Food Hygiene Department, School of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
4 Assistant Professor, Food Hygiene Department, School of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
5 Assistant Professor, Environmental Health Department, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Received : Apr 2014
Accepted : Jul 2014

Background and Aim: Probiotics are useful bacteria which, after being consumed, leave useful effects on human health. The present study was conducted to examine the antimicrobial effect of Lactobacillus paracasei on pathogenic bacteria, especially on Staphylococcus aureus in the field of food microbiology.

Materials and Methods: In this study, the effect of Lactobacillus paracasei isolated from yoghurt (1×10^8 cfu/ml) on the growth of Staphylococcus aureus (1×10^5 cfu/ml) was assessed at two different temperatures of 25 °C and 35°C in TSB. Then, samples from cocultures and control were pour plated in Baird Parker agar and MRS agar to compute the number of S. aureus and Lactobacillus paracasei at 0, 24, 48, 72 hours after incubation. Then, enterotoxin production was evaluated by ELIZA rida screen kit. The data were investigated by ANOVA and K-square (chi-square) tests.

Results: It was found that compared to controls, Lactobacillus paracasei inhibited the growth of Staphylococcus aureus and reduced the number of S. aureus cells about 3 logs in 25°C and 2 logs in 35°C. The production of A, C, and E enterotoxins was inhibited by S. aureus at a temperature of 25°C according to ELIZA rida screen test. The figure was 35°C for enterotoxins E and A.

Conclusion: Probiotics can be used as a new approach for the biocontrol of S. aureus without using antibiotics.

Key words: Lactobacillus Paracasei, Enterotoxin, Staphylococcus Aureus

*** Corresponding Author:**
Misaghi A;
E -mail:
Misaghia@vetmed.ut.ac.ir